

Samenvatting

Nauwkeurige instandhouding van het genoom, dat het volledige erfelijk materiaal van een cel bevat, is essentieel voor de overleving van alle organismen. Daarom is het zeer belangrijk voor het functioneren van de cel dat de informatie die in het genoom ligt opgeslagen op een juiste wijze wordt gekopieerd. De intrinsieke structuur van het genoom wordt echter continu bedreigd door endogene en exogene factoren die het DNA beschadigen. Een opeenstapeling van DNA schade of verkeerde reparatie van het DNA resulteert in instabiliteit van het genoom, wat kan leiden tot verminderd functioneren van de cel. Alle organismen zijn daarom voorzien van een aantal mechanismen dat het DNA kan repareren. Elk van deze mechanismen kan een bepaald soort schade herstellen. Eén van de meest bedreigende vormen van DNA schade zijn de DNA dubbelstrengs breuken (DSBs), die kunnen worden veroorzaakt door ioniserende straling, zoals bij radiotherapie. DSBs zijn met name gevaarlijk wanneer ze ontstaan tijdens replicatie van het genoom of tijdens de deling van cellen, wanneer de verdubbelde chromosomen over de twee dochtercellen worden verdeeld. Indien een gebroken chromosoom deling ondergaat, worden de chromosoomfragmenten niet gelijkelijk over de dochtercellen verdeeld, waardoor chromosomale afwijkingen ontstaan. Daarom kan de cel, wanneer het DNA is beschadigd, op verschillende punten tijdens de celcyclus stoppen met vermenigvuldigen, zodat er tijd is om het DNA te herstellen. Wanneer DSBs niet goed worden gerepareerd kan dit leiden tot het ontstaan van kanker. Om meer inzicht te krijgen in de biologische processen die in gang worden gebracht in de normale weefsels na blootstelling aan ioniserende straling, is kennis van de verschillende mechanismen die DSBs kunnen herstellen onmisbaar.

Hoofdstuk 1 beschrijft de verschillende soorten schade die aan het DNA kunnen ontstaan en de mechanismen die deze schade kunnen repareren. DNA schade kan in twee categorieën worden verdeeld. In de eerste categorie is slechts één van de twee DNA strengen beschadigd. Dit type schade wordt hersteld door de tegenoverliggende identieke DNA streng te gebruiken als een soort mal. Bij de tweede soort DNA schade zijn beide strengen van het DNA gebroken, zoals het geval is bij DSBs. Er zijn twee systemen die deze schade kunnen herstellen. Het eerste systeem, de homologe recombinatie (HR), gebruikt de tweede onbeschadigde kopie van het DNA met dezelfde DNA volgorde als een mal voor de reparatie. Bij het tweede systeem, de DNA eind-verbinding (NHEJ), wor-

den de gebroken uiteinden van het DNA simpelweg met elkaar verbonden, zonder dat hiervoor een mal wordt gebruikt. HR is een nauwkeurige manier om DNA te repareren, omdat hierbij de originele DNA volgorde wordt hersteld. Reparatie door middel van NHEJ is minder precies, omdat hierbij nucleotiden, waaruit het DNA bestaat, verloren kunnen gaan of kunnen worden toegevoegd. Herstel van DSBs via NHEJ is derhalve niet altijd foutloos, waardoor belangrijke informatie van het DNA verloren kan gaan. Een groot aantal eiwitten organiseert het signaleren, herstellen en verbinden van de DSBs. Deze eiwitten zijn over het algemeen verschillend voor de beide herstelsystemen, hoewel sommigen mogelijk betrokken zijn bij zowel HR als NHEJ.

NHEJ wordt niet alleen gebruikt bij het herstel van DSBs als gevolg van schade van buiten de cel, maar is ook betrokken bij het verwerken van de geprogrammeerde DSBs die optreden tijdens het maken van de genen die nodig zijn voor het immuunsysteem. Het ontstaan van deze DSBs treedt normaal op tijdens de zogenaamde V(D)J recombina-tie. Het V(D)J recombina-tie proces is noodzakelijk voor het aanmaken van de B- en T-cel-len die betrokken zijn bij de afweer.

