

Diss. ETH No. 18961

ACCESSIBILITY AND REPAIR OF UV DAMAGE IN TRANSCRIBED YEAST GENES

A dissertation submitted to the
ETH ZÜRICH

For the degree of
Doctor of Sciences

Presented by
KRISTIN KAPITZA
Dipl. Biochemikerin
born December 2nd, 1980
in Germany

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Fritz Thoma, examiner
Prof. Dr. Bernhard Dichtl, co-examiner
Prof. Dr. Ulrich Suter, co-examiner

2010

Summary

DNA is constantly exposed to various agents of cellular or environmental origin generating DNA damage. Cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) and pyrimidine-(6-4)-pyrimidone photoproducts (6-4PPs) are the two major classes of DNA lesions generated by ultraviolet (UV) light. UV lesions are repaired by nucleotide excision repair (NER) and photolyases. NER is a multistep pathway, conserved from *E. coli* to yeast and man, that involves damage recognition, excision of the damaged piece of DNA and DNA-repair synthesis. In contrast to NER, photolyases are damage specific enzymes (CPD photolyase or 6-4PP photolyase) that bind the lesion and revert the damage in a light-dependent reaction called photoreactivation. They are found in many organisms, but not in humans. Mutations in human NER genes are associated with diseases, such as xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy, which involve skin cancer and developmental and neurological symptoms.

Transcription is a molecular mechanism where RNA-polymerases (RNAPs) associated with numerous transcription factors move along the DNA of genes using one strand as a template to synthesize RNA (transcribed strand, TS). In eukaryotes, there are three different RNAPs. RNAPII mainly transcribes genes coding for proteins. Many DNA lesions in the TS, including UV lesions, block transcription. A subpathway of NER called transcription-coupled repair (TCR) removes the transcription blocking lesions and allows a continuation of RNA synthesis. Current data support the following basic mechanism and models: The elongating RNAPII is blocked at the lesion. The lesions are located in the active site of RNAPII and not accessible to repair enzymes. To make CPDs accessible, RNAPII might undergo a conformational change, backtrack, dissociate from the DNA, bypass the lesion, or, as a last resort, be ubiquitinated and degraded. TFIIIS and TCR factor Rad26 are candidates to facilitate backtracking, while Def1 and other proteins are implicated in ubiquitylation and degradation of the large subunit Rpb1 of RNAPII.

Previous experiments with yeast *S. cerevisiae* showed that CPDs in the TS of active genes are slowly repaired by photolyase, consistent with a transient inhibition of CPD accessibility by stalled RNAPII. In this study, we have overexpressed photolyase in yeast and in the appropriate mutants as a unique tool to measure the accessibility and repair of CPDs in transcribed genes of living cells in a time scale suitable to follow transcriptional processes. Two types of experiments were performed. In “kinetic experiments”, exponentially growing cells were damaged with UV light and irradiated with photoreactivating light to assess repair by photolyase. In “dark incubation experiments”, the time between UV damage formation and CPD repair was varied to assess dynamic properties of stalling and release of RNAPII. CPD repair was analysed in three different genes (*GAL10*, *ADH1* and *URA3*).

(i) We found a strand bias with slow repair of the TS compared to the NTS in all transcribed genes and in all investigated strains. The strand bias disappeared, when transcription was repressed. Strand bias was reduced in a *dst1* mutant, which is deficient for the transcription elongation factor TFIIS and compromised in transcription. Those data support the hypothesis that transient inhibition of CPD photolyase in transcribed DNA is due to stalled RNAPII.

(ii) Over 80% of the CPDs in the TS were repaired in six minutes photoreactivation indicating that the protection of CPDs by stalled RNAPII is transient and short-lived.

(iii) In dark incubation experiments, a fairly constant fraction of CPDs was repaired in the TS between 10 to 60 min after UV damage formation which is consistent with a dynamic equilibrium of released and newly stalled RNAPII.

(iv) Preliminary data with the mutants showed that neither Rad26 nor ubiquitylation of Rpb1 contribute to CPD accessibility in the TS.

In conclusion, our data show that the protection of CPDs by stalled RNAPII is short-lived and CPDs are rapidly accessible at least to a repair protein like photolyase. The results might help to understand the molecular mechanisms underlying TCR.

Zusammenfassung

Die DNA ist kontinuierlich der Schädigung durch äussere Einflüsse oder Stoffwechselfvorgänge ausgesetzt. Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPDs) und Pyrimidin-(6-4)-Pyrimidon Photoprodukte (6-4PPs) sind die zwei Hauptklassen von DNA Schäden, die durch ultraviolette (UV) Strahlung erzeugt werden. UV Schäden werden durch Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) und Photolyasen repariert. NER ist ein Prozess mit vielen Zwischenschritten und ist konserviert von *E. coli* zu Hefe und Mensch. NER umfasst die Schadenserkenkung, das Ausschneiden der geschädigten DNA sowie die DNA-Synthese zur Reparatur. Photolyasen hingegen sind Schaden-spezifische Enzyme (CPD Photolyase und 6-4PP Photolyase), die den Schaden binden und in einer Licht-abhängigen Reaktion namens Photoreaktivierung reparieren. Sie kommen in zahlreichen Organismen vor, aber nicht im Menschen. Mutationen in menschlichen NER Genen können zu Krankheiten wie Xeroderma pigmentosum, Cockayne-Syndrom und Trichothiodystrophie führen, welche mit der Entstehung von Hautkrebs, sowie mit neurologischen und entwicklungsbedingten Symptomen einhergehen.

