



Doctoral Thesis

## Repair of UV-induced DNA lesions in ribosomal genes of yeast *S. cerevisiae*

**Author(s):**

Meier, Andreas

**Publication Date:**

2002

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004323816> →

**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](#).

Diss. ETH Nr. 14549

**REPAIR OF UV-INDUCED DNA LESIONS IN  
RIBOSOMAL GENES OF YEAST *S. cerevisiae***

---

A dissertation submitted to the  
Swiss Federal Institute of Technology Zürich (ETH Zürich)

For the degree of  
Doctor of Natural Sciences

Presented by

ANDREAS MEIER

Dipl. Natw. ETH, ETH Zürich

Born December 18, 1972

Citizen of Uster, ZH

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Fritz Thoma, examiner

Prof. Dr. Josef Jiricny, co-examiner

Prof. Dr. Ulrich Suter, co-examiner

Zürich, 2002

## SUMMARY

---

DNA lesions induced by the UV component of solar radiation block basic cellular functions such as transcription and replication. All organisms have molecular repair systems to remove UV lesions preventing cell death, mutations and cancer. Cyclobutane pyrimidine dimers, CPDs, and pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts, (6-4) PPs, are the major classes of UV lesions. In many organisms, UV lesions are repaired by nucleotide excision repair (NER) and photoreactivation. NER is a complex pathway, which is fast in repair of transcribed strands of genes transcribed by RNA polymerase II (RNAP-II), because RNAP-II stalled at UV lesions promote repair (transcription-coupled NER, TC-NER). Photoreactivation is a one-enzyme pathway in which photolyase reverts the lesion in a light-dependent reaction. Photoreactivation is inhibited on transcribed strands of active RNAP-II genes, presumably by RNAP-II stalled at the lesion. In addition to the interference of repair with transcription, NER and photoreactivation are affected by the structural and dynamic properties of chromatin, the folding of eukaryotic DNA into nucleosomes and higher order chromatin structures.

The nucleolus is the factory of ribosome synthesis and harbours the multicopy ribosomal genes (rRNA genes, rDNA). In budding yeast, one rDNA repeat consists of the 35S rRNA gene, coding for the 35S rRNA precursor, and the intergenic spacer (rDNA spacer). The 35S gene is transcribed by a specialized RNA polymerase, RNAP-I. Only a fraction of the 100 to 200 tandemly-repeated rDNA copies are transcribed. Active genes are covered by RNAP-I and are free of nucleosomes. The other fraction is transcriptionally repressed and packaged into nucleosomes. NER in rDNA was studied in yeast and higher eukaryotes. While NER was slow in higher eukaryotes, repair was efficient in yeast. A contribution of transcription-coupled NER was suggested for repair of yeast RNAP-I genes. Photoreactivation in the nucleolus was never studied. The aim of this project was to investigate NER and photoreactivation and their

interaction with RNAP-I in ribosomal genes of yeast *S. cerevisiae*.

In the first part of this thesis, NER and photoreactivation were analyzed in the transcribed region of the 35S rRNA genes. Yeast strains AMY3 (*rad1Δ*), which is deficient in NER, and W303-1a (*RAD1*) were irradiated with UV light and incubated for repair. Active genes were released by digestion with restriction enzymes and separated from the inactive ones. Purified DNA was cut at CPDs by T4-endonucleaseV and analyzed by indirect end-labeling. We found that photoreactivation was more efficient than NER and is therefore the predominant pathway for CPD repair. Repair in rDNA was as efficient as in the nuclear *GAL10* gene. Thus, both pathways have unrestricted access to rDNA in the nucleolus. Photoreactivation of active genes was faster than in silenced genes, which is consistent with an open chromatin structure of active genes *in vivo*. The transcribed strands of active genes were preferentially repaired by NER, indicating transcription-coupled NER in RNAP-I transcribed genes. The inhibition of photoreactivation on the transcribed strand was mild compared to RNAP-II genes and suggests different properties of RNAP-I and RNAP-II stalled at DNA lesions.

The intergenic spacer (rDNA spacer) between two 35S genes contains the promoter of the 35S gene, a 5S rRNA gene, a potential origin of replication (rARS) and an enhancer. Photoreactivation was compared with chromatin analysis by nuclease digestion. Fast and slow photoreactivation correlated with nuclease accessibility, which indicated a modulation of photoreactivation by chromatin in the spacer region. A nuclease sensitive region upstream of the 35S promoter and four positioned nucleosomes were identified between the 5S gene and the 35S promoter. Modulation of photoreactivation between the 5S gene and the enhancer provided evidence for nucleosomes in this region, although no nuclease footprints were detected. As observed in the 35S transcribed region, photoreactivation was fast and NER was inefficient. CPDs in the 35S promoter region remained unrepaired by photoreactivation, NER and the combination of both pathways, indicating that RNAP-I transcription factors were bound to the promoter and inhibit repair. The 35S promoter consists of the core- and the upstream element, which bind the core factor (CF) and the upstream activating factor (UAF), respectively. In the last part of this study, the 35S promoter was analyzed to investigate the binding properties and stability of RNAP-I transcription factors. Yeast strains were irradiated with UV light. UV photofootprinting was analyzed at nucleotide resolution by primer extension. Photofootprinting in total rDNA revealed UV photofootprints in the upstream element ('upstream footprint') and the core element ('core footprint'). Yeast strains mutated in essential subunits of the core factor (CF) lost the core footprint only, strains defective in the UAF lost both the core- and the upstream footprint. This is consistent with published data that CF binding requires UAF, while UAF binds the upstream element without CF.

