



rijksuniversiteit  
 groningen

4-7-2016

ERIBA

# De associatie tussen Homologe Recombinatie en kanker

Bachelor Scriptie Rijksuniversiteit Groningen

Auteur: Susan Ott (s2469685)

SUPERVISOR: DR. DANIËL WARMERDAM (ERIBA)

## Samenvatting

DNA schade is een belangrijke oorzaak van kanker. Om DNA schade te voorkomen zijn er verschillende DNA reparatie mechanismen. De ernstigste vormen van DNA schade zijn dubbelstrengs breuken. Deze worden op verschillende manieren gerepareerd, waarvan de meest nauwkeurige manier homologe recombinatie is. De betrokkenheid van homologe recombinatie bij DNA reparatie blijkt ook uit de relatie met kanker. Tumorcellen kunnen een verminderde activiteit van recombinatie gestuurde DNA reparatie hebben, zoals bij erfelijke borstkanker door een mutatie in een BRCA gen. Verminderde activiteit van het homologe recombinatie zorgt voor extra DNA schade en mogelijk het ontstaan van kanker. Componenten van dit reparatie mechanisme kunnen ook worden versterkt in kankercellen en dit kan leiden tot een verminderde werking van kankertherapieën die erop gericht zijn het DNA te beschadigen waardoor er een verbeterde overleving van de kankercellen is. Dat homologe recombinatie betrokken is bij kanker brengt ook voordelen met zich mee, beïnvloeding van dit reparatie mechanisme biedt een mogelijkheid tot kankertherapie. Er is al een behandeling in de kliniek die aangrijpt op recombinatie deficiënte cellen, namelijk poly(ADP-ribose)polymerase 1 eiwit inhibitors. In deze scriptie wordt het proces van homologe recombinatie uitgelegd. Daarbij wordt de betrokkenheid van dit proces bij kanker belicht en worden mogelijkheden voor kankertherapie besproken.

# Inhoudsopgave

Samenvatting .....	1
Inhoudsopgave.....	2
Inleiding .....	3
De rol van HR in kanker .....	10
HR: een mogelijk therapie voor kanker? .....	13
Discussie .....	15
Referenties .....	16

# Inleiding

DNA schade is een belangrijke oorzaak van kanker.<sup>1</sup> Schade aan het DNA kan optreden door externe factoren zoals bestraling of door het ultraviolet licht van de zon. Het kan daarnaast ook ontstaan door processen die plaats vinden in cellen zelf, zoals tijdens DNA replicatie, de fase waarin cellen hun DNA verdubbelen om daarna te kunnen delen.<sup>2</sup>

Om DNA schade te beperken beschikken cellen over verschillende reparatie systemen, die alle vormen van schade aan het DNA kunnen repareren. Er zijn verschillende typen DNA schade, zoals enkel strengs breuken (SSB), dubbel strengs breuken (DSB) en schade aan basen in het DNA. Deze vormen van schade kunnen onder andere leiden tot mutaties of grotere genomische veranderingen, zoals translocaties, genetisch materiaal veranderd van plek in het DNA, inserties, er worden extra nucleotiden aan de sequentie toegevoegd of deleties, verdwijning van nucleotiden uit het chromosoom.<sup>2,3</sup> Bij een mutatie is er een verkeerde nucleotidebase ingebouwd in het DNA. Dankzij de DNA reparatiemechanismen wordt minder dan één op de duizend mutaties permanent.<sup>4</sup>

DNA bestaat uit twee strengen. In een SSB is één van beide strengen gebroken, terwijl de andere streng nog intact is en bij een DSB zijn beide strengen gebroken.<sup>4</sup> Een DSB is een van de gevaarlijkste vormen van DNA schade<sup>5</sup> en komt ongeveer tien keer per celdeling voor.<sup>3</sup> Een DSB kan zo schadelijk zijn dat zelfs één enkele breuk tot celdood kan leiden. Onvoldoende reparatie van een DSB kan leiden tot inserties of deleties. Vandaar dat het heel belangrijk is dat DSB op een goede manier worden gerepareerd.<sup>5</sup>

Een DSB kan op een paar verschillende manieren worden gerepareerd. Via een proces dat Non-Homologues End-Joining (NHEJ) wordt genoemd, waarbij de twee uiteinden van het DNA na een breuk weer aan elkaar worden gezet. En via Homologe Recombinatie (HR) een proces waarbij het zuster chromatide als voorbeeld streng wordt gebruikt om de DSB te repareren.<sup>5</sup>

Bij NHEJ moeten de DNA stengen eerst bij elkaar worden gebracht. Dit wordt op gang gebracht door de KU70 en KU80 eiwitten, die samen een eiwitcomplex vormen. Dit KU eiwitcomplex brengt de gebroken uiteinden van het DNA weer bij elkaar. Het KU complex zorgt voor het aantrekken en activeren van DNA-afhankelijk proteïne kinase (DNA-PK). Daarbij activeert het KU complex de katalytische subunit van DNA-PK, de DNA-PKcs. DNA-PKcs heeft verschillende functies, het stabiliseert de DNA uiteinden en voorkomt op deze manier afbraak<sup>6</sup> en het brengt daarbij de DNA stukken verder naar elkaar toe. Vervolgens moeten de DNA uiteinden weer aan elkaar worden verbonden. Omdat DNA bijna nooit recht doormidden breekt, maar meestal nog een uitstekend extra stukje streng (“overhang”) heeft aan een van beide kanten van de breuk, moet dat eerst worden opgelost. Dit kan op twee manieren gebeuren. Het stukje enkelstreng (overhang) kan worden gebruikt als template om nieuwe nucleotiden aan vast te maken, of de overhang wordt verwijderd door het endonuclease eiwit Artemis. Tot slot worden de uiteinden met elkaar verbonden door een complex gevormd door Ligase IV en XRCC4 (Figuur 2, A).<sup>7</sup> NHEJ is een reparatie mechanisme dat op een snelle en efficiënte manier DSBs kan herstellen. Nadelig is echter dat tijdens NHEJ vaak nucleotiden verloren gaan.<sup>4</sup> Dit gebeurt tijdens het verwijderen van de DNA overhang. Hierdoor is NHEJ een stuk minder nauwkeurig dan HR.<sup>7</sup>

