

Chemical carcinogens and chronic inflammation

Citation for published version (APA):

Shi, Q. (2017). *Chemical carcinogens and chronic inflammation: partners in crime*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Gildeprint Drukkerijen. <https://doi.org/10.26481/dis.20171218qs>

Document status and date:

Published: 01/01/2017

DOI:

[10.26481/dis.20171218qs](https://doi.org/10.26481/dis.20171218qs)

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 8

Summary and general discussion

On basis of epidemiological observations it is widely accepted that combined presence of inflammation together with exposure to chemical carcinogens leads to a more than additional increasing risk of cancer. However, the molecular and cellular mechanisms mediating this relationship remain unresolved. Therefore, the main objective of the present thesis was to investigate the underlying mechanisms of how inflammatory factors can alter the metabolism of chemical carcinogens and subsequent formation of DNA damage. The well known environmental mutagen benzo[a]pyrene was used as a model compound in the studies described in this thesis.

1. Chapter 2: Inflammation-associated extracellular β -glucuronidase alters cellular responses to the chemical carcinogen benzo[a]pyrene

The aim of this study was to show the effect of β -glucuronidase on B[a]P induced genotoxicity in *in vitro* cultured cells and to identify possible underlying mechanisms.

1.1 Main findings

β -glucuronidase is an enzyme released by neutrophils during inflammation. Our original hypothesis proposed that β -glucuronidase could re-activate detoxified B[a]P metabolites via hydrolysis of glucuronide conjugates. Hence, the presence of β -glucuronidase will increase the level of B[a]P metabolites and may ultimately result in higher B[a]P-DNA adduct formation. However, after co-incubation of liver and lung cells with β -glucuronidase and B[a]P, we initially observed a significantly lower level of the pre-carcinogenic metabolite B[a]P-7,8-dihydrodiol, as well as *CYP1A1* expression in comparison with B[a]P only. In contrast, at a later time point (t=24 h), the presence of β -glucuronidase indeed significantly enhanced B[a]P-7,8-dihydrodiol levels, *CYP1A1* expression, and B[a]P-DNA adduct levels. Interestingly, the concentration of unmetabolized B[a]P remained higher for a longer period of time by addition of β -glucuronidase to the B[a]P treatment.

1.2 Discussion

Based on these observations, we proposed and verified several possible modes of action. Firstly, there is a possibility that β -glucuronidase prevents B[a]P from entering cells because it could bind with the parent compound, because β -glucuronidase is a large protein which contains multiple binding sites for various different substrates [1]. Hence, when β -glucuronidase is released at the site of inflammation, B[a]P might bind to β -glucuronidase and consequently results in a slower rate of B[a]P entering into cells. Indeed, a high concentrations of B[a]P was able to reduce β -glucuronidase activity by approximately 20% (indicating an interaction between both). This 20% should however be considered as a minor effect and it is unlikely to be the cause of the significant inhibition of *CYP1A1* expression and delayed B[a]P metabolism, because in the cell incubations B[a]P was added in ~ 10 fold excess when compared to the amount of β -glucuronidase. Secondly, it was investigated whether β -glucuronidase activity is needed for the inhibition of *CYP1A1* expression at 6 hours. Therefore, we added the β -glucuronidase inhibitor D-saccharic acid 1,4-lactone monohydrate to the incubations with B[a]P and β -glucuronidase. However, the inhibition of β -glucuronidase activity did not change the down regulation of *CYP1A1* expression by β -glucuronidase. Since the inhibitory effect on *CYP1A1* expression was activity independent, it was studied whether blocking the cellular binding site of β -glucuronidase (i.e., insulin-like growth factor 2 receptor (IGF2R)) by mannose-6-phosphate could explain the down regulation of

CYP1A1 expression. High concentrations of mannose-6-phosphate competitively inhibit β -glucuronidase binding to IGF2R. This time, the β -glucuronidase induced inhibition of β -glucuronidase was abolished. Therefore, we suggested a connection between IGF2R as receptor of extracellular β -glucuronidase and intracellular AhR-signalling after B[a]P exposure. It should be mentioned that this connection between IGF2R and AhR signaling could be mediated by transforming growth factor β (TGF- β), because binding of ligands to IGF2R activates TGF- β , which suppresses AhR-mediated gene expression including the expression of *CYP1A1* [2, 3]. Unfortunately, assessment of TGF- β activity was not included in current work and needs further investigation and confirmation in the future. One more remark that needs to be made is that all experiments in **Chapter 2** were conducted at pH 5.5, because β -glucuronidase activity has a pH optimum at pH<6. Therefore, the effect of lowered pH was further investigated as described in **Chapter 3**.

1.3 Implications

It is known that B[a]P metabolites can be detoxified via UDP-glucuronosyltransferase (UGT) and β -glucuronidase at sites of inflammation could cleave the conjugated B[a]P metabolites by which reactive metabolites are re-activated. We confirm in **chapter 2**, for the first time, that β -glucuronidase indeed hydrolysis glucuronidated B[a]P metabolites. In addition, the current study also indicated another pathway in which β -glucuronidase enhanced B[a]P induced DNA damage by interacting with the IGF2R. Whether β -glucuronidase or IGF2R can serve as possible targets for preventing the increased cancer risk in subjects with inflammatory diseases needs further investigation. Moreover, these findings might also be applicable to other chemicals which are known to be conjugated via UGT.

2. Chapter 3: Acidic cellular microenvironment modifies carcinogen-induced DNA damage and repair.

An acidic microenvironment is very common at the site of inflammation. The reason for this acidic microenvironment is primarily the secretion of lactate from anaerobic glycolysis and some other acidic metabolites released during inflammatory reactions (e.g. HOCl). Since the majority of studies on the genotoxicity of B[a]P have been performed under neutral conditions (i.e. pH 7.4-7.8), it was investigated how B[a]P is metabolized under acidic conditions. The role of acidity in biotransformation processes is currently poorly understood.

2.1 Main findings

In **Chapter 3**, we co-incubated A549 and BEAS-2B cells with B[a]P in media with different extracellular pH conditions (i.e. pH_e 7.8, 7, 6.5, 6 and 5.5). We observed a pH dependent decrease of *CYP1A1* and *CYP1B1* gene expression, EROD activity, B[a]P-7,8-dihydrodiol levels, nucleotide excision repair (NER) capacity, B[a]P-DNA adduct levels and other types of DNA damage (γ -H2AX foci) at t=6h after the initiation of exposure. At later time points up to 48 hours, when the pH recovers to near neutral levels, the trend was reversed and a pH dependent increase was observed, except for NER capacity. In addition, the changes in intracellular pH (pH_i) and extracellular pH (pH_e) were examined, and a time dependent increased pH (restoration towards neutral conditions (pH 7.4-7.8)) was found. We concluded that acidic pH inhibits *CYP1A1* gene expression and enzyme activity, leading to lower B[a]P metabolism. However, when the pH_e and pH_i restored, *CYP1A1* expression and enzyme activity also recovered.

Consequently, more B[a]P-7,8-dihydrodiol and B[a]P induced DNA adducts were seen in the acidic pH samples. Although cells try to compensate by increasing repair activity (after the pH is restored), it could not prevent DNA adduct accumulation.

2.2 Discussion

We could explain the altered cellular response to genotoxins by acidic pH by assuming that at low pH enzyme activity is inhibited. However, some enzymes may actually have a higher activity at slightly decreased pH, dependent on their pH optimum. Moreover, there are many other factors that can be affected by acidic pH, which may contribute to lowered B[a]P metabolism which need to be verified in the future. For example, lowering intracellular pH can activate certain inflammation related pathways and its downstream targets, including activator protein 1 (AP-1), MAPK/ERK, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) pathways, as well as tumor necrosis factor α (TNF- α), extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2), isoforms of nitric oxide synthase (iNOS), and p38 [4-6]. In addition, the acidic pH microenvironment causes hypoxia like reactions, oxidative stress and ROS formation. All these phenomena added up makes the interpretation of the results observed from our current study more complicated to explain from a mechanistic point of view [4, 6-8].

