Universitätsklinikum Ulm
Institut für Humangenetik
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Walther Vogel

Der Comet Assay als Test im Biomonitoring - Untersuchungen zum Nachweis genotoxischer Effekte des Rauchens

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanbiologie (Dr. biol. hum.)
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Heike Hoffmann
aus Augsburg

Ulm 2006

Amtierender Dekan	:	Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin
1. Berichterstatter	:	Prof. Dr. Günter Speit
2. Berichterstatter	:	Prof. Dr. Peter Radermacher
Tag der Promotion	:	14. Juli 2006

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung **1**

1.1 Der Comet Assay im Biomonitoring 1
1.2 Genotoxizität und Kanzerogenität des Zigarettenrauchs 3
1.3 Genetische Polymorphismen und DNA-Effekte im Comet Assay 6
1.4 Expressionsunterschiede bestimmter Gene und DNA-Effekte im Comet Assay 9
1.5 Fragestellung 10

2 Material und Methoden **13**

2.1 Probanden und Material 13
2.1.1 Probanden 13
2.1.2 Blutproben 14
2.1.3 V79-Zellen 14
2.1.4 Testagenzien 16
2.1.5 Chemikalien 17
2.1.6 Geräte und Materialien 19
2.1.7 Lösungen, Medien und Puffer 20
2.1.8 Reagenziensysteme (Kits) und Restriktionsenzyme 22
2.1.9 Oligonukleotidprimer 22
2.2 Methoden 22
2.2.1 Der Comet Assay (Einzelzellgelelektrophorese) 22
2.2.2 Der Mikronukleustest (MNT) 28
2.2.3 Nachweis genetischer Polymorphismen 30
2.2.4 Expressionsanalyse 33
2.2.5 Statistik 37

3 Ergebnisse **43**

3.1 Comet Assay - *In vitro*-Experimente 43
3.1.1 Etablierung eines sensitiven Protokolls 43
3.1.2 Aphidicolin 44
3.1.3 Formaminopyrimidin-Glykosylase (FPG-Protein) 45
3.1.4 Intra- und Interindividuelle Variabilität 47
3.1.5 Referenzstandard 48
3.2 Comet Assay - Untersuchungen zur Genotoxizität des Rauchens 48

3.2.1 Basale Schäden . . . 49
3.2.2 Mutagensensitivität . . . 51
3.2.3 Reparaturaktivität . . . 51
3.3 Genotoxische Effekte bei starken Rauchern . . . 55
3.3.1 Basale DNA-Effekte im Comet Assay . . . 56
3.3.2 Mikronukleus-Test . . . 58
3.4 Assoziation von Comet Assay-Befunden und genetischen Polymorphismen 59
3.4.1 *Glutathion-S-Transferase M1* . . . 59
3.4.2 *Cytochrom P450 1A1* . . . 60
3.4.3 *Cytochrom P450 2E1* . . . 61
3.4.4 Reparaturgene *XPD*, *XRCC1* und *XRCC3* . . . 63
3.5 Expressionsanalyse . . . 65
3.5.1 Etablierung der Expressionsanalyse . . . 65
3.5.2 *XPD*-Expression . . . 70
3.5.3 *XRCC1*-Expression . . . 73
3.5.4 *XRCC3*-Expression . . . 75
3.6 Meta-Analyse bisher publizierter Daten zur Genotoxizität des Zigarettenrauchs . . . 78
3.6.1 Auswahl der Arbeiten . . . 78
3.6.2 Meta-Analyse der 38 Arbeiten . . . 79
3.6.3 Funnel Plot . . . 81
3.6.4 Studien mit Rauchen als Expositionsquelle . . . 81
3.6.5 Studien mit Rauchen als potenziellem Störfaktor . . . 83
3.6.6 Studien mit Bildanalysesystem . . . 83
3.6.7 Studien ohne Bildanalysesystem . . . 86
3.6.8 Zusammenfassung der Ergebnisse der Meta-Analyse . . . 86

4 Diskussion **89**
4.1 Untersuchungen zur Genotoxizität des Zigarettenrauchs mit dem Comet Assay . . . 89
4.1.1 Comet Assay Protokoll und Studienplanung . . . 89
4.1.2 Basale DNA-Schäden (Strangbrüche und oxidative Basenschäden) bei Rauchern und Nichtrauchern . . . 96
4.1.3 Mutagensensitivität bei Rauchern und Nichtrauchern . . . 100
4.1.4 Reparaturaktivität bei Rauchern und Nichtrauchern . . . 101
4.2 Assoziation von genetischen Polymorphismen und Comet Assay-Befunden 104
4.3 Einfluss der Reparaturgenexpression auf Comet Assay-Ergebnisse . . . 114
4.4 Schlussfolgerungen im Hinblick auf den Einsatz des Comet Assay im Biomonitoring . . . 118

5 Zusammenfassung **123**

6 Literaturverzeichnis **125**

Abkürzungsverzeichnis

α	Signifikanzniveau
ALS	Alkalilabile Stelle
APC	Aphidicolin
Aqua dest.	Destilliertes, steriles Wasser
Arg	Arginin
AraC	1-beta-D-Arabinofuranosylcytosin
β	Statistische „Power“
B[a]P	Benzo[a]pyren
BER	Basenexzissionsreparatur
bp	Basenpaare
BPDE	(±)-anti-B[a]P-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid
cDNA	„Complementary DNA“
CI	Konfidenzintervall
CP	„Crossing point“
Cyp1A1	Cytochrom P450 1A1
Cyp2E1	Cytochrom P450 2E1
Δ	Relevanter Unterschied
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
DSB	Doppelstrangbruch
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
FCS	Fötales Kälberserum
FPG	Formaminopyrimidin-Glykosylase
g	Erdbeschleunigung
GDI	„Genetic damage index“
Gln	Glutamin
Gy	Gray
GSTM1	Glutathion-S-Transferase M1
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HBSS	„Hanks balanced salt solution“
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HR	Homologe Rekombination
Ile	Isolecin

IPCS	„International Programme of Chemical Safety“
Ku70 bzw. 80	Lupus Ku Autoantigen Protein p70 bzw. p80
LMP	„Low melting point“-Agarose
Lys	Lysin
MEM	„Minimal essential medium-Earle“
Met	Methionin
min	Minuten
MMS	Methylmethansulfonat
MN	Mikronuklei
MNT	Mikronukleustest
n	Anzahl
N	Stichprobenumfang
n. d.	Nicht durchgeführt
NDI	„Nuclear division index“
NER	Nukleotidexzissionsreparatur
NHEJ	„Non homologous end joining“
Nr.	Nummer
NR	Nichtraucher
p	Wahrscheinlichkeit
P	Proband
PAH	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	„Phosphate buffer saline“
PCR	Polymerasekettenreaktion
PHA	Phytohaemagglutinin A
ρ	Dichte
R	Raucher
R	Korrelationskoeffizient
Rad51	*RecA* homologes DNA-Reparaturgen
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RMPI	„Roswell Park Memorial Institute“
RT	Raumtemperatur
σ	Standardabweichung
S9	Leberhomogenisat
SCE	Schwesterchromatidaustausch
SD	„Standard deviation“ (Standardabweichung)

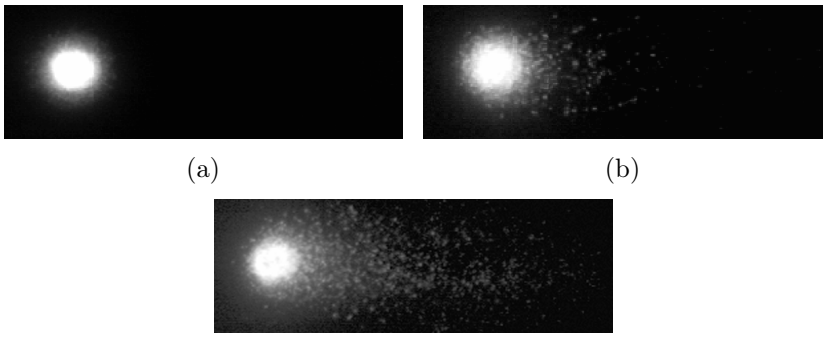
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	„Standard error“
sek	Sekunden
SEM	„Standard error of the mean“
SMD	„Standardized mean difference“
SNP	„Single nucleotid polymorphism“
T75	Zellkulturflasche 75 cm^2
TFIIH	Transkriptionsfaktor II H
Thr	Threonin
UPM	Umdrehungen pro Minute
Val	Valin
WT	Wildtyp
$\overline{x}$	Mittelwert
XP	Xeroderma Pigmentosum
XPD	Xeroderma Pigmentosum Komplementierungsgruppe D
XRCC1	„X-ray repair cross-complementing protein 1“
XRCC3	„X-ray repair cross-complementing protein 3“

1 Einleitung

1.1 Der Comet Assay im Biomonitoring

Der Comet Assay ist ein gut etablierter *in vitro*- und *in vivo*-Genotoxizitätstest und wird bei Substanzprüfungen eingesetzt [19, 57, 157]. In seiner alkalischen Version weist der Comet Assay Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie alkalilabile Stellen der DNA nach. Ferner sind auch Reparatureinschnitte an der DNA mit dem Comet Assay nachweisbar. Zur Analyse werden Zellen als Einzelzellsuspension in Agarose aufgenommen, auf einen Objektträger aufgetragen und unter alkalischen Bedingungen im Gel lysiert. Im Verlauf der Lyse werden sowohl die Zytoplasma- als auch die Kernmembran entfernt, so dass auf dem Objektträger nur noch die Kern-DNA vorliegt. Diese ungeschützte Kern-DNA wird auch als Nukleoid bezeichnet [29]. Anschließend werden die Zellen einem alkalischen Puffer ausgesetzt, wodurch die DNA denaturiert und die alkalilabilen Stellen in Strangbrüche überführt werden. Es folgt dann die Elektrophorese. Die Objektträger werden anschließend neutralisiert, entwässert und mit Ethidiumbromid gefärbt. Strangbrüche führen zu einer verstärkten DNA-Migration im elektrischen Feld. Abbildung 1.1 zeigt eine Kontrollzelle (a) und Zellen mit unterschiedlich stark geschädigter DNA (b, c). Die geschädigten Zellen ähneln dem Bild eines Kometen. Der „Schweif“ stellt die ausgewanderten DNA-Fragmente dar.

Aufgrund seiner einfachen Durchführung und seiner hohen Sensitivität gegenüber verschiedensten DNA-Schäden, findet der Comet Assay immer mehr Verwendung in Biomonitoring-Untersuchungen [43, 96]. Unter dem Begriff Biomonitoring versteht man die Bestimmung von Schadstoffen, ihren Metaboliten und deren Addukte an Proteinen und an die DNA [7]. Aufgrund der Tatsache, dass die Bevölkerung vielen genotoxischen Agenzien in der Umwelt ausgesetzt ist, hat das Biomonitoring in der arbeits- und umweltmedizinischen Toxikologie eine zentrale Bedeutung. Das Biomonitoring kann in das Dosismonitoring, das biochemische und das biologische Effektmonitoring unterteilt werden. Beim Dosismonitoring werden die Konzentrationen von Schadstoffen bzw. deren Metaboliten in Körperflüssigkeiten, vor allem im Blut und Harn gemessen. Im biochemischen Effektmonitoring werden die Reaktionsprodukte mutagener Substanzen



(a) (b)

(c)

Abbildung 1.1: Zunehmende DNA-Migration im Comet Assay. Es sind sowohl eine Kontrollzelle (a) als auch Zellen mit unterschiedlich starker DNA-Wanderung (b, c) dargestellt.

mit Proteinen und mit der DNA untersucht. Messbare Veränderungen des Organismus werden im biologischen Effektmonitoring untersucht. Dies können veränderte Enzymaktivitäten, Veränderungen der Chromosomenstruktur bzw. -zahl, Mikronuklei oder Comet Assay-Effekte sein.

In seinem Standardprotokoll weist der Comet Assay hauptsächlich DNA-Strangbrüche und alkalilabile Stellen (ALS) nach. Durch den Einsatz von Endonukleasen sind mit dem Comet Assay auch Basenmodifizierungen nachweisbar. So erkennt die Formaminopyrimidin-Glykosylase (FPG-Protein) zum Beispiel oxidierte und alkylierte Basen und schneidet die DNA an diesen Stellen ein. Dies führt zu einer erhöhten DNA-Migration im Comet Assay. Aufgrund seiner hohen Sensitivität wurde der FPG-modifizierte Comet Assay für den Einsatz im Biomonitoring vorgeschlagen [3, 27]. Darüber hinaus kann man das Blut von exponierten und nicht exponierten Personen *ex vivo* mit Mutagenen behandeln und die DNA-Effekte vergleichend mit dem Comet Assay untersuchen (Mutagensensitivitäts-Biomarker). Ferner ist vorgeschlagen worden die Reparaturaktivität von Zellen in Biomonitoring-Untersuchungen zu berücksichtigen [119]. Es ist durchaus denkbar, dass Blutzellen mutagen-exponierter Personen an die Reparatur adaptiert sind und DNA-Schäden schneller reparieren können als Zellen von nicht exponierten Personen. Auch durch diesen Ansatz können vergleichend Gruppen hinsichtlich DNA-Schäden mit dem Comet Assay im Biomonitoring untersucht werden. Zur Untersuchung von Reparaturaktivitäten wurden verschiedene Möglichkeiten vorgeschlagen. Zum einem können Reparaturkinetiken aufgenommen werden. Dabei werden Blutproben *ex vivo* mit Mutagenen behandelt und eine Abnahme des DNA-Schadens über die Zeit mit dem Comet Assay verfolgt. Zum anderen kann die

Reparaturkapazität von Blutproben untersucht werden. Dazu inkubiert man Vollblut mit Reparaturinhibitoren, die zu einer Akkumulation von Reparatureinschnitten führen und die DNA-Migration im Comet Assay erhöhen. Mit diesem Ansatz kann man die Blutproben sowohl auf ihre basale als auch auf ihre induzierte Reparaturkapazität nach Mutagenexposition untersuchen.

Im „International Programme of Chemical Safety (IPCS)“ wurde eine Richtlinie für die Durchführung des Comet Assay im menschlichen Biomonitoring vorgeschlagen [3]. Problematisch an Biomonitoring-Untersuchungen ist die geringe Exposition, der die Personen ausgesetzt sind. Diese Expositionen bedingen nur sehr schwache Effekte, die nur durch Tests mit niedriger Nachweisgrenze detektierbar sind. Außerdem werden Biomonitoring-Untersuchungen meist an sehr heterogenen Populationen durchgeführt. Es ist daher die Möglichkeit der Beeinflussung des Ergebnisses der Studie durch Störfaktoren gegeben. In der Regel besteht auch nicht die Möglichkeit zur Wiederholung einer Studie, so dass die Befunde nicht unabhängig bestätigt werden können.

Ein Problem des Comet Assay ist seine Variabilität, da viele Parameter Einfluss auf das Ergebnis nehmen können [146, 156]. Um eine möglichst gute Reproduzierbarkeit bzw. geringe Versuchsvariabilität des Comet Assay zu gewährleisten, wird unter standardisierten Bedingungen gearbeitet. Im Rahmen des IPCS [3] wurden Maßnahmen zur Qualitätssicherung vorgeschlagen. Die Präparate sollten z. B. von einem zweiten Auswerter vermessen werden (externer Standard), um die Schwankungsbreite der Auswertung abschätzen zu können. Außerdem sollten in jeder Elektrophorese ein Referenzstandard mitgeführt werden (interne Kontrolle), um Unregelmäßigkeiten während der Elektrophorese aufdecken zu können [3, 33]. Diese Vorschläge werden allerdings meist nicht berücksichtigt. Ohne diese Maßnahmen ist es sehr schwer, die Qualität einer Biomonitoring-Studie zu beurteilen. In dieser Arbeit wird kritisch untersucht, ob es möglich ist, eine Protokollvariante für den Comet Assay zu etablieren, die sensitiv sowie robust ist und im Biomonitoring sinnvoll eingesetzt werden kann.

1.2 Genotoxizität und Kanzerogenität des Zigarettenrauchs

Weltweit rauchen mehr als eine Milliarde Menschen. Besonders in Entwicklungsländern und unter Frauen nimmt der Zigarettenkonsum stetig zu. In den meisten Populationen rauchen zwischen einem Drittel und einem Fünftel aller Personen [69]. In den letzten 40 Jahren hat sich die Zusammensetzung der Zigaretten geändert. Die Nikotinkonzentration in den heutigen Zigaretten sind wesentlich geringer. Die Verringerung

der Nikotinkonzentration in den Zigaretten ging mit einem vermehrten Auftreten von Lungenkrebs bei Rauchern einher, da die Raucher um die gleichen Nikotinmengen im Blut zu haben, wesentlich mehr Zigaretten rauchten bzw. tiefer inhalieren mussten. Dieses Phänomen führt zu einem drastischen Anstieg des Lungenkrebs- und Plattenepithelkarzinomrisikos [138]. Ferner erhöht das Zigarettenrauchen das Risiko an Blasen- und Harnleiterkrebs zu erkranken [69]. Die Länge des Rauchens ist bei der Kanzerogenese der bestimmende Faktor. Umso früher das Zigarettenrauchen begonnen wurde und umso länger geraucht wurde, desto höher ist das Krebsrisiko.

Ziel vieler Studien war es die Mechanismen, die zur Krebsentstehung führen, zu untersuchen. Die Initiation einer Krebserkrankung wird durch genotoxische Substanzen im Zigarettenrauch herbeigeführt [34]. Zigarettenrauch führt im Knochenmark zur Induktion von Schwesterchromatidaustauschen. Ferner wurden im Knochenmark, in Erythrozyten und Lungenzellen erhöhte Mikronukleusfrequenzen nachgewiesen. Bezüglich dem Auftreten von Chromosomenaberrationen gibt es widersprüchliche Befunde (Übersicht bei DeMarini [34]). Der Zigarettenrauch verursacht auch DNA-Schäden. Nakayama et al. [102] fanden, dass Zigarettenrauch Einzelstrangbrüche in kultivierten menschlichen Zellen hervorruft. In einer anderen Arbeit an einer Zelllinie aus menschlichen B-Lymphozyten wurde nachgewiesen, dass dosisabhängige DNA-Effekte nach Exposition mit wasserlöslichen Substanzen des Zigarettenrauchs im Comet Assay auftraten. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass sich Inhibitoren der DNA-Reparatur in der Gasphase des Zigarettenrauchs befinden [173]. Ferner wurde nach Exposition der Zellen mit Zigarettenrauch die Bildung von oxidativen DNA-Addukten beschrieben [80]. Im Zigarettenrauch befinden sich also genotoxische Substanzen, die auch im Comet Assay zu DNA-Effekten führen.

Die chemische Zusammensetzung des Zigarettenrauchs wird hauptsächlich durch den verwendeten Tabak bestimmt. Analysen zum Rauchverhalten stellten fest, dass auch die Art und Weise des Rauchens einen Einfluss auf die aufgenommene Dosis von Nikotin, Mutagenen und Kanzerogenen ausübt. Der Zigarettenrauch beinhaltet u. a. folgende pulmonale Kanzerogene (Übersicht bei Hecht [62]):

- polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH), wie z. B. Benzo[a]pyren, Benzo[j]fluoranthan
- Azaarene (Dibenz[a]acridin, 7H-Dibenzo[c,g]carbazol, etc.)
- N-Nitrosamine, wie z. B. N-Nitrosodiethyldiamin
- organische Verbindungen (1,3-Butadien, Ethylcarbamat)

- anorganische Verbindungen, wie z. B. Nickel, Cadmium, Arsen

Ein Vertreter der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe ist das Benzo[a]pyren. In *in vitro*- und *in vivo*-Studien führte das Benzo[a]pyren zu Genmutationen und Chromosomenaberrationen. Garry et al. [49] untersuchten mit dem *in vivo* Comet Assay Ratten nach endotrachealer Benzo[a]pyren-Exposition. Für Lungenzellen und Lymphozyten zeigte sich eine deutliche Erhöhung der Comet Assay-Effekte im Vergleich zu den Kontrollzellen ohne Exposition. Statistisch signifikant erhöhte Tailmoment-Werte zeigten sich auch für Makrophagen und Hepatozyten. Damit wiesen Garry et al. nach, dass eine endotracheale Applikation von 3 mg Benzo[a]pyren in Lymphozyten zu einer verstärkten DNA-Migration im Comet Assay führt, dass Lymphozyten exponiert wurden und dass sich daher Lymphozyten als Zielzellen für die Untersuchung von Benzo[a]pyren-induzierten Schäden mit dem Comet Assay eignen.

In der Leber wird Benzo[a]pyren zunächst zum Benzo[a]pyren-7,8-diol umgewandelt. Anschließend wird der Metabolit durch das Phase 1-Enzym, die Epoxidhydrolase, zum (±)-Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE) aktiviert. BPDE ist ein starkes Mutagen und eine Induktion von Genmutationen wurde an einer menschlichen Fibroblastenlinie nachgewiesen [56]. BPDE bindet kovalent an das N^2 des Desoxyguanosins [62]. Dieses Addukt führt zu G → C nach A → T Transversionen. Bei der Aktivierung des BPDEs entstehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die oxidative Schäden an der DNA hervorrufen und daher Mutationen induzieren können [2]. Die BPDE-DNA-Addukte führen unter alkalischen Bedingungen zu DNA-Strangbrüchen und sind mit dem Comet Assay nachweisbar [56]. Rauchen stellt also eine adäquate Exposition durch mutagene Substanzen dar, deren DNA-schädigenden Effekte im Comet Assay nachweisbar sind. Zwar stellen Leukozyten nicht die primären Zielzellen für die Kanzerogenese dar, sie werden jedoch in den meisten Biomonitoring-Studien aufgrund ihrer Verfügbarkeit als Zielzellen für genotoxische Effekte verwendet.

In zahlreichen Arbeiten wurde versucht, mit dem Comet Assay die Genotoxizität des Zigarettenrauchs zu untersuchen. Dabei gibt es zwei Möglichkeiten, wie das Rauchen untersucht werden kann. Zum einen kann das Rauchen als hauptsächliche Expositionsquelle angesehen werden, zum anderen stellt das Rauchen im Rahmen von Arbeitsplatzuntersuchungen einen potenziellen Störfaktor dar. Die Datenlage bezüglich genotoxischer Effekte des Zigarettenrauchs im Comet Assay ist widersprüchlich (Übersichten bei Faust et al. [43], Husgafvel-Pursiainen [68] und Møller et al. [96]). Während einige Autoren statistisch signifikante Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern im Comet Assay finden [16, 121], finden andere diese nicht [37, 154]. Bei manchen Arbeiten hatten die Nichtraucher sogar höhere Comet Assay-Werte als die

Raucher [58, 151]. Diese Diskrepanz wird vermutlich durch den Einfluss von verschiedenen Störgrößen verursacht. So scheinen das Geschlecht und das Alter der Probanden Einfluss auf die Ergebnisse zu haben [96]. Es wird ferner diskutiert, ob saisonale Effekte den Comet Assay beeinflussen können [51]. Auch sollen Ernährungsgewohnheiten und intensiver Sport das Ergebnis des Comet Assay beeinflussen [40, 105].

1.3 Genetische Polymorphismen und DNA-Effekte im Comet Assay

In zahlreichen Untersuchungen wurde der Einfluss von genetischen Polymorphismen in Fremdstoffwechsel- und Reparaturgenen auf verschiedene genetische Endpunkte und Krebs untersucht (Übersicht bei Pavanello und Clonfero [112] und Wiencke [166]). Genetische Polymorphismen werden in Zusammenhang mit der Krebsentstehung gebracht. Unter Suszeptibilität versteht man die Empfindlichkeit oder die Anfälligkeit von Menschen oder von einzelnen Zellen, Organen oder Organismen für die Tumorgenese. Diese Anfälligkeit hängt von verschiedenen Faktoren ab. Reaktive Stoffwechselprodukte krebserregender Fremdstoffe sind in der Regel für die Tumorinitiation verantwortlich. Die Konzentration dieser Metabolite in der Zelle wird durch die Aktivität der für ihre Bildung zuständigen giftenden Enzyme und der für ihre Inaktivierung zuständigen entgiftenden Enzyme des Fremdstoffmetabolismus reguliert. Die DNA-Reparaturausstattung bedingt die Anfälligkeit von Zellen für Mutationen und für das Absterben von Zellen, unter anderem durch den programmierten Zelltod (Apoptose). Beispielsweise liegt die Tumorinzidenz für das Bronchialkarzinom bei Rauchern mit vergleichbarer Exposition nur bei ca. 10 - 20 %. Die Gründe für die individuelle Tumorentstehung sind noch weitgehend unbekannt. Im Biomonitoring werden in der Regel genotoxische Effekte bestimmter Expositionen untersucht. Auch hier wird von Suszeptibilität im übertragenen Sinne gesprochen, wenn Zellen einzelner Individuen besonders anfällig für bestimmte genotoxische Effekte sind.

In der Literatur wird kontrovers diskutiert, ob genetische Polymorphismen eine Ursache für die beobachtete interindividuelle Suszeptibilität für rauchbedingte biologische Effekte sind [34, 166]. Die meisten Kanzerogene im Zigarettenrauch müssen metabolisch aktiviert werden bevor sie kovalent an die DNA binden. Die Kanzerogene werden zunächst von den Phase 1-Enzymen (z. B. Cytochrom P450-Isoenzymfamilie) metabolisiert. In Phase 1-Reaktionen werden polare Gruppen an unpolare Xenobiotikamoleküle transferiert. In Phase 2 der Entgiftung finden Konjugationsreaktionen statt, bei denen körpereigene Moleküle wie z. B. Glutathion oder Aminosäuren an die zu ent-

giftende Substanz angekoppelt werden. Ein Phase 2-Enzym ist z. B. die Glutathion-S-Transferase M1 (GSTM1).

In zahlreichen Studien wurde ein Polymorphismus des GSTM1-Enzyms untersucht. Der Polymorphismus beruht auf einer Gendeletion, die einen Verlust der enzymatischen Aktivität zur Folge hat. Bei ca. 50 % der kaukasischen Bevölkerung fehlt homozygot das *GSTM1*-Allel. Die Häufigkeit des Polymorphismus erlaubt es, auch schon bei geringen Probandenzahlen Aussagen über mögliche Assoziationen zu treffen. Es wird diskutiert, dass das Fehlen der GSTM1 eine unzureichende Detoxifizierung von Kanzerogenen bedingt und dadurch das individuelle Krebsrisiko geringfügig erhöhen könnte. Außerdem wurde zwischen der GSTM1-Defizienz und dem Auftreten von Lungen-, Blasen- und Kolonkrebs eine Assoziation entdeckt (Übersicht bei Wu et al. [172]). PAH-exponierte Arbeiter, bei denen homozygot das *GSTM1*-Allel deletiert war, hatten höhere Adduktlevel als homozygote Wildtypträger [162].

Cyp1A1 ist ein Vertreter der Cytochrom P450-Isoenzymfamilie. Die *Cyp1A1*-Expression ist durch bestimmte Substanzen des Zigarettenrauchs induzierbar, z. B. durch PAHs oder aromatische Amine. Der Polymorphismus im Exon 7 ist eine Punktmutation, die zu einem Aminosäureaustausch von Isoleucin nach Valin im Codon 462 führt. Dieser Ile462Val-Polymorphismus führt zu einer erhöhten Enzymaktivität. Sie soll bei Rauchern und Passivrauchern mit einem erhöhten Bronchialkarzinomrisiko [61, 106] und bei Raucherinnen mit einem erhöhten Mammakarzinomrisiko [172] assoziiert sein. Georgiadis et al. [50] zeigten, dass die verschiedenen Polymorphismen im *Cyp1A1*-Gen einen Einfluss auf die Adduktmenge und auf Chromosomenaberrationen in Lymphozyten von PAH-exponierten Nichtrauchern ausüben.

Das *Cytochrom P450 2E1* ist an der Metabolisierung von vielen indirekten Kanzerogenen, wie z. B. Nitrosamine im Zigarettenrauch und kleinen organischen Verbindungen, wie Ethanol und Benzol, beteiligt. Ein Polymorphismus des *Cyp2E1*-Gens liegt in der 5'-untranslatierten Region an Position -1372 des Gens (GI 51511726) und mehrere Punktmutationen sind dort durch Sequenzierung beschrieben worden [60]. Dieser Polymorphismus soll mit erhöhten Mikronukleusfrequenzen, Adduktmengen, Schwesterchromatidaustauschen assoziiert sein [22, 70, 73].

Viele Polymorphismen in Reparaturgenen wurden im Zusammenhang mit tabakinduzierten genotoxischen Effekten und Krebs untersucht [172]. Wir untersuchten die Polymorphismen (Lys751Gln) des *XPD*-Gens, (Arg399Gln) des *XRCC1*-Gens und (Thr241Val) des *XRCC3*-Gens. Sie wurden in früheren Studien mit Mutagensensitivität und genotoxischen Effekten durch Rauchen und PAH-Exposition in Zusammenhang gebracht [11, 113, 163, 164]. Das *XPD*-Gen kodiert für eine ATP-abhängige Helikase.

Sie ist Teil des Transkriptionskomplexes TFIIH, der an der DNA-Strangtrennung während der Nukleotidexzissionsreparatur beteiligt ist. Mutationen im *XPD*-Gen können seine Funktion behindern bzw. ganz aufheben. Im Falle eines homozygoten Funktionsverlustes des XPD ist die Transkription nicht betroffen, da hierfür die Helikase nicht von Nöten ist. Die Nukleotidexzissionsreparatur hingegen kommt völlig zum Erliegen [14]. Die betroffenen Personen leiden dann unter dem seltenen Reparaturdefekt Xeroderma Pigmentosum (XP), der autosomal rezessiv vererbt wird. Charakteristisch für XP ist eine extreme Sensitivität gegenüber UV-Strahlung, die bereits in jungen Jahren zur Hautkrebsentstehung führt. Über Komplementierungsversuche an Zelllinien, die von betroffenen Personen generiert wurden, stellte man fest, dass es acht verschiedene Xeroderma Pigmentosum bedingende Gene gibt. Sie werden von XPA bis XPG bezeichnet. Ferner ist noch eine Variante beschrieben. Ein Polymorphismus in Exon 23 des *XPD*-Gens, der einen Aminosäurewechsel von Lysin nach Glutamin in Codon 751 bedingt, war signifikant überrepräsentiert in Hautkrebspatienten [158]. Es wurde diskutiert, dass der Polymorphismus eine verringerte Reparaturaktivität bei UV-bedingten DNA-Schäden hervorrief und dadurch das Hautkrebsrisiko der Personen erhöhte. Außerdem soll der Polymorphismus mit Basalzellkarzinomen assoziiert sein [41]. Hou et al. [65] fanden eine starke Assoziation des Lys751Gln-Polymorphismus und Lungenkrebs bei Nichtrauchern. Es gibt aber auch einige Arbeiten, die keinen nachteiligen Effekt des Polymorphismus auf Reparaturaktivitäten zeigen [1, 113]. Es gibt ferner widersprüchliche Daten bezüglich des Polymorphismus und der Häufigkeit von Chromosomenaberrationen im peripheren Blut. Lunn et al. [86] fanden eine starke Assoziation, Kiuru et al. [75] hingegen nicht.

XRCC1 ist an der Basenexzissionsreparatur beteiligt. Es dient anderen Reparaturproteinen als Gerüst, in dem es mit der Ligase III, der DNA Polymerase β und der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) interagiert. Ferner gibt es Hinweise, dass das XRCC1 auch an der Doppelstrangbruchreparatur beteiligt ist [21]. Mutationen in *XRCC1* rufen erhöhte Sensitivitäten gegenüber ionisierender und UV-Strahlung, Wasserstoffperoxid und Mitomycin C hervor [155]. Bisher sind mehrere Polymorphismen in *XRCC1* beschrieben worden [54]. Einer der Polymorphismen, der Arg399Gln-Polymorphismus, wurde sehr häufig untersucht. Seine Bedeutung ist noch nicht vollständig geklärt, da es in der Literatur widersprüchliche Befunde gibt. Einige Arbeiten zeigen eine Assoziation zwischen dem varianten 399Gln-Allel und einer reduzierten Reparaturaktivität [11, 66, 85]. Vodicka et al. [164] konnten auch mit dem Comet Assay nachweisen, dass Strahlungs-induzierte DNA-Schäden von den Zellen mit Polymorphismus schlechter repariert werden. Andere Arbeiten hingegen konnten keinen Einfluss des

Polymorphismus nachweisen [108, 124].

Das XRCC3-Protein ist bei der homologen Rekombination (HR), einem Weg der Doppelstrangbruchreparatur, involviert. Es interagiert mit und stabilisiert Ras51. Ein Aminosäureaustausch von Threonin nach Methionin im Codon 241 wurde für das Gen berichtet [137]. Bisher ist nur wenig über die Funktionalität des Aminosäureaustauschs bekannt. Eine positive Assoziation konnte zwischen dem varianten 241Met-Allel und Blasenkrebs [91], Hautkrebs [168] und Krebs bei Personen mit unterschiedlicher Radiosensitivität [123] festgestellt werden. Ferner zeigte Au et al. [11], dass Leukozyten mit variantem Allel mehr deletierte Chromosomen hatten als die Wildtyp-Zellen. Auch eine erhöhte Induktion von Chromosomenaberration in Lymphozyten assoziierte mit dem varianten Allel [75].

1.4 Expressionsunterschiede bestimmter Gene und DNA-Effekte im Comet Assay

Ein weiterer Aspekt, der zur Klärung der Suszeptibilität beitragen könnte, ist die Untersuchung von individuellen Expressionsunterschieden von Genen. Es wäre denkbar, dass nicht nur strukturelle Unterschiede der Proteine einen Einfluss auf deren Funktion ausüben, sondern auch Unterschiede in der Induzierbarkeit der Proteine die individuelle Suszeptibilität bedingen. Durch eine nur geringe Expression von Reparaturgenen können z. B. DNA-Schäden nicht schnell genug entfernt werden. Auch werden toxische Metabolite durch eine geringe Expression der abbauenden Enzyme nicht schnell genug entgiftet. Aber auch der umgekehrte Fall wäre denkbar. Eine besonders starke Expression von giftenden Enzymen führt zur schnellen Aktivierung der inaktiven Mutagene.

