



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Structure-based insights into the repair of UV-damaged DNA

Meulenbroek, E.M.

Citation

Meulenbroek, E. M. (2012, October 9). *Structure-based insights into the repair of UV-damaged DNA*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/19938>

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/1887/19938>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/19938> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Meulenbroek, Elisabeth Maria

Title: Structure-based insights into the repair of UV-damaged DNA

Issue Date: 2012-10-09

Samenvatting

DNA is de drager van ons genetisch materiaal. Het is daarom belangrijk dat de informatie in het DNA correct blijft. Door allerlei oorzaken kan er echter schade ontstaan in het DNA. Dat gebeurt zowel door processen in onze cellen, zoals door vrije zuurstofradicalen die ontstaan tijdens het metabolisme in de cel, als door invloeden van buitenaf, zoals UV-straling. Als de schade niet wordt hersteld, kan dat tot celdood en mutaties leiden. Dat laatste kan kanker tot gevolg hebben. Om deze negatieve gevolgen van DNA-schade te voorkomen, zijn er in de evolutie verschillende DNA-herstelmechanismen ontstaan. In **Hoofdstuk 1** van dit proefschrift staan de belangrijkste DNA-herstelmechanismen samengevat. De nadruk wordt hier gelegd op inzichten die zijn verkregen door middel van structuurbiologie. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift, gaat over de herstelmechanismen Transcriptie-gekoppelde Nucleotide Excisie Reparatie (TC-NER) en UV-schade endonuclease herstel (UVDE). De belangrijkste resultaten van dit promotieonderzoek staan hieronder samengevat.

TC-NER is een geconserveerd DNA-herstelmechanisme dat schades herstelt in de DNA-regio's waar actieve transcriptie plaatsvindt. Het is een submechanisme van Nucleotide Excisie Reparatie (NER), waarbij DNA-schade wordt hersteld door het uitknippen van een stuk DNA van 25-30 nucleotiden met de schade erin en door het vervolgens opvullen van het gat. De meeste eiwitten die zijn betrokken bij TC-NER komen uit het meer algemene mechanisme van NER, maar er zijn twee eiwitten uniek voor TC-NER: Cockayne Syndroom eiwit A en B (CSA en CSB). CSA is het substraat-bindende eiwit in een E3-ubiquitine ligase complex en CSB is een eiwit dat waarschijnlijk met zijn ATPase activiteit ruimte maakt rond de schade om herstel mogelijk te maken. Mutaties in CSA of CSB leiden tot de ernstige ziekte Cockayne Syndroom. Patiënten met deze ziekte vertonen o.a. versnelde veroudering. Dit laat zien dat CSA en CSB belangrijk zijn voor de mens, maar hun exacte functie is nog niet duidelijk.

Om meer inzicht te krijgen in de functie van CSA en om te kunnen verklaren hoe mutaties erin Cockayne Syndroom veroorzaken, zou een gedetailleerd plaatje van het eiwit nuttig zijn. Met bioinformatica is de algemene vorm van CSA te voorspellen. Het heeft een WD40 domein en dergelijke eiwitten hebben meestal een β -propeller vouwing. Wat niet voorspeld kan worden, is hoe alle lussen zijn gevouwen en welke zijketens waar zitten. Dat is namelijk het aspect waarin CSA anders is dan andere WD40 eiwitten. En het is juist die informatie die nodig is

om de ziekte te kunnen verklaren. Die informatie is alleen te verkrijgen door de structuur van het eiwit op te lossen. Dat hebben we dan ook gedaan en wel met de techniek eiwitkristallografie, waarmee een driedimensionaal plaatje van het eiwit met atomaire resolutie gemaakt kan worden.

De eerste stappen voor het oplossen van een eiwitstructuur bestaan uit het verkrijgen van het eiwit en de kristallisatie ervan. In **Hoofdstuk 2** staat beschreven hoe we CSA overgeproduceerd hebben in een complex met zijn interactiepartner DNA-schade Bindend eiwit 1 (DDB1), omdat CSA afzonderlijk niet oplosbaar was. We hebben het complex gezuiverd met drie zuiveringsstappen en vervolgens gekristalliseerd. De kristallen diffracteerden tot 2.9 Å.