2.3 Implications

The majority of studies that investigate the genotoxic effects of B[a]P *in vitro*, were performed under near to neutral conditions (i.e. pH 7.4-7.8). However, during inflammation, the pH at the site of inflammation may vary from 7.2 to 5.5, and this acidic microenvironment might alter the metabolic pattern of chemicals. Therefore, in this chapter, we demonstrated how B[a]P is metabolized under lowered pH conditions, and how pH influences B[a]P induced genotoxicity in more detail. This including changes in the intra- and extra-cellular pH, gene expression and enzyme activity of CYP1A1 which is critical for metabolizing B[a]P, and B[a]P induced DNA damage and repair. These findings might give further clues to explain some previous findings of inflammation induced cellular effects. For example, we previously observed an inhibition of DNA repair by hypochlorous acid (HOCl), which is generated during inflammation, and we now propose that the observed inhibitory effect on DNA repair can also be caused by acidic pH. It is unclear at this moment whether restoring the lowered pH to more neutral conditions would be a good intervention to prevent genotoxic effects in subjects with inflammatory diseases, because a low pH is also required for an adequate immune response against potential 'invaders'. In addition, this chapter also included a summary table that describes the relationship between each measured parameter (e.g. gene expression, CYP1A1 enzyme activity, DNA damage, DNA repair etc.), which might provide the starting parameters that are needed for *in silico* computer modelling.

3. Chapter 4: Effect of interleukin (IL)-8 on benzo[a]pyrene metabolism and DNA damage in human lung epithelial cells.

Interleukin-8 (IL-8) is an essential chemoattractant cytokine found in a variety of tissues and blood which attracts and activates neutrophils in inflammatory regions [9]. However, there is currently little knowledge on how IL-8 can affect B[a]P induced genotoxicity. Therefore, in **Chapter 4**, we investigated the effect of IL-8 on B[a]P metabolism in BEAS-2B cells and describe a possible underlying mechanism.

3.1 Main findings

After culturing BEAS-2B cells with IL-8 and B[a]P for 6 hours, there is no difference between the two treatments regarding genotoxic endpoints. But at t=24 h, we observed a significantly increased level of *CYP1A1*, *CYP1B1* gene expression, EROD activity and B[a]P-7,8-dihydrodiol concentrations in comparison of cell culture with B[a]P alone. Moreover, the unmetabolized B[a]P concentration remains higher in IL-8 samples at all timepoints than in samples that were not treated with IL-8. Overall, there is no difference in B[a]P-DNA adducts level between the samples of different treatment conditions.

3.2 Discussion

In theory, IL-8 could both activate as well as inhibit certain pathways that are important for B[a]P metabolism. For instance, IL-8 is known to induce a respiratory burst and it increases oxidative stress because it activates nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidases (Noxes) [10]. Because IL-8 could activate various Noxes, we hypothesized that stimulation by IL-8 reduced the intracellular NADPH level which inhibits CYP1A1 activity since CYP1A1 is a NADPH dependent enzyme. Consequently, less B[a]P-7,8-dihydrodiol is produced and less B[a]P is metabolized. This delayed B[a]P metabolism, which is similar to the effect seen after β -glucuronidase and acidic pH, will continue to trigger *CYP1A1/CYP1B1* gene expression, therefore resulting in a higher *CYP1A1*, *CYP1B1* gene expression, EROD activity, B[a]P-7,8-dihydrodiol concentration and B[a]P induced DNA adducts at later timepoints (i.e. t= 24 and 48 h). In order to confirm this, we measured the intracellular NADPH level and performed EROD assays with and without addition of NADPH. Indeed, IL-8 lowered the intracellular NADPH level. Although EROD enzyme activity was higher after addition of extra NADPH to the reaction mix, it appeared not to be the rate limiting factor for the effect of IL-8 on B[a]P metabolism. After that, we blocked Nox activity by adding the general Nox inhibitor (DPI), because IL8 is known to activate these type of enzymes. Interestingly, the IL-8 effect was abolished which indicated that the downstream effects of IL8 on B[a]P metabolism is mediated via Noxes. Therefore, we further investigate the effects of Noxes after IL-8 exposure. It has been reported that IL-8 can enhanced oxidative stress via generating ROS, which could subsequently deplete intracellular GSH level, and GSH is important for phase II detoxification of reactive B[a]P metabolites. Indeed, we observed a significant decreased level of GSH after IL-8 treatment or with IL-8 combined with B[a]P. Moreover, the GSSG level significantly increased only in the combination treatment (IL-8 and B[a]P). All these observations provide evidence that GSH plays a central role in the IL-8 induced delayed B[a]P metabolism. Hence, BSO, which is a glutathione synthesis inhibitor, was used to validate our hypothesis. Indeed, after depletion of GSH by BSO, B[a]P metabolism is similarly delayed as observed after exposure to IL-8. As a result, higher concentrations of unmetabolized B[a]P and B[a]P-7,8-dihydrodiol were found when comparing samples treated with BSO and B[a]P with samples only treated with B[a]P. Despite the higher concentrations of pre-mutagenic B[a]P metabolites, no increased levels of B[a]P related DNA adducts were observed. In order to answer this discrepancy, we examined NER capacity, which is the main mechanism for repairing B[a]P induced DNA damage. A previous study indeed showed that the depletion of GSH could enhance NER capacity [11]. As we hypothesized, IL-8 showed a 3-fold induction of NER activity after 24 hours stimulation.

3.3 Implications

IL-8 is another important inflammatory mediator that can increase the genotoxicity of chemicals. In this study, we demonstrated that IL-8 acts on B[a]P metabolism, which could further clarify the role of IL-8 in the combined effect of inflammation and B[a]P on cancer risk, but is also illustrative for the complexity of this relationship, because IL8 acted not only on B[a]P metabolism but also the cellular defense against oxidative stress, and DNA repair. Still, depletion of GSH seemed to play a central role, and therefore, it may be beneficial to restore GSH pool in people with chronic inflammatory diseases. This could be achieved by N-acetylcysteine (NAC), a GSH precursor. Although NAC is not considered successful in the treatment of COPD, patient may still benefit on the long run by preventing malignant diseases.

4. Chapter 5: Pulmonary Inflammation Impacts on CYP1A1-Mediated Respiratory Tract DNA Damage Induced by the Carcinogenic Air Pollutant Benzo[a]pyrene.

In order to further confirm and compare the observations in previous *in vitro* studies, an *in vivo* mouse model was used and investigated in **Chapter 5**.

4.1 Main findings

After exposing mice intra-nasally to LPS and subsequently to intra-tracheally instilled B[a]P, several phenotypic endpoints were examined in lung tissue and bronchoalveolar lavage fluid (BAL fluid), including histopathology of pulmonary inflammation, enzyme activities (e.g. Cyp1a, Nqo1, and β -glucuronidase), repair capacity, and the formation of DNA adducts. After the inflammatory trigger, larger amounts of inflammatory cells (mainly monocytes) were found in mouse lung, even in combination with B[a]P (LPS&B[a]P), when compared to control. β -glucuronidase activity was also increased in BAL, indicative for the presence and activation of inflammatory cells. However, a lower level of Cyp1a and Nqo1 enzyme activity was observed in the LPS&B[a]P exposed mice than in mice treated with B[a]P alone. Although there is a lower level of Cyp1a enzyme activity in the LPS&B[a]P group, the B[a]P induced DNA adduct levels were significantly higher by the simultaneous exposure to B[a]P and inflammation. There were no differences in CYP1B1 activity and NER capacity. Thus, it was concluded that the decrease of CYP1A1 activity in the lungs of LPS&B[a]P treated mice results in a decrease of B[a]P detoxification, consequently leading to an increasing in B[a]P-DNA adduct formation in the lung.

