



Universiteit
Leiden
The Netherlands

The role of homologous recombination in mitotic and meiotic double-strand break repair

Vries, Femke Adriana Theodora de

Citation

Vries, F. A. T. de. (2007, January 17). *The role of homologous recombination in mitotic and meiotic double-strand break repair*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/8784>

Version: Corrected 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/1887/8784>

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

Samenvatting

Samenvatting

DNA, in kranten vaak de blauwdruk van het leven genoemd, wordt continu van buitenaf bedreigd. Gelukkig beschikken cellen over een uitgebreid pakket aan noodmaatregelen om het genetische materiaal intact te houden. Gaat het in enkele gevallen toch fout, dan kan dat leiden tot kanker. Dit proefschrift gaat over één van die onmisbare maatregelen, waarmee de cel haar DNA beschermt. Om deze samenvatting te kunnen begrijpen, zal ik eerst een globale uitleg moeten geven over wat die allerbelangrijkste bouwsteen van levende wezens: het DNA, is.

Elke vorm van leven op aarde is opgebouwd uit één of meer cellen. De kleinste organismen bestaan uit slechts één cel, terwijl grotere organismen uit enkele tot honderd biljoen (een 1 met 14 nullen) cellen zijn opgebouwd. In alle cellen van levende wezens zit DNA, dat niet los in de celvloeistof ligt, maar stevig verpakt is binnen de membranen van de celkern. Niet al te lang geleden, in 1944, bewees Oswald T. Avery dat in het DNA, in codevorm, de erfelijke aanleg van organismen wordt beschreven.

De celkern ligt vol met DNA. Ieder soort organisme heeft een verschillend aantal DNA-moleculen per celkern. Die afzonderlijke DNA-moleculen worden chromosomen genoemd. Zo hebben mensen in elke celkern 46 chromosomen, die samen alle erfelijke eigenschappen van een mens dragen. Die chromosomen zijn veelal verschillend van grootte, maar toch steeds twee aan twee gelijk. De gelijke chromosomen vormen een paar. Menselijke cellen hebben dus 23 paar chromosomen in elke celkern. De informatie op de chromosomen is in elke cel gelijk. Om te zorgen dat deze informatie steeds goed wordt doorgegeven als een cel zich deelt, worden alle chromosomen voor de deling exact gekopieerd. Bij de normale celdeling (mitose) worden de verdubbelde chromosomen vervolgens simpelweg verdeeld over twee nieuwe cellen. Iedere nieuwe cel krijgt op deze manier de volledige set erfelijke eigenschappen mee. Bij de bijzondere celdeling die voorafgaat aan de vorming van voortplantingscellen (meiose), wordt het DNA ook eerst verdubbeld maar daarna in twee stappen (meiose I en II) verdeeld over uiteindelijk vier voortplantingscellen. Elke op deze manier gevormde geslachtscel bevat zo de helft van het aantal chromosomen, slechts één chromosoom van elk paar. Wanneer nu bij de bevruchting twee geslachtscellen versmelten, komen de chromosomen in het nieuw gevormde leven weer in paren voor: één chromosoom van elk paar is afkomstig van vader, één van moeder.

Kleinere stukjes van een chromosoom, de genen, bepalen telkens één van de erfelijke eigenschappen. In 2001 is aangetoond dat een mens 20.000 tot 25.000 verschillende genen heeft. Uiterlijke kenmerken van organismen worden bijvoorbeeld voor een belangrijk deel door erfelijke eigenschappen bepaald; hierbij kun je denken aan de oogkleur van mensen. Soms wordt een eigenschap

Samenvatting

door één enkel gen bepaald, maar veel vaker zijn er bij eigenschappen meer genen betrokken. Elk gen geeft de instructie voor de bouw van één bepaald eiwit met een eigen specifieke functie. Eiwitten kunnen betrokken zijn bij de opbouw van cellen, maar ze kunnen ook een veel belangrijkere taak hebben, namelijk het uitvoeren van alle levensfuncties. Deze laatste groep eiwitten, de werklieden van de cel die alle reacties in goede banen leiden, heten enzymen.