Hoofdstuk 3 gaat verder met de beschrijving van de kristalstructuur van CSA in een complex met DDB1. Zoals verwacht vormt CSA een β -propeller. CSA bindt aan DDB1 via een N-terminaal helix-lus-helix motief. In de structuur kunnen we zien waar de mutaties zitten die Cockayne Syndroom veroorzaken. Deze mutaties leiden waarschijnlijk vooral tot problemen, doordat ze de lokale of globale vouwing verstoren. Dit zorgt er dan voor dat CSA niet meer kan binden aan zijn substraat of aan zijn interactiepartner DDB1. Helaas zijn zulke fouten in een eiwit moeilijk om te corrigeren met een klassiek medicijn. Verder is gekeken naar wat de meest waarschijnlijke plek van CSA is waarmee het aan zijn substraat bindt. Dit bleek het midden van de bovenkant van het WD40 domein te zijn. Daar zit een klein, positief geladen gat dat lijkt op de substraatbindende plekken voor gefosforyleerde eiwitten. Dit suggereert dat CSA een gefosforyleerd eiwit herkent of een anderszins negatief geladen deel van een ander eiwit.

De kristalstructuur van CSA liet zien welke aminozuren betrokken kunnen zijn bij binding van het substraat. Dit moest wel nog gecontroleerd worden met biochemische experimenten. Dergelijke experimenten staan beschreven in **Hoofdstuk 4**. Een variant van CSA met mutaties middenin de mogelijke substraatbindende plek, bleek niet de UV-gevoeligheid van een CS-A cellijn te kunnen complementeren. Dit wijst erop dat het inderdaad een belangrijke plek voor de functie van het eiwit is. Vervolgens keken we naar de twee meest waarschijnlijke substraten voor binding door CSA: DNA en CSB. CSA bleek niet aan DNA te binden bij biologisch relevante eiwit-DNA verhoudingen. Daardoor is het onwaarschijnlijk dat CSA aan DNA bindt in de cel. In andere experimenten bleek dat CSB meegetrokken wordt met CSA als CSA met zijn C-terminale His-tag uit menselijke cellen wordt gehaald. Bovendien zat er minder CSB in cellijnen waar CSA tot overexpressie werd gebracht. Dit wijst erop dat CSB het daadwerkelijke substraat voor CSA kan zijn.

Bacteriën en lagere eukaryoten hebben nog een andere manier om DNA-schades te herstellen, namelijk die van UV-schade endonuclease herstel (UVDE). UVDE is een eiwit dat verschillende schades kan herkennen, waaronder UV-schades als Cyclobutaan Pyrimidine Dimeer (CPD) en 6-4 fotoproduct (6-4PP). Vervolgens kan UVDE ook een knip in het DNA maken aan de 5' kant van de schade. Andere enzymen maken het herstel daarna af. Het is bijzonder dat één enkel eiwit zowel meerdere schades kan herkennen als deze kan knippen. Normaal gesproken doen meer eiwitten dat samen. Daarom is UVDE een mooi, simpel modelsysteem voor DNA-schade herstel.

Een aantal jaren geleden is in Leiden de kristalstructuur van UVDE uit *Thermus thermophilus* opgelost. Daarin kon gezien worden dat een lysine in de buurt van de actieve plek van UVDE een post-translationele modificatie heeft. Dit is ongebruikelijk voor een bacterieel eiwit dat in een gastheer tot overexpressie wordt gebracht en daarom hebben we de identiteit en functie van deze modificatie onderzocht in **Hoofdstuk 5**. Met massa-spectrometrie en eiwitkristallografie hebben we aangetoond dat het om een carboxylering gaat. Met functionele en structurele testen van mutanten van UVDE hebben we de functie van deze carboxylering kunnen aantonen. Het bleek nodig om negatieve lading te geven die helpt bij de binding van de metaalionen die UVDE gebruikt voor katalyse. Bovendien bleek dat positieve lading op deze plek erg gevaarlijk is voor het eiwit, omdat dat voor veranderingen in de structuur zorgt dichtbij de plek waar de schade moet binden en daardoor gaat het eiwit ook onbeschadigd DNA knippen.