Transkription ist ein molekularer Mechanismus bei dem RNA-Polymerasen (RNAPs), die mit zahlreichen Transkriptionsfaktoren assoziiert sind, die DNA von Genen ablesen. Dabei wird ein Strang als Vorlage benutzt, um RNA zu synthetisieren (transkribierter Strang, TS). In Eukaryoten gibt es drei verschiedene RNAPs. Die RNAPII transkribiert hauptsächlich Gene, die für Proteine kodieren.

Viele DNA Schäden auf dem TS, einschliesslich UV Schäden, blockieren die Transkription. Ein Teilprozess der NER wird als Transkriptions-gekoppelte Reparatur (TCR) bezeichnet und entfernt die Transkriptions-blockierenden DNA Schäden, um die Fortsetzung der RNA Synthese zu gewährleisten. Aktuelle Daten unterstützen folgenden grundlegenden Mechanismus und Modelle: Die elongierende RNAPII ist am Schaden blockiert. Der Schaden befindet sich im aktiven Zentrum der RNAPII und ist nicht zugänglich für Reparatur-Enzyme. Um CPDs zugänglich zu machen, könnte die RNAPII eine Konformationsänderung machen, den Schaden überbrücken oder sich zurück bewegen, sie könnte von der DNA abgelöst werden, oder als letzter Ausweg ubiquityliert und abgebaut werden. TFIIIS und TCR-Faktor Rad26 könnten bei der Rückwärtsbewegung der RNAPII eine Rolle spielen, während Def1 und andere Proteine mit der Ubiquitylierung und dem Abbau der grossen Rpb1 Untereinheit der RNAPII in Verbindung gebracht werden.

Frühere Experimente mit der Hefe *S. cerevisiae* haben gezeigt, dass CPDs auf dem TS von aktiven Genen nur langsam durch Photolyase repariert werden, was übereinstimmt mit einer transienten Beeinträchtigung der Zugänglichkeit von CPDs durch blockierte RNAPII. Wir haben Photolyase in Hefe und geeigneten Mutanten überexprimiert, um ein einzigartiges Werkzeug zu

erhalten mit dem direkt die Zugänglichkeit und Reparatur von CPDs in transkribierten Genen von lebenden Zellen gemessen werden kann, und zwar in einem Zeitrahmen, der es erlaubt Transkriptions-abhängige Änderungen zu verfolgen. Zwei verschiedene Arten von Experimenten wurden durchgeführt. In "kinetischen Experimenten" wurden exponentiell wachsende Zellen mit UV Licht geschädigt und danach mit photoreaktivierendem Licht bestrahlt, um die Reparatur durch Photolyase zu messen. In sogenannten "Dunkel-Inkubations-Experimenten" wurde zwischen UV-induzierter Schadensbildung und CPD Reparatur eine Inkubationszeit eingefügt, um dynamische Eigenschaften des Blockierens und der Freisetzung von RNAPII zu untersuchen. Die Reparatur von CPDs wurde in drei verschiedenen Genen (*GAL10*, *ADHI* and *URA3*) analysiert.

(i) In allen transkribierten Genen und in allen untersuchten Stämmen haben wir Strang-spezifische Reparatur beobachtet mit langsamer Reparatur auf dem TS verglichen zum NTS. Der Strang-spezifische Unterschied verschwand, wenn die Transkription gehemmt wurde. Darüberhinaus war der strang-spezifische Unterschied verringert in der *dst1* Mutante, welche keinen Transkriptions-Elongations-Faktor TFIIS enthält und in der Transkription beeinträchtigt ist. Unsere Daten unterstützen die Hypothese, dass die transiente Inhibition der Photolyase in transkribierter DNA durch blockierte RNAPII verursacht wird.

(ii) Die Reparatur von über 80% der CPDs im TS in sechs Minuten Photoreaktivierungszeit deutet darauf hin, dass die Protektion der CPDs durch RNAPII transient und kurzlebig ist.

(iii) In "Dunkel-Inkubations-Experimenten" wird eine relativ konstante Fraktion CPDs im TS in einem Zeitraum von 10 bis 60 Minuten nach der Schadensbildung repariert. Dies steht im Einklang mit einem dynamischen Gleichgewicht zwischen freigesetzten und neu blockierten RNAPII.

(iv) Vorläufige Experimente mit Mutanten deuten darauf hin, dass weder Rad26 noch die Ubiquitylierung von Rpb1 einen Beitrag zur CPD Zugänglichkeit im TS leistet.

Zusammenfassend zeigen unsere Daten, dass die Protektion von CPDs durch blockierte RNAPII kurzlebig ist und CPDs schnell zugänglich sind, zumindest für Reparatur-Proteine wie Photolyase. Diese Resultate können zu einem besseren Verständnis der molekularen Mechanismen von TCR beitragen.