

Nutritional modulation of DNA repair

Citation for published version (APA):

Langie, S. A. S. (2008). *Nutritional modulation of DNA repair*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20081217sl>

Document status and date:

Published: 01/01/2008

DOI:

[10.26481/dis.20081217sl](https://doi.org/10.26481/dis.20081217sl)

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.

Samenvatting en Algemene Discussie

Alle levende organismen worden blootgesteld aan een waaier van potentieel schadelijke stoffen, die voortkomen uit het milieu, de voeding of zelfs uit endogene processen. Deze stoffen kunnen het cellulaire DNA beschadigen en wanneer zulke beschadigingen niet hersteld worden, kunnen deze laesies uiteindelijk leiden tot het ontstaan van mutaties. Mutaties kunnen op hun beurt resulteren in afwijkingen in de expressie van genen en het functioneren van de genproducten, welke kunnen leiden tot de initiatie van ziektes zoals kanker. Ondanks dat DNA schade iedere dag met relatief hoge frequenties optreden in ons lichaam, is het optreden van mutaties in vergelijking laag. Dit is te danken aan de brede variatie aan DNA herstel mechanismen die een organisme bezit om de integriteit van zijn genoom te waarborgen. Mede daardoor spelen DNA herstel processen een belangrijke rol in de preventie van kanker. Zo beschikt ook de mens over verschillende processen om het beschadigde DNA te herstellen; waaronder het nucleotide excisie herstel (NER) en base excisie herstel (BER) [1,2].

Aangezien DNA herstel één van de processen is om de initiatie van kanker als gevolg van DNA schade te voorkomen, kan het meten ervan gezien worden als een relevante biomarker bij het bepalen van individuele kanker risico's. Voor het zover is, moet er echter eerst informatie vergaard worden over de intra- en inter-individuele variaties in DNA herstel capaciteiten binnen een gezonde humane populatie. Deze fenotypische variaties worden gedeeltelijk veroorzaakt door zogenaamde genetische polymorfismen in DNA herstel genen, die kunnen leiden tot significante verschillen in de synthese en activiteit van de herstel enzymen. Daarnaast, zijn er nog andere factoren zoals exogene en endogene stoffen die het DNA herstel kunnen beïnvloeden. Vooral de modulatie van DNA herstel door voeding en voedingscomponenten zou verder onderzocht moeten worden, omdat dit mogelijkheden kan bieden voor effectieve preventie van kanker. Verder, suggereren zowel *in vitro* als *in vivo* studies dat de DNA herstel capaciteit door de redox status van de cel beïnvloedt kan worden, door onder andere de expressie van essentiële herstel enzymen te verhogen of verlagen. Aangezien de cellulaire redox status kan veranderen naarmate er meer of minder pro-oxidanten en anti-oxidanten aanwezig zijn in de voeding, was het doel van de huidige thesis om te bestuderen of men door modulatie van de redox status door middel van voedingsinterventies, de NER capaciteit kan verbeteren. Om deze invloed van voedingsfactoren op de NER capaciteit te kunnen bepalen, zijn er echter eerst simpele en betrouwbare technieken nodig die gebruikt kunnen worden om NER capaciteiten van mensen te bepalen.

In het verleden werden reeds verschillende methoden ontwikkeld die inderdaad DNA herstel kunnen bepalen. Deze technieken waren voornamelijk gebaseerd op de behandeling van cellen met schadelijke stoffen, waarna de verwijdering van deze schade over de tijd geregistreerd werd [beschreven in **Hoofdstuk 1**]. De grootste beperking van zulke toepassingen is dat ze tijdrovend zijn, verse cellen vereisen of cellen die speciaal behandeld moeten worden om overleving na invriezen te verzekeren. Alternatieve methoden zijn o.a. de “*in vitro* repair assays”, die afhankelijk zijn van de incubatie van een eiwit-extract uit cellen met een DNA substraat dat specifieke laesies bevat. Deze technieken zijn over het algemeen gevoeliger en meer geschikt voor het bepalen van DNA herstel in bevroren bloedmonsters, zoals ingevroren humane lymfocyten. Recentelijk, werd er door Collins *et al.* een “*in vitro* repair assays” ontwikkeld op basis van de zogenaamde “single-cell gel electrophoresis (comet) assay”, om de fenotypische BER capaciteit te kunnen meten [3]. Deze alternatieve methode meet de capaciteit van humane lymfocyt extracten om de initiële stappen van BER; namelijk de schade herkenning en incisie, op DNA substraten met 8-oxoguanine laesies uit te voeren. Echter, tot op heden waren er voor zover ons bekend slechts enkele comet-gebaseerde methoden beschikbaar die NER kunnen meten. Nochtans, zijn verscheidene humane kankers direct gerelateerd met blootstelling aan chemicaliën zoals polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK), die hun kankerverwekkende werking uitoefenen door de vorming van DNA addukten, welke voornamelijk verwijderd worden door NER. Daarom werd er een gemodificeerde comet assay ontwikkeld, zoals beschreven in **Hoofdstuk 2** van deze thesis, om inter-individuele verschillen in nucleotide excisie herstel te kunnen bepalen. In deze nieuwe “repair assay” bestaat het DNA substraat uit nucleïds opgenomen in een gel, die blootgesteld werden aan (\pm)-*anti*-benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide (BPDE), om BPDE-DNA addukten te induceren. Deze BPDE-DNA addukten zijn een bekend substraat voor het NER proces en bij incubatie van deze beschadigde nucleïds met cel extracten, zullen de herstel enzymen in deze extracten de eerste stappen van NER kunnen uitvoeren; namelijk de DNA schade herkenning en incisie. Als gevolg hiervan zullen er enkelstrengs DNA breuken ontstaan, die vervolgens na electroforese gevisualiseerd kunnen worden in de vorm van een staart aan de nucleïd. De lengte van deze staart en de hoeveelheid DNA dat zich erin bevindt is een maat voor de hoeveelheid breuken dat gevormd is en geeft een indicatie over de DNA herstel capaciteit van het cel extract (zie Figuur 1 van Hoofdstuk 2). Extracten van XPA^{-/-} en XPC^{-/-} fibroblasten, die deficiënt zijn voor de proteïnen vereist voor de initiële stappen van NER, werden gebruikt om deze assay te valideren. Humane lymfocyt extracten vertoonden ~8-voudige verschillen in hun

