



Universiteit
Leiden
The Netherlands

New factors in nucleotide excision repair : a study in *saccharomyces cerevisiae*

Dulk, B. den

Citation

Dulk, B. den. (2008, December 2). *New factors in nucleotide excision repair : a study in saccharomyces cerevisiae*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/13304>

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/1887/13304>

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

Samenvatting

DNA is de drager van onze genetische informatie, maar bezit niet de moleculaire eigenschappen om de stabiliteit te verklaren waarmee genetische eigenschappen worden overgeërfd. De structuur van het DNA wordt continu beschadigd door factoren buiten de cel (straling, sigarettenrook) en intern door producten van cellulair metabolisme. Beschadigingen aan het DNA hinderen verschillende essentiële processen binnen de cel, zoals transcriptie en replicatie. Defecten in deze processen kunnen dodelijke gevolgen hebben voor de cel. Daarnaast kunnen DNA schades worden omgezet in mutaties wanneer gemodificeerde basen foutief worden gerepliceerd. Deze mutaties kunnen leiden tot velerlei defecten, waaronder versnelde veroudering en, voor meercellige organismen, kanker. De reden dat het DNA molecuul in staat is om genetische eigenschappen stabiel te herbergen is dat de vele beschadigingen die het DNA dagelijks oploopt worden hersteld door meerdere zogenaamde DNA-herstel mechanismen. In **hoofdstuk 1** wordt een algemene introductie van deze herstelmechanismen gegeven.

Het onderwerp van dit proefschrift is nucleotide excisie herstel (afgekort NER, van Nucleotide Excision Repair), geïntroduceerd in **hoofdstuk 2**. Het NER systeem is in staat een grote verscheidenheid aan DNA beschadigingen, die qua structuur geen duidelijke overeenkomsten vertonen, te repareren. NER is van bijzonder belang voor de verwijdering van DNA beschadigingen veroorzaakt door UV licht afkomstig van de zon, zoals cyclobutaan pyrimidine dimeren (CPDs) en (6-4) fotoproducten ((6-4)PPs). Personen die lijden aan de erfelijke ziekte Xeroderma Pigmentosum hebben een defect NER systeem en deze aandoening is daarom geassocieerd met een sterk verhoogde kans op huidkanker.

De NER reactie wordt uitgevoerd door meerdere eiwitten die elk een specifieke taak vervullen in de verwijdering van het beschadigde DNA. De eerste stap in NER is de herkenning van beschadigd DNA, uitgevoerd door zogenaamde ‘schade sensor eiwitten’, die het genoom afzoeken naar aanwezige beschadigingen. Als er beschadigd DNA is gevonden worden andere NER factoren gerekruteerd die er voor zorgen dat de twee DNA strengen rondom de schade van elkaar worden gescheiden. Uit de beschadigde streng wordt een fragment van ongeveer 30 nucleotiden verwijderd. Nieuw DNA wordt aangemaakt door het DNA polymerase dat de onbeschadigde streng repliceert. Het DNA is weer volledig intact wanneer DNA ligase het nieuw gesynthetiseerde DNA vastplakt aan het bestaande DNA.

NER kan worden onderverdeeld in twee subsystemen: globaal genoom herstel (“*Glo-*

bal Genome Repair”, GGR), een systeem dat DNA schades in het gehele genoom kan verwijderen, en transcriptie-gekoppeld herstel (*Transcription Coupled Repair*, TCR), specifiek betrokken bij het herstel van schades in actief getranscribeerd DNA. Deze twee subsystemen verschillen in de methode waarop de schade wordt gedetecteerd. In GGR wordt het genoom doorzocht door specifieke schadeherkennings-eiwitten terwijl in TCR het RNA polymerase, dat strandt wanneer het DNA schades zoals CPDs of (6-4)PPs probeert te transcriberen, als signaal dient om de NER reactie te beginnen. Het NER systeem is evolutionair geconserveerd en onder eukaryote organismen vertonen de betrokken eiwitten een aanzienlijke homologie. In dit proefschrift wordt de gist *Saccharomyces cerevisiae* gebruikt als modelorganisme om NER te bestuderen.

