



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Nucleotide excision repair : complexes and complexities : a study of global genome repair in human cells

Volker, Marcel

Citation

Volker, M. (2006, May 15). *Nucleotide excision repair : complexes and complexities : a study of global genome repair in human cells*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4390>

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/1887/4390>

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

Samenvatting voor de leek

Samenvatting voor de leek

Onze erfelijke eigenschappen liggen opgeslagen in het DNA in elk van onze cellen. DNA is opgebouwd uit lange strengen nucleotiden; elk nucleotide is een ‘letter’ uit de genetische code. Er zijn vier soorten nucleotiden in DNA die we aanduiden met de letters A, T, C en G. Drie miljard van deze nucleotiden coderen alle erfelijke eigenschappen van de mens. In het genoom (alle nucleotiden bij elkaar) ligt elke ‘letter’ altijd tegenover dezelfde andere letter: A tegenover T en C tegenover G; dit maakt een totaal van zes miljard nucleotiden in drie miljard ‘baseparen’. De twee lange strengen DNA zijn om elkaar heen gedraaid als een soort wenteltrap, en dit levert het beeld van de spreekwoordelijke ‘DNA-helix’ op. Het voordeel van deze manier van organiseren is dat alle informatie twee keer aanwezig is, één keer in elke streng van het genoom. Het kopiëren van DNA (‘replicatie’) bijvoorbeeld is daardoor in principe eenvoudig: de twee strengen worden in feite uiteengeritst en tegenover elk nucleotide plaatst de cel het corresponderende nucleotide; het eindresultaat is twee kopieën van het genoom, waarna de cel zich in tweeën kan delen. Om eiwitten te maken wordt er eerst een kopie van het DNA gemaakt in RNA in een proces dat transcriptie heet. Dit RNA wordt daarna vertaald naar eiwit (dit proces heet ‘translatie’), waarbij elk blok van drie ‘letters’ één bouwsteen voor een eiwit codeert; een deel van het genoom dat de informatie bevat voor het maken van één eiwit wordt een gen genoemd. Een fout in het DNA kan dus leiden tot een fout in een eiwit; dit is een belangrijke onderliggende oorzaak voor het ontstaan van kanker.

Het is dus belangrijk dat er geen fouten in ons genomisch DNA sluipen maar dat is makkelijker gezegd dan gedaan. DNA is namelijk niet zo stabiel als men zich meestal voorstelt. Het DNA kan spontaan uiteenvallen en wordt bovendien beschadigd door chemische stoffen – zowel van buitenaf als door de cel zelf geproduceerd – en straling. Als de cel beschadigingen aan zijn DNA niet adequaat oplost, kan dat ernstige gevolgen hebben. Eén van de mogelijkheden is dat de polymerases, die transcriptie en replicatie uitvoeren, vastlopen op de beschadiging in het DNA, omdat ze niet geschikt zijn om beschadigd DNA te ‘lezen’. Een vastgelopen polymerase is een belemmering voor de cel om zijn DNA te kopiëren voordat de cel kan delen en kan ertoe leiden dat de cel doodgaat. Ook kan een beschadigd nucleotide verkeerd gelezen worden tijdens replicatie en zo leiden tot een soort ‘drukfout’ in het DNA (een ‘mutatie’). Zoals gezegd kan dat leiden tot het ontstaan van kanker.

Gelukkig zijn er verschillende systemen geëvolueerd die de schadelijke effecten van beschadigd DNA tegengaan. Ten eerste zal de cel vaak de zogenaamde celcyclus stoppen om te voorkomen dat replicatie plaatsvindt (met mogelijk de bovengenoemde gevolgen). Bovendien zorgt dit ervoor dat de cel extra tijd heeft om de beschadigingen te repareren. Hiervoor kan de cel een of meerdere van zijn DNA-herstelsystemen gebruiken, die het DNA in zijn normale, onbeschadigde, staat kunnen terugbrengen. Elk herstelsysteem is gespecialiseerd in het herstel van een aantal van de meest voorkomende DNA-lesies (beschadigingen) omdat deze onderling te veel verschillen om door één enkel systeem aangepakt te worden. In sommige gevallen is het DNA dusdanig ernstig beschadigd dat de cel besluit dat een herstelpoging zinloos is; in zulke gevallen kan een cel tot een ‘geordende zelfontmanteling’ overgaan, een proces dat bekendstaat als apoptose. Door apoptose te plegen voorkomt de cel dat de schade aan zijn DNA het hele organisme schade berokkent (zoals bijvoorbeeld via het ontstaan van kanker). **Hoofdstuk 1** beschrijft kort de reacties van een cel op DNA-schade met de nadruk op de DNA-herstelsystemen.