Om de relatie tussen defecten in de reparatie van DSBs en het ontstaan van kanker te onderzoeken, worden veel studies verricht waarbij gebruik wordt gemaakt van cellijnen en muismodellen die mutaties bevatten in DNA reparatiegenen. Hierbij is vastgesteld dat inactivatie van genen die betrokken zijn bij HR, veelvuldig leidt tot het sterven van de muizen in de embryonale fase. Het grote belang van HR wordt hiermee nog eens bena-drukt. Er zijn speciale muismodellen ontwikkeld waarbij mutaties van HR genen in bepaalde weefsels kan worden onderzocht. De resultaten van onderzoek aan deze muis-modellen toont dat HR betrokken is bij het ontstaan van chromosomale afwijkingen en kanker. Afwijkingen in genen die betrokken zijn bij NHEJ leiden niet alleen tot instabiliteit van het genoom, maar ook tot het verminderd functioneren van het proces van V(D)J recombina-tie. Een defect in één van de NHEJ eiwitten leidt dan ook tot problemen met het immuunsysteem. Muizen met een mutatie in één van de NHEJ genen kunnen ofwel levensvatbaar zijn, of sterven in de embryonale fase, afhankelijk van het gen dat defect is. De muizen die levensvatbaar zijn tonen vrijwel altijd een hoge gevoeligheid voor bestraling en immuundeficiëntie. Bij muizen die zowel een defect hebben in één van de NHEJ genen, als in p53, een gen betrokken bij de celcyclus, wordt de letaliteit hersteld. Deze muizen hebben echter aanleg tot het ontwikkelen van lymfomen. Een combinatie van een mutatie in een DNA reparatiegen en een defect in een ander gen, wat betrokken is bij het instandhouden van het genoom, kan daarom het ontstaan van kanker versnellen.

In **Hoofdstuk 2** worden de biochemische kenmerken beschreven van de eiwitten die betrokken zijn bij HR en de samenwerking van deze eiwitten in levende cellen. Dankzij biochemische studies naar de eiwitten die HR reguleren is een aantal modellen ontwikkeld die het proces van HR in vitro beschrijven, terwijl recente celbiologische studies zich richten op het gedrag van deze eiwitten in de cel. In één van de modellen voor reparatie van DSBs door middel van HR, wordt het ontbrekende DNA hersteld met behulp van de tweede intacte kopie van het DNA die aanwezig is op het zuster-chromatide. Deze reparatie begint met het bewerken van de breukuiteinden. Deze breukuiteinden worden vervolgens bedekt door een eiwit wat de identieke DNA volgorde op het zuster-chromatide kan herkennen. Hierbij wordt het DNA wat de mal vormt gebonden aan de gebroken DNA uiteinden. Het ontbrekende DNA wordt hersteld naar voorbeeld van de mal door DNA polymerasen, waarna de gerepareerde DNA uiteinden met elkaar worden verbonden door een ligase. De functie van de verschillende eiwitten die betrokken zijn bij HR worden in dit hoofdstuk bediscussieerd.

Rad51 is het sleuteleiwit in HR, omdat dit eiwit de identieke DNA volgorde op het zuster-chromatide herkent en de uitwisseling van DNA strengen tot stand kan brengen. Er zijn in totaal vijf paraloge eiwitten van Rad51 ontdekt: Xrcc2, Xrcc3, Rad51B, Rad51C en Rad51D. Een mutatie in één van deze paralogen leidt tot afwijkingen van de chromosomen en heeft invloed op de efficiëntie van reparatie door HR. Rad52 werkt samen met Rad51 en stimuleert de door Rad51 gereguleerde uitwisseling van DNA strengen. Een mutatie van Rad52 in gist veroorzaakt ernstige afwijkingen, terwijl een mutatie van Rad52 in zoogdieren slechts tot geringe problemen leidt. Rad54 levert een bijdrage gedurende het hele proces van HR. Het stabiliseert de binding van Rad51 aan het DNA, vervolgens stimuleert het Rad51 bij de binding van het gebroken DNA aan het DNA wat als mal dient en het rangschikken van het chromatine. In de laatste fase van HR kan Rad54 helpen bij het loskoppelen van Rad51 van het DNA. De exacte functie van het Rad50/Mre11/Nbs1 complex is nog onduidelijk. In vitro zijn Rad50 en Mre11 in staat om de uiteinden van DNA te binden en vast te houden. In gist lijkt het complex betrokken te zijn bij NHEJ, reparatie van het zuster-chromatide tijdens HR, het onderhouden van de telomeren en het verwerken van DSBs tijdens meiose. Brca1 en Brca2 zijn onmisbaar tijdens reparatie door HR. Resultaten van biochemische experimenten lijken erop te wijzen dat Brca2 Rad51 kan aantrekken tot de DSB en de verdeling van Rad51 over het gebroken DNA kan reguleren. Brca1 daarentegen heeft waarschijnlijk alleen indirect invloed op het functioneren van Rad51.