Bij HR wordt er gebruik gemaakt van de onbeschadigde homologe sequentie op het zuster chromosoom om de breuk te repareren. Hierdoor gaan er geen nucleotiden verloren en is het een nauwkeurigere manier om DSB te repareren dan NHEJ. HR komt alleen voor tijdens de S fase en de G<sub>2</sub> fase van de celdeling. Dit komt omdat dan het DNA is verdubbeld en er een zuster chromatide aanwezig is om als homoloog te fungeren tijdens de HR.<sup>8</sup> Het stadium van de cel cyclus speelt dus een rol bij de beslissing om een DSB te repareren door NHEJ of HR.<sup>7</sup>

Net als bij NHEJ moeten bij HR eerst de DNA stukken bij elkaar worden gebracht. Hierbij speelt het MRN complex een grote rol. Door de DSB wordt het CtBP interactie eiwit (CtIP) gefosforyleerd. Deze lokaliseert de DSB en bindt bijna onmiddellijk aan het MRN complex.<sup>9</sup> Het MRN complex bestaat uit de eiwitten Mre11, Rad50 en Nbs1. In het complex bindt Mre11 het DNA terwijl Rad50 ervoor zorgt dat de DNA helften aan elkaar worden verbonden. Mre11 heeft een werking als endo- en exonuclease en zorgt ervoor dat het DNA wordt ontbonden. Nbs1 zorgt er in het MRN complex voor dat interacties met andere DNA-reparatie eiwitten plaats vinden, waaronder die met ataxia telangiectasia mutated (ATM).<sup>10</sup> ATM is een kinase die geactiveerd wordt door het MRN complex, die vervolgens alle delen van het MRN complex fosforyleert. De activering van ATM en MRN leidt tot een toename van MRN complexen bij de DSB. Daarbij zorgt ATM nog voor fosforylering van andere HR componenten, waaronder het BRCA1 eiwit en CtIP.<sup>11</sup> Nadat BRCA1 is geactiveerd helpt deze samen met de eiwitten BARD1 en BRIP1 met het organiseren van reparatie eiwitten.<sup>12</sup>

Mre11 zorgt ervoor dat de nucleotiden aan de 5' kant van het DNA worden verwijderd (resectie) dit is nodig om later tijdens de HR het eiwit Rad51 te laten binden aan het DNA.<sup>13</sup> De resectie van het DNA uiteinde wordt gereguleerd door ATM die ervoor zorgt dat CtIP een reactie aangaat met BRCA1 en het MRN complex. Hierin zorgt het BRCA1 eiwit voor stabilisatie van het MRN-CtIP complex.<sup>14</sup> De CtIP binding kan worden geremd door 53BP1. Hierdoor kan er alsnog een alternatieve vorm van NHEJ (alt-NHEJ) plaatsvinden in plaats van HR.<sup>6</sup>

Via alt-NHEJ worden net als bij NHEJ de DNA stukken aan elkaar geplakt. Dit gebeurt echter nadat het MRN complex is gebonden aan het DNA. CtIP promoot deze vorm van reparatie, bijvoorbeeld als BRCA1 niet beschikbaar is, en zorgt ervoor dat er een gelimiteerde overhang ontstaat door resectie van een paar basen.<sup>15</sup> Anders dan bij NHEJ wordt echter Ligase III in complex met XRCC1 gebruikt om de gebroken uiteinden weer aan elkaar vast te maken. Dit complex wordt gestimuleerd door het MRN complex (Figuur 2, C).<sup>16</sup>

Als de cel na uiteinde resectie verder gaat met HR is het Rad51 eiwit essentieel. Deze zorgt ervoor dat de infiltratie in het zusterchromatide kan plaatsvinden en de homologe structuur kan worden gevonden. Rad51 heeft echter tijd nodig om te binden aan het kaal gemaakte stuk 3' DNA. Hierdoor heeft replicatie eiwit A (RPA) de kans om te binden.<sup>17,18</sup> RPA kan zowel een stimulerend als een remmend effect uitoefenen op Rad51. Zo remt RPA de Rad51 filament formatie: Rad51 gebonden aan singel strand DNA (ssDNA). Rad51 heeft namelijk een lagere affiniteit voor ssDNA dan RPA. RPA stimuleert juist wel de recombinatie door de secundaire structuur uit het ssDNA te verwijderen.<sup>19</sup> Een aantal recombinatie factoren kunnen de remmende werking van RPA tegengaan, om er zo voor te zorgen dat Rad51 kan binden en de HR kan plaatsvinden.<sup>17</sup> Hierin spelen Rad52 en BRCA2 een belangrijke rol.

