



Doctoral Thesis

Studies on DNA methylation

Author(s):

Stancheva, Irina

Publication Date:

1997

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001805914> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

STUDIES ON DNA METHYLATION

A dissertation Nr: 12180 submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
IRINA STANCHEVA
M.S. of University of Sofia, Bulgaria
born 19.06.1965
Russian citizen



accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Th. Koller, examiner
Prof. Dr. U. Suter, co-examiner
Dr. J.M. Sogo, co-examiner

1997

Zusammenfassung

Das Ziel meiner Doktorarbeit war die Untersuchung der Chromatinorganisation und DNS Methylierung von ribosomalen RNS (rRNS) Genen in der Ratte durch zwei verschiedene chemische Vernetzungstechniken: Formaldehyd Fixierung und Psoralen Photoverknüpfung. Diese zwei Versuchsansätze basieren auf unterschiedlichen chemischen Eigenschaften des Chromatins. Beide ermöglichen es, nukleosomale und nicht-nukleosomale, d.h. aktive und inaktive rRNS Genkopien zu unterscheiden. Dadurch können beide Techniken als nützliche Werkzeuge verwendet werden, um beide Arten des Chromatins in rRNS Genen zu separieren und unabhängig von einander zu untersuchen. Die Kombination beider Techniken erlaubt die Nachteile der einzelnen Techniken zu kompensieren. Die Psoralen Photovernetzung basiert auf der unterschiedlichen Bindung von Psoralen Molekülen in nukleosomale und nicht-nukleosomale DNS. Psoralen Photoverknüpfung ist möglicherweise die genaueste Methode, um das Verhältnis von aktiven (nicht-nukleosomalen) und inaktiven (nukleosomalen) rRNS Genkopien mit Hilfe des Gelretardationsverfahrens zu bestimmen. Leider ist die Psoralen verknüpfte DNS nicht immer durch Restriktionsenzyme verdaubar. Im Vergleich dazu werden, wenn die DNS im Chromatin in Nucleosomen verpackt ist (inaktive rRNS Kopien), die Histone durch die Formaldehydfixierung an die DNS gebunden. Dadurch können beide Klassen von Chromatin, die in rRNS Genen vorkommen, qualitativ erkannt werden. Formaldehyd erzeugte Histon-DNS Verbindungen haben den Vorteil reversibel zu sein. Dadurch können nukleosomale und nicht-nukleosomale DNS Fragmente zuerst im Gelretardationsverfahren aufgetrennt, aus dem Agarosegel isoliert und dann weiter analysiert werden.

Im ersten Teil meiner Dissertation habe ich die Eigenschaften der Formaldehydfixierung getestet, um dann die Formaldehydfixierungs- und Psoralen Vernetzung zur Untersuchung der DNS Methylierung in verschiedenen Regionen der rRNS Gene zu benutzen. In früheren Untersuchungen versuchte man eine Korrelation zwischen rDNS Methylierung und Transkriptionsaktivität herzustellen. Ich untersuchte daher getrennt und detailliert das Methylierungsmuster in transkriptionsaktiver und inaktiver rDNS, da eine solche Studie vorher noch nie gemacht wurde.

Meine Resultate geben einen klaren Hinweis darauf, daß hauptsächlich die regulatorischen Sequenzen (Promotoren und Enhancerregionen) von inaktiven rRNS Genkopien methyliert sind. In transkriptionsaktiven Genen und kodierenden Sequenzen, unabhängig davon ob sie transkribiert waren, wurde keine Methylierung gefunden. Ich nehme deshalb an, daß Methylierung in einem Mechanismus der Zellerinnerung involviert ist, welcher für die stabile Weitergabe aktiver und inaktiver rRNS Genkopien in einem konstanten Verhältnis sorgt. Um diese Annahme zu testen, versuchte ich im zweiten Teil meiner Dissertation das Beibehalten der Methylierungsmuster in aufeinanderfolgenden Zellgenerationen zu untersuchen. Dazu wurde der Grad der Remethylierung in Tochter DNS nach Durchlaufen der Replikationsgabel analysiert.