Eén van de manieren om het gedrag van de eiwitten die betrokken zijn bij HR te bestuderen op cellulair niveau is door middel van immunofluorescentie. Veel HR eiwitten vormen kleine structuren in de kern die foci worden genoemd en zich bevinden op plaatsen waar DNA schade is opgetreden. Deze foci kunnen spontaan optreden tijdens de celdeling of na blootstelling aan factoren die het DNA beschadigen. Immunofluorescentie is één van de technieken die veelvuldig wordt gebruikt om foci te detecteren. Een andere methode om de vorming van foci te bestuderen is door het betreffende eiwit te koppelen aan een fluorescerende groep en in het DNA te integreren. Het gedrag van dit eiwit kan daardoor zowel voor als na behandeling worden bestudeerd in levende cellen. Om een mogelijke samenwerking van bepaalde eiwitten te onderzoeken kan de vorming van foci van twee of meer eiwitten in dezelfde cel op hetzelfde tijdstip worden onderzocht. Co-localisatie, waarbij de eiwitten zich tegelijkertijd op dezelfde plaats bevinden, kan duiden op een verband tussen deze eiwitten. Alhoewel co-localisatie geen uitsluitel geeft over de specifieke interactie tussen de eiwitten, kan het wel een aanwijzing zijn dat bepaalde eiwitten samenwerken tijdens de reparatie van DSBs. Cellijnen met een defect in één van de DNA reparatie eiwitten kunnen meer of minder foci bevatten. Een vermindering in het aantal foci kan ontstaan wanneer het eiwit dat wordt onderzocht, of een eiwit waar deze mee samenwerkt, niet goed functioneert. Een toename van het aantal foci kan het gevolg zijn van een verminderd vermogen van de cel om de DNA schade te herstellen. Tabel 1 in dit hoofdstuk toont een uitgebreid overzicht van de literatuur met betrekking tot de vorming van foci door de verschillende eiwitten die betrokken zijn bij het herstel van DNA schade in normale cellijnen en cellijnen met een mutatie.

Het principe van het bestuderen van het dynamische gedrag van eiwitten die betrokken zijn bij HR in levende cellen is gebaseerd op de snelheid van het herstel van een fluorescerende signaal dat aan een eiwit is gebonden in een gebied dat is 'gebleekt' door een laserpuls. Het dynamische gedrag van Rad51, Rad52 en Rad54 in de celkern wordt beschreven in **Hoofdstuk 3**. De mobiliteit van deze eiwitten werd bestudeerd met behulp van de 'redistributie van fluorescentie na bleking' (FRAP) techniek. FRAP kan worden gebruikt om de diffusiesnelheid van eiwitten te meten door middel van het bleken van een strook die de gehele celkern overbrugt. De snelheid van het herstel van de intensiteit van de fluorescentie geeft een indicatie over de diffusiesnelheid van het betreffende eiwit. FRAP kan ook worden gebruikt om te bestuderen hoe lang bepaalde eiwitten zich in de door DNA schade geïnduceerde foci bevinden.

