

# DNA-reparation – en grundlæggende faktor i aldring og cancerudvikling

Professor Lene Juel Rasmussen, lektor Tinna Stevnsner & professor Vilhelm A. Bohr

Roskilde Universitetscenter, Institut for Biologi og Kemi, Aarhus Universitet, Institut for Molekylærbiologi, og National Institute on Aging, NIH, Baltimore, USA

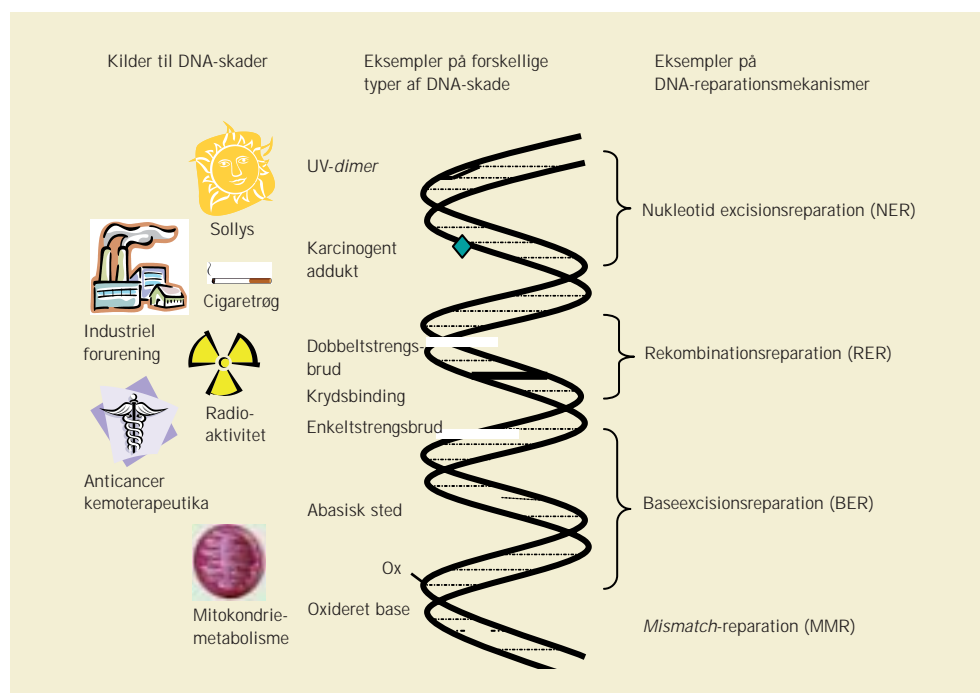
Stigende levealder indebærer større modtagelighed over for en række sygdomme som f.eks. cancer, hvilket har medført, at netop cancer også kaldes en aldersassocieret sygdom, selv om det dog langt fra kun er gamle mennesker, som bliver ramt af cancer [1]. En stadig stigende indsigt i gener og proteins rolle i aldrings- og sygdomsprocesserne har gjort det muligt at undersøge disse på et basalt molekylærbiologisk niveau. Dette har da også medført, at man i de senere år har gjort markante fremskridt inden for molekylærbiologisk alders- og cancerforskning, hvilket forhåbentligt kan øge både livskvalitet og forlænge levealderen i befolkningen.

## DNA-skader og reparation

En DNA-skade kan forårsages af faktorer, som er et produkt af kroppens eget stofskifte, eller som findes i vores omgivelser, og som kan trænge ind i vores celler og beskadige arvemassen

(Figur 1). Disse faktorer kan være elementer i sollys, forurening, fødevarer samt kosmetik, og der opstår dermed dagligt tusindvis af DNA-skader i hver eneste af kroppens celler. Hvis disse skader ikke repareres, kan de medføre celleforandringer, idet gener eller udtryk af disse ændres. Trods det at cellerne har reparationssystemer, som tager sig af DNA-skader, sker der alligevel en ophobning af skader med alderen, og dette bidrager til aldersprocessen og kan f.eks. forårsage cancersygdomme. I forskningen inden for DNA-reparation har man traditionelt fokuseret på de mekanismer, som ligger til grund for reparation af vores kromosomer dvs. det nukleare DNA, men i de senere år er der kommet mere og mere fokus på DNA-reparationen i mitokondrier [2]. Dette skyldes bl.a., at ophobning af skader i det mitokondrielle DNA som følge af begrænset eller nedsat mitokondriel DNA-reparationskapacitet kan resultere i mitokondriel dysfunktion, hvilket vil have væsentlige følgevirkninger. Dels producerer mitokondrierne energi til cellerne, dels producerer de store mængder af reaktive oxygenforbindelser, som effektivt beskadiger DNA'et. Derudover er mitokondrierne involveret i reguleringen af cellernes selvmords/apoptoserespons i forbindelse med kraftig DNA-beskadigelse. Flere og flere sygdomme er nu associeret med mitokondriel dysfunktion. Mitokondrielle sygdomme er yderst svækkende og meget komplekse af natur

