



Doctoral Thesis

Contribution of histones to nucleosome stability, DNA accessibility, and higher order chromatin structures in yeast

Author(s):

Fink, Michel Francis

Publication Date:

2007

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005506702> →

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. 17255

Contribution of Histones to Nucleosome Stability, DNA Accessibility, and Higher Order Chromatin Structures in Yeast

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

For the degree of

Doctor of Sciences

Presented by

MICHEL FRANCIS FINK

Dipl. Natw. ETH

born April 23, 1974

citizen of Amriswil, TG

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Fritz Thoma, examiner
Prof. Dr. Josef Jiricny, co-examiner
Prof. Dr. Ulrich Suter, co-examiner

2007

Summary

In the nucleus of eukaryotic cells the genome is packaged into chromatin. Chromatin regulates DNA dependent processes, including transcription, replication, recombination, and DNA repair. The structure of chromatin is based on repeating nucleosomes, octamers of the highly conserved histone proteins H2A, H2B, H3, and H4, around which DNA is wrapped in approximately two turns. Nucleosomes line up along the DNA in nucleosomal arrays and associate with linker histones and non-histone proteins, forming higher order chromatin structures. Chromatin structure is modulated by posttranslational modifications of histones, chromatin remodelling activities, and the binding of non-histone proteins, which affects DNA accessibility to regulatory proteins.

Phosphorylation of yeast histone H2A (in mammals H2A.X) at the C-terminal tail plays a role in DNA double-strand break repair. Mimicking H2A phosphorylation in yeast by replacement of serine 129 with glutamic acid (*htal*-S129E) suggested that phosphorylation destabilizes chromatin structures and thereby facilitates access of repair proteins. The C-terminal tail of H2A was proposed to contact the linker histone binding site on the nucleosome and could thereby affect higher order chromatin structures. In *S. cerevisiae* Hho1p is a candidate linker histone, and it suppresses homologous recombination. Here, we have tested chromatin structures in *htal*-S129 mutants, in C-terminal tail deletion strains, and in a *HHO1* deletion strain. We show that the *htal*-S129E affects neither nucleosome positioning in minichromosomes and genomic loci nor supercoiling of minichromosomes. Moreover, *htal*-S129E has no effect on chromatin stability measured by conventional nuclease digestion nor does it affect DNA accessibility and repair of UV-induced DNA lesions by nucleotide excision repair and photolyase. Similarly, deletion of the C-terminal tail or *HHO1* has no effect on nucleosome positioning and stability. These data argue against a general role of the C-terminal tail in organizing chromatin structure and suggest that phosphorylated H2A acts by recruitment of repair components and not by disruption of chromatin.

Histone H3 and H4 mutations that affect residues, which cluster in a discrete region on the surface of the (H3·H4)₂ tetramer around lysine 79 of H3, impair transcriptional silencing. Lysine 79 of H3 is methylated by the conserved histone methyltransferase Dot1p, and deletion of *DOT1* also affects silencing. The nucleosome surface around lysine 79 of H3 has therefore been suggested to be involved in nucleosome-nucleosome contacts or in the interaction of nucleosomes with silencing proteins. In a second part of this thesis we analysed nucleosome positioning, stability, and nucleosome-nucleosome contacts on a minichromosome and a subtelomeric *URA3* gene in H3 mutants affecting silencing. Loss of subtelomeric *URA3* silencing seems to be caused by a shift of a nucleosome at the promoter. However, these mutations show normal nucleosome positioning and stability on minichromosomes. Thus, these H3 mutations rather impair the recruitment and/or spreading of silencing proteins, than disturb nucleosome-nucleosome contacts.

The first part of this work was published in: M. Fink, D. Imholz, and F. Thoma (2007) Contribution of the Serine 129 of Histone H2A to Chromatin Structure. *Mol. Cell. Biol.*, **27**: 3589–3600.