Eén van de recombinatie factoren die de remmende werking van RPA tegengaan is het BRCA2 eiwit. BRCA2 kan zowel aan ssDNA binden als aan meerdere Rad51 moleculen.<sup>18</sup> Zo kan BRCA2 Rad51 naar het ssDNA brengen en verhoogt deze mogelijk de affiniteit van Rad51.<sup>5</sup> Een tweede manier om ervoor te zorgen dat RPA wordt vervangen door Rad51 is met behulp van Rad52.<sup>20</sup> Rad52 kan samen met Rad51 een complex vormen. In dit complex kan Rad52 RPA gebonden ssDNA herkennen en binden. Op deze manier kan Rad51 toegang krijgen tot het ssDNA en zo de plaats van RPA innemen.<sup>18</sup>

Zodra Rad51 is gebonden aan het ssDNA wordt er gezocht naar homologieën op het zuster chromatine. Dit doet Rad51 door in het zusterchromatide te infiltreren door het vormen van een 'displacement loop' (D-loop).<sup>6</sup> Hierbij wordt het 3' uiteinde aan de template van het zusterchromatide gebonden en wordt een homologe sequentie gezocht. Zodra deze is gevonden zijn er verschillende subpathways die ervoor zorgen dat DSB wordt gerepareerd, namelijk synthese-afhankelijke streng "annealing" (SDSA), dubbele streng breuk reparatie (DSBR) en breuk-geïnduceerde replicatie (BIR).<sup>19</sup> Nadat de D-loop is gevormd zijn er twee mogelijke opties. De D-loop kan met behulp van Rad52 ervoor zorgen dat er DNA polymerase optreedt of de D-loop neemt de andere streng van het zusterchromatide en vormt hiermee een "Holliday Junction" (HJ) (Figuur 2, B).<sup>21</sup>

In het geval van DNA polymerase in de D-loop wordt de HR via de SDSA pathway uitgevoerd. In deze pathway gaat de 3' staart die het zusterchromatide is binnengedrongen fungeren als een primer. Zodoende kan het DNA replicatie mechanisme worden aangezet en kan er een nieuw stukje DNA aan het 3' deel worden gemaakt. Dit kan vervolgens weer binden aan de 3' staart van de complementaire streng.<sup>22</sup> Hierna vindt er een tweede ronde van DNA-synthese plaats waarnaar vervolgens met behulp van Cdc9, een DNA ligase, het laatste stukje DNA aan elkaar wordt verbonden.<sup>5</sup> Dit proces wordt waarschijnlijk mede bevorderd door het RTEL1 eiwit, een anti-recombinase eiwit.<sup>21</sup>

In het tweede geval wordt er een HJ gevormd dit is een complex gevormd door twee DNA-strengen die in elkaar verweven zijn (Figuur 1).<sup>4</sup> In de HR treedt er vaak een dubbele HJ (dHJ) op.

Dit gebeurt als beide gebroken stukken van het DNA infiltreren in het zusterchromatide.<sup>23</sup> De vorming van een dHJ gebeurt met behulp van het Rad52 eiwit dat ervoor zorgt dat het DNA wordt gestabiliseerd.<sup>5</sup>

De DNA reparatie die met behulp van dHJ wordt uitgevoerd is

onderdeel van de DSBR pathway en kan resulteren in zowel een non-crossing over product als een crossingover product.<sup>23</sup> Bij een non-crossingover product worden de gebroken DNA uiteinden weer aan elkaar verbonden. Hier kan eventueel een klein stukje tussen gezet worden met de sequentie van het zusterchromatide. Bij een crossing over product wordt een gebroken deel aan het zusterchromatide vast gemaakt. Hierdoor kan er een partnerswitch plaatsvinden tussen de twee chromatiden.<sup>4</sup> Nadat ontbrekende nucleotiden zijn toegevoegd moeten de DNA-strengen weer van elkaar worden losgemaakt, de HJ's moeten worden verbroken. Er zijn verschillende eiwitten bij het loskoppelen betrokken. HJ's kunnen uit elkaar worden gehaald door het BLM-TOPOIII complex. Dit complex zorgt voor non-crossing-over producten en remt de chromosomale reorganisatie.<sup>24</sup>

Andere eiwitten kunnen HJs knippen, zoals GEN1,<sup>25</sup> MUS81/EME1 of het SLX1/SLX4 complex.<sup>6,26</sup> Door de HJ te knippen kan er zowel crossingover plaatsvinden als non-crossingover.<sup>6</sup> Na het knippen vindt er ligatie plaats, waarmee de dubbelstrengs breuk wordt gerepareerd.<sup>5</sup>



