



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Unravelling molecular mechanisms in transcription-coupled nucleotide excision repair

Weegen, Y. van der

Citation

Weegen, Y. van der. (2022, February 17). *Unravelling molecular mechanisms in transcription-coupled nucleotide excision repair*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3275039>

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/1887/3275039>

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

Samenvatting

Het DNA in ons lichaam wordt voortdurend blootgesteld aan allerlei bronnen die het DNA kunnen beschadigen, zoals UV-straling van de zon. Het is van groot belang dat deze beschadigingen opgeruimd worden omdat ze essentiële processen, zoals het dupliceren van DNA (replicatie) en het overschrijven van genetische informatie van DNA naar RNA (transcriptie), kunnen verstoren. Verstoringen in replicatie en transcriptie kunnen tot ziektes leiden, maar gelukkig beschikken onze cellen over verschillende DNA-reparatie systemen die de beschadigingen aan het DNA kunnen herstellen waardoor nadelige effecten worden voorkomen. Eén van deze DNA-reparatie systemen, genaamd transcriptie-gekoppelde reparatie (TCR), verwijdert specifiek beschadigingen die het afschrijven van DNA tijdens transcriptie verstoren. TCR wordt gestart wanneer het eiwitcomplex dat transcriptie uitvoert, genaamd RNA-polymerase II (RNAPII), vastloopt en klem komt te zitten op een DNA-beschadiging. Een vastgelopen RNAPII is een forse blokkade en zit het dupliceren van DNA en het verder afschrijven van genen flink in de weg.

Mutaties in genen die coderen voor TCR-eiwitten leiden tot Cockayne-syndroom (CS) of UV-sensitief syndroom (UV^S). CS is een ernstige neurodegeneratieve aandoening met een lage levensverwachting, terwijl UV^S wordt gekenmerkt door milde gevoeligheid voor UV licht zonder verdere neurologische symptomen. In **hoofdstuk 1** wordt recente literatuur samengevat over hoe DNA-beschadigingen die transcriptie blokkeren worden opgeruimd door TCR. Ook stellen we in dit hoofdstuk een model voor dat een mogelijke verklaring geeft voor de opvallende verschillende klinische kenmerken die veroorzaakt worden door aangeboren genetische defecten in TCR-genen.

Het is al geruime tijd bekend dat de TCR-eiwitten, CSB, CSA en UVSSA, binden aan vastgelopen RNAPII en essentieel zijn voor het repareren van DNA-beschadigingen tijdens transcriptie. Echter, hoe de wisselwerking tussen deze eiwitten ervoor zorgt dat DNA-reparatie plaatsvindt was tot nu toe onduidelijk. In **hoofdstuk 2**, hebben we een systematische aanpak gebruikt om het moleculaire mechanisme van de opbouw van het TCR-complex in menselijke cellen te ontrafelen. We laten zien dat CSB een C-terminaal CSA-interactiemotief (CIM) bevat dat direct bindt aan CSA en zorgt voor het aantrekken van CSA naar vastgelopen RNAPII. Eenmaal gebonden, trekt CSA het UVSSA-eiwit aan door een interactie aan te gaan met het CSA-interactie gebied (CIR) in UVSSA. Vervolgens bindt het TFIIH-complex aan vastgelopen RNAPII via directe eiwit-eiwit interacties met het TFIIH-interactie gebied (TIR) in UVSSA. Een belangrijke vinding is dat de TCR-eiwitten op een zeer coöperatieve manier binden aan RNAPII waarbij de interactie tussen CSA en UVSSA wordt gestabiliseerd door CSB en de interactie tussen UVSSA en het TFIIH-complex wordt gestabiliseerd door CSA.

