

Paternal exposure to benzo(a)pyrene : a genetic risk in offspring?

Citation for published version (APA):

Verhofstad, N. (2010). *Paternal exposure to benzo(a)pyrene : a genetic risk in offspring?*. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20101221nv>

Document status and date:

Published: 01/01/2010

DOI:

[10.26481/dis.20101221nv](https://doi.org/10.26481/dis.20101221nv)

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.

Chapter 7

Summary and general discussion

Benzo(a)pyrene (B[a]P) is known as an environmental and occupational pollutant, to which we are regularly exposed. After uptake, B[a]P is metabolically transformed into compounds that can be excreted in urine or faeces. Occasionally active compounds are formed that can bind to the DNA and form bulky DNA adducts. DNA adducts may lead to the formation of mutations and the subsequent onset of cancer development, unless they are removed by DNA repair mechanisms. Besides its known mutagenic and carcinogenic potential in somatic cells, B[a]P may also affect the DNA in reproductive tissues and male germ cells, potentially increasing health risks in offspring. The European Community's guidance document for genotoxicity under REACH requires that chemical compounds should be considered for testing on mutagenicity in germ cells when they are mutagenic in somatic cells. Since the results from classical germ cell mutagenicity tests were inconclusive and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) have been found to induce germ line mutations in sentinel animals exposed to contaminated outdoor air, B[a]P should be tested for its mutagenic potential in male germ cells. In this thesis, we evaluated B[a]P as a potential germ line mutagen and investigated whether DNA repair represents a relevant molecular protective mechanism affecting the relation between DNA adduct formation and the production of germ line mutations.

DNA adduct kinetics in testis and male germ cells

In the first study (**chapter 3**), we examined the DNA damaging effects of B[a]P and DNA adduct removal by global genome repair (GGR), as part of nucleotide excision repair (NER), in testes and sperm cells of exposed male mice. Wild type (Wt) and *Xpc*^{-/-} male mice were exposed to a single dose of B[a]P and sacrificed at day 1, 4, 7, 10, 14, 21, 32 and 42 after exposure to study DNA adduct formation at different stages of spermatogenesis. Since spermatogenesis takes 42 days in mice, a measurement in spermatozoa at day 42 after exposure represents DNA adducts that are formed in exposed spermatogonial stem cells or early type A spermatogonia. DNA adduct kinetics were compared between B[a]P exposed Wt and *Xpc*^{-/-} male mice to study the contribution of GGR/NER in DNA damage removal in testes and male germ cells. For our studies, we used *Xpc*^{-/-} rather than *Xpa*^{-/-} mice, since it was previously shown that *Xpa*^{-/-} mice might be too sensitive to compounds that give bulky adducts [1]. The observed toxicity in these *Xpa*^{-/-} mice was predominantly caused by the absence of transcription coupled repair (TCR), as part of NER. Therefore, to prevent unwanted toxicity in our studies, we decided to use *Xpc*^{-/-} mice, which are deficient for GGR/NER, but still have active TCR/NER.

We found DNA adducts in detectable amounts in whole testis and at all stages of spermatogenesis. In testes, *Xpc*^{-/-} mice contained significantly higher DNA adduct levels compared to Wt mice over the entire 42-days observation period. Also a difference in adduct half-life was observed between Wt and *Xpc*^{-/-} mice, with *Xpc*^{-/-} mice having more stable DNA adducts. These findings suggest that there is a significant role for GGR/NER in removing DNA adducts from testes. In spermatozoa, DNA adduct levels were only significantly higher in *Xpc*^{-/-} mice as compared to Wt mice at 6 weeks after exposure (day 42). At this time point, DNA adducts were measured in spermatozoa that would have developed from exposed spermatogonial stem cells or that would have been in an early mitotic stage of spermatogenesis at the time of exposure, and these cells have had the chance to divide multiple times and to re-

cover from the damage by DNA repair. It was also interesting to see that even in Wt mice DNA adducts were still detectable at 6 weeks after exposure, even though the levels were significantly lower as compared to *Xpc*^{-/-} mice. The results from spermatozoa suggest that the initial DNA damage in spermatogonia was relatively high, and that accurate DNA repair mechanisms, such as GGR/NER, are important for efficient DNA damage removal. DNA adducts were also detected shortly after exposure in mature spermatozoa, which are considered to be unable to metabolically activate B[a]P. These cells are however surrounded by tissues that can metabolize B[a]P (for instance Sertoli cells or epididymal epithelium) and the reactive metabolites could thus reach the spermatozoa. DNA damage that is not removed during spermatogenesis may lead to the formation of germ line mutations, but may also persist until fertilization and affect the growth and development of the embryo. Studies already showed paternal transmission of B[a]P induced DNA adducts in spermatozoa of smoking fathers to their fertilized embryos [2], and a relation between environmental exposure and intrauterine growth retardation in the first gestational month [3]. Further, DNA damaged sperm was found to be able to fertilize oocytes, regardless of the degree of DNA damage, but the embryonic development is affected by the degree of DNA damage [4]. Fortunately, the oocyte has the capacity to repair damaged DNA of sperm after fertilization when it is damaged less than ca. 8%; damage beyond this level will affect embryonic development and increase the chance of early pregnancy loss [4].

Although DNA damage in mature spermatozoa may affect the offspring's health, DNA damage in spermatogonial stem cells may be a more important problem, because DNA damage that is converted into mutations in these cells can affect an infinite number of generations thereafter.

B[a]P-induced gene expression changes in testis

In **chapter 3** we showed that B[a]P-induced DNA adducts were not efficiently removed from the DNA of testes and germ cells in *Xpc*^{-/-} mice, even though germ cells are thought to be well-protected against exposures *via* a complex network of molecular mechanisms. Stress induced proteins have been found to play an important role in spermatogenesis. For instance, heat-shock proteins were found to be induced in response to environmental stress but are also essential for normal gametogenesis; in mice homozygous for a deletion in the *Hsp70-2* gene, spermatocytes fail to complete meiotic prophase and become apoptotic [5]. HSP70-2 may protect germ cells in combination with the tumour suppressor gene *p53*, which prevents the propagation of DNA damage to daughter cells by causing cell cycle arrest for efficient repair or by inducing apoptosis [6]. In the mouse, *p53* is expressed during the meiotic prophase in spermatocytes and appears to be important for normal spermatogenesis, since the testis of mice with reduced levels of *p53* are histologically abnormal [7]. In other words, it seems that genes that are usually related to cellular stress responses are of importance for normal gametogenesis, even in the absence of additional exposures to genotoxins. In order to reveal the stress responses after B[a]P exposure in the testis, we investigated the changes in gene expression induced by B[a]P in testes from Wt and *Xpc*^{-/-} male mice (**chapter 4**). Since *Xpc*^{-/-} mice lack GGR/NER, which is considered to be one of the most important protective mechanisms against B[a]P induced DNA damage, we expected a different (adaptive) transcriptional response in

these mice as compared to Wt mice to compensate for the lack of DNA repair activity. Although gene expression levels were similar in unexposed Wt and *Xpc*^{-/-} mice and B[a]P induced similar gene expression changes in mice of both genotypes, the level in which these B[a]P exposure regulated genes were expressed differed significantly between Wt and *Xpc*^{-/-} mice ($p = 0.000000141$), with an overall slightly higher expression in *Xpc*^{-/-} mice as compared to their Wt counterparts. These differences were predominantly found within the regulation of cell cycle, but also at the level of translation, chromatin structure and spermatogenesis, indicative for a general stress response. Analysis of cell cycle phase dependent gene expression showed that expression of genes involved in G1-S and G2-M phase arrest was increased after B[a]P exposure in both genotypes.

