



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Control of replication associated DNA damage responses by Mismatch Repair

Ijsselsteijn, R.

Citation

Ijsselsteijn, R. (2023, October 26). *Control of replication associated DNA damage responses by Mismatch Repair*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3655391>

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/1887/3655391>

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

Samenvatting

Mutagenese, het proces dat veranderingen in de DNA-sequentie veroorzaakt, is de onderliggende oorzaak van veel ziektes die we als mensheid te voorduren hebben, de meeste bekende daarvan is kanker. Mutagenese ontstaat vaak tijdens DNA-replicatie en **hoofdstuk 1** bespreekt in detail hoe dit proces werkt. In het kort: tijdens de replicatie van dubbelstrengs DNA worden de beide DNA strengen van elkaar gescheiden om te worden verdubbeld door replicatieve DNA polymerases. Wanneer een replicatieve DNA-polymerase tijdens het verdubbelen van het DNA een foutieve nucleotide inbouwt ontstaat er een 'mismatch' die tijdens een volgende ronde van replicatie een mutatie kan worden. DNA-mismatch herstel (mismatch repair, MMR) kan deze mismatches detecteren en opruimen waardoor een mutatie in het DNA voorkomen wordt. In **hoofdstuk 1** wordt beschreven hoe het MMR-proces werkt: de MMR-eiwitten MSH2 en MSH6 vormen een dimeer wat mismatches kan herkennen en MSH2/MSH6 rekruteren vervolgens een dimeer bestaande uit MLH1 en PMS2 om een enkelstrengs breuk in de DNA-streng met de verkeerd ingebouwde nucleotide aan te brengen. Ten slotte kan EXO1, een exonuclease, gerekruteerd worden om een gedeelte van de nieuw gegeneerde DNA-streng te verwijderen, inclusief de mismatch. De noodzaak van EXO1 in het MMR-proces staat ter discussie omdat andere (exo)nucleases, waaronder FAN1, mogelijk de rol van EXO1 kunnen overnemen als EXO1 niet beschikbaar is. Andere eiwitten spelen mogelijk ook een rol in het MMR-proces, zoals PMS1 en MLH3. Deze eiwitten lijken op MLH1 en PMS2, maar hun exacte functie is tot op heden onduidelijk. Daarnaast leidt verlies van PMS1 of MLH3 niet tot een grote verstoring in het MMR-proces. In principe zijn er dus vier 'kern'-genen in het MMR-systeem, namelijk *MSH2*, *MSH6*, *MLH1* en *PMS2*. Verlies van één van deze genen leidt tot een niet-functionerend MMR-proces, resulterend in een verhoogde mutagenese en een verhoogd risico op kanker. Naast MMR beschrijft **hoofdstuk 1** ook de verschillende soorten DNA-schades en de bijbehorende DNA-herstelsystemen. Niet opgeruimde DNA-schade kan de DNA-dubbele helix zo vervormen dat replicatieve DNA polymerases het DNA niet meer kunnen verdubbelen. Als dit gebeurt activeert de cel de DNA-schadesignalering wat er uiteindelijk voor kan zorgen dat de cel doodgaat, maar het kan er ook voor zorgen dat mechanismen die DNA-schade kunnen tolereren geactiveerd worden, denk bijvoorbeeld aan de rekrutering van translesie synthese (TLS) polymerases. TLS polymerases kunnen beschadigd DNA repliceren waardoor de DNA-schadesignalering wordt afgeschaald en celdood vermeden wordt. Echter, TLS polymerases maken relatief veel fouten wat vaak leidt tot een verhoging van de mutagenese. Ons DNA wordt continue aangevallen door DNA-beschadigende stoffen, substanties die bijvoorbeeld in ons dieet zitten, waardoor het erg belangrijk is om uit te vinden of en hoe mutagenese door TLS polymerases gecontroleerd en beperkt wordt. In dit proefschrift is onderzocht of TLS en DNA-schade responsen gecontroleerd worden door MMR waardoor de DNA-schade geïnduceerde mutagenese beperkt blijft.