Het onderzoek in dit proefschrift is toegespitst op één DNA-herstelsysteem: nucleotide excisie herstel (waarvan de engelse afkorting 'NER' is). NER kan een verscheidenheid aan lesies herstellen, waaronder de fotolesies (cyclobutaan pyrimidine dimeren, CPD, en pyrimidine 6-4 pyrimidon fotoproducten, 6-4PP) veroorzaakt door het ultraviolette deel van zonlicht, kleine adducten ontstaan door het antikankermiddel cisplatin en grote adducten die worden veroorzaakt door de aromatische koolwaterstoffen in verbrand eten en sigarettenrook. NER bestaat uit een aantal stappen. Eerst wordt de beschadiging in het DNA herkend; dan worden de twee DNA-strengen rond de lesie van elkaar gehaald. Daarna wordt de streng waarin de lesie zich bevindt geknipt aan weerszijden van de lesie en het aldus uitgeknipte stuk DNA wordt verwijderd. Als laatste wordt dit verwijderde stuk DNA weer aangemaakt op eenzelfde manier als bij replicatie gebeurt: tegenover de nucleotiden in de overgebleven, onbeschadigde streng worden de juiste nucleotiden geplaatst en het geheel wordt 'aan elkaar geplakt', met als eindresultaat volledig hersteld DNA. NER is uitvoerig onderzocht, en **hoofdstuk 2** geeft een overzicht van de basisconcepten van NER, te beginnen met een korte schets van een van de twee 'onderdelen' van NER, namelijk transcriptie-gekoppeld herstel. Zoals de naam al aangeeft wordt hier herstel van beschadigd DNA gekoppeld aan transcriptie; meer specifiek worden schades waarop een RNA polymerase (eiwit dat transcriptie uitvoert) is vastgelopen sneller hersteld om de blokkering van transcriptie zo snel mogelijk op te heffen. Het andere onderdeel van NER is globaal genoomherstel; dit verwijdert lesies uit het hele genoom en wordt uitgebreid behandeld in hoofdstuk 3. In hoofdstuk 2 worden verder de consequenties besproken van defecten in NER zoals die tot uiting komen in enkele erfelijke ziekten. Patienten met een defect in globaal genoomherstel lijden aan een ziekte met de naam xeroderma pigmentosum of XP ('perkamenthuid' en pigmentvlekken). Hun hersteldefect uit zich op verschillende manieren maar de meest opvallende (en meest fundamentele) is een extreem verhoogd risico op het ontstaan van huidkanker in delen van de huid die aan de zon blootstaan. Deze eigenschap onderstreept het belang van globaal genoomherstel in het voorkomen van kanker. Aan de andere kant hebben patienten die een defect hebben in transcriptie-gekoppeld herstel geen last van een verhoogde kans op huidkanker. In plaats daarvan hebben ze groeiproblemen en geestelijke handicaps; deze eigenschappen kunnen uiteindelijk worden teruggevoerd op een defect in transcriptie dat wordt beschreven in hoofdstuk 4. Tenslotte beschrijft hoofdstuk 2 twee basisconcepten waar onze huidige manier van denken over NER op is gebaseerd: het idee dat de eiwitten betrokken bij NER een voor een naar de schade worden gehaald (in tegenstelling tot allemaal tegelijk), en het idee dat een DNA-schade niet in één stap wordt herkend maar in twee, waarbij elke stap een andere eigenschap van de schade detecteert.

