

**The Role of Sir2's  
Enzymatic Activity in the Assembly of  
Silencing Complexes  
in Budding Yeast**

Dissertation zur Erlangung der  
Doktorwürde der Naturwissenschaften

Eingereicht am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von  
Georg J. Hoppe  
aus Berlin

Boston 2002

1. Gutachter: Prof. Dr. Hans Lehrach

Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin, Germany

2. Gutachter: Prof. Dr. Danesh Moazed

Department of Cell Biology, Harvard Medical School, Boston, USA

Tag der Disputation: 6. November 2002

**ACKNOWLEDGEMENTS**

I am very grateful to Danesh Moazed for the opportunity to work in his laboratory as well as for his help and support. I am indebted to Jason Tanny for his cooperation on figure 3.5 and Sherwin Danaie for his help on figure 3.10. I thank Cece Centrella for technical assistance as well as Tim Mitchison and members of his laboratory for the use of his microscopes and the help provided.

# CONTENTS

<b>1 INTRODUCTION</b> .....	<b>6</b>
1.1 GENE SILENCING: AN INTRODUCTION.....	6
1.2 CHARACTERISTICS OF GENE SILENCING.....	8
1.3 THE SILENCING MACHINERY IN <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> .....	9
1.4 THE ROLE OF HISTONES IN SILENCING.....	13
1.5 THE ENZYMATIC ACTIVITY OF SIR2.....	15
1.6 THESIS GOALS.....	17
<b>2 MATERIALS AND METHODS</b> .....	<b>19</b>
2.1 CHEMICALS, BUFFERS, SOLUTIONS, MEDIA.....	19
2.2 LABORATORY DEVICES.....	20
2.3 HANDLING OF DNA.....	21
2.4 ENZYMATIC REACTIONS WITH DNA.....	22
2.5 CONSTRUCTION OF PLASMIDS.....	22
2.6 BACTERIA.....	24
2.7 YEAST.....	26
2.8 MICROSCOPY.....	30
2.9 SILENCING ASSAYS.....	30
2.10 CHROMATION IMMUNOPRECIPITATION (CHIP).....	31
<b>3 RESULTS</b> .....	<b>35</b>
3.1 THE ROLE OF THE ENZYMATIC ACTIVITY OF SIR2 FOR EFFICIENT ASSOCIATION OF THE SIR COMPLEX WITH DNA.....	35
3.2 THE ROLE OF SIR2 IN THE RECRUITMENT OF SIR3 TO rDNA.....	44
3.3 A ROLE FOR SIR3 IN rDNA SILENCING?.....	48
3.4 THE NAD <sup>+</sup> -DEPENDENT DEACETYLASE ACTIVITY OF SIR2 AND HISTONE H4 DEACETYLATION .....	49
3.5 THE N-TERMINI OF HISTONES H3 AND H4 IN rDNA SILENCING.....	51
<b>4 DISCUSSION</b> .....	<b>54</b>
4.1 THE SIR2-H364Y POINT MUTANT.....	54
4.2 THE ENZYMATIC ACTIVITY OF SIR2 AND THE ASSEMBLY OF SILENCING COMPLEXES ON CHROMATIN.....	55
4.3 RECRUITMENT OF SIR3 TO SILENT CHROMATIN.....	61
4.4 THE ROLE OF HISTONES IN rDNA SILENCING.....	63
4.5 HISTONES AS <i>IN VIVO</i> SUBSTRATES OF SIR2.....	64
<b>5 REFERENCES</b> .....	<b>65</b>

<b>6 APPENDIX .....</b>	<b>75</b>
6.1 SUMMARY .....	75
6.2 ZUSAMMENFASSUNG .....	77
6.3 ABBREVIATIONS.....	79
6.4 CURRICULUM VITAE .....	80
6.5 PUBLICATIONS .....	81

## 6 APPENDIX

### 6.1 Summary

The folding of DNA into high-order chromatin structures appears to play a central role in the regulation of gene transcription. During recent years, various complexes associated with transcriptional activation or repression have been shown to contain chromatin remodeling activity or enzymes that covalently modify histones.

The inactivation of large domains of DNA by their compaction into an inaccessible chromatin structure is referred to as chromatin silencing. This type of inactivation is involved in regulation of gene expression and is associated with chromosome structures that are involved in epigenetic inheritance.

