

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/29979> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Lemmens, Bennie

Title: Repair and genetic consequences of DNA double strand breaks during animal development

Issue Date: 2014-12-09

Addendum

Summary

Nederlandse samenvatting

Acknowledgements

Curriculum vitae

List of publications

Thesis summary

This thesis describes several studies conducted to examine how living organisms preserve their genetic material and how different DNA repair pathways influence genome stability. To study these questions the nematode *C. elegans* was used as a model organism, as it allows efficient genetic manipulation as well as in-depth genetic analysis of mutagenic processes. We exploited these unique attributes to i) convert these animals into *in vivo* sensors of DNA damage ii) identify factors not implicated in genome stability before, iii) unveil mechanisms that dictate DNA repair pathway choice, and iv) determine the biological consequences of endogenous barriers that impede DNA replication.

The genetic code of life is stored in DNA molecules that consist of two parallel strands of coupled nucleotides that form a DNA double helix. One of the most deleterious forms of DNA damage is a DNA double-strand break (DSB) in which both strands of the helix are broken. When not repaired adequately DSBs can lead to extensive loss of genetic information and/or genomic rearrangements, ultimately fueling genome instability, cellular dysfunction and malignant transformation. The high mutagenic and cytotoxic potential of DSBs poses a serious threat to human health, but also can be exploited to eradicate malignant cells. In fact, rapidly dividing cancer cells are often hypersensitive to DSB-inducing agents, including ionizing radiation (IR) and radiomimetic drugs. Surprisingly, certain cellular developmental programs actually depend on DSB formation, including the generation of gametes. Novel insights on the endogenous sources of DSBs as well as the mechanisms that deal with these toxic lesions should help us to better understand the complex processes underlying diseases such as cancer, as well as providing clues for treatment optimization. Furthermore, fundamental research on genome stability helps clarifying the driving forces of species evolution.

Chapter 1 summarizes the major contributions and recent progress in the *C. elegans* research field aimed to elucidate the complex networks involved in DSB repair. We describe the role of different DSB repair routes during nematode development and focus on two major DSB repair pathways: Non-Homologous End Joining (NHEJ) and Homologous Recombination (HR), the latter being widely studied due to its crucial role during gametogenesis.

Chapter 2 describes the identification of COM-1 (the ortholog of tumor suppressor CtIP) as a key factor dictating DSB repair pathway choice during gametogenesis. Germ cells lacking COM-1 suffer from unscheduled NHEJ activities that disturb programmed HR events during meiosis, ultimately resulting in chromosomal abnormalities and loss of progeny viability. Deleting the toxic NHEJ components in *com-1* deficient animals alleviated the meiotic defects and restored embryonic survival. Further genetic dissection revealed a redundant role for COM-1 and the nuclease EXO-1 in DNA end resection, a DSB processing step that enables HR.

Chapter 3 involves the characterization of the malignant brain tumour (MBT) domain protein LIN-61, which was identified in our lab to maintain genome stability in *C. elegans* germ cells. We combined various DNA repair assays and germline cytology techniques to reveal a role for LIN-61 in DSB repair via HR.

Chapter 4 entails our search for novel regulators of NHEJ, the major DSB repair pathway in somatic tissues. By generating a transgenic strain that allowed *in vivo* detection of NHEJ activity and performing unbiased forward genetics screens, a set of mutant animals was identified that had altered DSB repair efficacy. Interestingly, several mutants not only displayed defects in NHEJ and somatic IR-resistance, but also had common defects in mRNA splicing, revealing a new link between mRNA metabolism and NHEJ regulation.

In *chapter 5* we look into endogenous sources of DSBs and found an important role for DNA secondary structures in genome instability. Next to the canonical double helix, certain DNA sequences can fold into other inter- and intramolecular structures. One well-studied DNA secondary structure that is very stable under physiological conditions and is a potent replication block *in vitro* is the G4 quadruplex. Here evidence is presented for a model in which a single persistent G4 quadruplex can result in multiple genomic rearrangements during animal development, revealing the mutagenic potential of G4 DNA sequences and the biological significance of helicases that act on these DNA secondary structures.

Chapter 6 describes our efforts in resolving the repair mechanisms that act on G4-induced DSBs. Previously, our lab identified a novel DSB repair pathway, called polymerase Theta-Mediated End Joining (TMEJ) that acts on replication-born DSBs. Here we show that DNA sequence context can direct repair pathway choice at G4 sites: While G4-induced genomic rearrangements at non-repetitive DNA typically requires TMEJ, the presence of short DNA repeats flanking the G4 sequence bypasses this requirement and promotes homology-directed repair mechanisms.

