

Polycyclic aromatic hydrocarbon induced effects on gene expression in relation to carcinogenic potency

Citation for published version (APA):

Staal, Y. C. (2007). *Polycyclic aromatic hydrocarbon induced effects on gene expression in relation to carcinogenic potency*. Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20070412ys>

Document status and date:

Published: 01/01/2007

DOI:

[10.26481/dis.20070412ys](https://doi.org/10.26481/dis.20070412ys)

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.

9

Samenvatting en algemene discussie



Dit proefschrift beschrijft het onderzoek naar de veranderingen in genexpressie door polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAKs) in relatie tot hun verschillen in kankerverwekkend vermogen. Omdat de mens dagelijks blootgesteld wordt aan PAKs, is het van belang om de risico's van blootstelling aan PAKs te kunnen inschatten. Van PAKs met verschillende kankerverwekkend vermogen kan verwacht worden dat ze ook zullen verschillen in de genexpressie profielen die ze induceren in cellen en organen. Daarom heeft dit onderzoek als doel om door middel van genexpressie profilering inzicht te verkrijgen in PAK-geïnduceerde effecten, wat uiteindelijk een basis zou kunnen leggen voor verbetering van de huidige risicoschatting procedures voor PAKs die in de buitenlucht veel voorkomen.

Een nieuwe methode voor het labelen van monsters voor de microarray

Allereerst hebben we een methode ontwikkeld die het mogelijk maakt om drie of vier in plaats van twee RNA-monsters tegelijk te hybridiseren op microarrays. Het labelen van RNA-monsters met vier fluorforen was ontwikkeld voor de cDNA arrays, maar voor een ander platform met zelfgemaakte oligonucleotide arrays konden slechts drie fluorforen gebruikt worden. Deze nieuwe methode is toegepast in het onderzoek beschreven in de hoofdstukken 3, 4, 6 en 7. De methode vermindert niet alleen de kosten en benodigde tijd, maar reduceert ook de technische variatie voor microarray data.

***In vitro* studies**

Het onderzoek beschreven in de hoofdstukken 3 en 4 heeft als doel om de mogelijkheden van genexpressie profilering voor gebruik in kankerrisicoanalyse verkennen. Daarnaast wordt inzicht verkregen in de mechanismen van kankerverwekkend vermogen en de biologische processen van PAK-blootstelling die van belang zijn bij de ontwikkeling van kanker. Hiervoor zijn genexpressie verandering en DNA-adductvorming in de humane hepatoma cellijn HepG2 en in ratten lever coupes bestudeerd; dit wordt beschreven in respectievelijk de hoofdstukken 3 en 4. Genexpressie veranderingen bleken gerelateerd aan DNA-adductvorming, capaciteit tot binding aan de Ah-receptor en kankerverwekkend vermogen. Alhoewel op basis van genexpressie profielen in HepG2 cellen de zes PAKs (benzo[a]pyrene (B[a]P), benzo[b]fluoranthene (B[b]F), fluoranthene (FA), dibenzo[a,h]anthracene (DB[a,h]A), dibenzo[a,l]pyrene (DB[a,l]P) en 1-methylphenanthrene (1-MPA)) konden worden geclassificeerd naar kankerverwekkend vermogen, kon een perfecte classificatie voor deze PAKs niet worden bereikt voor de lever coupes. In dit model werd DB[a,l]P, die het meest kankerverwekkend is, geclassificeerd als een laag kankerverwekkende PAK. Dit kan mogelijk verklaard worden door de relatief lage inductie van *CYP1A1* in vergelijking met de andere kankerverwekkende PAKs in lever coupes, welke een belangrijk aspect lijkt te zijn voor correcte classificatie. DB[a,l]P induceerde de expressie van *CYP1A1* in HepG2 cellen wel.