Allereerst werd samenwerking tussen Rad51, Rad52 en Rad54 vastgesteld door middel van immunofluorescentie, waarbij co-localisatie van deze eiwitten ter plaatse van de foci kon worden geobserveerd. Vervolgens werd het dynamische gedrag van deze eiwitten bestudeerd met behulp van FRAP, teneinde vast te stellen of Rad51, Rad52 en Rad54 mogelijk deel uitmaken van een samengesteld complex van reparatie-eiwitten dat reeds aanwezig is voordat DNA schade ontstaat. De resultaten tonen dat deze drie eiwitten zich allemaal met een verschillende snelheid voortbewegen in de kernen van onbeschadigde cellen. Wanneer dezelfde experimenten in de door DNA schade geïnduceerde foci werden verricht, werd gezien dat deze foci dynamische structuren zijn waarbij Rad51 de stabiele component is terwijl Rad52 en Rad54 slechts kortdurend aanwezig zijn in deze structuren. De resultaten van deze studie suggereren dat het merendeel van de Rad51, Rad52 en Rad54 eiwitten geen deel uitmaken van een samengesteld complex van reparatie-eiwitten wanneer er geen schade aan het DNA is. Integendeel, het grootste deel van de eiwitten beweegt zich onafhankelijk door de celkern. Een voordeel van het feit dat de DNA reparatie-eiwitten zich vrijelijk door de kern bewegen in plaats van een complex te vormen voordat DNA schade is ontstaan, zou kunnen zijn dat kleine eiwitcomplexen gemakkelijker toegang hebben tot de plaats van DNA schade dan volumineuze complexen. Bovendien is het een voordeel dat de benodigde factoren voor herstel van DNA altijd snel in de buurt van de schade kunnen zijn wanneer de eiwitten zich vrijelijk door de kern bewegen, waardoor snelle en efficiënte herkenning van schade en vervolgens reparatie kan plaatsvinden.

In **Hoofdstuk 4** is een systematische analyse verricht naar een aantal factoren dat van invloed kan zijn op de resultaten van onderzoek door middel van stralingsgeïnduceerde foci. In de experimenten is gebruik gemaakt van Rad51 en Mre11 om de invloed van deze factoren te kunnen bepalen. De resultaten van deze proeven tonen aan dat een toename in het aantal cellen dat foci bevat afhankelijk is van de tijdsduur na de bestraling. Daarbij nam ook de grootte van de foci toe naarmate er meer tijd verstreek na bestraling. De dosis ioniserende straling was ook van invloed op het aantal foci-positieve cellen. Echter, na behandeling van de cellen met een hogere dosis straling werden niet alleen meer foci-positieve cellen waargenomen, maar ook het aantal foci per celkern was toegenomen. Het percentage foci-positieve cellen op een bepaald tijdstip en dosis was afhankelijk van de cellijn en het eiwit dat werd onderzocht. Hoewel Rad51 en Mre11 foci zich over het algemeen nooit in dezelfde kernen op hetzelfde moment bevinden, werden af en toe toch cel-

len gezien waarin Rad51 en Mre11 foci co-localisatie vertoonden. Dit kan betekenen dat er een correlatie is tussen deze twee eiwitten in een klein deel van de cellen. De resultaten die in hoofdstuk 4 worden beschreven tonen aan dat de incubatietijd na behandeling met bestraling, de dosis straling en de specifieke eigenschappen met betrekking tot de celcyclus van de betreffende cellijn invloed hebben op het aantal foci-positieve cellen, het aantal foci per celkern en de kenmerken van de foci. Bovendien laten de resultaten zien dat Rad51 en Mre11 op een bepaald moment tijdens de reparatie van DNA samenwerken, hoewel deze eiwitten normaliter geen foci vormen in dezelfde cellen.