Zoals hierboven genoemd bevat **hoofdstuk 3** een gedetailleerde weergave van het belangrijkste onderdeel van NER, globaal genoomherstel. De betrokken eiwitten en hun rollen, en hun interacties worden uitvoerig bediscussieerd. Om te beginnen worden de twee zogenaamde 'schadeherkennende factoren', UV-DDB en XPC-hHR23B, behandeld. Terwijl XPC-hHR23B algemeen wordt beschouwd als de factor die globaal genoomherstel begint door beschadigd DNA te herkennen, vervult UV-DDB hier wellicht een ondersteunende rol. De rol van UV-DDB in het herstel van 6-4PP wordt uitvoerig beschreven in hoofdstuk 10. Vervolgens wordt TFIIH behandeld, een complex van meerdere eiwitten dat meerdere functies vervult in de cel. Hoewel eerst werd gedacht dat TFIIH alleen betrokken was bij het openen van de DNA-strengen om andere eiwitten toegang tot het complex te verschaffen, is ondertussen duidelijk dat TFIIH een actieve rol speelt in het reguleren van die eiwitten en misschien zelfs helpt bij het herkennen van de schade. Daarna wordt XPA besproken. Oorspronkelijk werd XPA, samen met RPA, verantwoordelijk gedacht voor het herkennen van schades, maar later bleek dat XPA

in feite betrokken is bij het verzekeren ('verifiëren') van de aanwezigheid van een schade in het DNA. XPA zou dit kunnen doen door de volgende eiwitten die de knippen in het DNA maken te reguleren, mogelijkerwijs samen met TFIIH. Het volgende eiwit, RPA, werd zoals gezegd vroeger betrokken geacht bij schadeherkenning. RPA, dat een buitengewone affiniteit heeft voor enkelstrengs DNA, blijkt echter betrokken bij het stabiliseren van de stukken enkelstrengs DNA die ontstaan na het uit elkaar halen van het DNA rond de schade. Verder is RPA, net als XPA, van belang voor het reguleren van de knip-eiwitten, XPG en ERCC1-XPF. Van XPA, RPA en XPG is niet duidelijk in welke volgorde ze naar het NER-complex komen. De bewijzen voor en tegen verschillende bindingsvolgorden worden besproken, alsmede het voorstel dat deze drie eiwitten niet in een vaste volgorde binden, maar willekeurig. ERCC1-XPF is het laatste eiwit dat in het NER-complex wordt opgenomen voordat de 'dubbele knip' plaatsvindt die het beschadigde stuk DNA verwijdert. Hierna worden alle eiwitten die betrokken zijn bij de eerste stappen van NER verwijderd van het DNA; alleen RPA en mogelijk XPG blijven gebonden (zie ook hoofdstuk 10). Vervolgens worden eiwitten aangetrokken die ook betrokken zijn bij replicatie. PCNA, dat een ring vormt die om het DNA bindt, en waaraan de DNA polymerases binden; RF-C, het eiwit dat PCNA om het DNA helpt; en DNA polymerases delta en/of epsilon. Beide polymerases kunnen deze stap van NER uitvoeren; zie ook hoofdstuk 10. Tenslotte wordt DNA ligase I gerecruiteerd, een eiwit dat het nieuw aangemaakte stuk DNA 'vastplakt' aan het oude stuk DNA.

Er bestaat nog een koppeling tussen transcriptie en DNA-herstel die nog niet is genoemd. Na het toebrengen van DNA-schades die door transcriptie-gekoppeld herstel worden behandeld (zoals de al genoemde door UV-straling veroorzaakte fotolesies) wordt transcriptie geremd. Deze remming wordt normaal gesproken weer opgeheven naarmate het DNA wordt gerepareerd. Opvallend genoeg wordt transcriptie ook afgeremd in genen die geen lesies bevatten, en de oorzaak hiervan is nog onbekend. In **hoofdstuk 4** worden de eigenschappen en enkele mogelijke oorzaken voor dit fenomeen besproken. Het aanbrengen of verwijderen van fosfaat (een verbinding van één atoom fosfor en vier atomen zuurstof: PO_4) aan het RNA polymerase blijkt hier een belangrijke rol te spelen: in de aanwezigheid van DNA-schade wordt fosfaat aan het RNA polymerase aangebracht. Dit zorgt ervoor dat het polymerase niet meer begint aan de transcriptie van genen; hierdoor wordt de transcriptie geremd van alle genen, ook als ze niet beschadigd zijn. In normale cellen wordt dit fosfaat weer verwijderd als de DNA-schades zijn gerepareerd; in cellen van CS-patiënten echter is dit niet het geval. De permanente remming van transcriptie die zo ontstaat ligt waarschijnlijk ten grondslag aan veel van de symptomen van CS-patiënten.

