



# **Epigenetische mechanismen in de carcinogenese: Aangrijpingspunten van tumorpromotors en voor chemopreventie**

**Door**

**Joan Govaerts, Sam De Coster, Prof. dr. Nik van Larebeke**

**2006**

# Inhoud

<b>1</b>	<b><u>CARCINOGENESE: EEN MULTIFACTORIEEL MEERSTAPPENPROCES</u></b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b><u>EPIGENETISCHE MECHANISMEN DIE EEN INVLOED KUNNEN HEBBEN OP DE CARCINOGENESE</u></b>	<b>6</b>
<b>2.1</b>	<b>INDUCTIE VAN PROLIFERATIE</b>	<b>6</b>
2.1.1	DIRECTE STIMULATIE VAN MITOSE EN GROEI	6
2.1.2	MIDDELS INDUCTIE VAN CELDOOD GEVOLGD DOOR COMPENSERENDE PROLIFERATIE	8
<b>2.2</b>	<b>INHIBITIE VAN APOPTOSE</b>	<b>8</b>
2.2.1	BETEKENIS EN MECHANISME VAN APOPTOSE	8
2.2.2	PATHWAYS DIE CASPASES EN APOPTOSE ACTIVEREN	9
2.2.3	VOLGENS WELKE MECHANISMEN WORDT DE APOPTOSE NU GEÏNHIBEERD ?	10
2.2.4	INHIBITIE VAN APOPTOSE LEIDT TOT TUMORPROMOTIE	10
2.2.5	VOORBEELDEN	11
2.2.6	INTERACTIES	12
<b>2.3</b>	<b>INDUCTIE VAN OXIDATIEVE STRESS</b>	<b>12</b>
2.3.1	ALGEMEEN	12
2.3.2	MECHANISMEN DIE KUNNEN BIJDAGEN TOT DE CARCINOGENESE	13
2.3.3	AGENTIA DIE OXIDATIEVE STRESS KUNNEN INDUCEREN	15
2.3.4	INTERACTIES	15
<b>2.4</b>	<b>BEÏNVLOEDING VAN RECEPTOREN</b>	<b>15</b>
2.4.1	KERNRECEPTOREN (NR)	16
2.4.2	CELOPPERVLAKTERECEPTOREN	17
<b>2.5</b>	<b>(DE)METHYLATIE VAN DNA EN (DE)ACETYLATIE EN (DE)METHYLATIE VAN HISTONEN EN TRANSCRIPTIEFACTOREN</b>	<b>21</b>
2.5.1	(DE)METHYLATIE VAN DNA	21
2.5.2	HISTONEN: (DE)METHYLATIE, (DE)ACETYLATIE EN ANDERE POST-TRANSLATIONELE MODIFICATIES	23
2.5.3	ACETYLATIE VAN TRANSCRIPTIE-GERELATEERDE PROTEÏNEN	25
2.5.4	ONDERLINGE AFHANKELIJKHEID	25
<b>2.6</b>	<b>TRANSLATIONELE MODIFICATIES</b>	<b>26</b>
2.6.1	TRANSLATIE	26
2.6.2	REGULATIE VAN eIF4E EN CARCINOGENESE	26
2.6.3	RELEVANTIE VOOR TUMORPROMOTIE	27
<b>2.7</b>	<b>INHIBITIE VAN DE GAP JUNCTION INTERCELLULAIRE COMMUNICATIE (GJIC)</b>	<b>27</b>
2.7.1	FUNCTIE EN BETEKENIS VAN GAP JUNCTIONS	27
2.7.2	MECHANISMEN DIE KUNNEN BIJDAGEN TOT DE CARCINOGENESE	28
2.7.3	VOORBEELDEN	28
2.7.4	INTERACTIES	28
<b>2.8</b>	<b>ACTIVATIE VAN TELOMERASE</b>	<b>29</b>
2.8.1	FUNCTIE EN BETEKENIS	29
2.8.2	ROL IN TUMORPROMOTIE	29
2.8.3	VOORBEELDEN	29
2.8.4	INTERACTIES	29

<b>3</b>	<b>CHEMOPREVENTIE</b>	<b>30</b>
<hr/>		
<b>3.1</b>	<b>INLEIDING</b>	<b>30</b>
<b>3.2</b>	<b>AANGRIJPINGSPUNTEN VOOR CHEMOPREVENTIE: POTENTIËLE CHEMOPREVENTIEVE AGENTIA</b>	<b>30</b>
3.2.1	ANTIMUTAGENEN	30
3.2.2	ANTI-OXIDANTIA	30
3.2.3	DIFFERENTIATIE INDUCERS	31
3.2.4	ANTI-INFLAMMATOIRE MIDDELEN	31
3.2.5	RAS ACTIVATIE	31
3.2.6	SELECTIEVE OESTROGEEN RECEPTOR MODULATORS	31
3.2.7	ANGIOGENESE INHIBITOREN	32
3.2.8	TOPO-ISOMERASE II INHIBITORS	32
3.2.9	DNA METHYLATIE MODULATORS	32
3.2.10	APOPTOSE INDUCERS	33
3.2.11	HERSTELLEN GJIC	33
	<b>LIJST MET AFKORTINGEN</b>	<b>34</b>
<hr/>		
	<b>REFERENTIES</b>	<b>35</b>
<hr/>		

# 1 Carcinogenese: een multifactorieel meerstappenproces

De ontwikkeling van kanker is een proces waarbij een normale cel door de accumulatie van genetische fouten een voortschrijdende verandering ondergaat, waarbij eerst een lokale en uiteindelijk een kwaadaardige tumor gevormd wordt. Het ontstaan van mutaties is hierbij van primair belang, maar ook andere mechanismen, zoals veranderingen in de genexpressie of biologische signaalketens in de cel, kunnen een groot aandeel hebben in dit proces. De belangrijkste mechanismen volgens de welke deze zogehete ‘epigenetische carcinogenen’ de ontwikkeling van kanker kunnen beïnvloeden wordt hieronder weergegeven.

De carcinogenese is een meerstappen-proces. Uit experimentele studies met proefdieren blijkt dat er een duidelijk onderscheid gemaakt kan worden tussen drie verschillende fasen van de carcinogenese (Weinstein, 1991; Trosko, 2005).

- **Initiatie:** berust wellicht steeds op een irreversibele genetische verandering van een cel, veroorzaakt door een genotoxisch carcinogeen (Deman & Van Larebeke, 2001), waarbij bvb terminale differentiatie, DNA-repair, apoptose of een normale controle op de celcyclus verstoord worden.

- **Promotie:** de cel wordt reversibel gestimuleerd om te delen, terwijl er geen terminale differentiatie of apoptose optreedt. Inwerking van endogene (hormonen, groeifactoren, cytokines) of exogene (tumorpromotors) agentia, die wijzigingen in de genexpressie veroorzaken leidt tot klonale expansie. Via celproliferatie (celdeling) en de afwezigheid van apoptose (celdood) geeft een geïnitieerde kankercel aanleiding tot een kloon dochtercellen, een groep cellen die allen van dezelfde cel afkomstig zijn.

- **Progressie:** bijkomende genetische of epigenetische gebeurtenissen zorgen ervoor dat de cellen een nieuw fenotype tot expressie brengen, waarbij ze ook onafhankelijk worden van externe promotoren door de activatie van oncogenen en de inactivatie van tumor-suppressorgen. Tumorprogressie moet gezien worden als een proces van Darwiniaanse evolutie waarbij voortdurend cellen ontstaan met gewijzigde eigenschappen. Progressie geeft aanleiding tot het ontstaan van kankercellen die beter aangepast zijn aan andere en ongunstige omstandigheden (metastase) en weerstandig kunnen zijn tegen therapeutische agentia.

Onder *genotoxische of mutagene agentia* wordt in dit rapport verstaan: agentia die de mutatiefrequentie verhogen, hetzij door direct te binden of schade te berokkenen aan het genomisch DNA, hetzij door op een indirecte wijze schade aan DNA te veroorzaken of het correcte herstel van DNA-schade te verhinderen. Meestal gebeurt eerst een activatie van de stof in de cel. In de meeste gevallen bestaat voor deze agentia, zeker voor deze die op directe wijze DNA-schade veroorzaken, geen kritische dosis onder dewelke geen schadelijk effect optreedt (Ueno et al. 1996). Er wordt verondersteld dat er voor deze agentia geen veilige dosis bestaat (Klaunig et al. 2000).

*Epigenetische carcinogenen* werken op andere – niet DNA-actieve - manieren in op de cel. Hier verstaan wij onder epigenetische carcinogenen agentia die de DNA-sequentie niet wijzigen, dus geen mutaties veroorzaken. Wel beïnvloeden zij op één of andere wijze (door te fungeren als een ligand van een receptor, verstoring van de inter- en/of intracellulaire signaaltransductie, interactie met regulatorische DNA-sequenties, beïnvloeding van de methylering van DNA, wijziging van de chromatinestructuur,...) de expressie van genen of het

functioneren van eiwitten en bevorderen zo de vorming van tumoren. De uitgeoefende effecten zijn meestal tijdelijk van aard en vertonen een drempeldosis, waardoor chronische blootstelling, in vele gevallen boven een bepaalde kritische dosis, een vereiste is om carcinogeniciteit uit te oefenen. Receptor-bindende stoffen kunnen echter ook bij zeer lage concentraties een betekenisvol effect hebben (zie verder). Veel epigenetische carcinogenen lijken een belangrijke rol te spelen tijdens de promotie-fase van het kanker-vormingsproces (Klaunig et al., 2000).

Voor carcinogenese zijn 4 biologische cellulaire processen van belang: celdifferentiatie, celgroei, celproliferatie en (geprogrammeerde) celdood of apoptose.. In wat volgt zullen verschillende epigenetische mechanismen besproken worden. De lezer moet zich echter bewust zijn van het feit, dat geen enkel mechanisme op zich verantwoordelijk kan zijn voor de carcinogeniciteit van een niet-genotoxisch carcinogeen. Veel epigenetische carcinogenen werken op diverse biologische pathways (*i.e. receptor en daaropvolgende signaalcascades*) in. Daarenboven grijpen veel biologische pathways tegelijkertijd op de verschillende cellulaire processen in. De intensiteit, duur, context,... van het signaal bepaalt dan ook wat de uiteindelijke fysiologische respons van het systeem zal zijn. Maar uiteindelijk is het de verstoring van de balans tussen celproliferatie en apoptose, die tot de ontwikkeling van tumoren zal leiden.

Het is echter moeilijk om een diepgaande bespreking van de interactie en afhankelijkheid tussen de verschillende mechanismen te maken omdat in de wetenschappelijke literatuur omtrent epigenetische carcinogenen nog maar weinig geschreven is over deze materie: de complexe werking van veel niet-genotoxische carcinogenen is nog niet tot in detail gekend.

De term ‘epigenetische carcinogenen’ zoals deze hier beschreven werd, mag niet worden verward met ‘epigenetische informatie in het erfelijk materiaal’, die gedefinieerd wordt als ‘de informatie die vervat zit in het chromatine, behalve in de eigenlijke DNA sequentie, en die instaat voor een overerfbaar patroon in de genexpressie’ (Santos-Rosa & Caldas, 2005).

## **2 Epigenetische mechanismen die een invloed kunnen hebben op de carcinogenese**

### **2.1 Inductie van proliferatie**

Een effect dat veel epigenetische carcinogenen gemeen hebben is dat van de inductie van proliferatie. Chemische verbindingen kunnen opgesplitst worden in deze die hun effect doorvoeren via mitogene mechanismen en deze die celdood induceren met als gevolg een inductie van compenserende hyperproliferatie (Klaunig et al., 2000).

Het eerstgenoemde effect kan te wijten zijn aan een interactie met cellulaire receptoren, modulatie van groeifactoren en de verstoring van celgroeiregulatie.

De exacte mechanismen volgens dewelke de stimulatie van DNA-replicatie en de mitose leidt tot epigenetische carcinogenese zijn nog niet geheel duidelijk (Klaunig et al. 2000; Normanno et al. 2006).

Hoewel de inductie van de celproliferatie een integrale component is van de chemisch geïnduceerde carcinogenese, en een goede indicator is voor de niet-genotoxische carcinogenese, is er nog steeds discussie over het relatieve belang van stimulatie van celdeling in het kankerproces. De onduidelijkheid over de precieze mechanismen doorheen dewelke een verhoogde celproliferatie en selectieve klonale groei zouden bijdragen tot de carcinogenese, kan een gedeeltelijke verklaring vormen voor deze onzekerheid (Klaunig et al. 2000).

#### **2.1.1 Directe stimulatie van mitose en groei**

##### **2.1.1.1 Algemeen**

Verhoogde DNA-synthese en de daaropvolgende celdeling werden in verband gebracht met elk van de drie stadia in de carcinogenese, en werd naar voren geschoven als een belangrijk proces tijdens de carcinogenese (Klaunig et al. 2000).

Met betrekking tot de eigenlijke mechanismen aan de hand waarvan celgroei en mitose gestimuleerd kunnen worden blijken groeifactoren een belangrijke rol te spelen. Groeifactoren zijn polypeptiden die binden aan receptoren, met als hoofdfunctie het in gang zetten van de celproliferatie, maar met dikwijls ook sterke invloed op differentiatie, migratie en overleving.

Directe mitogenen zijn stoffen die cellen in de mitotische cyclus brengen, zonder dat er een voorafgaande verwonding is opgetreden die compensatoire proliferatie zou vereisen. Er ontstaat dus een onevenwicht tussen celdeling en celsterfte, waardoor de weefselmassa toeneemt. De epidermal growth factor (EGF), de transformerende groeifactor en de hepatocyte groeifactor kunnen op directe wijze de DNA-replicatie in de lever stimuleren.

Andere groeifactoren, zoals norepinephrine, oestrogenen, insuline en glucagon verhogen vooral de groeistimulerende effecten van directe mitogenen.

### 2.1.1.2 Mechanismen

Met betrekking tot de eigenlijke mechanismen die een stimulatie van de mitose koppelen aan de carcinogenese bestaan twee mogelijke scenario's.