4.2 Discussions

Interestingly, the inhibition of Cyp1a1 was also observed in our previous *in vitro* studies (β -glucuronidase or IL8 exposure and acidic microenvironment). The difference between *in vivo* and *in vitro* studies regarding the role of CYP1A1 activity and subsequent genotoxicity of B[a]P is still a matter of debate. *In vitro*, it was considered that CYP1A1 activity was indispensable for genotoxicity of B[a]P, whereas *in vivo* studies seemed to point to the opposite; CYP1A1 is indispensable for the detoxification of B[a]P [12, 13]. Therefore, it seems that mimicking inflammatory conditions *in vitro*, can reproduce the *in vivo* findings with more accuracy. More work should be done to understand the role of CYP1A1 on B[a]P induced genotoxicity and how inflammatory markers can affect that relationship. For a better understanding of the effect of LPS on

B[a]P induced genotoxicity in mouse lungs, we applied microarray technology (next chapter), to find further leads for underlying mechanisms.

4.3 Implications

This study gave evidence that air pollution is health threatening in multiple ways; by inducing inflammation, and also by increasing the genotoxicity of chemicals that are simultaneously inhaled. It confirmed our *in vitro* experiments, and therefore it can be stated that for optimal prevention, both sides of the coin need to be addressed. Not only exposure should be limited but also inflammation (due to presence of disease or induced by the exposure) should be avoided as much as possible. In regulatory toxicology, the presence of inflammation is not at all taken into account. We show here, however, that the genotoxic potential of compounds might be higher in the presence of inflammation/inflammatory mediators. Therefore, a better view of reality may be obtained by choosing other test conditions such as combination of inflammation and chemical carcinogens.

5. Chapter 6: Altered gene expression profiles in the lungs of benzo[a]pyrene-exposed mice in the presence of lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation

To gain more insight into the mechanism of how LPS influences B[a]P induced genotoxicity in the lungs of mice, RNA microarray technology was applied in **Chapter 6**.

5.1 Main findings

By performing a dedicated analysis of genes that are known to be involved in the cellular response to B[a]P, we confirmed the phenotypic observations as described in the previous Chapter 5. For instance, a down-regulation of *Cyp1a1* ($p < 0.05$) and *Nqo1* ($p = 0.088$), an up-regulation of *Gusb* (β -glucuronidase, $p = 0.075$), and no significant differences in *Cyp1b1* were shown in comparing lungs of mice exposed to LPS&B[a]P with lungs of mice that were exposed to B[a]P alone. Besides that, many other genes related to phase I and II metabolism of B[a]P were significantly inhibited after exposure to LPS, including *Ephx1*, *Arnt*, *Cbr1*, *Por*, *Nqo2* and *Comt*, as well as *Sult1a1*, *Gstp1*, *Gstm1*, *Gstt1* and *Gpx3*. Despite the fact that we did not observe a difference in NER capacity, a few NER related genes were significantly up- (i.e. *Xpa*) and down-regulated (i.e. *Ddb1*). Moreover, we applied a principal component analysis (PCA) analysis in order to identify the interrelationship among each exposure (i.e. Control, B[a]P, LPS and LPS&B[a]P) and genes that were able to separate the different exposure conditions were predominantly related to immune-response. This immune-response dependent separation of all exposure conditions is a further confirmation that B[a]P alone can already induce an inflammatory responses, and is also an indication that inflammation may play an underestimated role in B[a]P induced genotoxicity and possibly carcinogenicity. Finally, we also performed a global analysis based on the differentially expressed genes (DEGs) and a high percentage of the genes that were differentially regulated by B[a]P, were inhibited by LPS. For example, cell-cell adhesion, cell-cell communication, RNA translation and ribosome related processes were altered in such a way. This may indicate that pathways/cellular events to recover from the B[a]P exposure may be postponed by additional induction of inflammation by LPS.

5.2 Discussions

We confirmed *in vivo* our hypothesis that LPS, by counteracting some of the B[a]P transcriptomic changes, is actually prolonging the time window of B[a]P action and actually increased its overall genotoxic potential. However, there are some limitations of the study, which need to be addressed. For instance, *CYP1a1* gene expression and CYP1a1 protein activity is usually induced by B[a]P, but this was not found in the current study. This might be due to the selection of a single time point (48 hours) for both measurements; *Cyp1a1* gene expression is an early event, whereas protein expressions can be considered as a later event but enzyme activity additionally relies on posttranslational protein modifications. For instance, CYP activity can be inhibited by ROS, which is produced in excess by additional exposure to LPS, which may provide one explanation for the discrepancy between protein levels and enzyme activity, which do not correlate. 48 hours may thus be too late for assessing very early B[a]P metabolic events, but in our previous studies in which we exposed rodents to B[a]P, highest DNA adduct levels were always found at approximately 2 days after the exposure (Chapter 5). Therefore, to investigate cellular effects at the highest level of DNA damage, 48 hours was chosen as the exposure time point.

5.3 Implications

This study is the continuation of the study in Chapter 5 and aimed at obtaining more insight in additional underlying mechanisms for further research. The general concept that the presence of inflammation can inhibit the initial metabolism of B[a]P by phase I and II metabolism was confirmed at the level of gene transcription. New leads for future research could aim on cell-cell communication and cell adhesion. All data that were obtained in this study are shared and publicly available online for other researchers, who could benefit from our findings in explaining their *in vivo* findings with other genotoxic chemicals.

6. Concluding remarks and future perspective

The present thesis focused on the effect of inflammation on B[a]P metabolism and B[a]P-DNA adduct formation *in vitro* and *in vivo*. Currently, there is accumulating evidences that chronic inflammation contributes to the genotoxicity and carcinogenicity of chemical carcinogens, ultimately leading to cancer. However, due to the complex underlying network, there are only few studies that have investigated how inflammation contributes to the chemically induced carcinogenesis. Moreover, contradicting results between *in vitro* and *in vivo* studies even made this big puzzle more difficult to solve. In order to fill this knowledge gap, we systematically performed several *in vitro* and *in vivo* studies. So far, the results from our studies support the hypothesis that inflammation delays the metabolism of B[a]P and this leads to a prolonged exposure of cells to the parent compound B[a]P. Consequently, higher B[a]P-DNA adduct levels are formed which theoretically increase the risk for developing cancer. However, the more we study inflammation, the more we know its complexity, with many cytokines and pathways that are triggered and their crosstalk with each other and with other cellular processes. In addition, in the current thesis, only three inflammatory factors were studied in more detail for their effect on B[a]P, and there are other inflammatory factors that remain to be investigated. On top of that, most of the studies that investigated the link between inflammation and chemical carcinogens were conducted based on a single variable,

including TNF- α , IL-6, IL-1 β , hypoxia, oxidative stress and MPO, whereas the mixture of inflammatory mediators and the resulting microenvironment should be taken into account as a whole. Therefore, further research is needed.

An important observation in the current thesis is that *in vitro* studies should be performed in a time-dependent manner. Many *in vitro* studies on B[a]P were conducted at a single time point (most of the time 24 hours incubations), this might result in drawing misleading conclusions. For example, some inflammatory factors could inhibit CYPs at early time points, which leads to an induction of CYPs at later time points, because unmetabolized B[a]P keeps triggering the AhR-receptor.

In conclusion, the results presented in this thesis demonstrate the impact of various inflammatory factors on the genotoxicity of B[a]P. We provide mechanistic information on how inflammatory factors can make humans more susceptible to carcinogen exposure. It may also open doors for new preventive measures to lower cancer incidences in patients with chronic inflammatory diseases; a combination of anti-inflammatory approaches and reducing exposure to genotoxic chemicals is required. Furthermore, the application of state-of-the-art techniques in molecular approaches and animal models of inflammation-derived cancers could further help to elucidate this intriguing puzzle.

