Universiteit
Leiden
The Netherlands

Identifying and characterizing regulators of histone acylation and replication stress

Kollenstart, L.

Citation
Kollenstart, L. (2022, September 8). *Identifying and characterizing regulators of histone acylation and replication stress*. Retrieved from https://hdl.handle.net/1887/3455379

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/1887/3455379

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

CHAPTER 7

Nederlandse samenvatting
Curriculum Vitae
Publications
Dankwoord

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Het eencellige organisme bakkersgist, ook bekend als *Saccharomyces cerevisiae,* is een veelgebruikt modelorganisme in genetische studies. Behalve dat deze schimmel een belangrijke bron is voor vele fermentatieprocessen zoals het maken van bier, brood en wijn, is hij ook bij uitstek geschikt voor biologisch onderzoek. Ook al leefde de laatste gemeenschappelijke voorouder van zowel gist als de mens meer dan 1 miljard jaar geleden, vele cellulaire functies zijn in grote lijnen hetzelfde gebleven gedurende deze lange evolutionaire ontwikkeling. In biomedisch onderzoek wordt gist veel gebruikt om DNA, ons genetisch materiaal, te bestuderen. DNA bestaat uit een code die we beschrijven met een letter: A, T, C of G. De verschillende combinaties van deze letters vormen genen. Deze genen bevatten de gebruiksaanwijzing voor onze cellen om alle bouwstenen voor het leven te produceren. Om het DNA en DNA-aanverwante processen te bestuderen is gist bij uitstek geschikt. Het is namelijk erg eenvoudig om gist genetisch te modificeren. Een gen uitschakelen of op een andere manier tot expressie brengen is veel gemakkelijker dan in muizen- of mensencellen. Dit maakt gist een ideaal organisme om processen zoals DNA-reparatie of DNA-regulatie te bestuderen.

In dit proefschrift bestuderen we deze processen vooral vanuit de context van chromatine. De basiseenheid van chromatine is het nucleosoom. Een nucleosoom bestaat uit twee kopieën van 4 verschillende histon eiwitten, H2A, H2B, H3 en H4, waar 147 baseparen (letters) van DNA omheen gewikkeld zit. Deze histon eiwitten verpakken het DNA in een compacte vorm zodat het in de celkern past. Door deze verpakking is het DNA niet alleen een stuk compacter, maar is DNA ook te reguleren. Eén manier van regulatie is het modificeren van de histon eiwitten of het DNA door middel van kleine moleculaire vlaggetjes, ook wel post-translationele modificaties (PTMs) genoemd. Deze PTMs kunnen zowel de structuur als de toegankelijkheid van het DNA aanpassen, maar ook fungeren als aanlegplaatsen voor processen als DNA-reparatie en het aflezen van genen in het DNA, een proces genaamd transcriptie.

De eerste helft van het onderzoek in dit proefschrift heeft als doel om eiwitten te ontdekken die bepaalde PTMs kunnen reguleren. Het gaat hier specifiek om één familie van PTMs, acylaties, waarvan één soort al ontdekt werd in 1964. Deze modificatie, genaamd acetylatie, is een modificatie waarbij een acetylgroep covalent gelinkt wordt aan een lysine aminozuur op een histon eiwit. Normaal gesproken is het lysine aminozuur positief geladen en heeft het daardoor aantrekkingskracht tot het negatief geladen DNA. Wanneer een acetylgroep op het lysine residu wordt gezet, wordt de lading van lysine geneutraliseerd, met als gevolg de verzwakking van de aantrekkingskracht tussen het DNA en de histon eiwitten. Hierdoor zit het DNA minder

strak om het nucleosoom gewonden en opent het chromatine zich als het ware. Dit heeft tot gevolg dat het DNA meer toegankelijk wordt voor processen als DNA-reparatie en genregulatie. Aanverwante vormen van acetylatie zijn zo'n 10 jaar geleden pas ontdekt. Deze andere vormen zien er op het eerste gezicht nauwelijks anders uit, maar hebben kleine verschillen, soms zelf op atoomniveau, die ze van elkaar onderscheidt (Figuur 2 in de introductie).

