Maastricht University

Role of neutrophils in pulmonary DNA damage and repair

Citation for published version (APA):

Güngör, N. (2009). *Role of neutrophils in pulmonary DNA damage and repair*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. https://doi.org/10.26481/dis.20091215ng

Document status and date:
Published: 01/01/2009

DOI:
10.26481/dis.20091215ng

Document Version:
Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

• A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
• The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
• The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

• Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
• You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
• You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the “Taverne” license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 20 Apr. 2024

7

Summary and general discussion

Inflammation has been recognised as an important factor in cancer development [1]. In some types of cancer, an oncogenic change induces and inflammatory microenvironment that promotes the development of tumours (extrinsic pathway). Regardless of its origin, 'smouldering' inflammation in the tumour microenvironment has many tumour promoting effects. It aids in the proliferation and survival of malignant cells, and promotes angiogenesis and metastasis. Conversely, in other types of cancer, inflammatory conditions are present before a malignant change occurs and augment the risk of developing cancer (intrinsic pathway). The two pathways converge in the activation of transcription factors (mainly NF-κB, STAT-3 and HIF1α), which coordinate the production of inflammatory mediators (cytokines and chemokines), which in their turn recruit and activate inflammatory cells (*e.g.* neutrophils), resulting in inflammation. These mediators and effectors of inflammation are important constituents of the local environment of tumours [2]. Although the connection between inflammation and cancer is now generally accepted, it remains unclear whether inflammation is sufficient for cancer development. This thesis focuses on one candidate for endogenous 'inflammatory carcinogen', namely reactive oxygen species released by inflammatory neutrophils.

For the lung, experimental studies with rats, as well as molecular epidemiological studies in humans, have provided evidence that the influx of neutrophils into the airways may be an important process linking inflammation with carcinogenesis. Nevertheless, the mechanisms involved in inflammation (neutrophil) related carcinogenesis have only partly been elucidated. Carcinogenesis is a complicated multistep process and specifically in the initiation stage, genotoxic events are thought to play a crucial role. It is suggested that the genotoxic capacity of neutrophils may be a crucial etiological factor in this carcinogenic response. Neutrophils are a major source of oxidants in the inflamed lung, and the constant release of reactive oxygen species (ROS) by these cells provides a plausible mechanism by which inflammatory cells and pulmonary carcinogenesis might be related; ROS cause genetic alterations in the lung epithelium, which may induce/promote cancer development [3]. *In vitro* studies, using cocultures of activated neutrophils and target cells, indeed indicated oxidative DNA disturbances induced by neutrophils, which seems mainly driven by the release of hydrogen peroxide (H_2O_2). However, the major neutrophil derived oxidant is the myeloperoxidase (MPO) catalysed hypochlorous acid (HOCl) [4]. Interestingly, there is only limited data available on the potential role of this ROS in inflammation related carcinogenesis.

In addition to the direct genotoxic effects of ROS, neutrophils are also implicated in pulmonary genotoxicity *via* the promotion of metabolic activation of inhaled chemicals carcinogens, thereby generating highly DNA reactive and mutagenic compounds. The most relevant pathway by which neutrophils may enhance biological activation of chemical carcinogenesis is probably a MPO mediated peroxidative metabolism, activating carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), such as benzo[a]pyrene [5, 6]. In this way, MPO has been implicated in the pathogenesis of inflammation related carcinogenesis by epidemiological studies, with reference to the -463G→A polymorphism in the promoter region of the *MPO* gene, which is associated with a

reduced risk of lung cancer [7, 8]. Considering the role of MPO in the generation of HOCl, it could also be assumed that the possible protective effect of the -463A allele is mediated through a reduced production of HOCl.

Nevertheless, the causal role of neutrophils in ROS mediated DNA damage and mutagenesis is still primarily described by *in vitro* experiments. *In vivo* experiments, using experimental animals, have mainly provided indirect evidence implying that additional research is needed to further test the relation between neutrophils/MPO/HOCl and genotoxicity in the respiratory tract. The aim of the present thesis was to investigate the role of neutrophils in inflammation related carcinogenesis, focussing on three major pathways of neutrophil induced genotoxicity using both *in vitro* and *in vivo* models. In the first part of the thesis (**chapter 3**), we specifically focussed on mechanisms involved in primary genotoxicity induced by neutrophils and HOCl, whereas in **chapters 4 & 5,** a possible inhibitory effect of neutrophil derived HOCl on nucleotide excision repair is described, as an additional contribution of neutrophil derived oxidants to the genotoxic environment of lung inflammation. In the final **chapter 6**, a broader characterisation of the neutrophil induced effects in the mouse lung is presented by using gene expression profiling.

Genotoxic effects of neutrophils and HOCl

At this moment, it is generally accepted that the genotoxic capacity of neutrophils is at least partly attributable to the generation of DNA damaging and mutagenic ROS. In the past, the major focus was on H_2O_2 generated by neutrophils as being the presumed primary mediator of genotoxic effects, because it serves as a latent form of hydroxyl radical, the most reactive ROS towards DNA [9]. However, under physiological conditions, up to 70% of H_2O_2 is consumed by the neutrophil derived enzyme MPO to generate the strong oxidant HOCl [4], of which the genotoxic capacity is still unclear.

