

VU Research Portal

Vulnerabilities of cancer cells suffering from DNA replication stress

Benedict, B.

2021

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Benedict, B. (2021). *Vulnerabilities of cancer cells suffering from DNA replication stress*. [, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl



A

Nederlandse samenvatting

Publication list

Dankwoord

Nederlandse samenvatting

De celcyclus en DNA replicatie.

Elke dag delen miljoenen cellen in het lichaam. Voordat een cel kan delen, moet het eerst zijn DNA, het erfelijk materiaal, verdubbelen. Bij mensen ligt het DNA verspreid over 23 chromosomen. Elk chromosoom is opgebouwd uit twee complementaire strengen met nucleotiden die in de vorm van een dubbele helix om elkaar heen draaien en verbonden zijn door middel van waterstofbruggen. Het kopiëren van deze DNA strengen gebeurt tijdens een proces dat DNA replicatie heet. De DNA replicatie start wanneer enzymen de waterstofbruggen tussen de nucleotiden verbreken. Deze scheiding creëert een 'Y'-vorm, een zogenoemde replicatievork. Beide strengen fungeren als sjablonen voor het maken van een nieuw DNA molecuul, dat uiteindelijk uit een oude en een nieuwe complementaire streng bestaat. Op een van de strengen vindt het kopiëren van het DNA in voorwaartse richting plaats. Op de andere streng gebeurt het kopiëren van het DNA in achterwaartse richting, waarbij korte stukken DNA ontstaan die later aan elkaar geplakt worden. Als het DNA van een chromosoom gekopieerd is, zijn er twee identieke zusterchromatiden ontstaan. Na de replicatie worden de twee zusterchromatiden bij elkaar gehouden door een ringvormig eiwit complex met de naam cohesin. Cohesin werkt eigenlijk als een elastiek, dat om de twee zusterchromatiden is gewonden totdat ze verdeeld moeten worden over de dochtercellen.

Alleen als de omstandigheden voor een celdeling optimaal zijn, als er genoeg zuurstof en groeifactoren aanwezig zijn, start een cel met DNA replicatie, de zogenoemde S-fase. In omstandigheden die nadelig zijn, bijvoorbeeld in de afwezigheid van groeifactoren, blijft een cel hangen in de fase vóór de S-fase, de G₁-fase. Dit zogenoemde G₁- naar S-fase checkpoint wordt gereguleerd door de drie Retinoblastoom (Rb) eiwitten. Deze eiwitten blokkeren de overgang naar de S-fase in afwezigheid van groeifactoren. Als de omstandigheden optimaal zijn en een cel de S-fase intreedt dan verloopt het proces van DNA replicatie over het algemeen vrij correct. Echter, ook als de omstandigheden goed zijn, kunnen er alsnog fouten en schade ontstaan in het DNA. Een deel daarvan wordt al hersteld tijdens het kopiëren van het DNA. Tijdens de G₂-fase, de fase die volgt op de S-fase, wordt het DNA nog een keer extra gecheckt en kan eventuele DNA schade hersteld worden. Na de G₂-fase, in de mitose (oftewel de M-fase) vindt de daadwerkelijke verdeling van het DNA plaats. Allereerst worden de cohesinringen van de twee zusterchromatiden afgehaald. Vervolgens worden de chromatiden van elkaar losgetrokken en identiek verdeeld over de twee nieuwe dochtercellen.

Kankercel: een cel met een ongelimiteerde celdeling.

Beschadigingen in het DNA, bijvoorbeeld als gevolg van straling of blootstelling aan chemische stoffen, kunnen ervoor zorgen dat er kleine veranderingen ontstaan in het DNA

van een dochtercel. Als dit soort veranderingen effect hebben op het proces van de celdeling zelf, kan het gebeuren dat de controle over de celdeling verloren gaat. Als gevolg hiervan kunnen er nog meer fouten ontstaan tijdens een celdeling, wat uiteindelijk kan leiden tot het ontstaan van een cel die ongelimiteerd kan delen: een kankercel.

Deze oncontroleerbare celdeling kan een kankercel ook problemen geven. Zo missen bijvoorbeeld veel kankercellen het G₁- naar S-phase checkpoint. Dat betekent dat een kankercel direct kan beginnen aan het proces van DNA replicatie terwijl een cel daar helemaal niet op voorbereid is. Als gevolg hiervan zijn bijvoorbeeld niet alle bouwstenen van het DNA aanwezig en is het proces van DNA replicatie vaak verstoord in kankercellen. Dit fenomeen heet ‘replicatiestress’. In dit proefschrift hebben we onderzocht hoe kankercellen weten te overleven met replicatiestress. Het ontdekken en begrijpen van mechanismen die een kankercel gebruikt om met replicatiestress om te gaan kan leiden tot de ontwikkeling van therapieën die specifiek de kankercellen en niet de gezonde cellen remmen.

In **Hoofdstuk 1**, de introductie van mijn proefschrift, geef ik een uitgebreid overzicht van de celcyclus, DNA replicatie en replicatiestress in tumoren.

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift.

