



Universiteit
Leiden
The Netherlands

The BRCT domain from the large subunit of human Replication Factor C

Kobayashi, Masakazu

Citation

Kobayashi, M. (2006, September 6). *The BRCT domain from the large subunit of human Replication Factor C*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4546>

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/1887/4546>

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

Samenvatting

Iedere keer dat een cel deelt moet het DNA materiaal eerst verdubbeld worden. Deze aanmaak van een nieuwe streng DNA wordt verzorgd door een serie moleculen genaamd eiwitten. Dit zijn moleculen die bestaan uit een lange keten van achter elkaar geschakelde kleinere moleculen: aminozuren. Zowel de samenstelling van de aminozuren als de wijze waarop de totale keten wordt opgevouwen tot een 3-dimensionale structuur maken samen dat ieder eiwit een bepaalde functie kan uitoefenen.

Vanaf eind jaren 80 is er uitgebreid studie gedaan naar de manier waarop sommige van deze eiwitten met elkaar samen werken om de DNA replicatie mogelijk te maken. Eén van die eiwitten wordt RFC genoemd, kort voor 'Replication Factor C' en staat centraal in dit proefschrift. Het is opgebouwd uit een aantal afzonderlijk onderdelen of 'subunits' en speelt een belangrijke rol aan het begin van het replicatie proces doordat het een ander eiwit, PCNA, naar het DNA brengt. Het PCNA vormt vervolgens als het ware een ring om een deel van het DNA heen waaraan weer andere eiwitten bevestigd kunnen worden. Tot nog toe zijn veel van de wetenschappelijke studies vooral gericht geweest op het onderzoeken van dit mechanisme (**Hoofdstuk 1**).

In dit proefschrift is daarentegen juist gekeken naar de interactie tussen RFC en een ander gedeelte van het DNA. Een regio van het RFC eiwit lijkt qua vorm sterk op leden van de familie van de zogenaamde BRCT eiwitten, eiwitten die een rol spelen bij het ontstaan van borstkanker. Hoewel al deze eiwitten een min of meer gelijke structuur hebben zijn er grote onderlinge variaties in de samenstelling van aminozuren. Dit zou kunnen verklaren waarom van deze eiwitten, ondanks hun gelijkenis, wordt gedacht dat ze een groot aantal verschillende functies kunnen uitoefenen. Eén van deze functies, de binding van dubbelstrengs DNA (dsDNA) door RFC, is het voornaamste onderwerp van dit proefschrift.

In het eerste gedeelte van dit proefschrift is onderzocht welke factoren er een rol spelen bij de manier waarop RFC bepaalde structurele elementen van het DNA herkent. Er is gekeken hoe deze interactie geoptimaliseerd kan worden door een aantal verschillende eiwit fragmenten te produceren en vervolgens de sterkte van de binding tussen deze fragmenten en het DNA te vergelijken. Het blijkt dat om een goede binding te vormen, het BRCT-

achtige gedeelte van het eiwit alleen niet voldoende is maar dat de fragmenten nog een aantal aminozuren langer moeten zijn. Wanneer dit het geval is kan het fragment een stevig complex vormen met één specifiek deel van het DNA waaraan een zogenaamde ‘fosfaatgroep’ is bevestigd (**Hoofdstuk 2**). Verrassend genoeg echter, zien we dat wanneer het fragment nog langer wordt gemaakt, er verschillende complexen tegelijk gevormd kunnen worden waarbij niet langer maar slechts één gedeelte van het dsDNA betrokken is.

Door lokaal aminozuren te vervangen door andere aminozuren kan er gekeken worden welke residuen uit de BRCT regio van RFC essentieel zijn voor binding van DNA (**Hoofdstuk 3**). Door de zo gevonden aminozuren te vergelijken met die in andere, vergelijkbare, eiwitten waarvan uit de literatuur bekend is wat hun functie is, komen we tot de conclusie dat deze aminozuren specifiek de fosfaatgroep aan het DNA herkennen.

Om goed te begrijpen hoe het complex van DNA en RFC gevormd wordt, is het belangrijk om de structuur er van te kennen. In het tweede gedeelte van dit proefschrift is daarom getracht de structuur van het complex dat gevormd door dsDNA en RFC te bepalen. De techniek die hiervoor gebruikt is heet NMR (nuclear magnetic resonance). Omdat een deel van het complex vrij flexibel blijkt te zijn, was het niet mogelijk om op grond van uitsluitend NMR data de volledige structuur te bepalen. Om deze reden is daarnaast gebruikt gemaakt van het computerprogramma HADDOCK dat diverse vormen van informatie over de afzonderlijke aminozuren combineert om, samen met de NMR data, te komen tot een voorspelling van de structuur van het gehele complex (**Hoofdstuk 4 en 5**). Dit model blijkt uitstekend in staat om de experimentele resultaten, zoals die beschreven zijn in de eerdere hoofdstukken, te verklaren. Uiteindelijk kan dit model van grote waarde blijken bij het identificeren van andere leden van de BRCT familie die in staat zijn DNA te binden (**Hoofdstuk 6**).