

**BIOMARKER MÉRÉSI MÓDSZEREK FEJLESZTÉSE ÉS ALKALMAZÁSA
A MOLEKULÁRIS KÖRNYEZET-EPIDEMIOLOGIÁBAN POLICIKLUSOS
AROMÁS SZÉNHYDROGÉN EXPOZÍCIÓ KIMUTATÁSÁRA**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Kovács Katalin

**Pécsi Tudományegyetem,
Általános Orvostudományi Kar,
Orvosi Népegészségtani Intézet**

**Témavezető: Dr. Schoket Bernadette, PhD
Programvezető: Prof. Dr. med. habil. Ember István, DSc**

2012

Bevezetés

A környezetszennyező testidegen vegyületek emberi szervezetre gyakorolt hatása számos ponton követhető a kitettség (expozíció) mértékétől a kifejlődött egészségkárosító hatásig. Egy adott vegyület okozta expozíció mértékét vizsgálni lehet a biológiai mintákból az expozíció biomarkereivel, a korai és késői hatásokat az úgynevezett hatás markerekkel. Egy környezetszennyező potenciális daganatkeltő vegyület biológiailag hatásos dózisének a DNS és a genotoxikus ágens között kovalens kötődéssel kialakuló DNS-adduktok* mennyiségével jellemezhetjük egy adott szövetben.

A DNS-addukt biomarkerként tükrözi az egyedi expozíciót és sokkal pontosabb expozícióbecslést tesz lehetővé, mint a potenciális daganatkeltő vegyületnek a környezeti mintákban lévő koncentrációja, ezzel javítja az epidemiológiai vizsgálatok hatékonyságát és pontosságát. Számos DNS-addukt prekarcinogén DNS-módosulás, így humán DNS-ből történő kimutatása nagy jelentőségű a potenciális daganatkeltő környezeti ágensek hatásmechanizmusának felderítése szempontjából. A DNS-addukt meghatározást számos expozíció típus kimutatására alkalmazzák, így környezeti expozíciónál, táplálkozási expozíciónál, egészségügyi expozíciónál, munkahelyi expozíciónál.

A DNS-adduktok mérésére szolgáló vizsgálati módszerek jelentősen különböznek érzékenységükben és az alkalmazásukhoz szükséges DNS-mennyiségben. A policiklusos aromás szénhidrogén (PAH)-DNS-adduktok kimutatására a leggyakrabban a ³²P-utójelöléses módszert és az immunkémiai módszereket használják, amelyek szemi-kvantitatív addukt meghatározást tesznek lehetővé. A ³²P-utójelöléses módszer széles szubsztrátspecifitása és nagy érzékenysége miatt különösen alkalmas a humán molekuláris epidemiológiai vizsgálatokban összetett környezeti expozíció, elsősorban PAH-expozíció kimutatására. A ³²P-utójelöléses módszernél a DNS-adduktokat egy nagy specifikus radioaktivitású izotóppal – ³²foszforral – jelöljük, és a radioaktív bomlást mérjük. Az ³²P-utójelöléses módszer kimutatási határa 10 µg DNS-nél 1 addukt/10¹⁰ nukleotid. A

* Saját korábbi magyar nyelvű publikációink szóhasználatát követve, az angol „adduct” megfelelőjeként disszertációmban az „addukt” szót használom egyes magyar szakszövegekben előforduló „adduktum” szó helyett.

PAH-DNS-adduktok meghatározására szolgáló benz[a]pirén-7,8-diol-9,10-epoxid (BPDE)-DNS immunkémiai módszerekben BPDE-vel *in vitro* módosított DNS ellen termelt antiszérumot/antitestet alkalmaznak. Az antitest nemcsak a BPDE–DNS-adduktot ismeri fel, hanem az antitest keresztreaktivitása következtében kémiai rokon szerkezetű más PAH–DNS-adduktokat is. Az ELISA, DELFIA és CIA kompetitív immunkémiai módszereknél a mérendő jel az adduktokhoz van kapcsolva. A kompetitív immunkémiai módszerek érzékenysége 1-10 addukt/ 10^8 nukleotid tartományban van 10-35 μg DNS mintával.

Mindkét módszer típus nagy érzékenysége miatt humán minták vizsgálatára alkalmas. Azonban technikai összetettségük, csekély automatizálási lehetőségük, és ezért nagyfokú emberi munkaerő igényük miatt több száz vagy több ezer vizsgálati alanyt magába foglaló molekuláris epidemiológiai projektekben csak korlátozottan használhatók. Ezért különösen nagy szükség van nagy érzékenyséű és nagy minta kapacitású gazdaságos módszerek kidolgozására.

Célkitűzés

PhD munkám fő célkitűzése környezeti PAH expozíció kimutatására alkalmas ^{32}P -utójelöléses és immunkémiai DNS-addukt módszer fejlesztése és validálása volt.

A ^{32}P -utójelölési metodika továbbfejlesztésének célja:

- a módszerhez szükséges radioizotóp felhasználás növelése nélkül számottevően fokozni lehessen a minta feldolgozási kapacitást a vizsgáló laboratóriumokban úgy, hogy a laboratóriumi személyzet sugárvédelme ne sérüljön;
- olyan metodika kidolgozása, mely különböző eredetű DNS-minták DNS-adduktszintjeinek meghatározására általánosan alkalmas.

Az újonnan kifejlesztett nagy mintakapacitású PAH-DNS direkt szendvics kemilumineszcens immunkémiai módszer (BPDE-DNS SCIA) validálása:

- különböző típusú DNS-mintákból összehasonlító DNS-addukt vizsgálatok az immunkémiai módszer és a ^{32}P -utójelöléses módszer között;

- a két módszer közötti korreláció vizsgálata.