DNA herstel capaciteit, wat bleek te correleren met de verwijdering van BPDE-DNA addukten in dezelfde lymfocyten over een periode van 48 uur zoals bepaald met ³²P-postlabeling. Gelijkaardige verschillen werden waargenomen in humane lymfocyten door Gaivao *et al.*, welke een alternatieve *in vitro* NER assay toepaste die gebruik maakt van nucleoïd-DNA dat UV-geïnduceerde laesies bevat [4]. Dit zijn relatief grote variaties in NER capaciteiten in vergelijking met de inter-individuele ~4-voudige verschillen die gerapporteerd werden voor BER [4]. Opmerkelijk is dat bepaalde gezonde individuen zelfs een relatief lage NER capaciteit bleken te hebben, zoals gemeten werd met de comet-gebaseerde “*in vitro* repair assays”. Dit zou kunnen leiden tot een opstapeling van DNA schades na blootstelling aan genotoxische stoffen en vervolgens resulteren in een verhoogd risico op mutaties en kanker. Anderzijds, kan een lagere NER capaciteit ook het gevolg zijn van een geringe behoefte aan herstel door de afwezigheid van DNA-laesies, aangezien DNA schade de NER enzymen direct kan activeren *via* feedback controle mechanismen. Vandaar dat het belangrijk is om de DNA herstel capaciteit steeds in combinatie met de blootstelling te bepalen (bv. door het gebruik van blootstellings biomarkers), zodat er betrouwbare voorspellingen gedaan kunnen worden over de gevoeligheid van een individu om kanker te ontwikkelen. Desondanks kan men suggereren dat een verslechtering van het DNA herstel proces zal leiden tot een verhoogd risico op ziektes zoals kanker. Algemeen gezien, is deze nieuw ontwikkelde methode betrouwbaar, reproduceerbaar en kan gebruikt worden voor verse en bevroren lymfocyten, waardoor deze methode goed toepasbaar is in moleculair epidemiologische studies.

Onze *in vitro* NER assay werd vervolgens toegepast in een *in vitro* studie, als een eerste stap om de invloed van voedingsfactoren op het DNA herstel te onderzoeken. Een lage inname van bepaalde nutriënten kan een effect hebben op het DNA herstel [5], maar de moleculaire mechanismen waarlangs de voeding dit proces kan moduleren zijn nog steeds onduidelijk. Eén van de mogelijke mechanismen verloopt *via* de vorming van vrije radicalen, zoals reactieve zuurstof species (RZS). Anti-oxidanten uit de voeding kunnen RZS, die betrokken zijn bij de initiatie en de promotie van kankerontwikkeling [6,7], wegvangen; RZS zouden anders de herstel mechanismen kunnen remmen. *In vitro* en *in vivo* studies hebben inderdaad gerapporteerd dat een balans tussen oxidanten en anti-oxidanten van belang is voor het goed functioneren van het DNA herstel, inclusief NER [8,9]. Het doel van het *in vitro* onderzoek, zoals beschreven in **Hoofdstuk 3**, was er daarom op gericht om verder inzicht te verkrijgen in de relatie tussen oxidatieve stress en NER, zowel op het niveau van transcriptie als het daadwerkelijk functioneren van de betrokken proteïnen.

Teneinde de intracellulaire redox status te moduleren, werd gebruik gemaakt van niet-cytotoxische doses van waterstofperoxide (H_2O_2) en/ of van D,L-buthione-S,R-sulfoximine (BSO) om de natuurlijke cellulaire antioxidant glutathion (GSH) te depletieren. Om het effect van oxidatieve stress op de genexpressie te bestuderen, werden er specifieke genen geselecteerd die coderen voor NER proteïnen welke specifiek betrokken zijn bij de DNA schade herkenning en incisie (de stappen die ook gemeten worden in onze *in vitro* NER assay). De expressie van de meerderheid van de geselecteerde NER genen was verhoogd na blootstelling aan H_2O_2 . Een mogelijke verklaring hiervoor is dat verscheidene genen die betrokken zijn bij de cellulaire verdediging, gecontroleerd worden door redox-gevoelige transcriptie factoren zoals AP-1. Desondanks, was de expressie van het DNA herstel gerelateerde gen *ERCC1*, waarvan gerapporteerd wordt dat het ook een AP-1 bindingssequentie in zijn promotor gebied bezit, significant verlaagd door H_2O_2 . Echter, Fratelli *et al.* toonden aan dat de expressie van de AP-1 subunits, Fos en FosB, niet geïnduceerd werd door blootstelling aan H_2O_2 alleen, maar sterk geïnduceerd was in GSH gedepleteerde cellen [10]. Het herstellen van de *ERCC1* expressie, zoals werd gezien in onze studie in de GSH gedepleteerde cellen die blootgesteld waren aan H_2O_2 , zou dus gedeeltelijk verklaard kunnen worden door de activatie van deze transcriptie factor. Deze bevindingen suggereren dat GSH een signalisatie rol heeft in de redox-gereguleerde genexpressie van NER genen. Verdere studies zijn echter vereist om deze resultaten te verifiëren en de onderliggende mechanismen te begrijpen.

Aangezien de meerderheid van de gerelateerde NER genen een verhoogde expressie vertoonden na blootstelling aan H_2O_2 , werd er ook een verhoging van de fenotypische NER capaciteit verwacht. De blootstelling aan H_2O_2 resulteerde echter in een acute inhibitie van de NER capaciteit, wat significant correleerde met de *ERCC1* gen expressie ($R^2=0.85$, $p<0.01$). De geobserveerde inhibitie van NER door H_2O_2 in onze studie, kwam overeen met bevindingen van Hu *et al.* [8]. Andere studies, die onze data verder onderbouwen, toonden aan dat lipide peroxidatie producten (bv. 4-hydroxynonenal, malondialdehyde) potente inhibitoren kunnen zijn van NER, hoogst waarschijnlijk als gevolg van directe oxidatieve aanval en inactivatie van NER proteïnen [11-13]. Bovendien, werden onze *in vitro* bevindingen van **Hoofdstuk 3** bevestigd door een daaropvolgende *in vivo* studie, die beschreven wordt in **Hoofdstuk 4**. In pasgeboren biggen werd oxidatieve stress geïnduceerd door ze bloot te stellen aan ijzer. Oxidatieve stress werd vervolgens geregistreerd als verhoogde niveaus van 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) in het DNA van de colon en in de urine. De stijging in oxidatieve stress resulteerde in een verlaging van de NER capaciteit in de colon weefsels met maar liefst 70%. Aangezien anti-oxidanten de redox status kunnen

moduleren door het wegvangen van RZS en lipide peroxidatie producten, werd er gesteld dat het remmende effect van de oxidatieve stress op het DNA herstel, gecompenseerd kon worden door suppletie met anti-oxidant rijke voeding. De suppletie van de moeder zeugen met een anti-oxidant verrijkte voeding bleek in deze *in vivo* studie inderdaad de oxidatieve stress-geïnduceerde daling in NER capaciteit, in de colon van hun nageslacht, gedeeltelijk te compenseren. De fenotypische NER capaciteit was significant minder gereduceerd door de oxidatieve stress in de gesupplementeerde groep dan in de niet-gesupplementeerde dieren (30% gereduceerd in plaats van 70%). Voedings-interventies kunnen het nucleotide excisie herstel proces, dat zorgt voor het behoud van de genomstabiliteit, dus beschermen tegen de oxidatieve stress-geïnduceerde schadelijke effecten.

