

# Hypoxia, oxidative stress, and benzo[a]pyrene induced carcinogenesis

## Citation for published version (APA):

Schults, M. A. C. (2012). *Hypoxia, oxidative stress, and benzo[a]pyrene induced carcinogenesis*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. BOXPress. <https://doi.org/10.26481/dis.20121211ms>

## Document status and date:

Published: 01/01/2012

## DOI:

[10.26481/dis.20121211ms](https://doi.org/10.26481/dis.20121211ms)

## 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](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

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

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

# **Nederlandse samenvatting**

Volgens berekeningen zijn er in 2008 wereldwijd ongeveer 12,7 miljoen nieuwe gevallen van kanker geconstateerd en zijn er dat jaar maar liefst 7,6 miljoen mensen overleden aan deze ziekte. Omdat de wereldbevolking groeit en vergrijsst en omdat in opkomende economiën slechte gewoontes zoals roken worden overnemen zal dit aantal de komende jaren alleen maar toenemen (1). Al sinds jaar en dag is bekend dat omgevingsfactoren zoals sigarettenrook, alcohol, voeding en blootstelling aan schadelijke stoffen op het werk de oorzaak zijn van het overgrote deel van het aantal doden als gevolg van kanker (2). Het merendeel van de kankerverwekkende stoffen (carcinogenen) dat aanwezig is in de omgeving moet eerst omgezet (gemetaboliseerd) worden tot een nieuwe stof voordat deze stoffen echt schadelijk zijn (3). Daarom kunnen veranderingen in het metabolisme van deze stoffen van invloed zijn op de carcinogeniciteit (de mate waarin een stof kanker kan veroorzaken) van een stof. Uit onderzoek is gebleken dat wanneer verschillende mensen worden blootgesteld aan dezelfde hoeveelheden van een carcinogene stof, er grote individuele verschillen worden waargenomen in de hoeveelheid schade aan het DNA (4). Er zijn verschillende endogene factoren (factoren aanwezig in het lichaam) die de carcinogeniciteit van carcinogenen kunnen beïnvloeden en zo iemands gevoeligheid bepalen. Zo is er al veel bekend over de effecten die polymorfismen (mutaties in het DNA die bij grote delen van de bevolking voorkomen) hebben op het metabolisme van carcinogenen. Er zijn echter meerdere endogene factoren die van invloed kunnen zijn op iemands gevoeligheid voor die carcinogenen, zoals de aanwezigheid van een ontsteking of oxidatieve stress (een overschot aan vrije radicalen en een tekort aan anti-oxidanten). Bovendien kunnen diezelfde factoren misschien van invloed zijn op het herstel van de schade die veroorzaakt wordt door de carcinogenen.

## **Introductie en doelstellingen van dit proefschrift**

Benzo[a]pyreen (BaP) is een carcinogeen dat in grote mate om ons heen aanwezig is. Dat komt omdat het ontstaat bij incomplete verbranding. Zo is het aanwezig in uitlaatgassen, sigarettenrook en verbrand vlees. BaP is een lipofiele stof. Hierdoor passeert het gemakkelijk het celmembraan. Eenmaal in het cytoplasma van de cel bindt het zich aan de aryl hydrocarbon receptor (AhR), waarna het zich samen verplaatst naar de celkern. In de celkern bindt het zich aan de aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) en activeert het de genexpressie van bepaalde genen door zich te binden aan het DNA. Deze route staat bekend als de AhR-pathway. BaP staat vooral bekend om zijn vermogen om zijn eigen metabolisme te stimuleren door het induceren van de expressie van de cytochroom P450 isovormen CYP1A1 en CYP1B1, twee van de belangrijkste enzymen in de detoxificatie en activatie van BaP (5). Het detoxificatieproces van BaP kan grofweg verdeeld worden in twee fasen. Tijdens fase I wordt er een epoxide groep aan BaP gebonden door CYP1A1 en CYP1B1. De resulterende metaboliëten kunnen dan tijdens fase II geconjugeerd worden doordat er een sulfaat, glutathion of glucuronide zuur aan gebonden wordt. De ontstane metaboliëten is oplosbaar in water en kan zo makkelijk verwijderd worden uit het lichaam. Dit proces wordt gestuurd door de zogenoemde fase II-enzymen (6). BaP kan echter ook omgezet worden tot BaP-7,8-dihydroxy-9,10-epoxide (BPDE), wat aan het

DNA bindt en zogenoemde DNA-adducten vormt. Deze adducten moeten verwijderd worden door het *nucleotide excision repair* (NER)-mechanisme. Als deze adducten echter niet verwijderd worden, kunnen er mutaties in het DNA ontstaan die uiteindelijk tot kanker kunnen leiden.