A biológiai minták előkészítése (tárolás, DNS izolálás) hatásának a vizsgálata a DNS-addukt mennyiségi meghatározásra a ^{32}P -utójelölés és a SCIA új immunkémiai módszer esetében.

Anyagok és Módszerek

DNS-minták:

- i) BPDE–DNS-addukt standard;
- ii) Sejtkultúra – MCF-7 sejtvonal - aliquotonként 2×10^7 sejt $1 \mu\text{M}$ benz [a]pirénnel (B[a]P) 37°C -on 24 óráig kezelve;
- iii) Kezelt egerek: CD2F1 egerek intraperitoneálisan kezelve B[a]P-vel (100 és 200 mg/testsúly kg), benz[b]fluoranténnal (200 és 400 mg/testsúly kg) és dibenz[a,h]antracénnal (2,5; 5 és 10 mg/testsúly kg). A Qiagen Midi kittel izolált DNS-mintákat Dr. Soterios Kyrtopoulostól (NHRF, Athén, Görögország) kaptuk;
- iv) Humán tüdőszövet és perifériás vér limfocita;
- v) Egészséges anyai perifériás vér és újszülött köldökzsinór vér összfehérvérsejt frakciója (buffy coat).

DNS kinyerés:

A DNS izolálás az MCF-7 sejt mintákból és a humán biológiai mintákból fenol – kloroform - izo-amilalkohol extrakciós módszerrel, módosított Qiagen Midi kittel és kisózásos módszerrel történt.

DNS-addukt meghatározás a hagyományos ^{32}P -utójelöléses módszerrel:

A DNS mintát ($4 \mu\text{g}$) mikrokokkusz nukleáz és lép foszfodiészteráz enzim keverékével mononukleotidokra emésztettük, ezt követően az emésztett DNS adduktjainak dúsítása történt nukleáz P1 enzimmal, majd az addukt(ok) izotópos jelölését $50 \mu\text{Ci}$ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -vel és T4 polinukleotid kinázzal végeztük. A DNS-adduktokat többlépcsős vékonyréteg kromatográfiával választottuk el. A radioaktív mintázatot elektronikus autoradiográffal jelenítettük meg és mértük egyidejűleg. Az

adduktértékeket terület-arányosan korrigáltuk a kromatográfiás lemez háttér radioaktivitásának a levonásával.

A módosított ^{32}P -utójelöléses módszer:

A DNS-mintát (4 μg) emésztettük, majd addukt dúsítást végeztünk a hagyományos módszernél leírtak szerint. Az addukt dúsítási lépést követően szárazra pároltuk az emésztett DNS-mintát a ^{32}P -utójelölés előtt. A $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ radioizotópot 50 $\mu\text{Ci}/4 \mu\text{g}$ DNS-minta mennyiségről 10 $\mu\text{Ci}/4 \mu\text{g}$ DNS minta mennyiségig csökkentettük le. Az izotóp jelölési lépéshez a reakcióelegy végső térfogatát 5 μl -re állítottuk be. A kromatográfiás elválasztás, a radioaktív mintázat megjelenítése, valamint a háttér radioaktivitással való korrigálás megegyezett a hagyományos ^{32}P -utójelöléses módszernél alkalmazott eljárással.

DNS-addukt meghatározás az újonnan kifejlesztett BPDE-DNS SCIA módszerrel:

Az adduktot hordozó DNS-t egyszálú DNS-sé denaturáltuk, majd restriktációs enzimes emésztéssel megfelelő méretű fragmentumokra hasítottuk (2000 bp/fragmentum). Az adduktot hordozó DNS-fragmentumokat szelektíven kötöttük BPDE-DNS standard ellen termelt specifikus nyúl-antiszérummal egy szilárd felületre (mikrotiter lemezre). A DNS fragmentumok normál nukleotidjaihoz kapcsoltuk a mérendő jelet, ehhez monoklonális DNS-antitestet és kemilumineszcens végpontot alkalmaztunk. A PAH-DNS-adduktszinteket BPDE-DNS standard görbe alapján számoltuk.

Statisztikai elemzések:

A mintákat a ^{32}P -utójelöléses módszernél kétszer, a BPDE-DNS SCIA módszernél háromszor mértük. A statisztikai elemzéseket a GraphPad Prism 4.0 programmal végeztük Mann-Whitney, Wilcoxon és páros t teszttel. A korrelációs elemzést Spearman korrelációs teszttel végeztük. Kétoldali p értékeket adtunk meg. $P < 0,05$ esetén az értékek statisztikailag szignifikánsak voltak.

Eredmények összefoglalása

A ^{32}P -utójelöléses módszerfejlesztést célzó kutatásaim arra irányultak, hogy a mérési határfok megtartása mellett lecsökkentssem a mintánkénti radioizotóp felhasználást, hogy ezen keresztül meg tudjuk növelni a laboratóriumi mintafeldolgozó kapacitást.

BPDE–DNS-addukt standard, B[a]P-vel kezelt MCF-7 sejtvonalból izolált DNS-minták, humán perifériás tüdőszövetből izolált DNS-minták, perifériás vér limfocitából és buffy coat frakcióból izolált DNS-minták hagyományos és módosított ^{32}P -utójelöléses módszerrel mért DNS-adduktszintjeinek összehasonlítását végeztem. A hagyományos ^{32}P -utójelöléses módszerhez képest egy bepárlási művelet beiktatásával harmadára lecsökkentettem az izotópjelölési reakcióelegy térfogatát, mely mellett le lehetett csökkenteni a DNS mintánként felhasznált $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ szubsztrát mennyiségét 50 μCi -ről – a DNS-izolálására alkalmazott módszertől függően, - Qiagen kittel történő izolálás során a felére (25 μCi), illetve fenolos extrakciót alkalmazva az egyötödére (10 μCi), kísérletes és humán eredetű DNS-mintáknál egyaránt.