Gebaseerd op onze voorgaande bevindingen, werd verondersteld dat een verhoogde inname van anti-oxidanten *via* de voeding de NER capaciteit van een individu zou kunnen verhogen. Aangezien zogenaamde “single nucleotide polymorfismen” (SNPs) in DNA herstel genen ook een belangrijke invloed kunnen hebben op de gemeten DNA herstel capaciteit, kan het effect van de interventie met anti-oxidanten afhankelijk zijn van de genetische achtergrond van een individu. Bijgevolg, beschrijft **Hoofdstuk 5** van deze thesis een humane interventie studie waarin de effecten van verhoogde anti-oxidant inname, van genetische polymorfismen in NER genen, en van mogelijke interacties tussen beide factoren op de fenotypische NER capaciteit onderzocht worden. Van 168 gezonde vrijwilligers, die 1L blauwe bessen/appel sap per dag consumeerden gedurende 4 weken, werd voor en na de interventie bloed verzameld. Al de proefpersonen werden eerst gegenotypeerd voor 11 SNPs in NER-gerelateerde genen, door middel van een Multiplex PCR amplificatie gevolgd door een “single base extension” (SBE) gebaseerde methode die speciaal voor deze studie opgezet werd. Op basis van de genotype frequenties, werd een subpopulatie van 36 gezonde vrijwilliger geselecteerd voor de fenotypische bepaling van de NER capaciteit. Aangezien we eerder een significante correlatie tussen de NER capaciteit en de *ERCC1* genexpressie waargenomen hadden [**Hoofdstuk 3**] en omdat andere studies ook positieve correlaties van de DNA herstel capaciteit met *ERCC1* expressie rapporteerden [14-16], vond deze selectie plaats op basis van de *ERCC1* genotypes. Echter, in de interventie studie zoals beschreven in **Hoofdstuk 5**, werden geen significante associaties tussen de *ERCC1* polymorfismen en de NER capaciteit gevonden. Ook andere studies rapporteerden dat een relatie tussen *ERCC1* polymorfismen en de NER capaciteit niet gevonden kon worden [17,18] en de functionele relevantie van SNPs in het *ERCC1* gen blijven dus onduidelijk. Het veel voorkomende

genetische polymorfisme *XPA-A23G* vertoonde wel significante correlaties met de NER capaciteit in onze humane interventie studie; dragers van het GG genotype vertoonden een ~3-keer hogere NER capaciteit in vergelijking met de homozygote wild-type en heterozygote proefpersonen. Aangezien deze associatie niet beïnvloed werd door de voedingsinterventie, blijkt het *XPA-A23G* polymorfisme een goede voorspeller te zijn van de NER capaciteit, zoals bepaald met onze *in vitro* NER assay. Verder, werd het effect van de vier weken durende interventie met het anti-oxidant rijke blauwe bessen/appel sap op de NER capaciteit geëvalueerd en de eventuele genotype-voedingsinteracties bestudeerd. Ondanks dat de interventie eerder efficiënt bevonden was in het verhogen van de anti-oxidant capaciteit en het reduceren van *ex vivo* geïnduceerde oxidatieve schade [19,20], zagen wij in onze studie over het algemeen geen effect van de voedingsinterventie op de NER capaciteit [Hoofdstuk 5]. Echter, dragers van variante/risico allelen voor *XPC-K939Q* en *RAD23B-A249V* bleken wel baat te hebben bij de interventie. Zij vertoonden verhoogde NER capaciteiten na de interventie, wat niet geobserveerd werd in hun homozygote wild-type tegenhangers. Bijgevolg, ondersteunen onze resultaten de hypothese dat genetische polymorfismen de fenotypische DNA herstel capaciteit kunnen beïnvloeden en dat dit verder gemoduleerd kan worden door de voeding. Het effect van de voeding blijkt hierin echter een kleinere rol te spelen dan de effecten van genetische variatie.

Een reductie in de DNA herstel capaciteit tijdens ziekten die gepaard gaan met oxidatieve stress, kan bijdragen tot het ontstaan van mutaties en kanker. Bijvoorbeeld chronische inflammatoire long ziekten, zoals sarcoidosis, fibrosis en chronische obstructieve pulmonaire ziekte (COPD), worden gekarakteriseerd door de influx van polymorfe neutrofielen (PMNs) die hoge concentraties RZS produceren [21,22], wat vervolgens de balans tussen oxidanten en anti-oxidanten verstoort. Van deze PMNs werd aangetoond dat zij potente inhibitoren zijn van NER in humane long epitheel cellen [23]. Deze bevindingen vormen een mogelijke additionele biologische verklaring voor de associatie tussen inflammatie en long kanker. In zulke situaties van chronische oxidatieve stress, kan minder efficiënt DNA herstel leiden tot het achter blijven en opstapellen van DNA laesies, die mogelijk de voortgang van de replicatie-vork kunnen blokkeren. Om het instorten van de DNA replicatie-vork en de daarop volgende vorming van dubbel strengs DNA breuken te vermeiden, beschikken cellen over DNA schade tolerantie (DDT) mechanismen die instaat zijn de laesie te omzeilen en de replicatie voor te zetten [24,25]. In eukaryoten zijn er twee DDT mechanismen bekend; namelijk het DNA schade omzeilingmechanisme en de translaesie synthese (TLS). Het laatst genoemde mechanisme wordt met name uitgevoerd

door de onbetrouwbare translaesie polymerasen (bv. Pol η , Pol κ , Pol ζ) die de gebruikelijke replicatie DNA polymerasen (Pol δ or Pol ϵ) tijdelijk vervangen en op die manier een nucleotide inbouwen tegenover de laesie. Of de juiste of onjuiste base wordt ingebouwd is afhankelijk van de betrokken TLS polymerase en het type van DNA schade. Aangezien TLS polymerasen direct de beschadigde streng kopiëren, gaat dat vaak gepaard met fouten en kunnen er mutaties ontstaan die op hun beurt weer bijdragen tot het ontstaan van kanker. In tegenstelling tot TLS, gebruikt het DNA schade omzeilingmechanisme de informatie van de onbeschadigde zuster streng en passeert op die manier de laesie op een foutloze manier. Ondanks het feit dat de opeenvolgende stappen in dit mechanisme nog onduidelijk zijn, wordt er gesuggereerd dat het gepaard gaat met zogenaamde “template switching” en dat het kenmerken deelt met het homologe recombinatie systeem. Verder hebben studies in gist aangetoond dat het modifieren van “proliferating cell nuclear antigen” (PCNA) met lysine 63-gelinkte poly-ubiquitine ketens, het passeren van DNA laesies bevordert en dat dit proces mede bepaald of de schade wordt omzeild door het foutloze omzeilingmechanisme of door het fouten inducerende TLS [26-28]. In **Hoofdstuk 6** hebben we aangetoond dat PCNA, na blootstelling aan benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide (BPDE), ook poly-ubiquitinatie ondergaat in humane lung epitheel cellen (A549 cellen). Verstoring van de vorming van deze lysine 63-gelinkte poly-ubiquitine ketens bleek de mutageniteit van BPDE te verhogen, wat hoogst waarschijnlijk te wijten was aan de verhoogde rekrutering van de TLS polymerase Pol η . Eerdere studies suggereerden dat Pol η de belangrijkste polymerase is die verantwoordelijk is voor de mutageniteit van BPDE-DNA addukten, doordat het voornamelijk adenosine inbouwt tegenover BPDE- N^2 -dG laesies en zo G \rightarrow T transversies veroorzaakt [29]. Ook in onze studie, werd Pol η na blootstelling aan BPDE in verhoogde mate gerekruteerd en geco-lokaliseerd met PCNA, wat voornamelijk (74%) resulteerde in G \rightarrow T mutaties. Verder kan gesuggereerd worden dat lysine 63-gelinkte poly-ubiquitinatie van PCNA een belangrijk proces is in de bescherming van humane cellen tegen BPDE-geïnduceerde mutageniteit, door het DNA schade tolerantie systeem in de richting van het foutloze omzeilingmechanisme te sturen. Daarom kan worden verondersteld dat de vorming van deze specifieke poly-ubiquitine ketens een algemene vereiste is voor de fysiologische bescherming tegen het ontstaan van mutaties en kanker na blootstelling aan stoffen die DNA leasies veroorzaken, die in staat zijn de replicatievork te stoppen.

