

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká Fakulta



Autoreferát dizertační práce

**Uplatnenie funkčných testov na meranie DNA reparačnej kapacity v
molekulárne epidemiologických štúdiách**

Mgr. Jana Slyšková

Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i.

Praha, 2012

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze

a

Ústav experimentální medicíny Akademie věd České republiky

Program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Předseda oborové rady: Prof. RNDr. Stanislav Zdražil, DrSc.

Školící pracoviště: Oddělení molekulární biologie nádorů, Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i.

Autor: Mgr. Jana Slyšková

Školitel: MUDr. Pavel Vodička, CSc.

Školitel konsultant: RNDr. Alessio Naccarati, PhD.

S disertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Obsah

Abstrakt	3
Úvod	4
Hypotézy a ciele práce	6
Materiál a metódy	7
Výsledky a diskusia	9
Závery	13
Použitá literatúra	15
Životopis	17
Zoznam publikácií	20

Contents

Abstract	25
Introduction	26
Hypothesis and aims	28
Material and methods	29
Results and discussion	31
Conclusions	35
Reference list	15
Curriculum vitae	17
List of publications	20

Abstrakt

DNA opravy sú životne dôležitým procesom živých organizmov. Defekty mechanizmov DNA opráv pravdepodobne podmieňujú rozvoj nádorového ochorenia. DNA opravy, ako multigénne a multifaktoriálne procesy, je možné fenotypovo charakterizovať pomocou metódy kométového testu, ktorý meria DNA reparačnú kapacitu (DRC).

Táto doktorská práca je zameraná na výskum DRC bázevej a nukleotidovej excíznej dráhy v rôznych ľudských populáciách. Cieľom bolo zistiť úroveň variability DRC u zdravej populácie, odhaliť genetické a negenetické faktory ktoré túto variabilitu podmieňujú, zistiť či dochádza k adaptačnej zmene DRC v reakcii na vysokú genotoxickú záťaž a napokon, odhaliť vzťah medzi individuálnou hladinou DRC a rizikom vzniku nádorového ochorenia. Za účelom naplnenia stanovených cieľov bola DRC, s ohľadom na genetickú a environmentálnu variabilitu jedincov, vyšetrovaná u zdravých ľudí, u pracovníkov dlhodobo exponovaných karcinogénom a u pacientov s novodiagnostikovaným sporadickým karcinómom. Z metodického hľadiska mala práca za cieľ optimalizovať metódu kométového testu pre možnosť merania DRC v pevných tkanivách a pre plošnejšie využitie vo veľkých epidemiologických štúdiách.

Hlavným prínosom práce, založenej na piatich publikáciách, sú novo získané poznatky o biologickej podstate DRC a rozšírenie metodických postupov jej stanovovania. Najdôležitejšími výstupmi sú: 1) Dôkaz o možnosti fenotypovo analyzovať DNA opravy vo veľkých epidemiologických štúdiách a na rôznom type biologického materiálu, 2) Dôkaz o vysokej informačnej hodnote DRC analýzy, ktorá komplexne charakterizuje aktivitu DNA opráv 3) Zistenie významnej biologickej variability DRC u zdravých ľudí, ktorá je podmienená genetickou variabilitou, intersexuálnymi rozdielmi a životným štýlom, 4) Pozorovanie nevýznamného rozdielu v DRC u ľudí chronicky exponovaných karcinogénom v porovnaní s kontrolnou populáciou, 5) Odhalenie vzťahu nízkej opravnej aktivity DNA a vysokého DNA poškodenia k zvýšenému riziku vzniku nádorového ochorenia, 6) Aktualizácia kométového testu na meranie DRC v pevných tkanivách s vyššou výťažnosťou počtu vzoriek na analýzu a napokon 7) Vypracovanie prvej štúdie pojednávajúcej o DRC priamo v nádorovom tkanive.

Úvod

DNA poškodenie a jeho oprava

Ludský organizmus je konštantne exponovaný látkam, ktoré majú schopnosť narušať štruktúru a funkciu DNA. Genóm každej bunky je vystavený reaktívnym medziproduktom metabolizmu a externým mutagénom. Vzniknuté DNA poškodenia môžu blokovať normálny priebeh replikácie alebo transkripcie a ak nie sú opravené, môžu byť fixované v DNA ako škodlivé mutácie a ohrozovať viabilitu bunky. DNA, na rozdiel od iných molekúl, nemôže byť nahradená, môže byť len opravená. Aby bola bunka schopná udržať stabilitu jej genómu disponuje škálou DNA reparačných mechanizmov so širokým spektrom rozpoznávaných poškodení.

DNA opravy sú zabezpečované niekoľkými samostatnými, ale funkčne prepojenými dráhami, ktoré sú definované typom poškodenia, ktoré opravujú. Bázová (BER) a nukelotidová (NER) excízna oprava je aktivovaná predovšetkým štrukturálnymi zmenami báz. Obe dráhy majú veľmi podobný mechanizmus pôsobenia: 1. rozpoznanie DNA poškodenia, 2. jeho excízia z DNA, 3. dosyntetizovanie odstránenej sekvencie. Kým BER rozpoznáva skôr malé lézie, oxidácie, alkylácie, abázické miesta a vláknové zlomy (SBs), NER naopak rozpoznáva rozsiahle poškodenia ako sú veľké adukty a krížové väzby. Všeobecne platí, že NER opravuje poškodenia exogénneho pôvodu, kým BER rozpoznáva endogénne poškodenia. Defekty v oboch dráhach sú asociované so špecifickými syndrómami spojenými s vysokou náchylnosťou k malignite.

Najlepšie preskúmaná a vysoko mutagénna lézia opravovaná 8-oxoguanín DNA glykozylázou (OGG1) je 7,8-dihydro-8-oxoguanín (8-oxoG). Ten je často považovaný za reprezentatívny biomarker oxidačného stresu a aktivita OGG1 za marker BER kapacity (**Publikácia II, III, V**). U NER je v experimentálnych podmienkach najštudovanejšia oprava UV-indukovaných cyklobutánových pyrimidínových dimérov a 6-4 fotoproduktov (**Publikácia V**) a benzo[a]pyrén diolepoxidom (BPDE)-indukovaných aduktov (**Publikácia I, IV**).

Fenotypické stanovenie DNA opráv

Najmenej 150 doposiaľ identifikovaných génov je priamo zapojených do mechanizmu DNA opráv, väčšina z nich je u ľudí polymorfných [1]. Funkčný dopad väčšiny z polymorfizmov na aktivitu proteínu však zatiaľ nebol definovaný. DNA analýzy pri súčasnom stave poznatkov neposkytujú dostatočnú informáciu o celkovej DNA reparačnej aktivite. Analýza génových

expresii sa tiež ukázala byť nedostatočným informačným zdrojom, pretože zmeny v expresii génu nemusia nevyhnutne viesť k zmene aktivity proteínu a naopak, zmena aktivity proteínu nemusí byť sprevádzaná kvantitatívnou zmenou v jeho expresii [2]. Niektoré štúdie navyše odhadujú, že kapacita DNA opráv je určená nielen dedičnou zložkou odhadovanou na 48-75% [3], ale je modulovaná environmentálnymi faktormi a faktormi životného štýlu cez viacero možných mechanizmov ako je aktivácia/inhibícia enzýmov, dostupnosť nukleotidových prekursorov, regulácia génovej expresie atď. [4].

Vychádzajúc z predošlých argumentov je možno zhrnúť, že DNA opravy sú multifaktoriálnym procesom, ktorý je najkomplexnejšie charakterizovateľný fenotypovo pomocou funkčnej analýzy DNA reparačnej kapacity (DRC). DRC reflektuje všetky zložky environmentálnej a genetickej variability, ktoré ovplyvňujú aktuálnu kapacitu bunky/tkaniva/organizmu udržiavať stabilitu svojej DNA. DRC je možné merať pomocou jednoduchej, rýchlej a citlivej metódy kométového testu. Analýza DRC je založená na kvantifikácii SBs, ktoré vznikajú ako intermediáty počas DNA opráv excízneho typu - BER a NER.

Meranie DNA reparačnej kapacity v molekulárne epidemiologických štúdiách

Molekulárna epidemiológia, ako doplnok ku konvenčnej epidemiológii, sa zaoberá meraním molekulárnych alebo bunkových indikátorov zvýšeného rizika na rôzne ochorenia alebo reakcie organizmu na expozíciu škodlivým látkam. Jej hlavnými výhodami sú nižšie požiadavky na veľkosť vyšetrovanej populácie a vyššia informatívnosť o molekulárnych mechanizmoch zapojených do etiológie ochorení [5]. Metóda kométového testu na detekciu DNA poškodenia a DRC je uplatniteľná v molekulárne epidemiologických štúdiách rôzneho zamerania. Dopyšial' bolo publikovaných len zopár štúdií, ktoré analyzovali BER- a NER-DRC u zdravých ľudí, za cieľom definovať inter-individuálnu variabilitu DRC a jej vzťah ku genetickým, epigenetickým a negenetickým faktorom, ktoré ju podmieňujú (zamerianie **Publikácie I, II**). DRC môže byť ďalej využitá pri sledovaní genotoxického efektu expozície rôznym škodlivým látkam a potenciálnym karcinogénom používaných v priemysle (**Publikácia III**). A napokon, DRC môže predstavovať jeden z faktorov podmieňujúcich individuálnu vnímavosť k nádorovým ochoreniam a k ich liečbe (**Publikácia IV, V**).