In dit proefschrift ligt de focus van het onderzoek op twee endogene zuurstof-gerelateerde factoren (hypoxie, ofwel een tekort aan zuurstof, en oxidatieve stress). Uit eerder onderzoek is gebleken dat deze factoren van invloed zouden kunnen zijn op het metabolisme van carcinogenen (7) en het herstel van DNA-schade (8). Ons doel was om deze factoren verder te onderzoeken en de biologische significantie van deze factoren (door het veranderen van het metabolisme van carcinogenen en het herstel van DNA-schade) op het ontstaan van kanker te bewijzen.

De eerste endogene factor die we onderzocht hebben is hypoxie. Hypoxie, of meer specifiek, de stabilisatie van het hypoxia-inducible factor  $\alpha$  (HIF $\alpha$ ) eiwit is sterk geassocieerd met meerdere vormen van kanker zoals long- (9), lever- (10) en baarmoederhals- en borstkanker (11) en is van invloed op iemands prognose. Als er voldoende zuurstof aanwezig is, worden hydroxylgroepen aan HIF $\alpha$  gebonden door prolyl-4-hydroxylase (12). Het gehydroxyleerde HIF $\alpha$  wordt daarop herkend door een ubiquitine ligase complex dat het von Hippel-Lindau-eiwit (VHL) bevat. Na binding van VHL wordt HIF $\alpha$  afgebroken (13). Hypoxie voorkomt daartegen de hydroxylase-activiteit waardoor HIF $\alpha$  niet wordt afgebroken, maar zich verplaatst naar de celkern, waar het zich aan ARNT bindt en HIF1 vormt (14). HIF1 bindt zich hierna aan het DNA waar het de transcriptie van een groot aantal genen verhoogt. Dit proces staat bekend als de HIF-pathway. Deze veranderingen in genexpressie zijn cruciaal voor om de cel te laten overleven.

In dit proefschrift onderzochten we verschillende manieren van hypoxie-geïnduceerde carcinogeniciteit, maar de belangrijkste focus lag op het feit dat beide pathways ARNT nodig hebben en er dus sprake kan zijn van competitie tussen de twee pathways. Daarnaast onderzochten we het effect van HIF $\alpha$ -stabilisatie op de herstel van BaP-geïnduceerde schade door NER. Omdat veranderingen in de zuurstofconcentraties kan resulteren in veranderingen in oxidatieve stress (15,16), hebben we onderzocht of oxidatieve stress een tweede endogene factor kan zijn die van invloed is op het metabolisme van carcinogenen en op het herstel van de carcinogeen-geïnduceerde schade.

## Hypoxie en BaP-geïnduceerde DNA-schade

In dit proefschrift introduceren we een nieuw mechanisme waarbij HIF $\alpha$ -stabilisatie het carcinogeenmetabolisme moduleert. Dit kan een belangrijk mechanisme zijn in de carcinogeniteit van carcinogenen, aangezien HIF $\alpha$  al kan stabiliseren in de beginfase van de ontwikkeling van kanker. Dit komt omdat groeifactoren (17), activatie van oncogene en deactivatie van tumorsuppressorgenen (18) en de aanwezigheid van zuurstofradicalen de HIF-pathway kunnen activeren (19). Bovendien kunnen veranderingen in het metabolisme van carcinogenen waar we continu blootgesteld aan worden van grote invloed zijn op het ontstaan van kanker. Daarom kan ons voorgestelde mechanisme van groot belang zijn voor de preklinische stadia van de