- De ongecontroleerde toename van DNA-synthese en celdelingen zal onvermijdelijk gepaard gaan met een toename van het aantal mutaties. Inderdaad, de DNA-replicatie is – ondanks het bestaan van DNA-herstelmechanismen - niet foutloos. Deze mutaties kunnen resulteren in geïnitieerde cellen, die door klonale expansie een preneoplastisch letsel en uiteindelijk een neoplasma (Klaunig et al 2000) kunnen vormen.
- Induceren van klonale groei: de inductie van DNA synthese en mitose door niet-genotoxische agentia kan de (eventueel zelfs selectieve) klonale groei van reeds geïnitieerde cellen tot gevolg hebben. Hierbij zou het niet-genotoxisch agens de expansie van geïnitieerde of preneoplastische cellen tijdens de tumorpromotie fase bevorderen. Tumorpromotie wordt geassocieerd met een aanhoudende inductie van de celrelicatie (Klaunig et al 2000).

Beide scenario's, de vergroting van de kans op de vorming van nieuwe geïnitieerde cellen en de klonale expansie van reeds geïnitieerde cellen, lijken een aangehouden en chronische inductie van de proliferatie en DNA synthese te vereisen om te resulteren in tumorvorming (Klaunig et al 2000). Daarenboven zouden verschillende niet-genotoxische carcinogenen een selectieve verhoging van de DNA-synthese en mitogenese in preneoplastische cellen teweegbrengen (Kolaja et al., 1996 a,b), en zelfs een mitose-inhiberend effect uitoefenen op normale, niet-geïnitieerde cellen. De precieze werkingsmechanismen van deze laatste eigenschap zijn echter slecht gekend.

### 2.1.1.3 Voorbeelden

Het zware metaal lood (Pb) is een vaak voorkomende pollutant en wordt geklasseerd als een mogelijk humaan carcinogeen. Er zijn verbanden gevonden tussen blootstelling aan Pb en het optreden van nier-, long- en hersentumors.

Het precieze moleculair mechanisme van Pb-toxiciteit is niet helemaal ontrafeld. Er zijn aanwijzingen dat Pb genotoxische effecten (Van Larebeke et al., 2004) kan hebben maar daarnaast zijn er ook aanwijzingen voor epigenetische effecten.

Zo bvb. zijn er bewijzen dat  $Pb^{2+}$  Proteïne Kinase C (PKC)-gemedieerde pathways activeert door PKC van het cytosol naar plasmamembraan te helpen verplaatsen. Waarschijnlijk speelt de gelijkenis tussen  $Pb^{2+}$  en  $Ca^{2+}$  hierbij een grote rol, PKC is immers een calcium-afhankelijk proteïne. Hierdoor wordt het kinase geactiveerd en dit dwingt de cel tot proliferatie. (Boelsterli, 2003)

### 2.1.1.4 Interacties:

- Kupffercellen (levermacrofagen) zouden proliferatie beïnvloeden door het vrijgeven van tumor necrosis factor  $\alpha$  en zouden daarenboven betrokken zijn bij de inductie en modulatie van oxidatieve stress in de lever. Op welke manier deze factoren gerelateerd zijn aan de levercarcinogenese vereist verder onderzoek (Klaunig et al. 2000).

- RZV kunnen optreden als secundaire messengers en belangrijke cellulaire functies beïnvloeden, zoals proliferatie en apoptose (Valko et al. 2006)
- Vermoedelijk is de werking van mitose inducerende agentia die niet via de necrose inwerken, gekoppeld aan de activatie van (groefactor)receptoren (zie hoger, Klaunig et al. 2000).

## 2.1.2 Middels inductie van celdood gevolgd door compenserende proliferatie

### 2.1.2.1 Compensatoire celproliferatie door celdood

Toxische effecten van een agens kunnen, middels het induceren van necrose (aspecifiek toxisch effect) of apoptose (geprogrammeerde celdood) leiden tot een compensatoire celproliferatie. Ook bij deze fysiologische reactie spelen de mechanismen hierboven beschreven bij de inductie van mitose een rol.

### 2.1.2.2 Voorbeelden

Chloroform induceert indirect de mitose: bij hoge dosissen induceert chloroform levernecrose bij muizen, en onder invloed van de compenserende celproliferatie induceert chloroform levertumoren (Klaunig et al., 2000).

## 2.2 Inhibitie van apoptose

Om tot een goed begrip te komen van het mechanisme waardoor tumoren zich ontwikkelen na inhibitie van apoptose, wordt eerst ingegaan op het complexe mechanisme van deze gereguleerde celdood; de zgn. apoptose.

### 2.2.1 Betekenis en mechanisme van apoptose

Apoptose vervult een zeer belangrijke rol bij de weefselhomeostase: ze draagt er toe bij dat elk weefsel de correcte massa aanhoudt. Indien *cel-eliminatie door apoptose* gehinibeerd wordt, zal de mitotische generatie van nieuwe cellen resulteren in een stijging van de weefselmassa en hyperplasia van het betrokken orgaan. Apoptose zorgt ook voor de eliminatie van beschadigde cellen, ondermeer van cellen met beschadigd DNA, die mogelijk een verhoogde kans op tumorale transformatie hebben. Inhibitie van apoptose kan dus leiden tot het frequenter optreden van mutaties. Apoptose wordt getriggerd door stimuli. Minstens 2 pathways kunnen tussenkomen in de apoptose: de receptor-gemedieerde extrinsieke pathway en de mitochondrie-gemedieerde intrinsieke pathway. Beide mechanismen zorgen voor een toename van de caspase-activiteit.

*Caspases* zijn cysteïne-aspartaat proteases die selectief meer dan 100 substraatbindingen doorklieven bij het apoptoseproces. Ze kunnen onderverdeeld worden in initiator- of effectorcaspases afhankelijk van de rol die ze spelen bij de apoptose. Initiator caspases detecteren apoptotische stimuli en activeren hierna de effectorcaspases dewelke doelwitewitten zoals DNA repairenzymen, cytoskeletale enzymen en proteïnen betrokken bij de progressie van de celcyclus buiten werking stellen. Hierdoor worden processen in gang gezet die uiteindelijk tot de dood van de cel leiden (Curtin & Cotter, 2003).

*Inhibitors of Apoptosis Proteins (IAPs)* kunnen bepaalde caspases inactiveren, en voorkomen zo dat een cel overgaat tot apoptose (Pelengaris & Khan, 2006).

## 2.2.2 Pathways die caspases en apoptose activeren

### 2.2.2.1 Receptor-gemedieerde extrinsieke pathway

Apoptose kan geïnduceerd worden via signaalmoleculen, waaronder groeifactoren, die binden aan receptoren, de zgn. death receptors aan het celoppervlak. De best bestudeerde receptoren behoren tot de tumor necrosis factor (TNF) receptor gen superfamilie, waaronder de Fas-receptor en de TNF1-receptor die respectievelijk FasL en TNF $\alpha$  binden. Al deze receptoren beschikken over een Death domain, waarlangs bindingen met homologe domeinen op cytoplasmatische adaptoreiwitten mogelijk zijn. Naast deze death receptors bestaan er ook Decoy (lokaas) receptors (DcR). Deze binden dezelfde liganden als de death receptors maar kunnen geen adaptorproteïnen, die nodig zijn om de cascade die leidt tot apoptose te initiëren, binden. De primaire functie van lokaas-receptors is het moduleren van de gevoeligheid aan receptor-gemedieerde apoptose.

Binding van de ligand op de Fas-receptor zorgt voor een trimerisatie en clustering van de receptoren. Hierna worden een aantal proteïnen gebonden zodat een Death Inducing Signaling Complex (DISC) gevormd wordt. Dit complex bindt en activeert Caspase-8. Caspase-8 is van primair belang voor de verderzetting van het apoptoseproces want het eiwit zorgt voor de activatie van een caspase-cascade die leidt tot de executie van de cel. Het kan beschouwd worden als één van de gatekeeper-caspases. Anderzijds zorgt Caspase-8 ook voor de activatie (doorklieven) van het Bid proteïne wat de vrijstelling van cytochroom c door de mitochondriën bevordert, waardoor death receptors dus mede de mitochondrie-gemedieerde pathway initiëren (Curtin & Codder, 2003).

De TNF receptor (of TNFR1) medieert echter zowel apoptose als celoverleving doordat het twee pathways met tegengestelde werking kan induceren. Recent werd een nieuw model voor deze duale werking voorgesteld. Ligandbinding van de receptor induceert de vorming van een eiwitcomplex op het plasmamembraan bestaande uit een 4-tal proteïnen (complex I). Dit complex activeert snel NF- $\kappa$ B middels I $\kappa$ B kinase, waarna het complex I loskomt van de TNF receptor. In het cytosol recruteert het vrijgekomen complex I o.a. caspase-8 (hierbij complex II vormend) en gaat het apoptose-inducerende signalen uitsturen. Wanneer NF- $\kappa$ B geactiveerd is door complex I zorgt het echter voor een verhoogde transcriptie van caspase-8 inhiberende proteïnen. Als complex I er niet tijdig in slaagt NF- $\kappa$ B te activeren, wordt apoptose dus geïnduceerd door de caspase8-cascade. (Sanchez-Capelo, 2005).

### 2.2.2.2 Intrinsieke mitochondrie-gemedieerde pathway:

De mitochondriën spelen een prominente rol in de apoptose. De initiatie van de intrinsieke pathway wordt bepaald door de balans tussen anti- en pro-apoptotische proteïnen in de cel.

Wanneer er schade berokkend wordt aan DNA, wordt het genregulatorische proteïne p53 geactiveerd, en start de transcriptie van verschillende genen die o.a. coderen voor de **pro-apoptotische proteïnen**. Eén daarvan is Bax (Bcl-2 familie), dit proteïne verplaatst zich van het cytosol naar de mitochondriën en nestelt zich in het buitenste mitochondriale membraan. Hierdoor verhoogt de permeabiliteit van het membraan en wordt cytochroom C samen met pro-apoptotische enzymen (Smac/DIABLO, AIF, Endonuclease G en Omi/Htra2) vrijgesteld.

In het cytosol verenigt cytochroom C zich met Caspase-9, een andere apoptose gatekeeper, en met 'steiger'proteïnen tot een hoogmoleculair complex, het zgn. apoptosoom. Deze complexatie heeft een sterk positieve invloed op de activiteit van Caspase-9 dat hierdoor een caspase-cascade initieert die tot de dood van de cel leidt.

Andere proteïnen van de Bcl-2 familie (zoals bvb. Bid) zijn eveneens pro-apoptotisch en stimuleren de activiteit van o.a. Bax waardoor ze bijdragen tot de vrijstelling van cytochroom C uit mitochondriën. (Boelsterli, 2003; Desagher et al., 2000; Adrain et al., 2001; Sanchez-Capalo, 2005)

De proteïnen waarvoor **anti-apoptotische genen** (Bcl-2, Bcl-xL, A1, Bcl-w, Mcl-1) coderen zouden de apoptose blokkeren door de mitochondriale integriteit in stand te houden en de vrijstelling van cytochroom C en pro-apoptotische moleculen te verhinderen. Hiertoe zouden ze associëren met de cytoplasmatische zijde van drie intercellulaire membranen: het buitenste mitochondriale membraan, het endoplasmatisch reticulum en de kernenvelop. De vorming van een apoptosoom wordt zo verhinderd (Pelengaris & Khan, 2006).

### 2.2.3 Volgens welke mechanismen wordt de apoptose nu geïnhibeerd ?

Inactivatie van het gen p53 (coderend voor een tumorsuppressor die de expressie regelt van genen die een rol spelen bij de G1/S fase van de celcyclus) door mutaties of deleties werd aangetoond in meer dan 50% van de kankers en resulteert in overproductie van Bcl2 tov. Bax waardoor apoptose vermeden wordt. (Klaunig et al. 2000; Boelsterli, 2003).

Inhibitie van apoptose kan ook een epigenetische oorsprong hebben: Zo kunnen genen die een belangrijke rol spelen in het apoptoseproces en dus coderen voor cruciale proteïnen downgereguleerd worden. Anderzijds kunnen anti-apoptotische genen (zoals Bcl-2, Bcl-xL, A1, Bcl-w, Mcl-1) upgereguleerd worden. Dit kan gebeuren door een wijziging van de genexpressie ten gevolge van activatie van receptoren (zie hierboven), inhibitie van GJIC alsook door veranderingen in de methylatiestatus van DNA of de structuur van chromosomen. Zo wordt bvb. hypermethylering van het caspase-8 gen frequent waargenomen bij retinoblastomas en neuroblastomas (Gopisetty et al, 2005).

Ondermeer de transcriptiefactor AP-1 speelt een belangrijke rol bij de regulatie van apoptose. AP-1 kan de apoptose zowel positief als negatief beïnvloeden. AP-1 activiteit wordt geïnduceerd door o.a. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, metalen, cytokines, stressors. Inductie of inhibitie van apoptose door AP-1 is afhankelijk van de balans tussen pro- of anti-apoptotische doelwit-genen, de stimulus die AP-1 activeert, en de duur van de stimulus (Valko et al. 2006).

### 2.2.4 Inhibitie van apoptose leidt tot tumorpromotie

Tumorpromotie door xenobiotische stoffen die de apoptose inhiberen is als volgt te verklaren. Cellen waarvan het DNA onherstelbaar beschadigd werd, worden normaliter door apoptose geëlimineerd. Indien de apoptose echter geïnhibeerd wordt, kan het gebeuren dat mutaties gefixeerd worden in de cel populatie. Deze mutaties kunnen kanker-initiërende mutaties omvatten. Het feit dat sommige voor kanker geïnitieerde, preneoplastische cellen een groeivoordeel hebben ten opzichte van normale cellen, leidt tot een absolute en relatieve toename van het aantal geïnitieerde cellen dat voor verdere stappen in het proces van de

tumorale transformatie in aanmerking komt. Het netto resultaat van dit mechanisme (op het niveau van de weefsels) is enigszins gelijkaardig aan dat van de verhoogde mitose (zie hoger) (Boelsterli, 2003).

