



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Nucleotide excision repair at the single-molecule level : analysis of the E. coli UvrA protein

Wagner, K.

Citation

Wagner, K. (2011, February 17). *Nucleotide excision repair at the single-molecule level : analysis of the E. coli UvrA protein*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/16502>

Version: Not Applicable (or Unknown)

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/16502>

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

SAMENVATTING EN ALGEMENE DISCUSSIE

In dit proefschrift is de activiteit van het *Escherichia coli* UvrA eiwit bestudeerd met zgn. ‘single-molecule’ microscopie technieken, waarmee individuele eiwit-complexen geobserveerd kunnen worden. UvrA zorgt samen met UvrB en UvrC voor het verwijderen van beschadigd DNA uit het bacteriële genoom. Dit mechanisme (‘DNA repair’) wordt ‘Nucleotide Excision Repair’ (NER) genoemd en is ook aanwezig in hogere organismen. Volgens het huidige model voor bacterieel NER begint het verwijderen van DNA-schade met het vormen van het A₂B₂-complex, bestaande uit twee UvrA- en twee UvrB-subunits. In dit complex zoeken de twee UvrA-subunits naar schade in het bacterieel genoom. Nadat UvrA een mogelijke schade heeft gevonden, probeert UvrA om UvrB te laten binden; dit lukt echter alleen als het DNA daadwerkelijk beschadigd is. Als UvrB kan binden dissociëren de twee UvrA-subunits, waardoor er een UvrB₂-DNA complex overblijft. Dit complex wordt het ‘pre-precisie’ complex genoemd. Vervolgens bindt UvrC aan dit complex, dit eiwit knipt de beschadigde DNA-streng aan beide kanten van de schade.

UvrA heeft twee ATPase domeinen, die allebei tot de ABC (ATP Binding Cassette)-ATPase familie behoren. Dit type ATPase is o.a. ook aanwezig in de DNA repair eiwitten MutS en Rad50. UvrA hydrolyseert ATP in oplossing, zonder dat er DNA aanwezig is. Dit stabiliseert de dimeer van UvrA; in aanwezigheid van ATP werden meer UvrA-dimeren gedetecteerd dan wanneer ADP (het product van de hydrolyse van ATP) of ATP γ S (een ATP-analoog die niet kan worden gehydrolyseerd) werd gebruikt. Dit betekent dat de meest stabiele vorm van de UvrA-dimeer zowel ATP als ADP bevat, hoewel het onduidelijk is hoe ATP en ADP verdeeld zijn over de vier ATPase domeinen van de dimeer (hoofdstuk 2).

De ATPase van UvrA is gekoppeld aan DNA-binding. Wanneer UvrA aan onbeschadigd DNA bindt, wordt de hydrolyse geremd (hoofdstuk 4). Dit suggereert dat UvrA geen ATP verbruikt tijdens het zoeken naar DNA-schade. Het ontbreken van een cofactor heeft dan ook geen gevolgen voor het binden van Menthol- of Cholesterol-DNA (beide zijn grote en ‘bulky’ DNA-lesies). Dit laat zien dat binding of hydrolyse van ATP niet bijdraagt aan het scannen van DNA op de aanwezigheid van schade (hoofdstuk 2).

Het DNA-scanningsmechanisme van UvrA is bekeken met fluorescentie-microscopie, door een fluorescente kleurstof aan UvrA te koppelen. In theorie kan UvrA zich op drie manieren door het genoom verplaatsen: Door steeds een willekeurige plaats te binden en vervolgens weer los te laten (3D-diffusie), door over onbeschadigd DNA te bewegen (1D-diffusie) of door tegelijkertijd aan twee plaatsen te binden en zo over te springen naar een ander stuk DNA ('intersegmental transfers'). Waarschijnlijk is deze 'zoektocht' van UvrA naar DNA schade een zeer snel proces, aangezien bijna alle UvrA-complexen al een voorkeurs-site hadden gevonden voordat ze zichtbaar konden worden gemaakt. In onze experimenten hebben we geen 1D-diffusie van UvrA-complexen gezien, maar waarschijnlijk wel 3D-diffusie: Een klein aantal UvrA-complexen bond, nadat ze het eerst hadden losgelaten, opnieuw hetzelfde DNA molecuul, maar nu op een andere plaats (hoofdstuk 3).