Doordat bakkersgist zo gemakkelijk te modificeren is, hebben we een voorraad met systematisch gemodificeerde giststammen die elk één van de bijna 5000 niet-essentiële genen missen. Deze giststammen hebben we allemaal een unieke DNA-sequentie gegeven, een barcode, zodat we aan het DNA kunnen aflezen welke mutant we voor ons hebben. Omdat de DNA-barcodes ook uit chromatine bestaan, waren we in staat om te kijken welke van de barcodes, en dus welke van de mutanten, juist meer of minder modificaties hadden. Uit deze screen kwam naar voren dat de acetyl-achtige modificaties gereguleerd worden door dezelfde groep eiwitten. Dit hebben we in een reageerbuisje kunnen nabootsen om het te bevestigen dat deze eiwitten daadwerkelijk verschillende PTMs op chromatine kunnen zetten. Ook hebben we onderzocht wat er gebeurde in gist waarin een enorme toename te zien was voor één soort PTM, de crotonylatie groep. Het toevoegen van deze groep op het chromatine had als gevolg dat opeens vele genen werden aan- of uitgezet. Deze genen hadden vooral te maken met metabolisme. We vermoeden dus ook dat de regulatie van het chromatine door al die verschillende soorten PTMs een reactie kan zijn op het (veranderende) metabolisme van de cel.

Het tweede deel van het proefschrift beschrijft hoe we de verschillende mutante giststammen hebben gebruikt om verder te zoeken naar genen die betrokken zijn bij DNA reparatie of het kopiëren van het DNA, een proces dat essentieel is voor de celdeling en ook wel DNA-replicatie wordt genoemd. We hebben in de 5000 giststammen, die elk een ander gen missen, gekeken welke stammen slechter groeien wanneer we DNA-schade geven. Hoewel we vele verschillende vormen van DNA-schade hebben gegeven, hebben we ons vooral gericht op vormen van DNA-schade die problemen geven met het kopiëren van DNA. Dit leverde een lange lijst met verschillende giststammen op die gemuteerd waren in bekende als onbekende genen in DNA-schade en DNA replicatie. Om uit te sluiten dat we niet naar genen keken die misschien via een indirecte route bijdroegen aan de slechte groei, hebben we gekeken welke gistmutanten daadwerkelijk een cellulair signaal gaven op het beschadigde DNA. Door middel van microscopie, konden we kijken of het kopiëren van het DNA misging en er enkelstrengs DNA gevormd werd (DNA is normaal dubbelstrengs). Dit is een kenmerk van DNA-schade en reparatie en activeert specifieke eiwitten die betrokken zijn bij DNA-reparatie. Omdat we aan één zo'n eiwit, genaamd Ddc2, een fluorescente groep hebben gehangen, is dit eiwit onder

de microscoop te zien. Een subset van alle onderzochte mutanten had daadwerkelijk verhoogde DNA-schade. Wat ons opviel was dat van deze mutanten, een subset allemaal deel uitmaakte van één groot eiwitcomplex genaamd 'Mediator'. Van Mediator weten we dat het heel belangrijk is voor transcriptie, het aflezen van genen. Tijdens dit proces, kan het soms gebeuren dan het DNA en het product van transcriptie, RNA, samen dubbelstrengs worden. Dit wordt een R-loop genoemd en deze RNA-DNA hybride is erg stabiel. Daarom kan een R-loop een obstakel vormen voor zowel het aflezen als het kopiëren van DNA. We hebben gevonden dat in mutanten van het Mediator complex, er meer R-loops gevormd worden. Dit zou een mogelijke verklaring kunnen zijn voor de gevoeligheid van Mediator mutanten voor DNA-schade die DNA-replicatie remt. Hoe Mediator dit precies veroorzaakt, weten we nog niet. Het zou kunnen dat het een proces reguleert dat voorkomt dat het RNA zich dubbelstrengs kan maken met het DNA, bijvoorbeeld door het RNA richting de uitgang van de celkern te helpen zodat het niet kan terugvouwen naar het DNA. Behalve Mediator, hebben we nog veel meer kandidaat genen ontdekt die een rol kunnen spelen bij DNA-reparatie en DNA-replicatie. Meer onderzoek zal moeten uitwijzen of en hoe ze betrokken zijn bij deze processen.