Hoofdstuk 3 is gewijd aan een bijzonder ingewikkelde fase in GGR, de herkenning van verschillende, schijnbaar structureel ongerelateerde, beschadigde nucleotiden binnen een grote overmaat van onbeschadigd DNA. De NER factor Rad4-Rad23 bindt aan DNA dat afwijkt van de standaard Watson-Crick conformatie. Deze afwijkende gebieden in het DNA worden vervolgens verder geïnspecteerd door de daarna gerekruteerde factor TFIIH, benodigd voor het scheiden van de twee DNA strengen. Wanneer TFIIH zijn helicase activiteit gebruikt om de verbindingen tussen de twee strengen te verbreken, strandt het enzym op het moment dat het een beschadigde nucleotide probeert te verwerken. Deze blokkering is wellicht essentieel voor de verdere opbouw van het NER complex op de plaats van de schade.

Rad4, de gist homoloog van humaan XPC, is een centraal eiwit in het schadeherkenningsproces. De volgende hoofdstukken behandelen het Rad4 eiwit, de homoloog Rad34 in gist (**hoofdstuk 4**) en een nieuwe Rad4-bindingsfactor genaamd Rad33 (**hoofdstuk 5-6**). In tegenstelling tot andere NER eiwitten die essentieel zijn voor de NER reactie *in vitro*, is de betrokkenheid van Rad4 bij GGR en TCR anders dan die van zijn humane homoloog XPC. In humane cellen is XPC nodig voor GGR maar niet betrokken bij TCR. In gist is Rad4 echter essentieel voor zowel GGR als TCR van RNA polymerase II getranscribeerd DNA. NER is niet alleen maar actief in gebieden getranscribeerd door RNA polymerase II (het overgrote deel van het genoom), maar ook in ribosomaal DNA (rDNA) getranscribeerd door RNA polymerase I. Het rDNA locus bestaat uit een set van ~150 kopieën van de *rRNA* genen. Ongeveer 50% van de kopieën worden actief getranscribeerd, de overigen kopieën zijn niet actief. In eerdere studies hebben wij aangetoond dat Rad4 nodig is voor GGR in rDNA terwijl preferentieel herstel van de RNA polymerase I getranscribeerde streng plaatsvindt onafhankelijk van Rad4.

In **hoofdstuk 4** tonen we aan dat voor het Rad4-onafhankelijk herstel in het rDNA locus een homoloog van Rad4 nodig is, Rad34 (YDR314C). Dit eiwit is exclusief betrokken bij preferentieel herstel van de RNA polymerase I getranscribeerde streng (waarschijnlijk TCR). Rad34 en Rad4 kunnen elkaar niet vervangen en hebben dus strikt gescheiden rollen in NER.

In een supplement van **hoofdstuk 4 (hoofdstuk 4.1)** wordt onderzocht welke eigenschappen van Rad4 en Rad34 bepalen dat deze eiwitten specifiek actief zijn in verschillende regionen in het DNA. In het algemeen kunnen Rad4-homologen worden onderverdeeld in twee domeinen: een geconserveerd deel aan het carboxyl-uiteinde van het eiwit, en een niet-geconserveerd deel aan het amino-uiteinde van het eiwit. Hoewel het te verwachten viel dat de niet geconserveerde delen van Rad4 en Rad34 verant-

woordelijk zijn voor de specificiteit van de eiwitten zijn hybride eiwitten, waarin de niet-geconserveerde delen van Rad4 en Rad34 verwisseld zijn tussen de twee eiwitten, niet functioneel. Dit geeft aan dat elementen in de niet-geconserveerde delen van Rad4 en Rad34 specifiek samenwerken met de bijbehorende geconserveerde delen en dit niet kunnen met het carboxyl-uiteinden van de andere Rad4 homoloog.

De resultaten in **hoofdstuk 4** roepen de vraag op waarom er een Rad4 homoloog bestaat die exclusief nodig is voor NER van de RNA polymerase I getranscribeerde streng van het relatief kleine rDNA locus. De meest aannemelijk verklaring is dat het feit dat er in rDNA een ander RNA polymerase actief is de reden is dat Rad34 nodig is voor NER in rDNA. Om deze aanname te bewijzen zullen er additionele experimenten uitgevoerd moeten worden. DNA herstel zou bijvoorbeeld gemeten kunnen worden in de gescheiden fracties van transcriptioneel actieve en inactieve rDNA regionen. Daarnaast kunnen RNA polymerase I complexen worden geïsoleerd die *of* actief aan het transcriberen zijn *of* zijn vastgelopen op een schade. Deze geïsoleerde complexen kunnen geanalyseerd worden voor associatie met Rad34 en andere NER factoren. Dit zal aangeven of Rad34 al deel uitmaakt van het RNA polymerase I complex alvorens dit op een schade is vastgelopen of wordt gerekruteerd na inductie van DNA schade. Gezien *rad34* mutanten niet UV gevoelig zijn is het zeer de vraag of de primaire rol van Rad34 in NER ligt. Wellicht is Rad34 betrokken bij andere processen binnen de cel. Het is daarom interessant om te testen of Rad34, net als Rad4, aan (beschadigd) DNA bindt, en om te onderzoeken of Rad34 de rol van Rad4 kan overnemen in herstel van naakt DNA in een *in vitro* NER reactie.