All together these data indicate that animals possess a wide range of repair mechanisms to fix deleterious DSBs, which can arise from various sources, including IR, developmentally programmed nucleases and stochastic DNA replication impairments. Different repair routes can be used depending on cell type, protein expression, DSB nature, sequence context and repair substrate availability. Because each DSB repair route has unique consequences on repair outcome, the choice of repair can have tremendous influence on the genetic footprint a DSB leaves behind. This delicate balance has allowed DSBs to evolve as crucial substrates for developmental programs including gametogenesis, but also provides clues on how such lesions can change our genomes and promote serious diseases like cancer.

Nederlandse samenvatting

Dit proefschrift beschrijft een aantal studies die we hebben uitgevoerd om te onderzoeken hoe levende organismen hun genetisch materiaal op orde houden en hoe verschillende reparatiemechanismen hun sporen achter laten in het DNA van ontwikkelende dieren. De opeenstapeling van fouten in DNA kan leiden tot ernstige ontwikkelingsdefecten en veroudering, en ligt ten grondslag aan ziekten zoals kanker. Maar wat is DNA precies en waarom kunnen kleine foutjes in DNA zo'n grote gevolgen hebben? Om deze vraag te beantwoorden zal ik eerst het moleculairbiologisch kader schetsen waarin deze processen zich afspelen.

Een kijkje in de cel

Het menselijk lichaam bestaat uit vele miljarden cellen met elk hun taak en specialisatie. Fascinerend genoeg komt ieder mens voort uit één enkele cel, die na het samensmelten van de zaad- en eicel vele malen moet delen om alle weefsels en organen te kunnen vormen. Deze ene cel bevat alle informatie nodig om een compleet organisme te maken en is een mix van genetische eigenschappen van zowel vader als moeder.

Een cel vormt de kleinste bouweenheid van elk organisme, maar is tegelijkertijd ook een hele wereld op zich, of beter gezegd een stad (Figure 1). Zoals elke grote stad heeft iedere cel ook een stadsmuur (celmembraan), energie centrales (mitochondriën), fabrieken (ribosomen), transportbedrijven (golgi-systeem) en een bibliotheek (*celkern*). De bibliotheek is heel belangrijk, want hier is alle informatie opgeslagen die de stad nodig heeft om te kunnen functioneren. In deze bibliotheek liggen alle boeken, genaamd *chromosomen*, waar in staat hoe de cel de bouwstoffen en gereedschappen moet maken die nodig zijn om de stad te kunnen repareren indien nodig, maar ook hoe een stad/cel zich kan vermenigvuldigen. Elke keer dat een cel deelt moet deze hele bibliotheek dus ook netjes worden gekopieerd (*DNA replicatie*), zodat de dochtercellen ook toegang hebben tot alle genetische informatie.

DNA: het recept voor leven

Deze genetische informatie is opgeslagen in de vorm van *DNA*: twee complementaire kralensnoeren die een wenteltrap/helix vormen (Figuur 1 en 2A). De genetische informatie is gecodeerd in de volgorde van de kralen/traptreden, genaamd *basen* en er zijn vier verschillende DNA basen: guanine (G), cytosine (C), adenine (A) en thymine (T). Het feit dat G altijd paart met C in de DNA helix, en A altijd met T, zorgt er voor dat de twee strengen kunnen dienen als een backup voor elkaar wanneer één streng haar coderende informatie verliest (Figuur 2A). Deze structuur maakt DNA zo'n succesvolle en veilige drager van de genetische code.