The silent information regulator 2 (Sir2) protein is a key component of the silencing machinery in yeast. Sir2 is an enzyme that couples protein deacetylation to NAD<sup>+</sup> hydrolysis and is required for silencing at the silent mating type loci, the telomeres, and the ribosomal DNA repeats in *Saccharomyces cerevisiae*. In my thesis, I investigated the role of this enzymatic function in the assembly of silencing complexes at different loci.

I have examined the assembly of silencing complexes on DNA in cells carrying the sir2-H364Y and sir2-G262A mutations, which both abolish the enzymatic activity of Sir2. I show that the association of the SIR complex (Sir2/Sir4 and Sir3) with DNA at telomeres and the *HML-E* silencer, as well as the localization of Sir2-GFP, Sir3-GFP, and GFP-Sir4 to subnuclear telomeric foci, are lost in cells containing an enzymatically inactive Sir2 protein. In contrast, Sir2 associates with rDNA and localizes to the nucleolus with approximately equal efficiency in both SIR2 and sir2-H364Y cells. I find further that histone H4 associated with the rDNA repeats is hypoacetylated. Acetylation of H4 in rDNA and telomeric regions is increased in cells containing either a sir2 deletion or the sir2-H364Y allele, suggesting that Sir2 directly deacetylates histones in these regions. Consistent with this data, I find that

mutation of lysine 16 of histone H4 to glutamine, or deletion of histone H3 N-terminal residues 4-30 result in a dramatic loss of rDNA silencing. Finally, I show that the association of Sir3 with rDNA in a *sir4*Δ strain requires the enzymatic activity of Sir2, arguing that Sir3 can localize to chromatin independently of interactions with any of the known silencing proteins. Together, these data suggest that the modification of histones or other chromatin proteins by Sir2 creates a binding site for silencing complexes on chromatin.

## 6.2 Zusammenfassung

Die Kompaktierung von DNA in geordnete Strukturen scheint eine zentrale Rolle in der Regulation der Gentranskription zu spielen. Während der letzten Jahre sind diverse Proteinkomplexe identifiziert worden, die für die Aktivierung oder Inaktivierung der Transkription von Genen verantwortlich sind und die Chromatin-umordnende Aktivität besitzen oder Enzyme enthalten, die Histone kovalent modifizieren.

Die Inaktivierung von großen DNA Domänen durch Kompaktierung in eine geschlossene Chromatinstruktur wird als "Chromatin Silencing" bezeichnet. Diese Art der Inaktivierung spielt eine Rolle in der Regulation der Genexpression und ist assoziiert mit Chromosomenstrukturen, die in der epigenetischen Vererbung eine Rolle spielen.

Das Silent information regulator (Sir2) Protein ist eine Schlüsselkomponente des Silencing Apparates in Hefe. Sir2 ist ein Enzym, welches die Deacetylierung von Proteinen an die Hydrolyse von  $\text{NAD}^+$  koppelt und notwendig für Silencing an den "mating type" Loci, den Telomeren und den ribosomalen DNA Einheiten in *Saccharomyces cerevisiae* ist. In dieser Arbeit habe ich die Rolle der enzymatischen Aktivität bei der Bindung von Silencing-Komplexen an verschiedene Loci untersucht.

Im einzelnen habe ich die Bildung von Silencing Komplexen auf DNA in Zellen untersucht, die sir2-H364Y oder sir2-G262A Mutationen tragen, durch welche die enzymatische Aktivität von Sir2 verloren geht. Ich zeige, daß sowohl die Assoziation des SIR Komplexes (Sir2/Sir4 and Sir3) mit DNA der Telomeren und des *HML-E* silencers, als auch die Lokalisation von Sir2-GFP, Sir3-GFP und GFP-Sir4 zu telomerischen Foci in Zellen, die eine enzymatisch inaktive Variante von Sir2 exprimieren, verloren geht. Im Gegensatz dazu bindet Sir2 mit annähernd gleicher Effizienz sowohl in SIR2 als auch in sir2-H364Y Zellen an rDNA. Außerdem ist sir2-H364Y, genauso wie Sir2, im Nukleolus lokalisiert. Ich konnte weiterhin zeigen, dass an rDNA-Einheiten gebundenes Histon H4 hypoacetyliert ist. Die Acetylierung von Histone H4 in rDNA und Telomeren ist erhöht in Zellen, die entweder kein



