

VU Research Portal

Gene targeting by single-stranded DNA oligonucleotides in mouse embryonic stem cells

Aarts, M.

2010

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

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

citation for published version (APA)

Aarts, M. (2010). *Gene targeting by single-stranded DNA oligonucleotides in mouse embryonic stem cells*.

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

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Ons lichaam is opgebouwd uit miljarden cellen, die voortdurend opnieuw aangemaakt worden via celdelingen. Op die manier kan het lichaam groeien en beschadigde en verouderde cellen vervangen. Iedere celdeling wordt heel precies gereguleerd zodat er niet te veel of te weinig cellen gemaakt worden en zodat ze de juiste functie krijgen. In de kern van die cellen bevindt zich DNA dat al onze erfelijke informatie bevat. DNA bestaat uit zeer lange ketens van verschillende chemische bouwstenen, de basen: G, A, T en C. In het DNA zijn ongeveer 30.000 gebieden, ofwel “genen” gevonden waarin de basenvolgorde (de erfelijke code) informatie bevat voor de bouw en eigenschappen van ons lichaam. Deze informatie dient zeer nauwkeurig gekopieerd te worden zodat na deling de twee dochtercellen elk een identieke kopie bevatten. Ondanks de grote nauwkeurigheid waarmee het DNA gekopieerd wordt, wordt er zo nu en dan een verkeerde bouwsteen ingebouwd. Dat wordt een ‘mismatch’ genoemd. De cel heeft een reparatiesysteem om deze fouten op te sporen en te repareren, het mismatch repair (MMR) systeem. Soms echter faalt dat reparatiesysteem en ontstaan er permanente veranderingen (“mutaties”) in het erfelijke materiaal van een cel die uiteindelijk kunnen leiden tot het ontstaan van diverse aandoeningen en ziekten.

Enkele jaren geleden is de basenvolgorde van het menselijke DNA ontcijferd. Deze informatie kan gebruikt worden voor het opsporen van genen die ziekten veroorzaken. Er is echter ook gebleken dat de DNA volgorde van verschillende personen niet identiek is. De gevolgen van deze variaties zijn niet altijd duidelijk: soms gaat het om neutrale variaties en soms om ziekteveroorzakende variaties. Om erachter te komen wat de gevolgen zijn van deze variaties,

kunnen deze nagemaakt worden in diermodellen.

In dit proefschrift beschrijven wij een techniek die gebruikt kan worden om specifieke basen te veranderen in het DNA van een muis. Deze veranderingen worden in een cel gebracht door middel van “oligonucleotiden”, korte stukjes DNA van ongeveer 40 basen. De experimenten die beschreven zijn in dit proefschrift, zijn uitgevoerd met embryonale stamcellen (ES cellen) die geïsoleerd zijn uit een vroeg stadium van een muizenembryo. Deze cellen kunnen in het lab gemanipuleerd worden. Wanneer deze gemanipuleerde ES cellen teruggeplaatst worden in een muizenembryo, kunnen ze weer uitgroeien tot een muis. Zo kan in een muis bekeken worden wat de gevolgen zijn van bepaalde veranderingen in het DNA. Dit kan uiteindelijk bijdragen aan onze kennis over de functie van de verschillende genen in de mens en hoe deze beïnvloed wordt door fouten in het DNA.

Hoofdstuk 1 geeft een overzicht van alle informatie die momenteel bekend is over het maken van DNA mutaties met behulp van oligonucleotiden. Door meer te leren over de processen die een rol spelen bij deze techniek, kan de efficiëntie verbeterd worden. Hoewel meer onderzoek nodig is, zou deze techniek in de toekomst mogelijk gebruikt kunnen worden om ziekteveroorzakende mutaties in mensen te corrigeren, zogenaamde genterapie.

Eerder hebben wij gevonden dat het inbouwen van een oligonucleotide in het DNA van een cel niet zomaar lukt. Reparatiesystemen in een cel, waaronder het MMR systeem, herkennen de baseverandering in de oligonucleotide en voorkomen dat deze wordt ingebouwd. De DNA veranderingen

kunnen dus alleen geïntroduceerd worden wanneer het MMR systeem uit staat. Dit is echter zeer onwenselijk omdat er dan geen enkele fout in het DNA meer gerepareerd wordt. In **Hoofdstuk 2** hebben wij onderzocht of het mogelijk was om het MMR systeem slechts tijdelijk uit te schakelen, namelijk alleen tijdens de periode waarin de oligonucleotide wordt ingebouwd. Wij laten zien dat het tijdelijk uitschakelen van het reparatiegen *Msh2* inderdaad voldoende is voor het inbouwen van oligonucleotiden met 4 veranderde basen. Omdat er nog een beetje MSH2 achtergebleven is, worden oligonucleotide met 3 of minder basenveranderingen nog steeds als “fout” herkend en uit het DNA verwijderd. Deze methode kunnen we gebruiken om mutaties na te maken in het DNA van muizen ES cellen. We laten als eersten zien dat de ES cellen die op deze manier veranderd zijn, gebruikt kunnen worden voor het maken van een mutante muis.

