



Universiteit  
Leiden

The Netherlands

## **DNA repair and gene targeting in plant end-joining mutants**

Jia, Q.

### **Citation**

Jia, Q. (2011, April 21). *DNA repair and gene targeting in plant end-joining mutants*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/17582>

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/1887/17582>

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

## SAMENVATTING

Dubbel strengs breuken (DSB-en) in DNA vormen een van de meest ernstige vormen van DNA schade. Organismen hebben twee manieren om zulke DNA breuken te herstellen, via homologe recombinatie of "non-homologous end joining" (NHEJ). De eerste manier maakt gebruik van homologe gebieden in het DNA, die gebuikt worden om de breuk foutloos te herstellen. Bij de tweede methode worden de DNA einden direct aan elkaar gezet. In eukaryoten zoals planten en dieren wordt voornamelijk deze laatste methode gebruikt. Er zijn aanwijzingen dat er meerdere routes voor NHEJ zijn. Er is de klassieke route (C-NHEJ) die afhankelijk is van het Ku70/Ku80 eiwitcomplex en het Lig4/XRCC4/XLF eiwitcomplex. Wanneer een van deze eiwitcomplexen niet functioneel is, wordt een alternatief of back-up NHEJ herstelmechanisme (B-NHEJ) actief in zoogdieren. Alle herstelmechanismen werken samen om zo goed mogelijk het genoom intact te houden.

Herstelmechanismen voor DSB-en in het DNA zijn ook betrokken bij het inbouwen van exogeen DNA om genetisch gemodificeerde organismen te verkrijgen. Indien we de balans van de verschillende herstelmechanismen zouden kunnen manipuleren, zouden we in staat moeten zijn om de homologe recombinatie te bevorderen. Op die manier zouden we de frequentie van "gene-targeting" (GT; een methode om via homologe recombinatie een stuk endogeen DNA uit te wisselen met een ander stuk DNA) moeten kunnen verhogen, wat een enorm voordeel zou zijn voor studies naar de functie van genen en de precieze genetische modificatie van gewas planten. In planten is deze methode zeer lastig, omdat de frequentie zeer laag is.

In hoofdstuk 1 wordt de huidige kennis beschreven van de cellulaire respons op het ontstaan en herstel van DSBs en de resultaten verkregen met gene-targeting. Het doel van mijn thesis was om herstel van DSB-en in planten te bestuderen en om zo potentiële factoren te identificeren, waarmee de frequentie van GT verhoogd kan worden.

In hoofdstuk 2 worden een aantal Arabidopsis mutanten bestudeerd die gestoord zijn in genen die actief zijn in de C-NHEJ route. De mutanten zien er onder standaard condities normaal uit, maar wanneer ze blootgesteld worden aan bleomycine, dat DNA schade veroorzaakt dat voornamelijk bestaat uit DSB-en, worden de planten erg ziek. Echter met behulp van zogenaamde comet-assays is te zien dat na een herstel periode wel DNA herstel plaats vindt. Dit is een aanwijzing dat er nog een tweede NHEJ route is, die in deze mutanten actief is. Omdat NHEJ DNA herstelroutes ook tijdens Agrobacterium T-DNA transformatie zorgen voor het inbouwen van het T-DNA in het plantengenoom, hebben we ook T-DNA integratie en GT bestudeerd in deze mutanten. In de Ku70, Ku80 en Mre11 mutanten is de frequentie van T-DNA integratie slechts 10-20% ten opzichte van het wild-type. Dit betekent dat Ku en Mre11 belangrijk zijn voor T-DNA integratie. Maar er wordt nog wel, zij het met lage frequentie, T-DNA ingebouwd in deze mutanten. Dus er vindt nog NHEJ plaats. In de Lig4 mutant is de frequentie niet lager dan in het wild-type. De functie van Lig4 wordt waarschijnlijk overgenomen wordt door een van de andere ligasen in het

geval dat Lig4 inactief is. De GT frequentie in de Ku en Lig4 mutanten is niet veranderd ten opzichte van de wild-type. De Mre11 mutant geeft wel een lichte verhoging. Al deze resultaten duiden erop dat er ook in planten een alternatieve NHEJ route moet zijn. In de rest van de hoofdstukken wordt deze route nader bestudeerd.