A PAH-DNS adduktok kimutatására újonnan kifejlesztett BPDE-DNS szendvics kemilumineszcens immunkémiai módszert (BPDE-DNS SCIA) 2012-ben publikáltuk. Míg a régebbi kompetitív immunkémiai módszereknél a mérendő jel az adduktokhoz van kapcsolva, a SCIA módszernél a normál nukleotidokhoz. Az adduktot hordozó nukleotidok mennyiségéhez viszonyítva a nagyságrendekkel több normál nukleotidhoz kapcsolt szignál eredményezi a nagy jelerősséget. A módszer kimutatási határa $\sim 1,5$ addukt/ 10^9 nukleotid 5 μg DNS-sel. A BPDE-DNS SCIA validálása céljából összehasonlító vizsgálatokat végeztem az új immunkémiai módszer és a ^{32}P -utójelöléses módszer között. A DNS-minták B[a]P-vel kezelt MCF-7 sejtvonalból, B[a]P-vel, benzo[b]fluoranténnel (B[b]F), illetve dibenz[a,h]antracénnel (DB[a,h]A) több dózisban kezelt egerek májából, valamint anyai perifériás és újszülött köldökzsinórvér mintákból származtak. Az MCF-7 sejtekből mért B[a]P–DNS-adduktszintekben a SCIA/ ^{32}P -utójelölés mérési aránya kb. 0,5 volt. Az állatkísérletes mintákból az immunkémiai módszerrel sokszorososan kisebb DNS-adduktértékeket kaptunk, mint a ^{32}P -utójelöléssel ($\approx 1:5$ B[a]P-re, $\approx 1:30$ B[b]F-

re és $\approx 1:5$ DB[a,h]A-ra). A dózisfüggésre nagyon szoros, szignifikáns pozitív korreláció volt a két módszer között ($r=0,87-0,99$). A humán mintáknál átlagosan kb. 1:10 volt az arány a SCIA/ ^{32}P -utójelölés között, de nem volt korreláció a SCIA/ ^{32}P -utójelölés adatpárok között. A humán mintáknál a korreláció hiánya a két módszer között az összetett humán környezeti expozícióból származó különböző szerkezetű DNS-adduktok eltérő hatásfokú kimutathatóságára vezethető vissza.

Új tudományos eredmények és hasznosításuk

- A ^{32}P -utójelöléses módszernél az általam kidolgozott módszermódosítással 2-5-szörösére lehet növelni a DNS-addukt meghatározásra egyidejűleg feldolgozható biológiai minták számát a DNS izolálására alkalmazott módszertől függően, kísérletes és humán eredetű DNS-mintáknál egyaránt, az adduktok optimális izotóp jelölési hatásfokának a megőrzése mellett, és a sugárvédelmi biztonság megőrzésével.
- A fenti előnyök alapján különösen ajánlom a módosított módszert nagymintaszámú molekuláris epidemiológiai vizsgálatokban való alkalmazásra környezeti PAH-expozíció kimutatására.
- Bevezettem a módosított ^{32}P -utójelöléses módszert a nemzetközi molekuláris epidemiológiai kutatásokba, és alkalmaztam a NewGeneris EU FP6 Nr. 016320 Integrált Projektben (konzorciumvezető: Prof. Dr. J. Kleinjans, Maastricht University, Hollandia) környezeti és táplálkozási eredetű PAH-expozíció kimutatására európai anya-újszülött gyermek kohorszokból származó ~ 600 fős populációban.
- Az újonnan kifejlesztett BPDE-DNS SCIA direkt szendvics kemilumineszcens immunkémiai módszer validálása során megállapítottam, hogy ez az új immunkémiai módszer a ^{32}P -utójelöléses eljárással megegyező módon mutatja ki a PAH-expozícióbeli különbségeket expozíciós csoportok között. Ebből a minőségi szempontból a SCIA a ^{32}P -utójelöléses módszerrel egyenértékű, kísérletes rendszerekben és molekuláris környezet-epidemiológiai vizsgálatokban kiválóan alkalmazható. Az egyedi mintáknál a kétféle

adduktérték közötti korreláció hiánya megerősíti ismereteinket a két módszer szubsztrátspektruma közötti részleges átfedésről/eltérésről.

- Jelen doktori értekezésem írásakor a BPDE-DNS SCIA módszerrel már mintegy 2000 anyai és újszülött vérminta elemzése történt meg európai kohorszokból magzati PAH expozíció kimutatása céljából a NewGeneris EU FP6 Nr. 016320 Integrált Projektben.–Az eredmények statisztikai elemzése és a konzorciumi publikációk előkészítése folyamatban van.
- Megállapítottam, hogy a mintaelőkészítés során alkalmazott DNS-izolálási módszer és a DNS-minták tárolási módja kritikus hatással van a DNS-addukt mennyiségi kimutatásra. Erre különös figyelemmel kell lenni archív DNS-minták molekuláris epidemiológiai célú felhasználásánál és jövőbeni DNS-mintabankok tervezésénél.