Hoofdstuk 5 beschrijft de reactie van Rad51, Rad52 en Rad54 op DNA schade in cellijnen die overgevoelig zijn voor straling en een defect in één van de genen bevatten die betrokken zijn bij de reparatie van DSBs via HR. Dit is onderzocht met behulp van stralingsgeïnduceerde vorming van foci. De resultaten laten zien dat Rad52 in staat is om foci te vormen na DNA beschadiging in hamstercellen met een mutatie in Xrcc2, Xrcc3, Rad51C of Brca2, terwijl Rad51 en Rad54 hiertoe niet in staat waren. Bovendien bleek Rad52 niet noodzakelijk te zijn voor stralingsgeïnduceerde Rad51 en Rad54 foci. Aanvullende experimenten in normale cellijnen tonen aan dat de foci van deze drie eiwitten allen co-localiseren, maar dat de co-localisatie tussen Rad52 en Rad51 of Rad54 beperkt is, terwijl Rad51 en Rad54 foci elkaar volledig overlappen. Daarbij vertonen Rad52 foci een andere kinetiek dan Rad51 foci. In tegenstelling tot in gist, waar Rad52 onmisbaar is voor de vorming van Rad51 en Rad54 foci, is Rad52 in zoogdieren niet noodzakelijk voor stralingsgeïnduceerde vorming van Rad51 en Rad54 foci. Ondanks het feit dat Rad52 in gist en in zoogdieren biochemisch dezelfde eigenschappen vertoont en de DNA volgorde sterk overeenkomt, lijkt de bijdrage van gist Rad52 en zoogdier Rad52 aan de respons op DNA schade sterk verschillend.

Het eiwit Rad54 heeft verschillende functies tijdens de reparatie van DNA schade via HR. Om te onderzoeken welke van deze functies verantwoordelijk is voor het ontstaan van stralingsgeïnduceerde foci werden embryonale stamcellen met een specifieke mutatie in Rad54 gemaakt. Deze mutatie leidde tot verminderde binding van het ATP. Cellijnen met deze mutante Rad54 eiwitten vertoonden een sterke stijging in het aantal spontane Rad51 en Rad54 foci. Een verklaring hiervoor kan zijn dat de spontaan optredende DNA schade niet goed kan worden bewerkt in afwezigheid van Rad54 ATPase activiteit.

In **Hoofdstuk 6** is de mogelijkheid onderzocht om de proeven met stralingsgeïnduceerde vorming van foci te gebruiken vanuit het oogpunt van de kliniek. Om te proberen een manier te vinden die het effect van bestraling op de normale weefsels van patiënten kan voorspellen, werd naar een nieuwe methode gezocht om de individuele stralingsgevoeligheid te meten. Door middel van het screenen van cellen van een controlegroep, een groep stralingsgevoelige kankerpatiënten en een geselecteerde groep patiënten met severe combined immunodeficiency (SCID), werd getracht om mogelijke defecten in de DNA DSB reparatiemechanismen op te sporen met behulp van de vorming van foci van de eiwitten Rad51, Rad54, Mre11, γ -H2AX en Brca1. De resultaten laten zien dat een afwijkend patroon in stralingsgeïnduceerde vorming van foci kan worden waargenomen in cellen van patiënten met een verhoogde gevoeligheid voor bestraling en een bewezen defect in een reparatiegen. Deze methode was echter minder geschikt als screeningsmethode om de reactie van de normale weefsels op bestraling te voorspellen, als gevolg van de variabiliteit in het aantal foci en de grootte van de foci.

Het bepalen van telomeerlengte is een andere methode die mogelijk zou kunnen dienen als screeningsmethode om de reactie van bestraling op de normale weefsels te voorspellen, aangezien recente studies een verband aantonen tussen het onderhoud van de telomeren en stralingsgevoeligheid. Telomeren bedekken de uiteinden van de chromosomen, waardoor de cel onderscheid kan maken tussen normaal voorkomende uiteinden van chromosomen en beschadigde uiteinden zoals het geval is bij DSBs. Op deze manier beschermen telomeren de chromosoomuiteinden tegen verval. In dit hoofdstuk werd het verband tussen telomeerlengte en een verhoogde gevoeligheid voor bestraling onderzocht. Er kon echter geen correlatie tussen stralingsgevoeligheid en telomeerlengte worden vastgesteld in de cellen van de onderzochte patiënten.

Uit deze experimenten kunnen we concluderen dat de vorming van stralingsgeïnduceerde foci van bepaalde eiwitten in cellen en het meten van de telomeerlengte geen geschikte methoden zijn om de respons van de normale weefsels op bestraling te voorspellen.