In der Literatur wurden bisher hauptsächlich *in vitro*-Expressionsanalysen von Zellen nach Exposition mit Substanzen beschrieben, die zur Aufklärung bestimmter Stoffwechselwege beitragen sollen. Man erhofft sich davon, charakteristische Regulationsprofile von Substanzen aufzudecken und diese mit Wirkmechanismen bzw. Stoffwechselwegen zu korrelieren. Dadurch könnten die Wirkungen unbekannter Substanzen schnell identifiziert werden. Auch mit Substanzen aus dem Zigarettenrauch wurden Expressionsanalysen an Zelllinien durchgeführt. So wurden zum Beispiel Benzo[a]pyren [170] bzw. BPDE [174] analysiert. Die Microarray-Untersuchung von Yu et al. [174] zeigte eine starke Induktion von Genen der Nukleotid- und Basenexzissionsreparatur bei Hela-Zellen nach 53-stündiger Exposition mit 0,4 M BPDE. Wolf et al. [170] wiesen mittels Real Time-PCR eine besonders starke Induktion des *Cytochrom P450 1A1* bei

Benzo[a]pyren-behandelten Blasenzellen nach. Bisher ist relativ wenig über eine Assoziation von Genexpressionsdaten und genetischen Endpunkten bekannt. Mayer et al. [93] korrelieren die Expression von 70 Reparaturgenen mit DNA-Reparaturkapazitäten. Stimulierte Lymphozyten wurden mit ionisierender Strahlung exponiert und eine Reparaturkinetik wurde verfolgt. Bei 12 Reparaturgenen, u. a. *Ku70* und *Ku80*, die an der Doppelstrangbruchreparatur beteiligt sind, wurde 72 Stunden nach Exposition eine mehr als zweifach erhöhte Expression mittels Microarrayanalyse nachgewiesen. Die Expressionsdaten korrelieren mit Reparaturkapazitäten, die mit dem Comet Assay bestimmt wurden.

Meinem Wissen nach sind bisher nur sehr wenig Genexpressionsanalysen im Zuge von Biomonitoring-Untersuchungen durchgeführt worden. Dabei wäre es äußerst interessant, ob bestimmte Expositionen ähnliche Genexpressionsprofile bei verschiedenen Personen hervorrufen würden. Spira et al. [148] untersuchten mittels eines DNA-Microarrays individuelle Schwankungen der Expression von fremdstoffmetabolisierenden Genen bei Rauchern und Nichtrauchern. Die beiden Gruppen unterschieden sich hinsichtlich ihrer Genexpression nur in 97 Genen und es konnten gruppenspezifische „Cluster“ gebildet werden. Allerdings gab es Individuen, die sich deutlich von dem Expressionsmuster der Gruppe unterschieden. Einige Raucher ähnelten in ihrem Expressionsprofil eher dem der Nichtraucher. Zwei dieser Raucher entwickelten innerhalb eines Jahres Lungenkrebs. Diese Daten belegen die Vermutung, dass auch individuelle Expressionsschwankungen bei Suszeptibilitätsuntersuchungen mit in Betracht gezogen werden müssen.

1.5 Fragestellung

In dieser experimentellen Studie sollte geklärt werden, ob ein genotoxischer Effekt des Rauchens mit dem Comet Assay an peripheren Leukozyten nachweisbar ist. Zunächst sollte ein sensitives Comet Assay-Protokoll etabliert werden. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass die Alkalidenaturierungs- und Elektrophoresezeiten so gewählt werden, dass auch bei Kontrollzellen eine minimale DNA-Migration erzielt wird, um falsch negative Befunde auszuschließen. Durch die Auswahl einer homogenen Probandengruppe mit strengen Einschluss- und Ausschlusskriterien sollte der Einfluss von Störgrößen minimiert werden. Ein besonderes Augenmerk sollte auf die Qualität der Untersuchungen gelegt werden. Es sollte in jeder Elektrophorese ein Referenzstandard verwendet werden. Ferner sollten Parallelpräparate angefertigt bzw. Präparate doppelt ausgewertet werden. Folgende Aspekte sollten mit dem Comet Assay untersucht werden:

- Unterscheiden sich Raucher und Nichtraucher hinsichtlich basaler DNA-Schäden der Leukozyten des peripheren Bluts?
- Gibt es Unterschiede in der Induzierbarkeit von DNA-Schäden in den Leukozyten bei Rauchern und Nichtrauchern?
- Unterscheiden sich die Leukozyten des peripheren Bluts bei Rauchern und Nichtrauchern hinsichtlich der Reparaturaktivität?
- Üben genetische Polymorphismen in Genen des Fremdstoffmetabolismus und der DNA-Reparatur einen Einfluss auf die Comet Assay-Ergebnisse aus?
- Verändert das Zigarettenrauchen die Expression von Reparaturgenen und korrelieren Expressionsunterschiede mit den Comet Assay-Ergebnissen?
- Ist ein genotoxischer Effekt des Zigarettenrauchs im Comet Assay anhand einer Meta-Analyse publizierter Studien nachweisbar?

Diese Untersuchungen sollten zur Klärung der Fragen beitragen, ob ein genotoxischer Effekt des Zigarettenrauchs im Comet Assay durch ein sensitives Protokoll nachgewiesen werden kann und ob genetische Unterschiede der Probanden bzw. individuelle regulatorische Schwankungen das Ergebnis des Comet Assay beeinflussen können. Ziel dieser Arbeit sollte es sein, allgemeine Schlussfolgerungen für den Einsatz des Comet Assay im Biomonitoring abzuleiten.

2 Material und Methoden

2.1 Probanden und Material

2.1.1 Probanden

An dieser Studie nahmen 142 männliche Studenten und Mitarbeiter der Universität Ulm freiwillig teil. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Ulm geprüft und akzeptiert. Jeder Proband wurde über den Inhalt und die Ziele der Studie ausführlich informiert und musste eine Einverständniserklärung unterschreiben. Mein Probandenkollektiv setzte sich aus 71 Rauchern und 71 Nichtrauchern zusammen. Das Alter der Probanden und die Anzahl der täglich gerauchten Zigaretten sind in Tabelle 2.1 aufgelistet. 5 Probanden waren jünger als 20 Jahre. Die meisten Probanden (105) waren zwischen 20 und 30 Jahre alt. 22 Probanden waren zwischen 30 und 35 Jahre alt und die restlichen 7 Probanden waren älter als 35 Jahre. Drei Studenten gaben ihr Alter nicht an. Ein Nichtraucher wurde nur als Proband akzeptiert, wenn er noch nie regelmäßig Zigaretten geraucht hatte. Die Raucher mussten mindestens 10 Zigaretten pro Tag rauchen und durften das Rauchen nicht zwischenzeitlich unterbrochen haben. Es wurde dadurch versucht, keine bzw. eine ausreichende Exposition zu gewährleisten. 42 Probanden rauchten zwischen 10 und 20 Zigaretten pro Tag und 29 Personen rauchten mehr als 20 Zigaretten pro Tag. Mit Hilfe eines Fragebogens sollten potenzielle Störfaktoren ausgeschlossen werden. Ausschlusskriterien für die Teilnahme an der Studie waren:

- vorausgegangene Mutagenexposition
- aufgetretene Krebserkrankung
- Radio- oder Chemotherapie
- Röntgenuntersuchungen während der letzten 6 Monate
- regelmäßige Medikamenteneinnahme (auch hoch dosierte Vitaminpräparate)

- hoher Alkoholkonsum
- intensiver Sport während der letzten Woche.

2.1.2 Blutproben

Den 71 Nichtrauchern und 71 Rauchern wurden bis zu 20 ml Blut durch Venenpunktion in der Armbeuge entnommen und mit ca. 500 μl Heparin vermischt, damit keine Koagulation der Blutzellen stattfand. Ein Teil des heparinisierten Vollblutes wurde unmittelbar nach der Blutentnahme für die Durchführung des Comet Assay verwendet. Manche Experimente wurden an stimuliertem Vollblut durchgeführt. Dabei wurde das Vollblut durch Phytohaemagglutinin A (PHA) zum Wachstum angeregt, indem man 300 μl Vollblut in 3 ml RPMI-Medium (10 % FCS, 2 % PHA) verdünnt und die Zellen für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Mutagen behandelt. In den Fällen, in denen die Reparaturkapazität der Zellen mitbestimmt werden sollte, wurden während der Mutagenbehandlung 0,5 μg/ml bzw. 5 μg/ml Aphidicolin (APC) zugegeben. Nach der Mutagenbehandlung wurden die Zellen bei 800 UPM für 10 Minuten abzentrifugiert und das Pellet in 500 μl Hanks-Lösung resuspendiert. Für alle Probanden wurde aus dem Blut DNA isoliert. Bei einem Teilkollektiv der Probanden wurden Lymphozyten aus dem Vollblut isoliert. Dazu wurde 4 ml Ficoll-Paque^{TM} Plus (ρ = 1,077 g/ml) mit 4 ml Vollblut überschichtet. Das Blutkulturröhrchen wurde für 25 min mit 323 × g zentrifugiert. Im Blutkulturröhrchen bildete sich ein Dichtegradient. Auf dem Ficoll schieden sich die Lymphozyten ab. Diese wurden vorsichtig, ohne das Ficoll aufzuwirbeln mit einer Glaspipette entnommen und in ein neues Blutkulturröhrchen überführt. Die Zellen wurden mit 8 ml RPMI-Medium verdünnt und 10 Minuten bei 1200 UPM zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf wenige μl verworfen. Dieser Waschschritt wurde einmal wiederholt. Die Lymphozyten wurden in 5 ml Medium mit FCS resuspendiert und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 10 Minuten bei 1000 UPM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 375 μl kaltem RPMI-Medium ohne FCS resuspendiert. Es schloss sich eine Zellzählung an.

2.1.3 V79-Zellen

Zur Herstellung eines Referenzstandards für den Comet Assay und für *in vitro*-Experimente wurde die Zelllinie V79 verwendet. Es handelt sich um eine permanente Lungenfibroblastenlinie eines männlichen chinesischen Hamsters. Diese Zelllinie wird

Tabelle 2.1: Probandennummer (Nr.), Alter und Anzahl der täglich gerauchten Zigaretten (n), der an der Studie teilnehmenden Probanden.

Nr.	Alter	n	Nr.	Alter	n	Nr.	Alter	n	Nr.	Alter	n
1	27	0	**37**	31	≥ 20	**73**	35	≥ 20	**109**	20	≥ 15
2	24	0	**38**	27	0	**74**	23	≥ 10	**110**	24	≥ 10
3	–	0	**39**	26	0	**75**	25	≥ 20	**111**	20	≥ 10
4	24	≥ 20	**40**	36	≥ 20	**76**	22	≥ 10	**112**	28	≥ 15
5	18	≥ 10	**41**	26	0	**77**	23	0	**113**	26	0
6	23	0	**42**	25	≥ 10	**78**	23	0	**114**	31	≥ 10
7	40	≥ 10	**43**	–	0	**79**	28	0	**115**	20	≥ 15
8	28	≥ 10	**44**	21	≥ 15	**80**	32	0	**116**	25	0
9	25	0	**45**	23	0	**81**	27	0	**117**	18	≥ 20
10	26	≥ 15	**46**	19	0	**82**	24	≥ 40	**118**	–	≥ 10
11	24	0	**47**	24	0	**83**	27	≥ 20	**119**	24	≥ 15
12	24	0	**48**	25	0	**84**	26	≥ 20	**120**	26	0
13	26	0	**49**	32	≥ 15	**85**	27	≥ 25	**121**	22	0
14	31	0	**50**	27	0	**86**	33	≥ 25	**122**	19	0
15	25	0	**51**	26	0	**87**	29	0	**123**	27	≥ 10
16	28	≥ 10	**52**	25	≥ 20	**88**	25	0	**124**	31	0
17	32	≥ 15	**53**	22	≥ 20	**89**	30	≥ 25	**125**	26	0
18	24	0	**54**	23	≥ 30	**90**	26	0	**126**	21	0
19	26	0	**55**	18	≥ 15	**91**	20	0	**127**	21	≥ 10
20	34	≥ 15	**56**	34	≥ 15	**92**	26	0	**128**	24	≥ 10
21	37	≥ 10	**57**	21	≥ 25	**93**	25	≥ 20	**129**	24	≥ 20
22	24	≥ 40	**58**	23	0	**94**	24	≥ 30	**130**	23	0
23	26	0	**59**	21	0	**95**	23	≥ 20	**131**	21	≥ 10
24	26	0	**60**	39	0	**96**	29	0	**132**	27	0
25	23	≥ 15	**61**	42	0	**97**	30	0	**133**	29	0
26	28	≥ 10	**62**	31	0	**98**	27	≥ 20	**134**	27	≥ 10
27	27	≥ 15	**63**	37	≥ 10	**99**	32	0	**135**	24	0
28	27	0	**64**	21	0	**100**	26	0	**136**	24	0
29	31	0	**65**	23	0	**101**	34	0	**137**	26	0
30	31	0	**66**	30	≥ 10	**102**	23	≥ 20	**138**	26	≥ 10
31	26	≥ 10	**67**	27	≥ 20	**103**	23	≥ 20	**139**	24	≥ 10
32	33	≥ 20	**68**	23	≥ 10	**104**	32	0	**140**	21	≥ 10
33	32	≥ 20	**69**	36	0	**105**	23	0	**141**	23	0
34	26	≥ 15	**70**	26	0	**106**	27	0	**142**	26	≥ 20
35	26	0	**71**	26	≥ 10	**107**	25	≥ 20			
36	24	≥ 10	**72**	26	≥ 10	**108**	29	0			

- keine Angabe

häufig bei Genotoxizitätsprüfungen eingesetzt und ist zytogenetisch gut charakterisiert. Unsere Linie besitzt durchschnittlich 21 Chromosomen und der Zellzyklus dauert ca. 12 Stunden [135]. Die V79-Zellen werden in T75-Flaschen in MEM-Medium kultiviert. Die Subkultivierung erfolgte unter Standardzellkulturbedingungen. Für die Herstellung des Referenzstandards für den Comet Assay wurden V79-Zellen abtrypsiniert und in MEM-Medium mit 7,5 % DMSO bei -80 °C in Aliquots (10 μl, ca. 15000 Zellen) schockgefroren. Für jede Elektrophorese wurden ein Aliquot aufgetaut und auf einen vorbeschichteten Objektträger aufgetragen.

2.1.4 Testagenzien

Bestrahlung

Die Zellen wurden mit einer Cs^{137}-Bestrahlungsquelle (Gammacell 2000) mit der Strahlungsdosis von 4 Gy/min bestrahlt. Die gewünschte Dosis wurde durch die Bestrahlungsdauer festgelegt. Bei der Durchführung des Comet Assay wurden 500 μl Vollblut in einem Eppendorfgefäß bestrahlt und anschließend auf Eis maximal für 5 Minuten bis zur Aufarbeitung gelagert, um Reparatureffekte zu minimieren. Um Reparaturkinetiken messen zu können, wurden die Zellen mit 2 Gy bestrahlt und danach für einen Zeitraum von 15 und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurde ein Zellaliquot von 15000 Zellen entnommen und in den Comet Assay eingesetzt. Für den Mikronukleustest (MNT) wurden 300 μl Vollblut in 3 ml Chromosomenmedium 1A mit 2 Gy bestrahlt.

Mutagene

Wasserstoffperoxid ist ein gut charakterisierter Radikalbildner. Es ruft an der DNA oxidative Schäden hervor. Die verwendeten Wasserstoffperoxid (H_2O_2)-Verdünnungen wurden immer frisch vor der Behandlung aus einer 37 %igen Stammlösung in sterilem bidestillierten Wasser angesetzt. Für die *in vitro*-Versuche wurden die Lymphozyten mit 20 μM und für den Comet Assay mit anschließender FPG-Behandlung mit 10 und 20 μM H_2O_2 behandelt. Die Behandlung erfolgte für 5 Minuten auf Eis.

Methylmethansulfonat (MMS) ist ein direkt wirkendes Mutagen und gehört zur Klasse der Alkylantien. Isolierte Lymphozyten wurden für die *in vitro*-Experimente mit 1, 5 und 10 μM MMS für 1 Stunde bei 37 °C behandelt. Vollblut wurde zunächst 1:1 mit RPMI-Medium verdünnt und dann mit 60 μM MMS für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

Benzo[a]pyrendiolepoxid (BPDE) ist der aktive Metabolit des im Zigarettenrauch

befindlichen Benzo[a]pyrens. BPDE ist ein stark mutagener Adduktbildner. Die Verwendung von BPDE war von praktischem Vorteil, da auf eine exogene Metabolisierung des Benzo[a]pyrens mittels S9-Mix verzichtet werden kann. BPDE ist sehr instabil, was bei längerer Lagerung zu einer verminderten Wirkstärke führte und daher unterschiedlich starke DNA-Schädigung hervorrief. Für die *in vitro*-Experimente wurde Vollblut mit 1; 2,5; 5; 7,5 und 10 μM BPDE für 2 Stunden bei 37 °C behandelt. Die Comet Assay-Versuche wurden mit 10 μM BPDE durchgeführt. Um die Reparatur der DNA-Effekte, die durch BPDE hervorgerufen wurden, zu untersuchen, wurde das behandelte Blut bei 2000 UPM für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Ausgangsvolumen wurde mit RPMI-Medium aufgefüllt und die Zellen darin resuspendiert. Dieser Waschschritt wurde zweimal wiederholt.

2.1.5 Chemikalien

Acridinorange	Merck, Darmstadt
Agarose LMP, Sea plaque, GTG	Biozym, Hameln
Agarose MEEO	Roth, Karlsruhe
Agarose NEEO	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma, München
Aphidicolin (APC)	Sigma, München
Aqua ad injectabilis	Braun, Melsungen
1-beta-D-Arabinofuranosylcytosin (AraC)	Sigma, München
(±)-anti-B[a]P-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE)	BIU, Großhansdorf
Borsäure	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Bovine serum albumine, Fraction V	Sigma, München
Chromosomenmedium 1A	Gibco BRL, Eggenstein
Cytochalasin B	Sigma, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg
DNA-Standard 100 bp ladder (1 μg/ml)	Pharmacia, Freiburg
Essigsäure ($\geq$ 99,7 %)	Roth, Karlsruhe
Ethanol, absolut	Riedel DeHaen, Seelze
Ethidiumbromid	Sigma, München
Ficoll-Paque^{TM} Plus	Amersham, München
Fötales Kälberserum	Biochrom, Berlin
Formaminopyrimidin-Glykosylase (FPG-Protein)	Dr. A. Collins, Oslo, Norwegen

Gentamycin	Biochrom, Berlin
Hanks balanced salt solution (HBSS)	Biochrom, Berlin
Heparin-Natrium	Braun, Melsungen
KCl	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Minimal essential medium-Earle (MEM)	Biochrom, Berlin
Methanol	Merck, Darmstadt
$MgCl_2$	Merck, Darmstadt
NaCl	Fluka, Neu-Ulm
NaCl-Lösung, isoton (0,9 %)	Delta Pharma, Pfullingen
Na_2HPO_4	Merck, Darmstadt
NaH_2PO_4	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natrium-Ethylendiaminotetraacetat (EDTA)	Fluka, Neu-Ulm
Phosphate buffer saline (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+})	Biochrom, Berlin
PCR 10×Puffer	Pharmacia, Freiburg
Phytohaemagglutinin A (PHA), M-Form	Pharmacia, Freiburg
RPMI-1640 Medium mit Glutamax	Sigma, München
RNase A	Gibco BRL, Eggenstein
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure, rauchend (37 %)	Riedel DeHaen, Seelze
Taq-Polymerase (5 U/μl)	Pharmacia, Freiburg
Tris	Boehringer, Mannheim
Triton X-100	Sigma, München
Trypsin	Biochrom, Berlin
Wasser, steril	Delta Pharma, Pfullingen
Wasserstoffperoxid (37 %)	Merck, Darmstadt

2.1.6 Geräte und Materialien

AL Cellcounter, Modell 871	AL-Systeme, Karlsruhe
Blutkulturröhrchen 10 ml	Greiner, Nürtingen
Brutschrank B 6200	Heraeus, Hanau
CCD-Kamera 4910	Cohu, San Diego, USA
CO_2-Brutschrank	Heraeus, Hanau
Comet Assay II Meßsystem V 1.03	Perceptive Instruments Haver-Hill, UK
Deckgläser (24 x 60 mm)	Menzel, Braunschweig
Elektrophoresekammer DNA Sub Cell^{TM}	BioRad, München
Elektrophorese Power Supply	Fröbel, Ulm
Fluoreszenzmikroskop Axioplan	Zeiss, Oberkochen
Geldokumentationsanlage Image Store 5000	Ultra Violet Products Ltd., Cambridge, UK
Heizplatte	Medax, Kiel
Laminar Air Flow TL2448	Heraeus, Hanau
Laminar Air Flow HB2448K	Heraeus, Hanau
Lichtmikroskop Axiophot	Zeiss, Oberkochen
LightCycler	Roche, Mannheim
LightCycler Kapillaren	Roche, Mannheim
Neubauer-Zählkammer	Karl Hecht KG, Sondheim
Objektträger mit Mattrand	Menzel, Braunschweig
PCR-SoftStrips 0,2 ml, 8fach	Biozym, Hess. Oldendorf
Plastikpipetten 5, 10, 25, 50 ml	Falcon, Heidelberg
Reaktionsgefäße	Roht, Karlsruhe
Sterilfilter 0,2 μm	Millipore, Eschborn
Spritzen (1, 2, 5, 10, 20 ml)	BectonDickinson, Heidelberg
Strahlenquelle Gammacell 2000	Nuclear Data, Frankfurt
Thermal Cycler PTC 100	MJ Research Inc., Waterhouse, USA
Thermomixer Model 5436	Eppendorf, Hamburg
UV-Schirm	Bachofer, Reutlingen
Zellkulturflaschen, 25, 75 cm^2	Nunc, Wiesbaden
Zentrifuge Modell Minifuge	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Modell Labofuge 400	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Modell 5402	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugenröhrchen 10 ml	Nunc, Wiesbaden

2.1.7 Lösungen, Medien und Puffer

Acridinorange-Färbelösung	125 μg/ml Acridinorange in 10 ml Sörensenpuffer Lösung A 10 ml Sörensenpuffer Lösung B ad 100 ml mit Aqua dest.
Alkalischer Elektrophoresepuffer (pH > 13) Leitfähigkeit (60 - 65 mS/cm)	300 mM NaOH 1 mM EDTA
Bromphenolblau-Ladepuffer	3 g Saccharose 25 mg Bromphenolblau 2,5 ml EDTA (0,2 M, pH = 7,6) ad 10 ml mit Aqua dest.
dNTPs	0,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
Ethidiumbromid-Färbelösung	10 μg/ml in Aqua dest.
Fixierlösung I für MNT	Methanol/ Eisessig (5 + 1) 1:1 mit 0,9 % NaCl gemischt
Fixierlösung II für MNT	Methanol/ Eisessig (5 + 1)
Hanks-Lösung	50 ml Hanks balanced salt solution 2,35 ml 7,5 % $NaHCO_3$ ad 500 ml mit Aqua dest.
Lyse-Lösung (pH = 10)	2,5 M NaCl 100 mM EDTA 10 mM Tris, 1 % Triton X-100 und 10 % DMSO frisch zugeben

MEM-Medium	1×MEM-Earle 2 nM L-Glutamin 2,2 g/l $NaHCO_3$ 10 % FCS 50 μg/ml Gentamycin
Neutralisationspuffer (pH = 7,5)	0,4 M Tris pH mit 37 % HCl einstellen
10×PBS	95,5 g PBS in 1000 ml Aqua dest.
10×PCR-Puffer	100 mM TrisHCl (pH = 8,4) 15 mM $MgCl_2$
RPMI-Zellkulturmedium	500 ml RPMI-1640 mit Glutamax 10 % fötales Kälberserum 50 μg/ml Gentamycin
Sörensenpuffer Lösung A	0,3 M Na_2HPO_4×2 H_2O
Sörensenpuffer Lösung B	0,3 M KH_2PO_4
10×TBE-Puffer (pH = 8)	900 mM Tris 900 mM Borsäure 20 mM EDTA (pH = 8)
TE-Puffer	10 mM Tris (pH = 7,6) 1 mM EDTA (pH = 7,6)
Trypsin-Lösung (0,15 %)	2,5 % Trypsin in 1 % EDTA 10×PBS ad 1 l mit Aqua dest. 15 ml 7,5 % $NaHCO_3$

2.1.8 Reagenziensysteme (Kits) und Restriktionsenzyme

BcnI	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
BseMI	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
GFX^{TM} PCR DNA and Gel Band Purification	Amersham, München
NcoI	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
NucleoSpin Blood QuickPure	Machery-Nagel, Düren
PAXgene^{TM} Blood RNA Tube	Qiagen, Hilden
PAXgene^{TM} Blood RNA Kit	Qiagen, Hilden
PstI	MBI Fermentas, München
QuantiTect^{TM}SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden
RsaI	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
SuperScript^{TM}First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.9 Oligonukleotidprimer

Alle Primer wurden von der Firma Biomers, Ulm bezogen. Die Sequenzen der PCR-Primer sowie die Größe des amplifizierten Produktes sind in Tabelle 2.4 aufgelistet.

In Tabelle 2.5 sind die Primer für die Durchführung der Expressionsanalyse mit dem LightCycler dargestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Der Comet Assay (Einzelzellgelelektrophorese)

Der Comet Assay ist ein Genotoxizitätstest, der es ermöglicht Strangbrüche der DNA auf der Einzelzellebene nachzuweisen. Die Vorteile des Comet Assay liegen in seiner einfachen und schnellen Durchführbarkeit. Mit diesem sensitiven Test können sowohl DNA-Doppelstrangbrüche als auch DNA-Einzelstrangbrüche und alkalilabile Stellen nachgewiesen werden. Der Comet Assay wurde erstmals bei Singh et al. [139] beschrieben. In dieser Arbeit wurde ausschließlich die alkalische Version des Comet Assay verwendet. Die von Singh et al. [139] eingeführte Methode wurde modifiziert durchgeführt [142]. Abbildung 2.1 stellt den Comet Assay schematisch dar.

Tabelle 2.4: PCR-Primer und jeweilige Länge des resultierenden PCR-Produkts.

Gen		**Sequenz** (5' → 3')	**Produkt**
GSTM1	hin	GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C	
	rück	GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTC G	217 bp
Actin	hin	TCA CCA ACT GGG ACG ACA TG	
	rück	TCA TGA GGT AGT CAG TCA GGT	349 bp
Cyp1A1	hin	GAA CTG CCA CTT CAG CTG TCT	
	rück	GGC TGA ACC TTA GAC CAC ATA	411 bp
Cyp2E1	hin	CCA GTC GAG TCT ACA TTG TCA	
	rück	TTC ATT CTG TCT TCT AAC TGG CA	413 bp
XPD	hin	TCA AAC ATC CTG TCC CTA CT	
	rück	CTG CGA TTA AAG GCT GTG GA	344 bp
XRCC1	hin	CAA GTA CAG CCA GGT CCT AG	
	rück	CCT TCC CTC ATC TGG AGT AC	248 bp
XRCC3	hin	GCC TGG TGG TCA TCG ACT C	
	rück	ACA GGG CTC TGG AAG GCA CTG CTC AGC TCA CGC ACC	136 bp

Tabelle 2.5: LightCycler-Primer und jeweilige Länge des Produkts.

Gen		**Sequenz** (5' → 3')	**Produkt**
PBGD	hin	CCC AGC TGC AGA GAA AGT TCC	
	rück	GCA GCA CAC CCA CCA GAT CCA	262 bp
XPD	hin	AAC CTC AAC CTG ACC GTG GAC GA	
	rück	CCC ACT CAG AGC TGC TGA GCA AT	176 bp
XRCC1	hin	TGC GTA AGG AGT GGG TGC TGG AC	
	rück	TTC TGA GGA AGC TTG GGG GCT TC	151 bp
XRCC3	hin	TGC AGC TCT GCC TGG CTG TGC AGT T	
	rück	GGC TGC CAA ATC GGA GCT TCT GAA	180 bp

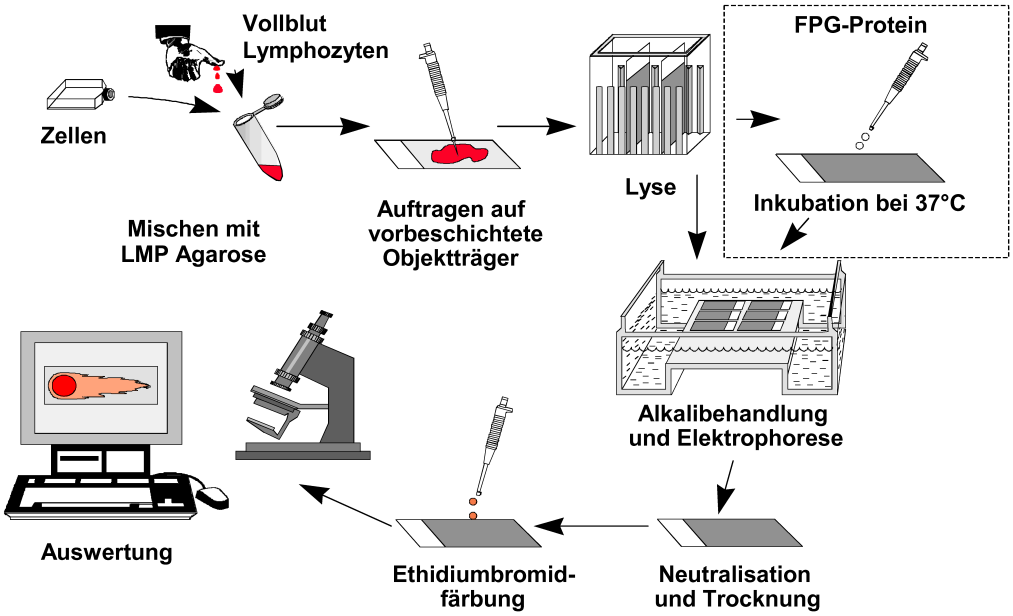


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Durchführung des Standard und FPG-modifizierten Comet Assay.

Herstellung der Präparate

Die Objektträger wurden am gegenüberliegenden Ende des Mattrandes mit Hilfe eines Diamantstiftes eingeritzt und in 60 °C warme Agarose (1,5 % MEEO in PBS) eingetaucht. Das Ritzen der Objektträger dient einer besseren Haftung der Agaroseschicht. Die Unterseite der Objektträger wurde abgewischt und die Objektträger horizontal getrocknet. Die so hergestellten Objektträger können über mehrere Monate gelagert werden.

Es wurde eine 0,5 %ige „low meltig point“ (LMP)-Agarose in PBS hergestellt und aliquotiert. Bis zur Verwendung wurden die Aliquots im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Je nach Bedarf wurde eine geeignete Menge an LMP-Aliquots aus dem Kühlschrank entnommen und ca. 5 Minuten bei 80 °C erhitzt, bis diese geschmolzen war. Anschließend wurde die LMP-Agarose mindestens für 1 Stunde auf 37 °C abgekühlt. 5 μl Vollblut oder 10 μl Lymphozyten bzw. andere Zellen wurden mit 120 μl LMP-Agarose in einem Reaktionsgefäß gründlich gemischt und auf einen Objektträger aufgetragen. Durch Auflegen eines Deckglases (24 × 60 mm) konnte eine gleichmäßige Beschichtung des Objektträgers mit dem Zell-Agarose-Gemisch sichergestellt werden. Die Objektträger wurden dann ca. 5 Minuten auf Eis getrocknet, bis sich das Deckglas gut von der Agaroseschicht ablösen ließ. Die Objektträger wurden für 1 Stunde in einer 4 °C

kalten Lyselösung in einer lichtgeschützten Küvette im Kühlschrank inkubiert. Während der Lyse wird die Zytoplasma- und Kernmembran vollständig entfernt, so dass die Kern-DNA frei in der Agarose vorliegt und nicht durch zelluläre Komponenten an ihrer Wanderung während der Elektrophorese gehindert werden kann.

Alkalidenaturierung und Elektrophorese

Nach der Lyse wurden die Objektträger in eine horizontal ausgerichtete, in einem Eiswasserbad stehende Elektrophoresekammer gelegt und mit alkalischem Elektrophoresepuffer (4 °C, pH $>$ 13) überschichtet. Die Elektrophoresekammer wurde abgedeckt, damit die Objektträger vor einfallendem Licht geschützt waren. Die Alkalidenaturierung wurde für jeden Zelltyp etabliert. In dieser Zeit denaturierte die doppelsträngige DNA und an alkalilabilen Stellen entstanden Einzelstrangbrüche. Anschließend wurde an die Elektrophoresekammer eine Spannung von 25 V (elektrische Feldstärke 0,86 V/cm) angelegt. Die Stromstärke wurde durch die Puffermenge auf 300 mA eingestellt. Die Elektrophoresezeit variierte je nach Zelltyp und musste vor Beginn der Arbeiten etabliert werden. Die Bedingungen für die Elektrophorese wurden so gewählt, dass Kontrollzellen eine minimale DNA-Migration aufwiesen. In jeder Zelle liegen spontane DNA-Schäden vor, die im Comet Assay zu einer DNA-Wanderung führen. Somit haben auch Kontrollzellen eine bestimmte DNA-Migration. Es ist so auch möglich, Substanzen („crosslinker“), die die DNA-Migration durch Quervernetzung verringern, mit dem Comet Assay zu untersuchen. Dadurch wird die Sensitivität des Comet Assay deutlich erhöht. Das Vorhandensein einer geringen DNA-Migration in den Kontrollzellen, führt außerdem dazu, dass überprüft werden kann, ob das Netzgerät ordnungsgemäß gearbeitet hat.

Neutralisierung und Anfärben der Präparate

Nach der Elektrophorese wurden die Objektträger aus der Elektrophoresekammer genommen und auf ein horizontal stehendes Färbebänkchen gelegt. Die Objektträger wurden dreimal für je 5 Minuten mit Neutralisationspuffer gewaschen. Nach der Neutralisation wurden die Objektträger zum Entwässern in eine Küvette mit absolutem Ethanol gestellt. Vertikal stehend wurden die Präparate mindestens eine halbe Stunde getrocknet. In diesem Zustand können die Präparate monatelang gelagert werden. Unmittelbar vor der Auswertung wurden die Präparate mit 50 μl Ethidiumbromid (10 μg/ml) gefärbt und eingedeckt. Bis zur Auswertung wurden die Objektträger dunkel in einer feuchten Kammer gelagert, damit sie nicht austrocknen.