Bij wegvallen van de blootstelling aan de tumorpromotor, wordt dit effect omgekeerd en wordt het aantal cellen in een weefsel hersteld, waarbij geïnitieerde cellen (die misschien meer frequent beschadigd of op één of andere wijze herkenbaar zijn, mogelijks preferentieel verwijderd worden (Roberts et al. 2004).

### 2.2.5 Voorbeelden

Verskillende tumorpromotoren voeren hun werking door via dit mechanisme. Voorbeelden zijn onder andere fenobarbital en verschillende peroxisoomproliferatoren (e.g. nafenopin) (Boelsterli, 2003)

**Fenobarbital**, een therapeutisch agens, wordt gebruikt als anti-epilepticum. In ratten en muizen veroorzaakt fenobarbital leververgroting, enzyminductie en tumoren in vivo, en induceert de S-fase en inhibeert de apoptose in vitro. De precieze werkingsmechanismen zijn nog niet bekend, maar Bcl-2 (een proto-oncogen dat codeert voor een integraal membraaneiwit) speelt een rol: fenobarbital stimuleert de expressie van Bcl-2 en dus anti-apoptotische signalen. Het effect van leververgroting is echter reversiebel: indien de blootstelling wegvalt wordt de lever hersteld tot de normale massa door de inductie van apoptose (Roberts et al., 1995; Boelsterli 2003). Aangezien er voldoende bewijzen gevonden zijn voor de carcinogeniteit van fenobarbital bij dieren wordt het als een mogelijk carcinogeen geklasseerd (IARC, 2001).

Apoptose, geïnduceerd door ioniserende straling, bleek in vitro geïnhibeerd te worden door de tumor promotor **TPA** (tetradecanoylforbolacetaat) (Klaunig et al., 2000).

### Peroxisoomproliferatoren

PPAR $\alpha$  (peroxisome proliferator activated receptor), een lid van de steroid hormoonreceptor superfamilie speelt bij knaagdieren een rol bij de door peroxisoomproliferatoren (PP) geïnduceerde S-faze en de modulatie van de expressie van PP-gerelateerde genen. Bij mensen staat PPAR $\alpha$  in voor moduleren van de lipide –homeostasis, wat de basis vormt voor het gebruik van ‘peroxisoomproliferatoren’ zoals fenofibraat, clofibraat en benzafibraat voor het verlagen van het bloedcholesterolgehalte.

Peroxisoomproliferatoren kunnen bijdragen aan de carcinogenese door indirect DNA-schade te induceren en/of door bij te dragen aan de celproliferatie. In de lever komt PPAR $\alpha$  sterk tot expressie, waar het op zijn beurt de genexpressie activeert via een DNA sequentie gekend als het peroxisoom proliferator respons element (PPRE), die te vinden is stroomopwaarts van genen geïnduceerd door PP, die coderen voor enzymen als het acyl-CoA oxidase en het peroxisomale enzyme voor  $\beta$ -oxidatie. PPAR $\alpha$  activatie is verantwoordelijk voor ondermeer enzyme-inductie, peroxisoom-proliferatie, leververgroting en de vorming van tumoren onder invloed van PP in knaagdieren. Uit deze waarnemingen blijkt dat de activatie van PPAR $\alpha$  een belangrijke rol speelt bij de regulatie van de apoptose door PPs. De genen die gereguleerd

worden om tot dit anti-apoptotisch effect te leiden zijn heden evenwel nog niet geïdentificeerd (Roberts et al., 2004).

Bij mensen lijkt de inductie van hepatocarcinoma door peroxisoom-proliferatoren echter niet op detecteerbare wijze voor te komen. De menselijke PPAR $\alpha$  receptor blijkt een sterk verschillende functie uit te oefenen. Activatie van de humane receptor door toedienen van PPAR $\alpha$  – liganden veroorzaakt geen of en zeer beperkte toename van peroxisomale  $\beta$ -oxidatie en de daarbij gepaard gaande levertumorpromotie. Toch lijken de fundamentele moleculaire processen, die na blootstelling aan PPAR $\alpha$  stimulerende agentia bij ratten en muizen leiden tot de inductie van levertumoren, leydig cel tumoren in de testis en pancreastumoren, ook bij de mens op te treden. Echter niet in kwantitatief dezelfde mate. Hieruit kan geconcludeerd worden dat peroxisoomproliferatoren bij de mens zeker niet hetzelfde risico meebrengen als bij ratten en muizen.

Toch is het niet uitgesloten dat PP ook gezondheidsschadende effecten hebben bij de mens. Zo is er 1 onderzoek gepubliceerd waarbij bleek dat een clofibrat en Wy-14,643-behandeling de groei van een menselijke borstkankercellijn bevorderde. Of dit effect veroorzaakt werd door activatie van de PPAR $\alpha$ -receptor dan wel door een ander mechanisme is niet duidelijk (Peraza et al., 2006). Voorzichtigheid lijkt geboden, niet alleen op grond van mechanistische overwegingen en experimentele resultaten, maar ook omdat epidemiologische waarnemingen bij mensen behandeld met peroxisoomproliferatoren wel een duidelijke daling in morbiditeit en mortaliteit tengevolge van cardiovasculaire aandoeningen te zien geven, maar niet in totale mortaliteit. Sommige studies tonen een stijging in de incidentie van sommige kankers, zij het niet in statistisch significante mate (Klaunig et al., 2003).

## 2.2.6 Interacties

Het al of niet in werking treden van het apoptose proces interageert met het al of niet in werking treden van andere processen zoals celproliferatie, inhibitie van GJIC, differentiatie of dedifferentiatie, senescentie, methylatie van DNA, wijzigingen in de chromosoomstructuur, oxidatieve stress, om de cel al dan niet tot een kankercel om te vormen.

Sommige agentia hebben trouwens een effect op meer dan 1 proces, zo zullen peroxisoomproliferatoren ook celproliferatie stimuleren (Chevalier et al. 2000).

## 2.3 Inductie van oxidatieve stress

### 2.3.1 Algemeen

Het optreden van oxidatieve stress kan worden omschreven als een verhoogde productie van oxiderende stoffen - reactieve zuurstofvormen (RZV) en stikstofvormen (RSV) - die niet gecompenseerd wordt door een verhoogde aanwezigheid van anti-oxidantia (superoxide dismutase, catalase, glutathion, ...) in de cel.

De oorzaak voor het ontstaan van RZV en RSV kan endogeen of exogeen zijn. Onder andere mitochondria, peroxisomen en de inflammatoire celactivatie kunnen bronnen zijn (Valko et al. 2006). Andere belangrijke wegen die tot oxidatieve stress kunnen leiden, lopen via de cytochromen P450 (CYPs): ze mediëren de fase I metabolische activatie van talloze

xenobiotische stoffen, meestal via een oxidatief proces. Deze transformatie leidt tot de vorming van intermediaire producten die via fase II afhankelijke conjugatiereacties verder omgevormd worden tot meestal inactieve stoffen die via de nieren geëxcreteerd worden. Hoewel fase I reacties ook detoxificerend kunnen zijn, vertonen de intermediaire stoffen die hieruit resulteren vaak een verhoogde cytotoxiciteit en/of carcinogeniciteit (het xenobioticum wordt dan een ‘precarcinogeen’ genoemd). De activatie kan door de polymorfismen van bepaalde CYP-genen soort-afhankelijk zijn, waardoor ook de carcinogeniciteit soort-afhankelijk wordt en dierproeven niet altijd model kunnen staan voor de inwerking van een agens bij de mens. Verschillende CYPs worden geïnduceerd door de aryl-koolwaterstof-receptor (AHR), wat deze enzymen en de inductie van oxidatieve stress koppelt aan het belang van receptoren bij de carcinogenese (zie later).

Belangrijk is ook dat CYPs deelnemen aan zowel de inactivatie als de activatie van geneesmiddelen die worden gebruikt bij het bestrijden van kanker (Rodriguez-Antona & Ingelman-Sundberg, 2006). Daarnaast zijn CYPs belangrijk bij de metabolisatie van tal van geneesmiddelen.

### 2.3.2 Mechanismen die kunnen bijdragen tot de carcinogenese

Een direct effect van oxidatieve stress en de generatie van RZV en RSV in de cel, zijn de directe beschadiging van de celcomponenten (DNA, proteïnes).

Minder bekend is echter dat oxidatieve stress ook een epigenetisch, ‘indirect’ effect uitoefent via de genregulatie en de signaaltransductie. Als gevolg van de productie van reactieve zuurstofvormen wordt een proteïnecomplex, nuclear factor E2 p45 - related factor 2 (Nrf2), geactiveerd dat gevoelig is aan oxidatieve stress. Dit proteïnecomplex wordt gemodificeerd en getransloceerd naar de nucleus, waar het bindt aan het ‘antioxidant respons element’ (ARE), dat instaat voor de activatie van verschillende genen die betrokken zijn bij de detoxificatie en verdediging tegen oxidantia (Boelsterli, 2003). Ondermeer worden onder invloed van oxidatieve stress een aantal ‘redox sensors’ geactiveerd, die de celsignalisatie veranderen. Belangrijk is het niveau van de oxidatieve stress. Bij hoge niveaus kunnen regulatorische of toxische fenomenen optreden die respectievelijk leiden tot apoptose of necrose. Intermediaire niveaus veroorzaken selectieve genactivatie en proteïne-expressie die beschouwd kan worden als een adaptieve respons op deze verhoogde oxidatieve stress (o.a. inductie van antioxidantie en stress proteïnes). Lage niveaus van RZV hebben een fysiologische rol in het cellulair antwoord op schadelijke invloeden, en bij het functioneren van een aantal signaaltransductiesystemen en zijn alsoo belangrijk voor de weefselhomeostasis. Lage concentraties van superoxide-radicalen en waterstofperoxide stimuleren proliferatie en overleving in vele celtypes. Het zijn dus voornamelijk de lage (en intermediaire) concentraties die van belang zijn bij de epigenetische carcinogenese (Boelsterli 2003; Valko et al. 2006).

Dezelfde signalen die gebruikt worden voor de regulatie van verschillende celmechanismen bij fysiologische niveaus van oxidatieve stress worden dus ook beïnvloed bij de adaptieve respons tegen een verhoogde oxidatieve stress. Het verschil is echter dat bij fysiologische signalen de veranderingen van de redox-staat meestal tijdelijk en kortdurend zijn, in vergelijking met door voldoende intense blootstelling aan xenobiotica geïnduceerde oxidatieve stress-signalen, die grote schade of zelfs celdood tot gevolg kunnen hebben, en die vaak langer aanhouden, en een grotere impact kunnen hebben (Boelsterli 2003; Valko et al. 2006).

Het resultaat van de beïnvloeding van twee mechanismen door RZV/RNV kan een verhoogde celproliferatie zijn. De twee voornaamste mechanismen die hierop betrekking hebben zijn de volgende.

### 2.3.2.1 Activatie van een positief genregulerend eiwit (transcriptiefactoren)

Belangrijk zijn de transcriptiefactoren NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor- $\kappa$ B) en AP-1 (activator-proteïne 1) die een belangrijke rol spelen in de cellulaire reactie op oxidatieve stress. NF- $\kappa$ B en AP-1 worden ondermeer door de MAP-kinase pathway geactiveerd en zijn betrokken bij groeiregulerende pathways die een rol spelen bij celoverleving, apoptose, proliferatie, differentiatie, en dus ook bij de carcinogenese (Boelsterli 2003; Valko et al. 2006).

### 2.3.2.2 Modulatie van de signaaltransductie

Het doorgeven van moleculaire signalen via hormonen, groeifactoren, cytokines en andere stoffen, via een celoppervlakte receptor en secundaire boodschappermoleculen tot aan een metabolisch doelwit, of een doelwit in de kern.

Vaak gebeurt deze signaaltransductie via een zelf-versterkende cascade van proteïnekinasen en fosfatasen. Reactieve zuurstofvormen en een verhoogde oxidatieve stress kunnen sommige delen van deze pathways nabootsen en proliferatie in vele cellen induceren. De reden hiervoor is dat de activiteit van veel proteïnen die betrokken zijn bij deze pathways afhankelijk is van hun redoxstatus. Zo worden bepaalde kinasen (enzymen die andere proteïnen fosforyleren) geactiveerd, en worden bovendien fosfatasen (enzymen die andere proteïnen defosforyleren) geïnactiveerd. Daarenboven kunnen RZV ook andere grote systemen beïnvloeden, zoals de status van receptoren die betrokken zijn bij Ca<sup>2+</sup> signalisatie en de activatie van de arachidonzuur- en de cAMP-pathway (Boelsterli 2003; Valko et al. 2006). RZV inhiberen in de eerste plaats fosfoserine/threonine-, fosfotyrosine- en fosfolipidefosfatasen, vermoedelijk door oxidatie van cysteïne-residuen op deze proteïnen. Deze structurele veranderingen leiden tot de verhoogde inductie van verschillende signaaltransductie cascades, waaronder groeifactor kinase-, src/Abl kinase-, MAPK- en P13-kinase afhankelijke signaaltransductie-pathways. Deze leiden op hun beurt tot de activatie van verschillende redox-gereguleerde transcriptiefactoren (AP-1, NF- $\kappa$ B, p53, HIF-1, NFAT) (Valko et al. 2006).

Belangrijke targets zijn *receptor* (groeifactor receptoren) en *niet-receptor tyrosine kinasen*. Onder indirecte invloed van reactieve zuurstofvormen kunnen deze kinasen gefosforyleerd en aldus geactiveerd worden. Vervolgens beïnvloeden zij processen zoals celoverleving, apoptose, proliferatie en differentiatie.

Ook *Ras-proteïnen*, die instaan voor de regulatie van celgroei en het tegenwerken van apoptotische effecten, kunnen geactiveerd worden door reactieve zuurstofvormen. *Proteïne tyrosine fosfatasen* kunnen reversibel en direct geïnactiveerd worden door reactieve zuurstofvormen, wat een belangrijke invloed kan hebben op redox-controle en celsignalisatie (Valko et al. 2006).

