

# Fact Sheet: genotoxiciteit

## Waarom willen we DNA-schade vaststellen?

---

DNA is een molecule die alle erfelijke informatie bevat. Bij de mens zit dit DNA in de vorm van chromosomen in de celkern van iedere cel. De genetische informatie ligt er gerangschikt op 46 chromosomen. Fouten (mutaties) in het DNA kunnen verschillende gevolgen hebben, waaronder overerfbare aandoeningen, premature veroudering of kanker. Het is daarom belangrijk te weten welke milieu-invloeden het DNA van onze cellen kunnen aantasten of welke bevolkingsgroepen gevoeliger zijn voor DNA-schade of meer DNA-schade vertonen.

Bij biomonitoring in de mens kijken we naar DNA-schade in (witte) bloedcellen. Bloed kan immers op een vrij eenvoudige manier bekomen worden. Bovendien circuleert bloed overal in het lichaam, en komt het daardoor ook in contact met schadelijke stoffen. Het aantonen van DNA-schade in bloedcellen is daarom geschikt als 'biomarker' om blootstelling aan zogenaamde 'genotoxische' stoffen (en mogelijk toegebrachte schade) aan te tonen. Er bestaan vele technieken om genetische schade op te sporen. In de humane biomonitoringscampagnes van het Steunpunt Milieu & Gezondheid wordt de komeetttest uitgevoerd op bloed om de DNA schade te meten.

Daarnaast meten we ook 8-deoxy-hydroxy-guanosine of 8-oxodG in de urine. Deze stof is een maat voor de hoeveelheid herstelde oxidatieve schade in het lichaam.

## Waarom de komeetttest?

---

Deze methode wordt gekozen omdat het een vrij eenvoudige, weinig tijdrovende en tegelijk gevoelige methode is om schade aan het DNA aan te tonen. Het gaat om schade die niet noodzakelijk blijvend en dus niet persé gevaarlijk is. DNA-schade bestaat namelijk vooral uit tijdelijke, herstelbare fouten. De meeste, bijna alle, schade wordt correct hersteld, maar het is wel zo dat schade nooit met een 100 % nauwkeurigheid kan hersteld worden en er dus altijd een (zeer kleine) kans op mutaties is. Dit betekent dat een toename in DNA-schade, zoals gemeten met de komeetttest, wijst op een toename in sommige deelaspecten van het kankerrisico, maar niet noodzakelijk op een stijging van het totale kankerrisico. Een komeetttest die wijst op meer cellen met DNA-schade, zou op groepsniveau op een toegenomen risico voor kanker kunnen duiden. Dit geldt echter niet op het niveau van het individu, omdat de komeetttest slechts een momentopname is.

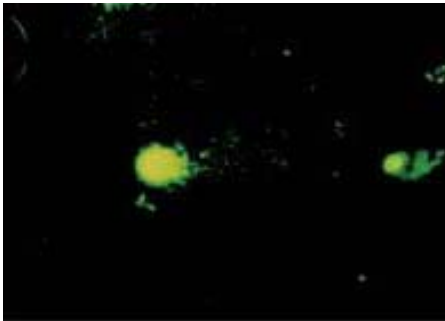
## Hoe werkt de komeetttest?

---

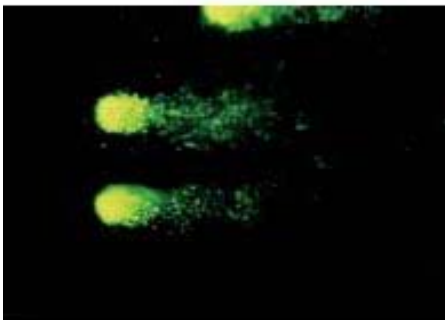
In de komeetttest wordt DNA, in dit geval uit witte bloedcellen, geïsoleerd en in een gel op een glaasje aangebracht. Vervolgens wordt de gel onder een elektrische spanning gebracht. De DNA-fragmenten zijn steeds negatief geladen, wat betekent dat ze in de gel naar de positieve pool van het elektrisch veld zullen migreren. Als DNA beschadigd is, ontstaan er meer fragmenten of losse uiteinden. Deze losse stukjes zijn lichter en zullen dus sneller migreren. Na kleuring van het DNA kan men onder de microscoop voor elke cel een 'DNA-komeet' zien. Indien er veel korte, beschadigde DNA-fragmenten voorkomen, zullen zij een behoorlijke komeetstaart vormen. De lengte en inhoud van de komeetstaart kunnen via automatische beeldanalysesystemen zeer nauwkeurig worden gemeten. Het resultaat van de komeetttest