In **hoofdstuk 2** wordt de rol van MMR in de DNA-schade respons beschreven. Uit dit literatuuroverzicht blijkt dat MMR een onmiskenbare rol speelt in de reactie op DNA-

schades die veroorzaakt worden door agentia die de DNA-helix structuur verstoren, het DNA alkyleren, het DNA oxideren of de DNA strengen covalent verbinden (interstrand crosslinken). Verlies van MMR kan resulteren in verhoogde cellulaire resistentie tegen deze verschillende DNA-schades. Verlies van MMR leidt vaak ook tot een verhoging van de mutagenese. **Hoofdstuk 2** laat verder zien wat de implicaties zijn van het verlies van MMR voor de ontwikkeling en de behandeling van kanker. DNA beschadigende stoffen worden namelijk vaak gebruikt om kanker te behandelen, maar verlies van MMR kan kankercellen juist resistent maken tegen zulke medicijnen. Sterker nog, deze medicijnen kunnen ervoor zorgen dat er in het voorstadium van kanker een omgeving ontstaat waarin cellen met een defect in MMR juist heel goed gedijen wat tot nieuwe tumoren kan leiden. Verder wordt in **hoofdstuk 2** verondersteld dat DNA beschadigende stoffen extra gevaarlijk zijn voor mensen met Lynch syndroom (LS), een erfelijk overdraagbare ziekte veroorzaakt door een dysfunctioneel MMR gen.

Hoofdstuk 2 beschreef de belangrijke rol van MMR in het beperken van mutagene effecten van DNA beschadigende stoffen en in de activatie van DNA-schade responsen. Een paar belangrijke vragen bleven echter onbeantwoord: (i) hoe vermindert MMR de mutagenese veroorzaakt door DNA beschadigende stoffen, (ii) hoe activeert het vervolgens de DNA-schade signalering en (iii) welke andere eiwitten, die mogelijk een rol spelen bij MMR, zijn bij deze processen betrokken? In **hoofdstuk 3** wordt getracht deze vragen te beantwoorden met behulp van een panel van muis embryonale stamcellijnen, die deficiënt gemaakt zijn voor MMR-eiwitten Msh6, Mlh1 of Pms2, voor de exonucleases Exo1 of Fan1 en voor de MMR-homologen Mlh3 of Pms1. Als DNA-beschadigend agens is ultraviolet type C (UV) licht gebruikt, omdat UV licht zeer goed gekarakteriseerde mutagene en cytotoxische DNA-schades veroorzaakt die model staan voor DNA-schades veroorzaakt door een scala van mutagene chemische stoffen waaraan de mens kan worden blootgesteld. Al deze cellijnen bevatte nog een additioneel defect in *Xpa* wat ervoor zorgt dat de UV-schades niet tussentijds gerepareerd worden. De resultaten uit **hoofdstuk 3** laten duidelijk zien dat Msh6, Mlh1 en Pms2 beschermen tegen UV-geïnduceerde mutagenese, maar voor de andere onderzochte eiwitten werd dit fenotype niet gevonden. Voor Exo1 en Fan1 kan dit komen omdat hun functie overgenomen kan worden door andere (exo)nucleases. Hetzelfde kan gezegd worden Mlh3 en Pms1, die beiden kunnen binden aan Mlh1; deze eiwitten delen mogelijk hun functie met *Pms2*. **Hoofdstuk 3** beschrijft tevens dat *Msh6*-deficiente cellen, in vergelijking met wild-type cellen, een flinke vermindering laten zien in UV-geïnduceerde enkelstrengs DNA-formaties en de daarmee geassocieerde DNA-schadesignaling. Hetzelfde kan echter niet gezegd worden voor *Mlh1* en *Pms2*, wat kan betekenen dat *Mlh1/Pms2*-onafhankelijke processen kunnen zorgen voor deze enkelstrengs DNA-formaties. Samenvattend, de resultaten in **hoofdstuk 3** suggereren dat *Msh2*, *Msh6*, *Mlh1* en *Pms2*, die essentieel zijn bij het opruimen van mismatches ontstaan door replicatieve DNA polymerases, tevens een rol spelen in het onderdrukken van UV-schade geïnduceerde mutagenese. Deze resultaten leidden tot de hypothese dat MMR TLS-geassocieerde

replicatiefouten verwijderd, wat vervolgens leidt tot de waargenomen enkelstrengs DNA-formaties en de activatie van DNA-schade responsen.

