

# **SUMO-abhängige Reaktionen auf einen persistenten DNA-Doppelstrangbruch**

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

vorgelegt von  
Diplom-Biochemiker  
Marian Kalocsay

27. Oktober 2009

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Ich habe weder anderweitig versucht, eine Dissertation einzureichen oder eine Doktorprüfung durchzuführen, noch habe ich diese Dissertation oder Teile derselben einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

München, den 27.10.2009

Promotionsgesuch eingereicht am	25.03.2009
Tag der mündlichen Prüfung	10.12.2009
Erster Gutachter	Prof. Dr. Stefan Jentsch
Zweiter Gutachter	Prof. Dr. Peter Becker





Ich möchte mich herzlich bei Stefan Jentsch bedanken, in dessen Arbeitsgruppe diese Doktorarbeit erstellt wurde. Er hat am Gelingen dieser Arbeit großen Anteil. Seine Tür steht immer offen für jegliche Unterstützung und konstruktive und begeisternde Diskussionen, die mir eine spannende, lehr- und abwechslungsreiche Doktorarbeitszeit ermöglichten.

Ich möchte mich auch bei Prof. Peter Becker besonders für die Begutachtung meiner Arbeit bedanken.

Mein großer Dank gilt auch allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Jentsch, die mir ein sehr positives Arbeitsumfeld mit stimulierenden Diskussionen und einigen tiefen Freundschaften gaben.

Bei der Boehringer-Ingelheim Stiftung möchte ich mich für die großzügige Unterstützung und Förderung ebenfalls bedanken.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern für alles, was sie während meiner Promotionszeit für mich getan haben.

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen Oktober 2001 und September 2009 unter der Anleitung von Prof. Dr. Stefan Jentsch am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

Wesentliche Teile dieser Arbeit sind in folgenden Publikationen veröffentlicht :

Jasiak, A. J., Hartmann, H., Karakasili, E., **Kalocsay, M.**, Flatley, A., Kremmer, E., Strasser, K., Martin, D. E., Söding, J. & Cramer, P. Genome-associated RNA Polymerase II Includes the Dissociable Rpb4/7 Subcomplex. *J Biol Chem* 283, 26423-7 (2008).

**Kalocsay, M.\***, Hiller, N. J.\* & Jentsch, S. Chromosome-Wide Rad51 Spreading and SUMO-H2A.Z-Dependent Chromosome Fixation in Response to a Persistent DNA Double-Strand Break. *Molecular Cell* 33, 335-43 (2009).

Experimente, die zum Zweck der Publikation von N. Hiller wiederholt wurden, sind mit Referenz <sup>1</sup> gekennzeichnet. Daten dieser Experimente wurden zur Erstellung der Abbildungen 3,7,12A&B,14C,15B verwendet.

Beobachtungen und Untersuchungen, die von N. Hiller durchgeführt wurden, sind mit Referenz <sup>2</sup> gekennzeichnet; diese sind hier nicht abgebildet.

Ergebnisse dieser Arbeit zur Rolle von H2A.Z und seiner SUMOylierung wurden bereits in aktuellen Übersichtsartikeln zitiert und diskutiert<sup>3-9</sup>.

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>3</b>
<b>DSB-Reparatur</b> .....	<b>3</b>
Rekombinationsmechanismen .....	3
Organisation von DSB-Reparatur .....	5
Rad51 und Homologiesuche .....	6
Chromatin und DSB-Reparatur .....	9
<b>Das Varianten-Histon H2A.Z</b> .....	<b>10</b>
Histon-Chaperone .....	12
Heterochromatin und <i>silencing</i> .....	13
SUMOylierung von Histonen .....	15
<b>Transkription und Elongations-Arrest</b> .....	<b>17</b>
Transkriptions-Aktivierung durch Ubiquitin .....	18
Das Ubiquitin-spezifische Chaperon Cdc48 .....	20
<b>Transkriptions-Repression durch SUMO</b> .....	<b>21</b>
<b>SUMO in der Reparatur von DSBs</b> .....	<b>22</b>
<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>24</b>
<b>Untersuchung eines definierten DNA-Doppelstrangbruchs</b> .....	<b>24</b>
H2A.Z als neuer Faktor in der DNA-Schadensantwort.....	27
Rekrutierung von H2A.Z an einen DNA-DSB.....	29
H2A.Z ist an der Reparatur von DNA-DSBs beteiligt.....	34
DNA-Resektion und <i>checkpoint</i> -Aktivierung benötigen H2A.Z .....	35
Ein persistenter DNA-DSB löst die chromosomenweite Ausbreitung von Rad51 aus .....	37
Die Geschwindigkeit der Ausbreitung von Rad51 .....	43
Rekrutierung von RPA durch einen persistenten DNA-DSB .....	45
Hürden und Grenzen der Ausbreitung von DNA-Reparaturfaktoren .....	47
Mikroskopische Untersuchung persistenter DSBs.....	48
Ein persistenter DSB relokalisiert zur Zellkern-Peripherie .....	50
H2A.Z ist für die DSB-Relokalisation notwendig .....	52
<b>H2A.Z wird durch SUMO und Ubiquitin modifiziert</b> .....	<b>55</b>

SUMOylierung von H2A.Z und DNA-Schäden .....	57
DSB-Relokalisierung benötigt die SUMOylierung von H2A.Z .....	59
<b>Neue Faktoren in der Aktivierung von Transkription .....</b>	<b>63</b>
Cdc48 lokalisiert an Bereiche hoher RNAPol II-Konzentration .....	64
Geninduktion und Transkriptions-Elongation in <i>cdc48</i> und <i>shp1</i> Mutanten .....	68
Die Bildung von ssDNA an Bereichen starker Transkription .....	72
Regulation der Transkriptions-Aktivierung durch SUMO und Ubiquitin .....	77
Suppressoren der SUMO-Inhibition in der Transkriptions-Aktivierung .....	81
Genetische Suche nach notwendigen Faktoren für die SUMO-TAD-Repression .....	85
Histon-Chaperone sind für eine effiziente SUMO-Repression notwendig .....	85
<b>DISKUSSION .....</b>	<b>88</b>
<b>Choreografie der Ereignisse auf dem gebrochenen Chromosom .....</b>	<b>88</b>
H2A.Z in der Reparatur von DSBs .....	92
Die Rolle von H2A.Z-SUMO .....	94
Das Verhalten der Rad51-Rekombinase bei Homologiesuche .....	96
<b>Repression der Transkription durch SUMO .....</b>	<b>99</b>
<b>Neue Faktoren bei der Transkriptions-Aktivierung .....</b>	<b>102</b>
Transkriptions-Elongation und mögliche neue Funktionen von Cdc48 .....	104
<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>107</b>
Hefestämme .....	107
Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> .....	107
ChIP und ChIP-on-chip .....	108
Quantitative PCR-Analysen (q-PCR) .....	111
Protein-Techniken .....	114
Roboter-basierte genetische Suche ( <i>screen</i> ) .....	116
Materialien und Rezepte .....	117
Tabelle in dieser Arbeit verwendeter Hefestämme .....	118
<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>120</b>

## Zusammenfassung

Die zelluläre Reaktion auf DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) ist von enormer Bedeutung für die Stabilität von Genomen. DSB-Reparatur erfordert die sequentielle Rekrutierung von Reparaturfaktoren zum Ort des Schadens. Fehlerfreie Reparatur von DNA-DSBs durch homologe Rekombination (HR) wird durch Rad51-abhängige Homologiesuche vermittelt. Bisher ist sehr wenig bekannt, wie Homologiesuche mechanistisch vorgeht und wie Zellen reagieren, wenn DSBs persistieren.

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass sich die Rekombinase Rad51 von einem einzelnen DNA-DSB ausgehend bidirektional ausbreitet. Dies erfolgt nach DNA-Resektion mit folgender Rekrutierung von RPA, dem Einzelstrang-DNA (ssDNA) bindenden Komplex. Persistiert der DSB, breitet sich Rad51 am gesamten geschädigten Chromosom über einen Bereich von mehreren hunderttausend Basen aus. Dabei bleibt Rad51 jedoch stets streng auf das geschädigte Chromosom beschränkt.

Rad51 breitet sich wesentlich schneller als RPA auf dem gebrochenen Chromosom aus, als bisherige Modelle zur HR annehmen. Die beobachteten chromosomenweiten Reaktionen von Rad51 lassen möglicherweise Rückschlüsse auf den Mechanismus der Homologiesuche zu.

Nicht-reparierte DNA-DSBs werden spät an der Zellkern-Peripherie fixiert. Dieser hier entdeckte Prozess erfordert das Varianten-Histon H2A.Z, seine SUMO-Modifikation und eine aktivierte DNA-Schadens-Signalkaskade (*checkpoint*). H2A.Z wird früh und transient in der Umgebung des DNA-DSB in Chromatin eingebaut und ist notwendig für effiziente DNA-Resektion und Aktivierung des *checkpoints*. Die Funktion der SUMOylierung von H2A.Z bei DSB-Fixierung ist *checkpoint*-unabhängig. Insgesamt induziert ein einzelner, persistenter DNA-DSB eine vielgestaltige zelluläre Antwort, die mit dieser bisher nicht beschriebenen Chromatin-Modifikation verknüpft ist.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit untersucht die Regulation von Transaktivatoren durch SUMO. SUMO wirkt reprimierend auf ihre Funktion.

Diese SUMO-Repression hängt mit der Struktur von Chromatin, Heterochromatin-*silencing* und mRNA-Prozessierung zusammen.

Das Ubiquitin-spezifische Chaperon Cdc48 assoziiert an Gen-Promotoren hohen Besatzes mit RNA-Polymerase II. Es wird spezifisch an induzierte Gene rekrutiert und wirkt wahrscheinlich bei der Lösung von Transkriptions-Blockaden. An stark transkribierten Bereichen wird die Bildung von ssDNA beobachtet.

# Einleitung

## ***DSB-Reparatur***

DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs), die durch ionisierende Strahlung,  $\gamma$ -Strahlung, bestimmte chemische Reaktionen und bei der Replikation der DNA entstehen, bedrohen die Stabilität genetischer Information. Werden sie nicht repariert, kann dies zu einem Verlust gebrochener Chromosomen während der Zellteilung führen. In Säugetieren steigt dadurch die Gefahr von Onkogenese. Deshalb sind präzise Mechanismen notwendig, um DSBs zu erkennen, die Zellteilung während ihrer Reparatur anzuhalten und die DNA-Schäden zu reparieren. Diese zellulären Mechanismen werden als DNA-Schadensantwort (*DNA damage response*, DDR) bezeichnet. Obwohl in wichtigen Details noch unklar, sind ihre Grundprinzipien bekannt. Wesentliche Teile der DDR wurden durch Studien der vergangenen Jahre in der Bäckerhefe als Modellorganismus aufgeklärt. Untersuchungen in höheren Eukaryonten zeigten, dass die Prinzipien der DDR und beteiligte Faktoren in vielen Fällen evolutionär konserviert sind.

## **Rekombinationsmechanismen**

Reparatur von Doppelstrangbrüchen kann im Wesentlichen durch zwei Hauptwege erfolgen: nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) und homologe Rekombination (HR). Welcher dieser beiden Hauptwege bei der Reparatur von DNA-DSBs beschritten wird, ist von der Präsenz homologer Chromosomen und dem Zellzyklus abhängig. NHEJ ist in höheren Eukaryonten der dominante Reparaturweg, in *S. cerevisiae* dominiert jedoch HR<sup>10</sup>. Durch NHEJ werden beide Enden eines DSB ligiert. Jedoch ist NHEJ potenziell fehleranfällig und somit mutagen, da durch die Aktivität von

Enzymen, die die Enden von DSBs prozessieren, Nukleotide verloren gehen können.

Fehlerfrei hingegen ist DNA-Reparatur durch homologe Rekombination (HR). Die Reparatur von DSBs durch HR erfolgt durch Kopieren von identischer oder sehr ähnlicher genetischer Information von intakten Loci. In diploiden Organismen treten diese auf doppelt vorhandenen Chromosomen oder nach erfolgter DNA-Replikation auf duplizierten Schwester-Chromosomen auf.

HR beginnt mit der Erkennung des DNA-DSB durch den MRN-Komplex (in *S. cerevisiae* MRX), der aus den Untereinheiten Mre11, Rad50 und Xrs2 besteht. MRX hat neben der Erkennung von DSBs die Funktion, beide Enden des Bruchs in räumlicher Nähe zu halten. Außerdem vermittelt MRX nukleolytische Aktivitäten, die die Bildung einzelsträngiger DNA (ssDNA) in der Umgebung des DSB initiieren. Einzelsträngige DNA wird unmittelbar von einem spezialisierten ssDNA-bindenden Komplex, dem heterotrimeren RPA-Komplex, gebunden und so vor weiterer Nukleolyse geschützt. Die gebildete einzelsträngige DNA rekrutiert zusammen mit RPA im Folgenden spezielle Kinasen, die die Zellteilung bis zur vollständigen Reparatur anhalten. Dies geschieht durch Aktivierung des DNA-Schadens-Kontrollpunkts (*DNA damage checkpoint*).

Nach gefundener Homologie und Invasion des homologen Locus' dient die gebildete Einzelstrang-DNA als Startstrang für die Synthese fehlerfrei kopierter DNA. Die Invasion homologer DNA bezeichnet man als Synapse. Dabei entsteht ein HR-Intermediat aufgeschmolzener homologer DNA, in der eindringende ssDNA mit ihrem komplementären Strang paart. Dieses Intermediat wird auch als D-Schleifenstruktur oder *D-loop* bezeichnet. Nach Synthese einer fehlerfreien Kopie der homologen Region werden abschließend die Rekombinations-Intermediate aufgelöst und die kopierte DNA an den Reparaturort eingefügt. Dies stellt das Rekombinationsereignis in der HR dar. Dabei entstehende DNA-Läsionen werden durch Ligasen verknüpft und *checkpoint*-Signale im Folgenden wieder abgeschaltet.

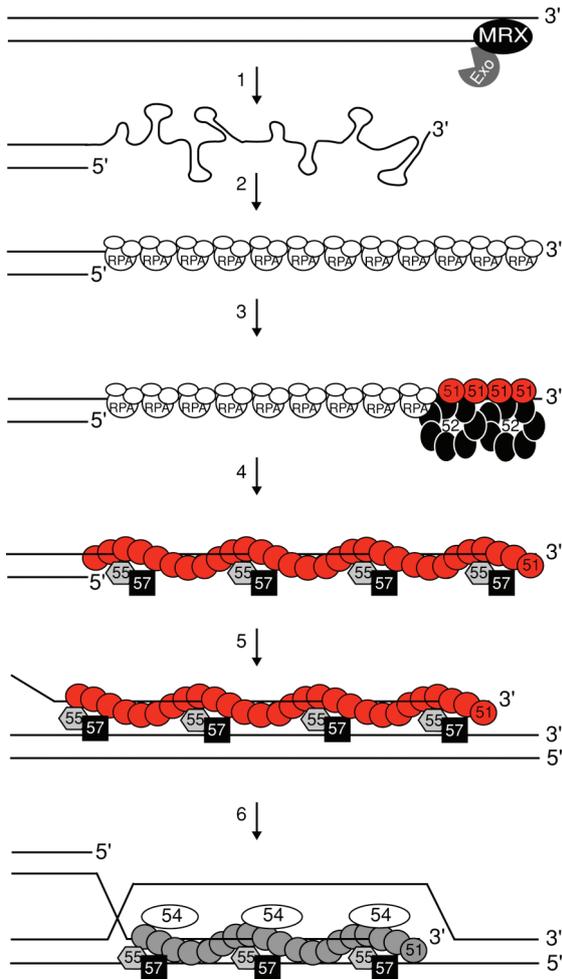


Abbildung 1 **Modell der Strang-Invasion durch Rad51 und der zeitlichen Organisation von HR.** Abgebildet ist nur eine Seite des DSB. 1) 3'-ssDNA wird durch den MRX-Komplex und 5'-3' Resektions-Exonukleasen gebildet. 2) ssDNA wird mit RPA bedeckt. 3) Rad52 (schwarz) rekrutiert Rad51 (rot) an den RPA-ssDNA-Komplex. 4) Das Rad51-Nukleoprotein-Filament wächst auf ssDNA vermittelt durch Rad55/Rad57. 5) Das Rad51-Filament lokalisiert an eine homologe DNA-Donor-Sequenz. 6) Rad54 interagiert mit Rad51, bewirkt einen Umbau des Chromatins, Aufschmelzen der DNA-Duplex und Strangpaarung zwischen Donor-DNA und dem eindringenden Rad51-Nukleoprotein-Filament. Abbildung modifiziert nach Krogh und Symington<sup>10</sup>.

In Abbildung 1 ist die Reihenfolge rekrutierter Faktoren am DSB schematisch dargestellt (Modell verändert nach Krogh und Symington<sup>10</sup>). Auf DSB-Erkennung durch MRX folgt die Bildung von ssDNA mit Rekrutierung von RPA. Im Folgenden wird RPA durch Rad51 (in rot dargestellt) ausgetauscht, bevor Reparatur durch HR eingeleitet wird.

## Organisation von DSB-Reparatur

Frühe Studien in der Bäckerhefe legten nahe, dass an DSB-Reparatur beteiligte Faktoren sukzessive zum Ort des Geschehens rekrutiert werden. An definierten DSBs kann mittels Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) die zeitliche Abfolge rekrutierter Reparaturproteine untersucht werden. Während

der Reparatur durch HR bedingt die Rekrutierung früher Faktoren die spätere Rekrutierung weiterer HR-Proteine. Bei der Reparatur von DSBs durch HR spielen Genprodukte der *RAD52*-Epistasisgruppe (*RAD50*, *RAD51*, *RAD52*, *RAD54*, *RDH54*, *RAD55*, *RAD57*, *RAD59*, *MRE11* (*RAD58*), *XRS2*) eine zentrale Rolle. Sie sind für DNA-Reparatur durch HR notwendig. Die Proteine der *RAD52*-Epistasisgruppe sind in höheren Eukaryonten hochkonserviert; Rad51, Mre11 und Rad50 sogar in Prokaryonten und Archeen. Mutanten der *RAD52*-Epistasisgruppe in *S. cerevisiae* sind gegenüber DNA-schädigenden Agenzien sensitiv<sup>11</sup>.

Mikroskopische Untersuchungen konnten eine zeitliche Abfolge an DSBs rekrutierter Proteine bestätigen. Nach Induktion von DSBs wurde beobachtet, dass sich DNA-Reparaturproteine in besonders hoher Konzentration in subnukleären Strukturen sammeln. Diese Strukturen werden als Reparaturfoci bezeichnet und kolokalisieren mit experimentell markierten DSBs. Reparaturfaktoren wie Mre11, Rad52 oder die Kinase Mec1 bilden nach Induktion von DSBs Foci. Die zeitliche Abfolge der Rekrutierung in Reparaturfoci liefert Hinweise auf eine „Choreografie“ der Ereignisse in der Reparatur von DSBs<sup>12,13</sup>.

In *S. cerevisiae* kann die subnukleäre Position von DSBs verändert werden, wenn DSBs in Reparaturfoci rekrutiert werden. Welche Rolle eine intra-nukleäre Relokalisierung von DSBs für ihre Reparatur spielt, ist Gegenstand aktueller Untersuchungen und nicht vollständig geklärt. Reparaturfoci treten auch in Säugerzellen auf, jedoch sind sie dort im Gegensatz zu *S. cerevisiae* positionsstabil, wie eine kürzliche publizierte Studie zeigt<sup>14</sup>. In Säugerzellen scheinen für die Immobilisierung von DSB-Enden verschiedene Reparaturproteine verantwortlich zu sein.

## **Rad51 und Homologiesuche**

Eine der spannendsten offenen Fragen zur DSB-Reparatur durch HR ist, wie homologe DNA-Regionen gefunden werden.

Bei der Homologiesuche spielt Rad51 eine zentrale Rolle. Rad51 ist eine Rekombinase und weist DNA-Helikaseaktivität auf. Rekombinasen wie Rad51 katalysieren die Paarung und den Austausch homologer DNA-Sequenzen in eukaryontischen Zellen. Dies geschieht über filamentöse Intermediate einzelsträngiger DNA, die präsynaptischen Filamente<sup>15</sup>. Nach der Einleitung von HR und DSB-Prozessierung durch nukleolytische Resektion werden DNA-Rad51-Nukleoprotein-Filamente mit einzelsträngiger DNA (ssDNA) gebildet. Rad51 findet sich auch in postsynaptischen Intermediaten, den *D-loops* (Abbildung 1).

Zum Mechanismus, wie Rad51-Nukleoprotein-Filamente homologe Regionen finden, gibt es unterschiedliche Hypothesen. Weitgehend unstrittig ist, dass die Identifikation von Homologie über DNA-Paarung komplementärer Sequenzen zwischen eindringender ssDNA und homologer aufgeschmolzener DNA erfolgt. Wie jedoch die Suche nach homologen Regionen erfolgt, ist nicht vollständig geklärt. Rad51-DNA-Filamente müssen zur Suche nach Homologie mit abzusuchenden Regionen in Kontakt treten. Ob diese Sondierung potenzieller Zielregionen gerichtet, d.h. durch systematisches Absuchen räumlich naher Bereiche, oder durch Zufallskontakte erfolgt, stellt zwei Hypothesen dar, die sich nicht notwendigerweise ausschließen. Zufallskontakte erfolgen statistisch wahrscheinlicher mit räumlich nahen Bereichen als mit weiter entfernten, was eine eindeutige Unterscheidung dieser beiden Möglichkeiten aus Experimentaldaten erschwert.

*In vitro* konnte die Bildung von Filamenten doppelsträngiger DNA (dsDNA) mit Rad51 nachgewiesen werden. Rad51 aus *S. cerevisiae* bildet ein rechtshändiges Rad51-Polymer auf ssDNA oder dsDNA, das sich über mehrere tausend Basen erstrecken kann und in dem die DNA in extrem gestreckter Konformation vorliegt. Eine kürzlich erschienene Studie konnte nachweisen, dass präsynaptische Rad51-Filamente in nukleosomale DNA eindringen können<sup>16</sup>.

Nach erfolgter DSB-Reparatur werden Rad51-Filamente durch die ATP-abhängige Translokase Rad54 dissoziiert und Rad51 so rezykliert. Rad54 erfüllt jedoch auch Funktionen in weiteren Schritten der HR und ist möglicherweise an der Suche von Homologie beteiligt. Hilfsproteine von

Rekombinasen, sogenannte Mediatoren, katalysieren den Austausch von RPA durch Rad51. Rad52 bindet Rad51 und ist als Mediator von zentraler Bedeutung für Homologiesuche und HR (Abbildung 1).

Rad51 lokalisiert innerhalb der ersten Stunde an induzierte DSBs und kann erst später an homologen Sequenzen detektiert werden. Strang-Invasion und synaptisches Intermediat mit Rad51 treten etwa 2 Stunden nach DSB-Bildung auf. Zu diesem Zeitpunkt ist die Suche nach Homologie normalerweise abgeschlossen. DNA-Synthese und Rekombination erfolgen dann innerhalb weniger Minuten<sup>17</sup>. Wie Rad51 jedoch mechanistisch homologe Sequenzen identifiziert, ob es systematisch Chromosomen absucht und wie Rad51 sich verhält, wenn keine Homologie vorhanden ist, sind weitgehend unbeantwortete, jedoch sehr spannende Fragen.

### **DNA-Schadens-Kontrollpunkt (*checkpoint*)**

Der Signalweg, der nach Erkennung eines DNA-Doppelstrangbruchs zum Anhalten der Zellteilung führt, wird als DNA-Schadens-Kontrollpunkt oder *DNA damage checkpoint* bezeichnet.

Die Auslösung des *checkpoints* erfolgt durch Interaktion von *checkpoint*-Kinasen mit RPA-bedeckter ssDNA. Die *checkpoint*-Kinasen Mec1 und Tel1 in der Bäckerhefe besitzen entsprechende Homologe in höheren Eukaryonten (ATR und ATM). Mec1 detektiert DNA-Schäden in Form von einzelsträngiger DNA (ssDNA) und leitet das Signal durch Phosphorylierung der transduzierenden Kinasen Rad53 und Chk1 weiter<sup>18</sup>. Rad53 gewinnt dann Auto-Phosphorylierungs-Aktivität, wird hyper-phosphoryliert und damit das Signal amplifiziert. In der Bäckerhefe genügt ein einzelner DSB, um einen etwa 12-14 Stunden währenden Zellzyklus-Arrest vor der Anaphase auszulösen. Dieser Arrest wird auch als G<sub>2</sub>/M-Arrest bezeichnet. Persistiert der DNA-Schaden weiterhin, kann die Bäckerhefe durch „Adaption“ wieder in den Zellzyklus eintreten und die Zellteilung trotz des bestehenden Schadens aufnehmen<sup>18</sup>.

Ein besonderes Zielprotein der *ATM-checkpoint*-Kinasen ist das Varianten-Histon H2AX. Tel1 wird in Hefen durch den MRX-Komplex an DNA-DSBs rekrutiert. Dort phosphoryliert Tel1 das kanonische Histon H2A an Serin 129. Dieses modifizierte Histon wird in Analogie zu höheren Eukaryonten auch als  $\gamma$ -H2AX bezeichnet. Die durch ATM induzierte Bildung von  $\gamma$ -H2AX kann sich über mehrere Kilobasen um einen einzigen induzierten DNA-DSB herum erstrecken<sup>19</sup>. Aktivierung des *checkpoints* setzt die Bildung von ssDNA voraus. Erkennung des DSB durch MRX und nachfolgende DSB-Prozessierung steuern die Auslösung des *DNA damage checkpoints*<sup>20</sup>.

## Chromatin und DSB-Reparatur

Die Erkennung von DNA-Schäden, ihre Prozessierung und schließlich ihre Reparatur finden in enger funktioneller Verbindung mit DNA-assoziierten Proteinen statt. So ist nicht nackte DNA, sondern Chromatin das natürliche Substrat für die Reparatur von Schäden. Die Struktur von Chromatin – insbesondere sind Histon-Modifikationen integraler Teil von DNA-Reparaturprozessen – und DNA-Reparatur beeinflussen sich wechselseitig wesentlich<sup>9</sup>.

In der Umgebung von DSBs werden nicht nur Histone im Chromatin phosphoryliert, sondern auch Chromatin-umbauende (remodellierende) Komplexe wie SWR1 und INO80 rekrutiert. Diese Komplexe verändern in der Umgebung von DSBs Nukleosomen in Position und Zusammensetzung.

$\gamma$ H2AX rekrutiert INO80 und SWR1 wahrscheinlich über die in beiden Komplexen enthaltene Untereinheit Arp4. *In vitro* konnte die Bindung von Arp4 an phosphorylierte H2A-Peptide demonstriert werden. INO80 und SWR1 werden nicht mehr an DSBs rekrutiert, wenn die Phospho-Akzeptorstelle von  $\gamma$ H2AX fehlt. Die Rekrutierung von SWR1 und INO80 und ihre Aktivität spielen eine wichtige Rolle für die Aktivierung des *DNA damage checkpoints*<sup>9,21,22</sup>.

In unmittelbarer Umgebung des DSB finden bei der Einleitung von HR Änderungen der Chromatin-Struktur statt. Die Bildung von einzelsträngiger DNA (ssDNA) bewirkt dort die Auflösung von Nukleosomen. Dies wird als

Histon-Verlust oder *histone-eviction* bezeichnet und ist als lokal begrenzte Chromatin-Änderung am DSB eingehend untersucht<sup>23,24</sup>.

## ***Das Varianten-Histon H2A.Z***

Nukleosomen sind Protein-DNA Einheiten, in der doppelsträngige DNA um einen Proteinkomplex aus evolutionär hochkonservierten Histon-Proteinen aufgewunden ist. Der zentrale Proteinkomplex von Nukleosomen besteht aus acht Histon-Proteinen, dem Histon-Oktamer. Das Histon-Oktamer wird aus einem zentralen (H3-H4)<sub>2</sub> Heterotetramer der Histon-Proteine H3 und H4 und je 2 flankierenden Heterodimeren der Histon-Proteine H2A und H2B gebildet. Diese das kanonische Oktamer bildenden Proteine werden als *core*-Histone bezeichnet. Zusätzlich zu diesen kanonischen Histonen verfügen Zellen über Histon-Varianten mit spezialisierten Aufgaben. Unter ihnen ist beispielsweise die Centromer-spezifische Histon H3-Variante CenH3 besonders gut untersucht. Die bekannte Anzahl von Varianten des Histons H2A umfasst die Proteine H2A.Z, H2A.X, H2A-Bbd und macroH2A.

H2A.Z ist eine evolutionär konservierte Variante des Histons H2A und ist in allen Eukaryonten zu finden. Seine Protein-Sequenz ist zwischen *Plasmodium falciparum*, dem Erreger der Malaria, *Saccharomyces cerevisiae* und *Homo sapiens* zu etwa 90% konserviert. Seine Sequenz-Identität zur Hauptform des Histons H2A des Menschen beträgt hingegen nur etwa 60%. In vielen höheren Eukaryonten ist H2A.Z essentiell, jedoch sind Deletionsmutanten von *HTZ1*, dem H2A.Z-Gen in der Bäckerhefe, lebensfähig. Unter den vielfältigen biologischen Prozessen, an denen H2A.Z beteiligt ist, sind beispielsweise Genaktivierung, Chromosomen-Segregation, Heterochromatin-*silencing* und Zellzyklus-Progression zu nennen<sup>25</sup>.

Post-translational wird H2A.Z sowohl in der Bäckerhefe als auch im Menschen an N-terminalen Lysin-Resten acetyliert. In *S. cerevisiae* findet sich acetyliertes H2A.Z in Regionen aktiver Gene. Durch massenspektrometrische Untersuchungen wurden keine post-translationalen Modifikationen von Htz1 im C-terminus detektiert<sup>26</sup>. Jedoch wurde kürzlich die C-terminale (Mono-)

Ubiquitylierung von H2A.Z in Säugerzellen beschrieben. Ubiquitylierte Spezies von H2A.Z finden sich in Heterochromatin<sup>27</sup>.

Die Struktur von Nukleosomen, in denen statt H2A das Varianten-Histon H2A.Z enthalten ist, ähnelt kanonischen Nukleosomen stark. Strukturelle Analysen sagen eine leichte Destabilisierung der Interaktion zwischen H2A.Z-H2B Dimeren und dem (H3-H4)<sub>2</sub>-Tetramer voraus, werden aber kontrovers diskutiert. Gemischte H2A-H2B/H2A.Z-H2B Nukleosomen konnten zwar *in vitro* studiert werden, wurden *in vivo* bisher jedoch nicht nachgewiesen<sup>25</sup>.

H2A.Z lokalisiert in *S. cerevisiae* auf allen Chromosomen und ist mit tausenden genomischer Loci assoziiert<sup>26,28-31</sup>. Dabei findet es sich in Promotor-Regionen von etwa 60% aller Gene<sup>29</sup>. In *htz1*- (und *swr1*-) Deletionsmutanten sind etwa 200 Gene missreguliert. Diese liegen präferentiell in subtelomeren Regionen gruppiert vor<sup>32</sup>. In *htz1*-Mutanten sind durch Sir-Proteinbesatz charakterisierte Heterochromatin-Regionen deutlich weiter über normalerweise euchromatische, benachbarte Bereiche hinaus ausgedehnt<sup>33</sup>. Daher nimmt man an, dass Htz1 in subtelomeren Regionen die Bildung von Heterochromatin begrenzt. In *Arabidopsis thaliana* schließen sich H2A.Z-Einbau und DNA-Methylierung wechselwirkend quantitativ aus<sup>34</sup>.

Die Nukleosomen-freie Region in Gen-Promotoren wird in etwa 2/3 aller Gene in *S. cerevisiae* von zwei H2A.Z-Nukleosomen flankiert<sup>30</sup>. Diese Nukleosomen-freie Region tritt in Gen-Promotoren etwa 200 Basenpaare (bp) oberhalb (in 5'-Richtung) der Translations-Startstelle gebildeter mRNA auf und umfasst etwa 150 Basenpaare. Hier befindet sich die Startstelle der Transkription<sup>35</sup>.

Bei der Induktion von Genen wird im allgemeinen ein deutlicher Verlust des Besatzes mit Htz1-Nukleosomen auf dem gesamten transkribierten Bereich beobachtet. Der Verlust von H2A.Z übersteigt den Verlust des Histons H3, der während transkriptions-induzierter Nukleosomen-Depletion zu beobachten ist. Man nimmt an, dass H2A.Z-H2B-Dimere durch SWR bei Transkriptions-Induktion depletiert werden. Detaillierte Studien zur Depletion von H2A.Z-Nukleosomen existieren allerdings nicht. Der Verlust von H2A.Z auf Genen nach Transkriptions-Induktion kann ebenfalls in höheren Eukaryonten beobachtet werden<sup>36</sup>.

## Histon-Chaperone

Histon-Chaperone sind spezialisierte Proteine, die Histone eskortieren und die Bildung von Nukleosomen begünstigen. Durch transiente Bindung erleichtern sie den geordneten Einbau von Histonen in DNA, ohne in Nukleosomen als Endprodukt enthalten zu sein<sup>37</sup>. Histon-Chaperone binden die basischen Histone bereits im Zytosol direkt nach ihrer Synthese und weisen unterschiedliche Spezifität bei der Interaktion mit H2A-H2B und H3-H4-Dimeren auf. So binden beispielsweise NAP1 und Nukleoplasmin präferentiell H2A-H2B, während N1/N2, der CAF1-Komplex, HIRA/Hir und Asf1 Spezifität gegenüber H3-H4-Dimeren aufweisen<sup>38</sup>. Histon-Chaperone erfüllen neben der *de novo* Bildung von Nukleosomen während der DNA-Replikation auch wichtige Funktionen Replikations-unabhängiger Vorgänge am Chromatin. Beispielsweise katalysieren sie den Austausch oder einen transienten Verlust von Histonen (*histone eviction*).

Asf1 wirkt bei Nukleosomen-Deassemblierung und -Reassemblierung während der Transkription an Gen-Promotoren und transkribierten Regionen. Ein weiterer Histon-Chaperon-Komplex, FACT, vermittelt den Histon-H2A-H2B-Ausbau und -Wiedereinbau während der Elongationsphase der Transkription durch RNA-Polymerase II<sup>39-41</sup>.

Der evolutionär konservierte CAF1-Komplex – abgeleitet von Chromatin Assemblierungs-Faktor 1 – begünstigt den Einbau der Histone H3 und H4 während der DNA-Replikation. Er setzt sich in *S. cerevisiae* aus den Untereinheiten Cac1, Cac2 und Cac3 zusammen, die Homologe in menschlichen Zellen besitzen. Obwohl in höheren Eukaryonten wie der Maus, *Drosophila* und *Xenopus* essentiell, können andere (H3-H4-)Histon-Chaperone in der Bäckerhefe die Funktionen des CAF1-Komplexes teilweise übernehmen, so dass dort die für CAF1 kodierenden Gene *CAC1-3* nicht essentiell sind. Während der DNA-Synthese wird die Funktion des CAF1-Komplexes durch assoziiertes Asf1 unterstützt. Asf1 (*anti silencing function 1*) wurde in der Bäckerhefe ursprünglich in einer genetischen Suche nach Überexpressions-Mutanten mit *silencing*-Defekten identifiziert.

Histon-Varianten wie H2A.Z werden durch spezifische Histon-Chaperone in Nukleosomen inkorporiert. Der aus mehreren Untereinheiten bestehende Proteinkomplex SWR katalysiert ATP-abhängig den Einbau von H2A.Z in Nukleosomen<sup>32,42,43</sup>; in *swr*-Deletionsmutanten wird H2A.Z nicht mehr in Nukleosomen inkorporiert<sup>43</sup>.

Die Gene *HIR1-3* codieren in *S. cerevisiae* für die Untereinheiten des Histon-regulatorischen Komplexes (HIR). Sie wurden als negative Regulatoren der Expression von Histon-Genen identifiziert und spielen zusammen mit *Asf1* eine positive Rolle bei positions-abhängigem Gen-*silencing*<sup>44,45</sup>. *HIR*-Gene sind wie *ASF1* in der Bäckerhefe nicht essentiell. Der HIR-Komplex erfüllt zum CAF1-Komplex teilweise redundante Funktionen, scheint jedoch zusammen mit *Asf1* im Gegensatz zu CAF1 auch den Replikations-unabhängigen Einbau von Histonen zu katalysieren<sup>46</sup>.

*HIR*- und *CAC*-Gene sind für die Etablierung und Aufrechterhaltung von Heterochromatin in der Bäckerhefe notwendig. Mutanten dieser Gene weisen synergistische Defekte beim *silencing* von Telomeren und der stillen *MAT*-Loci *HML* und *HMR* auf, wobei HIR direkte Repressor-Funktionen haben kann<sup>45,47</sup>.

## **Heterochromatin und *silencing***

Um abgelesen werden zu können, muss DNA für transkribierende Enzyme zugänglich sein. Dies geht mit einer locker verpackten, „offenen“ Struktur von Chromatin einher, die man als Euchromatin bezeichnet. Allgemein kompakteres und transkriptionell inaktives Chromatin bezeichnet man als Heterochromatin. In typischen Säugerzellen liegt etwa ein Zehntel des Genoms dauerhaft als konstitutives Heterochromatin vor. Besonders konzentriert findet es sich an den Chromosomen-Enden (Telomeren), an Centromeren (den Organisationszentren für Chromosomen-Verteilung nach ihrer Duplikation) und Transposons, repetitiven mobilen Bereichen von DNA.

All diese Bereiche sind transkriptionell inaktiv oder aktiv transkriptionell stillgelegt (*silenced*). An Transposons verhindert Heterochromatin-*silencing*,

dass diese mobilen genomischen Elemente unkontrolliert in andere Stellen des Genoms transponieren. *Silencing* durch Heterochromatin-Bildung spielt auch bei Prozessen wie der Embryonal-Entwicklung oder Zelldifferenzierung eine wichtige Rolle. Hier dürfen bestimmte Gene nur zu definierten Entwicklungsstadien aktiv sein.

In *Saccharomyces cerevisiae* ist Heterochromatin durch einen Komplex der Proteine Sir2-4 charakterisiert. Sir2 besitzt NAD<sup>+</sup>-abhängige Deacetylase-Aktivität und findet sich präferentiell an heterochromatischen Loci wie den stillen *MAT*-Loci *HML* und *HMR*, an transkriptionell inaktiven subtelomeren Regionen und dem *rDNA*-Lokus. Sir-Proteine bilden Nukleoprotein-Filamente am Chromatin, deren Ausbreitung von der enzymatischen Aktivität von Sir2 abhängt<sup>48</sup>.

Wie Heterochromatin von Euchromatin in Hefe präzise abgegrenzt wird, ist auch hinsichtlich der dabei wichtigen Rolle des Varianten-Histons H2A.Z im Detail nicht vollständig geklärt. Durch genetische Suchen konnten *silencing*-begrenzende Proteine (*silencing barrier proteins*) identifiziert werden, die bei diesem Prozess eine direkte Rolle zu spielen scheinen. Diese neuen *silencing barrier* Proteine sind jedoch wenig charakterisiert und ihr Wirkmechanismus unbekannt<sup>49</sup>.

### **Transposons in *S. cerevisiae***

Sämtliche im Genom von *S. cerevisiae* enthaltenen Transposons (*transposon yeast*, Ty) gehören der Familie der Retrotransposons an. Ty sind transponierbare DNA-Sequenzen, die über RNA-Intermediate kopiert und in andere Stellen des Genoms integriert werden können<sup>50</sup>. Die Struktur aller etwa 50 Ty ist ähnlich: zwei zentrale offene Leserahmen (*open reading frames*), die für virale Proteine kodieren, sind von bis zu mehrere hundert Basen langen Endsequenzen flankiert. Diese als LTRs (*long terminal repeats*) bezeichneten Sequenzen enthalten invertierte repetitive Abschnitte. Die flankierenden LTRs eines Transposons sind jeweils identisch in ihrer Orientierung und sehr ähnlich in ihrer Sequenz. Durch Rekombination

zwischen flankierenden LTRs kann der zentrale Teil eines Transposons verloren gehen, so dass nur ein LTR übrig bleibt. Solche einzelnen LTRs finden sich an mehreren hundert Stellen im Genom von *S. cerevisiae*.

## **SUMOylierung von Histonen**

Ubiquitin und Ubiquitin-ähnliche Proteine, zu denen neben anderen SUMO (Smt3 in der Bäckerhefe) gehört, werden nach energieabhängiger Aktivierung durch eine Kaskade von Enzymen kovalent an Lysine (K) ihrer Zielproteine verknüpft. SUMOylierung von Proteinen ist in der Bäckerhefe, Nematoden und höheren Eukaryonten lebensnotwendig. Das SUMOylierungs-System ist an vielen biologischen Prozessen wie Zellzyklus-Regulation, Genom-Stabilität, subzellulären Transport-Prozessen und der Regulation von Transkription beteiligt. Die SUMO-Modifikation von Proteinen bewirkt dabei oft eine Aktivitätsänderung durch Modulation von Protein-Protein Interaktionen<sup>51</sup>. Die SUMO-Modifikation von Histonen scheint im Gegensatz zur Ubiquitylierung nicht auf einzelne Histone beschränkt zu sein. So konnte die SUMOylierung verschiedener Säuger-Histone und in der Bäckerhefe die SUMOylierung aller vier *core*-Histone H2A, H2B, H3 und H4 nachgewiesen werden<sup>52,53</sup>.

Die SUMOylierung von Histon H4 kann in höheren Eukaryonten *Gen-silencing* durch die Rekrutierung von Histon-Deacetylasen (HDACs) und des Heterochromatin-Proteins 1 (HP1) auslösen<sup>52</sup>. In *S. cerevisiae* scheint die SUMOylierung von Histonen als Chromatin-Signal Transkription negativ zu regulieren. Mechanismen und Signaltransduktion sind jedoch weitgehend unbekannt<sup>53</sup>.

## Ubiquitylierung von Histonen

Im Gegensatz zur Verknüpfung mit Ubiquitin-Ketten (Poly-Ubiquitylierung) als Signal für proteasomalen Abbau dient die kovalente Verknüpfung eines Proteins mit einem einzelnen Ubiquitin-Rest (Mono-Ubiquitylierung) meist als Signal für die Modulation von Protein-Funktionen. Mono-Ubiquitylierung kann die Interaktion mit Ubiquitin-spezifischen Bindepartnern positiv oder durch sterische Hinderung die Bindung anderer Faktoren negativ beeinflussen.

In *S. cerevisiae* wird Histon H2B an Lysin 123 und in höheren Eukaryonten an Lysin 120 ubiquityliert<sup>54-56</sup>. Die Mono-Ubiquitylierung von Histon H2B ist für optimale Genexpression notwendig. Dies wurde an induzierbaren *GAL*-Genen in der Bäckerhefe besonders gut untersucht<sup>57,58</sup>. Die Ubiquitin-Modifikation an Histon H2B ist dabei transient und wird durch Ubiquitin-spezifische Isopeptidasen wie Ubp8 und Ubp10 wieder entfernt<sup>59-62</sup>.

Die Ubiquitin-Ligase (E3) für die (Mono-) Ubiquitylierung von Histon H2B ist Bre1/Lge1<sup>63,64</sup>. Die Deletionsmutante  $\Delta bre1$  ist zu  $\Delta htz1$  synthetisch letal. Zwischen dem Ubiquitylierungs-Weg von Histon H2B (Rad6/Bre1/Lge1) und nahezu allen Komponenten des SWR1-Komplexes besteht eine Vielzahl genetischer, synthetisch letaler Verbindungen<sup>65</sup>.