Met Atomic Force Microscopy (AFM) is de stoichiometrie van het UvrA-complex op DNA bepaald en is gevonden dat alleen UvrA-dimeren stabiel aan DNA binden. Tevens werd met AFM gezien dat een groot aantal van de UvrA-complexen aan de uiteindes van het (lineaire) DNA-substraat bond. Aangezien het uiteinde van lineair DNA een wat meer ontwonden structuur heeft, betekent dit dat UvrA aan DNA-structuren bindt waarvan de baseparing minder goed is, zoals bij een beschadigd nucleotide of een uiteinde. Aangezien er een aantal UvrA-complexen is gevonden die aan twee uiteindes tegelijkertijd bonden (de zogenaamde 'UvrA-bruggetjes'), bindt de UvrA-dimeer met maar één subunit aan een uiteinde (hoofdstuk 2).

Het herkennen van DNA-uiteindes is niet cofactor-afhankelijk. Aangezien een UvrA-complex, voordat het een uiteinde 'herkent', een aantal andere, onbeschadigde, sites moet hebben afgetast, betekent dit dat binding en/of hydrolyse van ATP geen rol speelt bij het zoeken naar DNA-schade. ATP speelt echter wel een rol bij het binden van de schade zelf, omdat UvrA in aanwezigheid van ADP of ATP γ S minder goed een interne schade herkent (hoofdstuk 2).

Op interne schades zijn, in tegenstelling tot op uiteindes, geen UvrA-bruggetjes gevonden. Dit betekent dat, als de UvrA-dimeer aan een interne schade is gebonden, beide subunits contact maken met het DNA naast de schade. De lagere schade-specificiteit van ADP- of ATP γ S-gebonden UvrA betekent dat, in deze configuraties, de structuur van de dimeer zo is dat UvrA niet goed met beide subunits tegelijk aan DNA kan binden (hoofdstuk 2).

Wanneer UvrA beschadigd DNA heeft gebonden, wordt ATP-hydrolyse geactiveerd. Dit helpt UvrA om aan zgn. ‘non-bulky’ DNA-schade te binden (dit type schade, zoals bijv. CPD-DNA, veroorzaakt een kleinere verstoring in de DNA-structuur dan ‘bulky-DNA adducts’ zoals Cholesterol of Menthol), aangezien de CPD-schade in aanwezigheid van ATP beter herkend wordt dan wanneer er geen cofactor aanwezig is. Omdat CPD-DNA wordt veroorzaakt door UV-licht is het herkennen van deze ‘non-bulky’ schade waarschijnlijk veel relevanter voor DNA repair *in vivo* dan het herkennen van synthetische ‘bulky adducts’, zoals Cholesterol-DNA, die *in vivo* niet voorkomen.

De specifieke bijdrage van elk van beide ATPase domeinen van UvrA aan schadeherkenning is onderzocht door middel van twee mutanten, UvrA K37A en UvrA K646A, waarin een van beide domeinen is gedeactiveerd en geen ATP meer kan binden. Beide mutanten waren compleet deficiënt in ATP-hydrolyse, wat laat zien dat de activiteiten van beide ATPase domeinen aan elkaar gekoppeld zijn. Het niet meer kunnen hydrolyseren van ATP had echter geen gevolgen voor het herkennen van de ‘bulky’ Cholesterol-schade; in aanwezigheid van ATP was zowel K37A als K646A niet gestoord in het binden van dit type schade. Echter, in deze conditie had K37A (en waarschijnlijk ook K646A) wel een lagere specificiteit voor de ‘non-bulky’ CPD-schade. Waarschijnlijk stimuleert ATP hydrolyse de herkenning van dit type schade door het uitsmelten van DNA rondom de schade mogelijk te maken. Dit helpt vooral bij het binden van ‘non-bulky’ lesies, omdat dit type schade een minder ontwonden DNA-structuur heeft dan synthetische DNA-schade zoals Cholesterol-DNA (hoofdstuk 4).

