



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).

Zusammenfassung

Unser menschlicher Körper besteht aus über 37 Billion Zellen und jede einzelne Zelle enthält unsere DNA, die wiederum sechs Milliarden Basenpaare umfasst. Die DNA ist unsere Erbinformation und dient als Bauplan für die Zellen. Ihre höchste Priorität ist es, die genetische Information sowohl vor körpereigenen als auch vor körperfremden Stoffen, die die DNA schädigen könnten, zu beschützen. Sonnenlicht, Schadstoffe in der Umwelt oder Nahrung sowie körpereigene Metaboliten können zu Veränderungen an der DNA führen und sie somit schädigen. Diese DNA Schäden müssen behoben werden, da Anhäufungen davon Krankheiten verursachen.

Sonnenlicht, genauer gesagt UV-Licht, führt zu mehr als 100.000 DNA-Schäden in jeder Zelle pro Tag. Die am meisten vorkommenden UV-induzierten Schäden werden Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer (CPD) und 6-4-Pyrimidin-Pyrimidon-Photoprodukte (6-4PP) genannt. Beide DNA-Schäden werden mit dem Reparaturmechanismus Nukleotidexzisionsreparatur (NER) repariert. Für den kompletten Reparaturmechanismus werden verschiedene Schritte durchlaufen. Als erstes muss der DNA-Schaden erkannt werden. NER unterscheidet dabei zwischen DNA-Schäden in aktiven Genen (TC-NER) und in allen anderen Genen (GG-NER). Nachdem der DNA-Schaden erkannt ist, wird er aus der DNA herausgeschnitten. Anschließend wird die dadurch entstandene Lücke, mit den richtigen DNA-Basen aufgefüllt. Dieser Reparaturmechanismus umfasst neben essentiellen Proteinen auch Unterstützungsproteine. Die aktuelle Forschung zeigt, dass diese bei der Optimierung des Reparaturmechanismus eine wichtige Rolle spielen. Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden einige dieser Unterstützungsproteine untersucht und erforscht, welche Funktion sie im Reparaturmechanismus NER einnehmen. Diese Erkenntnisse sorgen für mehr Einsicht in die Schadenserkennungsprozesse, mit denen NER arbeitet.

In Kapitel 1 werden die verschiedenen Proteine, die bei GG-NER beteiligt sind, beschrieben. Besonders relevant für die Erkennung von DNA-Schäden sind hierbei die Proteine XPC und DDB2. Durch einen raffinierten Mechanismus können XPC und DDB2 die UV-induzierten DNA-Schäden CPD und 6-4PP gut erkennen. Dieser Prozess wird negativ beeinflusst, wenn die DNA stark komprimiert ist. Ein DNA-Strang misst ungefähr zwei Meter. Damit er in die menschliche Zelle passt, muss er komprimiert werden, deshalb ist er um sogenannte Histone geschnürt.

Das hat den Vorteil, dass die DNA weniger Platz einnimmt, andererseits hat es den Nachteil, dass Proteine die DNA schlechter ablesen können. Damit die Reparatur der DNA trotzdem effizient verläuft, sind Unterstützungsproteine notwendig. Das Zusammenspiel von XPC und DDB2 wird durch Markierungen (Posttranslationale Proteinmodifikationen (PTM)) reguliert. Diese befinden sich an den Proteinen selbst oder an dem Chromatin, das die beschädigte DNA enthält. Dieses sensible Zusammenspiel zwischen XPC, DDB2 und Unterstützungsproteinen sorgt für eine effiziente Schadenserkennung und ist gleichzeitig notwendig, um zusätzliche Proteine, die für die Reparatur der DNA notwendig sind, zu rekrutieren.

In Kapitel 2 wird ein molekulares Markierungssystem beschrieben, das für das Reparieren des UV-induzierten Schadens CPD relevant ist. Das NER-Protein XPC erkennt den UV-induzierten DNA-Schaden 6-4PP leicht; es hat jedoch Schwierigkeiten, CPDs zu identifizieren. Im Laufe des Forschungsprozesses wurde entdeckt, dass XPC an die zwei Unterstützungsproteine PARP1 und PARP2 bindet. Es ist bekannt, dass sich diese beiden PARPs an DNA binden und dort eine spezifische Markierung, PARylation genannt, anbringen. Ob dieser Mechanismus auch nach UV-Bestrahlung zum Einsatz kommt, war bislang noch unbekannt. Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wurde herausgefunden, dass DNA-Abschnitte, die mit UV-Licht bestrahlt wurden, anschließend PARylation aufweisen. Zudem hat sich gezeigt, dass bei diesem Vorgang XPC eine wichtige Rolle spielt und durch UV-Bestrahlung sogar selbst PARyliert wird. Die XPC abhängige PARylation sorgt dafür, dass ein drittes Protein, ALC1, zur Schadstelle rekrutiert wird. ALC1 ist ein bekanntes Protein, das die Doppelhelix der DNA trennen kann. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sowohl PARP2 als auch ALC1 Proteine sind, die fürs Reparieren von CPDs wichtig sind.