Hypotézy a ciele práce

Táto doktorská práca je zameraná na výskum biologickej podstaty a regulácie DNA opráv u ľudí. Cieľom práce bolo charakterizovať variabilitu DNA reparačnej kapacity (DRC) v zdravej populácii, ako aj jej možnú alteráciu pri chronickej expozícii xenobiotikám a jej význam pri vzniku malígneho ochorenia. Pracovná hypotéza a samotná experimentálna práca vychádzala z niekoľkých predpokladov: (i) DNA opravy sú životne dôležitým procesom živých organizmov a pravdepodobne prispievajú k individuálnej vnímavosti k ochoreniam ktoré sú spúšťané DNA poškodením, (ii) DNA opravy môžu byť fenotypovo charakterizované pomocou modifikovanej metódy kométového testu, ktorý je rýchly, citlivou a vizualizačnou metódou na stanovenie DRC, (iii) DRC je komplexný marker aktuálnej kapacity bunky, tkaniva či celého organizmu udržiavať stabilitu svojej DNA. DRC reflektuje súčin všetkých faktorov, ktoré ju ovplyvňujú, a to genetickú variabilitu, úroveň génovej expresie, stabilitu proteínov, pôsobenie aktivátorov/inhibítorov proteínov, faktorov životného štýlu a životného prostredia.

Predkladaná práca bola zameraná na sledovanie DRC bázovej a nukleotidovej excíznej dráhy u zdravých ľudí, u ľudí profesne exponovaných karcinogénom a u pacientov s novodiagnostikovaným sporadickým karcinómom. Práca mala za cieľ zodpovedať nasledovné otázky:

- Aká je variabilita DRC v ľudskej populácii?
- Aké genetické a negenetické faktory ovplyvňujú úroveň DRC?
- Spúšťa dlhodobá expozícia genotoxickým látkam adaptačnú indukciu DRC?
- Je vysoká aktivita DRC asociovaná s nižším rizikom vzniku rakoviny?

Práca mala ďalšie ciele metodického zamerania:

- Modifikovať metódu pre meranie DRC v ľudských pevných tkanivách.
- Modifikovať metódu pre jej širšie využitie v rozsiahlych epidemiologických štúdiách.

Materiál and metódy

Študované populácie

Publikácia I: 100 zdravých jedincov (52 žien a 48 mužov; vek 21-86 rokov, priemerný vek 41.6 ± 17.5) odobraných na periférnu krv.

Publikácia II: 244 zdravých jedincov (61 žien and 183 mužov; vek 19-59 rokov, priemerný vek 41.3 ± 11.3) odobraných na periférnu krv.

Publikácia III: 24 styrenu exponovaných pracovníkov (16 žien, 8 mužov; priemerný vek 39.1 ± 6.1) a 15 neexponovaných úradníkov (9 žien, 6 mužov; priemerný vek 41.3 ± 8.3), všetci zamestnaní v rovnakej továrni, odobraní na periférnu krv.

Publikácia IV: 70 novodiagnostikovaných pacientov so sporadickým kolorektálnym karcinómom (24 žien a 46 mužov; priemerný vek 65.4 ± 10.1) a 70 zdravých kontrol spárovaných s pacientami podľa veku (36 žien a 34 mužov; priemerný vek 62.1 ± 12.7) odobraných na periférnu krv.

Publikácia V: 70 incidentných pacientov (17 žien a 53 mužov, priemerný vek 66.2 ± 10.6) so sporadickým kolorektálnym karcinómom odobraných na črevnú/rektálnu mukózu, tumor a periférnu krv.

Všetci jedinci podpísali informovaný súhlas so zaradením do štúdie a všetky štúdie boli povolené Etickou komisiou.

Stanovenie DNA poškodenia

DNA poškodenie bolo stanovené kométoým testom, ktorý kvantifikuje vláknové zlomy (SBs), alebo alkali-labilné miesta ktoré je možné konvertovať do SBs. Stručne, bunky boli ukotvené v agarózovej vrstve na mikroskopickom sklíčku a boli podrobené lýze, ktorou dôjde k obnaženiu DNA. Alkalickú denaturáciu DNA nasledovala elektroforéza, počas ktorej sa DNA obsahujúca SBs formuje do útvarov pripomínajúcich kométy. Pomer DNA v chvoste kométy je priamo úmerný rozsahu DNA poškodenia. Výsledky boli vyjadrené v DNA % v chvoste.

Stanovenie DNA reparácie

Modifikácie štandardného kométového testu umožňujú meranie SBs ktoré vznikajú ako medziprodukty pri DNA opravách excízneho typu, tzv. incíznou reparačnú aktivitu. Používajú sa dva prístupy:

Challenge assay (Publikácia I, IV):

Týmto testom sa meria DRC vo viabilných periférnych krvných mononukleárných bunkách (PBMC) izolovaných z čerstvej krvi. Stimulované PBMC v médiu boli ovplyvnené BPDE, ktorý indukuje DNA adukty. Po ovplyvnení bolo BPDE odstránené z média a bunky boli ďalej kultivované počas 4 hodín, aby mohli opraviť indukované poškodenia. Meraná hladina DNA zlomov reflektuje reparačnú kapacitu.

In vitro repair assay (Publikácia II, III, V):

Týmto testom sa meria DRC v zamrazených, menej viabilných bunkách alebo v pevných tkanivách, napr. kolorektálnej mukóze. Z buniek sa pripravil proteínový extrakt. Extrakt sa inkuboval so substrátovou DNA obsahujúcou špecifické poškodenie, indukované γ -lúčmi (SBs), Ro 19-8022+viditeľným svetlom (8-oxoG) alebo UV svetlom (fotoprodukty a diméry). Proteínový extrakt odstraňuje poškodenie z DNA a zanecháva zlomy, ktoré sa merajú.

Tento test môže byť prevedený klasickým formátom 2 gély/mikroskopické sklíčko, alebo novozavedeným formátom 12 gélov/mikroskopické sklíčko, ktorý bol optimalizovaný na meranie DRC v pevných ľudských tkanivách počas 2 mesačnej stáže v laboratóriu Prof. Andrew Collinsa v Oslo (Publikácia V).

Genotypovanie

Jednonukleotidové polymorfizmy (SNPs) v génoch kódujúcich DNA reparačné proteíny boli vyberané na základe ich dopadu na sekvenciu aminokyselín (meniace zaradenú aminokyselinu, delečné) a na základe frekvencie minoritnej alely (MAF > 3%). SNPs boli stanovené pomocou PCR-RFLP alebo pomocou TaqMan alelickej discriminačnej metódy.

Stanovenie génovej expzie

Expzia cieľových reparačných génov bola stanovená pomocou RT-qPCR. Celková RNA bola prepísaná do cDNA, ktorej počet kópií bol vyjadrený relatívnou kvantifikáciou. Výsledky boli normalizované na priemer Cq hodnôt alebo na referenčné gény. Normalizačná metóda bola testovaná pomocou algoritmu Genorm a Normfinder. Výsledky boli vyjadrené ako hodnoty relatívne k najvyššiemu Cq (t.j. ku vzorke s najnižšou expziou vyjadrenou ako 1) a boli log₂ transformované.

Výsledky a diskusia

V tejto časti sú zosumarizované najvýznamnejšie výsledky každej z piatich publikácií, ktoré reprezentujú dizertačnú prácu.

Publikácia I:

Publikácia “*DNA damage and nucleotide excision repair capacity in healthy individuals*” bola zameraná na stanovenie rozsahu DNA poškodenia a NER-špecifickej DRC u zdravých ľudí, na podklade genetickej a negetickej variability ktorá môže ovplyvňovať DNA stabilitu.

Pozorovaná inter-individuálna variabilita u 100 sledovaných ľudí bola významná, niektorí jedinci mali len zanedbateľné hodnoty reparačnej aktivity. Inter-individuálna variabilita BPDE-indukovanej NER-DRC bola 16-násobná. Priemerná hladina DNA poškodenia bola 0.1 SBs/10⁶ nukleotidov (~300 zlom/bunka). V meta-analýze zhrňujúcej 125 štúdií, priemerná hodnota SBs u rôznych populácií bola 0.09 SBs/10⁶ nukleotidov (~270 zlom/bunka) [6], čo zodpovedá našemu pozorovaniu a naznačuje, že táto hladina DNA poškodenia môže byť považovaná za referenčnú hodnotu pre zdravú populáciu. Pohlavie a konzumácia alkoholu pôsobili ako nezávislé faktory ovplyvňujúce hladinu DNA poškodenia. Muži a konzumenti alkoholu mali o 50% vyššie poškodenie DNA. Po stratifikácii DRC podľa individuálnych polymorfizmov v DNA reparačných génoch bolo pozorované, že jedinci s genotypom *XPC* 499Val majú zvýšené hodnoty DNA poškodenia [7,8]. *XPA* 23A genotyp bol asociovaný so zníženou NER-DRC [9-11], čo naznačuje, že tento genotyp môže byť relevantný pre výslednú aktivitu NER.

