Downloaded from UvA-DARE, the institutional repository of the University of Amsterdam (UvA)
http://dare.uva.nl/document/68217

File ID	68217
Filename	Samenvatting

SOURCE (OR PART OF THE FOLLOWING SOURCE):

Type	Dissertation
Title	DNA repair and antigenic variation in Trypanosoma brucei
Author	S. Ulbert
Faculty	Faculty of Medicine
Year	2003
Pages	120

FULL BIBLIOGRAPHIC DETAILS:
http://dare.uva.nl/record/141874

Copyright

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other then for strictly personal, individual use.

UvA-DARE is a service provided by the library of the University of Amsterdam (http://dare.uva.nl)

Samenvatting

DNA modificatie is een veel voorkomend verschijnsel in de natuur, zowel in prokaryoten als in eukaryoten. Gemodificeerde DNA basen hebben verschillene functies, variërend van beschermingsmechanismen tegen niet-eigen DNA tot een belangrijke rol in de regulatie van gen expressie. In de eencellige parasiet *Trypanosoma brucei*, die in zoogdieren leeft en verspreid wordt via insecten, is 1% van de thymine basen in hun nucleair DNA vervangen door de gemodificeerde base β-D-glucosyl-hydroxymethyluracil (J). J wordt vooral gevonden in repetitieve telomeer-sequenties. Verder is J alleen gedetecteerd in de parasiet als deze zich in de bloedbaan bevindt. De functie van deze gemodificeerde base is niet bekend. Behalve J bezit *T. brucei* ook nog een kleine hoeveelheid 5-hydroxymethyluracil (5-HmU). Op grond van eerdere studies is een model voorgesteld waarin J wordt gemaakt in twee stappen met 5-HmU als tussenproduct. Helaas zijn er nog geen enzymen geïdentificeerd die betrokken zijn bij de synthese van J.

Om meer inzicht te verkrijgen in de biosynthese van J, hebben we een systeem opgezet waarin specifiek 5-HmU uit DNA wordt weggehaald. Hiervoor hebben we het gen voor humaan DNA glycosylase, hSMUG1, in het *T. brucei* genoom geïntegreerd (hoofstuk 2). hSMUG1 is een onderdeel van een DNA reparatie systeem dat de foute base verwijdert (BER, Base Excision Repair). 5-HmU wordt weggeknipt door hSMUG1, resulterend in een base-loze plek in het DNA. Deze plek wordt herkend en het defect wordt hersteld door andere BER enzymen. De expressie van het hSMUG1 heeft tot gevolg dat de hoeveelheid J in de cellen sterk is verminderd. Verder leidt de expressie van hSMUG1 tot een ophoping van base-loze plekken en dubbelstrengs breuken in het DNA resulterend in de stagnerend groei van trypanosomen en uiteindelijk celdood. Deze DNA schade is specifiek voor sequenties die J bevatten. Dit duidt er op dat 5-HmU op dezelfde plekken zit als J. Het tot expressie komen van hSMUG1 in de insectvorm van de trypanosomen, die geen J bevatten in hun DNA, heeft geen effect op de cellen. Deze gegevens laten zien dat 5-HmU, net als J, alleen aanwezig is in de bloedbaanvorm van de parasiet (hoofstuk 3). Deze resultaten ondersteunen het model van J synthese: J wordt in twee stappen gemaakt uit thymine met 5-HmU als tussenproduct. We hebben ook direct gekeken naar J-synthetiserende enzymen in experimenten met trypanosoom extracten (hoofstuk 4). Deze experimenten gaven geen eenduidige resultaten, aangezien zij niet reproduceerbaar waren in een andere, onafhankelijke proef.