ontwikkeling van kanker. In de eerste drie hoofdstukken van dit proefschrift hebben we genexpressie, BaP-metabolisme, de vorming van BaP-metabolieten en DNA-schade onderzocht en bepaald wat het effect is van drie verschillende manieren van HIF $\alpha$ -stabilisatie: CoCl<sub>2</sub> (**hoofdstuk 2**), hypoxie (**hoofdstuk 3**), en von Hippel-Lindau (VHL)-deficiëntie (**hoofdstuk 4**). In **hoofdstuk 2** zijn A549-cellen afkomstig van een longcarcinoom gelijktijdig blootgesteld aan BaP (om de AhR-pathway te activeren), en CoCl<sub>2</sub> (om de HIF-pathway te activeren). Analyse gaf aan dat het activeren van de HIF-pathway de mRNA niveaus reduceert van de AhR-pathway genen CYP1A1 en CYP1B1. Bovendien is er minder AhR gebonden aan ARNT als de HIF-pathway wordt geïnduceerd. Deze resultaten toonden aan dat de activatie van de HIF-pathway effect heeft op de AhR-pathway. Naast het onderzoek naar het niveau van competitie tussen deze twee pathways zoals andere studies al eerder hebben gedaan (20,21), hebben we ook gekeken naar de biologische significantie van deze competitie. Dit was namelijk tot op heden nog niet aangetoond. Hiervoor hebben we het effect van genetische instabiliteit bepaald door het meten van de hoeveelheid gemuteerde cellen, DNA-breuken en BPDE-DNA adducten. De resultaten zoals beschreven in dit proefschrift laten zien dat de hoeveelheid BaP-geïnduceerde mutante cellen en de hoeveelheid DNA-breuken significant hoger zijn als de HIF-pathway wordt geactiveerd, wat aangeeft dat veranderingen van het metabolisme van carcinogenen een belangrijk mechanisme kunnen zijn voor de in andere onderzoeken waargenomen HIF-gemedieerde genetische instabiliteit (22,23).

Behalve de competitie voor ARNT zijn er echter ook andere mechanismen zijn die de HIF gemoduleerde BaP-genotoxiciteit bepalen. Zo zagen wij bijvoorbeeld dat het niveau van het BPDE-DNA-adduct slechts tussen de 20 en 50% verhoogd was als de HIF-pathway was geïnduceerd ten opzichte van BaP alleen, terwijl de hoeveelheid BaP-geïnduceerde mutaties 10 tot 20 maal hoger waren wanneer de HIF1 pathway was geactiveerd. Om mogelijke andere mechanismen te onderzoeken die betrokken zijn bij HIF-geïnduceerde BaP-carcinogeniciteit, hebben we in **hoofdstuk 3** de rol van zuurstof in de activatie en detoxificatie van BaP onderzocht. A549-cellen werden op vergelijkbare wijze behandeld als in het voorgaande hoofdstuk, maar dit keer werden de cellen blootgesteld aan verschillende concentraties zuurstof. Zuurstofconcentraties in het menselijk lichaam variëren sterk tussen de verschillende weefsels. Over het algemeen liggen ze tussen de 2 tot 9%, met uitzondering van sommige weefsels zoals de thymus en de retina, waar de zuurstofconcentratie op slechts 1% ligt (24). Daarom hebben we gekozen voor een concentratie van 0,2% zuurstof. Deze is representatief voor hypoxische omstandigheden.

In deze experimenten zagen we een toename in de genexpressie van fase I-enzymen. Dit is een indicatie voor een verhoogd BaP-metabolisme tijdens hypoxie, terwijl de waargenomen verminderde genexpressie van fase II-enzymen een verminderde verwijdering van de BaP-metabolieten aangeeft. Over het algemeen betekent dit een mogelijk verhoogd metabolisme, wat resulteert in een verhoogde vorming van BPDE. Uit onze gegevens bleek echter dat de cellen onder hypoxische condities een verminderde capaciteit hebben om BaP te metaboliseren, wat resulteerde in lagere hoeveelheden metabolieten die aanwezig zijn. De precursor metaboliet (BaP-7,8-dihydrodiol) van de reactieve metaboliet BPDE was echter in hogere concentraties in

de cel aanwezig. Dit toont aan dat de vastgestelde genexpressiepatronen de waargenomen metabole veranderingen niet volledig verklaren. Desalniettemin toonden we aan dat het verminderde BaP-metabolisme, maar geïnduceerde BaP-7,8-dihydrodiol vorming onder hypoxie leidde tot een accumulatie van BPDE-DNA-adducten over een periode van 168 uur, terwijl adducten efficiënt werden verwijderd bij 20% zuurstof.

Ross *et al.* toonden aan dat de tijd waarin BPDE-DNA-adducten aanwezig zijn in de cellen geassocieerd wordt met een verhoogde tumorvorming (25). Omdat in ons experiment de adducten onder hypoxische condities voor een langere tijd aanwezig zijn in vergelijking met niet-hypoxische condities, suggereert dit dat er een verhoogd risico is op BaP-geïnduceerde carcinogenese onder hypoxische condities. Naast de competitie voor ARNT, zoals aangetoond in **hoofdstuk 2**, tonen we in **hoofdstuk 3** aan dat hypoxie het carcinogeenmetabolisme in de richting van een meer toxische metaboolpatroon stuurt en dat de veranderde kinetiek van het metabolisme leidt tot meer blootstelling aan deze metabolieten. Dit resulteert vervolgens in een verhoogde adductvorming. Deze gegevens ondersteunen het idee dat de modulatie van het carcinogeenmetabolisme een belangrijk extra mechanisme is in de waargenomen HIF $\alpha$ -gemedieerde genetische instabiliteit.