Verder was nog niet duidelijk uit de kristalstructuur van *Tth*UVDE hoe dit eiwit verschillende DNA schades kan herkennen en knippen. Om deze vraag te beantwoorden hebben we de cokrystalstructuur van UVDE met beschadigd DNA (6-4PP) bepaald. In deze structuur (beschreven in **Hoofdstuk 6**) konden we zien dat UVDE een uniek mechanisme heeft om UV-schade in het DNA te herkennen. Niet alleen wordt de schade in een bindingsplek geduwd, ook de basen tegenover de schade gaan in een inkeping die specifiek is voor twee purines, wat leidt tot extra specificiteit voor beschadigde dipyrimidines. Het DNA moet over 90° buigen om in de bindingsgroef te passen; dit is waarschijnlijk energetisch ongunstig voor onbeschadigd DNA, wat leidt tot specificiteit voor beschadigd DNA waar bijvoorbeeld een deel van de waterstofbruggen al zijn verstoord. Om verder te onderzoeken waarom de meeste UVDEs meerdere schades kunnen knippen, hebben we de UVDE homologen *Tth*UVDE (die CPD, 6-4PP en AP kan knippen) en *Sac*UVDE (die alleen 6-4PP kan knippen) vergeleken in activiteit en structuur. De plek waar de schade bindt in het eiwit bleek minder flexibel te zijn in *Sac*UVDE door een zwavelbrug. Ook bleek *Sac*UVDE geen positieve ladingen te hebben aan beide kanten van de DNA-bindingsgroef - wat *Tth*UVDE wel heeft - en die ladingen zijn waarschijnlijk nodig om meerdere DNA substraten correct te kunnen buigen, zodat ze in de groef kunnen binden. Deze hypothesen hebben we bevestigd met activiteitstesten op mutanten van UVDE. De resultaten tonen aan dat de meeste UVDEs juist veel verschillende substraten kunnen binden, doordat ze goed DNA kunnen buigen met positieve ladingen aan beide kanten van de bindingsgroef en doordat ze een relatief flexibele bindingsplek voor schade hebben.

Het laatste hoofdstuk van dit proefschrift (**Hoofdstuk 7**) gaat over de kristalstructuur van een ongerelateerd eiwit, Aardappel Serine Protease Remmer (PSPI). PSPI is een onderdeel van het verdedigingsmechanisme van de plant. Het remt serine proteases zoals trypsine en chymotrypsine en kan daardoor voorkomen dat dieren of ziekteverwekkers zich voeden met de plant. PSPI bleek een β -trefoil vouwing te hebben. Karakteristiek hiervoor is een zeer stabiele kern met lussen die van daaruit naar buiten steken. De reactieve plekken van het eiwit zitten meestal in deze lussen. Het eiwit kan proteases remmen door ze vast te laten lopen op deze lussen: de proteases binden eraan met het doel de remmer kapot te knippen.

Echter, door de stabiele kern valt de remmer niet uit elkaar na de knip en blijft de protease op de remmer vastzitten doordat het blijft proberen die kapot te knippen. Door onze structuur te vergelijken met andere structuren van protease-remmers konden we bepalen wat de reactieve plekken zijn van PSPI. PSPI is bijzonder, omdat het een heterodimere protease-remmer is met twee reactieve plekken. In een post-translationeel proces zijn er namelijk zes aminozuren uit een lus weggeknipt. Uit onze structuur bleek een mogelijke functie hiervoor: het is misschien betrokken bij de activatie van de remmer, want het wegknippen van de lus legt één van de reactieve plekken bloot.

Afsluitende opmerking

Dit proefschrift laat zien hoe eiwitkristallografie inzicht kan geven in de functie van eiwitten. Het geeft voorbeelden van hoe een drie-dimensionaal plaatje van een eiwit met atomaire resolutie kan helpen in het verklaren hoe een eiwit werkt; zowel de globale vouwing als de exacte locaties van bepaalde aminozuren zijn hierbij van belang. Met de overvloed aan informatie die al beschikbaar is in de Eiwit Data Bank (PDB) kan bijna elke nieuwe structuur geïnterpreteerd worden door de structuur te vergelijken met eerder bekende structuren. Echter, de interessantste onderdelen van een eiwit zijn juist de delen die anders zijn dan in eerdere structuren. De interpretatie van die verschillen is vaak speculatief en daarom is biochemische verificatie ervan nodig. Technieken als mutagenese en activiteitstesten zijn hier zeer geschikt voor: ze vormen een complementaire bron van informatie. Zoals te zien is in de hoofdstukken over CSA en UVDE in dit proefschrift, is vooral de combinatie van structurele biologie met biochemie een erg sterke methode om biologische systemen te onderzoeken.