Ook de vrijstelling van calcium-ionen uit intracellulaire opslagplaatsen door oxidatieve stress kan resulteren in de activatie van kinases zoals proteïne kinases C (Valko et al., 2006).

Reactieve zuurstofvormen kunnen dus meewerken aan elk van de drie stadia van de carcinogenese (initiatie, promotie, progressie) (Valko et al., 2006).

### 2.3.3 Agentia die oxidatieve stress kunnen induceren

Tot de epigenetische carcinogenen die oxidatieve stress kunnen induceren behoren onder andere peroxisoomproliferatoren, gechlorideerde verbindingen (bvb. dioxines), barbituraten en metaalionen. Ook ioniserende straling is een belangrijke exogene oorzaak van oxidatieve stress. (Klaunig *et al.* 2000; Valko *et al.* 2006).

Inflammatie is een belangrijke bron van oxidatieve stress. Ook bepaalde voedingsgewoonten kunnen geassocieerd zijn met een verhoging van oxidatieve stress (Ferrari & Torres, 2003).

### 2.3.4 Interacties

- Oxidatieve stress kan geïnduceerd worden door de activatie van groeifactor- of cytokinereceptoren, waaronder de epidermale groeifactor (EGF) receptor, platelet-derived growth factor (PDGF) receptor, vasculaire endotheel groeifactor (VEGF) receptor, cytokine receptoren (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) en interleucine receptoren (IL-1 $\beta$ ) (Valko *et al.* 2006).

- Oxidatieve stress resulteert zowel in DNA-schade als in verstoring van de genexpressie, en kent dus een genotoxische en een epigenetische werking (Valko *et al.* 2006).

- Oxidatieve stress kan hypomethylatie induceren (Klaunig *et al.* 2000).

- De activatie van de AH-receptor leidt tot de inductie van de transcriptie van verschillende cytochromen van de CYP-familie, wat op zijn beurt de intensiteit van de oxidatieve stress kan beïnvloeden via veranderingen in de metabolisatie (activatie of inactivatie) van aanwezige toxische stoffen (zie verder).

## 2.4 Beïnvloeding van receptoren

De cel- en weefselhomeostase wordt gecontroleerd door 4 overlappende processen: celdgroei, celdproliferatie, celdood, celdifferentiatie. Deze zijn alle vier onderhevig aan verschillende regulerende factoren (extracellulaire signalen) en de daaropvolgende signaalketens. Er bestaan honderden verschillende signaalmoleculen. Voorbeelden zijn proteïnen, kleine peptiden, aminozuren, nucleotiden, steroïden, retinoïden, vetzuurafgeleiden en zelfs opgeloste gassen zoals stikstof- en koolstofmonoxide.

Deze signalen worden opgevangen door receptoren. Na activatie van deze receptoren door de signaalmoleculen worden intracellulaire signaalketens in werking gezet of binden de receptoren op specifieke responselementen van het DNA waardoor bovengenoemde processen beïnvloed worden.

Deze processen zijn cruciaal in de ontwikkeling van een geïnitieerde kankercel tot een tumorweefsel. Xenobiotische moleculen die inwerken op de signaalmoleculen, op de expressie van genen coderend voor receptoren, rechtstreeks op de receptoren of op de signaalketen downstream van de receptor en alzo het ontstaan van kanker bevorderen, kunnen geklasseerd worden onder de epigenetische carcinogenen.

Om tot een goed begrip te komen van de invloed van deze mechanismen op de carcinogenese, is het noodzakelijk om een degelijke kennis te hebben van de typen receptoren en de signaalketens die zij beïnvloeden. (Alberts *et al.*, 2002)

Receptoren kunnen onderverdeeld worden in 2 belangrijke types: kernreceptoren en celoppervlakte-receptoren.

### **2.4.1 Kernreceptoren (NR)**

NR zijn oplosbare, intracellulaire receptoren die wanneer ze een ligand binden, naar de celkern migreren en interageren met specifieke genregulator-elementen. Deze liganden zijn kleine, hydrofobe moleculen die doorheen het celmembraan diffunderen.

Kernreceptoren zijn zeer gevoelig aan xenobotische componenten. Dit is omdat vele lichaamsvreemde componenten voldoende eigenschappen delen met de ‘normale’ liganden om te binden aan de receptoren en voor agonistische of antagonistische effecten te zorgen.

Twee superfamilies zijn toxicologisch van groot belang en worden achtereenvolgens besproken.

#### **2.4.1.1 Steroid hormoonreceptoren**

Steroid hormoonreceptoren zijn een grote familie zinkvingerreceptoren. Alle receptoren van deze familie kunnen dimeren met de retinoic X receptor (RXR, die cis-9-retinoidezuur bindt). Receptoren van deze superfamilie bevatten steeds een ligandbindend domein en een DNA-bindend domein (zinkvingerdomein, i.e. een motief waarin zink gecoördineerd wordt door histidinen en cysteïne en dat past in de “major groove” van het DNA). In sommige gevallen worden de steroid hormoon receptors in inactieve toestand gehouden in het cytoplasma door een heat shock proteïne (hsp). Dit proteïne houdt de receptor in een conformatie klaar om de ligand te binden, maar niet in staat om DNA te binden. Na binding met een ligand ondergaan ze een conformatieverandering, binden eventueel co-activatoren en begeven zich naar de celkern. Hier binden ze aan de respons-elementen (RE) in het promotergebied van een bepaald gen.

Vbn: peroxisoom proliferator geactiveerde receptor PPAR, Thyroid receptor, oestrogeen-receptor.

### 2.4.1.2 PAS proteïnen

De PAS proteïnen zijn een familie receptoren die allemaal beschikken over een PAS-gebied (genoemd naar de eerste geïdentificeerde familieleden PER, ARNT en SIM). Het belangrijkste voorbeeld van PAS receptor is de aryl hydrocarbon receptor (AHR). Bij deze receptor is het PAS-domein eveneens de plaats waar agonisten zoals dioxines binden. Alle PAS-proteïnen hebben een helix-loop-helix gebied, dat een DNA bindingsgebied en een dimerisatie-motief omvat en dat ook in vele andere transcriptiefactoren gevonden wordt. Na ligandbinding verenigen de PAS proteïnen (bvb. AHR en zijn transcriptie-partner ARNT) zich tot een heterodimeer en binden zich aan het DNA.

## 2.4.2 Celoppervlaktereceptoren

Celoppervlaktereceptoren werken als signaal “transducers” (signaalomzetters). Ze converteren een extracellulair signaal (o.v.v. een wateroplosbaar signaalmolecule) naar een intracellulair signaal waardoor het gedrag van de cel zich wijzigt. De drie belangrijkste klassen worden hieronder besproken.

### 2.4.2.1 “Ion-channel linked” –receptoren (ionkanaalgekoppelde receptoren)

“Ion-channel linked” receptoren, ook gekend als ionotrope receptoren, zijn betrokken bij de signaaltransductie tussen elektrisch exciteerbare cellen. Dit type signaaltransductie wordt gemedieerd door een klein aantal neurotransmitters die in staat zijn om het ionkanaal van het proteïne waarop ze binden gedurende een korte tijd te openen of te sluiten. Hierbij verandert de ionpermeabiliteit van de cel en daarmee de exciteerbaarheid van de postsynaptische cel.

### 2.4.2.2 “G-protein coupled” (G-proteïne gekoppelde) receptoren (GPCR)

“G-protein coupled” receptoren beïnvloeden indirect een ander plasmamembraan-gebonden proteïne (enzyme of ionkanaal) middels een trimeer GTP-gebonden proteïne (G-proteïne). De activatie van het doelwitproteïne heeft dan een invloed op een of meerdere intracellulaire signaaloverdragers (enzymen) of verhogen de ionpermeabiliteit van het plasmamembraan. Ze kunnen door de meest diverse signaalmoleculen geactiveerd worden (hormonen, neurotransmitters,...).

Wanneer de receptoren geactiveerd worden, ondergaan ze een conformatieverandering waardoor ze het G-proteïne kunnen activeren. Er zijn verschillende types G-proteïnen voor verschillende functies, maar ze werken allemaal via hetzelfde mechanisme.

G-proteïnen bestaan uit 3 subeenheden -  $\alpha$ ,  $\beta$ , en  $\gamma$ . Bij stimulatie door een geactiveerde receptor, verwisselt de  $\alpha$ -eenheid het gebonden GDP-molecule voor een GTP-molecule. Deze uitwisseling voorziet de nodige energie om de  $\alpha$ -eenheid los te laten komen van de rest van het proteïne, zodat deze kan binden op het doeleiwit. Deze doelwitten zijn enzymen of ionkanalen, die op hun beurt het signaal dan weer verderleiden. Na activatie van het doelwit, hydrolyseert de  $\alpha$ -eenheid zijn gebonden GTP en herenigt het zich met de  $\beta\gamma$ -eenheid.

*Voorbeelden van pathways geïnitieerd door GPCR relevant voor carcinogenese:*

**Cyclisch AMP (cAMP):** is een kleine intercellulaire boodschappermolecule die gesynthetiseerd wordt na activatie van adenylyl cyclase. De G proteïnes activeren ( $G_s$ ) of inhiberen ( $G_i$ ) adenylyl cyclase-activiteit. In de meeste cellen zorgt een verhoging van [cAMP] voor de activatie van cAMP-dependente proteïne kinase (PKA). Dit enzyme fosforiliseert specifiek zowel serine als threonine in een aantal doelwitproteïnen, waardoor hun activiteit gereguleerd wordt.

In celtypes waar groeihormoon (GH) geproduceerd wordt, heeft de verhoging van intracellulaire cAMP concentratie een positieve invloed op de secretie van GH en dus de celgroei/proliferatie. In cellen met somatostatine receptoren (eveneens GPCR) wordt na activatie de cAMP verlaagd en groei geremd.

**Inositol fosfolipide signaalketen:** G-proteïne activeert het fosfolipase C- $\beta$  (PLC- $\beta$ ). Dit ontbindt het fosfadylyl-inositol-bifosfaat (PIP<sub>2</sub>) tot diacylglycerol en inositol-trifosfaat. Deze moleculen zorgen respectievelijk voor activatie van het proteïne kinase C (PKC) en vrijstelling van  $Ca^{2+}$  uit het endoplasmatisch reticulum. Dit  $Ca^{2+}$  activeert op zijn beurt eveneens het PKC. Forbol esters verhogen de activiteit van PKC en zorgt zo voor een tumorpromoter effect (zie 3.3).

**$Ca^{2+}$ :** De intracellulaire  $Ca^{2+}$  concentratie wordt (ondermeer) verhoogd door de activiteit van G-proteïnen (zie hierboven). Hoge concentratieniveaus van  $Ca^{2+}$  activeren calmoduline, wat op zijn beurt talrijke CaM-kinases (calmoduline-afhankelijke kinases) activeert. Sommige CaM-kinases fosforyleren proteïnen die instaan voor de genregulatie, zodat de transcriptie van bepaalde genen up- of downgereguleerd worden.

### 2.4.2.3 Enzyme-linked receptoren (EZLR)

EZ-linked receptoren spelen een belangrijke rol bij de groei, proliferatie, differentiatie of overleving van de cel. Ze worden geactiveerd door groeifactoren. Verstoring van deze processen zijn fundamentele gebeurtenissen bij het ontstaan van kankers en signaaltransductie via EZLR speelt hier een belangrijke rol in.

Heden zijn 5 klassen van EZLR bij zoogdieren geïdentificeerd:

- Tyrosine kinase receptoren
- Tyrosine kinase geassocieerde receptoren (o.a. cytokine-receptoren)
- Serine Threonine Kinase receptors
- Tyrosine fosfatasen
- Guanylyl cyclase receptoren

Hieronder worden de voor de carcinogenese belangrijkste klassen van receptoren besproken.

#### 2.4.2.3.1 Tyrosine kinase receptoren (TKR)

Tyrosine kinase receptoren worden geactiveerd door een veelheid aan groeifactoren en hormonen. Voorbeelden hiervan zijn EGF (epidermale growth factor), PDGF (platelet derived growth factor), insuline, IGF-1 (insulin-growth-factor).

TKR zijn transmembraanproteïnen, met aan de buitenzijde van de cel een ligandbindend domein, en binnenin een kinase domein. Bij activatie fosforyliseert het kinase domein tyrosine-zijketens, zowel bij zichzelf (autofosforylisatie) als intracellulaire signaalproteïnen. Autofosforylisatie van het cytosolisch gedeelte, zowel in het kinase gedeelte als daarbuiten zorgt daar respectievelijk voor een verhoging van de kinase-activiteit en de creatie van fosfotyrosines die dienen als docking-sites voor intracellulaire signaaleiwitten die binden via hun SH2-domein. Deze worden na de binding zelf gefosforyliseerd en hierbij geactiveerd.

***Voorbeelden van pathways geïnitieerd door TKR relevant voor carcinogenese:***

Sommige van deze gebonden eiwitten dienen als “adaptor” voor de activatie van het GTPase **Ras** –een belangrijk downstream signaalproteïne dat op zijn beurt verschillende andere pathways start, waaronder deze die cellen stimuleren om te prolifereren of te differentiëren. Mutaties die deze pathways activeren zijn een belangrijke oorzaak van vele kankertypes. Ras activeert ondermeer de volgende pathways:

**1<sup>ste</sup> Fosfolipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) pathway**

PLC- $\gamma$  initieert net als PLC- $\beta$  de inositol-fosfolipide signaalketen en dus de werking van PKC.

**2<sup>de</sup> MAP-kinase pathway (mitogen-activated-protein kinase a.k.a. Raf-Mek-Erk):**

Deze pathway reguleert celcyclusprogressie en is zonder twijfel de best bestudeerde van de ras geactiveerde pathways. De activatie van Raf (of MAP-kinase-kinase-kinase) door Ras zet een kinase-cascade in werking. Raf ondergaat een conformatieverandering en fosforyliseert/activeert Mek (MAP-kinase-kinase), dat op zijn beurt Erk activeert (het eigenlijk MAPK). Erk fosforyliseert transcriptie factoren van de ETS familie: Elk1 dat de expressie van Fos reguleert. Erk fosforyliseert eveneens c-Jun, wat tot de activatie van de AP1 transcriptiefactor leidt, die bestaat uit Fos-Jun heterodimeren. AP1 is een belangrijke regulator van de expressie van enkele genen met een sleutelrol in de stroomafwaartse signaalketen ten gevolge van groeifactoren, waaronder c-Myc. Al deze transcriptiefactoren beïnvloeden de expressie van proteïnen die een essentiële rol spelen in de normale mitogeen-gereguleerde celproliferatie (o.a. cycline D).