Figuur 1. Structuur van een Holliday Junction

Afbeelding van Srinivasan et al, 2016<sup>49</sup>



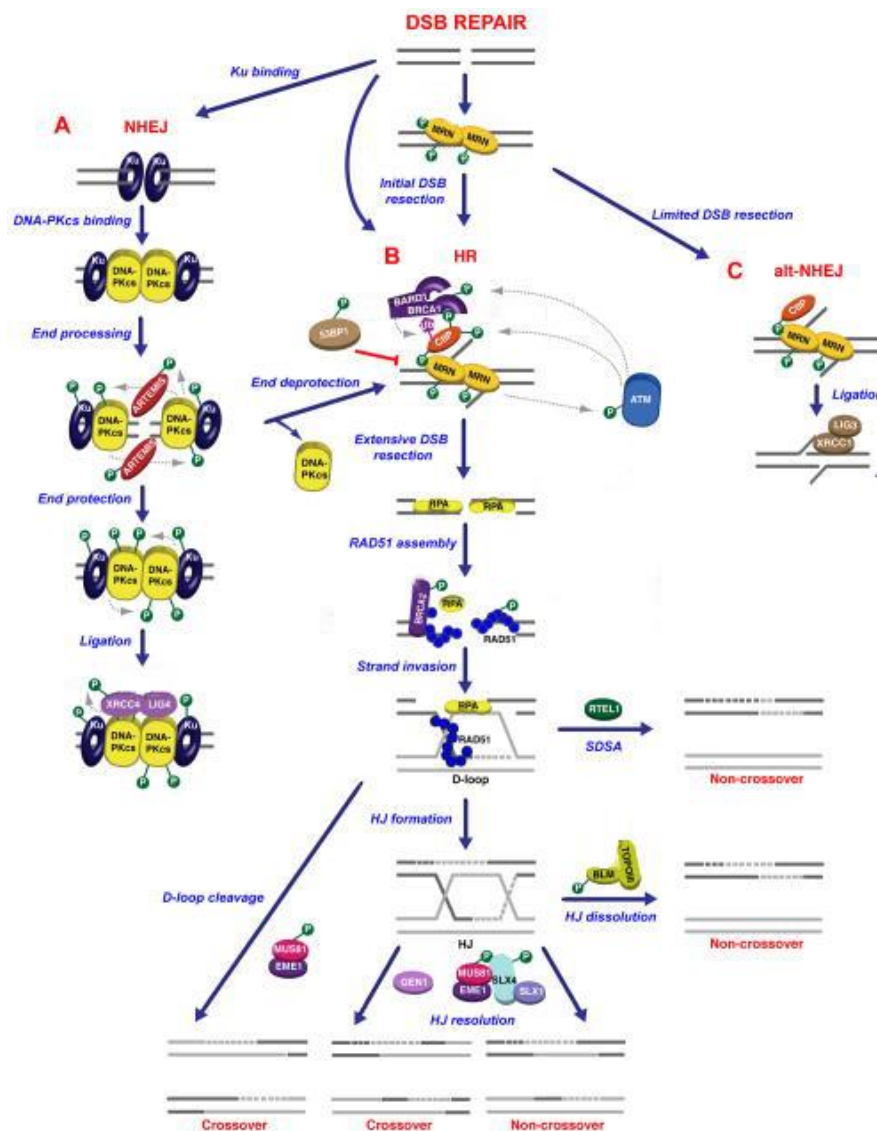
De laatste pathway voor HR is de BIR pathway. Tijdens deze pathway wordt de gehele arm van het zusterchromatide overgenomen ter reparatie van de DSB. In de BIR pathway infiltreert, net als in de SDSA pathway, de 3' staart zich in het zusterchromatide en fungeert deze als primer.<sup>27</sup> De DNA replicatie duurt echter veel langer dan die in de SDSA pathway.<sup>5</sup> De BIR pathway kan worden geïnduceerd omdat een afgebroken deel niet beschikbaar is.<sup>19</sup> De DNA replicatie op het zusterchromatide gaat net zo lang door tot het andere gebroken uiteinde is gevonden, of het uiteinde van het zusterchromatide is bereikt. Op deze manier wordt dan het DNA gerepareerd.<sup>28</sup>

Een nadeel van HR is dat de heterogeniteit deels verloren kan gaan. In plaats van twee verschillende chromosomen worden stukken van het zusterchromosoom exacte kopieën. Met de SDSA en DSBR pathways wordt het verlies van de heterogeniteit beperkt tot een klein stukje. Bij de BIR pathway echter, kan het hele uiteinde van het chromosoom worden gekopieerd van het zusterchromatide.<sup>28</sup> Verlies van heterogeniteit is een belangrijke factor in kankerontwikkeling. Bij verlies kan namelijk een gezond allel verloren gaan en een mogelijke gemuteerde versie van het zusterchromatide worden gekopieerd. Hierdoor verliest de cel het gezonde allel, wat kan leiden tot complicaties zoals tumor ontwikkeling<sup>29</sup>.

Een ander nadeel van HR is dat de reparatie mogelijk niet functioneel kan zijn. Dit kan gebeuren omdat er in een zusterchromatide een homoloog wordt gevonden, een sequentie die erg veel lijkt op de gebroken sequentie. In dat geval wordt de breuk met het verkeerde voorbeeld gerepareerd.<sup>4</sup>

Misregulatie in DNA-reparatie systemen kan leiden tot instabiliteit van het genoom en kanker. Veel mutaties in genen die betrokken zijn bij HR zijn geassocieerd met kanker.<sup>30</sup> Zo zijn mutaties in de BRCA1 en BRCA2 genen sterk geassocieerd met borstkanker en ovarium kanker.<sup>11</sup> Andere HR genen die geassocieerd zijn met kanker zijn onder andere mutaties in de Mre11, Nbs1, Rad50, Rad51 en Rad52.<sup>31</sup> Ook een mutatie in het Y42C die ervoor zorgt dat BRCA2 minder goed aan RPA kan binden wordt geassocieerd met kanker.<sup>17</sup>

Waarom kan een niet gerepareerde DSB leiden tot kanker? En waarom is de kans op kanker verhoogd bij mensen met mutaties in genen die betrokken zijn bij HR? En hoe kunnen we HR misschien gebruiken om kanker te bestrijden? Om antwoorden te zoeken op deze vragen wordt besproken welke rol HR speelt in de ontwikkeling van kanker en hoe de kennis over HR kan worden gebruikt in therapieën tegen kanker.



Figuur 2. De verschillende routes die zijn betrokken bij het repareren van een DSB.

A. Laat het proces van Non-Homologe End-joining (NHEJ) zien waarbij eerst het KU-complex en vervolgens DNA-PKcs aan de gebroken DNA uiteinden bindt. Daarna wordt met behulp van Ligase IV en XRCC4 de DNA stukken weer aan elkaar verbonden.

B. Bij homologe recombinatie (HR) worden de DNA stukken door het MRN complex bij elkaar gebracht. MRN activeert ATM dat vervolgens Brca1 en CtIP fosforyleert. Met behulp van BRCA1 en CtIP vindt er resectie plaats van de 3' staart van de gebroken uiteinden. Aan dit kale deel binden vervolgens RPA eiwitten die later met behulp van BRCA2 worden vervangen door Rad51, waarna er een homologe sequentie op het zusterchromatide kan worden gezocht met behulp van een displacement loop (D-loop). Mogelijk onder invloed van RTEL1 wordt synthese-afhankelijke streng annealing (SDSA) geïnduceerd. Met behulp van Cdc9 worden de stukken DNA weer aan elkaar vastgemaakt.

De vorming van een dubbele Holliday Junction zorgt ervoor dat het DNA wordt gerepareerd. Vervolgens kan de HJ op twee manieren worden verwijderd. Het TopoIII-BLM complex kan HJs uit elkaar halen en het Mus81/EME1 complex en GEN1 kunnen HJs doorknippen, waarna vervolgens het DNA weer aan elkaar wordt geplakt.