Recente studies hebben aangetoond dat naast directe eiwit-eiwit interacties ook het modifieren van RNAPII met het kleine eiwit ubiquitine - de zogeheten

ubiquitylatie - essentieel is voor de opbouw van het TCR-complex. De ubiquitylatie van RNAPII vindt plaats op een enkel lysine residue (K1268) van de grootste subunit (RPB1) van het RNAPII-complex. Deze RNAPII ubiquitylatie is niet nodig voor het binden van CSB en CSA aan RNAPII, maar het versterkt wel de interactie tussen UVSSA en RNAPII, mogelijk omdat UVSSA bij voorkeur bindt aan de geubiquityleerde vorm van RNAPII. Naast RNAPII, wordt ook UVSSA geubiquityleerd als reactie op DNA-schade en lijkt deze modificatie nodig voor het optimaal binden van TFIIF aan RNAPII. Het CSA-eiwit is onderdeel van een ubiquitine ligase complex genaamd CRL4^{CSA} dat de ubiquitylatie van RNAPII uitvoert. Het CSB-eiwit bindt aan de achterzijde van RNAPII en trekt vervolgens het CRL4^{CSA} complex aan. Het CRL4^{CSA} complex is erg flexibel en heeft de vorm van een hijskraan. Hoe deze ronddraaiende hijskraan bovenop RNAPII specifiek de K1268-site raakt aan de voorzijde van RNAPII is onbekend. In **hoofdstuk 3**, hebben we aangetoond dat het niet eerder gekarakteriseerde ELOF1-eiwit de kraandrijver is die RNAPII ubiquitylatie stimuleert door de ubiquitine ligase activiteit van het CRL4^{CSA} complex in de buurt van de K1268-site te brengen. Onze resultaten laten zien dat ELOF1 een transcriptie elongatie factor is die ook zonder DNA-schade gebonden is aan RNAPII in de buurt van de K1268-site. Ook al is ELOF1 al gebonden aan RNAPII voordat RNAPII vastloopt op een beschadiging, is ELOF1 niet nodig voor het aantrekken van CSB en het CRL4^{CSA} complex naar RNAPII. Een belangrijke vinding is dat ELOF1 rechtstreeks aan het CRL4^{CSA} complex bindt en de ubiquitine ligase activiteit van dit complex in de buurt van de K1268-site brengt, zodat het CRL4^{CSA} complex RNAPII kan ubiquityleren. Daarnaast laten we zien dat ELOF1 niet alleen belangrijk is voor TCR, maar dat dit eiwit ook een rol heeft in een TCR-onafhankelijk mechanisme dat cellen beschermt tegen DNA-schade tijdens replicatie. Hoewel het onduidelijk is hoe dit precies werkt, lijkt het erop dat dit mechanisme extra belangrijk wordt wanneer cellen niet in staat blijken om DNA beschadigen tijdens transcriptie te herstellen.

Ook al weten we dat de ubiquitylatie van TCR-eiwitten door het CRL4^{CSA} complex belangrijk is tijdens DNA-reparatie, we hebben momenteel een onvolledig beeld van alle relevante substraten van het CRL4^{CSA} complex. Een technisch probleem bij hun identificatie is dat substraten vaak kortdurend en zwak binden aan ubiquitine ligase complexen, terwijl reguliere immunoprecipitatie technieken juist afhankelijk zijn van relatief sterke eiwit-eiwitinteracties en vaak niet geschikt zijn om kortdurende interacties te detecteren. In **hoofdstuk 4**, hebben we een proximity-afhankelijke biotine identificatie (BioID) methode opgezet om eiwitten te identificeren die na de inductie van DNA-schade in de nabijheid zijn van CSA. Het idee is dat we hiermee ook kortdurende interacties, zoals die met potentiële substraten van het CRL4^{CSA} complex, kunnen vangen. Met behulp van BioID vonden we eiwitten waarvan al bekend was dat ze met CSA interacteerde, zoals UVSSA en het TFIIF-complex. Daarnaast vonden we ook een aantal nieuwe eiwitten die na DNA-schade in de buurt van CSA komen zoals het chromodomain Y-like protein (CDYL) en HIV Tat-specific factor 1 (HTATSF1). Vervolgonderzoek zal moeten uitwijzen of deze eiwitten een functie hebben in TCR.

In **hoofdstuk 5**, het laatste hoofdstuk van dit proefschrift, geven we een overzicht van hoe cellen reageren op verschillende type botsingen tussen de transcriptie machinerie en replicatie machinerie. Met name bespreken we hoe dit soort botsingen plaats kunnen vinden in CSB-en ELOF1-deficiënte cellen en

speculeren we over de CSB-onafhankelijke functie van ELOF1. Daarnaast geven we de richting aan voor toekomstig onderzoek om de rol van ELOF1 en de link tussen transcriptiestress en replicatiestress beter te begrijpen.