In **chapter 3**, the DNA damaging and mutagenic effects of HOCl on lung cells have been described. This study is the first to report that HOCl induces mutations in the *HPRT* gene of lung epithelial cells, suggesting an indirect genotoxic effect of HOCl by its attack on lipid and/or proteins producing malondialdehyde (MDA) and subsequent formation of 3-(2-Deoxy-*β*-D-*erythro*-pentofuranosyl)pyrimido[1,2-*α*]purin-10(3*H*)-one (M_1dG) adducts. An LPS induced acute lung inflammation mouse model, using depletion of circulating neutrophils, confirmed the link between pulmonary neutrophil influx, HOCl and formation of M_1dG adducts *in vivo*. Taken together, these data indicate that the MPO catalysed formation of HOCl during pulmonary inflammation should be considered as a significant source of neutrophil induced genotoxicity and possibly mutagenesis. These data support findings from recent molecular epidemiological studies, reporting a protective effect of a 463G→A polymorphism in the promoter region of the *MPO* gene on the lung cancer risk in smokers [7, 8]. However, as the in our studies used A549 cells present an adenomacarcinoma cell line and are in fact not a progenitor cell type, these may not be the ideal cells to explore genotoxic influ-

ence of HOCl relevant for tumour initiation. Therefore, further investigation of mutagenic effects of HOCl in primary lung epithelial cells may be more relevant for the initial genotoxic events that may occur during cancer development. While it is certainly possible that neutrophils are involved in the initiation events of pulmonary carcinogenesis, our data on HOCl induced genomic instability may also add to the known fact that neutrophil infiltration into tumours stimulates tumour progression [10].

DNA repair inhibition by neutrophils and HOCl

Although HOCl formation has been linked to induction of DNA damage, as described above, there is growing evidence that the protective effect of the A allele for lung cancer is predominantly observed in smokers, mainly suggesting an interaction between neutrophils, MPO and cigarette smoke constituents [11, 12]. The initial explanation for this association was sought in the role of MPO in the bioactivation of inhaled carcinogens. For example, MPO has been demonstrated to enhance the transformation of the prototype PAH benzo[a]pyrene into DNA binding metabolites (*e.g.* benzo[a]pyrene-diol-epoxide) [6, 13]. If these helix distorting DNA lesions escape from specific DNA repair (*i.e.* nucleotide excision repair (NER)), they may cause replication fork blocks, ultimately leading to mutagenesis and carcinogenesis [14].

As recent data have revealed that oxidising species, such as 4-hydroxynonenal [15], MDA [16] and nitric oxide [17], are endogenous inhibitors of NER and considering the potent protein oxidising effect of HOCl, the second hypothesis of the thesis focussed on the potential of HOCl to modulate DNA repair capacity in lung epithelial cells. **Chapter 4** demonstrated that neutrophils are potent inhibitors of NER in human pulmonary epithelial cells *in vitro, via* the MPO mediated generation of HOCl. A loss of function of NER enzymes, originating from direct HOCl induced oxidative attack on proteins, could only partly explain the NER inhibitory effects of HOCl on target cells, indicating that other mechanisms, like the formation of protein-DNA crosslinks [18], may be involved. Also the HOCl induced lipid peroxidation/protein oxidation product MDA, such as reported in chapter 3, has been shown to directly interact with repair enzymes [16], providing an additional possible mechanism for the observed HOCl induced NER inhibition. The relevance of this *in vitro* finding for DNA repair *in vivo* has been described in **chapter 5,** demonstrating an association between LPS induced pulmonary inflammation and reduced NER in the mouse lung. The effect of neutrophils was revealed by the use of an MPO knockout mouse model and the systemic depletion of circulating neutrophils with specific antibodies. However, in contrast to the *in vitro* findings, no distinct role of either MPO (and hence HOCl) or neutrophils was shown, suggesting that other factors are mediating inhibition of NER in the inflamed mouse lung. It is suggested that resident alveolar macrophages, by generating reactive nitrogen species (RNS), including nitric oxide, may be causing DNA repair inhibition [17].

Nonetheless, the results of chapter 4 & 5 together indicate an inflammation associated reduction of NER as a significant and previously unrecognised potential contri-

butory factor in the development of inflammation related pulmonary cancer. This effect may be most significant in subjects that are exposed to chemical carcinogens, for instance by chronic inhalation of cigarette smoke, and showing a concomitant pulmonary inflammatory response. NER is the most important repair pathway to remove large helix distorting DNA adducts that are produced following inhalation of such chemical carcinogens (*e.g.* PAH) [19, 20], and the formation of these promutagenic PAH-DNA adducts have been implicated as a causal process in lung cancer development in smokers [21]. As studies with NER deficient mice showed that effective DNA repair is crucial to prevent the carcinogenic effects of PAH induced DNA damage [22], it can be speculated that processes leading to suppression of the relevant DNA repair pathways may have a detrimental effect on the cancer susceptibility of individuals exposed to such chemicals. Epidemiological studies have indeed shown that polymorphisms in NER genes, leading to (hypothetically) decreased phenotypical NER capacity, are associated with increased risk of lung carcinogenesis [23, 24]. In a wider perspective, the present finding further supports the notion that (chronic) inflammation may be an important factor determining susceptibility to cancer following exposure to environmental chemicals, and could provide an additional explanation for the association between MPO polymorphisms and risk of pulmonary DNA adducts formation and carcinogenesis in PAH exposed subjects [25, 26].

