

DISS. ETH No. 26484

Gene-targeted identification of DNA lesions to unravel mechanisms of mutagenesis

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH Zurich

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

CLAUDIA ALOISI

M. Sc. in Chemistry, Università di Pisa, Italy

Born on 24.12.1990

Citizen of Italy

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Shana J. Sturla

Prof. Dr. Orlando D. Schärer

Prof. Dr. Hanspeter Nägeli

Prof. Dr. Martin Jinek

Dr. Hailey Gahlon

2019

Abstract

The integrity of our genomic material is continuously threatened by exposure to endogenous and exogenous DNA-damaging chemicals. The resulting chemical adducts to DNA can initiate adverse biological consequences, including cell death and DNA mutations that potentially lead to cancer. Our capacity to relate mutagenesis with specific DNA adducts is limited by the lack of strategies to measure the early event of DNA damage within genomic loci. Furthermore, inadequate knowledge regarding the cellular processes that handle the DNA adducts hinders our understanding of mutagenicity-driving factors in response to DNA damage in cells. The work described in this thesis concerns addressing both the gap in technology and the gap in knowledge with regard to a type of mutagenic, biologically relevant DNA adducts. The main achievements of this work were the development of strategies for the detection of the DNA adducts in a target DNA sequence, and the identification of cellular mechanisms that alleviate the mutagenicity induced by the DNA adducts.

In *Chapter 1*, topics further discussed in this thesis are introduced. DNA adduct-directed artificial nucleotides have been developed as a basis for interrogating damaged DNA in duplex hybridization or polymerase-mediated synthesis contexts. Strategies based on artificial nucleotides are employed for the work of *Chapters 2* and *3*. An *overview* of the studies presented in this thesis is given at the end of the chapter.

In *Chapter 2*, a strategy to detect the mutagenic O^6 -methylguanine DNA adduct in the DNA sequence of a cancer-relevant gene is developed. A DNA primer containing an artificial nucleoside analogue that stabilizes O^6 -methylguanine in the duplex allowed replication of DNA by an engineered DNA polymerase only when the artificial nucleotide was paired with O^6 -methylguanine. The artificial nucleotide-modified primer effectively marked presence and position of O^6 -methylguanine in the sequence. Furthermore, thanks to high specificity of replication, the modified DNA primer could be extended and amplified only when O^6 -methylguanine damaged DNA was present, and signal was obtained that linearly increased with the amount of O^6 -methylguanine in the sample. The presented strategy represents the first instance of polymerase amplification-based O^6 -methylguanine detection to single base resolution. This approach could be used to detect O^6 -methylguanine in other cancer-relevant gene sequences.

In *Chapter 3*, the scope and performance of artificial nucleotide-based detection of DNA adducts reported in the previous chapter is expanded by the introduction of an analytical measurement that allows for the quantification of the DNA adducts. A heterocyclic imidic nucleotide triphosphate analogue is synthesized for the detection and quantification of the mutagenic O^6 -carboxymethylguanine (O^6 -CMG), which has been associated to cancer development linked to meat consumption. The nucleotide analogue was incorporated selectively opposite O^6 -CMG over undamaged G by an engineered DNA polymerase, and was required for replication of DNA past O^6 -

CMG in the template strand. Molecular modelling studies identified base pairing and interaction with the polymerase as driving factors for the selective incorporation. The high template-selectivity meant that a DNA primer complementary to the target DNA containing O^6 -CMG could be amplified. The amplified DNA contained the artificial nucleotide and marked presence and location of O^6 -carboxymethylguanine. By developing an analytical method for the quantification of the incorporated nucleotide, trace amounts of O^6 -CMG were detected, and the amount of detected artificial nucleoside increased linearly with the initial amount of O^6 -carboxymethylguanine. The amplified quantitative signal obtained in this work for mutagenic DNA damage in a DNA sequence lays the foundation to the study of the cause-effect relationship between DNA damage and mutations.