Táto štúdia priniesla nové informácie o rozsahu DNA poškodenia a NER-DRC u zdravých ľudí a popísala špecifické genetické, biologické charakteristiky a faktory životného štýlu, ktoré majú na ne vplyv. Podobne orientovaná štúdia zameraná však na DRC špecifickú pre BER dráhu bola uverejnená v **Publikácii II.**

Publikácia II:

Štúdia “*Association of DNA repair polymorphisms with DNA repair functional outcomes in healthy human subjects*” bola zameraná na stanovenie BER-DRC u 244 zdravých ľudí, zohľadniac genetickú variabilitu v DNA reparačných génoch.

V tejto štúdií bola sledovaná oprava vláknových zlomov (SB-DRC) a oprava 8-oxoG (ox-DRC), tj. dlhá a krátka dráha BER. Pozorovaná inter-individuálna variabilita bola 9- a 21-násobná. Najnižšia SB-DRC bola dokázaná u jedincov s *XRCCI* 399Gln genotypom a najnižšia ox-DRC u jedincov s *OGGI* 326Cys genotypom. *XRCCI* Arg399Gln bol určený algoritmom na vyhľadávanie rizikových SNPs ako polymorfizmus s potenciálnym efektom na funkciu proteínu [12]. Niektoré molekulárne epidemiologické štúdie tiež popísali vplyv tohto polymorfizmu na kvalitu proteínu [13]. Tieto výsledky majú biologickú dôležitosť, pretože *XRCCI* pôsobí ako koordinátor opravy SBs [14]. Rovnako tak aj vzťah *OGGI* Ser326Cys k výslednej ox-DRC má biologické opodstatnenie, nakoľko ox-DRC reflektuje práve aktivitu *OGGI* proteínu. Niekoľko štúdií analyzujúcich biochemické vlastnosti *OGGI* naznačujú, že *OGGI* 326Cys genotyp môže ovplyvňovať kvalitu a aktivitu proteínu [15,16].

Štúdie publikované v **Publikáciách I a II** boli prevedené s cieľom nadobudnúť východzie poznatky o NER a BER aktivite u zdravých ľudí s následnou aplikáciou DRC ako biomarkeru individuálnej vnímavosti na chronickú genotoxickú záťaž a biomarker vnímavosti k nádorovým ochoreniam (**Publikácia III a IV**).

Publikácia III:

Štúdia “*Relationship between the capacity to repair 8-oxoguanine, biomarkers of genotoxicity and individual susceptibility in styrene-exposed workers*” bola zameraná na sledovanie BER-DRC a biomarkerov genotoxicity (SBs, chromozomálne aberácie, *HPRT*-mutácie a DNA adukty) vo vzťahu ku genetickej variabilite u 24 pracovníkov exponovaných styrénu a 15 neexponovaných úradníkov z rovnakej továrne. Pracovníci boli exponovaní 14 ± 5.6 rokov 98.1 ± 98.9 mg/m³ styrénu, čo sa približuje povolenému expozičnému limitu [17]. Styren bol IARCCom klasifikovaný ako možný karcinogén a bola dokumentovaná jeho mutagénna a klastogénna aktivita. Styren je metabolizovaný na styren oxid, ktorý má schopnosť sa kovalentne viazať na DNA a tvoriť adukty, ktoré sú opravované BER.

Všetky vyšetované biomarkere genotoxicity boli signifikantne zvýšené u exponovaných ľudí, s výnimkou BER-DRC, ktorá bola zvýšená len nesignifikantne. V predchodzej štúdií na inej styrénu exponovanej populácii bola BER-DRC významne zvýšená u exponovaných pracovníkov a hladina DNA poškodenia bola pozitívne korelovaná s reparačnými hodnotami [18]. Bola preto vyslovená hypotéza, že u exponovaných pracovníkov nedošlo k akumulácii genotoxického poškodenia vďaka adaptačnej indukcii DNA reparácií. Táto hypotéza však nebola v súčasnej štúdií podporená. Je možné predpokladať, že pri dlhodobej expozícii (o 10 rokov dlhšie ako v predchodzej štúdií) dochádza k indukcii iných adaptačných mechanizmov.

Naše výsledky však naznačujú, že BER-DRC môže byť modulovaná fajčením, pohlavím a genetickou variabilitou. Signifikantne nižšiu BER-DRC mali nositelia *XRCCI* 399Gln a *OGGI* 326Cys variantnej alely.

Publikácia IV:

Publikácia “*Differences in nucleotide excision repair capacity between newly diagnosed colorectal cancer patients and healthy controls*” pojednáva o hladine bazálneho DNA poškodenia a BER-DRC u 70 pacientov so sporadickým kolorektálnym karcinómom (CRC) v porovnaní so 70 kontrolami spárovanými s pacientami na vek. Pacientom bola odobraná krv pri prvom stanovení diagnózy, čiže neboli pred odberom podrobení liečbe.

U pacientov bolo pozorované signifikantne vyššie DNA poškodenie a nižšia schopnosť opravy DNA v porovnaní s kontrolami. Oba sledované parametre predstavovali nezávislé rizikové faktory podmieňujúce vznik CRC. Defektná BER-DRC bola pozorovaná u ďalších typov nádorového ochorenia, u rakoviny močového mechúra, prsníka, kože, hlavy a krku, pľúc a prostaty (viď Tabuľka 1 v **Publikácii IV**). Naše výsledky prispievajú k zoznamu pozorovaní o významnosti BER v procese karcinogenézy, ukazujúc rovnaký význam aj u sporadického CRC. Nízka schopnosť BER zvyšuje individuálnu vnímavosť k sporadickému CRC. Hladina DNA poškodenia u pacientov v porovnaní s kontrolami bola ~1113 verzus 540 zlom/bunka. V meta-analýze sumarizujúcej 119 štúdií podobného zamerania bolo spriemerované DNA poškodenie u zdravej populácie rovnakého veku ako bola naša na 510 zlom/bunka [6], čo sa plne zhoduje s nami pozorovanými hodnotami. Pacienti v našom súbore teda majú viac ako 2-násobne vyššie hodnoty DNA poškodenia ako kontroly, čo dodatočne poukazuje na zmenenú schopnosť udržiavať stabilitu DNA v PBMC. Expresný profil 9 kľúčových BER génov nezodpovedal výslednej hodnote BER-DRC. Hoci 2/3 študovaných génov vykazovalo zmenenú expresiu u pacientov, ich expresné hladiny neboli u pacientov výlučne nižšie (*XPB* a *XPF*), ako by sa dalo predpokladať zo zníženej celkovej DRC, ale niektoré gény boli u pacientov exprimované viac ako u kontrol (*XPA*, *XPG*, *ERCCI* a *RAD23B*). Expresia žiadneho génu nekorelovala s výslednou DRC. Tento fenomén bol pozorovaný aj inými výskumnými skupinami [2,19,20]. Táto štúdia preto zdôrazňuje významnosť analýzy DRC, ktorá komplexne reflektuje mnohogénny proces DNA reparácií. Otázka, či DRC je proces tkanivovo špecifický a či DRC v krvi môže reflektovať DRC iných tkanív však stále ostáva otvorená. Ďalšia štúdia bola zameraná okrem iného aj na zodpovedanie týchto otázok.

Publikácia V

V štúdií s názvom “*Functional, genetic and epigenetic aspects of base and nucleotide excision repair in colorectal carcinomas*” bola popísaná kapacita BER a NER v 70-tich tumoroch sporadického kolorektálneho adenokarcinómu v porovnaní s okolitým zdravým tkanivom. U 28 pacientov DRC v črevnej mukóze boli porovnané s DRC v krvi. Expresný profil 8 BER a 17 NER génov bol tiež sledovaný. Táto štúdia bola navyše zameraná na optimalizáciu kométového reparačného testu na meranie DRC z ľudských tkanivových biopsií.