**3<sup>de</sup> PI3Kinase-ProteïneKinaseB pathway (PI3/AKT of PI3/PKB):**

Ras werkt direct in op de katalytische eenheid van fosfatidylinositol 3 kinase (PI3K), dat inositolfosfolipiden genereert die dienen als intracellulaire docking sites op de celmembraan voor een aantal signaalproteïnen waaronder Proteïne Kinase B (Pkb of Akt). Pkb is een belangrijke boodschapper van overlevingssignalen voor de cel en werkt anti-apoptotisch.

Ook zullen BTK (een cytoplasmatisch tyrosine kinase) en PLC- $\gamma$  kunnen aanmeren en geactiveerd worden, wat dan via de omzetting van fosfadytyl-inositol-bifosfaat (PIP2) tot diacylglycerol en inositol-trifosfaat het PKC activeert.

PI3K activeert ook de NF $\kappa$ B transcriptie factor, eveneens van belang bij celoverleving en inflammatoire reacties.

#### 4<sup>de</sup> Senescentie pathway (oncogenetisch Ras)

Naast apoptose is senescentie een belangrijk mechanisme om de replicatie van mogelijk schadelijke cellen stil te leggen. Hierdoor wordt aan de cel een permanente celcyclus-stop opgelegd. Senescentie wordt gereguleerd door een aantal tumorsuppressorgenen, waarvan de cruciaalste p53 en p21 zijn. Oncogenetisch Ras triggert dit proces door via de MAPK pathway p16 en/of ARF te activeren die respectievelijk Rb en p53 activeren. Die op hun beurt dan de werkelijke senescentie-effectors zoals p21, PML en verschillende chromatine-veranderende factoren aansturen.

Oncogenetisch Ras kan zowel pro- als anti-apoptotische signalen via het Raf-Erk-pad uitsturen. Respectievelijk door fosforylisatie en hierdoor stabilisatie van oncogeen Myc, dat de apoptose induceert; en inhibitie van het pro-apoptotische Bad. Afhankelijk van celtype en de context, zal oncontroleerbare celproliferatie dan wel apoptose optreden. Zo zal in reeds getransformeerde cellen (met sterke expressie van Ras en Myc) eerder celoverleving/proliferatie geïnduceerd worden.

*Opmerking: samenwerking oncogenetisch Ras en c-Myc*

c-Myc – activatie induceert cel-apoptose, Ras activatie induceert cel-senescentie, maar wanneer Myc tesamen met Ras tot expressie komt zal proliferatie optreden. Ras zal Myc-geïnduceerde apoptose verhinderen, en Myc zal Ras-geïnduceerde senescentie inhiberen. (vb van oncogenetische samenwerking).

#### 2.4.2.3.2 Tyrosine kinase geassocieerde receptoren (TKAR)

TKAR zijn afhankelijk van diverse cytoplasmatische tyrosinekinasen, die geassocieerd zijn met de receptoren en verschillende doelwitproteïnen fosforyliseren, waaronder dikwijls de receptoren zelf waardoor deze geactiveerd worden. Deze receptoren werken dus op dezelfde manier als de tyrosine kinases maar hun kinase domein wordt door een apart gen gecodeerd en is niet-covalent gebonden aan de receptor.

Cytokine receptoren zijn een belangrijke subfamilie van EZLR. Ze omvatten de grootste en meest diverse klasse van receptoren die afhankelijk zijn van cytoplasmatische kinases om signalen in de cel verder te leiden. De liganden van deze receptoren zijn meestal lokale boodschapper moleculen (cytokines) of groeihormonen. Wanneer de receptoren geactiveerd worden, activeren ze op hun beurt een cytoplasmatische tyrosine kinase genaamd Janus Kinase (Jak). Dit fosforyliseert en activeert een aantal genregulatorische proteïnen, de zgn. Stats (Signal Transducers and activators of transcription). Deze begeven zich direct naar de kern en stimuleren de transcriptie van specifieke genen.

Sommige Tumorcellen hebben de capaciteit verworven om oncontroleerbaar te prolifereën, apoptose te vermijden, angiogenese<sup>1</sup> te stimuleren en immunologische rejectie te ontlopen. Stat-proteïnen, en vooral Stat3 en Stat5 reguleren deze processen en worden in een permanent geactiveerde staat frequent waargenomen in long, nier, prostaat, borst,...-kankers. Epigenetische silencing van het SOCS1 gen, een inhibitor van de Jak-Stat pathway, werd al waargenomen bij leverkanker.

<sup>1</sup> Vorming van nieuwe bloedvaten

Belangrijke vertegenwoordigers van de cytokine receptorfamilie zijn de “death receptors”. Deze behoren tot de TNF receptor-superfamilie.

### 2.4.2.3.3 Serine Threonine Kinase receptors (STKR)

De signaalproteïnen van de TGF- $\beta$  (transforming growth factors) superfamilie werken via de STKReceptoren. Ze werken als hormoon of als lokale boodschappers bij het reguleren van een groot aantal processen zoals celproliferatie, differentiatie, extracellulaire matrix vorming en celdood. De voor carcinogenese belangrijkste signaalproteïnen binnen deze superfamilie zijn de TGF- $\beta$ s zelf. Er bestaan twee types STKR's maar deze zijn structureel zeer gelijkaardig.

Wanneer de TGF-TypeII-receptor geactiveerd wordt, dimeriseert deze met een type I receptor, fosforyliseert en activeert deze. De type-I receptor bindt en activeert een latent, genregulerend eiwit van de Smad familie (Smad2 of Smad3), hierna komt het Smad los van de receptor en bindt het met Smad4. Het Smad-complex verplaatst zich naar de celkern, bindt op specifieke sites in het DNA en activeert een specifiek aantal genen.

Sommige TGF- $\beta$  familieleden dienen als morfogenen gedurende de ontwikkeling van weefsels (*concentratie is afhankelijk van de afstand tot het centrum van het zich ontwikkelende weefsel en hierdoor ‘weet’ de differentiërende cel welke richting ze uit moet gaan*) en induceren verschillende responsen in een ontwikkelende cel in functie van hun concentratie.

TGF- $\beta$ 1 speelt duale rol bij de ontwikkeling van kankers. Het kan zowel celproliferatie als apoptose stimuleren: Het interfereert met een groot aantal pathways zoals Fas, TNF $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, Jnk,... De uiteindelijke uitkomst van deze signaalcascades is afhankelijk van de balans van de in de cel aanwezige moleculen en de intensiteit van de respectievelijke signalen (Sanchez-Capelo, 2005).

## 2.5 (De)methylatie van DNA en (de)acetylatie en (de)methylatie van histonen en transcriptiefactoren

Het is duidelijk dat een verstoring van de normale genexpressie en de regulatie ervan een belangrijke rol speelt bij kanker. Deze kan te wijten zijn aan epigenetische wijzigingen aan de DNA of chromatinestructuur, onder de vorm van een gewijzigde methylatiestatus van het DNA en van methylatie- of acetylatiestatus of andere modificaties van de histonen. Ook transcriptiefactoren kunnen modificaties ondergaan door middel van deacetylatie.

### 2.5.1 (De)methylatie van DNA

#### 2.5.1.1 Voorkomen en betekenis van (de)methylatie

Methylatie en demethylatie zijn belangrijke mechanismen die de expressie van bepaalde genen beïnvloeden. Bij de hypermethylatie worden bepaalde delen van het DNA méér gemethyleerd waarbij de expressie geïnhibeerd wordt, terwijl bij de hypomethylatie juist een verminderde methylatie optreedt, waarbij de inhibitie van expressie opgeheven wordt. Op deze manier kunnen tumor-suppressorgenen door hypermethylatie uitgeschakeld worden en oncogenen door hypomethylatie tot expressie komen (Klein & Costa, 1997). Deze

epigenetische modificaties aan het DNA zijn bovendien overerfbaar naar de volgende celgeneratie.

Het aantal meldingen van het belang van hypermethylatie bij de ontwikkeling van kanker overstijgen die van hypomethylatie sterk. Tot op heden werden verschillende genen geïdentificeerd die hypermethylatie ondergaan tijdens de carcinogenese. Gevoelige genen zijn veelal deze betrokken bij de celcyclusregulatie (p16, p15, Rb), DNA herstel (BRCA1, MGMT), apoptose (DAPK, TMS1), geneesmiddelenresistentie, detoxificatie, differentiatie, angiogenese en metastase (Das & Singal, 2004). Hypermethylatie werd geassocieerd met onder andere longkanker (meer dan 40 genen, o.a. RAR $\beta$ , RASSF1A, CDKN2A, CDH13, APC), borstkanker (o.a. p16, het oestrogeenreceptor ER $\alpha$ -gen, het progesteronreceptor PR-gen, BRCA1, GSTP1, TIMP-3 en het E-cadherine gen), leukemie (o.a. het calcitonine-gen, p15, p21, het ER gen, SDC4 en MDR) (Das & Singal, 2004).

Hypomethylatie – de tweede vorm van veranderde methylering van DNA – is algemeen in vaste tumoren zoals leverkanker, baarmoederhalskanker, prostaattumoren en ook in haematologische aandoeningen zoals B-cell chronische lymfoïde leukemie. Een globale hypomethylatie werd ook waargenomen in borstkankers en in hersentumoren. Bovendien zou een hypomethylatie het gevolg kunnen zijn van een suboptimaal voedingspatroon of van blootstelling aan carcinogenen, waardoor dit mechanisme gekoppeld wordt aan milieublootstellingen (Pelengaris & Khan, 2006).

### 2.5.1.2 Mechanismen die kunnen bijdragen tot de carcinogenese

1/ Door hypermethylatie kunnen tumor-suppressorgen die normaalgezien actief zijn uitgeschakeld worden, wat de carcinogenese bevordert (Klein & Costa, 1997). DNA methylatie wordt gerealiseerd door een groep enzymen die bekend staan als DNA methyltransferases of DNMTs. Deze voegen een methylgroep toe op de 5e positie van cytosine CpG dinucleotide-eilanden. Deze DNA-regio's met een herhaalde CG sequentie (1000 tot 2000 baseparen lang) maken deel uit van de promotor van ongeveer de helft van alle menselijke genen, en zijn belangrijk bij de regulatie van de genexpressie door (de)methylatie. Verschillende mechanismen beschermen de cel tegen hypermethylatie van CpG eilanden: actieve transcriptie, actieve demethylatie, timing van replicatie en de lokale chromatinestructuur die de toegang voor DNA methyltransferase belemmert.

Bepaalde genen, zoals RASSF1A en p16 worden gemethyleerd bij een grote groep kankers, terwijl andere genen gemethyleerd worden in het geval van specifieke kankers. De mechanismen die aan de basis liggen van genselectiviteit bij de methylatie bij de carcinogenese blijven nog grotendeels onbekend, maar transcriptiefactoren die methyltransferases rekruteren voor binding aan specifieke promotoren zouden een rol spelen.

Op hun beurt zouden methyl-bindingsproteïnen interageren met histon-deacetylases en de histonacetylatie beïnvloeden (zie verder) (Di Croce et al. 2002).

2/ Bij de hypomethylatie van DNA - die wordt uitgevoerd door de groep enzymen die gekend staan als demethylases - treedt een verminderde methylatie op, waarbij de inhibitie van genexpressie opgeheven wordt (Costa & Klein, 1997). Hypomethylatie zou bijdragen tot de oncogenese door activatie van oncogenen zoals cMYC en H-RAS, door de activatie van latente transposons of door het induceren van chromosomale instabiliteit (Das & Singal, 2004; Pelengaris & Khan, 2006).

3/ Met betrekking tot de carcinogenese kunnen twee situaties zich voordoen. Een eerste mogelijkheid is dat de modificatie van de methylatietoestand van het DNA van een cel de oorzaak is van gene-silencing en dus een centrale en causale rol vervult tijdens de carcinogenese. Een tweede mogelijkheid is dat de (de)methylatie eigen is aan het fenotype van de geïntereerde cel, en dus enkel bijdraagt tot het behoud van gene-silencing veroorzaakt door genetische mechanismen. Of deze epigenetische veranderingen een oorzaak of een effect van de tumorgenese zijn, blijft voorlopig nog onduidelijk (Pelengaris & Khan, 2006).

Bepaalde geneesmiddelen kunnen de hypermethylatie terugschroeven en bepaalde genen terug activeren door rechtstreekse demethylering of door de eliminatie van DNA methyltransferases (Pelengaris & Khan, 2006). Aangezien echter ook hypomethylatie kan bijdragen tot de carcinogenese dient het gebruik van demethylerende agentia bij de behandeling van kanker dus met de nodige omzichtigheid te gebeuren, aangezien deze ernstige nevenwerkingen kunnen vertonen, en kwaadaardige transformaties zelfs in de hand kan werken (Das & Singal, 2004). Een vereiste om aan efficiënte behandeling te kunnen doen is de kennis van de mechanismen waardoor genen selectief ge(de)methyleerd worden door de cel, maar daarvoor is nog een hele weg af te leggen (Pelengaris & Khan, 2006).

### 2.5.1.3 Voorbeelden:

$\text{Ni}^{2+}$  bindt met histonen in het heterochromatine waardoor overcondensatie optreedt. Door deze condensatie worden naburige genen, die instaan voor het behoud van een normale celcyclus, mee opgenomen in het heterochromatine. Hierdoor worden deze genen sterker gemethyleerd dan normaal en zal de genetische activiteit van deze genen gesilenced worden. Hierdoor kan de celcyclus ontregeld raken en kunnen tumoren zich gaan ontwikkelen (Costa 1995).

