



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Structure and function of the UVDE repair protein

Paspaleva, K.

Citation

Paspaleva, K. (2009, April 1). *Structure and function of the UVDE repair protein*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/13711>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/13711>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

SAMENVATTING EN ALGEMENE DISCUSSIE

UVDE is een eiwit dat bijdraagt aan het herstel van beschadigd DNA. UVDE werd als eerste gevonden in gistsoort *Schizosaccharomyces pombe*. De eerste biochemische proeven met UVDE lieten zien dat het niet alleen actief is op door UV-licht beschadigd DNA, maar ook op DNA zonder base ('abasic sites') en DNA met 'foute' baseparen ('mismatches'). Het exacte mechanisme van UVDE voor zowel herkenning van DNA schades als voor het knippen (incisie) van beschadigd DNA was echter nog niet bekend. Van *S. pombe* UVDE was weliswaar bekend dat het Mn^{2+} en Mg^{2+} als cofactoren nodig heeft voor zijn functie, maar voor het gebruik van deze tweewaardige metaalionen bestond geen verklaring, en ook voor het aantal metaalionen dat UVDE zou kunnen gebruiken en de functie ervan bestond geen model.

Homologen van UVDE werden gevonden in vele soorten schimmels en een aantal bacteriën, zoals *Bacillus subtilis* en *Thermus thermophilus*. Hoewel de activiteit van *S. pombe* UVDE voor een deel bekend was, bestond er geen data betreffende welke DNA schades door de bacteriële UVDE-homologen herkend worden en welke metaalionen ze voor hun functie kunnen gebruiken.

De eerste weergave van UVDE, op moleculair niveau, is de kristal structuur van UVDE uit *T. thermophilus* (Hoofdstuk 2). Het UVDE enzym is een enkel TIM-barrel domein met een 29 Å brede groeve. Op de bodem van deze groeve bevindt zich een ruimte waar drie metaalionen zijn gecoördineerd. Behalve aminozuur His224, zijn alle aminozuren die betrokken zijn bij coördinatie van de metaalionen geconserveerd in alle bekende UVDE homologen. Punt mutaties in zowel *T. thermophilus* UVDE (Hoofdstuk 2) en in *S. pombe* UVDE (Hoofdstuk 5) laten zien dat coördinatie van metaal ionen van essentieel belang is voor de activiteit van UVDE, omdat de activiteit van UVDE verloren gaat na het omzetten van geconserveerde, bij metaalion coördinatie betrokken, aminozuren in alanines. De coördinatie van de drie metaalionen in UVDE is vergelijkbaar met coördinatie van de drie Zn^{2+} ionen in Endo IV, en door Endo IV als voorbeeld te nemen kan de functie van de metaalionen in UVDE, bij het knippen van DNA, begrepen worden. Hiervoor is een model opgesteld (Hoofdstukken 2 en 5), waarbij UVDE de metaalionen op positie 1 en (waarschijnlijk) positie 2 gebruikt om een nucleofiel hydroxide te maken; dit nucleofiel kan met dan de fosfodiëster banden in het DNA reageren, waarbij een instabiel intermediair gevormd wordt. Metaalion 3 zal vooral betrokken zijn bij het stabiliseren van dit instabiele intermediair.

Hoewel de fluorescentie scan geen uitsluitsel kon geven over de exacte identiteit van de gebonden metaalionen, laten biochemische experimenten zien dat het waarschijnlijk Mn^{2+} ionen zijn (Hoofdstuk 2). Metaal substitutie testen bevestigen dat inderdaad Mn^{2+} de cofactor is voor UVDE (Hoofdstuk 5). Hoewel Mn^{2+} niet het enige metaal ion is dat UVDE kan gebruiken, leidt het toevoegen van andere, tweewaardige, metaalionen tot een lagere activiteit, die ook meer afhankelijk is van het soort DNA schade. Tevens leidt het gebruik van andere metaalionen tot tegenovergestelde effecten op verschillende UVDE enzymen. Mg^{2+} heeft weliswaar een positief effect op de activiteit van *S. pombe* en *B. subtilis* UVDE, door het binden aan onbeschadigd

DNA te verlagen, maar *T. thermophilus* heeft, in aanwezig van Mg^{2+} , geen activiteit op de CPD DNA schade. Dit onverwachte effect van Mg^{2+} hangt duidelijk samen met de verminderde stabiliteit van het UVDE complex op de CPD schade. Op de 6-4PP DNA schade kan het negatieve effect van Mg^{2+} gecompenseerd worden door Mn^{2+} , omdat in aanwezigheid van beide metaalionen *T. thermophilus* UVDE efficiënt aan DNA kan binden. Deze gegevens laten zien dat, wanneer UVDE gebonden is aan CPD danwel 6-4PP, er significante verschillen bestaan in de coördinatie van metaalionen. Op basis van deze conclusie en de resultaten van metal substitutie experimenten (Hoofdstuk 5), stellen wij een model voor waarbij volledige bezetting van de metaal bindingssites in UVDE alleen voorkomt bij DNA binding en dat DNA een belangrijke rol speelt in de coördinatie van metaalionen door UVDE.

