



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Damage recognition in nucleotide excision repair

Malta, E.

Citation

Malta, E. (2008, December 9). *Damage recognition in nucleotide excision repair*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/13327>

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/1887/13327>

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

Samenvatting en algemene discussie

Het DNA, de drager van alle genetische informatie, wordt constant bedreigd door verschillende factoren. Door een reactie met het DNA veranderen deze factoren de moleculaire structuur van het DNA en vormen zo verschillende schades. Dit proces kan resulteren in celdood als de schades belangrijke cellulaire processen blokkeren zoals replicatie en transcriptie. Het is ook mogelijk dat mutaties in het DNA ontstaan waardoor de genetische informatie verandert.

Het ontstaan van een breuk in beide DNA strengen en het optreden van base modificaties die de replicatie en transcriptie blokkeren resulteert in een cellulaire respons die als functie heeft om de integriteit van de cel te bewaren. Cel cyclus checkpoint controle vertraagt de cel cyclus om de cel de tijd te geven de DNA schade te herstellen. Tevens worden de transcriptie van verschillende genen betrokken bij het herstel van de genetische informatie, DNA schade herstelmechanismen en chromatine remodeling mechanismen geïnduceerd. Maar als er teveel schade is gedaan aan het DNA om deze te kunnen herstellen, dan kan de cel een geprogrammeerd celdood mechanisme (apoptose) induceren om de integriteit van het organisme in het geheel te behouden. De cel kan er echter ook voor kiezen om in senescence te gaan waar de cel zich niet meer deelt en daardoor geen schade meer kan doen aan het organisme.

Het DNA schade herstelmechanisme, één van de belangrijkste mechanismen betrokken bij het behoud van de genetische informatie, kan verdeeld worden in een aantal verschillende sub-systemen, welke staan beschreven in **paragraaf 1.2**. Het “direct reversal” proces is het meest eenvoudige proces omdat de betrokken eiwitten de afwijkende groep direct verwijderen of het beschadigde nucleotide omzetten naar zijn oorspronkelijke onbeschadigde vorm. Tevens is dit het enige proces dat geen breuk veroorzaakt in een van de DNA strengen wat op zichzelf al een schade is. Alle andere DNA herstelmechanismen resulteren wel in een breuk in één van de DNA strengen. Voorbeelden van deze laatstgenoemde klassen van herstelmechanismen zijn base-excision herstel (BER), UV damage endonuclease (UVDE) herstel en nucleotide-excisionherstel (NER). Vele verschillende eiwitten, glycosylases, zijn nodig voor het BER mechanisme waarvan elk op zich maar één of een kleine groep gelijksoortige DNA schades herkent. Dit systeem herstelt de meest algemeen voorkomende DNA modificaties. Het NER systeem bestaat uit een kleine onveranderlijke groep eiwitten dat vele verschillende soorten DNA schades kan verwijderen, en wordt daarom toegepast om vele schades te repareren die niet door andere herstelmechanismen herkend worden. UVDE, een enkel eiwit aanwezig in sommige specifieke bacteriën en eukaryoten, is ook in staat om structureel verschillende DNA schades te herkennen, maar zijn repertoire van schades is niet zo breed als dat van NER.

Eiwitten die maar één of een kleine groep gelijksoortige DNA modificaties herkennen maken gebruik van een specifieke bindingspocket aanwezig in het eiwit. Deze pocket heeft de juiste afmetingen om een beschadigd nucleotide in zich te binden en voorkomt binding

van onbeschadigde en andere vormen van gemodificeerde nucleotiden. Om toegang te krijgen tot deze nucleotiden en om ze in de pocket te binden worden zij actief of passief uit het DNA gedraaid/geflipt (**paragraaf 1.3**). Deze strategie is alleen mogelijk als het eiwit maar één specifieke modificatie moet herkennen en daarom is het niet aannemelijk dat dezelfde strategie gevolgd wordt door het NER mechanisme.

Het NER mechanisme is uitvoerig bestudeerd in de bacterie *Escherichia coli*. In dit organisme bestaat het systeem uit maar drie verschillende eiwitten om de schade te herkennen en het DNA te knippen: UvrA, UvrB en UvrC. Het moleculaire mechanisme van het UvrABC systeem is uitvoerig bestudeerd en is samengevat in **paragraaf 1.4**. UvrA en UvrB zijn beiden betrokken in de schade herkenningstap. Er wordt aangenomen dat UvrA als eerste de aanwezigheid van een schade in het DNA detecteert waarna UvrB zijn aanwezigheid moet verifiëren en de exacte locatie van de modificatie moet bepalen. UvrC is de nuclease van het systeem en knipt aan weerszijden van de schade zodra de aanwezigheid van de schade is vastgesteld. Na beide knips wordt het uitgeknipte stukje DNA dat de schade bevat verwijderd en vervolgens wordt het gat gedicht door DNA polymerase.