**Arseen, dichloorazijnzuur en trichloorazijnzuur** kunnen hypomethylatie induceren en expressie van het oncogeen c-myc sterk doen toenemen (Watson & Goodman, 2002)

## 2.5.2 Histonen: (de)methylatie, (de)acetylactie en andere post-translationele modificaties

### 2.5.2.1 Betekenis

Naast de DNA-methylatie van DNA, speelt ook de acetylactie en methylactie van histonen – de eiwitten die in de kern associëren met en de structuur bepalen van het DNA - een belangrijke rol bij de genexpressie. Hierbij wordt een methyl/acetylgroep toegevoegd aan lysine residus aan het amino-terminale uiteinde van de histon-eiwitten. Net als bij de methylactie van DNA kunnen (de)methylactie en (de)acetylactie van histonen de structuur van chromosomen, de vorming van heterochromatine en de activiteit van transcriptionele activatorcomplexen beïnvloeden (Egger et al., 2004; Pelengaris & Khan, 2006).

### 2.5.2.2 Effecten op genexpressie en de carcinogenese

Het dynamische systeem van acetylactie/deacetylactie wordt gereguleerd door de histon-acetyltransferases (HATs – acetylering) en histon-deacetylases (HDACs – deacetylering).

Recent is duidelijk geworden dat deacetylatie van histonen door HDAC een van de belangrijkste manieren is waarop methylatie van DNA resulteert in vorming van heterochromatine en in de onderdrukking van de genexpressie (Pelengaris & Khan, 2006).

Deacetylatie geeft aanleiding tot de condensatie van het chromatine (het geheel van DNA en geassocieerde proteïnen), waardoor het DNA ontoegankelijk wordt voor transcriptie en genen uitgeschakeld worden (het chromatine wordt dan heterochromatine genoemd) (Pelengaris & Khan, 2006).

Veel transcriptiefactoren en chromatineregulatoren binden rechtstreeks of onrechtstreeks op geacetylerde histonen (Santos-Rosa & Caldas, 2005).

Er zijn verschillende mechanismen waarmee HDACs de ontwikkeling van kanker kunnen beïnvloeden.

Eenzijds kan een verhoogde HDAC-activiteit resulteren in de transcriptionele inactivatie van tumorsuppressorgenen zoals p53 en dus kankerbevorderend optreden.

Anderzijds vereist de tumorsuppressor Rb de activiteit van een klasse HDACs om zijn functie uit te oefenen (Santos-Rosa & Caldas, 2005). Ook zou p53 de transcriptie van het DNA-repair-helicase RecQ4 tijdens de G1-fase onderdrukken via een mechanisme waarbij HDAC-activiteit betrokken is, om te zorgen dat de genomische integriteit behouden blijft (Sengupta et al., 2005). Een verhoogde expressie van RecQ helicases kan aanleiding geven tot een verhoogde mutatiefrequentie (Yang et al., 2004) en bijgevolg kan men denken dat RecQ helicases betrokken zijn bij error prone DNA-repair<sup>2</sup>. De onderdrukking door p53 van de expressie van RecQ4 middels een HDAC-dependent mechanisme kan bijdragen tot het behoud van de integriteit van het genoom. HDAC kan via deze mechanismen dus ook een kanker-inhiberend effect uitoefenen.

Het meest algemene gevolg van de inhibitie van HDAC activiteit is het induceren van de differentiatie, groeistop en/of apoptose in tumorcellen in vivo en in vitro. HDAC inhibitors zouden dan ook kunnen gebruikt worden als anti-kanker geneesmiddelen (Santos-Rosa & Caldas, 2005). Maar door de centrale en complexe rol van HDAC is inhibitie van HDAC niet direct een goede benadering in termen van chemopreventie.

Acetylatie zorgt daarentegen voor een verminderde condensatie van DNA, waardoor dit toegankelijk wordt voor transcriptie en dus leidt tot activatie van genen (het chromatine wordt dan euchromatine genoemd) (Pelengaris & Khan, 2006). Mutaties in sommige HATs worden geassocieerd met de ontwikkeling van kanker. In dat opzicht kunnen HATs vergeleken worden met tumorsuppressoren, aangezien verliesmutaties een kankerbevorderend effect kunnen hebben (Santos-Rosa & Caldas, 2005).

De balans tussen HATs en HDACs kan worden veranderd door xenobiotische stoffen (tabaksrook, hormonen, sommige baseanalogen, reactieve zuurstofvormen) en straling, waardoor kan worden verondersteld dat deze de fenotypes van cellen kunnen beïnvloeden. De meeste van deze factoren zijn evenwel ook in staat om mutaties te genereren.

Methylatie van histonen kan zowel activatie als inactivatie tot gevolg hebben. De uitkomst is afhankelijk van het ge(de)methyleerde residu en de andere modificaties die aan het histon aanwezig zijn (Egger et al. 2004; Santos-Rosa & Caldas, 2005). Histon arginine wordt gemethyleerd door Proteïne arginine methyltransferases (PRMTs), terwijl histon lysine

<sup>2</sup> Onder error prone DNA-repair worden verstaan: vormen van repair die aanleiding geven tot fouten in de DNA-sequentie en dus mutaties.

gemethyleerd wordt door lysine methyltransferases. Zeer recent werden ook demethylases ontdekt, die het methylatieproces omkeerbaar maken (Santos-Rosa & Caldas, 2005).

Fosforylatie van serines, kan zowel geassocieerd zijn met condensatie als met transcriptionele activatie.

Ubiquitinatie van histonen leidt meestal tot een verhoogde genexpressie (Santos-Rosa & Caldas, 2005).

Sumoylatie, de modificatie van histonen door SUMO, een ubiquitine-achtig eiwit, gaat meestal gepaard met een verlaagde genexpressie door de associatie van de substraten met HDAC en HP (heterochromatine vormingsproteïne) (Santos-Rosa & Caldas, 2005).

### 2.5.3 Acetylatie van transcriptie-gerelateerde proteïnen

Van een aantal HAT proteïnes is bekend dat ze ook een aantal transcriptie-gerelateerde proteïnen acetyleren, waaronder transcriptiefactoren zoals p53, NF-κB, transcriptionele co-regulators zoals c-MYC en Rb en algemene transcriptiefactoren zoals TFIIE en TFIIB. Acetyltransferase activiteit op humane of virale oncoproteïnen kan ook bijdragen tot het ontstaan van kanker. Zo is bijvoorbeeld het C-MYC oncoproteïne een substraat van de acetyltransferases hGCN5/PCAF en TIP60. Acetylatie van c-MYC resulteert in een uitgesproken verhoging van de eiwitstabiliteit. Acetyltransferases zouden de c-MYC functie regelen door de snelheid van degradatie te veranderen.

Acetylatie van het lysine-residu naast het consensus-carboxyterminal binding protein (CtBP)-bindend PXDLS motief op transcriptionele repressoren zoals het adenovirus E1A kan leiden tot disruptie van repressor-complexen en zou een algemeen mechanisme voor genactivatie kunnen zijn (Zhang et al., 2000).

Ubiquitinatie en Sumoylatie kunnen transcriptie beïnvloeden door het modifieren van histon-deacetylases, tumorsuppressors (p53, PML) en transcriptiefactoren (c-myc, Glucocorticoïde receptor GR). Een afwijking van de normale ubiquitinatie/sumoylatie resulteert in defecten in de subcellulaire localisatie en verandert de degradatiesnelheid van factoren die belangrijk zijn bij de regulatie van celproliferatie en differentiatie, waaruit de relevantie voor de carcinogenese blijkt (Santos-Rosa & Caldas, 2005).

### 2.5.4 Onderlinge afhankelijkheid

De complexe samengang van verschillende mechanismen maakt het moeilijk om gericht in te werken op deze processen bij het trachten te voorkomen of terugdraaien van het carcinogenese-proces. Weinig is gekend over de interacties tussen verschillende mechanismen en de gevolgen voor het globale systeem bij het ingrijpen in één specifieke pathway. Het is dus belangrijk dat deze samenwerking verder ontrafeld wordt om tot efficiënte therapieën en chemopreventiestrategieën te kunnen komen (Santos-Rosa & Caldas, 2005).

Zoals reeds vermeld resulteert DNA methylatie in histonmodificaties, en dit door de inductie van een verhoogde rekrutering van histondeacetylases en histonmethyltransferases. Verschillende combinaties van histonmodificaties binnen één histon en tussen verschillende histonen zorgen uiteindelijk voor een verschillend uitkomst van deze modificaties in termen van transcriptionele activatie (Santos-Rosa & Caldas, 2005).

Door methyltransferases gemethyleerd DNA vormt een bindingsplaats voor methylbindingsproteïnen, die op hun beurt interageren met zowel HDAC complexen en DNA methyltransferases. De geassembleerde complexen worden verder gestabiliseerd door interacties tussen methyltransferases en HDAC's, hetgeen kan leiden tot uitbreiding van de hypermethylering tot aangrenzende regio's en het systematisch uitschakelen van genen (Di Croce et al., 2002).

## 2.6 Translationele modificaties

### 2.6.1 Translatie

Translatie is het proces waarbij mRNA - tijdens de transcriptie overgeschreven van het DNA, wordt 'vertaald' naar polypeptiden met behulp van de ribosomen. De regulatie van de mRNA translatie speelt een kritische rol bij celgroei, proliferatie en differentiatie. Modificatie van de translatie door xenobiotische stoffen kan – via deze processen – een invloed hebben op de carcinogenese.

Bij eukaryoten gebeurt de translatie meestal volgens de 'cap-afhankelijke' manier. De CAP-structuur bevindt zich aan het 5' uiteinde van het mRNA. Bij de regulatie van deze translatie speelt het CAP-bindende proteïne eucaryotic initiation factor eIF4E –een centrale rol. Dit eIF4E is snelheidsbepalend bij de vorming van het eIF4F complex.

Een ander mechanisme waarlangs translatie geïnitieerd wordt is CAP en eIF4E-onafhankelijk en verloopt d.m.v. een Internal Ribosome Entry Site (Mamane et al., 2004).

### 2.6.2 Regulatie van eIF4E en carcinogenese

Activatie/fosforylatie van het eIF4E en hiernaast ook andere componenten van de translationele machinerie gebeurt via de RAS-MAPK en PI3K-AKT-mTOR pathways. Deze pathways worden geïnitieerd door groeifactoren, mitogenen en hormonen.

De assemblage van het eIF4F-complex wordt gehinibeerd door een familie van repressoren genaamd de 4E-BP. Het zijn kleine, warmteresistente eiwitten die de CAP-afhankelijke translatie inhiberen. Binding van de 4E-BP aan eIF4E wordt gereguleerd door fosforylatie via o.a. de PI3K-AKT-mTOR pathway. Hypogefosforyleerde 4E-BPs binden sterk aan eIF4E terwijl hypergefosforyleerde vormen slechts een zwakke affiniteit vertonen. Extracellulaire stimuli zoals groeifactoren, hormonen, mitogenen, aminozuren, cytokines en G-proteïne coupled receptor-agonisten induceren 4E-BP fosforylatie en stellen aldus eIF4E vrij, die dan de translatie kan opdrijven.

eIF4E controleert de translatie van verschillende voor de carcinogenese belangrijke mRNA's die betrokken zijn in o.a. polyamine synthese, celcyclusprogressie, activatie van proto-oncogenen, angiogenese, celoverleving, invasie, autocriene groei stimulatie... Verhoogde concentraties aan vrij eIF4E leiden tot een specifieke overexpressie van sommige groeibevorderende genproducten zoals ornithine decarboxylase, cycline D1, c-myc, vascular endothelial growth factor (VEGF) en fibroblast growth factor (FGF). eIF4E heeft, naast een groeibevorderend ook een anti-apoptische werking.

Overexpressie van eIF4E bevordert de tumorale transformatie van de cel en werd waargenomen in talrijke soorten van vaste tumoren en tumorcellijnen.

### 2.6.3 Relevantie voor tumorpromotie

De mogelijkheid bestaat dat xenobiotische stoffen en andere exogene factoren die de hierboven vermelde pathways zouden activeren, bvb. door receptorbinding, op deze wijze de carcinogenese zouden bevorderen.

## 2.7 Inhibitie van de gap junction intercellulaire communicatie (GJIC)

### 2.7.1 Functie en betekenis van gap junctions

Het is reeds zeer lang bekend dat intercellulaire communicatie via gap-junctions belangrijk is voor de groeiconrole en differentiatie van normale cellen, en dat kankercellen, die gekenmerkt worden door een gebrek aan groeiconrole en de onmogelijkheid om terminaal te differentiëren geen functionele intercellulaire communicatie via gap junctions blijken te hebben.

Gap-junctions worden gedefinieerd als clusters van enkele tot honderden dicht bij elkaar gelocaliseerde kanalen die naburige celen met elkaar verbinden (Laird, 2006). Deze membraankanalen worden gekenmerkt door een celoverbruggende structuur, een relatieve aspecificiteit en een passieve moleculaire doorstroming. De selectiviteit is voornamelijk gestoeld op basis van grootte, waarbij moleculen kleiner dan 1000 Da – zoals cAMP, ADP en ATP – doorgelaten, maar grotere moleculen – zoals nucleïnezuren – tegengehouden worden. Gap junction-kanalen worden opgebouwd uit connexines (cx), een eiwitfamilie waarvan bij de mens op heden 21 leden gekend zijn (Kumar & Gilula, 1996; Laird, 2006). De verankering van de connexines met vier lussen in de celmembraan, waarbij zowel de N- als de C-uiteinden van het proteïne in het cytoplasma uitsteken, lijkt voor elk lid van deze eiwitfamilie gelijk te zijn. Zes connexines (hexameer) vormen samen een connexon of hemikanaal. Twee connexons uit de membranen van twee naburige cellen zijn aan elkaar gehecht en vormen samen één gap junction-kanaal. Gap-junction-kanalen kunnen opgebouwd worden uit twee identieke connexons (homotypisch kanaal) of twee verschillende connexons (heterotypisch kanaal). Bovendien kan één connexon opgebouwd worden uit een combinatie van verschillende connexines (heteromeer connexon), wat de diversiteit aan mogelijke kanalen nog vergroot (Laird, 2006).