In de kristalstructuur van *T. thermophilus* UVDE werd een extra electronendichtheid gevonden aan de aminogroep van aminozuur Lys229. In Hoofdstuk 3 geven we bewijs voor een post-translationele modificatie van dit aminozuur, die zeer waarschijnlijk een carboxyl-groep is. Deze carboxyl-groep heeft een functie in metaalion coördinatie door een negatieve lading te doneren aan het, in *T. thermophilus* UVDE, metaal coördinerende aminozuur His231. Lys229 is geconserveerd in eukaryote UVDE genen, wat de suggestie geeft dat dit aminozuur in eukaryote UVDE op dezelfde manier gemodificeerd kan worden als in *T. thermophilus* UVDE. Andere, bacteriële, UVDE genen hebben een leucine, isoleucine, methionine, threonine of valine op positie van Lys229, deze aminozuur kunnen niet gemodificeerd worden met een carboxyl-groep.

De kristalstructuur van UVDE geeft een verklaring voor de manier waarop UVDE DNA schades zou kunnen binden en vervolgens knippen. Een computer gegenereerd model, gebaseerd op de overeenkomsten in de structuur van UVDE en Endo IV, liet zien dat UVDE DNA zou kunnen buigen op de plaats van een DNA schade, waarbij de GQY-loop in UVDE het gebogen DNA zou kunnen stabiliseren (Hoofdstuk 2). Om de, te knippen, fosfodiësterband van het beschadigde DNA bij de metaalionen te kunnen positioneren, moet UVDE een base flip mechanisme gebruiken om de DNA schade in de actieve site van UVDE te plaatsen. Dit oorspronkelijke model (Hoofdstuk 2) wordt verder uitgewerkt in Hoofdstuk 4, waarbij we laten zien dat de eerste stap van herkenning van DNA schades waarschijnlijk bestaat uit het zoeken naar verschillen in persistentie (de mogelijkheid tot buigen) van het DNA. Tevens laten we zien dat niet alleen CPD en 6-4PP DNA schades of DNA met een ontbrekende base, maar ook gaten in de DNA helix ('gaps') en het ontbreken van een fosfodiëster band in de DNA helix ('nicks') worden herkend door UVDE. Dit laat zien dat elke, en dus niet alleen een door UV-licht veroorzaakte, verandering in het DNA, die de lokale flexibiliteit van het DNA verhoogt door UVDE herkend en hersteld kan worden. Deze resultaten verklaren, als eerste, waarom *S. pombe* UVDE op zo veel verschillende schades actief kan zijn. Tevens, laten we, met 2-aminopurine fluorescentie bepalingen, zien dat UVDE een duidelijke destabilisatie veroorzaakt in het DNA tegenover de DNA schade.

De kristalstructuur van *T. thermophilus* UVDE laat zien dat aminozuur Tyr105 een ongebruikelijke, naar buiten gerichte, oriëntatie heeft. In Endo IV, dat wat structuur betreft een grote overeenkomst vertoont met UVDE, heeft aminozuur Tyr72 dezelfde oriëntatie. In een co-kristal van Endo IV met DNA met een abasic site, heeft aminozuur Tyr72 contact met, door Endo IV, gebogen DNA. Gebaseerd op de overeenkomsten in de structuur van Endo IV en UVDE en het feit dat het veranderen van UVDE Tyr105 in alanine UVDE inactief maakt, nemen wij aan dat aminozuur Tyr105 contact met DNA mogelijk maakt (Hoofdstuk 2). De functie van dit aminozuur wordt verder uitgewerkt in Hoofdstuk 4, waar de fenotype van de *S. pombe* Y358A in meer details is bestudeert. De substitutie van *S. pombe* Tyr358 met alanine leidt tot verlies van activiteit op abasic sites, maar niet tot verlies van activiteit op CPD en 6-4PP. Zonder Tyr358 heeft *S. pombe* UVDE een verhoogde activiteit op UV-schades (zoals CPD en (6-4)PP), maar heeft die alleen bij een (lagere) pH van 6.5. Bij een meer fysiologische pH (7.5) heeft *S. pombe* geen incisie activiteit meer zonder Tyr358, maar kan het nog wel aan DNA binden. Op basis van deze resultaten nemen we aan dat behalve het stabiliseren van gebogen DNA, Tyr358 ook een functie heeft in het afschermen van de incisie site.

Hoewel oorspronkelijk beweerd werd dat het UVDE enzym een alternatief herstelmechanisme is voor UV beschadigd DNA, abasic sites, DNA mismatches en door oxidatie reacties beschadigd DNA, laten wij zien dat dit niet het geval is voor alle UVDE homologen. In hoofdstuk 4 laten we zien dat *S. pombe* UVDE weliswaar DNA kan knippen dat een nick of gap bevat, maar dat deze activiteit op deze substraten (en ook op abasic sites) sterk afhangt van de aanwezigheid van een pyrimidine base naast de DNA schade. Dit geeft aan dat, hoewel UVDE geëvolueerd kan zijn uit een oorspronkelijk AP (abasic site) endonuclease, het eigenlijke substraat voor UVDE UV-beschadigd DNA is en niet abasic sites. Tevens is *S. pombe* UVDE actief op substraten waarop bacteriële UVDE homologen niet actief zijn en is *T. thermophilus* UVDE zelfs alleen actief op UV beschadigd DNA.