In **hoofdstuk 4** hebben we geprobeerd te bepalen of het eerder vastgestelde mechanisme ook geldt in een HIF $\alpha$ -gestabiliseerde cellijn. Daarom hebben we cellen van een niercelcarcinoom (RCC) gebruikt die een niet-functionerend VHL-gen hebben. Deze werden vergeleken met RCC-cellen waar een functionerend VHL-gen in terug was gebracht (RCC4-VHL-cellen). Het niet-functioneren van het VHL-tumorsuppressoreiwit resulteert in de stabilisatie van HIF $\alpha$  ongeacht de zuurstofconcentratie en het is bekend dat de meeste RCCs een mutatie hebben in het VHL-gen (26). De resultaten uit dit proefschrift laten zien dat CYP1A1 mRNA-niveaus sterk zijn afgenomen in de RCC4-VHL-cellen in vergelijking met HIF $\alpha$ -gestabiliseerde RCC4-cellen. De mRNA-niveaus van CYP1B1 werden daarentegen niet beïnvloed door het verlies van VHL. Dit geeft aan dat CYP1A1 de belangrijkste speler is in het carcinogeenmetabolisme in RCC-cellen. HPLC-analyse toonde aan dat door het verlies van VHL het BaP-metabolisme vermindert, terwijl er wel hogere niveaus van BaP-7,8-dihydroxydiol aanwezig zijn (de precursormetabooliet van BPDE). Deze verandering in het carcinogeenmetabolisme resulteert in een verhoogd aantal BPDE-DNA-adduct in HIF $\alpha$  gestabiliseerde cellen. Al deze gegevens tonen aan dat het verlies van VHL van invloed is op BaP-gemedieerde genotoxische reacties in RCC. Dit ondersteunt onze hypothese dat HIF $\alpha$ -stabilisatie carcinogeenmetabolisme beïnvloedt.

De drie studies uitgevoerd in dit proefschrift tonen op verschillende manieren aan dat HIF $\alpha$ -stabilisatie carcinogeenmetabolisme moduleert. Om dit mechanisme verder te ontfaan, zijn er uiteraard meer studies nodig. Omdat we in ons onderzoek zagen dat de genexpressie van fase I-enzymen verminderd was na behandeling met CoCl<sub>2</sub>, maar geïnduceerd onder hypoxische omstandigheden, moet allereerst de invloed van specifieke genen in het BaP-metabolisme beter worden bepaald. Bovendien leek veranderde genexpressie van fase II-enzymen onder echte hypoxie het BaP-metabolisme te beïnvloeden, maar was dat niet het geval toen er sprake was van VHL-deficiëntie. Het uitschakelen van specifieke genen zal meer inzicht geven in de werking

van deze genen en hun invloed op het carcinogeenmetabolisme onder omstandigheden waarin HIF $\alpha$  gestabiliseerd is. Voorts hebben we waargenomen dat onder hypoxische omstandigheden het BaP-metabolisme vermindert. Dit resulteerde in verminderde metabolietvormen (behalve bij de voorloper van BPDE). Om bovendien volledig te begrijpen wat de fysiologische impact is van het gewijzigde carcinogeenmetabolisme, moeten onze resultaten bevestigd worden in een diermodel. Ten slotte kunnen toekomstige studies onderzoek doen naar het effect van HIF $\alpha$ -stabilisatie op andere carcinogenen, te beginnen bij andere polycyclische koolwaterstoffen en dat verder uitbreiden naar andere carcinogenen.