References

- [1] K. Sasaki, F. Taura, Y. Shoyama, S. Morimoto, Molecular characterization of a novel beta-glucuronidase from *Scutellaria baicalensis georgi*, *J Biol Chem*, 275 (2000) 27466-27472.
- [2] A. Starsichova, E. Hrubá, E. Slabáková, Z. Pernicová, J. Procházková, K. Pencíková, V. Seda, M. Kabátková, J. Vondráček, A. Kozubík, M. Machalá, K. Souček, TGF-beta1 signaling plays a dominant role in the crosstalk between TGF-beta1 and the aryl hydrocarbon receptor ligand in prostate epithelial cells, *Cell Signal*, 24 (2012) 1665-1676.
- [3] A. Gemma, Y. Hosoya, K. Uematsu, M. Seike, F. Kurimoto, A. Yoshimura, M. Shibuya, S. Kudoh, Mutation analysis of the gene encoding the human mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor (M6P/IGF2R) in human cell lines resistant to growth inhibition by transforming growth factor beta(1) (TGF-beta(1)), *Lung Cancer*, 30 (2000) 91-98.
- [4] Y. Kato, S. Ozawa, C. Miyamoto, Y. Maehata, A. Suzuki, T. Maeda, Y. Baba, Acidic extracellular microenvironment and cancer, *Cancer Cell Int*, 13 (2013) 89.
- [5] A. Bellocq, S. Suberville, C. Philippe, F. Bertrand, J. Perez, B. Fouqueray, G. Cherqui, L. Baud, Low environmental pH is responsible for the induction of nitric-oxide synthase in macrophages. Evidence for involvement of nuclear factor-kappaB activation, *J Biol Chem*, 273 (1998) 5086-5092.
- [6] A. Riemann, B. Schneider, A. Ihling, M. Nowak, C. Sauvant, O. Thews, M. Gekle, Acidic environment leads to ROS-induced MAPK signaling in cancer cells, *PLoS One*, 6 (2011) e22445.
- [7] J. Chiche, M.C. Brahim-Horn, J. Pouyssegur, Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer, *J Cell Mol Med*, 14 (2010) 771-794.
- [8] L.M. Maurer, E. Yohannes, S.S. Bondurant, M. Radmacher, J.L. Slonczewski, pH regulates genes for flagellar motility, catabolism, and oxidative stress in *Escherichia coli* K-12, *J Bacteriol*, 187 (2005) 304-319.
- [9] M. Bickel, The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation, *J Periodontol*, 64 (1993) 456-460.
- [10] Q. Shi, A.W. Boots, L. Maas, C. Veith, K. van Kuijk, G.R. Haenen, R.W. Godschalk, F.J. Van Schooten, Effect of interleukin (IL)-8 on benzo[a]pyrene metabolism and DNA damage in human lung epithelial cells, *Toxicology*, 381 (2017) 64-74.
- [11] S.A. Langie, A.M. Knaapen, J.M. Houben, F.C. van Kempen, J.P. de Hoon, R.W. Godschalk, R.W. Godschalk, F.J. van Schooten, The role of glutathione in the regulation of nucleotide excision repair during oxidative stress, *Toxicol Lett*, 168 (2007) 302-309.
- [12] V.M. Arlt, M. Stiborova, C.J. Henderson, M. Thiemann, E. Frei, D. Aimova, R. Singh, G. Gamboa da Costa, O.J. Schmitz, P.B. Farmer, C.R. Wolf, D.H. Phillips, Metabolic activation of benzo[a]pyrene in vitro by hepatic cytochrome P450 contrasts with detoxification in vivo: experiments with hepatic cytochrome P450 reductase null mice, *Carcinogenesis*, 29 (2008) 656-665.
- [13] D.W. Nebert, Z. Shi, M. Galvez-Peralta, S. Uno, N. Dragin, Oral benzo[a]pyrene: understanding pharmacokinetics, detoxication, and consequences--Cyp1 knockout mouse lines as a paradigm, *Molecular pharmacology*, 84 (2013) 304-313.

Hoofdstuk 8

Samenvatting en algemene discussie

Op basis van epidemiologische waarnemingen wordt het over het algemeen vanuit gegaan dat de aanwezigheid van ontsteking, in combinatie met de blootstelling aan carcinogene stoffen, leidt tot een toegenomen risico op kanker. Het hoofddoel van dit proefschrift was daarom om de onderliggende mechanismen van hoe ontstekingsfactoren het metabolisme van carcinogene stoffen en de daaropvolgende vorming van DNA schade kunnen veranderen. De bekende mutagene stof benzo[a]pyreen is gebruikt als modelverbinding in de studies die beschreven staan in dit proefschrift.

1. Hoofdstuk 2: Ontstekings-geassocieerde extracellulair β -glucuronidase verandert cellulaire reacties op de carcinogene stof benzo[a]pyreen

Het doel van deze studie was om het effect van β -glucuronidase op B[a]P geïnduceerde genotoxiciteit in *in vitro* gekweekte cellen aan te tonen en mogelijke onderliggende mechanismen te identificeren.

1.1 Voornaamste bevindingen

β -glucuronidase is een enzym dat wordt vrijgelaten door neutrofielen gedurende ontsteking. Onze oorspronkelijke hypothese stelde dat β -glucuronidase gedetoxificeerde B[a]P metabolieten opnieuw zou kunnen activeren door de hydrolyse van glucuronide conjugaten. Daarom zal de aanwezigheid van β -glucuronidase het niveau van de B[a]P metabolieten verhogen en kan dit uiteindelijk resulteren in een toegenomen vorming van B[a]P-DNA adducten. Echter, na co-incubatie van β -glucuronidase en B[a]P in lever- en longcellen bleek er een significant lager niveau van de pre-carcinogene metaboliet B[a]P-7,8-dihydrodiol en een significant lagere expressie van CYP1A1 te zijn vergeleken met de cellen blootgesteld aan alleen B[a]P. In tegenstelling, de aanwezigheid van β -glucuronidase verhoogde inderdaad de B[a]P-7,8-dihydrodiol niveaus, de CYP1A1 expressie en de B[a]P-DNA adduct levels op een later tijdstip (t=24 uur). Interessant genoeg bleef de concentratie van ongemetaboliseerd B[a]P hoger gedurende een langere periode door de toevoeging van β -glucuronidase aan de B[a]P behandeling.

1.2 Discussie

Op basis van deze bevindingen hebben we verschillende mogelijke werkwijzen voorgesteld en gecontroleerd. Ten eerste bestaat er de mogelijkheid dat β -glucuronidase voorkomt dat B[a]P de cellen in komt doordat het kan binden aan B[a]P, aangezien β -glucuronidase een groot eiwit is dat meerdere bindingsplaatsen bevat voor verschillende substraten [1]. Wanneer β -glucuronidase op de plaats van de ontsteking vrijkomt, zou B[a]P dus kunnen binden aan β -glucuronidase wat derhalve resulteert in een langzamere snelheid van B[a]P opname in de cellen. Inderdaad, een hoge concentratie van B[a]P was in staat om de activiteit van β -glucuronidase te verminderen met ongeveer 20% (wat indiceert dat er een interactie is tussen beide). Deze 20% dient echter als een klein effect beschouwd te worden en het is onwaarschijnlijk dat dit de oorzaak is van de significante remming van CYP1A1 expressie en vertraagd B[a]P metabolisme, aangezien in de cel incubaties B[a]P werd toegevoegd in 10-voudige overmaat vergeleken met de hoeveelheid van β -glucuronidase. Ten tweede werd er onderzocht of β -glucuronidase activiteit nodig is voor de remming van de expressie van CYP1A na 6 uur. Daarom hebben we de β -glucuronidase remmer D-saccharinezuur1,4-lactonemonohydraat toegevoegd aan de incubaties met B[a]P en glucuronidase. De remming van β -glucuronidase activiteit had echter geen effect op de

downregulatie van CYP1A1 expressie door β -glucuronidase. Aangezien het remmend effect op de expressie van CYP1A1 onafhankelijk was van de activiteit, werd er onderzocht of het blokkeren van de cellulaire bindingsplaats van β -glucuronidase (dat wil zeggen de insulin-like growth factor 2 receptor (IGF2R)) door mannose-6-fosfaat de downregulatie van CYP1A1 expressie zou kunnen verklaren. Hoge concentraties van mannose-6-fosfaat remt de binding van β -glucuronidase aan de IGF2R op een competitieve manier. Deze keer werd de β -glucuronidase geïnduceerde remming van β -glucuronidase opgeheven. Daarom suggereerden we dat er een verband is tussen IGF2R als receptor van β -glucuronidase en intracellulaire AhR-signalering na B[a]P blootstelling. Er dient te worden opgemerkt dat dit verband tussen IGF2R en AhR-signalering kan worden gemedieerd door het omzetten van groeifactor β (TGF- β), omdat binding van liganden aan IGF2R TGF- β activeert, die AhR-gemedieerde genexpressie, zoals de expressie van CYP1A1, onderdrukt [2, 3]. De TGF- β activiteit is helaas niet onderzocht in deze studie en dit zal dus in de toekomst verder onderzocht en bevestigd moeten worden. Een opmerking die gemaakt moet worden is dat alle experimenten in **hoofdstuk 2** bij een pH van 5.5 werden uitgevoerd, omdat β -glucuronidase activiteit een pH-optimum bij pH<6 heeft. Daarom werd het effect van een lagere pH verder onderzocht zoals beschreven in **hoofdstuk 3**.