Mikroskopie und Auswertung

Die Präparate wurden vor der Auswertung durch einen nicht an der Studie beteiligten Mitarbeiter codiert. Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop mit einem Anregungsfilter von 515 - 560 nm und einem Sperrfilter von 590 nm. Ein PC-gestütztes Bildanalysesystem, das über eine CCD-Kamera und eine Digitalisierkarte an das Mikroskop angeschlossen war, lieferte verschiedene Parameter. Die Weitverbreitetsten sind:

- Tailmoment (Produkt aus der Länge der DNA-Migration und der Schweifintensität)
- Tailintensity (relative Fluoreszenzintensität des Kometenschweifs gegenüber des Kometenkopfes)

Die in dieser Arbeit erhaltenen Comet Assay-Effekte hatten die gleiche Tendenz bei beiden Parametern. Daher werden die von mir erhobenen Comet Assay-Befunde anhand des Tailmoments dargestellt. Es wurde dieser Parameter ausgewählt, da er sowohl die Länge der DNA-Migration als auch die Schweifintensität berücksichtigt und daher die Unterschiede deutlicher ausgeprägt erscheinen. Der Nachteil des Tailmoments ist, dass diese Maßangabe sehr abstrakt und daher schwer nachvollziehbar ist [26, 142]. Die Auswertung wurde bei 400facher Vergrößerung mit der „Software“ Comet Assay II Messsystem V 1.03 durchgeführt. Pro Objektträger wurden 50 Zellen gemessen. Teilweise wurden Parallelpräparate ausgewertet oder bereits ausgewertete Objektträger von einem Zweitauswerter erneut vermessen. Die Zellen wurden zufällig ausgewählt, wobei Zellen aus Randbereichen des Objektträgers aufgrund möglicher unspezifischer DNA-Effekte nicht berücksichtigt wurden. Die Zellen durften auch nicht mechanisch geschädigt worden sein. Von den 50 ausgewerteten Zellen pro Präparat wurde der Mittelwert ($\overline{x}$) und ein Maß der Streuung (Standardabweichung [σ] bzw. „standard error of the mean“ [SEM]) bestimmt.

Modifikation des Comet Assay zum Nachweis von Basenmodifizierungen

Bestimmte Reparaturenzyme decken Basenmodifikationen auf, die nicht zur Erhöhung der DNA-Migration im Standard Comet Assay führen. Die aus *E. coli* stammende Formaminopyrimidin-Glykosylase (FPG) entfernt oxidierte und alkylierte Purinbasen. Die entstandene abasische Stelle wird durch die Endonuklease-Aktivität des FPG-Proteins in einen Einzelstrangbruch umgewandelt und führt so nach Denaturierung der DNA zu einer verstärkten Migration. Die FPG-behandelten Objektträger wurden

immer vergleichend mit unbehandelten und nur mit Enzympuffer behandelten Präparaten untersucht. Durch diesen Vergleich konnte eine Aussage über die Menge an vorhandenen Basenmodifizierungen getroffen werden. Das FPG-Protein erhielt ich von Dr. A. Collins (Oslo, Norwegen).

Bestimmung von Reparaturkapazitäten mittels Inhibitoren der DNA-Reparatur

Durch den Einsatz von Substanzen, die spezifisch Enzyme der DNA-Reparatur hemmen, konnte die individuelle Reparaturkapazität der Probanden bestimmt werden. **Aphidicolin** (APC), ein tetrazyklisches Diterpentetraol aus *Cephalosporium aphidicola*, ist ein Hemmstoff der DNA-Polymerasen α, δ und ϵ [140]. Basenmodifizierungen sind im Standard Comet Assay nicht sichtbar, weil sie nicht zu einer erhöhten DNA-Migration führen. Diese Modifizierungen werden von den Zellen über die Exzissionsreparatur entfernt, die Einschnitte an der DNA hervorruft. Die Verknüpfung der neu synthetisierten DNA kann nicht stattfinden, da das APC die Ligasefunktion der Polymerase hemmt. Dies führt zu einer Akkumulation von Exzissionseinschnitten und hat daher eine Erhöhung der DNA-Migration [141] zur Folge. Vergleicht man die Comet Assay-Effekte dieser Präparate mit den basalen Befunden, so kann die Reparaturaktivität nachgewiesen werden. Zu 495 μl Vollblut bzw. Vollblut mit 10 μM BPDE wurden 5 μl Aphidicolin (Endkonzentration 5 μg/ml) zugegeben und 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Ein Teil der Blutproben wurde 16 Stunden mit 5 μg/ml APC inkubiert. Dazu wurden die Blutproben 1:1 mit RPMI-Medium mit 10 % FCS und 2 % PHA verdünnt.

Ein anderer Inhibitor ist das **1-beta-D-Arabinofuranosylcytosin** (AraC), welches in der Zelle zu 1-beta-D-Arabinofuranosylcytosin-5´-triphosphat phosphoryliert und in die DNA eingebaut wird. Durch AraC werden die Polymerasen α und β gehemmt. Das 1:1 mit RPMI-Medium (10 % FCS, 2 % PHA) verdünnte Blut wurde mit 1 μg/ml AraC versetzt und 16 Stunden bei 37 °C inkubiert.

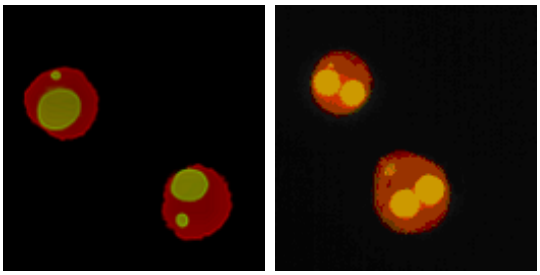
Referenzstandard

Bei jeder Elektrophorese wurde ein Präparat mit V79-Zellen mitgeführt. Die Zellen stammten aus zwei Kulturen, die zu Beginn der Studien in Aliquots tiefgefroren worden waren. Für jeden Comet Assay wurde eine Probe aufgetaut und zur Herstellung eines Präparates verwendet. Es wurden jeweils 50 Zellen des Referenzstandards vermessen. Am Ende der Studie wurde aus den einzelnen Werten des V79-Standards deren Mittelwert ($\overline{x}$) und Standardabweichung (σ) berechnet. Alle Elektrophoresen, bei denen der interne V79-Standard mehr als die zweifache Standardabweichung vom berechneten V79-Mittelwert abwich, wurden von der Studie ausgeschlossen. Der Referenzstandard

lieferte somit eine Qualitätskontrolle über die Variabilität der durchgeführten Elektrophoresen und deckte Unregelmäßigkeiten auf.

2.2.2 Der Mikronukleustest (MNT)

Der Mikronukleustest (MNT) weist Chromosomen- und Genommutationen nach. Er detektiert sowohl klastogene (chromosomenbrechende) als auch aneugene (chromosomenfehlverteilende) Effekte eines Mutagens. Mikronuklei sind Chromosomenbruchstücke oder ganze Chromosomen, die während der Mitose nicht auf die Tochterkerne verteilt und mit einer Kernmembran umgeben wurden. Sie erscheinen als kleiner Kern neben dem Zellkern in der Zelle [45]. In der vorliegenden Arbeit wurde der MNT an humanen Blutzellen durchgeführt. Die Entstehung von Mikronuklei setzt voraus, dass sich die Zelle mindestens einmal teilt. Da sich Blutzellen in der G_0-Phase befinden, müssen sie durch das Mitogen Phytohaemagglutinin (PHA) zum Wachstum stimuliert werden. Ferner wurde den Blutkulturen Cytochalasin B zugesetzt, unter dessen Einfluss die Karyokinese, nicht aber die Zytokinese stattfinden kann [46]. Für die Auswertung des MNT wurden nur zweikernige Zellen berücksichtigt. Die Abbildung zeigt Mikronuklei in Zellen ohne 2.2(a) und mit Cytochalasin B-Behandlung 2.2(b).



(a) (b)

Abbildung 2.2: Mikronuklei in Zellen ohne (a) und mit Cytochalasin B-Behandlung (b) nach Acridinorangefärbung.

Ansatz der Blutkulturen

In Blutkulturröhrchen wurden 300 μl unbehandeltes Blut zu 3 ml Chromosomenmedium 1A (2 % PHA) pipettiert. Ein Teil der Kulturen wurde mit 2 Gy bestrahlt, um Mikronuklei zu induzieren und dabei zu untersuchen, ob eine unterschiedliche Induktion von Mikronuklei bei Rauchern und Nichtrauchern nachweisbar ist. Es schloss sich eine 44-stündige Inkubation im CO_2-Brutschrank (5 %) bei 37 °C mit geöffnetem Deckel

an. Die Kulturen, die zur Bestimmung basaler Mikronukleusfrequenzen der Probanden bestimmt waren, wurden sofort für 44 Stunden im CO_2-Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 9 μl Cytochalasin B (Endkonzentration 6 μg/ml) zu den Blutkulturen und eine Weiterkultivierung für 24 Stunden.

Zellpräparation

Die Zellpräparation wurde in Anlehnung an Fenech und Morley [47] durchgeführt. Die Blutkulturen wurden bei 800 UPM für 10 Minuten abzentrifugiert und der Überstand bis auf wenige μl verworfen. Die Zellen wurden erneut resuspendiert und in eine Transferpipette übernommen. Es folgte die Zugabe von 5 ml einer eiskalten hypotonen KCl-Lösung (0,56 %). Die Zellen wurden resuspendiert und sofort bei 800 UPM für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen resuspendiert und in eine Transferpipette übernommen. Nun wurden 5 ml Fixierlösung I zu den Zellen gegeben und diese gut resuspendiert. Es folgte eine Inkubation bei RT für 10 Minuten. Anschließend wurde wie oben beschrieben abzentrifugiert. Mit 5 ml Fixierlösung II wurden die Zellen gut resuspendiert und 10 Minuten bei RT inkubiert. Es folgte die Zentrifugation und Resuspensation (s. o.). Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Nach dem letzten Fixierungsschritt wurden die Zellen auf einen Objektträger aufgetropft. Es wurde dabei darauf geachtet, dass das Zytoplasma intakt und möglichst groß war, um die Mikronuklei bei der Auswertung gut erkennen zu können.

Färbung und Auswertung

Die Präparate wurden kurz (1 Sekunde) in eine Küvette mit Acridinorange-Färbelösung getaucht. Das überschüssige Acridinorange wurde mit Aqua dest. abgewaschen und die Objektträger anschließend mit einem Deckglas eingedeckt. Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop bei 400facher Vergrößerung (Anregungsfilter: BP 450 - 490 nm, Sperrfilter: LP 520 nm). Pro Präparat wurden 1000 binukleare Zellen ausgewertet. Die Mikronuklei wurden nur gewertet, wenn sie folgenden Kriterien entsprachen:

- Die zwei Hauptkerne sind in etwa gleich groß.
- Die Mikronuklei besitzen die gleiche Färbung wie die beiden Hauptkerne.
- Der Durchmesser der Mikronuklei ist nicht größer als ein Drittel des Durchmessers der Hauptkerne.

- Die beiden Hauptkerne dürfen nicht über eine Plasmabrücke miteinander verbunden sein.

- Die Mikronuklei sind nicht mit einem der Hauptkerne verbunden.

Um auszuschließen, dass eine Abnahme der Mikronukleusfrequenz auf einen zytotoxischen Effekt zurückzuführen ist, wurde der Proliferationsparameter „nuclear division index“ (NDI) bestimmt. Dabei wurden 500 Zellen ausgewertet. Er wurde wie folgt berechnet:

$$NDI = \frac{1 \cdot n_{Zellen\ mit\ einem\ Kern} + \ldots + 4 \cdot n_{Zellen\ mit\ vier\ Kernen}}{n_{aller\ ausgewerteten\ Zellen}}$$

2.2.3 Nachweis genetischer Polymorphismen

Zum Nachweis genetischer Polymorphismen wurde zunächst die DNA aus den Leukozyten der Probanden isoliert. Es folgte die Durchführung einer PCR und anschließend ein Restriktionsverdau der amplifizierten Produkte.

DNA-Isolierung

Genomische DNA wurde mit dem NucleoSpin Blood QuickPure von Machery-Nagel aus Düren isoliert.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Um genetische Polymorphismen der *Glutathion-S-Transferase M1 (GSTM1)*, des *Cytochrom P450 1A1 (Cyp1A1)* und *2E1 (Cyp2E1)*, des *Xeroderma-Pigmentosum-D-(XPD)*-Gens, des *„X-ray repair cross-complementing protein 1“(XRCC1)*-Gens und des *„X-ray repair cross-complementing protein 3“ (XRCC3)*-Gens bestimmen zu können, musste zunächst eine Polymerasekettenreaktion durchgeführt werden, um definierte DNA-Abschnitte zu vervielfältigen. Die PCR wurde in 50 μl-Ansätzen nach folgendem Schema durchgeführt:

	Volumen
Aqua dest.	41,3 μl
10 x PCR-Puffer	5 μl
dNTP-Mix	0,5 μl
Taq-Polymerase (5 U/μl)	0,2 μl
Primer „hin“ (20 pmol/μl)	1 μl
Primer „rück“ (20 pmol/μl)	1 μl
DNA	1 μl

Dabei wurden die Primer (siehe Tabelle 2.4) so gewählt, dass einer an dem kodierenden und der andere an dem nichtkodierenden Strang bindet. Durch wiederkehrende Abfolgen von Denaturierung, Primerbindung („Annealing“) und Synthese wird die Sequenz exponentiell amplifiziert. Die „Annealing“-Temperaturen sind von dem jeweiligen Primerpaar abhängig. Es wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

Schritt		**Temperatur**	**Zeit**
Denaturierung der DNA		94 °C	4 Minuten
30 x	Denaturierung	92 °C	30 Sekunden
	„Annealing“	je nach Primer	30 Sekunden
	Synthese	72 °C	30 Sekunden
Terminale Synthese		72 °C	5 Minuten
Lagerung		4 °C	

Es wurden folgende „Annealing“-Temperaturen verwendet.

Gen	**„Annealing“-Temperatur**
GSTM1	58 °C
Actin	58 °C
Cyp1A1	56 °C
Cyp2E1	58 °C
XPD	61 °C
XRCC1	55 °C
XRCC3	60 °C

Die *GSTM1*-PCR war eine Multiplex-PCR. Da der *GSTM1*-Polymorphismus auf einer Deletion beruht, wurde ein anderer Genabschnitt (ein *Actin*-Fragment) als Kontrolle für die Funktionsfähigkeit der PCR mit amplifiziert. Mit dieser Methode können nur homozygote Träger der Deletion eindeutig genotypisiert werden. Heterozygote oder homozygote Träger des *GSTM1*-Allels waren nicht unterscheidbar. Wenn

in dieser Arbeit von Personen mit *GSTM1*-Deletion gesprochen wird, so sind die homozygoten Träger der Deletion gemeint.

Gelelektrophoretische Auftrennung und Aufreinigung

Zur Kontrolle wurden die amplifizierten Produkte je nach Produktgröße auf 0,8 bis 2 %igen Agarose-Gelen (MEEO-Agarose in 1×TBE) aufgetrennt. Je 5 μl PCR-Produkt wurden mit 5 μl Bromphenolblau-Ladepuffer aufgetragen. Als Längenstandard diente eine 100-bp-Leiter (1 μg/μl). Die Elektrophorese erfolgte je nach Kammergröße bei 80 oder 200 V. Anschließend wurde das Ethidiumbromid-gefärbte Gel unter UV-Licht fotografiert.

Um DNA bzw. PCR-Produkte aus dem Gel aufzureinigen, bediente ich mich der GFX^{TM}-Säulen. Die Aufreinigung erfolgte laut Anleitung.

Restriktionsfragmentlängenanalyse

Da es sich bei Polymorphismen der Gene *Cytochrom P450 1A1 (Cyp1A1)* und *2E1 (Cyp2E1)* [74], *Xeroderma-Pigmentosum-D (XPD)* [153], *„X-ray repair cross-complementing protein 1“ (XRCC1)* und *„X-ray repair cross-complementing protein 3“ (XRCC3)* [11] um Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen handelt, wurden die PCR-Produkte einer Restriktionsfragmentlängenanalyse unterzogen. Es wurden dabei folgende Restriktionsenzyme verwendet:

Gen	**Polymorphismus**	**Restriktionsenzym**	**Temperatur**
Cyp1A1	Ile462Val	*BseMI*	55 °C
Cyp2E1	GI 51511726, -1372	*RsaI*	37 °C
XPD	Lys751Gln	*PstI*	37 °C
XRCC1	Arg399Gln	*BcnI*	37 °C
XRCC3	Thr241Val	*NcoI*	37 °C

Für den Verdau wurde ein Ansatz von 25 μl gewählt, der sich wie folgt zusammensetzte:

PCR-Produkt	10 μl
jeweiliger Puffer	2,5 μl
Enzym (5 U/μl)	1 μl
Aqua dest.	11,5 μl

Die Ansätze wurden in einem Thermomixer für 2 Stunden bei der jeweiligen

Temperatur inkubiert und anschließend auf ein Agarose-Gel (0,8 bis 2 %) aufgetragen. Es entstanden folgende Produkte:

Gen	**Homoz. Wildtyp**	**Heterozygot**	**Homoz. Variante**
Cyp1A1	251, 160 bp	411, 251, 160 bp	411 bp
Cyp2E1	352, 61 bp	413, 352, 61 bp	413 bp
XPD	234, 110 bp	234, 171, 110, 63 bp	171, 110, 63 bp
XRCC1	159, 89 bp	248, 159, 89 bp	248 bp
XRCC3	136 bp	136, 97, 39 bp	97, 39 bp

Die Genotypisierung wurde anhand der Größe der entstandenen Produkte durchgeführt.

2.2.4 Expressionsanalyse

Um eine Expressionsanalyse durchführen zu können, wurde zunächst RNA aus den Leukozyten der Probanden isoliert. Die so erhaltene RNA wurde in cDNA umgeschrieben und dann in den LightCycler eingesetzt.

RNA-Isolation

2,5 ml venöses Blut wurde in einem PAXgene^{TM} Blood RNA Tube mindestens für 2 Stunden lysiert. Die Isolation der RNA erfolgte laut PAXgene^{TM} Blood RNA-Kit.

Reverse Transkription

Das Umschreiben der RNA in cDNA wurde mittels SuperScript^{TM}First-Strand Synthesis System for RT-PCR von Invitrogen laut Herstellerangaben durchgeführt. Das Umschreiben erfolgte mit „random"-Hexamerprimern.

Quantitative Real Time-PCR mittels LightCycler-Technologie

Die Real Time-PCR wurde in Glaskapillaren im LightCycler von Roche durchgeführt. Aufgrund des geringen Kapillardurchmessers waren schnelle Temperaturänderungen der PCR-Ansätze möglich. Eine lichtemmitierende Diode diente zur Anregung der Fluoreszenz, die in jeder Kapillare nach einem Amplifikationszyklus gemessen wurde. Man konnte dadurch am Monitor („real time") die Zunahme an Produkt verfolgen und die Produktmenge über ein Kalibrierverfahren bestimmen. Der DNA-Farbstoff SYBR Green, der für die Messungen verwendet wurde, interkaliert in die kleine Furche der DNA und ruft mit zunehmender Produktmenge die steigende Fluoreszenz hervor.

Die PCR-Reaktion kann in drei Phasen unterteilt werden. Zunächst gibt es eine frühe Hintergrundphase, während der das Signal im Hintergrundrauschen des Systems untergeht. Es schließt sich die Phase der exponentiellen Zunahme des Produkts, die log-Phase, an. Die Menge an gebildetem Produkt kann mittels folgender Gleichung berechnet werden:

$$T_n = T_0 (E)^n \tag{2.1}$$

T_n stellt die Menge an Zielsequenz im Zyklus n dar, T_0 die eingesetzte Menge und E entspricht der Effektivität der Reaktion. Nach der log-Phase wird ein Plateau erreicht, da einzelne Komponenten der Reaktion verbraucht wurden.

Da das SYBR Green sequenzunspezifisch an doppelsträngige DNA bindet und dadurch auch an Primerdimere binden kann, muss die Spezifität der Real Time-PCR überprüft werden. Dazu wurde der Kapillarinhalt auf ein Gel aufgetragen und die Produktgröße kontrolliert. Ferner gibt es die Möglichkeit der Schmelzkurvenanalyse, bei der die Produkte identifiziert werden können.

Schmelzkurvenanalyse

Eine Schmelzkurvenanalyse wurde der Real Time-PCR angeschlossen. Jedes Produkt hat eine spezifische Schmelztemperatur, die von seiner Größe und dem GC-Gehalt abhängt. Am Ende der Amplifikation wurde ein Temperaturgradient erzeugt, der zum Schmelzen der Produkte führte. Durch die Denaturierung des Produktes wurde das SYBR Green freigesetzt und die Fluoreszenz nahm ab. Durch die spezifische Schmelztemperatur wurde jedes Produkt eindeutig identifiziert.

Erstellen der Kalibrierkurve

Bei der Methode des „second derivative maximum“ wird der Punkt bestimmt, an dem das Hintergrundrauschen (10^{10} Kopien) überschritten wird. Dieser Punkt wird als „Crossing point“ (CP) bezeichnet. Er stellt die Zykluszahl dar, bei der die log-Phase beginnt. Setzt man die Menge der Zielsequenz gleich K und die Zyklusanzahl gleich CP, so ergibt sich aus Gleichung 2.1:

$$K = T_0 (E)^{CP} \tag{2.2}$$

Gleichung 2.2 kann wie folgt umgeformt werden:

$$\log K = \log T_0 + CP \cdot \log E \tag{2.3}$$

Rearrangiert man Gleichung 2.3 in die Form $y = mx + t$, wobei der CP gemessen werden soll, so erhält man Gleichung 2.4:

$$CP = -\frac{1}{\log E} \cdot \log T_0 + \frac{\log K}{\log E} \tag{2.4}$$

Dies ist die Gleichung der Standardkurve, wobei der CP über der logarithmischen Konzentration der eingesetzten DNA aufgetragen wird. Die Steigung ist das negative Reziprok des Logarithmus der Effektivität. Der Schnittpunkt wird berechnet aus dem Logarithmus der Menge an PCR-Produkt am CP, dividiert durch den Logarithmus der Effektivität.

Die Effektivität einer Reaktion bis zum CP kann nicht mit einer direkten Methode bestimmt werden. Es müssen daher verschiedene Verdünnungen einer Probe eingesetzt werden, um sicherzustellen, dass die Amplifikation einer Probe konstant bleibt. Wird eine Probe nun mit einem Quantifizierungsstandard verglichen, so weist sie nur dann dieselbe Effektivität auf, wenn die Steigungen gleich sind oder nicht mehr als um 0,1 voneinander abweichen. Die tatsächliche Konzentration und die Anzahl an Kopien sind dabei irrelevant. Als Quantifizierungsstandard wurde in dieser Arbeit das Haushaltsgen *Porphobilinogendesaminase (PBGD)* verwendet.

Für die Gene *XPD*, *XRCC1*, *XRCC3* und *PBGD* wurde aus cDNA mit den Primern aus Tabelle 2.5 eine Standard-PCR durchgeführt und das Produkt wie oben beschrieben aufgereinigt. Bei der Auswahl der Primer wurde darauf geachtet, dass die Produkte in etwa die gleiche Größe (200 bp) hatten, damit sie in relativ kurzer Zeit synthetisiert werden konnten. Ferner hatten die Primerpaare ungefähr die gleiche „Annealing"-Temperatur, damit sie parallel in einem LightCycler-Lauf amplifiziert werden konnten. Die Primerpaare wurden so ausgewählt, dass sie ein Intron überspannten. Dadurch konnte sehr einfach eine Verunreinigung der Proben mit DNA nachgewiesen werden, da das Verunreinigungsprodukt die Größe des erwarteten Produkts plus Intronlänge hätte. Das eluierte PCR-Produkt wurde von 10^{-1} bis 10^{-10} verdünnt und mit einer Negativkontrolle in den LightCycler eingesetzt.

LightCycler-Lauf

Anhand der erstellten Standardkurven konnten die Mengen an *XPD*-, *XRCC1*-, *XRCC3*- und *PBGD*-mRNA aus dem Vollblut der Probanden bestimmt werden. Als Quantifizierungsstandard diente das unregulierte *PBGD*. Das LightCycler-Karussell bot 32 Kapillaren Platz. Pro Lauf wurden 15 verschiedene cDNAs untersucht. Die Amplifikation der Reparaturgene erfolgte simultan zu der des Haushaltsgens in einem LightCycler-Lauf bei gleichen PCR-Bedingungen. Die zwei PCR-Ansätze wurden außerdem auf Kontaminationen hin untersucht. Die Expression der Reparaturgene wurde relativ zu *PBGD* bestimmt.

PCR-Protokoll und -Ansatz

Zur Durchführung der Real Time-PCR wurde der QuantiTect^{TM}SYBR Green PCR Kit von Roche verwendet. Die einzelnen Komponenten wurden wie folgt eingesetzt.

	Menge
Aqua dest.	6 μl
SYBR Green-Mix	10 μl
Primer „hin“	1 μl
Primer „rück“	1 μl
cDNA	2 μl

Zu Beginn der PCR wurden die Proben 15 Minuten bei 95 °C denaturiert. Es schlossen sich 50 Zyklen mit folgenden Schritten an:

	Temperatur	**Zeit**
Denaturierung	94 °C	15 Sekunden
„Annealing“	58 °C	20 Sekunden
Synthese	72 °C	20 Sekunden

Zur Ermittlung der Schmelzkurve wurde die Temperatur mit einer Geschwindigkeit von 0,05 °C pro Sekunde von 65 °C auf 98 °C erhöht. Die Fluoreszenz wurde auf Kanal 1 (F1) detektiert. Nach dem Abkühlen der Proben auf 40 °C erfolgte die quantitative Auswertung.

2.2.5 Statistik

Beschreibende Statistik und grundlegende Tests

In den Säulendiagrammen sind in der Regel die Mittelwerte ($\overline{x}$) und Standardabweichungen (σ) von 3 Versuchen dargestellt. Nur bei den Variabilitätsversuchen wurden der Mittelwert und die Standardabweichung aus 10 Experimenten berechnet. Die Ergebnisse der Biomonitoring-Untersuchungen wurden in Form von Box-and-Whisker Plots dargestellt. In dieser Darstellungsform wurde der Median, die 10., 25., 75. und 90. Perzentile und Ausreißer angezeigt. Die statistische Signifikanz wurde bei den *in vitro*-Experimenten mit dem parametrischen t-Test für zwei Stichproben mit ungleicher Varianz geprüft. Bei der Prüfung auf statistische Signifikanz bei den Biomonitoring-Untersuchungen wurde der nichtparametrische U-Test nach Mann-Whitney benutzt, da ich davon ausging, dass die Ergebnisse nicht normalverteilt sind. Die Nullhypothese wurde bei beiden Tests bei einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von kleiner 5 % ($p < 0{,}05$) abgelehnt. In den Abbildungen werden Signifikanzen $p < 0{,}05$ mit einem Stern (*) und $p < 0{,}01$ mit zwei Sternen (**) gekennzeichnet. Alle statistischen Tests sind als explorative Analysen zu interpretieren.

Stichprobenabschätzung bei Comet Assay-Studien

Vor der Durchführung der Comet Assay-Studien musste der Stichprobenumfang abgeschätzt werden. Diese Schätzung lieferte die Anzahl an Probanden, die mindestens pro Gruppe untersucht werden mussten, um einen statistisch signifikanten Unterschied im Tailmoment bei den Gruppen zu erhalten. Dazu benötigt man das Signifikanzniveau α, die Standardabweichung σ, einen relevanten Unterschied Δ und die Power β. Das Signifikanzniveau, auch Irrtumswahrscheinlichkeit genannt, wurde auf 5 % festgelegt. Das ist die Wahrscheinlichkeit, mit der die Nullhypothese (Rauchen hat keinen Einfluss auf das Tailmoment) irrtümlich abgelehnt wird. Daten für die Standardabweichung σ lassen sich aus früheren Comet Assay-Untersuchungen ableiten. σ berücksichtigt die Streuung der Comet Assay-Daten und betrug in einer früheren Studie 0,25. Ferner muss ein relevanter Unterschied Δ festgelegt werden. Dazu benötigt man Erfahrung, was einen „echten“ Unterschied zwischen zwei Gruppen im Comet Assay darstellt. Ich habe für meine Studien ein Δ von 0,3 im Tailmoment angenommen. β ist die Wahrscheinlichkeit, mit der die H_1-Hypothese (Rauchen hat einen Einfluss auf das Tailmoment) unter den gemachten Annahmen akzeptiert wird. Diese Wahrscheinlichkeit soll sehr hoch sein, und bei meinen Untersuchungen wurde diese auf 80 % gesetzt. Die Abbildung 2.3 stellt den Zusammenhang des Stichprobenumfangs (N) und Δ dar. Aus der Abbildung 2.3

geht hervor, dass eine Gruppengröße von ca. 12 Personen erforderlich ist, um einen Unterschied von 0,3 im Tailmoment nachweisen zu können.

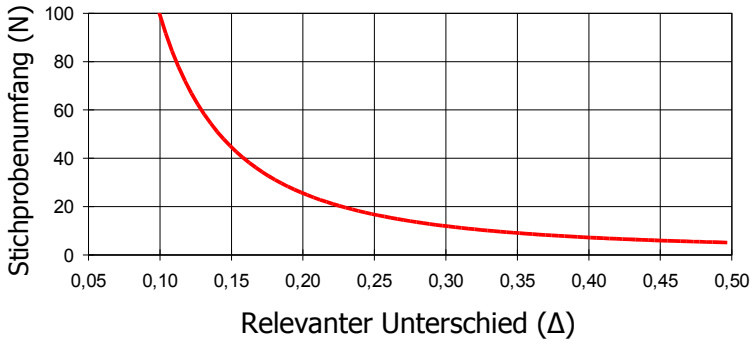


Abbildung 2.3: Stichprobenabschätzung ($\alpha = 0{,}05$, $\beta = 0{,}80$ und $\sigma = 0{,}25$) für Comet Assay-Studien.

Korrelation

Die Korrelation ist eine Beziehung zwischen zwei oder mehr quantitativen statistischen Variablen. Zur Quantifizierung der statistischen Korrelation dient unter anderem der Korrelationskoeffizient. Es gibt verschiedene Korrelationskoeffizienten (R). Im Allgemeinen wird der Korrelationskoeffizient von Pearson verwendet, welcher eine Normalverteilung der Daten voraussetzt. Ferner gibt es die Spearman Korrelation, die auch bei nicht normalverteilten Daten anwendbar ist. Der Korrelationskoeffizient R kann Werte zwischen + 1 und -1 annehmen. Bei positiver Korrelation nimmt R Werte > 0 an, bei negativer Korrelation < 0. Die Korrelation ist umso stärker, je näher R an $\pm$ 1 liegt. Bei Werten, die um 0 schwanken, ist keine statistische Korrelation vorhanden. Die Daten wurden transformiert (2.5) und in Form eines Korrelationsplots dargestellt.

$$y = \frac{2 \cdot (x - x_{min})}{(x_{max} - x_{min})} - 1 \tag{2.5}$$

x_{min} war der kleinste Wert der Messreihe, x_{max} stellte das Maximum der Daten dar und x den zu normierenden Wert. Durch diese Normierung erhielt man Werte von 1 (Maximum) bis -1 (Minimum). Diese Transformation wurde für beide zu plottenden Größen durchgeführt und das erhaltene Koordinatenpaar wurde in Form eines Punktes in die Graphik eingezeichnet. Falls die Korrelation nach Pearson zwischen den beiden Größen $\pm$ 1 ist, so liegen alle Punkte auf einer Ursprungsgeraden. Die Steigung der

Geraden ist der Korrelationskoeffizient R.

Meta-Analyse

Ziel einer Meta-Analyse ist es, unterschiedliche Ergebnisse aus verschiedenen Untersuchungen zu Wirkungen - z. B. Heilungen, Besserungen, Verschlechterungen, Linderungen - quantitativ vergleichbar zu machen. Die Tatsache, dass unterschiedliche Parameter für die Beschreibung von Comet Assay-Befunden existieren, macht eine Vergleichbarkeit von Studien der gleichen Thematik sehr schwierig. Durch die Einführung der „standardized mean difference“ (SMD) konnten die Studien zusammengefasst werden. Man dividiert die Differenz des Mittelwertes der zu untersuchenden Gruppe und des Mittelwertes der Kontrollgruppe durch die gemeinsame, „gepoolte“ Standardabweichung. Die SMD ist also ein auf die Standardabweichung normiertes Abstandsmaß zwischen zwei Gruppen.

In der PubMed-Datenbank wurden Arbeiten gesucht (beendet am 30 Juni 2005), in denen einen potenzieller Effekt des Rauchens mit dem Comet Assay untersucht wurde. Die Studien lassen sich in zwei Typen einteilen. Bei „Typ A“-Studien wurde das Rauchen direkt als Expositionsquelle untersucht. Bei „Typ B“-Studien hingegen wurden andere, meist berufsbezogenen Expositionsquellen untersucht; das Rauchen wurde hier als Störgröße betrachtet. In die Meta-Analyse flossen „Typ B“-Studien nur dann ein, wenn Informationen der Kontrollgruppe über deren Rauchverhalten vorlagen. In der Datenbank wurde nach den Ausdrücken „comet smok*“, „scg smok*“ und „scge smok*“ gesucht. Die relevanten Informationen der in die Meta-Analyse eingehenden Arbeiten wurden in das Programm RevMan 4.2 eingegeben [126]. Dieses Programm wurde von der Cochrane Collaboration entwickelt, um Cochrane Reviews und Meta-Analysen zu erstellen. Für jede Studie wurden die zentralen Informationen wie Stichprobengrößen, Mittelwerte und Standardabweichungen von Rauchern und Nichtrauchern der Comet Assay-Parameter tabelliert. Bei manchen Studien mussten Mittelwerte bzw. Standardabweichungen erst aus den Rohdaten berechnet werden. Angegebene „standard error of the means“ (SEM) wurden mittels der Stichprobenumfänge in Standardabweichungen umgerechnet. Manche Arbeiten gaben nur die Anzahl von Zellen in verschiedenen Schadensklassen an. Teilweise wurde ein Score aus den Rohdaten wie folgt berechnet:

$$Score \;=\; (n_0 \;\cdot\; 0\;) \;+\; (n_1 \;\cdot\; 1\;) \;+\; \ldots \;+\; (n_m \;\cdot\; m\;) \tag{2.6}$$

n stellt die Anzahl der Zellen in der jeweiligen Schadensklasse dar. In der Regel

wurden die Zellen in 5 Schadensklassen (0 - 4, m = 4) eingeteilt und pro Schadensklasse jeweils 50 Zellen ausgewertet. Die Werte lagen dadurch zwischen 0 und 200. Manche Arbeiten teilten die Zellen nur in 3 (m = 2) oder in 4 (m = 3) Schadensklassen ein. Die Berechnung erfolgte analog mit der Formel 2.6.

