



GÖTEBORGS UNIVERSITET

The structural and dynamical basis of NusA's role in transcription-coupled DNA repair

Damasus C. Okeke

Institutionen för kemi och molekylärbiologi
Naturvetenskapliga fakulteten

Akademisk avhandling för filosofie doktorsexamen i Naturvetenskap, som med tillstånd från Naturvetenskapliga fakulteten kommer att offentligt försvaras fredagen den [18 november 2022] kl. 13 i Sal M106 K Isaksson, Institutionen för kemi och molekylärbiologi, Medicinargatan 16, Göteborg.

ISBN: 978-91-8069-055-3 (PRINT)

ISBN: 978-91-8069-056-0 (PDF)

Available online at <http://hdl.handle.net/2077/73707>



GÖTEBORGS UNIVERSITET

Svensk summering

DNA-reparationsprocessen involverar en mängd reparationsmaskiner som kan känna igen och reparera det skadade DNA:t. Nukleotid excision reparation (NER) är en process som utnyttjas av celler för att ta bort stora DNA-skador. I *Escherichia coli* förmedlar transkriptions-reparationskopplingsfaktorer (TRCF), såsom Mfd, NusA och UvrD, koppling av transkription till DNA-reparation genom att rekrytera nödvändiga reparationsmaskiner.

NusA är ett flexibelt 55 kDa protein som består av sex domäner. Isolerad, fri NusA i lösning genomgår autoinhibitorisk intramolekylär interdomänkomplexbildning som negativt reglerar dess syntetiserade RNA-bindande aktivitet. NusAs roll i transkriptionsreglering såväl som i DNA-reparation har rapporterats i stor utsträckning, däremot har inga tidigare studier fokuserat på strukturell karakterisering av NusA-autoinhibering eller interaktionskomplex med reparationsenzym. Dessutom saknas information om den strukturella dynamiken som understryker DNA-substratbindande aktiviteter hos ett av reparationsenzymen, translesion DNA-polymeras IV (DinB). Syftet med denna avhandling är att klargöra den strukturella dynamiken bakom NusA autoinhiberande fenomen samt DinB-Thumb-domänens roll i translesions-DNA-reparationsrollen för DinB; och ytterligare karakterisera det transkriptionskopplade reparationskomplexet av NusA och DinB samt NusA och UvrD-helikas, med både biokemiska och biofysiska tekniker.

I denna avhandling slutförde jag för första gången både ryggrads- och metylgruppers resonanstilldelning av NusA i fullängd och bekräftar att vildtypen NusA och den "öppna" NusA-mutanten är i olika tillstånd. Relaxationsdata rapporterar mycket låg population av det öppna tillståndet i lösning och visar en tydlig trend av frisatt autoinhibering för det öppna NusA-tillståndet. På DinB-delen slutförde jag också för första gången sekventiell resonanstilldelningen och belyser den strukturella dynamik som styr dess DNA-substratplacering i det aktiva centret. Relaxationsdata visar att den DNA-bindande "thumb"-domänen är strukturellt flexibel. Jag visade för första gången att den avstannade RNAP får kontakt med DinB. Vi observerade att det själv-autoinhiberande fenomenet av NusA minskar dess affinitet för DinB i lösning. Däremot stabiliseras DinBs affinitet för NusA i närvaro av ytterligare domäner. I interaktionen mellan NusA och UvrD identifierade vi flertalet bindande interface inom den centrala NusA S1-KH1-KH2-regionen som krävs för att stabilisera interaktionen.

Keywords: Resonance assignment, DNA repair, transcription-repair coupling factors, transcription-coupled repair, NusA, DinB, UvrD, autoinhibition, DNA substrate, dynamics.