## Hypoxie en verminderde nucleotide excision repair

Adduct-niveaus van BPDE-DNA zijn altijd een evenwicht tussen het ontstaan van de schade en het herstel ervan. Daarom onderzochten we het effect van HIF $\alpha$ -stabilisering op het herstel van BPDE-DNA-adducten door NER; de belangrijkste route voor het verwijderen van deze DNA-adducten. Hoewel het bekend is dat hypoxie DNA-herstelmechanismen kan remmen, is er verrassend weinig bekend over het effect van hypoxie op NER. In **hoofdstuk 2** hebben we al gesuggereerd dat HIF $\alpha$ -stabilisatie zou kunnen leiden tot verminderde NER, omdat uit onze gegevens bleek dat het niveau van enkelstrengsbreuken die tijdens het herstel van deze adducten ontstaan, lager is wanneer de HIF-pathway wordt geïnduceerd. In **hoofdstuk 4** werden de waargenomen veranderingen in NER als gevolg van de stabilisatie van HIF $\alpha$  verder bekeken. De gegevens toonden in RCC-cellen met een niet werkend VHL-eiwit aan dat het verlies van VHL-functie geen effect heeft op de genexpressie van NER-genen, maar dat het vermogen om BPDE-DNA adducten te herstellen in de HIF $\alpha$ -gestabiliseerde RCC4-cellen aanmerkelijk verminderd is. Dit bevestigt onze eerdere observatie in cellen waarin HIF $\alpha$  is gestabiliseerd door CoCl<sub>2</sub> beschreven in **hoofdstuk 2**. Ineffectief herstel van adducten kan leiden tot een verhoogde gevoeligheid van kanker, zoals is aangetoond in een muizensoort waarin NER niet meer werkte. In deze muizen werd een verhoogde tumorvorming in de longen waargenomen nadat ze blootgesteld waren aan BaP (27). Bovendien lopen mensen met een verminderde NER-capaciteit een groter risico om kanker te ontwikkelen, zoals prostaatkanker (28) en borstkanker (29). Aangezien mutaties in VHL aanwezig zijn in de meeste niercarcinoma, kan de beperkte capaciteit van NER verantwoordelijk zijn voor verhoogde gevoeligheid van niercellen met een gemuteerd VHL-gen aan carcinogenen. Dit kan vervolgens leiden tot (de vorming van) nierkanker.

## Oxidatieve stress en een verhoogde adductvorming

Omdat oxidatieve stress een belangrijke factor is in hypoxie-geïnduceerde carcinogenese (15), hebben wij onderzocht of oxidatieve stress zelf een effect kan hebben op het metabolisme en de carcinogeniteit van BaP. Zoals eerder aangegeven kunnen individuen verschillend reageren op dezelfde blootstelling aan BaP, waardoor individuele verschillen in BPDE-DNA adductniveaus waargenomen worden. Deze verschillen kunnen gedeeltelijk verklaard worden door genetische verschillen (30).

Hoewel het effect van polymorfismen op BPDE-DNA adduct-niveaus uitgebreid is bestudeerd en genen die betrokken zijn bij carcinogeen metabolisme (31), DNA herstel (32), en oxidatieve stress (33) zijn geïdentificeerd, wordt het niveau van blootstelling vaak onnauwkeurig bepaald in grote epidemiologische studies die de impact van de genetische variatie onderzoeken op DNA-schade of ziekte. Dit kan leiden tot misclassificatie en verzwakking van de onderliggende relaties. Daarom hebben we een *ex vivo*-studie uitgevoerd naar 34 polymorfismen op basis van *a priori*-kennis (34). We hebben polymorfismen geïdentificeerd die verantwoordelijk waren voor verschillen in BPDE-DNA adductniveaus. In **hoofdstuk 5** presenteren we een belangrijk genetisch polymorfisme in catalase (C-262T), die tot op heden niet is in verband gebracht met veranderde BPDE-DNA adductvorming. Dit polymorfisme in de promotor van catalase zorgde voor een verhoogde activiteit van catalase in individuen met het homozygote *variante catalase allel* in tegenstelling tot personen met het wild-type allel, wat resulteerde in verminderde oxidatieve stress. Interessant is dat de genexpressie van catalase sterk gecorreleerd is aan CYP1B1-expressie in lymfocyten en A549-cellen. Hoewel we niet volledig het mechanisme hebben kunnen verklaren, toonden knockdownexperimenten aan dat twee transcriptiefactoren (nuclear factor 1 (NF1) en nucleaire erythroïde 2-gerelateerde factor 2 (Nrf2) mogelijk een rol spelen in de waargenomen catalase-afhankelijke CYP1B1 genexpressie. Onze resultaten suggereren een model waarbij het polymorfisme in catalase de hoeveelheid intracellulaire catalase bepaalt en zo de expressie van CYP1B1 beïnvloedt door de hoeveelheid H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in de cellen te verminderen. Dit voorkomt vervolgens de afname van transcriptiefactoren die nodig zijn om genexpressie van CYP1B1-enzymen te induceren. Deze gegevens tonen aan dat oxidatieve stress van invloed kan zijn op verandering in het carcinogeenmetabolisme. Het voorgestelde mechanisme moet echter verder onderzocht worden. Wel kan de identificatie van gevoelige groepen die dit specifieke polymorfisme hebben, leiden tot een betere risicobeoordeling. Dit kan uiteindelijk resulteren in specifiek advies over leefstijlveranderingen of verlaging van blootstelling van deze specifieke groepen aan bepaalde carcinogenen.