A slightly higher induction of the average gene expression was observed at the G2-M phase checkpoint in *Xpc*^{-/-} mice, but this did not reach statistical significance ($P = 0.086$). However, statistical significance was reached when the analysis was performed on up regulated genes only within this phase ($p = 0.024$), showing a trend towards a higher induction of G2-M phase genes in *Xpc*^{-/-} mice. These findings indicate that the presence of unrepaired DNA damage in testis blocks cell proliferation to protect DNA integrity in both DNA repair proficient and deficient animals, which is a normal reaction and does thus not differ from somatic cells. The difference between Wt and *Xpc*^{-/-} mice in B[a]P-induced gene expression levels within the G2-M phase could be ascribed to more damaged cells in testes of *Xpc*^{-/-} mice, instead of a stronger reaction in each individual cell. Unrepaired DNA damage can block the cell cycle in the late S-phase, until it is passed in an error-free or error-prone way with progression of the cell cycle and spermatogenesis. Eventually, sperm cells seem to continue their proliferation in the presence of DNA damage, because we have observed that DNA adducts can be carried along during spermatogenesis (**chapter 3**). Y-family polymerases can pass blocked replication forks by B[a]P induced DNA damage. In fact, polymerase κ is highly expressed in germ cells and replicates B[a]P damaged DNA in a mostly error-free way. Undamaged cells or less damaged cells of which the DNA damage still can be removed, as is likely to occur in Wt mice, can continue the cell cycle more easily and show lower expression levels of G2-M phase genes.

Other processes that were expected to have changed by exposure, like apoptosis and DNA repair processes other than GGR/NER, were not found to be modulated at the level of gene expression. However, this does not mean that these processes were not affected by B[a]P exposure. Other aspects could have played a role in the activation of apoptosis; 1) the large number of apoptotic cells in normal testis will make it difficult to measure subtle changes in the apoptotic response after a single B[a]P exposure, 2) the apoptotic response after B[a]P exposure is an acute response that is probably hard to assess 4 days after exposure, and 3) the activation of the different caspases leading to fragmentation of DNA occurs by cleavage of procaspases already stored in the cell, a process that is unlikely to be found at the transcriptional level [8]. This last aspect may also hold true for DNA repair, which also relies on activation and translocation of already existing proteins.

Mutagenic effects of benzo(a)pyrene in sperm cells

B[a]P has been studied extensively since its discovery in 1930 and it is clear that B[a]P has DNA damaging potential and mutagenic effects. However, it is less clear whether B[a]P induces mutations in germ cells in an *in vivo* situation. In **chapter 3** we found that B[a]P induced DNA adducts in spermatogonial stem cells of exposed male mice, which were not completely removed within 42 days after exposure. This indicates that DNA damage is present during the mitotic expansion of germ cells and subsequent meiosis, which offers the opportunity to transform this DNA damage into heritable gene mutations. In addition, recent studies with environmentally exposed animals suggest that PAHs are indeed mutagenic in male germ cells [9, 10]. Therefore, we studied in **chapter 5** whether B[a]P was able to induce gene mutations in testis and sperm cells of Wt and *Xpc*^{-/-} mice. To study this, we used mice that contain a plasmid-based shuttle vector with multiple copies of the *lacZ* reporter gene integrated in a head-to-tail organization in their genome [11]. The use of this transgenic mouse model permits the quantification and characterization of mutations in different organs and tissues over the life-time of an animal, and allows the detection of deletions, point mutations and chromosomal rearrangements, including translocations. DNA lesions induced by B[a]P are mainly point mutations, and therefore this model is appropriate to assess the mutagenic effects of B[a]P in reproductive tissues and sperm cells in an *in vivo* situation. The usefulness of this animal model was also demonstrated by a positive response in animals that were exposed to the well-known germ line mutagen ethyl nitrosourea (ENU).

Mice were sacrificed 6 weeks after the final B[a]P exposure to obtain sperm cells derived from exposed spermatogonial stem cells. Successful exposure was confirmed by a dose and time-dependent increase in mutant frequency in the known target organ spleen with higher mutant frequencies in *Xpc*^{-/-} mice as compared to Wt mice. Although B[a]P-related DNA adducts were detected in testis, mutant frequencies were not increased in this tissue. On the other hand, B[a]P significantly enhanced mutant frequencies in sperm of Wt mice after 6 weeks of exposure, but such an increase was not found in *Xpc*^{-/-} mice. These results were in contrast with what we hypothesized, since it was expected that *Xpc*^{-/-} mice would be a more sensitive model to study mutation induction [12]. Besides that, DNA adduct levels in *Xpc*^{-/-} mice were significantly higher 42 days after a single exposure (representing spermatogonial stem cells) as compared to Wt mice (**chapter 3**). It remains to be investigated why *Xpc*^{-/-} mice were not responsive towards the induction of mutants after B[a]P exposure. We consider that cytotoxicity induced by B[a]P in developing sperm cells might play a role in the lack of mutagenic effects in *Xpc*^{-/-} mice. Previous studies showed that high exposure to B[a]P may lead to sterility due to cytotoxicity of B[a]P to spermatogonia [13]. However, in our study no sterility was induced because the exposed mice did produce offspring. Though, the same 6 week exposure dose applied to the more DNA damage sensitive *Xpc*^{-/-} mice lead to a significant decrease in the number of offspring mice, which could be an indication of cytotoxicity. Moreover, a selection of cells may have occurred by favouring those cells that were not heavily damaged, and as a result no increased mutant frequencies could be detected. It would be interesting for future studies to investigate whether DNA damage is not homogeneously distributed throughout the testis, which would make a selection of less damaged cells possible.

Histopathological analysis of the testis will be performed to confirm this hypothesis and future studies should elucidate whether B[a]P exposure also reduces litter sizes of Wt male mice. For now, we can conclude that B[a]P can induce gene mutations in spermatogonial stem cells of mice. It is likely that these mutations are transmitted to the offspring, since they were detected in out-grown spermatozoa that were present in the epididymides and prepared for conception. Only selection could prevent the existence of these mutations in the progeny during or after fertilization.