C. Bij alternatieve Non-Homologe End-joining (alt-NHEJ) vindt er na het binden van het MRN complex een kleine resectie plaats van het DNA met behulp van CtIP. Vervolgens wordt het DNA met behulp van Ligase III en XRCC1 weer aan elkaar vast gemaakt.

Afbeelding van Ciccio et al, 2010<sup>6</sup>

## De rol van HR in kanker

Ongeveer één op de vijf mensen sterft aan kanker. Kanker ontstaat door een abnormale ongecontroleerde celgroei die resulteert in een gezwel, een tumor. Tumoren tasten het gezonde weefsel aan. Uiteindelijk kunnen kankercellen in de bloedbaan komen en zich zo verspreiden door het hele lichaam. Door uitgroei van deze metastasen, uitzaaiingen, kan een kankerpatiënt uiteindelijk doodgaan.<sup>4</sup>

De meeste kankers ontstaan uit één enkele cel. Door ophoping van DNA-schade kan er ongecontroleerde deling optreden en zo kanker ontstaan.<sup>4</sup> HR deficiëntie leidt tot genoom instabiliteit. In kanker zijn genen die betrokken zijn bij de HR pathway vaak verminderd actief.<sup>32</sup> Zo zijn mutaties in HR factoren geassocieerd met kanker.<sup>5</sup> HR defecten zijn daarom mogelijk verantwoordelijk voor de mutaties die ervoor zorgen dat er een tumor ontstaat.<sup>32</sup>

De bekendste defecten in HR zijn de BRCA<sub>1</sub> en BRCA<sub>2</sub> deficiënties.<sup>33</sup> In HR speelt BRCA<sub>1</sub> een rol in de stabilisatie van het MRN-CtIP complex en helpt BRCA<sub>2</sub> om Rad51 op de 3' staart te binden.<sup>12,14</sup> Hierdoor spelen Brca<sub>1</sub> en Brca<sub>2</sub> een cruciale rol binnen HR.<sup>32</sup> Alle vormen van HR worden aangetast bij een BRCA deficiëntie.<sup>34</sup> BRCA deficiënties zijn vooral geassocieerd met de ontwikkeling van borst, ovarium en eierstok kanker.<sup>12</sup> Maar de BRCA genen zijn ook onderzocht met betrekking tot darmkanker, eileiderkanker en alveesklierkanker.<sup>33</sup> BRCA deficiëntie kan op verschillende manieren ontstaan. Het meest voorkomend zijn mutaties in de kiemlijn. Deze mutaties zijn aanwezig in alle cellen van een individu, via een opgelopen mutatie of via epigenetische stillegging van de BRCA-genen.<sup>12</sup> Draggers met een erfelijke mutatie in een BRCA-gen hebben een risico van 50 tot 70% op het ontwikkelen van borstkanker voor het 70<sup>ste</sup> levensjaar. Bij mannen vergroot een BRCA mutatie de kans op prostaatkanker. Waarom verlies van BRCA<sub>1</sub> en BRCA<sub>2</sub> vooral tot borst-, ovarium- en prostaatkanker, en niet tot andere vormen van kanker leidt is nog niet duidelijk.<sup>34</sup>

Net als mutaties in het BRCA gen zijn ook mutaties in het MRN-complex, Rad51 en Rad52 geassocieerd met kanker.<sup>31</sup> Zo verlagen mutaties in het MRN-complex de efficiëntie van de reparatie van DSB.<sup>35</sup> Daarbij kunnen mutaties in het Nbs1 een apoptotisch defect veroorzaken, hierdoor gaan de cellen minder snel in gereguleerde celdood (apoptose) wanneer dat wel gewenst is.<sup>36</sup> Lage eiwit niveaus van het MRN-complex zijn geassocieerd met lage niveaus van ATM en het p53 eiwit.<sup>35</sup> Individuen met een vermindering in het ATM eiwit kunnen de ziekte ataxia-telangiectasia (AT) ontwikkelen. Deze ziekte zorgt voor neuronale degeneratie, maar zorgt ook voor een verhoogde kans op kanker. Mensen met AT hebben een levenslang risico op kanker van 30 tot 40%. Zij krijgen met name leukemie en borstkanker.<sup>37</sup> p53 is een eiwit dat tot expressie komt bij cellulaire stress.<sup>38</sup> Zo is p53 een eiwit dat onder andere betrokken is bij DNA-schade signalering.<sup>33</sup> Activatie van p53 kan ervoor zorgen dat de celcyclus tijdelijk wordt stopgezet, zodat het DNA in de cel kan worden gerepareerd. Ook kan p53 ervoor zorgen dat de cel stopt met delen of zelfs in apoptose gaat. Mutaties in p53 zijn een van de meest voorkomende in kanker, ongeveer 50% van de kankers hebben mutaties in het p53 gen. Door zijn tumorremmende functie is p53 vaak een essentiële component in het fenotype van een tumorcel.<sup>38</sup>

In borstkanker komt Rad51 net als BRCA vaak verminderd tot expressie. Rad51 deficiëntie zorgt in cellen voor chromosomale afwijkingen.<sup>39</sup> Aan de andere kant kunnen DNA-reparatie mechanismen in kankercellen ook worden versterkt. Hierdoor wordt DNA efficiënter gerepareerd en daardoor kan de kanker een resistentie tegen chemo- en radiotherapie ontwikkelen.<sup>31</sup> Zo wordt Rad51 in de meerderheid van de kankersoorten juist meer tot expressie gebracht dan in normale cellen. Hoe deze over-expressie wordt veroorzaakt is nog niet duidelijk, al wordt er gedacht dat het te maken heeft met p53. Het p53 eiwit heeft in normale omstandigheden namelijk een remmende werking op de Rad51 expressie. Maar omdat p53 in kankercellen vaak is gemuteerd worden de cellen p53 deficiënt en kan dit mogelijk de expressie van Rad51 verhogen. Deze over-expressie zorgt voor een vergroting van genoom instabiliteit en een verhoging van resistentie tegen therapieën gericht op accumulatie van DNA-schade in kanker cellen. Hierdoor hebben patiënten met een verhoogde expressie van Rad51 een slechtere prognose.<sup>40</sup> Ook een over-expressie van Nbs1 kan een rol spelen in kankerontwikkeling. Nbs1 over-expressie komt ongeveer in 45% voor in hoofd en nek plaveiselcelcarcinomen. Deze over-expressie wordt tevens geassocieerd met een slechtere prognose.<sup>41</sup>

