



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Identification and characterization of novel factors in the DNA damage response

Singh, J.K.

Citation

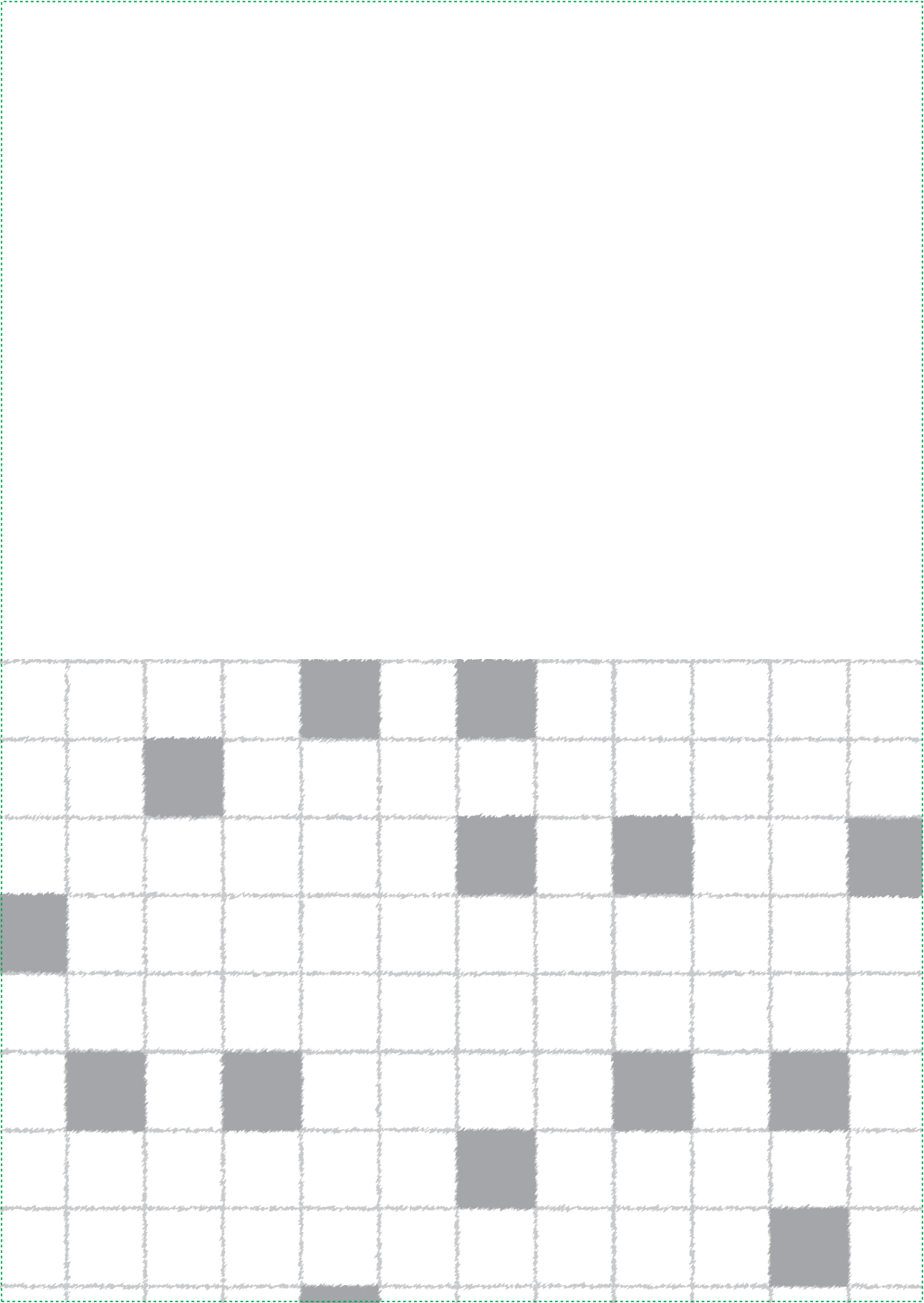
Singh, J. K. (2022, November 9). *Identification and characterization of novel factors in the DNA damage response*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3485639>