Dit onderzoek is verder uitgebreid in **Hoofdstuk 3**, waarin we bekijken wat de gevolgen zijn van het tijdelijk uitschakelen van een ander reparatiegen, *Mlh1*, op de efficiëntie van het inbouwen van een oligonucleotide. Tijdelijke uitschakeling van MLH1 zorgt ervoor dat het MMR systeem nog minder goed werkt, waardoor nu ook oligonucleotiden met 1, 2, en 3 basenveranderingen ingebouwd kunnen worden. De gevolgen van het uitschakelen van het MMR systeem zijn nader bestudeerd in cellijnen waarin verschillende componenten van het MMR systeem ontbreken om een idee te krijgen van de hoeveelheid fouten in het DNA die niet meer gerepareerd kunnen worden. Hoewel er iets meer extra fouten in het DNA ontstaan door het tijdelijk uitschakelen van MLH1, tonen wij aan dat deze methode goed gebruikt kan worden voor het maken van mutante muizen.

Het mechanisme waardoor de oligonucleotide wordt ingebouwd in het DNA is nog niet helemaal begrepen. Behalve het MMR systeem zijn er misschien nog vele andere systemen in een cel die een rol spelen in dit proces. In **Hoofdstuk 4** hebben wij de betrokkenheid van enkele voor de hand liggende systemen bekeken: transcriptie (het overschrijven van het DNA voor het maken van eiwitten), replicatie (proces waarin het DNA verdubbeld wordt voor de celdeling) en andere DNA reparatiesystemen. Onze resultaten laten zien dat de oligonucleotide hoogstwaarschijnlijk wordt ingebouwd tijdens DNA replicatie. Tijdens dit proces worden de DNA strengen als het ware uit elkaar “geritst”. De twee ontstane ketens dienen als voorbeeld voor twee nieuwe DNA ketens die langs de oude ketens geplakt worden. Wij denken dat de oligonucleotide op een zelfde manier aan de oude DNA ketens plakt en zo ingebouwd wordt in een nieuwe DNA streng, inclusief de baseverandering die wij aangebracht hebben. Uiteindelijk ontstaan er zo twee DNA strengen die elk uit een oude en een nieuwe keten bestaan. Na celdeling zal elk van de dochtercellen zo’n gemengde DNA streng bevatten.

In **Hoofdstuk 5** beschrijven wij de ontwikkeling van een nieuw reportersysteem voor het bestuderen van DNA manipulatie door middel van oligonucleotiden. We hebben een muizen ES cellijn gemaakt met een niet-functioneel gen dat codeert voor een groen fluorescerend eiwit (EGFP). Met behulp van oligonucleotiden kunnen we dit gen herstellen en zal er een groen fluorescerend eiwit geproduceerd worden. Door te bekijken hoeveel groene cellen er ontstaan zijn, kunnen we bepalen hoe efficiënt onze methode is en wat er met de cellen gebeurt op de lange termijn. We laten zien dat het type oligonucleotide een grote invloed heeft op de overleving van een gemodificeerde

cel. Wanneer normale oligonucleotiden ingebouwd worden, ondervindt een cel daar weinig hinder van en kan hij gewoon doorgroeien. Echter oligonucleotiden met speciale beschermingsgroepen op de uiteindes induceren DNA schade, waardoor de cel uiteindelijk dood gaat.

Een gedetailleerd protocol voor het aanbrengen van basenveranderingen in het DNA van een muizen ES cel staat beschreven in **Hoofdstuk 6**. We gebruiken de specifieke eigenschappen van de verschillende eiwitcomplexen van het MMR systeem om bepaalde basenveranderingen te introduceren. Tijdelijke uitschakeling van MSH2 of MLH1 kan gebruikt worden om bepaalde basen te veranderen in andere basen, waardoor uiteindelijk elk willekeurig stukje in het DNA veranderd kan worden. Cellen waarin het reparatie-eiwit MSH3 is uitgeschakeld, kunnen gebruikt worden voor het inbouwen van 4 extra basen. Hierdoor verschuift de afleesbare code van het DNA en wordt het gen onleesbaar. Deze methode kan gebruikt worden om de functies van bepaalde genen compleet uit te schakelen.

Samenvattend leveren de studies die beschreven zijn in dit proefschrift een belangrijke bijdrage aan het ontrafelen van het mechanisme van DNA modificatie door middel van oligonucleotiden in muizen ES cellen. Verschillende variabelen die een rol spelen in het modificatieproces zijn geïdentificeerd, wat geresulteerd heeft in de ontwikkeling van een algemeen toepasbaar protocol. Dit protocol maakt het mogelijk om de basenvolgorde van een gen op één specifieke plek te veranderen. Nader onderzoek zal uit moeten wijzen of deze techniek in de toekomst mogelijk toegepast zou kunnen worden als gentherapie voor menselijke ziekten.