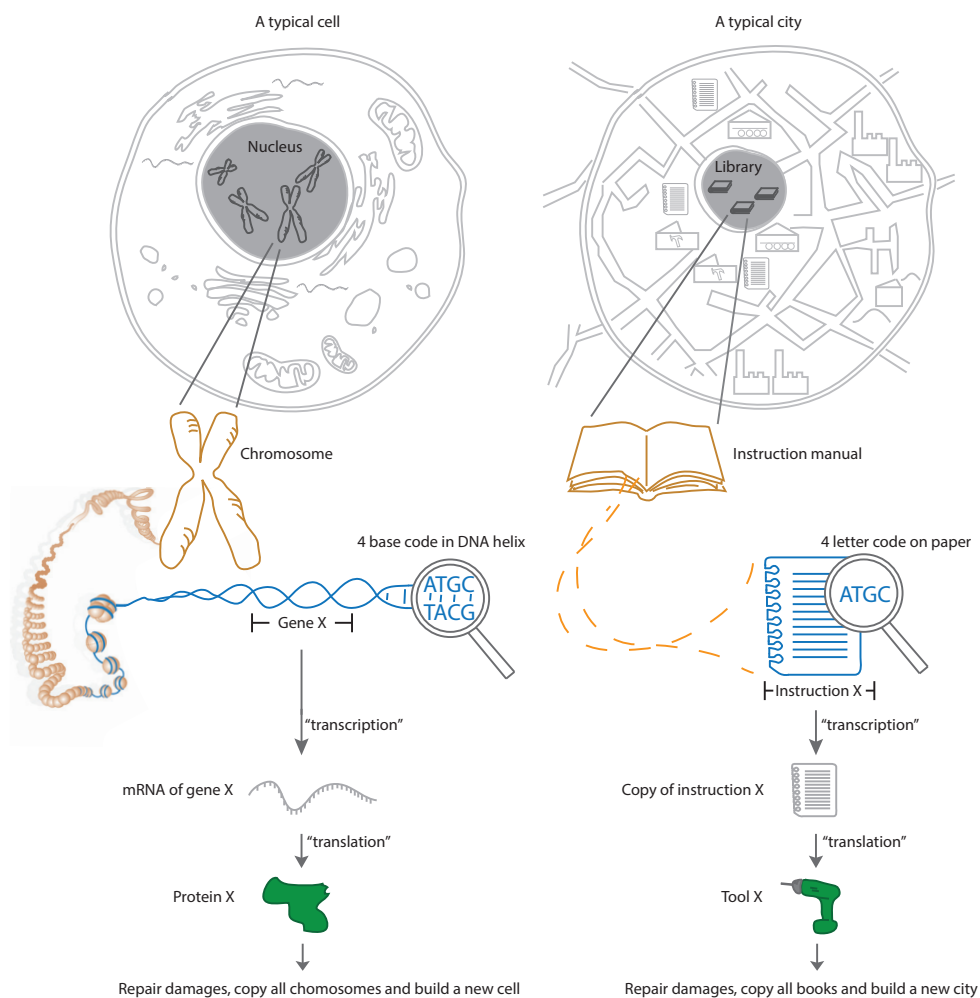
Een stuk coderend DNA noemen we een *gen* en het hele genenpakket van een organisme noemen we het *genoom* (Figuur 1). Genen coderen vaak voor *eiwitten*, de bouwstenen en werkpaarden voor een cel. De eigenschappen van een cel worden bepaald door welke genen worden afgelezen (Figuur 1). Met andere woorden, alle cellen binnen een organisme bevatten dezelfde bibliotheek, maar niet alle boeken zijn op dezelfde pagina's opgeslagen. Een intact genoom is van cruciaal belang omdat beschadigde genen foute instructies kunnen geven, waardoor de cel kan sterven of juist ongeremd gaat delen. Dat laatste noemen we *kanker*.

Gezien de mogelijke desastreus gevolgen van DNA schade worden de chromosomen beschermd van de buitenwereld en blijven deze 'boeken' uitsluitend in de celkern. Om de gen-instructies toch naar de eiwitfabrieken buiten de celkern te brengen wordt de genetisch code vertaald naar strengen 'messenger RNA' of *mRNA* (Figuur 1). De stabiliteit, vorm en lokalisatie van mRNA biedt de cel nog een extra laag van regulatie op eiwitproductie en daarmee ook op allerlei moleculaire processen.

DNA onderhoud: een millennia oude noodzaak

Een belangrijke set van genen is die van DNA reparatiegenen. De integriteit van ons genoom wordt continue bedreigd door agentia die DNA kunnen beschadigen, waaronder zonlicht, chemische stoffen uit bijvoorbeeld sigaretten, maar ook diverse bijproducten die intrinsiek gekoppeld zijn aan ons cellulair metabolisme. Processen die leiden tot veranderingen in het genoom noemen we *mutageen*. Zonder DNA reparatie-eiwitten accumuleert het genoom veel veranderingen (*mutaties*), waardoor in de loop der tijd cellen kunnen ontstaan die zich gaan misdragen. Personen die een mutatie dragen in het BRCA1 gen bijvoorbeeld, hebben een defect in het repareren van DNA breuken, en families met zo'n mutatie hebben een sterk verhoogde kans op kanker. Omdat defecten in DNA reparatiegenen vaak ten grondslag liggen aan verscheidende erfelijke vormen van kanker worden deze genen vaak ook *tumorsuppressors* genoemd.

Het belang van DNA reparatiegenen wordt nog eens verder benadrukt door het feit dat deze genen sterk geconserveerd zijn tijdens evolutie. Met andere woorden, de universele en essentiële rol van DNA heeft er toe geleid dat genen betrokken bij het kopiëren en repareren van DNA zijn behouden zelfs na miljoenen jaren selectie. Dit betekent ook dat DNA reparatiegenen in een fruitvlieg, worm, muis of mens veel met elkaar gemeen hebben en dat we de functies van deze factoren in modeldieren vaak kunnen extrapoleren naar die van de mens.



Figuur 1: Vergelijking tussen een menselijke cel en een stad

Schematisch weergave van een menselijke cel (links) en een stad (rechts). Menselijke cellen en steden hebben vergelijkbare structuren, zoals de celkern (nucleus) en de bibliotheek (library). De integriteit van informatiedragers, zoals het DNA in chromosomen (in de cel) of de tekst in boeken (in de stad) zijn van cruciaal belang voor het goed functioneren van de cel/stad. Zie Nederlandse samenvatting voor details.