## Weitere Histon-Modifikationen

Histon-Proteine können vielfältig post-translational modifiziert werden. Spezialisierte Faktoren erkennen diese Modifikationen und können sie enzymatisch verändern. Die Histon-Modifikationen dienen als Erkennungs-Signal für Veränderungen der Chromatin-Struktur durch sie „lesende“ Enzyme. Histon-Modifikationen beeinflussen den Umbau von Chromatin und wechselwirken mit der transkriptionellen Aktivität von Genen. An transkriptionell aktiven Bereichen des Genoms sind Histone oft acetyliert. Antagonisiert wird die Acetylierung von Histonen durch Histon-Deacetylasen (HDACs).

Methylierung von Histonen kann an Arginin- oder Lysin-Resten erfolgen<sup>66,67</sup>. Die Methylierung von Histonen schließt ihre Acetylierung meist aus. Dabei können drei unterschiedliche Formen der Methyl-Modifikation am selben Lysin-Rest auftreten: mono-, di- und tri-Methylierung. Welche Funktion Histon-Methylierung erfüllt, scheint in hohem Maße (Chromatin-) Kontext-spezifisch zu sein.

Nahezu alle bekannten post-translationalen Histon-Modifikationen wie Acetylierung, Phosphorylierung, Methylierung, Ubiquitylierung und SUMOylierung sind reversibel und an der Kontrolle elementarer Prozesse wie DNA-Replikation, DNA-Reparatur, Rekombination, Transkription und RNA-Prozessierung beteiligt.

### ***Transkription und Elongations-Arrest***

Die Regulation von Transkription durch RNA-Polymerase II (RNAPol II) ist essentiell für eukaryontische Genexpression. Transkription wird durch die Rekrutierung von Präinitiations-Komplexen (PIC) aus RNAPol II und generellen Transkriptions-Faktoren durch das TATA-bindende Protein TBP an Gen-Promotoren initiiert. Nach Verlassen des Promoters geht RNAPol II in die Elongationsphase über, bei der mRNA durch Transkription des Gens verlängert wird. Während dieser Phase der Transkription wird die größte Untereinheit von RNAPol II an ihrer C-terminalen Domäne (CTD), einem großen, sich wiederholenden Heptapeptid der Sequenz YSPTSPS, phosphoryliert. Die Phosphorylierung der CTD, die hauptsächlich an den Serinen 2 und 5 (Ser2P und Ser5P) auftritt, reguliert den Übergang zwischen den verschiedenen Phasen der Transkription. Allgemein findet sich Ser5P mit Promotor-nahen Bereichen assoziiert, während in 3'-Richtung, zum Ende des Gens hin, Ser2P ansteigt. Dieses Muster der CTD Phosphorylierung ist zwischen *S. cerevisiae* und Säugern konserviert<sup>68</sup>.

Das Anhalten von RNAPol II in Promotor-nahen Bereichen (*promotor proximal pausing*, PrPP) ist ein limitierender Schritt bei der Regulation von Transkription. Bei diesem Prozess wird RNAPol II in einem Bereich von etwa

50 Nukleotiden unterhalb der Transkriptions-Startstelle angehalten. Diese angehaltene RNAPol II kann mit Hilfe des Transkriptions-Faktors TFIIS reaktiviert werden, der so eine produktive Elongation ermöglicht.

PrPP tritt sowohl an aktiven, als auch inaktiven Genen auf und stellt einen wichtigen Mechanismus der Genregulation dar. Genomweite Studien des Chromatin-Besatzes mit RNAPol II zeigen, dass die Akkumulation von RNAPol II an transkriptionell inaktiven Genen weitaus verbreiteter ist, als bisher angenommen. Das Phänomen eines hohen Besatzes inaktiver Gene mit RNAPol II wird als Schwebезustand (*poising*) bezeichnet und könnte einer schnellen Aktivierung von Transkription dienen, indem inaktive RNAPol II in eine Elongations-kompetente Form überführt wird. PrPP spielt sehr wahrscheinlich - neben der sehr gut untersuchten Neurekrutierung von RNAPol II - eine wichtige Rolle bei der schnellen Induktion von Genen. Die genauen Mechanismen der Auflösung von Elongations-Blockaden und möglicherweise neben TFIIS beteiligte Faktoren sind bisher allerdings nicht vollständig klar.

Eine weitere Form von Blockade der Transkription tritt auf, wenn RNAPol II an einer DNA-Läsion arretiert oder infolge einer Beschädigung nicht mehr funktional ist. Diese Art der Blockade von Transkription ist allerdings nicht regulatorischer Natur, sondern kann für Zellen eine ernsthafte Bedrohung darstellen. Arretierte RNAPol II blockiert die Expression betroffener Gene und die Replikation von DNA dauerhaft<sup>69</sup>. In Folge eines Schadens arretierte RNAPol II muss entfernt werden können. Dies geschieht in der Regel über einen Abbau der arretierten RNAPol II durch das Ubiquitin-Proteasom System. Während der Transkription wird elongierende RNA-Polymerase II durch die Ubiquitin-Ligase Rsp5 ubiquityliert<sup>70,71</sup>.

## **Transkriptions-Aktivierung durch Ubiquitin**

Das Ubiquitin-/Proteasom-System erfüllt bei der Regulation von Transkriptions-Faktoren wesentliche Funktionen. Es beeinflusst ihre Lokalisierung, Aktivität und Proteinstabilität direkt oder indirekt. Ein bekanntes

Beispiel für indirekte Regulation ist der Transkriptions-Faktor  $\text{Nf}\kappa\text{B}$ , dessen Inhibitor  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  durch das Ubiquitin/Proteasom-System nach inflammatorischen Stimuli abgebaut wird.

Eine Hypothese zur direkten Aktivierung von Transkriptions-Faktoren durch (Mono-) Ubiquitylierung leitet sich aus der Beobachtung ab, dass in fast allen instabilen Transkriptions-Faktoren Transaktivierungs-Domänen (TAD) mit Domänen überlappen, die proteasomalen Abbau signalisieren (Degrons). Die für eine Transkriptions-Aktivierung notwendige Ubiquitylierung einer Modell-TAD lässt vermuten, dass proteasomaler Abbau die Aktivität von TAD stimuliert. Lineare Fusion mit Ubiquitin kann die für eine Aktivierung notwendige Ubiquitylierung einer Modell-TAD ersetzen<sup>72,73</sup>.

Ubiquitylierung des Transkriptions-Faktors Gal4 stimuliert produktive Transkription. Ohne den dafür notwendigen Faktor Dsg1 werden Gal4-aktivierte Gene zwar effizient transkribiert, jedoch wird die hergestellte mRNA nicht translatiert, da sie nicht korrekt prozessiert wird. Trotz dieser Hinweise auf veränderte Prozessierung transkribierter GAL-mRNA ist jedoch ein allgemeiner Mechanismus Ubiquitin-aktivierter TAD-Funktion bisher unbekannt<sup>74</sup>.

Ein bekannter Transkriptions-Faktor in der Bäckerhefe, bei dessen Aktivierung Ubiquitylierung eine essentielle Rolle spielt, ist der Transkriptions-Faktor Spt23. In seiner inaktiven Vorläuferform (Spt23 p120) liegt er als membranständiges Transmembran-Protein des endoplasmatischen Retikulums (ER) vor. Damit er als aktiver Transkriptions-Faktor im Zellkern wirken kann, muss er mobilisiert werden. Dies geschieht nach Ubiquitylierung durch die Ubiquitin-Ligase Rsp5 und folgende proteasomale Prozessierung<sup>75</sup>. Dafür ist eine Dimerisierung von Spt23 notwendig. Die prozessierte aktive Form des Spt23-Transkriptionsfaktors (Spt23 p90) muss vom unprozessierten membranständigen Dimerisierungs-Partner gelöst werden. Dies geschieht durch den Ubiquitin-spezifischen Chaperon-Komplex Cdc48<sup>Ufd1/Npl4</sup><sup>76</sup>.

## Das Ubiquitin-spezifische Chaperon Cdc48

Komplexe des Chaperons Cdc48 können eine Mono-Ubiquitylierung erkennen und regulatorische Funktionen vermitteln. Cdc48 in *S. cerevisiae* und sein konserviertes Homolog p97 in Säugerzellen sind homohexamere ATPasen der AAA-Familie. Cdc48 erfüllt zentrale Funktionen bei der Vermittlung von Ubiquitin-Signalen. Diese Signale können Teil des Ubiquitin-Proteasom-Systems zum Protein-Abbau sein. Jedoch werden auch andere, regulatorische Funktionen von Ubiquitin durch Cdc48 und seine Kofaktoren vermittelt<sup>77,78</sup>. Die Bindung ubiquitylierter Substrate durch Cdc48 kann direkt über seine N-terminale Ubiquitin-Bindungs-Domäne (N-Domäne) oder über assoziierte Kofaktoren erfolgen<sup>79</sup>. Unter den Kofaktoren, die die Rekrutierung von Substraten von Cdc48 steuern, sind der heteromere Ufd1/Npl4-Komplex und das Protein Shp1 besonders gut untersucht. Substrat-erkennende Kofaktoren von Cdc48 enthalten spezifische Ubiquitin-Bindungs-Domänen wie beispielsweise die Ubiquitin-assoziierte Domäne (UBA) in Shp1. Die Bindung der Cdc48-Kofaktoren Ufd1/Npl4 und Shp1 scheinen sich gegenseitig auszuschließen<sup>80,81</sup>. Shp1 - p47 ist das Homologe in Säugerzellen - spielt als Kofaktor von Cdc48 eine wichtige Rolle bei homotypischer Membran-Fusion oder der post-mitotischen Fusion von Golgi-Vesikeln.

Über Funktionen von Cdc48 im Zellkern ist sehr wenig bekannt. Zwar wurde in einer kürzlich publizierten Studie eine Funktion des Cdc48-Homologen p97 in Säugern bei Inaktivierung und Extraktion der mitotischen Kontroll-Kinase Aurora B von Chromatin gezeigt<sup>82</sup>. Jedoch ist bisher ungeklärt, ob Cdc48 Chromatin-assoziiert ist, welche Funktionen es dort erfüllen könnte und ob es am Chromatin ubiquitylierte Substrate bindet.

## ***Transkriptions-Repression durch SUMO***

Die SUMO-Modifikation von Transkriptions-Faktoren und ihrer Kofaktoren bewirkt in den meisten untersuchten Fällen Repression von Transkription. Mechanistisch kann eine durch SUMOylierung veränderte Lokalisierung die biologische Aktivität von Proteinen beeinflussen. Viele untersuchte Proteine lokalisieren nach Konjugation mit SUMO in diskrete, subnukleäre Strukturen.

Ein besonders gut untersuchtes Beispiel dafür ist das humane Fusions-Protein PML-RAR. PML steht dabei für promyelocytische Leukämie und RAR für den Retinsäure-Rezeptor-Anteil des Fusions-Proteins. PML-RAR kann in Zellen, die dieses Fusions-Protein beherbergen, zur Missregulation der Transkription verschiedener Onkogene führen. Die Strukturen, in denen sich besonders hohe Konzentrationen von PML finden, werden auch als PML-Körper oder *PML-bodies* bezeichnet. Sie enthalten neben PML-RAR besonders hohe Konzentrationen weiterer SUMOylierter Proteine. Eine mechanistisch ähnliche Repression von Transkriptions-Faktoren durch Lokalisierung in *PML-bodies* nach SUMOylierung ist z.B. für Lef1<sup>83</sup>, Sp3<sup>84,85</sup> oder Jun<sup>86</sup> beobachtet worden.

Jedoch könnten SUMOylierte Transkriptions-Faktoren auch eine SUMO-spezifische Rekrutierung von Repressoren oder einen Ausschluss von Aktivatoren bewirken. Für ersteres finden sich Hinweise in zwei aktuellen Studien. Die spezifische Erkennung SUMOylierter Proteine kann durch Domänen von Interaktions-Partnern erfolgen, die SUMO nicht-kovalent binden. Diese SUMO-erkennenden Bereiche von Proteinen werden als SUMO-Interaktionsmotive (SIM) bezeichnet. In einer kürzlich erschienen Studie konnte die nicht-kovalente Bindung des LSD1/CoREST1/HDAC Korepressor-Komplexes an SUMO beobachtet werden. Für diese Bindung ist ein atypisches SIM in CoREST1 notwendig<sup>87</sup>.

In einer anderen, kürzlich erschienen Studie wurde die SUMO-spezifische Rekrutierung eines Repressions-Komplexes mit dem ATP-abhängigen Chromatin-umbauenden Enzym Mi-2 beobachtet<sup>88</sup>. Für einen Modell-Transkriptions-Faktor, ein Hybridprotein des SUMOylierten Transkriptions-Faktors Sp3 mit einer DNA-bindenden Domäne, konnte

kürzlich gezeigt werden, dass SUMO die Bildung von transkriptionell inaktivem Heterochromatin bewirkt<sup>89</sup>.

### ***SUMO in der Reparatur von DSBs***

Homologe Rekombination (HR) von repetitiven Genom-Bereichen wie dem *rDNA*-Lokus in *S. cerevisiae* muss streng reguliert werden. Innerhalb dieses Lokus', der für ribosomale RNA kodiert, führt Rekombination zum Verlust von Genen oder einer vermehrten Bildung extrachromosomaler zirkulärer *rDNA*, die in großen Mengen toxisch wirkt. Der *rDNA*-Lokus befindet sich in einer speziellen subnukleären Struktur, dem Nukleolus. Man nimmt an, dass HR innerhalb des Nukleolus' reprimiert ist. Tritt nun ein DSB im *rDNA*-Lokus auf, muss dieser aus dem Nukleolus exportiert werden, bevor DSB-Reparatur durch HR effizient stattfinden kann. Die SUMOylierung von Rad52 verhindert, dass sich innerhalb des Nukleolus' Rad52-Foci bilden; fehlende Rad52-SUMOylierung führt zu Hyper-Rekombination in *rDNA*<sup>90</sup>. Wie jedoch das SUMO-Signal an Rad52 die transiente Relokalisierung von zu reparierender *rDNA* aus dem Nukleolus heraus vermittelt und ob Rad52-SUMOylierung Rekombination aktiv verhindert, sind bisher offene Fragen. Jedoch könnte SUMO allgemeine Funktionen in der Abgrenzung subnukleärer Bereiche haben.

## Kern-Territorien

Subnukleäre Bereiche können sich funktionell unterscheiden. So wurde die präferentielle Lokalisation von Chromatin abhängig von seinem Aktivitätsstatus in sogenannte Chromosomen-Territorien oder Kern-Territorien beobachtet. Dort könnten erhöhte Konzentration von Faktoren auftreten, die zur Aufrechterhaltung eines bestimmten Chromatin-Status' notwendig sind.

Zwischen Zellkern-Innerem und der Kern-Peripherie scheinen in *S. cerevisiae* funktionelle Unterschiede zu herrschen. An der Innenseite der Zellkern-Hülle befinden sich beispielsweise etliche Faktoren des SUMOylierungs-Systems, die mit Kernporen-Komplexen assoziiert sind. SUMO-Isopeptidasen wie Ulp1 oder Slx5/Slx8, ein SUMO-spezifischer Ubiquitin-Ligase-Komplex, finden sich an Kernporen-Komplexen in besonders hoher Konzentration<sup>91-93</sup>.

Kürzlich reprimierte Gene scheinen in *S. cerevisiae* abhängig vom Varianten-Histon H2A.Z an die Kern-Peripherie zu relokalisieren<sup>94</sup>. Daher nimmt man an, dass Änderungen der subnukleären Positionen von Loci auch funktionell mit biologischen Prozessen wie Transkription zusammenhängen. Wie die intra-nukleäre Relokalisation von Loci stattfindet, welche Faktoren dabei beteiligt sind und welche funktionellen Zusammenhänge zur Struktur von Chromatin oder DNA-Reparatur bestehen, sind höchst interessante Fragen und bisher nur ansatzweise beantwortet.

# Ergebnisse

## ***Untersuchung eines definierten DNA-Doppelstrangbruchs***

Studien in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* lieferten wesentliche Erkenntnisse, wie DNA-Reparatur durch homologe Rekombination (HR) stattfindet. Eine Fülle von Faktoren, die DNA-Doppelstrangbrüche (*DNA double strand breaks* oder DNA-DSBs) erkennen, sie prozessieren und schließlich reparieren, wurden in *S. cerevisiae* durch genetische Suchen identifiziert und gruppiert. Unter ihnen befinden sich Gene der *RAD52*-Epistasisgruppe, deren Proteinprodukte unmittelbar an Homologiesuche und DNA-Reparatur beteiligt sind. Die allgemeinen Prinzipien, sowie die an HR beteiligten Faktoren sind evolutionär hochkonserviert, so dass Untersuchungen in der Bäckerhefe als Modellorganismus Grundlage für nahezu alle mechanistischen Modelle zur Reparatur von DNA-DSBs darstellen und diese bis heute entscheidend prägen.

In den 90er Jahren wurde im Labor von James Haber ein experimentelles System etabliert, das es ermöglicht, DNA-DSBs an definierten Stellen im Genom zu untersuchen. Dieses experimentelle System komplementiert Studien, in denen z.B. mittels ionisierender Strahlung DNA-Schäden an nicht näher definierten Stellen des Genoms generiert werden, und bietet den enormen Vorteil, die Rekrutierung von Reparaturfaktoren an definierte Orte von DNA-Schäden direkt verfolgen zu können. Die Pionierarbeiten und Studien mittels dieses experimentellen Systems erweisen sich bis zum heutigen Tag als unschätzbar bei der Aufklärung von Mechanismen der DNA-Reparatur<sup>13,14,17,19-21,24,95-98</sup>.

Das experimentelle System zur Untersuchung definierter DNA-DSBs macht sich eine Besonderheit von *S. cerevisiae* zunutze. Die Bäckerhefe kann durch Austausch einer Kassette von Genen im *MAT*-Lokus durch Sequenzen der Donorloci *HML* und *HMR* ihr Geschlecht (*MAT*-Typ)

wechseln. Dieser intra-chromosomale Austausch von genetischer Information wird induziert, indem die Endonuklease HO an einer einzigen Stelle im Genom, dem *MAT*-Lokus, DNA schneidet. Zwar sind auch an den Loci *HML* und *HMR* die hochspezifischen Erkennungssequenzen für HO vorhanden, jedoch sind sie aufgrund des dort vorliegenden Heterochromatins nicht zugänglich.

Um die zellulären Reaktionen auf definierte DNA-DSBs zu untersuchen, werden haploide Hefestämme verwendet, in denen ein einzelner DNA-Doppelstrangbruch (DSB) im *MAT*-Lokus generiert werden kann (Abbildung 2). Dies geschieht durch Expression der Endonuklease HO unter Kontrolle des *GAL1-10*-Promotors, der durch Galaktose aktiviert und durch Glukose reprimiert wird.

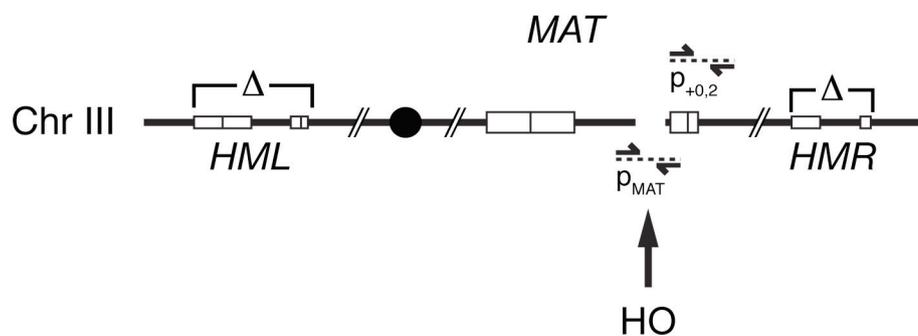


Abbildung 2 **Schematische Darstellung von Chromosom III.** Ein einzelner DNA-Doppelstrangbruch im *MAT*-Lokus wird nach Expression der Endonuklease HO gebildet. Homologieregionen sind als Kästen markiert. *HML*- und *HMR*-Homologieregionen sind im verwendeten Stamm JKM179 deletiert ( $\Delta$ ). Das Produkt des Primerpaars  $p_{MAT}$ , das den Bruch einschließt, wurde für die Analyse der DSB-Bildung benutzt. Das Primerpaar  $p_{+0,2}$  ist etwa 200 Basenpaare vom Bruch in Richtung rechtes Telomer entfernt und wurde für die Analyse der Rekrutierung von Reparaturfaktoren in ChIPs benutzt.

Der einzelne DNA-DSB induziert HR von *MAT* mit den Donorloci. Nach abgeschlossener HR ist der DSB repariert und die ursprüngliche Sequenz des *MAT*-Lokus' mit der des Donorlokus' ausgetauscht. Dabei besteht zwischen  $\alpha$ - oder  $\alpha$ -Sequenzen im *MAT*-Lokus und *HML* $\alpha$  oder *HMR* $\alpha$  Donorpräferenz für Rekombination von *MAT* $\alpha$  mit *HML* $\alpha$  und *MAT* $\alpha$  mit *HMR* $\alpha$ . Um den Vorgang gerichteter HR exklusiv zwischen zwei Loci untersuchen zu können, ist einer der beiden möglichen Donorloci deletiert. Im resultierenden Stamm

( $\Delta hmr$ ) kann nach DSB-Induktion Reparatur durch HR zwischen *MAT* und *HML* verfolgt werden. *HML* dient dabei als Donorsequenz. Dieser zur DSB-Reparatur fähige Hefestamm wird auch als donorprofizient bezeichnet. Nach etwa zwei Stunden ist die intra-chromosomale Suche nach Homologie abgeschlossen und Intermediate der Stranginvasion zwischen *MAT* und *HML* lassen sich detektieren. Das Rekombinationsereignis zwischen *MAT* und *HML* ist nach gefundener Homologie innerhalb weniger Minuten abgeschlossen und der DSB repariert.

Sind jedoch beide möglichen Donorsequenzen für Rekombination mit *MAT* deletiert ( $\Delta hml$ ,  $\Delta hmr$ ), kann der durch HO-Induktion generierte DSB nicht mehr durch HR repariert werden; er persistiert. Dieser Stamm wird als donordefizient bezeichnet (Abbildung 2).

Dieser donordefiziente Stamm erwies sich als besonders wertvoll für die Untersuchung früher Ereignisse der HR. Da sämtliche Schritte nach Identifikation der homologen Sequenz und das Rekombinationsereignis selbst blockiert sind, scheinen hier DNA-Reparaturfaktoren - insbesondere an frühen Ereignissen beteiligte Proteine - in besonders starkem Maße am DSB zu akkumulieren. In diesem Stamm können die Ereignisse vor dem eigentlichen Rekombinationsereignis untersucht werden. Wesentliche Erkenntnisse über die zeitliche Abfolge der Rekrutierung von Reparaturfaktoren - ihre „Choreografie“ -, die Bildung einzelsträngiger DNA (ssDNA) durch DNA-Resektion am induzierten DSB und die Aktivierung des *DNA damage checkpoints* wurden in donordefizienten Stämmen gewonnen<sup>13,14,17,19-21,24,95-98</sup>. Das Rekombinationsereignis selbst kann in donordefizienten Stämmen nicht stattfinden. Jedoch ist bisher trotz zahlreicher Studien unbekannt, ob im Falle persistierender DSBs Homologiesuche stattfindet und wie sich das gebrochene Chromosom selbst verhält.

Stetige Expression der HO-Endonuklease in Gegenwart von Galaktose stellt sicher, dass durch alternative Reparaturwege - beispielsweise nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) - reparierte DSBs unmittelbar wieder geschnitten werden. Persistierende DSBs führen schließlich zum Zelltod durch Chromosomen-Verlust<sup>95</sup>. Experimentell lässt sich der DSB durch quantitative PCR-Analyse (qPCR) mittels Primern, die den generierten DSB

überspannen, messen. Diese hier entwickelte Analyse ist deutlich einfacher auszuführen als bisherige Analysen, in denen die Bildung durch HO geschnittenen Produkts mittels DNA-Hybridisierung (*Southern-blotting*) nachgewiesen wurde. Die Analyse mittels qPCR liefert hochreproduzierbare Ergebnisse und ist für eine Analyse vieler Proben, die bei Vergleich verschiedener Stämme und ausgedehnter Zeitverläufe anfallen, bestens geeignet. Persistierende DSBs sind über Stunden bei konstanter Induktion von HO nachweisbar. Auch wird deutlich, dass die Induktion von DSBs synchron in nahezu der gesamten Population von Zellen stattfindet (Abbildung 3)<sup>1</sup>.

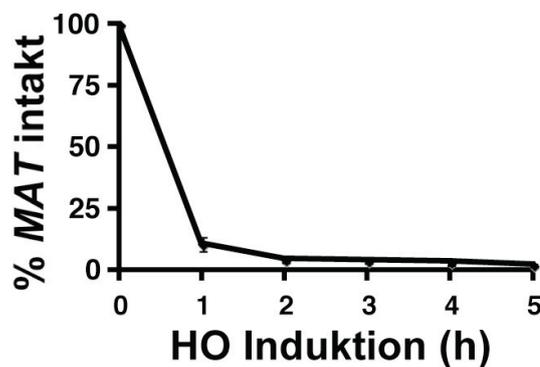


Abbildung 3 **DSB-Bildung gemessen durch quantitative PCR.** Mit dem Primerpaar  $p_{MAT}$  kann die Bildung des DSB gemessen werden. Eine kontinuierliche Expression von HO verhindert Reparatur des DSB durch NHEJ und Rekombination mit Schwester-Chromosomen. Messwerte wurden zu 100 % vor Induktion normalisiert. Fehlerbalken geben mittlere Standard-Abweichungen dreier unabhängiger Experimente an.

## H2A.Z als neuer Faktor in der DNA-Schadensantwort

Bereits ein einzelner DNA-DSB kann verheerende Folgen für die Stabilität des Genoms haben. Wird er nicht repariert, kann Duplikation der genetischen Information und fortschreitende Zellteilung den Verlust des gesamten gebrochenen Chromosoms zur Folge haben. So löst bereits ein einzelner DSB eine zelluläre Reaktion, die DNA-Schadensantwort (*DNA damage response*, DDR) aus. Diese stellt sicher, dass die Zellteilung bis zur abgeschlossenen Reparatur angehalten und die Reparatur des DSB eingeleitet wird. Dabei ist die Erkennung des DSB einer der ersten Schritte, die signalisieren, dass ein potenziell gefährlicher DNA-Schaden existiert. Die

Erkennung des DSB wird von DNA-Reparaturproteinen vermittelt, die gebrochene Enden eines DSB binden und eine Signaltransduktion zu weiteren Reparaturproteinen initiieren. Diese Erkennungsfaktoren sind die ersten detektierbaren Proteine, die spezifisch zu einem DSB rekrutiert werden. Mittels Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) lassen sich diese Proteine frühestens nach 30 Minuten an DSBs angereichert beobachten. Unter ihnen ist der MRX-Komplex bisher am besten untersucht.

Welche lokalen Änderungen ein DSB jedoch hinsichtlich der Struktur des Chromatins auslöst, ist bisher nur unzureichend beschrieben, obwohl anzunehmen ist, dass Änderungen der Chromatin-Struktur wesentliche Funktionen bei Signaltransduktion in der DDR und bei der Reparatur von DSBs erfüllen<sup>99</sup>. Einen Hinweis auf mögliche lokale Änderung der Chromatin-Struktur durch DSBs liefert die Beobachtung, dass Chromatin-modifizierende Komplexe wie der SWR1-Komplex an einen induzierten DSB rekrutiert werden. Der SWR-Komplex ist notwendig für die Inkorporation des Varianten-Histons H2A.Z in Chromatin. Trotz der beobachteten frühen Rekrutierung von SWR1 an einen DSB konnte jedoch in ChIP-Experimenten keine Anreicherung von H2A.Z - der frühesten untersuchte Zeitpunkt lag zwei Stunden nach Induktion des DSB - beobachtet werden<sup>24</sup>. Eine andere Studie berichtet von DSB-induzierter Anreicherung von H2A.Z, jedoch nur in bestimmten Mutanten von Chromatin-modifizierenden Enzymen<sup>21</sup>. Diese Befunde werden höchst kontrovers diskutiert<sup>6,24</sup>.

## **Rekrutierung von H2A.Z an einen DNA-DSB**

Die oben genannten Studien zur H2A.Z-Rekrutierung an einen DSB lagen bei Beginn dieser Arbeit allerdings nicht vor. In dieser Arbeit wurde systematisch untersucht, ob DSBs Änderungen der Chromatin-Struktur induzieren können. Es ist anzunehmen, dass ein DSB erhebliche Auswirkungen auf umgebende Nukleosomen haben kann. Nukleosomen-Umbau kann innerhalb kürzester Zeit auftreten, z.B. nach der Induktion von Genen, die innerhalb von Minuten die Zusammensetzung von Nukleosomen lokal massiv verändert. Deshalb wurden in Untersuchungen besonders auch frühe Zeitpunkte nach Induktion eines DSB analysiert.

Anhand des Chromatin-Besatzes mit H2A.Z ließen sich in dieser Arbeit bereits 15-30 Minuten nach Induktion eines einzelnen DSB deutliche Änderungen des Chromatin-Besatzes mit H2A.Z in der Umgebung des DSB detektieren. Dies trat sowohl in untersuchten donorprofizienten Stämmen, in denen Reparatur des DSB erfolgt, als auch in donordefizienten Stämmen, in denen der DSB persistiert, reproduzierbar auf. Bei Untersuchungen in donorprofizienten Stämmen wurde die Induktion der HO-Endonuklease durch Zugabe von Glukose nach einer Stunde beendet. Die beobachtete Anreicherung von H2A.Z in der Nähe des DSB ist von einer späteren Reparatur des DSB unabhängig.

In donordefizienten Stämmen ist eine deutliche Rekrutierung von H2A.Z in Umgebung des DSB bereits nach 30 Minuten deutlich zu beobachten. Diese Anreicherung tritt mithin besonders früh auf und scheint transient zu sein (Abbildung 4).

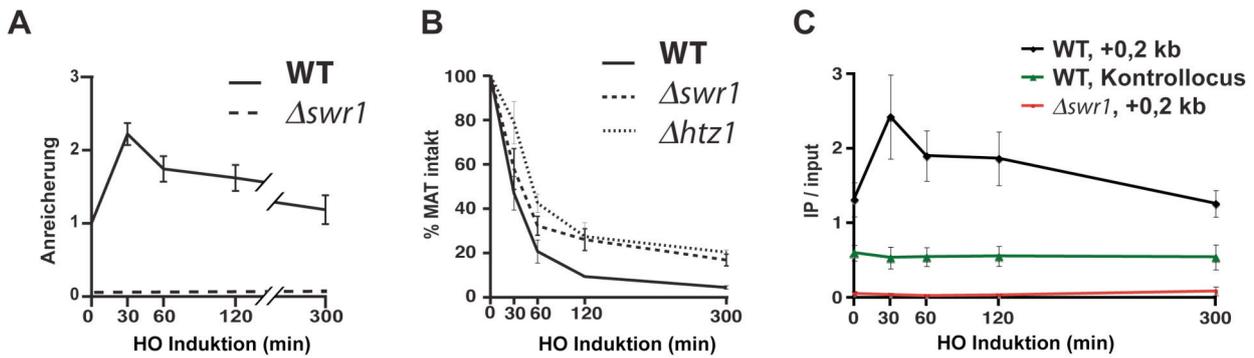


Abbildung 4 **Rekrutierung des Varianten-Histons H2A.Z an den induzierten DSB.** (A) Htz1<sup>3HA</sup> wird früh, jedoch transient an den induzierten DSB rekrutiert. Htz1<sup>3HA</sup>-gerichtete ChIP 0,2 kb entfernt vom DSB (Primerpaar p<sub>+0,2</sub>). Abgebildet sind IP/input Signale normalisiert auf 1 für den Zeitpunkt vor DSB-Induktion im WT-Stamm. In einer *swr1*-Deletionsmutante ( $\Delta swr1$ ) kann Chromatin-gebundenes Htz1 zu keinem Zeitpunkt detektiert werden. (B) DSB-Induktion durch HO-Expression in WT,  $\Delta swr1$  und  $\Delta htz1$ , analog zu Abbildung 3 gemessen. (C) Daten aus Abbildung 4 A ohne Normalisierung. H2A.Z wird nicht an einen Kontrolllokus (*MDV1*, grün) rekrutiert. In einer *swr1*-Deletionsmutante ( $\Delta swr1$ , rot) kann H2A.Z nicht am Chromatin detektiert werden. Fehlerbalken geben in allen Teilabbildungen mittlere Standard-Abweichungen für mindestens drei unabhängige Experimente an.

In einer *swr1*-Deletionsmutante ( $\Delta swr1$ ) ist allgemein kein Chromatin-gebundenes H2A.Z detektierbar. So ist, wie zu erwarten, auch die Rekrutierung von H2A.Z an den induzierten DSB abhängig von SWR1. An einem Kontrolllokus (*MDV1*) sind hingegen keine Änderungen des Chromatin-Besetzes mit H2A.Z durch HO-Induktion zu beobachten.

In *htz1*- sowie *swr1*-Deletionsmutanten werden DSBs mit leicht verringerter Effizienz gebildet (Abbildung 4 B). Um diesen Unterschied bei einem Vergleich von WT-Stämmen zu Deletionsmutanten zu berücksichtigen, wurde die gemessene Brucheffizienz in die Normalisierung einbezogen. In Abbildung 4 C sind die Primär-Daten ohne Normalisierung dargestellt.

Der beobachtete erhöhte Besatz von Chromatin mit H2A.Z in der Nähe des DSB könnte auf erhöhte *de novo* Inkorporation von H2A.Z zurückzuführen sein. Er könnte aber ebenfalls durch veränderte Umsatzraten oder verringerten Proteinabbau verursacht sein. In jedem Fall ist der nachgewiesene erhöhte Besatz von Chromatin mit H2A.Z aber ein deutlicher Hinweis auf eine lokale Änderung der Chromatin-Struktur als Reaktion auf die Bildung eines DSB.

Um den Befund erhöhten Besatzes mit H2A.Z an einem DSB zu untermauern und die Ausdehnung dieses Phänomens genau zu untersuchen, wurden im Folgenden CHIP-on-chip Analysen durchgeführt. Für diese genomweiten Analysen wurden amplifizierte DNA Fragmente aus CHIP Experimenten auf hochdichte Oligonukleotid-Matrizen, sogenannte *tiling-arrays*, hybridisiert. Diese *tiling-arrays* decken das gesamte Hefegenom ab und ermöglichen ein hochauflösendes genomweites Bild der Chromatin-Assoziation von Proteinen. Werden Datensätze zu verschiedenen Zeitpunkten eines Stimulus' miteinander verglichen, ermöglicht dies, die Änderung der Chromatin-Assoziation zu untersuchen.

### **Genomweite Lokalisation des Varianten-Histons H2A.Z**

Abbildung 5 A zeigt die CHIP-on-chip Analyse von H2A.Z auf Chromosom III im Vergleich zu unspezifischer Hintergrund-Bindung. Die mittels hochauflösender CHIP-on-chip gewonnenen Daten sind mit sehr geringen Varianzen reproduzierbar und stimmen stark mit im Verlauf dieser Arbeit publizierten Daten zweier unabhängiger Studien überein<sup>29,100</sup>.

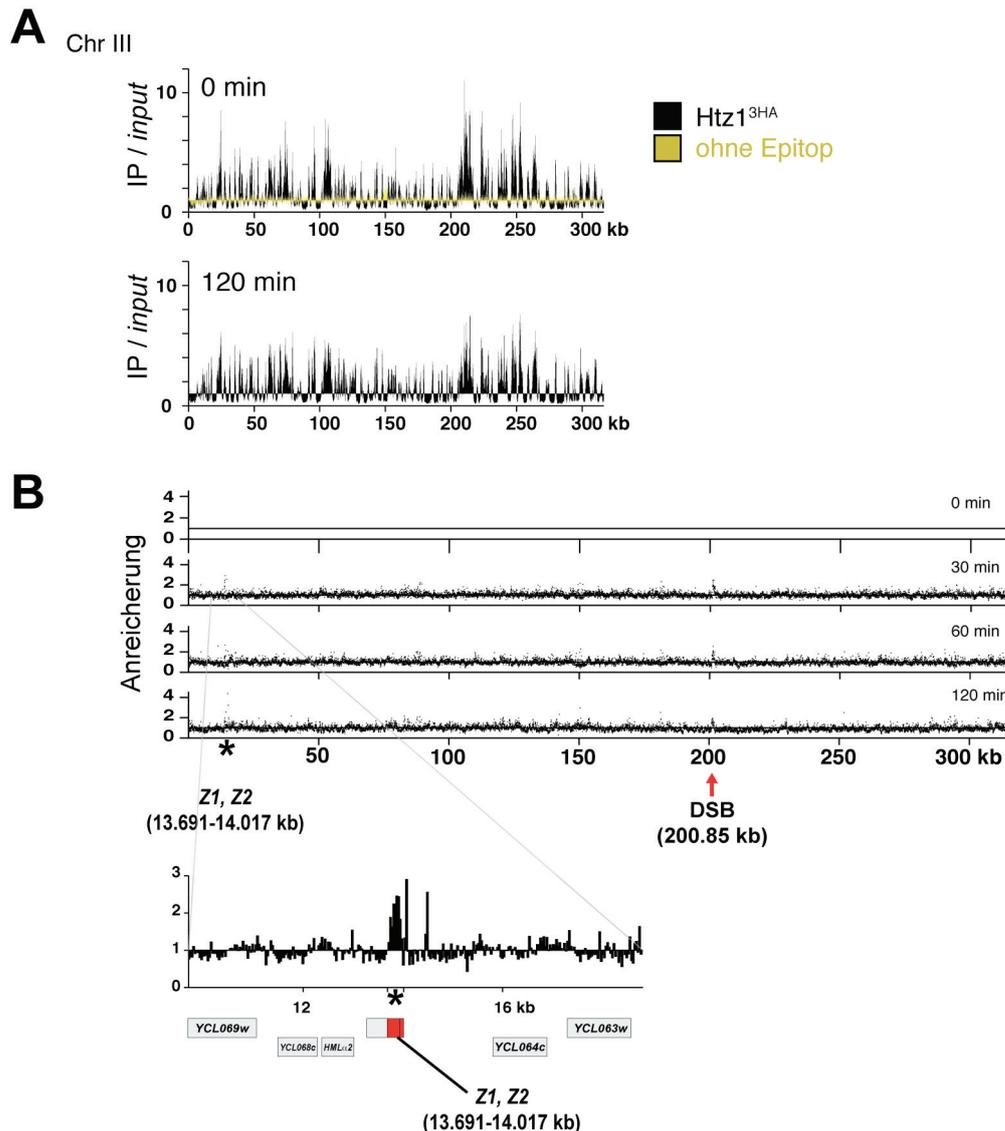


Abbildung 5 **Berechnung der relativen Anreicherung aus ChIP-on-chip Daten.** (A) *Htz1*<sup>3HA</sup> ChIP/*input* Signal (schwarz) auf Chromosom III im Vergleich zu analogen Daten aus einem Stamm, der kein Epitop-markiertes *Htz1* exprimiert (gelb). Der Besitz mit *Htz1*<sup>3HA</sup> auf Chromosom III ist vor und 120 Minuten nach Induktion der HO-Endonuklease weitgehend ähnlich. (B) Zeitaufgelöste Änderung des ChIP-on-chip Signals für H2A.Z. Abgebildet sind Daten für Chromosom III. Der Anreicherungsfaktor wurde durch Division der *IP/input* Verhältnisse zu entsprechenden Zeitpunkten durch Daten vor der Induktion berechnet. Mit einem Stern (\*, siehe auch das vergrößerte Segment) sind H2A.Z-Signaländerungen auf den Z1- und Z2-Sequenzen am *HML*-Lokus (rot) markiert. Diese sind auf der Oligonukleotid-Matrix enthalten, jedoch in den verwendeten Hefestämmen deletiert.

Die hier gezeigten Signale von H2A.Z auf Chromosom III vor und 120 Minuten nach Induktion mit Galaktose erscheinen weitgehend ähnlich, ein Kontrollversuch (gelb) liefert unkorrelierte Hintergrundsignale (Abbildung 5 A).

Um geringe Änderungen im Chromatin-Besatz mit H2A.Z zu visualisieren, wurden die erhaltenen Datensätze zu verschiedenen Induktions-Zeitpunkten auf den Datensatz ohne Induktion (0 min) normalisiert (Abbildung 5 B, Abbildung 6).

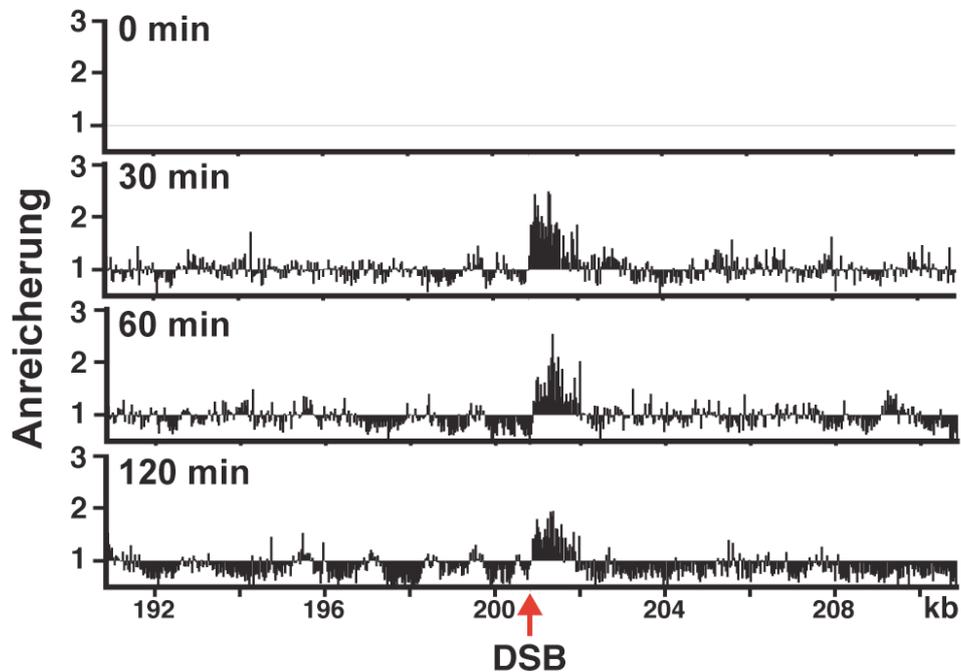


Abbildung 6 **Spezifische Rekrutierung von H2A.Z an einen induzierten DNA-DSB.** H2A.Z wird an der rechten Flanke des DSB angereichert. Htz1<sup>3HA</sup>-gerichtete ChIPs zu den angegebenen Zeitpunkten wurden amplifiziert und auf hochdichte *tiling-arrays* hybridisiert (ChIP-on-chip). Die H2A.Z-Anreicherungen (IP) wurden auf den 0 min Datensatz normalisiert. Die so erhaltene Anreicherung relativ zum Signal vor DSB-Induktion ist gegen die genomische Position auf Chromosom III um den induzierten DSB herum aufgetragen. Die Position des DSB (HO-Schnittstelle) ist durch einen roten Pfeil gekennzeichnet. Abgebildet ist eine Vergrößerung des Bereichs um die HO-Schnittstelle aus Abbildung 5 B.