Aus verschiedenen Gründen ist es schwierig, die DNS Remethylierung in Säugetier rRNS Genen zu untersuchen. Um die DNS Remethylierung in einem ersten Schritt trotzdem zu bearbeiten, benutzte ich ein Plasmid-Modellsystem, welches die Reinigung von Replikationsintermediaten und die Analyse von Dam-Remethylierungsraten erlaubt. Die Remethylierung einer einzelnen Dam-Remethylase Erkennungsstelle, welche sich auch mit der Erkennungssequenz des TaqI Restriktionsenzymes überlagert, wurde studiert. Falls die Erkennungssequenz vollständig methyliert ist, kann das Restriktionsenzym die DNS nicht mehr schneiden. Zwei verschiedene Plasmidkonstrukte, in denen die Replikation unidirektionell von einem ColE1 Replikationsursprung ausgeht, und welche die zu analysierenden Sequenzen in verschiedenen Orientierungen enthalten, erlaubten dabei die Remethylierung getrennt im "leading"- und "lagging"-Strand zu untersuchen. Unterschiedliche Replikationsintermediate, die bei fortschreitender Replikation entstehen, wurden mit Hilfe der präparativen, zweidimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennt und gereinigt. Kombiniert mit der TaqI-Verdauung konnte ich daraufhin den Zeitverlauf der Dam-Remethylierung abschätzen. Die Remethylierung erfolgt dabei ungefähr 1600 bp (\approx 2-3 sek.) nach der Replikationsgabel. Prinzipiell könnte ein ähnliches Verfahren auch dazu benutzt werden, die Remethylierungsraten in Zellen höherer Eukaryonten zu bestimmen.

Summary

The aim of my PhD thesis was to study the chromatin organisation and DNA methylation of rat ribosomal RNA (rRNA) genes using two different cross-linking techniques - formaldehyde fixation and psoralen photocross-linking. The two approaches are based on different chemical properties of chromatin. Both of them are able to distinguish successfully between nucleosomal and non-nucleosomal ribosomal DNA sequences, and by this between active and inactive rRNA gene copies. Consequently they are a suitable tool to separate and study independently the two classes of chromatin of rRNA genes. Since each of these techniques has some limitations I used the advantages provided by both of them. Psoralen photocross-linking, based on different amount of intercalation of psoralen molecules into nucleosomal and non-nucleosomal DNA, is probably the most precise method to quantify the proportion of active (non-nucleosomal) and inactive (nucleosomal) rRNA gene copies in a gel-retardation assay. However, psoralen cross-linked DNA is partially resistant to some restriction enzymes digestion. Formaldehyde fixation on the other hand binds histones to chromatin packed DNA (inactive rRNA gene copies) and also allows to recognise qualitatively both classes of chromatin of rRNA genes. Formaldehyde mediated histone-DNA adducts have the advantage of being reversible, and nucleosomal and non-nucleosomal DNA fragments separated in a gel retardation assay can be recovered from the agarose gels and further analysed.

In the first part of my thesis I tested the properties of formaldehyde fixation and applied both formaldehyde and psoralen cross-linking techniques to study DNA methylation in different regions along the rRNA genes. Since some earlier studies attempted to correlate rDNA methylation to their transcriptional activity, I wanted to analyse in detail the methylation patterns separately in transcriptionally active and silent rRNA gene copies, which has never been done so far. My results clearly indicate that methylation is prominent mainly in the regulatory sequences of inactive rRNA gene copies, such as promoter and enhancer regions. Transcriptionally active genes, as well as the coding sequences, whether transcribed or not, were found unmethylated. I suppose that methylation

might be involved in the mechanisms of cell memory, providing stable propagation of the constant proportion of active and inactive rRNA gene copies. To test this suggestion in the second part of my thesis I made an attempt to study the maintenance of methylation patterns in subsequent cell generations by analysing the rate of remethylation on daughter DNA strands after passage of the replication fork.

Mammalian rRNA genes in many respects are a complicated object to follow the DNA remethylation. Therefore as an initial step to approach this question I used a plasmid model system to purify replicative intermediates and to analyse the dam-remethylation rates. The remethylation of a single dam-methylase recognition site was studied, which overlaps the recognition sequence of TaqI restriction enzyme and inhibits the enzyme cleavage on fully methylated DNA. The orientation of analysed sequence towards an unidirectional replication fork movement from ColE1 ori in two different plasmid constructs allowed me to follow the remethylation event separately on the leading and on the lagging replicative arms. I used the preparative two-dimensional gels to separate and purify replicative intermediates in different stages of replication fork progression. In combination with the TaqI assay it allowed me to estimate the timing of dam-remethylation on the leading replicative arm to be around 1600 bp ($\approx 2-3$ sec) behind the replication fork. In principle similar approach can be used to study the remethylation rates in cells of higher eukaryotes.