

Structure and Function of the human AAA⁺ proteins RuvBL1 and RuvBL2

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht von
Diplom-Biochemikerin Sabine Gorynia
aus Berlin

am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

August, 2007

Gutachter: Prof. Dr. Wolfram Saenger
Prof. Dr. Peter Donner

Disputationstermin: 19.11.2007

This work has been performed from November 2004 until August 2007 at *Bayer Schering Pharma* (Berlin) and the *Instituto de Tecnologia Química e Biológica* (Oeiras, Portugal). My PhD thesis was supervised by Prof. Peter Donner and Prof. Maria Arménia Carrondo.

Parts of this thesis were already published or presented:

Publications

RuvBL1 – An AAA⁺ Protein with Roles in diverse Cellular Processes. Gorynia, S. (2007) Review, *Targeted Proteins Database 1 (Current BioData)*, submitted

Crystal Structure of the human AAA⁺ protein RuvBL1. Matias, P.M.*, Gorynia, S.*, Donner, P. and Carrondo, M.A. (2006), *JBC* **281**(50), 918-929 , *authors contributed equally to this work

Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the human RuvB-like protein RuvBL1. Gorynia, S., Matias, P.M., Gonçalves, S., Coelho, R., Thomaz, M., Haendler, B., Donner, P. and Carrondo, M.A. (2006) *Acta Crystallogr F* **62**: 61-66.

Oral Presentations

“Crystal Structure of the human AAA⁺ protein RuvBL1” Spine2-Complexes Kick-off Meeting, Paris, France, January 8, 2007

“Structure and Function of the human AAA⁺ proteins RuvBL1 and RuvBL2” The Scripps Research Institute, La Jolla CA, USA, December 8, 2006

“RuvBL1 – a great asset to its team!” 8th International School on the Crystallography of Biological Macromolecules, Como, Italy, May 21-25, 2006

“RuvBL1 – from Structure to Function?” Free University, Berlin on 18th November 2005

Poster Presentations

“Crystal Structure of the human AAA⁺ protein RuvBL1” Spine2-Complexes Kick-off Meeting, Paris, France, January 8, 2007

“Is ADP unblocking in the hexameric structure of human RuvBL1 the key to its functional activity?” 46th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, San Diego CA, USA, December 8-13, 2006.

“Is ADP unblocking in the hexameric structure of human RuvBL1 the key to its functional activity?” 8th International School on the Crystallography of Biological Macromolecules, Como, Italy, May 21-25, 2006.

“RuvBL1/RuvBL2 – a complex story: structural and biochemical characterisation” International Research Meeting, Schering AG Berlin, Germany, February 21-23, 2006

Summary

RuvBL1 and its homolog RuvBL2 (RuvB-like) are evolutionarily highly conserved eukaryotic proteins belonging to the AAA⁺ family of ATPases (ATPase associated with diverse cellular activities). They play important roles in chromatin remodelling, in transcriptional regulation, in DNA repair and in the c-Myc and Wnt signalling pathways. Proteins involved in these pathways are often mutated in human cancers. Both RuvBL proteins form a complex and act together in diverse cellular processes, for example in chromatin remodelling within the INO80 and TIP60 complexes. RuvBL1 and RuvBL2 also have additional separate functions during transcriptional regulation and mitosis.

In this thesis I present the three-dimensional structures of the selenomethionine variant of human RuvBL1 at 2.2 Å resolution and of the complex formed by RuvBL1 and RuvBL2 in which their respective domain II have been truncated. RuvBL1 assembled into a hexameric structure, whereas the RuvBL1/RuvBL2 complex formed a dodecamer consisting of two hexameric rings. Small-angle x-ray scattering (SAXS) experiments confirmed this structural organisation of RuvBL1 and of the RuvBL1/RuvBL2 complex in solution. Within the RuvBL1 hexamer and the dodecameric complex structure, an ADP molecule was bound to the monomers. RuvBL1 and RuvBL2 monomers contained three domains, of which the first and the third were involved in ATP binding and hydrolysis. Structural homology suggested that the second domain, which is unique among AAA⁺ proteins and not present in the bacterial homolog RuvB, was a novel DNA/RNA-binding domain. Nucleic acid-binding studies confirmed that RuvBL1 and also its purified domain II interacted with ssDNA, ssRNA and dsDNA, while RuvBL2 did not bind to various nucleic acid substrates. These results underpin that both proteins have different characteristics to fulfil their specialised functions. Other groups already localised the regions in RuvBL1 and RuvBL2 responsible for interaction with c-Myc, β-catenin and other proteins. The crystal structure of RuvBL1 revealed that these interacting regions belonged to domain II, which is ideally situated to contact other proteins, as it protrudes out of the hexameric ring. My results suggest that domain II is not only important for nucleic acid binding of RuvBL1, but also for the recruitment of cofactors interacting with RuvBL1 and RuvBL2.