Om meer inzicht te verkrijgen in de mogelijke biologische gevolgen en de betrokken mechanismen, is met behulp van GenMAPP inzicht verkregen in de oververtegenwoordiging van biologische processen in de sets van veranderde genen. Analyse van de significant veranderde genen met GenMAPP liet zien dat verschillende processen overlappen in HepG2 cellen en in lever coupes. Apoptose, cholesterol biosynthese en vetzuursynthese werden beïnvloed in beide modellen, hoewel dit niet altijd in dezelfde richting was of door dezelfde PAKs. Apoptose speelt een belangrijke rol bij het verwijderen van beschadigde cellen voordat deze zich kunnen ontwikkelen tot kankercellen. Zowel de remming van vetzuursynthese als de stimulatie van cholesterol biosynthese zijn gerelateerd aan het proces van kankerontwikkeling (1-6). In lever coupes werd zowel een stimulatie van cholesterol biosynthese als van vetzuur oxidatie gevonden. In HepG2 cellen werden zowel de vetzuursynthese als de cholesterol biosynthese geremd. Een stimulatie van de cholesterol synthese door PAKs veroorzaakt een verhoogde beschikbaarheid van energie. In prolifererend normaal weefsel en tumoren wordt dan ook een stimulering van cholesterol synthese gevonden (1), en hebben neoplastische cellen een groeivoordeel door hun capaciteit om cholesterol te synthetiseren (2). Effecten op vetzuursynthese na blootstelling aan PAKs wordt geassocieerd met een verhoogd risico op kanker door de betrokkenheid van peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs). Dit zijn nucleaire hormoon receptoren die betrokken zijn bij celproliferatie en differentiatie en die worden geactiveerd door vetzuren (7). Vetzuren zijn mogelijk nodig om in de toenemende energiebehoefte van pre-tumor cellen te voorzien. Verder bleken alleen de kankerverwekkende PAKs het proces van oxidatieve stress in de lever coupes te induceren. Dit werd niet gevonden voor HepG2 cellen, en duidt daarom op een verschil in respons van beide celsystemen op blootstelling aan PAKs.

De relatieve mate waarin PAKs in staat bleken te binden aan DNA was over het algemeen vergelijkbaar tussen HepG2 cellen en lever coupes, alleen DB[a,l]P induceerde relatief meer DNA-adducten in de lever coupes. Deze hogere DNA-adductvorming van DB[a,l]P zou verklaard kunnen worden door de relatief lage inductie van *CYP1A1* door DB[a,l]P in lever coupes. In eerder onderzoek is gevonden dat DNA-adductvorming hoger is in muizen met een defect *CYP1A1* gen na blootstelling aan PAKs dan in wild type muizen (8-10). Dus doordat de expressie van *CYP1A1* niet geïnduceerd wordt, zou DB[a,l]P minder gemetaboliseerd kunnen worden door *CYP1A1* en hierdoor minder gedetoxificeerd in lever coupes, wat leidt tot hogere DNA-adduct niveaus dan wanneer DB[a,l]P meer gemetaboliseerd zou worden.

Zoals verwacht veroorzaken de PAKs die relatief weinig kankerverwekkend zijn geen DNA-adduct vorming en veroorzaken weinig effect op genexpressie in beide modellen. DNA-adductniveaus correleren met kankerverwekkend vermogen van de desbetreffende PAK (11), hetgeen in onze studies ook gevonden wordt.

Samenvattend vonden we dat HepG2 cellen een beter *in vitro* model zijn dan lever coupes van de rat voor de classificatie van PAKs op hun kankerverwekkend vermogen met behulp van genexpressie profilering. Hoewel de relatief minst kankerverwekkende PAKs correct geclassificeerd worden in beide modellen, wordt de meest kankerverwekkende PAK, DB[a,l]P, verkeerd geclassificeerd bij het gebruik van lever coupes als model. Het vergroten van het aantal PAKs voor classificatie, waarbij PAKs met een meer diverse range in kankerverwekkende eigenschappen meegenomen worden, kan dit probleem mogelijk ondervangen. Hoewel beide *in vitro* modellen beschouwd worden als een relevant model voor de lever *in vivo*, bestaan er duidelijke verschillen tussen de twee modellen. De verschillen worden mogelijk veroorzaakt door verschillen in celproliferatie, zoals delende HepG2 cellen en rustende cellen in de lever coupes, of door verschillen in metabolisme (humaan versus rat). Verschillen tussen humane of ratten cellen kunnen ook bestaan in enzymen van de Cytochrome P450 familie die betrokken zijn bij metabolisme van PAKs. Een andere mogelijke verklaring is dat in lever coupes de normale lever architectuur behouden is gebleven, waarin hepatocyten en Kupffer cellen aanwezig zijn, terwijl HepG2 cellen slechts hepatocyten zijn.