A doktori (PhD) munkához kapcsolódó publikációk szakfolyóiratokban, illetve szakkönyvben:

Georgiadis P, Kovács K, Kaila S, Makedonopoulou P, Anna L, Poirier MC, Knudsen LE, Schoket S, Kyrtopoulos S. (2012) Development and validation of a direct sandwich chemiluminescence immunoassay (SCIA) for measuring DNA adducts of benzo[a]pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutagenesis*, 2012. Május 18. [Epub ahead of print] ***Impakt faktor: 3,98***

Kovács K, Anna L, Rudnai P, Schoket B. (2011) Recovery of bulky DNA adducts by the regular and a modified ³²P-postlabelling assay; influence of the DNA-isolation method. *Mutat. Res.*, 721:95-100. ***Impakt faktor: 2,94***

Gallo V, Khan A, Gonzales C, Phillips DH, Schoket B, Györffy E., Anna L, Kovács K, Möller P, Loft S, Kyrtopoulos S, Matullo G, and Vineis P. (2008) Validation of biomarkers for the study of environmental carcinogens: a review. *Biomarkers*, 13: 505-534. ***Impakt faktor: 1,73***

Györffy E, Anna L, Kovács K, Rudnai P, Schoket B. (2008) Correlation between biomarkers of human exposure to genotoxins with focus on carcinogen DNA adducts. *Mutagenesis*, 23:1-18. ***Impakt faktor: 3,16***

Kovács K, Györffy E, Anna L, Schoket B. (2006) Környezeti policiklusos aromás szénhidrogén expozíció biomonitorozása vizelet 1-hidrokipirén tartalmának meghatározásával – gyermekekre és felnőttekre vonatkozó szakirodalmi adatok összehasonlítása. *Egészségtudomány*, 50: 188-193.

Kovács K, Györffy E, Anna L, Schoket B.: 1-Hydroxypyrene. In: *Epidemiological concepts of validation of biomarkers for the identification/quantification of environmental carcinogenic exposures*. Eds. Vineis P, Gallo V. The Nofer Institute of Occupational Medicine, Lodz, Poland, ECNIS 2007.

Györffy E, Anna L, Rudnai P, Kovács K, Schoket B.: Correlations among biomarkers. In: *Biomarkers of carcinogen exposure and early effects*, Eds: Farmer PB, Emery JM, The Nofer Institute of Occupational Medicine, Lodz, Poland, ECNIS, 2006.

A disszertációtól független közlemények:

Anna L, Kovács K, Györffy E, Schoket B, Nair J. (2011) Smoking-related O⁴-ethylthymidine formation in human lung tissue and comparisons with bulky DNA adducts. *Mutagenesis*, 26: 523-527. ***Impakt faktor: 3,98***

Anna L, Holmila R, Kovács K, Györffy E, Györi Z, Segesdi J, Minárovits J, Soltész I, Kostič Sz, Csekeő A, Husgafvel-Pursiainen K, Schoket B. (2010) *TP53* tumorsupresszor génmutáció vizsgálatok magyar tüdőrákos betegcsoportban. *Egészségtudomány*, 54: 56-69.

Anna L, Holmila R, Kovács K, Györffy E, Györi Z, Segesdi J, Minárovits J, Soltész I, Kostič Sz, Csekeő A, Husgafvel-Pursiainen K, Schoket B. (2009) Relationship between *TP53* tumour suppressor gene mutations and smoking-related bulky DNA

adducts in a lung cancer study population from Hungary. *Mutagenesis*, 24: 475-480.
Impakt faktor: 3,54

Absztraktok szakfolyóiratokban:

Kovács K, Anna L, Győrffy E, Schoket B: The impact of pre-analytical processing of human tissue samples on the measurement of bulky DNA adducts by ³²P-postlabelling. *Mutagenesis* vol. 26, no. 5, pp. 689–722, 2011. **Impakt faktor: 3,98**

Anna L, Kovács K, Lukács V, Győrffy E, Rudnai P, Schoket B: Assessment of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons during pregnancy with bulky DNA adduct biomarker in European mother - child cohorts. *Mutagenesis* vol. 26, no. 5, pp. 689–722, 2011. **Impakt faktor: 3,98**

Rudnai P, Varró MJ, Rudnai T, Náráy M, Schoket B, Anna L, Győrffy E, Kovács K, Ürömi J, Herczegh T, Bodnár J: Associations between the children's blood lead level and their health status. *Epidemiology* 20(6):S260, 2009. **Impakt faktor: 5,5**

Anna L, Holmila R, Kovács K, Győrffy E, Győri Z, Segesdi J, Minárovits J, Soltész I, Kostič Sz, Csekeő A, Husgafvel-Pursiainen K, Schoket B: A *TP53* génmutáció és az aromás DNS-addukt szint közötti összefüggés tüdőrákos dohányzóknál. *Magyar Onkológia* 53: 6, 2009.

Kovács K, Győrffy E, Anna L, Schoket B: Urinary 1-hydroxypyrene as a biomarker of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure in the general population and correlation between 1-hydroxypyrene and white blood cell DNA adducts - Results of our literature survey, *European Journal of Molecular and Genetic Toxicology* <http://www.swan.ac.uk/cget/ejgt1.htm>, 2006.

Nemzetközi és hazai konferencia részvételek poszter bemutatóval és/vagy előadással első szerzőként: 24 db

Nemzetközi és hazai konferencia részvételek poszter bemutatóval és/vagy előadással társszerzőként: 41 db

Köszönetnyilvánítás

Doktori munkámat az Országos Környezetegészségügyi Intézet, Környezetegészségügyi Hatásvizsgálati Főosztály, Molekuláris Környezet-epidemiológiai Osztályán végeztem biológusként. Szeretném megköszönni Dr. Dura Gyulának, az Országos Környezetegészségügyi Intézet megbízott főigazgatójának és Dr. Rudnai Péternek, a Környezetegészségügyi Hatásvizsgálati Főosztály főosztályvezető főorvosának nagyvonalú segítőkészségét, amely lehetővé tette, hogy munkám során az intézmény szellemi és technikai lehetőségeit igénybe vehessem, és köszönöm támogatásukat doktori célkitűzésemhez.