De resultaten verkregen door de studies met hSMUG1 laten zien dat een BER activiteit gericht tegen 5-HmU schadelijk is voor de trypanosomen. Dit leidde tot de vraag of het BER systeem in *T. brucei* is aangepast aan de aanwezigheid van J. DNA glycosylasen, de belangrijkste componenten van het BER system, zijn zeer geconserveerd in de evolutie. Het was niet bekend of deze enzymen in staat zijn om J uit DNA te knippen. *T. brucei* zou misschien een paar glycosylasen missen, zodat trypanosomen J kunnen toleren in hun DNA. In biochemische experimenten hebben we verscheidene glycosylases van diverse organismen getest op hun capaciteit om J of 5-HmU te knippen. Wij vonden geen enkele excisie van J, maar 5-HmU kon door AlkA en Mug (*Escherichia coli*) en door humane SMUG1 and TDG verwijderd worden. We hebben verschillende DNA glycosylasen in *T. brucei* geïdentificeerd door databases te screenen en met biochemische experimenten. We hebben echter geen BER activiteit gevonden tegen 5-HmU en ethenocytosine, een product van oxidatieve DNA schade en het substraat voor de DNA glycosylasen MUG, TDG en SMUG1. Deze resultaten doen de vraag rijzen of trypanosomen, hoewel ze over een BER systeem beschikken dat vergelijkbaar is met dat van andere organismen, sommige vormen van oxidatieve schade aan de basen niet kunnen verwijderen. We hebben echter gevonden dat de aanwezigheid van J in het DNA geen aangepast BER systeem vergt, aangezien J door geen enkele glycosylase wordt herkend (hoofdtuk 5). Dit toont aan dat de evolutie van J is verlopen zonder de verstoring van het BER systeem en dat J vergelijkbaar zou kunnen zijn met DNA modificaties zoals 5-methylcytosine, dat ook niet wordt herkend door het DNA reparatie systeem.

In een onafhankelijk project hebben we het fenomeen antigene variatie in *T. brucei* onderzocht. Om het immuunsysteem van zoogdieren te ontwijken, veranderen de parasieten herhaaldelijk hun oppervlakte mantel. Deze mantel bestaat uit één soort eiwitten, het variant surface glycoproteine (VSG), die zeer dicht opeen gepakt zijn. Er zijn ongeveer duizend verschillende VSG genen en om één van die genen tot expressie te laten komen, moeten de VSG genen in één van de 20 VSG expressie-plaatsen zitten. Op één bepaald moment kan maar één expressie-plaats afgelezen worden door een DNA polymerase resulterend in één soort VSG eiwit in de mantel. Een mechanisme om VSG eiwitten te variëren is om een expressie-plaats te inactiveren en een andere te activeren (*in situ* switch). We hebben trypanosomen gemaakt met 3 expressie-plaatsen waarin elke plaats met een verschillende antibioticum-gen is gemarkeerd (hoofdstuk 6). Door antibioticum selectie konden we een eerder geïdentificeerde tussenfase van de *in situ* switchers onderzoeken. Een eerder artikel uit ons lab toonde aan dat, tijdens het switchen, twee expressie-plaatsen in een zogenaamde "pre-actieve" staat komen, resulterend in een tijdelijk activatie van

beide expressie-plaatsen terwijl de anderen inactief blijven. Ook de drie onderzochte expressie-plaatsen kwamen in de "pre-actieve" staat met vergelijkbare frequenties, suggererend dat dit een gemeenschappelijke eigenschap van het *in situ* VSG switchen is. Deze cellijn met de drie gemarkeerde expressie-plaatsen is ook gebruikt om de inactieve VSG expressie-plaatsen te onderzoeken. We hebben aan kunnen tonen dat de regulatie van de expressie-plaatsen een dynamische proces is en dat de transcriptie van de inactieve plaatsen veranderd kan worden, resulterend in gedeeltelijk geactiveerde expressie-plaatsen. Ook hebben we getracht de actieve expressie-plaats te lokaliseren in de kern. Hierbij werd gebruik gemaakt van *in vivo* GFP labellen van DNA in *T. brucei* (hoofstuk 7). Deze benadering werd gecompliceerd door het feit dat er gebruik gemaakt moest worden van repetitieve sequenties. Deze sequenties zijn echter onstabiel in trypanosomen hetgeen resulteerde in verlies uit het DNA.