De eerste stap in het bacteriële NER proces is de vorming van een complex tussen UvrA en UvrB, waarvan in **hoofdstuk 2** is aangetoond dat deze bestaat uit twee UvrA en twee UvrB moleculen. Dit UvrA₂B₂-complex wordt in oplossing gevormd en bindt aan het DNA waar het op zoek gaat naar een schade. In dit complex zijn de C-terminale domeinen van de twee UvrB moleculen aan elkaar gebonden. Aangezien een homoloog domein van UvrC ook bindt aan hetzelfde C-terminale deel is het waarschijnlijk dat de UvrB-UvrB interactie voortijdige binding van UvrC voorkomt. Alleen als beide UvrA moleculen van het complex dissociëren, wat alleen gebeurt als het complex een schade gevonden heeft, worden de C-terminale domeinen beschikbaar voor UvrC en kan incisie plaatsvinden. Een kristalstructuur van UvrB heeft laten zien dat het eiwit niet alleen helicase domeinen en een ATPase domein bevat, maar dat het eiwit tevens een geconserveerde β -haarspeld structuur heeft. Biochemische karakterisatie van dit domein heeft aangetoond dat het cruciaal is voor het schade herkenningmechanisme van UvrB. Mutaties aan de onderkant van de haarspeld hebben aangetoond dat twee geconserveerde tyrosine residuen (Tyr92 en Tyr93) binding van UvrB aan onbeschadigd DNA voorkomen door te botsen met de onbeschadigde nucleotiden.

In **hoofdstuk 3** hebben 2-aminopurine fluorescentie metingen laten zien dat wanneer beide UvrA moleculen los gelaten hebben, resulterend in een complex van UvrB gebonden aan het beschadigde DNA substraat, het nucleotide 3' van de schade en zijn basepairings partner uit de helix worden gedraaid. Dit suggereert dat UvrB een base flip mechanisme toepast om te zoeken naar afwijkingen in het DNA. Maar, in tegenstelling tot andere DNA schade herstelmechanismen verandert de schade zelf niet van positie door UvrB binding (**hoofdstuk 4**). Een reeds opgeloste kristalstructuur van *Bacillus caldotenax* UvrB gebonden aan een kleine "DNA loop" structuur liet zien dat één van de DNA strengen zich achter de

haarspeld structuur van UvrB bevindt en vastgeklemd zit tussen de haarspeld en de rest van het UvrB eiwit. De andere streng loopt voor de haarspeld langs. In **hoofdstuk 4** bewijzen we dat de streng die achter de haarspeld langs loopt de beschadigde streng is. Dit suggereert dat UvrB zijn helicase activiteit gebruikt om langs de beschadigde DNA streng te reizen in de 3'→5' richting. Een mutatie in de pocket van UvrB (Y249A), welke voorheen gedacht werd schadeherkenning te geven omdat beschadigde nucleotiden niet in de pocket passen, liet zien dat het binden van een base in deze pocket resulteert in dissociatie van UvrB van het onbeschadigde DNA. Op basis van onze resultaten stellen wij daarom het volgende mechanisme voor schadeherkenning door UvrB voor: incorporatie van een onbeschadigd nucleotide in de pocket van UvrB, welke alleen groot genoeg is om vlakke moleculen te binden, en het stacken van Tyr249 op dit nucleotide positioneert het naburige DNA op zo'n manier dat het in botsing komt met haarspeld-residuen Tyr92 en Tyr93. Dit verklaart de mogelijkheid van UvrB eiwitten die gemuteerd zijn op deze posities om aan onbeschadigd DNA te binden. Op beschadigd DNA blokkeert de aanwezigheid van de schade de translocatie in een positie die binding van een nucleotide in de pocket van UvrB onmogelijk maakt. In deze situatie hebben de naburige nucleotiden meer bewegingsvrijheid en kunnen zij een positie aannemen waarin zij niet meer met Tyr92 en Tyr93 in botsing komen. Dit model voorspelt dat modificaties die klein genoeg zijn om achter de haarspeld langs te bewegen en plat genoeg zijn om door de pocket van UvrB te komen detectie door het eiwit ontlopen. In **hoofdstuk 5** is aangetoond dat DNA substraten die een dergelijke vlakke groep bevatten in plaats van een nucleobase inderdaad niet efficiënt gedetecteerd worden door UvrB. In tegenstelling tot UvrB worden deze kleine vlakke DNA modificaties wel herkend door UvrA wat aantoont dat beide eiwitten verschillende strategieën toepassen om schade te vinden. UvrA herkent waarschijnlijk een meer algemene distortie van de DNA helix, zoals het optreden van enkelstrengs DNA rondom de schade. Het is ook mogelijk dat binding van UvrA de vorming van enkelstrengs DNA vergemakkelijkt zoals werd voorgesteld in **hoofdstuk 5**. UvrA en UvrB gaan klaarblijkelijk op zoek naar verschillende eigenschappen van de modificatie en alleen als UvrA en UvrB beiden de aanwezigheid van een schade signaleren, zal schadeherstel uiteindelijk plaatsvinden. Deze samenwerking voorkomt onnodig en energetisch duur herstel.