DNA dubbelstrengs breuken

Dit proefschrift concentreert zich op het herstellen van zogenaamde *DNA dubbelstrengs breuken* (DSBs), dat wil zeggen, lesies waarbij beide strengen van de DNA helix zijn gebroken (Figuur 2B). DSBs zijn erg gevaarlijk omdat ze kunnen leiden tot het verlies van grote stukken genetische informatie en/of ongewenste chromosoomfusies, wat uiteindelijk weer kan leiden tot genoominstabiliteit, cellulaire dysfunctie en kanker. De mutagene en cytotoxische eigenschappen van DSBs vormen een ernstige bedreiging voor de volksgezondheid, maar

kunnen gelukkig ook worden benut om kwaadaardige cellen uit te roeien. Sneldelende kankercellen zijn namelijk overgevoelig voor DSB-inducerende middelen, zoals ioniserende straling en diverse chemotherapeutische geneesmiddelen. Daarnaast zijn bepaalde cellulaire ontwikkelingsprogramma's verrassend genoeg afhankelijk van DSB formatie. Zo ondergaat bijvoorbeeld elke geslachtscel tientallen geprogrammeerde DNA breuken tijdens haar ontwikkeling.

Nieuwe inzichten over de endogene bronnen van DSBs en de mechanismen die omgaan met deze gevaarlijke lesies kunnen helpen om complexe ziekten zoals kanker beter te begrijpen, alsmede aanwijzingen verschaffen die de behandeling van kanker kunnen optimaliseren. Bovendien kan fundamenteel onderzoek naar DSB reparatie helpen bij het blootleggen van de drijvende krachten achter evolutie en soortvorming.

***Caenorhabditis elegans* als diemodel**

Om DSB reparatie te bestuderen heb ik gebruik gemaakt van een nematodesoort genaamd *C. elegans*. Dit 1 millimeter lange wormpje dient als een eenvoudig diemodel voor complexe organismen zoals de mens en heeft al geleid tot vele belangrijke ontdekkingen waar onder meer verschillende Nobelprijzen voor zijn uitgereikt. *C. elegans* heeft een korte levenscyclus (2-3 dagen) en een relatief compact genoom (30 keer kleiner dan de mens). Daarnaast kunnen we haar genoom relatief makkelijk aanpassen, waardoor we de worm nieuwe eigenschappen kunnen geven (*genetische manipulatie*). Deze eigenschappen maken diepgaande genetische analyse van mutagene processen mogelijk en we hebben deze eigenschappen dan ook benut om i) deze dieren te veranderen in levende sensoren van DNA-schade ii) nieuwe factoren te vinden betrokken bij genoomstabiliteit, iii) mechanismen te onthullen die DNA-reparatie keuze dicteren, en iv) de biologische gevolgen te bepalen van DSBs die voortkomen uit DNA replicatie problemen.

DSB reparatieroutes

Er zijn verschillend reparatiemechanismen geëvolueerd die DSBs kunnen 'lijmen' (Figuur 2B). Welke DSB reparatieroute gebruikt wordt is onder meer afhankelijk van het celtype (en de reparatiefactoren die hierin tot expressie komen), de DNA sequentiecontext van de breuk en de aanwezigheid van 'reparatie-templates.'

De voornaamste DSB reparatieroute in menselijke cellen heet *non-homologous end joining (NHEJ)* en kan breuken repareren onafhankelijk van de DNA sequentie context (Figuur 2B). De eerste stap in NHEJ is het beschermen van de dubbelstrengs breukeinden door zogenaamde Ku eiwitten (*DSB end protection*). Vervolgens rekruteren de Ku eiwitten een eiwitcomplex dat de breukeinden bijeenhoud (*DSB end bridging*). Dit complex bevat ook een DNA ligase die de DNA uiteinden daadwerkelijk aaneen lijmt (*DNA ligation*). NHEJ is een snelle en effectieve manier van DSB herstel maar heeft één groot nadeel: de afwezigheid van

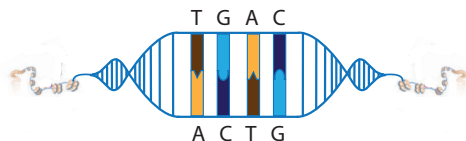
een DNA sequentie controle. Hierdoor kan NHEJ resulteren in kleine deleties of inserties en in het geval van meerdere DSBs leiden tot foutieve chromosoomfusies. Om deze redenen wordt NHEJ 'error-prone' genoemd.

