ETH zürich

ETH Library

Comparative analysis of chromatin structures in the budding yeast Saccharomyces cerevisiae and in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe

evidence for species-specific chromatin structures

Doctoral Thesis

Author(s):
Bernardi, Fabio

Publication date:
1991

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-000592302

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.

22. Mai 1991

Diss. ETH

Diss. ETH No 9370

COMPARATIVE ANALYSIS OF CHROMATIN STRUCTURES IN THE BUDDING YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* AND IN THE FISSION YEAST *SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE*: EVIDENCE FOR SPECIES-SPECIFIC CHROMATIN STRUCTURES.

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZUERICH

for the degree of

Doctor of Natural Sciences

presented by

Fabio Bernardi

Dipl. ETH Natw.

born 09. November 1963

citizen of Italy

Accepted on the recommendation of

PD. Dr. Fritz Thoma, examiner

Prof. Dr. Theodor Koller, co-examiner

Prof. Dr. Herbert Zuber, co-examiner

CatE

ETH-BIBLIOTHEK ZÜRICH

ETHICS ETH-BIB

00100000527789

1991

RIASSUNTO:

Negli organismi eucarioti, la molecola di DNA é strettamente legata a proteine specializzate - gli istoni - che la "impacchettano" e partecipano alla regolazione delle sue attività. Il DNA legato agli istoni é noto come cromatina. Esistono diversi gradi di ripiegamento del DNA nel nucleo ed uno dei passi fondamentali nella conoscenza della struttura della cromatina é stato compiuto con la scoperta della sua unità strutturale fondamentale nota come nucleosoma. I nucleosomi sono stipati uno accanto all' altro a formare una fibra di cromatina di 30 nm nella quale il DNA é fortemente condensato. Il modo in cui il DNA é "impacchettato" stabilisce se le proteine coinvolte nei processi di trascrizione, replicazione, ricombinazione e riparo del DNA possono interagire con esso. Per capire la regolazione a livello molecolare delle reazioni sopracitate, abbiamo deciso di studiare i meccanismi che determinano le posizioni che i nucleosomi devono assumere lungo la sequenza del DNA.

Lo scopo di questo lavoro é di stabilire l'esistenza o meno di strutture della cromatina di importanza generale e quindi comuni a diversi organismi. Perciò abbiamo paragonato strutture della cromatina in due specie di lievito che si sono evolute indipendentemente: *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe.*

Non molto è noto per quel che riguarda le strutture della cromatina in *Schizosaccharomyces pombe*, per questo motivo dapprima abbiamo analizzato i frammenti di DNA formatisi dalla digestione della cromatina genomica con un enzima batterico, una nucleasi di micrococco. In seguito a una digestione breve operata da questo enzima viene degradato solo il DNA che si trova tra un grano di nucleosoma e l'altro. I frammenti prodotti sono tutti multipli di 160 paia di basi come in *Saccharomyces cerevisiae* (Lohr et al., 1977) e quindi più piccoli di quelli ottenuti in cellule eucariote superiori. Abbiamo poi studiato le posizioni che assumono i nucleosomi in due diversi geni : *ade6* e *ura4.* La struttura della cromatina rivela otto nucleosomi posizionati nella parte 5' del gene di *ade6,* nucleosomi non posizionati nella parte 3' del gene e la regione del promotore

priva di nucleosomi. Nucleosomi posizionati sono stati trovati anche sul gene di *ura4.* Queste strutture della cromatina sono risultate essere indipendenti dal fatto che il gene si trovi nel cromosoma o su di un vettore extra-cromosomale. I risultati ottenuti mostrano che i geni cromosomali e extra-cromosomali di *Schizosaccharomyces pombe* possiedono strutture della cromatina simili a *Saccharomyces cerevisiae* e altri eucarioti. Chiameremo perciò i plasmidi extra-chromosomali in questo organismo "minicromosomi".

Nella seconda parte dello studio fatto ci siamo domandati se le strutture della cromatina fossero o meno mantenute tali nel caso che una sequenza di DNA fosse "impacchettata" nella cromatina di due organismi diversi. Eventuali strutture mantenute uguali potrebbero essere determinate dalla sequenza stessa del DNA e perciò di importanza generale. Al contrario strutture diverse non dipenderanno certo direttamente dalla sequenza del DNA ma piuttosto dalle proteine non-istoniche che interagiscono con esso. Queste interazioni sono chiaramente specifiche in ogni organismo. A questo scopo abbiamo costruito minicromosomi che sono in grado di replicarsi (e quindi anche di esistere) in maniera indipendente dal genoma in *S.cerevisiae* e *S.pombe.* Questi minicromosomi contengono il gene di URA3 di *S.cerevisiae* e/oppure il gene di *ade6* di *S.pombe.* Tutti e due i geni sono "impacchettati" in cromatina nei due lieviti. Sul gene di URA3 si sono trovati nucleosomi posizionati e una regione del promotore particolarmente accessibile alla nuclease di micrococco solo nel suo organismo di origine, *S.cerevisiae.* In *S.pombe* i nucleosomi su URA3 occupavano posizioni arbitrarie e il promotore non é risultato particolarmente sensibile alla nuclease di micrococco. L'esatto contrario si é verificato nel gene di *ade6,* dove nucleosomi posizionati e una regione del promotore sensibile alla nuclease di micrococco si sono riscontrati solo in *S.pombe* e non in *S.cerevisiae.* Abbiamo quindi concluso che le strutture della cromatina non sono determinate dalla sequenza del DNA in quanto nessuna caratteristica di tali strutture è stata conservata nei due diversi organismi. Al contrario i risultati sembrano dimostrare

che tali strutture sono specifiche della specie e che a determinarle siano piuttosto le proteine specifiche della specie.