Figur 1. Der findes et bredt spektrum af kilder til DNA-beskadigende stoffer og stråling. Disse giver hver især anledning til en eller flere slags DNA-skader. De forskellige DNA-reparationsmekanismer tager sig hver især af specifikke typer af DNA-skader.



og omfatter meget forskellige tilstande lige fra neurologiske lidelser, nedsat frugtbarhed, sukkersyge, hjertesygdomme, leversygdomme, nyresygdomme, blindhed, døvhed og slagtilfælde til migræne. Der findes endnu ingen behandling for mitokondrielt betingede sygdomme.

Genetisk stabilitet opretholdes af adskillige cellulære aktiviteter. For det første repareres DNA-skader af DNA-reparationssystemer såsom nukleotid excisionsreparation (NER), *base excisions-reparation* (BER), *mismatch-reparation* (MMR), rekombinationsreparation (RER) og translæsiønsyntese (TLS) [3]. For det andet forhindrer proteiner, der indgår i overordnede moduleringer af DNA-struktur og topologi, DNA-beskadigelse og kromosomale afvigelse, som kunne opstå som følge af DNA-metaboliske processer. For det tredje har cellerne overvågningsmekanismer (*checkpoints*), som detekterer ændringer i DNA'et, og i tilfælde af sådanne forårsager cellecyklusstop, hvorved cellen får tid til at reparere det skadede DNA, inden celledelingen afsluttes. Alle disse systemer findes med nogen variation i både encellede og flercellede organismer, hvilket tyder på, at bevarelse af vores arvemasse er fundamental for alle celler. Derfor er det heller ikke overraskende, at meget af den viden, vi har i dag om DNA-reparation, og som bidrager til udvikling af forfinede diagnostiske metoder og udvikling af medicin, er baseret på grundvidenskabelig forskning i en lang række forskellige biologiske systemer såsom bakterier, gærceller, orme, mus og mennesker.

### DNA-reparation og aldring

Med alderen sker der en gradvis reduktion af DNA-reparationskapaciteten, hvilket resulterer i en akkumulering af skader i arvemassen, hvilket giver anledning til forstyrrelse i DNA-metabolismen. Der findes en række sjældne sygdomme, hvor aldersprocessen forløber specielt hurtigt. Patienterne fremtræder betydeligt ældre end deres kronologiske alder, og de får aldersassocierede sygdomme i en tidlig alder. Det drejer sig om f.eks. Werners syndrom, Cockaynes syndrom, Blooms syndrom, Hutchinson-Guilford's progeria, Rothmund-Thomson's syndrom, xeroderma pigmentosum, thrichothiodystrofi og ataxia telangiectasia [4]. Alle disse tilstande er forbundne med molekylære defekter i DNA-reparationsmekanismerne, og i de fleste af disse sygdomsbilleder er der en markant stigning i forekomsten af cancer, men typen af cancer, som udvikles, kan variere med de forskellige tilstande. De førnævnte sygdomme kan kobles til mutationer i et enkelt gen, hvilket gør det muligt at undersøge sygdomsmekanismen på et basalt molekylært niveau bl.a. ved at udvikle musemodeller for disse sygdomme, baseret på knock-out eller mutation i det respektive gen.

Hvis man skal sammenligne de ovennævnte relativt sjældne førtidige aldringssyndromer med normal aldring må man sige, at Werners syndrom nok er den tilstand, der har flest ligheder med normal aldring. Sygdommen skyldes mutationer i Werner-genet, der koder for Werner-proteinet

### Eksempler på sygdomme med relation til DNA-reparation

#### Aldring før tid

Werners syndrom  
Cockaynes syndrom  
Blooms syndrom  
Hutchinson-Guilford's progeria  
Rothmund-Thomson's syndrom  
Trikotyodystrofi  
Ataxia telangiectasia

#### Cancer

Hereditær nonpolypøs kolorektal cancer (HNPCC)  
Xeroderma pigmentosum (XP)  
Fanconi anemia (FA)