Die so erhaltenen Änderungsprofile weisen eine deutliche, spezifische und frühe Rekrutierung von H2A.Z in der Nähe des induzierten DSB nach. Diese fällt über die Zeit in der Umgebung des DSB langsam ab.

Die Änderung des Chromatin-Besatzes mit H2A.Z in Umgebung des DSB ist bereits nach 30 Minuten deutlich ausgeprägt. Dabei ist auffällig, dass die beobachtete Ladung von H2A.Z präferentiell an der rechten (Centromer-distalen) Flanke des DSB auftritt und somit asymmetrisch zum DSB ist. Genau an dieser Stelle im *MAT*-Lokus befindet sich eine DNA-Sequenz, die mit entsprechenden Sequenzen im *HML* und *HMR*-Lokus identisch ist, die

sogenannte *Z1*-Homologie-Sequenz. Diese zu *HML* und *HMR* homologe Sequenz des *MAT*-Lokus' unterliegt nach Induktion des DSB der Strang-Resektion mit Bildung von ssDNA und tritt vor der Rekombination z.B. mit *HML* in die dortige *Z1*-Sequenz ein. In Stämmen, in denen *HML* und *HMR* vorhanden sind, tritt Strangresektion nur an der *Z1*- und dazu benachbarten Sequenzen asymmetrisch auf der rechten Seite des DSB auf. Fehlen hingegen *HML* und *HMR* wie in donordefizienten Stämmen, wird ssDNA an beiden Enden des DSB gebildet. Der Grund hierfür ist bisher unbekannt, jedoch deutet dies darauf hin, dass die Asymmetrie der HO-Schnittstelle aufgrund ihrer Funktion im Donor-präferierten *MAT*-Wechsel systemimmanent sein könnte<sup>97</sup>. Interessanterweise beginnt die Rekrutierung von DNA-Reparaturfaktoren wie Rad54 oder Rad51 genau an der *Z1*-Sequenz des *MAT*-Lokus', bevor sie an weiteren Stellen des gebrochenen Chromosoms III detektiert werden können<sup>13</sup>.

## **H2A.Z ist an der Reparatur von DNA-DSBs beteiligt**

Die Änderung des Chromatins am DSB durch Anreicherung von H2A.Z stellt eine sehr schnelle Reaktion auf das Ereignis des DNA-Schadens dar. Diese schnelle Änderung könnte Signalfunktion für spätere Prozesse in der DDR haben. Daher stellt sich unmittelbar die Frage, ob nachfolgende Schritte in der Prozessierung des DSB und die Aktivierung des *checkpoints* mit dieser Änderung des Chromatins zusammenhängen.

Am DNA-DSB findet Resektion mit der Bildung von Einzelstrang-DNA um die HO-Schnittstelle statt. Dies ist das notwendige Signal für die Aktivierung des DNA-Schadens-Kontrollpunkts (*checkpoint*). Wird er aktiviert, arretieren Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus' einige Stunden nach Bruch-Induktion.

## DNA-Resektion und *checkpoint*-Aktivierung benötigen H2A.Z

Die Bildung von Einzelstrang-DNA (ssDNA) kann durch einen Verlust detektierbaren DNA-Signals in der Nähe des DSB gemessen werden<sup>101</sup>. In einer *htz1*-Deletionsmutante ( $\Delta htz1$ ) scheint die Bildung von einzelsträngiger DNA im Vergleich zu WT-Zellen verzögert zu sein (Abbildung 7)<sup>1</sup>. Weitere unabhängige Experimente wie verminderte Rekrutierung von RPA,  $\gamma$ H2A.X und *Southern-blot* Analysen bestätigen die deutlich verringerte Bildung von ssDNA in der Umgebung des DSB in  $\Delta htz1$ -Mutanten<sup>2</sup>.

Die Bildung von einzelsträngiger DNA ist Voraussetzung für die Aktivierung des *DNA damage checkpoints*. Hyper-Phosphorylierung des DNA-Reparaturproteins Rad53 weist die Aktivierung des *checkpoints* nach. Tatsächlich ist die Hyper-Phosphorylierung von Rad53 in  $\Delta htz1$  und  $\Delta swr1$  Mutanten im Vergleich zu WT-Zellen deutlich vermindert. Deletionsmutanten von H2A.Z weisen ebenfalls erhöhte Sensitivität gegenüber DNA-Schäden auf<sup>2,43</sup>.

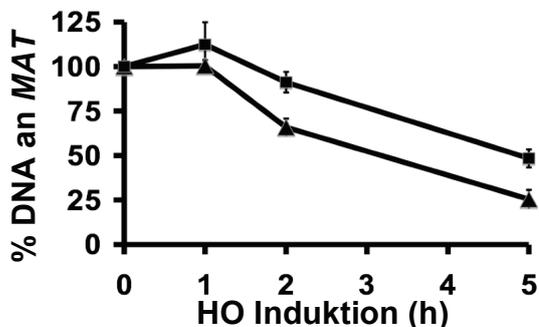


Abbildung 7 Defekt von H2A.Z-defizienten Mutanten in DNA-Resektion. H2A.Z wird für die effiziente Bildung von Einzelstrang-DNA am Doppelstrangbruch benötigt. Der Verlust von gemessenem *input*-DNA Signal kann als Indikator für die Bildung einzelsträngiger DNA an einem induzierten DNA-DSB dienen<sup>101</sup>. Abgebildet ist der Verlust von *input*-DNA Signal am *MAT*-Lokus 0,2 kb vom DSB entfernt in Wildtypstämmen (WT) und *htz*-Deletionsmutanten ( $\Delta htz1$ ). Signale wurden für den 0 h Zeitpunkt auf 1 normalisiert. Fehlerbalken geben mittlere Standard-Abweichungen dreier unabhängiger Experimente an.

Obwohl die beobachteten Unterschiede zwischen WT und *htz1*-Deletionsmutanten - verringerte ssDNA-Bildung und *checkpoint*-Aktivierung - eindeutig zu messen sind, sind sie vorsichtig zu interpretieren. H2A.Z ist zentral an der Organisation des gesamten Genoms beteiligt und spielt eine wichtige Rolle in der Transkription. So könnten die beobachteten Effekte der *HTZ1*-Deletion möglicherweise indirekt sein. Wäre die Expression von für die

untersuchten Prozesse wichtigen Genen deutlich verringert, könnte dies indirekte, pleiotrope Effekte auslösen. Auf eine direkte Funktion von H2A.Z am DSB deutet jedoch die hochspezifische Anreicherung von H2A.Z hin. Sie findet ausschließlich an der DSB-Stelle und im selben zeitlichen Rahmen statt, in dem frühe Prozesse der DDR beginnen. H2A.Z ist auf jeden Fall für eine effiziente DDR notwendig.

Zusammengefasst identifizieren diese Experimente H2A.Z und seinen Einbau in Chromatin als neuen Faktor bei der Reparatur von DNA-DSBs und deuten auf eine frühe Funktion von H2A.Z am Ort des DNA-Schadens hin.

## **Ein persistenter DNA-DSB löst die chromosomenweite Ausbreitung von Rad51 aus**

Homologiesuche ist einer der am wenigsten verstandenen Vorgänge bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen durch HR. Für Homologiesuche ist die Rekombinase Rad51 notwendig, doch wie die Homologiesuche mechanistisch stattfindet, ist bisher in wesentlichen Einzelheiten unklar.

Rad51 bildet Nukleoprotein-Filamente an ssDNA nachdem es gegen den ssDNA-bindenden Komplex RPA ausgetauscht wurde. Wenn in donorprofizienten Stämmen Reparatur des DSB durch HR beginnt, bilden sich Rad51-assoziierte Intermediate der Stranginvasion an *HML* nach etwa 2 Stunden. Zuvor kann eine Anreicherung von Rad51 in der Umgebung des DSB detektiert werden. Fehlen jedoch Donorsequenzen, bleibt die detektierbare Anreicherung von Rad51 auf Regionen um den DSB beschränkt. Diese Befunde lagen zu Beginn der vorliegenden Arbeit vor (Sugawara *et al.*, 2003<sup>17</sup>).

Zwar wurde in dieser früheren Studie die Assoziation von Rad51 auch in Abhängigkeit von der Entfernung vom induzierten DSB untersucht, jedoch kamen dafür nur einzelne, willkürlich gewählte Paare von Oligonukleotiden zum Einsatz. Die Ausbreitung von Rad51 scheint bidirektional zu erfolgen, jedoch war die präzise Länge gebildeter Rad51-Filamente bei Persistenz des DSB bislang unklar. Zudem wurden in dieser und weiteren Studien Rad51 Eptiop-markiert. Diese Rad51-Varianten scheinen aber nicht vollständig funktional zu sein, da durch diese Varianten als einzige Quelle von Rad51 deutliche Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Substanzen ausgelöst wird (S. Bergink, persönliche Mitteilung).

Bisher ist nur wenig darüber bekannt, wie sich die Rekombinations-Maschinerie verhält, wenn DSBs persistieren und ob in diesem Fall Homologiesuche weiterhin stattfindet. Wie sich die Rekombinase Rad51 in solchen Fällen verhält und welches Schicksal ein dauerhaft gebrochenes Chromosom erwartet, war zu Beginn dieser Arbeit unbeantwortet. Die zuvor etablierten ChIP-on-chip Analysen bieten die Möglichkeit, die Lokalisierung

von Rad51 und anderer DNA-Reparaturfaktoren deutlich präziser zu untersuchen als bisher möglich.

Zunächst musste jedoch für Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit ein geeigneter Antikörper gegen endogenes Rad51 identifiziert werden, der für ChIP-Experimente geeignet ist. In durchgeführten Vorstudien erwiesen sich kommerziell erhältliche polyklonale Antikörper, die durch Immunisierung gegen ein synthetisches N-terminales Peptid von Rad51 erhalten wurden, als am besten geeignet. Nach Induktion des DSB ließ sich eine deutliche Anreicherung des Signals von Rad51 am DSB in ChIP-Experimenten beobachten.

Um die Ausdehnung von Rad51-Filamenten bei persistierenden DSBs präzise messen zu können und zu überprüfen, ob sich Signal-Änderungen durch ChIP-on-chip Experimente auch ohne mathematische Normalisierung verschiedener Datensätze vergleichbar visualisieren lassen, wurden zwei ChIP-Proben von Rad51 vor und zwei Stunden nach Induktion des DSB gemeinsam auf eine Oligonukleotid-Matrix hybridisiert. Das Ergebnis dieses Pilot-Experiments war außerordentlich überraschend.

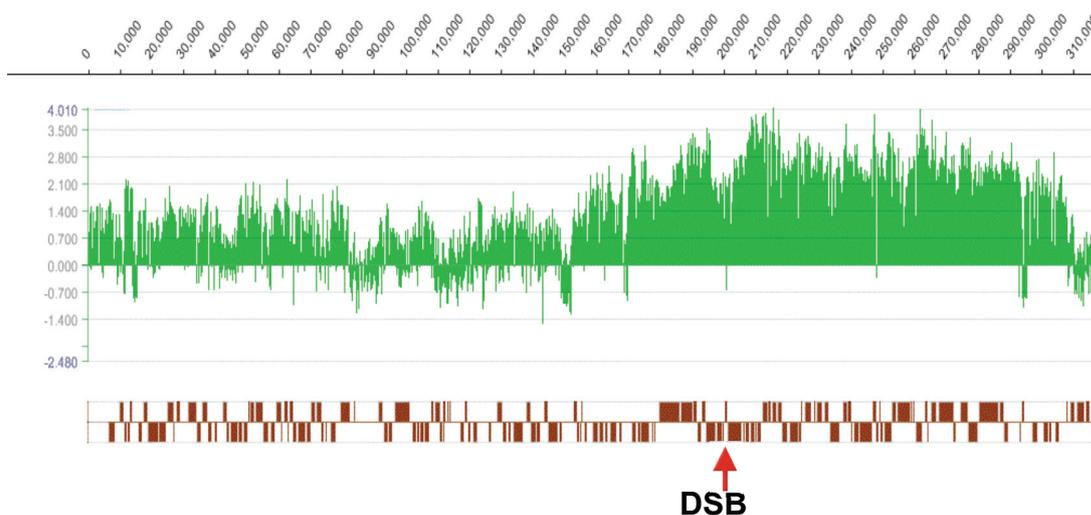


Abbildung 8 **Experimentell bestimmte Anreicherung von Rad51 auf dem gebrochenen Chromosom III.** Eine bemerkenswert starke Anreicherung von Rad51 findet sich 2 Stunden nach Induktion eines einzelnen DSB bei 201 kb über das gesamte gebrochene Chromosom ausgebreitet. Proben zweier gegen Rad51 gerichteter ChIPs vor und 2 Stunden nach Induktion des DSB wurden amplifiziert, Fluoreszenz-markiert und zusammen auf einen hochdichten *tiling array* hybridisiert (ChIP-on-chip). Die so erhaltene Anreicherung relativ zum Signal vor DSB-Induktion ist gegen die genomische Position auf Chromosom III aufgetragen. Die Position des DSB (HO-Schnittstelle) ist durch einen roten Pfeil gekennzeichnet. Gene sind als braune Kästen an ihren Positionen eingezeichnet. Gemessene Anreicherungen sind auf einer log<sub>2</sub>-Skala auf der Z-Achse dargestellt.

Die experimentell gemessene Anreicherung von Rad51 (Signal-Verhältnis der amplifizierten Rad51-ChIP Proben 2 Stunden / 0 Stunden) erstreckt sich über das gesamte gebrochene Chromosom III.

Dieses Ergebnis ist bemerkenswert, da früher angenommen wurde, dass die Rekrutierung von Rad51 nur lokal in der Nähe des DSB stattfindet. Reaktionen auf einen induzierten DSB, die das gebrochene Chromosom nahezu vollständig erfassen, waren bisher unbekannt. In Abbildung 8 wird deutlich, dass bereits 2 Stunden nach Induktion des DSB eine sehr starke Anreicherung von Rad51 auf dem gesamten gebrochenen Chromosom zu beobachten ist. Nimmt man an, dass Rad51 sich vom DSB ausgehend ausbreitet, lassen die hier gewonnenen Daten auf eine sehr hohe Geschwindigkeit der Ausbreitung von Rad51 schließen, die bisherige Annahmen deutlich übertrifft.

Über den Mechanismus, wie Rad51-Nukleoprotein-Filamente homologe Regionen identifizieren, wird kontrovers diskutiert. Lineare Suchmodi oder transiente Stoßkontakte sind zwei vorgeschlagene Mechanismen. In dieser Studie hier wird im Folgenden untersucht, ob in dem verwendeten Stamm Kontakte des mit Rad51-bedeckten DSB zu anderen Chromosomen durch ChIP-on-chip detektierbar sind. Diese könnten transiente Interaktionen des DSB während der Suche von Homologie darstellen.

Die massive, beobachtete Anreicherung von Rad51 kann in nachfolgenden Analysen bestätigt werden. Extensive Analysen zur Kinetik der Rad51-Ausbreitung sollen im Folgenden zentrale Fragen zum Verhalten der Rad51-Rekombinations-Maschinerie auf dem permanent gebrochenen Chromosom beantworten.

## **Chromosomenweite Rekrutierung von Rad51 durch einen persistenten DNA-DSB**

Rad51 ist bereits zwei Stunden nach Induktion des DSB auf Chromosom III stark angereichert. In Proben ohne DSB-Induktion kann keine Chromatin-Assoziation von Rad51 beobachtet werden. Das Signal für Rad51-Anreicherung bedeckt das gesamte Chromosom III, einen Bereich von etwa 300.000 Basen und ist somit außerordentlich weit ausgedehnt. Es reicht vom DSB in Centromer-distale Richtung (rechts) bis in die Nähe des rechten Telomers und in die andere Richtung sogar über das Centromer hinaus bis zum anderen Ende des Chromosoms. Bemerkenswerterweise weisen alle anderen Chromosomen keine erkennbar erhöhten Rad51-Signale auf (Abbildung 9). Dies lässt vermuten, dass sich das Rad51-Signal vom DSB ausgehend in beide Richtungen ausbreiten könnte. Signale von Rad51 sind ausschließlich auf das beschädigte Chromosom III begrenzt.

Einzelne, in Abbildung 9 sichtbare Signale auf anderen Chromosomen rühren von einzelnen Oligonukleotiden her. Diese Signale sind zu denen genomisch unmittelbar benachbarter Oligonukleotide unkorreliert. Um jedoch vollständig auszuschließen, dass es sich möglicherweise um messbare Assoziation von Rad51 auf anderen Chromosomen handelt, wurde die Hybridisierung identischer Proben wiederholt mit dem Ergebnis, dass Einzelsignale nun an wenigen anderen Stellen genomweit verteilt auftraten. Signale auf Chromosom III wurden jedoch unverändert stark gemessen. Die unkorrelierten vereinzelt Signale auf anderen Chromosomen sind folglich auf fehlerhafte Messwerte einzelner Oligonukleotide auf dem *tiling array* zurückzuführen.

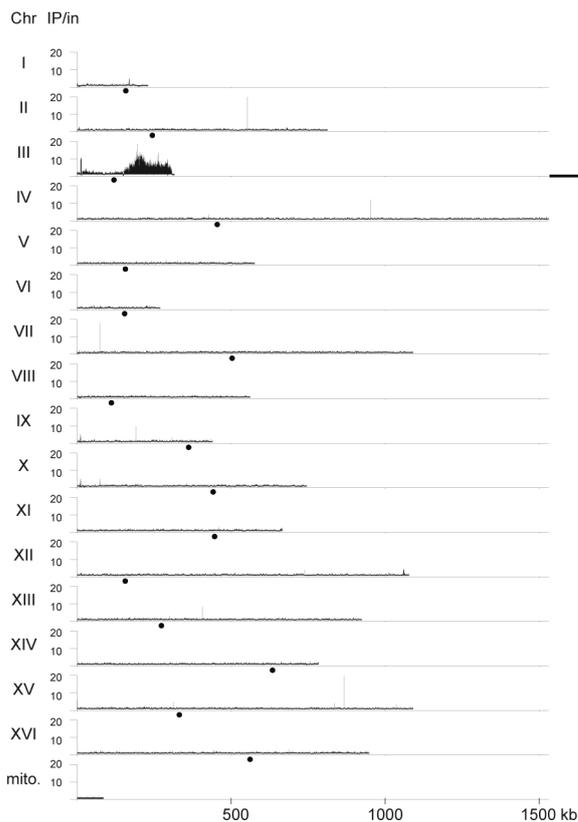
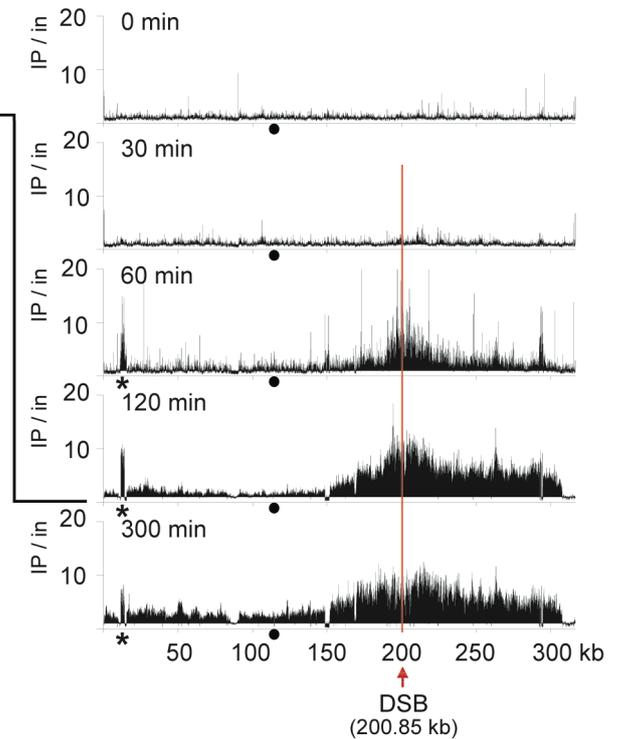
**A****B**

Abbildung 9 Die Ausbreitung von Rad51 auf dem geschädigten Chromosom. (A) Rad51-gerichtete ChIP-on-chip Analyse (genomweit) 2 Stunden nach HO-induzierter DSB-Bildung. Dargestellt sind etwa 380.000 *IP/input* Signale auf linearen Achsen an ihren relativen genomischen Positionen in kb auf jedem Chromosom. (B) Analyse analog zu A, dargestellt sind Signale auf Chromosom III zu angegebenen Zeitpunkten nach Induktion. Chromosom III ist vergrößert dargestellt, die Position des DSB bei 200,85 kb ist durch eine rote Linie markiert. Durch Sternsymbole (\*) sind Homologieregionen gekennzeichnet, die zu Signalen auf dem *array* führen, in den verwendeten Stämmen aber fehlen. In beiden Teilabbildungen sind die Positionen der Centromere durch ausgefüllte Kreise markiert.

Um die bemerkenswert ausgedehnte Anreicherung von Rad51 genauer zu untersuchen, wurden zeitaufgelöste ChIP-on-chip Analysen durchgeführt und Rad51 bis zu 5 Stunden nach Induktion des DSB untersucht. Die Ausbreitung von Rad51 scheint tatsächlich vom DSB auszugehen und bidirektional stattzufinden, bis ein Großteil des Chromosoms betroffen ist (Abbildung 9 B).

In dem verwendeten Stamm sind die Loci *HML* und *HMR* deletiert. Durch genomische Sequenzierung der verwendeten Stämme wurde überprüft, dass in  $\Delta hml$  und  $\Delta hmr$  auch die zu *MAT* identischen Homologieregionen (Z-Homologieregionen) fehlen. Jedoch sind diese homologen Sequenzen auf dem verwendeten genomweiten *DNA-array*

vorhanden. Deshalb werden detektierte Signale der Z1-Homologieregion automatisch neben *MAT* sowohl *HML* als auch *HMR* zugewiesen. Diese Signale stammen jedoch von Sequenzen der Z1-Regionen des *MAT*-Lokus' des für die ChIP-Analyse benutzten Stammes. Die Sequenzen der signalgebenden Oligonukleotide – auf der Oligonukleotid-Matrix ist das gesamte Genom in überlappende 50mere mit regelmäßigen Abständen von 32 Basen zerlegt (*tiled*) enthalten – überlappen nicht exakt. Daher können Signale, die Homologieregionen anderer Loci als *MAT* automatisch zugewiesen wurden, nicht ohne weiteres manuell umsortiert und so Signalen am *MAT*-Lokus zugerechnet werden.

Rad51 scheint sich erstaunlich schnell vom DSB ausgehend auszubreiten. Jedoch findet dies in beide Richtungen nicht gleichmäßig statt, wie die asymmetrische Verteilung beobachteter Signale um den DSB zeigt (Abbildung 9 B). Die beobachtete Geschwindigkeit, mit der sich Rad51 ausbreitet, übersteigt die angenommene Geschwindigkeit der Bildung von ssDNA, die konservativ mit etwa 4 kb (Kilobasen) pro Stunde angegeben wird, deutlich<sup>20</sup>. Dies würde bedeuten, dass die gemessene Anreicherung von Rad51 nicht auf den Bereich einzelsträngiger DNA beschränkt ist. Folglich müssten die gemessenen Signale von Rad51, die einen riesigen Bereich abdecken, auch in Regionen auftreten, in denen intakte Nukleosomen vorliegen. Dieses Verhalten ist für Rad51 als Nukleoprotein-Filamente bildendes Protein bisher nicht erwartet worden.

Die besonders große Geschwindigkeit der Ausbreitung von Rad51 ist ebenfalls ein sehr überraschender Befund. Um die Geschwindigkeit präzise abschätzen zu können, müsste ein Grenzbereich der Signalstärke willkürlich definiert werden, ab dem vom DSB ausgehend Rad51 als Chromatin-assoziiert betrachtet wird. Bis das Rad51-Signal beispielsweise das rechte Telomer des gebrochenen Chromosoms erreicht, scheint es konstant auf hohem Niveau zu bleiben. Jedoch liefern in den gemessenen Daten enthaltene Informationen eine einfache Lösung dieses Problems, die eine Abschätzung der Ausbreitungs-Geschwindigkeit von Rad51 ermöglichen.

## Die Geschwindigkeit der Ausbreitung von Rad51

Interessanterweise konnte an Chromosom XII 2 Stunden nach Induktion des DSB eine geringe Anreicherung des Signals für Rad51 beobachtet werden. Die Sequenz dieser Stelle auf Chromosom XII besitzt große Ähnlichkeit mit einer subtelomeren Sequenz auf Chromosom III. Daher führt ein Signal vom rechten Ende des Chromosoms III ebenfalls zu Signalen, die mit der entsprechenden Stelle auf Chromosom XII annotiert sind. Eine deutlich sichtbare Anreicherung dort ist zwischen den aufgenommenen Datensätzen für eine und zwei Stunden nach DSB-Induktion zu beobachten. Das Signal von Rad51 erreicht vom Bruch ausgehend das rechte Ende des Chromosoms - eine Entfernung von etwa 100 kb - spätestens nach 2 Stunden (Abbildung 10).

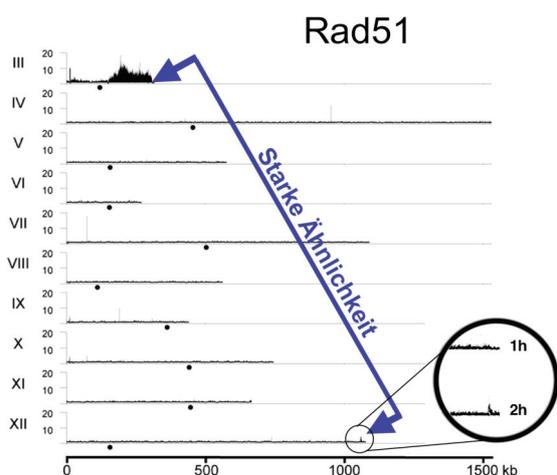


Abbildung 10 **Abschätzung der Ausbreitungs-Geschwindigkeit von Rad51 anhand ähnlicher, Telomernaher Sequenzen.** Die starke Sequenzähnlichkeit der mit blauen Pfeilen markierten Bereiche auf den Chromosomen III und XII führt zu einem missannotierten Signal auf Chr. XII in der Rad51-ChIP-on-chip Analyse. Dieses Signal tritt zwischen einer und zwei Stunden nach Induktion des DSB auf (siehe Vergrößerung). Daraus ergibt sich eine Abschätzung der Ausbreitungs-Geschwindigkeit von Rad51 von 50 kb pro Stunde.

Dies ermöglicht auch ohne Definition eines willkürlichen Schwellenwertes die Abschätzung der Geschwindigkeit von Rad51 in den ersten 2 Stunden seiner Ausbreitung auf insgesamt 50 kb pro Stunde.

Der überraschende Befund, dass ein einzelner persistenter DNA-DSB zu einer deutlichen Anreicherung von Rad51 auf dem gesamten betroffenen Chromosom führt, hat möglicherweise weitgehende Konsequenzen für das Modell von Homologiesuche. Das bisherige Modell geht aufgrund von Untersuchungen der letzten Jahre davon aus, dass Rad51 nur einen kleinen

Bereich von wenigen tausend Basen in der Umgebung des DSB besetzt. Man nimmt an, dass sich Rad51-Nukleoprotein-Filamente auf dem Bereich einzelsträngiger DNA bilden, indem zuvor dort gebundenes RPA durch die Aktion von Mediatoren wie Rad52 gegen Rad51 ausgetauscht wird. Obwohl eine kürzlich publizierte Studie nahelegt, dass Nukleosomen kein Hindernis für die Invasion durch Rad51-Nukleoprotein-Filamente darstellen<sup>16</sup>, wurde bisher angenommen, dass Rad51 ausschließlich an einzelsträngige DNA bindet. Die vorliegenden Daten lassen allerdings vermuten, dass Rad51 durchaus mit nukleosomaler, naturgemäß doppelsträngiger DNA und nicht nur mit ssDNA interagiert. Um die Geschwindigkeit von Rad51 direkt mit der Geschwindigkeit der Bildung von ssDNA vergleichen zu können, sind Experimentaldaten im selben System wünschenswert. Dafür wurden zeitaufgelöste ChIP-on-chip Experimente für Rfa1, eine Untereinheit des ssDNA-bindenden heterotrimeren RPA-Komplexes, durchgeführt.

## Rekrutierung von RPA durch einen persistenten DNA-DSB

Um den Bereich gebildeter ssDNA am induzierten DSB präzise zu bestimmen, wurde die Rekrutierung von RPA mittels zeitaufgelöster ChIP-on-chip gegen Rfa1 über mehrere Stunden analysiert. Für diese Experimente wird mit neun myc-Epitopen markiertes Rfa1-Protein exprimiert und mittels myc-spezifischer Antikörper detektiert und angereichert.

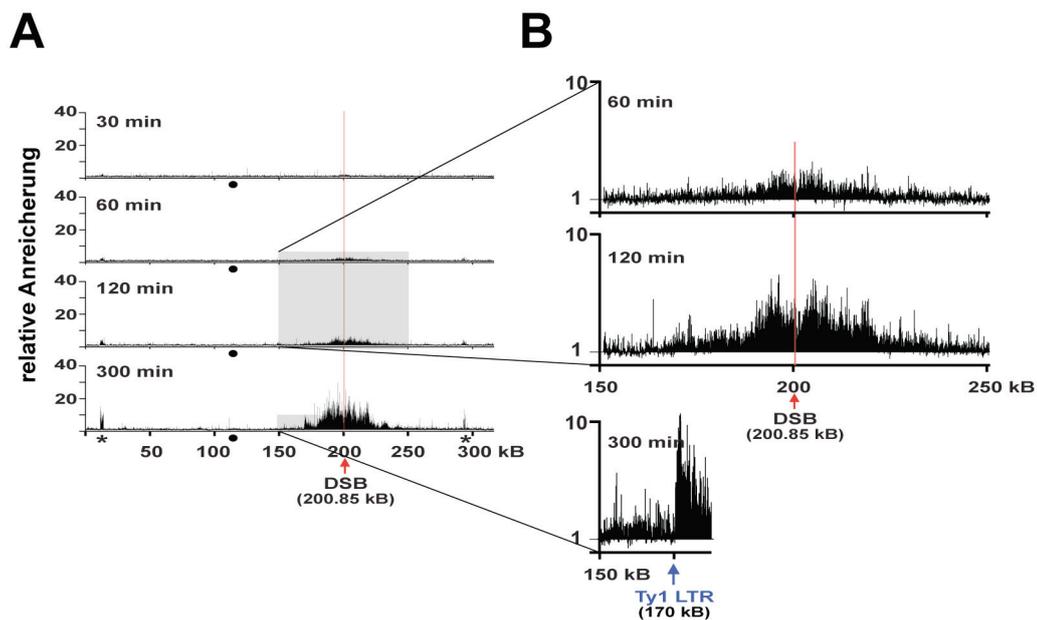


Abbildung 11 **Die Ausbreitung von RPA am induzierten DSB.** (A) Rfa1<sup>9myc</sup>-gerichtete ChIP-on-chip Analyse. Abgebildet sind Anreicherungen von Rfa1<sup>9myc</sup> auf Chromosom III. Analysen wurden für die angegebenen Zeitpunkte nach DSB-Induktion durchgeführt. Die Datensätze wurden analog zu Abbildung 5 auf den 0 min Datensatz normalisiert. Die Position des persistenten DSB ist mit einer roten Linie gekennzeichnet. Gefüllte Kreise zeigen die Position des Centromers an. (B) Vergrößerung des Bereichs um den DSB für die Zeitpunkte 60, 120 und 300 Minuten aus Abbildung 11 A. Der vergrößerte Bereich ist in Abbildung 11 A grau unterlegt. Ein blauer Pfeil markiert die Stelle des Ty-1 LTR YCRW $\delta$ 11 bei 170 kb.

300 Minuten nach DSB-Induktion ist eine Anreicherung von RPA über einen Bereich von etwa 70 kb detektierbar (Abbildung 11 A). Die gemessene Anreicherung von RPA scheint sich anfänglich bidirektional symmetrisch vom DSB ausgehend auszubreiten, was darauf hindeutet, dass DNA-Resektion in beide Richtungen vom DSB mit gleicher Geschwindigkeit beginnt.

Ein direkter Vergleich der Ausbreitungs-Geschwindigkeit von RPA und Rad51 ergibt Übereinstimmung innerhalb der ersten Stunde nach DSB-Induktion. Diese Abschätzungen wurden visuell vorgenommen. 60 Minuten nach DSB-Induktion sind RPA und Rad51 in einem Bereich von etwa 10 kb um den DSB herum deutlich angereichert (Abbildungen 9 B und 11 B).

Rfa1 findet sich nach 2 Stunden stark angereichert nur in einem Bereich über 10-15 kb links (Centromer-proximal) und etwa 25 kb rechts (Centromer-distal) vom Bruch (Abbildung 11 B). Dies deutet auf eine bidirektional asymmetrische Ausbreitungs-Geschwindigkeiten von RPA zu späteren Zeitpunkten hin. Relativ zur Position des DSB überholt das Rad51-Signal das von RPA innerhalb der zweiten Stunde nach DSB-Induktion, bis es das rechte Chromosomen-Ende erreicht. Die Geschwindigkeit von Rad51 ( $\sim 50$  kb / Stunde) liegt damit um eine Größenordnung höher, als dies für die Bildung einzelsträngiger DNA berechnet wurde ( $\sim 4-5$  kb / Stunde<sup>20</sup>).

Dies legt nahe, dass sich die Ausbreitung des Rad51-Signals zumindest zu späten Zeitpunkten ( $>1$  Stunde nach DSB-Bildung) nicht auf den Bereich einzelsträngiger DNA (ssDNA) beschränkt, möglicherweise aber in einem Bereich beginnt, in dem sich gleichzeitig eine deutliche Anreicherung von RPA findet. Dies entspräche dem Modell der Rad51-Ladung an ssDNA-Bereichen. Jedoch ist RPA auch Stunden nach der Ladung von Rad51 stark angereichert, so dass ein möglicher Austausch von RPA gegen Rad51 wahrscheinlich nicht vollständig ist.

Aus den vorliegenden Daten kann als Ursache für das beobachtete asymmetrische Verhalten von Rad51 und RPA eine besondere Beschaffenheit der DSB-Stelle z.B. aufgrund der Chromatin-Struktur im *MAT*-Lokus nicht ausgeschlossen werden.

## Hürden und Grenzen der Ausbreitung von DNA-Reparaturfaktoren

Auf der rechten Seite des DSB bei etwa 300 kb und damit einige tausend Basen vor repetitiven Telomer-Sequenzen scheint die Ausbreitung des Rad51-Signals scharf begrenzt zu sein (Abbildung 9). Auf der linken Seite vom DSB scheint die Ausbreitung von Rad51 hingegen durch ein einzelnes Ty1-LTR (*long terminal repeat*, bei 170 kb) und ein Ty1-Transposon (bei 150 kb) verzögert zu sein. Vom DSB ausgehend werden Rad51-Signale jenseits dieser Regionen weniger stark detektiert. Beide Sequenzen hindern im zeitlichen Verlauf die Ausbreitung von Rad51, sie erscheinen als „Hürde“. Rad51 ist zwar auf dem gesamten Chromosom angereichert, jenseits der Ty-Hürden jedoch schwächer (Abbildung 9 B).

Sehr viel schärfer scheint die Ausbreitung von RPA auf der linken Seite des DSB durch das Ty1-LTR bei 170 kb begrenzt zu sein (Abbildung 11 B). Signale des RPA-Profiles stellen jenseits von 170 kb nur noch unspezifische Hintergrundbindung dar. Hier besteht für die Ausbreitung von RPA nicht nur ein überwindbares Hindernis, sondern eine scharfe Grenze. Dies korreliert mit der in einer anderen Studie beobachteten verminderten Bildung von ssDNA durch Strangresektion jenseits dieser genomischen Position<sup>20</sup>.

Die Natur der scharfen Grenze für die Bildung von ssDNA und die Ausbreitung von RPA ist unbekannt. Da repetitive Transposon-Sequenzen selbstassoziierte DNA-Strukturen (Schleifen oder *loops*) bilden, können Endonukleasen der Strangresektion diese möglicherweise nicht prozessieren. Jedoch ist ebenfalls denkbar, dass am Ty1-LTR bei 170 kb eine besondere Chromatin-Struktur besteht, die prozessive DNA-Reparaturfaktoren aktiv inhibiert. Möglicherweise deutet dies auf einen Inhibitionsmechanismus der Rekombination von Transposons hin, deren unkontrollierte Rekombination Genominstabilität verursachen kann.

## Mikroskopische Untersuchung persistenter DSBs

Die gemessene chromosomenweite Ausbreitung von Rad51, fortschreitende Bildung von ssDNA mit RPA-Besatz und nicht zuletzt die seit langem bekannte Aktivierung des *damage checkpoints* sind bemerkenswerte Ereignisse, die durch den fortbestehenden Bruch eines Chromosoms ausgelöst werden. Im Falle der Anreicherung von Rad51 betreffen diese zellulären Reaktionen das gesamte gebrochene Chromosom, auf dem RPA ebenfalls über einen erheblichen Bereich angereichert ist. Die hier gewonnenen Daten lassen die Interpretation zu, dass die Rad51-Maschinerie zur Homologiesuche ihre Aktivität über Stunden beibehält. Welchem Schicksal unterliegen nun dabei aber die Enden des DSB und das gesamte gebrochene Chromosom selbst?

Über das Schicksal der beiden Enden eines bestehenden DSB ist bekannt, dass diese mit dem selben DNA-Reparaturfokus kolokalisieren; sie werden also nicht getrennt. Für dieses Zusammenhalten zweier loser Enden eines DSB ist der DSB-erkennende Proteinkomplex MRX (Mre11, Rad50, Xrs2) notwendig. In grundlegenden Untersuchungen dazu wurden die Enden eines DSB visualisiert, indem eine Anordnung von mehreren hundert Bindestellen für fluoreszierende Proteine in der Nähe der Bruchstelle genomisch integriert wurde<sup>102</sup>.

Der Nukleus einer Hefezelle durchmisst nur etwa 1,5  $\mu\text{m}$ . Diese geringe Größe limitiert Versuche, subnukleäre Vorgänge mittels konventioneller Lichtmikroskopie genau zu untersuchen. Jedoch ermöglichen leistungsfähige konfokale *Laserscan*-Mikroskope (z.B. *spinning disc* Mikroskope) und neuartige Techniken wie strukturierte Illumination immer genauere Untersuchungen auch besonders kleiner biologischer Strukturen in bisher unerreichter Präzision und Auflösung<sup>103</sup>.

Um das Schicksal des persistierenden DSB mikroskopisch zu untersuchen, wurde deshalb hier ein System etabliert, mit dem seine subnukleäre Lokalisation analysiert werden kann. Dazu wurde in die selben donorprofizienten und -defizienten Stämme, die auch für die vorangegangenen CHIP-Analysen verwendet wurden, eine repetitive

Anordnung von Lac-Repressor-Bindestellen (*lacO*) in unmittelbarer Nachbarschaft zum DSB integriert. Durch Expression eines GFP-Lac-Repressor Fusionsproteins mit einer Kernlokalisierungs-Sequenz (GFP-LacI-NLS) kann der Locus mikroskopisch visualisiert werden. Die folgenden mikroskopischen Analysen erfolgten mit einem leistungsfähigen *spinning disc* Mikroskop an lebenden Zellen in Echtzeit. Dazu wurden Zellen auf Concanavalin-A bedeckte Glasboden-Kulturschalen adhärirt und während der Mikroskopie bis zu mehrere Stunden in Flüssigkultur gehalten. Die Adhäsion der Zellen an den Objektträger erlaubt die mikroskopische Beobachtung auch einzelner Zellen über mehrere Stunden.

Um die Zellkern-Membran zu visualisieren, wurde Nic96, ein Nukleoporin, mit einem rot-fluoreszierenden Protein fusioniert (Nic96<sup>marS</sup>). Mit einem präzisen piezoelektrischen Feintrieb wurden konfokale Bilder in Schichten von 0,25 µm mit Laserlicht zur Anregung grüner und roter Fluoreszenz aufgenommen. Das exprimierte GFP-LacI-NLS bildet durch hohe Konzentration am genomisch integrierten Markerloкус einen deutlich sichtbaren, stark grün fluoreszierenden Fokus. Insgesamt erschien dieses System geeignet, die subnukleäre Lokalisation des DSB über die Zeit zu verfolgen.

## Ein persistenter DSB relokalisiert zur Zellkern-Peripherie

Vor Induktion des DSB wird eine relativ zur Zellkern-Membran zufällige Verteilung von GFP-Signalen beobachtet. GFP-Signale kolokalisieren in etwa 30% der untersuchten Zellen mit dem Marker für die Zellkern-Peripherie (Nic96<sup>mars</sup>). Überraschenderweise konnte jedoch einige Stunden nach Induktion des DSB eine bemerkenswerte Relokalisierung des GFP-Signals beobachtet werden, das zu späten Zeitpunkten nach DSB-Induktion keiner Zufallsverteilung mehr folgt. So findet sich der mit GFP markierte DSB 5 Stunden nach DSB-Induktion in etwa 70% der untersuchten Zellen an der Zellkern-Peripherie (Abbildung 12 A)<sup>1</sup>. In donorprofizienten Zellen, in denen eine Stunde Induktion des DSB mit nachfolgender Reparatur erfolgte, konnte keine Änderung der subnukleären Lokalisation des DSB beobachtet werden. Die bemerkenswerte Änderung der subnukleären Lokalisation eines persistenten DSB war bisher unbekannt. Möglicherweise liefert sie Hinweise darauf, wie Zellen mit permanent gebrochenen Chromosomen umgehen.

Unmittelbar nach diesem Befund drängten sich Fragen auf, wie diese subnukleäre Relokalisation mechanistisch stattfindet, ob sie funktionell mit der zellulären Antwort auf DNA-Schäden zusammenhängt und welcher Natur die beobachtete Immobilisierung eines DSB an der Zellkern-Peripherie ist. Insbesondere ist von großem Interesse, wie weit um den DSB ausgedehnt Fixierung an die Zellkern-Peripherie stattfindet. Diese Fragen ließen sich möglicherweise durch ChIP-Experimente gegen Komponenten der Zellkern-Peripherie beantworten; besonders Transmembran-Proteine der inneren Zellkern-Membran wie Mps3 erschienen dazu geeignet. Mps3 war als mögliches Marker-Protein auch deshalb interessant, weil Mps3 als Interaktor von H2A.Z in Hochdurchsatz-Interaktionsstudien mit dem *yeast two hybrid* (Y2H) System identifiziert wurde. Um die Relokalisierung des DSB und des gebrochenen Chromosoms genauer zu untersuchen, wurden mittels ChIP gegen Mps3 die Bedingungen untersucht, unter denen ein persistierender DSB an die Zellkern-Peripherie relokalisiert.