***In vivo* studie**

In hoofdstuk 5 wordt getracht overeenkomsten te vinden in genexpressie veranderingen door PAKs welke in gelijke mutagene doseringen zijn toegediend, om inzicht te verschaffen in de mechanismen die betrokken zijn bij kankerontwikkeling door PAKs. Deze studie is uitgevoerd met CD2F1 muizen die blootgesteld zijn aan een van de vier kankerverwekkende PAKs, waarna genexpressie analyse van de long en de lever is uitgevoerd. PAKs-doseringen zijn geselecteerd op basis van een gelijke mutagene potentie in muizen om overeenkomsten en verschillen in genexpressie te kunnen bestuderen bij iso-mutagene doseringen. De effecten op genexpressie in de lever bleken veel groter dan de effecten in de long, en in beide organen waren deze effecten PAK-specifiek. Genen waarvan de expressie in dezelfde richting veranderd werd door alle doseringen van alle PAKs, waren vooral betrokken bij metabolisme van xenobiotica. Genen waarvan de expressie in dezelfde richting veranderd werd door een van de doseringen voor elke PAK, waren betrokken bij oxidatieve stress en cel cyclus. Dit kan mogelijk gerelateerd kan zijn aan de DNA beschadigende effecten van PAKs. Dit suggereert een relatie tussen mutagene potentie en deze genexpressie veranderingen.

Net als in de lever coupes, werd ook een relatief lage inductie waargenomen van Cytochrome P450 enzymen door DB[a,l]P in muizen, terwijl de andere stoffen (B[a]P, B[b]F en DB[a,h]A) een duidelijke inductie van *CYP1A1*, *CYP1A2* (alleen in de lever) en *CYP1B1* vertoonden. Dit laat de overeenkomsten tussen muis en rat zien, en duidt erop dat ratten lever coupes een goed model zijn voor de *in vivo* effecten van PAKs op genexpressie.

Analyse van de biologische processen die oververtegenwoordigd zijn in de lijst van genen met veranderde expressie, liet zien dat oxidatieve stress beïnvloed wordt in zowel long als lever, vergelijkbaar met de effecten op de lever coupes. Oxidatieve stress werd echter alleen beïnvloed na B[a]P en B[b]F dosering, wat erop wijst dat deze twee stoffen meer oxidatieve stress veroorzaken dan DB[a,h]A en DB[a,l]P bij gelijk mutagene doseringen. Ook werd vetzuur beta-oxidatie beïnvloed, wat ook in de lever coupes gevonden werd. Hieruit kan worden geconcludeerd dat het *in vitro* lever coupes model tot een bepaalde hoogte een goed model is voor de *in vivo* situatie.

Interactieve effecten van PAK-mengsels

De laatste hoofdstukken (hoofdstukken 6 en 7) hebben als doel om inzicht te krijgen in de interactieve effecten van PAKs op genexpressie en op DNA-adductvorming. De structurele overeenkomsten tussen PAKs kunnen bij blootstelling aan PAK-mengsels leiden tot interactieve effecten. Hierom zijn de effecten van binaire PAK-mengsels vergeleken met de effecten van de individuele stoffen in HepG2 cellen en ratten lever coupes in respectievelijk hoofdstuk 6 en 7. Voor alle stoffen zijn gelijk toxische concentraties gebruikt, die voor HepG2 cellen bepaald zijn aan de hand van celcyclus veranderingen en apoptose niveaus en voor lever coupes zijn de concentraties bepaald aan de hand van DNA-adductvorming. In HepG2 cellen hadden de PAK-mengsels voornamelijk additieve of antagonistische effecten op genexpressie profielen. De expressie van vele individuele genen vertoonde ook additiviteit, terwijl andere genen voornamelijk antagonistische of synergistische effecten vertoonden. In de lever coupes was het effect op de genexpressie profielen voornamelijk antagonistisch. Ook voor individuele genen werd voornamelijk een antagonistisch effect gevonden, terwijl slechts twee genen synergisme vertoonden en tien genen additiviteit. Onze studies zijn de eerste geweest die het effect van PAK-mengsels op genexpressie profielen met behulp van microarray technologie bestudeerd hebben. In de literatuur wordt over het algemeen een additief of antagonistisch effect van PAK-mengsels op andere parameters gevonden, zoals Cytochrome P450 inductie en tumorigenese (12-14). De effecten die wij op genexpressie gevonden hebben, suggereren een lager kankerverwekkend vermogen van PAK-mengsels dan geschat wordt op basis van additiviteit van de individuele stoffen. Dit is in overeenstemming met wat eerder gevonden is op tumorvorming (13,14).