Net als Rad51 en Nbs1 wordt in veel tumoren ook ATM tot over-expressie gebracht. In kankercellen kan ATM voor celcyclus arrest zorgen en daardoor voor apoptose. In sommige tumoren blijkt de werking van ATM dan ook verminderd, waardoor er minder apoptose optreedt. Maar de ATM expressie kan evengoed in tumoren verhoogd zijn. Waarschijnlijk hebben deze tumoren andere mechanismen om de celcyclus arrest en apoptose te voorkomen. Een andere mogelijke verklaring voor verhoogde ATM activiteit bij kanker, is het stadium van waarin deze kankersoorten zich bevinden. In het beginstadium ontstaat er extra schade in de cel en wordt de ATM expressie verhoogd om tumorgenese te voorkomen. In een jonge tumor is dit proces mogelijk nog niet verminderd.<sup>42</sup>

In veel soorten kanker spelen componenten van HR een belangrijke rol, zowel verminderde expressie als over-expressie van HR gerelateerde eiwitten. HR is hierdoor een logisch aangrijpingspunt voor kankertherapie.

## HR: een mogelijk therapie voor kanker?

In veel kankertherapieën wordt DNA schade geïnduceerd om celdood te induceren in de kankercel. Zo wordt er in verschillende kankertherapieën gebruik gemaakt van inductie van dubbel strengs breuken (DSB). Beïnvloeding van HR draagt veelal bij aan deze vorm van kankertherapie.<sup>43</sup>

HR pathways worden in kanker vaak onderdrukt of juist geactiveerd. Bij een mutatie in een HR gen worden andere back-up HR eiwitten, eiwitten met een vergelijkbare functie, belangrijker voor het overleven van de cel. Dit is een mogelijk aangrijpingspunt voor kanker therapie, het selectief stilleggen van HR back-up mechanismen waardoor HR geheel wordt uitgeschakeld.<sup>43</sup> Het uitschakelen van HR leidt tot een grote genominstabiliteit. Er bestaan ook kankervormen die al HR deficiënt zijn. Deze kankervormen zijn waarschijnlijk gevoeliger voor schade die normaal door HR wordt gerepareerd. Tot slot zijn kankercellen door een grotere genomische instabiliteit door verminderde HR activiteit afhankelijker van bepaalde controlesystemen in de celcyclus om apoptose te voorkomen. Ook hierop zou een kankertherapie mogelijk kunnen aangrijpen.<sup>32</sup>

Er zijn veel kankertherapieën die DNA schade induceren waardoor DSB ontstaan. Daardoor is het een logische stap om HR in deze tumoren te verminderen, waardoor het DNA minder goed wordt gerepareerd en de cellen sneller in apoptose gaan.<sup>44</sup> In HR is een van de essentiële eiwitten het Rad51 eiwit.<sup>11</sup> Door de essentiële functie van het Rad51 is dit een logisch aangrijpingspunt om HR in kankercellen te verminderen. Niet alleen vermindering van Rad51 maar ook van BRCA2 zorgt voor een verhoogde sensitiviteit voor chemotherapie.<sup>44</sup> Rad51 kan worden verminderd met behulp van tyrosine kinase remmers. Tyrosine kinasen zorgen voor een vergrote Rad51 concentratie. Door dit te remmen, wordt Rad51 geremd, hierdoor worden de cellen gevoeliger voor schade inducerende therapieën.<sup>45</sup>

Niet alleen Rad51 remmers zijn een mogelijk aangrijpingspunt voor kanker therapie, ook ATM is een aangrijpingspunt voor therapie. Verminderde ATM expressie leidt tot een glucose beperking in de cel. Dit heeft tot gevolg dat de cel moet overgaan op verbruik van zijn eigen energie voorraad. In muizen met een ATM deletie leidt dit tot meer misvormde mitochondriën en zorgt de deletie voor een vertraagde tumorgenese. Daarbij zorgt ATM deficiëntie voor een verhoogde sensitiviteit voor radiotherapie.<sup>42</sup> ATM remmers zijn een mogelijkheid voor kankertherapie, maar er kan ook voor gekozen worden om juist ATM te extra te activeren. Zo zorgt het medicijn Metformine, veel gebruikt bij de behandeling van diabetes mellitus type 2, voor activatie van ATM. Patiënten met type 2 diabetes die behandeld worden met Metformine blijken een lager risico te hebben op het ontwikkelen van kanker.<sup>46</sup>

Een andere therapie die aangrijpt op het HR is al klinisch in gebruik, namelijk Olaparib. Olaparib is een poly(ADP-Ribose)polymerase 1 eiwit (PARP1) inhibitor, die de werking van het PARP1 eiwit remt.<sup>47</sup> PARP1 is een eiwit dat betrokken is bij de reparatie van enkel strengs breuken (SSB). Bij inhibitie van PARP vindt deze reparatie niet goed plaats, er ontstaat schade aan de nucleotidebase. Tijdens de replicatie wordt deze schade omgezet naar een DSB die vervolgens moet worden gerepareerd door HR.<sup>32</sup> Bij HR deficiënte cellen, zoals cellen met een BRCA mutatie, lukt dit niet goed. Zo zorgt PARP inhibitie bij BRCA deficiënte cellen voor een vergrote genomische instabiliteit en leidt dit uiteindelijk tot celdood. Bij kankerpatiënten met een BRCA deficiëntie is deze medicatie erg selectief voor het tumor weefsel en is normaal weefsel weinig gevoelig. Niet alleen BRCA deficiënte cellen zijn gevoelig voor PARP inhibitors, ook cellen met een verlies van Rad51 expressie reageren goed op PARP inhibitors.<sup>48</sup>