U tumorov bola pozorovaná zvýšená NER-DRC, ale nie BER-DRC. Zvýšená NER bola u CRC nádorov už reportovaná [21]. Niektoré ďalšie štúdie merali BER a NER nepriamo cez zvýšené hodnoty DNA poškodenia opravované týmito dráhami [22-24]. Na základe zhodnosti viacerých pozorovaní je možno predpokladať, že excízne opravy nie sú kľúčovými faktormi prispievajúcimi k malígnej transformácii črevného epitelu, ale skôr zvyhodňujú už existujúcu nádor tým, že znižujú jeho vnímavosť k akumulácii DNA poškodenia ktoré za normálnych okolností končí bunkovou smrťou. Hoci DRC u PBMC bola 2.5-krát nižšia ako v črevnom epitele, DRC oboch excíznych dráh nameraných v PBMC pozitívne korelovalo s DRC v črevnej mukóze. Krv teda reflektuje reparačnú kapacitu črevného epitelu a môže byť využitá ako náhradné tkanivo v biomonitorovacích štúdiách. Rovnaký fenomén bol pozorovaný v [21], a naznačený v [25]. Štyri BER gény (*NEIL1*, *APEX1*, *OGG1* and *PARP1*) a štyri NER gény (*CSB*, *CCNH*, *XPA* and *XPD*) mali zmenenú expresiu v tumorovom tkanive, v porovnaní so zdravým okolitým tkanivom. Expresia bola zmenená však len veľmi mierne a to 1.08 až 1.28-násobne. Expresia žiadneho sledovaného génu nekorelovala s výslednou DRC. Metóda kvantitatívneho stanovenia génových kópií teda nemôže slúžiť ako substitučná metóda sledovania reparačnej kapacity. Táto štúdia preto opäť podčiarkuje významnosť funkčného stanovenia DRC na proteínovej úrovni.

Závery

V tejto kapitole budú zodpovedané všetky otázky, ktoré boli stanovené v kapitole Hypotézy a ciele práce, zhrňujúc výsledky vlastnej experimentálnej práce na podklade doplnkovej literatúry.

- Aká je variabilita DRC v ľudskej populácii?

Pozorovali sme významnú inter-individuálnu variabilitu integrity DNA ako aj DNA reparácií u zdravých ľudí. Rozsah DNA poškodenia, ktoré reflektuje DNA zlomy a abázické miesta v DNA bolo 25-násobné. Priemerná hodnota bola 1 zlom/ 10^7 nukleotidov, a táto hodnota, zhodujúca sa s pozorovaniami mnohých iných skupín, môže byť považovaná za referenčnú hodnotu. Čo sa týka BER dráhy, variabilita v kapacite rozpoznať a odstrániť poškodenia z DNA bola vyššia (21-násobná) ako variabilita v kapacite dosyntetizovať vzniknutú medzeru a spojiť voľné konce (9-násobná). Incízna fáza limituje kapacitu celej dráhy. Variabilita v oprave rozmerných aduktov v rámci NER dráhy bola 16-násobná.

- Aké genetické a negenetické faktory ovplyvňujú úroveň DRC?

Nami pozorovaná BER-DRC bola najviac ovplyvnená prítomnosťou variantnej alely v polymorfizme *OGGI* Ser326Cys a *XRCCI* Arg399Gln. NER-DRC bola modulovaná polymorfizmom *XPA* G23A. U všetkých potenciálne funkčných polymorfických miest platilo, že variantná alela podmieňovala najnižšiu aktivitu proteínu. Naše výsledky v kombinácii s ďalšími *in silico*, *in vitro* a epidemiologickými štúdiami poukazujú na možný funkčný dopad polymorfizmov v génoch *XPA*, *XRCCI* a *OGGI* na aktivitu kódovaného proteínu. Naše výsledky ďalej poukazujú na význam rozdielov medzi pohlaviami a na faktory životného štýlu pri modulácii celkovej reparačnej kapacity.

- Spúšťa dlhodobá expozícia genotoxickým látkam adaptačnú indukciu DRC?

Preukázali sme významný genotoxický potenciál styrénu na ľudský organizmus cez markantné zvýšenie markerov genotoxického stresu u zamestnancov vystavených dlhodobej expozícii tejto látky, v porovnaní s neexponovanými úradníkmi. Vplyv expozície na DRC sa však nepotvrdil.

- Je vysoká aktivita DRC asociovaná s nižším rizikom vzniku rakoviny?

Je známe, že ~15% sporadických CRC je defektných v mismatch reparačnej dráhe. Naše očakávanie, že sporadické CRC tumory budú defektné aj v BER alebo NER dráhe sa však nepotvrdili. Naše výsledky však ukazujú, že pacienti so sporadickým CRC sú celkovo charakteristickí nižšou schopnosťou NER (meranej v krvi), čo ich pravdepodobne

predisponuje k vyššej genotoxickej záťaži a tak zvyšuje ich vnímavosť k malígnemu ochoreniu. Vzťah medzi nízkou DRC a rizikom rakoviny bol popísaný aj u iných typov tohto ochorenia, ako je zrejmé z dostupnej literatúry.

Napriek nepochybnej informačnej hodnote funkčných testov na meranie DRC, tieto metódy ešte stále nie sú rutinne aplikované v epidemiologických štúdiách. Táto skutočnosť je spôsobená najmä tým, že metódy na meranie DRC sú pomerne pracné, hlavne keď je potreba spracovať väčší počet vzoriek. Preto posledné dva ciele tejto práce boli zamerané na metodické prispôbenie techniky pre jej širšie využitie.

- Modifikovať metódu na možné meranie DRC v ľudských pevných tkanivách.

Poprvý raz bola metóda kométového testu aplikovaná na meranie DRC v ľudských pevných tkanivách. Táto modifikácia umožní sledovanie tkanivovej špecificity DNA opráv u ľudí.

- Modifikovať metódu pre jej širšie využitie pre spracovanie veľkého počtu vzoriek v rozsiahlych epidemiologických štúdiách.

Zaviedli a optimalizovali sme modifikáciu klasického formátu 2 gély/mikroskopické sklíčko na formát 12 gélov/mikroskopické sklíčko, čo predstavuje 6-násobné zvýšenie efektivity. Predpokladáme, že táto modifikácia má potenciál postupne úplne nahradiť pôvodný formát.

Použitá literatura

- [1] E.C. Friedberg DNA damage and repair, *Nature* 421 (2003) 436-440.
- [2] U. Vogel, M. Dybdahl, G. Frentz and B.A. Nexø DNA repair capacity: inconsistency between effect of over-expression of five NER genes and the correlation to mRNA levels in primary lymphocytes, *Mutat Res* 461 (2000) 197-210.
- [3] X. Wu, M.R. Spitz, C.I. Amos, J. Lin, L. Shao, J. Gu, M. de Andrade, N.L. Benowitz, P.G. Shields and G.E. Swan Mutagen sensitivity has high heritability: evidence from a twin study, *Cancer Res* 66 (2006) 5993-5996.
- [4] J.C. Mathers, J.M. Coxhead and J. Tyson Nutrition and DNA repair--potential molecular mechanisms of action, *Curr Cancer Drug Targets* 7 (2007) 425-431.
- [5] M. Dusinska and A.R. Collins The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions, *Mutagenesis* 23 (2008) 191-205.
- [6] P. Møller Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA, *Mutat Res* 612 (2006) 84-104.
- [7] J. Shen, M. Desai, M. Agrawal, D.O. Kennedy, R.T. Senie, R.M. Santella and M.B. Terry Polymorphisms in nucleotide excision repair genes and DNA repair capacity phenotype in sisters discordant for breast cancer, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15 (2006) 1614-1619.
- [8] Y. Zhu, H. Yang, Q. Chen, J. Lin, H.B. Grossman, C.P. Dinney, X. Wu and J. Gu Modulation of DNA damage/DNA repair capacity by XPC polymorphisms, *DNA Repair (Amst)* 7 (2008) 141-148.
- [9] X. Wu, H. Zhao, Q. Wei, C.I. Amos, K. Zhang, Z. Guo, Y. Qiao, W.K. Hong and M.R. Spitz XPA polymorphism associated with reduced lung cancer risk and a modulating effect on nucleotide excision repair capacity, *Carcinogenesis* 24 (2003) 505-509.
- [10] J. Lin, G.E. Swan, P.G. Shields, N.L. Benowitz, J. Gu, C.I. Amos, M. de Andrade, M.R. Spitz and X. Wu Mutagen sensitivity and genetic variants in nucleotide excision repair pathway: genotype-phenotype correlation, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16 (2007) 2065-2071.
- [11] S.A. Langie, L.C. Wilms, S. Hamalainen, J.C. Kleinjans, R.W. Godschalk and F.J. van Schooten Modulation of nucleotide excision repair in human lymphocytes by genetic and dietary factors, *Br J Nutr* 103 (2010) 490-501.
- [12] S. Savas, D.Y. Kim, M.F. Ahmad, M. Shariff and H. Ozelik Identifying functional genetic variants in DNA repair pathway using protein conservation analysis, *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 13 (2004) 801-807.
- [13] W.W. Au, S.A. Salama and C.H. Sierra-Torres Functional characterization of polymorphisms in DNA repair genes using cytogenetic challenge assays, *Environ Health Perspect* 111 (2003) 1843-1850.
- [14] Y. Wang, M.R. Spitz, Y. Zhu, Q. Dong, S. Shete and X. Wu From genotype to phenotype: correlating XRCC1 polymorphisms with mutagen sensitivity, *DNA Repair (Amst)* 2 (2003) 901-908.
- [15] R.M. Kershaw and N.J. Hodges Repair of oxidative DNA damage is delayed in the Ser326Cys polymorphic variant of the base excision repair protein OGG1, *Mutagenesis* (2012) 501-510.
- [16] L. Luna, V. Rolseth, G.A. Hildrestrand, M. Otterlei, F. Dantzer, M. Bjoras and E. Seeberg Dynamic relocalization of hOGG1 during the cell cycle is disrupted in cells harbouring the hOGG1-Cys326 polymorphic variant, *Nucleic Acids Res* 33 (2005) 1813-1824.