Tijdens het opstellen van dit proefschrift is de kristalstructuur van UvrA opgehelderd. In deze structuur zijn drie domeinen van UvrA geïdentificeerd: Het UvrB-bindende domein, het insertie domein (ID) en het zgn. ‘zinc-finger’ motief. Net zoals in de structuren van andere ABC ATPases, zijn deze domeinen gekoppeld in de ATPase domeinen van UvrA. ATPase domein I van UvrA (residu K37A is onderdeel van dit domein) bevat het UvrB-bindende domein en het ID; het zinc-finger motief van UvrA is verbonden aan ATPase domein II (waarvan residue K646 deel uitmaakt). In de structuur van UvrA zijn ook twee groepen van positief geladen aminozuren ontdekt, deze groepen liggen aan het oppervlak van UvrA en kunnen DNA binden. Deze DNA-bindende aminozuren zorgen voor de initiële herkenning van DNA schade, voordat ATP-hydrolyse wordt aangezet (hoofdstuk 5).

Het UvrB-bindende domein van UvrA is een relatief groot domein. Waarschijnlijk is dit het enige domein in UvrA dat direct aan UvrB kan binden. Het zinc-finger motief van UvrA heeft een andere structuur en ook een andere functie dan een 'normale' zinc-finger. Zinc-fingers van andere eiwitten kunnen aan DNA binden, het zinc-finger motief van UvrA heeft echter geen DNA-bindende functie. In plaats daarvan draagt het bij aan de stabiliteit van de UvrA-dimeer en de koppeling van DNA-binding aan ATP-hydrolyse; wanneer het zinc-finger motief uit UvrA is verwijderd, reageert de ATPase activiteit niet meer op het binden van (beschadigd) DNA (hoofdstuk 5).

In *E. coli* UvrA is het ID een relatief groot domein. In dit proefschrift is aangetoond dat dit domein een belangrijke rol speelt bij het binden van DNA-schade. Hoewel er tussen de UvrA-genen van verschillende soorten bacteriën veel variatie bestaat in de grootte en aminozuur-sequentie van dit domein, bevat het ID twee geconserveerde arginine-residuen die contact maken met DNA. De positie van het ID wordt gecoördineerd door ATP hydrolyse. Voordat UvrA ATP hydrolyseert, vormen de twee ID's van de UvrA-dimeer een ring om het gebonden DNA heen. De aanwezigheid van deze ring zorgt ervoor dat beide subunits van de dimeer contact kunnen maken met DNA, via de groep positief geladen aminozuren. Na ATP hydrolyse neemt het ID een andere positie in; dit resulteert waarschijnlijk in het lokaal opensmelten van DNA dat de binding aan 'non-bulky' DNA-schade stimuleert. Hierbij spelen de arginine-residuen een belangrijke rol, wanneer beide residuen ontbreken kan ATP het binden van CPD-DNA niet meer stimuleren (hoofdstuk 5).