Om beter te begrijpen hoe kankercellen met replicatiestress omgaan, hebben we in het lab gebruik gemaakt van embryonale muizen fibroblasten (MEFs) die de drie Rb eiwitten missen. Deze ‘triple knockout’ (TKO) MEFs missen het G₁ naar S checkpoint. Als je deze TKO MEFs zonder groeifactoren kweekt, stoppen ze niet in de G₁-fase zoals normale cellen, maar beginnen ze met het verdubbelen van hun DNA. In **Hoofdstuk 2** laten we zien dat dit tot replicatiestress en DNA schade leidt, waardoor de cellen uiteindelijk niet kunnen delen en stoppen in de G₂-fase van de cel cyclus. Dit zogenoemde G₂ arrest kan opgeheven worden door verlies van het *p53* gen. In **Hoofdstuk 2** laten we zien dat afwezigheid van *p53* ervoor zorgt dat het proces van DNA replicatie beter verloopt. Verlies van *p53* zorgt er namelijk voor dat de DNA replicatie op veel meer plekken tegelijkertijd kan starten, met andere woorden, dat er nieuwe ‘origins’ tijdens de DNA replicatie worden aangezet. Op deze manier kan een cel ervoor zorgen dat al het DNA gekopieerd wordt, er minder DNA schade ontstaat en de cellen kunnen delen.

Om naast verlies van het *p53* gen ook andere mechanismen te ontdekken die replicatiestress in de TKO MEFs verminderen en tot groei kunnen leiden, hebben we een genetische screen uitgevoerd. Opmerkelijk genoeg ontdekten we, naast *p53*, geen andere genen die betrokken zijn bij het G₂ arrest, zoals beschreven in **Hoofdstuk 3**.

Ondanks dat de afwezigheid van *p53* in TKO MEFs leidt tot de activatie van nieuwe origins en groei in afwezigheid van groeifactoren, zijn de replicatie problemen nog niet oplost en hebben deze cellen nog steeds last van replicatiestress. Om erachter te komen welke genen onmisbaar zijn voor groei met replicatiestress, hebben we opnieuw een genetische screen uitgevoerd, zoals beschreven in **Hoofdstuk 4**. Hieruit bleek dat het gen *Recql* noodzakelijk is voor groei in replicatiestress omstandigheden. Verder onderzoek heeft laten zien dat het *Recql* eiwit betrokken is bij het beschermen van een vastgelopen replicatievork. In afwezigheid van *Recql* breekt een vastgelopen replicatievork. Daarom bevordert *Recql* de DNA replicatie en zorgt *Recql* ervoor dat er geen gebroken replicatievorken, oftewel DNA schade, ontstaat.

In **Hoofdstuk 5** ontdekten we een ander gen dat vereist is voor groei in replicatiestress omstandigheden. Dit is het gen *Wapl*. De functie van het *Wapl* eiwit is het verwijderen van cohesinringen van DNA, de elastieken die de zusterchromatiden bijeen houden vanaf de DNA verdubbeling tot aan de daadwerkelijke celdeling. We laten zien dat het verwijderen van een cohesinring noodzakelijk is voor het repareren en herstarten van een gebroken replicatievork. Herstel van gebroken replicatievorken is belangrijk om ervoor te zorgen dat het hele DNA verdubbeld wordt en dat een cel kan delen.

Kankercellen hebben de strikte controle over de celdeling verloren; als gevolg hebben ze replicatie problemen en dus veel gebroken replicatievorken. Zoals we hebben laten zien, moeten kankercellen om een gebroken replicatievork te herstellen de cohesinringen van het DNA verwijderen. Uiteindelijk leidt dit specifiek in kankercellen tot een verminderd aantal cohesinringen op het DNA en dus tot verlies van de samenhang tussen de twee zusterchromatiden. Inderdaad hebben we in **Hoofdstuk 5** gezien dat specifiek in kankercellen en dus niet in gezonde cellen, de samenhang tussen de twee zusterchromatiden minder sterk is.

Ook de genen *Mau2* and *Nipbl*, belangrijk voor het laden van cohesinringen op het DNA, zijn vereist voor groei in replicatiestress condities. In **Hoofdstuk 6** laten we echter zien dat de *Mau2* en *Nipbl* eiwitten niet noodzakelijk zijn voor het repareren van gebroken replicatievorken. Daarentegen lijken de eerste resultaten uit te wijzen dat aanwezigheid van *Mau2* en *Nipbl* vereist zijn om het verdelen van de chromosomen in mitose goed te laten verlopen. Waarschijnlijk leidt de combinatie van minder cohesinringen die geladen worden en cohesinringen die verwijderd worden om gebroken replicatievorken te herstellen tot zeer sterke verzwakking van de binding tussen zusterchromatiden, waardoor er problemen in mitose ontstaan.

Tot slot vat ik de resultaten beschreven in dit proefschrift samen in **Hoofdstuk 7**. Ik bediscussieer verder onderzoek en ontwikkelingen die nodig zijn om de mechanismen die een kankercel gebruikt om te kunnen overleven met replicatiestress nog beter te begrijpen. Uiteindelijk hopen we dat kennis over deze mechanismen gebruikt kan worden voor de ontwikkeling van nieuwe antikanker therapieën die heel gericht kankercellen, maar niet gezonde cellen doden.