De halfwaardetijd van gap-junctions is kort, met waarden tussen 1 en 5 uur. Het aantal kanalen in een cel wordt bepaald door de snelheid van synthese van connexines, hun transport van het endoplasmatisch reticulum naar het trans-Golgi netwerk en hun integratie en samenstelling in de membraan, en door degradatie via de proteosomale of lysosomale pathway (Salameh & Dhein, 2005; Laird, 2005). De gap-junctionele intercellulaire communicatie kan ook gereguleerd worden door het openen of sluiten van kanalen (Solan & Lampe, 2005).

Stoffen die doorheen de gap junction-kanalen kunnen migreren zijn ondermeer anorganische ionen (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, ...) en een aantal kleine moleculen zoals cAMP, inositol 1,4,5-trifosfaat (IP<sub>3</sub>), adenosine, ADP en ATP. Kanalen kunnen verschillen vertonen in permeabiliteit, in functie van het soort connexines waaruit ze zijn opgebouwd. Dit zou

toelaten een onderscheid te maken tussen de verschillende signaalmoleculen en metabolieten, van groot belang voor de cel-cel communicatie (Kumar & Gilula, 1996).

Bij meercellige organismen wordt de homeostase behouden door regulatie van celgroei, celdeling, celdood, differentiatie en migratie. Hiertoe is de intercellulaire communicatie via cel-cel adhesie en gap junctions erg belangrijk, naast de extracellulaire communicatie (via oplosbare groeifactoren en via cel-matrix contacten), en intracellulaire communicatie (via signaaltransductienetwerken) (Vanhoecke et al., 2004). De eigenlijke functies van gap junctions zijn divers. Ze zijn belangrijk bij de snelle overdracht van elektrische signalen en het doorgeven van kleine metabolieten en ionen verstrekt de weefsels ook een mogelijkheid om de activiteit van verschillende cellen gecoördineerd te reguleren (Salemeh & Dhein, 2005).

### **2.7.2 Mechanismen die kunnen bijdragen tot de carcinogenese**

Inhibitie van de intercellulaire communicatie speelt een belangrijke rol tijdens de carcinogenese, meer in het bijzonder in de promotiefase, aangezien het als gevolg heeft dat negatieve groeiregulators, gesecreteerd door naburige (normale) cellen, de cel in kwestie niet meer bereiken. Een blokkeren van de gap junctions kan de geïnitieerde cel toelaten te prolifereren en aan apoptose te ontsnappen. De homeostasis, de stabiliteit van weefsels, gaat hierdoor verloren.

### **2.7.3 Voorbeelden**

Voorbeelden van tumor-promotors die inwerken op de gap junction intercellulaire communicatie zijn *chlordaan*, een peroxisoomproliferator en 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA, zie 3.3) (Trosko, 2003; Trosko et al., 2005).

### **2.7.4 Interacties**

GJIC speelt een belangrijke rol bij de regulatie van celgroei, differentiatie, en apoptose van progenitor cellen<sup>3</sup> (Valko et al., 2006).

Oestrogene componenten zoals DES (diethylstilbestrol), E2 ( $\beta$ -estradiol) en GEN (genistein) inhiberen de GJIC in Leydig cellen. DES doet dat via de oestrogeen receptor, terwijl E2 en GEN via oestrogeen receptor (ER) én PKC werken (Iwase et al., 2006).

---

<sup>3</sup> Progenitor cel: Een primitieve cel die geproduceerd wordt in het beenmerg en via de bloedstroom naar zich naar wonden aan het bloedvat verplaatst alwaar het de schade helpt herstellen.

## 2.8 Activatie van telomerase

### 2.8.1 Functie en betekenis

Telomeren zijn repeterende stukjes DNA-sequenties op de uiteinden van de chromosomen. Bij mensen is dat de '5-TTAGGG-3' sequentie. Dit stuk DNA beschermt het chromosoom tegen DNA-corrosie en zorgt voor de stabiliteit. Gedurende DNA replicatie is het DNA-polymerase niet in staat om dit uiteinde volledig te kopiëren, waardoor de nieuwe DNA-streng een beetje korter is dan de ouderlijke streng. Hierdoor zullen de telomeren geleidelijk afslijten gedurende opeenvolgende celdelingen tot een bepaalde kritische telomeerlengte waarna de cellen senescentie ondergaan.

Telomerase is een cellulair ribonucleoproteïne met reverse transcriptase-activiteit, dat de lengte van het telomeer onderhoudt, door hexamere herhalingen toe te voegen. Deze onderhoudsbeurt is nodig om de cellen uit het senescentie-stadium te houden waardoor ze kunnen blijven prolifereren.

Telomerase bestaat uit een telomerase RNA (TERC) molecule, de katalytische subunit telomerase reverse transcriptase (TERT) en nog een aantal bijkomende proteïnen die bijdragen aan de samenstelling en maturatie van het enzym.

### 2.8.2 Rol in tumorpromotie

Telomerase kan geactiveerd of gehinibeerd worden door regulatie ter hoogte van de transcriptie van het TERT gen door transcriptiefactoren. Voorbeelden van belangrijke repressors zijn p53 en TGF $\beta$ . Hoge concentraties leiden tot een significante vermindering in afschrijving TERT en dus telomerase activiteit. c-Myc, SP-1 en oestrogeen zijn belangrijke activatoren van TERT transcriptie.

Promoter demethylatie met '5-aza-2'-deoxycytidine blijkt eveneens een activerende invloed te hebben op TERT afschrijving en telomerase activiteit in diverse in vitro experimenten (Liu et al., 2004).

Telomerase activiteit wordt in verschillende celtypes waargenomen en correleert sterk met het proliferatieve potentieel van de cel. Zo wordt in 70% van de onsterfelijke menselijke cellijnen en 90-95% van kankercellen een hoge telomerase activiteit en stabiele telomeerlengte waargenomen. Tumorcellen zijn door hun blijvend intacte telomeren in staat om te oneindig prolifereren (Liu et al., 2004).

### 2.8.3 Voorbeelden

Oestrogenen  
Demethylerende agentia

### 2.8.4 Interacties

Oestrogenen activeren het telomerase, terwijl TGF $\beta$  een repressor is.

TERT-inhibitie vergemakkelijkt de inductie van de mitochondrie-gemedieerde apoptose-pathway (Massard et al., 2006).

### 3 Chemopreventie

#### 3.1 Inleiding

Onderzoek inzake chemopreventie omvat de studie naar stoffen die één of meer van de volgende eigenschappen bezitten: (1) de initiatie van tumoren voorkomen, (2) de groei van waargenomen tumoren afremmen of stopzetten (3) de latentieperiode van kanker verlengen, (4) de kankermortaliteit of de vorming van metastasen reduceren en (5) het optreden van secundaire tumoren verhinderen (Kapadia et al. 2003). Een belangrijke focus binnen het onderzoek naar chemopreventie van kanker richt zich hierbij op de identificatie, karakterisatie en ontwikkeling van nieuwe, veilige chemopreventieve agentia.

Meest efficiënte is om ingrijpen op promotiefase, omdat het onwaarschijnlijk is dat het aantal irreversiebele mutaties sterk verminderd wordt door toedienen van chemopreventieve middelen.

In dit rapport beperken we ons tot het geven van een overzicht van aangrijpingspunten voor chemopreventie.

#### 3.2 Aangrijpingspunten voor chemopreventie: potentiële chemopreventieve agentia

##### 3.2.1 Antimutagenen

Antimutagenen kunnen via volgende mechanismen werken:

- Opname van carcinogenen inhiberen:  $\text{Ca}^{2+}$  verhindert opname van galzuren in darmepitheelcellen
- Modulatie van CytP450 activiteit waardoor de activatie van verschillende procarcinogenen geblokkeerd wordt
- Blokkering van cyclo-oxygenases en lipoxygenase, wat ontstekingsremmend werkt
- Stimuleren van de conjugatie van geactiveerde carcinogenen aan glutathion of andere moleculen. Vb. Dithiolthion stimuleert faseII-enzyme activiteit.
- Blokkeren van binding van carcinogenen aan DNA, en de vorming van DNA-adducten vermijden. Fouten bij de verwijdering van DNA-adducten en bij het DNA-herstel zorgen voor het gros van de mutaties.

(Steele & Kelloff, 2005)

##### 3.2.2 Anti-oxidantia

Anti-oxidantia zoals polyphenolen (in groene thee en groenten) kunnen vrije electronen absorberen en hierdoor de vorming van schadelijke vrije radicalen belemmeren. Deze vrije radicalen dragen bij tot de oxidatieve stress en beschadigen het DNA door de vorming van adducten (Steele & Kelloff, 2005).

### 3.2.3 Differentiatie inducers

Door het induceren van terminale differentiatie kan de cel zich niet meer delen en kwaadaardige dochtercellen produceren (Steele & Kelloff, 2005).

Vbn: Retinoiden, Vitamine D, Calcium

### 3.2.4 Anti-inflammatoire middelen

Anti-inflammatoire middelen kunnen door de onstekingsreactie te verzwakken de vrijstelling van vrije radicalen verminderen. Ook kunnen zij een anti-proliferatief effect hebben, via inhibitie van de cyclooxygenase en lipoxygenase pathways (Steele & Kelloff, 2005).

Inderdaad, een belangrijk proliferatie-inducerend mechanisme is de arachidonzuur-metabolisme dat voor de productie van cytokinen zorgt. Deze pathway divergeert in de cyclooxygenase (COX) en de lipoxygenase (LOX) pathway. De producten van deze pathway zijn inflammatoire moleculen (prostaglandine en leukotrienes) die de celprogressiecyclus en dus de ontwikkeling van tumoren sterk stimuleren.

Inhibitie van de sleutelenzymen van deze pathway kunnen dus de kankerontwikkeling voorkomen, vertragen of zelfs omkeren.

COX-2 inhibitie oefent een anti-carcinogene werking uit via inhibitie van productie van cytokinen en vrije radicalen. Recent is er echter bezorgdheid gerezen omtrent het gebruik van COX2-inhibitoren wegens mogelijk cardiovasculair risico. Een klinische studie inzake het gebruik van COX-2 inhibitoren als chemopreventief middel werd stopgezet wegens een toename van cardiovasculaire accidenten bij proefpersonen die het actief product namen (Steele & Kelloff, 2005).

### 3.2.5 Ras activatie

Om de oncogene Ras pathway te activeren is farnesylatie nodig. Geneesmiddelen die deze farnesylatie - gekatalyseerd door het proteïne farnesyltransferase inhiberen, blokkeren dus de proliferatie van kankercellen. Natuurlijk componenten zoals limoneen en perillyl alcohol (uit citrusvruchten) verlagen de beschikbaarheid van farnesol waarbij eveneens de farnesyltransferase - activiteit bemoeilijkt wordt. (Steele & Kelloff, 2005)

Er bestaan ook synthetische isoprenoïden die binden op farnesyltransferase en zo de enzymactiviteit blokkeren (Kale et al., 2003).

### 3.2.6 Selectieve oestrogeen receptor modulators

De modulatie van hormonale activiteit is een ander belangrijk doelwit voor chemopreventie van kanker. Selectieve oestrogeen receptor modulators (SERMs) hebben zowel agonistische als antagonistische eigenschappen. Kanker-chemopreventieve middelen werken antagonistisch. Tamoxifen is hier een voorbeeld van en vertoont een borstkanker-voorkomende werking, maar wegens de ernstige nevenwerkingen (verhoogde kans op baarmoederwandkanker), wordt naarstig gezocht naar alternatieve oestrogeenreceptor inhiberende producten. SERMs als raloxifeen en arzoxifeen zouden het probleem moeten

minimaliseren. Antagonistische SERMs kunnen kankerchemopreventief werken (Steele & Kelloff, 2005).

### **3.2.7 Angiogenese inhibitoren**

Angiogenese is de vorming van nieuwe bloedvaten die de tumoren voeden.

Sulforafaan is een goedbestudeerde angiogenese-inhibitor die interfereert met alle essentiële stappen van neovascularisatie: van pro-angiogene signaaltransductie en “basement”-membraan integriteit tot endothelische celproliferatie, migratie en tubevorming (Bertl et al., 2006).

Sharma et al. (2001) toonden aan dat NSAID, retinoïden, SERMs via verschillende biologische mechanismen de angiogenese van tumoren kunnen inhiberen.

### **3.2.8 Topo-isomerase II inhibitors**

Een manier om de progressie van kankertumoren te vertragen is de snelheid van DNA-replicatie te verminderen door hun anti-topo-isomerase II activiteit te inhibiteren. Topoisomerasen I en II zijn enzymen die betrokken zijn bij de DNA-synthese. Topoisomerase I is het doelwit bij kankertherapie door camptothecine en zijn analogen. Deze agentia zijn echter giftig voor de cel en kunnen niet preventief gebruikt worden. Katalytische topo-isomerase II inhibitoren zijn potentiële chemopreventieve stoffen dankzij hun anti-proliferatieve werking via niet-toxische mechanismen.

Voorbeelden van topo-isomerase II inhibitoren zijn zowel thionen, zoals oltipraz, als fenolen, zoals genistein als agentia als indool-3-carbinol en sulforafaan (Steele & Kelloff, 2005).

### **3.2.9 DNA methylatie modulators**

In cellen van tumorweefsel is de methylatiestatus van het DNA zo'n 30% lager dan normaal (hypomethylatie). DNA hypomethylatie van oncogenen of hypermethylatie van tumorsuppressorgenen zijn afwijkingen die gevonden worden in dysplastische weefsels die verholpen zouden kunnen worden d.m.v. chemopreventieve agentia (Steele & Kelloff, 2005).

### 3.2.10 Apoptose inducers

Er kan op een groot aantal mechanismen ingespeeld worden om apoptose te induceren. Zo zouden zwavelhoudende componenten zoals bepaalde look-bestanddelen en isothiocyannaten MAPK-activiteit moduleren en RZV genereren (Steele & Kelloff, 2005).