Als we chromosomen wat verder uitvergrooten, dan zien we zeer lange ketens DNA. In 1953 waren de chemische componenten van het DNA bekend. James Watson en Francis Crick deden toen een voorstel voor de structuur van het DNA, zonder dat zij DNA ooit hadden kunnen zien. Later bleek het door Watson en Crick beschreven model juist te zijn. DNA lijkt op een wenteltrap en bestaat uit twee in elkaar gedraaide moleculen waarvan de ruggengraat gevormd wordt door een keten van afwisselend suiker en fosfaat groepen. De verbinding tussen de twee spiraalvormige ketens wordt gevormd door de vier verschillende basen van het DNA: A (adenine), C (cytosine), G (guanine) en T (thymine). C hecht altijd aan G in de tegenoverliggende keten en A hecht aan T in de tegenoverliggende keten. Zo vinden we op het DNA een lange reeks basenparen G-C, A-T, C-G en T-A, in een wisselende volgorde die uniek is voor ieder individu. De code in het DNA, geschreven in een vier-letterig alfabet, wordt gebruikt als recept om eiwitten op te bouwen en biedt de mogelijkheid om de erfelijke eigenschappen van een individu vast te leggen.

Er kunnen spontaan veranderingen (mutaties) in het erfelijk materiaal ontstaan. We spreken van mutaties op het moment dat één of meer letters in het molecuul anders is/zijn (bijvoorbeeld een A wordt een C), of als letters zijn weggevallen (een TCAG wordt een TAG) of toegevoegd. Mutaties zijn vaak handig, ze zorgen voor variatie in erfelijke eigenschappen en maken evolutie mogelijk. Soms heeft een mutatie ernstige gevolgen: als de DNA-code van een gen beschadigd wordt, kan een bepaald eiwit of enzym niet meer of nog maar gedeeltelijk functioneren. De specifieke taak van het eiwit bepaalt de ernst van de gevolgen.

Mutaties hebben veel verschillende oorzaken. Allereerst kan DNA beschadigd worden door normale scheikundige processen in de cel. Daarnaast wordt het DNA van buitenaf bedreigd, door bijvoorbeeld kosmische straling of chemische stoffen die met DNA reageren en genetische veranderingen veroorzaken. Schade veroorzaakt door straling kan bijvoorbeeld het gevolg zijn van een dagje strand (ultraviolette straling) of een bezoekje aan de tandarts (röntgenstraling). De chemische stoffen die DNA-schade veroorzaken, genotoxische agentia, kun je binnenkrijgen door het eten van gefrituurde kroketten of het inademen van tabaksrook. De hoeveelheid DNA-schades die we oplopen is enorm en wordt geschat op 10.000 gebeurtenissen per cel per dag. Om organismen te behoeden voor de mogelijk ernstige gevolgen van DNA-schade beschikt de cel over een heel scala aan noodgrepen. Er bestaan honderden eiwitten die betrokken zijn bij het opsporen, verwijderen en herstellen van DNA-schade. Gelukkig is reparatie in veruit de meeste gevallen succesvol. Wanneer de verdediging tegen DNA-

schade dan toch faalt, kunnen beschadigde cellen zichzelf opofferen en afsterven (apoptosis). Soms echter ontwikkelen cellen zich tot kankercellen, die ongeremd groeien en tumoren veroorzaken. Het hele proces van schadeherstel wordt extra gecompliceerd, als je bedenkt dat de instructie voor het opbouwen van de DNA-schadehersteleiwitten ook gegeven wordt door genen in het DNA. Iedereen kan zich voorstellen dat als de genen beschadigd worden die coderen voor één van die hersteleiwitten, de gevolgen dramatisch zijn en leiden tot zeer complexe ziekteverschijnselen.

De integriteit van het DNA wordt het meest bedreigd, wanneer beide ketens van een DNA- molecuul doorbroken worden, een zogenaamde dubbel-strengs breuk (DSB). De veroorzakers van speciaal dit type DNA-schade, de DSB, zijn ioniserende straling (b.v. röntgenstraling en straling afkomstig uit radioactieve stoffen) en specifieke chemische stoffen. DSBs ontstaan ook spontaan tijdens de mitose en meiose. Bij zo'n DSB kunnen de twee gebroken einden van een chromosoom uit elkaar drijven en de gevolgen daarvan kunnen natuurlijk rampzalig zijn. Herstel van deze DSBs is dan ook onontbeerlijk. De cel kan dubbel-strengs DNA-breuken op twee manieren repareren: 1. door de losse uiteinden simpelweg weer aan elkaar te plakken (DNA-eindverbinding ofwel non-homologous endjoining (NHEJ)). Dit proces is vanzelfsprekend niet altijd foutloos. 2. door de juiste informatie van een homolog chromosoom (bijvoorbeeld het tweede chromosoom van een paar of een zuster-chromatide) te kopiëren (homologe recombinatie ofwel homologous recombination (HR)). Het homologe molecuul dient dan als matrijs voor foutloos DSB-herstel.