Conclusie

De huidige thesis bestudeert de effecten van oxidanten en anti-oxidanten op de activiteit van het nucleotide excisie DNA herstel systeem (NER). Over het algemeen kan gesteld worden dat NER gereguleerd kan worden door de intracellulaire redox status en dat een anti-oxidant rijke voeding de effecten van oxidatieve stress op NER kan compenseren. Ondanks dat er tot op heden slechts een klein aantal studies zijn verricht die de invloed van voeding en voedingscomponenten op het DNA herstel hebben bestudeerd, ondersteunen de resultaten van deze en onze studies de hypothese dat de samenstelling van de voeding een belangrijke invloed kan hebben op de DNA herstel capaciteit van een organisme, en dan met name bij organismen/organen die blootgesteld worden aan verhoogde niveaus van oxidatieve stress. Aangezien er gesuggereerd wordt dat de beschermende effecten van onze dagelijkse voeding eerder te wijten zijn aan de combinatie van verscheidene stoffen dan aan slechts enkele voedingscomponenten, en gezien de cruciale rol van het DNA herstel bij ziektes en de algemene gezondheid van de mens, zijn extra studies naar de modulatie van het DNA herstel door voedingsmengsels dringend nodig. Ook is er verder onderzoek vereist om de moleculaire mechanismen achter de effecten van de voeding op het DNA herstel verder te onthullen en te bestuderen of genetische factoren de manier en mate van de fenotypische response beïnvloeden.

Naast DNA herstel processen, dragen de DNA schade tolerantie mechanismen bij aan de stabiliteit van het genoom en de bescherming tegen chemische carcinogenese. Veranderingen in het ubiquitinatie proces of in de genen die dit proces controleren, zouden dus de gevoeligheid van individuen voor mutagenen en carcinogenen vanuit het milieu kunnen beïnvloeden. Zo hebben verschillende studies gerapporteerd dat het ubiquitinatie proces kan worden geremd via de omkeerbare oxidatie van functionele thiol-groepen in ubiquitine-conjugatie enzymen [30-32]. De modulatie van de redox status door voedingsfactoren zou dus ook belangrijke gevolgen kunnen hebben voor het goed functioneren van de enzymen die betrokken zijn bij de lysine 63-gelinkte poly-ubiquitinatie van PCNA, wat nodig is om achtergebleven DNA laesies te omzeilen. Het zou een grote uitdaging zijn om na te gaan of anti-oxidanten uit de voeding ook het ubiquitinatie proces dat betrokken is bij de tolerantie van DNA schade kan beschermen tegen de schadelijke effecten van oxidatieve stress.

Als we uiteindelijk alle resultaten zoals beschreven in deze thesis zouden samenvatten, kan er geconcludeerd worden dat de nieuwe "*in vitro* repair assay" een betrouwbare, gevoelige en deels gevalideerde techniek is, die gebruikt kan

worden voor het fenotyperen van de NER capaciteit. Het is een zeer nuttige toepassing, waarmee we de rol van het DNA herstel in de ontwikkeling van kanker verder kunnen bestuderen en waardoor antwoorden geleverd zullen worden op belangrijke onderzoeksvragen met betrekking tot veranderingen in DNA herstel en de algemene gezondheid van de mens. De resultaten zoals beschreven in deze thesis, leveren mogelijkheden voor nieuwe toepassingen van het meten van DNA herstel, als een biomarker van gevoeligheid in moleculaire epidemiologische studies. Het analyseren van fenotypische biomarkers in parallel met genetische gevoeligheidsmarkers belooft waardevolle informatie op te leveren over relevante genotype-fenotype interacties. Deze informatie kan op zijn beurt nuttig zijn bij het identificeren van gevoelige subpopulaties die baat kunnen hebben bij specifieke voedingsinterventies. Echter, verdere en grotere studies naar het gecombineerde effect van genetische polymorfismen en voedingsfactoren op de fenotypische DNA herstel capaciteit, vereisen productievere en minder arbeidsintensieve technieken. De ontwikkeling hiervan zou dan ook de eerste prioriteit moeten krijgen om de vooruitgang van dit onderzoeksveld te garanderen.