Ook al vertonen de prokaryote en eukaryote NER eiwitten weinig structurele overeenkomsten (**paragraaf 1.6**), beiden herkennen zij vele verschillende soorten DNA modificaties. Tevens geldt voor beide systemen dat zij voornamelijk schades herstellen die niet (efficiënt) verwijderd worden door andere DNA herstelmechanismen. Dit suggereert dat ondanks hun verschillen beide systemen een gelijksoortig schade herkenningsmechanisme hebben. Het blijkt inderdaad zo te zijn dat ook eukaryoten meerdere eiwitten gebruiken in de schade herkenningsschapel van dit systeem om onnodig herstel te voorkomen. Van één van deze eiwitten, de initiële schadeherkenner XPC, is aangetoond dat het nucleotiden uit de helix roteert, een mechanisme ook toegepast door UvrB. Maar, in tegenstelling tot UvrB roteert

XPC de beschadigde nucleotide(n) en hun basepairings partners uit de DNA helix. De schade wordt hier vanuit de buitenste streng in oplossing gedraaid. Dit suggereert dat XPC een andere strategie toepast dan UvrB. Het flippen door XPC zorgt hier waarschijnlijk voor de schadeherkenning doordat het energetisch voordeliger is om plaats te vinden in de buurt van een schade omdat de schade de stacking van de basen en daarbij de stabiliteit van het DNA vermindert. Maar in de XPC studie was het een 3-nucleotide mismatch en niet de schade zelf die het eiwit had gepositioneerd. Het is daardoor niet bekend welke van de twee DNA strengen normaal gesproken de schade bevat, de binnenste of de buitenste streng. Fluorescentie metingen met de nieuw gesynthetiseerde DNA modificaties (**hoofdstuk 5**) zou de oriëntatie van de beschadigde streng kunnen ophelderen en het mechanisme van schadeherkenning van XPC verder kunnen karakteriseren. De gemodificeerde DNA substraten kunnen ook helpen bij het bepalen van de eigenschappen van schadeherkenning door het XPA eiwit. Van dit eiwit is bekend dat het een voorkeur heeft voor binding aan beschadigd DNA (t.o.v. onbeschadigd DNA) en een hoge affiniteit heeft voor binding aan DNA moleculen die een sterke buiging van de helix vertonen. Deze buiging zou ook door XPA geïnduceerd kunnen worden op de plaats van de schade om de aanwezigheid van een modificatie vast te stellen, aangezien buiging wordt vereenvoudigd door de schade. Een buigingsmechanisme om de aanwezigheid van een schade vast te stellen is ook mogelijk voor het bacteriële NER eiwit UvrA. Niet alleen zou dit resulteren in schadeherkenning, het zou ook kunnen zorgen voor het uitsmelten van de DNA strengen om de haarspeld structuur van UvrB te kunnen inserteren. Maar aangezien XPA gedacht wordt te binden aan TFIIH is het ook mogelijk dat zijn voorkeur voor gebogen DNA hem in staat stelt om te binden aan een specifieke DNA structuur die alleen gevormd wordt wanneer TFIIH een schade heeft gevonden. In dit geval is XPA geen schade herkenningsfactor maar is het alleen nodig om complexvorming in goede banen te leiden aangezien van het eiwit bekend is dat het een interactie heeft met meerdere eiwitten van het incisie complex.

Een andere overeenkomst tussen de prokaryote en eukaryote NER systemen is de betrokkenheid van een helicase eiwit in beide systemen. In bacteriën is UvrB de helicase waar dat in eukaryoten geldt voor XPD. Beide eiwitten openen het DNA rondom de schade daarbij resulterend in een open structuur welke herkend wordt door de nucleases van het NER systeem: UvrC in bacteriën en XPF•ERCC1/XPG in mensen. De helicase activiteit van UvrB heeft tevens een meer directe rol in schadeherkenning aangezien het vastloopt op de schade zelf (**hoofdstuk 4**). Een soortgelijk mechanisme is al eens voorgesteld voor het XPD eiwit. De recente opheldering van een kristalstructuur van XPD toonde de mogelijke aanwezigheid van een bindingspocket aan, een structureel kenmerk ook aanwezig in UvrB. Voor UvrB werd voorgesteld dat deze pocket betrokken is bij het onderscheiden van beschadigd en onbeschadigd DNA aangezien incorporatie van een (onbeschadigd) nucleotide resulteert in dissociatie. Hetzelfde mechanisme kan gelden voor XPD. Maar het is ook mogelijk dat deze pocket van XPD betrokken is bij de schadeherkenning door te voorkomen dat een beschadigd

nucleotide in de pocket wordt gebonden. Conformationele studies met 2-aminopurine en de fluorescente DNA modificaties beschreven in **hoofdstuk 5** zouden het voorgestelde mechanisme tot schadeherkenning van dit eiwit verder kunnen ophelderen.