Kiemelten köszönöm Dr. Schoket Bernadette témavezetőmnek tudományos munkám irányítását, hogy bevezetett a molekuláris környezetepidemiológia tudományába, elősegítette szakmai fejlődésemet, szakmai tanácsaival támogatta kísérletes munkámat, és külön köszönöm az értekezés elkészítésében nyújtott nagy segítségét.

Köszönöm Professzor Dr. Ember István a Pécsi Tudományegyetem Orvosi Népegészségtani Intézet vezetőjének, hogy a PhD eljárásban és értekezésem elkészítésében támogatott.

Köszönettel tartozom munkatársaimnak, a Molekuláris Környezet-epidemiológiai Osztály jelenlegi és volt tagjainak: Anna Líviának, Dr. Gyórfy Erikának, Bodnár Lászlónénak, Papp Istvánnénak, Karácsonyi Gábornénak és Lévay Katalinnak szakmai és emberi segítőkészségükért.

Köszönöm Dr. Soterios Kyrtopoulosnak és Dr. Panagiotis Georgiadisnak a National Hellenic Research Foundationban, Athénban, szakmai útmutatásukat, tanácsukat három hónapos ECNIS tanulmányi ösztöndíjam alatt 2008-ban, mely megalapozta további tudományos együttműködésünket a SCIA immunkémiai módszer kifejlesztésében és validálásában. Köszönöm Stella Kailanak és Paraskevi Makedonopoulounak a technikai segítséget.

Köszönöm Dr. David H. Phillips professzor úrnak, a DNS-addukt kutatás és a ³²P-utójelölés nemzetközi szaktekintélyének, hogy az Institute of Cancer Research, UK, suttoni laboratóriumában az ECNIS által szponzorált tanulmányi ösztöndíj keretein belül 2007-ben összehasonlító laboratóriumi vizsgálatokat végezhettem a ³²P-utójelöléses módszerrel. Köszönöm James Evansnek és Kathy Colenak a technikai segítséget.

Köszönöm családomnak és barátaimnak, hogy a tudományos munkámban nagy szeretettel és megértéssel támogattak és bátorítottak.

A PhD munkámat az alábbi projektek támogatásával készítettem, amelyért ezúton mondok köszönetet: ECNIS (Environmental cancer risk, nutrition and individual susceptibility) EU FP6 K+F Network of Excellence (szerződés szám: 513943). ECNIS² (Towards ECNIS Centre for Research and Education on Cancer, Environment and Food) EU FP7 (szerződés szám: 266198). NewGeneris (Newborns and Genotoxic exposure risks: Development and application of biomarkers of dietary exposure to genotoxic and immunotoxic chemicals and of biomarkers of early effects, using mother-child birth cohorts and biobanks) EU FP6 K+F Integrated Projekt (szerződés szám: 016320-2).

**DEVELOPMENT AND APPLICATION OF BIOMARKER METHODS IN
MOLECULAR ENVIRONMENTAL EPIDEMIOLOGY FOR THE
DETECTION OF EXPOSURE TO POLYCYCLIC AROMATIC
HYDROCARBONS**

PhD theses

Katalin Kovács

**Department of Public Health Medicine
Medical School
University of Pécs**

**Supervisor: Dr. Bernadette Schoket, PhD
Program leader: Prof. Dr. med. habil. István Ember, DSc**

2012

Introduction

Influence of environmental xenobiotic compounds to the human body can be followed up at several points along the pathway from the exposure to the adverse health effects. From biological samples, the level of exposure to a given compound can be investigated by using biomarkers of exposure, and the early and late effects are measurable by the biomarkers of effects. The biologically effective dose of a potential carcinogen in a given tissue can be characterised by the amount of DNA adducts, that are formed with covalent binding between the genotoxic agent and the DNA.

The DNA adduct biomarker reflects the individual exposure, and allows for more accurate exposure assessment than the concentration of the potential cancer-causing compound in the environmental samples, thereby improves the efficiency and the accuracy of the epidemiology studies. A number of DNA adducts are pre-carcinogenic DNA alterations, therefore their measurement from human DNA is of great importance in the research of the mechanism of action of potential cancer-causing environmental agents. DNA adducts are applied for the detection of various types of exposure including environmental, dietary, medical, and occupational exposures.

The methods for the determination of DNA adducts vary in their sensitivity and in the required amount of DNA substantially. The most widely used methods for the measurement of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-DNA adducts, are ^{32}P -postlabelling and immunoassays that provide semi-quantitative determination. The ^{32}P -postlabelling technique has wide substrate specificity and high sensitivity, therefore it is especially advantageous in molecular epidemiological studies for the detection of complex environmental exposures, particularly PAH exposure. In the ^{32}P -postlabelling method, the DNA adducts are labelled with a radioactive isotope – phosphorus-32 of high specific radioactivity – and the radioactive decay is detected. The detection limit of ^{32}P -postlabelling is about 1 adduct in 10^{10} nucleotides from 10 μg DNA. For the determination of PAH-DNA adducts, benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide (BPDE)-DNA immunochemical methods are used, in which an

antiserum/antibody elicited against DNA modified *in vitro* with BPDE is applied. The antibody recognises not only the BPDE-DNA adducts, but due to cross-reactivity of the antibody, also chemically-related other PAH-DNA structures. In the ELISA, DELFIA and CIA competitive immunoassays the measured signal is bound to the DNA adducts. The detection limit of the competitive immunoassays is 1 to 10 adducts in 10^8 nucleotides in 10 to 35 μg of DNA.

Both types of these high-sensitivity methods are suitable for the investigation of human samples. However, their technical complexity, limited automation opportunities, and demanding manpower and skill are limiting factors for the analysis of several hundred or several thousand human biological samples in large-scale molecular epidemiological projects. Therefore there is a great demand of development of high-sensitivity and high sample-capacity economical biomarker methods.