Die genaue Vorgehensweise für die Durchführung einer Meta-Analyse wird in dem „user's guide for RevMan 4.2“ [127] beschrieben. Jede Studie wurde in der Meta-Analyse durch einen SMD vertreten. Falls manche Arbeiten mehr als nur einen Comet Assay-Parameter angaben, wurde zuerst das Tailmoment, falls dies nicht verfügbar war, dann die Tailintensity, dann die Längenparameter und dann die Scores berücksichtigt. In meiner Analyse bedeuteten positive SMDs, dass ein DNA-schädigender Effekt durch das Rauchen nachgewiesen wurde. Negative SMDs hingegen deuteten darauf hin, dass der Effekt des Zigarettenrauchens nicht im Comet Assay nachweisbar ist. In die Meta-Analyse ging ferner der Studienumfang ein. Die Analyse wurde unter zwei Modellannahmen durchgeführt:

1. „fixed effects model“-Annahme
2. „random effects model“-Annahme

Beim „fixed effects model“ wird davon ausgegangen, dass die Raucher aller Studien die gleiche Exposition hatten und die aufgetretenen Unterschiede alleine durch die Stichprobenerhebung bedingt waren. In diesem Fall werden die Studien anhand der inversen Varianz der Effektgröße gewichtet. Hier floss ferner der Studienumfang bei der Gewichtung mit ein. Beim „random effects model“ wird nicht davon ausgegangen, dass alle Studien die gleiche Effektgröße besitzen, sondern dass diese normalverteilt ist. In diesem Modell zeigte sich tendenziell eine Gleichgewichtung (siehe „DerSimonian and Laird Model“ in [127]). Dies hatte zur Folge, dass die Gewichtungen der Studien im „fixed effects“ und „random effects model“ beträchtlich voneinander abwichen. Um abzuschätzen, welches Modell besser zur Darstellung des Ergebnisses der Meta-Analyse geeignet ist, wurde ein Test auf Heterogenität durchgeführt. Bei kleinen p-Werten wird das „random effects model“ empfohlen. Für beide Modelle wurde die SMD und deren 95 %iges Vertrauensintervall (CI) berechnet. Wenn dieses Intervall die Null nicht beinhaltet, dann hat das Rauchen einen statistisch signifikanten Effekt (Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %) in der Analyse. Die Abbildungen 3.34 - 3.39 zeigen das Ergebnis der Meta-Analyse des „fixed effects model“. Es wurde diese Darstellung gewählt, da anhand der Kreise um den SMD der Studienumfang abgeschätzt werden kann. Der Betrachter erhält dadurch einen Eindruck von der Uneinheitlichkeit des Studienumfangs. Um einen Publikationsbias aufzudecken, wurde eine „Funnel Plot“-Analyse

(Abbildung 3.35) durchgeführt. Diese Darstellungsform zeigt den berechneten SMD in Abhängigkeit seiner Ungenauigkeit (SE). In der Regel besitzen kleine Studien große SEs. Wenn kein Publikationsbias existiert, sollten kleine Studien mit unterdurchschnittlicher Effektgröße genauso vertreten sein, wie kleine Studien mit überdurchschnittlicher Effektgröße.

3 Ergebnisse

3.1 Comet Assay - *In vitro*-Experimente

3.1.1 Etablierung eines sensitiven Protokolls

In Vorversuchen wurde die optimale Alkalidenaturierungs- und Elektrophoresezeit von BPDE-behandeltem Vollblut untersucht. Dazu wurde Vollblut für zwei Stunden mit 1; 2,5; 5; 7,5 und 10 μM BPDE inkubiert. Für den Comet Assay wurden Parallelpräparate angefertigt. Es wurden drei verschiedene Comet Assay-Protokolle durchgeführt:

- 20 Minuten Alkalidenaturierung und 20 Minuten Elektrophorese (Protokollvariante 1),
- 35 Minuten Alkalidenaturierung und 25 Minuten Elektrophorese (Protokollvariante 2),
- 35 Minuten Alkalidenaturierung und 35 Minuten Elektrophorese (Protokollvariante 3).

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.1 dargestellt. Mit steigender BPDE-Konzentration nahmen die DNA-Effekte im Comet Assay bei allen drei Protokollvarianten zu. Eine Konzentrations-Effekt-Beziehung konnte nachgewiesen werden. Die konzentrationsabhängige Zunahme des Tailmoments fiel am geringsten bei der Protokollvariante 1 auf. Bei 2,5 μM BPDE wurde eine statistische Signifikanz auf dem 5 %-Niveau nachgewiesen. Bei Protokollvariante 2 wurde bereits bei 1 μM BPDE ein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p < 0{,}01$) nachgewiesen. Protokollvariante 3 lieferte die größten DNA-Effekte. Allerdings wurde durch die Versuchsbedingungen auch die Variabilität erhöht. Auch bei diesem Protokoll konnte bei 2,5 μM BPDE ein statistisch signifikanter Anstieg der DNA-Migration im Vergleich zu unbehandelten Zellen auf dem 5 %-Niveau ermittelt werden. Das Protokoll mit 35 Minuten Alkalidenaturierung und 25 Minuten Elektrophorese war das sensitivste Protokoll für

BPDE-induzierte DNA-Schäden, und wurde daher bei den folgenden Comet Assay-Untersuchungen verwendet. Für isolierte Lymphozyten ergaben sich die gleichen Zeiten.

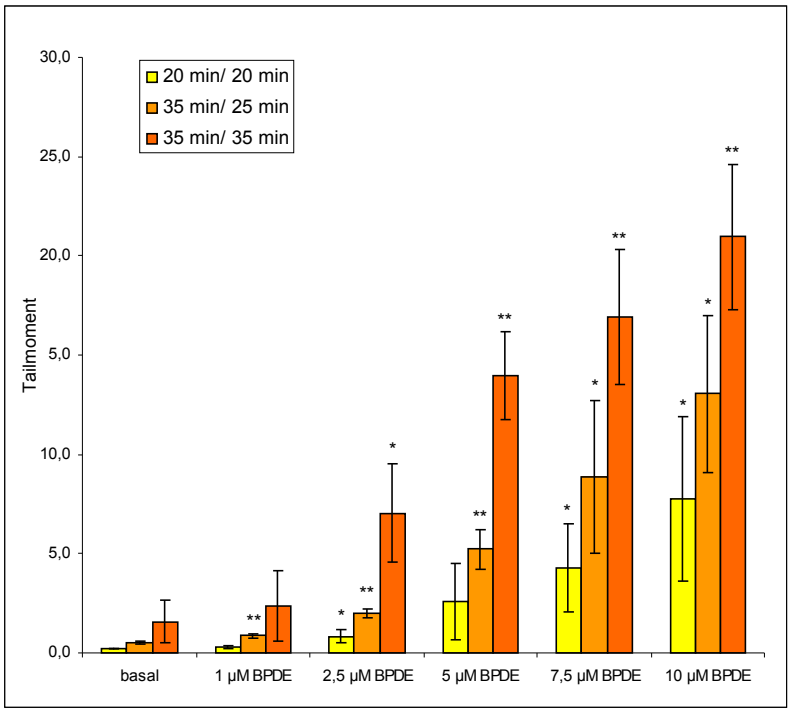


Abbildung 3.1: DNA-Migration im Comet Assay mit zunehmender BPDE-Konzentration bei drei verschiedenen Protokollen.

Im Rahmen von Vorversuchen wurden die effektivsten Konzentrationen für die Testsubstanzen bestimmt sowie die Zeitpunkte für die Erfassung der Reparatureffekte (15 und 30 Minuten bei 2 Gy-Bestrahlung bzw. 30 und 60 Minuten bei Inkubation mit BPDE).

3.1.2 Aphidicolin

In einer weiteren Serie von Vorversuchen wurden vergleichende Tests mit unstimuliertem und stimuliertem Blut durchgeführt, da in der Literatur Daten existieren, die zeigen, dass stimuliertes Blut besser zur Untersuchung von Reparaturkapazitäten geeignet sein soll [136]. Wie in Abbildung 3.2 gezeigt, erhöht APC die basalen DNA-Effekte nur geringfügig. BPDE rief sowohl bei unstimuliertem als auch bei stimuliertem Blut eine Erhöhung des Tailmoments hervor. Bei kombinierter Gabe von APC und dem Mutagen wurde eine deutliche Zunahme der DNA-Schäden nachgewiesen. Die Schadensinduktion sowie die Versuchsvariabilität waren beim stimulierten Blut höher. Da die Versuche an

stimuliertem Blut keine sensitiveren Ergebnisse im Comet Assay produzierten, wurde in dieser Arbeit mit unstimuliertem Blut gearbeitet.

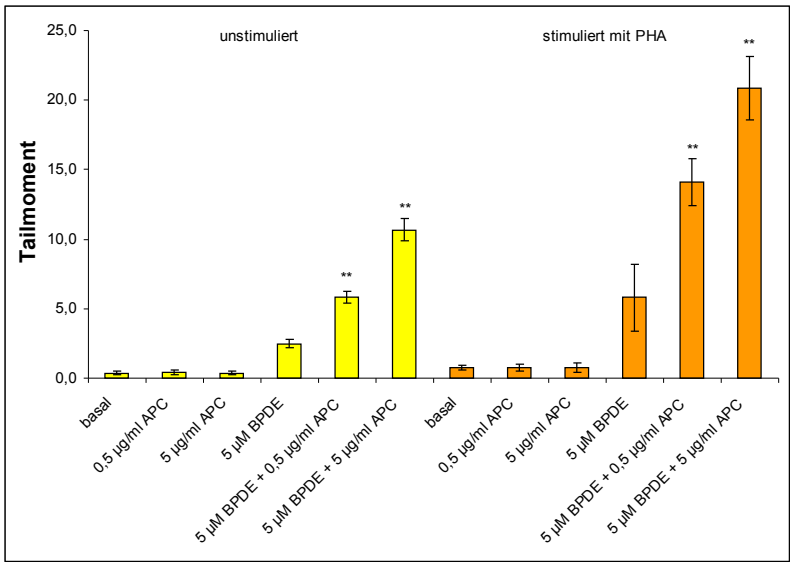


Abbildung 3.2: Tailmoment-Werte von unstimuliertem und stimuliertem Blut nach Inkubation mit BPDE und APC.

Es konnte ferner gezeigt werden, dass APC nicht nur die Reparatur von BPDE-Addukten hemmt, sondern auch einen vergleichbaren Einfluss auf MMS-induzierte DNA-Schäden (Alkylierungen) ausübt. Im Unterschied dazu wird der DNA-schädigende Effekte von ionisierender Strahlung im Comet Assay durch APC nicht verstärkt [145].

3.1.3 Formaminopyrimidin-Glykosylase (FPG-Protein)

Eine Inkubation von Comet Assay-Präparaten mit dem FPG-Protein wurde im Rahmen des IPCS [3] vorgeschlagen, um die Sensitivität und Spezifität des Comet Assay zu erhöhen. Es wurde zunächst versucht, optimale Rahmenbedingungen für den FPG-Comet Assay zu etablieren. Wie in Abbildung 3.3 zu sehen ist, wurde gezeigt, dass das FPG-Protein neben oxidativen Schäden auch die Effekte von alkylierenden Substanzen wie MMS im Comet Assay erfasst [144].

Abbildung 3.4 zeigt bei steigender MMS-Konzentration von 1, 5 und 10 μM eine geringe Zunahme der DNA-Migration an isolierten Lymphozyten im Comet Assay. Die MMS-bedingte Migration wurde durch die FPG-Behandlung verstärkt und eine Konzentrations-Effekt-Beziehung konnte abgeleitet werden.

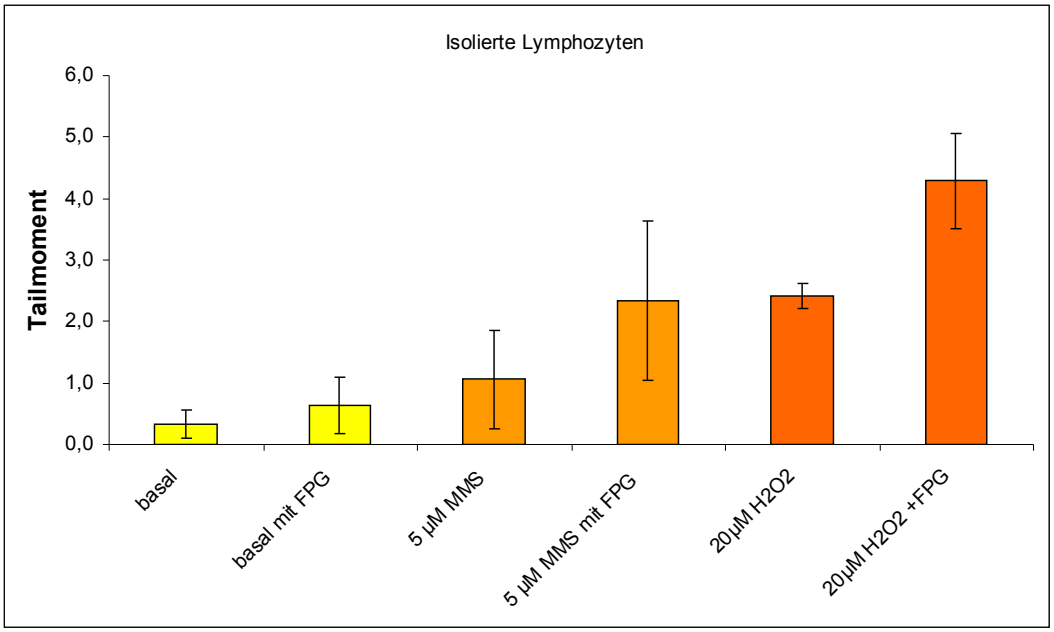


Abbildung 3.3: MMS- und H_2O_2-induzierte DNA-Effekte in isolierten Lymphozyten.

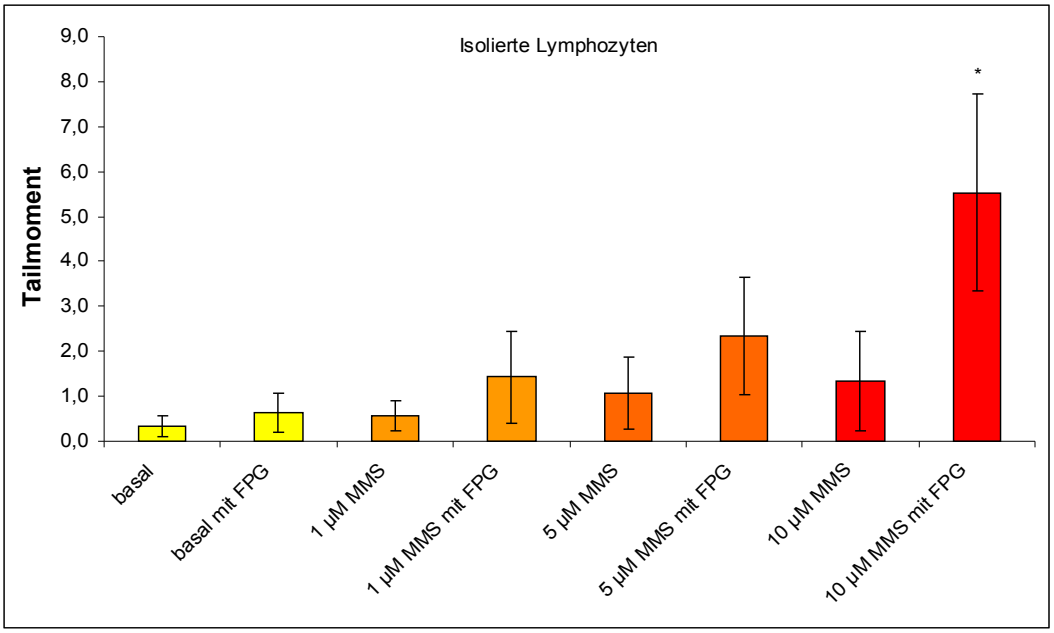


Abbildung 3.4: DNA-Effekte (Tailmoment) von MMS und FPG in isolierten Lymphozyten.

Eine zunehmende Konzentrations-Effekt-Beziehung wurde auch für die FPG-Behandlung nach MMS an Leukozyten gezeigt (Abbildung 3.5). Die Versuchsvariabilität war geringer als bei den Versuchen an isolierten Lymphozyten. Im Vollblut war sogar bei den Kontrollzellen nach FPG-Behandlung eine statistisch signifikante Zunahme der DNA-Migration nachweisbar. Daher wurde dieses Protokoll für die Versuche mit dem FPG-Protein in dieser Arbeit verwendet.

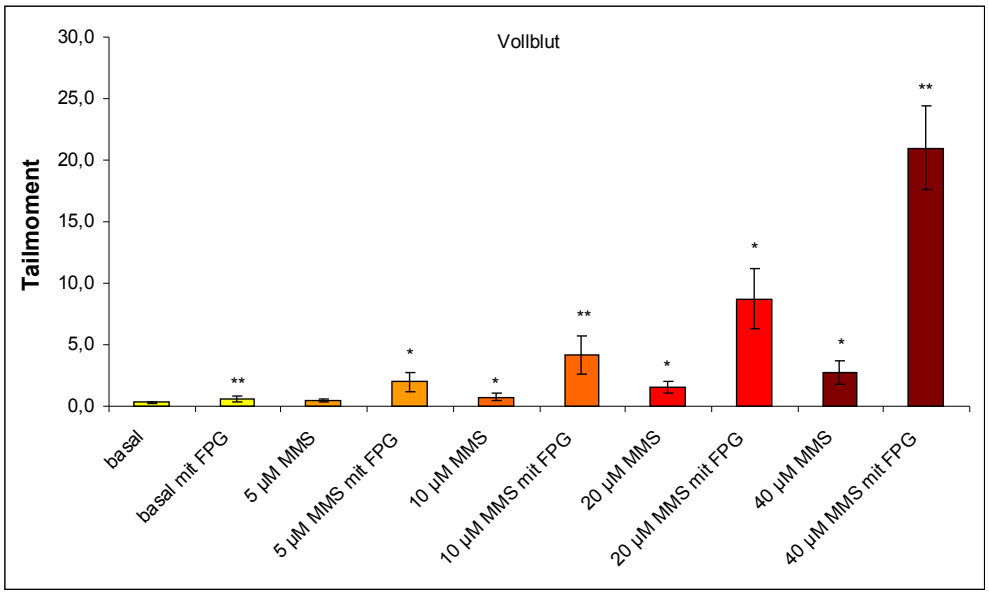


Abbildung 3.5: Tailmoment-Werte in Leukozyten nach Zugabe von MMS und FPG-Nachbehandlung.

3.1.4 Intra- und Interindividuelle Variabilität

Um die erhaltenen Unterschiede im Comet Assay bei Rauchern und Nichtrauchern interpretieren zu können, musste zunächst das Ausmaß der Versuchsvariabilität abgeschätzt werden. Dazu wurde Vollblut von drei Probanden zehnmal im Comet Assay untersucht. Die Befunde sind in Abbildung 3.6 dargestellt. Untersucht wurden die intra- und interindividuellen Schwankungen von basalen und durch ionisierende Strahlung induzierten Comet Assay-Effekten. Ferner wurde ein Reparaturzeitpunkt auf seine Variabilität untersucht. Die hohen Standardabweichungen der induzierten DNA-Effekte deuteten auf eine starke intraindividuelle Variabilität hin. Die basalen Werte der Personen schwankten geringfügiger. Ferner wurde ein interindividueller Unterschied der Tailmoment-Werte nachgewiesen. Dieser war nur geringfügig bei den basalen Comet Assay-Effekten ausgeprägt, die induzierten DNA-Effekte jedoch waren sehr variabel.

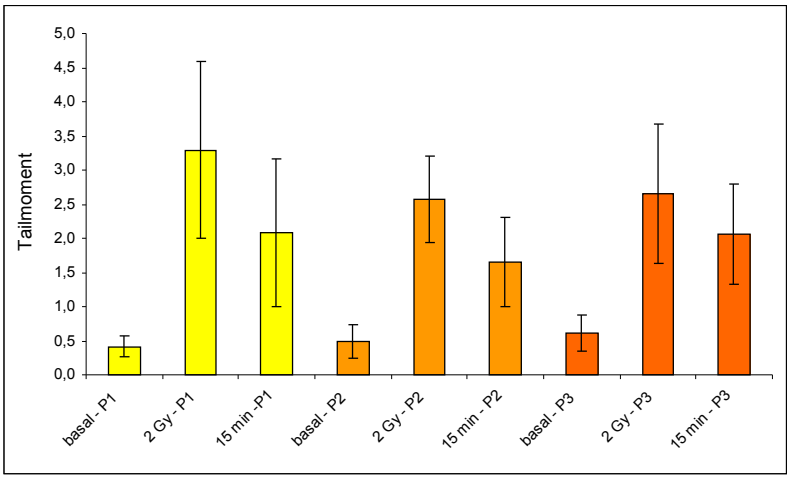


Abbildung 3.6: Intra- und interindividuelle Variabilität der Comet Assay-Effekte. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von zehn Versuchen bei drei Probanden (P1 - P3).

3.1.5 Referenzstandard

In dieser Arbeit wurde ein Referenzstandard eingesetzt, um die elektrophoresebedingte Variabilität beurteilen zu können. Bei jeder Elektrophorese wurden ein Aliquot von unbehandelten V79-Zellen mitgeführt. Für diese Arbeit wurden zwei verschiedene V79-Kulturen für die Erstellung der Referenzstandards verwendet. Jeder Punkt in Abbildung 3.7 stellt das Tailmoment eines Referenzstandards dar. Es ist sowohl der Mittelwert von ca. 0,65 als auch die zweifache Standardabweichungen vom Mittelwert als obere bzw. untere Grenze (gestrichelte Linie) eingezeichnet. Der Referenzstandard einer Elektrophorese lag außerhalb der Grenzen. Diese Elektrophorese wurde von der Studie ausgeschlossen. Es war ein deutlicher chronologischer Anstieg der Tailmoment-Werte des Referenzstandards sichtbar. Die beiden unterschiedlichen Chargen des Referenzstandards (linke bzw. rechte Hälfte der Abbildung 3.7) sind klar voneinander abgegrenzt.

3.2 Comet Assay - Untersuchungen zur Genotoxizität des Rauchens

Die Abbildungen 3.8 - 3.25 fassen die Ergebnisse der Studie an Rauchern und Nichtrauchern im Comet Assay zusammen. Das Tailmoment wurde als Parameter für die Messung der DNA-Migration ausgewählt. Teilweise wurden Parallelpräparate erzeugt

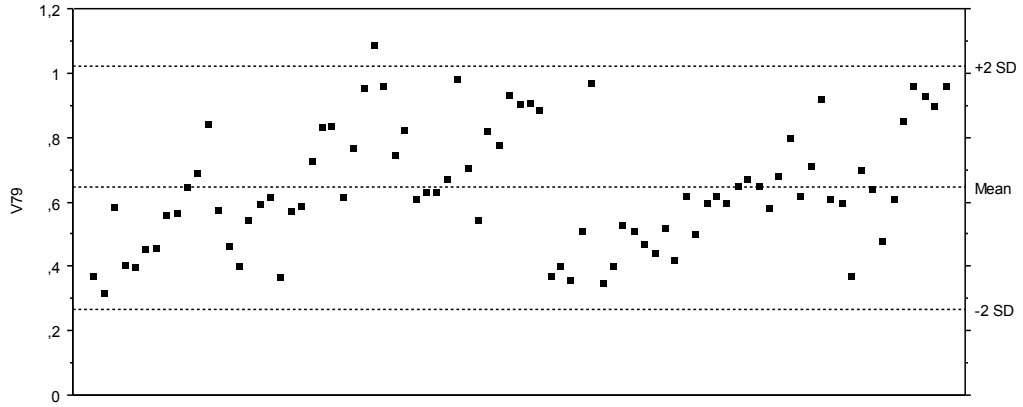


Abbildung 3.7: Tailmoment-Werte der Referenzstandards (V79-Aliquots) von 83 Elektrophoresen. Durch gestrichelte Linien sind der Mittelwert (Mean) sowie ± 2 Standardabweichungen (SD) eingezeichnet.

oder die Präparate wurden von zwei Personen ausgewertet. Diese Kontrollmaßnahmen sollten unterschiedliche Befunde bei Rauchern und Nichtrauchern absichern, so dass zufällige Unterschiede, die z. B. durch die Auswertung oder Versuchsvariabilität hervorgerufen werden, möglichst auszuschließen waren. Die Doppelauswertung und die Parallelpräparate kamen in den meisten Fällen zum gleichen Ergebnis. Für diese wird im Folgenden auf die Darstellung der Daten verzichtet. Im Falle eines Unterschieds der Doppelauswertung oder der Parallelpräparate wird im Text explizit darauf hingewiesen. Insgesamt nahmen an der Studie 142 Personen teil. Im Rahmen dieses Projekts wurden mehrere Fragestellungen nacheinander an Teilkollektiven bearbeitet, so dass nicht alle Comet Assay-Variationen mit allen Probanden durchgeführt wurden.

3.2.1 Basale Schäden

Es wurde für alle Probanden untersucht, ob sich Raucher und Nichtraucher hinsichtlich basaler DNA-Schäden im Comet Assay unterscheiden. Abbildung 3.8 stellt die basalen DNA-Effekte von Leukozyten von 71 Rauchern und 71 Nichtrauchern dar. Die Mediane beider Gruppen glichen sich (Tailmoment von ca. 0,38). Ferner ähnelte sich auch die Variabilität innerhalb der Gruppen.

Es wurde dann untersucht, ob es einen Unterschied in den basalen DNA-Schäden bei Lymphozyten von Rauchern und Nichtrauchern im Comet Assay gab. Bei einem Teilkollektiv von 31 Rauchern und 32 Nichtrauchern wurden zunächst die Lymphozyten des Vollblutes isoliert und anschließend ein Comet Assay durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.9 dargestellt. Es wurde kein Unterschied der basalen DNA-Schäden

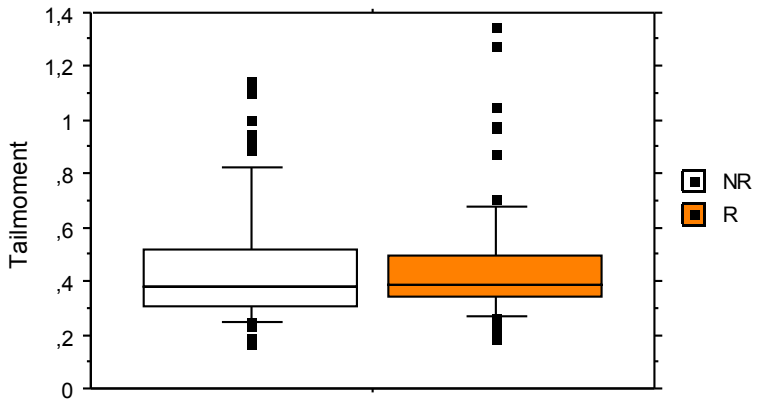


Abbildung 3.8: Basale Tailmoment-Werte der Leukozyten von 71 Rauchern und 71 Nichtrauchern. Der Median wird durch den waagerechten Strich in der Box dargestellt. Die Begrenzungen der Box sind die 25. und 75. Perzentile. Die horizontalen Striche über und unter der Box symbolisieren die 10. und 90. Perzentile. Ausreißer sind durch Quadrate gekennzeichnet.

bei isolierten Lymphozyten von Rauchern und Nichtrauchern festgestellt. Der Median lag bei beiden Gruppen ungefähr bei einem Tailmoment von 0,23. Somit fand sich nicht nur für Vollblut sondern auch bei Lymphozyten kein Unterschied der DNA-Migration im Comet Assay zwischen Rauchern und Nichtrauchern.

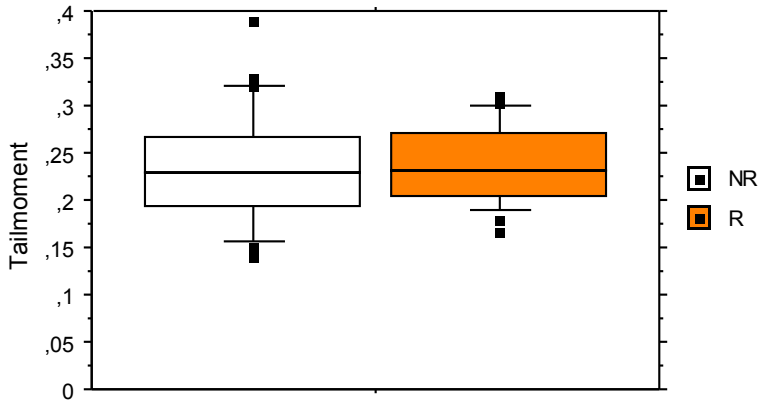


Abbildung 3.9: Basale DNA-Schäden (Tailmoment) von isolierten Lymphozyten von 31 Rauchern und 32 Nichtrauchern im Comet Assay.

3.2.2 Mutagensensitivität

Abbildung 3.10 zeigt die durch 10 μM BPDE induzierten DNA-Effekte im Comet Assay. Es wurden 19 Raucher und 20 Nichtraucher untersucht. BPDE induzierte eine deutliche Zunahme der DNA-Migration in Blutproben bei Rauchern und Nichtrauchern im Comet Assay. Der Median stieg von ca. 0,38 (Kontrollniveau) auf ca. 2. Es wurde aber keine unterschiedliche Mutagensensitivität bei Rauchern und Nichtrauchern nachgewiesen.

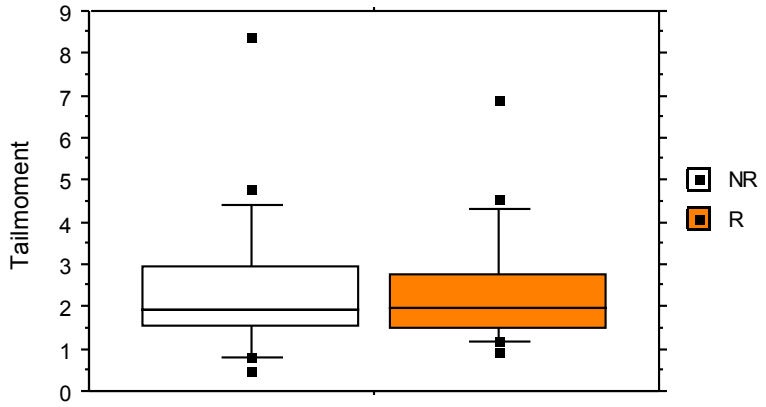


Abbildung 3.10: BPDE-induzierte Tailmoment-Werte in Leukozyten von 19 Rauchern und 20 Nichtrauchern.

Mit Blutproben von 38 Rauchern und 40 Nichtrauchern wurden strahlungsinduzierte DNA-Schäden (2 Gy γ-Strahlung) im Comet Assay untersucht. Die Befunde sind in Abbildung 3.11 dargestellt. Durch die ionisierende Strahlung wurde die DNA-Migration im Comet Assay erhöht (ca. sechsfache Erhöhung bezogen auf das Kontrollniveau). Die Leukozyten von Rauchern und Nichtrauchern unterschieden sich bezüglich der strahlungsinduzierten DNA-Effekte im Comet Assay nicht statistisch signifikant.

3.2.3 Reparaturaktivität

Es wurden sowohl Reparaturkinetiken als auch basale und induzierte Reparaturkapazitäten der Leukozyten bei Rauchern und Nichtrauchern untersucht.

Reparaturkinetik

Es wurde zunächst untersucht, ob sich die Leukozyten von Rauchern und Nichtrauchern hinsichtlich der Reparatur von DNA-Schäden signifikant unterscheiden. Zunächst

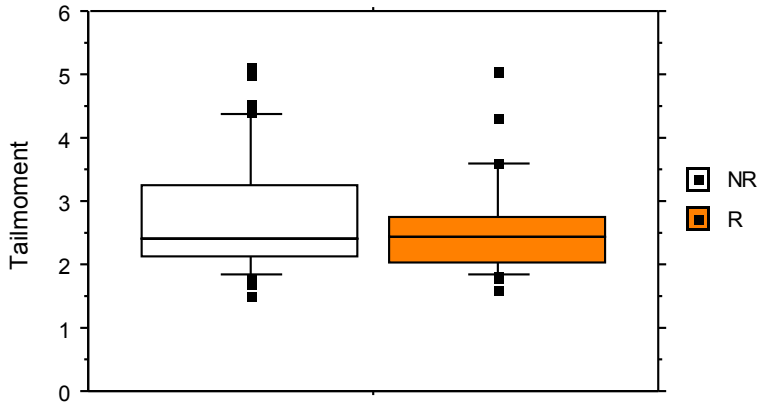


Abbildung 3.11: Strahlungsinduzierte (2 Gy) Tailmoment-Werte in Leukozyten von 38 Rauchern und 40 Nichtrauchern.

wurde zeitlich die Reparatur der BPDE-induzierten DNA-Effekte im Comet Assay untersucht (Abbildung 3.12). Es war auffällig, dass die DNA-Migration nur geringfügig abnahm. Bei der Gruppe der Raucher war die Abnahme der DNA-Migration deutlicher als bei der Gruppe der Nichtraucher ausgeprägt. Dieser Unterschied war allerdings nicht statistisch signifikant.