De overige DSB reparatieroutes beginnen in tegenstelling tot NHEJ met 'DNA end resection'; een DSB verwerkingstap waarbij de dubbelstrengs breukeinden niet worden beschermd maar juist worden omgezet in enkelstrengs DNA staarten (Figuur 2B). Deze blootgelegde enkelstrengs DNA sequenties kunnen nu gaan paren met 'homologe' DNA sequenties waardoor de stabiele dubbelstrengs DNA helix wordt hersteld. Als beide breukeinden homologe/passende sequenties bevatten kunnen deze 'repeats' paren om zo de breuk te overbruggen; afhankelijk van de lengte van de homologe sequenties spreekt men dan van *single strand annealing* (SSA) of *microhomology mediated end joining* (MMEJ) (Figuur 2B). SSA en MMEJ zijn per definitie mutageen omdat er van twee repeats één wordt gemaakt en er dus altijd genetische informatie verloren gaat.

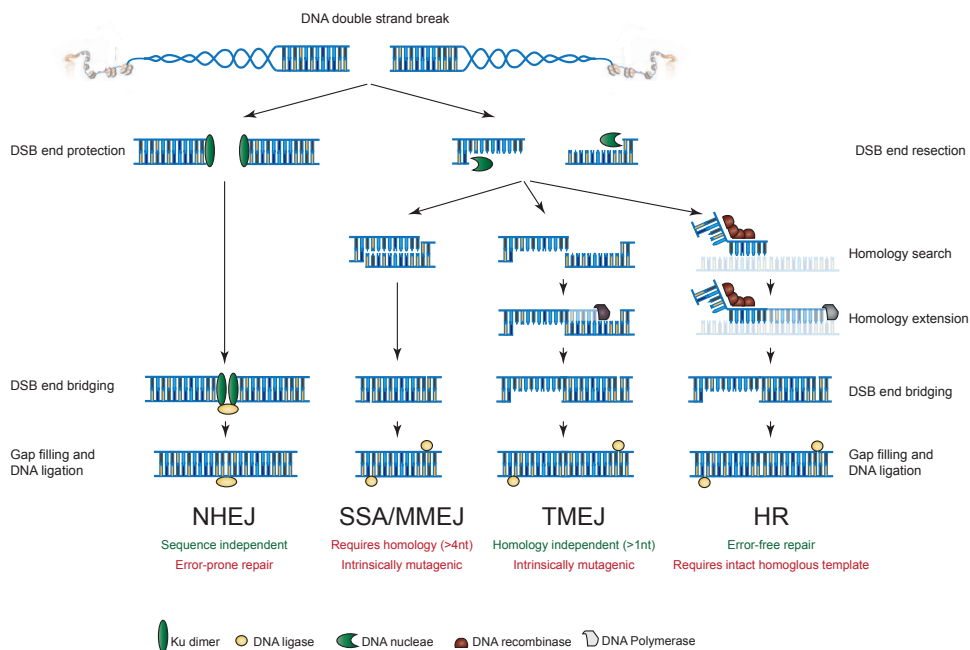
Recentelijk heeft onze onderzoeksgroep een alternatieve DSB reparatieroute beschreven genaamd *polymerase Theta mediated end joining* (TMEJ). Deze route is belangrijk bij het herstellen van DSBs die ontstaan tijdens het kopiëren van het genoom en kan acteren in de afwezigheid van homologe repeats. In het opgestelde model herstelt TMEJ een DSB door één DNA base van beide breukeinden te laten paren en deze te laten verlengen door polymerase Theta, een eiwit dat DNA basen kan inbouwen (Figuur 2B). Hierdoor ontstaat weer een stabiele dubbelstrengs DNA helix en is de breuk overbrugd. Ook hier kunnen enkele basenparen verloren raken en soms bouwt polymerase Theta extra DNA basen in, hetgeen TMEJ mutageen maakt.

Er is echter één DSB reparatiemechanisme dat in principe geen mutaties achterlaat: *homologous recombination* (HR). Ook HR begint met 'DNA end resection', maar nu worden de enkelstrengs DNA staarten geladen met zogenaamde *recombinase* eiwitten (Figuur 2B). Zo'n DNA/recombinase complex kan nu op zoek gaan naar homologe DNA templates die niet beschadigd zijn, en vanuit daar de verloren informatie inkopiëren. In delende cellen kan bijvoorbeeld het recentelijk gemaakte kopie van het chromosoom (*zusterchromatide*) dienen als ideaal reparatie-template. Tijdens HR wordt zo'n intact homologe template gebruikt om de enkelstrengs DNA eindjes te verlengen, zodat deze lang genoeg zijn om de breuk kunnen overbruggen (Figuur 2B). Zodra eventueel overgebleven gaatjes weer zijn gevuld en beide strengen zijn dichtgelijmd door DNA ligases is de DNA helix weer volledig hersteld en is er geen informatie verloren gegaan.

A.



B.



