



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Regulation of DNA damage and immune response pathways by post-translational protein modification

Dijk, M.

Citation

Dijk, M. (2020, September 9). *Regulation of DNA damage and immune response pathways by post-translational protein modification*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/136522>

Version: 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/1887/136522>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/136522> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Dijk, M.

Title: Regulation of DNA damage and immune response pathways by post-translational protein modification

Issue Date: 2020-09-09

Samenvatting

De cellen in ons lichaam worden continu uitgedaagd door allerlei interne bedreigingen en schadelijke invloeden van buitenaf. Als hier niet op een goede manier mee wordt omgegaan, worden mogelijk kritieke processen verstoord en kan dit zelfs tot ziekte leiden. Onze cellen zijn daarom sterk afhankelijk van een aantal mechanismen die ze beschermen tegen mogelijke gevaren. De fysieke barrières en biochemische signaleringsroutes van het immuunsysteem vormen bijvoorbeeld een belangrijke eerste verdediging tegen pathogenen, die gastheercellen proberen binnen te dringen en zo ernstige aandoeningen kunnen veroorzaken. Het uitgebreide netwerk van de DNA-schaderespons draagt anderzijds de verantwoordelijkheid voor het opsporen en repareren van beschadigde nucleotiden in het DNA, die het ontstaan van mutaties kunnen bevorderen en bijdragen aan de ontwikkeling van erfelijke of ouderdom-gerelateerde ziektes. Het is natuurlijk cruciaal dat de processen die onderdeel uitmaken van dergelijke mechanismen correct worden geactiveerd en uitgevoerd. Hiertoe is het belangrijk dat eiwitten met de gewenste functionaliteit op het juiste moment op de juiste plaats zijn. Bovendien moet er onderling goed gecommuniceerd worden. Afgezien van het reguleren van de productie van de benodigde eiwitten, wordt dit grotendeels mogelijk gemaakt door zogenaamde post-translationele modificaties (PTM's): een verscheidenheid aan chemische aanpassingen die de activiteit, lokalisatie en interacties van bestaande eiwitten verder verfijnen. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift is gericht op de rol en het belang van PTM's in de mechanismen die onze cellen beschermen. De achtergrond van deze studie wordt uitgebreid beschreven in hoofdstuk 1.

Een belangrijke strategie om het gedrag van eiwitten tijdens de DNA-schaderespons te coördineren is het koppelen en ontkoppelen van functionele groepen. Wanneer meerdere van zulke (typen) PTM's gecombineerd worden, kunnen ze elkaars effect versterken of juist tegenwerken. Alleen door ze perfect op elkaar af te stemmen, wordt dus gezorgd voor het optimaal functioneren van eiwitten en processen.

Zo'n veelgebruikte modificatie is het koppelen van een klein regulerend eiwit genaamd ubiquitine. Deze koppelingsreactie wordt vaak gestimuleerd door een eiwitcomplex uit de familie van cullin-RING ligases (CRL's). Voor twee van zulke CRL's is een belangrijke rol weggelegd tijdens nucleotide-excisieherstel (nucleotide excision repair, NER) – een uiterst belangrijk mechanisme dat ons tegen bepaalde vormen van DNA-schade beschermt. In de mens is dit zelfs het enige proces waarmee de gevaarlijke verbindingen tussen aangrenzende pyrimidines in het DNA, die door zonlicht kunnen worden toegebracht, verwijderd kunnen worden. In de subroute van NER die werkzaam is op al ons DNA, speelt de CRL die is opgebouwd met het eiwit DDB2 (CRL^{DDB2}) een grote rol in het opsporen van beschadigingen. Zolang niet nodig wordt de ubiquitine-koppelingsfunctionaliteit van dit complex inactief gehouden. Echter, in reactie op DNA-schade leidt de activering van CRL^{DDB2} ertoe dat verschillende doeleiwitten worden gemodificeerd met ubiquitine. Dit draagt bij aan het afstemmen van het gedrag van deze eiwitten op een efficiënte reparatie van de schade. Een CRL met een vergelijkbare structuur, maar opgebouwd met CSA in plaats van DDB2 (CRL^{CSA}), is onmisbaar in de andere subroute van NER, die specifiek beschadigingen herstelt in DNA

dat actief wordt uitgelezen door RNA-polymerase. Wanneer RNA-polymerase bezig is het DNA te vertalen naar RNA, maar tijdens dit proces (de transcriptie) vastloopt bij schade, wordt CRL^{CSA} als een van de eerste complexen aangetrokken. Een interessant gegeven is dat de ubiquitine-koppelingsactiviteit van CRL's op haar beurt afhankelijk is van een andere modificatie, namelijk de koppeling van het ubiquitine-achtige eiwit NEDD8. Zoals beschreven in hoofdstuk 2, blijkt deze NEDD8-modificatie niet alleen de CRL te activeren, maar ook invloed uit te oefenen op de interactie tussen CRL^{CSA} en RNA-polymerase. Het verhinderen van de NEDD8-koppeling zorgt namelijk voor een verhoogde binding van de CRL^{CSA}-eiwitten aan de polymerase. Daarnaast blijkt zowel deze NEDD8-modificatie in het algemeen als de aanwezigheid van CSA belangrijk te zijn voor de afbraak van RNA-polymerase, die kan optreden onder invloed van UV-straling. Deze manier om vastgelopen RNA-polymerase te verwijderen lijkt een laatste redmiddel om geprogrammeerde celdood tegen te gaan wanneer NER niet goed uitgevoerd kan worden en RNA-polymerase te lang blijft stilstaan. Mogelijk speelt dit mechanisme een rol in het voorkomen van de neurologische ontwikkelingsproblemen die kenmerkend zijn voor Cockayne syndroom, dat onder andere veroorzaakt kan worden door een CSA-tekort als gevolg van mutaties in het CSA-gen.