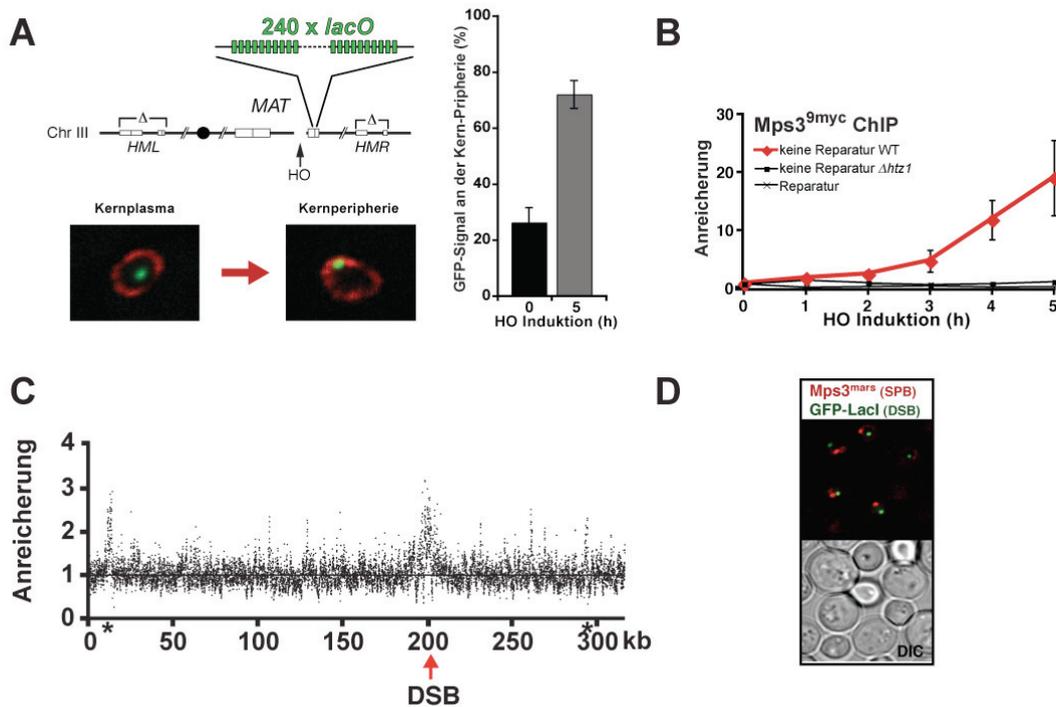


Abbildung 12 **Rekrutierung eines persistenten DNA-DSB an die Zellkern-Peripherie und Abhängigkeit von H2A.Z.** (A) *In vivo* Visualisierung der DSB-Rekrutierung zur Zellkern-Peripherie. Expression eines GFP-LacI-Fusionsproteins markiert eine 240x*lacO*-Anordnung, die in der Nähe des *MAT*-Lokus integriert wurde. Die Kern-Peripherie wird durch Nic96<sup>mars</sup> sichtbar gemacht (rot). Die Kolokalisierung der Signale wurde 0 oder 5 Stunden nach Induktion der HO-Endonuklease untersucht. (Durchschnittswerte und Standard-Abweichungen dreier unabhängiger Experimente, n > 345). Repräsentative Bilder für nukleoplasmatische und kernperiphere Lokalisierung des GFP-Signals sind abgebildet. (B) Mps3<sup>9myc</sup>-gerichtete ChIP am *MAT*-Lokus (0,2 kb entfernt vom DSB) nach HO-Induktion. Abgebildet sind *IP/input* Signale normalisiert auf 1 für das Signal vor Induktion. (C) Mps3<sup>9myc</sup>-gerichtete ChIP-on-chip Analyse von Chromosom III. Mps3<sup>9myc</sup> ist 5 Stunden nach Induktion um den DSB angereichert. Stern-Symbole (\*) markieren Homologie, die auf der Oligonukleotid-Matrix, jedoch nicht im verwendeten Hefestamm vorhanden ist. Anreicherungs-Faktoren für Mps3<sup>9myc</sup> wurden auf den Datensatz 30 Minuten nach Induktion normalisiert. (D) Weniger als 6% der mit GFP markierten DSBs kolokalisiert mit dem Spindelpol-Körper (SPB, n > 500) vor und nach DSB-Induktion. Der größte Teil Mars-markierten Mps3s (Mps3<sup>mars</sup>) ist am SPB konzentriert. Die repräsentative Aufnahme wurde 4 Stunden nach DSB-Induktion gemacht. DIC bezeichnet das Phasenkontrastbild.

## H2A.Z ist für die DSB-Relokalisation notwendig

Zunächst kann in ChIP-Experimenten nach 2 Stunden ein deutlich ansteigendes Signal für Mps3 am persistierenden DSB beobachtet werden. Zu Zeitpunkten, in denen eine spezifische Anreicherung von H2A.Z beobachtet wurde (30 min nach DSB-Induktion) sind die Signale für eine Anreicherung von Mps3 allerdings nahezu unverändert. Die Anreicherung von Mps3 scheint später als die frühe Rekrutierung von H2A.Z stattzufinden; sie ist erst einige Stunden nach Induktion des DSB deutlich ausgeprägt. Zu diesem Zeitpunkt hat bereits extensive Strang-Resektion und ausgedehnte Anreicherung von Rad51 stattgefunden. Dies legt nahe, dass die Relokalisierung des DSB an die Zellkern-Peripherie ein spätes Ereignis ist. Möglicherweise hängt sie von vorangehenden Signalen der DNA-Schadensantwort wie Bildung von ssDNA mit nachfolgender Aktivierung der *checkpoints* ab. Da diese Prozesse in *htz1*- und *swr1*-Deletionsmutanten ( $\Delta htz1$  und  $\Delta swr1$ ) gestört sind, lag es nahe, zu überprüfen, ob die Relokalisation des DSB in  $\Delta htz1$ -Mutanten verringert ist. Tatsächlich kann in diesen Mutanten anhand von ChIP-Experimenten keine Anreicherung von Mps3 mehr an den DSB beobachtet werden. H2A.Z und sein Chromatin-Einbau sind folglich für eine Relokalisierung des persistenten DSB notwendig. Wird der DSB in einem donorprofizienten Stamm repariert, findet ebenfalls keine Relokalisierung des DSB zur Zellkern-Peripherie statt (Abbildung 12 B)<sup>1</sup>. Dies korrespondiert mit hier gemachten mikroskopischen Beobachtungen in donorprofizienten Stämmen.

Eine direkte Untersuchung in *checkpoint*-Mutanten konnte die Notwendigkeit der *checkpoint*-Aktivierung für die DSB-Relokalisation bestätigen. Ebenso kann die Relokalisierung des persistenten DSB nicht mehr in  $\Delta rad51$ -Deletionsmutanten beobachtet werden und erfordert somit Rad51<sup>2</sup>.

Um zu untersuchen, über welche Bereiche des gebrochenen Chromosoms sich die Verankerung des DSB an der Zellkern-Peripherie erstreckt, wurden zunächst ChIP-Proben gegen Mps3 mittels Primerpaaren in steigender Entfernung vom DSB untersucht. Die so erhaltenen Ergebnisse

suggerierten eine mit steigendem Abstand vom DSB geringer werdende Rekrutierung von Mps3<sup>1</sup>. Jedoch lieferten diese Analysen keine präzise Aussage über die genaue Ausdehnung der Bruch-Rekrutierung. Die Primerpaare wurden in Abständen von mehreren tausend Basen auf Chromosom III gewählt. Jedoch können Signalverläufe über große Distanzen durch Messwerte an Einzelstellen nicht extrapoliert werden. Daher wurde die Rekrutierung von Mps3 mittels ChIP-on-chip auf dem gebrochenen Chromosom genau kartiert.

Bruch-induzierte Signal-Änderungen für Mps3 finden in einem Bereich von 30 kb um den DSB herum statt. Die symmetrische Verteilung starker Änderungen mit einem Maximum an der Bruchstelle legt nahe, dass beide Enden des persistierenden DSB zur Zellkern-Peripherie rekrutiert werden. Zudem ist deutlich erkennbar, dass sich der Signalverlauf im Bereich von 30 kb um den Bruch nicht stetig verhält. Jedoch liegen die gemessenen Maxima um den DSB symmetrisch verteilt vor. Die Rekrutierung von Mps3 scheint spezifisch für den Bereich um den DSB zu sein (Abbildung 12 C).

Die Frage, ob die Verankerung des DSB an der Zellkern-Peripherie spezifisch durch Mps3 bewirkt wird, ist nicht einfach zu beantworten. Zunächst wurde Mps3, das hauptsächlich am Spindelpol-Körper (SPB) lokalisiert, mikroskopisch untersucht. Fluoreszenz-markiertes Mps3 (Mps3<sup>mars</sup>) lässt sich als schwach-rote Fluoreszenz der Zellkern-Peripherie mit einem punktuell sehr starken Signal am SPB beobachten. Induktion des DSB führt nicht zu einer Relokalisierung des DSB zum Spindelpol-Körper. Dies weist darauf hin, dass die räumliche Nähe des DSB zu Mps3, die in ChIP-Experimenten detektiert wird, nicht notwendigerweise spezifisch für sämtliches Mps3-Protein sein muss (Abbildung 12 D).

Andere Proteine der Zellkern-Peripherie wie Nic96 oder Heh2 finden sich in ChIP-Experimenten ebenfalls in der Nähe des DSB angereichert. Untersuchungen von *mps3*-Mutanten, in denen der nukleäre Proteinteil von Mps3 deletiert ist, werden weiterhin zum DSB rekrutiert<sup>2</sup>. Die Verankerung des DSB an der Zellkern-Peripherie findet möglicherweise nicht ausschließlich an spezifischen Strukturen der Zellkern-Peripherie wie dem SPB oder den Kernporen statt, sondern über ausgedehnte Bereiche der Kernperipherie.

Zusammengefasst zeigen die hier gemachten Beobachtungen, dass die beobachtete Chromosomen-Relokalisierung spezifisch für den Chromosomen-Bruch ist. Der persistente DSB ist zusammen mit *checkpoint*-Signalwegen und DNA-Reparaturproteinen der Auslöser für diese zelluläre Antwort auf gebrochene Chromosomen. Dies stellt einen neuen und bisher nicht bekannten, späten Teil der DNA-Schadensantwort (DDR) dar.

## ***H2A.Z wird durch SUMO und Ubiquitin modifiziert***

H2A.Z wird spezifisch an dem untersuchten DSB angereichert. DNA-Schäden lösen Signale aus, die bewirken, dass die Progression des Zellzyklus' angehalten und Reparatur des Schadens eingeleitet wird. Post-translationale Modifikationen von Proteinen können solche Signalfunktion besitzen. Im Zusammenhang mit der Antwort auf DNA-Schäden ist die SUMOylierung von Reparaturproteinen wie beispielsweise Rad52 besonders stark induziert. Ihre Funktion ist zwar bisher nicht vollständig verstanden, jedoch konnte nachgewiesen werden, dass die SUMOylierung von Rad52 für die Relokalisation von rDNA aus dem Nukleolus vor Reparatur dort induzierter DNA-Schäden notwendig ist<sup>90,104</sup>.

In den oben beschriebenen Untersuchungen in dieser Arbeit wurde eine wichtige Rolle des Varianten-Histons H2A.Z für die Relokalisierung eines persistenten DSB an die Zellkern-Peripherie gezeigt. Jedoch sind post-translationale Modifikationen von H2A.Z bisher wenig untersucht. Insbesondere ist unbekannt, ob SUMO- und Ubiquitin-modifizierte Spezies von H2A.Z existieren und welche Funktion diese Modifikationen von H2A.Z haben könnten.

Protein-Modifikationen, im speziellen die Modifikation von Histonen, können das Verhalten von Chromosomen wesentlich beeinflussen. Um vermutete, uncharakterisierte Modifikationen von H2A.Z zu untersuchen, wurden hier gerichtete Experimente durchgeführt, um SUMOylierte oder ubiquitylierte Formen von H2A.Z zu identifizieren. Dabei werden durch Histidin-Peptide markierte Formen von SUMO und Ubiquitin exprimiert und kovalent mit SUMO oder Ubiquitin verknüpfte Proteine unter denaturierenden Bedingungen und hohen Salzkonzentrationen mittels NiNTA-Präzipitation gereinigt. Durch SUMO oder Ubiquitin modifizierte Spezies können mittels spezifischer Antikörper als langsamer migrierende Spezies in denaturierenden Gelelektrophorese-Experimenten nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung post-translationaler Modifikationen des Histons H2A.Z konnte die SUMOylierung und Ubiquitylierung eines kleinen Teils der Gesamtmenge von H2A.Z beobachtet werden (Abbildung 13).

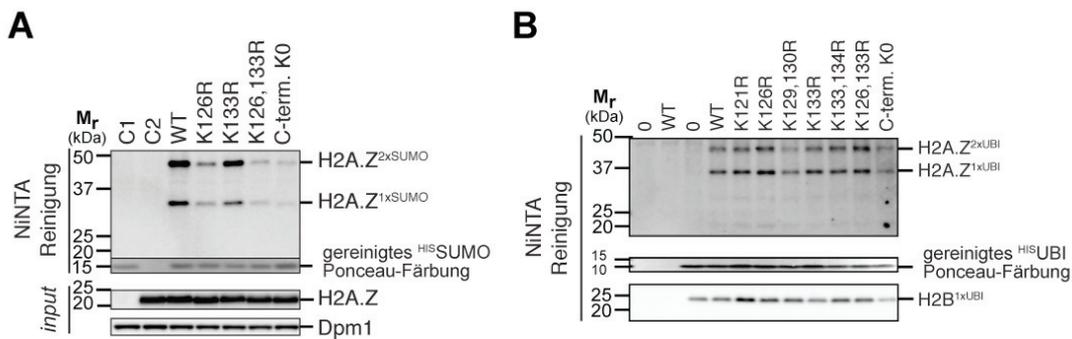


Abbildung 13 **SUMOylierung und Ubiquitylierung von H2A.Z.** (A) Hefe-H2A.Z wird durch SUMO modifiziert. Zwei Spezies mit einem ( $H2A.Z^{1xSUMO}$ ) oder zwei ( $H2A.Z^{2xSUMO}$ ) SUMO-Resten können detektiert werden. His-Peptid-markierte Proteine ( $^{His}SUMO$  oder  $^{His}Ubiquitin$ ) wurden denaturierend über NiNTA gereinigt und 3HA-markiertes H2A.Z durch HA-spezifische Antikörper nachgewiesen. Dpm1-Detektion wurde als *input*-Kontrolle benutzt. Die Kontrollen C1 und C2 exprimieren jeweils kein Epitop-markiertes H2A.Z oder SUMO. Es wurden WT, Einzel- oder Doppel-Lysinmutanten von H2A.Z-Proteinen verglichen (K126R, K133R und K126,133R) und eine Mutante, in der sämtliche C-terminale Lysine zu Arginin mutiert sind (C-term. K0). (B) Zwei Formen von Ubiquitin-modifiziertem H2A.Z mit einem ( $H2A.Z^{1xUBI}$ ) oder zwei ( $H2A.Z^{2xUBI}$ ) Ubiquitin-Resten können detektiert werden. Ubiquitylierte Proteine wurden denaturierend gereinigt analog zu Abbildung 13 A. Wildtyp-H2A.Z (WT) und H2A.Z-Mutanten, in denen potenzielle Ziellysine im C-terminus zu Arginin mutiert sind, werden alle in ähnlichem Maße mit Ubiquitin modifiziert.

Durch systematische Kartierung möglicher Ziellysine für die Modifikation mit SUMO konnten Lysin-Reste im C-terminus des Proteins als SUMOylierungsstellen identifiziert werden. Eine Mutations-Analyse möglicher Modifikationsstellen zeigt, dass H2A.Z hauptsächlich an Lysin 126 (K126) und zu geringerem Teil an Lysin 133 (K133) mit SUMO modifiziert wird. Mutation sämtlicher C-terminaler Lysine führt zu keiner weiteren Verringerung des Anteils SUMO-modifizierter Spezies von H2A.Z gegenüber der K126,133R-Doppelmutante. SUMOylierte und ubiquitylierte Spezies von H2A.Z migrieren gegenüber unmodifiziertem H2A.Z wie zu erwarten langsamer (Abbildung 13).

Zur Detektion modifizierter Spezies wurde C-terminal Epitop-markiertes H2A.Z exprimiert. Die SUMO-Modifikation von endogenem H2A.Z ist besonders schwer zu detektieren, da kommerziell erhältliche Antikörper Epitope im C-terminus des Proteins erkennen. In dieser Region weist H2A.Z Sequenz-Unterschiede zu H2A auf. Vermutlich werden C-terminale Epitope durch die Modifikation mit SUMO verändert und nicht mehr durch die getesteten Antikörper detektiert. Nach N-terminaler HA-Epitop-Markierung

von H2A.Z konnten keine SUMOylierten Spezies nachgewiesen werden. Möglicherweise interferiert eine Veränderung des N-Terminus von H2A.Z mit seiner SUMOylierung. Dies könnte ein Hinweis auf eine Wechselwirkung der SUMOylierung von H2A.Z mit Funktionen anderer Regionen dieses Proteins sein.

H2A.Z-Mutanten-Proteine, in denen die C-terminalen Lysine zu Argininen mutiert sind, sind unverändert gering mit Ubiquitin modifiziert (Abbildung 13 B). Dies legt nahe, dass SUMOylierung und Ubiquitylierung an verschiedenen Lysinen stattfinden und beide Modifikationen nicht direkt kompetieren.

## **SUMOylierung von H2A.Z und DNA-Schäden**

Zwischen der SUMOylierung von H2A.Z und der Antwort auf DNA-Schäden (DDR) könnte ein funktioneller Zusammenhang bestehen. Die Phänotypen von *htz1*-Deletionsmutanten ( $\Delta htz1$ , Abbildung 7) in der DDR zeigen, dass H2A.Z für eine effiziente zelluläre Reaktion auf DNA-Schäden notwendig ist. Jedoch kann der Effekt einer Deletion von *htz1* möglicherweise indirekt ausgelöst werden. Eine Analyse der spezifischen, SUMOylierungs-defizienten *htz1*-Mutanten erscheint aber zur Untersuchung einer möglichen Funktion von H2A.Z-SUMO in der DSB-Reparatur vielversprechend.

Zunächst wurde untersucht, ob die SUMOylierung von H2A.Z insgesamt durch DNA-Schäden induzierbar ist oder ihr Muster verändert ist. Ersteres kann für wichtige DNA-Reparaturfaktoren wie z.B. Rad52 beobachtet werden<sup>104</sup>. Mutation der SUMOylierungs-Stellen scheint die Gesamt-Proteinmenge von H2A.Z-Varianten nicht zu beeinflussen. Dies ermöglicht einen direkten Vergleich des Anteils SUMOylierter Spezies von H2A.Z in Gegenwart von DNA-schädigenden Agenzien wie Zeozin.

Eine weitere, interessante Frage ist, ob die beobachtete SUMOylierung von H2A.Z am Chromatin stattfindet. Dazu wurde das SUMOylierungs-Profil von H2A.Z in *swr1*-Deletionsmutanten untersucht, in denen H2A.Z nicht mehr in Chromatin eingebaut werden kann. Die hier beschriebenen

Untersuchungen wurden auch auf ubiquitylierte Spezies von H2A.Z ausgedehnt.

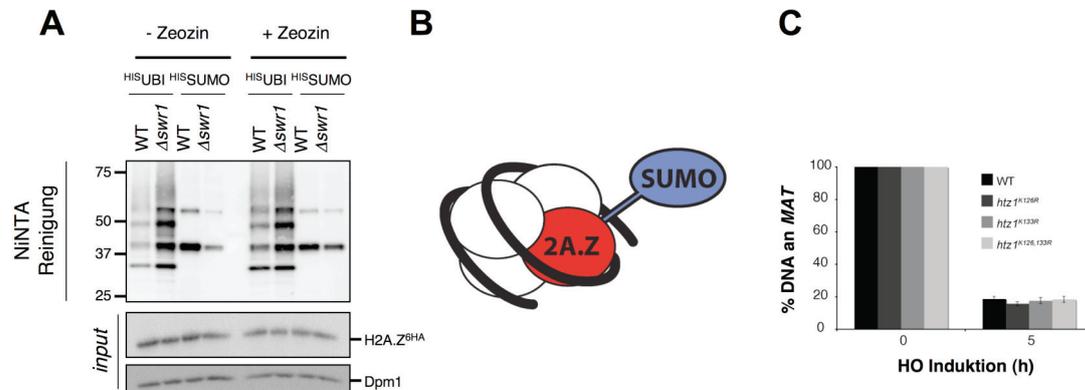


Abbildung 14 **Post-translationale Modifikationen von H2A.Z und DNA-Schäden.** (A) Die SUMOylierung von H2A.Z ist in  $\Delta swr1$ -Mutanten erniedrigt. Weder Ubiquitylierung noch SUMOylierung von H2A.Z sind durch Gegenwart von 0,2 mg/ml Zeozin für 2 Stunden deutlich beeinflusst. (B) Modell aus den Daten der Abbildungen Abbildung 13 und Abbildung 14 A. SUMOylierung von H2A.Z scheint die Inkorporation durch den SWR-Komplex in Nucleosomen zu erfordern. Die SUMOylierungs-Stellen von H2A.Z befinden sich im C-Terminus des Proteins und damit in der Region, in der DNA in das Nucleosom eintritt. (C) Der Verlust von DNA-Signal am DSB deutet darauf hin, dass DNA-Resektion in Mutanten, die H2A.Z-Varianten ohne SUMO-Akzeptorstellen exprimieren, unverändert ist. Quantitative PCR-Analysen wurden wie in Abbildung 7 durchgeführt.

Weder SUMOylierung noch Ubiquitylierung scheinen durch DNA-schädigende Agenzien wie Zeozin deutlich beeinflusst zu sein (Abbildung 14 A). Jedoch ist die SUMOylierung von H2A.Z im Gegensatz zu seiner Ubiquitylierung in  $\Delta swr1$ -Mutanten deutlich verringert. Dies legt nahe, dass für eine SUMOylierung von H2A.Z ein Einbau in Nucleosomen notwendig ist. Die Ubiquitylierung von H2A.Z scheint hingegen deutlich erhöht zu sein, wenn es nicht mehr in Chromatin eingebaut werden kann. Dies lässt vermuten, dass nicht-inkorporiertes H2A.Z durch verstärkte Ubiquitylierung und folgenden proteasomalen Abbau instabil wird. Um dieses Verhalten jedoch genauer beschreiben zu können, wären weitere Untersuchungen hinsichtlich der Proteininstabilität und des proteasomalen Abbaus von H2A.Z notwendig.

Zusammen mit der Kartierung der SUMOylierungs-Stellen von H2A.Z im C-Terminus des Proteins und der Notwendigkeit des SWR1-Komplexes

nicht nur für nukleosomalen Einbau von H2A.Z, sondern auch für seine SUMOylierung, lässt sich die Struktur eines Nukleosoms mit SUMOyliertem H2A.Z schematisch darstellen. Die kartierte SUMOylierungs-Stelle von H2A.Z liegt in der Region, in der DNA in das Nukleosom eintritt. Die SUMO-Modifikation befindet sich strukturell oberhalb und unterhalb von DNA-Nukleosomen-Kontakten und nicht an Lysin-Resten im Inneren des Nukleosoms. Dies ist sterisch sehr gut mit bekannten Strukturen von H2A.Z-Nukleosomen in Einklang zu bringen (Modell, Abbildung 14 B).

Untersuchungen zur Funktion der SUMOylierung von H2A.Z sollten aufklären, ob der DDR-Defekt durch Deletion des *HTZ1*-Gens spezifisch für die SUMOylierung sein könnte. Dazu wurden SUMOylierungs-defiziente Varianten von H2A.Z (*htz1*<sup>K126R</sup>, *htz1*<sup>K133R</sup> und *htz1*<sup>K126,133R</sup>) in dem verwendeten System zur HO-Induktion eines DSB exprimiert. SUMOylierung von H2A.Z schien dabei allerdings keinen Einfluss auf die Bildung von ssDNA zu haben. Die verringerte Bildung von ssDNA, wie sie in Mutanten ohne Htz1 zu beobachten ist ( $\Delta$ *htz1*, Abbildung 7), trat nicht in SUMOylierungs-defizienten Mutanten von *htz1* auf. Folglich scheint die frühe Funktion von H2A.Z-Chromatin in der DDR unabhängig von H2A.Z-SUMOylierung zu sein (Abbildung 14 C)<sup>1</sup>.

## **DSB-Relokalisierung benötigt die SUMOylierung von H2A.Z**

Generell scheint die Bildung von ssDNA in SUMOylierungs-defizienten Mutanten von *htz1* nicht gestört zu sein. Die Menge an Gesamtprotein von H2A.Z ist für WT-Protein und SUMOylierungs-defiziente Varianten ähnlich. Eine Untersuchung der Lokalisierung von SUMOylierungs-defizienten Mutanten von *htz1* sollte jedoch aufklären, ob in diesen Mutanten auch die Lokalisierung von H2A.Z unverändert ist. Dies scheint der Fall zu sein. Insgesamt ist die Lokalisierung von *htz1*<sup>K126R</sup> im Vergleich zu WT-Protein genomweit nicht verändert. Frühe Rekrutierung an einen induzierten DSB findet für diese SUMOylierungs-defiziente Variante von H2A.Z mit gleicher Effizienz wie für WT-H2A.Z statt (Abbildung 15 A). Dies deutet darauf hin,

dass die SUMOylierung für die Lokalisation von H2A.Z keine große Rolle spielt. Ebenfalls kann angenommen werden, dass SUMOylierungs-defiziente H2A.Z-Varianten nicht missgefaltet sind und die SUMO-Modifikation nicht für einen Chromatin-Einbau nötig ist. Hingegen scheint der Chromatin-Einbau durch SWR1 für eine effiziente SUMOylierung notwendig zu sein. Auch wenn nach DNA-Schädigung eine erhöhte SUMOylierung von H2A.Z nicht detektiert werden kann, stellt sich die Frage, ob die SUMOylierung von H2A.Z eine spezifische Rolle in der DNA-Reparatur spielt.

Dazu wurde die Lokalisation des DSB an die Zellkern-Peripherie in diesen Mutanten mittels ChIP und mikroskopisch untersucht. Überraschenderweise zeigten die identifizierten SUMOylierungs-defizienten Varianten von H2A.Z (*htz1*<sup>K126R</sup>, *htz1*<sup>K133R</sup> und *htz1*<sup>K126,133R</sup>) einen spezifischen Defekt in der Relokalisierung des persistenten DSB zur Zellkern-Peripherie. Im Gegensatz zu frühen Funktionen von H2A.Z am DSB ist dies aber nicht auf eine veränderte *checkpoint*-Aktivierung zurückzuführen (Abbildung 15 B<sup>1</sup>,C,D). Dieser Befund deutet auf eine spezifische Funktion der SUMOylierung von H2A.Z hin, die unabhängig von anderen Signalwegen der DNA-Schadensantwort zu sein scheint.

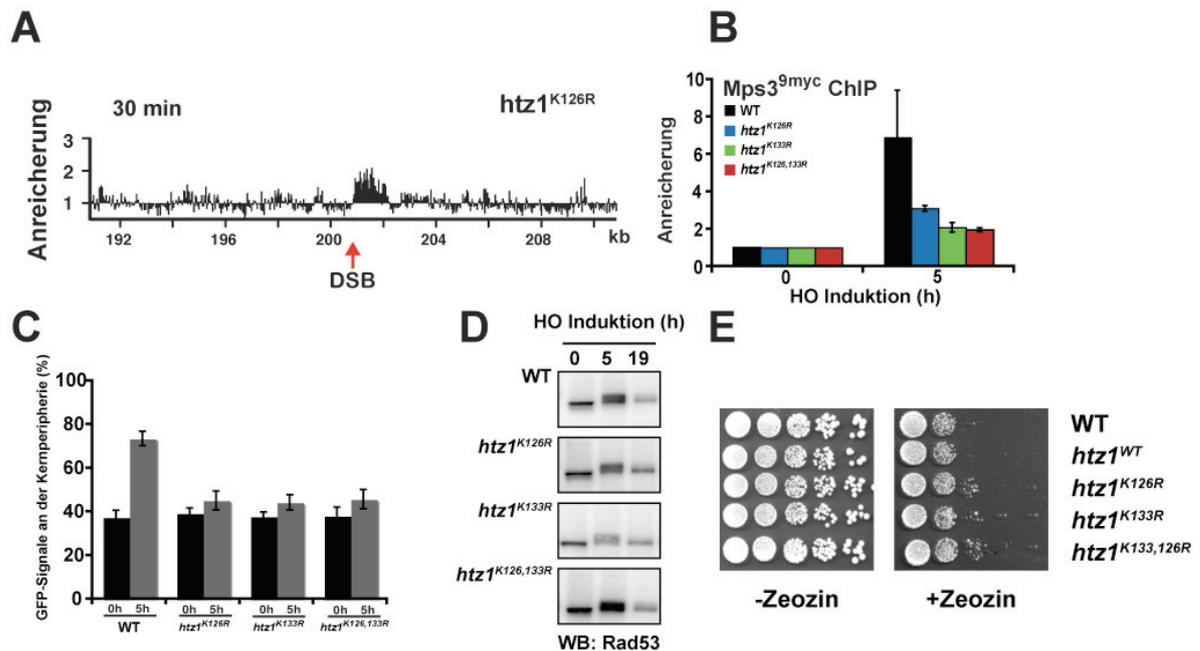


Abbildung 15 **H2A.Z-SUMOylierung ist für die Rekrutierung des DSB an die Kernperipherie notwendig.** (A) Die SUMOylierungs-defiziente H2A.Z-Variante ( $htz1^{K126R}$ ) wird ähnlich wie WT H2A.Z-Protein am DSB inkorporiert (vergleiche Abbildung 6). (B) Mps3<sup>9myc</sup>-gerichtete ChIP analog zu Abbildung 12 in SUMOylierungs-defizienten *htz1*-Mutanten. Abgebildet sind nur Werte für 0 und 5 Stunden. (C) Quantifizierung von Echtzeit-Mikroskopie Daten zur DSB-Relokalisierung zur Kernperipherie. (analog zu Abbildung 12,  $n > 550$ ) Abgebildet sind Durchschnittswerte dreier unabhängiger Experimente  $\pm$  Standard-Abweichung. (D) SUMOylierungs-defiziente *htz1*-Mutanten weisen keine Defekte in *checkpoint*-Aktivierung und Adaption nach HO-Induktion und DSB-Bildung auf. Untersucht wurde die Phosphorylierung von Rad53. (E) Phänotypen von *htz1*-Lysinmutanten. Gleiche Mengen Zellen wurden in einer seriellen Verdünnungsreihe auf YPD-Platten oder Platten mit dem DNA-schädigenden Agens Zeozin (1,0  $\mu$ g/ml, pH 7,2) ausgebracht und nach 2 Tagen Wachstum bei 30°C fotografiert. Untersucht wurden die in (C) verwendeten Stämme.

Die unveränderte Aktivierung des *checkpoints* in SUMOylierungs-defizienten Mutanten von *htz1* kann anhand der Phosphorylierung von Rad53 beobachtet werden. Auch die Aufhebung des *checkpoints* bei persistenten DSBs, die Adaption, scheint in diesen Mutanten unverändert stattzufinden. (Abbildung 15 D). Die für mikroskopische Untersuchungen verwendeten *htz1*-Mutanten weisen ebenfalls keine erhöhte Sensitivität gegenüber DNA-Schäden auf (Abbildung 15 E). Der Verlust der DSB-Relokalisierung scheint in diesen spezifischen Mutanten allerdings nicht direkt mit dem gemessenen Anteil SUMOylierter Spezies von H2A.Z zu korrelieren. Auch Mutanten mit nur leicht

verringertes SUMOylierung von H2A.Z ( $htz1^{K133R}$ ) weisen einen Verlust der DSB-Relokalisierung auf, wie sie in Mutanten mit deutlich niedrigeren Mengen an SUMOyliertem H2A.Z ( $htz1^{K126}$ ) zu beobachten ist. Eine strenge Dosis-Korrelation veränderter Proteinfunktion zum Anteil SUMOylierter Spezies kann hier also nicht beobachtet werden. Dies ist allerdings allgemein für viele untersuchte SUMO-Substrate der Fall. In jedem Fall weisen Mutanten der SUMOylierungs-Stellen von H2A.Z deutliche Defekte bei DSB-Lokalisation an die Zellkern-Peripherie auf, die spezifisch sind.

Diese Ergebnisse legen insgesamt nahe, dass SUMOylierung von H2A.Z und Aktivierung des *checkpoints* unabhängig voneinander für die Relokalisierung nicht-reparierter Chromosomen-Brüche an die Zellkern-Peripherie notwendig sind. Welche Faktoren die SUMO-Modifikation an H2A.Z erkennen, welche weiteren Auswirkungen die fehlende SUMOylierung von H2A.Z haben kann und wie das Signal für eine Immobilisierung des DSB an die Zellkern-Peripherie von H2A.Z-SUMO ausgehend übertragen wird, sind höchst interessante, jedoch bisher unbeantwortete Fragen.

## ***Neue Faktoren in der Aktivierung von Transkription***

Ubiquitylierung spielt an verschiedenen Stellen bei der Regulation von Transkription eine wichtige Rolle. Transkriptions-Aktivatoren können ubiquityliert sein, Histon H2B-Ubiquitylierung ist von wesentlicher Bedeutung für die Elongationsphase der Transkription und die Ubiquitylierung von RNA-Polymerase II (RNAPol II) ist unerlässlich, um schadhafte arretierte RNAPol II abzubauen. Jedoch ist bisher sehr wenig bekannt, welche Faktoren nukleäre Ubiquitylierung erkennen und ihre Funktion vermitteln.

Unter bekannten Faktoren, die regulatorische Funktionen von Ubiquitin vermitteln, nimmt das Chaperon Cdc48 zusammen mit seinen Kofaktoren eine herausragende Stellung ein. Cdc48 ist möglicherweise mit dem Transkriptions-Faktor Spt23 im Zellkern assoziiert. Nach seiner Mobilisierung liegt aktiviertes Spt23 p90 wahrscheinlich als (mono-) ubiquitylierter Transkriptions-Faktor vor. Eine Untersuchung, in der die Extraktion von Aurora B von Chromatin durch das Cdc48-Homologe p97 beschrieben wurde, liefert einen Hinweis darauf, dass Cdc48 generell Funktionen im Zellkern haben könnte<sup>82</sup>.

Diese Hinweise auf Ubiquitin-spezifische Funktionen von Cdc48 im Zellkern und die funktionelle Vielseitigkeit von Cdc48-Komplexen gaben Anlass, gezielt zu untersuchen, ob Cdc48 möglicherweise an weiteren Prozessen am Chromatin wie der Segregation von Proteinkomplexen oder Proteinabbau beteiligt ist.

Erste hier durchgeführte ChIP-Experimente mit polyklonalen Antikörpern gegen Cdc48 zeigten, dass Cdc48 an Gen-Promotoren angereichert ist (ohne Abbildung). Für eine genaue Kartierung der Chromatin-Assoziation von Cdc48 bieten sich hochaufgelöste ChIP-on-chip Analysen an. Solche Analysen wurden im Rahmen dieser Arbeit auch in Kooperation mit Jasiak *et al.* für eine genaue Kartierung der genomweiten DNA-Assoziation des Rbp4/7 Subkomplexes von RNA-Polymerase II eingesetzt und die erhaltenen Ergebnisse publiziert<sup>105</sup>. Aus dem Profil der Lokalisation von Cdc48 lassen sich möglicherweise Hinweise auf eine Funktion im Zellkern ableiten.

## Cdc48 lokalisiert an Bereiche hoher RNAPol II-Konzentration

Das genomweite Profil des Chromatin-Besetzes mit Cdc48 ergab eine überraschende und bemerkenswerte, starke Korrelation mit Signalen des Besetzes von RNA-Polymerase II (RNAPol II). Cdc48 ist genomweit an hunderten von Gen-Promotoren angereichert. Es markiert dabei nach visueller Inspektion in den meisten Fällen die Bereiche hohen Besetzes mit RNAPol II. Abgebildet ist ein repräsentativer Bereich über 100 kb auf Chromosom II (Abbildung 16).

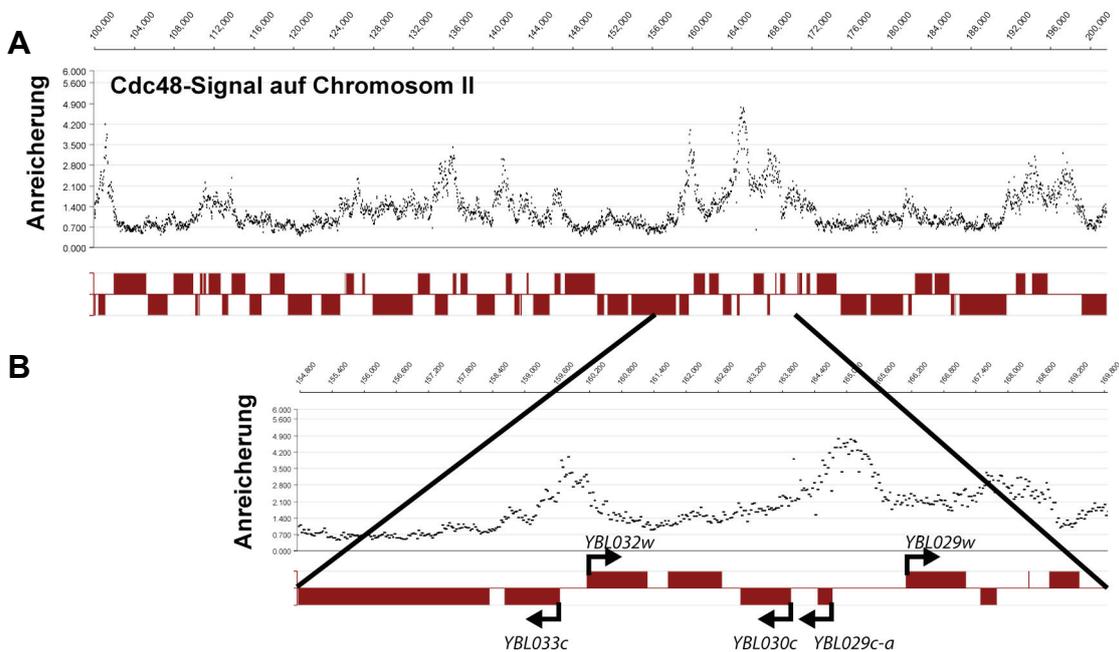


Abbildung 16 **Anreicherung von Cdc48 auf Chromosom II.** Cdc48 ist in bemerkenswerter Weise überwiegend an Gen-Promotoren angereichert. Die Lokalisierung von Cdc48 wurde genomweit mit spezifischen polyklonalen Antikörpern durch ChIP-on-chip Analyse analog zu Abbildung 5 A untersucht. (A) Abgebildet ist ein repräsentativer Bereich von 100 kb auf Chromosom II. Die Cdc48-Anreicherung ist in linearer Skala dargestellt. Die Positionen von Genen sind mit rotbraunen Kästen markiert. (B) Vergrößerung des angegebenen Bereichs aus (A). Die Richtung der Transkription ist mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet.

Ein Vergleich der ChIP-on-chip Profile von Cdc48 (diese Arbeit) und Rpb3, einer großen Untereinheit von RNAPol II (Jasiak *et al.*, 2009<sup>105</sup>), ergibt genomweit weitgehende Ähnlichkeit der Signalverläufe. Jedoch scheinen die Spitzen lokaler Anreicherungen von Cdc48 grundsätzlich in 5'-Richtung von

Genen hohen Besatzes mit RNAPol II verschoben zu sein. Die Spitzen von Cdc48-Signalen befinden sich meist an Initiations-Stellen der Transkription und an Bereichen, in denen RNAPol II durch PrPP (*promotor proximal pausing*) arretiert. Für einen Vergleich des Cdc48-Profiles an diesen Bereichen stehen bisher keine öffentlich zugänglichen, hochaufgelösten Daten z.B. der Anreicherung von CTD-Serin 2 Phosphorylierung zur Verfügung. Detaillierte bioinformatische Analysen der ChIP-on-chip Daten für Cdc48 und Vergleiche mit Profilen anderer Faktoren müssen folgen.

Cdc48 ist genomweit stark an Gen-Promotoren und dem 5'-Ende von Genen mit starkem RNAPol II-Besatz angereichert. Dies liefert einen deutlichen Hinweis auf eine allgemeine Funktion von Cdc48 bei der Gentranskription. Besonders interessant ist die Frage, ob durch Geninduktion, die in vielen Fällen mit einer erhöhten Gen-Assoziation von RNAPol II einhergeht, ebenfalls eine erhöhte Rekrutierung von Cdc48 zu beobachten ist. Änderungen des Chromatin-Besatzes können mittels ChIP-on-chip hochaufgelöst visualisiert werden. Weiterhin ist von besonderem Interesse, welche Kofaktoren mit Cdc48 im Zellkern assoziiert sind und ob diese eine ähnliche Chromatin-Lokalisation aufweisen. Um dies zu untersuchen, wurden Datensätze im gleichen experimentellen System zu verschiedenen Zeitpunkten von Geninduktion aufgenommen. Unter Modell-Genen zur Studie von Transkriptions-Aktivierung sind in *S. cerevisiae* die *GAL*-Gene besonders gut untersucht.

## Cdc48 und sein Kofaktor Shp1 werden nach Induktion spezifisch an GAL-Gene rekrutiert

Die Transkription der *GAL*-Gene lässt sich in *S. cerevisiae* durch Galaktose induzieren und durch Glukose wieder reprimieren. Untersuchungen zur Transkriptions-Aktivierung von *GAL*-Genen lieferten seit den Siebziger Jahren die experimentelle Grundlage für viele wichtige Modelle von Vorgängen am Chromatin, die mit Gentranskription verknüpft sind. *GAL*-Gene werden in aktuellen, grundlegenden Untersuchungen weiterhin als experimentelles Modell intensiv studiert.

Geninduktion mit Galaktose bewirkt deutlich ausgeprägte Änderungen des Chromatin-Besatzes mit Cdc48. Die spezifische Rekrutierung von Cdc48 an Gene, die durch Galaktose induziert wurden, ist bereits nach 30 Minuten zu messen. Das Verhalten des Cdc48-Kofaktors Shp1 ähnelt dabei dem Verhalten von Cdc48 in bemerkenswerter Weise. Beide Proteine werden durch Induktion mit Galaktose spezifisch an *GAL*-Genen angereichert.