Dit proefschrift gaat vooral over de tweede manier van dubbel-strengs breukherstel via homologe recombinatie. Met het beschreven onderzoek hebben we geprobeerd te begrijpen wat de biologische gevolgen van bijvoorbeeld blootstelling aan straling zijn, onder andere omdat röntgenstraling veelvuldig wordt gebruikt als anti-kanker therapie. Daarnaast probeerden we met dit onderzoek inzicht te krijgen in hoe het herstel van DSBs moleculair in zijn werk gaat. Uiteindelijk probeerden we te begrijpen hoe homologe recombinatie bijdraagt aan het voorkomen van kanker. Voor ons onderzoek maakten we o.a. gebruik van modelorganismen als *Schizosaccharomyces pombe* (spleijgist) en muizen met een genetisch defect in één van hun DNA-reparatiemechanismen. Het gebruik van gisten als model voor menselijke cellen is niet zo ver gezocht als het lijkt. Ook al staan gisten en de mens evolutionair mijlenver uit elkaar, de genetische informatie is nog enigszins identiek. Dit blijkt uit het feit dat gistcellen die zich niet langer kunnen delen, gered kunnen worden door stukken menselijk DNA in de cel te spuiten.

In **hoofdstuk 1**, de inleiding, wordt uitgebreid verteld hoe dubbel-strengs breuken ontstaan, hoe we denken dat het herstel van DSBs via homologe recombinatie in zijn werk gaat en welke eiwitten daarbij betrokken zijn. Er wordt een onderscheid gemaakt tussen het DSB-herstel tijdens de mitose en tijdens de meiose.

Samenvatting

Met behulp van röntgengevoelige bakkersgistcellen zijn veel eiwitten geïdentificeerd, die betrokken zijn bij het herstel van dubbel-strengs breuken in mitotisch delende cellen. Deze eiwitten behoren allemaal tot een familie van eiwitten betrokken bij stralingsgevoeligheid (radiation sensitivity), de RAD52-groep. Er zijn verschillende genen die coderen voor deze groep van eiwitten, onder andere het Rad51 gen, het Rad52 gen en het Rad54 gen. De functies van die eiwitten worden beschreven in **paragraaf 1.3**. In dit proefschrift houden wij ons vooral bezig met de functie van het Rad52 enzym. Rad52 is van vitaal belang voor bakkersgistcellen, maar zoogdiercellen waarin Rad52 ontbreekt, zijn normaal levensvatbaar. In splijtgist *S. pombe* zijn twee eiwitten gevonden die homoloog zijn aan bakkersgist Rad52, namelijk Rad22A en Rad22B. Een interessante vraag is of deze twee eiwitten, Rad22A en Rad22B, ook functioneel verschillend zijn. De resultaten van zo'n onderzoek helpen om de functie van zoogdier Rad52 te begrijpen en kunnen ons op het idee brengen welk eiwit mogelijk de functie van Rad52 in zoogdieren heeft overgenomen. Recent is ontdekt dat de functies van bakkersgist Rad52 in zoogdieren waarschijnlijk worden uitgevoerd door het BRCA2 enzym. BRCA2 (breast cancer 2) is het eiwit dat ontbreekt of gemuteerd is bij mensen met een erfelijke vorm van borstkanker.

Om geslachtscellen te kunnen vormen, moet een bijzondere kerndeling, de meiose, ervoor zorgen dat er van elk paar chromosomen, slechts één enkel chromosoom in elke voortplantingscel komt. Hiervoor is het nodig dat de homologe chromosomen van één paar met elkaar verbonden worden in een ritssluitingachtige structuur, het synaptonemale complex (SC; zie figuur 3 van hoofdstuk 1). Deze structuur houdt de chromosomen van één paar bijeen tijdens de eerste fase van de meiose, maar belangrijker is, dat er nu binnen de hekwerken van het SC ook homologe recombinatie kan plaatsvinden tussen de gepaarde chromosomen. Deze homologe recombinatie tijdens de meiose zorgt voor nieuwe combinaties van genen, omdat genen worden uitgewisseld met genen op het homologe tweede chromosoom van een paar (een zogenaamde cross-over). Deze cross-overs zorgen voor herrangschikking van de eigenschappen, zodat er extra variatie onder nakomelingen ontstaat en liggen aan de basis van de evolutie.

