



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Roadblocks & bypasses : protection of genome stability by translesion DNA synthesis in *C. elegans*

Bostelen, I. van

Citation

Bostelen, I. van. (2019, December 3). *Roadblocks & bypasses : protection of genome stability by translesion DNA synthesis in C. elegans*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/81315>

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/1887/81315>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/81315> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Bostelen, I. van

Title: Roadblocks & bypasses : protection of genome stability by translesion DNA synthesis in *C. elegans*

Issue Date: 2019-12-03

Nederlandse samenvatting

De studies die ik in dit proefschrift beschrijf hebben een centraal thema: *Translaesie DNA-synthese* (TLS). TLS is een verdedigingsmechanisme dat in alle bekende levende organismen actief is en het beschermt tegen diverse negatieve gevolgen van beschadigingen aan het genetisch materiaal, het DNA. In al mijn experimenten heb ik gebruik gemaakt van het modelorganisme *C. elegans*. Omdat niet iedereen ingewijd is in moleculair-biologische onderwerpen als DNA & cellen, DNA-schade & herstel, en modelorganismen zoals de nematode *C. elegans*, zal ik hier eerst een beknopte introductie¹ geven, gevolgd door een samenvatting van de door mij verkregen inzichten.

Cellen & DNA

Een volwassen mens is opgebouwd uit ongeveer 37×10^{12} cellen die zijn ontstaan zijn uit een enkele bevruchte eicel. 37.000 miljard cellen dus, met een grote verscheidenheid: hersencellen, spiercellen, stamcellen, etc. Elk weefsel is opgebouwd uit specifieke cellen en alle weefsels samen vormen een mens, en uiteraard geldt praktisch hetzelfde voor goudvissen, brandnetels, wolven, champignons, wormen en elke andere meercellige op aarde. Zoals ons lichaam organen bevat, zo bevat een cel organellen met verschillende functies. Er zijn bijvoorbeeld organellen die zorgen voor de energievoorziening van de cel en anderen nemen de eiwitproductie voor hun rekening. Het organel wat voor mij het meest interessant is, is de celkern: een compartiment dat het DNA bevat, het materiaal waarop de instructies gecodeerd staan zijn om een organisme te bouwen en te onderhouden.

Een DNA-molecuul bestaat uit twee complementaire strengen die de bekende “dubbele helix” vormen. De bouwstenen van het DNA zijn vier nucleotiden: Adenine (A), Thymine (T), Guanine (G) en Cytosine (C) - waarbij A altijd met T paart, en G altijd met C. Celkernen van levende organismen bevatten enorm lange DNA-moleculen in de vorm van chromosomen. De wonderlijke organisatie hiervan wordt duidelijk als je beseft dat al het DNA van één cel achter elkaar wel 1 á 2 meter lang is, terwijl een celkern een gemiddelde doorsnede heeft van slechts 0,005 millimeter. Elke menselijke cel heeft 23 paar chromosomen en elk paar bestaat uit één chromosoom van de vader en één van de moeder. Alle 46 chromosomen samen vormen het menselijk genoom. Sinds ongeveer 40 jaar is de wetenschap in staat om de volgorde van nucleotiden in DNA te bepalen. Dit noemen we DNA-sequenzen en de reeks van A's, T's, G's en C's noemen we een sequentie. In 2003 is er een imposante en belangrijke mijlpaal bereikt toen de sequentie van het volledige menselijke genoom werd gepubliceerd. Mede hierdoor weten we ondertussen dat de sequentie van het totale menselijke genoom ongeveer 20.000 genen bevat, en elk gen bevat de instructie voor de productie van een eiwit. Eiwitten, ook wel proteïnes genoemd, zijn grote moleculen die uiteenlopende essentiële functies vervullen in ons lichaam. Er zijn bijvoorbeeld enzymen die zorgen voor de vertering van ons voedsel;

¹ Voor een gedetailleerde wetenschappelijke Engelstalige introductie verwijs ik graag naar Hoofdstuk 1: *General Introduction*.

er zijn proteïnes die de structuur aan onze cellen en ons lichaam geven; en er zijn weer anderen die een belangrijke rol spelen als hormoon, in de communicatie tussen cellen op afstand.