References

1. Hansen W. K. and Kelley M. R. Review of mammalian DNA repair and translational implications. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;295:1-9.
2. Friedberg E. C. DNA damage and repair. *Nature* 2003;421:436-440.
3. Collins A. R., Dusinska M., Horvathova E., Munro E., Savio M. and Stetina R. Inter-individual differences in repair of DNA base oxidation, measured in vitro with the comet assay. *Mutagenesis* 2001;16:297-301.
4. Gaivao I., Piasek A., Brevik A., Shaposhnikov S. and Collins A. R. Comet assay-based methods for measuring DNA repair in vitro; estimates of inter- and intra-individual variation. *Cell Biol Toxicol* 2007.
5. Tyson J. and Mathers J. C. Dietary and genetic modulation of DNA repair in healthy human adults. *Proc Nutr Soc* 2007;66:42-51.
6. Cross C. E., Halliwell B., Borish E. T., Pryor W. A., Ames B. N., Saul R. L., McCord J. M. and Harman D. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987;107:526-545.
7. Cerutti P. A. Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 1985;227:375-381.
8. Hu J. J., Dubin N., Kurland D., Ma B. L. and Roush G. C. The effects of hydrogen peroxide on DNA repair activities. *Mutat Res* 1995;336:193-201.
9. Topinka J., Binkova B., Sram R. J. and Fojtikova I. DNA-repair capacity and lipid peroxidation in chronic alcoholics. *Mutat Res* 1991;263:133-136.
10. Fratelli M., Goodwin L. O., Orom U. A., Lombardi S., Tonelli R., Mengozzi M. and Ghezzi P. Gene expression profiling reveals a signaling role of glutathione in redox regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:13998-14003.
11. Feng Z., Hu W. and Tang M. S. 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* 2004;101:8598-8602.
12. Feng Z., Hu W., Marnett L. J. and Tang M. S. 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* 2006;601:125-136.
13. Hiramatsu K., Ogino T., Ozaki M. and Okada S. Monochloramine inhibits ultraviolet B-induced p53 activation and DNA repair response in human fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 2006;1763:188-196.
14. Dabholkar M. D., Berger M. S., Vionnet J. A., Ekwuagu C., Silber J. R., Yu J. J. and Reed E. Malignant and nonmalignant brain tissues differ in their messenger RNA expression patterns for ERCC1 and ERCC2. *Cancer Res* 1995;55:1261-1266.
15. Vogel U., Dybdahl M., Frentz G. and Nexø B. A. DNA repair capacity: inconsistency between effect of over-expression of five NER genes and the correlation to mRNA levels in primary lymphocytes. *Mutat Res* 2000;461:197-210.
16. Wei Q., Xu X., Cheng L., Legerski R. J. and Ali-Osman F. Simultaneous amplification of four DNA repair genes and beta-actin in human lymphocytes by multiplex reverse transcriptase-PCR. *Cancer Res* 1995;55:5025-5029.
17. Zhou W., Liu G., Park S., Wang Z., Wain J. C., Lynch T. J., Su L. and Christiani D. C. Gene-smoking interaction associations for the ERCC1 polymorphisms in the risk of lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:491-496.
18. Zienolddiny S., Campa D., Lind H., Ryberg D., Skaug V., Stangeland L., Phillips D. H., Canzian F. and Haugen A. Polymorphisms of DNA repair genes and risk of non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis* 2006;27:560-567.
19. Wilms L. C., Hollman P. C., Boots A. W. and Kleinjans J. C. Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes. *Mutat Res* 2005;582:155-162.
20. Wilms L. C., Boots A. W., de Boer V. C., Maas L. M., Pachen D. M., Gottschalk R. W., Ketelslegers H. B., Godschalk R. W., Haenen G. R., van Schooten F. J. and Kleinjans J. C. Impact of multiple genetic polymorphisms on effects of a 4-week blueberry juice

- intervention on ex vivo induced lymphocytic DNA damage in human volunteers. *Carcinogenesis* 2007;28:1800-1806.
21. Hunninghake G. W., Gadek J. E., Lawley T. J. and Crystal R. G. Mechanisms of neutrophil accumulation in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 1981;68:259-269.
 22. Noguera A., Batle S., Miralles C., Iglesias J., Busquets X., MacNee W. and Agusti A. G. Enhanced neutrophil response in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2001;56:432-437.
 23. Gungor N., Godschalk R. W., Pachen D. M., Van Schooten F. J. and Knaapen A. M. Activated neutrophils inhibit nucleotide excision repair in human pulmonary epithelial cells: role of myeloperoxidase. *Faseb J* 2007;21:2359-2367.
 24. Broomfield S., Hryciw T. and Xiao W. DNA postreplication repair and mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 2001;486:167-184.
 25. Wang Z. DNA damage-induced mutagenesis : a novel target for cancer prevention. *Mol Interv* 2001;1:269-281.
 26. Hoegge C., Pfander B., Moldovan G. L., Pyrowolakakis G. and Jentsch S. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 2002;419:135-141.
 27. Hofmann R. M. and Pickart C. M. Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell* 1999;96:645-653.
 28. Spence J., Sadis S., Haas A. L. and Finley D. A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol Cell Biol* 1995;15:1265-1273.
 29. Zhang Y., Wu X., Guo D., Rechkoblit O., Geacintov N. E. and Wang Z. Two-step error-prone bypass of the (+)- and (-)-trans-anti-BPDE-N2-dG adducts by human DNA polymerases eta and kappa. *Mutat Res* 2002;510:23-35.
 30. Jahngen-Hodge J., Obin M. S., Gong X., Shang F., Nowell T. R., Jr., Gong J., Abasi H., Blumberg J. and Taylor A. Regulation of ubiquitin-conjugating enzymes by glutathione following oxidative stress. *J Biol Chem* 1997;272:28218-28226.
 31. Obin M., Shang F., Gong X., Handelman G., Blumberg J. and Taylor A. Redox regulation of ubiquitin-conjugating enzymes: mechanistic insights using the thiol-specific oxidant diamide. *Faseb J* 1998;12:561-569.
 32. Berlett B. S. and Stadtman E. R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997;272:20313-20316.

Summary and General Discussion

All living organisms are daily exposed to a variety of potentially harmful agents that originate from the environment, diet or even endogenous processes, which can damage cellular DNA. If damages to DNA remain unrepaired, these lesions may ultimately result in mutations that can lead to aberrant expression or function of gene products and subsequent initiation of diseases like cancer. Although, DNA damages occur in our body at relatively high frequencies each day, the incidence of mutations is in comparison low, which is due to the wide range of DNA repair mechanisms that organisms possess to maintain the integrity of their genome. Thus, DNA repair processes play a crucial role in the prevention of carcinogenesis. Humans possess several routes to repair damaged DNA, including nucleotide excision repair (NER) and base excision repair (BER) [1,2].

Since DNA repair is one of the steps that can intervene between DNA damage and the onset of carcinogenesis, it might be a relevant biomarker in the assessment of individual cancer risks. However, we first needed to gather more information on the intra- and inter-individual variations in DNA repair capacity in a healthy human population. These phenotypic variations are partly due to polymorphisms in DNA repair genes that may result in significant differences in repair enzyme synthesis or activity. Furthermore, other factors like exposure to environmental carcinogens or endogenous agents can have a major influence on DNA repair. Especially the modulation of DNA repair by nutrition and dietary compounds should be investigated. Moreover, *in vitro* as well as *in vivo* studies suggest that modulation of the redox status may alter DNA repair capacity, involving up- or down-regulation of enzymes that play a role in repair processes. Since the cellular redox status can be modulated by pro-oxidants and dietary antioxidants, the aim of the present thesis was to investigate the effect of nutritional redox modulation on the phenotypic NER capacity. In order to investigate the impact of nutritional factors on the NER capacity simple and reliable approaches to phenotypically assess NER in samples from population studies are needed.