(WRN), som er et enzym, der både kan vikle DNA-streng fra hinanden og nedbryde enderne på DNA-streng. Werner-proteinet har vist sig at indgå i mange forskellige cellulære processer, såsom DNA-reparation, transkription (budbringning fra DNA'et), replikation (kopiering af DNA'et), rekombination (omrokering imellem DNA-streng) og vedligeholdelse af telomererne (kromosomender). Werner-proteinet synes dog ikke at være essentielt for nogle af disse processer, men den overordnede nedsatte effektivitet af disse mange forskellige processer giver tilsammen ophav til genomisk ustabilitet. Hvis man ser på mutationer i *CSA*- og *CSB*-generne, som giver ophav til Cockaynes syndrom, indgår de proteiner, som disse gener koder for, i lighed med Werner-proteinet i en række vigtige cellulære processer som DNA-reparation, transkription og celledød [5]. Antallet af gener, som kan kobles til aldringsprocessen er stigende, og for ganske nylig har man fundet ud af, at mutationer i *Lamin A*-genet giver ophav til Hutchinson-Gilford's progeria. Lamin A er et strukturelt protein i cellekernen uden enzymatisk aktivitet, og endnu er der ingen, der rigtigt forstår, hvordan defekten i netop dette protein kan give ophav til det komplekse sygdomsbillede, som Hutchinson-Gilford progeria har.

### DNA-reparationskapacitet som en prædikator for cancerisiko

NER er et meget vigtigt reparationssystem, som står for at fjerne relativt komplekse DNA-skader, inklusive skader induceret af sollys og en række forskellige karcinogener, som bl.a. findes i tobaksrøg. Mutationer i gener, der er essentielle i dette reparationssystem, kan f.eks. føre til sygdommen xeroderma pigmentosum, hvor patienterne har en betydelig forøget risiko for at få nonmelanom hudcancer. I epidemiologiske studier har endvidere vist, at nedsat NER-kapacitet korrelerer med øget risiko for at få sollysinduceret basalcellecarcinom, tobaksinduceret lungecancer og hoved- og halscancer samt brystcancer [6]. I visse tilfælde har det været muligt i NER-

generne at finde specifikke polymorfier (genetiske variationer i befolkningen som forekommer >1%), som kan associeres med f.eks. kolorektal cancer, hoved- og halscancer, brystcancer og hudcancer.

**DNA-reparation og arvede nonpolypos kolorektal cancer**  
MMR er et DNA-reparationssystem, der genkender og retter forkert indsatte baser og små loops, der ikke er blevet rettet af DNA-polymerasens egen korrekturlæsningsaktivitet. Et defekt MMR-system resulterer i meget høj genetisk ustabilitet, som ofte betegnes »mutatorfænotype«. Arvede nonpolypos kolorektal cancer (HNPCC) er en arvelig genetisk cancersygdom, der netop skyldes mutationer i komponenter af MMR-systemet. Opdagelsen af, at HNPCC skyldes mutationer i MMR-generne, har for alvor øget interessen for at forstå sammensætningen af DNA-reparationskomplekserne i menneskeceller. Mutationer i mindst fire MMR-gener er fundet hos HNPCC-patienter, nemlig i *hMSH2*, *hMSH6*, *hMLH1* og *hPMS2* [7, 8].

HNPCC er karakteriseret ved tidlig udvikling af kolorektal cancer og ved et bredt spektrum af cancer i andre vævstyper og organer, herunder maven, livmoderen, æggestokkene og urinvejene. HNPCC-individer arver en mutation i en af allelerne, der koder for et MMR-protein. Den anden allel muteres eller mistes og resulterer i en celle med et defekt MMR-system. Et defekt MMR-system fører til genetisk ustabilitet og en mutatorfænotype. Opstår der mutationer i protooncogener og/eller tumorsuppressorgener (de såkaldte cancergener), kan dette føre til dannelsen af en cancercelle. Man ved ikke nøjagtigt, hvad der disponerer et individ for kolorektal cancer i HNPCC. Nogle mutationer i MMR-gener er associeret med en kraftig nedsat frekvens af tumorer uden for tyktarmen. Disse mutationer forhindrer den berørte allel i at udøve en dominant negativ effekt på MMR-processen. Det er også vist, at sammensætningen og aktiviteten af MMR-komplekserne blandt HNPCC-patienter varierer afhængigt af den enkelte mutation.