Figuur 2: Verschillende mechanismen om dubbelstrengs DNA breuken te repareren

A. Schematische weergave van de genetische code zoals opgeslagen in de base-volgorde van de DNA helix **B.** Overzicht van de verschillende DNA dubbelstrengs breuk reparatieroutes en hun voor- en nadelen. Bescherming van de breukeinden door Ku eiwitten (DSB end protection) initieert NHEJ, terwijl het exposeren van enkelstrengs breukeinden (DSB end resectie) kan resulteren in SSA, MMEJ, TMEJ en HR. Deze laatste reparatieroutes maken allen gebruik van DNA basenparing, maar de oorsprong en hoeveelheid van de benodigde homologe basen is verschillend. Legenda toont de kern-eiwitfuncties nodig voor DNA dubbelstrengs breuk herstel. Zie Nederlandse samenvatting voor details.

De wetenschappelijke bijdrage van dit proefschrift

Dit proefschrift beschrijft de experimenten die zijn uitgevoerd om de gevolgen en reparatiemogelijkheden van DSBs verder in kaart te brengen. Hoofdstuk 1 geeft een overzicht van de recente ontwikkelingen in het onderzoeksveld waarbij *C. elegans* is gebruikt om DSB reparatiemechanismen op te helderen. Hieruit blijkt dat veel onderzoek is gedaan naar DSB herstel via HR omdat dit de dominante reparatieroute is om de geprogrammeerde DNA breuken in geslachtscellen te herstellen.

In hoofdstuk 2 beschrijven we een nieuwe rol voor het eiwit COM-1 (de wormenvariant van de menselijke tumorsuppressor CtIP) tijdens de productie van geslachtscellen. We brengen een essentiële rol voor COM-1 aan het licht die gelegen is in het onderdrukken van NHEJ in geslachtscellen; in de afwezigheid van COM-1 worden de geprogrammeerde DSBs niet gerepareerd via HR maar gebonden door Ku eiwitten, met vele NHEJ-gemedieerde chromosoomfusies tot gevolg. Door Ku te verwijderen in COM-1 deficiënte dieren konden we deze chromosomale afwijkingen opheffen en de hoeveelheid levensvatbaar nageslacht drastisch verbeteren. Deze observaties geven een nieuwe kijk in de biologische functie van de tumorsuppressor CtIP alsmede de mogelijke toxische gevolgen van NHEJ.

In hoofdstuk 3 en hoofdstuk 4 beschrijven we de identificatie en karakterisatie van nieuwe factoren nodig voor efficiënte DSB reparatie. Zo beschrijven we een nieuwe rol voor het eiwit LIN-61 in HR en een verrassende rol van mRNA bindende eiwitten in het bevorderen van NHEJ in *C. elegans*. Om deze nieuwe factoren te kunnen vinden hebben we verschillende wormen geconstrueerd die groen fluorescerend licht geven wanneer ze een DSB hebben hersteld. Deze studies dragen bij aan het in kaart brengen van de cellulaire mechanismen die genoomstabiliteit bevorderen en bieden onderzoekers extra gereedschappen om DSB reparatie in levende dieren te meten.

Hoofdstukken 5 en 6 omvatten nieuwe bevindingen omtrent DNA replicatie blokkades en hun rol in het genereren van DSBs tijdens de ontwikkeling van dieren. DNA sequenties rijk aan de base guanine kunnen naast de DNA helix ook andere vormen aannemen, zogenaamde G4-quadruplex structuren. Dit zijn een soort knopen van enkelstrengs DNA waar de DNA polymerase die normaal het genoom kopieert op vast loopt. Deze 'DNA knopen' moeten daarom worden ontwonden door speciale *helicase* eiwitten zoals DOG-1 (de wormenvariant van tumorsuppressor FANCI). In hoofdstuk 5 dragen we bevindingen aan die argumenteren dat in de afwezigheid van DOG-1 deze 'DNA knopen' in het genoom van de worm blijven zitten en leiden tot meerdere DSBs gedurende de ontwikkeling van het dier. Dit is de eerste keer dat het lot van één enkele secundaire DNA structuur is blootgelegd in levende dieren en benadrukt het belang van dit soort helicases voor genoomstabiliteit; ook gegeven het feit dat het menselijk genoom meer dan honderdduizend G-rijke sequenties bevat die mogelijk G4-quadruplexes kunnen vormen. In hoofdstuk 6 laten we zien dat deze G4-geïnduceerde DSBs veelal gerepareerd worden via TMEJ, maar dat de noodzaak van polymerase Theta wordt opgeheven als er flankerende DNA repeats aanwezig zijn. Deze laatste observatie geeft inzicht in het mechanisme van de nog redelijk onbekende TMEJ route en doet suggereren dat polymerase Theta vooral nodig is om homologe sequenties aan breukeinden te creëren om zo uiteindelijk de DSB te kunnen overbruggen (Figuur 2).

