



Doctoral Thesis

Chromatin accessibility studied by DNA repair in yeast *S.cerevisiae*

Author(s):

Bucceri, Andrea

Publication Date:

2006

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005284003> →

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 No. 16848

Chromatin Accessibility Studied By DNA Repair In Yeast *S.cerevisiae*

A dissertation submitted to the
ETH Zurich

for the degree of Doctor of Natural Sciences

presented by

ANDREA BUCCERI

Dipl. Biological Science, Viterbo (Italy)

born 27.07.1975

Italian nationality

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Fritz Thoma
Prof. Dr. Ueli Suter
Prof. Dr. Walter Schaffner

2006

Riassunto

L'organizzazione del DNA eucariotico in nucleosomi, strutture chromatiniche di ordine superiore e regioni specializzate come l'eterochromatina e i chinetocori costituisce una barriera per le proteine coinvolte nella replicazione, nella ricombinazione, nella riparazione e nella trascrizione. Perciò, una questione fondamentale è come avviene l'accesso del DNA nella chromatina in vivo. I nucleosomi sono le unità strutturali della chromatina eucariotica e consistono di DNA avvolto attorno a un istone ottamerico, composto di proteine istoniche, e regolano l'accesso al DNA da parte delle proteine. I nucleosomi possono dissociarsi, aprirsi, o le proteine istoniche possono slittare per esporre porzioni di DNA in posizioni più accessibili. Queste transizioni strutturali possono essere modulate da complessi proteici di rimodellamento della chromatina che modificano covalentemente le proteine istoniche o alterano le interazioni tra il DNA e le proteine istoniche tramite l'utilizzo dell'energia derivante dall'idrolisi dell'ATP. Comunque, non è ancora chiaro come e quanto velocemente le proteine accedono al DNA dei nucleosomi in vivo.

Studi precedenti hanno dimostrato che la riparazione del DNA tramite la fotoliase e il "nucleotide excision repair" (NER) dei danni indotti dalla luce ultravioletta è modulata nella chromatina in vivo.

La fotoliase presente nel lievito è un enzima monomero che riconosce i dimeri ciclobutanici di pirimidina (CPDs) indotti dalla luce ultravioletta e li ripara tramite l'utilizzo dell'energia luminosa per ripristinare le basi originali. Il DNA non organizzato in nucleosomi è riparato in quindici minuti mentre il DNA nei nucleosomi viene riparato in due ore. La chromatina silente (l'eterochromatina del lievito) è riparata più lentamente. Il DNA centromerico nei chinetocori non è riparato.

Qui usiamo la riparazione del DNA tramite la fotoliase nel lievito per investigare come e quanto velocemente i danni sul DNA possono venire riconosciuti in varie regioni della chromatina. Abbiamo espresso ad alti livelli la fotoliase del lievito in un ceppo di lievito, deficiente per il gene endogeno della fotoliase e per l'NER, tramite l'utilizzo di un plasmide presente in molte copie quando introdotto nelle cellule e che contiene un forte promotore per l'espressione costitutiva dei geni. La riparazione del DNA è stata analizzata in diverse regioni della cromatina che differiscono sia per la struttura che per la funzione. Sorprendentemente, i nostri risultati hanno rivelato che diverse regioni vengono riparate in pochi secondi. Il 50% dei danni sul DNA furono riparati in 5 secondi mentre la riparazione di più dell'80% dei danni avvenne in 90 secondi in diverse regioni della cromatina inclusi geni attivi e inattivi e i promotori di geni repressi. La riparazione del DNA fu più veloce avvenne nei promotori privi di nucleosomi dove circa il 70% dei danni fu riparato in circa 5 secondi. Deviazioni da questa riparazione veloce furono notate nella cromatina silente dei loci *HMR* e *HML* che fu riparata in un

lasso di tempo di minuti mentre i centromeri non furono riparati. Perciò, i nostri risultati forniscono una nuova scala temporale per l'accessibilità del DNA nella cromatina. I nostri dati sono coerenti con le veloci transizioni conformazionali dei nucleosomi osservate in vitro. La veloce riparazione del DNA suggerisce fortemente che l'apertura spontanea dei nucleosomi facilita l'accesso al DNA piuttosto che la dissociazione o il rimodellamento della cromatina.