Neutrophil induced inflammatory pathways and gene expression changes in the lung microenvironment

It should be realised, however, that induction of DNA damage and mutagenesis alone does not cause cancer and that neutrophils, for instance by generating an inflammatory prooxidant environment, may have an impact on the initiation and progression of carcinogenesis. In this way, the release of ROS by neutrophils is also believed to cause a cell proliferative response, which may contribute significantly to the carcinogenic response following chronic inflammation.

As gene expression changes usually occur in early stages of disease development, the expression of inflammation associated genes and the identification of pathways related to mechanisms of inflammation related carcinogenesis, is studied in **chapter 6**. However, no significant effect of neutrophils was observed on genes involved in carcinogenic processes, as most gene expression changes were related to immune and inflammation related processes providing more information on the central role of neutrophils in the inflammatory response. Nonetheless, these neutrophil associated profiles of the inflammatory response merit further attention, as they may increase susceptibility to inflammatory lung disease and may also impact on seemingly unrelated pathological conditions and perhaps cancer, regarding the involvement of inflammatory mediators (chemokines and cytokines) in cancer related inflammation. Another finding is the neutrophil induced upregulation of multiple genes involved in oxidative stress related biological processes and, moreover, a positive correlation between the neutrophil induced gene expression response and the promutagenic

DNA lesion M_1dG, as reported in chapter 3. Additionally, lung inflammation revealed neutrophil dependent upregulation of cell cycle progression related pathways, possibly referring to a higher cell turnover rate, suggesting that neutrophil influx is associated with a higher risk of accumulation and fixation of mutations. These results, in combination with the role of impaired DNA repair pathways as part of cancer ethiopathogenesis (chapter 4 & 5), provide a further confirmation for the link between inflammation and pulmonary genotoxicity and suggest that it is indeed the extent of the inflammatory response which could drive genetic instability in the genesis but also perpetuation of carcinogenesis.

Closing remarks

The emphasis of the present thesis was to investigate the role of neutrophils in inflammation related carcinogenesis. At present, there is accumulating *in vivo* evidence that neutrophils are an important factor in later stages of the carcinogenic process. PMN infiltration into tumours might stimulate tumour progression by contributing to genetic instability of the tumour cells through release of ROS [10]. In line with this, it has been shown that tumour growth can be inhibited by the elimination of circulating PMN [27]. However, experimental evidence on more upstream events on tumour initiation, such as DNA damage and mutagenesis, is limited. Additionally to *in vitro* coculture models, the use of an MPO knockout mouse model and the systemic depletion of circulating neutrophils with specific antibodies is a promising approach to further reveal the effect of neutrophils in animals acutely exposed to inflammatory agents. By using these models, this thesis described that MPO catalysed HOCl increases DNA damage and inhibits the repair of promutagenic bulky lesions, possibly inducing mutagenesis. However, it should be emphasised that genotoxicity only relates to DNA reactivity, which means that is essentially not the same as carcinogenicity. A major challenge would thus be to investigate if the *in vitro* HOCl induced mutagenesis, as discussed in this thesis, can be extrapolated to a neutrophil influx in the *in vivo* situation.

A following question that rises is whether the *in vitro* and *in vivo* mechanisms of inflammation related carcinogenesis and the role of neutrophils herein, as discussed in this thesis, can be extrapolated to humans. So far, it is still unclear whether neutrophils really cause ROS induced genotoxicity in the inflamed human respiratory tract. On the other hand, recent molecular epidemiological studies, in combination with experimental *in vitro* and *in vivo* studies, have provided consistent evidence that neutrophils and human pulmonary carcinogenesis might be causally related by the capacity of neutrophils, *via* the release of MPO, to promote biological activation of environmental carcinogens, like PAH, into DNA damaging metabolites [28]. Whereas data presented in this thesis extended these observations by showing that inflammatory neutrophils, *via* MPO catalysed HOCl, increase DNA lesions and inhibit the repair of such promutagenic DNA adducts, possibly inducing mutagenesis in target cells relevant for tumourigenic outcomes, still a lot of work needs to be done to provide deeper

insight in the implication of these processes in pulmonary carcinogenesis and formal proof that inflammation causes cancer is still required. Such knowledge may eventually lead to new approaches for inflammatory cancer prevention. Evidently, although the present study focussed on the lung, it needs to be emphasised that our findings may also be of importance for other organs where cancer development is associated with pre-existing neutrophilic inflammation.