Het is recent bewezen dat isothiocyannaten (ITC) apoptose induceren in verschillende kankercellijnen. Gedurende het verloop van apoptose inductie door ITC, zoals benzylisothiocyanaat (BITC), een belangrijke ITC die geïsoleerd wordt uit papaya, worden meerdere signaaltransductie pathways beïnvloed en verschillende intermediairen in . Door blootstelling van cellen aan BITC resulteerde in de inhibitie van de G2/M progressie. Daarbij werden niet alleen G2/M-celcyclus stop regulerende genen maar ook apoptose-inducerende genen upgereguleerd. Het gefosforyliseerde Bcl-2 hierbij een sleutelrol speelt door de p38 MAPK-afhankelijke celcyclusstop te linken aan de JNK-activatie (belangrijke pro-apoptotische molecule) door BITC. Ook heeft BITC blijkbaar een sterker cytotoxisch effect bij prolifererende menselijke colonepitheelcellen dan bij cellen in de quiescentie fase (Nakamura en Miyoshi, 2006).

### 3.2.11 Herstellen GJIC

Inhibitie van de GJIC kan een belangrijke rol spelen tijdens de tumor-promotiefase. Als gevolg ervan zouden groeiregulerende signaalmoleculen, uitgestuurd door naburige cellen, de voor kanker geïnitieerde cel niet meer bereiken.

Experimenten waarbij het herstellen van de GJIC resulteerde in groei-stop van getransformeerde cellen en het feit dat de groei-inhibitie van getransformeerde cellen gecorreleerd is met hun mogelijkheid om te communiceren met normale cellen zijn hiervan een illustratie (Trosko, 2005; Mesnil *et al.*, 2005).

Chemicaliën die erin slagen om de inhibitie van GJIC op te heffen, zonder daarbij cytotoxische effecten uit te oefenen, zijn dus potentiële chemopreventieve agens.

vbn.: Flavonen

## Lijst met afkortingen

AHR: aryl-koolwaterstof-receptor  
AP-1: activator-proteïne 1  
ARE: antioxidant respons element  
cAMP: cyclisch adenosyl monofosfaat  
DAG: diacylglycerol  
DES: diethylstilbestrol  
DISC: Death Inducing Signaling Complex  
E2:  $\beta$ -estradiol  
EGF: epidermal growth factor  
ER: oestrogeen receptor  
ERK: extracellular-signal-regulated kinase  
GDP: Guanine difosfaat  
GEN: genistein  
GJIC: gap junction intercellulaire communicatie  
GTP: Guanine trifosfaat  
HAT: histon-acetyltransferases  
HDAC: histon-deacetylases  
IAP: Inhibitors of Apoptosis Proteins  
IGF-1: insulin-growth-factor  
Jak: Janus Kinase  
MAPK: mitogen activated protein kinase  
NF- $\kappa$ B: Nuclear Factor- $\kappa$ B  
NR: nuclear receptors (kernreceptoren)  
Nrf2: nuclear factor E2 p45 - related factor 2  
PDGF: platelet-derived growth factor receptor  
PI3K: fosfatidylinositol 3 kinase  
PIP2: fosfidityl-inositol-bifosfaat  
PKA: proteïne kinase A  
PKC: Proteïne Kinase C  
PLC- $\beta$  fosfolipase C- $\beta$   
PPAR $\alpha$ : peroxisome proliferator activated receptor  
RSV: reactieve stikstofvormen  
RXR retinoic X receptor  
RZV: reactieve zuurstofvormen  
Stat: Signal Transducers and activators of transcription  
TERT: telomerase reverse transcriptase  
TNF: tumor necrosis factor  
TPA: tetradecanoylforbolacetaat  
VEGF: vasculaire endotheel groeifactor receptor

## Referenties

- Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci.* 2001 Jun;26(6):390-7.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *The Cell.* 2002. Garland Science, New York, USA.
- Baker et al. Inhibition of gap junctional communication by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in rat hepatocytes. *Carcinogenesis* 1995, 16 (10):2321-2326).
- Bertl E, Bartsch H, Gerhauser C. Inhibition of angiogenesis and endothelial cell functions are novel sulforaphane-mediated mechanisms in chemoprevention. *Mol Cancer Ther.* 2006 Mar;5(3):575-85.
- Boelsterli UA. *Mechanistic Toxicology.* 2003. Taylor & Francis, London, UK.
- Costa M. Model for the epigenetic mechanism of action of nongenotoxic carcinogens. *Am J Clin Nutr.* 1995 Mar;61(3 Suppl):666S-669S.
- Curtin JF, Cotter TG. Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cell Signal.* 2003 Nov;15(11):983-92.
- Das PM, Singal R. DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol.* 2004 Nov 15;22(22):4632-42.
- Demant J, Van Larebeke N. *Carcinogenesis: mutations and mutagens.* *Tumour Biol.* 2001 22(3): 191-202.
- Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 2000 Sep;10(9):369-77.
- Di Croce L, Raker VA, Corsaro M, Fazi F, Fanelli M, Faretta M, Fuks F, Lo Coco F, Kouzarides T, Nervi C, Minucci S, Pelicci PG. Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science.* 2002 Feb 8;295(5557):1079-82.
- Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature.* 2004 May 27;429(6990):457-63.
- Ferrari CK, Torres EA. Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic diseases of aging. *Biomed Pharmacother.* 2003 Jul-Aug;57(5-6):251-60.
- Gopisetty G, Ramachandran K, Singal R. DNA methylation and apoptosis. *Mol Immunol.* 2006 Apr;43(11):1729-40.

- IARC. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. Geneva: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, 1972-PRESENT. (Multivolume work)., p. 70 264 (2001)
- Iwase Y, Fukata H, Mori C. Estrogenic compounds inhibit gap junctional intercellular communication in mouse Leydig TM3 cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006 May 1;212(3):237-46.
- Kale TA, Hsieh SA, Rose MW, Distefano MD. Use of synthetic isoprenoid analogues for understanding protein prenyltransferase mechanism and structure. *Curr Top Med Chem.* 2003;3(10):1043-74.
- Kapadia GJ, Azuine MA, Sridhar R, Okuda Y, Tsuruta A, Ichiishi E, Mukainake T, Takasaki M, Konoshima T, Nishino H, Tokuda H. Chemoprevention of DMBA-induced UV-B promoted, NOR-1-induced TPA promoted skin carcinogenesis, and DEN-induced phenobarbital promoted liver tumors in mice by extract of beetroot. *Pharmacol Res.* 2003 Feb;47(2):141-8.
- Klaunig JE, Babich MA, Baetcke KP, Cook JC, Corton JC, David RM, DeLuca JG, Lai DY, McKee RH, Peters JM, Roberts RA, Fenner-Crisp PA. PPARalpha agonist-induced rodent tumors: modes of action and human relevance. *Crit Rev Toxicol.* 2003;33(6):655-780.
- Klaunig JE, Kamendulis LM, Xu Y. Epigenetic mechanisms of chemical carcinogenesis. *Hum Exp Toxicol.* 2000 Oct;19(10):543-55.
- Klein CB, Costa M. DNA methylation, heterochromatin and epigenetic carcinogens. *Mutat Res.* 1997 Apr;386(2):163-80.
- Kolaja KL, Stevenson DE, Walborg EF Jr, Klaunig JE. Dose dependence of phenobarbital promotion of preneoplastic hepatic lesions in F344 rats and B6C3F1 mice: effects on DNA synthesis and apoptosis. *Carcinogenesis.* 1996 May;17(5):947-54.
- Kolaja KL, Stevenson DE, Walborg EF Jr, Klaunig JE. Selective dieldrin promotion of hepatic focal lesions in mice. *Carcinogenesis.* 1996 Jun;17(6):1243-50.
- Kumar NM & Gilula NB. The gap junction communication channel. *Cell.* 1996 84(3):381-8.
- Laird DW. Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction internalization and degradation. *Biochim. Biophys. Acta.* 2005 1711(2):172-82.
- Laird DW.. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem. J.* 2006 394(Pt 3):527-43.
- Leithe E, Rivedal E. Ubiquitination and down-regulation of gap junction protein connexin-43 in response to 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate treatment. *J Biol Chem.* 2004 Nov 26;279(48):50089-96.
- Liu L, Lai S, Andrews LG, Tollefsbol TO. Genetic and epigenetic modulation of telomerase activity in development and disease. *Gene.* 2004 Sep 29;340(1):1-10.
- Mably TA, Bjerke DL, Moore RW. Gendron-Fitzpatrick, A.; Peterson, R.E. In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. III. Effects on spermatogenesis and reproductive capability. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1992; 114: 108.

- Mamane Y, Petroulakis E, Rong L, Yoshida K, Ler LW, Sonenberg N. eIF4E--from translation to transformation. *Oncogene*. 2004 Apr 19;23(18):3172-9.
- Massard C, Zermati Y, Pauleau AL, Larochette N, Metivier D, Sabatier L, Kroemer G, Soria JC. hTERT: a novel endogenous inhibitor of the mitochondrial cell death pathway. *Oncogene*. 2006 Aug 3;25(33):4505-14.
- Mesnil, M., Crespin, S., Avanzo, J.L. & Zaidan-Dagli, M.L.. Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process. *Biochim. Biophys. Acta*. 2005 1719(1-2):125-45.
- Nakamura Y, Miyoshi N. Cell death induction by isothiocyanates and their underlying molecular mechanisms. *Biofactors*. 2006;26(2):123-34.
- Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, Carotenuto A, De Feo G, Caponigro F, Salomon DS. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*. 2006 Jan 17;366(1):2-16.
- Pelengaris S & Khan M. *The molecular biology of cancer*. 2006. Blackwell Publishing, Malden, USA.
- Peraza MA, Burdick AD, Marin HE, Gonzalez FJ, Peters JM. The toxicology of ligands for peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Toxicol Sci*. 2006 Apr;90(2):269-95.
- Roberts RA, Michel C, Coyle B, Freathy C, Cain K, Boitier E. Regulation of apoptosis by peroxisome proliferators. *Toxicol Lett*. 2004 Apr 1;149(1-3):37-41.
- Roberts RA, Soames AR, Gill JH, James NH, Wheeldon EB. Non-genotoxic hepatocarcinogens stimulate DNA synthesis and their withdrawal induces apoptosis, but in different hepatocyte populations. *Carcinogenesis*. 1995 Aug;16(8):1693-8.
- Salameh, A. & Dhein, S. (2005). Pharmacology of gap junctions. New pharmacological targets for treatment of arrhythmia, seizure and cancer? *Biochim. Biophys. Acta*. 1719(1-2):36-58.
- Sanchez-Capelo A. Dual role for TGF-beta1 in apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005 Feb;16(1):15-34.
- Santos-Rosa H, Caldas C. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Eur J Cancer*. 2005 Nov;41(16):2381-402.
- Sengupta S, Shimamoto A, Koshiji M, Pedoux R, Rusin M, Spillare EA, Shen JC, Huang LE, Lindor NM, Furuichi Y, Harris CC. Tumor suppressor p53 represses transcription of RECQ4 helicase. *Oncogene*. 2005 Mar 3;24(10):1738-48.
- Sharma S, Ghoddoussi M, Gao P, Kelloff GJ, Steele VE, Kopelovich L. A quantitative angiogenesis model for efficacy testing of chemopreventive agents. *Anticancer Res*. 2001 Nov-Dec;21(6A):3829-37.

- Steele VE, Kelloff GJ. Development of cancer chemopreventive drugs based on mechanistic approaches. *Mutat Res.* 2005 Dec 11;591(1-2):16-23.
- Trosko JE, Chang CC. Role of stem cells and gap junctional intercellular communication in human carcinogenesis. *Radiat Res.* 2001 Jan;155(1 Pt 2):175-180.
- Trosko JE. The role of stem cells and gap junctional intercellular communication in carcinogenesis. *J Biochem Mol Biol.* 2003; 36(1):43-8.
- Trosko JE. The role of stem cells and gap junctions as targets for cancer chemoprevention and chemotherapy. *Biomed Pharmacother.* 2005 Oct;59 Suppl 2:S326-31.
- Ueno AM, Vannais DB, Gustafson DL, Wong JC, Waldren CA. A low, adaptive dose of gamma-rays reduced the number and altered the spectrum of S1- mutants in human-hamster hybrid AL cells. *Mutat Res.* 1996 Nov 4;358(2):161-9.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006 Mar 10;160(1):1-40.
- Vanden Heuvel JP, Clark GC, Thompson CL, McCoy Z, Miller CR, Lucier GW, Bell DA. CYP1A1 mRNA levels as a human exposure biomarker: use of quantitative polymerase chain reaction to measure CYP1A1 expression in human peripheral blood lymphocytes. *Carcinogenesis.* 1993 Oct;14(10):2003-6.
- Vanhoecke, B.W., Depypere, H.T., De Beyter, A., Sharma, S.K., Parmar, V.S., De Keukeleire, D & Bracke, M.E. (2005). New anti-invasive compounds: Results from the Indo-Belgian screening program. *Pure Appl. Chem.* 77(1):65-74.
- Van Larebeke N, Koppen G, Nelen V, Schoeters G, Van Loon H, Albering H, Riga L, Vlietinck R, Kleinjans J; Flemish Environment and Health Study Group. Differences in HPRT mutant frequency among middle-aged Flemish women in association with area of residence and blood lead levels. *Biomarkers.* 2004 Jan-Feb;9(1):71-84.
- Watson RE, Goodman JI. Epigenetics and DNA methylation come of age in toxicology. *Toxicol Sci.* 2002 May;67(1):11-6.
- Weinstein IB. Mitogenesis is only one factor in carcinogenesis. *Science.* 1991 Jan 25;251(4992):387-8.
- Yang H, Wolff E, Kim M, Diep A, Miller JH. Identification of mutator genes and mutational pathways in *Escherichia coli* using a multicopy cloning approach. *Mol Microbiol.* 2004 Jul;53(1):283-95.
- Zhang Q, Yao H, Vo N, Goodman RH. Acetylation of adenovirus E1A regulates binding of the transcriptional corepressor CtBP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Dec 19;97(26):14323-8.