In het laatste inleidende hoofdstuk, **hoofdstuk 5**, wordt NER in de context van de celkern geplaatst. Het DNA van de cel bevindt zich in de kern, maar er is meer in de kern dan alleen DNA. De belangrijkste andere component in de kern zijn eiwitten die het DNA heel compact ingepakt houden; deze combinatie van DNA en eiwitten heet 'chromatine' en heeft in principe een negatieve invloed op NER (omdat het minder goed bij het DNA kan, ingepakt als het is door de andere eiwitten). Er bestaan echter een aantal mechanismes die NER helpen door het chromatine te openen, waardoor NER beter bij het DNA kan en het herstel ervan gestimuleerd wordt. Deze mechanismen en enkele van de eiwitten die erin een rol spelen worden besproken. Nadat NER zijn werk heeft gedaan wordt de oorspronkelijke structuur van het chromatine hersteld; de eiwitten die hiervoor zorgen worden ook besproken.

Het meeste onderzoek naar NER is gedaan ‘*in vitro*’, d.w.z. met extracten van cellen en/of met gezuiverde eiwitten. Het onderzoek in dit proefschrift echter is voornamelijk uitgevoerd in intacte cellen. Het grote voordeel hiervan is dat de omstandigheden waaronder een experiment wordt uitgevoerd (bijvoorbeeld de zoutconcentratie of de activiteit van gezuiverde eiwitten) geen invloed kunnen uitoefenen op de uitkomst ervan. De meest gebruikte techniek in dit proefschrift is de zogenaamde ‘immunofluorescentie’. Hierbij worden cellen eerst met een chemische stof ‘gefixeerd’, als het ware chemisch bevroren. Daarna worden antilichamen (vandaar ‘immuno’) in de cellen gebracht die niet bedoeld zijn om ziekteverwekkers op te sporen, maar die eiwitten waarin de onderzoeker geïnteresseerd is – in dit geval dus NER-eiwitten. Deze antilichamen kunnen op hun beurt voorzien worden van een lichtgevend label (vandaar ‘fluorescentie’). Dit label kun je zien als de cel onder de microscoop wordt gelegd en zo kan het gedrag van de eiwitten worden bestudeerd.

In **hoofdstuk 6** is immunofluorescentie gebruikt om de volgorde te bepalen waarin verschillende NER-eiwitten naar de schade toegaan. Om dit mogelijk te maken hebben we een methode ontwikkeld om NER en andere processen die met UV-schades te maken hebben te bestuderen. Dit is een elegante en eenvoudige methode waarin de cellen, die groeien op een klein dun glaasje, worden bedekt met een dun filter van polycarbonaat (dat normaal wordt gebruikt om oplossingen te filteren) met kleine gaatjes die een klein deel van de cel, en dus ook de kern, onbedekt laten. Als de cellen met UV worden bestraald, blokkeert het polycarbonaat het UV zodat de celkernen (en dus het DNA) alleen aan UV worden blootgesteld direct onder de gaatjes. Deze methode wordt daarom meestal ‘lokale bestraling’ genoemd; een schematische weergave ervan is te vinden in hoofdstuk 8, figuur 5. Processen die reageren op de UV-lesies vinden nu specifiek plaats in deze ‘spots’ en kunnen zichtbaar gemaakt worden met bijvoorbeeld immunofluorescentie. XPC bleek naar DNA-schades te gaan in cellen waarin XPA niet aanwezig was (deze cellen waren afkomstig van XP-patienten), maar vice versa ging XPA niet naar schades als XPC niet aanwezig was: XPC bevindt zich dus vóór XPA in globaal genoomherstel. Op een soortgelijke manier werd vastgesteld dat XPA en XPG elkaar niet beïnvloedden, terwijl we tenslotte vonden dat ERCC1-XPF zich na XPA naar de schade begaf.

Hoofdstuk 7 beschrijft in meer detail de bovenstaande methode van ‘lokale bestraling’. In dit hoofdstuk is de methode verder gebruikt om de relatie te bestuderen tussen UV-bestraling en de bovengenoemde remming van transcriptie. We zagen dat de remming beperkt bleef tot die delen van de celkern die UV-lesies bevatten, terwijl in de rest van de kern transcriptie op het normale niveau bleef. Onze conclusie was dat het signaal voor het reduceren van transcriptie niet werd overgebracht door een factor die vrij door de hele kern kan bewegen, zoals TFIIH (dat een kandidaat was voor deze rol).