In Kapitel 3 und 4 wird auf die Unterstützungsproteine der High-Mobility-Group (HMG)A, HMGN und HMGB näher eingegangen. Das Reparieren von UV-Schäden in kompakter DNA ist eine große Herausforderung. Damit Reparaturproteine Zugang zu einer schadhafte DNA-Stelle erlangen, sind Proteine notwendig, die die DNA teilweise entpacken. In der Literatur ist beschrieben, dass HMG-Proteine diese Eigenschaft besitzen, weshalb sie Gegenstand weiterer Forschung sind.

In Kapitel 3 wird die Funktion, die HMGN in menschlichen Zellen einnehmen, untersucht. Bisher wurde nur in Experimenten an Mäusen gezeigt, dass das Unterstützungsprotein HMGN in dem Reparaturmechanismus TC-NER eine wichtige Rolle spielt. Ob dies auch beim Menschen der Fall ist, war bis dato noch unbekannt. Als Erstes wurde deshalb untersucht, ob HMGN auch beim Menschen ein

wesentlicher Bestandteil des TC-NER ist. Überraschenderweise ist dies nicht so: Nach UV-Bestrahlung bindet HMGN nicht mehr an DNA, sondern löst sich hingegen. Dieser funktionelle Unterschied zwischen Mäusen und Menschen lässt sich möglicherweise durch artspezifische genetische Differenzen erklären.

In Kapitel 4 wird analysiert, welche Proteine sich an UV-bestrahltes Chromatin binden bzw. sich von ihm lösen. Es stellte sich heraus, dass sich HMGN und HMGA von Chromatin lösen, HMGB sich hingegen daran bindet. Weil sich HMGB, genau wie NER-Proteine, an UV-bestrahlte DNA bindet, liegt der Fokus im Weiteren vor allem auf HMGB. HMGB kommt in vier unterschiedlichen Formen vor (HMGB1, HMGB2, HMGB3 und HMGB4) und alle vier Formen binden sich an UV-bestrahlte DNA. Um die Funktion jeder einzelnen HMGB-Form erforschen zu können, wurde eine Methode entwickelt, durch die jede Form einzeln aus einer Zelle entfernt werden kann. Diese Methode dient dazu, die Funktion, die HMGB im NER einnimmt, besser zu verstehen.

In Kapitel 5 werden zwei Patienten vorgestellt, die eine neuartige Mutation im Protein ERCC1 aufweisen. Bislang sind lediglich zwei weitere Patienten bekannt, bei denen eine Mutation im ERCC1 vorliegt. Bei beiden Patienten handelt es sich jedoch um eine andere Mutation, die auch ein anderes Krankheitsbild verursacht. Deshalb ist die Frage, welche Konsequenzen die neuartige Mutation für die betroffenen Patienten hat, besonders spannend. ERCC1 ist an drei DNA-Reparaturmechanismen beteiligt, darunter auch NER. Es arbeitet eng mit dem Protein XPF zusammen: Gemeinsam bilden sie eine Art Schere, die den DNA-Schaden ausschneidet. Die in diesem Kapitel beschriebenen Patienten haben zwei Mutationen innerhalb des ERCC1-Gens. Zum einen weist ein Allel eine Deletion auf und zum anderen liegt auf einem anderen Allel eine Veränderung einer Aminosäure (R156W) vor. Durch diese zweitgenannte Mutation ist die Interaktion zwischen XPA und ERCC1 stark geschwächt. Beim Untersuchen von Hautzellen der betroffenen Patienten stellte sich heraus, dass sie über eine wesentlich geringere Anzahl an ERCC1 und XPF verfügen, als dies bei gesunden Hautzellen der Fall ist. Interessanterweise schwächt diese neu entdeckte Mutation den Reparaturmechanismus NER stark; auf die anderen beiden Reparaturmechanismen hat sie jedoch nur einen geringen Einfluss. Insgesamt hat die Mutation ein neues Krankheitsbild zur Folge, das durch Nieren- und Leberprobleme charakterisiert wird.

In Kapitel 6 werden die wissenschaftlichen Erkenntnisse aus dieser Doktorarbeit zusammenfassend in einen größeren Kontext gestellt. Zudem wird ein Ausblick gegeben, welche Bereiche weiterer Forschung bedürfen. Die vorliegende Forschungsarbeit liefert einen tieferen Einblick

Zusammenfassung

in die Zusammenarbeit von Unterstützungsproteinen innerhalb des Reparaturmechanismus NER. Über dies wird eine neue ERCC1-Mutation beschrieben, die zu Leber und Nierenproblemen führt. Die vorliegende Veröffentlichung soll auf dieses einzigartige Krankheitsbild Aufmerksam machen.