References

1. Coussens, L.M. and Werb, Z. (2002) Inflammation and cancer. *Nature*, **420**, 860-867.
2. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. and Balkwill, F. (2008) Cancer-related inflammation. *Nature*, **454**, 436-444.
3. Weitzman, S.A. and Gordon, L.I. (1990) Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. *Blood*, **76**, 655-663.
4. Hampton, M.B., Kettle, A.J. and Winterbourn, C.C. (1998) Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, **92**, 3007-3017.
5. Kensler, T.W., Egner, P.A., Moore, K.G., Taffe, B.G., Twerdok, L.E. and Trush, M.A. (1987) Role of inflammatory cells in the metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons in mouse skin. *Toxicol Appl Pharmacol*, **90**, 337-346.
6. Mallet, W.G., Mosebrook, D.R. and Trush, M.A. (1991) Activation of (+-)-trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene to diolepoxides by human polymorphonuclear leukocytes or myeloperoxidase. *Carcinogenesis*, **12**, 521-524.
7. London, S.J., Lehman, T.A. and Taylor, J.A. (1997) Myeloperoxidase genetic polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Res*, **57**, 5001-5003.
8. Cascorbi, I., Henning, S., Brockmoller, J., Gephart, J., Meisel, C., Muller, J.M., Loddenkemper, R. and Roots, I. (2000) Substantially reduced risk of cancer of the aerodigestive tract in subjects with variant--463A of the myeloperoxidase gene. *Cancer Res*, **60**, 644-649.
9. Henle, E.S. and Linn, S. (1997) Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *J Biol Chem*, **272**, 19095-19098.
10. Soo, C.C., Haqqani, A.S., Hidiroglou, N., Swanson, J.E., Parker, R.S. and Birnboim, H.C. (2004) Dose-dependent effects of dietary alpha- and gamma-tocopherols on genetic instability in mouse Mutatect tumors. *J Natl Cancer Inst*, **96**, 796-800.
11. Schabath, M.B., Spitz, M.R., Zhang, X., Delclos, G.L. and Wu, X. (2000) Genetic variants of myeloperoxidase and lung cancer risk. *Carcinogenesis*, **21**, 1163-1166.
12. Schabath, M.B., Spitz, M.R., Hong, W.K., Delclos, G.L., Reynolds, W.F., Gunn, G.B., Whitehead, L.W. and Wu, X. (2002) A myeloperoxidase polymorphism associated with reduced risk of lung cancer. *Lung Cancer*, **37**, 35-40.
13. Petruska, J.M., Mosebrook, D.R., Jakab, G.J. and Trush, M.A. (1992) Myeloperoxidase-enhanced formation of (+-)-trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene-DNA adducts in lung tissue in vitro: a role of pulmonary inflammation in the bioactivation of a procarcinogen. *Carcinogenesis*, **13**, 1075-1081.
14. Luch, A. (2005) Nature and nurture - lessons from chemical carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*, **5**, 113-125.
15. Feng, Z., Hu, W. and Tang, M.S. (2004) Trans-4-hydroxy-2-nonenal inhibits nucleotide excision repair in human cells: a possible mechanism for lipid peroxidation-induced carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 8598-8602.
16. Feng, Z., Hu, W., Marnett, L.J. and Tang, M.S. (2006) Malondialdehyde, a major endogenous lipid peroxidation product, sensitizes human cells to UV- and BPDE-induced killing and mutagenesis through inhibition of nucleotide excision repair. *Mutat Res*, **601**, 125-136.
17. Chien, Y.H., Bau, D.T. and Jan, K.Y. (2004) Nitric oxide inhibits DNA-adduct excision in nucleotide excision repair. *Free Radic Biol Med*, **36**, 1011-1017.
18. Kulcharyk, P.A. and Heinecke, J.W. (2001) Hypochlorous acid produced by the myeloperoxidase system of human phagocytes induces covalent cross-links between DNA and protein. *Biochemistry*, **40**, 3648-3656.
19. Lindahl, T. and Wood, R.D. (1999) Quality control by DNA repair. *Science*, **286**, 1897-1905.
20. Gillet, L.C. and Scharer, O.D. (2006) Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem Rev*, **106**, 253-276.
21. Denissenko, M.F., Pao, A., Tang, M. and Pfeifer, G.P. (1996) Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science*, **274**, 430-432.

22. Ide, F., Iida, N., Nakatsuru, Y., Oda, H., Tanaka, K. and Ishikawa, T. (2000) Mice deficient in the nucleotide excision repair gene XPA have elevated sensitivity to benzo[a]pyrene induction of lung tumors. *Carcinogenesis*, **21**, 1263-1265.
23. Wu, X., Zhao, H., Wei, Q., Amos, C.I., Zhang, K., Guo, Z., Qiao, Y., Hong, W.K. and Spitz, M.R. (2003) XPA polymorphism associated with reduced lung cancer risk and a modulating effect on nucleotide excision repair capacity. *Carcinogenesis*, **24**, 505-509.
24. Zienolddiny, S., Campa, D., Lind, H., Ryberg, D., Skaug, V., Stangeland, L., Phillips, D.H., Canzian, F. and Haugen, A. (2006) Polymorphisms of DNA repair genes and risk of non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis*, **27**, 560-567.
25. Dally, H., Gassner, K., Jager, B., Schmezer, P., Spiegelhalder, B., Edler, L., Drings, P., Dienemann, H., Schulz, V., Kayser, K., Bartsch, H. and Risch, A. (2002) Myeloperoxidase (MPO) genotype and lung cancer histologic types: the MPO -463 A allele is associated with reduced risk for small cell lung cancer in smokers. *Int J Cancer*, **102**, 530-535.
26. Van Schooten, F.J., Boots, A.W., Knaapen, A.M., Godschalk, R.W., Maas, L.M., Borm, P.J., Drent, M. and Jacobs, J.A. (2004) Myeloperoxidase (MPO) -463G->A reduces MPO activity and DNA adduct levels in bronchoalveolar lavages of smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **13**, 828-833.
27. Pekarek, L.A., Starr, B.A., Toledano, A.Y. and Schreiber, H. (1995) Inhibition of tumor growth by elimination of granulocytes. *J Exp Med*, **181**, 435-440.
28. Knaapen, A.M., Gungor, N., Schins, R.P., Borm, P.J. and Van Schooten, F.J. (2006) Neutrophils and respiratory tract DNA damage and mutagenesis: a review. *Mutagenesis*, **21**, 225-236.

