

Replication of UV-lesions in yeast centromeres

Doctoral Thesis

Author(s):

Hahn, Raphael

Publication date:

2009

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005825682>

Rights / license:

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

DISS. ETH NO. 18362

Replication of UV-lesions in yeast centromeres

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

For the degree of
Doctor of Sciences

Presented by
RAPHAEL HAHN
Dipl. Biologe
born August 30, 1977
in Germany

accepted on the recommendation of

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

2009

Summary

DNA of all organisms from yeast to man is constantly damaged by (by)products of the normal cellular metabolism and by various environmental agents such as the ultraviolet (UV) component of sunlight. Many DNA lesions are deleterious for the cell. They may cause cell death, arrest the cell cycle as a DNA damage checkpoint response, and they block RNA synthesis in gene transcription and DNA synthesis during DNA replication.

All organisms therefore have various repair systems that remove DNA lesions. The major classes of DNA lesions generated by UV light are cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) and pyrimidine-(6-4)-pyrimidone photoproducts (6-4PPs). Those lesions are repaired by nucleotide excision repair (NER), a complex multistep pathway, and, in many organisms but not in humans, by photolyases in a light dependent reaction (photoreactivation). Since DNA in higher organisms is tightly packaged in a nucleoprotein complex called chromatin, damage formation and repair are intimately coupled to DNA accessibility in chromatin. While most regions in the genome are efficiently repaired, repair of yeast centromeres is strongly inhibited by the kinetochore, a specialized chromatin structure required for chromosome segregation.

In addition to DNA repair, organisms have developed mechanisms to bypass lesions during replication and thereby tolerate them. In yeast the bypass of lesions depends on the *RAD6/RAD18* pathway and is mediated by specialized DNA polymerases (translesion synthesis, TLS) or by avoiding the damage via a template switch of the replicative DNA polymerases (damage avoidance). Furthermore, a *RAD52* dependent pathway can bypass UV-lesions using recombination. Previous work established that replicative polymerases are stalled at UV-lesions, DNA-synthesis might be stopped and resumed further downstream leaving a non-replicated single stranded DNA gap at the site of the lesion. The gap is filled later. However, since UV lesions are generated all over the genome and at very low yields at defined sites, it has, so far, been impossible to investigate the bypass of UV lesions during replication at the site of the damage.

Here, we have developed a unique system in yeast *S. cerevisiae* that allows us to analyze repair of UV-damage in DNA and replication of damaged DNA at a specific site in living cells. To this end, we have constructed yeast strains that overexpress CPD-photolyase from yeast and (6-4)-photolyase from *Arabidopsis thaliana*. We confirmed that overexpressed yeast CPD-photolyase repairs lesions within minutes but not in centromeres. Additionally, we showed that overexpressed *Arabidopsis thaliana* (6-4)-photolyase is functional in yeast and capable of repairing 6-4PPs genome-wide within minutes. Rapid repair by both photolyases enhanced survival of UV irradiated cells. Furthermore, cells were able to override the G1 checkpoint after high UV-doses and photoreactivation. Thus, we established a novel system to study the replication of UV-lesions within 125 bp of yeast centromeres.

Using this system, we showed that cells released into S-phase in presence of damaged centromeres accumulated DNA fragments (replication intermediates, RIs) that likely represent abrogated DNA synthesis at UV-lesions. RIs furthermore coincided with the observation of ssDNA at centromeres. We assume that ssDNA gaps form opposite the lesion consistent with previous studies with excision-defective yeast strains. Our results, however, are novel because we showed that RIs and ssDNA gaps occurred site specifically, that means within the 125 bp of centromere DNA containing the CPD lesions. Additionally, we found that RIs were transient and disappeared during incubation of cells after UV-irradiation, a phenomena known as post-replication repair. Classical replication experiments measuring a density shift of DNA during replication provided evidence for a bypass of a majority of CPDs at damaged centromeres during replication. However, the data also suggest that some CPDs might have been removed during centromere replication, possibly by NER.

Preliminary experiments with the appropriate mutants suggest that the bypass of centromeric lesions involves the error-free component of the *RAD6/RAD18* damage tolerance pathway, but is not influenced by the lack of translesion synthesis DNA polymerases.

Zusammenfassung

Die DNA aller Organismen, von der Hefe bis zum Menschen, wird ständig durch zelluläre Metabolite oder durch äußere Einflüsse wie ultraviolette (UV) Strahlung geschädigt. DNA Schäden können zu Zelltod oder zu einem Stopp im Zellzyklus führen. Zusätzlich können DNA Schäden die RNA- oder DNA-Synthese während Transkription und Replikation blockieren.