Although it has been shown that the ATPase activity of RuvBL1 and RuvBL2 is needed for several *in vivo* functions, I could only detect a marginal enzymatic activity with the purified individual proteins. The structure of the RuvBL1/ADP complex showed that hexamerisation blocked the nucleotide-binding pocket and that the ADP molecule was tightly bound to the

monomer. A significantly higher ATPase activity was observed for the RuvBL1/RuvBL2 complex. Surprisingly, this activity was further stimulated after truncation of domain II, suggesting that conformational changes within the RuvBL1/RuvBL2 complex allowed a better exchange between ADP and ATP. Since RuvBL1 and RuvBL2 contain all the structural motifs characteristic of an ATP-driven helicase, this activity was tested with the purified proteins. I could clearly demonstrate that RuvBL1, RuvBL2 and their complex can only exert helicase activity when domain II is truncated, suggesting that cofactors drive conformational changes via domain II and allow *in vivo* enzymatic activity of these highly conserved proteins.

Zusammenfassung

RuvBL1 und RuvBL2 (RuvB-like) sind hochkonservierte eukaryotische Proteine, die zu der Familie der AAA⁺ ATPasen gehören (ATPases associated with diverse cellular activities). Zu ihren wichtigen Funktionen in der Zelle zählt die Regulation der Chromatinstruktur und der Transkription. Darüberhinaus sind RuvBL1 und RuvBL2 an der DNA Reparatur beteiligt und stellen regulatorische Komponenten der c-Myc und Wnt Signalwege dar. Viele Proteine, die bei diesen Signalwegen Funktionen übernehmen, sind bei humaner Cancerogenese mutiert. Obwohl RuvBL1 und RuvBL2 einen Komplex bilden und so gemeinsam arbeiten, führen sie einige Aufgaben auch separat aus.

In dieser Arbeit wurde die dreidimensionale Struktur von humanem RuvBL1 und von dem Komplex aus RuvBL1 und RuvBL2 gelöst. RuvBL1 bildet eine hexamere Ringstruktur, während der Komplex aus RuvBL1 und RuvBL2 ein Dodekamer darstellt, welches sich aus 2 hexameren Ringen zusammensetzt. SAXS-Experimente (small-angle x-ray scattering) bestätigten, dass RuvBL1 und der RuvBL1/RuvBL2 Komplex in Lösung tatsächlich Hexamere, beziehungsweise Dodekamere bilden und diese strukturelle Organisation kein Artefakt der Kristallisation war. Aus den Kristallstrukturen ist ersichtlich, dass in allen RuvBL1 und RuvBL2 Monomeren ein ADP Molekül in der Nukleotid-Bindungstasche vorhanden ist. Die Proteine RuvBL1 und RuvBL2 bestehen aus 3 Domänen, von denen die erste und die dritte für die ATP-Bindung und -Hydrolyse wichtig sind. Die zweite Domäne, welche durch die Strukturaufklärung von RuvBL1 das erste Mal identifiziert wurde, ist bislang einzigartig in der Familie der AAA⁺ ATPasen und kein Bestandteil des bakteriellen Homologs RuvB. Sie weist nicht nur strukturelle Ähnlichkeiten zu einigen DNA-Bindedomänen anderer Proteine auf, sondern interagiert im Fall von RuvBL1 tatsächlich mit einzel- und doppelsträngiger DNA und RNA. Im Gegensatz dazu interagiert RuvBL2 nicht mit Nukleinsäuren. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass RuvBL1 und RuvBL2 unterschiedliche Eigenschaften haben, um ihre speziellen Funktionen auszuüben.

Andere Arbeitsgruppen lokalisierten bereits die Aminosäure-Abschnitte in RuvBL1 und RuvBL2, welche für die Interaktion mit c-Myc, β -catenin und weiteren Proteinen verantwortlich sind. Die Kristallstruktur von RuvBL1 zeigte, dass diese Interaktionsflächen zu der Domäne II gehören. Diese ragt aus dem hexameren Ring heraus und ist somit ideal positioniert, um mit anderen Proteinen zu interagieren. Die hier dargestellten Ergebnisse belegen, dass Domäne II nicht nur an der DNA-Bindung von RuvBL1 beteiligt ist, sondern auch für die Interaktion von RuvBL1 und RuvBL2 mit Kofaktoren benötigt wird.

Obwohl bereits mehrfach in der Literatur gezeigt wurde, dass die ATPase Aktivität von RuvBL1 und RuvBL2 für verschiedene *in vivo* Funktionen essentiell ist, besitzen die einzelnen aufgereinigten Proteine nur eine sehr geringe *in vitro* Aktivität. Die Struktur des RuvBL1/ADP Komplexes macht deutlich, dass die Hexamerisierung der RuvBL1 Monomere die Nukleotid-Bindungstasche blockiert und dass die ADP Moleküle sehr stark an die einzelnen Monomere gebunden sind. Allerdings zeigt der Komplex aus RuvBL1 und RuvBL2 eine deutlich höhere ATPase Aktivität als die einzelnen Proteine. Diese Aktivität wird überraschenderweise gesteigert, wenn die Domänen II in RuvBL1 und RuvBL2 verkürzt werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Konformationsänderungen innerhalb des RuvBL1/RuvBL2 Komplexes einen besseren Austausch zwischen ADP und ATP erlauben. Da RuvBL1 und RuvBL2 alle strukturellen Eigenschaften enthalten, die charakteristisch für ATP-abhängige Helikasen sind, wurden die gereinigten Proteine auf Helikaseaktivität getestet. Es wurde gezeigt, dass RuvBL1, RuvBL2 und der Komplex aus beiden Proteinen nur dann Helikaseaktivität ausüben können, wenn ihre Domäne II verkürzt ist. Dies ist ein Hinweis darauf, dass innerhalb der Zelle über die Domäne II Konformationsänderungen hervorgerufen werden, die möglicherweise durch Kofaktoren bewerkstelligt werden und eine enzymatische *in vivo* Aktivität dieser hochkonservierten Proteine erlauben.