Inherited mutations in offspring mice

Although we demonstrated that B[a]P induced mutations in spermatogonial stem cells (**chapter 5**), it remains uncertain whether these mutations are transmitted to the offspring. This may possibly depend on the exposure dose and exposure duration affecting the germ cells; high doses and long-term exposure to B[a]P can be cytotoxic to germ cells [13]. In **chapter 5**, we found that mutations induced in spermatogonial stem cells are still present in mature spermatozoa in the epididymides of Wt mice, but not in *Xpc*^{-/-} mice. The combination of exposure dose and the genetic background of the animal model can therefore affect the outcome of the experiment.

It is unlikely that the *lacZ* mouse model can be used to study mutations in the offspring, because the mutant frequency is too low and large numbers of offspring would be needed to detect the transmittance of such mutations with sufficient power. Therefore, we set up a pilot study using a sensitive method to analyze expanded simple tandem repeat (ESTR) mutation rates in DNA fingerprints of offspring mice, which has been described in **chapter 2**, in combination with the DNA repair deficient (*Xpc*^{-/-}) mouse model. The analysis of ESTR mutations has proven to be a successful method for the analysis of transmittable mutations in the offspring of animals and humans (see **chapter 2**). As compared to the classical germ cell assays, the analysis of ESTR mutations is a more sensitive method that requires reduced number of animals, takes less time and is more cost-effective. However, the disadvantages of this assay are that only a few laboratories are equipped to perform the analysis, that it measures mutation induction in non-coding DNA without phenotypic effects, and that the defined mechanism of mutation induction is yet unknown. It is suggested that tandem repeat mutations arise through an indirect mechanism of mutation induction [14]. Still, we chose this method because it has been successfully applied as a germ line mutation assay.

The results from this pilot study showed that B[a]P exposure did not increase ESTR mutation rates in offspring of B[a]P exposed male *Xpc*^{-/-} mice as compared to offspring of control male mice ($p = 0.91$, **chapter 6**). In fact, paternal and maternal mutation rates seemed even higher in offspring of control male mice. Although these results are in concordance with the lack of response found in **chapter 5** and a correlation was observed between ESTR mutations and *lacZ* mutant frequencies, it remains to be elucidated why the *Xpc*^{-/-} mouse model is not responsive towards mutation induction in reproductive tissues after B[a]P exposure and whether the ESTR mutations reflect *lacZ* gene mutations in Wt animals. We already suggested that B[a]P-induced cytotoxicity to the germ cells is causing this lack of response in *Xpc*^{-/-} mice, since the number of offspring was significantly lower after B[a]P exposure as compared to the control group. In addition, the DNA adduct levels in testes rather decreased after 6 weeks exposure as compared to 4 weeks exposure, while an ac-

cumulation of DNA damage was expected. This suggests that testicular and germ cells with high levels of DNA damage are triggered to enter apoptosis/necrosis, thereby decreasing overall DNA adduct levels. On the other hand, the apoptotic pathway was not found to be modulated at the levels of gene expression (**chapter 4**) after acute exposure to a single dose of B[a]P. Therefore, it can not be excluded that other processes are involved in this lack of effect. Gene expression analysis also revealed that B[a]P exposure affected mitochondrial function and oxidative phosphorylation which is indicative for a decreased motility and fertilizing capacity of the sperm (**chapter 4**). B[a]P exposure is known to affect spermatogenesis by reduced motility and lower sperm concentrations. But also epigenetic alterations changing the methylation pattern could have affected the spermatogenic process and therefore the quality and the fertilizing capacity of the sperm [15].

For future studies, it is recommended to expand the number of offspring tested, since this would improve the reliability of the results. At least 100, but preferably more offspring have to be tested per group to obtain significant results. Unfortunately, this was not achieved in this pilot study in which we tested 55 and 65 offspring in the B[a]P exposed and control group, respectively. Since a significant *lacZ* mutant induction was found in sperm cells of exposed Wt mice after 6 weeks exposure and 6 weeks of recovery, it is also proposed to study the formation of B[a]P-induced germ line mutations in offspring of Wt mice. These results may further reveal whether B[a]P can be classified as a germ line mutagen, affecting the health of progeny.

Overall Conclusion

From the results in this thesis it can be concluded that B[a]P possesses DNA damaging effects in testis and especially male germ cells, and that XPC, a key protein in GGR/NER, plays an important role in the efficient removal of B[a]P-induced DNA adducts in these reproductive cells. Nonetheless, in response to B[a]P exposure, gene expression changes were relatively the same in testes of Wt and *Xpc*^{-/-} mice, mainly showing that cell cycle is arrested to provide additional time for repair. Since *Xpc*^{-/-} mice lack the most important repair mechanism for B[a]P induced DNA damage, cell cycle arrest is more induced in testes of *Xpc*^{-/-} mice than of Wt mice, especially at the G2-M phase transition.

B[a]P-induced mutation induction was only observed in sperm cells of exposed Wt mice, representing germ line mutations in spermatogonial stem cells. Our results were recently confirmed in a paper by Olsen *et al.*, in which they showed that *de novo* mutations had been induced in spermatozoa originating from B[a]P exposed (3 x 50 mg/kg bw) spermatogonia [16]. Characterization of the mutations from exposed spermatogonia showed increased levels of GC-TA transversions, which are produced mostly by B[a]P exposure. In our studies, *Xpc*^{-/-} mice seemed to be too sensitive for B[a]P after subchronic exposure, which may have lead to cytotoxicity. Future studies should expand the number of offspring tested and further evaluate inherited mutations in offspring of B[a]P exposed male mice.