- [17] A.f.T.S.a.D.R. (ATSDR) Toxicological profile for styrene, Atlanta, GA: U.S. Department of health and human services, Public health service Online available (1992) <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp53.html>.
- [18] P. Vodicka, J. Tuimala, R. Stetina, R. Kumar, P. Manini, A. Naccarati, L. Maestri, L. Vodickova, M. Kuricova, H. Jarventaus, Z. Majvaldova, A. Hirvonen, M. Imbriani, A. Mutti, L. Migliore, H. Norppa and K. Hemminki Cytogenetic markers, DNA single-strand breaks, urinary metabolites, and DNA repair rates in styrene-exposed lamination workers, *Environmental Health Perspectives* 112 (2004) 867-871.
- [19] M. Hanova, L. Vodickova, R. Vaclavikova, Z. Smerhovsky, R. Stetina, P. Hlavac, A. Naccarati, J. Slyskova, V. Polakova, P. Soucek, R. Kumar, K. Hemminki and P. Vodicka DNA damage, DNA repair rates and mRNA expression levels of cell cycle genes (TP53, p21(CDKN1A), BCL2 and BAX) with respect to occupational exposure to styrene, *Carcinogenesis* 32 (2011) 74-79.
- [20] T. Paz-Elizur, D. Elinger, Y. Leitner-Dagan, S. Blumenstein, M. Krupsky, A. Berrebi, E. Schechtman and Z. Livneh Development of an enzymatic DNA repair assay for molecular epidemiology studies: distribution of OGG activity in healthy individuals, *DNA Repair (Amst)* 6 (2007) 45-60.
- [21] M. Herrera, G. Dominguez, J.M. Garcia, C. Pena, C. Jimenez, J. Silva, V. Garcia, I. Gomez, R. Diaz, P. Martin and F. Bonilla Differences in repair of DNA cross-links between lymphocytes and epithelial tumor cells from colon cancer patients measured in vitro with the comet assay, *Clin Cancer Res* 15 (2009) 5466-5472.
- [22] C. Jonsson, P. Stal, U. Sjoqvist, J.E. Akerlund, R. Lofberg and L. Moller DNA adducts in normal colonic mucosa from healthy controls and patients with colon polyps and colorectal carcinomas, *Mutagenesis* 25 (2010) 499-504.
- [23] G. Kirkali, D. Keles, A.E. Canda, C. Terzi, P.T. Reddy, P. Jaruga, M. Dizdaroglu and G. Oktay Evidence for upregulated repair of oxidatively induced DNA damage in human colorectal cancer, *DNA Repair (Amst)* 10 (2011) 1114-1120.
- [24] A. Pfohl-Leszkowicz, Y. Grosse, V. Carriere, P.H. Cugnenc, A. Berger, F. Carnot, P. Beaune and I. de Waziers High levels of DNA adducts in human colon are associated with colorectal cancer, *Cancer Res* 55 (1995) 5611-5616.
- [25] L. Cheng, Y. Guan, L. Li, R.J. Legerski, J. Einspahr, J. Bangert, D.S. Alberts and Q. Wei Expression in normal human tissues of five nucleotide excision repair genes measured simultaneously by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8 (1999) 801-807.

Životopis

Meno a priezvisko: Jana Slyšková
Dátum a miesto narodenia 14/01/1982,
Považská Bystrica, Slovenská republika
Národnosť Slovenská
Adresa Svatoslavova 31, Praha 4, Česká republika
Telefónne číslo 00420 608 560 027
E-mail j.slyskova@gmail.com

Študijná a profesná história

2000-2005 Magisterské štúdium, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, obor biológia a antropológia, Slovenská republika
2005-2006 Výskumný pracovník, Laboratórium molekulárnej a bunkovej toxikológie, Oddelenie experimentálnej a aplikovanej genetiky, Výskumná základňa Zdravotníckej univerzity v Bratislave, Slovenská republika
2006-súčasne Postgraduálne štúdium, Oddelenie molekulárnej biológie nádorov, Ústav experimentálnej medicíny Akadémie vied, Praha, Česká Republika
2010-súčasne Výskumný pracovník, Ústav biologie a lékařské genetiky, 1. Lékařská fakulta, Praha, Česká Republika

Zahraničné stáže a kurzy

Finančná podpora/stáž **EEA-researchfund:** B/CZ0046/40031, 1.-31.3.2011
Projekt: Hodnotenie markerov DNA integrity v tumoroch sporadického kolorektálneho karcinómu.
Hostiteľ: Oddelenie výživy, Univerzita v Oslo, Nórsko
Finančná podpora/stáž **UICC-ICRETT:** ICR/11/068/2011, 31.10-1.12.2011
Projekt: Tkanivovo špecifické stanovenie excíznej reparačnej kapacity u pacientov s kolorektálnym karcinómom.

Finančná podpora/stáž	<p>Hostiteľ: Oddelenie výživy, Univerzita v Oslo, Nórsko Hlávkova Nadácia, 31.10 - 1.12.2011 Projekt: DNA reparačná kapacita vo vzťahu k liečbe kolorektálneho karcinómu.</p>
Stáž	<p>Hostiteľ: Oddelenie výživy, Univerzita v Oslo, Nórsko 7.8. – 3.10. 2012 Laboratórium Prof. Andrew Collinsa, Oddelenie výživy, Univerzita v Oslo, Nórsko</p>
Kurzy	<p>Pokroky v molekulárnej biológii a genetike, Ústav molekulárnej genetiky, Praha, november 2006 Praktiká z molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta, Praha, január 2007 Molekulárna biológia, Prírodovedecká fakulta, Praha, september-jún 2007 Základy vedeckej práce, Akadémia vied Českej republiky, Praha, júl 2008 Real-time kvantitatívna PCR, TATAA Biocenter, Praha, december 2009 Cytogenetika, Inštitút postgraduálnych štúdií, Praha, február 2010</p>

Granty

Hlavná riešiteľka grantu	<p>GAUK: 124710/2010 Projekt: Sledovanie DNA reparačnej kapacity vo vzťahu ku kolorektálnemu karcinómu a jeho liečbe.</p>
--------------------------	---

Jazykové znalosti

Aktívna znalosť anglického jazyka	First Certificate in English (Cambridge), 2009
-----------------------------------	--

Iné

Prednáška	<p>Reparačná kapacita opravy 8-oxoguanínu vo vzťahu k ďalším biomarkerom u styrenu exponovaných pracovníkov; Genetická toxikológia a prevencia rakoviny, Bratislava, SR, 2006</p>
-----------	---

Poster	Stanovenie nukleotídnej excíznej reparácie u zdravých ľudí, 10. Stretnutie DGDR: DNA reparácie, Berlín, SRN, 2008
Poster	Analýza DNA poškodenia a DNA reparačnej kapacity v súvislosti s kolorektálnym karcinómom; EEMS, Oslo, Nórsko, 2010
Vedúca bakalárskej práce	Jednonukleotidové polymorfizmy ako biomarker predispozície ku kolorektálnemu karcinómu, 2009 Študent: Lucia Žifčáková, Katedra bunkovej biológie, Prírodovedecká fakulta, Karlova univerzita, Praha
Oponentka diplomovej práce	Stanovenie oxidačného poškodenia pomocou jednobunkovej gélovej elektroforézy, 2008 Študent: Věra Škubalová, Katedra biológie a medicínskych vied, Fakulta farmakológie, Karlova univerzita, Hradec Kralove
Cena za najlepšiu publikáciu	Publikácia roku: P. Vodicka et al. Carcinogenesis. 2007; 28:657-664. v kategórii "Toxikológia", ocenená Českou spoločnosťou pre experimentálnu a klinickú farmakológiu a toxikológiu Českej lekárskej spoločnosti J.E.Purkyně

