

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/20094> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Melis, Joost

**Title:** Nucleotide excision repair in aging and cancer

**Date:** 2012-11-06



# Samenvatting

## Nederlandse samenvatting

Alle cellen in ons lichaam bevatten DNA. DNA is de blauwdruk van het leven en bevat alle genetische informatie die het mogelijk maakt om te functioneren en je te ontwikkelen. Het DNA bevat duizenden specifieke stukken informatie (genen). Deze genen zijn verantwoordelijk voor de productie van functionele en structurele bouwstenen in onze cellen (eiwitten).

Het is van belang om de genetische informatie zo min mogelijk beschadigd te laten raken zodat cellen normaal kunnen blijven functioneren. DNA wordt echter constant blootgesteld aan schadelijke factoren van buitenaf (exogeen), zoals UV-straling van het zonlicht, tabaksrook, stoffen in voedsel en dranken. Maar ook factoren die het lichaam zelf genereert (endogeen) kunnen schadelijk zijn. Een voorbeeld hiervan is je metabolisme, waarbij onder andere reactieve zuurstofradicalen kunnen ontstaan.

Schadelijke moleculen kunnen reageren met het DNA en daar beschadigingen veroorzaken. Dit gebeurt in groten getale. In iedere cel vinden naar schatting door endogene factoren alleen al ongeveer 50.000 DNA beschadigingen per dag plaats! Een uurtje zonnebaden op een zonnige dag levert ongeveer 80.000 DNA beschadigingen op per blootgestelde cel. In het totale lichaam loopt het aantal dagelijkse DNA beschadigingen dus op tot in de biljoenen.

DNA schade en de daaruit voortkomende mutaties en genomische instabiliteit in cellen zijn de drijvende kracht achter het ontstaan van kanker en andere verouderingsgerelateerde ziekten bij mens en dier. Zo zorgt teveel UV-straling door onbeschermd zonnen of veel roken bijvoorbeeld voor veel extra DNA schade en de kans dat hierdoor kanker ontstaat wordt daardoor groter. Tijdens het leven en veroudering groeit het aantal beschadigingen in het DNA waardoor cellen en processen in het lichaam minder goed of efficiënt functioneren. **Hoofdstuk 2** beschrijft het proces van veroudering over 6 verschillende levensfasen (onderzocht in muizen). We volgden hier de pathologische veranderingen tijdens het leven en koppelden dit waar mogelijk aan de veranderingen in activiteit van alle genen om zo meer inzicht te krijgen over processen die tijdens veroudering een rol kunnen spelen.

Het lichaam heeft een aantal erg goede afweersystemen om DNA schade te voorkomen of te repareren. Zo neutraliseren antioxidanten in de cellen zoveel mogelijk reactieve zuurstofradicalen waardoor ze niet meer met het DNA kunnen reageren. Ook probeert ons lichaam zo snel mogelijk schadelijke stoffen af te breken, zodat ze niet meer met het DNA kunnen reageren en geen schade kunnen veroorzaken. Dit mechanisme is echter niet genoeg om het DNA schadevrij te houden en daarom zijn DNA herstelmechanismen van groot belang in ons lichaam. Deze mechanismen repareren en beperken de DNA schade zodat cellen (zolang mogelijk) normaal kunnen blijven functioneren.

Er zijn verschillende reparatiesystemen in het lichaam actief die allemaal op een specifieke manier werken en verschillende soorten DNA schade repareren. Eén van deze DNA herstelmechanismen in het Nucleotide Excisie Reparatie (NER) mechanisme, die beschadigingen repareert die de helixstructuur van het DNA verstoren (bijvoorbeeld door UV-straling en sommige stoffen in tabaksrook of voedselwaren). NER kan worden onderverdeeld in twee sub-routes: transcriptie-gekoppeld (TC-NER) herstel en globaal genoomherstel (GG-NER). TC-NER repareert de schade in actieve genen, terwijl GG-NER schade in het hele genoom verwijdert. De twee NER-routes verschillen in de manier van het

herkennen van de DNA schade, maar repareren vervolgens op eenzelfde manier de schade. NER bestaat uit meer dan 30 eiwitten die samenwerken om de schade te repareren.