References

1. Klein, J.C., Beems, R.B., Zwart, P.E., Hamzink, M., Zomer, G., van Steeg, H. and van Kreijl, C.F. (2001) Intestinal toxicity and carcinogenic potential of the food mutagen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in DNA repair deficient XPA^{-/-} mice. *Carcinogenesis*, **22**, 619-626.
2. Zenzes, M.T., Puy, L.A., Bielecki, R. and Reed, T.E. (1999) Detection of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts in embryos from smoking couples: evidence for transmission by spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, **5**, 125-131.
3. Srm, R.J., Binkov, B., Rssner, P., Rubes, J., Topinka, J. and Dejmek, J. (1999) Adverse reproductive outcomes from exposure to environmental mutagens. *Mutation research*, **428**, 203-215.
4. Ahmadi, A. and Ng, S.C. (1999) Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *Journal of experimental zoology*, **284**, 696-704.
5. Dix, D.J. (1997) Hsp70 expression and function during gametogenesis. *Cell stress & chaperones*, **2**, 73-77.
6. Smith, M.L. and Fornace, A.J., Jr. (1996) The two faces of tumor suppressor p53. *The American journal of pathology*, **148**, 1019-1022.
7. Rotter, V., Schwartz, D., Almon, E., Goldfinger, N., Kapon, A., Meshorer, A., Donehower, L.A. and Levine, A.J. (1993) Mice with reduced levels of p53 protein exhibit the testicular giant-cell degenerative syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 9075-9079.
8. Boatright, K.M. and Salvesen, G.S. (2003) Mechanisms of caspase activation. *Current opinion in cell biology*, **15**, 725-731.
9. Somers, C.M., Yauk, C.L., White, P.A., Parfett, C.L. and Quinn, J.S. (2002) Air pollution induces heritable DNA mutations. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 15904-15907.
10. Somers, C.M., McCarry, B.E., Malek, F. and Quinn, J.S. (2004) Reduction of particulate air pollution lowers the risk of heritable mutations in mice. *Science*, **304**, 1008-1010.
11. Dolle, M.E., Martus, H.J., Gossen, J.A., Boerrigter, M.E. and Vijg, J. (1996) Evaluation of a plasmid-based transgenic mouse model for detecting in vivo mutations. *Mutagenesis*, **11**, 111-118.
12. Melis, J.P., Wijnhoven, S.W., Beems, R.B., Roodbergen, M., van den Berg, J., Moon, H., Friedberg, E., van der Horst, G.T., Hoeijmakers, J.H., Vijg, J. and van Steeg, H. (2008) Mouse models for xeroderma pigmentosum group A and group C show divergent cancer phenotypes. *Cancer Res*, **68**, 1347-1353.
13. Revel, A., Raanani, H., Younglai, E., Xu, J., Han, R., Savouret, J.F. and Casper, R.F. (2001) Resveratrol, a natural aryl hydrocarbon receptor antagonist, protects sperm from DNA damage and apoptosis caused by benzo(a)pyrene. *Reprod Toxicol*, **15**, 479-486.
14. Yauk, C.L., Berndt, M.L., Williams, A., Rowan-Carroll, A., Douglas, G.R. and Stampfli, M.R. (2007) Mainstream tobacco smoke causes paternal germ-line DNA mutation. *Cancer Res*, **67**, 5103-5106.
15. Yauk, C., Polyzos, A., Rowan-Carroll, A., Somers, C.M., Godschalk, R.W., Van Schooten, F.J., Berndt, M.L., Pogribny, I.P., Koturbash, I., Williams, A., Douglas, G.R. and Kovalchuk, O. (2008) Germ-line mutations, DNA damage, and global hypermethylation in mice exposed to particulate air pollution in an urban/industrial location. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 605-610.
16. Olsen, A.K., Andreassen, A., Singh, R., Wiger, R., Duale, N., Farmer, P.B. and Brunborg, G. Environmental exposure of the mouse germ line: DNA adducts in spermatozoa and formation of de novo mutations during spermatogenesis. *PLoS ONE*, **5**, e11349.

Samenvatting en algemene discussie

Benzo(a)pyreen (B[a]P) staat bekend als een milieu- en beroepsmatige verontreinigende stof, waaraan iedereen regelmatig wordt blootgesteld. Na opname wordt B[a]P in het lichaam omgezet in verbindingen die kunnen worden uitgescheiden in de urine of feces. Hierbij worden echter af en toe actieve verbindingen gevormd die aan het DNA kunnen binden en zogenaamde DNA-adducten kunnen vormen. Deze DNA-adducten kunnen leiden tot het ontstaan van mutaties en daaropvolgend tot de ontwikkeling van kanker, tenzij ze worden verwijderd door DNA-herstelmechanismen. Naast de bekende mutagene en carcinogene werking in somatische cellen kan B[a]P ook invloed hebben op het DNA in de reproductieve weefsels en mannelijke geslachtscellen, waardoor de gezondheidsrisico's voor het nageslacht mogelijk worden verhoogd. De richtlijnen van de Europese Gemeenschap (EG) voor genotoxiciteit in het kader van REACH vereist dat chemische stoffen moeten worden getest op mutageniteit in geslachtscellen als ze mutageen zijn in somatische cellen. Aangezien de resultaten van de klassieke mutageniteitstesten geen uitsluitel geven en polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAKs) kiembaanmutaties blijken te induceren in vrijlevende dieren blootgesteld aan verontreinigde buitenlucht, zal B[a]P moeten worden getest voor de mutagene werking in mannelijke geslachtscellen. In dit proefschrift evalueerden we B[a]P als een potentiële kiembaanmutageen en onderzochten we of DNA-herstel een relevant beschermend moleculair mechanisme vertegenwoordigt dat invloed kan hebben op de relatie tussen DNA-adductvorming en het ontstaan van kiembaanmutaties.

DNA-adduct kinetiek in testis en mannelijke geslachtscellen

In de eerste studie (**hoofdstuk 3**), onderzochten we de DNA-beschadigende effecten van B[a]P in de testis en geslachtscellen van blootgestelde mannelijke muizen, en de verwijdering van de door B[a]P-geïnduceerde DNA-schade door het globale genoomherstel (GGR) dat een onderdeel is van het nucleotide-excisie herstel (NER). Wild type (Wt) en *Xpc*^{-/-} mannelijke muizen werden blootgesteld aan een eenmalige dosis B[a]P en werden opgeofferd op dag 1, 4, 7, 10, 14, 21, 32 en 42 na blootstelling om de vorming en verwijdering van DNA-adducten te bestuderen tijdens de verschillende stadia van de spermatogenese. Aangezien de spermatogenese in muizen 42 dagen duurt, zal de meting in geslachtscellen op dag 42 na de blootstelling DNA-adducten vertegenwoordigen die gevormd werden in blootgestelde spermatogoniale stamcellen of vroege type A spermatogonia. DNA-adduct kinetiek werd vergeleken tussen de aan B[a]P-blootgestelde Wt en *Xpc*^{-/-} mannelijke muizen om de bijdrage van GGR/NER bij de verwijdering van DNA-schade in testis en mannelijke geslachtscellen te bestuderen. Voor onze studies hebben we gebruik gemaakt van *Xpc*^{-/-} muizen in plaats van *Xpa*^{-/-} muizen, omdat eerder al was aangetoond dat *Xpa*^{-/-} muizen hoogstwaarschijnlijk te gevoelig zijn voor blootstelling aan stoffen die omvangrijke DNA-adducten kunnen vormen [1]. De waargenomen toxiciteit in *Xpa*^{-/-} muizen werd voornamelijk veroorzaakt door het ontbreken van het transcriptie-gekoppelde herstel (TCR), dat ook onderdeel is van NER. Om ongewenste toxiciteit in onze studies te voorkomen, hebben we gekozen voor *Xpc*^{-/-} muizen, die deficiënt zijn voor GGR/NER, maar nog steeds actieve TCR/NER bezitten.

