



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Chromatin remodelers in the DNA double strand break response

Smeenk, G.

Citation

Smeenk, G. (2012, September 11). *Chromatin remodelers in the DNA double strand break response*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/19771>

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/1887/19771>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/19771> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Smeenk, Godelieve

Title: Chromatin remodelers in the DNA double strand break response

Date: 2012-09-11

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Alle cellen in een organisme bevatten hetzelfde DNA. Dit DNA bevat alle informatie die nodig is om de cel te maken en het organisme te laten functioneren. DNA bestaat uit een genetische code die is opgedeeld in afgegrensde eenheden, de genen. Een gen codeert voor de productie van één soort eiwit. Eiwitten vormen de functionele en structurele bouwstenen van de cel.

Het is van essentieel belang voor de overleving van de cel, weefsel en organisme dat de genetische informatie intact blijft. Ons DNA staat continu bloot aan beschadigende agentia zoals zonlicht, röntgenstraling en stoffen die vrijkomen bij de stofwisseling. Er wordt geschat dat elke cel per dag gemiddeld 10.000 DNA beschadigingen te verwerken krijgt. Deze beschadigingen kunnen potentieel leiden tot mutaties die de genetische code definitief veranderen. Mutaties kunnen ervoor zorgen dat celdood optreedt of dat juist de celgroei op hol slaat, wat uiteindelijk kan leiden tot kanker. Om de zeer nadelige effecten van DNA schade tegen te gaan, zijn cellen uitgerust met een zeer efficiënt reparatiemechanisme dat nagenoeg alle schades repareert. Een van de meest gevaarlijke soorten DNA schade is de DNA dubbelstrengs breuk waarbij beide strengen van de DNA helix gebroken zijn.

Als de schade gedetecteerd wordt, kan de celcyclus stopgezet worden om tijd te genereren voor het reparatieproces. In dit proces vindt een cascade van stappen plaats dat leidt tot een opeenhoping van eiwitten met een specifieke functie bij de DNA breuk. Deze eiwitten dragen bij om de schade zo efficiënt mogelijk te repareren.

Het volume van de celkern bedraagt gemiddeld $60 \mu\text{m}^3$ en bevat ongeveer 2 meter DNA. Dit betekent dat het DNA met behulp van eiwitten heel strak gevouwen moet worden om in de kern te passen. Het compact gevouwen DNA wordt chromatine genoemd. Ondanks de compacte vouwing van chromatine kan het DNA nog steeds beschadigd worden. Echter, de compacte chromatine structuur vormt een barrière voor de reparatie-eiwitten om de DNA schade te bereiken en te verwijderen. Het beschadigde DNA in chromatine kan op gecontroleerde wijze toegankelijk gemaakt worden door het chromatine te ontvouwen met behulp van chromatine remodelers zodat efficiënte reparatie kan plaatsvinden.

Voor het onderzoek in dit proefschrift hebben we gezocht naar nieuwe factoren die een rol spelen in de reparatie van dubbelstrengs breuken.

De gemakkelijkste manier om de functie van een eiwit te bestuderen is om te onderzoeken wat er mis gaat als het eiwit verwijderd wordt uit de cel. Dit kan op twee manieren. Ten eerste kan een gen uit een cel verwijderd worden. Via geslachtscellen kan dit resulteren in een muismodel deficiënt in het gen van keuze (een z.g. knock-out muis model). Ten tweede kan het product van een specifiek gen geblokkeerd worden, zodat er geen eiwit meer aangemaakt kan worden (de z.g. knock-down van een gen). Met behulp van deze techniek kan relatief gemakkelijk onderzocht worden welke eiwitten een rol spelen in een bepaald proces.

De studie beschreven in dit proefschrift begon met een onderzoek in de worm *C. elegans* waarbij werd gezocht naar factoren die een rol spelen in de bescherming

tegen röntgenstraling. In dit onderzoek werden 45 genen gevonden die de worm beschermen tegen de gevolgen van röntgenstraling. Vervolgens hebben we bestudeerd of de homologen in de mens een zelfde rol spelen, dit wil zeggen dat knock-down van deze genen menselijke cellen meer gevoelig maken voor röntgenstraling.

In dit proefschrift richtten we het onderzoek op de rol van drie chromatine remodelers, CHD2, CHD4 en SMARCA5, in de dubbelstrengs breuk respons. Daarnaast hebben we gekeken naar RAD51C, een bekende factor die een rol speelt in de DNA schaderespons.

Dubbelstrengs breuken als gevolg van bijvoorbeeld blootstelling van cellen aan röntgenstraling kunnen gevisualiseerd worden door eiwitten die ophopen op breuken te markeren met fluorescerende antilichamen. De breuken zijn onder de microscoop te zien als fluorescente stippen die foci (e.v. focus) genoemd worden. Een andere methode is om zeer lokaal in de cel schade te introduceren door middel van laser bestraling. Het nadeel hiervan is dat er verschillende soorten schade in onbekende hoeveelheden op dezelfde plek worden gemaakt. Het voordeel van deze methode is dat levende cellen onder de microscoop kunnen worden gevolgd in de tijd. Om te kijken naar het gedrag van een specifiek eiwit, wordt het eiwit gemarkeerd met een fluorescerend molecuul, zodat detectie mogelijk is.

CHD4

In hoofdstuk 2 wordt de nieuwe functie van de chromatine remodeler CHD4 in de dubbelstrengs breuk respons beschreven. CHD4 is een onderdeel van het NuRD chromatine remodeling complex bestaande uit meerdere eiwitten die samen een bepaalde functie uitvoeren. We hebben aangetoond dat CHD4 en andere factoren uit het NuRD complex naar de plaats van de schade toegaan wat suggereert dat het complex een directe rol speelt in de dubbelstrengs breuk respons. Meer specifiek hebben we gevonden dat CHD4 nodig is voor signalering en reparatie van dubbelstrengs breuken.

SMARCA5

We hebben ontdekt dat de chromatine remodeler SMARCA5 ook een rol in de dubbelstrengs breuk respons speelt. Net als CHD4 gaat SMARCA5 naar de schade toe waar het detectie en reparatie van dubbelstrengs breuken faciliteert.

CHD2

De chromatine remodeler CHD2, die familie is van CHD4, speelt ook een rol in de reparatie van dubbelstrengs breuken. Onze resultaten wijzen uit dat CHD2 bindt aan poly-ADP-ribose op de plek van de breuk. Poly-AP-ribose werkt als een soort anker om eiwitten op een specifieke plek te lokaliseren. Na toevoeging van een remmer van poly-ADP-ribose zien we dat CHD2 niet meer op de schadeplek ophoopt. Het is niet precies bekend wat poly-ADP-ribose doet in de dubbelstrengs breuk respons, naast het rekruteren van eiwitten.

RAD51C

Rad51C is niet alleen belangrijk voor reparatie van dubbelstrengs breuken maar ook belangrijk voor de ontwikkeling van de muis. Dit blijkt uit het feit dat Rad51C knock-out muizen niet levensvatbaar zijn. Muizen die één goed exemplaar en één gemuteerd exemplaar van het Rad51C gen bezaten (heterozygoten) hadden echter geen problemen. We observeerden ook dat heterozygote Rad51C cellen meer gevoelig waren voor DNA schade dan cellen zonder mutaties, wat aangeeft dat heterozygote Rad51C cellen minder goed in staat zijn DNA schade te repareren.