Om genen uit te kunnen wisselen tussen homologe chromosomen worden er tijdens de meiose in de context van de vorming van het SC actief dubbel-strengs breuken gecreëerd. Deze dubbel-strengs breuken worden vervolgens foutloos hersteld door homologe recombinatie. Er zijn verschillen tussen homologe recombinatie in de mitose en in de meiose. Ten eerste worden de DSBs in de meiose actief geïnduceerd, ten tweede komt homologe recombinatie tijdens de meiose 100 tot 1000 keer vaker voor dan in mitotisch delende cellen en ten derde wordt tijdens de meiose bij voorkeur het homologe chromosoom gebruikt voor herstel, terwijl dit in normaal delende cellen ook een tweede kopie (chromatide) van het eigen chromosoom kan zijn. De eiwitten betrokken bij homologe recombinatie in mitose en meiose zijn veelal gelijk. In **paragraaf 1.4**

worden specifieke eiwitten betrokken bij homologe recombinatie tijdens de meiose verder besproken.

Tot slot wordt in hoofdstuk 1 aandacht besteed aan het reguleren van de functies van de verschillende eiwitten betrokken bij DSB-herstel. Om eiwitten te kunnen afbreken nadat zij hun functie hebben uitgevoerd of om eiwitten op de juiste plek in de cel te krijgen, worden eiwitten vaak gemarkeerd met een ander eiwit. Vooral het markeren met ubiquitine is bekend. De wetenschappers die ontdekten dat eiwitten die met ubiquitine gemarkeerd zijn, afgevoerd worden naar de afvalverwerking van de cel, noemden dit de kiss of death. Zij ontvingen een Nobelprijs voor hun werk. Behalve ubiquitine zijn er meer eiwitten die eiwitten kunnen markeren, zoals SUMO (small ubiquitin-like modifier). Hoe SUMO aan eiwitten wordt gekoppeld en wat er dan mogelijk met die eiwitten gebeurt, staat beschreven in **paragraaf 1.5**.

In **hoofdstuk 2** concentreren we ons op de verschillen in functie tussen Rad22A en Rad22B in *S. pombe*. Om dit onderzoek uit te kunnen voeren hebben we eerst via gentechnologie bacteriën gemaakt, die we splijtgist Rad22A en Rad22B lieten produceren. Uit de bacteriecelextracten hebben we Rad22A en Rad22B gezuiverd. Met de gezuiverde Rad22A en Rad22B eiwitten hebben we proeven gedaan. We hebben ontdekt dat zowel Rad22A als Rad22B in staat zijn aan DNA te binden, maar dat Rad22A alleen bindt aan enkel-strengs DNA, terwijl Rad22B ook bindt aan DNA dat gedeeltelijk enkel- en gedeeltelijk dubbel-strengs is. Zowel Rad22A als Rad22B kunnen twee enkel-strengs DNA ketens aan elkaar plakken tot dubbel-strengs DNA (een proces dat annealing heet), maar Rad22A doet dat veel sneller en efficiënter. De annealings-reactie van Rad22B wordt geremd wanneer teveel enkel-strengs DNA is omgezet en er dus teveel dubbel-strengs DNA is ontstaan. Als vervolgens Rad22A wordt toegevoegd aan de reactie, heft Rad22A de remming op en zorgt ervoor dat het enkel-strengs DNA dat nog in de reactie aanwezig is, wordt omgezet in dubbel-strengs DNA. Van de gezuiverde Rad22A en Rad22B eiwitten hebben we ook opnamen gemaakt met een electronenmicroscop (zie de omslag van dit proefschrift). Uit deze opnamen blijkt dat zowel Rad22A als Rad22B hun functies niet uitvoeren als losse eiwitten, maar dat ze allebei grotere complexen vormen, waarbij een aantal (waarschijnlijk zeven) Rad22A of Rad22B eiwitten aan elkaar vastzitten.