Zoznam publikácií

Zoznam publikácií viazaných k dizertačnej práci

- I **Slyskova J**, Naccarati A, Polakova V, Pardini B, Vodickova L, Stetina R, Schmuczerova J, Smerhovsky Z, Lipska L, Vodicka P. DNA damage and nucleotide excision repair capacity in healthy individuals. *Environmental Molecular Mutagenesis*. 2011; 52: 511-7. **IF 3.493**
- II Vodicka P, Stetina R, Polakova V, Tulupova E, Naccarati A, Vodickova L, Kumar R, Hanova M, Pardini B, **Slyskova J**, Musak L, De Palma G, Soucek P, Hemminki K. Association of DNA repair polymorphisms with DNA repair functional outcomes in healthy human subjects. *Carcinogenesis*. 2007; 28:657-64. **IF 5.402**
- III **Slyskova J**, Dusinska M, Kuricova M, Soucek P, Vodickova L, Susova S, Naccarati A, Tulupova E, Vodicka P. Relationship between the capacity to repair 8-oxoguanine, biomarkers of genotoxicity and individual susceptibility in styrene-exposed workers. *Mutation Research*. 2007; 634:101-11. **IF 2.938**
- IV **Slyskova J**, Naccarati A, Pardini B, Polakova V, Vodickova L, Smerhovsky Z, Levy M, Lipska L, Liska V, Vodicka P. Differences in nucleotide excision repair capacity between newly diagnosed colorectal cancer patients and healthy controls. *Mutagenesis*. 2012; 27:225-32. **IF 3.983**
- V **Slyskova J**, Korenkova V, Collins A, Prochazka P, Vodickova L, Svec J, Lipska L, Levy M, Schneiderova M, Liska V, Holubec L, Soucek P, Naccarati A, Vodicka P. Functional, genetic and epigenetic aspects of base and nucleotide excision repair in colorectal carcinomas. *Clinical Cancer Research*. accepted for publication on 5.9.2012. **IF 7.742**

Zoznam ostatných publikácií

- VI Naccarati A, Pardini B, Landi S, Landi D, **Slyskova J**, Novotny J, Levy M, Lipska L, Polakova V, Vodicka P. Polymorphisms in miRNA binding sites of nucleotide excision repair genes and colorectal cancer risk. *Carcinogenesis*. 2012; 33:1346-51. **IF 5.402**

- VII Hanova M, Vodickova L, Vaclavikova R, Smerhovsky Z, Stetina R, Hlavac P, Naccarati A, **Slyskova J**, Polakova V, Soucek P, Kumar R, Hemminki K, Vodicka P. DNA damage, DNA repair rates and mRNA expression levels of cell cycle genes (TP53, p21^(CDKN1A), BCL2 and BAX) with respect to occupational exposure to styrene. *Carcinogenesis*. 2011; 32:74-9. **IF 5.402**
- VIII Polakova V, Pardini B, Naccarati A, Landi S, **Slyskova J**, Novotny J, Vodickova L, Bermejo JL, Hanova M, Smerhovsky Z, Tulupova E, Kumar R, Hemminki K, Vodicka P. Genotype and haplotype analysis of cell cycle genes in sporadic colorectal cancer in the Czech Republic. *Human Mutation*. 2009; 30:661-8. **IF 5.956**
- IX Tulupova E, Kumar R, Hanova M, **Slyskova J**, Pardini B, Polakova V, Naccarati A, Vodickova L, Novotny J, Halamkova J, Hemminki K, Vodicka P. Do polymorphisms and haplotypes of mismatch repair genes modulate risk of sporadic colorectal cancer? *Mutation Research*. 2008; 648:40-5. **IF 3.204**
- X Musak L, Soucek P, Vodickova L, Naccarati A, Halasova E, Polakova V, **Slyskova J**, Susova S, Buchancova J, Smerhovsky Z, Sedikova J, Klimentova G, Osina O, Hemminki K, Vodicka P. Chromosomal aberrations in tire plant workers and interaction with polymorphisms of biotransformation and DNA repair genes. *Mutation Research*. 2008; 641:36-42. **IF 3.204**
- XI Pardini B, Naccarati A, Novotny J, Smerhovsky Z, Vodickova L, Polakova V, Hanova M, **Slyskova J**, Tulupova E, Kumar R, Bortlik M, Barale R, Hemminki K, Vodicka P. DNA repair genetic polymorphisms and risk of colorectal cancer in the Czech Republic. *Mutation Research*. 2008; 638:146-53. **IF 3.204**

Charles University in Prague

Faculty of Science



Summary of the Ph.D. Thesis

**The application of functional tests to measure DNA repair capacity in
molecular epidemiological studies**

MSc. Jana Slyšková

Institute of Experimental Medicine, AS CR, v.v.i.

Prague, 2012

Abstract

DNA repair is a vital process of living organisms. Defects in DNA repair systems are expected to be important, if not crucial factors, in the development of human cancers. DNA repair is a multigene and multifactorial process, which can be most comprehensively characterized by the phenotypic comet repair assay, measuring DNA repair capacity (DRC).

The present PhD study was focused on investigating DRC, specific for base and nucleotide excision repair pathways, in human populations with different characteristics. The study was designed to understand the extent of physiological variability of DRC in the general healthy population, its modulation by genetic and non-genetic factors, tentative adaptability to high genotoxic stress and, finally, its involvement in cancer aetiology. In order to explore these issues, DRC, in respect to genetic and environmental variability, was investigated in healthy subjects as well as in individuals with higher requirement for DNA stability maintenance, i.e. workers occupationally exposed to carcinogens, and in newly diagnosed cancer patients. Additionally, from a methodological aspect, the study was also aimed to ameliorate the comet repair assays for their wider applicability in human epidemiological studies.

The major outcomes of the PhD study which are fully reported in the five publications included in the present Thesis are: 1) The demonstration of feasibility to phenotypically study DRC in large-scale epidemiological studies on different types of biological material, 2) Evidence that the marker of DRC provides fundamental information that cannot be obtained by single gene or transcript analysis, 3) The observation of substantial biological variability in the DNA repair processes among healthy individuals, modulated by the genetic variability and by the inter-sexual differences and lifestyle factors, 4) Record of lack of alteration of DRC following chronic exposure to high doses of carcinogens, 5) Proof of suboptimal activity of DNA repair and high level of DNA damage in cancer patients, showing the significance of DRC in the individual susceptibility to cancer, 6) An upgrade of comet repair assay for DRC measurement in human solid tissues with higher yield of samples processed per one analysis, which was finally followed by 7) The achievement of a first study on DRC in cancer-target tissues and tumors.

Introduction

DNA damage and its repair

The human organism is constantly exposed to a wide range of agents that bind to DNA and disrupt its structure. The genome is attacked by reactive cellular metabolites and by a spectrum of mutagens from the environmental sources. Generated DNA lesions can block replication and transcription, or subsequently they may lead to mutations that threaten cell viability. DNA, in contrast to other biomolecules, cannot be replaced, it can only be repaired. The ability of cell to protect its genomic integrity against a large variety of DNA alterations is a vital process of living organisms. Therefore, cells have evolved a variety of DNA repair mechanisms with a broad substrate specificity to maintain the stability of the genome.

DNA repair can be divided into several distinct, but functionally interwoven pathways, which are defined by the type of DNA lesions that they process. Base excision repair (BER) and nucleotide excision repair (NER) are activated mainly by structural modifications of DNA bases. Both pathways act according to a common pattern: recognition of the DNA lesion, excision of the damage and resynthesis of the removed sequence. While BER recognizes mostly subtle changes, such as oxidations, alkylations, abasic sites or strand breaks (SBs), NER is activated by helix-distorting damage, such as bulky adducts or strand crosslinks. Generally, most NER lesions arise from exogenous sources, whereas BER is mostly concerned with damage of endogenous origin. Defects in both pathways are associated with specific cancer-prone syndromes.

The best-known and the most deleterious lesion repaired by 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) is 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoG). It is often used as a cellular biomarker for indicating the extent of oxidative stress and activity of OGG1 as a marker of BER activity (**Manuscript II, III, V**). Concerning NER, the most studied is the repair of UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts (**Manuscript V**) and benzo[a]pyrene diolepoxide (BPDE)-induced adducts (**Manuscript I, IV**).

Phenotyping DNA repair

DNA repair is a multigene and a multipathway process. It involves more than 150 genes, many of them being polymorphic in the human population [1]. The functional consequences of the majority of them have not been fully characterized thus far. In the current state of the art, DNA analyses do not provide sufficient information in the prediction of the overall DNA

repair activity. Gene expression analysis has shown to be misleading source of information, because changes in mRNA levels do not necessarily reflect changes in enzyme activity and vice versa [2]. Moreover, family-based studies showed that DNA repair is a phenotype with 48-75% heritability [3]. The rest is influenced by environmental and lifestyle factors [4]. Summarizing all of the above, the multifactorial process of DNA repair might be better characterized by functional analysis of DNA repair capacity (DRC), the true phenotypic endpoint that comprises the variability of both hereditary and environmental components, and as such it gives the information of actual DNA repair activity of the cell/tissue/organism. DNA repair can be phenotypically characterized by the comet assay technique. It can quantify the SBs that are generated as intermediates during the DNA repair of excision type, in particular BER and NER, i.e. a rate-limiting incision step [26,27].