Wanneer één van de meest essentiële NER-factoren defect is kan dit leiden tot zeldzame ziektes zoals Xeroderma pigmentosum (XP), Trichothiodystrophy (TTD) of Cockayne syndroom (CS). XP patiënten hebben een extreem hoog risico (>1000x zo hoog als gezonde mensen) op huidkanker wanneer ze bloot worden gesteld aan zonnestraling. CS en TDD patiënten hebben een defect TC-NER, wat zich voornamelijk manifesteert in groei- en neurologische afwijkingen. In **hoofdstuk 3** is het belang van twee essentiële NER-factoren (XPA en XPC) onderzocht. Muizen die een defect *Xpa* of *Xpc* gen hebben blijken gevoeliger te zijn voor spontane ontwikkeling van kanker dan normale muizen gedurende veroudering. In een *Xpa* muis is TC-NER en GG-NER defect, in een *Xpc* muis alleen GG-NER. We ontdekten dat de kankergevoeligheid van *Xpa* en *Xpc* muizen ook van elkaar verschilde en *Xpc* gevoeliger was, ondanks het feit dat alleen GG-NER niet functioneert. Beide muismodellen lieten een vergelijkbare toename in levertumoren zien, maar in *Xpc* muizen ontstonden daarnaast nog meer longtumoren. Dit laatste was niet het geval in *Xpa* en normale (wild type) muizen. Aangezien de longen worden blootgesteld aan zuurstof hebben we in **hoofdstuk 4** onderzocht of *Xpc* muizen gevoeliger zijn dan normale en *Xpa* muizen voor schade die door zuurstofradicalen wordt veroorzaakt. DNA schade door zuurstofradicalen wordt voor het grootste gedeelte niet gerepareerd door NER, maar door een ander DNA herstelmechanisme: Base Excisie Reparatie (BER). Onze resultaten duiden erop dat *Xpc* muizen inderdaad meer blijvende DNA schade (in de vorm van mutaties) ophopen na blootstelling aan stoffen die zorgen voor meer zuurstofradicalen in de cellen, in tegenstelling tot wild type en *Xpa* muizen. De XPC-factor lijkt daarom ook betrokken te zijn bij processen buiten NER, die DNA schade door zuurstofradicalen voorkomen of achteraf repareren.

Muizen met een defect DNA herstelmechanisme zoals de *Xpa* en *Xpc* muizen, kunnen niet alleen gebruikt worden voor het bestuderen van kankerontwikkeling en verouderingsgerelateerde ziektes, maar kunnen ook ingezet worden om nauwkeuriger, efficiënter en goedkoper kankerverwekkende stoffen te identificeren. Mens en milieu dienen zo min mogelijk in aanraking te komen met kankerverwekkende stoffen. Daarom worden stoffen uitvoerig getest alvorens ze op de markt mogen worden gebracht en verwerkt mogen worden in consumentengoederen. Om deze stoffen te identificeren worden momenteel testen gebruikt die niet heel erg nauwkeurig zijn en grote aantallen proefdieren vereisen. Daarnaast duren deze onderzoekstudies erg lang (tot >3 jaar) en kosten veel geld. **Hoofdstuk 5** beschrijft de mogelijke toepassing van de *Xpa* en *Xpc* muismodellen in het identificeren van kankerverwekkende (carcinogene) stoffen. Deze twee muismodellen zijn al kankergevoelig doordat ze sneller en meer mutaties in het DNA ophopen in vergelijking met normale muizen (die momenteel nog het meest gebruikt worden als proefdieren). Deze muismodellen hebben we ingekruist met een muismodel dat een defect p53 gen heeft. P53 is een belangrijk eiwit in het tegengaan van kankerverwekkende processen (p53 is een tumor suppressor). De aanmaak van het p53 eiwit wordt na een bepaalde mate van DNA schade geactiveerd en zorgt ervoor dat cellen waarvan het DNA beschadigd is niet verder kunnen delen voordat de schade gerepareerd is. Als de schade te ernstig is en niet meer gerepareerd kan worden zorgt signalering via onder andere p53 ervoor dat deze cel zal afsterven en geen schade meer kan veroorzaken. De door ons ontwikkelde *Xpa*\*p53 en *Xpc*\*p53 muismodellen hebben dus een defect dat ervoor zorgt dat er sneller en meer mutaties ontstaan door schadelijke stoffen voor het DNA (genotoxische stoffen) en een minder goed functionerend veiligheidssysteem hebben waardoor cellen met schade in leven blijven en zich kunnen

gaan vermenigvuldigen (tumorvorming). Als we deze muismodellen blootstellen aan kankerverwekkende stoffen ontwikkelen ze veel sneller en vaker tumoren dan normale muizen. Door deze gevoeligheid zijn er veel minder muizen nodig om een kankerverwekkende stof te identificeren en kan het veel tijd en geld besparen. *Xpc*\**p53* muizen blijken qua identificatie van carinogene stoffen nog gevoeliger te zijn dan *Xpa*\**p53* muizen. Daarnaast laten we zien dat deze muismodellen geschikt zijn om tot voorheen moeilijk op te sporen carcinogene stoffen te identificeren, de zogenaamde niet-genotoxische carcinogenen (stoffen die niet direct schade veroorzaken aan het DNA, maar tumorvorming op een andere manier bevorderen).

Mannelijke *Xpa*\**p53* en *Xpc*\**p53* muizen die blootgesteld werden aan de genotoxische carcinogeen 2-AAF in de hierboven beschreven carcinogeniteitstesten lieten een zeer verhoogde incidentie van blaastumoren zien na 9 maanden blootstelling. In **hoofdstuk 6** onderzochten we of deze verhoging in tumorincidentie te herleiden was naar een volledige deficiëntie van het p53 gen, veroorzaakt door mutaties geïnduceerd door de genotoxische 2-AAF blootstelling. Deze resultaten leidden tot de ontdekking van een mechanisme waarbij mutaties in het eerste (N-terminale) deel van het p53 gen zorgen voor de productie van een alternatief en ingekort p53 eiwit (de dN-p53 isovorm). Ons onderzoek toont aan dat deze isovorm dN-p53 een functioneel eiwit is, maar verschilt in functie van het normale p53 eiwit.