Several approaches to determine DNA repair have been described in the past, which are largely based on treatment of live cells with damaging agents and subsequent monitoring of damage removal in time [described in **Chapter 1**]. The major limitation of such assays is that they are time-consuming and require freshly isolated cells or cells that need to be handled in such a way that their survival after cryopreservation is assured. Alternative approaches are the *in vitro* repair assays that depend on the incubation of a cell extract with a DNA substrate containing specific lesions. These methods are generally more

sensitive and suitable for detecting DNA repair responses in frozen samples, such as human lymphocytes. Recently, Collins *et al.* developed such an *in vitro* repair assay based on the single-cell gel electrophoresis (comet) assay, to measure phenotypical differences in BER [3]. This alternative approach measures the capacity of human lymphocyte extracts to perform the initial steps of BER, i.e. damage recognition and incision, on DNA substrates carrying 8-oxoguanine lesions. However, up to now there were to the best of our knowledge only a few comet-based assays to measure NER. Still, many human cancers are directly related to exposure to environmental chemicals like polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) that exert their carcinogenic action through formation of bulky-DNA adducts which are generally removed by NER. Therefore, a modified comet assay was developed to phenotypically assess inter-individual differences in nucleotide excision repair capacities, as described in **Chapter 2** of this thesis. In this repair assay the DNA substrate consist of gel-embedded nucleoids that were treated with (\pm)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide (BPDE) after cell lysis to induce BPDE-DNA adducts, which are a known substrate for NER. Incubation of these substrate nucleoids with cell extracts will allow the initial steps of NER to occur, i.e. damage recognition and incision, resulting in single strand breaks that can be detected by the comet assay. The rate at which breaks accumulate is indicative for the DNA repair capacity in the cell extracts (see Figure 1 of Chapter 2). Extracts from XPA^{-/-} and XPC^{-/-} fibroblasts (deficient in the proteins needed for the initial steps of NER) were used to validate this assay. Furthermore, human lymphocyte extracts showed significant variations in their DNA repair capacity, which seemed to correlate with the removal of bulky DNA lesions in the same cells over a period of 48 hours determined by ³²P-postlabeling. Inter-individual variations in NER capacity measured by our assay were in the range of ~8-fold. Similar variations of ~10-fold were observed in human lymphocytes by Gaivao *et al.*, conducting an alternative *in vitro* NER assay that uses nucleoid DNA containing UV-induced lesions [4]. These are relatively wide variations in NER capacity compared with inter-individual variations for BER that were reported to be approximately ~4-fold [4]. Notably, some individuals even appear to have negligible NER capacity as measured by comet-based *in vitro* repair assays, which might lead to an accumulation of DNA lesions after exposure to genotoxic agents, and a subsequent increased risk of mutations and cancer development. However, on the other hand, a lower NER capacity might also reflect the absence of lesions, because DNA damage can activate NER proteins directly via feedback control mechanisms. It is therefore necessary to assess DNA repair activity in combination with exposure (for example by using biomarkers of exposure) to be able to make reliable predictions

on cancer susceptibility and risk. Nonetheless, it can be considered that impairment of DNA repair processes will lead to increased risks of pathological diseases like cancer. Overall, this newly developed assay is reliable, reproducible and can be used on frozen or freshly isolated lymphocytes, indicating its applicability in molecular epidemiological studies.

Our NER assay was first applied in an *in vitro* study as an attempt to investigate the influence of dietary factors on DNA repair. Although, there is some evidence that low intake of certain nutrients may affect DNA repair (reviewed in [5]), the molecular mechanisms through which diet can modulate this process are still unclear. One of the possible mechanisms is the modulation of the cellular redox status by dietary compounds, which can affect DNA repair processes. The formation of free radicals, like reactive oxygen species (ROS), is known to decrease the cellular redox status, leading to a state of oxidative stress. On the other hand, dietary antioxidants may prevent/reduce oxidative stress through the scavenging of ROS or by stimulating endogenous defences. Furthermore, previous investigations have shown the involvement of free radicals in both the initiation and promotion of carcinogenesis [6,7], and *in vitro* as well as *in vivo* studies have reported the importance of a balance between oxidants and antioxidants for the proper functioning of DNA repair, including NER [8,9]. Therefore, the aim of the *in vitro* study that is described in **Chapter 3** was to obtain further insight in the relation between oxidative stress and nucleotide excision repair, both at the transcription and protein level. To modify the intracellular oxidative stress, we used non-cytotoxic doses of hydrogen peroxide (H_2O_2) and D,L-buthione-S,R-sulfoximine (BSO) to deplete the cellular antioxidant glutathione (GSH). To study the effect of oxidative stress on gene expression, we specifically selected genes that encode NER proteins involved in the recognition and incision steps of the repair process, because these phases are reflected in our NER capacity assay. The expression of most of the selected NER-related genes was up-regulated upon exposure to H_2O_2 . This could be due to the fact that expression of many genes involved in cellular defence is controlled by redox-sensitive transcription factors such as AP-1. However, the expression of *ERCC1*, which was also reported to have an AP-1 binding sequence in the promoter region, was significantly down-regulated by H_2O_2 . Though, Fratelli *et al.* showed that the expression of the AP-1 subunits, Fos and FosB, was not induced by H_2O_2 alone, but was strongly induced in GSH depleted cells [10]. Therefore, the restoration of *ERCC1* expression that was seen in our study in GSH depleted cells exposed to H_2O_2 may partly be explained by activation of this transcription factor. These findings suggest that GSH has a signalling role in the redox-regulated gene expression of NER genes, but further

studies are needed to verify these results and to understand the underlying molecular mechanisms.

Since most of the selected NER genes showed an increased expression upon exposure to H₂O₂, NER capacity as measured by our repair assay was expected to increase as well. However, an acute inhibition of NER capacity was seen after exposure to H₂O₂, which significantly correlated with the *ERCC1* gene expression ($R^2=0.85$, $p<0.01$). The observed inhibition of NER by H₂O₂ in our study, was in line with research from Hu *et al.* [8]. Further support for these observations comes from studies showing that lipid peroxidation products (e.g. 4-hydroxynonenal, malondialdehyde) can be potent inhibitors of NER, most likely by direct oxidative attack and inactivation of NER proteins [11-13]. Moreover, our *in vitro* observations in **Chapter 3** were confirmed in a subsequent *in vivo* study that is described in **Chapter 4**. Iron-induced oxidative stress in newborn piglets, monitored as increased levels of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) in colon tissue DNA and in urine, lead to a 70% reduction of the NER capacity. Since dietary antioxidants can modulate the redox status by acting as scavengers of ROS and lipid peroxidation products, we proposed that the inhibiting effects of oxidative stress on DNA repair could be compensated for by antioxidant rich supplementation. Indeed, in this *in vivo* study, supplementation of mother sows with an antioxidant enriched diet seemed to partly compensate the oxidative stress-induced reduction of the NER capacity in colon tissues of their offspring. The phenotypic NER capacity was significantly less reduced by oxidative stress in the supplemented group compared to the unsupplemented animals (reduced with 30% in stead of 70%, respectively). Thus, dietary interventions could guard against the oxidative stress-induced deleterious effects by protecting nucleotide excision repair processes that maintain the integrity of the genome.

