



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Nucleotide excision repair: from molecular mechanisms to patient phenotypes

Apelt, K.

Citation

Apelt, K. (2022, April 13). *Nucleotide excision repair: from molecular mechanisms to patient phenotypes*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3283552>

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/1887/3283552>

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

Samenvatting

Ons lichaam bestaat uit meer dan 37 biljoen cellen. Elke cel bevat vervolgens weer zes miljard basenparen DNA. In dit DNA staat de belangrijke genetische informatie die als bouwplan voor de opbouw van de cellen dient. Voor de cel is het van groot belang om deze genetische informatie te waarborgen. Beschadigingen aan het DNA kunnen namelijk leiden tot het verlies van informatie of in het uiterste geval tot celdood. Beschadigingen kunnen afkomstig zijn van zonlicht, milieu- en voedingsgerelateerde stoffen, evenals lichaamseigen metaboliëten. Het repareren van deze beschadigingen is van groot belang, omdat deze zich anders ophopen en tot het ontstaan van ziektes kunnen leiden.

Per dag leidt zonlicht, met name het UV-licht, tot meer dan 100.000 DNA beschadigingen in elke cel. De twee meest voorkomende UV-geïnduceerde beschadigingen worden cyclobutane pyrimidine dimeren (CPD) en 6-4 pyrimidine-pyrimidone fotoproducten (6-4PP) genoemd. Beide hinderlijke DNA-beschadigingen worden gerepareerd via een reparatiemechanisme genaamd nucleotide excisie reparatie (NER). In de eerste stap van NER worden de beschadigingen herkend. Tijdens NER zijn hier twee verschillende manieren voor waarbij onderscheid wordt gemaakt tussen DNA dat actief wordt afgelezen (TC-NER) en DNA dat op dat moment niet wordt afgelezen (GG-NER). De essentiële factoren die nodig zijn voor NER zijn al in kaart gebracht. Met gezuiverde versies van deze essentiële factoren kan de NER reactie in de reageerbuis worden uitgevoerd op naakt DNA. De cel is echter ingewikkelder dan naakt DNA in een reageerbuis. Er zijn dan ook zogenoemde regulatoire factoren die een belangrijke rol spelen bij het goed laten verlopen van het reparatieproces in de levende cel, waar het DNA strak is opgerold in een compacte structuur genaamd chromatine DNA. In dit proefschrift beschrijven we een aantal regulatoire factoren en bestuderen we welke rol ze hebben in NER. Dit helpt om uiteindelijk een beter begrip te krijgen van de gebeurtenissen die plaatsvinden tijdens de fase van schadeherkenning in NER.

In hoofdstuk 1 geven we een overzicht van hoe NER markeringen in het chromatine achterlaat om het herkennen van DNA-beschadigingen in compact DNA mogelijk te maken. Tijdens GG-NER spelen de essentiële factoren XPC en DDB2 een belangrijke rol bij het herkennen van UV-geïnduceerde DNA-beschadigingen. Het DNA in menselijke cellen is ongeveer twee meter lang. Door het DNA om zogenoemde histonen te wikkelen, wordt het DNA compacter. Het voordeel hiervan is dat het

DNA minder ruimte nodig heeft. Tegelijkertijd is het nadeel dat het DNA minder toegankelijk is voor reparatiefactoren. Om de reparatie alsnog efficiënt te laten verlopen, spelen regulatoire factoren een belangrijke rol door bijvoorbeeld een stukje chromatine uit te pakken. Een recent inzicht is dat het samenspel tussen XPC en DDB2 gereguleerd wordt door markeringen (post-translationele modificaties) op de factoren zelf, of aan het chromatine met de DNA beschadigingen. Juist het samenspel tussen XPC en DDB2 met regulatoire factoren zorgt voor een efficiënte schadeherkenning in het DNA. Dit is tegelijk noodzakelijk voor het rekruteren van andere DNA reparatiefactoren.

In hoofdstuk 2 wordt een moleculair markeringsysteem omschreven dat de grondslag legt voor het efficiënt repareren van CPD's. Hoewel de NER-factor XPC zeer efficiënt aan UV schades van het type 6-4PP bindt, herkent het nauwelijks het andere type genaamd CPD's. Wij hebben gevonden dat XPC aan de twee regulatoire factoren met de namen PARP1 en PARP2 bindt. In het algemeen is bekend dat de twee PARPs aan DNA kunnen binden en daar een specifieke modificatie achterlaten die we PARylatie noemen. Deze PAR-modificatie is een specifiek soort suiker met een negatieve lading die aan elkaar geschakeld kan worden en zo lange ketens vormt waar dan specifieke eiwitten aan kunnen binden. Wij hebben ontdekt dat op de plek van UV-beschadigingen PARylatie plaatsvindt. Het blijkt dat in dit proces XPC een belangrijke rol speelt en dat bovendien ook XPC zelf gePARyleerd wordt na UV bestraling. Deze XPC-afhankelijke PARylatie zorgt ervoor dat een derde regulatoire factor, ALC1, naar de DNA beschadigingen gerekruteerd wordt door te binden aan de lange aan elkaar geschakelde PAR ketens. ALC1 is een bekende moleculaire motor die in staat is compact chromatine te ontvouwen om het DNA toegankelijk te maken. Zo hebben wij laten zien dat PARP2 en ALC1 allebei essentieel zijn voor het repareren van CPD's.