Sir2 Protein exprimieren oder das sir2-H364Y-Allel tragen. Dies legt nahe, dass Sir2 unmittelbar Histone in diesen Regionen deacetyliert. Im Einklang mit diesen Beobachtungen steht das Ergebnis, dass eine Mutation von Lysin 16 des Histon H4 Proteins zu Glutamin oder die Deletion der Aminosäuren vier bis 30 des N-Terminus von Histone H3 zu einem dramatischen Verlust des rDNA Silencing führt. Schließlich kann ich zeigen, dass Sir3 in einem *sir4*Δ Stamm nur dann mit rDNA assoziiert ist, wenn Sir2 enzymatisch aktiv ist. Dies legt nahe, dass Sir3 ohne Interaktion mit einem der bisher bekannten Silencing Proteine an Chromatin binden kann. Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Modifikation von Histonen oder anderen Proteinen des Chromatins durch Sir2 eine Bindungsstelle für Silencing-Komplexe in Chromatin eröffnet.

### 6.3 Abbreviations

A	Alanine
Ac	Acetyl group
ADP	Adenosine diphosphate
ADPRAc	O-acetyl-ADP-ribose
ChIP	Chromatin immunoprecipitation
DNA	Desoxyribonucleic acid
EDTA	(Ethylenedinitrilo)tetraacetic acid
G	Glycine
GFP	Green Fluorescent Protein
H	Histidine
h	hour
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]
HDAC	(NAD <sup>+</sup> -independent) histidine deacetylase
IP	Immunoprecipitation
kb	kilobase
min	minute
OD <sub>660</sub>	Optical density at 660 nm
PCR	Polymerase chain reaction
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PolI	RNA polymerase I
PolII	RNA polymerase II
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamide adenine dinucleotide
NTS	non-transcribed spacer
RENT	REgulator of Nucleolar silencing and Telophase exit
rDNA	Ribosomal desoxyribonucleic acid
RNA	Ribonucleic acid
sec	second
SD media	Synthetic minimal media
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Sir	Silent information regulator
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
Y	Tyrosine

## 6.4 Curriculum Vitae

### Personal Data

Date of birth: August 2, 1971  
 Place of birth: Berlin, Germany

### University Education

1998-present **Harvard Medical School**

Department of Cell Biology, *Boston, MA, USA*

Work on Ph.D. thesis

1992-present **Freie Universität Berlin**, *Berlin, Germany*

Department of Chemistry

1998	Diplom Biochemie
1997	Vordiplom Biochemie
1996	Vordiplom Chemie

Medical School

1995	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1993	Ärztliche Vorprüfung

### School Education

1991	Abitur
1989-91	Walther-Rathenau-Oberschule, Berlin
1988-89	Biggar Composite High School, Saskatchewan, Canada
1985-88	Walther-Rathenau-Oberschule, Berlin
1979-84	Carl-Orff-Grundschule, Berlin

## 6.5 Publications

Hoppe GJ, Tanny JC, Rudner AD, Gerber SA, Danaie S, Gygi SP, Moazed D:  
Steps in assembly of silent chromatin in yeast: Sir3-independent binding of a Sir2/Sir4  
complex to silencers and role of Sir2-dependent deacetylation.  
*Mol Cell Biol* 2002; **22**: 4167-4180

Shou W, Sakamoto KM, Keener J, Morimoto KW, Traverso EE, Azzam R, Hoppe GJ,  
Feldman RMR, DeModena J, Moazed D, Charbonneau H, Nomura M, Deshaies RJ:  
Net1 stimulates RNA Polymerase I transcription and regulates nucleolar structure  
independently of controlling mitotic exit.  
*Mol Cell* 2001; **8**: 45-55

Koenig Merediz SA, Schmidt M, Hoppe GJ, Alfken J, Meraro D, Levi BZ, et al.:  
Cloning of an interferon regulatory factor 2 isoform with different regulatory ability.  
*Nucl Ac Res* 2000; **28**: 4219-4224

Schmidt M, Hochhaus A, Konig-Merediz SA, Brendel C, Proba J, Hoppe GJ, et al.:  
Expression of Interferon Regulatory Factor 4 in Chronic Myeloid Leukemia: Correlation With  
Response to Interferon Alfa Therapy.  
*J Clin Oncol* 2000; **18**: 3331-3338