Samenvatting en algemene discussie

Ontsteking wordt beschouwd als een belangrijke factor bij de ontwikkeling van kanker [1]. Kanker en ontstekingen zijn met elkaar verbonden door twee pathways: de extrinsieke en de intrinsieke pathway. Bij sommige kankersoorten leidt een oncogene verandering tot een ontstoken micro-omgeving die de ontwikkeling van tumoren bevordert (extrinsieke pathway). Een dergelijke 'sluimerende' ontsteking in de micro-omgeving van de tumor heeft, ongeacht de oorsprong ervan, verschillende tumorbevorderende effecten. Het draagt bij tot de proliferatie en de overleving van kwaadaardige cellen en bevordert de angiogenese en de metastase. Bij andere kankersoorten daarentegen, bestaat er vóór de kwaadaardige ontwikkeling reeds een ontsteking die het risico op de ontwikkeling van kanker verhoogt (intrinsieke pathway). Deze twee pathways komen samen in de activering van transcriptiefactoren (voornamelijk NF-κB, STAT-3 en HIF1α) die de productie van inflammatoire mediatoren, zoals cytokines en chemokines, coördineren. Deze stoffen produceren en activeren op hun beurt inflammatoire cellen (*bijv*. neutrofielen) en dit volledige proces resulteert uiteindelijk in een ontsteking. De inflammatoire mediatoren en effectoren zijn belangrijke onderdelen van de tumormicro-omgeving [2]. Hoewel het verband tussen ontstekingen en kanker tegenwoordig algemeen aanvaard is, blijft het echter onduidelijk of een ontsteking alleen volstaat om kanker te ontwikkelen. In dit proefschrift ligt de nadruk op reactieve zuurstofradicalen, vrijgegeven door inflammatoire neutrofielen, als mogelijke endogene 'inflammatoire carcinogenen'.

Wat betreft de long, bewezen zowel experimentele onderzoeken op ratten, als moleculaire epidemiologische onderzoeken bij mensen dat de infiltratie van neutrofielen in de luchtwegen mogelijk een belangrijk proces is waardoor ontstekingen worden gekoppeld aan carcinogenese. Desondanks werden de betrokken mechanismen bij ontstekingsgerelateerde (neutrofiel-) carcinogenese slechts gedeeltelijk toegelicht. Carcinogenese is een complex, meerstaps proces waarin voornamelijk de genotoxische gebeurtenissen in de beginfase een zeer belangrijke rol te spelen. Met name de genotoxische capaciteit van neutrofielen blijkt hierin een cruciale etiologische factor te zijn. Neutrofielen vormen een zeer grote bron van oxidanten in de ontstoken long en de voortdurende afscheiding van reactieve zuurstofradicalen (ROS) vormt mogelijk de basis van de relatie tussen de inflammatoire cellen en de pulmonaire carcinogenese. ROS veroorzaken genetische wijzigingen in het longepitheel die kunnen leiden tot de ontwikkeling van kanker of deze kunnen bevorderen [3]. *In vitro* onderzoeken met coculturen van geactiveerde neutrofielen en doelcellen indiceerden inderdaad oxidatieve DNA-schade veroorzaakt door neutrofielen, hoofdzakelijk aangedreven door de afscheiding van waterstofperoxide (H_2O_2). De belangrijkste neutrofiel-afgeleide oxidant is echter myeloperoxidase (MPO-) gekatalyseerd waterstofhypochloriet (HOCl) [4]. Opvallend is dat er slechts een beperkt aantal gegevens beschikbaar is over de potentiële rol van deze oxidant in ontstekingsgerelateerde carcinogenese.

Naast de rechtstreekse genotoxische effecten van ROS, zijn neutrofielen ook betrokken bij de pulmonaire genotoxiciteit *via* de metabolische activering van geïnhaleerde chemische carcinogenen. Als gevolg daarvan worden zeer DNA-reactieve en mutagene samenstellingen geproduceerd. De meest relevante pathway via dewelke neutrofielen de biologische activering van chemische carcinogenen bevorderen is

waarschijnlijk een MPO-gemedieerd peroxidatief metabolisme dat carcinogene polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK), zoals benzo[a]pyreen, activeert [5, 6]. Aldus toonden epidemiologische onderzoeken aan dat MPO betrokken is bij de pathogenese van ontstekingsgerelateerde carcinogenese; het -463G→ polymorfisme in de promotorregio van het *MPO*-gen wordt geassocieerd met een verlaagd risico op longkanker [7, 8]. Rekening houdend met de rol van MPO bij de HOCl-productie kan ook worden verondersteld dat het mogelijke beschermende effect van het -463A-allel een gevolg is van een lagere productie van HOCl.