Conclusie

Dit proefschrift biedt verscheidende nieuwe inzichten in het ontstaan en repareren van DSBs en legt de mogelijke gevolgen bloot van mutagene reparatiemechanismen. Zo hebben we nieuwe regulators van NHEJ gevonden die belangrijk zijn voor DSB herstel in *C. elegans*, maar we tonen ook aan dat NHEJ erg gevaarlijk kan zijn tijdens de ontwikkeling van geslachtscellen. Strakke coördinatie is dus nodig om de verschillende reparatieroutes op elkaar af te stemmen zodat DNA breuken efficiënt maar ook accuraat worden hersteld.

Daarnaast dragen we additioneel bewijs aan dat specifieke DNA sequenties in het genoom een bedreiging kunnen vormen voor genoomstabiliteit omdat ze stabiele DNA structuren kunnen vormen die het nauwkeurig kopiëren van het genoom verhinderen. Secundaire DNA structuren die niet worden ontwonden vormen een aanhoudende bron van DSBs die na reparatie via TMEJ meerdere mutaties kunnen veroorzaken in ontwikkelde dieren.

Curriculum vitae

Bennie Lemmens was born on February 21, 1984 in Casteren, the Netherlands. He attended the Pius X College in Bladel from 1996 to 2002, where he specialized in the “Nature and Health” profile. After receiving his VWO diploma, he enrolled the study Biology at the Utrecht University and obtained his Bachelor’s degree in 2005. Later that year he enrolled the international prestige Master ‘Developmental Biology and Biomedical Genetics’ at the Utrecht University. As part of his Master’s program he performed his first internship at the laboratory of Dr. Rene Medema at the Utrecht Medical Centre, where he studied the role of Polo-like kinase 1 in DNA damage checkpoint signaling in human cancer cells. His second internship was performed at the laboratory of Dr. Ronald Plasterk at the Hubrecht Institute, where he used the model organism *C. elegans* to study microsatellite instability and screened for new DNA repair genes. In 2007 he wrote his Master thesis on the clinical applications of RNA interference at the lab of Dr. Rene Ketting and was awarded Master of Science. In October of the same year, Bennie started his PhD studies under the supervision of Dr. Marcel Tijsterman at the Hubrecht Institute in Utrecht. In 2009, the Tijsterman group moved to the city of Leiden where the research was continued in the department of Toxicogenetics at the Leiden University Medical Centre. The key results Bennie obtained during his PhD are described in this thesis and involve various aspects of genome instability during animal development. In 2014 he will continue his career as a postdoctoral fellow at the Karolinska Institute in Stockholm, Sweden, where he will use high-end microscopy to study DNA damage signaling and cell cycle regulation in the laboratory of Dr. Arne Lindqvist.



Acknowledgements

Jaren heb ik hier naar toegewerkt en trots ben ik op het resultaat: een boekje met allerlei wetenschappelijke bevindingen die voor de eerste keer zijn geobserveerd op deze aarde. Ik realiseer me ook dat er veel níet in staat. Mappen vol experimenten die het proefschrift helaas niet hebben gehaald omdat de technieken, tijd, of biologie niet wilden mee werken. Maar ook dát is wetenschap en ik hoop me nog jaren te kunnen verwonderen over de prachtige biologie die onze aarde rijk is. Maar wetenschappelijk onderzoek doe je niet alleen. Ik ben ontzettend dankbaar voor de steun, wijze lessen en fijne tijd die ik heb mogen ervaren tijdens mijn promotie. Super bedankt allemaal voor jullie bijdrage aan dit werk!

Op de eerste plaats Marcel; mijn promotor, baas, compagnon, sparringpartner en ideeën kanon. Je gaf me veel vrijheid en je deur stond altijd open: voor mij een ideale leer- en werkomgeving. We hebben naast ontelbare mailtjes met (te) gekke hypothesen, ook vele ideeën uitgewisseld over het bedrijven van wetenschap: van het runnen van gelen tot het runnen van een onderzoeksgroep. Ik heb veel respect voor je enthousiasme en je open doch scherpe blik op de wereld.

Leon bedankt voor het warme welkom in Leiden, je jarenlange inzet voor de afdeling en het feit dat je mijn interim-promotor wilde zijn.

Waar zou ik zijn zonder mijn directe collega's en oud-collega's van de Tijstermangroep: Daphne, Evelien, Karin, Kristy, Sophie, Wouter, Jennemiek, Nick, Marijn, Ron, Robin, Jane, Ivo, Evelina, Jordi, Maartje en Juliëtte. Stuk voor stuk toppers en een geweldig team door de jaren heen. Daphne, ik heb veel van je geleerd als student én collega en heb je boekje menigmaal opengeslagen. Ook een speciaal bedankje voor Jennemiek, Evelien, Ron en Jane; jullie buitengewone inzet heeft het onderzoek in hoofdstuk 3 en 6 vele malen versneld. Also thanks to my fellow 'mannex'-members, Nick, Marijn and Wouter; you all gave me support when I needed it very badly and brought a wide spectrum of music into my life, both of which I will never forget. Sophie en Ivo, jullie ideeën waren vaak om te smullen. Evelina, Maartje en Juliëtte, bedankt voor jullie frisse kijk op mijn experimenten en jullie hulp bij het zoeken naar end joining factoren. Jordi, thanks a lot for helping me out on my job search in Sweden.