De effecten op DNA-adductvorming verschilden tussen HepG2 cellen en lever coupes. Terwijl in HepG2 cellen de effecten synergistisch waren, waren de effecten in lever coupes over het algemeen antagonistisch. Mogelijk is in HepG2 cellen de bioactivatie van PAKs versterkt bij blootstelling aan meerdere PAKs, wat kan leiden tot hogere concentraties van DNA-reactieve metabolieten. Dit komt overeen met het synergistische effect op de *CYP1A2* expressie in HepG2 cellen en de antagonistische effecten op de *CYP1A2* expressie in lever coupes. Ook is het mogelijk dat phase II enzymen die betrokken zijn bij de detoxificering van PAKs verzadigd raken en

CHAPTER 9

daarbij leiden tot verhoogde niveaus van PAK-metabolieten. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat PAK-mengsels antagonistische effecten hebben op DNA-adductvorming in MCF7 cellen (15). Dus wat betreft interactieve effecten op DNA-adductvorming bestaat er een duidelijk verschil tussen verschillende *in vitro* modellen, welke mogelijk verklaart kan worden door de genexpressie verschillen op enzymen betrokken bij metabolisme.

Opmerkelijk is dat in HepG2 cellen stoffen als FA en 1-MPA, die geen DNA-adducten vormen en zwak tot niet kankerverwekkend zijn, invloed hebben op de effecten van andere PAKs in mengsels. Beide stoffen veroorzaakten synergistische effecten op DNA-adductvorming en kunnen hierdoor een belangrijke bijdrage leveren aan een verhoogde kankerverwekkend vermogen van mengsels. Er is echter nog geen onderzoek gedaan naar de interactie van deze stoffen op de ontwikkeling van kanker.

Tot slot

Met deze studies wilden we inzicht verkrijgen in de verandering van genexpressie na blootstelling aan PAKs en de interactieve effecten die plaats kunnen vinden in mengsels, wat kan helpen om de risicoanalyse van PAKs uit de buitenlucht te verbeteren. We hebben laten zien dat classificatie van PAKs naar kankerverwekkend vermogen door middel van genexpressie profilering haalbaar is in HepG2 cellen, maar minder in lever coupes. Door middel van analyse van de biologische processen hebben we inzicht gekregen in de werkingsmechanismen die betrokken zijn bij PAK-blootstelling. Deze resultaten laten zien dat hoewel PAKs structureel gelijkend zijn, dat ze toch erg kunnen verschillen in hun effecten op genexpressie. Ook hebben we door de effecten van mengsels te bestuderen laten zien dat PAKs interactieve effecten kunnen hebben op genexpressie, DNA-adductvorming en andere parameters; hoewel het type interactie kan verschillen tussen parameters, tussen de stoffen en tussen *in vitro* modellen. De meeste interacties op genexpressie suggereren dat mengsels van PAKs een lager risico vormen dan op basis van de individuele stoffen verwacht wordt, hoewel sommige interactieve effecten op DNA-adductvorming juist een verhoogd kankerverwekkend vermogen suggereren. Door het bestuderen van de effecten van PAK-mengsels op verschillende parameters hebben we inzicht gekregen in de interactieve effecten van PAKs op verschillende parameters wat van belang kan zijn voor kankerrisicoanalyse van PAK-mengsels.