Table of Contents

Summary	I
Zusammenfassung	III
1 Introduction	1
1.1 RuvBL1 and RuvBL2 are highly conserved AAA ⁺ proteins.....	1
1.2 RuvBL1 and RuvBL2 are components of chromatin remodelling complexes	3
1.3 RuvBL1 and RuvBL2 are involved in transcription	5
1.4 Additional roles of RuvBL1 and RuvBL2 in snoRNP assembly and mitosis.....	8
2 Aim of this thesis.....	10
3 Materials and Methods	11
3.1 Cloning	11
3.1.1 RuvBL1 and RuvBL2.....	11
3.1.2 RuvBL1 and RuvBL2 for co-expression in <i>E. coli</i> and insect cells.....	12
3.1.3 Domain II of RuvBL1	12
3.1.4 Deletion mutants of RuvBL1 and RuvBL2.....	13
3.1.5 Surface mutants of RuvBL2	15
3.2 Protein expression	17
3.3 Purification of recombinant RuvBL1, RuvBL2 and their surface mutants.....	17
3.4 Purification of the RuvBL1/RuvBL2 complexes	18
3.5 Purification of RuvBL1-DII and RuvBL2-DII.....	18
3.6 Thermal Shift Assay	19
3.7 Dynamic Light Scattering	19
3.8 Nanodrop.....	20
3.9 ATPase assay.....	20
3.10 DNA helicase assay.....	21
3.11 Electrophoretic mobility shift assay	22

3.12	Protein crystallization.....	22
3.13	Data collection of the selenomethionine variant of RuvBL1	23
3.14	Structure solution of RuvBL1	23
3.15	Data collection of the RuvBL1/RuvBL2 complex with a truncated domain II.....	25
3.16	Structure solution of the truncated RuvBL1/RuvBL2 complex.....	25
3.17	Small-Angle X-Ray Scattering.....	26
4	Results	28
4.1	Crystal structure determination of RuvBL1	28
4.1.1	Purification of RuvBL1	28
4.1.2	Crystallization of RuvBL1	30
4.1.3	Structure of the RuvBL1 monomer.....	32
4.1.4	Structure of the RuvBL1 hexamer	35
4.1.5	Motifs for ATP Binding and Hydrolysis.....	37
4.2	Attempts to obtain the crystal structure of RuvBL2	39
4.2.1	Purification of RuvBL2	39
4.2.2	Crystallization of RuvBL2	41
4.3	Purification and crystallization of the RuvBL1/RuvBL2 complex	45
4.3.1	Purification of the RuvBL1/RuvBL2 wild-type complex	45
4.3.2	Characterisation of mutated RuvBL1/RuvBL2 complexes.....	50
4.3.3	Purification and crystallization of RuvBL1/RuvBL2 complexes with	
	truncated domains II.....	52
4.3.4	Structure of the RuvBL1/RuvBL2 complex.....	55
4.4	Characterisation of RuvBL1 and the RuvBL1/RuvBL2 complex using small-angle x-ray scattering	57
4.5	Biochemical characterisation of RuvBL1, RuvBL2 and their complexes	60
4.5.1	ATPase activity of purified RuvBL1	60
4.5.2	Increased ATPase activity of the RuvBL1/RuvBL2 complex	62

4.5.3	ATPase activity of the RuvBL1/RuvBL2 complex is pH-dependent	63
4.5.4	Does domain II regulate ATP hydrolysis?	64
4.5.5	RuvBL1, but not RuvBL2 binds to nucleic acids.....	65
4.5.6	The highly conserved AAA ⁺ proteins RuvBL1 and RuvBL2 exert helicase activity	67
4.5.7	Summary of biochemical results	70
5	Discussion	72
5.1	The RuvBL1 structure exhibits a typical nucleotide-binding pocket and a novel domain important for its cellular functions	72
5.2	RuvBL1 and RuvBL2 not only function separately but also assemble into a dodecameric complex and act together	74
5.3	The functions of RuvBL1 and RuvBL2 require binding to nucleic acids.....	76
5.4	Domain II of RuvBL1 and RuvBL2 is involved in regulation of ATP	79
5.5	The evolutionarily conserved AAA ⁺ proteins RuvBL1 and RuvBL2 unwind DNA	82
6	References	85
7	Abbreviations	92
8	Appendix	93
8.1	Curriculum vitae.....	93
8.2	Acknowledgements	95