Aims

The main objective of my PhD work was the further development and validation of the ^{32}P -postlabelling method and an immunochemical assay for the detection of environmental PAH exposure by the measurement of DNA adducts.

Further development of the ^{32}P -postlabelling method in order to:

- increase the through-put of the ^{32}P -postlabelling method substantially without increasing the total radioisotope requirement, whilst maintaining radio-safety of the laboratory personnel;
- elaborate a method that is generally applicable for the DNA adduct analysis of various types of DNA samples.

Validation of the newly developed high through-put direct sandwich chemiluminescence immunoassay (BPDE-DNS SCIA) for the determination of PAH-DNA adducts by:

- comparisons of DNA adduct quantification by the immunoassay and the ^{32}P -postlabelling method from different types of DNA samples;
- the investigation of the correlation of the DNA adduct levels between the two methods.

Investigation of the impact of the preparation of the biological samples (storage, DNA isolation) to the quantification of DNA adducts by the ^{32}P -postlabelling method and the new SCIA.

Materials and Methods

DNA samples:

- i) BPDE–DNA adduct standard;
- ii) Cell culture – MCF-7 cell line treated in aliquots of 2×10^7 cells with $1 \mu\text{M}$ benzo[a]pyrene (B[a]P) at 37°C for 24 hours;
- iii) Treated mice: CD2F1 mice treated with intra-peritoneal injections of B[a]P (100 and 200 mg/kg), benzo[b]fluoranthene (B[b]F) (200 and 400 mg/kg), and dibenzo[a,h]anthracene (DB[a,h]A) (2,5; 5 and 10 mg/ kg), respectively. The DNA samples isolated with Qiagen Midi Kit were provided by Dr. Soterios Kyrtopoulos (NHRF, Athen, Greece);
- iv) DNA samples from human peripheral blood lymphocytes and non-tumorous peripheral lung tissue samples;
- v) Buffy coat fractions from healthy human maternal peripheral blood and newborn cord blood.

DNA isolation:

DNA was isolated from aliquots of the treated MCF-7 cells and from human biological samples with the traditional phenol – chloroform - iso-amyl alcohol extraction procedure, a modified Qiagen Midi kit procedure and the salting out procedure.

DNA adduct determination by the regular ^{32}P -postlabelling method:

DNA (4 μg) was digested with micrococcal nuclease and spleen phosphodiesterase to mononucleotides, followed by adduct enrichment with nuclease P1, then the radio-labelling of the adducts occurred with $50 \mu\text{Ci}$ [γ - ^{32}P]ATP and T4 polynucleotide kinase. Separation of DNA adducts was performed by multi-directional thin-layer chromatography. Radioactivity patterns were detected and

quantified by electronic autoradiograph. Background radioactivity in the blank area, corrected for the size of the adduct areas was subtracted from the radioactivity of the adduct areas.

The modified ^{32}P -postlabelling method:

DNA digestion (4 μg) and the adduct enrichment were the same as in the regular method. An evaporation-to-dryness step of the DNA digest was introduced before the ^{32}P -radiolabelling step. The amount of the radioisotope was decreased from the regular 50 μCi per 4 μg DNA in a range down to 10 μCi per 4 μg DNA sample. The final reaction volume in the radio-labelling step was set to 5 μl . The chromatographic separation, the detection of the radioactivity patterns and correction for the background radioactivity was the same as in the regular method.

DNA adduct determination by the newly developed BPDE-DNA SCIA method:

The DNA sample was denatured to single stranded DNA and fragmented to specific-size fragments (2000 bp/fragment) by restriction enzyme. The adducted DNA fragments were selectively bound to a solid surface (microtiter plate) by a specific rabbit antiserum elicited against BPDE-DNA standard. The chemiluminescent signal to be measured was coupled to the non-adducted mononucleotides by a monoclonal DNA-antibody. BPDE-DNA standard curve was used for the calculation of the levels of PAH-DNA adducts.

Statistical analyses:

DNA samples were analysed in two replicates by the ^{32}P -postlabelling method and in three replicates by BPDE-DNA SCIA. The statistical analyses were performed with GraphPad Prism 4.0 software, using Mann-Whitney, Wilcoxon and paired t tests. The correlation analyses were performed with Spearman correlation test. Two-tailed p values were given. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Summary of results

My research aimed at the further development of the ^{32}P -postlabelling method by which, whilst maintaining the adduct-labelling efficiency, the amount of the radioisotope per sample can be reduced, and thereby the sample processing capacity of the laboratory is increased.

The regular and the modified ^{32}P -postlabelling methods were used for comparative determinations of the levels of DNA adducts from various types of DNA samples, i.e. BPDE-DNA adduct standard, DNA samples from MCF-7 cell line treated with B[a]P, DNA samples from human non-tumorous peripheral lung tissue, human peripheral blood lymphocytes and human buffy coat samples. In the modified ^{32}P -postlabelling method, the final reaction volume of the radio-labelling was reduced with an evaporation-to-dryness step to one-third of the volume that was used in the regular method. This facilitated the reduction of the amount of $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ substrate from 50 μCi per sample – depending on the DNS isolation method – by 50% for the Qiagen-isolated samples (i.e., 25 μCi per sample) and by 80% for the DNA samples isolated with the classic phenol extraction procedure (i.e., 10 μCi) for both experimental and human samples.