DNA-schade, herstel & mutaties

Om van een enkele bevruchte eicel uit te kunnen groeien tot een volwassen mens moeten cellen delen en voordat een cel kan delen dient het volledige genetische materiaal gedupliceerd te worden. Dit proces noemen we DNA-replicatie en het wordt uitgevoerd door specifieke eiwitten die we polymerases noemen. Bij DNA-replicatie wordt de dubbele helix van het DNA opengeritst zodat er twee enkele strengen ontstaan. Vervolgens synthetiseert een polymerase een nieuwe streng complementair aan de bestaande streng. Tegenover een A wordt altijd een T ingebouwd en omgekeerd, tegenover een G wordt altijd een C ingebouwd en *vice versa*. De replicatieve polymerases in onze cellen zijn erg efficiënt en ontzettend accuraat: de meeste schattingen zeggen dat slechts 1 per 1.000.000 nucleotiden verkeerd wordt ingebouwd. Echter, bij een genoom van 6,4 miljard nucleotiden resulteert dit alsnog in een grote hoeveelheid fouten, zeker als je beseft dat dat genoom vele malen gerepliceerd moet worden om van 1 naar 37.000 miljard cellen te gaan.

Daarnaast is schade aan het DNA onvermijdelijk omdat DNA van zichzelf een nogal instabiel molecuul is en doordat omgevingsfactoren schade kunnen toebrengen aan het DNA. Bekende voorbeelden van externe bronnen van DNA-schade zijn: UV-straling in zonlicht, chemicaliën in sigarettenrook en röntgenstraling. Verder zorgen ook metabole processen in een cel voor schade aan het DNA. De diverse oorzaken resulteren in verschillende types DNA-laesies: van chromosomale breuken waarbij het DNA-molecuul volledig gebroken is, ook wel dubbelstrengs breuken (DSBs) genoemd, tot kleine chemische veranderingen aan de moleculaire structuur van de nucleotiden. Organismen hebben een uitgebreide reeks aan 'verdedigingslijnies' ontwikkeld om de nadelige effecten van een DNA-schade tegen te gaan en in de meeste gevallen zijn deze herstelmechanismen in staat om de schade foutloos te repareren. Desondanks veroorzaakt DNA-schade (of het foutieve herstel ervan) in sommige gevallen veranderingen van het genetisch materiaal, of het kan essentiële processen zoals DNA-replicatie blokkeren. Genetische veranderingen die ontstaan door DNA-schade, of foutjes tijdens DNA-replicatie, of andere processen, noemen we mutaties.

In dit proefschrift heeft een specifiek type DNA-schade mijn grootste interesse: DNA-laesies die wegversperringen vormen voor DNA-replicatie. De polymerases die normaal het DNA dupliceren zijn ontzettend efficiënt en vrijwel foutloos als het DNA onbeschadigd is, maar ze komen in de problemen als de structuur van het DNA afwijkt: het polymerase loopt dan vast en uiteindelijk blijven er stukken DNA over die niet gedupliceerd zijn of er kunnen breuken in het DNA ontstaan, welke

vervolgens leiden tot mutaties, verlies van grotere stukken DNA, verminderde groei & vruchtbaarheid, en uiteindelijk zelfs celdood. In meercellige organismen is het belangrijkste verdedigingsmechanisme dat hier tegen beschermt Translesie DNA-synthese (TLS). TLS maakt gebruik van gespecialiseerde TLS-polymerases die, anders dan replicatieve polymerases, wél beschadigd DNA kunnen repliceren. Door dit te doen, zorgt TLS voor continuïteit van DNA-replicatie. Hierbij dient wel gezegd te worden dat TLS-polymerases iets vaker fouten maken dan de replicatieve polymerases en beschadigd DNA kan moeilijk te 'lezen' zijn, bijvoorbeeld doordat normale paring tussen A en T, of G en C, wordt beïnvloed. Hierdoor lijkt het logisch dat TLS resulteert in de vorming van nieuwe mutaties en dit is inderdaad nog steeds een wijdverbreid begrip. In dit proefschrift laat ik echter zien dat het netto-effect van TLS anti-mutageen is, omdat het de vorming van DNA-breuken en de resulterende genomische instabiliteit voorkomt. Het belang van TLS voor de menselijke gezondheid wordt goed geïllustreerd door patiënten met de genetische aandoening *Xeroderma pigmentosum* variant. Bij deze mensen functioneert TLS niet goed en daardoor zijn ze extreem gevoelig voor zonlicht en hebben ze zo'n 1000-maal meer kans op het ontwikkelen van huidkanker dan de gemiddelde bevolking. Kortom, TLS heeft twee grote voordelen: 1) het zorgt ervoor dat DNA-replicatie kan doorgaan in de aanwezigheid van DNA-schade; 2) het onderdrukt de vorming van nieuwe mutaties en beschermt daardoor de integriteit van het genoom.

