

Histone Modifications and Nucleosome Core Particle Recognition

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
MICHAEL STUDER
Dipl. Natw. ETH
born May 21, 1975
citizen of Visp (Switzerland)

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. T. J. Richmond, examiner
Prof. Dr. N. Ban, co-examiner

Zurich, 2005

SUMMARY

Chromatin modifications and gene regulation are fundamental processes in the biology of eukaryotes. The most compact form of chromatin is inaccessible to proteins and represents a major barrier for gene expression and other fundamental cellular processes. As a consequence, chromatin structure must be highly dynamic and undergo many modifications that lead to gene transcription or chromatin silencing. Structural studies of proteins involved in chromatin modification and regulation in the nucleosome context might help in the understanding of all these processes.

Covalent histone modifications represent one mechanism which affects chromatin structure and gene regulation (the “histone code hypothesis”). Although most of these modifications occur on the flexible histone tails, the disruptor of telomeric silencing 1 (Dot1) methylates H3-K79 on the core of the protein. The work in this thesis presents the detailed analysis of the methylation and binding properties of yeast Dot1 in the context of nucleosome core particles (NCP). yDot1 was expressed in insect cells and purified to homogeneity. It was shown that yDot1 binds to NCPs with nanomolar affinity. Experiments using tailless histones revealed an essential and highly unexpected role of the H4 tail on the enzymatic activity of yDot1. A ubiquitin-H2A fusion protein was produced and the influence of this modification on yDot1 was assessed. Extensive crystallization attempts were carried out in order to obtain crystals of a NCP/yDot1 complex.

Another mechanism by which chromatin structure and gene regulation is affected is the replacement of histones with their specific variants. The centromere protein A (CENP-A) is a centromere-specific H3 variant. In the second part of this work, methods for the expression and purification of human CENP-A were established. *Xenopus laevis* histone octamers could be refolded with human CENP-A, but as octamer assembly and NCP reconstitutions were highly inefficient further structural analysis of a NCP containing CENP-A was not possible.

In a third project in collaboration with Prof. I. G. Maccara, the binding of the regulator of chromosome condensation 1 (RCC1) to NCP was analyzed with the ultimate goal being the X-ray structure determination of the complex. We could clearly show that RCC1 and RCC1 in complex with RanGDP bind to NCP. Despite extensive crystallization screening, crystals of an RCC1/NCP or an RCC1/RanGDP/NCP ternary complex were not obtained.

ZUSAMMENFASSUNG

Chromatinmodifikation und Genregulation sind fundamentale Prozesse in der Biologie der Eukaryoten. Die kompakteste Form von Chromatin ist für Proteine unzugänglich und stellt deshalb eine grosse Hürde für die Expression von Genen und andere fundamentale zelluläre Prozesse dar. Deshalb ist Chromatin sehr dynamisch und stark modifiziert, was sowohl zur Transkription als auch zum „Silencing“ von Genen führen kann. Die Erforschung von Proteinen, die in der Modifikation und Regulation von Chromatin beteiligt sind, wird zum Verständnis all dieser Prozess beitragen.

Die kovalente Modifikation von Histonen stellt einen Mechanismus zur Beeinflussung der Chromatinstruktur und Genregulation dar. Die meisten Modifikationen erfolgen an den flexiblen Histon „Tails“. Eine Ausnahme bildet die Methylierung vom Lysin 79 im Kern von H3, welche vom „disruptor of telomeric silencing 1“ (yDot1) ausgeführt wird. Diese Dissertation stellt eine detaillierte Analyse der Methylierungs- und Bindungseigenschaften des Proteins yDot1 von Hefe im Kontext mit Nukleosomen (NCP) vor. yDot1 wurde in Insektenzellen hergestellt und aufgereinigt. Es wurde aufgezeigt, dass yDot1 mit nanomolarer Affinität an Nukleosome bindet. Experimente mit globulären Histonen zeigten eine unerwartete Rolle des H4 N-terminus auf die enzymatische Aktivität von yDot1 auf. Ein Ubiquitin-H2A Fusionsprotein wurde hergestellt und sein Einfluss auf yDot1 untersucht. Umfangreiche Kristallisationsversuche wurde unternommen um Kristalle eines NCP/yDot1 Komplexes zu erhalten.

Der Austausch von Histonen mit spezifischen Varianten stellt einen zweiten Mechanismus dar, der die Chromatinstruktur und Genregulation beeinflussen kann. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden Methoden zur Herstellung und Aufreinigung vom Zentromer Protein A (CENP-A), eine Zentromer-spezifische H3 Variante, etabliert. „*Xenopus laevis*“ Histonoktamere wurden zusammen mit CENP-A zurückgefaltet. Die Rückfaltung von Oktameren und die Rekonstitution von Nukleosomen waren sehr ineffizient, dies verunmöglichte eine Strukturanalyse.

Ein drittes Projekt, in Kollaboration mit Prof. I. G. Maccara, untersuchte die Bindung vom “regulator of chromosome condensation 1” (RCC1) an das Nukleosom mit dem Ziel der Röntgenstrukturanalyse des Komplexes. Wir konnten zeigen, dass RCC1 und ein Komplex von RCC1 mit RanGDP Nukleosome bindet. Trotz intensiven Versuchen konnten keine Kristalle des Komplexes gezüchtet werden.