

Xīn Gào

Dr. sc. hum.

Titel: Biomarkers of oxidative stress and related DNA methylation: the associations with overall, lung, colorectal, breast and prostate cancer incidence

Fach: Epidemiologie

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. Ben Schöttker

English summary

Lung cancer, colorectal cancer, breast cancer and prostate cancer are the four most common cancer sites and they are responsible for half of the cancer deaths worldwide. Therefore, to identify risk factors for these common cancers is a preliminary task of cancer prevention. It has been shown in biological studies that excessive reactive oxygen species concentrations in cells are involved in carcinogenesis. However, there is a lack of population-based, prospective studies on the associations of biomarkers of the redox status and cancer incidence and the mechanisms of cancer development by redox signaling remains unsettled.

Two urinary biomarkers were utilized to investigate the associations of oxidative stress with cancer risk based on the German ESTHER study (general population, age-range 50-75 years): 8-isoprostane and oxidized guanine/guanosine molecules concentrations. Urinary 8-isoprostane is the gold standard biomarker for the redox status of the human organism and it reflects the lipid peroxidation. Oxidized guanine/guanosine molecules, including 8-hydroxyguanine and its nucleoside forms, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 8-hydroxyguanosine reflect the oxidatively generated DNA/RNA damage. Oxidized guanine/guanosine molecule and 8-isoprostane concentrations were measured from stored urine samples of 8,793 older adults of the ESTHER study, who were followed up for cancer incidence for 14 years. The urinary 8-isoprostane concentration was statistically significantly, positively associated with lung cancer, but not with the other three common cancers. However, 8-isoprostane did not improve for lung cancer prediction if added to the model of established risk factors. Oxidized guanine/guanosine molecule concentrations were not associated with any cancer site in the total population. However, colorectal cancer incidence statistically significantly increased by 8%, 9% and 8% per 1 standard deviation increase in oxidized guanine/guanosine molecule levels among current non-smokers, women and non-obese participants, respectively.

In addition, the associations of two serum biomarkers of oxidative stress with common cancers were assessed in the ESTHER study and the Norwegian Tromsø study (both general population cohorts):

Derivatives of reactive oxygen metabolite levels and total thiol levels. D-ROMs are a battery of biomolecules generated by the oxidation of lipids, proteins and nucleic acids. Serum total thiol levels are regarded as a biomarker of the antioxidant capacity because this biomarkers captures the concentration of free thiol groups of proteins in blood circulation, which can reversibly be oxidized. Derivatives of reactive oxygen metabolite and total thiol levels were measured in all 4,345 participants of the ESTHER 8-year follow-up and in case-cohort design in the Tromsø study (cancer cases: $n = 941$; sub-cohort: $n = 1,000$). Individual study results were pooled by random effects meta-analysis. Derivatives of reactive oxygen metabolite levels were statistically, significantly, positively associated with lung, colorectal and breast cancer but not with prostate cancer in the meta-analysis. Statistically, significantly, inverse associations were observed for total thiol levels and breast and prostate cancer, whereas borderline, non-significant, inverse associations were observed for lung and colorectal cancer in the meta-analysis. However, both serum biomarkers of oxidative stress did not improve the prediction of cancer if added to models containing established risk factors.

Furthermore, a systematic review of literature reviews was conducted to give an overview of redox signaling pathways that are postulated to be involved in cancer development. This systematic review describes the 20 most mentioned redox-regulation pathways, including reactive oxygen species generating organelles and enzymes, kinases and phosphatases families and transcription factors. Furthermore, 519 genes were identified from the 20 pathways. Based on the ESTHER study, these genes were further used in a screening to identify CpG sites, of which the DNA methylation levels were associated urinary 8-isoprostane levels. Inverse associations of DNA methylation at cg25365794 (*ALOXE3*), cg01009697 (*NTRK2*) and cg08862778 (*MTOR*) with 8-isoprostane levels were observed in a derivation set ($n = 1,000$) and validated in two independent subsets of the cohort ($n = 548$ and $n = 741$). Multivariate regression models were used to evaluate the associations of DNA methylation at the three CpG sites with lung, colorectal, prostate, breast and overall cancer incidence as well as cardiovascular, cancer and all-cause mortality. DNA methylation at cg25365794 (*ALOXE3*) was inversely associated with lung and prostate cancer incidence. DNA methylation at cg01009697 (*NTRK2*) was positively associated with overall and lung cancer incidence and all-cause mortality, respectively. DNA methylation at cg08862778 (*MTOR*) was inversely associated with breast cancer incidence. Proteins encoded by *NTRK2* and *MTOR* play important roles in phosphoinositide 3-kinases signaling, which is a pathway involved in cancer development and cell senescence.