Door gericht gebruikt te maken van de specifieke mutaties in de kankercellen kan met behulp van selectieve remmers kanker op een zeer specifieke en individuele manier worden behandeld. Hierdoor kunnen onnodige behandelingen worden voorkomen en zal er minder toxiciteit plaatsvinden in patiënten.<sup>33</sup>

## Discussie

DNA reparatie mechanismen spelen een essentiële rol in de ontwikkeling en het overleven van een organisme. De reparatie mechanismen verminderen DNA schade en zorgen voor vermindering van veroudering en preventie van kanker.<sup>6</sup> HR is een belangrijk mechanisme in het DNA reparatie systeem. Het zorgt ervoor dat de stabiliteit van ons genoom wordt behouden.<sup>19</sup> Genomische instabiliteit is één van de hoofdoorzaken van kanker. HR is vaak betrokken bij de ontwikkeling van kanker. Zo kan HR lokaal worden verminderd in bepaalde vormen van kanker,<sup>21</sup> of juist worden vergroot.<sup>31</sup> Daarnaast kan de functie van HR worden onderdrukt om te zorgen dat kanker bestrijdende therapieën beter aanslaan. Beïnvloeding van HR biedt veel mogelijkheden om kanker te bestrijden.<sup>21</sup>

Een goede therapie van kanker zorgt voor een selectieve bestrijding van de kankercellen, waarbij er zo min mogelijk toxiciteit bij gezonde cellen plaatsvindt. Hiervoor is het nodig om op zoek te gaan naar een zo gericht mogelijke therapie. Er zijn heel veel verschillende eiwitten betrokken bij HR die allemaal met elkaar in verband staan. De precieze verbanden zijn tot nu toe nog niet allemaal bekend. Desondanks zijn er al een aantal therapieën tegen kanker die aangrijpen op HR. Zo zorgen tyrosine kinasen en ATM remmers voor een verminderde activiteit van HR. Hierdoor zorgen deze middelen voor een verbeterde werking van DNA schade inducerende therapieën. Behandeling met PARP inhibitors is een therapie die aangrijpt op tumoren die al HR deficiënt zijn, bijvoorbeeld door BRCA mutaties. PARP is een eiwit dat normaal een rol speelt bij de reparatie van een enkel strengs breuk. Bij PARP inhibitie verandert deze breuk in een dubbel strengs breuk. Deze kan door HR deficiëntie niet goed worden gerepareerd waardoor celcyclus arrest optreedt en de cel dood gaat. Olaparib is een PARP inhibitor die momenteel al in de kliniek wordt gebruikt.

Gezien de vele aangrijpingspunten in het HR mechanisme zijn er nog veel mogelijkheden voor nieuwe kanker medicijnen. Daarom zal er meer onderzoek komen naar hoe HR kan worden gebruikt om kanker te bestrijden. Therapieën zullen gericht en persoonlijker worden door gebruik te maken van specifieke HR eigenschappen van de tumor. Hiermee wordt voorkomen dat ze schade toebrengen aan het gezonde weefsel. Zo kan onderzoek naar HR helpen om zoveel mogelijk patiënten met kanker te genezen met zo min mogelijk lange termijn complicaties.



## Referenties

1. Shimada M, Nakanishi M. DNA damage checkpoints and cancer. *J Mol Histol.* 2006;37(5-7):253-260.
2. Hoeijmakers JH. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med.* 2009;361(15):1475-1485.
3. Raji H, Hartsuiker E. Double-strand break repair and homologous recombination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast.* 2006;23(13):963-976.
4. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. In: *Molecular biology of the cell*. 8th ed. New York, USA: Garland Science; 2008:263-328, 1205-1268.
5. Sebesta M, Krejci L. DNA replication, recombination, and repair: Molecular mechanisms and pathology. In: Hanaoka F, Sugawara K, eds. *DNA replication, recombination, and repair: Molecular mechanisms and pathology*. Tokyo, Japan: Springer; 2016:73-109.
6. Ciccio A, Elledge SJ. The DNA damage response: Making it safe to play with knives. *Mol Cell.* 2010;40(2):179-204.
7. Weterings E, Chen DJ. The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Res.* 2008;18(1):114-124.
8. Kadyk LC, Hartwell LH. Sister chromatids are preferred over homologs as substrates for recombinational repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 1992;132(2):387-402.
9. Lamarche BJ, Orazio NI, Weitzman MD. The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance. *FEBS Lett.* 2010;584(17):3682-3695.
10. Rupnik A, Grenon M, Lowndes N. The MRN complex. *Curr Biol.* 2008;18(11):R455-7.
11. Krajewska M, Fehrmann RS, de Vries EG, van Vugt MA. Regulators of homologous recombination repair as novel targets for cancer treatment. *Front Genet.* 2015;6:96.
12. Walsh CS. Two decades beyond BRCA1/2: Homologous recombination, hereditary cancer risk and a target for ovarian cancer therapy. *Gynecol Oncol.* 2015;137(2):343-350.
13. Paull TT, Gellert M. The 3' to 5' exonuclease activity of Mre11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell.* 1998;1(7):969-979.
14. Huen MS, Sy SM, Chen J. BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(2):138-148.
15. You Z, Bailis JM. DNA damage and decisions: CtIP coordinates DNA repair and cell cycle checkpoints. *Trends Cell Biol.* 2010;20(7):402-409.
16. Frit P, Barboule N, Yuan Y, Gomez D, Calsou P. Alternative end-joining pathway(s): Bricolage at DNA breaks. *DNA Repair (Amst).* 2014;17:81-97.
17. San Filippo J, Sung P, Klein H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem.* 2008;77:229-257.
18. Sung P, Krejci L, Van Komen S, Sehorn MG. Rad51 recombinase and recombination mediators. *J Biol Chem.* 2003;278(44):42729-42732.