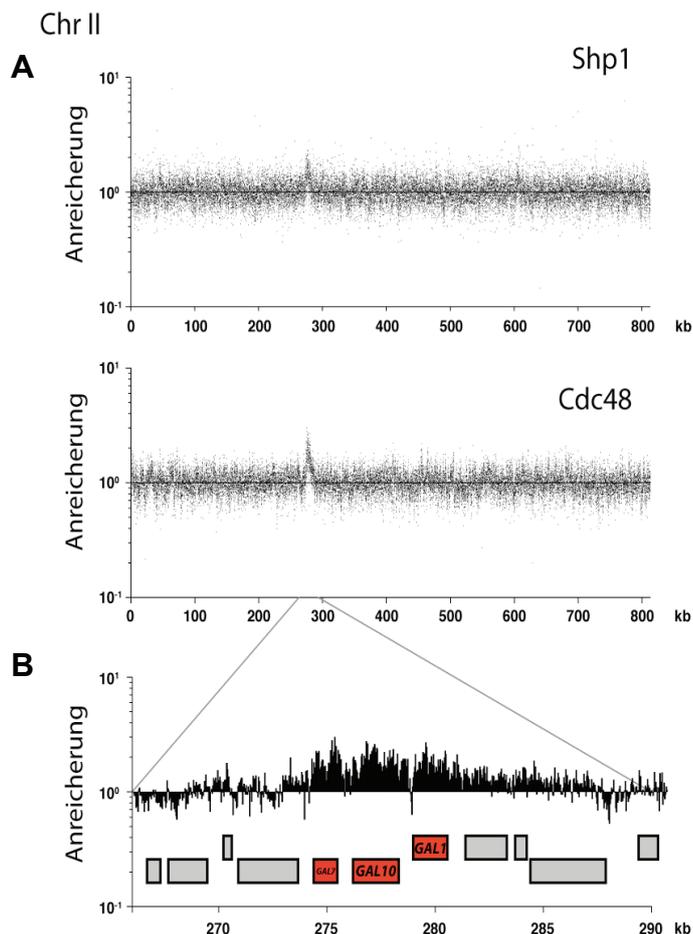


Abbildung 17 **Shp1 und Cdc48 werden durch Transkriptions-Induktion mit Galaktose an GAL-Gene rekrutiert.** (A) ChIP-on-chip Analyse der relativen Änderung des Chromatin-Besatzes mit Shp1 und Cdc48 durch 2 Stunden Induktion mit Galaktose. Dargestellt sind Änderungen der Anreicherungen auf Chromosom II. (B) Vergrößerte Ansicht der *GAL*-Gengruppe auf Chromosom II. Positionen der Gene *GAL7*, *GAL10* und *GAL1* sind mit roten Kästen markiert. Die relative Anreicherung ist in logarithmischer Skala (log<sub>10</sub>) dargestellt und über die relative genomische Position in kb aufgetragen.

Die relativen Änderungen des Chromatin-Besatzes mit Shp1 und Cdc48 sind zu frühen Induktions-Zeitpunkten auf bekannte durch Galaktose induzierbare Gene beschränkt. So können für Cdc48 und Shp1 deutliche Änderungen an der *GAL*-Gengruppe *GAL7, GAL10, GAL1* (*GAL gene cluster*) auf Chromosom II beobachtet werden (Abbildung 17 A).

An *GAL2*, einem weiteren stark durch Galaktose induzierbaren Gen, kann in ChIP-on-chip Analysen ebenfalls eine starke und spezifische Anreicherung von Cdc48 beobachtet werden. Im Übrigen scheinen genomweit nach Induktion mit Galaktose für 30 Minuten keine weiteren Änderungen des Besatzes mit Cdc48 oder Shp1 aufzutreten, die von unspezifischer Hintergrund-Bindung abweichen (ohne Abbildung).

Eine genaue Analyse der hochauflösenden Daten im Bereich der *GAL7-1*-Gengruppe ergibt eine bemerkenswerte Feinstruktur. Die größte Änderung des genomischen Besatzes mit Cdc48 findet auf kodierenden Regionen statt. In Promotor- und Terminator-Regionen ist sie deutlich geringer ausgeprägt (Abbildung 17 B). Dieses Verhalten ist reproduzierbar.

Etwa 2 Stunden nach Zugabe von Galaktose ist ein deutlicher Anstieg des Besatzes mit Cdc48 auf etlichen Genen zu beobachten, die für ribosomale Proteine kodieren (ohne Abbildung). Dies ist möglicherweise auf eine generelle Induktion von parallel regulierten Genen für ribosomale Proteine, dem RP-Regulon, zurückzuführen. Gene des RP-Regulons könnten durch die Zugabe von Galaktose zum Wachstumsmedium auf Laktat-Basis (YP-Laktat) und damit verbundene metabolische Veränderungen induziert werden. Eine kürzlich erschienene Studie zeigt, dass Galaktose die Fraktion Elongations-kompetenter RNAPol II auf Genen dieses Regulons deutlich erhöht<sup>106</sup>.

Cdc48 assoziiert zusammen mit elongierender RNAPol II an Chromatin. Dies wirft unmittelbar die Frage auf, ob Cdc48 zusammen mit seinem Kofaktor Shp1 eine mögliche positive Funktion in der Transkriptions-Elongation spielt.

## **Geninduktion und Transkriptions-Elongation in *cdc48* und *shp1* Mutanten**

Die bemerkenswerten Befunde, dass Cdc48 nach Induktion an *GAL*-Gene rekrutiert wird und genomweit an Orten hohen RNAPol II-Besatzes konzentriert ist, werfen die Frage auf, ob die Transkriptions-induzierte Anreicherung von Cdc48 funktionell mit der Aktivierung von Genen zusammenhängt. Bisher sind keine Funktionen von Cdc48-Komplexen bei der Regulation von Gen-Aktivität oder Chromatin-Struktur bekannt. Aufgrund der beobachteten spezifischen Rekrutierung von Shp1 und Cdc48 könnten diese beiden Proteine bei der Regulation effizienter Transkription wirken. Diese mögliche Funktion wird im Folgenden gezielt durch die Verwendung von *cdc48*- und *shp1*-Mutanten untersucht. Da *CDC48* essentiell ist, muss dafür auf temperatursensitive Mutanten wie die gut charakterisierte *cdc48-6* Mutante zurückgegriffen werden<sup>75</sup>. *SHP1* ist nicht essentiell in Hefe.

### **In Mutanten von *cdc48* und *shp1* ist die Induktion von *GAL*-Genen gestört**

Die Induktion von Genen, ihre induzierte Transkription durch RNAPol II, kann durch Quantifizierung gebildeter Boten-RNA (*messenger RNA* oder mRNA) verfolgt werden. Aus einer durch reverse Transkription erhaltenen cDNA-Bibliothek lassen sich die Mengen enthaltener DNA-Spezies mittels quantitativer PCR (qPCR) bestimmen.

Zur internen Normalisierung wurde quantifizierte mRNA von *GAL*-Genen auf die gemessene Menge von *ADH1*-mRNA normalisiert. *ADH1* kodiert für die Alkohol-Dehydrogenase 1 in *S. cerevisiae* und ist konstitutiv stark exprimiert. Die gemessenen und auf *ADH1* normalisierten Mengen gebildeter mRNA von *GAL1* sind in Abbildung 18 dargestellt. *GAL*-Gene wurden durch Zugabe von Galaktose für eine und zwei Stunden induziert. Die

Bestimmung der Induktion von *GAL1* durch Galaktose für eine Stunde im Hefestamm DF5 wurde in drei unabhängigen Experimenten wiederholt.

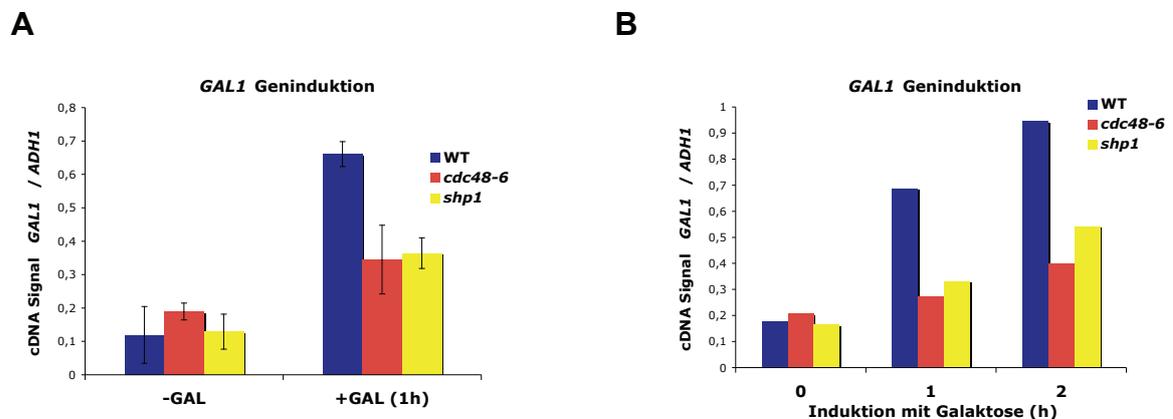


Abbildung 18 **Induktion des *GAL1*-Genes durch Galaktose.** Revers transkribierte mRNA (cDNA) wurde durch quantitative PCR vor und nach Induktion mit Galaktose analysiert. Abgebildet ist das cDNA-Signal für *GAL1* normalisiert auf das Signal von *ADH1*. (A) *GAL1*-Induktion nach einer Stunde in Wildtyp-Zellen (WT), temperatursensitiven Mutanten von *cdc48* (*cdc48-6*) und Deletionsmutanten von *SHP1* ( $\Delta shp1$ ). Experimente wurden bei 30°C durchgeführt, einer permissiven Temperatur von *cdc48-6*. Fehlerbalken zeigen mittlere Standard-Abweichungen dreier unabhängiger Experiment an. (B) *GAL1*-Induktion nach einer und zwei Stunden analog zu (A).

Bereits eine Stunde nach Zugabe von Galaktose kann im Wildtyp-Stamm (WT) eine etwa sechsfache Induktion des *GAL1*-Gens beobachtet werden. In *cdc48-6* Mutanten und *shp1*-Deletionsmutanten ( $\Delta shp1$ ) ist die Induktion von *GAL1* deutlich verringert. Sie erreicht nur etwa die Hälfte der für WT-Zellen beobachteten Induktion (Abbildung 18 A). Sämtliche Experimente zur Untersuchung der Induktion von *GAL1* wurden bei 30°C durchgeführt. Diese Temperatur ist für die *cdc48-6* Mutante permissiv. Allerdings liegen bei dieser Temperatur bereits deutlich messbare Defekte in der effizienten Induktion des *GAL1*-Gens in *cdc48-6* vor. Bei Induktion von *GAL1* durch Galaktose über 2 Stunden lässt sich in WT-Zellen ein weiterer Anstieg von *GAL1*-mRNA beobachten. Jedoch werden die zuvor beobachteten Defekte bei der Induktion von *GAL1* in  $\Delta shp1$  oder *cdc48-6* auch bei längeren Induktionszeiten nicht kompensiert (Abbildung 18 B).

Aufgrund der genomweiten Lokalisierung von Cdc48 im 5'-Bereich von Genen lässt sich vermuten, dass Cdc48 zusammen mit Shp1 eine Rolle bei

der effizienten Transkriptions-Elongation spielen könnte. Dies wird in folgenden Experimenten untersucht.

### Phänotypen von *cdc48-6* und *shp1* in der Transkriptions-Elongation

Deletionsmutanten der Histon-Methyltransferase Set2 ( $\Delta set2$ ) und anderer Regulatoren der Transkriptions-Elongation wie z.B. TFIIS (Dst1 in *S. cerevisiae*) weisen geringere Sensitivität in Gegenwart des Uracil-Analogs 6-Azauracil (6AU) als Wildtyp-Zellen (WT) auf, wenn sie mit integrativen *URA3*-Plasmiden transformiert sind. Ist hingegen *URA3* auf einem *CEN*-Plasmid (z.B. pRS316) transformiert, sind Zellen mit Defekten in der Transkriptions-Elongation sensitiv auf 6AU<sup>107</sup>. Eine vollständige Erklärung dafür ist nicht bekannt. Verändertes Wachstum in Gegenwart von 6-Azauracil, das transkriptionellen Stress induziert, liefert häufig Hinweise auf einen allgemeinen Defekt in der Transkriptions-Elongation<sup>42,108-110</sup>.

Mutanten von *cdc48* oder *shp1* sind gegenüber hohen Temperaturen oder chemischen Substanzen besonders empfindlich (S. Bergink & S. Böhm, persönliche Mitteilung). In Gegenwart von 6-Azauracil weisen die untersuchten Mutanten unter den gewählten experimentellen Bedingungen jedoch ein stärkeres Wachstum als WT-Zellen auf (Abbildung 19).

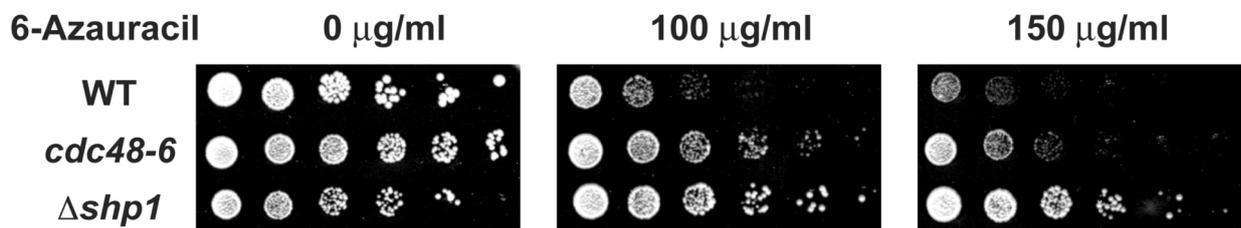


Abbildung 19 **6-Azauracil-Sensitivität von *cdc48-6* und *shp1* Mutanten.** Nach genomischer Integration eines *URA3*-Plasmids wurden *cdc48-6* und  $\Delta shp1$  Mutanten auf Platten mit synthetischem Wachstumsmedium ohne Uracil (SC -Ura) und steigenden Konzentrationen von 6-Azauracil in fünffachen seriellen Verdünnungsreihen ausgebracht. Abgebildet sind Platten nach 3 Tagen Wachstum bei 30°C.

Ein möglicherweise geringeres Wachstum dieser Mutanten, das auf generelle Wachstums-Defekte zurückzuführen sein könnte, wird in diesem Fall kompensiert. WT-Zellen weisen mit steigender Konzentration von 6-Azauracil Defekte im Wachstum auf. Dies ist ein Hinweis auf funktionelle Transkriptions-Elongation in WT-Zellen, jedoch nicht in den untersuchten Mutanten.

Die beobachtete deutlich verringerte, dosisabhängige Sensitivität von *cdc48-6* und  $\Delta$ *shp1* Mutanten in Gegenwart von 6-Azauracil (Abbildung 19) liefert einen weiteren, genetischen Hinweis auf die Beteiligung von Cdc48 und Shp1 an Prozessen, die Transkriptions-Elongation beeinflussen. Eine verringerte Sensitivität auf 6-AU kann auch in *rsp5*-Deletionsmutanten ( $\Delta$ *rsp5*), in denen die Ubiquitylierung von RNA-Polymerase II verringert ist, gleichermaßen beobachtet werden (ohne Abbildung).

Bei der quantitativen Analyse modifizierter Histone in *cdc48-6* und  $\Delta$ *shp1* Mutanten konnte eine verringerte Menge der an Lysin 4 tri-methylierten Spezies des Histons H3 (H3K4me<sub>3</sub>) im Vergleich zu Wildtyp-Zellen (WT) beobachtet werden. Ebenfalls ist in  $\Delta$ *shp1* Mutanten der Anteil der mono-ubiquitylierten Spezies von Histon H2B gegenüber WT-Zellen erniedrigt (ohne Abbildung). Diese beiden Befunde deuten zusätzlich auf eine Funktion von Cdc48 und Shp1 in der Transkriptions-Elongation hin.

Cdc48 scheint zusammen mit seinem Kofaktor Shp1 für eine effiziente Expression von *GAL*-Genen notwendig zu sein. Zusammen mit dem hohen Chromatin-Besatz von Cdc48 an Gen-Promotoren und der spezifischen Rekrutierung von Cdc48 und Shp1 an induzierte Gene liefern diese Beobachtungen deutliche Hinweise, dass Cdc48-Shp1-Komplexe eine wichtige Rolle für effiziente Transkription spielen könnten. Indirekte Ursachen der beobachteten Defekte in der Gen-Aktivierung in Mutanten von *cdc48* und *shp1* sind allerdings formal beim bisherigen Stand der Untersuchungen nicht gänzlich auszuschließen. In diesen Mutanten könnte unter Umständen die Expression genereller Transkriptions-Faktoren erniedrigt sein. Jedoch sprechen die hier gemachten Beobachtungen - insbesondere die Transkriptions-spezifische Chromatin-Assoziation von Cdc48 - für eine Wirkung von Cdc48 in unmittelbarer Nähe des Transkriptionsereignisses. Auf welche Substrate Cdc48 dabei wirkt und ob dies Ubiquitin-spezifisch ist, sind

bisher offene Fragen. Möglicherweise dient die Aktivität von Cdc48 der Segregation von Transkription-blockierenden Protein-Interaktionen und ermöglicht so eine effiziente Transkription.

## **Die Bildung von ssDNA an Bereichen starker Transkription**

In dieser Arbeit wurden umfangreiche Untersuchungen zur Rekrutierung des Varianten-Histons H2A.Z und des ssDNA-bindenden Komplexes RPA nach Induktion eines einzelnen DSB vorgenommen. Induktion des DSB erfolgte dabei mit Galaktose und folgender Expression der HO-Endonuklease (Abbildung 4, Abbildung 11). Bei diesen Untersuchungen wurden genomweite Datensätze aufgenommen, die auch eine Analyse der induzierten *GAL*-Gene ermöglichen. Dabei wurden interessante Änderungen des Chromatin-Besatzes mit H2A.Z und RPA an diesen Genen deutlich.

## **Verlust von H2A.Z auf *GAL*-Genen durch Transkriptions-Induktion**

In einer Studie von Mizuguchi *et al.* wurde die biochemische Reinigung des SWR-Komplexes beschrieben und seine Funktion beim Einbau des Varianten-Histons H2A.Z in Chromatin untersucht<sup>43</sup>. SWR könnte nicht nur für den Einbau von H2A.Z, sondern auch für den Verlust von H2A.Z an stark transkribierten Bereichen des Chromatins verantwortlich sein. Diese Aktivität von SWR ist allerdings bisher nicht beschrieben. Der allgemeine, Transkriptions-assoziierte Verlust von Histonen (*histone-eviction*) wird durch den RNAPol II-assoziierten FACT-Komplex katalysiert.

H2A.Z geht durch Induktion mit Galaktose besonders stark auf einem scharf begrenzten Bereich auf Chromosom II verloren. Dieser deutliche Verlust von H2A.Z liegt im Bereich der *GAL7-1*-Gengruppe und korreliert mit der Transkriptions-Induktion dieser Gene (Abbildung 20).

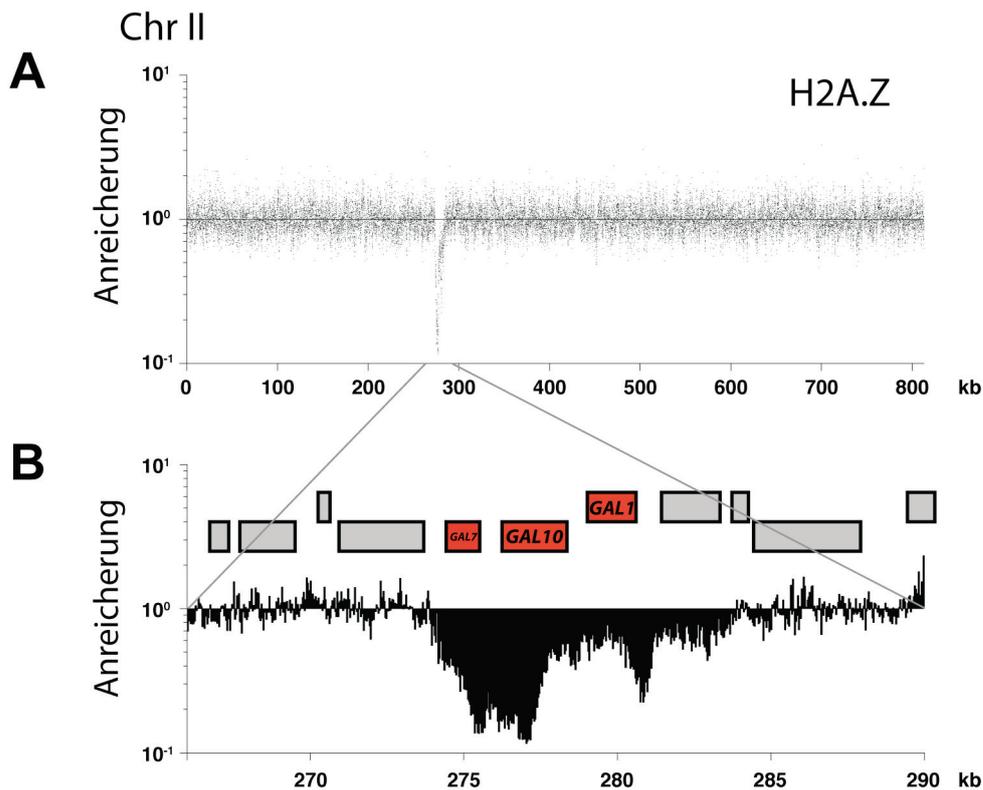


Abbildung 20 **Relative Anreicherung von H2A.Z auf Chromosom II durch 60 Minuten Induktion mit Galaktose.** (A) Htz1<sup>3HA</sup>-gerichtete ChIP-on-chip Analyse. Abgebildet sind Anreicherungs-Faktoren von Htz1<sup>3HA</sup> auf Chromosom II. Der Datensatz für 60 Minuten Induktion wurde auf den 0 min Datensatz normalisiert. Abgebildete Daten entsprechen der Analyse aus Abbildung 5 B. (B) Vergrößerung des Bereichs um die *GAL7-1*-Gengruppe auf Chromosom II. Die Position von Genen ist durch rechteckige graue Kästen markiert, *GAL*-Gene durch rote. Relative Anreicherungen sind auf einer log<sub>10</sub>-Skala über die genomische Position in kb aufgetragen.

Der Verlust von H2A.Z ist weitgehend auf die transkribierten Bereiche der induzierten *GAL*-Gene beschränkt. Jedoch findet sich in der Terminator-Region des Gens *GAL1* ein besonders stark ausgeprägter Abfall des detektierten Signals für H2A.Z (Abbildung 20 B). Ein spezifischer Verlust von H2A.Z findet auch an anderen induzierten *GAL*-Genen wie *GAL2* statt. Hingegen sind an anderen Stellen genomweit keine deutlichen Änderungen des Chromatin-Besetzes mit H2A.Z zu beobachten.

Für eine Quantifizierung des Verlustes von H2A.Z an induzierten Genen, der mit dem allgemeinen Verlust von Histonen einhergeht, wären allerdings Untersuchungen notwendig, die eine quantitative Bezugsgröße einschließen. So könnte beispielsweise der Verlust von H2A.Z auf die detektierte Menge anderer Histone wie Histon H3 bezogen werden. Histon H3

findet sich jedoch ebenfalls deutlich verringert an Bereichen starker Transkription, so dass absolute Quantifizierungen in stark transkribierten Bereichen technisch nicht einfach sind.

Der beobachtete Verlust von H2A.Z auf stark induzierten Genen ist aus mehreren Untersuchungen bekannt<sup>25</sup>. Jedoch liefert hier eine ähnliche Analyse für den ssDNA-bindenden Komplex RPA sehr überraschende Ergebnisse.

### **Der ssDNA-bindende RPA-Komplex wird an induzierte *GAL*-Gene rekrutiert**

RPA ist nach Induktion mit Galaktose spezifisch an *GAL*-Genen angereichert (Abbildung 21). Diese Anreicherung ist bereits 30 Minuten nach Induktion zu beobachten und bleibt bei konstanter Induktion über mehrere Stunden bestehen. Analog zu oben beschriebenen Untersuchungen (Abbildung 11) wurden dafür gegen Rfa1<sup>9myc</sup> gerichtete, genomweite ChIP-on-chip Profile analysiert. Datensätze für eine Induktion von 60 Minuten sind in Abbildung 21 dargestellt.

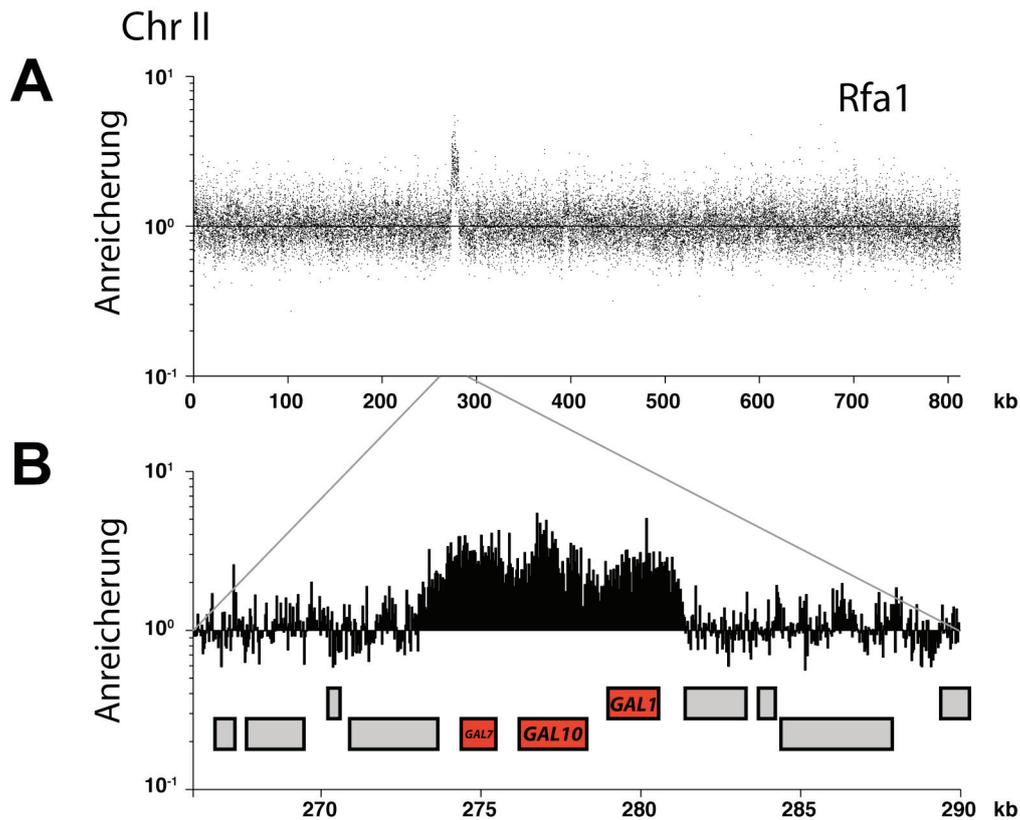


Abbildung 21 **Relative Anreicherung von Rfa1 auf Chromosom II durch 60 Minuten Induktion mit Galaktose.** (A) Rfa1<sup>9myc</sup>-gerichtete ChIP-on-chip Analyse. Abgebildet sind Anreicherungs-Faktoren von Rfa1<sup>9myc</sup> auf Chromosom II. Der Datensatz für 60 Minuten Induktion wurde auf den 0 min Datensatz normalisiert. Abgebildete Daten entsprechen der Analyse aus Abbildung 11. (B) Vergrößerung des Bereichs um die GAL7-1-Gruppe auf Chromosom II. Die Position von Genen ist durch rechteckige graue Kästen markiert, GAL-Gene durch rote. Relative Anreicherungen sind auf einer log<sub>10</sub>-Skala über die genomische Position in kb aufgetragen.

Die Anreicherung von RPA erfolgt sehr schnell auf Genen der GAL-Gengruppe auf Chromosom II aber auch an anderen GAL-Genen wie GAL2 oder in geringerem Maße GAL80. Eine Analyse der Feinstruktur der RPA-Anreicherung zeigt, dass die induzierte Anreicherung mit RPA spezifisch den gesamten transkribierten Bereich der GAL-Gengruppe auf Chromosom II betrifft. Promotor-Regionen der induzierten Gene werden geringer mit RPA angereichert als kodierende Bereiche (Abbildung 21 B).

DNA-assoziiertes RPA wird generell mit Bereichen einzelsträngiger DNA (ssDNA) in Verbindung gebracht. Die bemerkenswerte Anreicherung

induzierter Gene mit dem ssDNA-bindenden Komplex RPA legt nahe, dass sich dort ssDNA bildet, die innerhalb kürzester Zeit RPA bindet.

Die beobachtete Anreicherung von RPA an induzierten *GAL*-Genen ist relativ gering. Dies wurde mittels quantitativer PCR aus nicht-amplifizierten CHIP-Proben bestimmt, da eine solche Abschätzung ausschließlich aus CHIP-on-chip Daten nicht möglich ist. Eine geringe Anreicherung kann Hinweise auf eine schwache, möglicherweise indirekte DNA-Assoziation von Proteinen liefern. Sie kann aber auch nur in einer sehr kleinen Subpopulation von Zellen auftreten. Diese Möglichkeiten lassen sich formal aufgrund von CHIP-Analysen nicht unterscheiden.

Die hier beobachtete Rekrutierung von RPA durch Geninduktion könnte eine wichtige Rolle bei der Regulation von Transkription spielen. Während der Transkription muss das DNA-Hybrid aufgeschmolzen werden, der kodierende DNA-Strang wird von RNAPol II abgelesen. Dabei bleibt er von seinem komplementären DNA-Strang getrennt. Möglicherweise ist die hier detektierte Anreicherung von RPA bei starker Induktion der Transkription Hinweis auf eine transiente, kotranskriptionelle Bindung von RPA an den nicht-transkribierten DNA-Strang. Genauere Untersuchungen, ob RPA mit dem kodierenden oder dem dazu gegenläufigen DNA-Strang assoziiert, könnten Hinweise auf eine mögliche Funktion der kotranskriptionellen Bildung von ssDNA liefern.

## **Regulation der Transkriptions-Aktivierung durch SUMO und Ubiquitin**

Die korrekte Transkription von Genen wird durch ein komplexes Zusammenspiel von Regulatoren, generellen Transkriptions-Faktoren und der Struktur von Chromatin sichergestellt. Dabei müssen Transkriptions-Proteine zur richtigen Zeit am richtigen Ort wirken. Post-translationale Verknüpfungen mit Ubiquitin und SUMO können dabei die biologische Aktivität von Transkriptions-Faktoren regulieren.

Meist liegt *in vivo* nur ein Teil der zu untersuchenden Proteine in ubiquitylierter oder SUMOylierter Form vor. Eine Möglichkeit, die Funktion modifizierter Spezies von Proteinen zu untersuchen, ist die Herstellung von linearen Fusions-Proteinen mit Ubiquitin oder SUMO. Diese Hybrid-Proteine können modifizierte Spezies möglicherweise ersetzen. Da Ubiquitin und SUMO über C-terminale Glycin-Reste an ihre Substrate konjugiert werden, wird in dieser Arbeit Ubiquitin oder SUMO in linearen Fusions-Proteinen N-terminal fusioniert. So steht das Doppel-Glycin (GG) von Ubiquitin oder SUMO nicht mehr für eine mögliche Konjugation an weitere Proteine zur Verfügung. Mittels linearer, N-terminaler Fusion von Ubiquitin wurde in einer Studie von Salghetti *et al.* die Ubiquitin-spezifische Aktivierung eines Modell-Transkriptions-Faktors untersucht<sup>111</sup>.

### **SUMO und Transkriptions-Repression**

SUMOylierung von Transkriptions-Faktoren hat in den meisten untersuchten Fällen eine starke Verminderung ihres Potenzials zur Aktivierung von Transkription zur Folge. Wie die starke Repression von Transkription durch SUMO mechanistisch vor sich geht, wenn keine Inaktivierung durch intranukleäre Relokalisation zu beobachten ist, ist jedoch weitgehend unklar. Dies scheint für eine Fülle von untersuchten Transkriptions-Faktoren der Fall zu sein. Ihre SUMOylierten Formen können in vergleichbarem Maße an

Zielgenen durch ChIP-Analysen detektiert werden. Daher scheiden eine Destabilisierung der SUMOylierten Proteine oder veränderte Bindungscharakteristika zu Zielgenen als Ursachen verringerter Transkriptions-Aktivierung meist aus. Die SUMOylierung scheint die Funktion der Transaktivierungs-Domäne DNA-gebundener Transkriptions-Faktoren am Zielgen zu reprimieren.

In dieser Arbeit wurde ein genetisches Modellsystem konzipiert, das eine direkte Untersuchung der Funktion von SUMO in der Transkriptions-Repression in Kombination mit genetischen Suchen ermöglicht. Dazu wurde ein Reporter-gen-System in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* entwickelt, das eine Untersuchung der Funktion von SUMO-Fusions-Proteinen ermöglicht. Auf diese Weise kann die SUMOylierung von Transkriptions-Faktoren experimentell substituiert werden. In diesem System können durch genetische Suchen Suppressoren identifiziert werden, die in hoher Kopienzahl einem Effekt von SUMO bei der Transkriptions-Repression entgegenwirken (*high copy number suppressor screen*).

### **Reporter-gen-System zur Untersuchung modulierter Transkriptions-Aktivierung**

Für Untersuchungen zur Funktion von SUMO (Smt3 in *S. cerevisiae*) bei der Repression von Transkriptions-Faktoren wurde ein Modell-Transkriptions-Faktor mit einer definierten DNA-Bindedomäne (LexA) und einer starken Transaktivierungs-Domäne (TAD) als Fusions-Protein mit SUMO exprimiert. Die DNA-bindende LexA-Domäne allein aktiviert dabei die Transkription der Reportergene nicht. Als Reportergene dienen *HIS3* und *URA3*, als starke Transaktivierungs-Domäne wurde die VP16-Sequenz eines viralen Transkriptions-Faktors aus *Herpes simplex* fusioniert. Expression von LexA-VP16 Fusions-Proteinen führt zu einer Aktivierung der Reportergene. Ist jedoch zusätzlich SUMO an den Modell-Transkriptions-Faktor fusioniert, findet keine Aktivierung der Reportergene mehr statt (Abbildung 22).

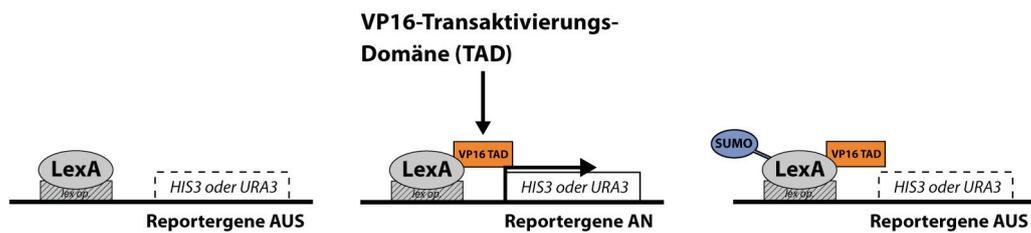


Abbildung 22 **Schematische Darstellung des experimentellen Systems.** Ein Fusions-Protein aus DNA-bindender LexA-Domäne, starker Transaktivierungs-Domäne (VP16-TAD) und linearer N-terminaler Smt3-Fusions-Domäne (SUMO) bindet an genomisch stabil integrierte DNA-Bindestellen (*lexop*). Expression der Reportergene *HIS3* und *URA3* wird durch das Hybrid-Protein kontrolliert. (A) LexA alleine führt nicht zu einer Reportergen-Aktivierung. (B) LexA-VP16 aktiviert die Reportergene. (C) Durch SUMO-Fusion geht das Transkriptions-Aktivierungs-Potenzial von LexA-VP16 verloren und die kontrollierten Reportergene werden nicht aktiviert.

Lineare N-terminale Fusions-Proteine von SUMO sind prinzipiell Substrate für SUMO-spezifische Isopeptidasen wie Ulp1. Um eine Abspaltung des SUMO-Teils vom Fusions-Protein durch Isopeptidasen zu verhindern - dies würde einen nicht-modifizierten, aktiven Transkriptions-Faktor generieren - wurde zunächst das Doppel-Glycin (GG) zwischen SUMO und dem Fusions-Protein zu Glycin-Alanin (GA) mutiert. Eine Mutation der GG-Verknüpfung (*linker*) zu GA verhindert die Abspaltung des SUMO-Teils vom Restprotein weitgehend. Überexpression der Isopeptidase Ulp1 führt allerdings zu einer Spaltung von SUMO und LexA-VP16 am GA-*linker*. Daher wurde der *linker* zu Alanin-Valin (AV) mutiert. Dieser optimierte *linker* führt auch bei Überexpression von *ULP1* nicht zu einer Abspaltung von SUMO (ohne Abbildung).

Die Fusion mit SUMO bewirkt eine starke Repression des Potenzials zur Transkriptions-Aktivierung. Die Funktion der starken Transaktivierungs-Domäne (TAD) VP16 scheint durch SUMO-Fusion inhibiert zu sein. In folgenden Untersuchungen wurde der optimierte Modell-Transkriptions-Faktor SUMO-LexA-VP16 (SLV) zur Untersuchung der Funktion dieser SUMO-Repression verwendet.

Zunächst wurde untersucht, ob die beobachtete Repression von LexA-VP16 durch Fusion mit SUMO möglicherweise durch eine veränderte Menge Chromatin-gebundener Fusions-Proteine zu erklären ist. Jedoch zeigt eine ChIP-Analyse, dass die Fusion mit SUMO (SLV) oder HA-Epitop-markiertem SUMO (<sup>HA</sup>SLV) die Bindung der Modell-Transkriptions-Faktoren an ihre Zielsequenz *lexop* nicht verändert (Abbildung 23).

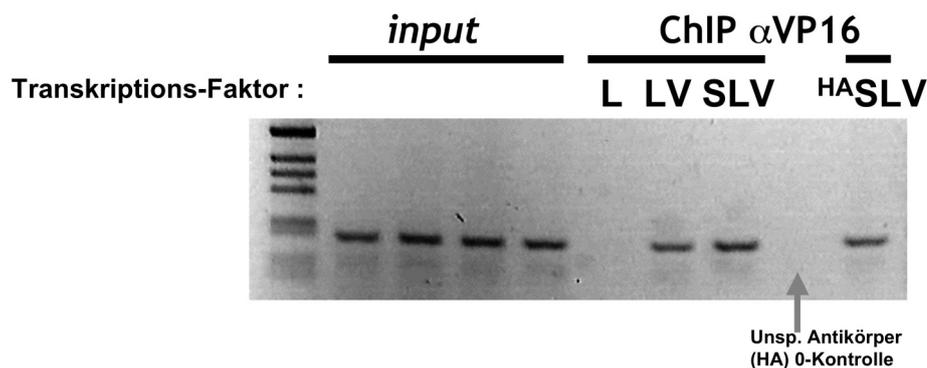


Abbildung 23 **Die Chromatin-Bindung der Modell-Transkriptions-Faktoren wird durch SUMO-Fusion nicht beeinträchtigt.** Mittels spezifischer Antikörper gegen die VP16-Transaktivierungs-Domäne wurde in ChIP-Experimenten die Bindung der exprimierten Faktoren LexA (L), LexA-VP16 (LV), SUMO-LexA-VP16 (SLV) und <sup>HA</sup>SUMO-LexA-VP16 (<sup>HA</sup>SLV) an die *lexop*-Sequenz untersucht. Eine Kontrolle unspezifischer Hintergrund-Bindung (grauer Pfeil) wurde mit HA-spezifischen Antikörpern in einem Stamm durchgeführt, der SLV ohne HA-Epitop exprimiert. Abgebildet ist eine Agarose-Gelanalyse mit Ethidium-Bromid Färbung durch ChIP angereicherter und mittels spezifischer Primer für *lexop* amplifizierter DNA.

Die Repression der starken VP16-TAD durch SUMO scheint am Ort der Transaktivierung stattzufinden. Um Faktoren zu identifizieren, die an dieser Repression beteiligt sind, wurde im Folgenden genetisch eine Plasmid-Bibliothek nach Suppressoren durchsucht, die SUMO-Repression inhibieren. Diese *high copy number* Suppressoren führen zu einer Aktivierung des Reportergens *HIS3* und können durch Selektion auf Histidin-freiem Medium (SC -His) isoliert werden.

## Suppressoren der SUMO-Inhibition in der Transkriptions-Aktivierung

Nach Überexpression einer Gen-Bibliothek mit einer durchschnittlichen Fragmentgröße von 5 kb und einer Komplexität von ca. 14000 unabhängigen Klonen wurde auf Bedingungen selektiert, in denen der SUMO-Transkriptions-Faktor das *HIS3*-Reportergen aktiviert. Ohne Expression von Suppressor-Plasmiden ist das Reportergen *HIS3* ausgeschaltet (Abbildung 22). Verschiedene Plasmide wurden in diesem *high copy number suppressor screen* isoliert, in Retransformation getestet, die Fragmentgrenzen sequenziert und kodierende Bereiche nach gemeinsam enthaltenen Genen gruppiert. Die gemeinsamen Gene der *high copy number* Suppressoren mit starkem Wachstum nach Retransformation fallen in nur 5 Gruppen: *LEU3*, *GDS1*, *AZF1*, *HHT2&HHF2* und *RRI2&MSN1* (Tabelle 1).

Plasmid	Gene	Wachstum nach Retransformation	Plasmid	Gene	Wachstum nach Retransformation
red 8	<i>LEU3</i>	+++	red10	<i>AZF1</i>	+
2	<i>LEU3</i>	+++	3	<i>AZF1</i>	+
13	<i>LEU3</i>	+++	7	<i>AZF1</i>	+
20	<i>LEU3</i>	+++	14	<i>AZF1</i>	+
5	<i>LEU3</i>	+++	17	<i>AZF1</i>	+
16	<i>GDS1</i>	+++	18	<i>GDS1</i>	+
15	<i>RRI2&amp;MSN1</i>	+++	22	<i>GDS1</i>	+
			26	<i>GDS1</i>	+
red1	<i>LEU3</i>	++	27	<i>GDS1</i>	+
red7	<i>LEU3</i>	++	22	<i>GDS1</i>	+
red9	<i>LEU3</i>	++	28	<i>HHT1&amp;HHF1</i>	+
red11	<i>LEU3</i>	++	30	<i>HHT1&amp;HHF1</i>	+
15	<i>AZF1</i>	++	31	<i>LEU3</i>	+
16	<i>AZF1</i>	++	33	<i>LEU3?</i>	+
29	<i>AZF1</i>	++	34	<i>rRNA</i>	+
17	<i>AZF1</i>	++	10	<i>SET4-SNR37</i>	+
21	<i>AZF1</i>	++	13	<i>SNF12</i>	+
4	<i>GDS1</i>	++	6	<i>SNR49</i>	+
20	<i>GDS1</i>	++	4	<i>MSN4, YKL061w</i>	+
24	<i>GDS1</i>	++	12	<i>YMR298,DYN3</i>	+
38	<i>GDS1</i>	++			
11	<i>HHT2&amp;HHF2</i>	++			
12	<i>HHT2&amp;HHF2</i>	++			
23	<i>HHT2&amp;HHF2</i>	++			
36	<i>HHT2&amp;HHF2</i>	++	7 mal	<i>ATR1</i>	+++
37	<i>RRI2&amp;MSN1</i>	++			
39	<i>RRI2&amp;MSN1</i>	++			

Tabelle 1 **Isolierte *high copy number* Suppressoren der SUMO-TAD-Inhibition.** Suppressor-Plasmide wurden nach gemeinsamen kodierenden Genen und Wachstum der Reporter-Stämme unter Selektionsbedingungen gruppiert. Die Stärke des Wachstums, angezeigt durch + für schwaches Wachstum bis +++ für sehr starkes Wachstum, liefert einen Hinweis auf die Aktivität des *HIS3*-Reportergens unter selektiven Bedingungen (Histidin-freies Wachstumsmedium, SC-HIS). *LEU3*, *AZF1*, *GDS1*, *RRI2/MSN1* und Gene für die Histone H3 und H4 (*HHT2* und *HHF2*) konnten wiederholt und auf nicht-identischen Plasmiden identifiziert werden. Die Selektion wurde in Gegenwart von 10 mM 3-Aminotriazol (3-AT) durchgeführt. *ATR1* (*amino-triazole resistance*) kodiert für einen bekannten, unspezifischen Faktor, der Wachstum von *S. cerevisiae* unter diesen Bedingungen ermöglicht.