Desondanks wordt de causale rol van neutrofielen in door ROS-veroorzaakte DNA-schade en mutagenese voornamelijk beschreven door *in vitro* experimenten. *In vivo* experimenten op proefdieren leverden vooral indirecte bewijzen, vandaar dat bijkomende onderzoeken noodzakelijk zijn voor het verder bestuderen van de relatie tussen neutrofielen/MPO/HOCl en genotoxiciteit in de luchtwegen. Dit proefschrift heeft als doelstelling de rol van neutrofielen in ontstekingsgerelateerde carcinogenese te onderzoeken door gebruik te maken van zowel *in vitro* als *in vivo* modellen, met speciale aandacht voor de drie belangrijkste pathways van door neutrofiel veroorzaakte genotoxiteit. Het eerste onderdeel van het proefschrift (**hoofdstuk 3**) richt zich voornamelijk op de mechanismen betrokken bij de primaire genotoxiciteit veroorzaakt door neutrofielen en HOCl. **Hoofdstukken 4 & 5** behandelen het mogelijke remmende effect van neutrofiel-gederiveerd HOCl op nucleotide excisieherstel, wat mede bijdraagt tot de genotoxische omgeving van een longontsteking. In **hoofdstuk 6** wordt tot slot een bredere karakterisering van de neutrofiel-afgeleide effecten in de muizenlong geschetst door middel van genexpressieprofilering.

Genotoxische effecten van neutrofielen en HOCl

Op dit moment is het algemeen aanvaard dat de genotoxische capaciteit van neutrofielen tenminste gedeeltelijk is toe te schrijven aan de productie van DNA-beschadigende en mutagene ROS. In het verleden lag de klemtoon voornamelijk op door neutrofielen geproduceerd H_2O_2. Deze oxidant werd beschouwd als de voornaamste mediator van de genotoxische effecten, aangezien ze fungeert als een latente vorm van het hydroxylradicaal, de meest DNA-reactieve ROS [9]. Onder fysiologische omstandigheden wordt echter tot 70% van H_2O_2 verbruikt door het neutrofiel-afgeleide enzym MPO om zo de sterke oxidant HOCl [4] te kunnen produceren waarvan de genotoxische capaciteit nog steeds niet gekend is.

Hoofdstuk 3 beschrijft de DNA-beschadigende en mutagene effecten van HOCl op longcellen. Dit onderzoek toonde als eerste aan dat HOCl mutaties veroorzaakt in het *HPRT*-gen van longepitheelcellen en bijgevolg een indirect genotoxisch effect zou hebben door lipiden en/of proteïnen aan te vallen, waardoor malondialdehyde (MDA) en 3-(2-Deoxy-*β*-D-*erythro*-pentofuranosyl)pyrimido[1,2-*α*]purin-10(3*H*)-1 (M_1dG)-adducten worden gevormd. Dankzij depletie van circulerende neutrofielen slaagden we erin om in een muizenmodel met een LPS-geïnduceerde acute longontsteking het verband tussen de infiltratie van pulmonaire neutrofielen, HOCl en de vorming van

M_1dG-adducten *in vivo* aan te tonen. Al deze resultaten indiceren dat de MPO-gekatalyseerde vorming van HOCl tijdens een longontsteking dient te worden beschouwd als een belangrijke bron van neutrofiel-geïnduceerde genotoxiciteit en mogelijk mutagenese. De resultaten onderbouwen eveneens bevindingen uit recente moleculaire epidemiologische onderzoeken waarin het beschermende effect wordt beschreven van een 463G→A-polymorfisme van het MPO-gen op longkanker bij rokers [7, 8]. Aangezien de in ons onderzoek gebruikte A549-cellen adenomacarcinomacellen zijn en dus niet behoren tot het progenitorceltype, zijn ze mogelijk niet ideaal geschikt voor het onderzoeken van de genotoxische invloed van HOCl op het ontstaan van tumoren. Daarom is verder onderzoek naar de mutagene effecten van HOCl in primaire longepitheelcellen waarschijnlijk veel relevanter voor de initiële genotoxische effecten die mogelijk optreden tijdens de ontwikkeling van kanker. Hoewel de mogelijkheid zeker bestaat dat neutrofielen betrokken zijn bij de initiatiefase van pulmonaire carcinogenese, vormen onze gegevens over de HOCl-geïnduceerde genomische instabiliteit een toevoeging op het gekende feit dat de infiltratie van neutrofielen in tumoren de ontwikkeling van de tumor stimuleert [10].

Inhibitie van DNA-herstel door neutrofielen en HOCl

Hoewel de vorming van HOCl werd geassocieerd met de inductie van DNA-schade, zoals hierboven beschreven, zijn er steeds meer bewijzen dat het beschermende effect van het A-allel op longkanker hoofdzakelijk wordt geobserveerd in rokers, wat een interactie tussen neutrofielen, MPO en sigarettenrookcomponenten suggereert [11, 12]. De eerste verklaring voor dit verband werd gezocht in de rol van MPO in de bio-activering van geïnhaleerde carcinogenen. Zo werd bijvoorbeeld aangetoond dat MPO de transformatie van het prototype PAK benzo[a]pyreen in DNA-bindende metabolieten (*bijv*. benzo[a]pyreen-diol-epoxide) verhoogt [6, 13]. Als deze helixverstorende DNA-lesies ontglippen aan het specifieke DNA-herstel (*i.e.* nucleotide excisieherstel (NER)), blokkeren zij mogelijk de replicatievork, wat uiteindelijk resulteert in mutagenese en carcinogenese [14].