Zusammenfassung

Im Zellkern eukaryotischer Zellen ist das Genom in Chromatin verpackt. Chromatin reguliert DNA-abhängige Prozesse, wie die Transkription, Replikation, Rekombination und DNA-Reparatur. Die Struktur des Chromatins beruht auf einer repetitiven Grundeinheit, dem Nukleosom. Nukleosomen bestehen aus einem Oktamer, das aus den stark konservierten Histon Proteinen H2A, H2B, H3 und H4 aufgebaut ist, und DNA, die in etwa zwei Umdrehungen um das Histon Oktamer gewickelt ist. Nukleosomen sind auf der DNA zu nukleosomalen Arrays aufgereiht, binden Linker-Histon H1 und Nicht-Histon-Proteine und bilden dabei Chromatinstrukturen höherer Ordnung. Die Chromatinstruktur wird kontinuierlich durch posttranslationale Modifikationen von Histonen, energieabhängige Chromatin „remodelling“ Aktivitäten und reversible Wechselwirkung mit Nicht-Histon-Proteinen moduliert, wodurch die Zugänglichkeit der DNA für Regulationsproteinen kontrolliert wird.

Die Phosphorylierung des Hefe Histons H2A (in Säugetieren H2A.X) am C-terminalen Schwanz spielt eine Rolle bei der Reparatur von DNA-Doppelstrang-Brüchen. Es gibt Hinweise, dass Ersetzen von Serin 129 in H2A durch Glutamat (*hta1-S129E*), um die Phosphorylierung zu imitieren, die Chromatinstruktur destabilisiert. Aufgrund der Lage des C-terminalen Endes im Nukleosom könnte die H2A-Phosphorylierung die Zugänglichkeit der DNA für Reparaturproteine erleichtert. Andererseits könnte der C-terminale Schwanz von H2A die Bindungsstelle für das Linker-Histon am Nukleosom kontaktieren und dadurch die Chromatinstruktur beeinflussen. In *S. cerevisiae* gilt Hho1p (ein Protein, das die homologe Rekombination unterdrückt) als Kandidat für ein Linker-Histon.

Im ersten Teil haben wir die Chromatinstruktur in *hta1-S129* Mutanten, in Stämmen mit deletierten C-terminalen Schwänzen von H2A und in einer *hho1Δ* Mutante getestet. Wir zeigen, dass *hta1*-Mutanten weder einen Einfluss auf die Positionierung der Nukleosomen in Minichromosomen und genomischen Loci noch auf das Supercoiling von Minichromosomen hat. Ferner haben *hta1*-Mutanten keine Auswirkung auf die Stabilität des Chromatins, die durch konventionellen Nukleaseverdau gemessen wurde. Die *hta1-S129E* Mutation hat auch keinen Effekt auf die Zugänglichkeit der DNA für die Nukleotid Exzisions Reparatur und Photolyase. Gleichermassen hat die Deletion von *HHO1* keinen Effekt auf die Positionierung der Nukleosomen. Diese Resultate sprechen gegen eine generelle Funktion des C-terminalen Schwanzes in der Organisation der Chromatin Struktur und deuten darauf hin, dass die Phosphorylierung von H2A durch die Rekrutierung von Reparaturfaktoren agiert und nicht durch die Auflockerung von Chromatin.

Mutationen der Histone H3 und H4, die Aminosäuren betreffen, welche in einer Oberflächenregion des (H3·H4)₂ Tetramers um Lysin 79 von H3 angehäuft sind, mindern das Silencing von Genen. Lysin 79 von H3 wird durch die konservierte Histon-Methyltransferase Dot1p methyliert und die Deletion von *DOT1* hat auch einen Einfluss auf das Silencing. Aus diesem Grund wurde vorgeschlagen, dass die Oberfläche des Nukleosoms um Lysin 79 von H3 herum an Nukleosom-

Nukleosom-Kontakten oder an der Interaktion von Nukleosomen mit Silencing-Proteinen beteiligt ist.

In einem zweiten Teil dieser Arbeit haben wir in H3-Mutanten, in denen Silencing beeinträchtigt ist, Chromatin untersucht. Auch hier konnten wir keinen generellen Effekt auf die Positionierung der Nukleosomen, deren Stabilität und Nukleosom-Nukleosom-Kontakte feststellen. In einem subtelomeren *URA3* Gen allerdings konnten wir beobachten, dass die Verschiebung eines einzigen Nukleosoms am Promotor mit dem Verlust des Silencing und der Aktivierung von *URA3* korreliert. Daher beeinträchtigen diese H3-Mutationen eher die Rekrutierung und/oder die Ausbreitung von Silencing-Proteinen als dass sie Nukleosom-Nukleosom-Kontakte stören. Der erste Teil dieser Arbeit wurde veröffentlicht in: M. Fink, D. Imholz, and F. Thoma (2007) Contribution of the Serine 129 of Histone H2A to Chromatin Structure. *Mol. Cell. Biol.*, **27**: 3589–3600.