*HHT2&HHF2* ist ein Gen-Lokus, der für die Histone H3 und H4 kodiert, *RRI2&MSN1* kodieren für eine COP9-Signalosom Untereinheit und einen Transkriptions-Aktiviator. *MSN1* wurde als Suppressor von *snf1*-Mutationen isoliert. *LEU3* und *AZF1* kodieren für Transkriptions-Faktoren und *GDS1* für ein uncharakterisiertes Protein. Eine Literatur-Recherche nach bekannten gemeinsamen Funktionen der identifizierten Suppressoren insbesondere in Verbindung mit Gen-*silencing* ergab Gemeinsamkeiten der Gene *LEU3* und *GDS1*<sup>49</sup>. Zunächst musste jedoch sichergestellt werden, dass die beobachtete Suppression auf Überexpression der Suppressoren und nicht auf die hohe Kopienzahl isolierter Suppressor-Plasmide zurückzuführen ist.

### **Überexpression von *silencing barrier* Proteinen revertiert die Funktion von SUMO bei der TAD-Repression**

Die isolierten *high copy number* Suppressor-Plasmide enthalten teilweise bis zu 5 kb große genomische Abschnitte, auf denen mehrere Gene kodiert sind. Um die Suppressor-Funktion auf einzelne Gene einzuschränken, wurden gemeinsame, überlappende Bereiche gleicher Gen-Regionen identifiziert und auf diesen Bereichen liegende Gene vereinzelt kloniert. Suppression der Transkriptions-Inhibition durch SUMO konnte durch Überexpression von *GDS1*, *LEU3*, *AZF1*, *HHT2* und *HHF2* (Histon H3 und H4) auf Plasmiden geringer Kopienzahl beobachtet werden. Damit wirken die Produkte dieser Gene als Hochdosis-Suppressoren (*high dose suppressors*).

Die Genprodukte von *LEU3* und *GDS1* wurden in einer anderen Studie bei einer Suche nach Proteinen identifiziert, die die Ausbreitung transkriptionell stillgelegter (*silenced*) Chromatin-Regionen begrenzen. Leu3 und Gds1 wirken dabei Chromatin-gebunden und wurden als sogenannte *silencing barrier proteins* beschrieben. Wie die Begrenzung von Heterochromatin durch Leu3 und Gds1 mechanistisch stattfindet, ist jedoch unbekannt<sup>49</sup>. Der Suppressions-Effekt von *silencing barrier* Proteinen ließ vermuten, dass *silencing* und die Bildung von Heterochromatin bei der Repression von Transkriptions-Aktivierung durch SUMO in *S. cerevisiae* eine

Rolle spielen könnte. Daher wurde die Transkriptions-Repression der SUMO-Transkriptions-Faktoren in *sir*-Deletionsmutanten ( $\Delta sir1$ ,  $\Delta sir2$ ,  $\Delta sir3$  und  $\Delta sir4$ ) untersucht, in denen die Bildung von Sir-bedecktem Heterochromatin nicht mehr stattfinden kann.

### **Sir-Proteine sind für eine effiziente Repression des Modell-Transkriptions-Faktors durch SUMO notwendig**

Heterochromatin ist in *S. cerevisiae* mit einem Komplex der Proteine Sir2, Sir3 und Sir4, die zusammen den SIR-Komplex bilden, bedeckt. Auf Heterochromatin bildet SIR Nukleoprotein-Filamente. Deletionsmutanten der *SIR*-Gene *SIR2*, *SIR3* und *SIR4* ( $\Delta sir2$ ,  $\Delta sir3$  und  $\Delta sir4$ ) weisen starke Defekte in der Bildung von Heterochromatin und *silencing* auf. Sir1 besitzt Funktionen bei der Rekrutierung von Sir-Proteinen und spielt eine wichtige Rolle bei der Etablierung von Heterochromatin; die anderen Proteine des SIR-Komplexes sind für die Aufrechterhaltung von Heterochromatin notwendig.

Durch Herstellung von Deletionsmutanten der einzelnen *SIR*-Gene wurde untersucht, ob die beobachtete SUMO-TAD-Repression von Sir-vermitteltem *silencing* abhängt. Dabei wurden SUMO-Fusions-Proteine mit und ohne HA-Epitop-Markierung des SUMO-Teils exprimiert (SLV und <sup>HA</sup>SLV). Die Repression der starken VP16-TAD durch Fusion mit <sup>HA</sup>SUMO scheint in den Deletionsmutanten  $\Delta sir2$ ,  $\Delta sir3$  und  $\Delta sir4$  deutlich verringert zu sein (Abbildung 24).

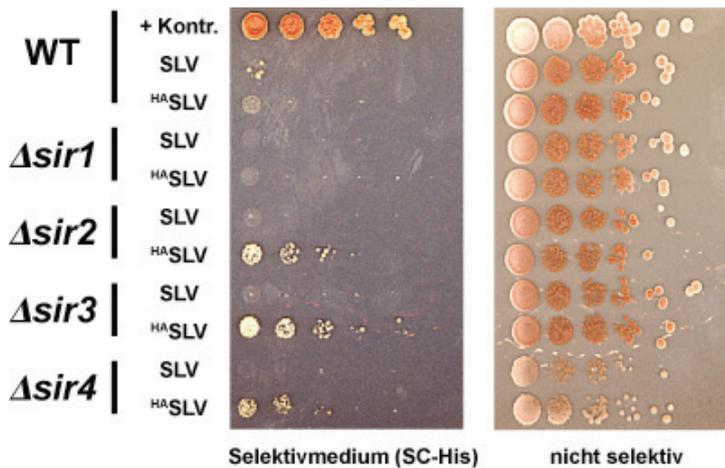


Abbildung 24 **SIR-Gene sind für eine effiziente Repression des <sup>HA</sup>SUMO-Transkriptions-Faktors notwendig.** In den Deletionsmutanten  $\Delta sir2$ ,  $\Delta sir3$  und  $\Delta sir4$  ist die Repression des <sup>HA</sup>SUMO-Transkriptions-Faktors (<sup>HA</sup>SLV) weniger effizient als in Wildtyp-Zellen (WT) oder  $\Delta sir1$ -Mutanten. Das Fusions-Protein von Lex-VP16 mit SUMO ohne Epitop-Markierung (SLV) ist in allen untersuchten *sir*-Mutanten effizient reprimiert. Gleiche Mengen an Zellen wurden in fünffachen seriellen Verdünnungsreihen auf Platten mit selektivem Wachstumsmedium (SC-His) und nicht-selektive Platten ausgebracht. Als Positiv-Kontrolle (+ Kontr.) diente Expression des aktiven LexA-VP16 Transkriptions-Faktors.

In *sir1*-Deletionsmutanten ( $\Delta sir1$ ) scheint die effiziente Repression der TAD durch SUMO-Fusion allerdings nicht beeinflusst zu sein. Die beobachtete Abhängigkeit der SUMO-Repression von *SIR*-Genen ist nur für Fusions-Proteine mit Epitop-markiertem SUMO (<sup>HA</sup>SLV) zu beobachten. In Hybrid-Proteinen ohne HA-Epitop (SLV) ist die VP16-TAD in allen untersuchten Mutanten durch SUMO effizient reprimiert (Abbildung 24). Möglicherweise verringert das N-terminale HA-Epitop an SUMO die Bindung SUMO-spezifischer Kofaktoren. Dies wäre konsistent mit der Hypothese, dass die beobachtete TAD-Repression durch SUMO-spezifische Faktoren vermittelt wird. Um solche Faktoren zu identifizieren, kann genetisch nach Mutanten gesucht werden, in denen diese Repression nicht mehr auftritt. Dazu bietet die Kollektion von Deletionsmutanten nicht-essentieller Gene in *S. cerevisiae* eine geeignete Möglichkeit. Diese Kollektion ist in Roboter-basierten genetischen Suchen (*screens*) bereits erfolgreich zur Suche nach genetischen Interaktionen wie z.B. in *screens* auf synthetische Letalität oder Epistasis-Analysen eingesetzt worden.

## **Genetische Suche nach notwendigen Faktoren für die SUMO-TAD-Repression**

Für die Roboter-basierte genetische Suche nach notwendigen Faktoren für die SUMO-TAD-Repression wurde ein Plasmid hergestellt, das sowohl ein Reporter-gen enthält als auch für den Modell-Transkriptions-Faktor kodiert. Eine Plasmidkarte sowie Einzelheiten zur Durchführung des *screens* finden sich im Anhang (Abbildung 28).

## **Histon-Chaperone sind für eine effiziente SUMO-Repression notwendig**

Durch den Roboter-basierten *screen* wurden neben weiteren, in gerichteten Kontroll-experimenten nicht reproduzierbaren Treffern die Deletionsmutanten  $\Delta cac2$  und  $\Delta hir3$  identifiziert. In diesen Mutanten aktiviert SUMO-LexA-VP16 die Transkription des verwendeten Reporter-gens. *CAC*- und *HIR*-Gene kodieren für unterschiedliche Klassen von Histon-Chaperonen. Zusammen mit den zuvor identifizierten Genen für die Histone H3 und H4 als *high dose* Suppressoren liefert dies Hinweise darauf, dass der Einbau von Histonen für die Funktion von SUMO bei der Repression von TAD eine Rolle spielen könnte (Abbildung 25).

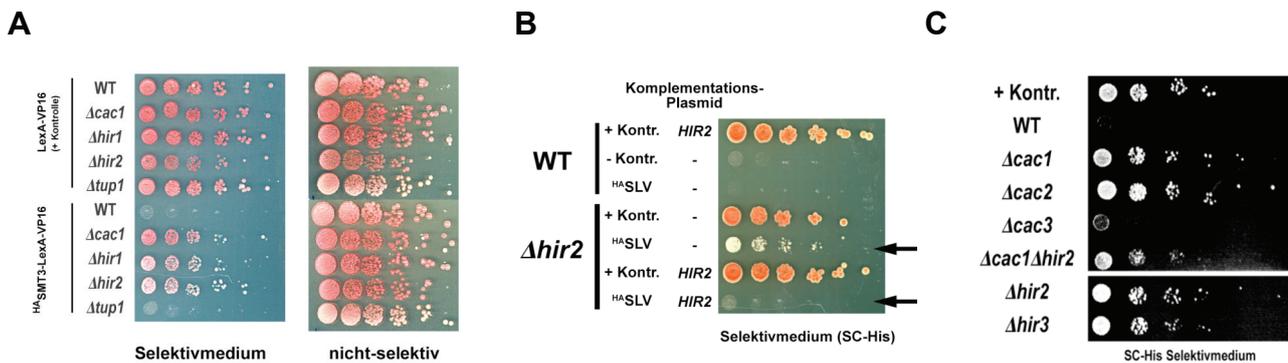


Abbildung 25 **Die Histon-Chaperone der CAF- und HIR-Komplexe sind für eine effiziente SUMO-Repression notwendig.** (A) Die TAD-Repression durch Fusion mit SUMO ist in Deletionsmutanten von Genen, die für Untereinheiten der CAF- und HIR-Komplexe kodieren ( $\Delta cac1$ ,  $\Delta hir1$ ,  $\Delta hir2$ ), deutlich verringert. Deletionsmutanten von  $TUP1$  ( $\Delta tup1$ ) weisen keinen Defekt in SUMO-vermittelter TAD-Repression auf. Untersucht wurde TAD-Repression durch Fusion mit SUMO, das N-terminal ein HA-Epitop trägt ( $^{HA}$ SUMO-LexA-VP16). Expression von LexA-VP16 diente als Positiv-Kontrolle (+). (B) Komplementation von  $hir2$ -Deletionsmutanten mit Plasmid-kodiertem  $HIR2$ . Die experimentelle Anordnung ist analog zu (A).  $HIR2$ -Plasmide können den Defekt von  $hir2$ -Mutanten ( $\Delta hir2$ ) komplementieren, Plasmide ohne  $HIR2$  (-) nicht. (C)  $CAC$ - und  $HIR$ -Gene sind in der SUMO-TAD-Repression epistatisch. In einer  $cac1, hir2$ -Doppelmutante ( $\Delta cac1 \Delta hir2$ ) kann keine Verringerung der SUMO-TAD-Repression gegenüber Einzelmutanten beobachtet werden. Deletion des Gens für  $CAC3$  ( $\Delta cac3$ ) führt zu einer geringen Inhibition der SUMO-TAD-Repression. In (C) wurde Die Repression einer VP16-TAD durch Fusion mit SUMO ohne Epitop-Markierung (SUMO-LexA-VP16) untersucht.

Eine Verringerung der TAD-Repression durch SUMO wurde ebenfalls in Deletionsmutanten von  $ASF1$ , dem Gen für das Histon-Chaperon  $Asf1$  (*anti silencing function 1*) beobachtet. Der Verlust von effizientem *silencing* in *S. cerevisiae* in Mutanten von Histon-Chaperonen ist ein bekannter Effekt<sup>45</sup>. Wie dieser genetische Zusammenhang jedoch genau zu erklären ist, ist bisher nicht vollständig klar. Möglicherweise ist in diesen Mutanten die Struktur von Chromatin generell verändert. Beim Einbau von Histonen in Chromatin erfüllen die unterschiedliche Histon-Chaperone teilweise redundante Funktionen. Die Repression der TAD-Funktion durch SUMO weist hinsichtlich genetischer Interaktionen mit Histon-Chaperonen bemerkenswerte Gemeinsamkeiten zu Heterochromatin-*silencing* subtelomerer Loci oder der stillen *MAT*-Loci  $HML$  und  $HMR$  auf. Möglicherweise sind die zugrunde liegenden Mechanismen ähnlich. Die genetische Verknüpfung von SUMO-vermittelter TAD-Repression mit Faktoren, die für die Struktur und Integrität von Chromatin nötig sind, liefert Hinweise auf einen möglichen mechanistischen Zusammenhang. Welche Änderungen in Chromatin-Struktur

und -Dynamik durch SUMO lokal ausgelöst werden, müssen jedoch weitergehende Studien klären.

In folgenden Untersuchungen konnte hier durch mRNA-Quantifizierung von Reporter genen beobachtet werden, dass diese weiterhin exprimiert werden, wenn sie unter Kontrolle des SUMO-Transkriptions-Faktors stehen. Interessanterweise interagiert der identifizierte *high dose suppressor* Leu3 mit dem Protein Dcp1 bei Immuno-Präzipitation (ohne Abbildung). Dcp1 ist Teil des die <sup>m7</sup>G-cap von mRNA entfernenden Enzymkomplexes (*decapping enzyme*), der wesentlichen Einfluss auf die Stabilität von mRNA ausübt. Dies könnte Hinweise auf eine Inhibition der effizienten Expression von Genen durch SUMO auf der Ebene der Stabilität von mRNA liefern. Die hier identifizierten genetischen und biochemischen Interaktionen bieten möglicherweise die Grundlage für weitere vielversprechende Untersuchungen der Wechselwirkung von SUMO-Signalen, Chromatin-Struktur und mRNA-Stabilität.

## Diskussion

### *Choreografie der Ereignisse auf dem gebrochenen Chromosom*

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass die zelluläre Reaktion auf persistierende DNA-Doppelstrangbrüche eine vielschichtige Choreografie von Ereignissen auslöst, die selektiv das gebrochene Chromosom betrifft. Die ersten Schritte sind dabei mit den Ereignissen zu Beginn homologer Rekombination vergleichbar. Nach Erkennung des DSB erfolgt seine Prozessierung und beginnende Homologiesuche. Die Identifikation von H2A.Z als neuem Faktor, der spezifisch in der Nähe von DNA-DSBs akkumuliert, erweitert das Bild früher Vorgänge bei der Erkennung von DSBs wesentlich. Diese Änderung der Chromatin-Struktur als Reaktion auf einen Bruch im Chromatin ist eng mit frühen Ereignissen bei der Einleitung von Reparatur verknüpft.

Nachfolgende Schritte der zellulären Reaktion auf einen persistenten DSB scheinen sich nur vollständig zu manifestieren, wenn sich die Suche nach Homologie fortsetzt. Die Rekombinase Rad51 assoziiert in diesem Fall mit außerordentlich großen Bereichen des geschädigten Chromosoms. Diese unerwartet stark ausgeprägte und sich über Bereiche von mehreren hunderttausend Basen erstreckende Assoziation von Rad51 zeigt, dass die folgenden Ereignisse auf persistente DSBs chromosomenweit erfolgen (Abbildung 26).

Interessanterweise wurde vor kurzem in einer anderen Studie gezeigt, dass ein persistenter DSB auch zu einer deutlichen Anreicherung der phosphorylierten Form von H2A (phospho-H2A an Serin 129 oder  $\gamma$ H2A.X) auf nahezu dem gesamten Chromosom führt. Diese durch CHIP-on-chip im selben experimentellen System gemessene, chromosomenweite Anreicherung von  $\gamma$ H2A.X weist bemerkenswerte Parallelen zur hier beobachteten Assoziation von Rad51 auf<sup>112</sup>. Chromosomenweite Reaktionen

wurden ebenfalls für eine DSB-induzierte Anreicherung von Komponenten des Cohesin-Komplexes, der Schwester-Chromatiden zusammenhält, beobachtet. DNA-DSBs lösen eine anhaltende Rekrutierung des Cohesin-Komplexes aus, der vom DSB ausgehend auf dem beschädigten Chromatin akkumuliert<sup>112</sup>. Dieses Verhalten spiegelt die hier hochauflösend untersuchte, DSB-induzierte Rekrutierung von RPA und Rad51 wieder. Interessanterweise weist die Rekrutierung von Cohesin-Komplexen sehr große Ähnlichkeiten zur Akkumulation von RPA auf. Cohesin breitet sich vom DSB ausgehend aus und bleibt dabei weitgehend auf Bereiche beschränkt, in denen hier eine Rekrutierung von RPA beobachtet wurde. Die möglichen Grenzen der Bildung von Einzelstrang-DNA, die der Assoziation von RPA vorausgehen muss, scheinen ebenfalls die Ausbreitung von Cohesin zu verhindern.

Zu späten Zeitpunkten ist eine Relokalisierung des DNA-DSB an die Zellkern-Peripherie zu beobachten. Diese erfolgt nur, wenn der DSB persistiert und erfordert neben der Aktivierung des *checkpoints* die Rekombinase Rad51. Rad51 bleibt bis zur Relokalisation des DSB mit weiten Teilen des geschädigten Chromosoms assoziiert. Daher hängen DSB-Relokalisierung und Homologiesuche durch Rad51 sehr wahrscheinlich funktionell zusammen (Abbildung 26).

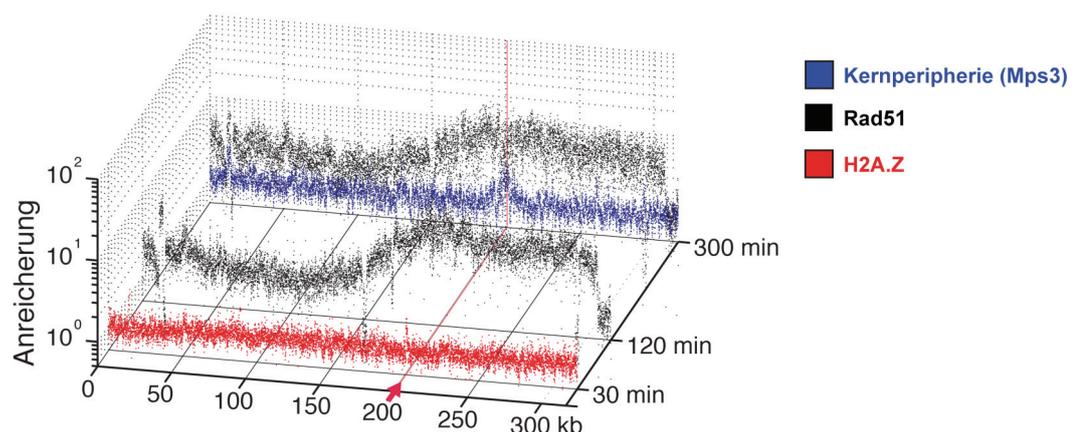


Abbildung 26 **Choreografie der chromosomalen Ereignisse nach Induktion eines persistenten DSB**. Zusammenfassung der Daten der Abbildungen 5, 9 und 12. Die Position des DSB ist durch einen roten Pfeil gekennzeichnet. Um die relative Anreicherung zu erhalten, wurden ChIP-Datensätze (IP) auf die entsprechenden Datensätze vor Induktion und im Falle von Mps3<sup>9myc</sup> (Kernperipherie) auf den 30 Minuten-Datensatz normalisiert. Die Z-Achse ist in log<sub>10</sub>-Skala abgebildet.

Welcher Natur ist nun die Immobilisierung des persistenten DSB an der Zellkern-Peripherie? Hochauflösende ChIP-on-chip Analysen zeigen, dass beide Enden des DSB dort symmetrisch assoziieren. Jedoch ist diese intranukleäre Relokalisierung nicht notwendigerweise die Folge eines aktiven Transports des DSB. Möglicherweise wird bei langem Bestehen eines gebrochenen Chromosoms seine freie Beweglichkeit innerhalb des Zellkerns eingeschränkt. Dies kann durch erhöhte Bindung von Proteinen erfolgen, die ihrerseits an der Kernperipherie immobilisiert sind. An der Zellkern-Wand fixiert sind naturgemäß Transmembran-Proteine der Zellkern-Membran oder Strukturen wie Kernporen-Komplexe, die Kanäle durch die Zellkern-Wand bilden. Letztlich besteht die Frage, welche Faktoren die Anker für DSBs an der Zellkern-Peripherie darstellen. Auf Seite der DNA erscheinen Histone und weitere Chromatin-assoziierte Faktoren dabei unwahrscheinlich, da zum Zeitpunkt der Relokalisation des DSB die betroffenen Bereiche weitgehend aus einzelsträngiger DNA bestehen. Auf Seite der Zellkern-Peripherie kommen mehrere mögliche Bindepartner des DSB in Frage.

Durch ChIP-Experimente konnte die Anreicherung mehrerer untersuchter Faktoren, die sich in der Zellkern-Peripherie befinden, an den persistenten DSB beobachtet werden. Nach Formaldehyd-Fixierung ist eine präzise Unterscheidung, welche Faktoren direkt und welche indirekt assoziieren, nicht möglich. Sämtliche untersuchte Faktoren folgen einer ähnlichen Kinetik der DSB-Assoziation. Daher scheint die Verankerung des DSB über weite Teile der Zellkern-Peripherie zu erfolgen. Die laterale Diffusion des DSB an der Zellkern-Innenwand nach DSB-Fixierung ist deutlich eingeschränkt, wie in einer kürzlich erschienen Studie von Nagai *et al.* demonstriert wird<sup>96</sup>. Die Relokalisierung des DNA-DSB an die Zellkern-Peripherie wird von Nagai *et al.* mit Komponenten der Kernpore und der dort lokalisierenden SUMO-spezifischen Ubiquitin-Ligase Slx5/Slx8 in Verbindung gebracht. In *slx5/8*-Deletionsmutanten erfolgt jedoch eine Relokalisierung des DSB zur Zellkern-Peripherie, so dass die Funktion von Slx5/Slx8 bei diesem Phänomen weiter unklar bleibt. In jener Studie wurde beobachtet, dass die Relokalisierung des DSB in Mutanten von Kernporen-Komponenten gestört ist<sup>96</sup>. Tatsächlich weisen Mutanten von Kernporen-Komponenten neben Defekten in DNA-Reparatur eine Erhöhung der DNA-Rekombinations-

Frequenz auf. Jedoch können diese Effekte auch pleiotrope Ursachen haben, da Mutationen in Teilen der Kernpore weitreichende Konsequenzen haben können. Diese reichen von verändertem Protein-Import in den Zellkern bis zu starker Änderung in der Transkription und effektiven Expression durch veränderten Kernexport von mRNA. Möglicherweise betrifft dies für die untersuchten Prozesse essentielle Gene.

Insgesamt ist die postulierte Verankerung des DSB spezifisch an Komponenten des Kernporen-Komplexes nicht ausreichend nachgewiesen. Tatsächlich kommt eine andere kürzlich publizierte Studie zu dem Ergebnis, dass die Verankerung des DSB spezifisch über Mps3, ein Transmembran-Protein der inneren Zellkern-Membran, erfolgt<sup>113</sup>. Die scheinbar kontroversen Befunde ließen sich allerdings erklären, wenn die DSB-Stelle über Mps3 verankert wird, das in seiner lateralen Beweglichkeit in der Zellkern-Membran durch Assoziation mit Kernporen-Komplexen eingeschränkt ist.

Welche weiteren Faktoren mit persistenten DSBs an der Zellkern-Peripherie assoziieren, ist für die Aufklärung der bisher unklaren Funktion der DSB-Verankerung von entscheidender Bedeutung. Möglicherweise dient die Immobilisierung des DSB nicht nur einer lokalen Isolation des beschädigten Teils eines Chromosoms. Falls das gebrochene Chromosom nicht repariert werden kann, ist es existenzbedrohend. Vielmehr scheinen die Vorgänge der zellulären Reaktion auf ein gebrochenes Chromosom hochgeordnet und organisiert zu sein mit dem Ziel, bestmöglich alternative Reparaturwege im Falle gescheiterter Homologiesuche zu nutzen, um das Überleben der Zelle sicherzustellen. Nagai *et al.* zeigen, dass die experimentelle Verankerung des Bruchs an die Kernperipherie Reparatur befördert<sup>96</sup>. Andererseits weisen Mutanten, die hier identifiziert werden und spezifisch keine Lokalisierung des Bruchs an die Kernperipherie mehr zeigen (z.B. *htz1*<sup>K126,133R</sup>), keine erhöhte Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Substanzen auf. Deshalb könnte die Fixierung der DSB-Enden an die Kernperipherie für Zellen aus anderen Gründen günstig sein. Möglicherweise wird die Reparatur der betroffenen Chromatin-Region vorbereitet, falls Homologie schließlich doch identifiziert wird. Diese könnte nach einem Paarungsvorgang zur Verfügung stehen. Vielleicht gewährleistet die Verankerung des DSB an der Zellkern-Peripherie auch die Transkriptions-Aktivität von Genen in Umgebung des DNA-

Schadens. Dies könnte durch Expressionsanalysen von Genen in Nachbarschaft des persistenten DSB untersucht werden.

Die zeitlich und räumlich geordnete Choreografie von vielschichtigen Ereignissen an einem persistenten DSB legt nahe, dass ein ausgearbeitetes System existiert, um die Gefahr, die von gebrochene Chromosomen ausgeht, zu verringern (Abbildung 26).

## **H2A.Z in der Reparatur von DSBs**

Die Struktur von Chromatin ist mit zellulären Prozessen, die an der DNA stattfinden, eng verknüpft. Beispielsweise spiegeln sich der Transkriptions-Status oder der heterochromatische Zustand in der Struktur des Chromatins wieder. Änderungen der Chromatin-Struktur sind oft Folge von geordneten Vorgängen an der DNA. Zum Verständnis der Funktion von Chromatin ist die Wechselwirkung von Signalen, die seine Struktur beeinflussen und von Signalen, die von der Chromatin-Struktur ausgehend zelluläre Prozesse steuern, unerlässlich.

Der Chromatin-Besatz mit H2A.Z spiegelt die Organisation des Genoms wieder. H2A.Z ist über die Grenzen eukaryontischer Spezies hinweg hoch konserviert. Eine direkte Rolle des H2A-Varianten-Histons H2A.Z bei der Reparatur beschädigten Chromatins ist bisher nicht beschrieben. Jedoch finden sich Hinweise, dass H2A.Z-Chromatin an weitaus mehr Prozessen als der Organisation der Gen-Struktur oder der Positionierung von Nukleosomen beteiligt ist. Erste Hinweise auf eine Rolle von H2A.Z bei der Reparatur von DSBs finden sich neben der hohen Sensitivität von *htz1*-Deletionsmutanten gegenüber DNA-Schäden in der Rekrutierung des SWR-Komplexes an einen DNA-DSB. Jedoch wurde - abgesehen von einem Verlust von H2A.Z bei beginnender Bildung von ssDNA, der mit dem allgemeinen Verlust von Nukleosomen einhergeht - keine Änderung der Besatzes mit H2A.Z in der Umgebung des DSB beobachtet<sup>24</sup>. Die dort berichtete Unabhängigkeit der zellulären Antwort auf DNA-Schäden in  $\Delta swr1$ -Mutanten, insbesondere bei

der Aktivierung des *DNA damage checkpoints*, wurde kürzlich von den selben Autoren deutlich relativiert<sup>9</sup>.

Im selben experimentellen System, das auch in dieser Studie verwendet wurde, konnte an anderer Stelle nachgewiesen werden, dass DNA-DSBs sehr früh vom MRX (MRN) Komplex und assoziierten Faktoren erkannt werden, die die Bildung von ssDNA durch Strang-Resektion auslösen. In dieser Studie hier wird nachgewiesen, dass ein weiterer Faktor früh zur DNA-Reparaturstelle rekrutiert wird, das Varianten-Histon H2A.Z (Abbildung 26). Da eine fehlende Rekrutierung von H2A.Z offensichtlich die Effizienz der Strang-Resektion negativ beeinflusst, ist denkbar, dass dies durch physikalische Kontakte mit dem MRX-Komplex oder eine Modulation seiner Aktivität geschieht.

Die aus einem Bruch des Chromatins resultierende Änderung der Chromatin-Struktur in Umgebung des DSB könnte Signal-Funktionen erfüllen, die frühe Schritte der Strang-Resektion initiieren. H2A.Z bildet chromosomale Grenzen transkribierter Bereiche oder von Heterochromatin-Regionen. Möglicherweise begrenzt H2A.Z auch den unmittelbaren Nahbereich eines DNA-DSB. Die hier beobachtete Rekrutierung von H2A.Z erstreckt sich über einen Bereich von nur wenigen Nukleosomen in direkter Umgebung des DSB. Die asymmetrische Rekrutierung von H2A.Z an die rechte Seite des DSB im *MAT*-Lokus spiegelt möglicherweise eine Besonderheit dieses Lokus' wieder. Sind *HML* oder *HMR* als Donorsequenzen vorhanden, findet auch Strang-Resektion nur auf der rechten Seite der HO-Schnittstelle statt<sup>13,97</sup>. Weitergehende Untersuchungen mit induzierten DSBs an anderen genomischen Loci werden die Frage experimentell beantworten können, ob die asymmetrische Rekrutierung von H2A.Z an DSBs allgemein stattfindet.

Die spezifische Rekrutierung von H2A.Z an einen DSB deutet zusammen mit weiteren Befunden auf eine – allerdings möglicherweise nicht essentielle – Rolle von H2A.Z in der Reparatur von DNA hin. Die Beobachtung, dass bei Deletion des Gens für H2A.Z oder Elimination seines Chromatin-Einbaus die Bildung von ssDNA und nachfolgende Aktivierung des *checkpoints* deutlich ineffizienter sind, sollte allerdings im Hinblick auf mögliche indirekte Effekte auf Transkription oder die Struktur von Chromatin in *Δhtz1*-Mutanten vorsichtig interpretiert werden. Die Rekrutierung von DNA-

Reparaturfaktoren wie Rad51, das auf die Bildung von ssDNA folgt, kann auch in  $\Delta htz1$ -Mutanten beobachtet werden. Allerdings tritt sie erst einige Stunden verzögert im Vergleich zu WT-Zellen auf (diese Studie, ohne Abbildung). Insgesamt erfordert eine effiziente zelluläre Antwort auf DNA-Schäden aber den Chromatin-Einbau von H2A.Z.

## Die Rolle von H2A.Z-SUMO

H2A.Z wird am C-terminus durch SUMO modifiziert. Dabei liegen die SUMOylierungs-Stellen an der Eintrittsstelle der DNA in das Nukleosom. Sterisch ist die SUMOylierung von H2A.Z am C-terminus mit der Struktur von Nukleosomen gut vereinbar.

Der Anteil SUMOylierter Spezies von H2A.Z ist in *swr*-Mutanten deutlich erniedrigt. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die SUMOylierung von H2A.Z auf seinen Chromatin-Einbau folgt und diesen bedingt. Ob durch einen induzierten DNA-DSB rekrutiertes H2A.Z in unmittelbarer Nähe des DSB SUMOyliert wird, lässt sich aus den bisher gewonnenen Daten allerdings nicht bestimmen.

SUMOylierte Spezies von H2A.Z sind im Gegensatz zu anderen DNA-Reparaturproteinen wie Rad52 nicht durch das hier untersuchte DNA-schädigende Agens Zeozin induzierbar. Jedoch weisen *htz1*-Mutanten ohne die SUMOylierungs-Stellen K126 und K133 eine gestörte Relokalisierung des DNA-DSB an die nukleäre Peripherie auf, die unabhängig von der Auslösung des *damage checkpoints* ist. SUMOylierung von H2A.Z scheint also Funktionen zeitlich nach Auslösung des *checkpoints* bei der DSB-Rekrutierung zu erfüllen. Die dafür notwendigen Faktoren sind unbekannt, jedoch lässt sich ein *checkpoint*-unabhängiger Signalweg postulieren, der letztlich die Relokalisierung eines persistenten DSB bewirkt (Abbildung 27).

Die von Nagai *et al.* postulierte Bindung eines persistierenden DSB spezifisch an den Kernporen-Komplex wurde neben der dort vorgeschlagenen Funktion der DSB-Rekrutierung von den Autoren kürzlich relativiert und an anderer Stelle kontrovers diskutiert<sup>9,113</sup>. In den hier identifizierten SUMO-

defizienten *htz1*-Mutanten scheint die Relokalisierung des DSB sehr viel spezifischer beeinflusst zu sein als in *htz*-Deletionsmutanten oder Kernporen-Mutanten. Dies bietet einen geeigneten Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen, um eine mögliche, jedoch bisher unbekannte, spezifische Funktion der DSB-Relokalisierung aufzuklären.

Die Notwendigkeit der SUMOylierung von H2A.Z für eine intra-nukleäre Relokalisierung geschädigter DNA weist bemerkenswerte Parallelen zur Relokalisierung geschädigter rDNA aus dem Nukleolus hinaus auf. Diese erfordert die SUMOylierung von Rad52<sup>104</sup>. Die Retention kürzlich reprimierter Gene an der Kernperipherie, die H2A.Z benötigt, könnte ebenfalls spezifisch von der SUMOylierung von H2A.Z abhängen. Eine Funktion der SUMOylierung von H2A.Z in der Transkriptions-Aktivierung und einem postulierten „transkriptionellen Gedächtnis“ zu untersuchen, erscheint vielversprechend.

SUMOyliertes H2A.Z löst möglicherweise einen Signalweg aus, an dessen Ende die Fixierung gebrochener DNA an die Kernperipherie steht. Darauf weist die *checkpoint*-unabhängige Funktion von H2A.Z-SUMO bei der Relokalisation dauerhaft gebrochener Chromosomen hin. Spannende Fragen sind, welche Faktoren die SUMOylierung von H2A.Z erkennen und wie das SUMO-Signal an H2A.Z ausgelesen und weitergeleitet wird, so dass es schließlich die Relokalisation gebrochener Chromosomen auslöst. Die Funktion SUMOylierter Proteine im Chromatin und ihre Signaltransduktion sind bisher nur wenig aufgeklärt. In den nächsten Jahren sind auf dem Gebiet der Signaltransduktion an Chromatin und Untersuchungen von SUMO als Modulator dabei spannende und neue Erkenntnisse zu erwarten.

## Das Verhalten der Rad51-Rekombinase bei Homologiesuche

Auf frühe, den DSB erkennende Schritte bei der DNA Reparatur durch HR folgen der Besatz einzelsträngiger DNA mit RPA und sein Austausch gegen die Rekombinase Rad51. Nach allgemeinen Modellen der HR bildet Rad51 Nukleoprotein-Filamente auf ssDNA und stimuliert dadurch die Suche nach Homologie, folgende Stranginvasion und schließlich das Rekombinationsereignis. Der Befund, dass sich Rad51 ausgedehnt und sehr schnell auf dem beschädigten Chromosom über Stunden ausbreitet, ist unerwartet und könnte generelle Hinweise auf den Mechanismus der Homologiesuche liefern. Die weitreichende Ausbreitung von Rad51 spiegelt wahrscheinlich stattfindende Homologiesuche wieder. Die Suche nach Homologie ist das am wenigsten verstandene Ereignis in der homologen Rekombination<sup>114</sup>.

Die durchschnittliche Geschwindigkeit der Ausbreitung von Rad51, die in dieser Arbeit durch hochauflösende ChIP-on-chip Analysen gemessen wurde, liegt um eine Größenordnung höher als die bisher angenommene Geschwindigkeit für die Bildung von ssDNA<sup>25,115</sup>. Rad51-DNA Interaktionen sind also weit über den Bereich einzelsträngiger DNA hinaus detektierbar. *In vitro* Experimente einer früheren Studie zeigen, dass Nukleosomen kein prinzipielles Hindernis für eindringende Rad51-Filamente darstellen<sup>16</sup>. Das bisherige Modell zur HR betrachtet ausschließlich homogene, ssDNA-gebundene Rad51 Nukleoprotein-Filamente. Die Ergebnisse dieser Studie erweitern dieses Modell wesentlich.

Der Befund, dass die Ausbreitung von Rad51 deutlich schneller als die Bildung von ssDNA erfolgt, legt nahe, dass für die beobachtete Ausbreitung von Rad51 die Enden des Chromosomen-Bruchs verantwortlich sind. Die faszinierende Beobachtung, dass die Ausbreitung von Rad51 bidirektional vom Bruch ausgehend erfolgt, ist vermutlich Konsequenz einer Sondierung des geschädigten Chromosoms *in cis*. Nach diesem Modell sondieren die mit Rad51 assoziierten Enden des DNA-DSB das betroffene Chromosom oder suchen Homologie durch die Bildung von DNA-Schleifen (Abbildung 27).

Die beobachtete Chromatin-Assoziation von Rad51 geht über den Bereich kanonischer DNA-Rad51-Nukleoprotein-Filamente hinaus und

schließt auch Bereiche des geschädigten Chromosoms ein, in denen intaktes Chromatin vorliegt. Die Bildung von Rad51-DNA-Filamenten zu einem frühen Zeitpunkt der Reparatur in unmittelbarer Umgebung des Bruchs schließen hier gewonnene Daten jedoch keineswegs aus. Die Ausbreitungs-Profile von RPA und Rad51 sind innerhalb der ersten Stunde nach Bildung des DSB nahezu deckungsgleich. Dies weist darauf hin, dass Rad51 anfangs im Bereich einzelsträngiger DNA assoziiert.

Bemerkenswert ist die strikte Begrenzung der Ausbreitung von RPA auch mehrere Stunden nach Bildung des DSB. Ein Ty1-Transposon-LTR (*long terminal repeat*) auf der linken Seite des DSB begrenzt die Bildung von ssDNA. Ein ähnlicher Befund wurde kürzlich in einer Studie von Zhu *et al.* berichtet<sup>20</sup>. Die Ausbreitung von Rad51 ist zu frühen Zeitpunkten an diesem LTR und an einem Transposon mit mehreren LTRs bei 150 kb verzögert, so dass diese Loci keine strikten Begrenzungen für die Ausbreitung von Rad51, sondern retardierende Hindernisse oder Hürden darstellen.

Gelangen Homologie-suchende Rad51-DNA-Filamente in Telomer-nahe Bereiche und ist die Suche nach Homologie nicht abgeschlossen, wird eine Relokalisierung des persistierenden DSB an die nukleäre Peripherie ausgelöst. Rad51 selbst ist für diesen Prozess genau wie die Aktivierung des *DNA damage checkpoints* notwendig. H2A.Z-SUMO ist für die DSB-Relokalisation ebenfalls notwendig, jedoch von der Aktivierung des *checkpoints* unabhängig. Die Signaltransduktion für die DSB-Relokalisation ist bisher nicht vollständig verstanden. Interessanterweise wird sie jedoch ausgelöst, wenn Homologie-suchende Rad51-Strukturen subtelomere Regionen erreichen (Abbildung 27).

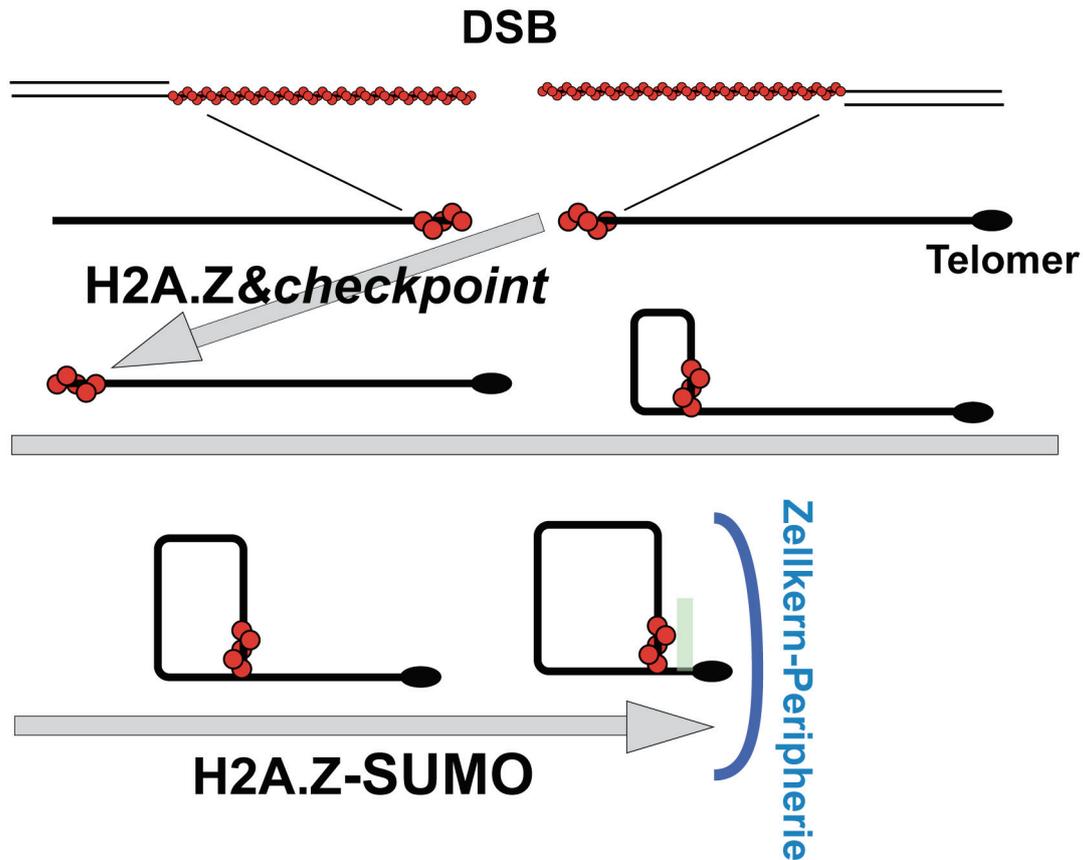


Abbildung 27 **Hypothetisches Modell der Homologiesuche durch Rad51.** Rad51-ssDNA Nukleoprotein-Filamente könnten das geschädigte Chromosom auf der Suche nach Homologie sondieren. Bestimmte Chromatin-Strukturen wie Ty-Transposons wirken retardierend, subtelomere Sequenzen begrenzend. Erreicht Rad51 Telomer-nahe Regionen, lokalisiert der persistierende DSB an die Kernperipherie. Dafür notwendig sind Persistenz des DSB, *checkpoint*-Aktivierung, Rad51 und H2A.Z-SUMOylierung. SUMO-H2A.Z löst dabei möglicherweise eine bisher unbeschriebene, *checkpoint*-unabhängige Signaltransduktion aus.