Het modelorganisme *C. elegans*

In alle experimenten die ik beschrijf in dit proefschrift gebruik ik de nematode *C. elegans*. Dit kleine wormpje, ongeveer 1 mm lang en zo dun als een menselijke haar, komt voor in de bodem, verspreid over de wereld. Meer dan 50 jaar geleden is het door onderzoeker Sydney Brenner voor het eerst gebruikt als modelorganisme in de ontwikkelingsbiologie. Vooralsnog is *C. elegans* nog steeds een vrij nieuw model om de stabiliteit van het genoom en DNA-schadeherstel te bestuderen, maar wel een modelorganisme met grote voordelen. Ten eerste lijken wij mensen meer op deze wormen dan je verwacht. Friedrich Nietzsche schreef in 1883 al (vrij vertaald): "Je hebt je ontwikkeld van worm naar mens, maar van binnen ben je nog steeds grotendeels worm." Hoewel hij het niet had over genetica of moleculaire biologie, weten we nu dat het ook op deze velden van toepassing is. Vrijwel alle herstelmechanismen voor DNA-schade zijn geconserveerd gebleven tijdens de evolutie en dus functioneren ze zowel in *C. elegans* als in de mens, op nagenoeg dezelfde manier.

Verder is *C. elegans* zo geschikt als modelorganisme vanwege zijn eenvoud. Een volwassen dier bestaat uit slechts ongeveer 1.000 cellen, en het genoom is ~30 maal compacter dan dat van de mens. Hiernaast is *C. elegans* erg gemakkelijk te kweken en te onderhouden in het laboratorium. De worm is hermafrodit, kan zichzelf bevruchten, en zeer snel voortplanten: binnen enkele dagen produceert een volwassen dier ~300

kinderen. Heel soms worden ook mannetjes geboren. Dit kunnen we in ons voordeel gebruiken, doordat we deze mannetjes kunnen kruisen met hermafrodieten. Als we dit doen met een mannetje met mutatie X en een hermafrodiet met mutatie Y, kunnen we nageslacht genereren dat beiden mutaties X+Y heeft. Dit is een groot voordeel bij genetisch onderzoek zoals het mijne.

Tijdens mijn promotieonderzoek is de CRISPR/Cas9 techniek beschikbaar gekomen en toegepast in *C. elegans*. Met deze techniek heb ik specifieke genetische aanpassingen kunnen maken, door genen uit te schakelen die een rol spelen bij het herstel van DNA-schade.

Anderzijds heb ik meegewerkt aan de ontwikkeling van een micro-evolutie-assay, dat ook gebruik maakt van de diverse voordelen van *C. elegans* als model: brede toegankelijkheid van genetische knock-outs, snelle groei en het compacte genoom, in combinatie met het sequencen van het gehele genoom en bio-informatica. Dit assay hebben we gebruikt om de accumulatie van spontane mutaties gedurende vele generaties op een onbevooroordeelde manier te bestuderen.

Dit proefschrift

Zoals ik eerder beschreef zijn er vele verschillende beschermingsmechanismes aanwezig in cellen die bescherming bieden bij DNA-schade. Deze mechanismes vormen samen een netwerk dat als geheel wordt aangeduid als *DNA damage response* (DDR). De DDR is een complexe cellulaire reactie bestaande uit signaleringsroutes en DNA-herstelnetwerken. In **hoofdstuk 2** bestudeer ik *Translaesie DNA-synthese* als onderdeel van de DDR. Ik beschrijf een verrassend eenvoudige lineaire volgorde van gebeurtenissen voor hoe *C. elegans* omgaat met DNA-schade veroorzaakt door licht. Als ik TLS en twee andere DNA-schadeherstelroutes tegelijkertijd inactiveer, kunnen de dieren in het donker nog op normale snelheid groeien en zich voorplanten, maar in de aanwezigheid van normaal daglicht kunnen ze eenvoudigweg niet groeien en produceren ze geen nageslacht meer. Zelfs zeer lage niveaus van normaal daglicht onderdrukken de groei al. Ik concludeer in deze studie dat TLS en de andere twee mechanismes dodelijke DNA-breuken, als gevolg van blootstelling aan licht, tegengaan. Mijn observaties in dit hoofdstuk laten ook zien hoe sterk licht het DNA kan beschadigen, en waarom er dus meerdere beschermingslagen nodig zijn tegen een dergelijke, veel aanwezige, bron van DNA-schade.

In **hoofdstuk 3** beschrijf ik de bijdrage van het TLS-polymerase genaamd 'REV-1' aan genoom stabiliteit, over een periode van ongeveer een half jaar, wat gelijk staat aan zo'n 50 generaties. Ik beschrijf hier dat REV-1 spontane mutagenese zowel bevordert als onderdrukt. Omdat REV1 TLS stimuleert, voorkomt het verlies van kleine stukjes sequenties uit het genoom, ook wel deleties genoemd. Het huidige dogma is dat TLS de vorming van mutaties stimuleert. Mijn bevindingen gaan in tegen dit dogma, omdat

de werking van REV-1 onder normale omstandigheden overwegend anti-mutageen is. Hiermee voorkomt REV-1 de accumulatie van deleties, ten koste van puntmutaties². Ik laat ook zien dat slechts één beschadigde nucleotide per $\sim 10^{10}$ nucleotiden, REV1-activiteit vereist. De conclusie is dat voortgang van DNA-replicatie belangrijker is dan het voorkomen van enkele nucleotidesubstituties.