Therefore, based on our previous observations, we speculated that enhanced intake of antioxidants may be a candidate to improve NER in humans as well, possibly in combination with single nucleotide polymorphisms (SNPs) in repair genes that were also found to have an influence on DNA repair capacities. Therefore, **Chapter 5** of this thesis describes a human intervention study in which the effects of dietary antioxidant intake, genetic polymorphisms in NER genes, and possible interactions between both on the phenotypically assessed NER capacity were investigated. Samples from 168 healthy volunteers consuming 1L blueberry/apple juice per day were collected before and after a four week intervention period. All subjects were genotyped for 11 SNPs in NER related genes, using Multiplex PCR amplification plus a single base extension (SBE) based method, which was developed at our laboratory for this particular

study. Based on the resulting genotype frequencies, a subpopulation of 36 healthy volunteers was selected for the phenotypical assessment of NER. Since, we previously observed a significant correlation between NER capacity and *ERCC1* gene expression [Chapter 3] and because other studies also reported a positive correlation between repair capacity and *ERCC1* expression [14-16], the selection of subjects occurred according to their *ERCC1* genotype. However, in the intervention study depicted in Chapter 5, we did not observe any significant associations of the studied *ERCC1* polymorphisms and the NER capacity. Since, inconsistent results have been reported before in scientific literature [17,18], the functional relevance of SNPs in *ERCC1* remains unclear. The common genetic polymorphism *XPA-A23G* did show significant correlations with the NER capacity in our human intervention study, with carriers of the *XPA-GG* genotype showing a ~3-fold higher NER capacity compared to homozygous wild-type and heterozygous subjects. Since these associations were not affected by the dietary intervention, *XPA-A23G* seems to be a good predictor for the NER capacity as assessed by our *in vitro* NER assay. Furthermore, the effect of the four week intervention with antioxidant rich blueberry/apple juice on the phenotypic NER capacity was evaluated and possible genotype-diet interactions were studied. Although, this intervention was found to be efficient in enhancing antioxidant defence and reducing *ex vivo* induced oxidative DNA damages [19,20], we did not observe a general effect of the dietary intervention on the NER capacity [Chapter 5]. However, carriers of variant/risk alleles of *XPC-K939Q* and *RAD23B-A249V* seemed to benefit from the intervention, showing increased NER capacities after the intervention, which was not observed in their homozygous wild-type counterparts. As such, our results support the hypothesis that genetic polymorphisms significantly affect the phenotypic DNA repair capacity, which can be further modulated by diet. However, the effect of diet seems to play a minor role as compared to the effects of genetic variation.

Although, the underlying mechanisms still remain unclear, a reduction in repair capacity during diseases involving oxidative stress might contribute to mutagenesis and carcinogenesis. For instance, chronic lung inflammatory diseases, such as sarcoidosis, fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease (COPD), are characterized by the influx of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) that produce and release ROS [21,22], leading to a chronic imbalance between oxidants and antioxidants. These PMNs have been demonstrated to be potent inhibitors of NER in human pulmonary epithelial cells, providing a possible biological explanation for the association between inflammation and lung cancer development [23]. Though, in such situations of chronic oxidative stress, less efficient repair can lead to persistence and

accumulation of DNA lesions, which might block the progression of the replication fork. To avoid collapsing of the DNA replication fork and subsequent formation of double strand breaks upon such a blockage, cells possess DNA damage tolerance (DDT) systems to circumvent the damage and continue replication in the presence of lesions [24,25]. There are two known DDT pathways in eukaryotes, namely the damage avoidance pathway and translesion synthesis (TLS). The later comprises low fidelity translesion polymerases (e.g. Pol η , Pol κ , Pol ζ) that replace the replicative DNA polymerase (Pol δ or Pol ϵ), incorporating the correct or incorrect nucleotide opposite the lesion, depending on the involved TLS polymerase and the type of DNA damage. Since TLS polymerases directly copy the damaged DNA template, often in an error-prone way, it can cause mutations and contribute to carcinogenesis. In contrast to TLS, the damage avoidance pathway uses the information of the undamaged sister duplex at the replication fork, bypassing the lesion in an error-free way. Although its mechanism is yet unclear, it is suggested to involve template switching and might share some features with homologous recombination. Studies in yeast have shown that modification of the polymerase clamp proliferating cell nuclear antigen (PCNA) with lysine 63-linked poly-ubiquitin chains promotes the bypass of DNA lesions and determines if the bypass occurs via the error-free damage avoidance pathway or the error-prone TLS [26-28]. In **Chapter 6** we show that PCNA is also poly-ubiquitinated in human pulmonary epithelial cells (A549 cells) upon exposure to benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide (BPDE) and that disruption of this lysine 63-linked poly-ubiquitin chain formation enhances BPDE-induced mutagenicity, likely involving increased recruitment of the TLS polymerase Pol η . Previous reports have suggested that Pol η is the main polymerase responsible for the mutagenicity of BPDE-DNA adducts by predominantly inserting an adenosine opposite the BPDE- N^2 -dG lesion, causing the characteristic G \rightarrow T transversions [29]. Indeed in our study, the recruitment and co-localization of Pol η with PCNA was enhanced upon exposure to BPDE, leading predominantly (74%) to G \rightarrow T mutations. As such, we suggest that lysine 63-linked poly-ubiquitination of PCNA is an important process to protect mammalian cells against BPDE-induced mutagenicity, directing DDT mechanisms into the error-free damage avoidance pathway. Therefore, we imply that the formation of these specific poly-ubiquitin chains as a general requirement for physiological protection against mutagenesis and chemical carcinogenesis in mammalian cells.

Concluding remarks

The emphasis of the present thesis was on the modulation of DNA repair by pro-oxidants and dietary antioxidants. Overall, it is clear that NER can be regulated by the intracellular redox status and that an antioxidant rich diet can compensate for the oxidative stress-induced effects on NER capacity, but larger studies with more subjects are needed. Although, only a small number of studies have assessed the influence of diet and dietary compounds on DNA repair processes so far, the results from our studies support the hypothesis that dietary compounds and whole foods may have an important influence on an individual's DNA repair capacity, especially in subjects that are exposed to high levels of oxidative stress. Since the protective effects of an individual's diet are suggested to be mainly the result of the combined effects of various bioactive compounds within whole foods rather than the effect of a single compound and considering the crucial role of DNA repair in human health and disease, additional investigations on the modulation of DNA repair by complex dietary mixtures is required. Extended research is also needed to further elucidate the molecular mechanisms underlying the effects of dietary compounds on DNA repair and whether genetic factors influence the direction and magnitude of the phenotypic response.

Next to DNA repair processes, DNA damage tolerance mechanisms, involving ubiquitination, guard against chemical carcinogenesis by preventing mutagenesis and thus contributing to genomic stability. As such, alterations in ubiquitination and the genes that control this process may influence the susceptibility of individuals to environmental mutagens and carcinogens. For instance, studies have reported that oxidative stress can modulate the ubiquitination process via reversible S thiolation/dethiolation of ubiquitin-conjugating enzymes [30-32]. Consequently, modulation of the redox status by dietary factors could have major consequences on the proper functioning of enzymes involved in lysine 63-linked poly-ubiquitination of PCNA, which may lead to the inefficient bypass of persisting lesions. A major challenge would thus be to investigate if dietary antioxidants can protect the ubiquitination process that is involved in damage tolerance against the deleterious effects of oxidative stress. Therefore, additional studies are needed to further elucidate the mechanism and modulating factors of damage tolerance pathways in humans, and to appreciate their role in cancer development upon exposure to environmental agents.