Geringe Signale von Rad51 an subtelomeren Bereichen deuten darauf hin, dass die DNA dort für Homologiesuche nicht zugänglich ist. In folgenden Studien könnte dies genauer untersucht werden, indem diese Regionen gentechnisch verkürzt, mutiert oder an andere Stellen des Genoms transplantiert werden. An Transposons oder in subtelomeren Regionen könnten spezielle Chromatin-Strukturen die Ursache für eine Begrenzung von Strangresektion und Rad51-vermittelter Homologiesuche sein. Transposons in Säugerzellen oder repetitive Sequenzen könnten auf ähnliche Weise die Funktion von DNA-Reparaturprozessen orchestrieren.

## ***Repression der Transkription durch SUMO***

Die Repression von Transkriptions-Faktoren durch SUMOylierung scheint ein universelles und evolutionär konserviertes Prinzip der Regulation von Transkription zu sein. Wie SUMOylierung von Transkriptions-Faktoren jedoch die Aktivierung von Zielgenen verhindert oder sogar ihre Repression bewirkt, scheint für verschiedene Transkriptions-Faktoren mechanistisch unterschiedlich stattzufinden und ist in vielen Fällen unklar<sup>51,116,117</sup>. Prinzipiell können drei hypothetische Mechanismen der Wirkung von SUMO unterschieden werden : SUMOylierung kann die Rekrutierung von Repressoren, eine verringerte Bindung von Koaktivatoren oder eine veränderte Lokalisation des Transkriptions-Faktors bewirken.

Die biologische Aktivität von Proteinen kann durch post-translationale Modifikationen wie z.B. Ubiquitylierung, Phosphorylierung oder Acetylierung moduliert werden. Diese Modifikationen könnten durch SUMOylierung beeinflusst sein, indem SUMO die Affinität des Zielproteins für modifizierende Enzyme ändert. Lysine können nach SUMOylierung für andere post-translationale Modifikationen blockiert sein; Lysine sind auch Modifikations-Stellen für Ubiquitylierung und Methylierung. Ist ein Lysin mit SUMO verknüpft, kann es nicht mehr durch Ubiquitin modifiziert werden. Die Fusion des Modell-Transkriptions-Faktors LexA-VP16 beeinflusst seine ubiquitylierten Spezies nur unwesentlich. Daher scheint eine allgemeine, die Ubiquitylierung antagonisierende Funktion von SUMO in diesem Fall unwahrscheinlich.

Die SUMOylierung von Transkriptions-Faktoren kann ihre Aktivität senken, indem das SUMOylierte Protein anders lokalisiert, inhibierende Faktoren rekrutiert oder aktivierende vom Wirkungsort ausschließt. Eine veränderte Lokalisierung betrifft unter Umständen nur die aktive (z.B. phosphorylierte) Form des SUMOylierten Transkriptions-Faktors. Dabei könnte SUMOylierung auch Einfluss auf den Kerntransport des Transkriptions-Faktors selbst, assoziierter Faktoren oder auch der gebildeten mRNA haben.

Der in dieser Studie verwendete Modell-Transkriptions-Faktor bindet jedoch nach Fusion mit SUMO in vergleichbarem Maße an seine Zielgene. Eine veränderte DNA-Bindung oder ein veränderter Kernimport sind daher unwahrscheinlich. Eine weitere einfache Erklärung für die Inhibitions-Funktion von SUMO könnte ein durch SUMO induzierter Abbau des Zielproteins liefern. Für die meisten untersuchten Transkriptions-Faktoren, deren Aktivität durch SUMOylierung beeinflusst wird, wurde dies jedoch nicht beobachtet. Eine Analyse der Gesamt-Proteinmenge und – wichtiger noch – der Menge am Wirkungsort durch ChIP-Experimente liefert keinen Hinweis darauf, dass SUMO-Fusion Proteinabbau stimuliert (Abbildung 23).

Der Ausschluss von Koaktivatoren vom Ort der Transkriptions-Aktivierung stellt einen weiteren möglichen Mechanismus dar. Eine sterische Maskierung starker Transkriptions-Aktivierungs-Domänen (TAD) wie der sauren VP16-Aktivierungs-Domäne im verwendeten Hybrid-Protein erscheint jedoch unwahrscheinlich. Aus zahlreichen *yeast two hybrid* Studien ist bekannt, dass bei Fusion nahezu beliebiger Proteine mit starken Aktivierungs-Domänen wie der VP16-Domäne ihr Potenzial zur Transkriptions-Aktivierung erhalten bleibt. Hingegen bewirkt die Fusion mit SUMO eine deutliche Verringerung der Transkriptions-Aktivität des LexA-VP16 Proteins. Eine durch SUMO verhinderte Rekrutierung von Aktivatoren ist dadurch aber nicht ausgeschlossen.

Für die Untersuchung dieser Frage sind weitergehende biochemische Analysen notwendig. Eine faszinierende Möglichkeit, Chromatin-assoziierte Proteine zu bestimmen, liefert eine Kombination von DNA-Sonden und Massenspektrometrie<sup>118</sup>. Diese „reverse“ Chromatin-IP identifiziert die *in vivo* an spezifischen Loci assoziierten Proteine. Zwar wurde diese Technik bisher nur für repetitive Sequenzen wie Telomere (*telomeric repeats*) benutzt, doch ist sie prinzipiell auch auf andere Loci - insbesondere in Kombination mit leistungsfähiger Massenspektrometrie (*SILAC*) - erweiterbar.

SUMO könnte jedoch auch post-transkriptionelle Prozesse modulieren und eine Rolle bei der Prozessierung von mRNA spielen. Bereits während ihrer Synthese assoziieren mRNAs mit Proteinen, die ihr zukünftiges Schicksal wie ihre subzelluläre Lokalisierung, ihre Translation und ihre Halbwertszeit beeinflussen. Transkribierte mRNA wird am 5'-Ende mit einer

Kappen-Struktur versehen und am 3'-Ende mit einem polyA-Schwanz. Diese mRNA-Reifung ist für die Initiation ihrer Translation notwendig. Ist die Reifung von mRNA gestört, wird sie im Zuge der zellulären RNA-Qualitätskontrolle abgebaut. Parallel zu Nonsense-vermitteltem mRNA-Abbau (NMD) geschieht der Abbau anomaler mRNA schließlich durch das Exosom, einen RNA-abbauenden Multiprotein-Komplex. Eine Funktion von SUMO bei diesen Prozessen ist bisher kaum untersucht, jedoch weist eine wenig veränderte Menge an Primärtranskript von SUMO-TAD kontrollierten Genen auf einen möglichen post-transkriptionellen Mechanismus der Regulation effizienter Transkription durch SUMO hin.

Bisher konnte kein SUMO-spezifischer Repressor von allgemeiner Bedeutung nachgewiesen werden<sup>51,116,117</sup>, obwohl Ergebnisse jüngster Studien erste Hinweise an Einzelfällen liefern, die allgemeinere Bedeutung haben könnten<sup>87,88</sup>. Eine spezifische Erkennung der SUMO-Modifikation am Transkriptions-Faktor könnte durch SUMO-bindende Proteine bewirkt werden. Diese besitzen oft SUMO-Interaktionsmotive (SIM) und binden SUMO in Verbindung mit seiner Umgebung. Jedoch kann SUMO Protein-Protein-Interaktionen auch verringern, indem es Bindestellen für weitere Faktoren sterisch blockiert. Da SIM eine hohe Sequenz-Heterogenität aufweisen und damit nicht einfach bioinformatisch durch Such-Algorithmen identifizierbar sind, können bisher keine verlässlichen Aussagen über die Identität von SIM in Transkriptions-Regulatoren getroffen werden. Die Interaktion von Chromatin-assoziierten Proteinen mit SUMO muss daher in weiteren Untersuchungen experimentell erfolgen.

Die beobachteten genetischen Zusammenhänge von SUMO-TAD-Repression mit Histon-Chaperonen deuten darauf hin, dass SUMO lokale Veränderungen der Chromatin-Struktur induziert. Dies trägt wahrscheinlich zur reprimierten Aktivität SUMOylierter Transkriptions-Faktoren bei. Eine lokale Änderung der Transkriptions-assoziierten Dynamik von Chromatin kann aber auch die Folge verringerter Transkription sein.

SUMO-Repression ist nicht auf Transkriptions-Faktoren beschränkt. Auch Histone werden mit reprimierender Wirkung auf Transkription SUMOyliert<sup>53,119</sup>. Eine durch SUMO modulierte Dynamik der Struktur von Chromatin ist möglicherweise zusammen mit post-transkriptionellen mRNA-

Prozessen der Schlüssel zu einem universellen Mechanismus SUMO-vermittelten *silencings*.

### ***Neue Faktoren bei der Transkriptions-Aktivierung***

Für die Beteiligung Ubiquitin-spezifischer Faktoren wie proteasomaler Proteine bei der Aktivierung von Transkription finden sich etliche Hinweise<sup>120-123</sup>. Andere Ubiquitin-bindende Faktoren, die bei der Aktivierung von Transkription beteiligt sein können, sind hingegen bisher wenig untersucht. Ubiquitylierung ist als post-translationale Proteinmodifikation an der Regulation verschiedener Prozesse während der Transkription beteiligt. Die Ubiquitylierung von Histon H2B an Lysin 123 und die nachfolgende Methylierung von Histon H3 an Lysin 4 (H3K4) ist sowohl in *S. cerevisiae* als auch in höheren Eukaryonten mit aktiv transkribierten Chromatin-Regionen assoziiert. H3K4-Methylierung markiert allgemein genomische Bereiche elongierender Transkription<sup>124,125</sup>. Die Mono-Ubiquitylierung an Histon H2B erfüllt regulatorische Funktionen, die unabhängig von Ubiquitin-Proteasom-vermitteltem Proteinabbau zu sein scheinen. Welche Faktoren die Ubiquitylierung an Histonen spezifisch erkennen, ist allerdings nicht vollständig aufgeklärt.

Transkriptions-Faktoren wie Gal4 oder Met4, die die Expression induzierbarer Gene kontrollieren, werden während ihrer Aktivierung ubiquityliert. Diese Ubiquitylierung ist für ihr Aktivierungs-Potenzial notwendig<sup>74,123,126,127</sup>. Bei der Untersuchung möglicher Ubiquitin-spezifischer Faktoren, die bei der Aktivierung der Transkription eine Rolle spielen könnten, wurden in dieser Arbeit bemerkenswerte Funktionen des Ubiquitin-spezifischen Chaperons Cdc48 zusammen mit seinem Kofaktor Shp1 beobachtet. Cdc48 assoziiert genomweit an Chromatin-Bereichen, in denen RNA-Polymerase II konzentriert ist. Bei der Induktion von Genen ist eine spezifische Rekrutierung von Cdc48 und Shp1 zu beobachten. Diese Rekrutierung scheint nicht auf *GAL*-Gene beschränkt zu sein; durch den Nährstoffwechsel von Laktat auf Galaktose kann eine Anreicherung von

Cdc48 an verschiedene Gene, die für ribosomale Proteine kodieren, beobachtet werden. Diese Gene werden bei Galaktose-Zugabe nach einer Verzögerungsphase von etwa 2 Stunden transkriptionell induziert<sup>106</sup>.

Vermutlich dient die Ubiquitylierung von Gen-assoziierten Faktoren als Signal für die Rekrutierung von Ubiquitin-spezifischen Cdc48-Komplexen. Als mögliche ubiquitylierte Substrate von Cdc48 an GAL-Genen kommen durch Induktion rekrutierte Transkriptions-Faktoren wie Gal4 oder als Folge elongierender RNA-Polymerase II entstehende Ubiquitin-Markierungen von Histonen wie beispielsweise H2B-Ubiquitylierung in Frage<sup>71,74,128</sup>. Die durch hochauflösende ChIP-on-chip beobachtete, scharfe Begrenzung der Cdc48-Rekrutierung über den gesamten transkribierten Bereich der GAL-Gengruppe ist nicht auf Gal4-Bindestellen beschränkt. Auch bindet Gal4 nicht genomweit an Gen-Promotoren. Dies legt nahe, dass ubiquityliertes Gal4 nicht der alleinige Binde-Partner von rekrutiertem Cdc48 ist. In Mutanten, die als einzige Quelle für Histon H2B eine Ubiquitylierungs-defiziente Mutante exprimieren, in der Lysin 123 zu Arginin mutiert ist (*H2B*<sup>K123R</sup>, erhalten von N. Hiller), ist sowohl die genomweite Lokalisierung von Cdc48 als auch seine Rekrutierung an induzierte Gene gegenüber WT-Zellen nahezu unverändert (diese Studie, ohne Abbildung). Dies deutet darauf hin, dass H2B-Ubiquitylierung ebenfalls als Hauptursache für die Chromatin-Assoziation von Cdc48 ausscheidet.

Eine wesentliche, bisher ungeklärte Frage ist, welche Substrate Cdc48 am Chromatin bindet und ob dies Ubiquitin-spezifisch erfolgt. In Hochdurchsatz-Studien wurden biochemische Interaktionen von Cdc48 mit RNAPol II-assoziierten Faktoren wie Set2, etlichen Komponenten des Mediator-Komplexes und Spt16 des heterodimeren FACT-Komplexes identifiziert<sup>129</sup>. Dies liefert weitere Hinweise auf Transkriptions-assoziierte Funktionen von Cdc48.

Eine bekannte Ubiquitin-spezifische Funktionen von Cdc48 ist die Trennung von Protein-Protein-Interaktionen, seine Segregase-Aktivität. Es ist anzunehmen, dass Cdc48 diese Aktivität auch im Zellkern in Chromatin-assoziierten Prozessen aufweist. Möglicherweise dient die Aktivität von Cdc48-Komplexen der Extraktion von Proteinen aus Chromatin. Die Chaperon-Aktivität von Cdc48, wie sie auch für Proteine des proteasomalen

19S-Komplexes bei der Transkriptions-Elongation vermutet werden, könnte an einer Konversion von RNAPol II in eine Elongations-kompetente Form, an der Disassemblierung inhibitorischer Proteinkomplexe oder auch an effizientem Chromatin-Umbau beteiligt sein.

## **Transkriptions-Elongation und mögliche neue Funktionen von Cdc48**

Die Überführung von bereits vor Geninduktion gebundener, arretierter RNAPol II in ihre elongierende Form ist in etlichen Studien bei der Regulation strikt regulierter Gene in Säugerzellen beobachtet worden<sup>130-134</sup>. Nach aktuellen Modellen wird die Transkription von Genen nicht nur durch die Rekrutierung von RNAPol II gesteuert, sondern ebenfalls auf der Ebene der Elongation, die nach der Initiationsphase stattfindet. Die Elongation von RNAPol II kann durch Prozesse wie PrPP (*promotor proximal pausing*) arretiert sein. RNAPol II liegt dabei angehalten nach retrograder Bewegung (*backtracking*) in Promotor-nahen Bereichen vor. Die Induktion von Genen sowohl in Säugerzellen als auch in *S. cerevisiae* kann zu einer Überführung arretierter RNAPol II in eine Elongations-kompetente Form führen. Diese Art der Regulation ermöglicht eine permanent „offene“ Chromatin-Struktur von Promotoren, eine essentielle Voraussetzung für ständig transkribierte Gene<sup>68,106</sup>.

Das genomweite Profil der Assoziation von Cdc48 mit Chromatin deutet darauf hin, dass Cdc48 an diesen Bereichen besonders stark assoziiert. Die katalytische Aktivität von Cdc48 könnte den Übergang arretierter RNAPol II zur Elongation modulieren.

Jedoch könnte Cdc48 auch dazu dienen, schadhaft arretierte RNAPol II zu entfernen. Die Beseitigung schadhaft arretierter RNAPol II nach ihrer Ubiquitylierung spielt eine wichtige Rolle für die Stabilität des Genoms. Arretierte RNAPol II wird dabei auf transkriptionell aktive Bereiche im Zuge der Transkriptions-gekoppelten DNA-Reparatur (*transcription coupled repair*, TCR) über das Ubiquitin-Proteasom System abgebaut. Dies ist für die

Genom-Stabilität von entscheidender Bedeutung. Man nimmt an, dass in humanen Zellen das gesamte Genom einschließlich transkriptionell stillgelegter Bereiche in geringem Maße von RNAPol II transkribiert wird. Dies prädestiniert RNA-Polymerasen für Funktionen in der Überwachung der Genom-Integrität<sup>135</sup>. Bisher ist offen, ob Cdc48 modulierend auf Transkriptions-Elongation wirkt oder bei der Beseitigung schadhafter oder inhibitorischer Strukturen am Chromatin. Beide Fälle sind allerdings mit einem attraktiven Modell der Lösung von Transkriptions-Blockaden durch Cdc48 gut vereinbar.

Die Anreicherung des ssDNA-bindenden Komplexes RPA an Bereiche starker Transkriptions-Induktion ist eine weitere bemerkenswerte Beobachtung. Die spezifische Anreicherung des essentiellen, an DNA-Reparatur und Telomer-Organisation beteiligten Komplexes RPA an stark transkribierte Bereiche wurde bisher nicht beschrieben. Wird Chromatin stark transkribiert, müssen transkribierende Enzyme DNA trotz der Verpackung von DNA in Nukleosomen kontinuierlich ablesen. Dies ist bei hoher Transkriptions-Aktivität mit einem starken, jedoch nicht vollständigen Verlust von Histonen verbunden. Histone werden vor transkribierenden RNA-Polymerasen durch assoziierte Enzym-Komplexe wie den FACT-Komplex ausgebaut und nach Passage der Polymerase wieder in DNA eingebaut. Diese Aktivität führt nach Histon-Ausbau zu einer negativen Verdrillung der DNA (*supercoiling*), die durch Transkription, die eine positive Verdrillung bewirkt, wieder ausgeglichen wird. Arretiert nun die transkribierende RNA-Polymerase, wird das negative *supercoiling* vor ihr nicht unmittelbar ausgeglichen. Dies kann durch Helikasen geschehen, deren katalytische Aktivität *supercoiling* auflöst. Bei fehlender Helikase-Aktivität kann die Torsions-Spannung negativ verdrillter DNA vor transkribierenden Polymerasen auch durch kurzzeitiges Öffnen der DNA-Doppelhelix gelöst werden. Dies führt zur kurzzeitigen Bildung von einzelsträngiger DNA (ssDNA)<sup>136</sup>.

Mechanistisch könnte während der Transkription durch DNA-abhängige RNA-Polymerasen und des damit verbundenen Umbaus nukleosomaler DNA ein kurzes „Zeitfenster der Möglichkeit“ zur Bindung von Faktoren wie beispielsweise ssDNA-bindender Proteine entstehen<sup>137</sup>. Wäre

dies die Ursache für die beobachtete Lokalisierung von RPA an stark induzierte Gene, könnte dies möglicherweise nur in einer kleinen Subpopulation von Zellen stattfinden. Eine schwache Rekrutierung oder eine starke Rekrutierung in einer kleinen Subpopulation von Zellen lassen sich aus CHIP-Daten nicht ohne weiteres unterscheiden.

Die Stabilisierung von einzelsträngiger DNA während der Transkription durch RPA könnte die Transkription funktionell begünstigen. RPA-Bedeckung von ssDNA verhindert dabei eventuell die Rehybridisierung des transkribierten DNA-Strangs mit dem Gegenstrang. Ein übermäßiger Besatz einzelsträngiger DNA in transkribierten Bereichen könnte jedoch auch inhibitorisch auf Transkription wirken, so dass für eine effiziente Transkription die stabile Interaktion von RPA mit ssDNA wieder gelöst werden muss.

Falls RPA bei der Regulation von Gen-Aktivität eine direkte Rolle spielt, ist dieser für DNA-Reparatur so wichtige zentrale Akteur weitaus vielseitiger als bisher angenommen.

## Material und Methoden

Die verwendeten mikrobiologischen, molekularbiologischen und biochemischen Methoden folgen im Wesentlichen und wenn nicht anders angegeben Standardprotokollen nach Sambrook *et al.*<sup>138</sup>, Ausubel *et al.*<sup>139</sup> und Herstellerangaben. Es wurden analysenreine Chemikalien der Firmen GE-Healthcare, Fluka, Invitrogen, Merck, New England Biolabs, Roth, Roche, Riedel de Haen, Serva oder Sigma verwendet. Für die unten beschriebenen Methoden wurden entionisiertes und sterilisiertes Wasser, sterile Lösungen und durch Autoklavierung sterilisierte Reaktionsgefäße verwendet.

### Hefestämme

Erstellte und verwendete Hefestämme sind in Tabelle 2 aufgelistet. Für Untersuchungen zu einem persistenten DNA-DSB wurden Abkömmlinge des Stamms JKM179 ( $\Delta hml::ADE1 MAT\alpha \Delta hmr::ADE1 ade1-100 leu2-3,112 lys5 trp1::hisG' ura3-52 ade3::GAL::HO$ ) oder der verwandten JKM139 und JKM161 verwendet<sup>17,95</sup>. Stämme mit chromosomalen Epitop-Markierungen wurden über eine PCR-basierte Strategie generiert<sup>140,141</sup>. Alle *htz1*-Mutationen wurden in den endogenen *HTZ1*-Lokus zusätzlich zu einer *ADH1*-Terminatorsequenz eingeführt.

Der Stamm MK97 wurde für Echtzeitmikroskopie verwendet. Er wurde durch Integration eines 240 LacI-Bindungsstellen enthaltenden Plasmids (pMK*lacOZ1*) in die *Z1*-Sequenz 150 Basen entfernt von der HO-Schnittstelle erhalten. *GFP-LacI-NLS* wird unter Kontrolle des *URA3*-Promoters nach Integration des Plasmids pMKGFP-*lacI* in den *LEU3*-Lokus in diesem Stamm konstitutiv exprimiert; Nic96 ist mit dem rot fluoreszierenden Protein Mars Epitop-markiert. Das Plasmid pYM38-*mars::hphNT1* dazu wurde freundlicherweise von R. Wedlich-Söldner zur Verfügung gestellt. Auf selbe Weise wurde auch *Mps3* Fluoreszenz-markiert. Die entsprechenden Stämme sind als MK97 und MK95 entsprechend bezeichnet.

### Kultivierung von *S. cerevisiae*

Hefen wurden auf Platten mit 2 % Agar und YPD- oder selektiven Wachstumsmedien bei 30°C kultiviert. Flüssigkulturen wurden frisch über Nacht in 5 ml Vorkulturen angeimpft und am nächsten Morgen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 verdünnt und im allgemeinen bis zur logarithmischen Wachstumsphase bei konstantem Schütteln wachsen gelassen. Laktat-haltige Medien – insbesondere SC-Laktat-Medien – erforderten teilweise längere Kultivierung in Flüssigkulturen. In solchen Medien wurden Hefen bis zu 3 Tagen in Vorkultur gehalten, bis die Stämme an das Medium mit Verdoppelungszeiten von etwa 2 Stunden adaptierten. Für Zeiträume bis zu vier Wochen wurden Hefen auf Kulturplatten bei 4°C gelagert. Ansonsten

wurden immer frisch ausgestrichene Kulturen von bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Stämmen gefrorener, stationärer Kulturen mit 16,7% Glycerin verwendet. Bei Induktion von DSBs durch das DNA-schädigende Agens Zeozin (Invitrogen) wurde dies für 2 Stunden zu Flüssigkulturen zu einer Konzentration von  $600\mu\text{g/ml}$  zugegeben. Bei Zugabe von Zeozin, das nur in einem sehr geringen pH-Bereich wirkt, wurden Medien verwendet, deren pH vor Autoklavierung mit Tris-Base auf pH 7,5 eingestellt wurde. Auch für Selektion von Plasmiden mit Zeozin-Resistenz wurden titrierte Medien verwendet; zur Plasmid-Selektion wurden Zeozin-Konzentrationen von  $300\mu\text{g/ml}$  verwendet.

## Induktion der HO-Endonuklease

Hefekulturen wurden bis zum logarithmischen Wachstum ( $\text{OD}_{600}$  0,6-1) in selektivem SC- oder YPlaktat-Medium<sup>142</sup> wachsen gelassen. Zeitaufgelöste ChIP-Experimente wurden im Wesentlichen wie in Sugawara *et al.* und Aparicio *et al.* beschrieben durchgeführt<sup>17,143</sup>. Für Zeitverläufe unter Galaktose-Induktion wurde Galaktose-Lösung zu einer Endkonzentration von 2% zugegeben, für die nicht-induzierte Kultur das entsprechende Volumen Wasser.

## ChIP und ChIP-on-chip

Nach den angegebenen präzisen Zeitpunkten wurde die  $\text{OD}_{600}$  von aliquotierten Volumina von 200 ml bestimmt, nötigenfalls eine Probe von 1  $\text{OD}_{600}$  für *input*-Kontrollen abgenommen und für genau 16 Minuten mit 5,5 ml Formaldehyd 37% bei Raumtemperatur unter konstantem Schütteln *gecrosslinkt*. Das Quenchen des *Crosslinkers* erfolgte durch Zugabe von 30 ml 2,5 M Glycin-Lösung für mindestens 20 Minuten. Berechnete gleiche Äquivalente an Zellen wurden in Zentrifugenbechern eingewogen, nach Zentrifugation das Pellet 2 mal mit PBS gewaschen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. 20  $\mu\text{l}$  Pefabloc 100x (100 mg/ml) und 800  $\mu\text{l}$  FA-Lysepuffer mit Complete<sup>®</sup> Protease-Inhibitoren wurden den gefrorenen Zellpellets zugefügt. Silika-Zirkon *beads* wurden bis etwa 2 mm unterhalb des Flüssigkeitsmeniskus' hinzugegeben und die Röhrcchen fest verschlossen, ohne dass *beads* den Verschluss stören. Die Lyse wurde in 6 Zyklen mit je 3 Minuten bei einer Frequenz von  $30\text{ s}^{-1}$  mit anschließender 3-minütiger Kühlung auf Eis in einem *beadbeater* (Retsch) durchgeführt.

Dann wurden die Röhrcchen mit je einer frischen heißen 23G Kanüle  $\varnothing$  0,6 mm am Boden durchbohrt und der flüssige Inhalt der Röhrcchen durch Zentrifugation in ein neues Gefäß gesammelt. Nach 15 Minuten hochtouriger Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 2 ml frischem FA-Lysepuffer mit Protease-Inhibitoren in spezielle harte Gefäße in ein Bioruptor Sonifizierungsbad (Diagenode) eingespannt. Sonifizierung erfolgte in Eiswasser in 30x10 Zyklen zu 30 s mit 30 s Kühlzyklen und zwischenzeitlichem Wechseln des Eiswassers.

Nach einer weiteren hochtourigen Zentrifugation (14000 upm) für 30 Minuten wurde der Überstand abgenommen und entweder direkt für eine folgende Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das so eingefrorene „Chromatin“ ist für einige Monate bei  $-80^{\circ}\text{C}$  haltbar.

20  $\mu\text{l}$  Chromatin wurden als *input* abgenommen und in der Regel 800  $\mu\text{l}$  für eine ChIP mit 25-35  $\mu\text{l}$  vorgekoppelter Antikörper-Agarose *beads* für 90 Minuten bei Raumtemperatur über Kopf rotieren gelassen. 40  $\mu\text{l}$  vorgequollene ProteinA-Agarose wurden 5 Minuten nach Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  Antiserum zugegeben, falls nicht vorgekoppelte Antikörper-Agarose benutzt wurde.

Nach 90 Minuten wurden die *beads* durch Zentrifugation (3000 upm) präzipitiert, der Überstand verworfen, die Beads in 380  $\mu\text{l}$  FA-Lysepuffer in *low-DNA and protein-binding* Filtersäulen mit 5  $\mu\text{m}$  Porengröße (Millipore) überführt und dort zweimal mit FA-Lysepuffer, einmal mit FA-Lysepuffer mit 500 mM NaCl, ChIP Waschpuffer und einmal TE Puffer jeweils durch Zentrifugation (3000 upm, 30 s) gewaschen.

Elution erfolgte nach Überführen der *beads* in 120  $\mu\text{l}$  TE-Puffer mit 1% SDS in neue Reaktionsgefäße für 10 Minuten bei  $65^{\circ}\text{C}$ . Das präzipitierte Material wurde nach Überführung in geeignete Reaktionsgefäße und Zugabe von 20  $\mu\text{l}$  ProteinaseK-Stammlösung auf ein Volumen von 200  $\mu\text{l}$  mit TE-Puffer aufgefüllt und Proteine in einer PCR-Maschine für 3 Stunden bei  $42^{\circ}\text{C}$  total verdaut. *Input*-Proben wurden analog und parallel behandelt. Nach dem totalen Proteinverdau wurden die *crosslinks* bei  $65^{\circ}\text{C}$  für 8 Stunden revertiert und Proben dann bis zur weiteren Verarbeitung bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Nach einer Reinigung der Proben, die in 5 Volumina des PB Bindepuffers ohne pH-Indikator aufgenommen wurden, wurden mit dem *PCR-purification kit* (QiaQuick, Hersteller Qiagen) gereinigte angereicherte DNA in je 100  $\mu\text{l}$  Puffer eluiert und durch quantitative PCR analysiert oder zur Amplifikation mit nachfolgender Hybridisierung auf *tiling arrays* amplifiziert. Bindung in Gegenwart von 0,5 % SDS an die PCR-Reinigungssäulen des *PCR-purification kits* (Qiagen) erfordert die Aufnahme der 200  $\mu\text{l}$  ProteinaseK-Reaktion in mindestens dem 5fachen Volumen PB-Puffer (Qiagen). Dies erspart eine sonst übliche Phenol-Chloroform-Extraktion. Reproduzierbarkeit unter diesen Bedingungen und befriedigend geringe Verluste an DNA während dieser Reinigung wurden systematisch getestet.

Das Protokoll folgt in wesentlichen Teilen dem ChIP-Protokoll von Aparicio *et al.*. Detailliertere Beschreibungen und Puffer-Zusammensetzungen sind dort aufgeführt<sup>143</sup>.

## Amplifikation von ChIP-DNA

ChIP-on-chip folgt dem im Rahmen dieser Arbeit etablierten und publizierten Protokoll<sup>105,144</sup> nach einer Adaption von<sup>145</sup>. Nach einem 30 minütigen Verdau mit DNase-freier RNase bei Raumtemperatur erfolgte eine erneute Reinigung der DNA mittels des Qiagen *PCR-purification kits*. Das Volumen des Eluats betrug 50  $\mu\text{l}$ . Präzipitierte DNA wurde für eine folgende Amplifikation auf ein

geringes Volumen von wenigen  $\mu\text{l}$  in einem Rotationsverdampfer (*speedvac*) bei  $45^\circ\text{C}$  eingengt und auf ein Volumen von  $10 \mu\text{l}$  mit Wasser aufgefüllt. Die Konzentration der *input*-DNA wurde mittels eines Mikrophotometers (NanoDrop) bestimmt. Für die folgende Amplifikation wurden davon jeweils  $15 \text{ ng}$  eingesetzt.

Die Amplifikation und Reamplifikation der DNA erfolgte mittels der kommerziell erhältlichen *kits* WGA2 und WGA3 (SIGMA) und erfolgt nach dem Prinzip Ligations-vermittelter PCR. In einem ersten Schritt wurden *linker*-Oligonukleotide an die gereinigten DNA-Fragmente ligiert, dann erfolgten 14 Zyklen Amplifikation zu je 5 Minuten Primerbindung und Produktelongation zusammen bei  $65^\circ\text{C}$ . Nach erfolgten 14 Amplifikationszyklen wurde die erhaltene DNA wieder mittels des PCR-Reinigungskits gereinigt und die erhaltene Konzentration mikrophotometrisch bestimmt. Die folgende analoge Reamplifikation wurde mit genau  $15 \text{ ng}$  DNA durchgeführt. Wird diese Menge überschritten, ist die Bildung unspezifischer Reaktionsprodukte zu beobachten. Nach 14 weiteren Reamplifikations-Schritten und DNA-Reinigung wird die Konzentration der DNA mikrophotometrisch bestimmt sowie das Verhältnis  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$  gemessen. Dieses sollte etwa  $1,9$  betragen und unter  $2$  liegen sowie die Konzentration der in  $50 \mu\text{l}$  eluierten DNA größer als  $100 \text{ ng}/\mu\text{l}$  sein.

Es folgte eine Analyse der DNA-Fragmentgrößen auf einem  $2\%$  Agarose-Gel mit Ethidium-Bromid. Die Fragmentgrößen sollten denen bei der Sonifizierung entstandenen Größen entsprechen und überwiegend in einem Bereich von  $150\text{-}500$  Basen verteilt sein. Fanden sich deutlich sichtbare Mengen von Fragmenten in einem Größenbereich von  $>1000$  Basen, ist dies ein Hinweis auf unspezifische Reaktionsprodukte und die Proben wurden verworfen. Bei der Reproduzierbarkeit der WGA-Amplifikation wurden deutliche Unterschiede zwischen Produktionschargen der *WGA-kits* festgestellt, zuweilen lieferten einige Chargen des *WGA-kits* unbrauchbare unspezifische DNA.

Vor Hybridisierung von amplifizierten Proben auf *tiling arrays* wurde eine kleine Menge zuvor abgenommenen Materials vor und nach der Amplifikation mittels quantitativer PCR mit Primern an Stellen zu erwartender signifikanter Anreicherungen analysiert. Bei einer Überprüfung der amplifizierten DNA sollte die relative Anreicherung spezifischer Loci gegenüber unspezifischen tendenziell erhalten bleiben. Die präzisen Anreicherungsfaktoren blieben jedoch nach der Amplifikation nicht erhalten. Dies erwies sich als unproblematisch.

Die gereinigte und amplifizierte DNA wurde zu ImaGenes (Berlin) auf Trockeneis geschickt. Dort erfolgte eine genauere Qualitätsanalyse der DNA mittels eines Bioanalyzers (Agilent), eine Markierung von *input*- und IP-Proben mit den Fluoreszenz-Farbstoffen Cy3 und Cy5 (Klenow) und eine nachfolgende Hybridisierung auf hochdichte *tiling arrays*, die das gesamte Hefegenom in regulären Abständen von  $32$  Nukleotiden mit  $50\text{mer}$  Oligonukleotiden abdecken (*tiling arrays*, NimbleGen, CA4214-00-01).

Die Hybridisierung, das Auslesen der Daten und eine primäre Datenanalyse erfolgte durch die Firma ImaGenes GmbH im Rahmen der ChIP-on-chip Serviceleistung. Dabei wurde jeder Datensatz, der aus etwa  $380.000 \text{ IP}/\text{input}$  Verhältnissen besteht, auf das mediane Verhältnis über alle

gemessenen Signale normalisiert (Basislinie = 1, entspricht mittlerer Signalintensität).

## Quantitative PCR-Analysen (q-PCR)

Nach Herstellerangaben (Taq-Man SYBR-Green *kit* von Roche) wurden pro Reaktion 2 µl IP-Material oder 2 µl *input* Material in 1:10 Verdünnung mit Wasser jeweils in Triplikat-Reaktionen zu 20 µl mit 10 µl *Taq-SYBR green master mix* und 1,2 µl der einzelnen Primer (10mM) und 5,6 µl Wasser gemischt. 18 µl *master mix* für jedes Primerpaar werden in 384-Kammerplatten für die *realtime*-PCR-Analyse vorgelegt und jeweils 2 µl Probe mit einer Präzisions-Pipette oder einem automatisierten Pipettier-Roboter zugefügt. Eine Verdünnungsreihe einer *input*-Probe in Verdünnungen von 1:10, 1:20, 1:50, 1:100 und 1:1000 pro Primerpaar wurde auf jede Reaktionsplatte zu Kalibrationszwecken zugefügt. Jede Reaktion wurde in Triplikaten bei 45 PCR-Zyklen und nachfolgender Schmelzkurven-Analyse in einem *lightcycler* der Firma Roche durchgeführt. Die Schmelzkurven-Analyse gab Aufschluss darüber, ob nur eine Produktspezies gebildet wurde.

DNA-Konzentrationen der Proben wurden halbautomatisiert nach der Methode des Maximums der 2. Ableitung des gemessenen Fluoreszenz-Signals berechnet. Die Effizienz der analytischen PCR-Reaktionen der Standard-Verdünnungsreihe variierte gewöhnlich leicht um 1,9fache Amplifikation pro Reaktionszyklus.

Die berechneten Konzentrationswerte werden in eine Excel-Tabelle exportiert und dort weiter mathematisch prozessiert. 3D Visualisierungen von Daten wurden durch Export der berechneten Werte als Vektoren oder Matrizen in die mathematische Analyse-Programmiersprache Matlab durchgeführt. Abbildungen wurden mit dem Vektorgrafik-Programm Illustrator (Adobe) skaliert und beschriftet.

## Normalisierungen der quantitativen Echtzeit-PCR-Daten (RT-PCR)

Für alle RT-PCR Experimente werden die Signale auf einen Kontrolllokus (*MDV1*, auf Chr. X) normalisiert. Die mit *MDV1*-spezifischen Primern erhaltenen Werte werden im Folgenden als „Kontrolle“ bezeichnet, mit anderen Primern erhaltene Werte im allgemeinen als „Test“. Folgende Formel findet dabei Verwendung :  $\text{Anreicherung} = \frac{\text{IP}[\text{Test}]/\text{input}[\text{Test}]}{\text{IP}[\text{Kontrolle}]/\text{input}[\text{Kontrolle}]}$ .

Die Signale wurden, wenn angegeben, auf 1 für den Zeitpunkt vor Induktion des DSB normalisiert, um die relative Anreicherung über die Zeit zu verdeutlichen. Genauere Angaben zur Normalisierung finden sich in Kalocsay et al., 2009<sup>144</sup>.

## Echtzeitmikroskopie

Zur Fluoreszenz-mikroskopischen Beobachtung des GFP-markierten persistierenden DNA-DSB wurden Hefen bis zur exponentiellen Wachstumsphase in YPlaktat- oder SC-Laktat-Medium kultiviert. Zellen wurden auf Concanavalin-A bedeckte Glasboden-Petrischalen (MatTek) aufgebracht und DSBs durch 2% Galaktose in SC-Laktat induziert. Ein ANDOR/Till iMIC CSU22 *spinning disk* Konfokalmikroskop mit einer 100x 1,45NA Objektivlinse (Olympus) wurde verwendet, um Z-Bildstapel von 250 nm Schrittgröße aufzunehmen. Um Assoziation mit der nukleären Peripherie in Zellpopulationen zu bestimmen, wurden Z-Ebenen mit dem hellsten fokussierten GFP-Signal der GFP-markierten *lacO*-Anordnung manuell ausgewählt und ausgewertet. Diese Auswahl erfolge ohne Berücksichtigung des Signals der Kernperipherie. Im Folgenden wurden nur Z-Ebenen ausgewertet, die ein klares Rotsignal an der Zellkernperipherie aufwiesen. Als mit an der Kernperipherie befindlichem DSB wurden Zellen gezählt, in denen die GFP-LacI-Signale mit die Kernperipherie markierendem Nic96<sup>mars</sup>-Signal entweder überlappten oder dieses berührten. Alle übrigen Zellen wurden als nukleoplasmatisch gezählt. Für diese manuellen Auswertungen wurde die Software ImageJ verwendet<sup>146</sup>.

## Klonierung der Plasmide für Stämme zur Echtzeit-mikroskopischen Untersuchung und Herstellung von Stämmen

Für Klonierungen wurden Enzyme und Reaktionspuffer der Firma NEB (New England Biolabs) nach Herstellerangaben verwendet. Ein 300 bp PCR-Produkt mit den Primern 5'-ggaattctgtttgcttgagtctgagatatca-3' and 5'-ggggtagccgctagcccctgggtt ttggtttgtagagtgggtg-3' der genomischen *Z1*-Sequenz aus dem *MAT*-Lokus wurde in YIplac128 über *EcoRI*/*KpnI* kloniert und über gerichtete PCR-Mutagenese mutiert, um eine *NotI*-Schnittstelle nach 150 Basen zu erhalten. Das *XbaI*/*NheI*-Fragment der *lacO*-Anordnung aus pLAU43<sup>147</sup> wurde neben die *Z1*-Sequenz integriert, um das Plasmid pMK*lacOZ1* zu erhalten. Nach Linearisierung mit *NotI* wurde JKM179 transformiert, um MK92 zu erhalten. Die Integration der *lacO*-Anordnung neben den *MAT*-Lokus wurde durch PCR mit *lacO*- und YIplac-spezifischen Primern verifiziert. Das *GFP:lacI:NLS*-Fragment aus pAFS135<sup>148</sup> wurde mittels PCR amplifiziert und über *XbaI*/*XhoI* in einen YIplac211-Vektor kloniert, der einen *URA3*-Promotor (kloniert über *BamHI*/*XbaI*) enthält. Das so erhaltene Plasmid ist mit pMKGFP-lacI bezeichnet. Nach Linearisierung mit *EcoRV* wurde MK92 damit transformiert, um MK101 zu erhalten.

## Klonierung weiterer Plasmide

Plasmide für die Expression von Modell-Transkriptions-Faktoren hatten das Plasmid pLexHyb/Zeo (Invitrogen) zum Ursprung, das zur Expression von LexA unter der Kontrolle des *ADH1*-Promotors dient. Um LexA-VP16 zu exprimieren, wurde in dieses Plasmid die für die VP16-TAD aus *Herpes simplex* kodierende Sequenz für die Aminosäuren EFISTAPPTDVSLGDELHLDGEDVAMAHADALDDFDLDM LGDGDSPGPG über die Schnittstellen *EcoRI/SalI* in pLexHyb/Zeo eingeführt, um pLex-VP16 (LV) zu erhalten. Kodierende Sequenzen für SUMO (Smt3) oder <sup>HA</sup>SUMO mit einer C-terminalen Verknüpfung über die Aminosäuren AV wurden vor die für LexA-VP16 kodierende Sequenz über die Schnittstellen *HindIII/HpaI* eingeführt, um pSUMO-LexA-VP16 (SLV) oder p<sup>HA</sup>SUMO-LexA-VP16 (<sup>HA</sup>SLV) zu erhalten. Die eingefügten SUMO-Sequenzen wurden durch Amplifikation des *smt3*-Gens aus genomischer Hefe-DNA unter Verwendung spezifischer Primer mit den angegebenen Schnittstellen, der GG- zu AV-Mutation im C-Terminus von *smt3* und wenn angegeben einer für ein N-terminales HA-Epitop kodierenden Sequenz, erhalten. Selektion der Plasmide erfolgte sowohl in *E. coli* als auch in *S. cerevisiae* in Gegenwart von Zeozin nach Herstellerangaben (Invitrogen).

Zur Herstellung von Expressionsplasmiden für Hochdosis-Suppressoren wurden zunächst in einen YCplac22-Vektor PCR-amplifizierte Sequenzen des *ADH1*-Promotors (*EcoRI/BamHI*) und des *ADH1*-Terminators (*PstI/HindIII*) eingefügt, um YC22-pADH zu erhalten. Folgende Gene, die mit spezifischen Primern mit den angegebenen Schnittstellen und wenn angegeben mit der kodierenden Sequenz für eine Epitop-Markierung aus genomischer DNA von *S. cerevisiae* amplifiziert wurden, wurden über die angegebenen Schnittstellen in YC22-pADH eingefügt: *ULP1* (*BamHI/PstI*), <sup>HA</sup>*leu3* (*BamHI/SalI*), *HIR2* (*BamHI/SalI*). Um ein Expressionsplasmid einer katalytisch inaktiven Mutante von *ulp1* zu erhalten, wurden die entsprechenden Basen, die zu einem Austausch des katalytischen Cysteins 480 in Ulp1 zu einem Serin führen, im *ULP1*-Plasmid mittels PCR-gerichteter Mutagenese verändert.