To investigate 35S promoters of active and inactive genes, active and inactive promoters were fractionated by restriction enzyme digestion. Both 35S promoter fractions showed the core- and upstream footprint, suggesting that CF and UAF bind all promoters *in vivo*, irrespective of whether the gene is transcribed or not.

To study the stability of the transcription complexes, irradiated cells were incubated for repair, active and inactive 35S promoters were fractionated and analyzed by primer extension. No repair by photolyase was observed in the core element of active promoters indicating that CF and UAF are stabilized when the gene is transcribed. On the other hand, photoreactivation was fast in inactive promoters, which suggests a lower stability of the complexes in promoters of genes that are not transcribed. The data imply that stabilization of CF and UAF is required for initiation of RNAP-I transcription.

## ZUSAMMENFASSUNG

---

DNA Schäden, welche durch die UV Komponente des Sonnenlichts induziert werden, blockieren grundlegende zelluläre Funktionen wie z.B. Transkription und Replikation. Alle Lebewesen besitzen molekulare Reparatursysteme, um die UV Schäden zu beseitigen. Dies verhindert Zelltod, Mutationen und Krebs. Cyclobutan Pyrimidin Dimere, CPDs, und Pyrimidine (6-4) Pyrimidon Photoprodukte, (6-4) PP, sind die zwei häufigsten Arten von UV Schäden. Die meisten Lebewesen reparieren diese mit Hilfe von Nukleotid Exzisions Reparatur (NER) und Photoreaktivierung. NER ist ein komplexes System, das bevorzugt transkribierte Stränge von Genen repariert, die von RNA Polymerase II (RNAP-II) transkribiert werden, weil RNAP-II an UV Schäden blockiert wird und so NER aktiviert (transkriptions-gekoppelte Reparatur, TC-NER). Photoreaktivierung ist ein Ein-Enzym System, bei welchem Photolyase die UV Schäden in einer lichtabhängigen Reaktion entfernt. Photoreaktivierung ist auf transkribierten Strängen von aktiven RNAP-II Genen inhibiert, verursacht möglicherweise durch RNAP-II, die an einem UV Schaden blockiert wird und der Photolyase den Zugang zum Schaden verhindert. Reparatur ist nicht nur durch Transkription beeinflusst, sondern auch durch die strukturellen und dynamischen Eigenschaften von Chromatin: In eukaryontischen Zellen ist die DNA in Nukleosomen verpackt, die wiederum in weiteren Stufen kompaktiert werden.

Der Nukleolus ist der Syntheseort von Ribosomen und enthält 100 bis 200 identische Kopien von ribosomalen Genen (rRNA Gene oder rDNA) und zwischen diesen Genen liegende 'Spacer' (rDNA Spacer). In der Bäckerhefe *S. cerevisiae* werden die 35S rRNA Gene von einer spezialisierten RNA Polymerase, RNAP-I, transkribiert und anschliessend weiter zu den ribosomalen RNAs weiter prozessiert. In einer Zelle wird jeweils nur ein Teil der repetitiven Kopien transkribiert, der andere Teil ist abgeschaltet. Die aktive Fraktion ist von RNAP-I bedeckt und frei von Nukleosomen. Die anderen Gene sind bezüglich Transkription inaktiv und

in Nukleosomen verpackt. NER im Nukleolus wurde in Hefe und in höheren Eukaryonten studiert. Während NER in höheren Eukaryonten sehr langsam arbeitet, war NER in Hefe sehr schnell. Des weiteren fand man in Hefe Indizien für transkriptions-gekoppelte NER in ribosomalen Genen. Im Gegensatz zu NER wurde Photoreaktivierung noch nicht untersucht. In dieser Dissertation wurde die Reparatur von ribosomalen Genen in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* studiert. Das Ziel dieses Projekts war, NER und Photoreaktivierung und die Wechselwirkungen mit RNAP-I zu analysieren.