#### Basal molekylærbiologisk viden og diagnostik

Inden for HNPCC-diagnostik er den nyeste udvikling, at man begynder at forstå funktionen af de proteiner, som indgår i MMR-reparationsprocessen. Denne viden åbner nye muligheder for at screene kolorektal cancer-patienter, som ikke har mutationer i de allerede kendte MMR-gener. En anden meget vigtig information, som den molekylærbiologiske forskning har ført med sig, er, at man nu ved, at det er muligt, at nogle kolorektal cancer-patienter kan have mere end en mutation i MMR-generne (de såkaldte svage mutatoralleler). Disse mutationer er før i tiden ofte blevet kategoriseret som polymorfier, idet de hver for sig ikke synes at ændre funktionen af det pågældende gen. Men hvis de er i kombination med andre polymorfier/mutationer, vil de kunne inaktivere MMR-systemet fuldstændigt, og dermed vil det pågældende individ være

disponeret for kolorektal cancer. Denne viden understreger vigtigheden af at få kortlagt det menneskelige genom og øge forståelsen for, hvordan individets specifikke sammensætning af arvemasse påvirker et evt. sygdomsforløb.

Hvorfor er det vigtigt at indføre basal molekylærbiologisk viden i det kliniske arbejde? Et eksempel herpå er det såkaldte Amsterdam-kriterium, som anvendes til diagnosticering af HNPCC-patienter. Dette kriterium er meget snævert defineret. Konsekvensen er derfor, at der er en meget stor gruppe af coloncancerpatienter, som enten fejlagtigt bliver diagnosticeret som havende ikke-HNPCC, eller som bliver puttet i en stadig voksende gruppe af patienter kaldet atypisk HNPCC-patienter. Desuden finder man mange *missense*-mutationer hos patienter, hos hvem man har mistanke om, at de lider af HNPCC. Store deletioner samt *frameshift*-mutationer, der fører til ekspresion af trunke proteiner, medfører en åbenlys inaktivering af proteinets funktion. De funktionelle konsekvenser af *missense*-mutationer er derimod ikke åbenlyse. Disse er fordelt over hele den kodende sekvens af genet og ligger ikke koncentreret i bestemte regioner, således at man ville kunne forudse deres biokemiske defekt. *Missense*-mutationer kan forårsage defekt MMR ved f.eks. 1) inaktivering af enzymatisk aktivitet (adenosintrifosfat-binding/hydrolyse), 2) defekt protein-protein-interaktion (kompleksdannelse), 3) defekt protein-DNA-binding (*mismatch*-genkendelse), 4) defekt subcellular lokalisering af MMR-proteiner, 5) ændret ekspresion af MMR-proteiner (støkiometri af MMR-komplekser) og 6) ændret stabilitet af MMR-proteiner. I forbindelse med denne form for mutationer er det ofte svært at forudsige den biokemiske defekt, hvilket gør det vigtigt at implementere funktionelle/biokemiske metoder i diagnostikken. Derfor er langsigtede forskningsprojekter som f.eks. at kortlægge de molekylære komponenter og mekanismer i MMR-systemet hos mennesker uden tvivl af stor betydning for bedre behandling af patienter med HNPCC.

#### Perspektiver

DNA-reparation er en kompliceret process, og mens der er sket store fremskridt på det mere mekanistiske plan med henblik på at forstå de basale processer, de involverede molekyler, proteininteraktionerne mv., har det været vanskeligt at udvikle DNA-reparations-*assays*, som kan bruges i større populationsstudier eller hos det enkelte individ. Enkelte *assays* har været anvendt i studier med et større antal patienter. Det drejer sig for eksempel om kometanalysen, hvor DNA skader kan detekteres i enkelte celler [9] og om en analyse kaldet *host cell reactivation*, en slags måling af reparation i aktive gener [10] (Figur 2). Førstnævnte *assay* kan bl.a. anvendes til at måle niveauet af DNA-skader med i f.eks. lymfocytter, som isoleres efter et individs indtagelse af forskellige fødevarer. Sidstnævnte *assay* har bl.a. været anvendt i (ovennævnte) studier af sammenhængen imellem NER-kapacitet og cancerisiko. Man har også analyseret DNA-reparation ved at undersøge

DNA-reparations-assays med potentiale  
for individuel cancerisikovurdering

*Host cell reactivation assay (HCR):* Lymfocytter fra blodprøve analyseres for kapacitet til at fjerne skader i en DNA-vektor med specifik type DNA-skade

*Comet assay:* Nogle få celler (f.eks. lymfocytter) analyseres for eksisterende DNA-skader og/eller for kapacitet til at fjerne skader, der påføres de pågældende cellers DNA

Figur 2. To metoder, som må forventes at kunne udvikles til brug for cancerisikovurdering.

genekspressionsmønsteret af DNA-reparationsproteiner [4]. Efterhånden som der opnås en dybere forståelse af de processer, der fører til DNA-beskadigelse, og til de forskellige DNA-reparationsprocesser, må man forvente, at der kan udvikles nye behandlingsstrategier ikke kun til at bekæmpe cancersygdomme med, men også til at udskyde aldringsprocessen med. Sådanne strategier kunne involvere metoder til at reducere DNA-skader med og eller fremme/stimulere DNA-reparation, hvorved man må forvente at udsætte eller afværge en

række aldersassocierede sygdomme. Det er på tide at overveje at inkludere analyser af DNA-reparationen i den mere almindelige kliniske analyse af patienter med aldersassocierede sygdomme.