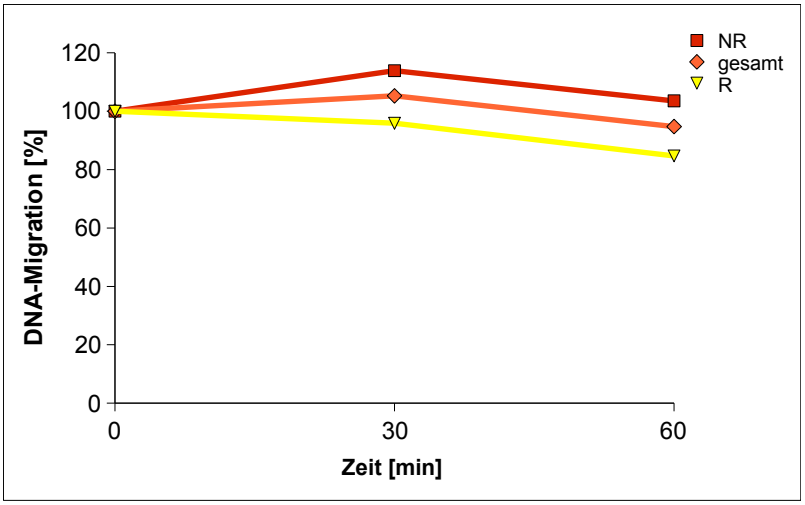


Abbildung 3.12: DNA-Migration nach 30- bzw. 60-minütiger Reparatur nach 10 μM BPDE-Behandlung der Blutproben von 19 Rauchern und 20 Nichtrauchern.

Bei der strahlungsbedingten DNA-Migration war 15 Minuten nach der Exposition eine deutliche Abnahme ersichtlich (siehe Abbildung 3.13). Der DNA-Schaden verringerte sich um 50 %. 30 Minuten nach Expositionsende belief sich der restliche DNA-Schaden

auf ca. 43 %. Die Gruppe der Nichtraucher reparierte den durch 2 Gy-Bestrahlung hervorgerufenen DNA-Schaden geringfügig besser. Dieser Unterschied war aber statistisch nicht signifikant.

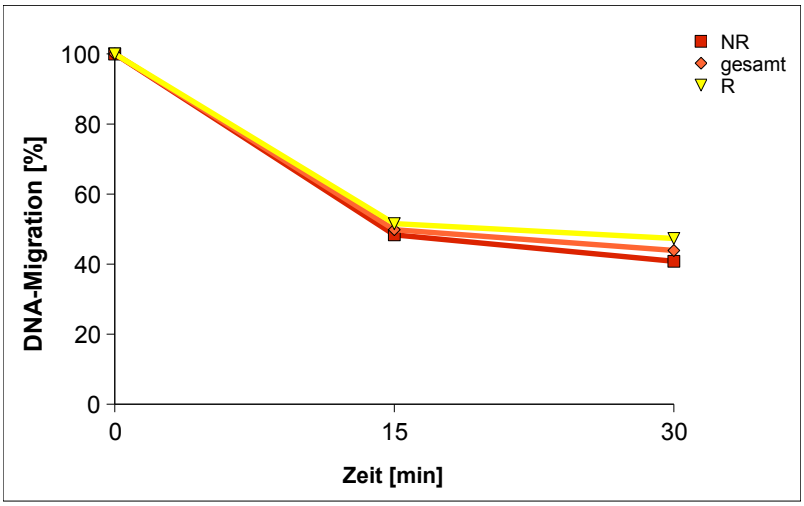


Abbildung 3.13: Reduktion der DNA-Effekte in den Leukozyten von 38 Rauchern und 40 Nichtrauchern nach 2 Gy-Bestrahlung.

Reparaturkapazität

Es war auch von Interesse, ob sich Leukozyten von Rauchern und Nichtrauchern in ihrer basalen Reparaturkapazität unterscheiden. Abbildung 3.14 zeigt den Einfluss von einer zweistündigen Inkubation von Aphidicolin auf die basalen DNA-Effekte. Die Inkubation führte zu einer verstärkten DNA-Migration. Der Median der Gruppe der Raucher (n = 12) unterschied sich nicht statistisch signifikant von dem der Nichtraucher (n = 12).

Einem Hinweis aus der Literatur folgend [30], wurde die APC-Inkubation auf 16 Stunden ausgeweitet. Diese Protokollvariation (siehe Abbildung 3.15) führte zu einem starken Anstieg der DNA-Migration im Comet Assay. Die Gruppe der Raucher hatte dabei einen größeren Median als die Gruppe der Nichtraucher. Dieser Unterschied war aber nicht statistisch signifikant.

Crebelli et al. [30] fanden nach 16-stündiger Inkubation mit AraC einen statistisch signifikanten Unterschied der Comet Assay-Ergebnisse bei kultivierten Lymphozyten von exponierten Aluminiumarbeitern und Kontrollpersonen. Auch dieser Versuchsansatz wurde mit den Rauchern und Nichtrauchern durchgeführt. Abbildung 3.16 zeigt Tailmoment-Werte von 19 Rauchern und 20 Nichtrauchern. Die 16-stündige AraC-Inkubation hatte eine Erhöhung der Tailmoment-Werte zur Folge. Es wurde kein statis-

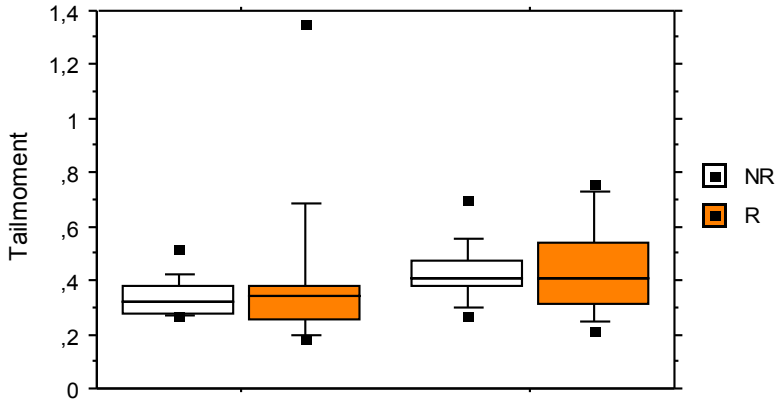


Abbildung 3.14: Basale Reparaturkapazität der Leukozyten von 12 Nichtrauchern und 12 Rauchern nach Inkubation mit APC (2 Stunden). Links sind die basalen Tailmoment-Werte von Nichtrauchern und Rauchern, rechts die APC-induzierten Werte dargestellt.

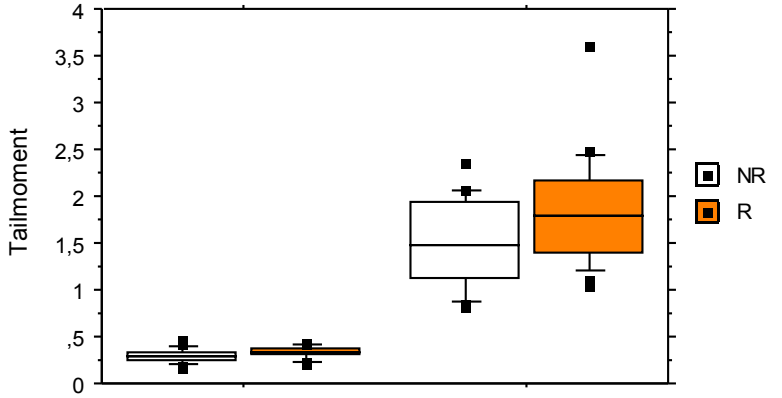


Abbildung 3.15: Basale Reparaturkapazität der Leukozyten von 20 Nichtrauchern und 19 Rauchern nach Inkubation mit APC (16 Stunden). Links sind die basalen Tailmoment-Werte von Nichtrauchern und Rauchern, rechts die APC-induzierten Werte dargestellt.

tisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ermittelt. Interessanterweise wurde in dieser Studie bei den basalen DNA-Effekten ein signifikant erhöhtes Tailmoment der Gruppe der Raucher nachgewiesen. Dieser Effekt wurde allerdings bei der Auswertung der Parallelpräparate nicht bestätigt.

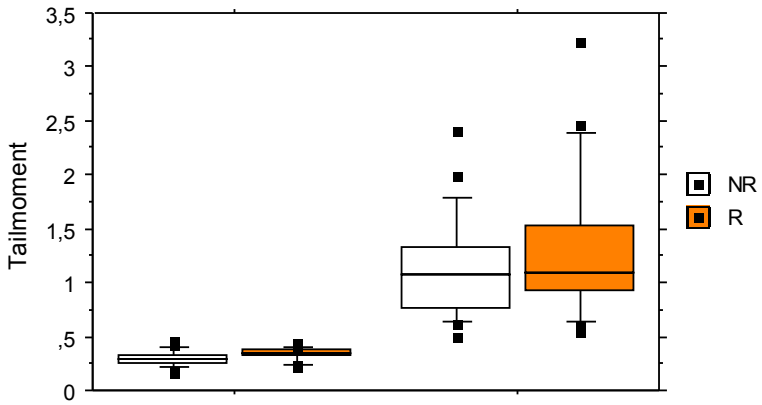


Abbildung 3.16: Basale Reparaturkapazität der Leukozyten von 20 Nichtrauchern und 19 Rauchern nach Inkubation mit AraC (16 Stunden). Links sind die basalen Tailmoment-Werte von Nichtrauchern und Rauchern, rechts die AraC-induzierten Werte dargestellt.

Es wurde auch untersucht, ob es einen Unterschied in der Reparaturkapazität nach Mutagenexposition in den Leukozyten von Rauchern und Nichtrauchern gibt. Abbildung 3.17 zeigt den Einfluss einer kombinierten Gabe von BPDE und APC auf die DNA-Migration gemessen mit dem Comet Assay. Die BPDE-APC-Kombination führte zu einer drastisch erhöhten Zunahme der Tailmoment-Werte. Allerdings war zwischen den Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied nachweisbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Inkubation der Leukozyten mit Reparaturinhibitoren zu keinem statistisch signifikanten Unterschied bezüglich der Comet Assay-Werte bei Rauchern und Nichtrauchern führte.

3.3 Genotoxische Effekte bei starken Rauchern

Da die durchgeführten Protokolle des Comet Assay bisher keinen Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern aufzeigten, wurden die folgenden Versuche an Rauchern mit einer besonders starken Exposition ($>$ 20 Zigaretten pro Tag) durchgeführt.

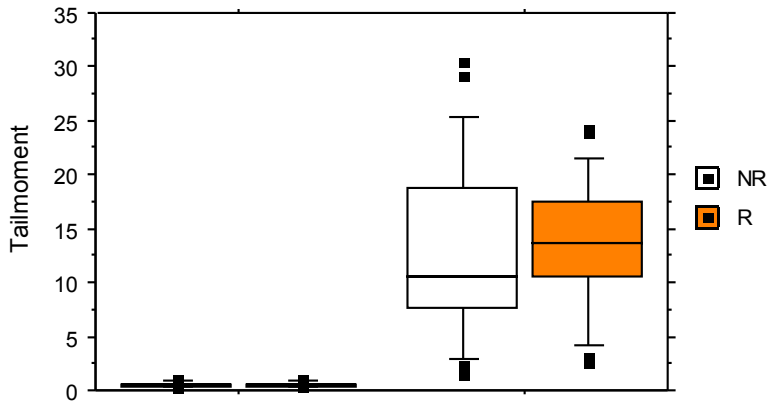
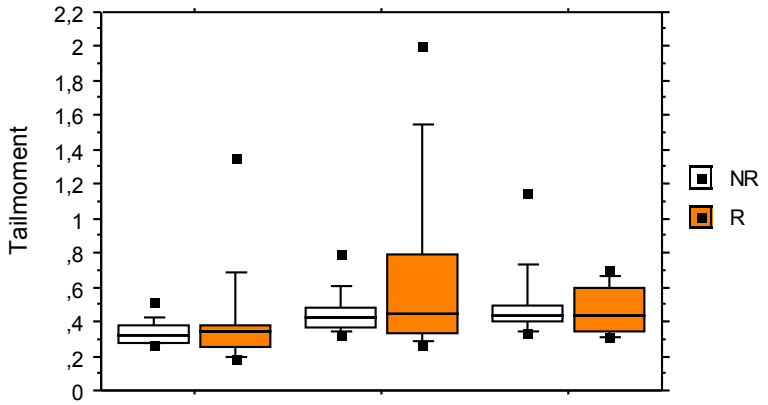


Abbildung 3.17: Induzierte Reparaturkapazität der Blutproben von 20 Nichtrauchern und 19 Rauchern nach Inkubation mit BPDE und APC für 2 Stunden. Links sind die basalen Tailmoment-Werte von Nichtrauchern und Rauchern, rechts die induzierten Werte dargestellt.

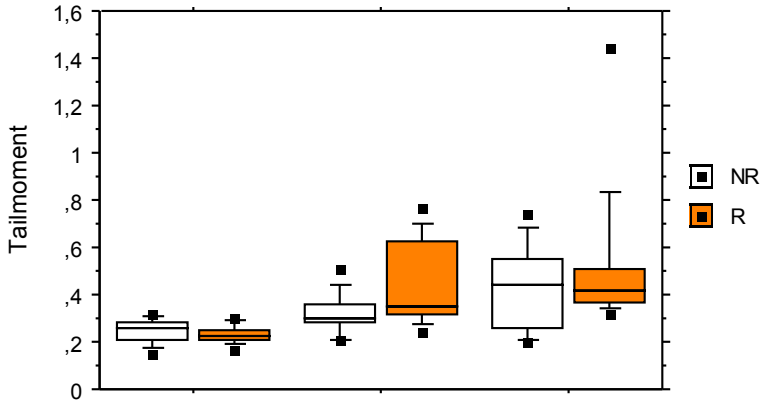
3.3.1 Basale DNA-Effekte im Comet Assay

In der Literatur wird diskutiert, dass durch den Einsatz des FPG-Proteins die Sensitivität des Comet Assay erhöht wird [3]. Ich habe deshalb auch den FPG-modifizierten Comet Assay an Leukozyten von starken Rauchern und Nichtrauchern durchgeführt. Abbildung 3.18 zeigt die basalen DNA-Effekte und FPG-sensitiven Stellen im Comet Assay. Sowohl im Vollblut als auch in den Lymphozyten unterschieden sich starke Raucher und Nichtraucher hinsichtlich ihrer basalen DNA-Schäden nicht. Der Median der Tailmoment-Werte der Leukozyten lagen bei den starken Rauchern und Nichtrauchern zwischen 0,3 und 0,4. Bei den Lymphozyten lag der Median des Tailmoments der beiden Gruppen zwischen 0,2 und 0,3. Vergleicht man die basalen DNA-Effekte von den starken Rauchern mit denen der Raucher im Gesamtkollektiv (Median bei einem Tailmoment von 0,38) so erkennt man, dass starke Raucher (mehr als 20 Zigaretten pro Tag) keine erhöhte DNA-Migration im Comet Assay im Vergleich zu „normalen“ Rauchern (mindestens 10 Zigaretten pro Tag) aufweisen. Auch wenn man starke Raucher mit dem Comet Assay untersucht, kann man keine erhöhte DNA-Migration und damit keinen genotoxischen Effekt des Zigarettenrauchs nachweisen.

Sowohl bei den Leukozyten als auch bei den Lymphozyten nahmen die Tailmoment-Werte allein durch die Behandlung mit dem FPG-Enzympuffer zu. Ein zusätzlicher, die DNA-Migration erhöhender Effekt des FPG-Proteins ist nur bei den Lymphozyten zu sehen. Der Median der Nichtraucher lag geringfügig höher als der der Raucher. Auch dieser Unterschied war nicht statistisch signifikant.



(a)



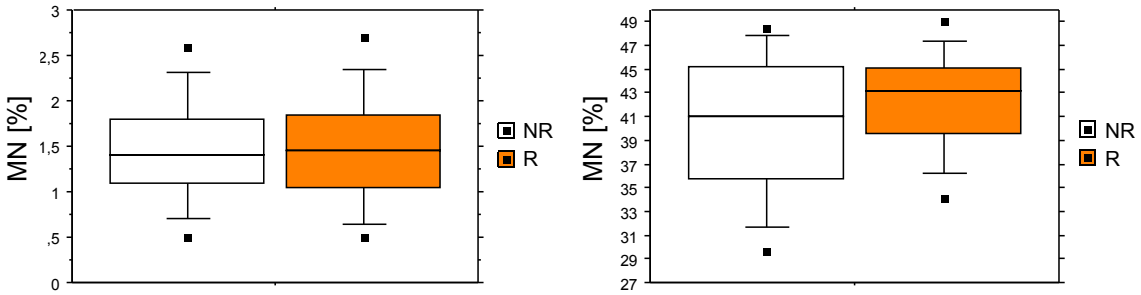
(b)

Abbildung 3.18: Basale DNA-Effekte (links), Einfluss der FPG-Behandlung (mitte) und FPG-sensitive Basenschäden (rechts) der Leukozyten (a) und isolierten Lymphozyten (b) von 12 Rauchern und 12 Nichtrauchern.

Auch bei starken Rauchern wurde weder ein Unterschied in den basalen noch in den oxidativen DNA-Schäden im Comet Assay im Vergleich zu den Nichtrauchern festgestellt.

3.3.2 Mikronukleus-Test

Da der Comet Assay nicht in der Lage war, DNA-Schäden, die durch das Rauchen hervorgerufen wurden, zu detektieren, wurde ein anderer Genotoxizitätstest, der Mikronukleus-Test an 12 starken Rauchern und 12 Nichtrauchern durchgeführt. In der Literatur gibt es Hinweise, dass starker Zigarettenkonsum die Mikronukleusfrequenz erhöht [18]. Abbildung 3.19 fasst die Ergebnisse des Mikronukleus-Tests zusammen. Es wurden sowohl die basalen als auch die durch 2 Gy-induzierten Mikronukleusfrequenzen untersucht. Die basalen Mikronukleusfrequenzen unterscheiden sich bei Rauchern und Nichtrauchern nicht (ca. 1.3 %). Die Bestrahlung ließ die durchschnittliche Mikronukleuszahl auf 40 % bei den Nichtrauchern und 44 % bei den Rauchern ansteigen. Der Median der Mikronuklei der Lymphozyten der Raucher lag nach 2 Gy-Bestrahlung höher als der der Nichtraucher. Dieser Unterschied war allerdings nicht statistisch signifikant.



(a) (b)

Abbildung 3.19: Basale (a) und durch ionisierende Strahlung induzierte (b) Mikronukleusfrequenzen in Blutproben von 12 Rauchern und 12 Nichtrauchern.

3.4 Assoziation von Comet Assay-Befunden und genetischen Polymorphismen

Um genetische Polymorphismen der *Glutathion-S-Transferase M1 (GSTM1)*, des *Cytochrom P450 1A1 (Cyp1A1)* und *2E1 (Cyp2E1)*, des *Xeroderma-Pigmentosum-D (XPD)*-Gens, des *„X-ray repair cross-complementing protein 1“ (XRCC1)*-Gens und des *„X-ray repair cross-complementing protein 3“ (XRCC3)*-Gens bestimmen zu können, musste zunächst eine Polymerasekettenreaktion durchgeführt werden, um die DNA-Abschnitte, die den Polymorphismus enthalten, zu vervielfältigen.

3.4.1 *Glutathion-S-Transferase M1*

Zunächst wurde der *GSTM1*-Genotyp der Probanden und dessen Einfluss auf das Ergebnis des Comet Assay untersucht. Der *GSTM1*-Polymorphismus beruht auf einer Deletion und konnte daher ohne Restriktionsverdau typisiert werden. Es wurde eine Multiplex-PCR durchgeführt und anschließend wurden die PCR-Ansätze auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen. In Abbildung 3.20 ist das Bandenmuster je eines Probanden, der negativ bzw. positiv für das GSTM1-Allel ist, dargestellt.

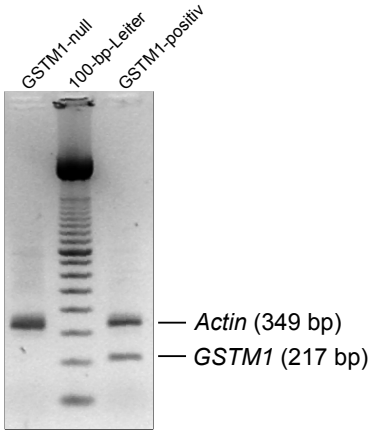
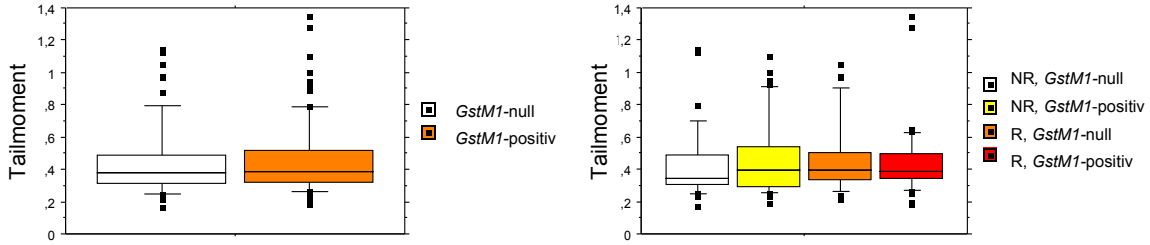


Abbildung 3.20: Gelelektrophoretisch aufgetrennte PCR-Produkte einer *GSTM1*-Genotypisierung. Es sind die beiden verschiedenen Genotypen (GSTM1-null links und GSTM1-positiv rechts neben der 100-bp-Leiter) zu sehen. Als interner Standard wurde ein *Actin*-Fragment amplifiziert.

Bei 65 Probanden waren beide Allele deletiert. 77 Personen waren heterozygot bzw. trugen homozygot das Wildtypallel. Abbildung 3.21(a) zeigt, dass die Tailmoment-Werte bei Personen mit homozygoter Deletion ähnlich verteilt sind wie die der hetero-

zygoten und homozygoten Wildtypträger. Das Kollektiv wurde zusätzlich in Raucher und Nichtraucher aufgeteilt (3.21(b)). Bei 33 der Nichtraucher und 32 der Raucher war das *GSTM1*-Allel homozygot deletiert. 39 der Nichtraucher und 38 der Raucher trugen mindestens ein Wildtypallel. Die Tailmoment-Werte waren bei allen vier Gruppen ähnlich verteilt, so dass keine Assoziation zwischen dem *GSTM1*-Genotyp bzw. Raucher-Status und den Comet Assay-Effekten nachweisbar war. Der *GSTM1*-Genotyp scheint demnach keinen Einfluss auf das Ergebnis des Comet Assay auszuüben.



(a) (b)

Abbildung 3.21: Basale Tailmoment-Werte der Leukozyten aufgeteilt nach dem *GSTM1*-Status (a) und dem Raucher-Status (b) von 142 Probanden.

3.4.2 *Cytochrom P450 1A1*

Der *Cyp1A1*-Polymorphismus wurde durch eine Restriktionsfragmentlängenanalyse bestimmt. Das Restriktionsenzym *BseMI* schneidet die Wildtyp-Sequenz in zwei Fragmente der Größe 251 bp und 160 bp (siehe Abbildung 3.22).

Falls ein Basenaustausch von A → G stattgefunden hat, bleibt die Sequenz unverdaut (411 bp). Dieser Austausch bedingt einen Aminosäurewechsel von Isoleucin nach Valin im Codon 462 des Proteins. Das variante Allel ist unter der kaukasischen Bevölkerung sehr selten. Abbildung 3.23(a) zeigt den Einfluss des Polymorphismus auf die DNA-Migration im Comet Assay. 11 Personen waren heterozygot, 131 Personen trugen beide Wildtypallele. Homozygote Träger des Wildtypallels hatten geringfügig erhöhte Tailmoment-Werte. Die Comet Assay-Befunde der 11 heterozygoten Probanden waren sehr variabel. Der Median der DNA-Migration der heterozygoten Personen war allerdings nicht signifikant von dem der homozygoten Wildtypallel-Träger verschieden. Die Abbildung 3.23(b) deutet an, dass auch das Vollblut von heterozygoten Rauchern keine erhöhte DNA-Migration im Comet Assay aufwies. Die Daten legen den Schluss nahe, dass der Ile492Val-Polymorphismus im *Cyp1A1*-Gen die DNA-Wanderung im Comet

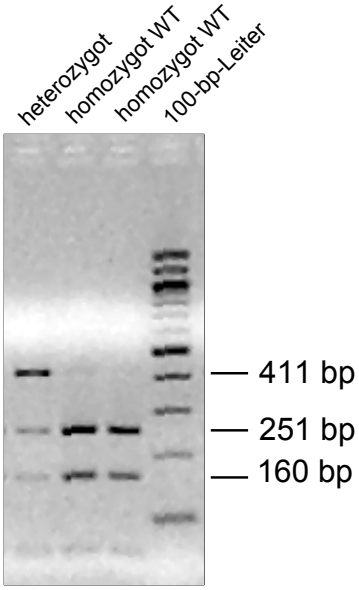
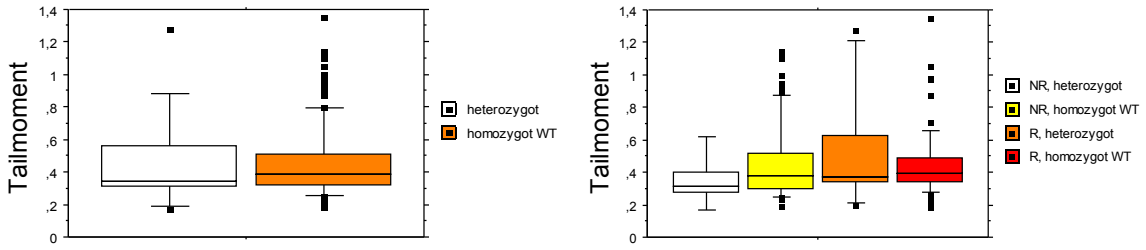


Abbildung 3.22: *Cyp1A1*-Genotypisierung. Gelelektrophoretisch aufgetrennter Verdau. In der ersten Spur ist das Bandenmuster eines heterozygoten Probanden, in der zweiten und dritten Spur das eines homozygoten Wildtypallel-Trägers dargestellt.

Assay nicht beeinflusst. Dieser Befund ist aufgrund der geringen Probandenzahlen allerdings nur eingeschränkt gültig.



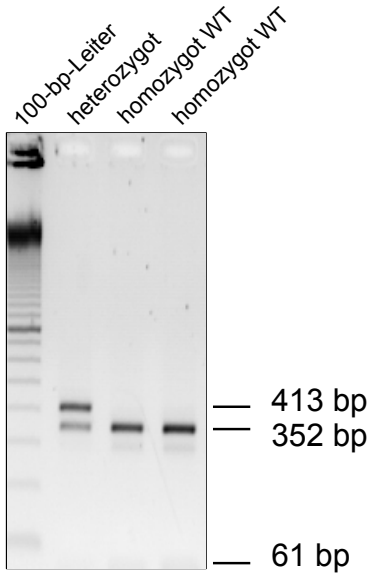
(a) (b)

Abbildung 3.23: Basale Tailmoment-Werte der Leukozyten aufgeteilt nach dem *Cyp1A1*-Status (a) und dem Raucher-Status (b) von 142 Probanden.

3.4.3 *Cytochrom P450 2E1*

Der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus des Gens *Cyp2E1* wurde durch einen Verdau mit *RsaI* typisiert. Die Wildtyp-Sequenz wurde durch das Enzym in zwei Fragmente der Größe 352 bp und 61 bp verdaut. In Abbildung 3.24 ist das Bandenmuster

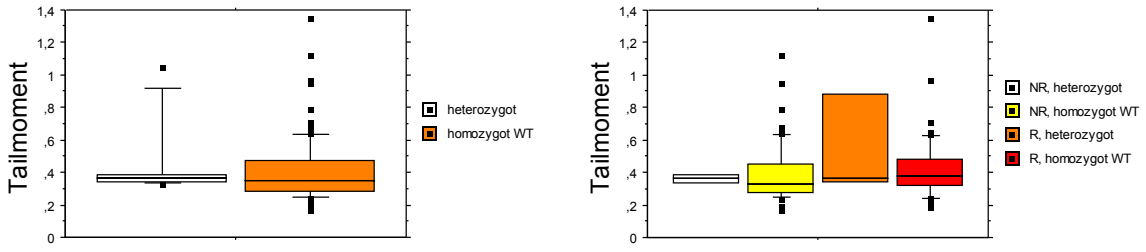
eines heterozygoten Probanden und das von homozygoten Probanden dargestellt.



(a)

Abbildung 3.24: *Cyp2E1*-Genotypisierung. Gelelektrophoretisch aufgetrennter Verdau. In der zweiten Spur ist das Bandenmuster eines heterozygoten Probanden, in der dritten und vierten Spur das eines homozygoten Wildtypallel-Trägers dargestellt.

Das variante Allel wurde nicht enzymatisch gespalten. Der Polymorphismus befindet sich in der 5'-untranslatierten Region des Gens (GI 51511726) an Position -1372. Die Unterschiede der DNA-Migration im Comet Assay von heterozygoten und homozygoten Wildtypallel-Trägern ist in Abbildung 3.25 dargestellt. Auch dieses polymorphe Allel ist in der kaukasischen Bevölkerung sehr selten. Unter den 102 untersuchten Probanden waren 7 (3 Raucher und 4 Nichtraucher) heterozygot bezüglich des varianten Allels. 95 Personen (47 Raucher und 48 Nichtraucher) trugen zwei Wildtypallele. Die geringe Allelfrequenz erlaubte nur sehr vage Aussagen über die Bedeutung des Polymorphismus für die DNA-Migration im Comet Assay. Die heterozygoten Personen unterschieden sich in der DNA-Migration nicht statistisch signifikant von den Personen, die homozygot für das Wildtypallel waren. Die Variabilität des Comet Assay war bei den heterozygoten Probanden höher als bei den Personen, die homozygot das Wildtypallel trugen. Es gab keinen Hinweis darauf, dass bei heterozygoten Rauchern der Median der Tailmoment-Werte signifikant von dem der homozygoten Raucher abwich. Dieser Befund beruht allerdings nur auf 3 Personen. Es scheint, als ob der Polymorphismus im *Cyp2E1*-Gen keinen Einfluss auf die DNA-Migration im Comet Assay ausübt.



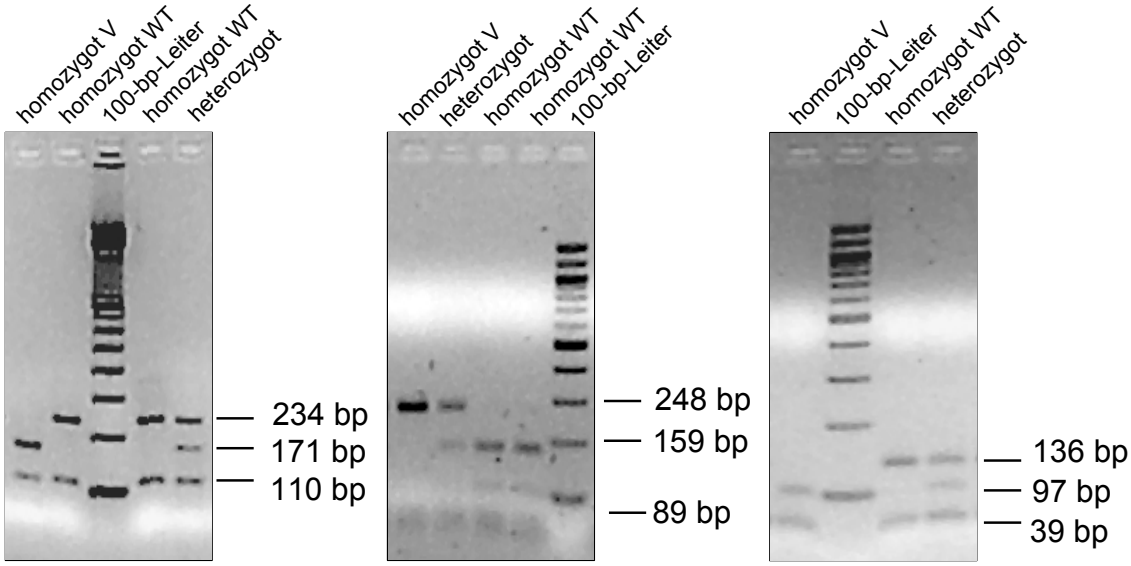
(a) (b)

Abbildung 3.25: Basale Tailmoment-Werte der Leukozyten aufgeteilt nach dem *Cyp2E1*-Status (a) und dem Raucher-Status (b) von 102 Probanden.

3.4.4 Reparaturgene *XPD*, *XRCC1* und *XRCC3*

Es wurde außerdem der Einfluss der Reparaturgene *XPD*, *XRCC1* und *XRCC3* auf basale DNA-Effekte untersucht. Der hier untersuchte Polymorphismus des *XPD* führt zu einem Aminosäureaustausch von Lysin nach Glutamin im Codon 751. Das Restriktionsenzym *PstI* schneidet die amplifizierte Sequenz einmal (234 bp, 110 bp). Bei Vorhandensein des Polymorphismus wird das 234 bp-Fragment in ein 171 bp- und ein 63 bp-Stück verdaut (Abbildung 3.26(a)). *BcnI* typisiert den Polymorphismus des *XRCC1*-Gens. Der untersuchte Polymorphismus führt zu einem Aminosäurewechsel im Codon 399 von Arginin zu Glutamat. Die Wildtypsequenz wird durch das Enzym in ein 159 bp und ein 89 bp großes Fragment gespalten. Der Polymorphismus verhindert dies (Abbildung 3.26(b)). Ferner wurde der Polymorphismus (Thr241Met) im *XRCC3*-Gen untersucht. *NcoI* schneidet das variante Allel in zwei Fragmente der Größe 97 bp und 39 bp (Abbildung 3.26(c)). Es wurde ein Teilkollektiv von 102 Personen untersucht.

In Tabelle 3.1 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der basalen Tailmoment-Werte der Gruppen aufgelistet. Betrachtet man die basalen Tailmoment-Werte, so sieht man, dass diese bei homozygoten Trägern des varianten *XPD*-Allels (0,524) geringfügig erhöht sind im Vergleich zu denen der homozygoten Wildtypallel-Trägern (0,396) und heterozygoten Probanden (0,370). Sowohl die stärkere DNA-Migration der Raucher (0,565) als auch der Nichtraucher (0,473) führte zu dieser Erhöhung. Dieser Unterschied war allerdings statistisch nicht signifikant. Die anderen beiden Polymorphismen scheinen keinen Einfluss auf die DNA-Migration zu haben. Beim *XRCC1*-Gen verringerte sich sogar die DNA-Migration (von 0,390 auf 0,369) bei homozygoten Trägern des Polymorphismus. Auch der Raucher-Status schien keinen Einfluss auf die Comet Assay-Befunde zu haben. Beim *XRCC3*-Gen wiesen die heterozygoten Träger des varianten Allels die größte DNA-Migration mit einem Tailmoment



(a) (b) (c)

Abbildung 3.26: *XPD*- (a), *XRCC1*- (b) und *XRCC3*-Genotypisierung (c). Gelelektrophoretisch aufgetrennter Verdau. Es sind verschiedene Genotypen der drei Gene dargestellt.