19. Li X, Heyer WD. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res.* 2008;18(1):99-113.
20. Zhou C, Pourmal S, Pavletich NP. Dna2 nuclease-helicase structure, mechanism and regulation by rpa. *Elife.* 2015;4:10.7554/eLife.09832.
21. Barber LJ, Youds JL, Ward JD, et al. RTEL1 maintains genomic stability by suppressing homologous recombination. *Cell.* 2008;135(2):261-271.
22. West SC. Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(6):435-445.
23. Agmon N, Yovel M, Harari Y, Liefshitz B, Kupiec M. The role of holliday junction resolvases in the repair of spontaneous and induced DNA damage. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(16):7009-7019.
24. Bussen W, Raynard S, Busygina V, Singh AK, Sung P. Holliday junction processing activity of the BLM-topo IIIalpha-BLAP75 complex. *J Biol Chem.* 2007;282(43):31484-31492.
25. Ip SC, Rass U, Blanco MG, Flynn HR, Skehel JM, West SC. Identification of holliday junction resolvases from humans and yeast. *Nature.* 2008;456(7220):357-361.
26. Andersen SL, Bergstralh DT, Kohl KP, LaRocque JR, Moore CB, Sekelsky J. Drosophila MUS312 and the vertebrate ortholog BTBD12 interact with DNA structure-specific endonucleases in DNA repair and recombination. *Mol Cell.* 2009;35(1):128-135.
27. Rodgers K, McVey M. Error-prone repair of DNA double-strand breaks. *J Cell Physiol.* 2016;231(1):15-24.
28. Llorente B, Smith CE, Symington LS. Break-induced replication: What is it and what is it for? *Cell Cycle.* 2008;7(7):859-864.
29. Happle R. Loss of heterozygosity in human skin. *J Am Acad Dermatol.* 1999;41(2 Pt 1):143-164.
30. Karpenshif Y, Bernstein KA. From yeast to mammals: Recent advances in genetic control of homologous recombination. *DNA Repair (Amst).* 2012;11(10):781-788.
31. Bartosova Z, Krejci L. Nucleases in homologous recombination as targets for cancer therapy. *FEBS Lett.* 2014;588(15):2446-2456.
32. Evers B, Helleday T, Jonkers J. Targeting homologous recombination repair defects in cancer. *Trends Pharmacol Sci.* 2010;31(8):372-380.
33. Cerbinskaite A, Mukhopadhyay A, Plummer ER, Curtin NJ, Edmondson RJ. Defective homologous recombination in human cancers. *Cancer Treat Rev.* 2012;38(2):89-100.
34. Weinber, R. The biology of cancer. In: 2th ed. New York USA: Garland Science; 2014:511-575.
35. Dzikiewicz-Krawczyk A. The importance of making ends meet: Mutations in genes and altered expression of proteins of the MRN complex and cancer. *Mutat Res.* 2008;659(3):262-273.
36. Stracker TH, Morales M, Couto SS, Hussein H, Petrini JH. The carboxy terminus of NBS1 is required for induction of apoptosis by the MRE11 complex. *Nature.* 2007;447(7141):218-221.

37. Meyn MS. Ataxia-telangiectasia, cancer and the pathobiology of the ATM gene. *Clin Genet*. 1999;55(5):289-304.
38. Chen F, Wang W, El-Deiry WS. Current strategies to target p53 in cancer. *Biochem Pharmacol*. 2010;80(5):724-730.
39. Yoshikawa K, Ogawa T, Baer R, et al. Abnormal expression of BRCA1 and BRCA1-interactive DNA-repair proteins in breast carcinomas. *Int J Cancer*. 2000;88(1):28-36.
40. Hine CM, Seluanov A, Gorbunova V. Use of the Rad51 promoter for targeted anti-cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(52):20810-20815.
41. Yang MH, Chiang WC, Chou TY, et al. Increased NBS1 expression is a marker of aggressive head and neck cancer and overexpression of NBS1 contributes to transformation. *Clin Cancer Res*. 2006;12(2):507-515.
42. Cremona CA, Behrens A. ATM signalling and cancer. *Oncogene*. 2014;33(26):3351-3360.
43. Helleday T. Homologous recombination in cancer development, treatment and development of drug resistance. *Carcinogenesis*. 2010;31(6):955-960.
44. Quiros S, Roos WP, Kaina B. Rad51 and BRCA2--new molecular targets for sensitizing glioma cells to alkylating anticancer drugs. *PLoS One*. 2011;6(11):e27183.
45. Miyagawa K. Clinical relevance of the homologous recombination machinery in cancer therapy. *Cancer Sci*. 2008;99(2):187-194.
46. Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Cufi S, Martin-Castillo B, Menendez JA. Metformin activates an ataxia telangiectasia mutated (ATM)/Chk2-regulated DNA damage-like response. *Cell Cycle*. 2011;10(9):1499-1501.
47. Lord CJ, Tutt AN, Ashworth A. Synthetic lethality and cancer therapy: Lessons learned from the development of PARP inhibitors. *Annu Rev Med*. 2015;66:455-470.
48. Rouleau M, Patel A, Hendzel MJ, Kaufmann SH, Poirier GG. PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(4):293-301.
49. Srinivasan AR, Olson WK. Holliday junction. <http://rutchem.rutgers.edu/olson-wilma-k>. Updated 2008. Accessed juli 7, 2016.