In **hoofdstuk 4** zijn studies beschreven met muis embryonale stamcellen die deficiënt zijn gemaakt voor *Polymerase H (Polh-)*, het gen dat codeert voor polymerase Eta (Pol η). Deze cellen zijn gebruikt om te onderzoeken of MMR beschermt tegen TLS-geassocieerde replicatiefouten en op die manier UV-geïnduceerde mutagenese beperkt. Pol η is een TLS polymerase dat UV-beschadigd DNA juist relatief foutloos kan repliceren. Als *Polh* niet meer aanwezig is, kunnen andere TLS polymerases het UV-beschadigde DNA te repliceren. Echter deze andere TLS polymerases maken vaker fouten wat leidt tot een verhoging van de UV-geïnduceerde mutagenese. Als het beschermend effect van MMR op UV-geïnduceerde mutagenese gecorreleerd is aan de mate van TLS replicatiefouten, dan zou het verlies van MMR in deze *Polh*-deficiënte cellen moeten zorgen voor een nog hogere UV-geïnduceerde mutagenese dan in *Polh*-proficiënte cellen. Om deze stelling te onderzoeken zijn er *PolhMsh6* en *PolhMlh1*-deficiënte cellen gemaakt en deze zijn vervolgens blootgesteld aan UV-straling. De resultaten lieten zien dat UV-geïnduceerde mutagenese hoger is in deze dubbelmutanten dan in de enkelmutanten, zelfs als de getallen van de enkelmutanten bij elkaar worden opgeteld. Verder lieten de resultaten in **hoofdstuk 4** zien dat verlies van *Msh6* in een *Polh*-deficiënte achtergrond ook resulteert in een verlaging van de UV-geïnduceerde enkelstrengs DNA-formaties en geassocieerde DNA-schade signaleringen. Consistent met de resultaten in **hoofdstuk 3**, zorgde het verlies van *Mlh1*, ook in *Polh*-deficiënte achtergrond, niet voor een vermindering van enkelstrengs DNA en DNA-schade signalering. Een verklaring hiervoor zou gevonden kunnen worden in eerder gepubliceerd werk wat laat zien dat *Msh2/Msh6*, en niet *Mlh1/Pms2*, verantwoordelijk zijn voor de rekrutering van TLS polymerases naar beschadigd DNA. Ander werk laat zien dat *Msh2/Msh6* juist zorgen voor de activatie van template switching, een route om tijdens replicatie DNA-schades foutloos te passeren. Deze twee waarnemingen en de resultaten beschreven in **hoofdstuk 4** suggereren dat MMR in twee stappen DNA-schade responsen controleert: (i) MMR verwijderd TLS fouten waardoor DNA-schade signalering wordt geactiveerd en mutagenese wordt voorkomen en (ii) *Msh2/Msh6* rekruteert vervolgens TLS polymerases om de DNA schade mogelijk foutloos te repliceren of *Msh2/Msh6* zorgt voor de activatie van het foutloze template switching om op die manier mutagenese te voorkomen en DNA-schade signalering uit te doven.

Ondanks dat alle lichaamscellen van LS-patiënten heterozygoot zijn voor een MMR-gen, ontwikkelen de meeste LS-patiënten voornamelijk darmkanker. Het onderzoek beschreven in **Hoofdstuk 5** was er opgericht om de vraag te beantwoorden of cellen die één disfunctionele kopie van een MMR-gen bevatten, zoals de darmcellen van LS-patiënten, een groter risico lopen op de nadelige effecten van genotoxische verbindingen uit voedsel dan wild-type cellen. Om dit te onderzoeken werden muis embryonale stamcel modellen gegenereerd die lijken op LS-cellen doordat ze 1 werkende en 1 defecte kopie van het *Msh2* of *Mlh1*-gen hebben. Deze cellen werden vervolgens blootgesteld aan 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b)pyridine (PhIP),

