

DISS. ETH NO. 20274

ELUCIDATING THE ROLE OF MISMATCH REPAIR  
IN CLASS SWITCH RECOMBINATION  
AND CHROMATIN ASSEMBLY

A dissertation submitted to  
ETH ZURICH

for the degree of  
Dr. sc. ETH Zurich

Presented by  
STEPHANIE BREGENHORN

Dipl. Mol.med. Albert-Ludwigs-Universität Freiburg  
08.11.1983

Citizen of  
GERMANY

Accepted on the recommendation of

Prof. Josef Jiricny  
Prof. Annette Oxenius  
Dr. Anne Durandy  
Prof. Christoph Borner

2012

## 1 ZUSAMMENFASSUNG

Das erfolgreiche Überleben einer Spezies ist von ihrer Fähigkeit abhängig, bei der Zellteilung eine genaue Kopie des Erbguts in Form von DNS an Tochterzellen weiterzuvererben. Replikative Polymerasen, welche die DNS vervielfältigen, arbeiten sehr präzise, aber dennoch entkommen  $1/10^7$  Nukleotide ihrer Korrekturfunktion. Im Laufe der Evolution hat sich ein Reparaturmechanismus entwickelt, der diese fehlgepaarten Basen erkennt und sie effizient entfernt. Dieser Mechanismus wird als "Fehlpaarungsreparatur" (englisch "mismatch repair", MMR) bezeichnet. Die Relevanz dieses Reparaturweges wird aus Patientendaten ersichtlich, die in Folge einer Keimbahnmutation in einem der MMR Gene am Lynch-Syndrom (auch hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom (HNPCC) genannt) erkranken. Das Lynch Syndrom ist auf molekularer Ebene durch Mikrosatelliteninstabilität gekennzeichnet und geht mit frühzeitig auftretenden kolorektalen Karzinomen sowie teilweise weiteren Tumorerkrankungen einher.

Um die fehlgepaarten Basen reparieren zu können, benötigt die MMR Maschinerie Zugang zur neu-synthetisierten DNS. Der Zugang der DNS wird jedoch durch die Verpackung der DNS in Chromatin erschwert oder gar verhindert, die ebenso wie MMR hinter der Replikationsgabel stattfindet und durch den "chromatin assembly factor" CAF-1 koordiniert wird. In der hier vorgestellten Studie wurde untersucht, inwieweit sich MMR und nukleosomale Verpackung gegenseitig beeinflussen. Dabei konnte gezeigt werden, dass im Zuge der MMR die Anlagerung von Nukleosomen in humanen Zellextrakten verzögert ist. Zudem ist die Effizienz der MMR reduziert, sofern sie auf bereits verpackte DNS trifft. Sowohl MSH6, ein Protein der MMR Maschinerie, als auch CAF-1, das bei der Verpackung der DNS in Chromatin mitwirkt, interagieren mit "Proliferating Cell Nuclear Antigen" (PCNA), dem Prozessivitätsfaktor der replikativen Polymerasen. Dies legt die Vermutung nahe, dass PCNA MMR und Chromatinverpackung an der Replikationsgabel koordiniert. Tatsächlich scheint diese Regulation sogar deutlich komplexer zu sein, da zudem eine direkte Interaktion zwischen MSH6 und CAF-1 beobachtet werden konnte, die schadensabhängig erfolgt.

Neben ihrer Funktion in der Fehlpaarungsreparatur sind MMR-Proteine in eine Vielzahl weiterer Prozesse involviert. So spielen sie insbesondere bei der Reaktion auf DNS Schäden, der Stabilisierung von repetitiven Trinukleotiden in der DNS, der mitotischen und meiotischen Rekombination, der Reparatur von Interstrang-Crosslinks und der Antikörperdiversifizierung eine wichtige Rolle. Die