REFERENCES

1. Rao, K.N. (1995) The significance of the cholesterol biosynthetic pathway in cell growth and carcinogenesis (review). *Anticancer Res*, 15, 309-14.
2. Rao, K.N., Elm, M.S., Kelly, R.H., Chandar, N., Brady, E.P., Rao, B., Shinozuka, H. and Eagon, P.K. (1997) Hepatic hyperplasia and cancer in rats: metabolic alterations associated with cell growth. *Gastroenterology*, 113, 238-48.
3. Zhou, W., Simpson, P.J., McFadden, J.M., Townsend, C.A., Medghalchi, S.M., Vadlamudi, A., Pinn, M.L., Ronnett, G.V. and Kuhajda, F.P. (2003) Fatty acid synthase inhibition triggers apoptosis during S phase in human cancer cells. *Cancer Res*, 63, 7330-7.
4. Pizer, E.S., Jackisch, C., Wood, F.D., Pasternack, G.R., Davidson, N.E. and Kuhajda, F.P. (1996) Inhibition of fatty acid synthesis induces programmed cell death in human breast cancer cells. *Cancer Res*, 56, 2745-7.
5. Kuhajda, F.P. (2000) Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition*, 16, 202-8.
6. Iwano, S., Nukaya, M., Saito, T., Asanuma, F. and Kamataki, T. (2005) A possible mechanism for atherosclerosis induced by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biochem Biophys Res Commun*, 335, 220-6.
7. Fajas, L., Debril, M.B. and Auwerx, J. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma: from adipogenesis to carcinogenesis. *J Mol Endocrinol*, 27, 1-9.
8. Kondraganti, S.R., Fernandez-Salguero, P., Gonzalez, F.J., Ramos, K.S., Jiang, W. and Moorthy, B. (2003) Polycyclic aromatic hydrocarbon-inducible DNA adducts: evidence by ³²P-postlabeling and use of knockout mice for Ah receptor-independent mechanisms of metabolic activation *in vivo*. *Int J Cancer*, 103, 5-11.
9. Uno, S., Dalton, T.P., Derkenne, S., Curran, C.P., Miller, M.L., Shertzer, H.G. and Nebert, D.W. (2004) Oral exposure to benzo[a]pyrene in the mouse: detoxication by inducible cytochrome P450 is more important than metabolic activation. *Mol Pharmacol*, 65, 1225-37.
10. Uno, S., Dalton, T.P., Dragin, N., Curran, C.P., Derkenne, S., Miller, M.L., Shertzer, H.G., Gonzalez, F.J. and Nebert, D.W. (2006) Oral benzo[a]pyrene in Cyp1 knockout mouse lines: CYP1A1 important in detoxication, CYP1B1 metabolism required for immune damage independent of total-body burden and clearance rate. *Mol Pharmacol*, 69, 1103-14.
11. Brookes, P. and Lawley, P.D. (1964) Evidence for the Binding of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons to the Nucleic Acids of Mouse Skin: Relation between Carcinogenic Power of Hydrocarbons and Their Binding to Deoxyribonucleic Acid. *Nature*, 202, 781-4.
12. Falahatpisheh, M.H., Donnelly, K.C. and Ramos, K.S. (2001) Antagonistic interactions among nephrotoxic polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Toxicol Environ Health A*, 62, 543-60.
13. Gray, D.L., Warshawsky, D., Xue, W., Nines, R., Wang, Y., Yao, R. and Stoner, G.D. (2001) The effects of a binary mixture of benzo(a)pyrene and 7H-dibenzo(c,g)carbazole on lung tumors and K-ras oncogene mutations in strain A/J mice. *Exp Lung Res*, 27, 245-53.
14. Nesnow, S., Mass, M.J., Ross, J.A., Galati, A.J., Lambert, G.R., Gennings, C., Carter, W.H., Jr. and Stoner, G.D. (1998) Lung tumorigenic interactions in strain A/J mice of five environmental polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ Health Perspect*, 106 Suppl 6, 1337-46.
15. Mahadevan, B., Parsons, H., Musafia, T., Sharma, A.K., Amin, S., Pereira, C. and Baird, W.M. (2004) Effect of artificial mixtures of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons present in coal tar, urban dust, and diesel exhaust particulates on MCF-7 cells in culture. *Environ Mol Mutagen*, 44, 99-107.