DNA-adducten werden aangetroffen in testes en in alle stadia van de spermatogenese. Testes van *Xpc*^{-/-} muizen bevatten over de gehele observatieperiode van 42 dagen hogere DNA-adductniveaus in vergelijking met de

testes van Wt muizen. Ook werd er tussen Wt en *Xpc*^{-/-} muizen een verschil in de halfwaardetijd van adducten waargenomen, met meer stabiele DNA-adducten in *Xpc*^{-/-} muizen. Deze bevindingen veronderstellen dat er een belangrijke rol is voor GGR/NER bij het verwijderen van DNA-adducten in de testis. In de geslachtscellen waren de DNA-adductniveaus alleen op dag 42 significant hoger in *Xpc*^{-/-} muizen in vergelijking met Wt muizen. Op dit tijdstip werden DNA-adducten gemeten in geslachtscellen die zich hebben ontwikkeld uit blootgestelde spermatogoniale stamcellen of uit cellen die zich in een vroeg stadium van de mitotische spermatogenese bevonden op het moment van blootstelling. Deze cellen hebben de kans gehad om zich meerdere keren te delen en om zich te herstellen van de schade door DNA-herstelmechanismen. Het was ook interessant om te zien dat zelfs in Wt muizen DNA-adducten nog steeds detecteerbaar waren op 6 weken na de blootstelling, hoewel de niveaus significant lager waren in vergelijking met de *Xpc*^{-/-} muizen. De resultaten in de geslachtscellen veronderstellen dat het oorspronkelijke niveau van DNA-schade in spermatogonia relatief hoog moet zijn geweest en dat accurate DNA-herstelmechanismen, zoals GGR/NER, belangrijk zijn voor een efficiënte verwijdering van deze DNA-schade. DNA-adducten werden ook kort na de blootstelling ontdekt in volgroeide spermatozoa, waarvan wordt gedacht dat ze eigenlijk niet in staat zijn om B[a]P metabool te activeren. Deze volgroeide cellen zijn echter omgeven door cellen die wel B[a]P kunnen metaboliseren (bijvoorbeeld Sertoli cellen of epididymale epitheel cellen), waardoor de reactieve metabolieten van B[a]P de geslachtscellen konden bereiken. DNA-schade die niet wordt verwijderd gedurende de spermatogenese kan leiden tot de vorming van kiembaanmutaties, maar deze schade kan ook blijven bestaan tot aan de bevruchting en invloed hebben op de groei en ontwikkeling van het embryo. Studies toonden reeds de overdracht van B[a]P-geïnduceerde DNA-adducten aan in geslachtscellen van rokende vaders naar de bevruchte eicel en DNA-adducten werden vervolgens ook aangetroffen in embryo's [2]. Verder is er een relatie gevonden tussen blootstelling aan milieufactoren en intra-uteriene groeivertraging in de eerste maanden van de zwangerschap [3]. Het is aangetoond dat DNA-beschadigde spermacellen in staat zijn om eicellen te bevruchten, ongeacht de mate van DNA-schade, maar de embryonale ontwikkeling wordt wel beïnvloed door de mate van DNA-schade [4]. Gelukkig heeft de eicel het vermogen om beschadigd DNA, afkomstig van spermacellen, te repareren wanneer deze minder dan 8% is beschadigd; schade boven dit niveau zal de embryonale ontwikkeling beïnvloeden en de kans op een abortus verhogen [4].

Hoewel de DNA-schade in volgroeide spermatozoa de gezondheid van nakomelingen kan beïnvloeden, is DNA-schade in spermatogoniale stamcellen mogelijk een belangrijker probleem. DNA schade in deze cellen kan worden omgezet naar mutaties die vervolgens een oneindig aantal generaties erna kan beïnvloeden.

B[a]P-geïnduceerde genexpressieveranderingen in testis

In **hoofdstuk 3** hebben we laten zien dat B[a]P-geïnduceerde DNA-adducten niet efficiënt werden verwijderd van het DNA in testis en geslachtscellen van *Xpc*^{-/-} muizen, hoewel van geslachtscellen wordt gedacht dat ze goed beschermd zijn tegen zulke blootstellingen door een complex netwerk van moleculaire mechanismen. Stress-geïnduceerde eiwitten blijken inderdaad een belangrijke rol in de spermatogenese te spelen. Zo werden heat-shock eiwitten gevonden die worden

gestimuleerd in antwoord op stress uit de omgeving, maar ze blijken ook essentieel te zijn voor een normale gametogenese; bij muizen die homozygoot zijn voor een deletie in het *Hsp70-2* gen zijn de spermatocyten niet in staat om de meiotische profase te voltooien waardoor ze in apoptose gaan [5]. *Hsp70-2* beschermt mogelijk de geslachtscellen in combinatie met het tumorsuppressorgen *p53*, zodat het doorgeven van DNA-schade aan dochtercellen wordt voorkomen door efficiënte reparatie tijdens een stop van de celcyclus of het induceren van geprogrammeerde celdood, oftewel apoptose [6]. In de muis komt *p53* tot expressie tijdens de meiotische profase in spermatocyten, en lijkt *p53* belangrijk voor de normale spermatogenese, omdat testes van muizen met een verminderde expressie van *p53* histologisch abnormaal zijn [7]. Met andere woorden, het lijkt erop dat genen die meestal gerelateerd zijn aan cellulaire stressreacties belangrijk zijn voor de normale gametogenese, zelfs bij het ontbreken van een blootstelling aan genotoxische stoffen. Om de stressreacties na B[a]P-blootstelling in de testis verder te onthullen, onderzochten we de door B[a]P veroorzaakte veranderingen in genexpressie in testes van Wt en *Xpc*^{-/-} mannelijke muizen (**hoofdstuk 4**). Omdat *Xpc*^{-/-} muizen gebrekkig zijn in GGR/NER, wat wordt beschouwd als één van de belangrijkste beschermingsmechanismen tegen B[a]P-geïnduceerde DNA-schade, verwachtten we een andere (adaptieve) transcriptionele reactie in deze muizen in vergelijking met Wt muizen om te compenseren voor het gebrek aan DNA-herstelactiviteit. Hoewel genexpressieniveaus sterk vergelijkbaar waren in onbehandelde Wt en *Xpc*^{-/-} muizen en B[a]P vergelijkbare genexpressieveranderingen induceerde in de muizen van beide genotypen, verschilde de mate waarin deze B[a]P-gereguleerde genen tot expressie kwamen aanzienlijk tussen Wt en *Xpc*^{-/-} muizen ($p = 0,00000141$), met in totaal een hogere expressie in *Xpc*^{-/-} muizen in vergelijking met Wt muizen. Deze verschillen werden voornamelijk gevonden in de regulering van de celcyclus, maar ook op het niveau van de translatie, chromatine structuur en de spermatogenese, wat inderdaad indicatief is voor een algemene reactie op cellulaire stress. Uit analyse van de celcyclusfase-afhankelijke genexpressie bleek dat de expressie van genen die betrokken zijn bij de G1/S- en G2/M-controle was toegenomen na B[a]P-blootstelling in beide genotypen.

