



Universiteit
Leiden
The Netherlands

How electrostatic interactions drive nucleosome binding of RNF168 & PSIP : structural studies and their implications for rational drug design

Horn, V.

Citation

Horn, V. (2019, July 3). *How electrostatic interactions drive nucleosome binding of RNF168 & PSIP : structural studies and their implications for rational drug design*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/74692>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/74692>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/74692> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Horn, V.

Title: How electrostatic interactions drive nucleosome binding of RNF168 & PSIP : structural studies and their implications for rational drug design

Issue Date: 2019-07-03

Nederlandse Samenvatting

Eiwitten en eiwitcomplexen die modificaties op de histon eiwitten in nucleosomen aanbrengen, herkennen en verwijderen spelen een fundamentele rol in de regulatie van DNA-gerelateerde processen. De belangrijke rol van deze klasse van eiwitten bij gezondheid en ziekte heeft geleid tot een intense interesse in hoe deze eiwitten op moleculair niveau op hun substraat opereren. Essentiële inzichten in de moleculaire basis van de biologie van chromatine zijn verkregen door te bestuderen hoe deze eiwitten complexen vormen met nucleosomen. Een groeiend aantal structuren van eiwit-nucleosoom complexen bepaald met Röntgenkristallografie en cryo-electronenmicroscopie (cryo-EM) spelen hierin een sleutelrol. Alle biofysische technieken kennen echter hun intrinsieke beperkingen. Het overwinnen van deze beperkingen om diepgaande kennis te verkrijgen van de interacties tussen effectoreiwitten en nucleosomen is één van de grootste uitdagingen in structuurbiologie.

Hoofdstuk 1 geeft een overzicht van de structuren van eiwit-nucleosoom complexen. We introduceren de verschillende type bindingsplekken voor eiwitten op het nucleosoom en beschrijven structuren verkregen met Röntgenkristallografie en cryo-EM. Daarna bespreken we methodes die data uit verschillende biofysische bronnen gebruiken voor het genereren van structurele modellen samen met de resulterende modellen en de belangrijkste inzichten in de moleculaire basis van herkenning.

In **Hoofdstuk 2** hebben we deze methodologie toegepast om de moleculaire basis van binding door RNF168 aan het nucleosoom te onderzoeken. Dit eiwit speelt een cruciale rol in het herstellen van DNA-schade. De activiteit van RNF168 hangt af van de ubiquitineren van H2A K13/K15 door het RNF168^{RING} domein. We hebben NMR-spectroscopie, cross-linking massaspectrometrie en data uit mutagenese gebruikt om aan te tonen dat RNF168^{RING} aan de 'acidic patch' bindt en om een structuurmodel van het nucleosoom-gebonden E3-E2 complex te ontwikkelen. Dit heeft een atomair begrip opgeleverd van de interactie tussen de acidic patch en verschillende Arg residuen van de basische bindingshelix van RNF168^{RING}. Door de specifieke oriëntatie van de E3 subunit op het nucleosoom wordt het katalytische centrum van het E2 enzym dicht bij het te modificeren lysine residu op de H2A N-terminus gebracht. We hebben ons model getest door een H2A-mutant te ontwerpen waarin de electrostatische eigenschappen van de acidic patch verstoord zijn in een regio die wel interactie heeft met RNF168 maar niet betrokken is bij de binding van Ring1B, een andere E3 subunit die ook aan de acidic patch bindt. We laten zien dat deze mutatie inderdaad selectief de

activiteit van RNF168 verstoort en de activiteit van Ring1B ongemoeid laat. Vervolgens hebben we ons structuurmodel vergeleken met recente E3-E2~Ub structuren die het bestaan van een actieve ‘gesloten’ en een inactieve ‘open’ conformatie van het complex aantonen. Uit deze vergelijking blijkt dat onze structuur overeenkomt met een ‘gesloten’ conformatie, terwijl er voor ‘open’ conformaties botsingen zouden optreden tussen de ubiquitine en het nucleosoom. Daarom stellen wij voor dat het nucleosoom zelf, door sterische hinder, de conformationele ruimte van ubiquitine in het E3-E2~Ub complex beperkt en zo de vorming van gesloten complexen bevordert.