### **Oxidatieve stress en een verminderd herstel van DNA adducten**

Het effect van oxidatieve stress op BaP-geïnduceerde DNA-schade kan niet alleen resulteren in verhoogde BPDE-DNA adduct vorming, maar net als bij HIF $\alpha$ -stabilisatie leiden tot verminderde NER-capaciteit. Er is eerder aangetoond binnen onze afdeling dat NER-activiteit aanzienlijk werd verminderd door *in vitro*-activatie van neutrofielen in longcellen (35) en dat dit vermoedelijk veroorzaakt werd door het ontstaan van oxidatieve stress na de influx van neutrofielen in het weefsel (8). Op basis van deze eerdere observaties wilden we onderzoeken of dit ook het geval was bij chronisch ontstoken lever. Daarom werd in **hoofdstuk 6** de rol van oxidatieve stress in schadeherkenning en DNA-herstel in steatotische levers van 35 ernstig obese patiënten met ofwel non-alcoholische steatohepatitis (NASH; ontstoken lever) of steatose (leververvetting) vergeleken met elkaar. Door gebruik te maken van een kleuring voor histon-2AX-fosforylering ( $\gamma$ H2AX) toonden we aan dat er sprake is van een verminderde herkenning van de schade in levers met hogere niveaus van



myeloperoxidase, een indicator voor influx van neutrofielen. Deze verminderde  $\gamma$ H2AX-vorming ging gepaard met een significante afname van de NER-capaciteit. Onze resultaten bevestigen dus de eerdere bevindingen dat de influx van neutrofielen leidt tot een verminderde NER-activiteit. Dit zou een rol kunnen spelen bij het ontstaan van kanker. Deze patiënten zouden kunnen profiteren van een betere behandeling van de ontsteking of van specifieke aanpassingen in hun dieet, zoals extra vitamine E die de ontwikkeling van hepatocellulair carcinoom kan beperken (36). Nader onderzoek is echter nodig om te bevestigen of deze waargenomen verlaging in NER ook geldt voor andere ontstekingsaandoeningen in het menselijk lichaam.

## Algemene conclusie

Er is al veel bekend over BaP-geïnduceerde DNA-schade en welke factoren hierop van invloed kunnen zijn, in het bijzonder over het effect van polymorfismen die betrokken zijn bij het metabolisme van carcinogenen. Er zijn echter meer endogene factoren die de gevoeligheid voor carcinogenen kunnen beïnvloeden. Daarom was het doel van dit proefschrift om twee van deze endogene factoren (hypoxie en oxidatieve stress) verder te onderzoeken om zo meer inzicht te krijgen in het effect dat ze hebben op de BaP-geïnduceerde DNA-schade en het herstel van die schade. Omdat BaP gemetaboliseerd moet worden tot BPDE voordat het kan reageren met het DNA, kunnen veranderingen in het metabolisme van BaP uiteindelijk resulteren in een veranderd BPDE-DNA adduct niveau en veranderde genetische instabiliteit. De eerste endogene factor die is onderzocht in dit proefschrift was hypoxie en de daaropvolgende HIF $\alpha$ -stabilisatie. Momenteel is de kennis over de invloed van HIF $\alpha$ -stabilisatie op carcinogeenmetabolisme beperkt tot de competitie tussen de HIF-pathway en de AhR-pathway. Echter is nog nooit aangetoond of dat deze competitie ook daadwerkelijk klinische gevolgen heeft. In drie hoofdstukken hebben we laten zien dat niet alleen HIF $\alpha$ -stabilisatie veranderingen veroorzaakt in genexpressie van genen die betrokken zijn bij BaP-metabolisme, maar dat dit ook leidt tot een veranderd BaP-metabolisme en tot verhoogde DNA-schade. Hetzelfde effect toonden we aan in de in het lichaam voorkomende door HIF $\alpha$  gestabiliseerde cellen, wat de klinische relevantie van deze competitie aangeeft. Dit toont aan dat BaP-metabolisme al kan worden beïnvloed in de vroege stadia van carcinogenese.