Aan de hand van de in dit proefschrift gepubliceerde resultaten hebben we een nieuw model opgesteld voor de schade-herkenning van UvrA. Als eerste bindt een van de twee positief geladen groepen van de UvrA-dimeer aan DNA. Vervolgens vormen de twee ID's een ring om dit DNA heen. In dit complex proberen beide monomeren met hun positief-geladen groepen contact te maken met DNA; dit lukt waarschijnlijk alleen als het DNA een schade bevat. Wanneer beide monomeren van UvrA stabiel contact maken met DNA verandert de conformatie van de UvrA-dimeer. Hierdoor worden de twee zinc-fingers uit elkaar getrokken, wat resulteert in activatie van ATP-hydrolyse. De hydrolyse van ATP zorgt, op zijn beurt, weer voor een verandering in de positie van het ID. Door deze her-positionering van het ID bewegen de arginines in dit domein, die direct contact maken met het DNA, uit elkaar, wat een trekkracht op het DNA veroorzaakt. Als gevolg van deze beweging worden de twee DNA-strengen uitgesmolten, waardoor UvrA stabiel kan binden.

De her-positionering van het ID (die het uitsmelten van DNA mogelijk maakt) is waarschijnlijk het gevolg van hydrolyse in ATPase domein I, aangezien het ID gekoppeld is aan dit ATPase domein (hoofdstuk 5).

De twee ATPase domeinen van UvrA dragen ieder op een andere manier bij aan de interactie met UvrB. Beide ATPase mutanten binden zeer slecht aan UvrB, alhoewel K37A iets beter bindt dan K646A. Ondanks dat beide mutanten gestoord zijn in UvrB-binding, hebben ze nog een behoorlijke incisie-activiteit. Dit geeft aan dat ze nog steeds UvrB op beschadigd DNA kunnen laden. De activiteit van de twee mutanten hangt echter samen met de lengte van het DNA. Op een lang (678 bp) substraat heeft K646A een hogere incisie-activiteit dan K37A, terwijl op een kort (50 bp) fragment K37A een hogere activiteit heeft. Omdat beide mutanten niet zijn verstoord in schade-herkenning, betekent dit dat de lengte van het DNA een effect moet hebben op de manier waarop de mutanten UvrB op de schade zetten (hoofdstuk 4). Als UvrB aan DNA bindt, worden er ongeveer 70 baseparen om UvrB heengeslagen en dit draagt bij aan het laden van UvrB. De lagere incisie van K37A op het lange DNA geeft aan dat, als deze mutant UvrB bindt, DNA niet om UvrB heen kan slaan. Met UvrA K646A daarentegen is de orientatie van UvrB anders; deze mutant heeft een hogere incisie op het lange substraat wat suggereert dat, hoewel K646A zeer slecht aan UvrB bindt, als UvrB aan K646A bindt het DNA wél om UvrB heen kan slaan. Dit verschil in UvrB-binding tussen de twee ATPase mutanten geeft aan dat, tijdens het laden van UvrB en de daaropvolgende dissociatie van UvrA, de beide ATPase domeinen op een andere wijze bijdragen aan de interactie met UvrB (hoofdstuk 4).

Bij de excisie van DNA schade *in vivo* wordt UvrABC geholpen door andere eiwitten, zoals bijv. photolyase of ATL-eiwitten, die ook aan DNA schade kunnen binden. In dit proefschrift is aangetoond dat photolyase UvrA helpt bij het binden van CPD-DNA. Photolyase (en waarschijnlijk ook ATL) doet dit door de verstoring in het DNA, die wordt veroorzaakt door de aanwezigheid van schade, te vergroten zodat UvrA er makkelijker aan kan binden. Wanneer UvrA het ID mist, kan het beter aan photolyase-gebonden CPD-sites binden. Dit suggereert dat het ID in de weg zit als UvrA probeert om aan beschadigd DNA te binden, dat al gebonden is door een helper-eiwit. In sommige bacterie-soorten is een UvrA-homoloog gen aanwezig (UvrA klasse III), dat geen ID bevat. Deze klasse III UvrA-eiwitten zijn waarschijnlijk niet essentieel voor NER, maar zouden specifiek betrokken kunnen zijn bij het herkennen en verwijderen van DNA schade waaraan een helper-eiwit heeft gebonden.