Der erste Teil der Arbeit untersuchte die Reparatur durch NER und Photoreaktivierung des 35S Gens. Die Hefestämme AMY3 (*rad1Δ*), welcher ein defektes NER-System besitzt, und W303-1a (*RAD1*) wurden mit UV Licht bestrahlt und für Reparatur inkubiert. Aktive 35S Gene wurden durch Verdau mit Restriktionsenzymen herausgelöst und von den inaktiven Genen getrennt. Gereinigte DNA wurde mit T4-EndonukleaseV geschnitten und mit Hilfe von Indirekter Endmarkierung analysiert. Die Resultate zeigten, dass Photoreaktivierung effizienter als NER, und deshalb der Hauptreparaturweg ist, um CPDs zu eliminieren. Reparatur der rDNA war ebenso schnell wie im *GAL10* Gen, das im Nukleus lokalisiert ist. Daraus wurde geschlossen, dass beide Reparatursysteme ungehinderten Zugang zum Nukleolus haben. Photoreaktivierung war schneller in aktiven Genen als in nichttranskribierten Kopien. Dies deutete darauf hin, dass inaktive Gene in Nukleosomen verpackt sind, was die Reparatur hemmt, und dass aktive Gene offen zugänglich sind. Die transkribierten DNA Stränge wurden nur in aktiven Genen präferentiell von NER repariert, was auf transkriptions-gekoppelte NER in ribosomalen Genen schliessen lässt. Im Gegensatz zu RNAP-II Genen war die Inhibition von Photoreaktivierung auf dem transkribierten Strang nur mild. Dies deutet auf unterschiedliche Eigenschaften von RNAP-I und RNAP-II hin, wenn sie an UV Schäden blockiert sind.

Der rDNA Spacer liegt zwischen zwei 35S Genen und enthält den Promotor des 35S Gens, das 5S rRNA Gen, einen potentiellen Replikations-Startpunkt (ARS) und einen 'Enhancer'. Durch Vergleich einer Chromatin Analyse durch Nuklease-Verdau mit Photoreaktivierung wurde die Chromatinstruktur des rDNA Spacers untersucht. Schnelle Photoreaktivierung korrelierte mit Nuklease-Schnittstellen, langsame Photoreaktivierung mit Stellen, die für die Nuklease unzugänglich waren. Dies zeigte, dass der rDNA Spacer in Nukleosomen verpackt ist. Eine offen zugängliche Chromatinregion wurde oberhalb des 35S Promotors entdeckt. Zwischen dem 5S Gen und dem 35S Promotor wurden vier positionierte Nukleosomen gemessen.

Wie bereits im transkribierten Bereich des 35S Gens beobachtet, zeigten die Resultate im rDNA Spacer schnelle Photoreaktivierung und langsame NER. Überraschenderweise wurden UV Schäden im 35S Promotor weder durch Photoreaktivierung noch durch NER entfernt. Dies deutete darauf hin, dass RNAP-I Transkriptionsfaktoren an den 35S Promotor binden und so die

Reparatur verunmöglichen.

Der 35S rRNA Promotor besteht aus dem Core Element und dem Upstream Element. Der Core Faktor (CF) und der Upstream Aktivations Faktor (UAF) binden an die entsprechenden Elemente. Im letzten Teil dieser Arbeit wurde der 35S Promotor analysiert, um die Bindungseigenschaften und die Stabilität dieser Faktoren *in vivo* zu studieren. Hefezellen wurden mit UV Licht bestrahlt und die UV Schadensbildung wurde mittels der Primer Extension Technik mit Nukleotid-Auflösung analysiert (UV Photofootprinting). Die Resultate in total rDNA zeigten UV Footprints im Upstream-Element (Upstream Footprint) und im Core-Element (Core Footprint). Stämme, die in essentiellen Untereinheiten des CF mutiert sind, verloren den Core Footprint, Stämme mit defizientem UAF verloren sowohl den Core Footprint als auch den Upstream Footprint. Dies bestätigte publizierte Daten, dass die Bindung des CF von UAF abhängig ist. Im Gegensatz dazu bindet UAF das Upstream Element ohne CF.

Um die Bindung von CF und UAF sowohl in aktiven- als auch in inaktiven 35S Genen zu studieren, wurden Promotoren von aktiven und inaktiven Genen durch Verdau mit Restriktionsenzymen fraktioniert und die UV Schadensbildung analysiert. Sowohl in aktiven- als auch in inaktiven 35S Promotor Fraktionen wurde der Core- und der Upstream Footprint beobachtet. Daraus wurde geschlossen, dass CF und UAF an alle Promotoren binden, unabhängig davon ob das 35S Gen aktiv transkribiert wird oder abgeschaltet ist.

Um die Stabilität der Transkriptionsfaktoren zu untersuchen, wurden die bestrahlten Zellen bis zu zwei Stunden für Reparatur inkubiert und Photoreaktivierung studiert. Eine Inhibition der Photoreaktivierung in aktiven Promotoren wies darauf hin, dass CF und UAF stabilisiert werden, wenn das Gen transkribiert wird. Andererseits konnte die Photolyase inaktive Promotoren reparieren. Daraus wurde geschlossen, dass CF und UAF in inaktiven Promotoren mit einer geringeren Stabilität als in aktiven Promotoren binden. Die Resultate geben einen Hinweis darauf, dass CF und UAF stabilisiert werden müssen, damit RNAP-I Transkription starten kann.