Negli ultimi tempi l'interesse per il lievito *S.pombe* come modello per gli eucarioti superiori é aumentato in quanto esso si presenta come valida alternativa a *S.cerevisiae* e, da quanto emerge da dati biochimici e genetici, sembra sia più evoluto. Dal punto di vista della cromatina noi pensiamo che questo organismo possa essere utilizzato per studi sui meccanismi molecolari che regolano l'espressione, la replicazione e il riparo di un gene. Forse lo studio complementare di questi due organismi più che la singola analisi di uno dei due può portare a soluzioni di parte dei problemi non ancora risolti negli eucarioti superiori. In ogni caso ci riserviamo di far presente che l'uso di sequenze provenienti da diversi organismi per studi relativi alla cromatina in un determinato organismo può non essere appropriato in quanto le strutture della cromatina sembrano essere specifiche della specie.

SUMMARY:

In eukaryotic cells, the genomic DNA is folded by histone octamers into a linear array of nucleosomes which is further condensed into 30 nm compact chromatin fibers. The way how the DNA is packaged determines whether proteins involved in DNA dependent reactions (transcription, replication, DNA-repair, recombination) and their regulation can interact with their corresponding sequences. In order to understand the molecular basis of these reactions, we study the mechanisms which determine the nucleosomal arrangement along the DNA and in chromatin fibers.

In this work we searched for "significant" chromatin structures by comparison of chromatin structures in the two evolutionarily diverged yeast species *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe.*

Since little was known on chromatin structures of *Schizosaccharomyces pombe,* we first analyzed the nucleosomal repeat of genomic chromatin and the structure of two genes, ade6 and ura4. The size of the nucleosomal repeat found in *S.pombe* was 160 bp, similar to that of *S.cerevisiae* (Lohr et al., 1977), but shorter than the nucleosomal repeats described in larger eukaryotes. Furthermore, the arrangement of nucleosomes along the *ade6* gene and its flanking regions both in the chromosome and in extrachromosomal plasmids was analyzed. The *ade6* gene contains eight precisely positioned nucleosomes on the 5' half, not positioned nucleosomes around the 3' end and a nuclease sensitive promoter region. We have found that the chromatin structure was independent of the chromosomal or episomal location. Precisely positioned nucleosomes, but no nuclease sensitive region were detected on the *ura4* gene in the chromosome and on an episome. The results show that *S.pombe* chromosomal and extrachromosomal genes have chromatin structures similar to those of *S. cerevisiae* and higher eukaryotes. Therefore we prefer to call the extrachromosomal plasmids in *S.pombe* "minichromosomes".

In the second part of the work we asked what structural features are maintained or differ when the same DNA-sequence is packaged by two different organisms. Structures which are identical in both organisms might be determined by the DNA-sequence and might be of general importance. Structures which differ do not depend on the DNA-sequence, but on the proteins interacting with the sequence. These interactions are species-specific.

Minichromosomes able to replicate and be maintained extrachromosomally in *S.cerevisiae* and in *S.pombe* were constructed. The minichromosomes contained the URA3 gene of *S.cerevisiae* and/or the ade6 gene of *S.pombe.* The URA3 gene and the ade6 gene were folded in nucleosomes in both organisms. While the URA3 gene showed precisely positioned nucleosomes flanked by nuclease sensitive regions in *S.cerevisiae*, no positioned nucleosomes or nuclease sensitive regions were detected in *S.pombe.* The reverse was observed with the ade6 gene. The ade6 gene showed precisely positioned nucleosomes in *S.pombe* but not in *S.cerevisiae.* Since no structural feature was conserved between *S.pombe* and *S.cerevisiae* -neither on the URA3 gene nor on the ade6 gene- we concluded that the DNA sequence was not the major determinant for the chromatin structures. The fact that only *S.cerevisiae* sequences in *S.cerevisiae* and *S.pombe* sequences in *S.pombe* form defined structures such as precisely positioned nucleosomes strongly suggests that the species specificity in chromatin formation is determined by the species specificity of proteins.

Recently the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* received more consideration as a model system for higher eukaryotes. We suggest that this organism can be used to investigate the molecular mechanisms of gene regulation, replication, transcription and DNA-repair, eventually in extrachromosomal vectors. Moreover we think that complementary studies in the two yeasts rather than the analysis of a single organism could enhance the perspective of problems in higher eukaryotic cells. The experiments related to chromatin done in heterologous systems have to take into account

that, DNA sequences have distinct chromatin structures in different organisms, as suggested by the results obtained in this study.