Aangezien recent onderzoek heeft aangetoond dat oxiderende stoffen, zoals 4-hydroxynonenal [15], MDA [16] en stikstofmonoxide [17], endogene remmers van NER zijn en gezien het mogelijke proteïne-oxiderende effect van HOCl, handelt de tweede hypothese van dit proefschrift voornamelijk over de capaciteit van HOCl om DNA-herstel in de longepitheelcellen te moduleren. In **hoofdstuk 4** toonden we in menselijke longepitheelcellen *in vitro* aan dat neutrofielen mogelijke NER-remmers zijn door de MPO-geïnduceerde productie van HOCl. De NER-remmende effecten van HOCl op doelcellen konden slechts gedeeltelijk worden verklaard door de verminderde werking van de NER-enzymen, veroorzaakt door een directe HOCl-geïnduceerde oxidatieve aanval op proteïnen. Waarschijnlijk zijn ook andere mechanismen, zoals de vorming van proteïne-DNA crosslinks, hierbij betrokken [18]. Er werd eveneens aangetoond dat het HOCl-geïnduceerde lipideperoxidatie-/proteïne-oxidatieproduct MDA, zoals beschreven in hoofdstuk 3, rechtstreeks reageert op

herstelenzymes [16] en aldus een bijkomend mogelijk mechanisme vormt voor de geobserveerde HOCl-geïnduceerde NER-inhibitie. De relevantie van deze *in vitro* bevinding voor DNA-herstel *in vivo* werd beschreven in **hoofdstuk 5**, waarin een verband tussen LPS-geïnduceerde pulmonaire ontsteking en verminderde NER in de muizenlong wordt onderbouwd. Het effect van neutrofielen werd toegelicht door het gebruik van een MPO-knockout-muizenmodel en de systemische depletie van circulerende neutrofielen met specifieke antilichamen. In tegenstelling tot de *in vitro* bevindingen, werd noch van MPO (en bijgevolg van HOCl), noch van neutrofielen een duidelijke rol bewezen, wat wijst op het feit dat andere factoren de inhibitie van NER tot stand brengen in de ontstoken muizenlong. We veronderstellen dat de residente alveolaire macrofagen mede aan de oorzaak liggen van de inhibitie van DNA-herstel [17] door het genereren van reactieve stikstofradicalen (RNS), waaronder stikstofmonoxide.

Niettemin duiden de resultaten van hoofdstuk 4 & 5 de ontstekingsgerelateerde reductie van NER aan als een belangrijke en niet eerder herkende potentiële medebepalende factor in de ontwikkeling van ontstekingsgerelateerde longkanker. Dit effect is wellicht het meest doorslaggevend bij personen blootgesteld aan chemische carcinogenen (*bijv*. PAK), bijvoorbeeld door chronische inhalatie van sigarettenrook. NER is de belangrijkste herstelpathway voor de verwijdering van grote helixverstorende DNA-adducten die worden geproduceerd na inhalatie van dergelijke chemische carcinogenen, zoals PAK [19, 20]. De vorming van zulke promutagene PAK-DNA-adducten werd beschouwd als een causaal proces in de ontwikkeling van longkanker bij rokers [21]. Aangezien uit studies met NER-deficiënte muizen is gebleken dat een efficiënt DNA-herstel van wezenlijk belang is voor het verhinderen van de carcinogene effecten van PAK-geïnduceerde DNA-schade [22], kan worden verondersteld dat de processen, die relevante DNA-herstelpathways onderdrukken, de personen die werden blootgesteld aan dergelijke chemische stoffen mogelijk vatbaarder maken voor kanker. Epidemiologische onderzoeken toonden inderdaad aan dat de polymorfismen in NER-genen, die leiden tot een (hypothetische) verminderde fenotypische NER-capaciteit, worden geassocieerd met een verhoogd risico op longkanker [23, 24]. Bekeken vanuit een breder perspectief, onderbouwt deze bevinding de theorie die zegt dat een (chronische) ontsteking een belangrijke factor kan zijn bij de bepaling van de vatbaarheid op kanker na blootstelling aan chemische stoffen uit de omgeving. Dit biedt eventueel een bijkomende verklaring voor het verband tussen MPO-polymorfismen en het risico op de vorming van pulmonaire DNA-adducten en carcinogenese in PAK blootgestelde mensen [25, 26].

Neutrofiel-geïnduceerde inflammatoire pathways en genexpressiewijzigingen in de micro-omgeving van de long

Er moet echter ook rekening mee worden gehouden dat de inductie van DNA-schade en mutagenese alleen niet aan de oorzaak ligt van kanker en dat neutrofielen, bijvoorbeeld door het generen van een inflammatoire pro-oxidantomgeving, een impact

kunnen hebben op de initiatie en de progressie van carcinogenese. De afscheiding van ROS door neutrofielen veroorzaakt mogelijkerwijs een celproliferatieve reactie, die een belangrijke bijdrage kan leveren aan de carcinogene respons volgend op een chronische ontsteking.

