

Diss. ETH No. 10415

**BIOCHEMICAL MARKERS OF CARCINOGENESIS IN MOUSE
SKIN AND THEIR MODULATION BY DIET RESTRICTION**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

For the degree of
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by

WOLFGANG FISCHER

Dipl. Biol. University of Konstanz

born January 5, 1964

citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. C. Schlatter, examiner

Prof. W. K. Lutz, co-examiner

Prof. F. Würgler, co-examiner

1993

Summary

The risk of an individual to develop a carcinogen-induced tumor appears to be dependent on heritable and life-style factors that determine carcinogen metabolism leading to DNA lesions and rates of DNA repair and cell division. The question is whether a biological variable which is postulated to be associated with the carcinogenic process could be used as a predictive marker for an individual cancer risk. In the present study, the mouse skin tumor model was used to investigate whether the levels of DNA adducts and/or oxidative DNA damage and/or the rates of cell division in the epidermis are indicators of the risk of cancer formation for an individual in an outbred population. A high risk was considered to be reflected by a short latency period for the appearance of a tumor.

In a first experiment the backs of NMRI mice (outbred) were treated chronically with the DNA-reactive carcinogen 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) and the skin tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA). DMBA-nucleotide adduct levels measured were highest in those mice which showed the longest latency periods. Adduct levels were inversely correlated with the rate of cell division (labeling index, LI), indicating that dilution of adducts by cell division was a predominant factor in determining adduct concentrations. Since it is known that TPA increases the rate of cell proliferation, the question was addressed whether the unexpected correlation could also be seen in a tumor promoter-free model. It was also tested whether other biological markers, namely the level of oxidative DNA damage would show a correlation with the papilloma latency period. Knowing that food restriction can delay the formation of tumors in mice and rats, the further question was asked whether food restriction would have an influence on the parameters examined. In this experiment two groups of NMRI mice were treated chronically with DMBA. One group was fed *ad libitum* while the daily food intake of the other group was restricted to 70 %. Under the experimental conditions, food restriction did not result in a delay of papilloma formation. In the *ad libitum* group, and as in the first study, DNA-adduct levels were inversely correlated with the latency time. On the other hand, the levels of 8-hydroxy-guanosine (an oxidative DNA lesion, 8-OH-dG) and the LI were significantly higher in those mice that showed short latency periods. In conclusion, these findings indicate that the rate of cell division and oxygen-related DNA damage can, under certain conditions, be better indicators of an individual cancer risk than DNA adducts.

Due to the observation that food restriction had no effect on the time of papilloma appearance when the mice were treated chronically with the complete

skin carcinogen DMBA, another model based on initiation with DMBA and promotion with TPA was used next. Indeed, food restriction resulted in a clear delay of papilloma formation. From this data it appears that food restriction exerts its protective effect on mechanisms related to the tumor promoter TPA. Using this initiation-promotion model it was examined whether there is a relationship between the rate of the carcinogenic process and the LI or the level of 8-OH-dG. Additionally, the question was asked whether the latter two variables were altered in the same fashion when the rate of papilloma formation was delayed by decreasing the tumor promoter dose or by restricting the daily food intake. Both decreasing TPA dose as well as food restriction resulted in a delay of papilloma formation. Within the *ad libitum* groups promoted with different TPA doses, a correlation was found between the LI and the time when 50 % of the mice of a group showed a papilloma (t_{50}). It was observed that the higher the t_{50} value, the lower the LI. In contrast, the LI was nearly the same in the restricted groups (treated with different TPA doses) despite differing in their t_{50} values. On the other hand, the relationship between 8-OH-dG levels and t_{50} values were similar in *ad libitum* and restricted groups. Due to this findings it seems that the mechanism by which diet restriction delays the papilloma formation is based on oxidative events rather than on the rate of cell division.

In a further study, the mouse skin tumor model was used to investigate whether the dose response for DMBA and TPA, when administered together chronically in different dose combinations, can be distinguished in a dose-time-effect analysis. The tumor-free time as a function of dose increased in a more or less constant fashion when DMBA was reduced stepwise while the TPA dose was held constant. On the other hand, reduction of the TPA dose (DMBA held constant) resulted in a markedly different shape of the curve. The stepwise reduction of the TPA dose resulted in a nearly exponential increase of the tumor-free time. Additionally, it was found that the shapes of dose-response relationship curves are dependent on the time of observation and that they are different with TPA or DMBA as function of dose. It can be concluded that appropriate dose-response information could be used for mechanistic interpretation and for low-dose extrapolation.

For extrapolations to other situations, the model specificity and the relatively high dose levels must be taken into consideration.

Zusammenfassung

Das Risiko eines Individuums an einen karzinogen-induzierten Tumor zu erkranken scheint von vererbaren Faktoren und dem Lebensstil abhängig zu sein, welche unter anderem den Metabolismus, die Rate der DNA Reparatur und der Zellteilung bestimmen. Es stellt sich die Frage, ob eine biologische Variable, von der ein Zusammenhang mit dem Prozess der Krebsentstehung postuliert wird, als prädiktiver Marker für ein individuelles Krebsrisiko herangezogen werden kann. In der vorliegenden Studie wurde das Maus-Haut-Tumor-Modell verwendet, um festzustellen, ob DNA-Addukte, oxidative DNA-Schädigung und/oder die Zellteilungsrate in der Epidermis als Indikatoren für ein Krebsrisiko eines Individuums einer heterogenen Population gebraucht werden können. Es wurde angenommen, dass sich ein hohes Krebsrisiko in Form einer kurzen Latenzzeit für die Krebsentstehung widerspiegelt.

