

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/20138> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Vrouwe, Mischa G.

Title: DNA damage responses in mammalian cells : focus on signaling and repair

Date: 2012-11-20

8

Addenda

SUMMARY

DNA is the carrier of genetic information and therefore it is important to protect its integrity in order to ensure fitness of the organism. There are many sources that generate DNA damage i.e. through cellular metabolism and through external exposure like solar UV and certain chemicals. To protect against the deleterious effects of DNA lesions cells have at their disposal two defense mechanisms. One protective mechanism is to repair damaged DNA, for which cells have multiple repair pathways to cope with a wide variety of DNA lesions. The second protective mechanism works through signaling pathways controlling cell cycle progression and apoptosis, giving cells time to repair damaged DNA or to remove damaged cells in order to protect the organism. **Chapter 1** and **chapter 2** provide an introduction to various repair pathways and DNA damage signaling.

The UV-DDB complex consisting of DDB1 and DDB2 is the primary factor that detects and binds to UV-induced DNA lesions. Consequently, defects in DDB2 result in defective nucleotide excision repair [NER]. Being the first factor in the NER process as well as the factor that binds directly to DNA damage embedded in chromatin leaves open the possibility that the local chromatin environment might be subject to DDB2 dependent changes. Indeed it has been demonstrated that the UV-DDB associated Cul4/Roc1 ubiquitin ligase complex ubiquitylates histones after UV. **Chapter 3** describes the identification of PARP1 as a component of the UV-DDB complex and its possible role in UV dependent chromatin remodeling. The induction of UV lesions results in the formation of poly(ADP-ribose) [PAR] chains at sites of UV damage. The formation of PAR chains was in part due to the presence of single stranded DNA gaps as a result of NER induced incisions. However, part of the PAR formation was found to be independent of single stranded DNA yet dependent on DDB2, indicating a function during the early stages of NER. In fact, DDB2 itself is a target for PARylation and PAR negatively affects the level of ubiquitylation of DDB2. Consistently it was observed that stabilizing PAR modifications through depletion of the PAR removing enzyme PARG increased the DDB2 chromatin retention time, most likely as a result of decreased DDB2 degradation. We also found that the chromatin remodeling protein ALC1 was also recruited to UV exposed DNA in a PAR dependent manner. This recruitment was also observed in XPA deficient cells but was suppressed by DDB2 depletion or PARP inhibition. The role of ALC1 in NER was further demonstrated by depletion of ALC1 or by PARP inhibition as both treatments resulted in reduced CPD repair.

While UV lesions evoke the activation of PARP and thereby affect repair other post translational modifications, most notably phosphorylation, serve to inhibit cell cycle progression. **Chapter 4** describes the central role of the ATR kinase in activation of cell cycle checkpoints after UV exposure. Surprisingly, it was found that checkpoint proteins were activated in both normal repair proficient cells as well as in global genome NER [GG-NER] deficient cells independent of replication. Activation of p53 was rapid in normal cells with p53 levels reducing in time. In contrast, in cells with a defect in GG-NER p53 was more delayed to normal cells but, crucially, p53 levels did not diminish. Similar differences in kinetics between repair GG-NER proficient and deficient cells were also observed for phosphorylation of H2AX and suggest that the underlying cause for checkpoint activation

differs between repair proficient and deficient cells. Nonetheless, in both cases the activation of checkpoint proteins depends on the ATR kinase. Consistent with the activation of ATR, DNA breaks were detected in both normal and repair deficient cells. The latter is remarkable as the repair deficiency precludes the formation of DNA breaks as part of the NER process. The presence of breaks and their persistent nature in GG-NER deficient cells is supported by the recruitment of replication factors PCNA, pol δ and pol η to sites of UV damage. These data indicate that rather than being directly activated by UV lesions prior processing needs to occur. We show that APE1 exhibits endonuclease activity on UV lesions. As the incision by APE1 occurs 5' of the lesion without removing it this might result in a structure that is refractory to repair and eventually provokes ATR signaling.