DNA repair capacity in human molecular epidemiological studies

The molecular epidemiological approach, measuring molecular or cellular indicators of disease risk or exposure to causative factors, is a valuable tool in addition to conventional epidemiology. Its main advantages are that it requires far smaller numbers of subjects than conventional epidemiology and the biomarkers, if carefully chosen, can give useful information about molecular mechanisms involved in the disease aetiology [5]. The comet assay, aimed at determining DNA damage or DRC, has been used in a wide range of human epidemiological studies. So far, there are few reports investigating BER- or NER-specific DRC in general healthy population in order to estimate physiological inter-individual variability of DRC and its relation to genetic, epigenetic and biological or lifestyle factors (Scope of **Manuscripts I, II**). DRC has also been used to evaluate genotoxic effects of various chemicals, usually potential carcinogens that are used in the industrial production (Scope of **Manuscript III**). Finally, comet assay techniques have been utilized for measuring the individual susceptibility to various diseases, mostly in association to cancer risk, or recently even with response to anticancer treatment (Scope of **Manuscript IV, V**).

Hypothesis and aims

This doctoral Thesis reflects the still growing interest in understanding the nature and biological regulation of DNA repair in humans both under physiological and pathological conditions. The subject of this Thesis was to investigate the variability of DNA repair capacity (DRC) in healthy individuals, as well as DRC behavior during the chronic exposure to xenobiotics and its role in human carcinogenesis. The working hypotheses and the experimental work were driven by several major starting points: (i) DNA repair is a vital process of organisms that might play a significant role in the individual susceptibility to DNA-damage driven diseases; (ii) DNA repair can be phenotypically characterized by the modification of comet assay, that is a rapid, sensitive and visual tool for DRC assessment; (iii) DRC is a complex marker comprising all individual factors that influence the actual level of cellular DNA repair activity. DRC, specific for base and nucleotide excision repair pathways, were explored in healthy individuals and in two other different groups of subjects, both with possible alterations of DNA repair, i.e. workers occupationally exposed to constant high genotoxic stress and patients with colorectal carcinoma. These different categories of individuals were selected to answer the following questions:

- What is the normal variability of DRC in healthy humans?
- What are the genetic and non-genetic factors that might modulate DRC?
- Does long-term exposure to genotoxins trigger an adaptive induction of DRC?
- Is a high DRC associated with lower risk of cancer?

This Thesis also aimed to optimize methodologies for DRC evaluation by means of the following aspects:

- To implement comet repair assays for DRC measurement in human solid tissues
- To optimize higher-throughput version of the comet repair assay to meet criteria required by large epidemiologic studies

Material and methods

Study populations

Manuscript I: 100 healthy individuals (52 women and 48 men; age range 21-86 years, mean age 41.6 ± 17.5) sampled for peripheral blood.

Manuscript II: 244 healthy individuals (61 women and 183 men; age range 19-59 years, mean age 41.3 ± 11.3) sampled for peripheral blood.

Manuscript III: 24 workers exposed to styrene (16 women, 8 men) and 15 unexposed clerks (9 women, 6 men), all from the same factory, sampled for peripheral blood.

Manuscript IV: 70 newly diagnosed patients with sporadic CRC (24 women and 46 men; mean age 65.4 ± 10.1) and 70 age-matched healthy controls (36 women and 34 men; mean age 62.1 ± 12.7) sampled for peripheral blood.

Manuscript V: 70 incident patients (17 women and 53 men, mean age 66.2 ± 10.6) with sporadic CRC sampled for colon/rectal tissue, both tumor and healthy, and peripheral blood.

All individuals provided informed consent and all studies have been approved by the responsible Ethic Committees.

DNA damage assay

Comet assay determines basal DNA damage at a single cell level. It quantifies the damage that is spontaneously transformed into SBs, i.e. true SBs and alkali-labile sites. Briefly, isolated cells are embedded in the agarose on the microscope slide; they undergo lysis to expose DNA. Further alkali unwinding cause denaturation of DNA and the electrophoresis create comet-like formations due to the presence of SBs. The extent of DNA in the tail of the comet is directly proportional to the extent of damage. Results are expressed in tail DNA %.

DNA repair assays

Modifications of standard comet assay have been developed to measure SBs not only as a steady-state level of DNA damage, but as an intermediates of excision repair pathways, i.e. incision repair activity. Two different approaches have been developed:

Challenge assay (Manuscript I and IV) was applied for measuring DRC in viable PBMC isolated from fresh blood. PBMC, mitogen-stimulated in culture medium, were treated with a DNA-damaging agent, i.e. BPDE, to induce BPDE-adducts. After the treatment, the agent was washed out and cells were further cultured to allow them to incise the damage from

DNA. Level of incurred breaks, reflecting the actual DRC, was measured during the period of 4 hours.

In vitro repair assay (**Manuscript II, III and V**) was applied for measuring DRC in frozen PBMC, or solid tissues, i.e. colorectal mucosa. Cells, in which DRC was measured, were lysed and cellular protein extract was prepared. Extract was incubated with a substrate DNA which contained DNA damage artificially induced by γ -rays (SBs), Ro 19-8022+visible light (8-oxoG) or UV light (photoproducts and dimers). Protein extract removes DNA damage from the substrate DNA and creates SBs which are measured.

Moreover, *in vitro* repair assay can be performed in classic 2-gel/microscopic slide format system, or by an advanced 12-gel/microscopic slide format which was employed and optimized on human tissue samples in collaboration with Prof. Collins during my 2 month stay fellowship in his laboratory (**Manuscript V**).

Genotyping analysis

SNPs in genes encoding DNA repair proteins were selected according the effect on the amino acid sequence in the protein (missense, deleterious) and according the minor allele frequency (MAF > 3%). SNPs were determined by a common PCR-RFLP based method or with TaqMan allelic discrimination assay.

Gene expression analysis

The expression of target DNA repair genes was examined by RT-qPCR. Total RNA was transcribed into cDNA, which copy number was expressed by relative quantification. Ninety six well plates or 96x96 array platform was applied. Results were normalized to the mean of Cq values or according to reference genes, which depended on the normalization procedure recommended by Genorm and Normfinder algorithms. Data were expressed as relative to maximum quantities (lowest expression was considered as 1) and they were log₂ transformed.

Results and discussion

In this section, the major findings from each publication representing the dissertation thesis are discussed.

Manuscript I:

The study “*DNA damage and nucleotide excision repair capacity in healthy individuals*” was performed to assess the range of basal DNA damage and NER-specific DRC in healthy individuals, on the background of individual genetic and non-genetic factors presumably modulating DNA stability.

In our study group of 100 subjects, the observed inter-individual variability was remarkably large, and some individuals were characterized by only a negligible DNA repair activity. The inter-individual variability of BPDE-induced NER repair was 16-fold. An average DNA damage level was calculated for 0.1 SBs/10⁶ nucleotides (~300 breaks/cell). In a meta-analysis based on 125 studies, the average SBs across several healthy populations was reported to be 0.09 SBs/10⁶ nucleotides (~270 breaks/cell) [6] which is in strong consistency with our data and which may approve this level of SBs as a reference value. Both gender and alcohol consumption contributed as independent factors modulating the level of DNA damage. In men and alcohol consumers DNA damage was of 50% higher. When DNA damage and DRC were stratified for DNA repair polymorphisms it was observed that the *XPC* 499Val genotype predisposed to the highest DNA damage level, as observed also by [7,8], while the presence of *XPA* 23A was associated with reduced NER-DRC [9-11]. The conformity of available data suggests that *XPA* 23A might be relevant for modulation of NER-DRC outcome.

In this study, we have reported the range of variability of DNA damage and NER-DRC in the general population and specified the genetic, biological and lifestyle characteristics that modulate its level. A similar study design was applied in **Manuscript II** to explore DRC specific for BER pathway.

Manuscript II:

The study “*Association of DNA repair polymorphisms with DNA repair functional outcomes in healthy human subjects*” was aimed at evaluating the BER-specific DRC in 244 healthy individuals, in respect to genetic variability in several DNA repair genes.

In this study, strand break repair (SB-DRC) and 8-oxoG repair (ox-DRC), i.e. the long and the short patch of BER, were followed. The observed inter-individual variability was 9-fold and 21-fold for SB-DRC and ox-DRC, respectively. The lowest SB-DRC was detected in carriers of *XRCC1* 399Gln genotype and the lowest ox-DRC in the *OGG1* 326Cys carriers. *XRCC1* Arg399Gln has been recognized by “Sorting Intolerant from Tolerant” algorithm to have a high probability of being functionally significant [12]. Indeed, in the area of molecular epidemiology, there is ample evidence that this particular SNP might influence the quality of protein [13]. This data seems biologically plausible, as *XRCC1* acts as a coordinator of SB repair [14]. The phenotypic influence of the *OGG1* Ser326Cys to ox-DRC is also biologically plausible, as ox-DRC reflects predominantly the activity of OGG1. Several studies which analyzed the biochemical properties of the OGG1 enzyme suggest that the *OGG1* 326Cys genotype may represent a phenotype with delayed or deficient repair of 8-oxoG [15,16]. Studies reported in **Manuscript I** and **II**, conducted on disease-free populations, were designed to provide a background data for further applications of DRC as a biomarker of susceptibility to deal with constant genotoxic stress induced by exposure to genotoxic agents, or susceptibility to cancer, as published in **Manuscript III and IV**.