1.3 Implicaties

Het is bekend dat B[a]P metabolieten kunnen worden ontgift door UDP-glucuronosyltransferase (UGT) en dat op plekken van ontsteking β -glucuronidase de geconjugeerde B[a]P metabolieten kan spitsen waardoor de reactieve metabolieten worden geactiveerd. In **hoofdstuk 2** bevestigen wij voor de eerste keer dat β -glucuronidase inderdaad glucuronideerde B[a]P metabolieten hydrolyseert. Daarnaast duiden de resultaten uit deze studie erop dat er nog een andere weg is, waarin β -glucuronidase B[a]P geïnduceerde DNA schade verhoogde door de interactie met IGF2R. Of β -glucuronidase en IGF2R als mogelijke doelen kunnen dienen om het verhoogde risico op kanker bij patiënten met ontstekingsziekten te voorkomen, moet nog verder worden onderzocht. Bovendien kunnen deze bevindingen ook van toepassing zijn op andere chemicaliën die door UGT geconjugeerd worden.

2. Hoofdstuk 3: Zure cellulaire micro-omgeving verandert carcinogeen-geïnduceerde DNA schade en reparatie.

Een zure micro-omgeving is heel gewoon op de plaats van een ontsteking. De reden voor deze zure micro-omgeving is voornamelijk de afscheiding van lactaat uit anaerobe glycolyse en enkele andere zure metabolieten die vrijkomen tijdens ontstekingsreacties (bijvoorbeeld HOCl). Aangezien de meeste studies naar de genotoxiciteit van B[a]P onder neutrale condities zijn uitgevoerd (d.w.z. pH 7,4-7,8), werd in dit hoofdstuk onderzocht hoe B[a]P wordt gemetaboliseerd onder zure omstandigheden. De rol van zuurheid bij biotransformatieprocessen is momenteel nog niet goed begrepen.

2.1 Voornaamste bevindingen

In hoofdstuk 3 hebben we A549- en BEAS-2B-cellen geïncubeerd met B[a]P in media met verschillende extracellulaire pH-omstandigheden (dat wil zeggen pH_e van 7,8, 7, 6,5, 6 en 5,5). We hebben een pH-afhankelijke afname van CYP1A1- en CYP1B1-genexpressie, EROD-activiteit, B[a]P-7,8-dihydrodiol niveaus, nucleotide excisie reparatie (NER) capaciteit, B[a]P-DNA-adductniveaus en andere typen DNA schade (γ -H2AX foci)

waargenomen op $t = 6$ uur na de aanvang van de blootstelling. Op latere tijdstippen tot 48 uur na begin van de blootstelling, wanneer de pH is teruggekomen naar bijna neutrale niveaus, werd de trend omgedraaid en werd een pH-afhankelijke toename waargenomen, behalve in de NER-capaciteit. Daarnaast werden de veranderingen in intracellulaire pH (pHi) en extracellulaire pH (pHe) onderzocht en werd er een tijdsafhankelijke verhoging van de pH gevonden (herstel naar neutrale condities (pH 7,4-7,8)). Geconcludeerd kan worden dat een zure pH de CYP1A1-genexpressie en enzymactiviteit remt, wat leidt tot een verminderd B[a]P-metabolisme. Echter, wanneer de pHe en pHi herstelden naar normale waarden, werden ook CYP1A1-expressie en enzymactiviteit hersteld. Bijgevolg werden meer B[a]P-7,8-dihydrodiol- en B[a]P-geïnduceerde DNA-adducten gezien in de zure pH-monsters. Hoewel cellen dit proberen te compenseren door de reparatieactiviteit te verhogen (nadat de pH is hersteld), kan het DNA-adduct-accumulatie echter niet voorkomen.

2.2 Discussie

De veranderde cellulaire respons op genotoxines door een zure pH kan verklaard worden door aan te nemen dat bij een lage pH de enzymactiviteit geremd wordt. Sommige enzymen kunnen echter daadwerkelijk een hogere activiteit hebben bij een licht verminderde pH, afhankelijk van hun pH-optimum. Bovendien zijn er vele andere factoren die beïnvloed kunnen worden door een zure pH, welke kunnen bijdragen aan een verlaagd B[a]P-metabolisme en welke in de toekomst moet worden geverifieerd. Het verlagen van de intracellulaire pH kan bijvoorbeeld bepaalde ontstekingsgerelateerde pathways en zijn downstream doelen activeren, met inbegrip van activator-eiwit 1 (AP-1), MAPK / ERK, nucleaire factor kappa-light-chain-enhancer van geactiveerde B-cellen (NF- κ B), alsook tumor necrosefactor α (TNF- α), extracellulaire signaal-gereguleerde kinasen (ERK1 / 2), isoformen van stikstofoxide-synthase (iNOS) en p38 [4-6]. Daarnaast veroorzaakt de zure pH-micro-omgeving hypoxie-achtige reacties, oxidatieve stress en ROS-vorming. Al deze verschijnselen opgeteld maken de interpretatie van de resultaten die in onze huidige studie worden waargenomen, ingewikkelder om vanuit mechanistisch oogpunt te kunnen verklaren [4, 6-8].

2.3 Implicaties

De meeste studies die de genotoxische effecten van B[a]P in vitro onderzoeken, werden onder (bijna) neutrale omstandigheden uitgevoerd (d.w.z. pH 7,4-7,8). Bij ontsteking kan de pH op de ontstekingsplaats echter variëren van 7,2 tot 5,5 en deze zure micro-omgeving kan het metabolische patroon van chemicaliën veranderen. Daarom hebben we in dit hoofdstuk aangetoond hoe B[a]P wordt gemetaboliseerd onder verlaagde pH-omstandigheden en hoe de pH de geïnduceerde genotoxiciteit van B[a]P beïnvloedt. Dit omvat veranderingen in de intra- en extracellulaire pH, genexpressie en enzymactiviteit van CYP1A1, die belangrijk zijn voor het metaboliseren van B[a]P en het repareren van B[a]P-geïnduceerde DNA-schade. Deze bevindingen kunnen verdere aanwijzingen geven om enkele eerdere bevindingen van ontstekings-geïnduceerde cellulaire effecten te verklaren. Bijvoorbeeld, we hebben eerder een remming van DNA-reparatie door hypochloorzuur (HOCl) waargenomen wat tijdens ontsteking wordt gegenereerd. We stellen nu voor dat het waargenomen remmende effect op DNA-reparatie ook kan worden veroorzaakt door een zure pH. Het is op dit moment onduidelijk of het herstellen van de verlaagde pH naar meer neutrale omstandigheden een goede interventie zou zijn om genotoxische effecten bij personen met

ontstekingsziekten te voorkomen, omdat een lage pH ook nodig is voor een adequate immuunrespons tegen potentiële indringers. Daarnaast bevat dit hoofdstuk ook een samenvattende tabel waarin de relatie tussen elke gemeten parameter wordt omschreven (bijv. Genexpressie, CYP1A1-enzymactiviteit, DNA-schade, DNA-reparatie, enz.), welke de startparameters die nodig zijn voor in silico modellen kunnen voorzien.