Een techniek die veel gebruikt wordt in het onderzoek van levende cellen is om de eiwitten waarin men geïnteresseerd is te koppelen aan het zgn. groen fluorescerend eiwit (GFP is de Engelse afkorting hiervan). Dit zorgt ervoor dat dit eiwit gevuld kan worden in levende cellen met behulp van een gevoelige fluorescentiemicroscoop – de cellen hoeven dus niet zoals bij immunofluorescentie eerst gefixeerd te worden. In **hoofdstuk 8** wordt het gedrag van een specifiek aan GFP gekoppeld NER-eiwit, XPA, beschreven. Door zijn diffusiesnelheid – de snelheid waarmee het door de cel beweegt – te meten kon worden bepaald dat XPA door de kern bewoog zonder zich in een groot eiwitcomplex te bevinden (zoals bijv. een ‘repairoosoom’, d.w.z. een complex van alle NER-eiwitten). Dit was extra bewijs voor het model dat is beschreven in hoofdstuk 2, waarin de NER-eiwitten zich een voor een naar de lesie begeven. Ook vonden we dat na de ‘lokale’ UV-bestraling RPA in het NER-complex kon worden opgenomen in afwezigheid

van XPA, wat een aantal oudere publicaties weerlegde, die claimden dat XPA zich in een complex bevondt met RPA.

Het eiwit UV-DDB lijkt slechts noodzakelijk te zijn voor het herstel van één type DNA-lesie, de CPD; alle andere lesies kunnen onafhankelijk van UV-DDB worden hersteld na herkenning door XPC-hHR23B. Ook het herstel van 6-4PP leek lange tijd niet beïnvloed te worden door de aan- of afwezigheid van UV-DDB. Dit was raadselachtig, omdat UV-DDB een hogere affiniteit voor 6-4PP heeft dan voor CPD – de affiniteit waarmee een schade-herkennend eiwit aan een lesie bindt hangt meestal samen met de snelheid van herstel ervan. Zoals beschreven in **hoofdstuk 9** konden we middels het gebruik van een aantal methoden laten zien dat UV-DDB wel degelijk een grote invloed kan hebben op het herstel van 6-4PP. Omdat UV-DDB de opmerkelijke eigenschap heeft te worden afgebroken tijdens herstel was het effect echter beperkt tot een klein aantal lesies. Als een kleine hoeveelheid 6-4PP werd geïnduceerd werd hun herstel sterk versneld door de aanwezigheid van UV-DDB; boven een bepaalde ‘drempel’ echter verdween dit effect. In dat geval werd herstel onafhankelijk van UV-DDB voortgezet omdat zoals gezegd 6-4PP, in tegenstelling tot CPD, door XPC kunnen worden herkend en vervolgens hersteld.

Volgens *in vitro* onderzoek zijn de DNA polymerases delta en epsilon en DNA ligase I betrokken bij de laatste twee stappen van NER: het synthetiseren van DNA in het gat dat overblijft na het verwijderen van het beschadigde stuk DNA, en het vastmaken van het nieuwe aan het oude stuk DNA. In **hoofdstuk 10** presenteren we, na gebruik te hebben gemaakt van de lokale bestraling en immunofluorescentie, sterke aanwijzingen dat dit inderdaad het geval is *in vivo*, omdat zowel DNA polymerases delta als epsilon en DNA ligase I zich ophoorden op de plaatsen van UV-schade. Door cellen twee keer met UV te bestralen, een keer de gehele cel en een keer ‘lokale’ bestraling, konden we bepalen of eiwitten gebonden bleven aan het NER-complex op de lesie of niet. We vonden onder andere dat alle eiwitten die betrokken zijn bij de stappen in NER tot en met de dubbele knip, na deze knippen uit het complex verdwenen voordat de volgende eiwitten (PCNA, RF-C, enz.) werden aangetrokken. De enige uitzondering hierop was RPA, dat wel gebonden bleef, waarschijnlijk om het stuk enkelstrengs DNA te beschermen en tegelijk te helpen PCNA aan te trekken. Aan de andere kant vonden we dat als de dubbele knippen niet konden plaatsvinden de eiwitten stevig aan het complex gebonden bleven, en dat de eiwitten betrokken bij de laatste stappen van NER niet naar het complex gingen.