In **Hoofdstuk 3** hebben we een manier gezocht om de inzichten te benutten die zijn voortgekomen uit een structuurmodel van het epigenetische ‘reader’ domein PSIP1-PWWP gebonden aan een nucleosoomsubstraat. Dit model laat zien dat dit domein bindt aan zowel de getrimethyleerde lysine op de histon H3-staart als het nucleosomaal DNA. We wilden deze informatie gebruiken om de intrinsiek lage bindingsaffiniteit van een H3-peptide met trimethyllysine voor PSIP1-PWWP te verhogen, door negatief geladen residuen in te bouwen om zo DNA na te bootsen. Door het gebruik van verschillende peptidestructuren hebben we aangetoond dat de bindingsaffiniteit positief gecorreleerd is aan de negatieve lading. Dit is in het bijzonder het geval voor een H3-peptide met een vertakte, negatief geladen hoofdketen, die de verdeling van de lading in een nucleosoom nabootst. Met behulp van NMR-titratiestudies hebben we gevonden dat de verhoogde affiniteit veroorzaakt wordt door de electrostatische interacties, maar ook dat de trimethyllysine in de H3-sequentie minder goed bindt aan zijn natuurlijke bindingsepitoom in en rondom de ‘aromatic cage’.

PSIP1-PWWP speelt een rol in verschillende ziekten en zou daarom een interessant doelwit kunnen zijn voor medicijnen. Voor het gebruik van potentiële remmers van PSIP1-PWWP-activiteit op basis van de H3-staart komt echter een uitdaging om de hoek kijken. Hoewel we laten zien dat het inbouwen van negatieve ladingen de bindingsaffiniteit vergroot, veroorzaakt het ook een verlies van specificiteit. Dit probleem bespreken we in **Hoofdstuk 4**, waarin we ons hebben gericht op een methode voor het optimaliseren van aromatic-cage-binding om niet alleen de affiniteit maar ook de specificiteit te vergroten. We hebben een manier geïntroduceerd om niet-natuurlijke functionele zijketens in te bouwen in de peptidesequentie door alkylering van een cysteïneresidu. Vervolgens hebben we de toepasbaarheid hiervan laten zien door de PSIP1-PWWP-gebonden complexen van een H3-peptide met een serie negatief geladen glutamaten aan de N-terminus te vergelijken met ofwel een natuurlijke trimethyllysine (Kme3) dan wel een nabootsing daarvan op basis van cysteïne-alkylatie. Hieruit bleek dat in de gebonden conformatie van de Kme3 op basis van cysteïne een kleiner deel van het H3-peptide gebonden is, terwijl beide complexen een vergelijkbare

bindingsaffiniteit vertonen. Dit betekent dat het zwavelatoom een negatief effect heeft op de vorming van een aromatic-cage-complex. In verband met de lage affiniteit van Kme3 is echter nog niet duidelijk of dit effect ook significant is voor functionele groepen met een hogere affiniteit voor de aromatic cage dan trimethyl-ammonium.

Om verbindingen die geoptimaliseerd zijn voor binding aan de aromatic cage sneller te kunnen screenen, hebben we besloten om een microscale thermophoresis (MST) assay op te zetten. Het bleek echter dat de aromatic cage van PSIP1 een interactie aangaat met het fluorescente label. Door de lage affiniteit van de peptide-eiwitinteractie was het labelen van het peptidesubstraat dan ook niet toepasbaar. In plaats daarvan hebben we een PSIP1-mutant gemaakt die selectieve eiwitlabeling mogelijk maakt. In de daaropvolgende metingen werd een uitdoving van de initiële fluorescentie geobserveerd die afhankelijk bleek van de toegevoegde concentratie van het peptide. Door de monsters te denatureren en vervolgens het herstel van de fluorescentie te observeren, waren we in staat om dit effect te correleren aan peptidebinding. Interessant is dat dit effect afwezig is voor cysteïne-bevattende H3-peptiden die niet gemodificeerd zijn tot Kme3-analogen. NMR-studies hebben echter aangetoond dat deze peptiden nog steeds binden aan PSIP1-PWWP, uitsluitend gedreven door elektrostatische interacties. We concluderen dat het uitdoven van de fluorescentie specifiek informatie geeft over binding met de aromatic cage en daarom van grote waarde is voor het screenen van functionele groepen die daar een interactie mee aangaan. Verder hebben we gezien dat de initiële fluorescentie voldoende is om bindingsaffiniteiten af te leiden en hebben we een syntheseprotocol en een assay voor de screening van potentiële peptide-gebaseerde PSIP1-PWWP-remmers voorgesteld.

Hoofdstuk 5 bevat een kritische reflectie op het onderzoek dat beschreven is in dit proefschrift, alsmede suggesties voor toekomstig onderzoek naar aanleiding van de hierin gepresenteerde bevindingen.