In **hoofdstuk 3** wordt duidelijk hoe Rad52 samenwerkt met Rad54, een ander eiwit van de Rad52 groep. We hebben deze samenwerking onderzocht, door splijtgistcellen te maken waarin we Rad22A, Rad22B en Rhp54 (Rad54 homoloog pombe) in verschillende combinaties uitschakelden. We onderzochten de enkel, dubbel of trippel mutante splijtgistcellen op röntgengevoeligheid en gevoeligheid voor de chemische stoffen cis-platinum en hydroxyurea. Het blijkt dat de functies van Rad22A, Rad22B en Rhp54 bij het herstel van DSB zo verweven zijn, dat wanneer één van deze eiwitten uitgeschakeld is, het dubbel-strengs breukherstel via homologe recombinatie niet meer goed kan verlopen.

Samenvatting

We hebben de onderlinge betrokkenheid van Rad52 en Rad54 ook onderzocht in muizen. In muizen waarin we zowel Rad52 als Rad54 uitschakelden, blijkt dat meestal de defecten veroorzaakt door de afwezigheid van Rad54 niet worden versterkt door afwezigheid van Rad52. In twee specifieke situaties leidde de aangebrachte schade echter wel tot versterkte defecten, namelijk in het geval dat we röntgenshade aanbrachten aan beenmergcellen van de muis en in het geval dat we hele muizen inspoten met de chemische stof MMC. We concludeerden hieruit dat wanneer Rad52 en Rad54 afwezig zijn, behalve de homologe recombinatie ook bijvoorbeeld de annealing van enkel-strengs DNA (een rol van Rad52) niet meer goed verloopt.

In **hoofdstuk 4** beschrijven we dat eiwitten betrokken bij dubbel-strengs breukherstel gemarkeerd worden door SUMO. We ontdekten dat Rad22A en Rad22B in splijtgist *S. pombe* waarschijnlijk gemodificeerd worden door SUMO, doordat beide eiwitten interacteren met Hus5, een enzym dat SUMO koppelt aan haar doelwit. We vonden dezelfde interacties bij homologe eiwitten in *Drosophila melanogaster*, de fruitvlieg. We onderzochten het effect van afwezigheid van Su(Var)2-10, een enzym dat SUMO bij een specifiek doelwit in de buurt brengt, op de levensvatbaarheid van fruitvliegen na bestraling. We vonden dat als er onvoldoende Su(Var)2-10 aanwezig is, fruitvliegen een verlaagde overlevingskans hebben na blootstelling aan röntgenstraling. We zochten ook naar een homoloog van Su(Var)2-10 in *S. pombe* en vonden een stuk *S. pombe* DNA dat informatie bevat voor een eiwit dat homoloog is aan Su(Var)2-10 en soortgelijke enzymen in andere organismen die SUMO aan een specifiek doelwit koppelen. We noemden dit vermoedelijke enzym Pli1 en hebben het gen dat codeert voor Pli1 uitgeschakeld in splijtgistcellen. Afwezigheid van Pli1 leidde niet tot verhoogde röntgegevoeligheid in splijtgist. We vermoeden dat, ondanks dat er duidelijke aanwijzingen zijn dat eiwitten betrokken bij homologe recombinatie gemodificeerd worden met SUMO, deze modificatie slechts indirect betrokken is bij DSB-herstel. We denken dat zonder SUMO modificatie de structuur van de celkern niet langer intact kan worden gehouden, met bijbehorende effecten op bijvoorbeeld DNA herstelprocessen.

In **hoofdstuk 5** geven we het belang aan van een goed functionerend synaptonemaal complex (SC) tijdens de meiose. De ritssluitingstructuur van het SC bestaat uit twee axiale ketens die parallel aan de homologe chromosomen liggen en transversale elementen die de homologe chromosomen met elkaar verbinden. Wanneer we in muizen het gen uitschakelen dat codeert voor één van de transversale eiwitten, Sycp1, wordt het SC niet goed opgebouwd. De muizen zijn dan onvruchtbaar. Uit verder onderzoek van de meiose in deze muizen blijkt, dat de eerste stappen van de meiose, waarin de paring van de homologe chromosomen en de homologe recombinatie plaatsvinden, wel ingezet worden, maar dat de meiose niet wordt afgemaakt. Daadwerkelijke uitwisselingen van genen tussen de homologe chromosomen (cross-overs) vinden niet plaats. We denken daarom dat Sycp1 een coördinerende rol speelt tijdens de meiose en cross-overs mogelijk maakt.