While ATR and the related kinases ATM and DNA-PK_{cs} are known to respond to DNA damage and are likely to phosphorylate several hundred proteins they are not the only kinases whose activity is influenced by DNA damage. To gain insight into the dynamics of phosphorylation and dephosphorylation following DNA damage, quantitative mass spectrometry analyses were performed using the chemotherapeutic drug cisplatin [described in **chapter 5**]. We identified 183 phosphopeptides with more than 2-fold increase and 194 phosphopeptides that were more than 2-fold decreased phosphorylation levels following cisplatin treatment. As expected, many [46%] of the up regulated phosphopeptides were phosphorylated at an ATM/ATR consensus sequence. Interestingly, some proteins were found to contain both up regulated as well as down regulated sites. Possibly this differential phosphorylation signifies some form of molecular switch. We also tested the hypothesis that changes in RNA transcript levels correlate with changes in protein levels after cisplatin treatment. However, we found no clear correlation between changes in transcript and its corresponding protein. In contrast, pathway analysis based on transcriptomics, proteomics and phosphoproteomics did reveal a large overlap in affected processes. The impact of cisplatin on DNA damage repair pathways was, however, only manifested in the phosphoproteome analysis. This suggests that phosphorylation events are important for DNA repair pathway activation after genotoxic stress.

Chapter 6 describes how cells from individuals with Cornelia de Lange Syndrome [CdLS] respond to genotoxic stress. CdLS is a disease where the function of the cohesin complex has been compromised. Cohesin is important for multiple cellular functions i.e. maintaining sister chromatid cohesion, gene regulation, DNA repair and DNA damage signaling. The identification of disease causing mutations in cohesin and associated factors in CdLS individuals prompts the question whether these individuals would be at increased risk when exposed to genotoxic agents. Two fibroblast and five B-cell lymphoblastoid lines were screened for the presence of pathogenic mutations in the *NIPBL* and *SMC1A* gene. Mutations in the *NIPBL* gene were detected in one fibroblast and two B-cell lymphoblastoid lines whereas no causative genetic alterations were found in the other cell lines. Clonal survival assays indicated that CdLS cells have no clear increased sensitivity for ionizing radiation [IR]. In contrast, exposure to the DNA crosslink-inducing agent mitomycin C [MMC] revealed increased sensitivity of all CdLS lines compared to normal controls. Although CdLS cells did not show decreased survival upon IR exposure



there was a marked increase in chromosomal aberrations when exposed in G2 but not when exposed in G1, suggesting homologous recombination is impaired. Chromosomal aberrations were also increased after MMC. It should be noted that the reduced survival and increased chromosomal aberrations were observed in all CdLS cells regardless of the presence or absence of *NIPBL* mutations. This study demonstrates that CdLS cells have increased sensitivity for certain DNA damaging agents highlighting potential health risk for CdLS individuals when exposed to such agents.

NEDERLANDSE SAMENVATTING

DNA is de drager van genetische informatie en het is daarom van essentieel belang om de integriteit van deze informatie te beschermen en daarmee het organisme. Beschadiging van DNA kan het gevolg zijn van vele processen zoals de vorming van schadelijke moleculen door cellulaire metabolismen en door blootstelling aan bepaalde chemicaliën in onze leefomgeving of UV-straling van de zon. Om de cel te vrijwaarden van de gevolgen van DNA veranderingen beschikt deze over beschermingsmechanismen. Een van de mechanismen is om DNA schade te herstellen. Om dit te bereiken beschikken cellen over meerdere herstelsystemen die in staat zijn om een breed scala aan DNA afwijkingen te corrigeren. Een ander beschermingsmechanisme maakt gebruik van signaaltransductie waarbij processen zoals cel cyclus progressie en apoptose (celdood) worden gereguleerd. **Hoofdstukken 1 en 2** geven een introductie in DNA schade herstelsystemen en signalering.

Het UV-DDB complex bestaat uit DDB1 en DDB2 en is de belangrijkste factor voor detectie van en binding aan UV geïnduceerde DNA schade. Defecten in DDB2 resulteren dan ook in nucleotide excisie herstel (NER) deficiëntie. De eigenschap om aan beschadigd DNA te binden in de context van chromatine opent de mogelijkheid dat het lokale chromatine onderhevig is aan UV-DDB afhankelijke modificaties. **Hoofdstuk 3** beschrijft de identificatie van PARP1 als een component van het UV-DDB complex en de mogelijke rol in UV afhankelijke chromatine veranderingen. Behandeling van cellen met UV straling resulteert in de formatie van poly[ADP-ribose] (PAR) ketens op de plaats van de schade. De vorming van PAR ketens is gedeeltelijk afhankelijk van enkelstrengs DNA formatie als gevolg van de NER reactie. Echter, een gedeelte van de PAR formatie vindt plaats in afwezigheid van enkelstrengs DNA en hiervoor is DDB2 essentieel, indicatief voor een rol gedurende de eerste stappen van het NER proces. We tonen verder aan dat PAR belangrijk is voor de dynamiek en stabiliteit van DDB2 en de rekrutering van de chromatine remodeler ALC1. Depletie van ALC1 of inhibitie van PAR resulteert in verminderd herstel van UV schade wat de rol van ALC1 in NER onderschrijft.