Antikörperdiversifizierung beruht auf drei irreversiblen Veränderungen der DNS des Immunglobulinlokus: der V(D)J Rekombination, der somatischen Hypermutation (SHM) und der Klassenwechsel-Rekombination (englisch "class switch recombination", CSR). Zunächst findet im Zuge der B-Zell Entwicklung die V(D)J Rekombination statt, bei der unterschiedliche Gensegmente [variable (V), diversity (D) und joining (J)], welche für die schwere und leichte Antikörperkette kodieren, beliebig zusammengelagert werden und so das primäre Antikörperrepertoire bilden. Bindet eine B-Zelle ihr spezifisches Antigen und erhält zusätzliche Signale durch Interaktion mit einer T-Zelle, so können SHM und CSR erfolgen. Dabei wird die Affinität des Antikörpers für sein Antigen durch Mutationen in der Antigenbindungsstelle erhöht (SHM) und der Antikörper mit einer anderen Effektorfunktion ausgestattet (CSR). Während der CSR werden gezielt Doppelstrangbrüche (DSB) in die DNS eingeführt, welche unter Entfernung der dazwischen liegenden, für die konstante Region kodierenden, Gene rekombiniert werden. Sowohl CSR, als auch SHM werden durch die Aktivierungs-abhängige Cytidin-Deaminase (AID) initiiert, ein Enzym, das Cytosine im Immunglobulinlokus deaminiert und somit Uracil-Basen in der DNS generiert. Genetische Daten weisen darauf hin, dass zwei Reparaturwege, MMR und "base excision repair" (BER) in CSR und SHM eine wichtige Rolle spielen. Während diese Reparaturwege versuchen, die U/G Fehlpaarungen zu bearbeiten, bedingen sie Mutationen und generieren DSB, so dass sie ihrer eigentlichen Funktion, dem Erhalt des Erbguts, entgegenwirken. In dieser Studie haben wir den noch ausstehenden biochemischen Beweis erbracht, dass diese beiden Reparaturwege tatsächlich DSB generieren können. Darüber hinaus konnte der dafür verantwortliche molekulare Mechanismus weiter beleuchtet werden. Dabei zeigte sich, dass die Bildung von DSB von dem BER-Enzym Uracil-N-Glycosylase und dem MMR Faktor MutS $\alpha$  abhängt. Bei Läsionen, die nur dann zu DSB führen, wenn MutL $\alpha$  vorhanden ist, liegt diese Abhängigkeit in der intrinsischen Endonukleasefunktion von MutL $\alpha$  begründet. Zudem konnte der erste *in vivo* Beweis dafür erbracht werden, dass die Entstehung von DSB durch das Zusammenspiel von MMR und BER nicht auf B-Zellen beschränkt ist, sodass es eine generellere Bedrohung der genomischen Integrität darstellen könnte.

## 2 SUMMARY

The successful survival of a species depends on faithful passage of genetic material from one cell to its daughters. Replicative polymerases possess low error rates, but, in spite of this,  $1/10^7$  nucleotides escape their proof reading activity. These biosynthetic errors have to be corrected by postreplicative mismatch repair (MMR), which improves replication fidelity by two to three orders of magnitude. The importance of MMR is beyond doubt – its malfunction brings about a mutator phenotype, which was shown to be the underlying cause of Lynch Syndrome, a predisposition to early-onset cancer of the colon, endometrium, ovary and other organs.

We hypothesized that MMR might interfere with chromatin packaging, as rapid assembly of nucleosomes behind the replication fork would most likely hinder the mismatch recognition factor MutS $\alpha$  from binding mismatches and initiating their repair. To study the interplay of MMR and chromatin assembly, we set up a biochemical system using human cell extracts that were proficient for both chromatin assembly and MMR. As anticipated, mismatch-containing plasmids carrying preassembled nucleosomes were poor substrates for MMR. In contrast, ongoing MMR interfered with nucleosome deposition. CAF-1, the mediator of chromatin assembly, and the MSH6 subunit of the mismatch recognition factor MutS $\alpha$  both interact with proliferating cell nuclear antigen (PCNA), the processivity factor of replicative DNA polymerases. We therefore postulated that PCNA might govern the balance between MMR and chromatin assembly. We found, however, that this regulation might be more complex than foreseen, as MutS $\alpha$  and CAF-1 interact not only with PCNA, but also with each other.

Recent literature implicated MMR proteins, in addition to the repair of biosynthetic errors, also in DNA damage response, triplet repeat stability, mitotic and meiotic recombination, the repair of interstrand cross-links and antibody diversification. Antibody diversification consists of three processes affecting immunoglobulin (Ig) loci: V(D)J recombination, somatic hypermutation (SHM) and class switch recombination (CSR). CSR endows antibodies with different effector functions. It is initiated by activation-induced cytidine deaminase (AID), which converts cytosines to uracils and thus gives rise to U/G mismatches. Surprisingly, metabolism of U/Gs in activated B-cells is inefficient and gives rise to DNA double strand breaks (DSBs), one of the key prerequisites for CSR. Genetic data implicate two DNA repair pathways in the processing of these mismatches: base excision repair (BER) and mismatch repair (MMR). In order to dissect the molecular mechanism of the roles of

these repair pathways in the processing of U/G mispairs, we generated substrates containing uracils at defined positions and incubated them with extracts of human cells. We found that the induction of DSBs was dependent on the BER enzyme uracil N-glycosylase (UNG) and on the MMR factor MutS $\alpha$ , whereas MutL $\alpha$  was only found to participate in a subset of events and its contribution depended on its endonucleolytic activity. Given that interference of BER and MMR is not restricted to B-cells, it may pose a general threat to genomic integrity.