Korrespondance: Lene Juel Rasmussen, Institut for Biologi og Kemi, Roskilde Universitetscenter, DK-4000 Roskilde. Email: ljr@ruc.dk

Antaget: 10. marts 2006  
Interessekonflikter: Ingen angivet

#### Litteratur

1. DePinho RA. The age of cancer. *Nature* 2000;408:248-54.
2. Stevnsner T, Thorslund T, de Souza-Pinto NC et al. Mitochondrial repair of 8-oxoguanine and changes with aging. *Exp Gerontology* 2002;37:1189-96.
3. Larsen NB, Rasmussen M, Rasmussen LJ. Nuclear and mitochondrial DNA repair: similar pathways? *Mitochondrion* 2005;5:89-108.
4. Kyng KJ, Bohr VA. Gene expression and DNA repair in progeroid syndromes and human aging. *Ageing Res Rev* 2005;4:579-602.
5. Licht CL, Stevnsner T, Bohr VA. Cockayne Syndrome group B cellular and biochemical functions. *Am J Hum Genet* 2003;73:1217-39.
6. Neuman AS, Sturgis EM, Wei Q. Nucleotide excision repair as a marker for susceptibility to tobacco-related cancers: a review of molecular epidemiological studies. *Mol Carcinogenesis* 2005; 42:65-92.
7. Liberti SE, Rasmussen LJ. Is hEXO1 a cancer predisposing gene? *Mol Cancer Res* 2004;2:427-32.
8. Kunkel TA, Erie DA. DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem* 2005; 74:681-710.
9. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnology* 2004;26:249-61.
10. Athas WF, Hedayati MA, Matanoski GM et al. Development and field-test validation of an assay for DNA repair in circulating human lymphocytes. *Cancer Res* 1991;51:5786-93.

## Erhvervede mutationer – basal cancerbiologi

1. reservelæge Kirsten Grønæk & professor Per Guldberg

H:S Rigshospitalet, Hæmatologisk Afdeling, og  
Kræftens Bekæmpelse, Institut for Biologisk Kræftforskning

En milepæl i bestræbelserne på at kortlægge kræftens biologi har været erkendelsen af, at det er forandringer i cellernes gener (mutationer), der er den drivende kraft bag kræftudviklingen [1-3]. Der foreligger nu uigendriveligt bevis for, at mutationer i cellens genom er en forudsætning for malign vækst. Mutationerne repræsenterer det stabile element, der tilfører cellen nye egenskaber, og som overføres fra en generation af kræftceller til den næste. Fejl i generne opstår ofte tilfældigt i forbindelse med kopiering af genomet under celledeling, men kan også fremprovokeres af påvirkninger udefra.

Når en mutation bidrager positivt til en normal celledeling, vil der gennem gentagne celledelinger dannes en population af celler (klon), der alle har ophav i – og

dermed genetisk set er identiske med – den muterede celle. Herved opstår kræftudviklingens første, præmaligne stadie. For at kræften skal udvikle sig, må en af disse præmaligne celler erhverve sig endnu en mutation med vækstfremmende effekt, efterfulgt af en ny bølge af klonal ekspansion. Kræftdannelsen kan således beskrives som en trinvis – oftest langvarig – proces, hvor hvert trin repræsenterer en mutation i et kræftassocieret gen. Det skønnes, at 4-6 mutationer er nødvendige for dannelsen af en kræftcelle med invasive egenskaber [4]. Antallet afhænger af, hvilken celletype den givne kræftform udspringer fra, samt hvilke gener der muteres [5].

Kræft er altså altid en genetisk sygdom, om end sjældent arvelig i gængs forstand. Langt størstedelen af de registrerede kræfttilfælde er sporadiske sygdomme. I denne statusartikel beskrives, hvorledes gener kan forandres, så de får kræftfremmende egenskaber, endvidere beskrives de cellulære signal-kæder og kontrolmekanismer, der påvirkes af mutationerne, og et konkret eksempel på, hvordan dannelsen af en malign tumor kan forklares ved forandringer i specifikke gener.