3. Hoofdstuk 4: Effect van interleukine (IL) -8 op benzo[a]pyreen metabolisme en DNA schade in humane longepitheelcellen.

Interleukine-8 (IL-8) is een essentiële chemoattractant cytokine, welke gevonden wordt in een verscheidenheid aan weefsels en bloed en neutrofielen aantrekt en activeert in ontstekingsgebieden [9]. Er is echter momenteel weinig kennis over hoe IL-8 B[a]P-geïnduceerde genotoxiciteit kan beïnvloeden. Daarom hebben we in hoofdstuk 4 het effect van IL-8 op B[a]P metabolisme in BEAS-2B cellen onderzocht en beschrijven we een mogelijk onderliggende mechanisme.

3.1 Voornaamste bevindingen

Na het kweken van BEAS-2B cellen met IL-8 en B[a]P gedurende 6 uur, was er geen verschil gevonden tussen de twee behandelingen met betrekking tot genotoxische eindpunten. Echter, op $t = 24$ uur hebben we een significant verhoogd niveau van CYP1A1, CYP1B1 genexpressie, EROD-activiteit en B[a]P-7,8-dihydrodiol concentraties waargenomen in vergelijking met cellen blootgesteld aan alleen B[a]P. Bovendien blijft de ongemetaboliseerde B[a]P-concentratie bij alle tijdstippen hoger in IL-8 monsters dan in monsters die niet met IL-8 werden behandeld. Over het algemeen is er geen verschil in B[a]P-DNA-adducten tussen de monsters van verschillende behandelingsomstandigheden.

3.2 Discussie

In theorie zou IL-8 bepaalde pathways die belangrijk zijn voor B [a] P metabolisme zowel kunnen activeren als remmen. Het is bijvoorbeeld bekend dat IL-8 een ademhalingsuitbarsting kan veroorzaken en oxidatieve stress kan verhogen doordat het nicotinamide adenine dinucleotidofosfaat (NADPH) oxidasen (Noxes) activeert [10]. Aangezien IL-8 verschillende Noxes zou kunnen activeren, veronderstelden we dat stimulatie door IL-8 het intracellulaire NADPH-niveau verminderde, wat CYP1A1-activiteit remt, aangezien CYP1A1 een NADPH-afhankelijk enzym is. Bijgevolg wordt er minder B[a]P-7,8-dihydrodiol geproduceerd en wordt er minder B[a]P gemetaboliseerd.

Dit vertraagde B[a]P metabolisme, welke vergelijkbaar is met het effect dat wordt gezien na blootstelling aan β -glucuronidase en een zure pH, zal CYP1A1 / CYP1B1 genexpressie blijven veroorzaken, wat resulteert in een hogere CYP1A1, CYP1B1 genexpressie, EROD-activiteit, B[a]P-7,8-dihydrodiolconcentratie en B[a]P geïnduceerde DNA-adducten op latere tijdstippen (d.w.z. $t = 24$ en 48 uur). Om dit te bevestigen, hebben we het intracellulaire NADPH-niveau gemeten en EROD-analyses uitgevoerd met en zonder toevoeging van NADPH. Inderdaad, IL-8 verlaagde het intracellulaire NADPH niveau. Hoewel EROD-enzymactiviteit hoger was na toevoeging van extra NADPH aan het reactiemengsel, bleek het niet de snelheid beperkende factor voor het effect van IL-8 op B[a]P metabolisme. Daarna hebben we de Nox activiteit geblokkeerd door de algemene Nox-remmer (DPI) toe te voegen, aangezien IL-8 bekend staat om dit soort enzymen te activeren. Interessant is dat het IL-8 effect teniet werd gedaan, wat aangeeft

dat de downstream effecten van IL-8 op B[a]P metabolisme wordt gemedieerd door de Noxen. Daarom hebben we de effecten van de Noxen na blootstelling aan IL-8 verder onderzocht. Er is gerapporteerd dat IL-8 oxidatieve stress kan verhogen door de vorming van ROS, waardoor het intracellulaire GSH niveau vervolgens kan worden afgebroken. GSH is belangrijk voor de fase II ontgiftiging van reactieve B[a]P metabolieten. Inderdaad, we vonden een significant verminderd niveau van GSH na behandeling met IL-8 alleen of gecombineerd met B[a]P. Bovendien is het GSSG niveau alleen significant verhoogd in de combinatiebehandeling (IL-8 en B[a]P). Al deze waarnemingen geven aan dat GSH een centrale rol speelt in de IL-8 geïnduceerde vertraagde B[a]P metabolisme. Daarom is BSO, een glutathione synthese remmer, gebruikt om onze hypothese te valideren. Na de uitputting van GSH door BSO, werd het B[a]P metabolisme inderdaad op dezelfde wijze vertraagd als waargenomen na blootstelling aan IL-8. Als gevolg daarvan werden hogere concentraties niet-gemetaboliseerd B[a]P en B[a]P-7,8-dihydrodiol gevonden bij het vergelijken van monsters behandeld met BSO en B[a]P en monsters behandeld met alleen B[a]P. Ondanks de hogere concentraties van pre-mutagene B[a]P metabolieten werden geen verhoogde niveaus van B[a]P gerelateerde DNA adducten waargenomen. Om deze discrepantie te beantwoorden, hebben we NER-capaciteit onderzocht, welke het belangrijkste mechanisme is voor het repareren van B[a]P geïnduceerde DNA schade. Uit een eerdere studie bleek inderdaad dat de uitputting van GSH de NER-capaciteit zou kunnen verbeteren [11]. Zoals we vermoedden, bleek IL-8 een 3-voudige inductie van NER activiteit na 24 uur te bewerkstelligen.

3.3 Implicaties

IL-8 is een andere belangrijke ontstekingsmediator die de genotoxiciteit van chemicalien kan verhogen. In deze studie hebben we aangetoond dat IL-8 effecten heeft op het B[a]P metabolisme, wat de rol van IL-8 in het gecombineerde effect van ontsteking en B[a]P op het kankerrisico verder kan verduidelijken, maar ook illustratief is voor de complexiteit van deze relatie, aangezien IL-8 niet alleen effect had op het B[a]P metabolisme, maar ook op de cellulaire verdediging tegen oxidatieve stress en DNA reparatie. Toch leek de uitputting van GSH een centrale rol te spelen, en daarom kan het voordelig zijn om de GSH-pool te herstellen bij mensen met chronische ontstekingsziekten. Dit kan worden bereikt door N-acetylcysteïne (NAC), een GSH precursor. Hoewel NAC niet succesvol wordt beschouwd bij de behandeling van COPD, kan de patient nog steeds op de lange termijn profiteren door slechtaardige ziekten te voorkomen.

4. Hoofdstuk 5: Pulmonale inflammatie beïnvloedt de CYP1A1-gemedieerde luchtweg DNA schade veroorzaakt door de kankerverwekkende luchtvervuiler Benzo[a]pyreen.

Om de waarnemingen van de eerdere in vitro studies te bevestigen en te vergelijken werd een in vivo muismodel gebruikt en onderzocht in **hoofdstuk 5**.

4.1 Voornaamste bevindingen

Nadat muizen intra-nasaal warden blootgesteld aan LPS en vervolgens aan intratracheïstische ingebracht B[a]P, werden verschillende fenotypische eindpunten onderzocht in longweefsel- en bronchoalveolaire lavagevloeistof (BAL-vloeistof), waaronder histopathologie van longontsteking, enzymactiviteiten (bijv. CYP1a, Nqo1 en β -glucuronidase), reparatiecapaciteit en de vorming van DNA adducten. Na de

ontstekingstrigger werden grotere hoeveelheden ontstekingscellen (hoofdzakelijk monocytten) gevonden in de longen van de muis, zelfs in de combinatie met B[a]P {LPS & B[a]P} in vergelijking met controle. β -glucuronidase activiteit werd ook verhoogd in BAL, wat indicatief is voor de aanwezigheid en activatie van ontstekingscellen. Een lagere enzymactiviteit van CYP1a en Nqo1 werd echter waargenomen in de LPS & B[a]P-blootgestelde muizen vergeleken met muizen die werden behandeld met B[a]P alleen. Hoewel er een lager enzymactiviteit van Cyp1a in de LPS & B[a]P-groep was, waren de B[a]P geïnduceerde DNA adductniveaus significant hoger door de gelijktijdige blootstelling aan B[a]P en ontsteking. Er waren geen verschillen in CYP1B1 activiteit en NER capaciteit. Zo werd geconcludeerd dat de afname van CYP1A1 activiteit in de longen van LPS & B[a]P behandelde muizen resulteert in een afname van B[a]P detoxificatie, waardoor er een toename in B[a]P-DNA adductvorming in de long is.