In *Chapter 4*, we investigated the impact of DNA repair on the cellular phenotype induced by O^6 -CMG, to address a pervasive gap of knowledge regarding repair and mutagenicity of O^6 -CMG. Based on few previous studies performed on O^6 -CMG and on structurally similar DNA adducts, two important cellular DNA repair pathways were investigated for their capacity to alleviate toxicity and mutagenicity of a O^6 -CMG-inducing drug. Cells impaired in those repair pathways mutated at a higher rate than repair-proficient cells, likely due to O^6 -CMG persistence and accumulation. Adduct level measurement and characterization of the mutational spectra are underway and expected to provide further insight regarding the impact and contribution of those repair pathways. Despite pending experimentation, the findings in this work answered a longstanding question and demonstrated that O^6 -CMG mutagenicity is significantly increased upon inadequate DNA repair.

In *Chapter 5*, findings of the work of this thesis are summarized. Future opportunities and challenges are critically discussed and recommendations for future directions are presented.

Finally, in *Chapters 6 and 7*, the cellular DNA repair of DNA damage induced by the cancer drug acylfulvene was identified, and repair initiation was characterized using a combination of molecular biology, biochemistry and crystallography studies. Cellular toxicity is on the opposite spectrum of the biological consequences induced by DNA damage discussed so far, i.e. mutagenesis. DNA damage-induced cellular toxicity is exploited in chemotherapy to induce cell death of fast-dividing cancer cells. However, cellular processes such as insufficient bioactivation and DNA repair can decrease susceptibility of cancer cells to the action of DNA-damaging chemotherapeutic drugs. In the last chapters of this thesis, the repair of DNA damage induced by acylfulvene is studied by interrogating the contribution and the mode of action of an important DNA repair pathway. The identification of a potential, pivotal cellular mechanism of drug resistance achieved in this work means that therapeutic strategies to tackle mechanisms of resistance could be devised, such as the combined treatment with specific repair inhibitors.

Sommario

L'integrità del nostro materiale genetico è continuamente minacciata dall'esposizione a sostanze chimiche endogene ed esogene. Gli addotti chimici al DNA che si generano possono innescare condizioni biologiche avverse, inclusa morte cellulare e mutazioni del DNA che potenzialmente portano al cancro. La nostra capacità di correlare la mutagenesi alla presenza di specifici addotti al DNA è limitata dalla carenza di approcci in grado di misurare i danni al DNA in definiti loci genici. Inoltre, un'inadeguata conoscenza dei processi cellulari coinvolti nella gestione dei danni al DNA ostacola la nostra comprensione dei fattori che guidano la mutagenicità nelle cellule in risposta ai danni al DNA. Il lavoro descritto in questa tesi riguarda l'affrontare sia il divario nella tecnologia che il divario nella conoscenza degli addotti del DNA con carattere mutagenico che hanno rilevanza biologica. I principali risultati di questo lavoro includono lo sviluppo di strategie per la rilevazione di addotti mutageni al DNA in una sequenza bersaglio del DNA e l'identificazione di meccanismi cellulari che alleviano la mutagenicità indotta da tali addotti al DNA.

Nel *Capitolo 1* vengono introdotti alcuni argomenti discussi in questa tesi. Nucleotidi artificiali sono stati sviluppati sulla base di addotti al DNA per studiare l'ibridizzazione nella doppia elica di tali danni o per studiare sintesi del DNA mediata dalla polimerasi. Strategie basate su nucleotidi artificiali sono impiegate per il lavoro dei *Capitoli 2* e *3*. Una panoramica degli studi presentati in questa tesi è fornita alla fine del capitolo.

Nel *Capitolo 2* viene sviluppata una strategia per rilevare l'addotto mutagenico O^6 -metilguanina nella sequenza del DNA di un gene rilevante per il cancro. Un iniziatore di DNA contenente un analogo nucleosidico artificiale che stabilizza l' O^6 -metilguanina ha consentito la replicazione del DNA da parte di una DNA polimerasi ingegnerizzata solo quando il nucleotide artificiale era accoppiato con O^6 -metilguanina. L'iniziatore contenente il nucleotide artificiale era in grado di indicare la presenza e la posizione di O^6 -metilguanina nella sequenza generata. Inoltre, grazie all'elevata specificità della replicazione, l'iniziatore di DNA modificato poteva essere amplificato solo in presenza di DNA danneggiato con O^6 -metilguanina ed il segnale misurato aumentava linearmente con la concentrazione di O^6 -metilguanina nel campione. La strategia presentata rappresenta il primo esempio del rilevamento di O^6 -metilguanina basata sull'amplificazione della polimerasi con risoluzione alla singola base e potrebbe essere estesa ad altre sequenze geniche di interesse per il cancro.