Behalve de invloed van hypoxie hebben we ook vastgesteld dat oxidatieve stress een effect kan hebben op het carcinogeenmetabolisme. We hebben een relatie kunnen leggen tussen een polymorfisme in catalase dat invloed heeft op de genexpressie van CYP1B1. Tot slot toonden we aan dat de NER-capaciteit wordt verminderd in HIF $\alpha$ -gestabiliseerde cellen, waardoor het herstel van BPDE-DNA adducten wordt verminderd. Bovendien hebben we in een humaan model bevestigd dat oxidatieve stress in staat is om NER te remmen.

Kortom, de resultaten van dit proefschrift tonen de verschillende soorten impact aan die hypoxie heeft op de mutageniteit van BaP. Naast het verhogen van de BaP-geïnduceerde DNA-schade en het verminderen van het herstel door hypoxie, speelt ook oxidatieve stress een belangrijke rol in het veroorzaken van DNA-schade en het verminderde herstel van deze schade. Over het geheel genomen geeft dit proefschrift

een beter inzicht in de endogene mechanismen die van invloed kunnen zijn op de BaP-mutageniteit. Dit kan in de toekomst leiden tot onderzoek dat bekijkt of het mogelijk is om de mutageniteit van kankerverwekkende stoffen te verminderen door HIF $\alpha$ -stabilisatie te beïnvloeden en oxidatieve stress te verminderen. Het begrijpen van de moleculaire mechanismen die de carcinogeniciteit van BaP bepalen kan bovendien van groot belang zijn in het bepalen van preventieve maatregelen of het ontdekken van nieuwe behandelingen tegen carcinogeen-geïnduceerde tumoren. Bovendien kan een beter idee over de oorzaken van de interindividuele verschillen leiden tot een betere risico-evaluatie van kankerverwekkende stoffen.

- 1 Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D. (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, **61**, 69-90.
- 2 Lichtenstein, P., Holm, N.V., Verkasalo, P.K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., Pukkala, E., Skytthe, A., and Hemminki, K. (2000) Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med*, **343**, 78-85.
- 3 Luch, A. (2005) Nature and nurture - lessons from chemical carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*, **5**, 113-125.
- 4 Rojas, M., Marie, B., Vignaud, J.M., Martinet, N., Siat, J., Grosdidier, G., Cascorbi, I., and Alexandrov, K. (2004) High DNA damage by benzo[a]pyrene 7,8-diol-9,10-epoxide in bronchial epithelial cells from patients with lung cancer: comparison with lung parenchyma. *Cancer Lett*, **207**, 157-163.
- 5 Gelboin, H.V. (1980) Benzo[alpha]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiol Rev*, **60**, 1107-1166.
- 6 Baird, W.M., Hooven, L.A., and Mahadevan, B. (2005) Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ Mol Mutagen*, **45**, 106-114.
- 7 Chan, W.K., Yao, G., Gu, Y.Z., and Bradfield, C.A. (1999) Cross-talk between the aryl hydrocarbon receptor and hypoxia inducible factor signaling pathways. Demonstration of competition and compensation. *J Biol Chem*, **274**, 12115-12123.
- 8 Gungor, N., Haegens, A., Knaapen, A.M., Godschalk, R.W., Chiu, R.K., Wouters, E.F., and van Schooten, F.J. (2010) Lung inflammation is associated with reduced pulmonary nucleotide excision repair in vivo. *Mutagenesis*, **25**, 77-82.
- 9 Jackson, A.L., Zhou, B., and Kim, W.Y. (2010) HIF, hypoxia and the role of angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Expert Opin Ther Targets*, **14**, 1047-1057.
- 10 Wu, X.Z., Xie, G.R., and Chen, D. (2007) Hypoxia and hepatocellular carcinoma: The therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, **22**, 1178-1182.
- 11 Vaupel, P., and Mayer, A. (2007) Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev*, **26**, 225-239.
- 12 Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., and Ratcliffe, P.J. (2001) Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, **292**, 468-472.
- 13 Kallio, P.J., Wilson, W.J., O'Brien, S., Makino, Y., and Poellinger, L. (1999) Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem*, **274**, 6519-6525.
- 14 Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., and Semenza, G.L. (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 5510-5514.
- 15 Chandel, N.S., and Budinger, G.R. (2007) The cellular basis for diverse responses to oxygen. *Free Radic Biol Med*, **42**, 165-174.
- 16 Moller, P., Loft, S., Lundby, C., and Olsen, N.V. (2001) Acute hypoxia and hypoxic exercise induce DNA strand breaks and oxidative DNA damage in humans. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **15**, 1181-1186.
- 17 Bardos, J.I., and Ashcroft, M. (2004) Hypoxia-inducible factor-1 and oncogenic signalling. *Bioessays*, **26**, 262-269.
- 18 Semenza, G.L. (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, **3**, 721-732.