Taking into account strengths and limitations of this work, the presented results support the hypothesis that oxidative stress plays a role in carcinogenesis. Nevertheless, oxidative stress biomarkers showed

no potential to be of use for screening programs aiming for cancer prevention. DNA methylation alterations in genes, coding for proteins involved in the phosphoinositide 3-kinases signaling pathway may provide a mechanistic link between the observed association of oxidative stress biomarkers and the incidences of common cancers.

Deutsche Zusammenfassung

Lungenkrebs, Darmkrebs, Brustkrebs und Prostatakrebs sind die vier häufigsten Krebsarten und sind für die Hälfte aller Krebstodesfälle weltweit verantwortlich. Daher ist es eine vorrangige Aufgabe der Krebsprävention, Risikofaktoren für diese häufigen Krebsarten zu identifizieren. In biologischen Studien wurde gezeigt, dass stark erhöhte Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies in Zellen an der Karzinogenese beteiligt sind. Es mangelt jedoch an bevölkerungsbasierten, prospektiven Studien über die Assoziationen von Biomarkern des Redox-Status¹ und der Krebsinzidenz, und die Mechanismen der Krebsentstehung durch Redox-Signalwege sind nach wie vor ungeklärt.

Zwei in Urinproben messbare Biomarker wurden verwendet, um die Zusammenhänge von oxidativem Stress und Krebsrisiko auf der Grundlage der deutschen ESTHER-Studie (Allgemeinbevölkerung, Alter 50-75 Jahre) zu untersuchen: Die 8-Isoprostan und oxidierte Guanin/Guanosin-Molekülkonzentrationen. Die Konzentration von 8-Isoprostan in Urinproben ist der Goldstandard-Biomarker für den Redox-Status des menschlichen Organismus² und er spiegelt die Lipidperoxidation wider. Oxidierte Guanin/Guanosin-Moleküle, darunter 8-Hydroxyguanin und seine Nukleosidformen, 8-Hydroxy-2'-Desoxyguanosin und 8-Hydroxyguanosin, reflektieren den oxidativ erzeugten DNA/RNA-Schaden. Oxidierte Guanin/Guanosin-Moleküle und 8-Isoprostan-Konzentrationen wurden aus eingelagerten Urinproben von 8.793 älteren Erwachsenen der ESTHER-Studie gemessen, die eine 14-jährige Nachbeobachtungszeit für die Krebsinzidenz aufweisen. Die Konzentration von 8-Isoprostan im Urin war statistisch signifikant, positiv mit Lungenkrebs assoziiert, nicht aber mit den anderen drei häufigen Krebsarten. Die 8-Isoprostan-Variable verbesserte jedoch nicht ein Lungenkrebs-Prädiktionsmodell, das bereits etablierte Krebsrisikofaktoren beinhaltet. Oxidierte Guanin/Guanosin-Molekülkonzentrationen waren nicht mit einer Krebserkrankung in der Gesamtbevölkerung assoziiert. Pro Anstieg um eine Standardabweichung bei den oxidierten Guanin/Guanosin-Molekülwerten stieg jedoch die Darmkrebsinzidenz statistisch signifikant um jeweils 8%, 9% und 8% bei aktuellen Nichtrauchern, Frauen und nicht Übergewichtigen an.