The newly-developed BPDE-DNA direct sandwich chemiluminescence immunoassay (BPDE-DNA SCIA) for the determination of PAH-DNA adducts has been published in 2012. Whereas in the earlier competitive immunoassays the signal to be measured is coupled to the DNA adducts, in the SCIA the chemiluminescent signal is coupled to the non-adducted nucleotides. In SCIA, the strong end-point signal derives from the many orders of magnitude difference between the number of the non-adducted and the adducted mononucleotides. The limit of detection of the method is ~ 1.5 adducts/ 10^9 nucleotides from 5 μg DNA sample. For the validation of BPDE-DNA SCIA, I performed comparative measurements between the immunoassay and the ^{32}P -postlabelling method. The DNA samples were obtained from MCF 7 cells treated with B[a]P, from the liver of mice, which were treated *in vivo* with several doses of B[a]P, B[b]F, and DB[a,h]A, respectively, and from human maternal peripheral blood and newborn cord blood samples. For the B[a]P-DNA adduct levels measured by SCIA and ^{32}P -postlabelling from the MCF 7 cells,

the ratio between the adduct values was about 0.5. For the animal samples, the adduct levels were several times lower by the immunoassay than by the ^{32}P -postlabelling method (the ratios were $\approx 1:5$ for B[a]P, $\approx 1:30$ for B[b]F and $\approx 1:5$ for DB[a,h]A). All the same, there was a very strong, highly significant positive correlation between the DNA adduct measurements of the dose-response curves by SCIA and ^{32}P -postlabelling for each PAH compound ($r = 0.87-0.99$). For the human samples, the ratio between the SCIA and ^{32}P -postlabelling values was approximately 1:10, but there was not correlation between the data-pairs measured by the two methods. For the human samples, the lack of correlation between the two methods may be explained by the different efficiency of detection of different structural types of DNA adducts that are derived from complex human environmental exposure.

New scientific achievements and their application

- With the modification of the ^{32}P -postlabelling method, I increased the through-put of the process – the number of DNA samples that can be worked up in one session – 2 to 5-fold – depending on the method that had been used for the isolation of the DNA. The modified ^{32}P -postlabelling method is generally applicable for experimental and human samples, provides unchanged optimal adduct-labelling efficiency and radio-safety of the personnel.
- Based on the above advantages, I particularly recommend the modified method for use in large-scale molecular epidemiological studies for the detection of environmental PAH exposure.
- I introduced the modified ^{32}P -postlabelling method into the international molecular epidemiological research, and I employed it in NewGeneris EU FP6 Integrated Project No. 016320 (Consortium leader: Prof. Dr. J. Kleinjans, Maastricht University, the Netherlands), for the detection of environmental and dietary PAH exposures in European mother-newborn child cohorts for about 600 samples.

- In the validation of the newly developed direct sandwich chemiluminescence immunoassay, BPDE-DNA SCIA, I demonstrated that this method, similarly to the ^{32}P -postlabelling method, recognises the differences of PAH exposure among the exposure groups. From this qualitative point of view, the SCIA is equivalent to the ^{32}P -postlabelling method, and is suitable for experimental and molecular environmental epidemiological studies. For the individual samples, the lack of correlation between the two methods confirms our knowledge of the partial difference/overlapping of the substrate spectra of the two methods.
- When writing this doctoral dissertation, the BPDE-DNA SCIA has already been employed for about 2,000 maternal and newborn blood samples from European cohorts in the NewGeneris EU FP6 Integrated Project No. 016320, for the detection of maternal and fetal PAH exposure. The results of the statistical analyses and the consortium publications are currently being prepared.
- I showed that in the sample preparation process, the isolation methods and the storage conditions of the DNA samples exert a critical impact on the quantitative determination of DNA adducts. Therefore, a special attention should be placed to this factor when archived DNA samples are used in molecular epidemiological studies, and also when DNA biorepository banks are established for future studies.

Publications related to the PhD work in scientific journals and books:

Georgiadis P, Kovács K, Kaila S, Makedonopoulou P, Anna L, Poirier MC, Knudsen LE, Schoket S, Kyrtopoulos S. (2012) Development and validation of a direct sandwich chemiluminescence immunoassay (SCIA) for measuring DNA adducts of benzo[a]pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutagenesis*, 2012 May 18. [Epub ahead of print] **Impact factor: 3.98**

Kovács K, Anna L, Rudnai P, Schoket B. (2011) Recovery of bulky DNA adducts by the regular and a modified ³²P-postlabelling assay; influence of the DNA-isolation method. *Mutat. Res.*, 721:95-100. **Impact factor: 2.94**

Gallo V, Khan A, Gonzales C, Phillips DH, Schoket B, Gyórfy E., Anna L, Kovács K, Möller P, Loft S, Kyrtopoulos S, Matullo G, and Vineis P. (2008) Validation of biomarkers for the study of environmental carcinogens: a review. *Biomarkers*, 13: 505-534. **Impact factor: 1.73**

Gyórfy E, Anna L, Kovács K, Rudnai P, Schoket B. (2008) Correlation between biomarkers of human exposure to genotoxins with focus on carcinogen DNA adducts. *Mutagenesis*, 23:1-18. **Impact factor: 3.16**

Kovács K, Gyórfy E, Anna L, Schoket B. (2006) Környezeti policiklusos aromás szénhidrogén expozíció biomonitorozása vizelet 1-hidroxipirén tartalmának meghatározásával – gyermekekre és felnőttekre vonatkozó szakirodalmi adatok összehasonlítása. *Egészségtudomány*, 50: 188-193.

Kovács K, Gyórfy E, Anna L, Schoket B.: 1-Hydroxypyrene. In: Epidemiological concepts of validation of biomarkers for the identification/quantification of environmental carcinogenic exposures. Eds. Vineis P, Gallo V. The Nofer Institute of Occupational Medicine, Lodz, Poland, ECNIS 2007.