- 19 Cash, T.P., Pan, Y., and Simon, M.C. (2007) Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing. *Free Radic Biol Med*, **43**, 1219-1225.
- 20 Gradin, K., McGuire, J., Wenger, R.H., Kvietikova, I., fhitelaw, M.L., Toftgard, R., Tora, L., Gassmann, M., and Poellinger, L. (1996) Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor. *Mol Cell Biol*, **16**, 5221-5231.
- 21 Gassmann, M., Kvietikova, I., Rolfs, A., and Wenger, R.H. (1997) Oxygen- and dioxin-regulated gene expression in mouse hepatoma cells. *Kidney Int*, **51**, 567-574.
- 22 Reynolds, T.Y., Rockwell, S., and Glazer, P.M. (1996) Genetic instability induced by the tumor microenvironment. *Cancer Res*, **56**, 5754-5757.
- 23 Papp-Szabo, E., Josephy, P.D., and Coomber, B.L. (2005) Microenvironmental influences on mutagenesis in mammary epithelial cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, **116**, 679-685.
- 24 Simon, M.C., and Keith, B. (2008) The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 285-296.
- 25 Ross, J.A., Nelson, G.B., Wilson, K.H., Rabinowitz, J.R., Galati, A., Stoner, G.D., Nesnow, S., and Mass, M.J. (1995) Adenomas induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in strain A/J mouse lung correlate with time-integrated DNA adduct levels. *Cancer Res*, **55**, 1039-1044.
- 26 Cohen, H.T., and McGovern, F.J. (2005) Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*, **353**, 2477-2490.
- 27 Ide, F., Iida, N., Nakatsuru, Y., Oda, H., Tanaka, K., and Ishikawa, T. (2000) Mice deficient in the nucleotide excision repair gene XPA have elevated sensitivity to benzo[a]pyrene induction of lung tumors. *Carcinogenesis*, **21**, 1263-1265.
- 28 Lockett, K.L., Snowwhite, I.V., and Hu, J.J. (2005) Nucleotide-excision repair and prostate cancer risk. *Cancer Lett*, **220**, 125-135.
- 29 Latimer, J.J., Johnson, J.M., Kelly, C.M., Miles, T.D., Beaudry-Rodgers, K.A., Lalanne, N.A., Vogel, V.G., Kanbour-Shakir, A., Kelley, J.L., Johnson, R.R., and Grant, S.G. (2010) Nucleotide excision repair deficiency is intrinsic in sporadic stage I breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 21725-21730.
- 30 Eder, E. (1999) Intraindividual variations of DNA adduct levels in humans. *Mutat Res*, **424**, 249-261.
- 31 Rojas, M., Cascorbi, I., Alexandrov, K., Kriek, E., Auburtin, G., Mayer, L., Kopp-Schneider, A., Roots, I., and Bartsch, H. (2000) Modulation of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adduct levels in human white blood cells by CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphism. *Carcinogenesis*, **21**, 35-41.
- 32 Zhao, H., Wang, L.E., Li, D., Chamberlain, R.M., Sturgis, E.M., and Wei, Q. (2008) Genotypes and haplotypes of ERCC1 and ERCC2/XPD genes predict levels of benzo[a]pyrene diol epoxide-induced DNA adducts in cultured primary lymphocytes from healthy individuals: a genotype-phenotype correlation analysis. *Carcinogenesis*, **29**, 1560-1566.
- 33 Rojas, M., Godschalk, R., Alexandrov, K., Cascorbi, I., Kriek, E., Ostertag, J., Van Schooten, F.J., and Bartsch, H. (2001) Myeloperoxidase--463A variant reduces benzo[a]pyrene diol epoxide DNA adducts in skin of coal tar treated patients. *Carcinogenesis*, **22**, 1015-1018.
- 34 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. (2007) 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*, **28**, 1800-1806.

## Nederlandse samenvatting

- 35 Gungor, N., Godschalk, R.W., Pachen, D.M., Van Schooten, F.J., and Knaapen, A.M. (2007) Activated neutrophils inhibit nucleotide excision repair in human pulmonary epithelial cells: role of myeloperoxidase. *FASEB J*, **21**, 2359-2367.
- 36 Singal, A.K., Jampana, S.C., and Weinman, S.A. (2011) Antioxidants as therapeutic agents for liver disease. *Liver Int*, **31**, 1432-1448.