Inoltre, abbiamo espresso ad alti livelli la fotoliase di *E.coli* nel lievito per investigare come un enzima che si è evoluto in assenza di proteine istoniche e di attività di rimodellamento della cromatina può accedere ai danni sul DNA nella cromatina eucariotica. I nostri risultati mostrano che la fotoliase procariotica ripara la cromatina in un lasso di tempo di minuti ed è inibita nei centromeri. Perciò, la riparazione del DNA tramite la fotoliase di *E.coli* è modulata in modo simile a quella tramite la fotoliase del lievito. Questi risultati suggeriscono che l'accesso al DNA nella cromatina è ampiamente dipendente dalle proprietà dinamiche intrinseche della cromatina piuttosto che dal reclutamento di attività di rimodellamento cromatina.

In conclusione, i nostri dati impattano la nostra visione della natura repressiva della cromatina e illustrano come altre proteine coinvolte in altri tipi di riparazione del DNA o nella regolazione genica possono accedere al DNA in diverse regioni che differiscono sia per la struttura che per la funzione. Inoltre, dal momento che i danni indotti dalla luce ultravioletta sul DNA possono generarsi in tutto il genoma e che la formazione di questi danni e la riparazione tramite la fotoliase sono dipendenti dalla luce, il nostro sistema fornisce uno strumento per studiare l'accessibilità della cromatina in vivo e in un lasso di tempo di secondi.

Parte dei risultati di questo lavoro sono stati pubblicati in Bucceri A, Kapitza K, and Thoma F. (2006). EMBOJ 25, 3123-32.

Summary

The packaging of eukaryotic DNA in nucleosomes, higher order chromatin structures and specialized regions like heterochromatin and kinetochores constitutes a barrier for proteins involved in replication, recombination, repair and transcription. Thus, a fundamental question is how DNA is accessed in chromatin of living cells. Nucleosomes are the structural units of eukaryotic chromatin made of DNA wrapped around an octamer of histone proteins, and they regulate the access of DNA to other proteins. Nucleosomes may dissociate, unfold, or histone octamers may slide to expose DNA sites in more accessible positions. Those transitions can be modulated by chromatin remodeling complexes that covalently modify histones, or alter DNA-histone interactions and histone compositions by using the energy of ATP-hydrolysis. However, it is still poorly understood how and how fast proteins can access nucleosomal DNA *in vivo*. Previous studies have shown that repair of UV-induced DNA lesions by photolyase and nucleotide excision repair (NER) is modulated in chromatin of living cells. Yeast photolyase is a monomeric enzyme that recognizes UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) and reverts CPDs with the energy of light to restore the native bases. Nucleosome free DNA was repaired in fifteen minutes and nucleosomes in two hours. Silent chromatin (yeast heterochromatin) was more slowly repaired. Centromeric DNA in kinetochores was not repaired.

Here, we use DNA-repair by photolyase in yeast to investigate how and how fast DNA-damage can be recognized in various chromatin regions. We have overexpressed yeast photolyase from a high-copy number vector containing a strong constitutive promoter in a yeast strain where the endogenous copy of photolyase was deleted and NER inactivated by deletion of *RAD1* to avoid competitive repair. Repair was analyzed in various chromatin regions which differ in structure and function. Surprisingly, our results revealed that different chromatin domains were repaired within seconds. 50% of the DNA lesions were repaired in 5s and more than 80% within 90s in various nucleosomal regions including inactive and active genes and repressed promoters. The fastest repair was observed in open promoters where about 70% of the lesions were removed after 5s. Deviations from this rapid repair were noticed in silent chromatin of the *HML* and *HMR* loci which was repaired within minutes, while centromeres were not repaired. Thus, our results provide a new time scale of DNA accessibility in chromatin. Consistent with fast conformational transitions of nucleosomes observed *in vitro*, this rapid repair strongly suggests that spontaneous unwrapping of nucleosomes rather than histone dissociation or chromatin remodeling provides accessibility to nucleosomal DNA.

In addition, we have overexpressed *E.coli* photolyase in yeast to investigate how an

enzyme that evolved in absence of histones and chromatin remodeling activities finds access to DNA-lesions in eukaryotic chromatin. Our results show that the prokaryotic photolyase repairs chromatin in a time scale of minutes and is inhibited in centromeres. Thus, repair by E.coli photolyase was modulated in a similar way as the yeast photolyase. These results suggest that the accessibility of DNA in chromatin is largely dependent on intrinsic dynamic properties of chromatin without recruitment of remodeling activities.

In conclusion, our data impact our view on the repressive nature of chromatin and illustrate how proteins involved in other repair pathways or in gene regulation can access DNA in structurally and functionally diverse chromatin regions. Moreover, since UV-lesions are induced throughout the genome and since UV-damage formation and repair by photolyase are light dependent, our system provides a tool to study chromatin accessibility in living cells on a second time scale.

The major results of this work were published by Bucceri A, Kapitza K and Thoma F. (2006 EMBOJ 25, 3123-32).