Gyórfy E, Anna L, Rudnai P, Kovács K, Schoket B.: Correlations among biomarkers. In: Biomarkers of carcinogen exposure and early effects, Eds. Farmer PB, Emeny JM, The Nofer Institute of Occupational Medicine, Lodz, Poland, ECNIS, 2006.

Publications beyond the subjects of the dissertation:

Anna L, Kovács K, Gyórfy E, Schoket B, Nair J. (2011) Smoking-related O⁴-ethylthymidine formation in human lung tissue and comparisons with bulky DNA adducts. *Mutagenesis*, 26: 523-527. **Impact factor: 3.98**

Anna L, Holmila R, Kovács K, Gyórfy E, Győri Z, Segesdi J, Minárovits J, Soltész I, Kostič Sz, Csekeő A, Husgafvel-Pursiainen K, Schoket B. (2010) *TP53* tumorsupresszor génmutáció vizsgálatok magyar tüdőrákos betegcsoportban. *Egészségtudomány*, 54: 56-69.

Anna L, Holmila R, Kovács K, Gyórfy E, Győri Z, Segesdi J, Minárovits J, Soltész I, Kostič Sz, Csekeő A, Husgafvel-Pursiainen K, Schoket B. (2009) Relationship between *TP53* tumour suppressor gene mutations and smoking-related bulky DNA

adducts in a lung cancer study population from Hungary. *Mutagenesis*, 24: 475-480.
Impact factor: 3.54

Abstracts in scientific journals:

Kovács K, Anna L, Győrffy E, Schoket B: The impact of pre-analytical processing of human tissue samples on the measurement of bulky DNA adducts by ³²P-postlabelling. *Mutagenesis* vol. 26, no. 5, pp. 689–722, 2011. **Impact factor: 3.98**

Anna L, Kovács K, Lukács V, Győrffy E, Rudnai P, Schoket B: Assessment of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons during pregnancy with bulky DNA adduct biomarker in European mother - child cohorts. *Mutagenesis* vol. 26, no. 5, pp. 689–722, 2011. **Impact factor: 3.98**

Rudnai P, Varró MJ, Rudnai T, Náráy M, Schoket B, Anna L, Győrffy E, Kovács K, Ürömi J, Herczegh T, Bodnár J: Associations between the children's blood lead level and their health status. *Epidemiology* 20(6):S260, 2009. **Impact factor: 5.5**

Anna L, Holmila R, Kovács K, Győrffy E, Győri Z, Segesdi J, Minárovits J, Soltész I, Kostič Sz, Csekeő A, Husgafvel-Pursiainen K, Schoket B: A *TP53* génmutáció és az aromás DNS-addukt szint közötti összefüggés tüdőrákos dohányzóknál. *Magyar Onkológia* 53: 6, 2009.

Kovács K, Győrffy E, Anna L, Schoket B: Urinary 1-hydroxypyrene as a biomarker of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure in the general population and correlation between 1-hydroxypyrene and white blood cell DNA adducts - Results of our literature survey, *European Journal of Molecular and Genetic Toxicology* <http://www.swan.ac.uk/cget/ejgt1.htm>, 2006.

24 international and national conference participations as first author with poster and/or oral presentations.

41 international and national conference participations as co-author with poster and/or oral presentations.

Acknowledgements

I carried out my doctoral work as a biologist at the Department of Molecular Environmental Epidemiology, Division of Environmental Health Impact Assessment, of the National Institute of Environmental Health. I would like to thank Dr. Gyula Dura, acting Director-General of the National Institute of Environmental Health, and Dr. Péter Rudnai, Head of the Environmental Health Impact Assessment for their generous helpfulness that made possible my work and the use of the institute's intellectual and technical means. I also thank for their support of my doctoral goals.

I am especially thankful to my supervisor, Dr. Bernadette Schoket, who introduced me to the molecular environmental epidemiology, who guided my research, promoted my professional development, supported my experimental work with expert advice, and my special thanks to her for her assistance in the preparation of my doctoral dissertation.

I would like to thank Professor Dr. István Ember, Head of Department of Public Health Medicine of University of Pécs, who supported me in the PhD process and in the the preparation of my dissertation.

May I also thank my colleagues, the current and former members of the Department of Molecular Environmental Epidemiology, Lívia Anna, Dr. Erika Gyórfy, Lászlóné Bodnár, Istvánné Papp, Gáborné Karácsonyi and Katalin Lévay for the professional and personal helpfulness.

I thank Dr. Soterios Kyrtopoulos and Dr. Panagiotis Georgiadis at National Hellenic Research Foundation in Athens, for their professional advice during the three-month ECNIS Fellowship in 2008, which established our further scientific collaboration in the development and validation of the SCIA immunochemical method. Thanks to Stella Kaila and Paraskevi Makedonopoulou for the technical support.

I thank Professor Dr. David H. Phillips, the internationally highly recognised expert of DNS adduct research and ³²P-postlabelling, for having hosted me for comparative laboratory investigations in his laboratory in the Institute of Cancer Research, Sutton, UK, within the framework of an ECNIS-sponsored Fellowship in 2007. I also thank James Evans and Kathy Cole for the technical support.

I would like to thank my family and friends who supported me with great love and understanding in my scientific work.

The following projects supported my PhD work: ECNIS (Environmental cancer risk, nutrition and individual susceptibility) EU FP6 R+D Network of Excellence (contract number: 513943); ECNIS2 (Towards ECNIS Centre for Research and Education on Cancer, Environment and Food) EU FP7 (contract number: 266198); NewGeneris (Newborns and Genotoxic exposure risks: Development and application of biomarkers of dietary exposure to genotoxic and immunotoxic chemicals and of biomarkers of early effects of using mother-child birth cohorts and biobanks) EU FP6 R+D Integrated project (contract number: 016320-2).