Een iets hogere inductie van de gemiddelde genexpressie werd waargenomen bij de G2/M-controle in *Xpc*^{-/-} muizen, maar dit bleek statistisch niet significant ($p = 0,086$). Statistische significantie werd bereikt wanneer de analyse werd uitgevoerd op alleen hoger gereguleerde genen binnen deze fase ($p = 0,024$), waarbij een hogere inductie van de G2/M-controlegenen in *Xpc*^{-/-} muizen werd aangetoond. Dit geeft aan dat de aanwezigheid van niet-herstelde DNA-schade in testis de celproliferatie blokkeert om zo de integriteit van het DNA in zowel Wt als *Xpc*^{-/-} muizen te beschermen, wat een normale reactie is die niet afwijkt van somatische cellen. Het verschil tussen de Wt en *Xpc*^{-/-} muizen in B[a]P-geïnduceerde genexpressieniveaus binnen de G2/M-controle kan mogelijk worden toegeschreven aan meer ernstig beschadigde cellen in de testes van *Xpc*^{-/-} muizen in plaats van een sterkere reactie in elke individuele cel. Niet-herstelde DNA-schade kan de celcyclus blokkeren in de late S-fase, totdat het wordt voorbijgegaan in een fout-vrije of fout-inducerende manier met vervolgens progressie van de celcyclus en spermatogenese. Uiteindelijk lijken geslachtscellen hun proliferatie zelfs in de aanwezigheid van DNA-schade te continueren, omdat we eerder hebben vastgesteld dat DNA-adducten kunnen worden meegedragen tijdens de spermatogenese (**hoofdstuk 3**). Y-familie

polymerasen kunnen de door DNA-schade geblokkeerde replicatievorken passeren. Polymerase κ komt bijvoorbeeld hoog tot expressie in geslachtscellen en kopieert door B[a]P beschadigd DNA in een fout-vrije manier. Onbeschadigde of minder beschadigde cellen waarvan de DNA-schade nog steeds kan worden verwijderd, wat waarschijnlijk het geval is in Wt muizen, kunnen de celcyclus makkelijker continueren en tonen als gevolg een lager expressieniveau van de G2/M-controle genen.

Andere processen die werden verwacht te zijn veranderd door de blootstelling, zoals apoptose en andere DNA-herstelprocessen dan GGR/NER, werden niet gedifferentieerd op het niveau van genexpressie. Echter, dit betekent niet dat deze processen niet beïnvloed werden door de B[a]P-blootstelling. Andere aspecten kunnen een rol hebben gespeeld bij de activatie van apoptose; 1) het grote aantal apoptotische cellen in de normale testis zal het moeilijk maken om subtiele veranderingen in de apoptotische respons na een B[a]P-blootstelling te meten, 2) de apoptotische respons na B[a]P-blootstelling is een acute respons die waarschijnlijk moeilijk is vast te stellen 4 dagen na de blootstelling, en 3) de activering van verschillende caspases die leiden tot fragmentatie van het DNA gebeurt door splitsing van pro-caspases die reeds zijn opgeslagen in de cel; een proces dat waarschijnlijk niet te meten is op transcriptioneel niveau [8]. Dit laatste aspect kan ook het geval zijn voor DNA-herstelmechanismen, die ook afhankelijk zijn van activering en transport van al aanwezige eiwitten.

Mutagene effecten van benzo(a)pyreen in spermacellen

B[a]P werd uitgebreid bestudeerd sinds haar ontdekking in 1930 en het is duidelijk dat B[a]P DNA-beschadigende en mutagene effecten heeft. Het is echter minder duidelijk of B[a]P *in vivo* mutaties induceert in geslachtscellen. In **hoofdstuk 3** vonden we dat B[a]P-geïnduceerde DNA-adducten in spermatogoniale stamcellen van blootgestelde mannelijke muizen niet volledig waren verwijderd binnen 42 dagen na de blootstelling. Dit geeft aan dat DNA-schade aanwezig is tijdens de mitotische expansie van geslachtscellen en de daaropvolgende meiose, waarin de mogelijkheid bestaat dat DNA-schade wordt omgezet in erfelijke genmutaties. Bovendien suggereerden recente studies met dieren blootgesteld aan verontreinigde omgevingslucht, dat PAK's mutageen kunnen zijn in mannelijke geslachtscellen [9, 10]. Daarom hebben we in **hoofdstuk 5** onderzocht of B[a]P in staat was om genmutaties te induceren in de testis en spermacellen van Wt en *Xpc*^{-/-} muizen. Om dit te onderzoeken gebruikten we muizen die een plasmide-gebaseerde shuttlevector bevatten met meerdere kopieën van het *lacZ*-reportergen geïntegreerd in een nek-aan-staart-organisatie in hun genoom [11]. Het gebruik van dit transgene muismodel maakt het kwantificeren en karakteriseren van mutaties in de verschillende organen en weefsels mogelijk gedurende de levensduur van een dier, en laat de detectie van deleties, puntmutaties en chromosomale herschikkingen toe. DNA-beschadigingen veroorzaakt door B[a]P zijn voornamelijk puntmutaties, en daarom is dit model geschikt om de mutagene effecten van B[a]P in de reproductieve weefsels en spermacellen te beoordelen in een *in vivo* situatie. De bruikbaarheid van dit diermodel werd ook aangetoond door een positieve reactie bij dieren die blootgesteld werden aan de bekende kiemcelmutagene stof ethylnitrosourem (ENU).

Muizen werden 6 weken na de laatste B[a]P-blootstelling opgeofferd om geslachtscellen te verkrijgen uit blootgestelde spermatogoniale stamcellen.

Succesvolle blootstelling werd bevestigd door een dosis- en tijdsafhankelijke toename in mutantfrequentie in het bekende doelorgaan de milt, met hogere mutantfrequenties in *Xpc*^{-/-} muizen in vergelijking met Wt muizen. Hoewel B[a]P-gerelateerde DNA-adducten werden gedetecteerd in testes, werden geen verhoogde mutantfrequenties in dit weefsel teruggevonden. Aan de andere kant, B[a]P verhoogde de mutantfrequenties wel in het sperma van Wt muizen na 6 weken blootstelling, terwijl een dergelijke stijging niet werd teruggevonden in *Xpc*^{-/-} muizen. Deze resultaten waren in tegenstelling tot wat we veronderstelden, omdat werd verwacht dat de *Xpc*^{-/-} muis een gevoeliger model zou zijn voor het bestuderen van mutatie-inductie [12]. Daarbij waren de DNA-adductniveaus in *Xpc*^{-/-} muizen significant hoger op dag 42 na een eenmalige blootstelling (die spermatogonale stamcellen vertegenwoordigen) in vergelijking met Wt muizen (**hoofdstuk 3**). Er moet nog worden onderzocht waarom *Xpc*^{-/-} muizen niet ontvankelijk waren voor de inductie van mutanten na B[a]P-blootstelling. Wij vermoeden dat cytotoxiciteit geïnduceerd door B[a]P in de ontwikkelende geslachtscellen een rol kan spelen bij het ontbreken van de mutagene effecten in de *Xpc*^{-/-} muizen. Eerdere studies toonden aan dat hoge blootstelling aan B[a]P kan leiden tot onvruchtbaarheid als gevolg van cytotoxiciteit van B[a]P voor spermatogonia [13]. In onze studie werd geen steriliteit geïnduceerd, aangezien de blootgestelde muizen nakomelingen produceerden. Echter, dezelfde 6 weken blootstelling toegediend aan de voor DNA-schade gevoeliger *Xpc*^{-/-} muizen resulteerde wel in een aanzienlijke daling van het aantal nakomelingen, wat een indicatie voor cytotoxiciteit kan zijn. Bovendien kan zich een selectie van de cellen hebben voorgedaan door begunstiging van deze cellen die niet zwaar werden beschadigd en als gevolg daarvan kunnen geen verhoogde mutantfrequenties worden opgespoord. Het is interessant voor toekomstige studies om te onderzoeken of DNA-schade inderdaad niet homogeen verspreid is over de testis, die een selectie van minder beschadigde cellen mogelijk zou maken.