Mijn studenten Claudia, Chantal, Cynthia en Renier bedankt voor jullie bijdrage aan mijn onderzoek. Verder wil ik ook alle overige collega's op het Hubrecht, UMC, UU, Erasmus MC en LUMC niet vergeten, omdat ze een vruchtbare omgeving hebben gevormd die mij als wetenschapper enorm hebben gesterkt. Zo wil ik graag het Medema lab bedanken voor mijn eerste lab-ervaringen en de wijze lessen op het gebied van kankerwetenschap, de Utrechtse 'worm club' voor leuke seminars, de Hubrecht crew voor fantastische borrels, Teije en Martin voor een onvergetelijke trip naar de International *C. elegans* meeting, alle TOXGEN collega's voor de hevige literatuuurdiscussies, alle lotgenoten van MGC voor de fameuze PhD workshops en my fellow Lemmy's-fans (including Wouter W, Godelieve, Angela, Mark, Agata,

Erik, Thomas and Mona) for all the witty discussions about evolution and ethanol. Allemaal bedankt voor de geweldige tijd!

Promovendus zijn betekent soms hele dagen door de microscoop turen, duizenden wormen picken, avonden puzzelen op een observatie, dat manuscript toch nog maar eens doorlezen op bed en wakker liggen van negatieve resultaten. Afleiding is dan ook broodnodig om succesvol te kunnen zijn op je werk. Gelukkig kon ik bij veel vrienden terecht voor een lach, een tactische spelletje of gewoon een goed gesprek. Boven de rivieren, mijn jaarclub (Aike, Alban, Ayelt, Bas, Gijs, Hanno, Ido, Kawai, Mattijs, Menne, Paul en Yuri), het BG en Club Funghi en onder de rivieren, vrienden van het eerste uur (Tijs, Gijs, Hans, Melvin, Ronnie en Olav) en alle gezellige aanhang natuurlijk.

Ik ben ook dankbaar dat de genetica mij nooit in de steek heeft gelaten en dan doel ik op mijn directe bloedverwanten, hun partners en kruisnageslacht. Als jongste broertje en ome Bennie heb ik zo veel geleerd van jullie: Doret, Johan, Timo, Isa, Jordi, Stijn, Heidi, Djoy, Juul, Frank, Susanne, Lynn, Ise, Jorn, Anton, Linda, Guusje en Ties. Aan de nieuwsgierigheid en open blik van een kind kan menig wetenschapper een voorbeeld nemen.

En natuurlijk mijn ouders; jullie hebben me gesteund in ieder aspect van mijn leertraject en me de kans gegeven om me te ontplooien tot wetenschapper. Pap, helaas heeft het niet zo mogen zijn dat je mijn verdediging mee hebt kunnen maken; ik had je graag de bloemen op de berg laten zien. Mam, je hebt altijd in me geloofd en ik kan altijd op je rekenen. Je bent een rots voor ons allemaal.

Dan rest me nog om mijn paranimfen te bedanken. Het is een luxe om twee slimmeriken van dit kaliber aan mijn zijde te hebben. Robin, je bent onmisbaar geweest voor dit werk; van wormeninjecties tot bio-informatisch abracadabra, geen verzoekje ging je te ver. Dimitris, you are a great scientist and as 'wise as' Solomon.

Last but not least, Ana. Your advice and moral support has made this thesis a better product and has led me to new scientific adventures. You give me direction and make me complete.

List of publications

Lemmens BB, Tijsterman M.

DNA double-strand break repair in *Caenorhabditis elegans*
Chromosoma. 2011

Lemmens BB, Johnson NM, Tijsterman M.

COM-1 promotes homologous recombination during *Caenorhabditis elegans* meiosis by antagonizing Ku-mediated non-homologous end joining
PLoS Genet. 2013

Lemmens BB, van Schendel R, Tijsterman M.

PNN-1 and UAF-1 link RNA splicing to DNA repair by Non-Homologous End Joining
Manuscript in preparation

Lemmens BB, van Schendel R, Tijsterman M.

A single unresolved G4 quadruplex structure spawns multiple genomic rearrangements during animal development
Manuscript in preparation

Johnson NM, **Lemmens BB**, Tijsterman M.

A role for the malignant brain tumour (MBT) domain protein LIN-61 in DNA double-strand break repair by homologous recombination
PLoS Genet. 2013

Waaaijers S, Portegijs V, Kerver J, **Lemmens BB**, Tijsterman M, van den Heuvel S, Boxem M.
CRISPR/Cas9-Targeted Mutagenesis in *Caenorhabditis elegans*
Genetics. 2013