Om voldoende functioneel CSA, en dus CRL^{CSA}, te garanderen, is niet alleen de integriteit van het CSA-gen, maar ook de stabiliteit van het eiwit essentieel. In hoofdstuk 3 onthullen we een cruciale rol voor het chaperonne-complex genaamd TRiC in het reguleren van de CSA-stabiliteit en -lokalisatie, alsook in de opbouw van CRL^{CSA}. TRiC maakt deel uit van het netwerk dat de totale eiwitbalans waarborgt en faciliteert hiertoe de vouwing van vele eiwitten. TRiC blijkt ook CSA te stabiliseren en daarmee onmisbaar te zijn voor het goed functioneren van CRL^{CSA} in transcriptie-gekoppeld NER en wellicht ook voor andere processen (van de DNA-schaderespons). Een aantal zogeheten missense-mutaties in het CSA-gen, die in verband zijn gebracht met Cockayne syndroom, leiden bovendien tot een verhoogde binding van het gemuteerde eiwit aan TRiC. Mogelijk verklaart dit (deels) hoe zulke mutaties bijdragen aan de ontwikkeling van deze ziekte.

Naast de modificaties door ubiquitine en NEDD8, speelt ook de koppeling van het ubiquitine-achtige eiwit SUMO een belangrijke rol in de detectie en reparatie van DNA-schade, evenals in de signaaluitwisseling met andere processen. Dankzij een goed-geconserveerd katalytisch domein, treden de PIAS-eiwitten op als SUMO-koppelaars in vele verschillende (DNA-schaderespons)routes. In hoofdstuk 4 tonen we aan dat het SP-RING-achtige domein van Zimp7, dat erg op dit katalytische domein in de PIAS-eiwitten lijkt, eveneens ware SUMO-koppelingsactiviteit kan bieden. Aangezien Zimp7 ook blijkt te worden aangetrokken naar plaatsen van DNA-schade is deze SUMO-koppelaar wellicht een belangrijke factor in de DNA-schaderespons. Daarnaast wijst de interactie met PCNA, dat als het ware een bindingsplatform voor DNA polymerase en andere eiwitten op het DNA vormt, op een mogelijke rol voor Zimp7 in het proces waarin DNA gekopieerd wordt (de replicatie). De precieze biologische functies van Zimp7 moeten nog verder ontrafeld worden. Deze kunnen afhankelijk zijn van de ontdekte SUMO-koppelingsactiviteit, maar ook gebaseerd zijn op de eigenschap DNA-transcriptie te kunnen stimuleren. De huidige kennis doet

vermoeden dat Zimp7 breed verwickeld is in de processen die het juist functioneren van cellen moeten veiligstellen.

Waar de DNA-schaderespons vooral gebruik maakt van het koppelen en ontkoppelen van functionele groepen, worden de routes en eiwitten van het immuunsysteem vaak gereguleerd door middel van het (af)knippen van kleine stukjes eiwit. Deze PTM wordt veelal ingezet om de zogenaamde protease-functionaliteit van een eiwit te activeren, zodat dit weer een volgend eiwit kan knippen. Zo'n aaneenschakeling van protease-activeringen zorgt ervoor dat een signaal in korte tijd opgeschaald kan worden tot een enorme reactie. Hoewel dit een snelle eliminatie van ziekteverwekkers mogelijk maakt, kan zowel het gebrekkig als het onevenredig vaak starten van een dergelijk proces ernstige gevolgen hebben. C1-inhibitor (C1-esteraseremmer) reguleert verschillende routes van het immuunsysteem door de vouwing van de eiwitten die zo'n kettingreactie initiëren dusdanig te veranderen dat de protease-activiteit niet spontaan geactiveerd kan worden. De activiteit van deze remmer zelf kan worden verhoogd door de interactie met lange ketens van disacchariden, beter bekend als glycosaminoglycanen (GAG's). Ons model, getoond in hoofdstuk 5, verklaart waarom zo'n GAG de remmende werking van C1-inhibitor op specifieke, maar niet alle proteasen, kan bevorderen. Waarschijnlijk neutraliseert een negatief geladen GAG de afstotende krachten tussen C1-inhibitor en een bepaalde lus in de protease. Tussenkost van zo'n saccharideketen lijkt dan ook alleen een stimulerend effect te hebben op C1-inhibitor's activiteit wanneer deze gericht is tegen een protease met een positief geladen lus. Het optimaliseren van de remmende werking van C1-inhibitor op de verschillende proteasen, lijkt een goede manier om de huidige behandeling van hereditair angio-oedeem door het toedienen van gezuiverd C1-inhibitor te verbeteren. Deze aandoening wordt gekenmerkt door terugkerende aanvallen van mogelijk levensbedreigende zwellingen die in het hele lichaam kunnen ontstaan. De onderliggende ongecontroleerde reactie van het immuunsysteem wordt veroorzaakt door een tekort aan functioneel C1-inhibitor, wat nogmaals het belang van een regulerend eiwit in ziekte en gezondheid benadrukt.

De in dit proefschrift beschreven manieren van eiwitregulatie zijn slechts een kleine selectie uit het brede repertoire van modificaties die door onze cellen worden ingezet. Stuk voor stuk leveren ze echter een onmisbare bijdrage aan de weerbaarheid tegen interne en externe dreigingen. In hoofdstuk 6 wordt uiteengezet hoe ons onderzoek de kennis op dit gebied vergroot en aanknopingspunten biedt voor vervolgstudies. Samen ondersteunen de bevindingen ons begrip, en uiteindelijk ook de behandeling of de preventie, van de vele aandoeningen die in verband staan met het verlies van eiwitregulatie in de processen die onze cellen beschermen.