4.2 Discussie

Interessant genoeg is ook de inhibitie van Cyp1a1 waargenomen in onze eerder in vitro studies (β -glucuronidase of IL-8 blootstelling en zure omgeving). Het verschil tussen de in vivo en in vitro studies met betrekking tot de rol van CYP1A1-activiteit en de daaropvolgende genotoxiciteit van B[a]P is nog steeds een kwestie van debat. *In vitro* werd geconcludeerd dat de activiteit van CYP1A1 onmisbaar was voor de genotoxiciteit van B[a]P, terwijl in vivo studies het tegendeel lieten zien; CYP1A1 is onmisbaar voor de ontgiftiging van B[a]P [12,13]. Het lijkt er daarom op dat door het nabootsen van ontstekingsomstandigheden in vitro, de in vivo bevindingen met meer nauwkeurigheid kan worden gereproduceerd. Meer onderzoek moet worden gedaan om de rol van CYP1A1 op B[a]P geïnduceerde genotoxiciteit beter te begrijpen en hoe ontstekingsmarker die relatie kunnen beïnvloeden. Voor een beter inzicht in het effect van LPS op B[a]P geïnduceerde genotoxiciteit in de longen van de muis hebben we microarray technologie (volgens hoofdstuk) toegepast om verdere aanknopingspunten voor onderliggende mechanismen te vinden.

4.3 Implicaties

Deze studie gaf aanwijzingen dat luchtverontreiniging de gezondheid bedreigt op meerdere manieren: door ontsteking te veroorzaken, en ook door het verhogen van de genotoxiciteit van chemicaliën die tegelijkertijd worden ingeademd. Het heeft onze in vitro experimenten bevestigd, en daarom kan worden gesteld dat voor een optimale preventie, beide zijden van de munt moeten worden aangepakt. Niet alleen dient de blootstelling beperkt te worden, maar ook ontsteking (door aanwezigheid van ziekte of door blootstelling veroorzaakt) moet zoveel mogelijk gemeden worden. Bij de regulatoire toxicologie wordt er geen rekening gehouden met de aanwezigheid van ontsteking. Wij tonen hier echter aan dat het genotoxische potentieel van verbindingen hoger kan zijn in de aanwezigheid van ontsteking/ ontstekingsmediatoren. Daarom kan er een betere kijk op de realiteit worden verkregen door andere testomstandigheden te kiezen, zoals combinatie van ontsteking en chemische carcinogene stoffen.

5. Hoofdstuk 6: Veranderde gen expressie profielen in de longen van benzo[a]pyreen-blootgestelde muizen in de aanwezigheid van lipopolysaccharide geïnduceerde pulmonale ontsteking.

Om meer inzicht te krijgen in het mechanisme van hoe LPS invloed heeft op B[a]P geïnduceerde genotoxiciteit in de longen van muizen, werd RNA microarray technologie toegepast in *hoofdstuk 6*.

5.1 Voornaamste bevindingen

Door een toegewijde analyse uit te voeren van genen die bekend zijn bij de cellulaire respons op B[a]P, hebben we de fenotypische waarnemingen bevestigd zoals beschreven in hoofdstuk 5. Zo werden er bijvoorbeeld een downregulatie van Cyp1A1 ($p < 0,05$) en Nqo1 ($p = 0,088$), een upregulatie van Gusb (β -glucuronidase, $p = 0,075$) en geen significante verschillen in Cyp1B1 aangetoond bij het vergelijken van longen van muizen blootgesteld aan LPS & B[a]P met longen van muizen blootgesteld aan B[a]P alleen. Daarnaast werden veel andere genen, gerelateerd aan fase I en II metabolisme van B[a]P, aanzienlijk geremd na blootstelling aan LPS, waaronder Ephx1, Arnt, Cbr1, Por, Nqo2 en Comt, evenals Sult1a1, GSTp1, Gstm1, Gstt1 en Gpx3. Ondanks het feit dat we geen verschil in NER-capaciteit hebben waargenomen, hadden een paar NER-gerelateerde genen een aanzienlijk hogere expressie (d.w.z. Xpa) en een lagere expressie (d.w.z. Ddb1). Daarnaast hebben we een principal component analyse (PCA) toegepast om de onderlinge relatie tussen elke blootstelling (d.w.z. controle, B[a]P, LPS en LPS & B[a]P) te bepalen en genen die de verschillende blootstellingsomstandigheden konden scheiden, waren voornamelijk gerelateerd aan immuunrespons. Deze immuunresponsafhankelijke scheiding van alle blootstellingsomstandigheden is een verdere bevestiging dat B[a]P alleen al een ontstekingsreactie kan veroorzaken en ook een aanwijzing dat ontsteking een onderschatte rol kan spelen in B[a]P geïnduceerde genotoxiciteit en eventueel carcinogeniteit. Tenslotte hebben we ook een globale analyse uitgevoerd op basis van de differentieel uitgedrukte genen (DEG's) en een groot percentage van de genen die door B[a]P differentieel gereguleerd werden, werden door LPS geremd. Bijvoorbeeld, cel-cel adhesie, cel-cel communicatie, RNA-translatie en ribosoom gerelateerde processen werden zodanig veranderd. Dit kan aangeven dat pathways/cellulaire gebeurtenissen, die betrokken zijn bij het herstel van B[a]P blootstelling, kunnen worden uitgesteld door extra inductie van ontsteking door LPS.

5.2 Discussie

Wij hebben in vivo onze hypothese bevestigd dat LPS, door sommige transcriptomische veranderingen van B[a]P genen tegen te gaan, het tijdsverloop van B[a]P werking daadwerkelijk verlengt en zijn algemene genotoxische potentieel daadwerkelijk verhoogt. Er zijn echter enkele beperkingen van de studie, die moeten worden aangehaald. Bijvoorbeeld, CYP1A1-genexpressie en CYP1A1-eiwitactiviteit worden gewoonlijk geïnduceerd door B[a]P. Dit werd echter niet gevonden in de huidige studie. Dit kan het gevolg zijn van de keuze van een enkel tijdpunt (48 uur) voor beide metingen; CYP1A1-genexpressie is een vroege gebeurtenis, terwijl eiwitexpressies als een latere gebeurtenis kunnen worden beschouwd. Enzymactiviteit berust echter ook op posttranslationele-eiwitmodificaties. CYP-activiteit kan bijvoorbeeld worden geremd door ROS, wat in overmaat wordt geproduceerd door extra blootstelling aan LPS. Dit kan een verklaring geven voor de discrepantie tussen eiwitgehalten en enzymactiviteit, die

niet correleren. 48 uur kan dus te laat zijn voor het beoordelen van zeer vroege metabole activiteiten van B[a]P. Echter, in onze eerdere studies waarin we knaagdieren aan B[a]P hebben blootgesteld, werden de hoogste DNA-adductniveaus altijd gevonden op ongeveer 2 dagen na de blootstelling (hoofdstuk 5). Om de cellulaire effecten op het hoogste niveau van DNA schade te onderzoeken, werd daarom 48 uur gekozen als belichtingspunt.