een mutagene stof dat wordt gevormd tijdens het grillen van vlees op een hoge temperatuur en dat helix-verstorende DNA-schades veroorzaakt. **Hoofdstuk 5** laat zien dat cellen heterozygoot voor Msh2 of Mlh1 met een hogere frequentie deficiënt werden voor MMR dan wild-type cellen wanneer deze blootgesteld werden aan PhIP. Eerder gepubliceerd werk liet zien dat cellen die MMR zijn verloren extra vatbaar waren voor mutagenese geïnduceerd door verschillende types van DNA-schade. In **hoofdstuk 5** werden deze bevindingen bevestigd door in muis embryonale stamcellen aan te tonen dat PhIP-geïnduceerde mutagenese wordt versterkt door defecten in een van de vier MMR-kerngenen (*Msh2*, *Mlh1*, *Msh6* en *Pms2*). Ten slotte resulteerde het verlies van Msh2 in verminderde DNA-schade signalering als gevolg van PhIP blootstelling. Dit kan ervoor zorgen dat MMR-deficiënte cellen een groeivoordeel hebben ten opzichte van MMR-proficiënte cellen als ze blootgesteld worden aan PhIP. Alles bij elkaar genomen suggereren de gegevens in **hoofdstuk 5** dat PhIP de oncogenese bij LS-patiënten op drie niveaus kan stimuleren: (i) door de frequentie te verhogen waarmee cellen, die heterozygoot zijn voor een van de MMR-kerngenen, MMR compleet verliezen; (ii) doordat de MMR-deficiënte cellen het vermogen hebben verloren om PhIP-geïnduceerde mutagenese te onderdrukken; en (iii) doordat deze cellen ook de DNA-schade signaleringsmechanismen zijn verloren waardoor de MMR-deficiënte cellen een groeivoordeel verkrijgen en normale cellen wegconcurreren. Als zodanig kunnen deze gegevens belangrijk zijn om LS-patiënten te adviseren een levensstijl aan te nemen waardoor ze zoveel mogelijk DNA beschadigende stoffen vermijden, stoffen die bijvoorbeeld veelvuldig voorkomen in bepaalde ongezonde diëten. Verder kunnen de bevindingen in **hoofdstuk 5** verklaren waarom LS-patiënten voornamelijk darmkanker ontwikkelen, doordat dit weefsel constant blootgesteld wordt aan DNA beschadigende stoffen uit het dieet.

Samenvattend laat dit proefschrift zien dat MMR een belangrijke rol speelt bij het reguleren van DNA-schade geïnduceerde mutagenese en wat de implicaties daarvan zijn voor gezonde individuen maar ook voor LS-patiënten. Dit proefschrift beschrijft een mechanisme waarin MMR eerst de misincorporatie verwijdt tegenover een DNA-schade, maar ook belangrijk kan zijn om vervolgens (error-free) bypass van de DNA-schade te faciliteren middels rekrutering van TLS polymerases of template switching componenten. **Hoofdstuk 6** bespreekt de resultaten en modellen beschreven in dit proefschrift in detail en in het licht van eerder gepubliceerde artikelen. Verder bespreekt **hoofdstuk 6** ook mogelijke vervolgstappen voor het onderzoek dat gepresenteerd wordt in dit proefschrift, zoals het verder onderzoeken van de verschillende eiwitten die bij het MMR-proces op beschadigd DNA betrokken kunnen zijn, zoals andere nucleases. Een andere interessante vervolgstap zou kunnen zijn om te onderzoeken hoe MMR-mismatches tegenover beschadigd DNA herkent en verwijdt. Dit kan bijvoorbeeld onderzocht worden door MMR-activiteit te meten op voor-geprepareerde DNA-substraten met DNA-schade of door de binding tussen Msh2/Msh6 en een mismatch met PhIP-schade te bestuderen. Tot slot laat dit proefschrift zien dat DNA-schade bijzonder gevaarlijk kan zijn voor mensen met disfunctionele kopieën van MMR-genen en **hoofdstuk 6** bespreekt de klinische

implicaties van deze conditie in meer detail. Het aanpassen van het dieet zodat er minder DNA-beschadigende verbindingen in de darmen terechtkomen zou een goed advies zijn voor patiënten met een MMR-beperking.