Het idee dat TLS niet accuraat is, is voornamelijk vastgesteld na blootstelling aan genotoxides, zoals bijvoorbeeld UV-licht, omdat het aantal mutaties zonder deze blootstelling meestal te laag is om te detecteren. In **hoofdstuk 4** beschrijf ik de rol van alle vier TLS-polymerases tezamen bij het beschermen van genetische stabiliteit. We hebben de accumulatie van mutaties in TLS-deficiënte dieren die werden gekweekt onder normale omstandigheden gevolgd, wederom over ongeveer 50 generaties. Voor elke genetische achtergrond hebben we uitgebreide mutatieprofielen kunnen maken, met daarin mutaties die uiteenlopen van eenvoudige puntmutaties tot complexe genomische veranderingen. Mutanten waarbij alle bekende TLS-polymerases uitgeschakeld zijn, kunnen nog steeds groeien en planten zich voort, en blijkbaar is TLS dus niet essentieel. Niettemin hebben TLS-deficiënte mutanten verhoogde genomische instabiliteit. Verder stelde de grote dataset mij in staat te bepalen dat de meest voorkomende replicatieblokkades zich vormen op het nucleotide G, die bij afwezigheid van TLS leiden tot DSBs.

In **hoofdstuk 5** presenteer ik een nieuwe test om reparatie van een specifieke DNA-beschadiging te bestuderen, genaamd *interstrand crosslinks* (ICLs). ICLs zijn sterke verbindingen tussen nucleotiden van complementaire DNA-strengen en vormen absolute blokkades voor DNA-replicatie. Ze vormen een groot probleem voor levende organismes en het herstelproces is complex en nog niet in detail beschreven. Het doel hier was om een assay te ontwikkelen dat herstel van ICLs zichtbaar maakt in een meercellig organisme (*in vivo*) om bestaand biochemische (*in vitro*) assay aan te vullen. In dit hoofdstuk laat ik zien dat *C. elegans* hiervoor inderdaad kan worden gebruikt. We zijn erin geslaagd om stukjes DNA met een ICL te introduceren in levende dieren om vervolgens de sequentie te bepalen van het geïntroduceerde stukje DNA nadat DNA-herstel-processen in de cellen van *C. elegans* de ICL gerepareerd hebben. Door dit te doen kunnen we zien of er wel of geen mutatie is ontstaan op de locatie van ICL. We kunnen ook direct zien wat voor mutatie er is ontstaan. Vervolgens gebruik ik deze nieuwe methode om verschillende DNA-reparatie-deficiënte achtergronden te testen. Onze eerste voorlopige bevindingen laten zien dat deze nieuwe methodologie werkt en met deze test komt er een nieuwe tool beschikbaar om ICL-reparatie *in vivo* te bestuderen.

In de algemene discussie in **hoofdstuk 6** heb ik mijn bevindingen in een breder perspectief geplaatst en beschrijf ik welke belangrijke vragen nog onbeantwoord zijn en interessant zijn voor toekomstig onderzoek. Gebaseerd op mijn eigen onderzoek concludeer ik uiteindelijk dat de sterke evolutionaire conservatie van TLS verklaard

² Puntmutaties zijn een specifiek soort mutaties waarbij het ene nucleotide veranderd is in een ander nucleotide. Bijvoorbeeld een verandering van een G naar een T. In de meeste gevallen zijn puntmutaties veel minder schadelijk dan deleties.

wordt door de dubbele functies van TLS: het bewaken van zowel replicatiepotentieel als genoomstabiliteit. In alle studies zie ik dat TLS genomische instabiliteit onderdrukt, omdat het de conversie van replicatieblokkades naar DSBs voorkomt. Als TLS niet goed functioneert ontstaan er DSBs die vervolgens resulteren in grotere en meer schadelijke mutaties die worden doorgegeven aan volgende generaties. Translaesie-DNA-synthese is gunstig voor de gezondheid van individuele organismen, soorten, en het leven in het algemeen, omdat het voortdurende voorplanting en groei ondersteunt. Hoewel DNA-schade altijd aanwezig en onvermijdelijk is, bewaakt TLS tegen de vorming van de mutaties die anders leiden tot kanker, veroudering en aangeboren ziekte.