5.3 Implicaties

Deze studie is de voortzetting van de studie in hoofdstuk 5 en gericht op het verkrijgen van meer inzicht in aanvullende onderliggende mechanismen voor verder onderzoek. Het algemene concept dat de aanwezigheid van ontsteking het initiële metabolisme van B[a]P door fase I en II metabolisme kan remmen werd bevestigd op het niveau van gentranscriptie. Nieuwe aanknopingspunten voor toekomstig onderzoek kunnen gericht zijn op celcommunicatie en celadhesie. Alle gegevens die in deze studie zijn verkregen, worden gedeeld en online beschikbaar gesteld voor andere onderzoekers, die kunnen profiteren van onze bevindingen om hun in vivo bevindingen te verklaren met andere genotoxische chemicaliën.

6. Concluderende opmerkingen en toekomstperspectief

Het huidige proefschrift richtte zich op het effect van ontsteking op B[a]P metabolisme en B[a]P-DNA adductvorming in vitro en in vivo. Momenteel is het verzamelen van bewijzen dat chronische ontsteking bijdraagt aan de genotoxiciteit en carcinogeniteit van chemische carcinogene stoffen, die uiteindelijk tot kanker leiden. Echter, door het complexe onderliggende netwerk, zijn er maar weinig studies die hebben onderzocht hoe ontsteking bijdraagt aan de chemisch geïnduceerde carcinogenese. Bovendien hebben tegenstrijdige resultaten tussen in vitro en in vivo studies het oplossen van deze grote puzzel zelfs moeilijker gemaakt. Om dit gat in de kennis te vullen, hebben we in vitro en in vivo studies systematisch uitgevoerd. Tot nu toe ondersteunen de resultaten van onze studies de hypothese dat ontsteking de stofwisseling van B[a]P vertraagd en dit leidt tot langdurige blootstelling van cellen aan de verbinding B[a]P. Bijgevolg worden hogere B[a]P-DNA-adductniveaus gevormd die theoretisch het risico op kankerontwikkeling verhogen. Hoe meer we echter ontsteking bestuderen, hoe meer we zijn complexiteit kennen, met veel cytokines en pathways die worden geactiveerd en hun crosstalk met elkaar en met andere cellulaire processen. Daarnaast werden in het huidige proefschrift slechts drie ontstekingsfactoren gedetailleerd bestudeerd voor hun effect op B[a]P, en er zijn andere ontstekingsfactoren die nog onderzocht moeten worden. Daarnaast werden de meeste studies die het verband tussen ontsteking en chemische carcinogenen onderzochten, uitgevoerd gebaseerd op een enkele variabele, waaronder TNF- α , IL-6, IL-1 β , hypoxie, oxidatieve stress en MPO, terwijl met het mengsel van ontstekingsmediatoren en de daaruit voortvloeiende micro-omgeving in hun geheel rekening mee gehouden moet worden.

Een belangrijke observatie in het huidige proefschrift is dat in vitro studies op tijdsafhankelijke wijze moeten worden uitgevoerd. Veel in vitro studies naar B[a]P werden uitgevoerd op één enkel tijdstip (meestal 24 uren incubaties), wat kan resulteren in het trekken van misleidende conclusies. Sommige ontstekingsfactoren kunnen bijvoorbeeld CYP's op vroege tijdstippen belemmeren, wat leidt tot een inductie van CYP's op latere tijdstippen, omdat ongemetaboliseerd B[a]P de Ahr receptor activeert.

Concluderend, de resultaten die in dit proefschrift gepresenteerd worden, tonen de impact van verschillende ontstekingsfactoren op de genotoxiciteit van B[a]P. Wij geven mechanistische informatie over hoe ontstekingsfactoren mensen meer vatbaar kunnen maken voor blootstelling aan kankerverwekkende stoffen. Het kan ook deuren openen voor nieuwe preventieve maatregelen om kankergevallen bij patiënten met chronische ontstekingsziekten te verminderen; een combinatie van anti-inflammatoire benaderingen en vermindering van blootstelling aan genotoxische chemicaliën is vereist hiervoor. Bovendien kan de toepassing van state-of-the-art technieken in moleculaire benaderingen en diermodellen van ontsteking gerelateerde kanker verder helpen om deze intrigerende puzzel te verhelderen.

Referenties

- [1] K. Sasaki, F. Taura, Y. Shoyama, S. Morimoto, Molecular characterization of a novel beta-glucuronidase from *Scutellaria baicalensis georgi*, *J Biol Chem*, 275 (2000) 27466-27472.
- [2] A. Starsichova, E. Hrubá, E. Slabáková, Z. Pernicová, J. Procházková, K. Penciková, V. Seda, M. Kabátková, J. Vondráček, A. Kozubík, M. Machalá, K. Souček, TGF-beta1 signaling plays a dominant role in the crosstalk between TGF-beta1 and the aryl hydrocarbon receptor ligand in prostate epithelial cells, *Cell Signal*, 24 (2012) 1665-1676.
- [3] A. Gemma, Y. Hosoya, K. Uematsu, M. Seike, F. Kurimoto, A. Yoshimura, M. Shibuya, S. Kudoh, Mutation analysis of the gene encoding the human mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor (M6P/IGF2R) in human cell lines resistant to growth inhibition by transforming growth factor beta(1) (TGF-beta(1)), *Lung Cancer*, 30 (2000) 91-98.
- [4] Y. Kato, S. Ozawa, C. Miyamoto, Y. Maehata, A. Suzuki, T. Maeda, Y. Baba, Acidic extracellular microenvironment and cancer, *Cancer Cell Int*, 13 (2013) 89.
- [5] A. Bellocq, S. Suberville, C. Philippe, F. Bertrand, J. Perez, B. Fouqueray, G. Cherqui, L. Baud, Low environmental pH is responsible for the induction of nitric-oxide synthase in macrophages. Evidence for involvement of nuclear factor-kappaB activation, *J Biol Chem*, 273 (1998) 5086-5092.
- [6] A. Riemann, B. Schneider, A. Ihling, M. Nowak, C. Sauvant, O. Thews, M. Gekle, Acidic environment leads to ROS-induced MAPK signaling in cancer cells, *PLoS One*, 6 (2011) e22445.
- [7] J. Chiche, M.C. Brahim-Horn, J. Pouyssegur, Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer, *J Cell Mol Med*, 14 (2010) 771-794.
- [8] L.M. Maurer, E. Yohannes, S.S. Bondurant, M. Radmacher, J.L. Slonczewski, pH regulates genes for flagellar motility, catabolism, and oxidative stress in *Escherichia coli* K-12, *J Bacteriol*, 187 (2005) 304-319.
- [9] M. Bickel, The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation, *J Periodontol*, 64 (1993) 456-460.
- [10] Q. Shi, A.W. Boots, L. Maas, C. Veith, K. van Kuijk, G.R. Haenen, R.W. Godschalk, F.J. Van Schooten, Effect of interleukin (IL)-8 on benzo[a]pyrene metabolism and DNA damage in human lung epithelial cells, *Toxicology*, 381 (2017) 64-74.
- [11] S.A. Langie, A.M. Knaapen, J.M. Houben, F.C. van Kempen, J.P. de Hoon, R.W. Gottschalk, R.W. Godschalk, F.J. van Schooten, The role of glutathione in the regulation of nucleotide excision repair during oxidative stress, *Toxicol Lett*, 168 (2007) 302-309.
- [12] V.M. Arlt, M. Stiborova, C.J. Henderson, M. Thiemann, E. Frei, D. Aimova, R. Singh, G. Gamboa da Costa, O.J. Schmitz, P.B. Farmer, C.R. Wolf, D.H. Phillips, Metabolic activation of benzo[a]pyrene in vitro by hepatic cytochrome P450 contrasts with detoxification in vivo: experiments with hepatic cytochrome P450 reductase null mice, *Carcinogenesis*, 29 (2008) 656-665.
- [13] D.W. Nebert, Z. Shi, M. Galvez-Peralta, S. Uno, N. Dragin, Oral benzo[a]pyrene: understanding pharmacokinetics, detoxication, and consequences--Cyp1 knockout mouse lines as a paradigm, *Molecular pharmacology*, 84 (2013) 304-313.