In **hoofdstuk 5** wordt een tweede nieuw geïdentificeerde factor, Rad33, geïntroduceerd. Cellen waaruit het *RAD33* gen is verwijderd zijn duidelijk gevoelig voor UV straling. DNA herstel experimenten laten zien dat GGR volledig defect is in *rad33* cellen. Daarnaast is de efficiëntie van TCR ernstig verminderd. Uit 'two-hybrid' interactie proeven blijkt dat Rad33 direct bindt aan Rad4 en Rad34, wat impliceert dat Rad33 deel uitmaakt van het Rad4-Rad23 complex. De hoeveelheid Rad4 en Rad34 eiwit in de cel is aanzienlijk minder in afwezigheid van Rad33. De resultaten die worden besproken in **hoofdstuk 5** duiden er echter op dat het lagere niveau van Rad4 eiwit niet de enige oorzaak is van het NER defect in *rad33* cellen.

Hoofdstuk 6 rapporteert over de betrokkenheid van Rad33 in een UV geïnduceerde, post translationele, modificatie van het Rad4 eiwit. We laten hier zien dat deze modificatie voor een deel bestaat uit ubiquitine. In cellen met functioneel NER is de UV geïnduceerde Rad4 modificatie nauwelijks waarneembaar, maar in *rad33* cellen, of in cellen waarin de interactie tussen Rad4 en Rad33 genetisch is verbroken, is de aanwezigheid van het gemodificeerde Rad4 eiwit duidelijk zichtbaar. Rad4 lijkt te worden gemodificeerd terwijl het actief is in de TCR reactie, gezien deletie van het *RAD26* gen de toegenomen Rad4 modificatie teniet doet. Dit kan betekenen dat de modificatie van Rad4 een intrinsiek onderdeel is van de TCR reactie. Gezien in *rad33* cellen TCR veel minder efficiënt verloopt, is het denkbaar dat in deze mutant de gemodificeerde Rad4 eiwitten relatief langer aanwezig zijn en daardoor duidelijker waarneembaar. Een andere mogelijke verklaring is dat Rad33 normaliter de activiteit van Rad4 reguleert door het eiwit in bepaalde situaties af te schermen van de modificatie.

De Rad4 modificatie doet denken aan de UV geïnduceerde ubiquitinering van het humane Rad4 homoloog XPC, waarvan is aangetoond dat de modificatie leidt tot een

verhoogde affiniteit van XPC voor DNA. Een verschil tussen de modificatie van Rad4 en XPC is dat Rad4 modificatie gerelateerd is aan TCR terwijl ubiquitineren van XPC een GGR specifieke gebeurtenis is. Het kan echter niet worden uitgesloten dat modificatie van Rad4 ook een rol speelt in GGR, maar dat in afwezigheid van Rad33 het Rad4-Rad33 complex niet in staat is om DNA schades te bereiken in niet-getranscribeerd DNA. Om meer te leren over de rol van het gemodificeerde Rad4 in gist zal de volledige aard van de modificatie bepaald moeten worden. Het is ook interessant om te bepalen of de gemodificeerde Rad4 eiwitten een veranderde affiniteit voor (beschadigd) DNA bezitten.

Er is geen duidelijk humaan sequentie homoloog van Rad33. Echter, de data in **hoofdstuk 6** laat zien dat de voorspelde structuur van Rad33 overeenkomsten vertoont met de structuur van het Cdc31 eiwit. Cdc31 is de gist homoloog van het humane Centrin2, een eiwit dat deel uitmaakt van het XPC-hHR23B complex en bijdraagt aan een efficiënt NER proces. We laten zien dat Rad4 bindt aan Rad33 via dezelfde geconserveerde aminozuren die XPC verbinden aan Centrin2, een vinding die mogelijk aanduidt dat de rol van Rad33 functioneel vergelijkbaar is aan die van Centrin2 in NER in humane cellen.