Das Reporter-Plasmid für den Roboter-basierten *screen* wurde hergestellt durch Fusionierung der PCR-amplifizierten LexA-Bindestellen des Plasmids pSH18-34 (Invitrogen) mit einem aus genomischer Hefe-DNA durch PCR amplifizierten *URA3*-Gen, das in einen YCplac111-Vektor kloniert wurde. In diesen Vektor wurde die SUMO-LexA-VP16-exprimierende Sequenz aus pSUMO-Lex-VP16 zusammen mit einem Teil der Vektorsequenz, die auch das Zeozin-Resistenzgen enthält, eingesetzt. Eine detaillierte Karte mit verwendeten und vorhandenen Schnittstellen ist in Abbildung 28 dargestellt.

Für die Überexpression von N-terminal His-markiertem SUMO und Ubiquitin wurden integrative Expressionsplasmide aus Hoege *et al.*<sup>149</sup> und weiteren Studien der Arbeitsgruppe verwendet. Die korrekte Sequenz der exprimierten Bereiche sämtlicher in dieser Arbeit hergestellter Plasmide wurde durch Sequenzierung überprüft.

## Transformation von Plasmiden in *S. cerevisiae* und *E. coli*

Transformation von Plasmiden in Hefestämme erfolgte nach der hocheffizienten PEG/TE/Lithium-Acetat-Methode nach Gietz *et al.* durch Hitzeschock bei 42°C für 10 Minuten<sup>150-152</sup>. Transformierte Stämme mit Plasmiden, die Antibiotika-Resistenzen vermitteln, wurden vor Überführung in Medien mit Antibiotika für eine Stunde nach Transformation in nicht-selektivem YPD-Medium vorkultiviert.

Die Transformation von Plasmiden aus Hefe heraus in *E. coli* (*shuttle plasmids*) im *high copy number suppressor screen* erfolgte durch Elektroporation von Elektroporations-kompetenten *E. coli* Bakterien des Stamms XL-1 *blue* nach Standardprotokollen. Plasmid-haltige DNA aus Hefen wurde durch Lyse einer kleinen Menge einer Einzelkolonie von *S. cerevisiae* durch 10 minütiges Kochen in 50 µl 1 % SDS mit folgender Phenol-Chloroform Extraktion von DNA nach Standard-Protokollen erhalten.

Transformation von *E. coli* erfolgte durch Elektroporation in speziellen Küvetten mit einer Spaltbreite von 0,1 mm mit einem Puls von 1,8 kV und 25 µF bei einem Widerstand von 200 Ω. Vor dem Ausbringen auf Antibiotika-haltige Medien wurden *E. coli* für eine Stunde in nicht-selektivem LB-Medium bei 37°C für eine Stunde inkubiert.

## Reinigung von mRNA und mRNA-Quantifizierung

Die Reinigung von mRNA aus *S. cerevisiae* erfolgte mit dem RNAEasy *kit* der Firma Qiagen nach Herstellerangaben. Zur Reinigung wurden 2 OD<sub>600</sub> einer logarithmisch wachsenden Flüssigkultur eingesetzt. Dies entspricht etwa 3-4x10<sup>7</sup> Zellen. Lyse erfolgte mit Silika-Zirkon *beads* (Biospec, Ø 0,5 mm) in Gegenwart von β-Mercaptoethanol im *beadbeater* (Retsch MM301) für 3 mal 3 Minuten bei 30 s<sup>-1</sup>. Reverse Transkriptions-Reaktionen wurden mit dem *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit* der Firma Roche nach Herstellerangaben mit oligo-dT Primern durchgeführt. Quantifizierung erfolgte analog zu CHIP-Analysen durch Echtzeit-PCR-Analyse (*real time PCR analysis*).

## Protein-Techniken

Zur TCA-Fällung von Proteinen wurden Extrakte nach Zugabe von 55% Trichloressigsäure (TCA) zu einer Endkonzentration von 8% und Inkubation für 20 Minuten auf Eis gefällt. Denaturierende Reinigung von His-markierten Proteinen erfolgte über magnetische Nickel-Nitrilo-tri-Essigsäure (NiNTA) Agarose-*beads* der Firma Qiagen in Gegenwart von 6 M Guanidiumhydrochlorid, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris pH 8,0 und 15 mM Imidazol. Proteinextrakte aus Hefe und analytische denaturierende NiNTA-

Reinigungen wurden wie in Hoege *et al.* detailliert beschrieben durchgeführt<sup>149</sup>

## Immunoblot

Durch denaturierende Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennte Proteine wurden mit Hilfe einer Tankblot-Apparatur (Hofer) aus dem Gel auf eine PVDF-Membran überführt. Der Transfer erfolgte bei Raumtemperatur (RT) für 47 min in Transferpuffer (250 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0.1% SDS und 20% Methanol) bei konstanter Spannung von 70 Volt. Zum immunologischen Nachweis der immobilisierten Proteine wurde die Membran für 1 h bei RT in 5% Magermilchpulver (w/v) in TBST (25 mM Tris pH7.5, 137 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 0.05% Tween-20) blockiert. Nach kurzem Waschen in TBST erfolgte die Inkubation mit Primärantikörpern über Nacht bei 4°C in 5% Magermilchpulver (w/v) in TBST. Nach dreimaligem Waschen der Membran für 5 min mit TBST wurde die Membran für 1 h bei RT mit einem HRP-konjugierten sekundären Antikörper (Verdünnung 1:10000) in 5% Magermilchpulver (w/v) in TBST inkubiert. Nach erneutem 4-maligem Waschen in TBST wurden gebundene Antikörper mittels Chemilumineszenz (ECL-Plus *Westernblot Detection Kit*, GE-Healthcare) nachgewiesen. Detektion erfolgte mit einer CCD-Kamera (Fujifilm). In dieser Studie wurden folgende Antikörper verwendet: anti-HA Affinitätsmatrix (Roche), anti-c-Myc Agarose (SIGMA), anti-Rad51 (SantaCruz, sc-33626), anti-Dpm1 (monoklonal aus Maus, Invitrogen), anti-phospho-Rad53 (SantaCruz), anti-Histon H2B (polyklonal aus Kaninchen, Active Motif, Katalog-Nummer 39237), anti-Histon H3 K4 tri-Methyl (Abcam, ab8580), anti-Cdc48 (polyklonal aus Kaninchen, Rumpf *et al.*<sup>78</sup>, Affinitäts-gereinigt von A. Strasser), anti-Shp1 (polyklonal aus Kaninchen, Rumpf *et al.*<sup>78</sup>), anti-Pgk2 (monoklonal aus Maus, Invitrogen)

## Immuno-Präzipitation

150 OD<sub>600</sub> Hefe-Zellen wurden in 1 ml Lyse-Puffer (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1% Triton-X-100 und Complete-Protease-Inhibitoren) mit Silika-Zirkon *beads* lysiert und der klare Überstand einer hochtourigen Zentrifugation mit vorgekoppelter anti-HA Agarose für 12 Stunden bei 4°C unter Rotation inkubiert. Die Agarose-*beads* wurden in Filtersäulen (Millipore) 5 mal mit Lysepuffer gewaschen und Proteine durch 10 minütiges Kochen in SDS-haltigem Probenpuffer eluiert. Proteine aus *input*-Proben wurden durch Zugabe von 55% TCA für 20 Minuten auf Eis gefällt, mit eiskaltem Aceton einmal gewaschen und in SDS-Probenpuffer gelöst. Detektion von Proteinen erfolgte durch HA- und myc-spezifische Antikörper nach Westernblot.



geeignetem Spoulationsmedium induziert und durch weitere Replika-plattierung auf haploide Klone selektiert. Dieses Verfahren ist detailliert von Tong *et al.* und dort enthaltenen Referenzen beschrieben<sup>154,155</sup>. Selektierte, zufällig ausgewählte Nachkömmlinge von Sporen tragen die Deletionsmutation und enthalten das Reporter-Plasmid. Nach weiteren Replikaplattierungen wurden die Deletionsmutanten schließlich auf für das Reportergergen (*URA3*) selektive Platten - in diesem Fall SC-Medium ohne Uracil - automatisiert replikaplattiert und das Wachstum durch visuelle Inspektion der Kolonien untersucht. Da jede Deletionsmutante doppelt in der Kollektion enthalten ist, wurden nur solche Kolonien bewertet, deren Duplikate gleiches Wachstum auf Selektivmedien zeigten.

## Materialien und Rezepte

### Medien für *S. cerevisiae*

#### YPD

1% Hefeextrakt

2% Pepton

2% D-(+)-Glukose

optional : 2% Agar für Kulturplatten, Titration auf pH 7,5 mit Tris-Base

#### SC-Medium

2% D-(+)-Glukose

0,67 % *Yeast Nitrogen Base* ohne Aminosäuren

0,2% *drop out* Aminosäure-Mix (Herstellung bedarfsweise für entsprechende Selektion)

optional : 2% Agar für Kulturplatten, Titration auf pH 7,5 mit Tris-Base

#### YP-Laktat Medium

1 % Bacto Yeast Extrakt

2 % Bacto Pepton

etwa 3 % Milchsäure

pH auf 5,5 eingestellt (12 g NaOH wurden in 900 ml Wasser gelöst und der pH mit 85%iger Milchsäure auf 5,5 eingestellt. Anschließend erfolgte Zugabe der übrigen Komponenten und Autoklavierung.)

#### SC-Laktat Medium

0,67 % *Yeast Nitrogen Base* ohne Aminosäuren

0,2% *drop out* Aminosäure-Mix (Herstellung bedarfsweise für entsprechende Selektion)

pH auf 5,5 eingestellt (12 g NaOH wurden in 900 ml Wasser gelöst und der pH mit 85%iger Milchsäure auf 5,5 eingestellt. Anschließend erfolgte Zugabe der übrigen Komponenten und Autoklavierung.)

## Chemikalien und Materialien

Nourseothricin 100 mg/ml (cloNAT, WERNER BioAgents) für Selektion auf *NatNT2*

Geneticin (G418-Sulfat, Calbiochem) für Selektion auf *KanMX6*

detaillierte Angaben der für ChIP verwendeten Materialien und Chemikalien finden sich bei Aparicio *et al.*<sup>143</sup>. Einige wichtige Komponenten sind im Folgenden aufgeführt :

Complete<sup>®</sup>-Protease-Inhibitoren, EDTA-frei (Roche)

Pefabloc SC (4-(2-Aminoethyl)-benzylsulfonylfluorid-HCl, Roche), Arbeitskonzentration 1 mg/ml

Silika-Zirkon *beads* (Biospec, Ø 0,5 mm)

*beadbeater* (Retsch MM301)

Bioruptor UCD-200 (Diagenode)

Protein A Sepharose CL-4B (GE Healthcare, gefriergetrocknet)

Filtersäulen Amicon Ultrafree-MC (Millipore, Durapore PVDF-Membran, Porengröße 5,0 µm)

ProteinaseK (Sigma) Stammlösung 20 mg/ml in TBS (25 mM Tris pH7.5, 150 mM NaCl)

## Tabelle in dieser Arbeit verwendeter Hefestämme

JKM179	<i>Δhml::ADE1 MATα Δhmr::ADE1 ade1-100 leu2-3,112 lys5 trp1::hisG' ura3-52 ade3::GAL::HO</i>	Lee et al., 1998
JKM139	<i>Δhml::ADE1 MATα Δhmr::ADE1 ade1-100 leu2-3,112 lys5 trp1::hisG' ura3-52 ade3::GAL::HO</i>	Lee et al., 1998
JKM161	<i>HMLα MATα Δhmr::ADE1 ade1-100 leu2-3,112 lys5 trp1::hisG' ura3-52 ade3::GAL::HO</i>	Sugawara et al., 2003
MK3	JKM179, <i>HTZ1<sup>3HA</sup>-tADH::KanMX6</i>	Kalocsay et al., 2009
MK7	JKM179, <i>HTZ1<sup>3HA</sup>-tADH::KanMX6 swr1::natNT2</i>	Kalocsay et al., 2009
MK 92	JKM179, <i>YCR041W-240xLacO::LEU2</i>	Kalocsay et al., 2009
MK 101	JKM179, <i>YCR041W-240xLacO::LEU2, pURA3-GFP-LacI::URA3</i>	Kalocsay et al., 2009
MK97	JKM179, <i>NIC96<sup>mars</sup>::hphNT1 YCR041W-240xLacO::LEU2, pURA3-GFP-LacI::URA3</i>	Kalocsay et al., 2009
MK95	JKM179, <i>MPS3<sup>mars</sup>::hphNT1 YCR041W-240xLacO::LEU2, pURA3-GFP-LacI::URA3</i>	Kalocsay et al., 2009
NHT71	JKM179, <i>MPS3<sup>9myc</sup>::KanMX6</i>	Kalocsay et al., 2009
NHT72	JKM179, <i>MPS3<sup>9myc</sup>::KanMX6 htz1::natNT2</i>	Kalocsay et al., 2009
NHT73	JKM179, <i>MPS3<sup>9myc</sup>::KanMX6 swr1::natNT2</i>	Kalocsay et al., 2009
MK90	JKM179, <i>RFA1<sup>6HA</sup>::kitRP1</i>	Kalocsay et al., 2009
NHT132	JKM161, <i>MPS3<sup>9myc</sup>::HIS3MX6 htz1::natNT2</i>	Kalocsay et al., 2009
NHT133	JKM161, <i>MPS3<sup>9myc</sup>::HIS3MX6 swr1::natNT2</i>	Kalocsay et al., 2009
MK139	JKM179, <i>NIC96<sup>mars</sup>::hphNT1 YCR041W-240xLacO::LEU2, pURA3-GFP-LacI::URA3 Htz1-tADH::KanMX6</i>	Kalocsay et al., 2009
MK140	JKM179, <i>NIC96<sup>mars</sup>::hphNT1 YCR041W-240xLacO::LEU2, pURA3-GFP-LacI::URA3 htz1-K126R-tADH::KanMX6</i>	Kalocsay et al., 2009
MK141	JKM179, <i>NIC96<sup>mars</sup>::hphNT1 YCR041W-240xLacO::LEU2, pURA3-GFP-LacI::URA3 htz1-K133R-tADH::KanMX6</i>	Kalocsay et al., 2009

MK142	JKM179, NIC96 <sup>marS</sup> ::hphNT1 YCR041W-240xLacO::LEU2, pURA3-GFP-LacI::URA3 htz1-K126,133R-tADH::KanMX6	Kalocsay <i>et al.</i> , 2009
NHT282	JKM179, MPS3 <sup>myc</sup> ::kITRP1 HTZ1-tADH::KanMX6	Kalocsay <i>et al.</i> , 2009
NHT283	JKM179, MPS3 <sup>myc</sup> ::kITRP1 htz1-K126R-tADH::KanMX6	Kalocsay <i>et al.</i> , 2009
NHT284	JKM179, MPS3 <sup>myc</sup> ::kITRP1 htz1-K133R-tADH::KanMX6	Kalocsay <i>et al.</i> , 2009
NHT285	JKM179, MPS3 <sup>myc</sup> ::kITRP1 htz1-K126,133R-tADH::KanMX6	Kalocsay <i>et al.</i> , 2009
MK 147	JKM179, htz1-K126R <sup>3HA</sup> -tADH::KanMX6	Kalocsay <i>et al.</i> , 2009
MK 168	JKM179, htz1-K133R <sup>3HA</sup> -tADH::KanMX6	Kalocsay <i>et al.</i> , 2009
MK 149	JKM179, htz1-K126,133R <sup>3HA</sup> -tADH::KanMX6	Kalocsay <i>et al.</i> , 2009
MK 163	JKM179, htz1-K121R <sup>3HA</sup> -tADH::KanMX6	Kalocsay <i>et al.</i> , 2009
MK 164	JKM179, htz1-K129,130R <sup>3HA</sup> -tADH::KanMX6	Kalocsay <i>et al.</i> , 2009
MK 165	JKM179, htz1-K133,134R <sup>3HA</sup> -tADH::KanMX6	Kalocsay <i>et al.</i> , 2009
MK 170	JKM179, htz1-K121,126,129,130,133,134R <sup>3HA</sup> -tADH::KanMX6	Kalocsay <i>et al.</i> , 2009
L40	MATa his3Δ200 trp1-901 leu2-3112 ade2 LYS2::(4lexAop-HIS3 ),URA3::(8lexAop-lacZ) GAL4	Hollenberg <i>et al.</i> , 1996
	L40, sir1::KanMX6	diese Arbeit
	L40, sir2::KanMX6	diese Arbeit
	L40, sir3::KanMX6	diese Arbeit
	L40, sir4::KanMX6	diese Arbeit
	L40, hir1::KanMX6	diese Arbeit
	L40, hir2::KanMX6	diese Arbeit
	L40, hir3::KanMX6	diese Arbeit
	L40, tup1::KanMX6	diese Arbeit
	L40, cac1::KanMX6	diese Arbeit
	L40, cac2::KanMX6	diese Arbeit
	L40, cac3::KanMX6	diese Arbeit
	L40, cac1::KanMX, hir2::NatNT2	diese Arbeit
	L40, dcp1 <sup>3myc</sup> ::KanMX6	diese Arbeit
	L40, dcp2 <sup>3myc</sup> ::KanMX6	diese Arbeit
DF5	trp1-1 his3Δ200 ura3-52 leu2-3,11 lys2-801	Finley <i>et al.</i> , 1987
	DF5, cdc48-6	Rape <i>et al.</i> , 2001
	DF5, shp1::NatNT2	Stefanie Böhm
	DF5, rad6::HIS3	W. Seufert
	DF5, ufd2::LEU2	Rumpf <i>et al.</i> 2006
	DF5, htz1::NatNT2	diese Arbeit

JKM139 and JKM179 sind beschrieben in : Lee, S. E. *et al.* Cell 94, 399-409 (1998)

JKM 161 sind beschrieben in : Sugawara, N., Wang, X. & Haber, J.E. Mol Cell 12, 209-219 (2003)

Mit NHT bezeichnete Stämme wurden von N. Hiller erstellt.

## Literaturverzeichnis

1. Kalocsay, M. & Hiller, N. J. Beobachtung von M. Kalocsay, experimentelle Wiederholung von N.J. Hiller.
2. Hiller, N. J. Beobachtung von Natalie J. Hiller. (2008).
3. Henikoff, S. Labile H3.3+H2A.Z nucleosomes mark 'nucleosome-free regions'. *Nat Genet* **41**, 865-6 (2009).
4. Gartenberg, M. R. Life on the edge: telomeres and persistent DNA breaks converge at the nuclear periphery. *Genes Dev* **23**, 1027-31 (2009).
5. Heinrichs, A. DNA repair: Persistent breaks. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 239 (2009).
6. Lu, P. Y., Lévesque, N. & Kobor, M. S. NuA4 and SWR1-C: two chromatin-modifying complexes with overlapping functions and components. *Biochem. Cell Biol.* **87**, 799-815 (2009).
7. Garcia-Dominguez, M. & Reyes, J. C. SUMO association with repressor complexes, emerging routes for transcriptional control. *Biochim Biophys Acta* **1789**, 451-9 (2009).
8. Morrison, A. J. & Shen, X. Chromatin remodelling beyond transcription: the INO80 and SWR1 complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 373-84 (2009).
9. van Attikum, H. & Gasser, S. M. Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response. *Trends Cell Biol* (2009).
10. Krogh, B. O. & Symington, L. S. Recombination proteins in yeast. *Annu Rev Genet* **38**, 233-71 (2004).
11. Symington, L. S. Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 630-70, table of contents (2002).
12. Lisby, M., Barlow, J. H., Burgess, R. C. & Rothstein, R. Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell* **118**, 699-713 (2004).
13. Wolner, B., van Komen, S., Sung, P. & Peterson, C. L. Recruitment of the recombinational repair machinery to a DNA double-strand break in yeast. *Mol Cell* **12**, 221-32 (2003).
14. Lisby, M., Mortensen, U. H. & Rothstein, R. Colocalization of multiple DNA double-strand breaks at a single Rad52 repair centre. *Nat Cell Biol* **5**, 572-7 (2003).
15. San Filippo, J., Sung, P. & Klein, H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem* **77**, 229-57 (2008).
16. Sinha, M. & Peterson, C. L. A Rad51 presynaptic filament is sufficient to capture nucleosomal homology during recombinational repair of a DNA double-strand break. *Mol Cell* **30**, 803-10 (2008).
17. Sugawara, N., Wang, X. & Haber, J. E. In vivo roles of Rad52, Rad54, and Rad55 proteins in Rad51-mediated recombination. *Mol Cell* **12**, 209-19 (2003).

18. Harrison, J. C. & Haber, J. E. Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. *Annu Rev Genet* **40**, 209-35 (2006).
19. Shroff, R. et al. Distribution and dynamics of chromatin modification induced by a defined DNA double-strand break. *Curr Biol* **14**, 1703-11 (2004).
20. Zhu, Z., Chung, W. H., Shim, E. Y., Lee, S. E. & Ira, G. Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends. *Cell* **134**, 981-94 (2008).
21. Papamichos-Chronakis, M., Krebs, J. E. & Peterson, C. L. Interplay between Ino80 and Swr1 chromatin remodeling enzymes regulates cell cycle checkpoint adaptation in response to DNA damage. *Genes Dev* **20**, 2437-49 (2006).
22. van Attikum, H., Fritsch, O., Hohn, B. & Gasser, S. M. Recruitment of the INO80 complex by H2A phosphorylation links ATP-dependent chromatin remodeling with DNA double-strand break repair. *Cell* **119**, 777-88 (2004).
23. Tsukuda, T., Fleming, A. B., Nickoloff, J. A. & Osley, M. A. Chromatin remodelling at a DNA double-strand break site in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **438**, 379-83 (2005).
24. van Attikum, H., Fritsch, O. & Gasser, S. M. Distinct roles for SWR1 and INO80 chromatin remodeling complexes at chromosomal double-strand breaks. *Embo J* **26**, 4113-25 (2007).
25. Zlatanova, J. & Thakar, A. H2A.Z: view from the top. *Structure* **16**, 166-79 (2008).
26. Millar, C. B., Xu, F., Zhang, K. & Grunstein, M. Acetylation of H2AZ Lys 14 is associated with genome-wide gene activity in yeast. *Genes Dev* **20**, 711-22 (2006).
27. Sarcinella, E., Zuzarte, P. C., Lau, P. N., Draker, R. & Cheung, P. Monoubiquitylation of H2A.Z distinguishes its association with euchromatin or facultative heterochromatin. *Mol Cell Biol* **27**, 6457-68 (2007).
28. Li, B. et al. Preferential occupancy of histone variant H2AZ at inactive promoters influences local histone modifications and chromatin remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18385-90 (2005).
29. Guillemette, B. et al. Variant histone H2A.Z is globally localized to the promoters of inactive yeast genes and regulates nucleosome positioning. *PLoS Biol* **3**, e384 (2005).
30. Raisner, R. M. et al. Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin. *Cell* **123**, 233-48 (2005).
31. Zhang, H., Roberts, D. N. & Cairns, B. R. Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss. *Cell* **123**, 219-31 (2005).
32. Kobor, M. S. et al. A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2-related ATPase Swr1p deposits histone variant H2A.Z into euchromatin. *PLoS Biol* **2**, E131 (2004).
33. Meneghini, M. D., Wu, M. & Madhani, H. D. Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. *Cell* **112**, 725-36 (2003).

34. Zilberman, D., Coleman-Derr, D., Ballinger, T. & Henikoff, S. Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks. *Nature* **456**, 125-9 (2008).
35. Yuan, G. C. et al. Genome-scale identification of nucleosome positions in *S. cerevisiae*. *Science* **309**, 626-30 (2005).
36. Farris, S. D. et al. Transcription-induced chromatin remodeling at the c-myc gene involves the local exchange of histone H2A.Z. *J Biol Chem* **280**, 25298-303 (2005).
37. De Koning, L., Corpet, A., Haber, J. E. & Almouzni, G. Histone chaperones: an escort network regulating histone traffic. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 997-1007 (2007).
38. Loyola, A. & Almouzni, G. Histone chaperones, a supporting role in the limelight. *Biochim Biophys Acta* **1677**, 3-11 (2004).
39. Schwabish, M. A. & Struhl, K. Evidence for eviction and rapid deposition of histones upon transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* **24**, 10111-7 (2004).
40. Schwabish, M. A. & Struhl, K. Asf1 mediates histone eviction and deposition during elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell* **22**, 415-22 (2006).
41. Orphanides, G., Wu, W. H., Lane, W. S., Hampsey, M. & Reinberg, D. The chromatin-specific transcription elongation factor FACT comprises human SPT16 and SSRP1 proteins. *Nature* **400**, 284-8 (1999).
42. Krogan, N. J. et al. A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1. *Mol Cell* **12**, 1565-76 (2003).
43. Mizuguchi, G. et al. ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* **303**, 343-8 (2004).
44. Sherwood, P. W., Tsang, S. V. & Osley, M. A. Characterization of HIR1 and HIR2, two genes required for regulation of histone gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **13**, 28-38 (1993).
45. Kaufman, P. D., Cohen, J. L. & Osley, M. A. Hir proteins are required for position-dependent gene silencing in *Saccharomyces cerevisiae* in the absence of chromatin assembly factor I. *Mol Cell Biol* **18**, 4793-806 (1998).
46. Schermer, U. J., Korber, P. & Horz, W. Histones are incorporated in trans during reassembly of the yeast PHO5 promoter. *Mol Cell* **19**, 279-85 (2005).
47. Prochasson, P., Florens, L., Swanson, S. K., Washburn, M. P. & Workman, J. L. The HIR corepressor complex binds to nucleosomes generating a distinct protein/DNA complex resistant to remodeling by SWI/SNF. *Genes Dev* **19**, 2534-9 (2005).
48. Rusche, L. N., Kirchmaier, A. L. & Rine, J. The establishment, inheritance, and function of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Biochem* **72**, 481-516 (2003).
49. Oki, M., Valenzuela, L., Chiba, T., Ito, T. & Kamakaka, R. T. Barrier proteins remodel and modify chromatin to restrict silenced domains. *Mol Cell Biol* **24**, 1956-67 (2004).

50. Malone, C. D. & Hannon, G. J. Small RNAs as guardians of the genome. *Cell* **136**, 656-68 (2009).
51. Hay, R. T. SUMO: a history of modification. *Mol Cell* **18**, 1-12 (2005).
52. Shii, Y. & Eisenman, R. N. Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13225-30 (2003).
53. Nathan, D. et al. Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications. *Genes Dev* **20**, 966-76 (2006).
54. Robzyk, K., Recht, J. & Osley, M. A. Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science* **287**, 501-4 (2000).
55. Zhang, Y. Transcriptional regulation by histone ubiquitination and deubiquitination. *Genes Dev* **17**, 2733-40 (2003).
56. Osley, M. A. H2B ubiquitylation: the end is in sight. *Biochim Biophys Acta* **1677**, 74-8 (2004).
57. Kao, C. F. et al. Rad6 plays a role in transcriptional activation through ubiquitylation of histone H2B. *Genes Dev* **18**, 184-95 (2004).
58. Osley, M. A., Fleming, A. B. & Kao, C. F. Histone ubiquitylation and the regulation of transcription. *Results Probl Cell Differ* **41**, 47-75 (2006).
59. Daniel, J. A. et al. Deubiquitination of histone H2B by a yeast acetyltransferase complex regulates transcription. *J Biol Chem* **279**, 1867-71 (2004).
60. Henry, K. W. et al. Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8. *Genes Dev* **17**, 2648-63 (2003).
61. Emre, N. C. et al. Maintenance of low histone ubiquitylation by Ubp10 correlates with telomere-proximal Sir2 association and gene silencing. *Mol Cell* **17**, 585-94 (2005).
62. Gardner, R. G., Nelson, Z. W. & Gottschling, D. E. Ubp10/Dot4p regulates the persistence of ubiquitinated histone H2B: distinct roles in telomeric silencing and general chromatin. *Mol Cell Biol* **25**, 6123-39 (2005).
63. Hwang, W. W. et al. A conserved RING finger protein required for histone H2B monoubiquitination and cell size control. *Mol Cell* **11**, 261-6 (2003).
64. Wood, A. et al. Bre1, an E3 ubiquitin ligase required for recruitment and substrate selection of Rad6 at a promoter. *Mol Cell* **11**, 267-74 (2003).
65. Krogan, N. J. et al. Regulation of chromosome stability by the histone H2A variant Htz1, the Swr1 chromatin remodeling complex, and the histone acetyltransferase NuA4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13513-8 (2004).
66. Shilatifard, A. Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu Rev Biochem* **75**, 243-69 (2006).
67. Sims, R. J., 3rd, Nishioka, K. & Reinberg, D. Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet* **19**, 629-39 (2003).
68. Koch, F., Jourquin, F., Ferrier, P. & Andrau, J. C. Genome-wide RNA polymerase II: not genes only! *Trends Biochem Sci* **33**, 265-73 (2008).

69. Svejstrup, J. Q. Contending with transcriptional arrest during RNAPII transcript elongation. *Trends Biochem Sci* **32**, 165-71 (2007).
70. Somesh, B. P. et al. Multiple mechanisms confining RNA polymerase II ubiquitylation to polymerases undergoing transcriptional arrest. *Cell* **121**, 913-23 (2005).
71. Somesh, B. P. et al. Communication between distant sites in RNA polymerase II through ubiquitylation factors and the polymerase CTD. *Cell* **129**, 57-68 (2007).
72. Muratani, M. & Tansey, W. P. How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 192-201 (2003).
73. Salghetti, S. E., Muratani, M., Wijnen, H., Futcher, B. & Tansey, W. P. Functional overlap of sequences that activate transcription and signal ubiquitin-mediated proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3118-23 (2000).
74. Muratani, M., Kung, C., Shokat, K. M. & Tansey, W. P. The F box protein Dsg1/Mdm30 is a transcriptional coactivator that stimulates Gal4 turnover and cotranscriptional mRNA processing. *Cell* **120**, 887-99 (2005).
75. Hoppe, T. et al. Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. *Cell* **102**, 577-86 (2000).
76. Rape, M. et al. Mobilization of processed, membrane-tethered SPT23 transcription factor by CDC48(UFD1/NPL4), a ubiquitin-selective chaperone. *Cell* **107**, 667-77 (2001).
77. Richly, H. et al. A series of ubiquitin binding factors connects CDC48/p97 to substrate multiubiquitylation and proteasomal targeting. *Cell* **120**, 73-84 (2005).
78. Rumpf, S. & Jentsch, S. Functional division of substrate processing cofactors of the ubiquitin-selective Cdc48 chaperone. *Mol Cell* **21**, 261-9 (2006).
79. Jentsch, S. & Rumpf, S. Cdc48 (p97): a "molecular gearbox" in the ubiquitin pathway? *Trends Biochem Sci* **32**, 6-11 (2007).
80. Hetzer, M. et al. Distinct AAA-ATPase p97 complexes function in discrete steps of nuclear assembly. *Nat Cell Biol* **3**, 1086-91 (2001).
81. Meyer, H. H., Wang, Y. & Warren, G. Direct binding of ubiquitin conjugates by the mammalian p97 adaptor complexes, p47 and Ufd1-Npl4. *Embo J* **21**, 5645-52 (2002).
82. Ramadan, K. et al. Cdc48/p97 promotes reformation of the nucleus by extracting the kinase Aurora B from chromatin. *Nature* **450**, 1258-62 (2007).
83. Sachdev, S. et al. PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev* **15**, 3088-103 (2001).
84. Ross, S., Best, J. L., Zon, L. I. & Gill, G. SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization. *Mol Cell* **10**, 831-42 (2002).
85. Sapetschnig, A. et al. Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1. *Embo J* **21**, 5206-15 (2002).

86. Schmidt, D. & Muller, S. Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2872-7 (2002).
87. Ouyang, J., Shi, Y., Valin, A., Xuan, Y. & Gill, G. Direct binding of CoREST1 to SUMO-2/3 contributes to gene-specific repression by the LSD1/CoREST1/HDAC complex. *Mol Cell* **34**, 145-54 (2009).
88. Stielow, B. et al. Identification of SUMO-dependent chromatin-associated transcriptional repression components by a genome-wide RNAi screen. *Mol Cell* **29**, 742-54 (2008).
89. Stielow, B., Sapetschnig, A., Wink, C., Kruger, I. & Suske, G. SUMO-modified Sp3 represses transcription by provoking local heterochromatic gene silencing. *EMBO Rep* **9**, 899-906 (2008).
90. Torres-Rosell, J. et al. The Smc5-Smc6 complex and SUMO modification of Rad52 regulates recombinational repair at the ribosomal gene locus. *Nat Cell Biol* **9**, 923-31 (2007).
91. Cook, C. E., Hochstrasser, M. & Kerscher, O. The SUMO-targeted ubiquitin ligase subunit Slx5 resides in nuclear foci and at sites of DNA breaks. *Cell Cycle* **8**, 1080-9 (2009).
92. Li, S. J. & Hochstrasser, M. The Ulp1 SUMO isopeptidase: distinct domains required for viability, nuclear envelope localization, and substrate specificity. *J Cell Biol* **160**, 1069-81 (2003).
93. Zhao, X., Wu, C. Y. & Blobel, G. Mlp-dependent anchorage and stabilization of a desumoylating enzyme is required to prevent clonal lethality. *J Cell Biol* **167**, 605-11 (2004).
94. Brickner, D. G. et al. H2A.Z-mediated localization of genes at the nuclear periphery confers epigenetic memory of previous transcriptional state. *PLoS Biol* **5**, e81 (2007).
95. Lee, S. E. et al. Saccharomyces Ku70, mre11/rad50 and RPA proteins regulate adaptation to G2/M arrest after DNA damage. *Cell* **94**, 399-409 (1998).
96. Nagai, S. et al. Functional targeting of DNA damage to a nuclear pore-associated SUMO-dependent ubiquitin ligase. *Science* **322**, 597-602 (2008).
97. White, C. I. & Haber, J. E. Intermediates of recombination during mating type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **9**, 663-73 (1990).
98. Mimitou, E. P. & Symington, L. S. Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature* (2008).
99. van Attikum, H. & Gasser, S. M. ATP-dependent chromatin remodeling and DNA double-strand break repair. *Cell Cycle* **4**, 1011-4 (2005).
100. Albert, I. et al. Translational and rotational settings of H2A.Z nucleosomes across the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* **446**, 572-6 (2007).
101. Chen, C. C. et al. Acetylated lysine 56 on histone H3 drives chromatin assembly after repair and signals for the completion of repair. *Cell* **134**, 231-43 (2008).
102. Lisby, M. & Rothstein, R. DNA repair: keeping it together. *Curr Biol* **14**, R994-6 (2004).
103. Gunkel, M. et al. Dual color localization microscopy of cellular nanostructures. *Biotechnol J* **4**, 927-38 (2009).

104. Sacher, M., Pfander, B., Hoegge, C. & Jentsch, S. Control of Rad52 recombination activity by double-strand break-induced SUMO modification. *Nat Cell Biol* **8**, 1284-90 (2006).
105. Jasiak, A. J. et al. Genome-associated RNA Polymerase II Includes the Dissociable Rpb4/7 Subcomplex. *J Biol Chem* **283**, 26423-7 (2008).
106. Pelechano, V. et al. Regulon-specific control of transcription elongation across the yeast genome. *PLoS Genet* **5**, e1000614 (2009).
107. Kizer, K. O. et al. A novel domain in Set2 mediates RNA polymerase II interaction and couples histone H3 K36 methylation with transcript elongation. *Mol Cell Biol* **25**, 3305-16 (2005).
108. Exinger, F. & Lacroute, F. 6-Azauracil inhibition of GTP biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **22**, 9-11 (1992).
109. Mandal, S. S., Cho, H., Kim, S., Cabane, K. & Reinberg, D. FCP1, a phosphatase specific for the heptapeptide repeat of the largest subunit of RNA polymerase II, stimulates transcription elongation. *Mol Cell Biol* **22**, 7543-52 (2002).
110. Morillon, A., O'Sullivan, J., Azad, A., Proudfoot, N. & Mellor, J. Regulation of elongating RNA polymerase II by forkhead transcription factors in yeast. *Science* **300**, 492-5 (2003).
111. Salghetti, S. E., Caudy, A. A., Chenoweth, J. G. & Tansey, W. P. Regulation of transcriptional activation domain function by ubiquitin. *Science* **293**, 1651-3 (2001).
112. Strom, L. et al. Postreplicative formation of cohesion is required for repair and induced by a single DNA break. *Science* **317**, 242-5 (2007).
113. Oza, P., Jaspersen, S. L., Miele, A., Dekker, J. & Peterson, C. L. Mechanisms that regulate localization of a DNA double-strand break to the nuclear periphery. *Genes Dev* **23**, 912-27 (2009).
114. Barzel, A. & Kupiec, M. Finding a match: how do homologous sequences get together for recombination? *Nat Rev Genet* **9**, 27-37 (2008).
115. Vaze, M. B. et al. Recovery from checkpoint-mediated arrest after repair of a double-strand break requires Srs2 helicase. *Mol Cell* **10**, 373-85 (2002).
116. Gill, G. Something about SUMO inhibits transcription. *Curr Opin Genet Dev* **15**, 536-41 (2005).
117. Lyst, M. J. & Stancheva, I. A role for SUMO modification in transcriptional repression and activation. *Biochem Soc Trans* **35**, 1389-92 (2007).
118. Dejardin, J. & Kingston, R. E. Purification of proteins associated with specific genomic Loci. *Cell* **136**, 175-86 (2009).
119. Iniguez-Lluhi, J. A. For a healthy histone code, a little SUMO in the tail keeps the acetyl away. *ACS Chem Biol* **1**, 204-6 (2006).
120. Gonzalez, F., Delahodde, A., Kodadek, T. & Johnston, S. A. Recruitment of a 19S proteasome subcomplex to an activated promoter. *Science* **296**, 548-50 (2002).
121. Nalley, K., Johnston, S. A. & Kodadek, T. Proteolytic turnover of the Gal4 transcription factor is not required for function in vivo. *Nature* **442**, 1054-7 (2006).

122. Ferdous, A. et al. The role of the proteasomal ATPases and activator monoubiquitylation in regulating Gal4 binding to promoters. *Genes Dev* **21**, 112-23 (2007).
123. Archer, C. T., Delahodde, A., Gonzalez, F., Johnston, S. A. & Kodadek, T. Activation domain-dependent monoubiquitylation of Gal4 protein is essential for promoter binding in vivo. *J Biol Chem* **283**, 12614-23 (2008).
124. Gerber, M. & Shilatifard, A. Transcriptional elongation by RNA polymerase II and histone methylation. *J Biol Chem* **278**, 26303-6 (2003).
125. Hampsey, M. & Reinberg, D. Tails of intrigue: phosphorylation of RNA polymerase II mediates histone methylation. *Cell* **113**, 429-32 (2003).
126. Kaiser, P., Flick, K., Wittenberg, C. & Reed, S. I. Regulation of transcription by ubiquitination without proteolysis: Cdc34/SCF(Met30)-mediated inactivation of the transcription factor Met4. *Cell* **102**, 303-14 (2000).
127. Flick, K. et al. Proteolysis-independent regulation of the transcription factor Met4 by a single Lys 48-linked ubiquitin chain. *Nat Cell Biol* **6**, 634-41 (2004).
128. Shilatifard, A. Molecular implementation and physiological roles for histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 341-8 (2008).
129. Krogan, N. J. et al. Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **440**, 637-43 (2006).
130. Core, L. J., Waterfall, J. J. & Lis, J. T. Nascent RNA sequencing reveals widespread pausing and divergent initiation at human promoters. *Science* **322**, 1845-8 (2008).
131. Zeitlinger, J. et al. RNA polymerase stalling at developmental control genes in the *Drosophila melanogaster* embryo. *Nat Genet* **39**, 1512-6 (2007).
132. Muse, G. W. et al. RNA polymerase is poised for activation across the genome. *Nat Genet* **39**, 1507-11 (2007).
133. Guenther, M. G., Levine, S. S., Boyer, L. A., Jaenisch, R. & Young, R. A. A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell* **130**, 77-88 (2007).
134. Bernstein, B. E. et al. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* **125**, 315-26 (2006).
135. Ljungman, M. & Lane, D. P. Transcription - guarding the genome by sensing DNA damage. *Nat Rev Cancer* **4**, 727-37 (2004).
136. Ljungman, M. The transcription stress response. *Cell Cycle* **6**, 2252-7 (2007).
137. Studitsky, V. M., Walter, W., Kireeva, M., Kashlev, M. & Felsenfeld, G. Chromatin remodeling by RNA polymerases. *Trends Biochem Sci* **29**, 127-35 (2004).
138. Sambrook, J., Fritsch, E.F., und Maniatis, T. *Molecular Cloning*. CSH Laboratory Press (1989).
139. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidmna, J.G., Smith, J.A., und Struhl, K. *Current Protocols in Molecular Biology*. Green and Wiley, New York (1994).

140. Janke, C. et al. A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* **21**, 947-62 (2004).
141. Knop, M. et al. Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* **15**, 963-72 (1999).
142. Ira, G. et al. DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature* **431**, 1011-7 (2004).
143. Aparicio, O. et al. Chromatin immunoprecipitation for determining the association of proteins with specific genomic sequences in vivo. *Curr Protoc Mol Biol* **Chapter 21**, Unit 21 3 (2005).
144. Kalocsay, M., Hiller, N. J. & Jentsch, S. Chromosome-Wide Rad51 Spreading and SUMO-H2A.Z-Dependent Chromosome Fixation in Response to a Persistent DNA Double-Strand Break. *Molecular Cell* **33**, 335-43 (2009).
145. O'Geen, H., Nicolet, C. M., Blahnik, K., Green, R. & Farnham, P. J. Comparison of sample preparation methods for ChIP-chip assays. *Biotechniques* **41**, 577-80 (2006).
146. Rasband, W. S. ImageJ. *U. S. National Institutes of Health* (1997-2005).
147. Lau, I. F. et al. Spatial and temporal organization of replicating *Escherichia coli* chromosomes. *Mol Microbiol* **49**, 731-43 (2003).
148. Straight, A. F., Belmont, A. S., Robinett, C. C. & Murray, A. W. GFP tagging of budding yeast chromosomes reveals that protein-protein interactions can mediate sister chromatid cohesion. *Curr Biol* **6**, 1599-608 (1996).
149. Hoegge, C., Pfander, B., Moldovan, G. L., Pyrowolakis, G. & Jentsch, S. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* **419**, 135-41 (2002).
150. Gietz, R. D. & Schiestl, R. H. Quick and easy yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc* **2**, 35-7 (2007).
151. Gietz, R. D. & Schiestl, R. H. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc* **2**, 31-4 (2007).
152. Gietz, R. D. & Schiestl, R. H. Large-scale high-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc* **2**, 38-41 (2007).
153. Gera, J. F., Hazbun, T. R. & Fields, S. Array-based methods for identifying protein-protein and protein-nucleic acid interactions. *Methods Enzymol* **350**, 499-512 (2002).
154. Tong, A. H. et al. Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science* **294**, 2364-8 (2001).
155. Tong, A. H. et al. Global mapping of the yeast genetic interaction network. *Science* **303**, 808-13 (2004).