Tabelle 3.1: Basale Tailmoment-Werte der Leukozyten von 102 Probanden aufgeteilt nach dem *XPD*-, *XRCC1*-, *XRCC3*- und dem Raucher-Status.

		XPD (Lys751Gln)		*XRCC1* (Arg399Gln)		*XRCC3* (Thr241Met)	
		Anzahl	$Mittelwert_{Tailmoment}$ ± SD	Anzahl	$Mittelwert_{Tailmoment}$ ± SD	Anzahl	$Mittelwert_{Tailmoment}$ ± SD
	alle	49	0,396 ± 0,168	43	0,390 ± 0,143	46	0,369 ± 0,162
Homozygot Wildtyp	NR	27	0,391 ± 0,203	19	0,365 ± 0,127	18	0,356 ± 0,223
	R	22	0,403 ± 0,117	24	0,411 ± 0,154	28	0,378 ± 0,109
	alle	35	0,370 ± 0,158	44	0,443 ± 0,253	41	0,450 ± 0,236
Heterozygot	NR	17	0,346 ± 0,095	25	0,409 ± 0,214	23	0,397 ± 0,131
	R	18	0,393 ± 0,201	19	0,488 ± 0,297	18	0,517 ± 0,317
	alle	18	0,524 ± 0,295	15	0,369 ± 0,142	15	0,425 ± 0,178
Homozygot Variante	NR	8	0,473 ± 0,229	8	0,382 ± 0,190	11	0,424 ± 0,202
	R	10	0,565 ± 0,345	7	0,355 ± 0,065	4	0,427 ± 0,1

von 0,450 auf. Diese Erhöhung kommt durch eine stärkere DNA-Migration der Raucher (0,517) als der der Nichtraucher (0,450) zustande. Dieser DNA-schädigende Effekt tritt aber nur bei den heterozygoten Probanden auf und war auch nicht statistisch signifikant. Demnach scheinen auch die untersuchten Polymorphismen in den Reparaturgenen keinen Einfluss auf das Ergebnis des Comet Assay auszuüben.

3.5 Expressionsanalyse

Des Weiteren wurde untersucht, ob eine Korrelation zwischen der Expression dreier Reparaturgene (*XPD*, *XRCC1* und *XRCC3*) und den Ergebnissen des Comet besteht.

3.5.1 Etablierung der Expressionsanalyse

Die Expression der Reparaturgene *XPD*, *XRCC1* und *XRCC3* wurde mittels quantitativer Real Time-PCR bestimmt. Eine relative Expressionsbestimmung war in diesem Falle ausreichend. Es wurde untersucht, ob sich Expressionsunterschiede der Reparaturgene auf die DNA-Migration im Comet Assay auswirken. Die Menge an *XPD*-, *XRCC1*- und *XRCC3*-cDNA wurde relativ zur Menge der cDNA des Haushaltsgens *PBGD* bestimmt. Für dieses Gen sind bislang keine Pseudogene bekannt. Ferner wird das PBGD-Protein, genauso wie die zu untersuchenden Gene, nur in geringen Mengen exprimiert.

Erstellung von Standardkurven

Um die Expression der Reparaturgene quantifizieren zu können, mussten für alle vier Gene Standardkurven erstellt werden. In Abbildung 3.27 ist exemplarisch die Kalibriergerade des *XPD*-Fragments dargestellt.

Die Steigungen der vier Kalibrierkurven betrugen -3,571 für *PBGD*, -3,574 für *XPD*, -3,630 für *XRCC1* und -3,528 für *XRCC3*. Die Steigungen der Standardgeraden der zu untersuchenden Gene wichen nur geringfügig von der des Haushaltsgens ab ($< 0{,}1$). Die Quantifizierung erfolgte durch das Einsetzen der erhaltenen „Crossing points“ der zu bestimmenden Probe in die Geradengleichung der jeweiligen Standardkurve.

$$Konzentration = \frac{Crossing\ point}{Steigung\ der\ Standardgeraden} \tag{3.1}$$

Jedes Produkt wurde anschließend an die PCR-Reaktion mittels Schmelzkurven-

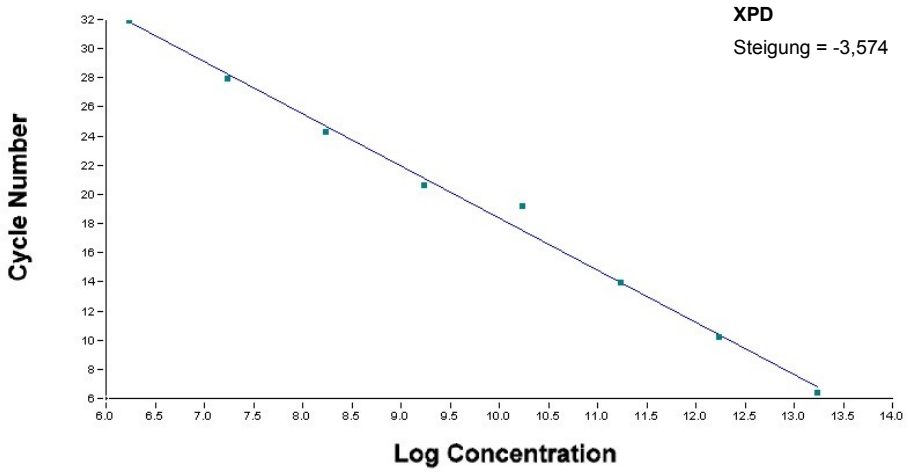


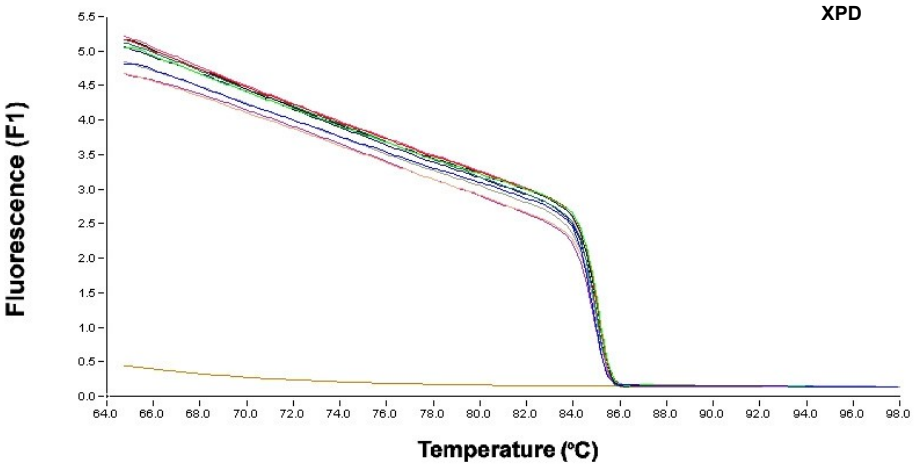
Abbildung 3.27: Standardkurve des *XPD*-Fragments. Es wurden acht verschiedene DNA-Konzentrationen eingesetzt.

analyse charakterisiert. Abbildung 3.28 zeigt die spezifische Schmelzkurve des *XPD*-Fragments. Abbildung 3.28(a) zeigt die Reduktion der Fluoreszenz nach Erreichen der spezifischen Denaturierungstemperatur von 84,92 °C des *XPD*-Fragments. Durch zweimaliges Ableiten wurde die Schmelztemperatur als „Peak“ (siehe Abbildung 3.28(b)) sichtbar. Die exakte Temperatur konnte mittels des Programms „LightCycler Software Version 3.5“ bestimmt werden. Für das *XRCC1*-Fragment ergab sich eine Schmelztemperatur von 87,23 °C und das *XRCC3*-Fragment denaturierte bei 88,60 °C. Das Produkt des Haushaltsgens *PBGD* schmolz bei 87,18 °C.

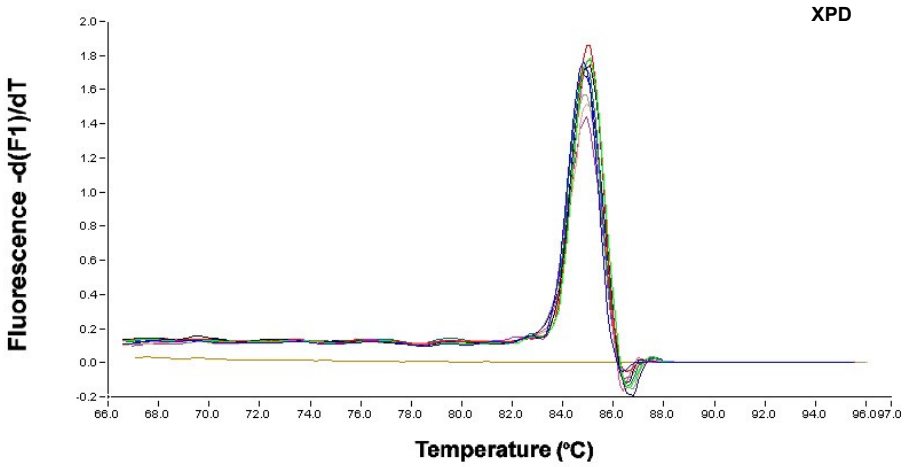
LightCycler-Lauf

Die Abbildung 3.29 zeigt exemplarisch eine Schmelzkurvenanalyse des *XRCC3*- und *PBGD*-Fragments von 15 Personen. Der erste „Peak“ stellt das Fragment des Haushaltsgens mit einer Schmelztemperatur von ca. 87 °C, der zweite das des *XRCC3*-Gens, das bei ca. 89 °C denaturiert, dar. Alle 41 cDNAs der Probanden wurden dreimal unabhängig auf ihre *XPD*-, *XRCC1*- und *XRCC3*-Expression untersucht.

Wie in Abbildung 3.30 zu sehen ist, wurde eine unterschiedlich starke Expression der Reparaturgene bei den Probanden nachgewiesen. Dargestellt ist die relative Genexpression des jeweiligen Reparaturgens bezogen auf die Haushaltsgenexpression. Die stärkste *XPD*-Expression (ca. neunfach höher als beim Referenzgen) wurde bei Proband 77 nachgewiesen. Es gab aber auch Probanden, bei denen die Expression ähnlich hoch wie die des *PBGD*-Gens (112) oder nur geringfügig erhöht (92) war. Bis auf zwei Ausnahmen (Probanden 74, 77) hatten die drei Messwerte eine nur geringe Variabi-



(a)



(b)

Abbildung 3.28: Graphische Darstellung der Schmelzkurvenanalyse des *XPD*-Fragments. Abbildung (a) zeigt die Denaturierung des Produkts bei ca. 85 °C, Abbildung (b) wurde durch zweifache Ableitung der Kurve aus (a) erhalten. Die Schmelztemperatur kann am „Peak“ der Kurve abgelesen werden.

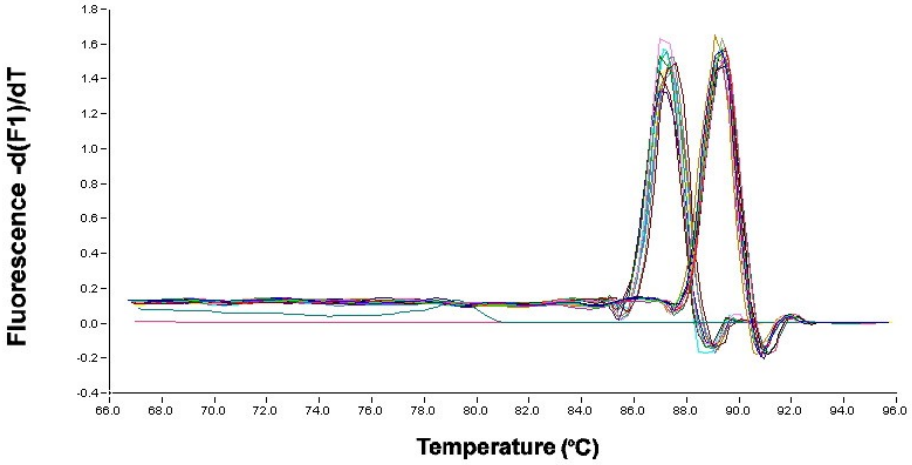
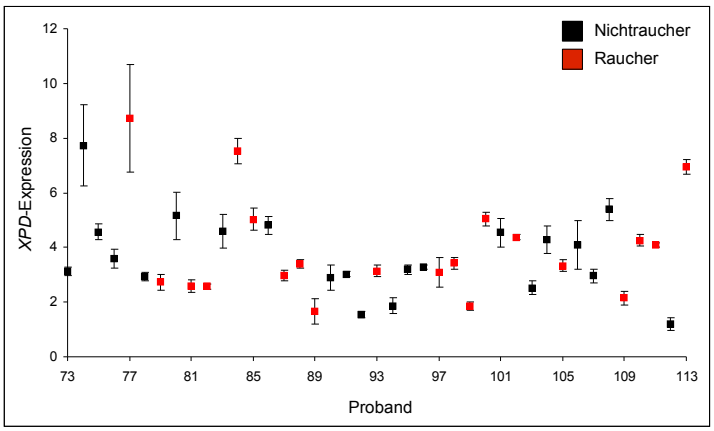


Abbildung 3.29: Schmelzkurvenanalyse der *PBGD*- (links) und *XRCC3*-Fragmente (rechts) von 15 Personen. Als Negativkontrollen dienten die beiden Primermixe ohne cDNA.

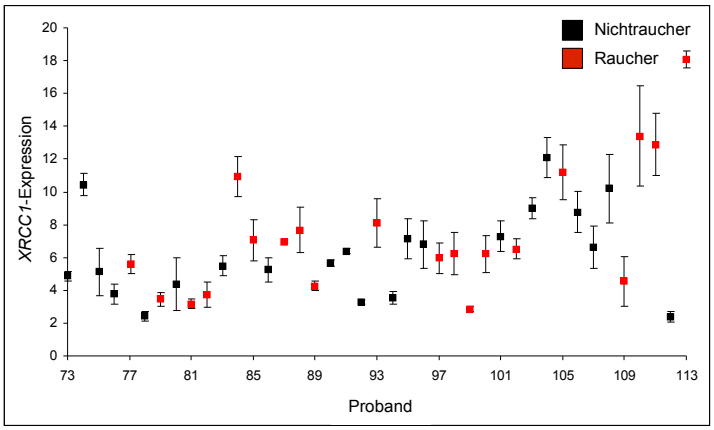
lität. Das *XRCC1*-Gen wurde bis zu achtzehnfach (Proband 113) stärker exprimiert als das Haushaltsgen. Die geringste Expression war bei Proband 112 nachweisbar. Die Variabilität der Messwerte war im Vergleich zu der *XPD*-Analyse höher. Auffallend an der *XRCC3*-Expression war, dass sie nicht induzierbar war wie die des *XPD*- und *XRCC1*-Gens. Die Werte der Probanden schwankten um 1, was keine Induktion bzw. Repression bedeutete. In der Abbildung 3.30 sind die Raucher rot und die Nichtraucher schwarz dargestellt. Wie an dem Farbmuster leicht zu erkennen ist, hatte das Rauchen keinen Einfluss auf die Reparaturgenexpression.

Es war ferner von Interesse, ob die Expressionsdaten der Probanden mit deren Comet Assay-Befunden korrelieren. Es wurden Pearson- und Spearman-Korrelationskoeffizienten berechnet. Es ergab sich nur eine leichte negative Korrelation (R = -0,351 bei Pearson und R = -0,319 bei Spearman) zwischen der *XPD*-Expression und den basalen Comet Assay-Effekten. Dies bedeutet, dass eine erhöhte *XPD*-Expression mit einer verminderten DNA-Migration im Comet Assay korrelierte.

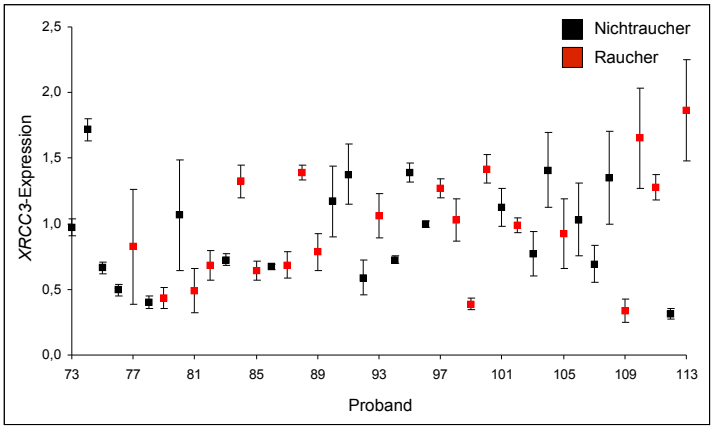
Im Folgenden wurde untersucht, ob die Schwankungen der Reparaturgenexpression charakteristisch für das Individuum und reproduzierbar waren. Es sollten jeweils drei Probanden mit hoher und niedriger Expression dreimal untersucht werden. Die Probanden 77, 108 und 113 wurden für die Untersuchungen zur hohen *XPD*-Expression, die Probanden 78, 89 und 92 für die Untersuchungen zur niedrigen Expression herangezogen. Für die Untersuchung der *XRCC1*-Expression wurden die Probanden 104, 111, 113 (hohe Expression) und 78, 89, 92 (niedrige Expression) einbestellt. Da für das



(a)



(b)



(c)

Abbildung 3.30: Unterschiedliche *XPD*- (a) , *XRCC1*- (b) und *XRCC3*-Expression (c) von 21 Nichtrauchern und 20 Rauchern. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen und die Standardabweichung.

XRCC3-Gen keine drastischen Expressionsschwankungen nachzuweisen waren, wurden keine Probanden nach untersucht. Allerdings wurde die *XRCC3*-Expression bei den acht einbestellten Probanden mit untersucht.

3.5.2 *XPD*-Expression

Bei den acht Probanden wurde dreimal unabhängig voneinander die Expression des *XPD*-Gens gemessen. Leider war jeweils eine mRNA von Proband 77, 111 und 113 degradiert, so dass nur zwei unabhängige Analysen durchgeführt werden konnten. Die erhaltenen Expressionsdaten sind in Tabelle 3.2 dargestellt. Die zu drei verschiedenen Zeitpunkten bestimmten *XPD*-RNA-Mengen eines Individuums lagen dicht beieinander. Die aus der vorherigen Expressionsanalyse erhaltenen individuellen Tendenzen konnten teilweise nicht bestätigt werden. Bei den Probanden, die aufgrund ihrer hohen *XPD*-Expression ausgewählt wurden (77, 108 und 113), war nur eine wesentlich geringere Expression messbar. Probanden, die aufgrund ihrer niedrigen Expression ausgewählt wurden (78, 89 und 92), blieben auf niedrigem Niveau. Auch die Probanden mit mittlerer Expression (104 und 111) bestätigten ihre Expressionstendenz.

Es wurde ferner auch ein Comet Assay mit dem Blut der acht Probanden durchgeführt. Es wurden sowohl die basalen, als auch die BPDE-induzierten DNA-Effekte und deren Reparatur untersucht. Das *XPD*-Gen ist eine Komponente (ATP-abhängige DNA-Helikase) des TFIIH-Komplexes, der während der Nukleotidexzissionsreparatur (NER) die Trennung der beiden DNA-Stränge an einem Reparatureinschnitt vermittelt. BPDE-DNA-Addukte werden über die NER repariert, so dass es interessant war, ob es eine Korrelation zwischen der Expression des *XPD*-Gens und der Schadensinduktion durch BPDE bzw. deren Reparatur gibt. Abbildung 3.31 zeigt einen Korrelationsplot der *XPD*-Expression und der basalen sowie der induzierten DNA-Effekte und der Reparatur zu zwei Zeitpunkten im Comet Assay. Eingezeichnet wurde jeder der drei Messwerte pro Person. Zwischen den basalen DNA-Effekten im Comet Assay und der *XPD*-Expression bestand keine Korrelation ($R_{Pearson}$ = 0,178, $R_{Spearman}$ = 0,123). Auch korrelierte die DNA-Migration im Comet Assay nach BPDE-Inkubation nicht mit der *XPD*-Expression ($R_{Pearson}$ = 0,158, $R_{Spearman}$ = 0,342). Wie an den Korrelationskoeffizienten der Reparaturversuche ($R_{Pearson}$ = -0,082, $R_{Spearman}$ = 0,120 nach 30-minütiger und $R_{Pearson}$ = -0,176, $R_{Spearman}$ = -0,131 nach 60-minütiger Reparatur) zu sehen ist, war keine Korrelation nachweisbar.

Tabelle 3.2: Wiederholte *XPD*-Expressionsanalyse von acht verschiedenen Probanden. Es sind sowohl die Einzel- als auch die Mittelwerte ($\overline{x}$) der *XPD*-Genexpression in den Leukozyten der jeweiligen Probanden dargestellt. Ferner sind auch die Expressionsdaten (1. Analyse) aufgeführt, die zur Auswahl der Person führten.

Proband	**Wert der 1. Analyse**	***XPD*-Expression**	**SD**
77 - 1		n. d.	
77 - 2		2,370	0,085
77 - 3		2,179	0,304
77 - $\overline{x}$	**8,717**	**2,274**	
113 - 1		0,700	0,053
113 - 2		0,841	0,203
113 - 3		n. d.	
113 - $\overline{x}$	**6,946**	**0,771**	
108 - 1		0,664	0,140
108 - 2		0,664	0,050
108 - 3		0,388	0,043
108 - $\overline{x}$	**5,585**	**0,572**	
104 - 1		1,973	0,183
104 - 2		1,992	0,075
104 - 3		3,308	0,311
104 - $\overline{x}$	**4,271**	**2,425**	
111 - 1		n. d.	
111 - 2		2,504	0,244
111 - 3		3,829	0,185
111 - $\overline{x}$	**4,091**	**3,166**	
78 - 1		2,242	0,072
78 - 2		2,402	0,293
78 - 3		1,919	0,124
78 - $\overline{x}$	**2,947**	**2,187**	
89 - 1		3,236	0,042
89 - 2		3,737	0,097
89 - 3		3,894	0,462
89 - $\overline{x}$	**1,651**	**3,622**	
92 - 1		0,315	0,042
92 - 2		0,268	0,008
92 - 3		0,261	0,025
92 - $\overline{x}$	**1,531**	**0,281**	

n. d. nicht durchgeführt

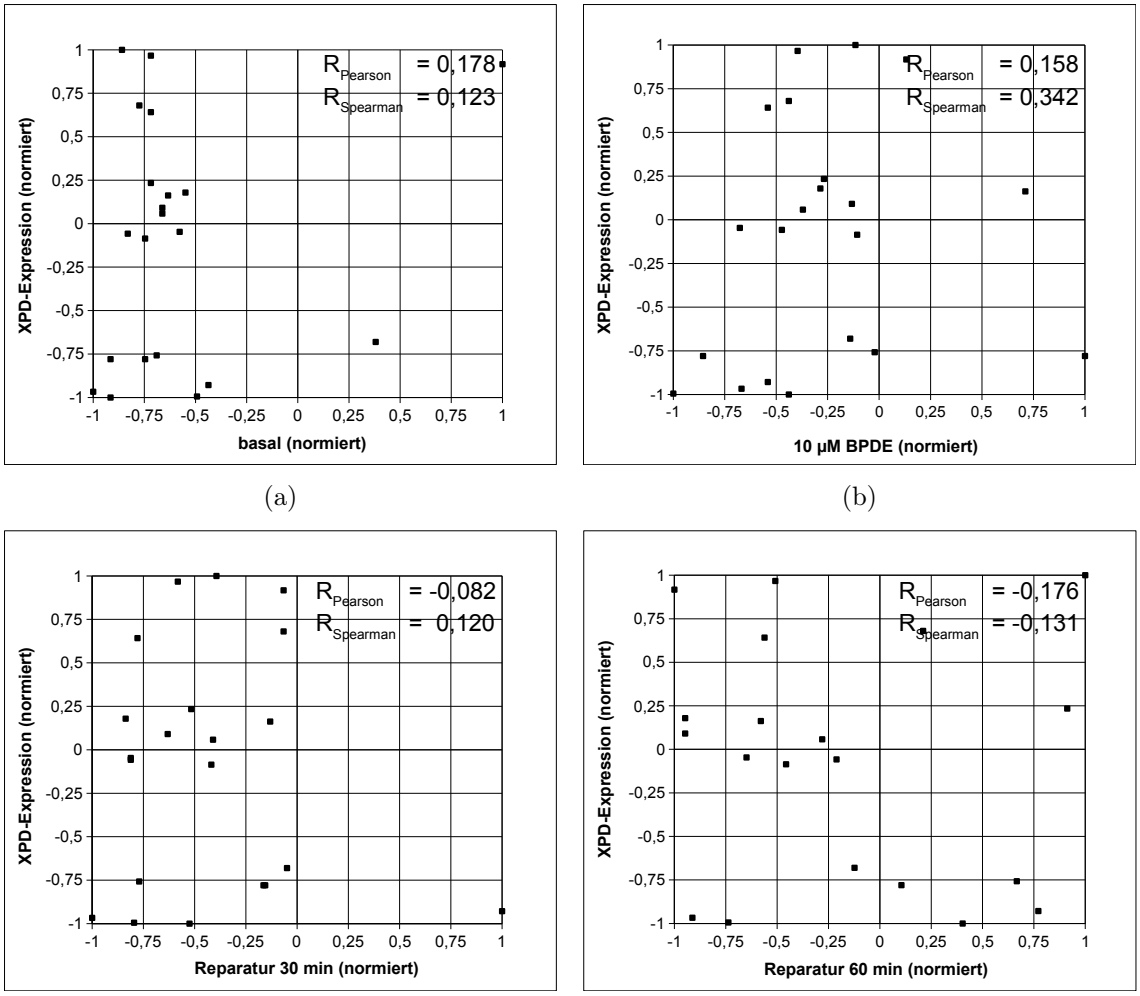


Abbildung 3.31: Korrelation der *XPD*-Expression mit den basalen (a) und BPDE-induzierten (b) Comet Assay-Effekten, sowie mit zwei Reparaturzeitpunkten von 30 (c) und 60 Minuten (d).

3.5.3 *XRCC1*-Expression

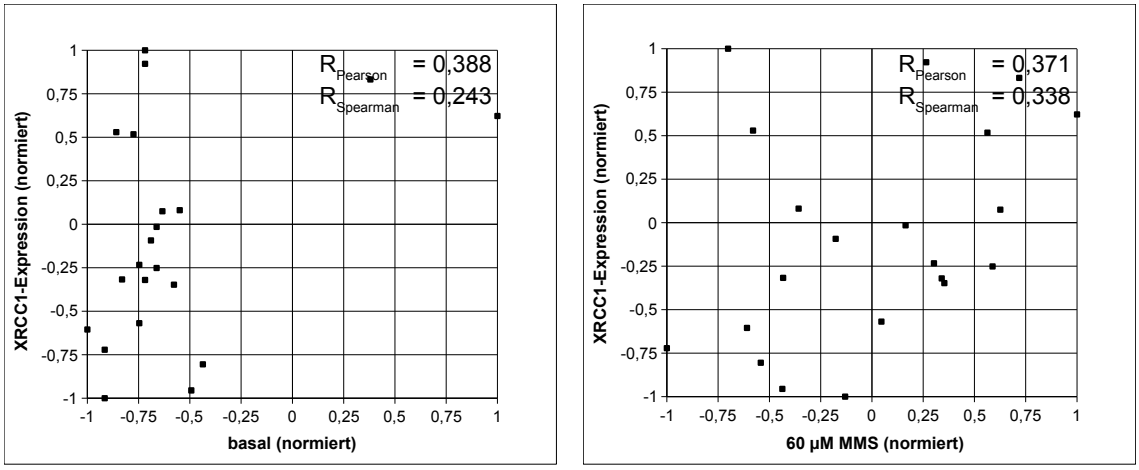
Es wurde auch die *XRCC1*-Expression zu drei verschiedenen Zeitpunkten bei den acht Probanden bestimmt. Die Ergebnisse der quantitativen PCR sind in Tabelle 3.3 dargestellt. Auch hier ist auffällig, dass die Expression bei den Probanden 104, 111 und 113, die aufgrund ihrer hohen *XRCC1*-Expression ausgewählt wurden, deutlich geringer war. Bei Proband 89, der bei der ersten Analyse eine relativ geringe Expression des *XRCC1*-Gens aufwies, wurde eine relativ starke *XRCC1*-Induktion nachgewiesen. Bei den restlichen Probanden wurde eine mittlere Expression nachgewiesen.

Das Blut der Probanden wurde auch mit 60 μM MMS versetzt und im Comet Assay auf DNA-Strangbrüche hin untersucht. XRCC1 ist an der Basenexzissionsreparatur (BER) beteiligt. Es dient als Gerüst für andere Reparaturproteine. MMS ist ein Alkylanz und induziert vor allem DNA-Methylierungen. Diese werden über die BER repariert. Es war daher sehr interessant, ob die *XRCC1*-Expression einen Einfluss auf die MMS-induzierte DNA-Migration im Comet Assay hat. Abbildung 3.32(a) zeigt die Korrelation zwischen den basalen Comet Assay-Befunden und der *XRCC1*-Expression, Abbildung 3.32(b) korreliert die MMS-induzierten Werte des Comet Assay mit der Expression von *XRCC1*. Bei beiden Analysen konnte eine schwach positive Korrelation ($R_{Pearson} = 0{,}388$, $R_{Spearman} = 0{,}243$) bei den basalen Tailmoment-Werten und bei den induzierten Werten ($R_{Pearson} = 0{,}371$, $R_{Spearman} = 0{,}338$) nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass mit zunehmender *XRCC1*-Expression die DNA-Migration im Comet Assay geringfügig zunahm.

Tabelle 3.3: Wiederholte *XRCC1*-Expressionsanalyse von acht verschiedenen Probanden. Es sind sowohl die Einzel- als auch die Mittelwerte ($\overline{x}$) der *XRCC1*-Genexpression in den Leukozyten der jeweiligen Probanden dargestellt. Ferner sind auch die Expressionsdaten (1. Analyse) aufgeführt, die zur Auswahl der Person führten.

Proband	**Wert der 1. Analyse**	***XRCC1*-Expression**	**SD**
113 - 1		4,658	0,069
113 - 2		7,751	0,643
113 - 3		n. d.	
113 - $\overline{x}$	**18,069**	**6,204**	
111 - 1		n. d.	
111 - 2		3,903	0,888
111 - 3		8,047	1,616
111 - $\overline{x}$	**12,875**	**5,975**	
104 - 1		3,908	0,754
104 - 2		3,805	0,475
104 - 3		6,696	0,621
104 - $\overline{x}$	**12,108**	**4,803**	
108 - 1		2,563	0,103
108 - 2		4,186	0,126
108 - 3		2,276	0,036
108 - $\overline{x}$	**10,213**	**3,008**	
77 - 1		n. d.	
77 - 2		5,222	0,186
77 - 3		4,129	1,032
77 - $\overline{x}$	**5,612**	**4,676**	
89 - 1		8,310	2,134
89 - 2		7,055	0,194
89 - 3		6,743	2,448
89 - $\overline{x}$	**4,267**	**7,370**	
92 - 1		2,953	0,068
92 - 2		1,780	0,522
92 - 3		1,633	0,178
92 - $\overline{x}$	**3,267**	**2,122**	
78 - 1		4,922	1,583
78 - 2		5,244	1,034
78 - 3		3,070	0,444
78 - $\overline{x}$	**2,436**	**4,412**	

n. d. nicht durchgeführt



(a) (b)

Abbildung 3.32: Korrelation der *XRCC1*-Expression mit den basalen (a) und MMS-induzierten (b) DNA-Effekten des Comet Assay.

3.5.4 *XRCC3*-Expression

Folgende *XRCC3*-Expression wurde für die acht Probanden zu den drei verschiedenen Zeitpunkten bestimmt (siehe Tabelle 3.4). Auch bei der wiederholten Expressionsanalyse des *XRCC3*-Gens zeigte sich fast keine Induzierbarkeit. Die Werte schwankten bei allen Messungen um 1.

XRCC3 ist an der homologen Rekombination, einem Teil der Doppelstrangbruchreparatur, beteiligt. Es stabilisiert und interagiert mit Rad51. Ionisierende Strahlung ruft Doppelstrangbrüche hervor, die mittels homologer Rekombination repariert werden. Auch hierzu wurden Versuche mit 2 Gy-Strahlung im Comet Assay durchgeführt. Die Korrelationsplots sind in Abbildung 3.33 dargestellt. Es wurden deutliche positive Korrelationen zwischen der *XRCC3*-Expression und den basalen Tailmoment-Werten bei der Pearson-Korrelationsanalyse ($R_{Pearson} = 0{,}480$) nicht aber bei der Korrelation nach Spearman nachgewiesen ($R_{Spearman} = 0{,}194$). Bei den durch ionisierende Strahlung induzierten Tailmoment-Werten wurde eine positive Korrelation bei beiden Modellen ($R_{Pearson} = 0{,}478$, $R_{Spearman} = 0{,}568$) nachgewiesen. Allerdings war 15 und 30 Minuten nach der Bestrahlung der Zellen keine Korrelation nachweisbar. Die Bedeutung der Korrelationen ist aufgrund der geringen *XRCC3*-Expression fraglich.

Tabelle 3.4: Wiederholte *XRCC3*-Expressionsanalyse von acht verschiedenen Probanden. Es sind sowohl die Einzel- als auch die Mittelwerte ($\overline{x}$) der *XRCC3*-Genexpression in den Leukozyten der jeweiligen Probanden dargestellt. Ferner sind auch die Expressionsdaten (1. Analyse) aufgeführt, die zur Auswahl der Person führten.