Darüber hinaus wurden die Assoziationen von zwei Serum-Biomarkern von oxidativem Stress mit häufigen Krebsarten in der ESTHER-Studie und der norwegischen Tromsø-Studie untersucht (beides

bevölkerungsbezogene Studien): Derivate von reaktiven Sauerstoffmetaboliten und Gesamtthiol-Spiegel. Derivate von reaktiven Sauerstoffmetaboliten sind eine Reihe von Biomolekülen, die durch die Oxidation von Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren entstehen. Serum Gesamtthiol-Spiegel gilt als Biomarker für die antioxidative Kapazität, da dieser Biomarker die Konzentration der freien Thiolgruppen von Proteinen im Blutkreislauf erfasst, welche reversibel oxidiert werden können. Derivate von reaktiven Sauerstoffmetaboliten und Gesamtthiol-Spiegel wurden bei allen 4.345 Teilnehmern des ESTHER 8-Jahres-Follow-ups und im Case-Cohort-Design in der Tromsø-Studie gemessen (Krebsfälle: $n = 941$; Sub-kohorte: $n = 1.000$). Ergebnisse der Einzelstudien wurden durch eine Meta-Analyse mit zufälligen Effekten gepoolt. Die Derivate von reaktiven Sauerstoffmetaboliten-Werte waren in der Meta-Analyse statistisch signifikant positiv mit Lungen-, Darm- und Brustkrebs, aber nicht mit Prostatakrebs, assoziiert. Statistisch signifikante inverse Assoziationen wurden zwischen Gesamtthiol-Spiegel und Brust- sowie Prostatakrebs beobachtet, während bei Lungen- und Darmkrebs in der Meta-Analyse grenzwertige, statistisch nicht signifikante, inverse Assoziationen beobachtet wurden. Allerdings konnten auch diese beide Serum-Biomarker für oxidativen Stress die Vorhersagekraft eines Modells mit etablierten Krebsrisikofaktoren nicht verbessern.

Darüber hinaus wurde eine systematische Übersichtsarbeit über Review-Artikel erstellt, um einen Überblick über Redox-Signalwege zu geben, die an der Krebsentwicklung beteiligt sein sollen. Diese systematische Übersicht beschreibt die 20 am häufigsten in der Literatur genannten Redox-Signalwege, einschließlich reaktiver Sauerstoffspezies generierender Organellen und Enzyme, Kinase- und Phosphatase-Familien und Transkriptionsfaktoren. Darüber hinaus wurden 519 Gene aus den 20 Redox-Signalwegen identifiziert. Mit Hilfe von Daten der ESTHER-Studie wurden diese Gene hinsichtlich CpG-Stellen gescreent, deren DNA-Methylierungswerte mit der 8-Isoprostankonzentration im Urin assoziiert waren. Inverse Assoziationen der DNA-Methylierung bei *cg25365794* (*ALOXE3*), *cg01009697* (*NTRK2*) und *cg08862778* (*MTOR*) mit 8-Isoprostanspiegeln wurden in einem Screening-Satz an Probanden ($n = 1.000$) beobachtet und in zwei unabhängigen Teilmengen der Kohorte ($n = 548$ und $n = 741$) validiert. Mit multivariaten Regressionsmodellen wurden die Assoziationen der DNA-Methylierung der drei CpGs mit Lungen-, Darm-, Prostata-, Brust- und Gesamtkrebsinzidenz sowie kardiovaskulärer, Krebs- und Gesamtmortalität untersucht. Die DNA-Methylierung bei *cg25365794* (*ALOXE3*) war invers mit der Lungen- und Prostatakrebsinzidenz assoziiert. Die DNA-Methylierung bei *cg01009697* (*NTRK2*) war positiv mit der Gesamt- und Lungenkrebsinzidenz bzw. der Gesamtmortalität assoziiert. Die DNA-Methylierung bei *cg08862778* (*MTOR*) war invers mit der Brustkrebsinzidenz assoziiert. Sowohl das *NTRK2*- als auch das *MTOR*-Protein sind am

Phosphoinositid-3-Kinasen-Signalweg beteiligt, einem Pfad, der eine wichtige Rolle bei der Krebsentstehung und der Zellalterung spielt.

Unter Berücksichtigung der Stärken und Schwächen der vorliegenden Arbeit stützen die vorgestellten Ergebnisse die Hypothese, dass oxidativer Stress eine Rolle bei der Karzinogenese spielt. Nichtsdestotrotz, zeigten die Biomarker für oxidativen Stress kein Potential eines Nutzens für Krebsvorsorge-Screenings. DNA-Methylierungsveränderungen in Genen, die für Proteine kodieren, die am *Phosphoinositid-3-Kinasen*-Signalweg beteiligt sind, könnten einen Mechanismus darstellen, der den Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und der Entstehung häufiger Krebsarten erklären kann.