Histopathologische analyse van de testis zal worden uitgevoerd om deze hypothese te bevestigen en toekomstige studies moeten uitwijzen of blootstelling aan B[a]P ook de nestgrootte (worpen) van Wt mannelijke muizen vermindert. Voor nu kunnen we concluderen dat B[a]P genmutaties kan induceren in spermatogonale stamcellen van muizen. Het is waarschijnlijk dat deze mutaties worden doorgegeven aan het nageslacht, omdat ze werden ontdekt in volgroeide spermatozoa die aanwezig waren in de epididymen en voorbereid waren voor conceptie. Alleen selectie tijdens of na de bevruchting kan het bestaan van deze mutaties in het nageslacht voorkomen.

Erfelijke mutaties in het nageslacht van muizen

Hoewel we hebben aangetoond dat B[a]P mutaties kan induceren in spermatogonale stamcellen (**hoofdstuk 5**) blijft het onduidelijk of deze mutaties worden doorgegeven aan het nageslacht. Deze mogelijkheid kan afhangen van de dosis en de blootstellingsduur die de kiemcellen aantasten; een hoge dosis en een lange-termijn blootstelling aan B[a]P kunnen cytotoxisch zijn voor geslachtscellen [13]. In **hoofdstuk 5** vonden we dat mutaties die geïnduceerd werden in spermatogonale stamcellen nog aanwezig zijn in volgroeide spermatozoa uit de epididymen van Wt muizen, maar niet van *Xpc*^{-/-} muizen. De combinatie van blootstelling,

blootstellingsduur en de genetische achtergrond van het diermodel kan dus van invloed zijn op de uitkomst van het experiment.

Het is onwaarschijnlijk dat het *lacZ*-muismodel kan worden gebruikt om mutaties te bestuderen in het nageslacht, omdat de mutantfrequentie te laag is en een te groot aantal nakomelingen nodig zou zijn om de overdracht van deze mutaties met voldoende statistische kracht op te sporen. Daarom hebben we gebruik gemaakt van een gevoelige methode om zogenaamde Expanded Simple Tandem Repeat (ESTR) mutatiefrequenties in DNA-profielen van de nakomelingen te analyseren, welke is beschreven in **hoofdstuk 2**, in combinatie met het DNA-herstedeficiënte (*Xpc*^{-/-}) muismodel. De analyse van ESTR-mutaties blijkt een succesvolle methode te zijn voor de analyse van overdraagbare mutaties in de nakomelingen van dieren en mensen (zie **hoofdstuk 2**). In vergelijking met de klassieke mutageniteitstesten is de analyse van ESTR-mutaties een gevoeliger methode dat minder dieren eist, minder tijd in beslag neemt en meer kosteneffectief is. Echter, de nadelen van deze test zijn dat slechts enkele laboratoria zijn uitgerust om de analyse uit te voeren, dat het mutatie-inductie meet in niet-coderend DNA zonder fenotypische effecten, en dat het mechanisme van mutatie-inductie grotendeels nog onbekend is. Verondersteld wordt dat Tandem Repeat mutaties ontstaan door een indirect mechanisme van mutatie-inductie [14]. Toch hebben we gekozen voor deze methode, omdat het succesvol is toegepast als een kiembaanmutageniteitstest.

De resultaten van deze experimentele studie toonden aan dat B[a]P-blootstelling de ESTR-mutatiefrequenties niet verhogen in nakomelingen van B[a]P-blootgestelde mannelijke *Xpc*^{-/-} muizen in vergelijking met de nakomelingen van de mannelijke controlemuizen ($p = 0,91$, **hoofdstuk 6**). In feite, vaderlijke en moederlijke mutatiefrequenties waren zelfs 1,4 keer hoger bij de nakomelingen van de mannelijke controlemuizen. Hoewel deze resultaten in overeenstemming zijn met het gebrek aan respons, gevonden in **hoofdstuk 5** en een correlatie werd gevonden tussen ESTR-mutaties en *lacZ*-mutantfrequenties, moet nog worden opgehelderd waarom het *Xpc*^{-/-} muismodel niet reageert in de richting van mutatie-inductie in reproductieve weefsels na B[a]P-blootstelling. We hebben al verondersteld dat het ontbreken van een reactie wordt veroorzaakt door B[a]P-geïnduceerde cytotoxiciteit in de geslachtscellen, aangezien het aantal nakomelingen significant lager was na de B[a]P-blootstelling in vergelijking met de controlegroep. Bovendien namen de DNA-adductniveaus in testis af na 6 weken chronische blootstelling in vergelijking tot 4 weken chronische blootstelling, terwijl een verdere ophoping van DNA-schade werd verwacht. Dit veronderstelt dat testis en geslachtscellen met hoge DNA-schadeniveaus apoptose/necrose ondergaan en zodoende de DNA-adductniveaus en mogelijk ook het aantal mutaties verlagen. Aan de andere kant, de apoptotische pathway werd niet als gedifferentieerd gevonden op het niveau van de genexpressie (**hoofdstuk 4**) na acute blootstelling aan een enkele dosis B[a]P. Derhalve kan niet worden uitgesloten dat er andere processen betrokken zijn bij dit gebrek aan effect. Bijvoorbeeld, genexpressie-analyse toonde ook dat B[a]P-blootstelling invloed heeft op de mitochondriële functie en oxidatieve fosforylering, die indicatief zijn voor een verminderde beweeglijkheid en bevruchtend vermogen van het sperma (**hoofdstuk 4**). Van B[a]P-blootstelling is inderdaad bekend dat het de spermatogenese beïnvloed door verminderde beweeglijkheid en lagere spermaconcentraties. Maar ook epigenetische veranderingen die het methyleringspatroon aanpassen kunnen de

spermatogenese en daarmee de kwaliteit en het bevruchtend vermogen van de geslachtscellen beïnvloeden [15].