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/1887/3485639>

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



CHAPTER 7

Nederlandse Samenvatting

Curriculum Vitae

Publications

Acknowledgements

NEDERLANDSE SAMENVATTING

De cellen in ons lichaam worden continu blootgesteld aan allerlei interne en externe bedreigingen die kunnen leiden tot beschadigingen aan ons DNA. Onze cellen zijn daarom sterk afhankelijk van een aantal essentiële beschermingsmechanismen die DNA-schade opsporen en repareren, en gezamenlijk de DNA-schaderespons worden genoemd. Het niet goed functioneren van de DNA-schaderespons kan leiden tot mutaties en instabiliteit van het genoom, hetgeen weer kan bijdragen tot de ontwikkeling van ziekten zoals kanker, neurodegeneratieve stoornissen en veroudering. Van de verschillende DNA-beschadigingen die kunnen optreden behoren DNA dubbelstrengsbreuken tot de meest genotoxische. Daarnaast zijn er verschillende DNA-beschadigingen die tijdens de verdubbeling van ons DNA, ook wel DNA-replicatie genoemd, de voortgang van de replicatievork kunnen blokkeren. Langdurige blokkade van replicatievorken kan leiden tot instabiliteit en het uiteenvallen van deze vorken, hetgeen de vorming van DNA dubbelstrengsbreuken tot gevolg kan hebben. Inzicht in de mechanismen die betrokken zijn bij het repareren van DNA-breuken en het voorkomen van replicatie stress in de vorm van instabiliteit of het uiteenvallen van replicatievorken, kan leiden tot een beter begrip van de DNA-schaderespons en de talrijke aandoeningen die worden geassocieerd met defecten in deze respons. Alhoewel, studies aan eiwitten die betrokken zijn bij de DNA-schaderespons in detail zijn bestudeerd en tot vernieuwende inzichten hebben geleid, blijft het volledige repertoire van eiwitten dat bij deze respons betrokken is onbekend. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift is gericht op de identificatie en het functioneel karakteriseren van nieuwe factoren betrokken bij de reparatie van DNA dubbelstrengsbreuken en het voorkomen van replicatie stress. De achtergrond van deze studie wordt uitgebreid beschreven in hoofdstuk 1.

In de afgelopen jaren hebben de matig gekarakteriseerde Zinc Finger (ZnF) eiwitten veel aandacht gekregen, omdat zij mogelijk een rol spelen in de DNA-schaderespons en het ontstaan van kanker. ZnF domeinen komen voor in tenminste 5% van alle humane eiwitten en deze zijn ingedeeld in verschillende ZnF domeinfamilies, waaronder de C2H2 domeinfamilie. ZnF eiwitten met een C2H2 domein staan vooral bekend om hun DNA-bindende vermogen. Verder onderzoek heeft aangetoond dat ZnF domeinen ook in staat zijn om RNA, lipiden en gemethyleerd DNA te binden. Daarnaast kunnen ZnF domeinen ook aan bepaalde chemische modificaties van eiwitten, ofwel post-translationale modificaties (PTMs) binden. Hierbij valt te denken aan modificaties zoals SUMO, ubiquitine, PAR en methyl. ZnF eiwitten kunnen ook meerdere typen ZnF-domeinen