Naast inductie van PAR resulteert de aanwezigheid van UV schade ook in fosforylatie, een andere eiwitmodificatie met een belangrijke rol in de regulatie van de celcyclus. **Hoofdstuk 4** beschrijft de rol van ATR kinase na blootstelling aan UV. We vinden dat activatie van checkpoint eiwitten in zowel normale als globaal genoom NER (GG-NER) deficiënte cellen plaatsvindt in een replicatie onafhankelijk proces. Zowel p53 als H2AX worden gefosforyleerd zij het met verschillende kinetiek in normale en GG-NER deficiënte cellen wat suggereert dat er verschillende processen aan ten grondslag liggen. In beide gevallen echter is de activatie afhankelijk van ATR en in overeenstemming hiermee worden DNA breuken gedetecteerd in zowel normale als GG-NER deficiënte cellen. Dit laatst is opmerkelijk aangezien de deficiëntie het ontstaan van breuken als gevolg van NER uitsluit. De aanwezigheid van de replicatiefactoren PCNA, pol δ en pol η bij UV beschadigd DNA is een verdere indicatie dat breuken worden gevormd. We tonen aan dat breuken gedeeltelijk het gevolg zijn van APE1 endonuclease activiteit op UV schade. Omdat de incisie plaatsvindt aan de 5' zijde van de schade zonder deze te verwijderen resulteert dit mogelijk in een structuur welke moeilijk te herstellen is en uiteindelijk leidt tot ATR activatie.

Hoewel van ATR en de gerelateerde kinasen ATM en DNA-PKcs bekend is dat ze enkele honderden eiwitten fosforyleren na DNA schade wordt de activiteit van andere kinasen ook door schade beïnvloed. Om inzicht te krijgen in de dynamiek van fosforylatie en defosforylatie is kwantitatieve massaspectrometrische analyse uitgevoerd na behandeling met het chemotherapeuticum cisplatina (**hoofdstuk 5**). We hebben 183 fosfopeptides geïdentificeerd die meer dan tweevoudig verrijkt waren en 194 fosfopeptides die meer dan tweevoudig verminderd waren in fosforylatie niveaus na cisplatina behandeling. Zoals verwacht zijn veel (46%) van de verrijkte fosfopeptides gemodificeerd op een ATM/ATR consensus sequentie. Opvallend is dat bij sommige eiwitten zowel verrijking als depletie van fosforylatie wordt gevonden binnen hetzelfde eiwit. Deze differentiële fosforylatie functioneert mogelijk als moleculaire schakelaar. De hypothese dat veranderingen in RNA transcript niveaus correleren met veranderingen in eiwit niveaus na cisplatina is ook getest. Er is echter geen eenduidige correlatie gevonden tussen veranderingen in transcript niveaus en het corresponderende eiwit. Pathway analyse gebaseerd op transcriptomics, proteomics en fosfoproteomics laat echter een grote overlap zien in processen. Het effect van cisplatina op DNA herstel mechanismen is echter alleen manifest in de fosfoproteome analyse en dit suggereert dat fosforylatie belangrijk is voor DNA herstel activatie na genotoxische stress.

Hoofdstuk 6 beschrijft hoe cellen van personen met Cornelia de Lange Syndroom [CdLS] reageren op genotoxische stress. CdLS is een ziekte waarbij het cohesin complex niet correct functioneert. Cohesin is belangrijk voor meerdere cel functies zoals het in stand houden van zuster chromatide cohesie, genregulatie, DNA herstel en DNA schade signalering. De identificatie van pathogene mutaties in cohesin en geassocieerde factoren in CdLS patiënten riep de vraag op of deze personen verhoogd risico lopen wanneer blootstelling aan genotoxische agentia plaats vind. Twee fibroblast en vijf B-cell lymphoblastoïde lijnen werden geanalyseerd op de aanwezigheid van pathogene mutaties in de *NIPBL* en *SMC1A* genen. In een fibroblast en twee B-cell lymphoblastoïde lijnen zijn *NIPBL* mutaties gevonden. In de andere lijnen zijn geen causale genetische afwijkingen gevonden. Klonale survival proeven tonen aan dat CdLS cellen niet gevoeliger zijn voor ioniserende straling [IR] dan controle cellen. Blootstelling aan het DNA crosslink agens mitomycine C [MMC] leidt echter tot verhoogde gevoeligheid vergeleken met normale cellen. Hoewel CdLS cellen een normale overleving hebben na IR vertonen ze verhoogde niveaus van chromosomale afwijkingen na blootstelling G2, maar niet na blootstelling in G1. Dit suggereert een mogelijk defect in homologe recombinatie. Chromosomale afwijkingen zijn ook na MMC verhoogd. De verminderde overleving en verhoogde chromosomale afwijkingen zijn in alle CdLS cellen present ongeacht de aan- of afwezigheid van *NIPBL* mutaties. Deze studie toont aan dat CdLS cellen een verhoogde gevoeligheid hebben voor bepaalde agentia die DNA schade induceren, wat een potentieel gezondheidsrisico kan betekenen voor CdLS patiënten.