Voor toekomstige studie's is het aan te bevelen om het aantal nakomelingen uit te breiden, omdat dit de betrouwbaarheid van de resultaten verbetert. Ten minste 100, maar bij voorkeur meer nakomelingen dienen per groep te worden getest om significante resultaten te behalen. Helaas was dit aantal niet bereikt in deze experimentele studie waarin 55 en 65 nakomelingen, in respectievelijk de B[a]P-blootgestelde en controlegroep, werden getest. Aangezien een significante *lacZ*-mutantinductie werd gevonden in spermacellen na 6 weken blootstelling en 6 weken herstel, wordt ook voorgesteld om de vorming van B[a]P-geïnduceerde kiembaanmutaties in het nageslacht van de blootgestelde Wt muizen te bestuderen. Deze resultaten kunnen verder uitwijzen of B[a]P inderdaad kan worden geclassificeerd als een kiembaanmutageen, die de gezondheid van het nageslacht aantast.

Algemene conclusie

Uit de resultaten van dit proefschrift kan worden geconcludeerd dat B[a]P DNA-beschadigende effecten bezit in de testis en met name mannelijke geslachtscellen, en dat XPC, een belangrijk eiwit in GGR/NER, een belangrijke rol speelt in de efficiënte verwijdering van B[a]P-geïnduceerde DNA-adducten in deze geslachtscellen. Desalniettemin, in antwoord op B[a]P-blootstelling waren de genexpressieveranderingen relatief hetzelfde in testes van Wt en *Xpc*^{-/-} muizen, waaruit blijkt dat voornamelijk de celcyclus is geblokkeerd om extra tijd te geven voor herstel. Aangezien *Xpc*^{-/-} muizen gebrekkig zijn in het meest belangrijke herstelmechanisme voor B[a]P-geïnduceerde DNA-schade, is de celcyclus meer tegengehouden in testes van *Xpc*^{-/-} muizen dan van Wt muizen, met name in de overgang van de G2-fase naar de M-fase.

B[a]P-geïnduceerde mutatie-inductie werd alleen waargenomen in spermacellen van blootgestelde Wt muizen, wat in feite neerkomt op kiembaanmutaties in spermatogoniale stamcellen. Onze resultaten werden onlangs bevestigd in een artikel van Olsen *et al.*, waarin zij aantoonde dat *de novo* mutaties waren geïnduceerd in spermatozoa, afkomstig van B[a]P-blootgestelde (3 x 50 mg/kg bw) spermatogonia [16]. Karakterisering van de mutaties uit blootgestelde spermatogonia toonde verhoogde niveaus van GC-TA transversies, die voornamelijk worden geproduceerd door B[a]P-geïnduceerde DNA-schade. In onze studies leken *Xpc*^{-/-} muizen te gevoelig voor een subchronische blootstelling aan B[a]P, die heeft kunnen leiden tot cytotoxiciteit. Toekomstig onderzoek dient het aantal geteste nakomelingen uit te breiden en erfelijke mutaties in de nakomelingen van aan B[a]P-blootgestelde mannelijke muizen verder te evalueren.

Referenties

1. Klein, J.C., Beems, R.B., Zwart, P.E., Hamzink, M., Zomer, G., van Steeg, H. and van Kreijl, C.F. (2001) Intestinal toxicity and carcinogenic potential of the food mutagen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in DNA repair deficient XPA^{-/-} mice. *Carcinogenesis*, **22**, 619-626.
2. Zenzes, M.T., Puy, L.A., Bielecki, R. and Reed, T.E. (1999) Detection of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts in embryos from smoking couples: evidence for transmission by spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, **5**, 125-131.
3. Srm, R.J., Binkov, B., Rssner, P., Rubes, J., Topinka, J. and Dejmek, J. (1999) Adverse reproductive outcomes from exposure to environmental mutagens. *Mutation research*, **428**, 203-215.
4. Ahmadi, A. and Ng, S.C. (1999) Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *Journal of experimental zoology*, **284**, 696-704.
5. Dix, D.J. (1997) Hsp70 expression and function during gametogenesis. *Cell stress & chaperones*, **2**, 73-77.
6. Smith, M.L. and Fornace, A.J., Jr. (1996) The two faces of tumor suppressor p53. *The American journal of pathology*, **148**, 1019-1022.
7. Rotter, V., Schwartz, D., Almon, E., Goldfinger, N., Kapon, A., Meshorer, A., Donehower, L.A. and Levine, A.J. (1993) Mice with reduced levels of p53 protein exhibit the testicular giant-cell degenerative syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 9075-9079.
8. Boatright, K.M. and Salvesen, G.S. (2003) Mechanisms of caspase activation. *Current opinion in cell biology*, **15**, 725-731.
9. Somers, C.M., Yauk, C.L., White, P.A., Parfett, C.L. and Quinn, J.S. (2002) Air pollution induces heritable DNA mutations. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 15904-15907.
10. Somers, C.M., McCarry, B.E., Malek, F. and Quinn, J.S. (2004) Reduction of particulate air pollution lowers the risk of heritable mutations in mice. *Science*, **304**, 1008-1010.
11. Dolle, M.E., Martus, H.J., Gossen, J.A., Boerrigter, M.E. and Vijg, J. (1996) Evaluation of a plasmid-based transgenic mouse model for detecting in vivo mutations. *Mutagenesis*, **11**, 111-118.
12. Melis, J.P., Wijnhoven, S.W., Beems, R.B., Roodbergen, M., van den Berg, J., Moon, H., Friedberg, E., van der Horst, G.T., Hoeijmakers, J.H., Vijg, J. and van Steeg, H. (2008) Mouse models for xeroderma pigmentosum group A and group C show divergent cancer phenotypes. *Cancer Res*, **68**, 1347-1353.
13. Revel, A., Raanani, H., Younglai, E., Xu, J., Han, R., Savouret, J.F. and Casper, R.F. (2001) Resveratrol, a natural aryl hydrocarbon receptor antagonist, protects sperm from DNA damage and apoptosis caused by benzo(a)pyrene. *Reprod Toxicol*, **15**, 479-486.
14. Yauk, C.L., Berndt, M.L., Williams, A., Rowan-Carroll, A., Douglas, G.R. and Stampfli, M.R. (2007) Mainstream tobacco smoke causes paternal germ-line DNA mutation. *Cancer Res*, **67**, 5103-5106.
15. Yauk, C., Polyzos, A., Rowan-Carroll, A., Somers, C.M., Godschalk, R.W., Van Schooten, F.J., Berndt, M.L., Pogribny, I.P., Koturbash, I., Williams, A., Douglas, G.R. and Kovalchuk, O. (2008) Germ-line mutations, DNA damage, and global hypermethylation in mice exposed to particulate air pollution in an urban/industrial location. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 605-610.
16. Olsen, A.K., Andreassen, A., Singh, R., Wiger, R., Duale, N., Farmer, P.B. and Brunborg, G. Environmental exposure of the mouse germ line: DNA adducts in spermatozoa and formation of de novo mutations during spermatogenesis. *PLoS ONE*, **5**, e11349.