bevatten, waardoor ze een veelzijdige specificiteit voor binding aan verschillende PTMs vertonen. ZnF domeinen komen voor in verschillende niet- eiwitsuperfamilies, zoals bijvoorbeeld in transcriptiefactoren, nucleaire hormoonreceptoren, integrase enzymen, E3 ubiquitine ligases, chromatine remodelers, tumor suppressors, RAS GTPases, membraantransport eiwitten en chaperones. Door de veelzijdige bindings-specificiteit van de ZnF domeinen in deze eiwitten, zijn zij in staat om verschillende processen in onze cellen te reguleren, waaronder het herstel van DNA dubbelstrengsbreuken. In hoofdstuk 2 beschrijf ik de functies van een aantal ZnF eiwitten in de twee belangrijkste DNA dubbelstrengsbreukherstel routes, namelijk niet-homologe eind-verbinding (NHEJ) en homologe recombinatie (HR). De focus ligt voornamelijk op de functionele relevantie van de ZnF domeinen in deze processen en hoe het disfunctioneren van ZnF eiwitten kan leiden tot de ontwikkeling van kanker. Ondanks dat we de functie van een aantal ZnF eiwitten inmiddels beter begrijpen, blijft het merendeel van deze eiwitten tot dusverre onvoldoende gekarakteriseerd. Verschillende studies hebben aangetoond dat ZnF eiwitten lokaliseren op DNA-schade die door bestraling van cellen met een laser is gemaakt. Deze methode induceert een breed spectrum aan DNA-schades, waaronder DNA dubbelstrengsbreuken, enkelstrengsbreuken en oxidatieve DNA-schade, hetgeen suggereert dat ZnF eiwitten aan verschillende DNA-beschadigingen kunnen binden. Bovendien scoren ZnF eiwitten hoog in CRISPR/Cas9 screens gericht op het identificeren van eiwitten die cellen beschermen tegen DNA-beschadigende stoffen, waaronder chemotherapeutica. Alhoewel de huidige kennis een rol voor ZnF eiwitten in DNA-reparatie en de ontwikkeling van kanker impliceert, zal verder onderzoek moeten uitwijzen hoe deze eiwitten bij deze processen betrokken zijn.

Ons DNA is met histon-eiwitten verpakt in chromatine, hetgeen ervoor zorgt dat het in de celkern past. Echter, dit maakt het efficiënt detecteren en repareren van DNA dubbelstrengs breuken uitdagend. Gelukkig zijn eiwitten in onze cellen in staat om de chromatine structuur rondom DNA dubbelstrengs breuken te ontvouwen, zodat het DNA toegankelijk wordt voor DNA-reparatie eiwitten. Een van deze enzymen die betrokken is bij dit proces is poly(ADP-ribosyl)-polymerase 1 (PARP1). Wanneer PARP1 bindt aan DNA-breuken wordt het geactiveerd en bevordert het lokaal de ontvouwing van chromatine door de vorming van poly(ADP-ribose)-ketens (PAR) op zichzelf en op histon-eiwitten. Dit proces leidt tevens het rekruteren van ATP-afhankelijke chromatine-remodelers, die het chromatine vervolgens nog verder ontvouwen. Een eerdere studie heeft aangetoond dat verschillende ZnF eiwitten, waaronder ZNF384, op DNA-schade

lokaliseren en dat PARP1 hiervoor noodzakelijk is. In hoofdstuk 3 beschrijf ik een belangrijke rol voor ZNF384 in het herstel van DNA dubbelstrengsbreuken via niet-homologe eind-verbinding (NHEJ), hetgeen in humane cellen het dominante mechanisme is voor het herstel van deze vorm van DNA-schade. Lokalisatie van ZNF384 op DNA dubbelstrengsbreuken vereist de PARP1-afhankelijke ontvouwing van beschadigd chromatine. Deze ontvouwing maakt het beschadigd DNA toegankelijk, zodat ZNF384 er via het C2H2 ZnF domein aan kan binden. Door middel van massaspectrometrie, heb ik aangetoond dat ZNF384 interacteert met de twee belangrijke NHEJ-eiwitten, Ku70/Ku80. Deze interactie wordt bewerkstelligd door het N-terminale domein van ZNF384. Het C2H2-domain dat aan DNA bindt en het N-terminale domein dat met Ku70/Ku80 interacteert zijn allebei belangrijk voor de lokalisatie van Ku70/Ku80 op DNA dubbelstrengsbreuken, als ook voor de lokalisatie van eiwitten die weer door Ku70/Ku80 worden aangetrokken, zoals APLF en XRCC4/LIG4. Deze resultaten suggereren dat ZNF384 fungeert als een 'Ku-adaptor' die DNA dubbelstrengsbreuken en Ku70/Ku80 bindt om de opbouw van de cNHEJ reparatie machine te faciliteren. Hiermee heb ik een nieuwe en belangrijke rol voor ZNF384 in het herstel van DNA dubbelstrengsbreuken en behoud van genoomstabiliteit aangetoond.