Alle Organismen können daher Schäden reparieren. Die häufigsten durch UV-Strahlung hervorgerufenen Schäden sind Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPDs) und Pyrimidin-(6-4)-Pyrimidon Photoprodukte (6-4PPs). Sie werden durch Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) repariert. Zusätzlich besitzen manche Organismen Photolyasen, die in einer lichtabhängigen Reaktion den Schaden reparieren (Photoreaktivierung). Bedingt durch die Verpackung der DNA in DNA-Proteinkomplexe, dem Chromatin, ist die Bildung und Reparatur von Schäden eng an die Zugänglichkeit der DNA im Chromatin gekoppelt. Während die meisten Regionen des Genoms effizient repariert werden können, ist die Reparatur in Hefe Centromeren stark durch Kinetochore gehemmt, einer speziellen Chromatinstruktur, die für die Segregation von Chromosomen benötigt wird.

Zusätzlich zur DNA-Reparatur können Schäden während der Replikation umgangen und damit toleriert werden. In Hefe ist diese Toleranz abhängig von *RAD6/RAD18* und benutzt spezielle DNA-Polymerasen oder erfolgt durch einen Wechsel der DNA Polymerasen auf einen andern DNA-Strang. Toleranz kann auch durch eine *RAD52* abhängige Rekombination erfolgen. Es wurde gezeigt, dass die Replikation von geschädigter DNA zur Anhäufung von Einzelstranglücken in der DNA (ssDNA) führt. Diese bilden sich vermutlich gegenüber des Schadens, durch Blockade der DNA-Synthese und der Wiederaufnahme der DNA-Synthese dahinter. Die Lücken werden später gefüllt. Da UV-Schäden überall im Genom generiert werden und mit geringer Ausbeute an definierten Stellen, war es bisher nicht möglich, die Replikation von UV-Schäden am Ort ihres Entstehens zu untersuchen.

Wir entwickelten deshalb ein einzigartiges System in der Bäckerhefe *S. cerevisiae*, um die Replikation und Reparatur von UV-Schäden an einer spezifischen Stelle zu

untersuchen. Dazu konstruierten wir Hefestämme, die die CPD-Photolyase von Hefe und die (6-4)-Photolyase aus *Arabidopsis thaliana* überexprimierten. Wir bestätigten die schnelle Reparatur von CPDs ausserhalb von Centromeren durch überexprimierte CPD-Photolyase. Außerdem zeigten wir, dass die überexprimierte (6-4)-Photolyase aktiv ist und 6-4PPs genomweit innerhalb von Minuten repariert. Dank der schnellen Reparatur der Photolyasen überlebten mehr Zellen nach UV-Bestrahlung. Des Weiteren setzten sich Zellen nach hohen UV-Dosen und Photoreaktivierung über den G1 Zellzyklus Kontrollpunkt hinweg. Die Überexpression von Photolyasen stellt ein neuartiges System dar, um die Replikation von UV-Schäden in den 125 bp langen Hefe Centromeren zu untersuchen.

Mit Hilfe dieses Systems konnten wir zeigen, dass es nach dem Entlassen von UV geschädigten Zellen in die S-Phase zur Akkumulation von DNA-Fragmenten (Replikations Intermediate, RIs) kommt, die wahrscheinlich durch den Abbruch der DNA Synthese am Schaden entstehen. Zusammen mit den RIs detektierten wir ssDNA. Im Einklang mit früheren Studien vermuten wir, dass sich ssDNA Lücken gegenüber des Schadens bilden. Das Neue an unseren Ergebnissen ist jedoch, dass wir zeigen können, dass RIs und ssDNA zusammen am Ort des Schadens, das heisst innerhalb der 125 bp des Centromers auftreten. Außerdem fanden wir, dass RIs während der Inkubation der Zellen nach UV-Bestrahlung wieder verschwanden; ein Phänomen das als Post-Replikationsreparatur bekannt ist. Klassische Replikationsexperimente, mit denen man die Replikation über die Änderung der DNA Dichte nachweisen kann, deuten darauf hin, dass die Mehrheit der CPDs in Centromeren während der Replikation umgangen wurden. Zusätzlich lassen die Daten vermuten, dass NER einige CPDs während der Replikation der Centromere entfernt.

Vorläufige Experimente mit Mutanten deuten darauf hin, dass zur Toleranz von Centromerschäden die fehlerfreie Komponente des *RAD6/RAD18* Signalwegs benötigt wird und dass das Fehlen von TLS DNA-Polymerasen keinen wesentlichen Einfluss hat.