When summarising the results as described in this thesis, it can be concluded that the newly developed *in vitro* repair assay is a reliable, sensitive and thoroughly validated method for the phenotypic assessment of the NER capacity. It provides a powerful tool to further substantiate the role of DNA repair in the development of cancer and to provide answers to important research questions on DNA repair

and human health. The results presented in this thesis may open doors for new applications of DNA repair measurements as a biomarker of susceptibility in molecular epidemiological studies. Analysing phenotypic biomarkers in parallel with genetic susceptibility markers, promises to yield valuable information on genotype-phenotype interactions, which may in turn be helpful in the identification of susceptible subpopulations and individuals that may benefit from specific dietary interventions. However, further and larger studies into the joint effect of genetic polymorphisms and dietary factors on the phenotypic DNA repair capacity require high throughput, less-labour intensive methods and development of these technologies should be prioritized in order to improve progression in this research area.

References

1. Hansen W. K. and Kelley M. R. Review of mammalian DNA repair and translational implications. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;295:1-9.
2. Friedberg E. C. DNA damage and repair. *Nature* 2003;421:436-440.
3. Collins A. R., Dusinska M., Horvathova E., Munro E., Savio M. and Stetina R. Inter-individual differences in repair of DNA base oxidation, measured in vitro with the comet assay. *Mutagenesis* 2001;16:297-301.
4. Gaivao I., Piasek A., Brevik A., Shaposhnikov S. and Collins A. R. Comet assay-based methods for measuring DNA repair in vitro; estimates of inter- and intra-individual variation. *Cell Biol Toxicol* 2007.
5. Tyson J. and Mathers J. C. Dietary and genetic modulation of DNA repair in healthy human adults. *Proc Nutr Soc* 2007;66:42-51.
6. Cross C. E., Halliwell B., Borish E. T., Pryor W. A., Ames B. N., Saul R. L., McCord J. M. and Harman D. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987;107:526-545.
7. Cerutti P. A. Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 1985;227:375-381.
8. Hu J. J., Dubin N., Kurland D., Ma B. L. and Roush G. C. The effects of hydrogen peroxide on DNA repair activities. *Mutat Res* 1995;336:193-201.
9. Topinka J., Binkova B., Sram R. J. and Fojtikova I. DNA-repair capacity and lipid peroxidation in chronic alcoholics. *Mutat Res* 1991;263:133-136.
10. Fratelli M., Goodwin L. O., Orom U. A., Lombardi S., Tonelli R., Mengozzi M. and Ghezzi P. Gene expression profiling reveals a signaling role of glutathione in redox regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:13998-14003.
11. Feng Z., Hu W. and Tang M. S. 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* 2004;101:8598-8602.
12. Feng Z., Hu W., Marnett L. J. and Tang M. S. 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* 2006;601:125-136.
13. Hiramatsu K., Ogino T., Ozaki M. and Okada S. Monochloramine inhibits ultraviolet B-induced p53 activation and DNA repair response in human fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 2006;1763:188-196.
14. Dabholkar M. D., Berger M. S., Vionnet J. A., Ekwuagu C., Silber J. R., Yu J. J. and Reed E. Malignant and nonmalignant brain tissues differ in their messenger RNA expression patterns for ERCC1 and ERCC2. *Cancer Res* 1995;55:1261-1266.
15. Vogel U., Dybdahl M., Frentz G. and Nexø B. A. DNA repair capacity: inconsistency between effect of over-expression of five NER genes and the correlation to mRNA levels in primary lymphocytes. *Mutat Res* 2000;461:197-210.
16. Wei Q., Xu X., Cheng L., Legerski R. J. and Ali-Osman F. Simultaneous amplification of four DNA repair genes and beta-actin in human lymphocytes by multiplex reverse transcriptase-PCR. *Cancer Res* 1995;55:5025-5029.
17. Zhou W., Liu G., Park S., Wang Z., Wain J. C., Lynch T. J., Su L. and Christiani D. C. Gene-smoking interaction associations for the ERCC1 polymorphisms in the risk of lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:491-496.
18. Zienolddiny S., Campa D., Lind H., Ryberg D., Skaug V., Stangeland L., Phillips D. H., Canzian F. and Haugen A. Polymorphisms of DNA repair genes and risk of non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis* 2006;27:560-567.
19. Wilms L. C., Hollman P. C., Boots A. W. and Kleinjans J. C. Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes. *Mutat Res* 2005;582:155-162.
20. Wilms L. C., Boots A. W., de Boer V. C., Maas L. M., Pachen D. M., Gottschalk R. W., Ketelslegers H. B., Godschalk R. W., Haenen G. R., van Schooten F. J. and Kleinjans J. C. Impact of multiple genetic polymorphisms on effects of a 4-week blueberry juice

- intervention on ex vivo induced lymphocytic DNA damage in human volunteers. *Carcinogenesis* 2007;28:1800-1806.
21. Hunninghake G. W., Gadek J. E., Lawley T. J. and Crystal R. G. Mechanisms of neutrophil accumulation in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 1981;68:259-269.
 22. Noguera A., Batle S., Miralles C., Iglesias J., Busquets X., MacNee W. and Agusti A. G. Enhanced neutrophil response in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2001;56:432-437.
 23. Gungor N., Godschalk R. W., Pachen D. M., Van Schooten F. J. and Knaapen A. M. Activated neutrophils inhibit nucleotide excision repair in human pulmonary epithelial cells: role of myeloperoxidase. *Faseb J* 2007;21:2359-2367.
 24. Broomfield S., Hryciw T. and Xiao W. DNA postreplication repair and mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 2001;486:167-184.
 25. Wang Z. DNA damage-induced mutagenesis : a novel target for cancer prevention. *Mol Interv* 2001;1:269-281.
 26. Hoegge C., Pfander B., Moldovan G. L., Pyrowolakis G. and Jentsch S. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 2002;419:135-141.
 27. Hofmann R. M. and Pickart C. M. Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell* 1999;96:645-653.
 28. Spence J., Sadis S., Haas A. L. and Finley D. A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol Cell Biol* 1995;15:1265-1273.
 29. Zhang Y., Wu X., Guo D., Rechkoblit O., Geacintov N. E. and Wang Z. Two-step error-prone bypass of the (+)- and (-)-trans-anti-BPDE-N2-dG adducts by human DNA polymerases eta and kappa. *Mutat Res* 2002;510:23-35.
 30. Jahngen-Hodge J., Obin M. S., Gong X., Shang F., Nowell T. R., Jr., Gong J., Abasi H., Blumberg J. and Taylor A. Regulation of ubiquitin-conjugating enzymes by glutathione following oxidative stress. *J Biol Chem* 1997;272:28218-28226.
 31. Obin M., Shang F., Gong X., Handelman G., Blumberg J. and Taylor A. Redox regulation of ubiquitin-conjugating enzymes: mechanistic insights using the thiol-specific oxidant diamide. *Faseb J* 1998;12:561-569.
 32. Berlett B. S. and Stadtman E. R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997;272:20313-20316.