In hoofdstuk 3 en 4 hebben we een mogelijke rol van regulatoire factoren die behoren tot de high-mobility group (HMG) eiwitten HMGA, HMGB en HMGN in NER onderzocht. Het repareren van UV beschadigingen in compact DNA is een uitdaging voor de cel. Factoren die het DNA minder compact maken, zorgen ervoor dat de NER-factoren toegang krijgen tot de DNA beschadigingen. In het algemeen is bekend dat HMG-factoren deze functie kunnen uitoefenen. Daarom zijn dit interessante factoren om te bestuderen.

In hoofdstuk 3 is de rol van de HMGN in menselijke cellen onderzocht. Tot nu hebben alleen studies in muizen laten zien dat HMGN een belangrijke rol speelt in TC-NER. Of het een dergelijke rol ook in menselijke cellen heeft, was tot dusver niet duidelijk. We zijn begonnen om te onderzoeken of HMGN essentieel is in humaan TC-NER. Tot onze

verrassing bleek HMGN in menselijke cellen geen rol te hebben in TC-NER. Ook laten onze resultaten zien dat humaan HMGN niet op plekken van UV beschadigingen lokaliseert, maar juist verdwijnt. Het verschil in de rol van HMGN tussen muizen en menselijke cellen zou veroorzaakt kunnen worden door soort-specifieke genetische aanpassingen.

In hoofdstuk 4 hebben we in kaart gebracht welke factoren binden of juist loslaten van chromatine na bestraling met UV-licht. Daarbij hebben we onder andere gevonden dat HMGN- en HMGA-eiwitten loslaten, terwijl HMGB juist bindt aan door UV-licht beschadigd chromatine. Omdat HMGB bindt aan chromatine na UV-bestraling, net zoals NER-factoren dat doen, hebben we ons hierna voornamelijk gericht op dit type HMG-eiwit. HMGB komt in vier verschillende vormen voor: HMGB1, HMGB2, HMGB3 en HMGB4. Ons onderzoek laat zien dat alle vier de vormen van HMGB binden aan UV-beschadigingen. Om in de toekomst te kunnen onderzoeken of en welke HMGB-eiwitten een rol spelen in NER, hebben we een methode opgezet waarbij elke HMGB-vorm individueel te verwijderen is uit de cel. Deze nieuwe methode kan als basis gebruikt worden om de relevantie van HMGB-factoren in NER beter te begrijpen.

In hoofdstuk 5 beschrijven we twee patiënten van 11 jaar en 13 jaar oud met mutaties in het belangrijke NER-gen ERCC1 die een uniek fenotype hebben met fotogevoeligheid en zware nier- en leverproblemen. In de literatuur waren al twee eerdere patiënten met ERCC1 mutaties beschreven: weliswaar zonder nier- en leverproblemen, maar juist met neurodegeneratie. Beide patiënten zijn vroeg overleden (1-2 jaar). Vanwegen dit verschil in het klinische beeld wilden we meer te weten komen over de consequenties van de mutatie in de patiënten. ERCC1 vormt samen met XPF een belangrijk onderdeel van verschillende DNA-reparatiemechanismen: NER en een tweede mechanisme dat interstrengs crosslinks - verbindingen tussen de twee DNA strenggen - opruimt. In deze reparatiemechanismen functioneert ERCC1-XPF als een soort schaar dat het DNA rondom de DNA-beschadigingen knipt. De patiënten hebben twee verschillende mutaties. Op één allel hebben ze een deletie en op het andere allel is er één verandering van een aminozuur (R156W) in het ERCC1-gen. De R156W-mutatie bevindt zich in de buurt van een belangrijk domein dat verantwoordelijk is voor de binding van de NER-factor XPA. Door de R156W-mutatie wordt de interactie tussen XPA en ERCC1 sterk verzwakt. Bij het onderzoeken van huidcellen van de patiënten hebben we opgemerkt dat de hoeveelheid ERCC1 en XPF sterk verlaagd is. Samengevat zagen we dat de ERCC1-R156W mutatie leidt tot een sterk defect in NER gecombineerd met een matig defect in het repareren van interstrengs crosslinks. We denken dat dit gecombineerde DNA-reparatiedefect leidt tot een nieuw ziektebeeld met een klein gestalte,

Samenvatting

fotogevoeligheid en nier- en leverproblemen.

In hoofdstuk 6 worden alle wetenschappelijke bevindingen uit dit proefschrift in een bredere context besproken. Dit biedt vervolgens weer nieuwe aanknopingspunten voor discussie. Samengevat zorgt dit proefschrift voor meer kennis over het netwerk van regulatoire factoren in NER. Bovendien beschrijven we een nieuwe ERCC1 mutatie die tot lever- en nierproblemen leidt. Door het publiceren van onze bevindingen willen we dit unieke ziektebeeld onder de aandacht brengen.