Proband	**Wert der 1. Analyse**	***XRCC3*-Expression**	**SD**
113 - 1		1,699	0,206
113 - 2		2,280	0,219
113 - 3		n. d.	
113 - $\overline{x}$	**1,867**	**1,990**	
104 - 1		0,865	0,048
104 - 2		0,961	0,069
104 - 3		1,547	0,058
104 - $\overline{x}$	**1,410**	**1,124**	
108 - 1		1,071	0,096
108 - 2		0,844	0,065
108 - 3		0,856	0,073
108 - $\overline{x}$	**1,353**	**0,923**	
111 - 1		n. d.	
111 - 2		0,675	0,059
111 - 3		1,493	0,073
111 - $\overline{x}$	**1,278**	**1,084**	
77 - 1		n. d.	
77 - 2		0,684	0,046
77 - 3		0,938	0,042
77 - $\overline{x}$	**0,825**	**0,811**	
89 - 1		0,542	0,012
89 - 2		1,460	0,194
89 - 3		1,431	0,064
89 - $\overline{x}$	**0,784**	**1,144**	
92 - 1		0,469	0,070
92 - 2		0,360	0,035
92 - 3		0,393	0,067
92 - $\overline{x}$	**0,589**	**0,407**	
78 - 1		1,027	0,046
78 - 2		0,741	0,068
78 - 3		0,553	0,024
78 - $\overline{x}$	**0,402**	**0,774**	

n. d. nicht durchgeführt

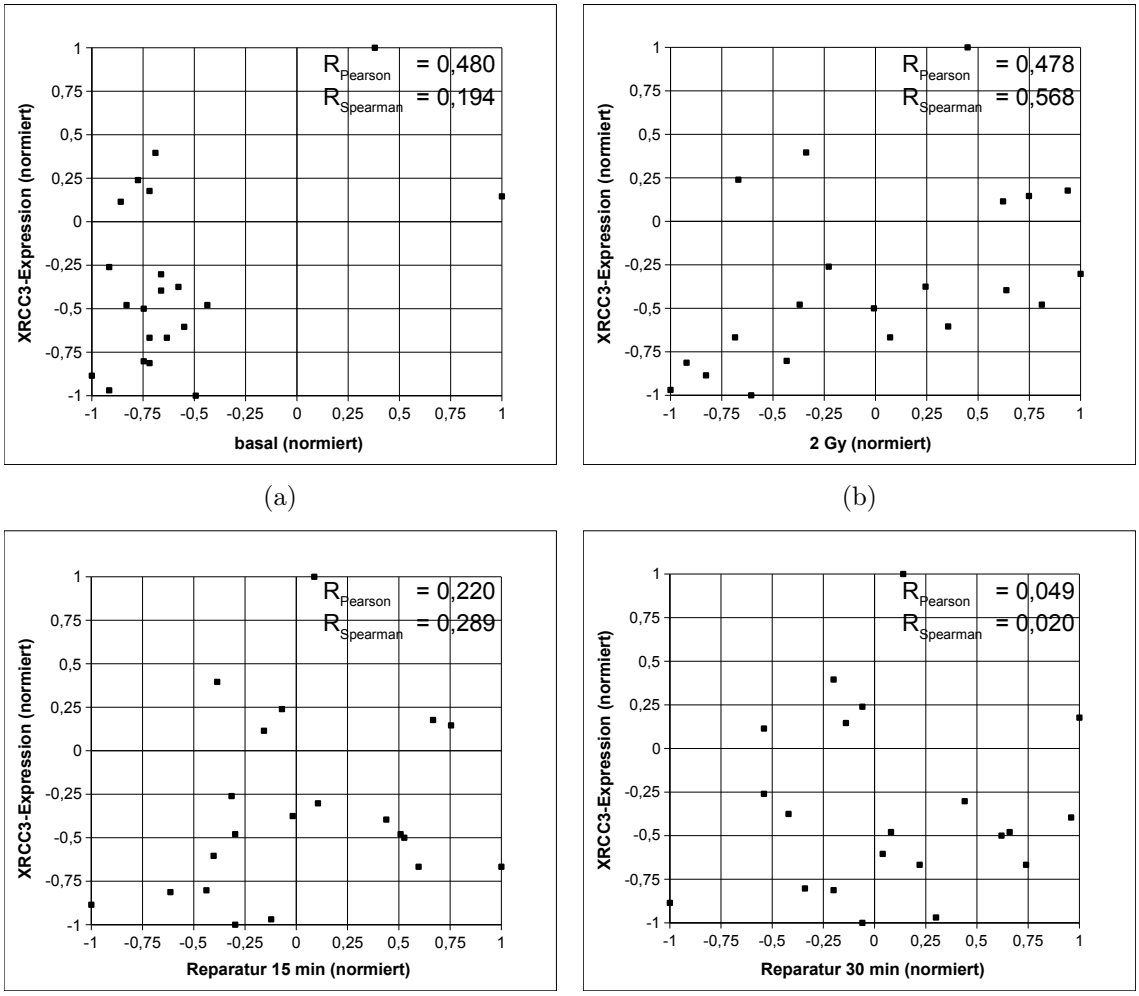


Abbildung 3.33: Korrelation der *XRCC3*-Expression mit den basalen (a) und 2 Gy-induzierten (b) Comet Assay-Effekten, sowie mit zwei Reparaturzeitpunkten von 15 (c) und 30 Minuten (d).

3.6 Meta-Analyse bisher publizierter Daten zur Genotoxizität des Zigarettenrauchs

Es gibt viele Arbeitsgruppen, die mit dem Comet Assay Biomonitoring-Untersuchungen durchführen, da der Test sehr schnell durchzuführen ist. Ein Problem des Comet Assay ist, dass diverse Protokollvarianten existieren und Variationen bei der Testdurchführung das Ergebnis beeinflussen können. Auch werden verschiedene, nicht miteinander zu vergleichende Parameter (Tailmoment, Tailintensity, Score etc.) benutzt, die das Ergebnis des Comet Assay beschreiben. Es ist daher sehr schwierig, Comet Assay-Befunde verschiedener Studien miteinander zu vergleichen. Durch die Normierung der Parameter erhielt ich die „Standardized mean difference“ (SMD), ein auf die Standardabweichung normiertes Abstandsmaß zwischen zwei Gruppen. Damit konnten die Ergebnisse verschiedener Studien miteinander verglichen werden.

3.6.1 Auswahl der Arbeiten

Eine Literatursuche in der PubMed-Datenbank nach „comet smok*“, „scg smok*“ und „scge smok*“ ergab 167 Treffer. Davon hatten 6 Arbeiten nichts mit dem Thema zu tun (SCG stand auch für eine andere Thematik). Einige dieser Studien wurden von der Meta-Analyse ausgeschlossen.

- 11 Studien waren nicht auf Englisch.
- 5 Studien thematisierten nicht das Zigarettenrauchen sondern andere Arten von Rauch.
- Der neutrale Comet Assay wurde bei einer Studie durchgeführt.
- In 28 Studien wurden andere Zellen als Blut untersucht.
- Bei einer Studie wurde nur eine Person untersucht.
- Bei 18 Studien wurden Raucher und Nichtraucher nicht gleichzeitig untersucht. Es wurden z. B. nur Nichtraucher (8), nur Raucher (1), nur Exraucher (2), nur Passivraucher (1), nur rauchende Trinker (1) oder es wurde Rauchen nur in Kombination mit der Induktion von DNA-Schäden (5) untersucht.
- In 17 Studien fehlten Informationen über das Rauchverhalten der Kontrollgruppe (alles „Typ B“-Studien).

- Bei 16 Arbeiten fehlten die Rohdaten oder es wurden keine Angaben über statistische Größen gemacht.
- 8 Arbeiten stellten Reviews ohne neue Daten dar.

Außerdem wurden nur die Arbeiten, die die folgenden Comet Assay-Parameter verwendet haben, für die Meta-Analyse benutzt.

- Tailmoment (auch „Olive Tailmoment“)
- Tailintensity (auch „percent DNA in tail“)
- Taillength
- Tailmigration
- Cometlength
- Score (berechnet aus verschiedenen Schadensklassen, in die die Zellen eingeteilt werden, z. B. „visual score“, „genetic damage index“ (GDI))

Falls die Rohdaten vorhanden waren, die Mittelwerte und Standardabweichungen aber fehlten, wurden diese berechnet. Von den restlichen 56 Arbeiten konnten bei 19 Studien keine statistischen Kenngrößen berechnet werden, da bei 14 nur p-Werte eines statistischen Tests angegeben waren und 5 Arbeiten einen Unterschied der Gruppen nur im Text erwähnten. Es blieben also 37 Arbeiten übrig. Die Studien lassen sich in zwei Typen einteilen. Bei „Typ A“-Studien wurde das Rauchen direkt als Expositionsquelle untersucht. Bei „Typ B“-Studien hingegen wurden andere, meist berufsbezogenen Expositionsquellen untersucht; das Rauchen wurde hier als Störgröße betrachtet. In die Meta-Analyse flossen „Typ B“-Studien nur dann ein, wenn Informationen zur Kontrollgruppe über deren Rauchverhalten vorlagen. Bei Basaran et al. [13] wurden zwei Populationen und zwei verschiedene Kontrollgruppen untersucht. Beide Kontrollgruppen gingen in die Meta-Analyse ein, so dass sich die Meta-Analyse letztendlich auf 38 Studien aus 37 Publikationen stützt. In Tabelle 3.5 sind die in die Meta-Analyse eingehenden Arbeiten aufgelistet.

3.6.2 Meta-Analyse der 38 Arbeiten

Die kleinste Studie untersuchte jeweils drei Raucher und Nichtraucher. Die umfangreichste Studie bestand aus 134 Rauchern und 213 Nichtrauchern. Die durchschnittliche Gruppengröße betrug 17 sowohl bei Rauchern als auch bei Nichtrauchern. Insgesamt

Tabelle 3.5: Studien der Meta-Analyse. Es sind sowohl die Anzahl der Raucher bzw. Nichtraucher als auch die „standardized mean differences“ (SMD) der jeweiligen Studien mit Konfidenzintervall angegeben.

Name	**Zitat**	$\mathbf{n}_{Raucher}$	$\mathbf{n}_{Nichtraucher}$	**SMD**	**95 % CI**[a]
Betti et al.	[16]	38	62	0,7	[0,28; 1,11]
Dhawan et al.	[36]	31	31	2,2	[1,61; 2,9]
Nia et al.	[104]	21	24	-0,13	[-0,72; 0,46]
Anderson et al.	[6]	6	6	0,44	[-0,72; 1,59]
Piperakis et al.	[116]	20	20	1,95	[1,18; 2,72]
Mohankumar et al.	[99]	16	10	2,09	[1,09; 3,09]
Speit et al.	[147]	20	20	-1,54	[-2,25; -0,82]
Diem et al.	[37]	28	52	-0,08	[-0,54; 0,38]
Hininger et al.	[63]	10	10	1,26	[0,28; 2,24]
Ellahuene et al.	[42]	6	6	1,85	[0,4; 3,29]
Pitarque et al.	[117]	3	8	0,22	[-1,12; 1,55]
Zhu et al.	[177]	15	26	0,07	[-0,56; 0,71]
Palus et al.	[109]	18	6	1,23	[0,56; 1,91]
Sardas et al.	[130]	5	3	3,36	[0,64; 6,07]
Hartmann et al.	[58]	24	23	-0,77	[-1,36; -0,17]
Sram et al.	[152]	134	213	-1,52	[-1,77; -1,28]
Moretti et al.	[100]	8	12	-0,07	[-0,96; 0,83]
Van Delft et al.	[161]	18	17	-0,22	[-0,88; 0,45]
Grover et al.	[55]	31	23	1,37	[0,77; 1,97]
Kalaiselvi et al.	[72]	20	30	0,17	[-0,4; 0,74]
Garaj-Vrhovac und Kopjar	[48]	21	29	0,51	[-0,06; 1,08]
Biri et al.	[17]	9	9	0,52	[-0,42; 1,47]
Danadevi et al.	[32]	15	21	3,32	[2,27; 4,37]
Basaran et al.	[13]a	24	6	0,86	[-0,07; 1,78]
Basaran et al.	[13]b	14	8	0,51	[-0,37; 1,39]
Laffon et al.	[77]	11	14	-1,51	[-2,42; -0,6]
Sul et al.	[154]	26	17	0	[-0,61; 0,61]
Palus et al.	[110]	28	12	0,5	[-0,19; 1,18]
Maluf et al.	[88]	7	15	0,32	[-0,59; 1,22]
Danadevi et al.	[31]	57	45	1,55	[1,1; 1,99]
Jianlin et al.	[71]	6	15	-0,51	[-1,47; 0,45]
Dusinska et al.	[38]	7	13	0,79	[-0,17; 1,75]
Hoffmann und Speit	[64]	12	12	-0,11	[-0,91; 0,69]
Touil et al.	[159]	11	7	0	[-0,95; 0,95]
Maluf und Erdtmann	[87]	3	9	0,62	[-0,72; 1,96]
Poli et al.	[121]	50	50	0,48	[0,08; 0,88]
Sardas et al.	[132]	10	18	0,58	[-0,21; 1,37]
Kopjar und Garaj-Vrhovac	[76]	20	40	1,9	[1,26; 2,54]
Total		803	959		

[a] Konfidenzintervall

wurden in dieser Meta-Analyse 803 Raucher und 959 Nichtraucher untersucht. Die SMDs und ihre 95 % CIs der in die Meta-Analyse eingehenden Arbeiten sind graphisch in Abbildung 3.34 dargestellt. Die Intervalle unterscheiden sich hinsichtlich Lokalisierung und Größe beträchtlich. Dies deutet auf eine große Heterogenität der Studien hin. Beim „fixed effects model“ beträgt die resultierende SMD 0,18 (95 % CI: 0,07 bis 0,28). Ein Test auf Heterogenität ergab im „fixed effects model“ einen p-Wert von 0,0009. Dies deutet darauf hin, dass das „random effects model“ mit einer SMD von 0,55 (95 % CI: 0,16 bis 0,93) den Effekt geeigneter beschreibt. Für die Darstellung der Plots wurde trotzdem das „fixed effects model“ ausgewählt, da die unterschiedliche Gewichtung der Studiengröße besser abgelesen werden kann als beim „random effects model“. Dass der Effekt stärker beim „random effect model“ ausgeprägt ist, kommt dadurch zustande, dass der Einfluss der großen Studie [151] beim „fixed effects model“ heruntergewichtet wurde. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Meta-Analyse in beiden Modellen eine geringfügig erhöhte DNA-Migration im Comet Assay bei Leukozyten von Rauchern nachweisen konnte.

3.6.3 Funnel Plot

Es war nun von Interesse, ob der sehr geringe Einfluss des Rauchens auf die DNA-Migration ein Artefakt durch einen „Publikationsbias“ darstellt. Dadurch dass negative Studien in der Regel schwerer zu publizieren sind und teilweise absichtlich nicht publiziert werden, fehlen bei Meta-Analysen meist die Ergebnisse von kleinen negativen Studien. Dieses Fehlen hat eine Verzerrung des Ergebnisses zur Folge. Um meine Meta-Analyse auf einen „Publikationsbias“ zu untersuchen, wurde eine Funnel Plot-Analyse (Abbildung 3.35) durchgeführt. Der Funnel Plot stellt die Beziehung der SMDs zu ihren SEs dar. Jeder Punkt repräsentiert eine Studie. Die gestrichelte vertikale Linie stellt den durchschnittlichen SMD des „fixed effects model“ (0,18) dar. Studien, deren Ergebnis nur kleine Präzision besitzt (hoher SE), mit deutlicher DNA-Wanderung sind in der rechten unteren Ecke dargestellt. Auffällig an diesem Plot ist, dass kleine Studien mit kleinem Effekt fehlten. Dieses Fehlen deutete auf einen Publikationsbias hin.

3.6.4 Studien mit Rauchen als Expositionsquelle

Die 38 Studien enthielten 12 „Typ A“-Studien, in denen 258 Raucher und 303 Nichtraucher untersucht wurden. Der Median der untersuchten Raucher bzw. Nichtraucher lag bei 20 Personen pro Studie. Abbildung 3.36 stellt die SMDs der 12 „Typ A“-Studien im „fixed effects model“ dar. Es wurde ein deutlich stärkerer Einfluss des Rauchens

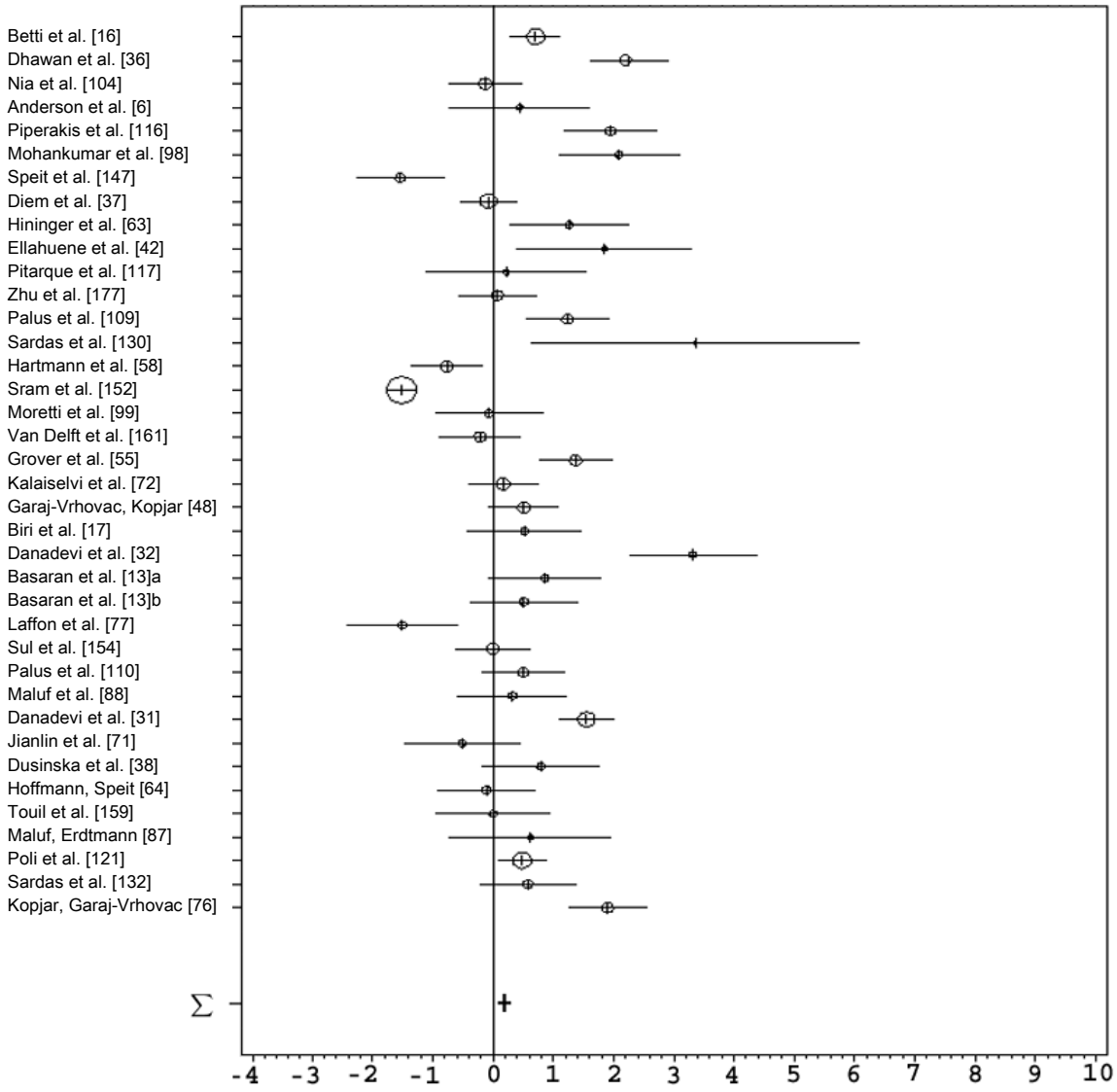


Abbildung 3.34: „Standardized mean difference (SMD)“-Werte von 38 Studien im „fixed effects model“ der Meta-Analyse. Eine SMD ist als vertikale Linie dargestellt, die Radien der Kreise entsprechen den jeweiligen Studienumfängen. Die 95 % CI sind als horizontale Linien gekennzeichnet. Positive SMDs weisen auf einen DNA-schädigenden Effekt des Rauchens im Comet Assay hin, wohingegen negative SMDs einen gegenläufigen Effekt anzeigen. In der Σ-Linie ist der durchschnittliche SMD und dessen 95 % CI aller Studien dargestellt.

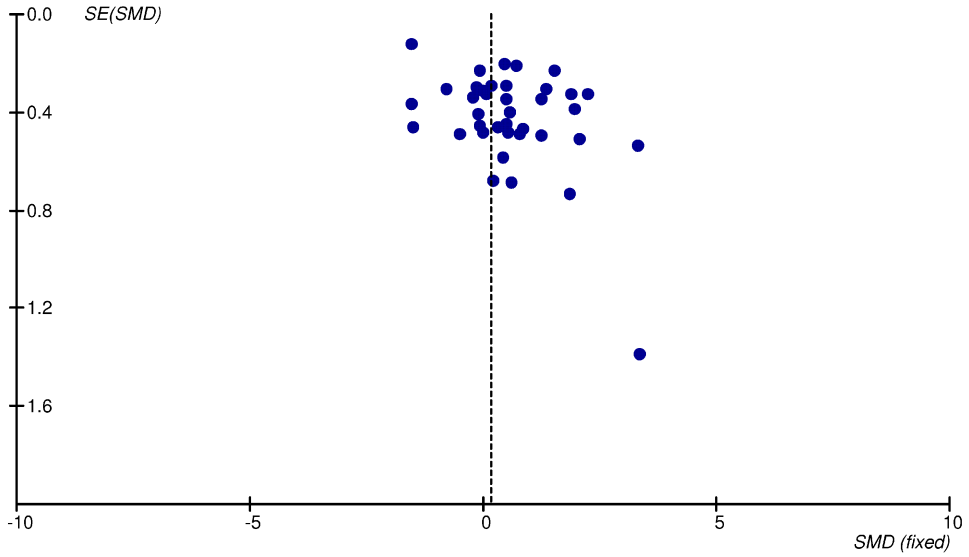


Abbildung 3.35: Funnel Plot-Darstellung der 38 eingehenden Studien (Punkte). Dargestellt ist der Zusammenhang der SMDs und deren SEs. Die vertikale gestrichelte Linie stellt den durchschnittlichen SMD des „fixed effects models“ dar.

(“fixed“: SMD = 0,54, 95% CI = 0,36 bis 0,72, p < 0,0001, „random“: SMD = 0,71, 95 % CI = 0,13 bis 1,3, p = 0,02) bei den Studien entdeckt, die das Rauchen als direkte Expositionsquelle untersucht haben, als bei der Analyse, die alle Arbeiten berücksichtigt.

3.6.5 Studien mit Rauchen als potenziellem Störfaktor

545 Raucher und 656 Nichtraucher wurden in 26 „Typ B“-Studien untersucht. Durchschnittlich waren 15 Raucher und 16 Nichtraucher pro Studie vertreten. In den „Typ B“-Studien, die das Rauchen als potenziellen Störfaktor betrachteten, wurde kein DNA-schädigender Effekt des Rauchens (SMD = 0,00, 95 % CI: -0,13 bis 0,12, p = 0,97) in der Meta-Analyse im „fixed effects model“ nachgewiesen (Abbildung 3.37). Das „random effects model“, welches die große negative Studie [151] geringer gewichtet, findet einen grenzwertigen Einfluss des Rauchens (SMD = 0,47). Dieser ist allerdings nicht statistisch signifikant (95 % CI: -0,03 bis 0,96, p = 0,07).

3.6.6 Studien mit Bildanalysesystem

Die 38 Studien der Meta-Analyse teilen sich auf in Studien, die mit (n = 23) und ohne (n = 15) Bildanalysesystem ausgewertet wurden. In der Gruppe der Studien, die mit

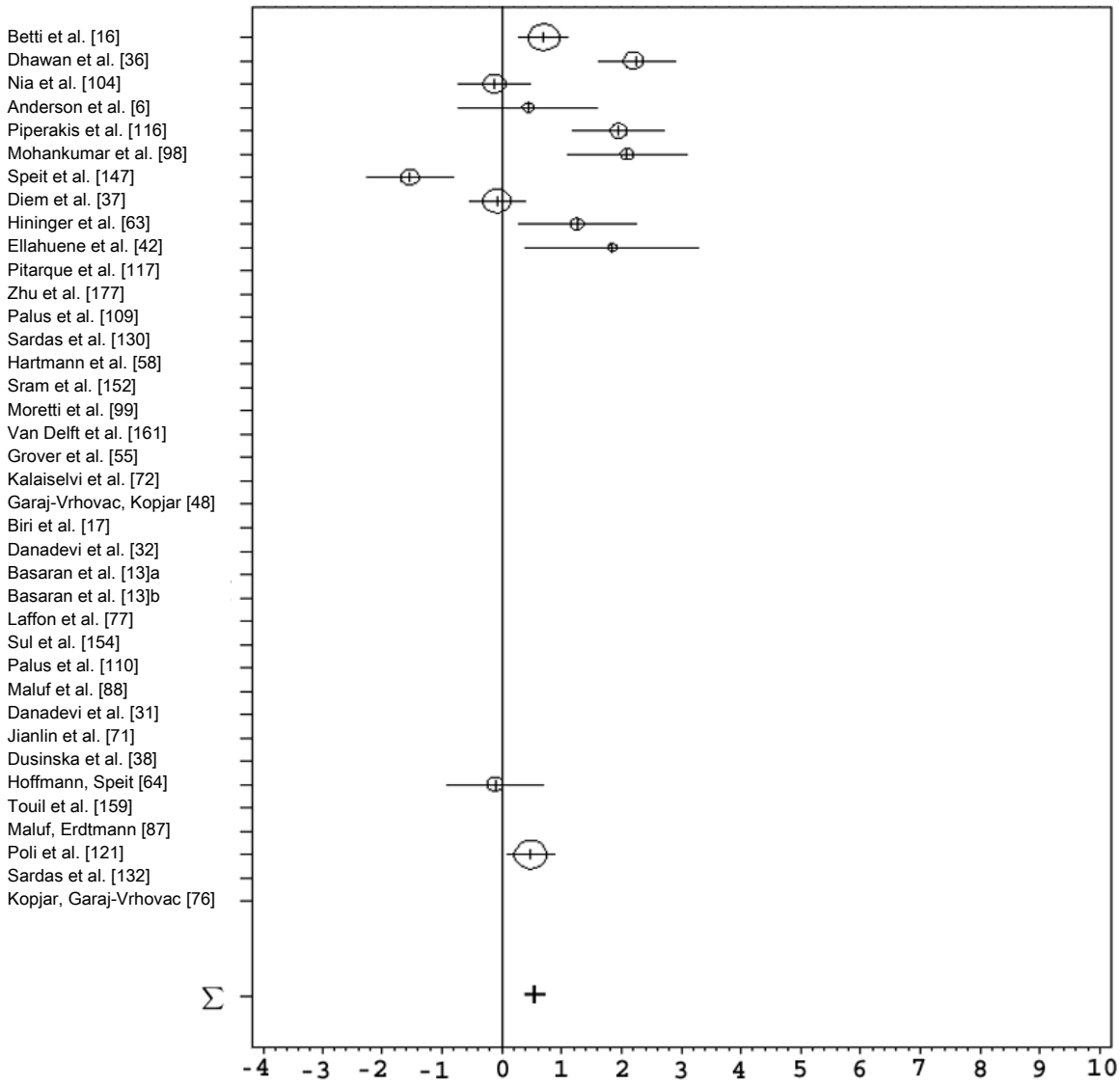


Abbildung 3.36: SMD-Werte im „fixed effects model“ von 12 Studien, die primär das Rauchen als Expositionsquelle untersucht haben.

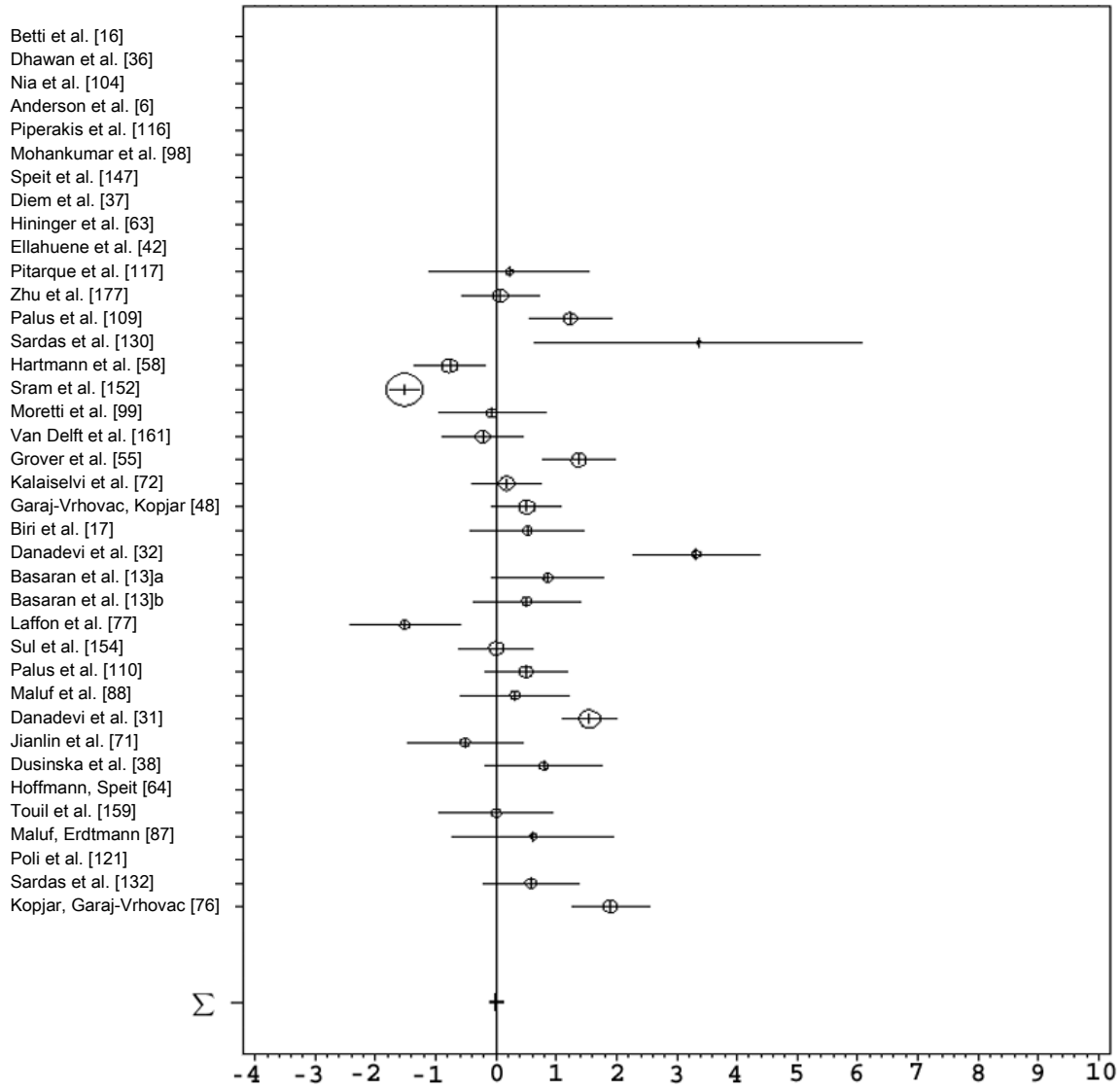


Abbildung 3.37: SMD-Werte im „fixed effects model“ von 26 Studien, die das Rauchen als potenziellen Störfaktor im Rahmen einer Biomonitoring-Studie untersuchten.

Hilfe eines Bildanalysesystems ausgewertet wurden, befinden sich auch wenige Studien, die durch Längenmessung des Kometenschweifs im Okular des Mikroskops ausgewertet wurden. Beide Auswertemethoden gelten als exakt und wurden daher unter dem Überbegriff „Studien mit Bildanalysesystem“ aus Gründen der Vereinfachung zusammengefasst. Insgesamt wurde das Blut von 576 Rauchern und 700 Nichtrauchern in Comet Assay-Studien mit Bildanalysesystem untersucht. Pro Studie wurden durchschnittlich 20 Raucher und 20 Nichtraucher untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.38 dargestellt. Das „fixed effects model“ führte zu einer SMD von 0,02 (95% CI: -0,10 bis 0,14, p = 0,72), die SMD des „random effects model“ betrug 0,42 (95 % CI: -0,12 bis 0,97, p = 0,13). Bei diesen 23 Studien wurde kein Einfluss des Rauchens auf die DNA-Migration im Comet Assay nachgewiesen.

3.6.7 Studien ohne Bildanalysesystem

In 15 Studien (227 Raucher und 259 Nichtraucher) wurden die Zellen visuell in Schadensklassen eingeteilt und daraus ein Score berechnet. Pro Studie wurden durchschnittlich 15 Raucher bzw. Nichtraucher untersucht. Der SMD des „fixed effects model“ betrug 0,72 (95 % CI: 0,50 bis 0,94, p < 0,0001) (siehe Abbildung 3.39). Auch das „random effects model“ lieferte einen klar positiven SMD von 0,80 (95 % CI: 0,37 bis 1,24). Bei diesen Arbeiten wurde in beiden Modellen ein deutlicher Einfluss des Rauchens auf die DNA-Migration im Comet Assay aufgezeigt.

3.6.8 Zusammenfassung der Ergebnisse der Meta-Analyse

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in meiner Meta-Analyse unter beiden Modellannahmen ein genotoxischer Effekt des Zigarettenrauchs an Leukozyten mit dem Comet Assay nachweisbar war. Dieser Effekt trat hauptsächlich in Studien, die das Zigarettenrauchen direkt untersucht haben („Typ A“), auf. In den Studien, die das Rauchen als potenzielle Störgröße betrachteten („Typ B“), war kein genotoxischer Effekt des Zigarettenrauchs nachweisbar. Ferner wurde ein DNA-schädigender Effekt des Zigarettenrauchs vorwiegend in Studien, die visuell ohne Bildanalysesystem ausgewertet wurden, gefunden.