Manuscript III:

The study “*Relationship between the capacity to repair 8-oxoguanine, biomarkers of genotoxicity and individual susceptibility in styrene-exposed workers*” explored BER- DRC and biomarkers of genotoxicity (SBs, chromosomal aberrations, *HPRT*-mutations and DNA adducts) in relation to the genetic variability of 24 exposed workers and 15 unexposed clerks from the same factory. Workers were exposed for 14 ± 5.6 years to 98.1 ± 98.9 mg/m³ of styrene which is near to the permissible exposure limit [17]. Styrene was classified by IARC as a possible human carcinogen and was observed to induce DNA and chromosomal damage. Styrene is metabolized into styrene-oxide that covalently binds to DNA and forms DNA adducts, which are recognised by BER pathway.

All examined biomarkers of genotoxicity were significantly higher in exposed workers, except of only a non-significant increase in BER capacity in comparison with controls. In a previous investigation on a different styrene-exposed study population, BER-DRC in workers was significantly increased and the level of SBs was associated with higher repair rates [18]. In that context, it was postulated that the lack of accumulation of genotoxic damage over time in exposed individuals could be due to the induction of adaptive DNA repair processes. However, despite a similar trend, this hypothesis was not confirmed by the present study. This

discrepancy might be due to the different characteristics and size of the two study populations, or different mechanisms might be involved in the adaptation to the constant long-term genotoxic stress (~10 years longer than in previous study). On the other hand, our results suggest that BER-DRC might be modulated by smoking, gender and by genetic variability; a significantly lower BER-DRC was found in *XRCC1* 399Gln and *OGG1* 326Cys allele carriers.

Manuscript IV:

The case-control study entitled “*Differences in nucleotide excision repair capacity between newly diagnosed colorectal cancer patients and healthy controls*” reports a comparison of the level of DNA damage and NER-DRC between 70 patients with sporadic CRC and 70 age-matched healthy controls. Patients were sampled for blood at the time of the first cancer diagnosis and before any treatment.

Significantly higher DNA damage and lower NER-DRC were observed in patients as compared to controls. Both parameters represented independent risk factors for CRC development. Deficient NER-DRC was previously reported for several other types of cancers (see Table 1 in **Manuscript IV**). Our results contribute to the list of evidences on the importance of NER in carcinogenesis, showing the same relevance also for sporadic CRC. The level of DNA damage in patients as compared to controls was ~1113 versus 540 breaks/cell. A meta-analysis pooling the data from 119 publications showed that cancer-free population of the same age as ours bears 510 breaks/cell [6], which is in full agreement with our data. Thus, CRC patients had >2-fold higher level of SBs in DNA, which additionally demonstrates a general alteration of the DNA repair status in PBMC. Surprisingly, expression profile of 9 core NER genes did not follow the same pattern as overall DRC. Although 2/3 of studied genes (6) were differently expressed in patients, their expression was not solely reduced (*XPB* and *XPF*), as it would have been expected from low DRC, but some were upregulated in patients (*XPA*, *XPG*, *ERCC1* and *RAD23B*). Moreover, expression level of neither genes correlated with the DRC. This phenomenon has been observed by many other studies as well [2,19,20]. As such, the present study showed the usefulness of DRC analysis, which measures the real outcome of a complex multigene process like DNA repair. In this context, the question whether DRC in surrogate tissue fully reflects DRC in target tissue still remained to be addressed. This aspect has been subsequently afforded by the following manuscript.

Manuscript V

The study “*Functional, genetic and epigenetic aspects of base and nucleotide excision repair in colorectal carcinomas*” describes the level of BER- and NER-DRC in tumors of 70 patients with sporadic CRC in comparison to adjacent healthy tissues. In a subgroup of 28 patients, DRC in colon tissue was compared with DRC in blood cells. Additionally, expression profiling of 8 BER and 17 NER genes in both tissues was performed. This study was also dedicated to the optimization of the comet repair assay for DRC measurement in solid tissue and for higher throughput.

An increase of NER-DRC but not of BER-DRC was observed in tumors which was previously reported for NER [21]. Other studies have inferred higher BER or NER in tumors indirectly via measuring the low steady state level of DNA damage [22-24]. Consistency of observations might lead to the conclusion that excision repair is not a factor contributing to the malignant transformation, but rather contributes to the growth advantage of existing tumor mass by decreasing the vulnerability to DNA damage accumulation and cell death. Interestingly, even though PBMC had 2.5-fold lower repair out of all studied tissues, they positively correlated with the DRC of healthy mucosa for both excision repairs. This shows that DRC measured in blood may reflect the repair potential of the colonic mucosa. The same phenomenon was seen by [21], and suggested by [25]. PBMC might be therefore considered to be an appropriate surrogate for cancer-target tissue. Four BER genes (*NEIL1*, *APEX1*, *OGG1* and *PARP1*) and four NER genes (*CSB*, *CCNH*, *XPA* and *XPB*) were deregulated in tumors, showing 1.08-1.28-fold differences against healthy tissues. Individual gene expression levels did not correlate with overall DRC. Quantitative differences in gene copy numbers were not reflected by corresponding changes in enzymatic activity of coded proteins. In other words, measuring the gene expression is not a substitutive method for evaluation of the activity of the protein or pathway, which again highlights the relevance and informative value of functional studies.

Conclusions

In this section, each question postulated in the Hypothesis and aims will be provided by an answer, summarizing the main outcomes of present PhD experimental work in light of existing literature/knowledge.

- What is the normal variability of DRC in healthy humans?

We have observed a substantially large inter-individual variability in DNA integrity, as well as in the DRC rates, among healthy individuals. The range of DNA damage, representing SBs and abasic sites in DNA, varied of 25-fold. The average level was 1 SB/10⁷ nucleotides and, as supported by the data from the literature, this level might be considered as a reference value for healthy individuals. Concerning the BER machinery, the variability of recognizing and incising the damage from DNA was observed to be much larger (21-fold) than the capacity to resynthesized and ligate the originated SBs (9-fold). Incision capacity was indeed recognized as a rate-limiting step of BER. The variability to remove bulky adducts from DNA by NER pathway was 16-fold.

- What are the genetic and non-genetic factors that might modulate DRC?

Our results, in combination with other *in silico*, *in vitro* and epidemiologically-based studies, highlight the possible relevance of non-synonymous polymorphisms in *XPA* G23A, *XRCC1* Arg399Gln and *OGG1* Ser326Cys genes to the function of the coded protein. Our results also show that DNA stability might be further modulated by inter-sexual differences and by lifestyle factors.

- Does long-term exposure to genotoxins trigger an adaptive induction of DRC?

We have observed clear genotoxic effect of long-term exposure to high doses of styrene. Genotoxic markers, reflecting DNA and chromosomal damage were significantly increased in exposed workers in comparison to unexposed controls. However, a significant influence of exposure on DRC was not observed.

- Is a high DRC associated with lower risk of cancer?

It is known that ~15% of sporadic CRC is deficient in mismatch repair. Our expectations that tumor cells might be also deficient in BER or NER, which would contribute to the malignant transformation of the epithelium, were not fulfilled. Nonetheless, we have shown that sporadic CRC patients are generally less active in NER (as measured in blood), which predispose them to higher genotoxic stress and as such might increase their susceptibility to

cancer. This phenomenon was observed for several other types of malignancies, as apparent from the literature.

Despite the undeniable relevance of functional approaches to study DNA repair, DRC is still not routinely included as a biomarker in human biomonitoring studies. This is partially due to the fact that it is rather laborious method, especially when a large amount of samples must be analyzed in a short time. Therefore, the last two aims of this Thesis were of methodological character and were motivated by the need to upgrade the methodology for its wider applicability.

- To implement comet repair assays for DRC measurement in human solid tissues

For the first time, we employed and optimized repair assays for both excision repair pathways, BER and NER, on solid tissues of human origin. Our effort enables future addressing of tissue specificity of DNA repair.

- To optimize higher-throughput version of the comet repair assay to meet criteria required by large epidemiologic studies

We have adopted and optimized the modification of classical 2-gel slide format into 12-gel slide format, which increases 6-times the yield of analyzed samples per microscopic slide. This method can be strongly recommended for routine used.

Reference list

(see Použitá literatúra, p. 15)

Curriculum vitae

(see Životopis, p. 17)

List of publications

(see Zoznam publikácií, p. 20)