Aangezien genexpressiewijzigingen zich meestal voordoen tijdens de vroege ontwikkelingsstadia van een ziekte, werden de expressie van genen en de identificatie van pathways, betrokken bij ontstekingsgerelateerde carcinogenese, bestudeerd in hoofdstuk 6. Er werd echter geen significant effect van neutrofielen geobserveerd in genen die betrokken zijn bij carcinogene processen, omdat het merendeel van de expressiewijzigingen verband hield met immuun- en ontstekingsgerelateerde processen die verdere informatie bieden over de centrale rol van neutrofielen in de inflammatoire reactie. Desalniettemin verdienen deze neutrofiel-geassocieerde profielen van de inflammatoire respons verdere aandacht, aangezien zij de vatbaarheid op een inflammatoire longziekte kunnen verhogen en mogelijk ook een invloed hebben op ogenschijnlijke niet verwante pathologische omstandigheden en zelfs kanker. Een andere bevinding is de neutrofiel-veroorzaakte up-regulatie van meervoudige genen betrokken bij oxidatieve stressgerelateerde biologische processen. Bovendien werd er een positieve correlatie ontdekt tussen het neutrofiel-veroorzaakte genexpressieproces en de promutagene DNA-lesie M_1dG, zoals beschreven in hoofdstuk 3. Daarnaast bleek longontsteking ook geassocieerd met een neutrofiel-afhankelijke up-regulatie van celcyclusgerelateerde pathways, wat mogelijk wijst op een snellere celdeling. Dit alles doet vermoeden dat de infiltratie van neutrofielen zorgt voor een vermeerdering van en tevens versnelde fixatie van mutaties. Deze resultaten bevestigen nogmaals het verband tussen ontstekingen en pulmonaire genotoxiteit en suggereren dat de omvang van het inflammatoire proces inderdaad van wezenlijk belang is voor de genetische instabiliteit in carcinogenese.

Slot

In dit proefschrift lag de klemtoon op het onderzoeken van de rol van neutrofielen in ontstekingsgerelateerde carcinogenese. Tegenwoordig zijn er steeds meer in vivo bewijzen waaruit blijkt dat neutrofielen een belangrijke rol spelen in de latere stadia van het carcinogeneseproces. PMN-infiltratie in tumoren kan de ontwikkeling ervan stimuleren door de genetische instabiliteit van de tumorcellen te beïnvloeden via de afscheiding van ROS [10]. In het verlengde van deze bevinding werd aangetoond dat de tumorgroei kan worden verhinderd door eliminatie van de circulerende PMN [27]. Er is slechts beperkt experimenteel bewijs voor de rol van DNA-schade en mutagenese in de vroegste stadia van carcinogenese, met name de tumorinitiatie. Ter aanvulling van de *in vitro* co-cultuurmodellen, is het gebruik van een MPO-knockout muizenmodel en de systemische depletie van circulerende neutrofielen met specifieke antilichamen een veelbelovende aanpak om het effect van neutrofielen op dieren, die intens werden blootgesteld aan een inflammatoire agens, te verklaren. Door gebruik van deze modellen werd in dit proefschrift beschreven dat MPO-gekatalyseerd HOCl

de DNA-schade vergroot en het herstel van omvangrijke promutagene lesies verhindert en zo mogelijk de aanzet vormt tot mutagenese. Wat echter benadrukt dient te worden is dat genotoxiteit enkel refereert naar DNA-reactiviteit, wat in essentie niet hetzelfde is als carcinogeniteit. Het is bijgevolg een heel grote uitdaging om te onderzoeken of *in vitro* HOCl-veroorzaakte mutagenese, zoals besproken in dit proefschrift, kan worden geëxtrapoleerd naar een neutrofielinfiltratie *in vivo*.

Het volgende vraagteken dat ontstaat is of de *in vitro* en *in vivo* mechanismen van ontstekingsgerelateerde carcinogenese en de rol van neutrofielen hierin, zoals beschreven in dit proefschrift, kunnen worden geëxtrapoleerd naar mensen. Tot dusver blijft het nog steeds onzeker of neutrofielen daadwerkelijk ROS-geïnduceerde genotoxiteit veroorzaken in de ontstoken menselijke luchtwegen. Anderzijds hebben recente moleculaire epidemiologische onderzoeken, in combinatie met experimentele *in vitro* en *in vivo* onderzoeken, consistente bewijzen aangevoerd waaruit blijkt dat neutrofielen en menselijke pulmonaire carcinogenese mogelijk causaal gerelateerd zijn doordat neutrofielen, via de afscheiding van MPO, de biologische activering van omgevingscarcinogenen, zoals PAK, tot DNA-beschadigende metabolieten [28] stimuleren. Dit proefschrift toont nader aan dat inflammatoire neutrofielen, *via* MPO-gekatalyseerd HOCl, de DNA-lesies vermeerderen en het herstel van dergelijke DNA-adducten verhinderen, en aldus mogelijk leiden tot mutagenese in doelcellen met tumorverwekkende gevolgen. Toch dient er nog veel aandacht te worden besteed aan het uitdiepen van deze processen in pulmonaire carcinogenese, alsook aan het bieden van een definitief uitsluitsel dat ontstekingen inderdaad kanker veroorzaken. Dergelijke kennis kan uiteindelijk leiden tot nieuwe benaderingen voor de preventie van inflammatoire kanker. Hoewel deze studie zich beperkte tot de longen, spreekt het voor zich dat onze bevindingen ook van groot belang kunnen zijn voor andere organen waarin de ontwikkeling van kanker wordt geassocieerd met een vooraf bestaande (neutrofiel-) ontsteking.