In dierlijke cellen speelt poly(ADP-ribose) polymerase1 (Parp) niet alleen een rol bij herstel van enkelstrengs breuken, maar ook in de alternatieve NHEJ route. In planten zijn twee Parp genen geïdentificeerd, die betrokken zijn bij stress tolerantie en geprogrammeerde celdood. Hun rol bij herstel van DNA schade wordt bestudeerd in hoofdstuk 3, met behulp van planten waarin een of beide Parp genen zijn gemuteerd. Hieruit blijkt dat Parp1 een rol speelt in het herstel van DNA schade, voornamelijk van enkelstrengs breuken. Mutatie van zowel Parp 1 als ook Parp 2 zorgt voor nog grotere gevoeligheid voor chemicaliën die DNA schade veroorzaken. In vitro "end joining" laat zien dat voornamelijk "end joining" via microhomologie (MMEJ) is verstoord in deze mutanten. Er was geen meetbaar effect van deze mutaties op T-DNA integratie en GT.

In hoofdstuk 4 worden de gevolgen bestudeerd van mutaties in beide NHEJ routes tegelijk. Deze mutanten (Ku80,Parp1,Parp2) zijn nog gevoeliger voor DNA schade dan wanneer alleen de klassieke of alternatieve route is uitgeschakeld. Dit betekent dat de eiwitten inderdaad betrokken zijn bij verschillende DNA herstel routes. "End joining" studies laten zien dat Parp betrokken is bij MMEJ en dat Ku de DNA uiteinden beschermt voor afbraak. Wanneer beide routes uitgeschakeld zijn, is de in vitro "end joining" weer onverwacht hoog, op het wild-type niveau. De twee Parp genen hebben beide eenzelfde functie in MMEJ en uitschakelen van beide genen is nodig om de MMEJ te inactiveren. T-DNA integratie is sterk verlaagd in de Parp/Ku mutant, maar nog steeds aanwezig. Al deze resultaten samen laten zien dat er nog steeds "end joining" plaats vindt als beide NHEJ routes uitgeschakeld zijn en dat er dus nog een derde NHEJ route moet zijn.

In de laatste stap voor herstel van DSB-en worden de DNA uiteinden aan elkaar gezet door ATP-afhankelijke DNA ligase enzymen. In zoogdieren is Lig3 verantwoordelijke voor deze stap in de B-NHEJ route. In planten is geen Lig3 aanwezig. Daarom is het plantspecifieke Lig6 en zijn mogelijke rol in B-NHEJ bestudeerd met behulp van mutanten in het Lig6 gen. Tevens zijn planten bestudeerd die gemuteerd zijn in zowel Lig4 als ook in Lig6. Geen duidelijke functie voor herstel van DSB-en of het inbouwen van T-DNA of GT kon worden vastgesteld voor Lig6. Bestuderen van beschikbare DNA databases liet zien dat er mogelijk nog een ander ligase gen is in planten dat mogelijk de functie overneemt van Lig4 en Lig6 in het geval dat beide genen uitgeschakeld zijn.

Er kan dus worden geconcludeerd dat planten een aantal NHEJ routes hebben om DSB-en te herstellen, niet alleen de klassieke Ku-afhankelijke route, maar ook meerdere alternatieve routes. Omdat planten goed moeten kunnen omgaan met allerlei vormen van stress, omdat ze die niet uit de weg kunnen gaan, zou het noodzakelijk kunnen zijn om meerdere alternatieve NHEJ routes te hebben om te overleven. Het is een bijzonder interessante uitdaging om op te helderen welke factoren zorgen voor deze derde, tot nu

toe nog onbekende en hypothetische route. Een gedetailleerde kennis van alle in planten beschikbare NHEJ routes zal in de toekomst mogelijk wel kunnen leiden tot de ontwikkeling van methoden om de GT frequentie te verhogen.