In einem Experiment wurden die Rücken von NMRI Mäusen (Auszuchtstamm) mit dem DNA-reaktiven Kanzerogen 7,12-Dimethylbenz[a]anthrazen (DMBA) und dem Hauttumorpromotor 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) chronisch behandelt. Die gemessenen DMBA-Nukleotid-Addukte waren in den Tieren am niedrigsten, die die längste Latenzzeit hatten. Die Adduktkonzentrationen korrelierten mit der Zellteilungsrate (Labeling Index, LI), was darauf hindeutet, dass bei der Bestimmung der Adduktkonzentrationen die Verdünnung der Addukte durch die Zellteilung der dominierende Faktor war. Da bekannt ist, dass TPA zu einer Erhöhung der Zellteilungsrate führt, stellte sich die Frage, ob die unerwartete Korrelation auch in einem tumorpromotorfreien Modell beobachtet werden kann. Weiterhin wurde überprüft, ob andere biologische Variablen, wie z.B. die oxidative DNA-Schädigung, ebenfalls mit der Latenzzeit korrelieren. Aufgrund der Tatsache, dass eine Futterrestriktion zu einer Verzögerung der Tumorbildung führt, stellte sich die Frage, ob die Restriktion einen Einfluss auf die untersuchten Parameter hat. Zwei Gruppen von Mäusen wurden chronisch mit DMBA behandelt. Eine Gruppe wurde *ad libitum* gefüttert, während die tägliche Futteraufnahme der zweiten Gruppe auf 70 % reduziert wurde. Unter diesen experimentellen Bedingungen führte die Restriktion zu keiner Verzögerung der Papillomentstehung. In der *ad libitum*-Gruppe wie auch in dem ersten Experiment, zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen den Adduktkonzentrationen und der Latenzzeit. Auf der anderen Seite, waren die 8-Hydroxyguanosinkonzentrationen (ein oxidativer DNA-Schaden, 8-OH-dG) sowie der LI in den Mäusen höher, die eine kurze Latenzzeit hatten. Zusammengefasst zeigen diese Befunde, dass unter bestimmten Bedingungen die Zellteilungsrate und die oxidative DNA-Schädigung bessere Indikatoren für ein individuelles Krebsrisiko sind, als DNA-Addukte.

Da die Futterrestriktion bei chronischer Behandlung der Mäuse mit dem kompletten Hautkanzerogen DMBA keinen Einfluss auf die Zeit der Papillomentstehung hatte wurde ein anderes Modell verwendet; Mäuse wurden mit DMBA initiiert und mit TPA promoviert. Unter diesen Bedingungen führte die Futterrestriktion zu einer eindeutigen Verzögerung der Papillomentstehung. Daraus lässt sich schliessen, dass die Restriktion ihren protektiven Effekt ausübt, indem sie auf einen Mechanismus wirkt, der mit TPA in Beziehung steht. Das gleiche Modell wurde verwendet, um die Beziehung zwischen der Krebsentstehungsrate und dem LI oder der 8-OH-dG-Konzentration zu untersuchen. Zusätzlich stellte sich die Frage, ob diese beiden Variablen auf die gleiche Art und Weise beeinflusst werden, wenn die Papillomentstehung entweder durch Reduktion der TPA-Dosis oder durch eine Futterrestriktion verzögert wird. Beide Arten der Modulation führten zu einer Verzögerung der Papillomentstehung. In den *ad libitum*-Gruppen, die mit unterschiedlichen TPA-Dosen behandelt wurden, zeigte sich zwischen dem LI und der Zeit wenn 50 % der Mäuse in einer Gruppe ein Papillom haben (t_{50}) eine Korrelation. Je höher die t_{50} -Werte waren, desto tiefer waren die LI. Im Gegensatz hierzu waren die LI in den restringierten Gruppen (mit unterschiedlichen TPA-Dosen behandelt) nahezu gleich, obwohl sie sich in ihren t_{50} -Werten unterschieden. Auf der anderen Seite war die Beziehung zwischen den 8-OH-dG-Konzentrationen und den t_{50} -Werten in den *ad libitum*-Gruppen und den restringierten Gruppen ähnlich. Aufgrund dieser Daten scheint der Mechanismus, durch den die Futterrestriktion die Papillomentstehung verzögert, eher auf oxidativen Vorgängen als auf der Zellteilungsrate zu basieren.

In einer weiteren Studie wurde das Maushaut-Modell verwendet, um zu untersuchen, ob die "dose-response" von DMBA und TPA in einer Dosis-Zeit-Effekt-Analyse unterschieden werden kann, wenn diese in bestimmten Dosiskombinationen chronisch appliziert werden. Eine schrittweise Reduktion der DMBA-Dosis (die TPA-Dosis wurde konstant gehalten) führte zu einem nahezu konstanten Anstieg der tumorfreien Zeit als Funktion der Dosis. Auf der anderen Seite führte eine schrittweise Reduktion der TPA-Dosis (DMBA-Dosis wurde konstant gehalten) zu einem nahezu exponentiellen Anstieg der tumorfreien Zeit. Zusätzlich zeigte sich, dass die Formen der Dosis-Wirkungs-Beziehungs-Kurven in Bezug auf die Tumorzinzidenz vom Beobachtungszeitpunkt abhängig sind. Die Kurven sind unterschiedlich, wenn TPA oder DMBA in der Dosis variiert wird. Daraus kann man schliessen, dass geeignete Dosis-Wirkungs-Informationen zu einer mechanistischen Interpretation und zu einer Tief-Dosis-Extrapolation herangezogen werden können.

Für eine Extrapolation dieser Ergebnisse auf andere Situationen sollte die Modellspezifität und die Verwendung der relativ hohen Dosen berücksichtigt werden.