geeft aan hoeveel % van het DNA zich in de komeetstaart bevindt. Bij niet-beschadigd DNA vindt men zo goed als geen DNA-fragmenten of losse uiteinden en zal er weinig of geen afzonderlijke migratie optreden. In dat geval wordt geen komeetuitzicht bekomen. Dit wordt in onderstaande figuur geïllustreerd. Bovenaan zien we DNA van een niet-beschadigde cel; onderaan DNA van twee cellen die wel genetische schade hebben opgelopen. Hier is een aanzienlijke 'komeetstaart' zichtbaar. Na manuele uitzuivering van de foutief gemeten cellen, kan dan uiteindelijk een % DNA-migratie berekend worden voor elk individu.

Wie gemiddeld meer cellen met dergelijke DNA-schade heeft t.o.v. een controlepopulatie zal niet noodzakelijk kanker ontwikkelen of een andere aandoening krijgen. Dit wijst echter wel op een verhoogde blootstelling aan genotoxische stoffen wat potentieel een risico kan betekenen en waarvoor waakzaamheid dus geboden is, bijvoorbeeld het achterhalen van de verontreinigende factor die voor de schade verantwoordelijk is en het in de toekomst beperken of voorkomen van de blootstelling eraan.



DNA van niet beschadigde cel:  
er migreren zo goed als geen  
losse fragmenten



DNA van 2 beschadigde cellen:  
er migreren losse fragmenten  
die een komeetstaart vormen

DNA-breuken zijn echter niet de belangrijkste vorm van schade aan het DNA, vaker zijn er modificaties van DNA-basen aanwezig. Bij de komeetttest kunnen specifieke enzymen gebruikt worden die bepaalde gemodificeerde basen uitknippen. Geoxideerde purinebasen (8-oxoGua, FaPyAde, FaPyGua, naast gealkyleerde basen zoals N7-methylGua) kunnen gedetecteerd worden m.b.v. het FGP enzyme. Om met de komeetttest geoxideerd DNA te detecteren, wordt de enzymebehandeling uitgevoerd na lysis van de cellen. Het FGP enzyme verwijdert dan de foutieve bases uit het DNA en knipt de DNA streng door op die plaats. Hierdoor ontstaan extra breuken en een verhoogde migratie van het DNA in het elektrisch veld. Het verschil in % DNA migratie met en zonder incubatie van het FGP enzyme, is een maat voor oxidatief beschadigd DNA.

### **Wat is 8-deoxy-hydroxy-guanosine?**

---

8-deoxy-hydroxy-guanosine (8-oxodG) is een biomerker voor oxidatieve stress. Het molecuul 8-oxodG wordt gevormd wanneer actieve vormen van zuurstof DNA beschadigen. De oxidatieve schade wordt hersteld door intracellulaire mechanismen. Dit resulteert in wateroplosbare 8-oxo-dG-moleculen die via de urine uit het lichaam verwijderd worden. De concentratie van 8-oxo-dG in urine blijkt een gevoelige maat te zijn voor de graad van oxidatieve beschadiging van het DNA, die het risico op mutaties verhoogt. Verhoogde waarden voor 8-oxo-dG zijn een indicatie dat er maatregelen getroffen worden binnenin het lichaam om de oxidatieve stress in te dijken. Blootstelling aan toxische verbindingen en stresstoestanden kunnen bijdragen aan toegenomen oxidatieve stress. Daarnaast kan er potentieel een invloed zijn van inname van 8-oxodG via de voeding en kan het aanwezig zijn in de urine door celdood.

### **Hoe wordt 8-oxodG gemeten?**

---

8-oxodG wordt kwantitatief gemeten in de urine d.m.v. een competitieve *in vitro* immunosorbent assay (ELISA).

Op een microtiterplaat, waarvan de bodem bedekt is met 8-oxodG, wordt een anti-8-oxodG antilichaam toegevoegd samen met het urinestaal. Het antilichaam gaat competitief reageren met zowel de 8-oxodG op de bodem van de plaat en het 8-oxodG dat aanwezig is in het urinestaal. Hogere concentraties 8-oxodG in het urinestaal gaan zorgen voor een verminderde binding van het antilichaam aan het 8-oxodG dat gebonden is op de bodem van de plaat. Via binding van een secundair antilichaam, enzymen en een substraat kan de hoeveelheid van het gebonden 8-oxodG antilichaam aan de plaat bepaald worden. Via standaard curves kan vervolgens de hoeveelheid 8-oxodG in het urinestaal bepaald worden.