Het vermogen van cellen om te overleven en zich te vermenigvuldigen hangt af van het kopiëren van DNA via DNA-replicatie tijdens elke celcyclus. Echter, tijdens dit proces is het DNA kwetsbaar voor obstakels die de voortgang van de replicatievork kunnen blokkeren, en daarbij DNA-replicatie stress kunnen veroorzaken. De DNA-schaderespons speelt niet alleen een belangrijke rol in het herstellen van DNA dubbelstrengsbreuken, maar zorgt er ook voor dat DNA-replicatie stress voorkomen of verholpen wordt. Een veel voorkomend obstakel dat de voortgang van replicatievorken kan blokkeren is transcriptie, het proces waarbij genen worden afgelezen en er een kopie in de vorm van RNA wordt gemaakt. Er kunnen botsingen ontstaan tussen de eiwitmachines die transcriptie en DNA-replicatie reguleren. Die botsingen kunnen leiden tot transcriptie-replicatieconflicten (TRCs). TRCs komen meestal in een head-on oriëntatie voor, waarbij frontale botsingen tussen de replicatie- en transcriptie machines optreden. Daarnaast zijn R-loops een veel voorkomende bron van TRCs. R-loops zijn zeer stabiele DNA-RNA hybride structuren die als bijproduct van transcriptie gevormd worden. Door hun impact op de vorming van TRCs zijn R-loops een bron van genoominstabiliteit gebleken. In de afgelopen jaren is er veel onderzoek gedaan naar het samenspel van transcriptie, R-loops en de geassocieerde genoominstabiliteit. Dit onderzoek heeft geleid tot de ontdekking van verschillende

eiwitten die betrokken zijn bij het ontstaan van R-loops. Een volledig begrip van de context waarin R-loops ontstaan en TRC-geassocieerde genominstabiliteit veroorzaken ontbreekt echter. In hoofdstuk 4 beschrijf ik de functie van het non-specific lethal (NSL) chromatine remodeling complex in het reguleren van R-loops. Mijn bevindingen suggereren dat KANSL3, een unieke subunit van het NSL complex, cellen beschermt tegen replicatie stress door de herstart van vastgelopen replicatievorken te bevorderen, die zijn ontstaan nadat R-loops TRCs hebben veroorzaakt. KANSL3 onderdrukt de vorming van R-loops en voorkomt zo botsingen tussen de replicatie- en transcriptiemachines. Toekomstig onderzoek is nodig om inzicht te krijgen in hoe exact KANSL3 de vorming van R-loops en daarmee de stabiliteit van de replicatievork beïnvloedt.

Naast chromatine remodeling complexen en transcriptie factoren spelen verschillende eiwitten die RNA binden een belangrijke rol in het afbreken van R-loops om replicatie stress te voorkomen. In hoofdstuk 5 beschrijf ik een belangrijke rol voor het RNA afbrekende enzym ERI1 in dit proces. ERI1 is een evolutionair geconserveerde 3'-5' exonuclease die een rol speelt in verschillende RNA-processing routes, inclusief de routes die betrokken zijn bij het afbreken van ribosomaal RNA en de degradatie van histon mRNAs. Ik heb gevonden dat verlies van ERI1 leidt tot een toename van R-loops en de phosphorylatie van RPA (S4/S8), hetgeen indicatief is voor een verhoging van het aantal gestalde/uiteengevallen vorken. Ook heb ik aangetoond dat een inactiverende mutatie in het 3'-5' exonuclease domein van ERI1 leidt tot een verhoogd phosphorylatie-niveau van RPA (S4/S8). Dit geeft aan dat de exonuclease activiteit van ERI1 belangrijk is bij het voorkomen van gestalde/uiteengevallen vorken. Tenslotte beschrijf ik dat ERI1 bindt aan gestalde replicatievorken, hetgeen suggereert dat ERI1 een directe rol speelt in het behouden van vorkstabiliteit. Toekomstig onderzoek zal moeten uitwijzen hoe ERI1 een rol speelt in het beschermen van de integriteit van replicatievorken en of dit afhangt van ERI1's rol in het afbreken van R-loops. In het laatste hoofdstuk van dit proefschrift, namelijk hoofdstuk 6, beschrijf ik hoe mijn bevindingen bijdragen aan ons begrip over genomstabiliteit, richt ik mij op onopgeloste kwesties, en maak ik aanbevelingen voor vervolgstudies.