CURRICULUM VITEA,

Mischa G. Vrouwe was born on the 30th November 1975 in Ter Aar. He attended the Christelijk Lyceum in Alphen aan den Rijn and received his HAVO diploma in 1992. From 1992 to 1996 he attended the HLO in Leiderdorp studying biotechnology. After the successful completion of the HLO he subsequently started at Leiden University reading chemistry. During his studies he performed an internship at the department of molecular genetics of the Leiden Institute of Chemistry where he worked on the purification of the Rad7/Rad16 complex from *saccharomyces cerevisiae*. In 2000 he successfully completed his doctoraal exam. He started his PhD. in 2000 at the department of Toxicogenetics [formerly the department radiation genetics and chemical mutagenesis] where he worked on various topics in DNA repair but focusing on UV and ionizing radiation. Between 2008 and 2009 he worked as a research technician where he helped setup an in vitro lung tissue culture system. From 2010 he works as a postdoctoral researcher studying the molecular mechanisms of transcription coupled nucleotide excision repair.

LIST OF PUBLICATIONS

1. Pines, A.*, **M.G.Vrouwe***, Jurgen A. Martelijn, Dimitris Typas, Martijn S. Luijsterburg, Medine Cansoy, Paul Hensbergen, André Deelder, Anton de Groot, Syota Matsumoto, Kaoru Sugawara, Nicolas Thoma, Wim Vermeulen, Harry Vrieling, and Leon Mullenders. 2012. PARP1 promotes nucleotide excision repair through DDB2 stabilization and recruitment of ALC1. *J. Cell Biol.* In press
2. Luijsterburg, M.S., M.Lindh, K.Acs, **M.G.Vrouwe**, A.Pines, H.van Attikum, L.H.Mullenders, and N.P.Dantuma. 2012. DDB2 promotes chromatin decondensation at UV-induced DNA damage. *J. Cell Biol.* **197**: 267-281.
3. Lagerwerf, S., **M.G.Vrouwe**, R.M.Overmeer, M.I.Fousteri, and L.H.Mullenders. 2011. DNA damage response and transcription. *DNA Repair (Amst)* **10**: 743-750.
4. Pines, A., C.D.Kelstrup, **M.G.Vrouwe***, J.C.Puigvert*, D.Typas*, B.Misovic, A.de Groot, S.von Stechow, B.van de Water, E.H.Danen, H.Vrieling, L.H.Mullenders*, and J.V.Olsen*. 2011. Global phosphoproteome profiling reveals unanticipated networks responsive to cisplatin treatment of embryonic stem cells. *Mol. Cell Biol.* **31**: 4964-4977.
5. **Vrouwe, M.G.**, A.Pines, R.M.Overmeer, K.Hanada, and L.H.Mullenders. 2011. UV-induced photolesions elicit ATR-kinase-dependent signaling in non-cycling cells through nucleotide excision repair-dependent and -independent pathways. *J. Cell Sci.* **124**: 435-446.
6. **Vrouwe, M.G.**, L.H.F.Mullenders. 2009. Nucleotide excision repair: From DNA damage processing to human disease. K.K.Khana and Y. Shiloh [Eds.] *The DNA Damage response: Implications on Cancer Formation and Treatment*. Springer.
7. **Vrouwe, M.G.**, E.Elghalbzouri-Maghrani, M.Meijers, P.Schouten, B.C.Godthelp, Z.A.Bhuiyan, E.J.Redeker, M.M.Mannens, L.H.Mullenders, A.Pastink*, and F.Darroudi. 2007. Increased DNA damage sensitivity of Cornelia de Lange syndrome cells: evidence for impaired recombinational repair. *Hum. Mol. Genet.* **16**: 1478-1487.

*,+ Equal author contributions