Nel *capitolo 3*, l'ambito d'uso e le prestazioni della rilevazione degli addotti al DNA basata su nucleotidi artificiali discussa nel capitolo precedente e altrove è ampliata con l'introduzione di una misurazione analitica che consente la quantificazione dell'addotto di DNA. Un analogo imidico eterociclico di trifosfato nucleotidico è sintetizzato per il rilevamento e la quantificazione della mutagenica O^6 -carbossimetilguanina (O^6 -CMG), che è stata associata allo sviluppo del cancro legato al consumo di carne. L'analogo nucleotide è stato incorporato in una sequenza di DNA da una DNA polimerasi

ingegnerizzata opposto a O^6 -CMG ma non G in maniera selettiva, ed era necessario per la replicazione del DNA dopo la presenza di O^6 -CMG. Studi di modellistica molecolare hanno identificato l'accoppiamento di base e l'interazione con la polimerasi come fattori trainante dell'incorporazione selettiva. L'elevata selettività nei riguardi del DNA stampo ha permesso di amplificare un iniziatore di DNA complementare al DNA target contenente O^6 -CMG. Il DNA amplificato conteneva il nucleotide artificiale e questo indicava la presenza e la posizione di O^6 -CMG. Grazie ad un metodo analitico sviluppato per la quantificazione del nucleotide incorporato, sono state rilevate tracce di O^6 -CMG e la quantità di nucleoside artificiale rilevata aumentava linearmente con la quantità iniziale di O^6 -CMG. Il segnale quantitativo ottenuto per il danno del DNA mutageno in una sequenza di DNA ottenuta con questo lavoro pone le basi per lo studio della relazione causa-effetto tra danno al DNA e mutazioni.

Nel capitolo 4 viene affrontato la profonda mancanza di conoscenze riguardi la riparazione cellulare di O^6 -CMG. Sulla base della letteratura precedente sull' O^6 -CMG e su addotti strutturalmente simili, sono state investigate due importanti vie di riparazione del DNA cellulare per la loro capacità di alleviare la tossicità e la mutagenicità di un farmaco che induce l' O^6 -CMG nelle cellule. Le cellule che erano compromesse nella loro capacità di riparare DNA mutavano ad un ritmo più elevato rispetto alle cellule con capacità di riparazione intatte, probabilmente a causa della persistenza e dell'accumulo di O^6 -CMG. La misurazione del livello di addotto e la caratterizzazione delle variazioni mutazionali sono in corso e dovrebbero fornire ulteriori informazioni sull'impatto e sul contributo di tali meccanismi di riparazione. Nonostante la sperimentazione sia ancora in corso, i risultati di questo lavoro rispondono ad un vecchio quesito sulla riparazione del DNA e dimostrano che la mutagenicità di O^6 -CMG aumenta significativamente in caso di riparazione inadeguata del DNA.

Nel capitolo 5, sono riassunti i risultati del lavoro di questa tesi. Opportunità e sfide future vengono discusse criticamente e vengono presentate raccomandazioni per direzioni future.

Infine, nei *Capitoli 6 e 7*, viene identificata la riparazione dei danni al DNA indotti da un agente chemioterapico, e l'iniziazione della riparazione viene caratterizzata con una combinazione di studi di biologia molecolare, biochimica e cristallografia in uno sforzo collaborativo. La tossicità cellulare è sullo spettro opposto delle conseguenze biologiche indotte dai danni al DNA affrontate nel capitolo precedente. La tossicità cellulare indotta dai danni al DNA viene comunemente sfruttata nella chemioterapia per indurre la morte di cellule tumorali che si dividono rapidamente. Tuttavia, processi cellulari come l'insufficiente bioattivazione e la riparazione del DNA possono ridurre la suscettibilità delle cellule tumorali all'azione di farmaci chemioterapici che danneggiano il DNA. In questi due capitoli, la riparazione dei danni indotti da uno specifico farmaco chemioterapico viene affrontata studiando il contributo e la modalità di azione di un importante meccanismo di riparazione del DNA. L'identificazione di un probabile ma al contempo importante meccanismo cellulare di resistenza ai farmaci raggiunta in questi lavori implica che potrebbero essere elaborate strategie terapeutiche per contrastare tale meccanismo, come il trattamento combinato con specifici inibitori della riparazione.