



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Computational, biochemical, and NMR-driven structural studies on histone variant H2A.B

Zhang, H.

Citation

Zhang, H. (2020, August 25). *Computational, biochemical, and NMR-driven structural studies on histone variant H2A.B*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/135944>

Version: 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/1887/135944>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/135944> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Zhang, H.

Title: Computational, biochemical, and NMR-driven structural studies on histone variant H2A.B

Issue Date: 2020-08-25

Samenvatting

De natuur gebruikt een speciale klasse van histon-eiwitten, de zogenaamde histon-varianten, om eigenschappen van chromatine op specifieke plekken in het genoom te veranderen. Histon variant H2A.B is een van de meest afwijkende varianten van histon H2A en is betrokken bij een aantal belangrijke cellulaire functies, zoals transcriptie en mRNA-splicing. Door incorporatie van H2A.B in nucleosomen laten circa 15 baseparen van de uiteindes van het nucleosomale DNA los van de histoneiwitkern. De onderliggende moleculaire basis van deze bijzondere, geopende nucleosoomconformatie is nog niet bekend. Het werk beschreven in dit proefschrift heeft als doel om het effect van H2A.B-integratie op de structurele en dynamische eigenschappen van het nucleosoom te bepalen, voornamelijk met behulp van kernspinresonantie (NMR).

Hoofdstuk 1 vat de huidige kennis over de structuur en functie van histonvariant H2A.B samen. Ik belicht de verschillen in aminozuurvolgorde tussen de variant H2A.B en de canonieke H2A, geef een overzicht van het experimentele bewijs voor de geopende nucleosoomstructuur en bespreek de rol van H2A.B in transcriptie en mRNA-splicing.

Hoofdstuk 2 biedt een compact overzicht van isotoplabeling technieken die worden gebruikt in NMR aan vloeistoffen met macromoleculaire complexen, zoals nucleosomen.

Als eerste stap in deze studie van H2A.B wordt de structuurbepaling van de H2A.B-H2B heterodimeer met behulp van NMR-spectroscopie en Rosetta beschreven in **Hoofdstuk 3**. Het combineren van de chemische verschuivingen van de kernen in de eiwit-backbone met intermoleculaire NOEs resulteerde in een goed gedefinieerd ensemble van structuren. De H2A.B-H2B-structuur laat zien dat de kern van de dimeer is gevouwen volgens het klassieke 'histone-handshake' motief waaruit zeer flexibele N- en C-terminale staarten steken. De structuur van de variant lijkt sterk op die van het canonieke H2A-H2B dimeer. Ik heb verder ontdekt dat de H2A.B-H2B dimeer een hogere thermostabiliteit heeft dan de canonieke H2A-H2B dimeer. Op basis van een analyse van verschillende mutanten concludeer ik dat de lagere netto lading van de H2A.B-kern resulteert in verminderde

elektrostatistische afstoting met de H2B-kern, en daardoor in verhoogde stabiliteit.

Vervolgens heb ik onderzoek gedaan naar de structurele en dynamische eigenschappen van de H2A.B-nucleosomen in **Hoofdstuk 4**. Met behulp van een isotoplabeling strategie geoptimaliseerd voor de zeer flexibele delen van het nucleosoom, heb ik eerst in detail de N-terminale staarten van H3 en H2A.B onderzocht. De gegevens laten zien dat de lengtes van de staarten zijn zoals verwacht op basis van de canonieke nucleosoomstructuur. Dit wijst erop dat de α N-helix van H2A.B of H3 stabiel gevouwen zijn, ondanks de geopende conformatie van het H2A.B nucleosoom. Daarnaast is de H3-staart flexibeler en waarschijnlijk minder sterk aan DNA gebonden in H2A.B nucleosomen. De conformatie en dynamiek van de H2A.B-kern in het nucleosoom is vervolgens onderzocht met behulp van specifieke isotoplabeling van methyl groepen. Op basis van zowel structurele als dynamische gegevens, concludeer ik dat zogenaamde 'docking' domein van H2A.B, dat de interface vormt met histon H3-H4, stabiel gevouwen is in het nucleosoom. Met hulp van het bijgewerkte structurele model voor het H2A.B-nucleosoom kon ik een verschuiving van een DNA-bindende arginine in de aminozuurvolgorde van H2A.B identificeren. Door deze verschuiving in register zou de zijketen kunnen botsen met het nucleosomale DNA en dus bijdragen aan de opening van de DNA-uiteinden. Nucleosomen gemaakt met een H2A-mutant waarin deze arginine is verschoven naar de positie zoals in H2A.B vertoonden een aanzienlijk verhoogde gevoeligheid voor restrictie van het nucleosomale DNA door micrococcal nuclease. Dit laat zien dat de arginine-registerverschuiving bijdraagt aan de geopende nucleosoomconformatie voor H2A.B.

In **hoofdstuk 5** heb ik de pKa-waarden van residuen in en rond de 'acidic patch', een bindingsplaats voor vele eiwitten op het oppervlak van het nucleosoom, experimenteel bepaald met behulp van NMR spectroscopie. Allereerst heb ik de structuur van het canonieke H2A-H2B-dimeer bepaald volgens dezelfde methode als beschreven in Hoofdstuk 3 voor de variant-dimeer. De op basis van deze structuur voorspelde pKa waarden zijn voor verschillende zure residuen verhoogd als gevolg van een clustering effect. Desalniettemin tonen de NMR pH-titratie experimenten duidelijk aan dat de pKa-waarden van

alle glutamaten lager zijn dan 4.5. Ik heb daarnaast H2B H106 geïdentificeerd als de groep die het dichtst bij de fysiologische pH titreert. Dit residu bevindt zich dicht bij de bindingsplek van verschillende nucleosoom-bindende eiwitten, wat suggereert dat protonering van deze histidine verantwoordelijk kan zijn voor vermindering van bindingsaffiniteit.

Hoofdstuk 6 bevat een brede bespreking van de resultaten verkregen in dit proefschrift vanuit het perspectief van integratieve structurele biologie, de structuur-functie relatie van H2A.B en de rol van eiwit-elektrostatica in het algemeen. Er worden suggesties gedaan voor vervollexperimenten die kunnen bijdragen aan onze kennis over de structuur en functie van H2A.B-nucleosomen.