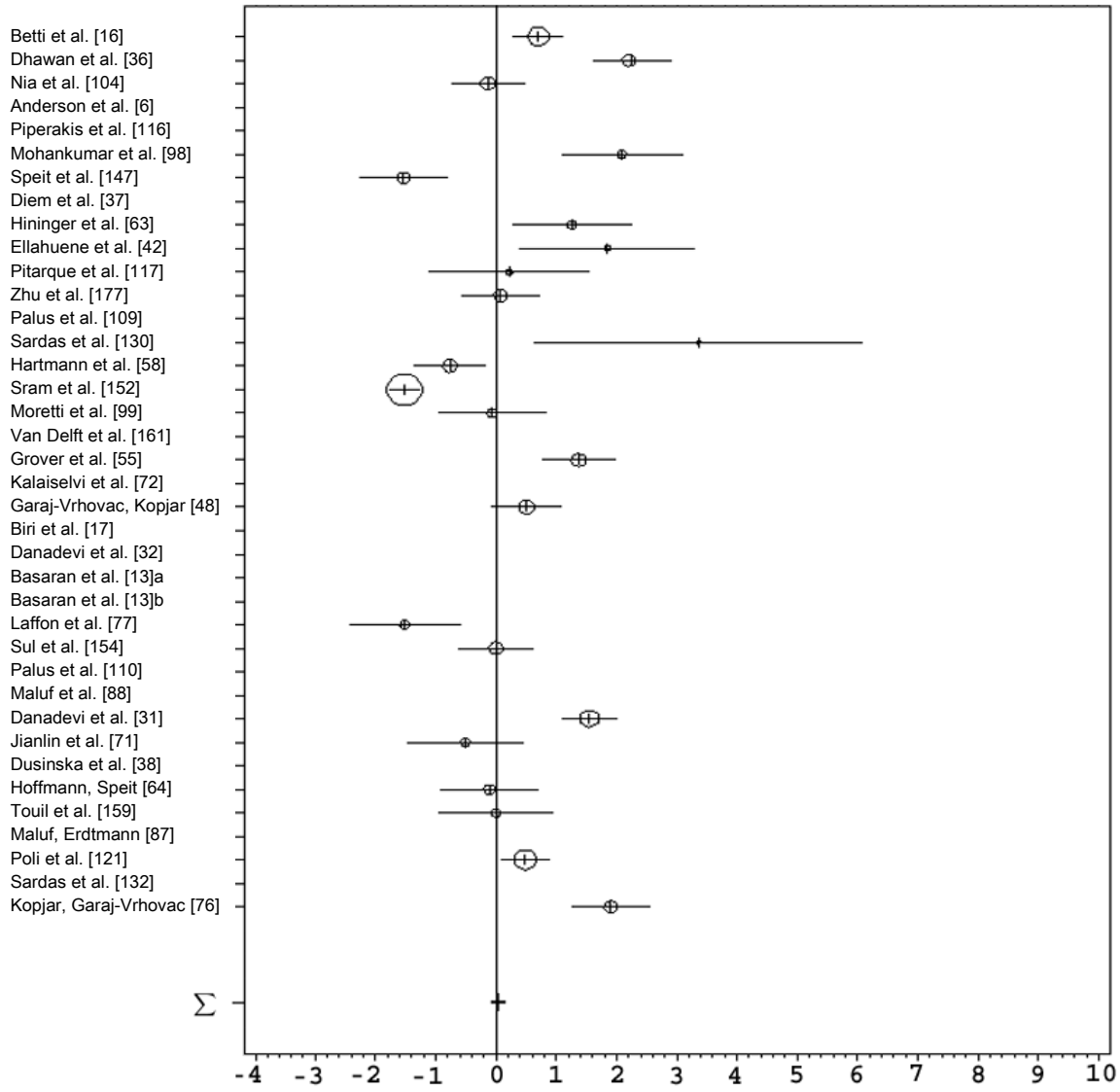


Abbildung 3.38: SMD-Werte im „fixed effects model“ von 23 Studien, die ein Bildanalysesystem zur Bestimmung der DNA-Migration im Comet Assay benutzten.

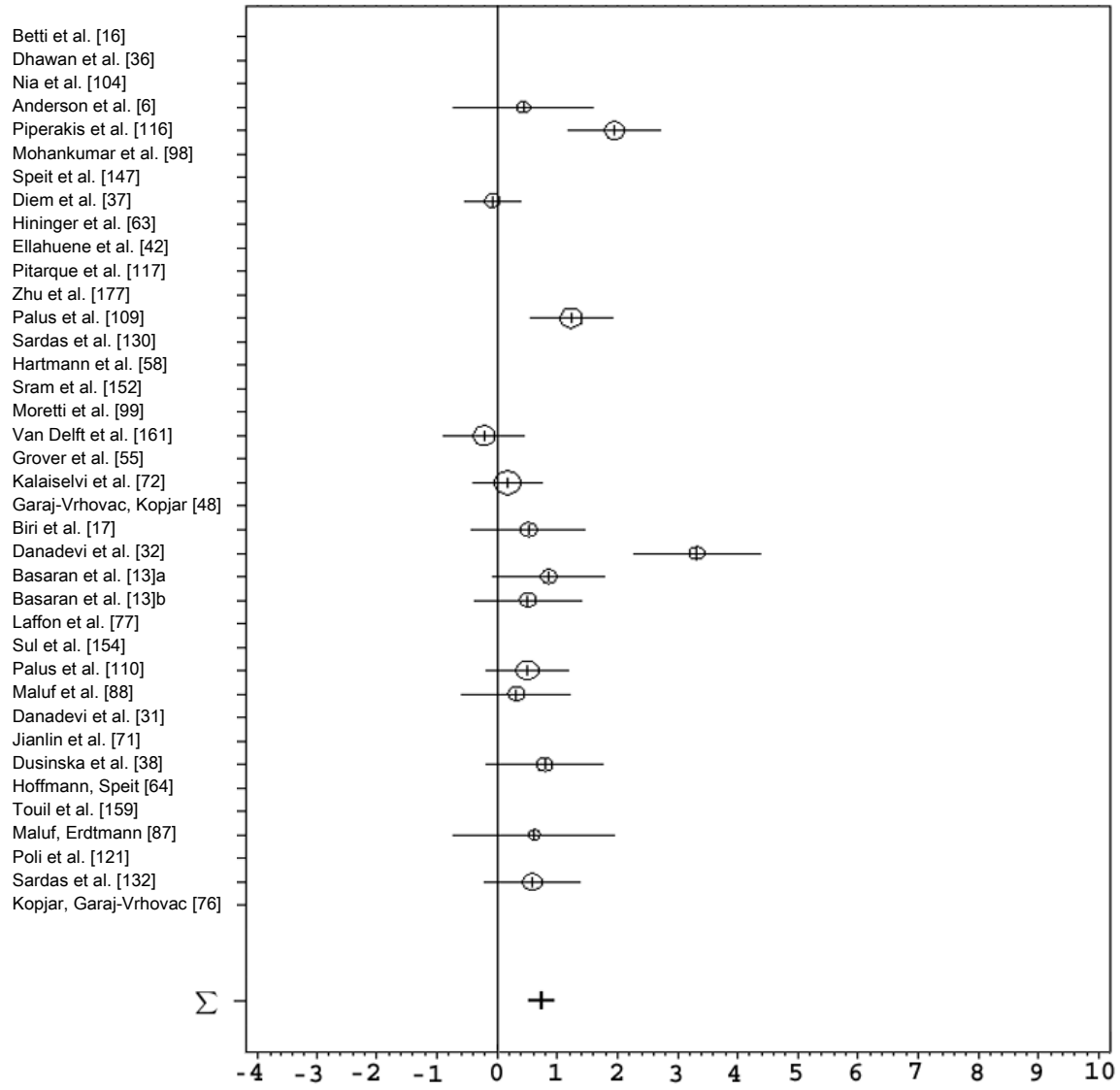


Abbildung 3.39: SMD-Werte im „fixed effects model“ von 15 Studien, die kein Bildanalysesystem zur Bestimmung der DNA-Migration im Comet Assay benutzten.

4 Diskussion

4.1 Untersuchungen zur Genotoxizität des Zigarettenrauchs mit dem Comet Assay

Meine vergleichenden Untersuchungen an Rauchern und Nichtrauchern mit dem Comet Assay haben ergeben, dass keine signifikanten Unterschiede nachweisbar waren hinsichtlich der basalen DNA-Schäden, der Mutagensensitivität und der Reparaturaktivität. Im Folgenden sollen diese Aspekte und auch die Ergebnisse der Meta-Analyse kritisch diskutiert werden. Ferner hatten weder genetische Polymorphismen noch die Expression von Reparaturgenen Einfluss auf das Ergebnis des Comet Assay. Auch dieser Befund wird im Folgenden diskutiert. Es wurden auf der Basis der Ergebnisse allgemeine Schlussfolgerungen für die Einsatzfähigkeit des Comet Assay im Biomonitoring abgeleitet.

4.1.1 Comet Assay Protokoll und Studienplanung

Genotoxizität und Kanzerogenität von Zigarettenrauch

Das Zigarettenrauchen führt in mehreren Geweben zur Krebsentstehung. Besonders in den letzen Jahren häufen sich die Fälle von Lungenkrebs und Plattenepithelkarzinom bei Rauchern [138]. Außerdem treten vermehrt Blasen- und Harnleiterkrebs bei Rauchern auf [69]. In vielen epidemiologischen Assoziationsstudien wurde ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer Krebserkrankung und dem Zigarettenrauchen nachgewiesen. Die Ursache für die Krebsinitiation wird auf das Vorhandensein von genotoxischen Substanzen im Zigarettenrauch zurückgeführt (Übersicht bei DeMarini [34]). Die Exposition mit Zigarettenrauch führt in verschiedenen Zellen zu Schwesterchromatidaustauschen und zur Induktion von Mikronuklei. Bezüglich des Auftretens von Chromosomenaberrationen gibt es widersprüchliche Befunde. Der Zigarettenrauch verursacht auch DNA-Schäden. Nakayama et al. [102] fanden, dass Zigarettenrauch Einzelstrangbrüche in kultivierten menschlichen Zellen hervorrief. In einer anderen Arbeit an einer Zelllinie aus menschlichen B-Lymphozyten (Raji-Zellen) wurde nachgewiesen,

dass dosisabhängige DNA-Effekte nach Exposition mit wasserlöslichen Substanzen des Zigarettenrauchs im Comet Assay auftraten. Ferner konnte nachgewiesen werden, dass sich Inhibitoren der DNA-Reparatur in der Gasphase des Zigarettenrauchs befinden [173]. Auch wurde nach Exposition der Zellen mit Zigarettenrauch die Bildung von oxidativen DNA-Addukten beschrieben [80]. Diese Befunde legen den Schluss nahe, dass im Zigarettenrauch genotoxische Substanzen vorhanden sind, die auch im Comet Assay zu DNA-Effekten führen.

In chemischen Analysen des Zigarettenrauchs wurden viele genotoxische und kanzerogene Substanzgruppen, wie z. B. polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe und N-Nitrosamine, identifiziert. Ein Vertreter der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe ist das Benzo[a]pyren. In *in vitro*- und *in vivo*-Studien führte das Benzo[a]pyren zu Genmutationen und Chromosomenaberrationen. Garry et al. [49] untersuchten *in vivo* mit dem Comet Assay Sprague-Dawley Ratten nach endotrachealer Benzo[a]pyren-Exposition. Eine deutliche Erhöhung der Comet Assay-Effekte zeigte sich für Lungenzellen und Lymphozyten im Vergleich zu den Kontrollzellen ohne Exposition. Statistisch signifikant erhöhte Tailmoment-Werte zeigten Garry et al. auch für Makrophagen und Hepatozyten. Die Tatsache, dass Benzo[a]pyren im Blut zu DNA-Effekten im Comet Assay führt, setzt voraus, dass die Leukozyten über eine ausreichende metabolische Aktivität zur Aktivierung des Promutagens verfügen. Dey et al. [35] zeigten, dass Leukozyten das Cpy1A1 exprimieren, das für die Giftung des Benzo[a]pyrens benötigt wird. Garry et al. [49] wiesen also nach, dass nach endotrachealer Applikation von 3 mg Benzo[a]pyren die Lymphozyten der Ratten ausreichend exponiert wurden, so dass eine erhöhte DNA-Migration mit dem Comet Assay nachweisbar war. Lymphozyten scheinen daher als Zielzellen für die Untersuchung von Benzo[a]pyren-induzierten Schäden mit dem Comet Assay geeignet zu sein. Generell lässt sich sagen, dass im Zigarettenrauch eine Vielzahl von genotoxischen Substanzen vertreten sind, die auch im Comet Assay zu DNA-Effekten führen. Mir erscheint daher das Zigarettenrauchen als angemessene Expositionsquelle, mit der ich die Relevanz des Comet Assay hinsichtlich seines Einsatzes im Biomonitoring untersucht habe.

Comet Assay - Testdurchführung

Wichtig für den Nachweis geringer DNA-Migration im Comet Assay, die ich im Biomonitoring erwarte, ist die Etablierung eines sensitiven Protokolls. Das Protokoll muss für jeden Zelltyp und jede Laborausstattung neu etabliert werden. Die Dauer der Lyse und Alkalidenaturierung sind für menschliche Leukozyten und Lymphozyten eher unkritisch und man kann sich an publizierten Erfahrungen orientieren. Die Elektrophoresezeit hin-

gegen muss für jeden Zelltyp so eingestellt werden, dass Kontrollzellen eine minimale Wanderung aufweisen [157]. Diese Migration wird durch spontane DNA-Schäden verursacht. Für die Sensitivität des Comet Assay ist es wichtig, dass die Bedingungen so gewählt werden, dass auch geringe DNA-Effekte bereits zu einer DNA-Migration führen. Nur so kann sichergestellt werden, dass der ganze DNA-schädigende Effekt einer Substanz nachgewiesen werden kann. Ferner können auch „crosslinkende“ Substanzen durch die Reduktion von DNA-Effekten mit erfasst werden. Es wurden drei verschiedene Protokolle (siehe Abbildung 3.1) auf ihre Sensitivität gegenüber Benzo[a]pyren-induzierte DNA-Schäden untersucht. Die Protokollvariante 2 lieferte schon bei 1 μM BPDE eine statistisch signifikant erhöhte DNA-Migration. Dieses Protokoll ist also in der Lage, die DNA-Effekte, die durch akute Exposition mit 1 μM BPDE induziert werden, statistisch signifikant nachzuweisen. Mit Sicherheit ist die Benzo[a]pyren-Exposition während des Zigarettenrauchens geringer als 1 μM. Ob dieses Protokoll dennoch sensitiv genug ist, um die Benzo[a]pyren-induzierten DNA-Effekte nach chronischer Exposition durch Zigarettenrauch mit dem Comet Assay zu detektieren, wurde in dieser Arbeit untersucht.

Wichtig bei der Durchführung des Comet Assay im Biomonitoring ist die Verwendung einer Positivkontrolle, da die zu erwartenden DNA-Effekte als gering einzuschätzen sind. Durch die Positivkontrolle kann die Sensitivität des Testprotokolls überprüft werden, indem man das Tailmoment der Kontrolle mit den historischen Kontrollwerten vergleicht. Stimmen die Werte nicht überein, so sind während der Versuchsdurchführung Unregelmäßigkeiten aufgetreten. Meine Positivkontrollen waren Blutzellen, die mit Standardmutagenen wie BPDE oder ionisierender Strahlung behandelt wurden.

Das Comet Assay-Protokoll muss nicht nur sensitiv sondern auch robust sein. Im Biomonitoring können die Untersuchungen meist nicht unabhängig wiederholt werden, da die Probanden für weitere Untersuchungen oft nicht mehr zur Verfügung stehen. Es ist daher äußerst wichtig, dass die Versuche unter standardisierten Bedingungen ablaufen und dass die gewählten Versuchsbedingungen möglichst stabil sind. Damit wird sichergestellt, dass Comet Assay-Befunde verschiedener Personen überhaupt vergleichbar sind und die Werte von Personen aus einer Gruppe zusammengefasst werden können. Die Robustheit eines Comet Assay-Protokolls wird durch das Mitführen eines Referenzstandards in den Elektrophoresen überprüfbar [33]. Mit dessen Hilfe wird die interexperimentelle Variabilität nachgewiesen, die möglicherweise zu falsch-negativen Ergebnissen führt. In meiner experimentellen Studie wurde in jeder Elektrophorese ein V79-Zellpräparat mitgeführt. Zu Beginn der jeweiligen Teilprojekte wurden aus zwei V79-Kulturen die Zellen in Aliquots tiefgefroren. Für jede Elektrophorese wurde ein Aliquot aufgetaut und ein Präparat erstellt. Am Ende jedes Teilprojektes wurden

von den Tailmoment-Werten der einzelnen Referenzstandards der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Alle Elektrophoresen, bei denen das Tailmoment des Referenzstandards mehr als die zweifache Standardabweichung vom errechneten Mittelwert abwichen, wurden von der Wertung ausgeschlossen. Generell lässt sich sagen, dass ich ein sehr robustes Comet Assay-Protokoll etabliert habe, da nur das Tailmoment eines Referenzstandards deutlich von dem der anderen abwich (s. Abb. 3.7). Das bedeutet, dass die Versuchsvariabilität nur bei einer der 83 Elektrophoresen unakzeptabel war. Allerdings war ein deutlicher chronologischer Anstieg der Tailmoment-Werte der beiden Chargen des Referenzstandards sichtbar. Dies deutet auf einen Lagerungseffekt der aliquotierten Standards hin. Dieser Effekt muss bei der Auswahl der auszuschließenden Elektrophoresen mit eingerechnet werden. Statt des Mittelwertes der Tailmoment-Werte der Referenzstandards sollte in Zukunft eine Regressionsgerade aus den Werten einer V79-Charge berechnet werden. Als tolerierbare Variabilitätsgrenze sollte eine bestimmte Abweichung der Werte der Referenzstandards von der Regressionsgerade definiert werden. Dadurch wird sichergestellt, dass zu jedem Zeitpunkt der Studie die Referenzstandards die gleiche Variabilität haben dürfen. Die Ursache dieses Lagerungseffektes ist mir unbekannt. Hininger et al. [63] zeigten, dass weder die DMSO-Lagerung noch der Tieffrierschritt einen Einfluss auf die DNA-Migration im Comet Assay haben.

Ein besonderes Augenmerk wurde in dieser experimentellen Studie auf die Probandenauswahl gelegt. Es ist durchaus denkbar, dass geringe Comet Assay-Effekte von individuellen Störfaktoren überlagert werden. Durch stringente Ein- und Ausschlusskriterien war mein Probandenkollektiv sehr homogen. Es wurden nur männliche, junge Studenten und Angestellte für die Studie ausgewählt. In der Literatur gibt es Arbeiten, die einen Einfluss des Geschlechts und des Alters auf die Comet Assay-Befunde nachweisen. Anderson et al. [5] fanden höhere Comet Assay-Werte bei Frauen nach Aflatoxin-Exposition, wohingegen Bajpayee et al. [12] und Lam et al. [78] eine erhöhte DNA-Migration im Comet Assay bei Männern nachwiesen. Die Tatsache, dass manchmal männliche und manchmal weibliche Probanden erhöhte DNA-Effekte im Comet Assay zeigen, deutet eher auf einen geschlechtsunspezifischen, zufälligen Effekt hin. Møller hingegen konnte in einer Rekalkulation von 125 Publikationen keinen geschlechtsspezifischen Effekt nachweisen [97], was mir aufgrund der Studiengröße plausibel erscheint. Auch wird das Alter der Probanden als Störgröße für den Comet Assay diskutiert [88]. In einer Meta-Analyse berichtet Møller von einem statistisch signifikanten Einfluss des Alters auf die DNA-Migration [97]. Dieser Effekt wird durch zwei unabhängige chinesische Studien bestätigt [78, 178]. Die erhöhte DNA-Migration im

Comet Assay soll durch eine schlechtere Reparatur von Schäden in gealterten Zellen ausgelöst werden. Ferner wurden regionale und saisonale Einflüsse auf den Comet Assay nachgewiesen. Die Meta-Analyse von Møller zeigte, dass Comet Assay-Untersuchungen in nördlichen Ländern geringere basale DNA-Effekte als in südlichen Ländern nachweisen konnten [97]. Einen Einfluss der Jahreszeit wurde in einer anderen Untersuchung der Arbeitsgruppe um Møller [95] entdeckt. Als Ursache für die erhöhte DNA-Migration im Comet Assay wird eine erhöhte Sonneneinstrahlung während der Sommermonate diskutiert. Auch Giovannelli et al. [51] fanden saisonale Schwankungen in den basalen DNA-Effekten. In dieser Studie war der Effekt allerdings weniger mit der Sonneneinstrahlung als mit der Lufttemperatur korreliert. Die Ozon-Konzentration in der Luft hatte nur einen geringen Einfluss auf die Comet Assay-Untersuchungen. Valverde et al. [160] hingegen fanden eine erhöhte DNA-Migration im Comet Assay in Leukozyten von Personen, die in Gebieten mit hohen Ozon-Konzentrationen leben. Diese Befunde deuten auf einen saisonalen Effekt hin, dessen Ursache bisher noch nicht geklärt werden konnte. Ich habe mich daher bemüht, das Probandenkollektiv meiner Studie möglichst homogen zu halten. Jeder Proband musste einen Fragebogen ausfüllen. Die Studie erstreckte sich über drei Jahre, so dass davon auszugehen ist, dass sich saisonale Einflüsse herausmitteln. Es wurden alle Personen ausgeschlossen, die an Krebs oder einer schweren Infektion in den letzten sechs Monaten erkrankt waren, da diese Erkrankungen das Immunsystem aktivieren, welches viele oxidative und zytotoxische Enzyme und Mediatoren freisetzt. Auch Personen, die Strahlung ausgesetzt waren, z. B. beim Röntgen oder bei einer Radiotherapie, wurden von der Studie ausgeschlossen, da ionisierende Strahlung unter anderem zu Strangbrüchen in Leukozyten führt. Ferner wurden Personen, die viel Sport betrieben hatten, von der Teilnahme an der Studie ausgeschlossen. Es wurde nachgewiesen, dass eine besonders starke sportliche Belastung zu einer Erhöhung der Comet Assay-Werte führten [59, 105]. Die Erhöhung wurde in Zusammenhang mit DNA-Schäden gebracht, die durch oxidativen Stress ausgelöst werden. Personen, die regelmäßig Medikamente einnahmen, wurden auch ausgeschlossen, da die Auswirkungen der Medikamente nicht abschätzbar sind. Auch die Einnahme von hochdosierten Vitaminpräparaten ist nicht unumstritten. Das Anti-Oxidant Vitamin C soll freie Radikale über „Redox-Cycling“ abfangen, so dass diese die Makromoleküle der Zellen nicht schädigen. Eine afrikanische Studie allerdings konnte keinen präventiven Effekt des Vitamin C auf Wasserstoffperoxid-induzierte DNA-Schäden messen [4]. Eine andere Studie befasste sich mit Beta-Karotinen, die wiederum antioxidativ wirken sollen [84]. Es stellte sich heraus, dass Beta-Karotin in geringen Konzentrationen von 1 - 3 μM protektiv auf DNA-Schäden wirkt. Bei Konzentrationen von 4 - 10 μM Beta-

Karotin hingegen verlor sich der protektive Effekt und es wurden sogar DNA-Schäden induziert. Daher verzichtete ich auf Probanden, die hochdosierte Vitaminpräparate zu sich nahmen. Ferner durften die Probanden keinen erhöhten Alkoholkonsum haben, da es bezüglich der genotoxischen Wirkung widersprüchliche Befunde gibt. In einigen Studien wurde eine Assoziation zwischen dem Alkoholkonsum und DNA-Effekten im Comet Assay nachgewiesen [72, 178], die allerdings in anderen Studien nicht auftrat [78, 81].

Im Vorfeld meiner experimentellen Studie wurde untersucht, welche Zielzellen am besten für die Durchführung eines Comet Assay geeignet sind. Daher wurden vergleichende Untersuchungen von Leukozyten und isolierten Lymphozyten durchgeführt. Die Abbildungen 3.4 und 3.5 zeigen, dass nach FPG-Behandlung im Comet Assay die Versuchsvariabilität bei den Leukozyten wesentlich geringer war als bei isolierten Lymphozyten. Dadurch konnten im Vollblut bei wesentlich niedrigeren MMS-Konzentrationen bereits statistisch signifikante Unterschiede an Basenmodifizierungen nachgewiesen werden. In einem Teilprojekt bin ich der Frage nachgegangen, ob ein genotoxischer Effekt des Zigarettenrauchs besser an isolierten Lymphozyten zu erfassen ist [64]. Es wurde keine erhöhte Sensitivität von Lymphozyten gefunden. Generell ist von der Verwendung von isolierten Lymphozyten im Biomonitoring abzuraten, obwohl diese in vielen Arbeiten verwendet werden [36, 99, 136]. Abgesehen vom größeren Zeitaufwand kann die Isolation der Lymphozyten zu einer DNA-Schädigung führen, da die Zellen während der Isolation mit Luftsauerstoff in Kontakt kommen. Sofern frische Blutproben zur Verfügung stehen, sollten diese auch verwendet werden.

Ein weiterer Aspekt, der im Vorfeld der Studie geklärt wurde, ist, ob PHA-stimulierte Lymphozyten besser für die Durchführung des Comet Assay geeignet sind. Dazu wurden vergleichende Untersuchungen mit unstimuliertem oder PAH-stimuliertem Vollblut durchgeführt. In Comet Assay-Versuchen nach Aphidicolin-Exposition (siehe Abbildung 3.2) zeigte sich, dass die DNA-Effekte bei stimulierten Leukozyten wesentlich höher waren als bei unstimulierten Zellen. Allerdings trat in den Versuchen mit den stimulierten Zellen auch eine erhöhte Variabilität auf, so dass die Sensitivitäten der Protokolle mit und ohne PHA-Stimulation vergleichbar waren. Diese Untersuchung belegt, dass auch unstimulierte Lymphozyten über eine ausreichende metabolische Aktivität verfügen, um Untersuchungen zur Reparaturkapazität durchzuführen. Schmezer et al. [136] regten zunächst an, Reparaturkapazitäten im Biomonitoring an stimuliertem Blut durchzuführen. Die gleiche Arbeitsgruppe veröffentlichte aber später eine Arbeit, die die Reparaturkapazitäten von stimuliertem und unstimuliertem Blut miteinander vergleicht [93]. Es zeigten sich keine Unterschiede bezüglich der Repa-

raturkapazitäten der Zellen. Auch konnten Mayer et al. [93] keine unterschiedlichen Reparaturkapazitäten nach γ-Bestrahlung bei stimulierten und unstimulierten Zellen nachweisen. Die Verwendung von unstimulierten Lymphozyten ist auch für das Biomonitoring von praktischem Vorteil. Ein weiterer Aspekt, der gegen die Verwendung von PHA-stimuliertem Blut spricht ist, dass für stimulierte Blutkulturen erhöhte DNA-Effekte mit dem Comet Assay nachgewiesen wurden. Diese wären laut Narayanan et al. [103] auf DNA-schädigende Komponenten im Blut zurückzuführen, die durch die Lyse von Granulozyten und Erythrozyten entstehen. Ob diese Hypothese allerdings der Wahrheit entspricht ist fraglich.

Besonders wichtig für die Beurteilung der mittels Comet Assay gewonnen Daten ist eine angemessene statistische Auswertung [83, 96, 167]. Im Biomonitoring ist die statistische Bearbeitung von großer Bedeutung, da die gemessenen Effekte meist sehr gering sind. Dabei tritt häufig das Problem auf, dass ein statistisch signifikanter Effekt nicht unbedingt eine biologische Relevanz besitzt. Die biologische Relevanz lässt sich aber im Biomonitoring relativ schwer abschätzen, da es in der Regel keine unabhängigen Wiederholungsversuche gibt und keine Dosis-Effekt-Beziehungen abgeleitet werden können. Man kann nicht davon ausgehen, dass die durch den Comet Assay ermittelten Daten normalverteilt sind. Somit sind nichtparametrische Tests, wie z. B. der Mann-Whitney U-Test, durchzuführen, die auf dem Median basieren. Der Test nach Mann-Whitney ist auch relativ unempfindlich gegenüber Ausreißern. Im Vorfeld muss eine Stichprobenabschätzung durchgeführt werden, um die zu untersuchende Probandenanzahl (Stichprobenumfang) abzuschätzen. Dazu benötigt man das Signifikanzniveau α, die Standardabweichung σ, einen relevanten Unterschied Δ und die „Power“ β. Das Signifikanzniveau, auch Irrtumswahrscheinlichkeit genannt, wurde auf 5 % festgelegt. Das ist die Wahrscheinlichkeit, mit der die Nullhypothese (Rauchen hat keinen Einfluss auf das Tailmoment) irrtümlich abgelehnt wird. Daten für die Standardabweichung σ lassen sich aus früheren Comet Assay-Untersuchungen ableiten. σ berücksichtigt die Streuung der Comet Assay-Daten. Ferner muss ein relevanter Unterschied festgelegt werden. Dazu benötigt man Erfahrung, was einen „echten“ Unterschied zwischen zwei Gruppen im Comet Assay darstellt. Ich habe für meine Studien ein Δ von 0,3 im Tailmoment angenommen. Kleinere Unterschiede im Tailmoment sind meiner Meinung nach nicht biologisch relevant, wenn man die Versuchsvariabilität berücksichtigt. β ist die Wahrscheinlichkeit, mit der die H_1-Hypothese (Rauchen hat einen Einfluss auf das Tailmoment) unter den gemachten Annahmen akzeptiert wird. Diese Wahrscheinlichkeit sollte immer sehr hoch angesetzt werden. Bei meinen Untersuchungen wurde diese auf 80 % festgelegt. Aus diesen Größen wurde der Stichprobenumfang berechnet. Falls

ein Unterschied im Tailmoment von 0,3 (Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %) zwischen der Gruppe der Raucher und der Nichtraucher existiert, so müssen mindestens 12 Personen pro Gruppe untersucht werden (siehe Abbildung 2.3).

Wichtig für die Testung auf statistische Signifikanz ist, dass die statistische Einheit beim Comet Assay nicht die Zelle sondern die Probe ist [83]. Dieser Aspekt wird häufig nicht beachtet. So werden hoch signifikante Ergebnisse zwischen Gruppen erzielt, indem die Einzelwerte der ausgewerteten Zellen statt deren Mittelwert für die Berechnungen herangezogen werden. Zhu et al. [176] zum Beispiel beschreiben in einer Studie um Raucher und Nichtraucher, dass die DNA-Migration der Raucher statistisch signifikant erhöht sei. Das Tailmoment der beiden Gruppen unterscheidet sich allerdings nur geringfügig. Diese Daten legen die Vermutung nahe, dass hier die Zelle als statistische Einheit gewählt wurde.

Von Wiklund und Agurell [167] wurde vorgeschlagen, dass für die statistische Analyse von Comet Assay-Untersuchungen das Tailmoment verwendet werden sollte. In einer Simulation stellten sie fest, dass die beste Aussagekraft von logarithmierten Tailmoment-Werten ausgeht. Durch die Logarithmierung werden annähernd normalverteilte Werte erzielt. Diese Empfehlung findet jedoch weitgehend keine Berücksichtigung bei der Auswertung von Comet Assay-Untersuchungen. Meine statistischen Analysen waren alle klar negativ und auch eine Transformation der Daten durch Logarithmierung hätte zu keinem positiven Ergebnis geführt.

4.1.2 Basale DNA-Schäden (Strangbrüche und oxidative Basenschäden) bei Rauchern und Nichtrauchern

Betrachtet man die Abbildungen 3.8 und 3.9, so ist kein Unterschied der basalen DNA-Schäden der Leukozyten von Rauchern und Nichtrauchern im Comet Assay zu erkennen. In einer tschechischen Comet Assay-Studie an PAH-exponierten Polizisten und Kontrollpersonen zeigte sich auch kein Unterschied in den basalen DNA-Schäden bei Rauchern und Nichtrauchern [23]. Diese Studie hebt sich von den anderen Arbeiten auf diesem Gebiet ab, da ein Referenzstandard als Maßnahme zur Qualitätssicherung eingesetzt wurde. In der Literatur existieren zu diesem Thema jedoch widersprüchliche Daten. Während manche Autoren einen genotoxischen Effekt des Zigarettenrauchs mit dem Comet Assay nachweisen können, finden andere diesen nicht (Übersichten bei Faust et al. [44], Møller et al. [96] und Sram et al. [151]). In manchen Arbeiten haben Raucher sogar geringere DNA-Effekte als Nichtraucher [58, 77]. Für diese widersprüchlichen Ergebnisse gibt es keine einfache Erklärung und alle Erklärungsansätze bleiben

spekulativ. Eventuell ist die nachgewiesene Empfindlichkeit des Comet Assay als *in vitro*- und *in vivo*-Test nicht ausreichend für den Einsatz im Biomonitoring. Die widersprüchlichen Ergebnisse könnten dadurch zufällig entstanden sein. Der Test erfasst sensitiv DNA-Strangbrüche, die frühe Ereignisse der Mutagenese darstellen. Diese sind kurzlebig und werden gut von den Zellen repariert [142]. Der Test scheint wesentlich besser für den Nachweis von akuten und hohen Expositionen (wie bei Standardgenotoxizitätstestungen) geeignet zu sein als für chronische und geringe Expositionen, wie sie typischerweise im Biomonitoring zu erwarten sind. Ferner ist noch nicht geklärt, ob bei chronischer Belastung, z. B. durch den Zigarettenrauch, ein höherer Basalschaden („steady state“) bei Rauchern zu erwarten ist. In der tierexperimentellen Studie von Garry et al. [49] konnte ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der endotrachealen Exposition mit Benzo[a]pyren von der Rattenlunge und Comet Assay-Effekten in peripheren Lymphozyten nachgewiesen werden. Durch diese Arbeit wurde bewiesen, dass Benzo[a]pyren-induzierte DNA-Schäden mit dem Comet Assay in Leukozyten nachweisbar sind. Allerdings kann man nicht davon ausgehen, dass die akute, endotracheale Applikation von 3 mg Benzo[a]pyren der Exposition während des Zigarettenrauchens gleicht. Diese Exposition ist chronisch und deutlich geringer.

Es gibt Empfehlungen in der Literatur, dass durch den Einsatz des FPG-Proteins nicht nur die Spezifität sondern auch die Sensitivität des Comet Assay erhöht wird [3, 27]. Vergleichende Untersuchungen mit dem Comet Assay an Vollblut und isolierten Lymphozyten (Abbildung 3.18) von starken Rauchern und Nichtrauchern in An- und Abwesenheit des FPG-Proteins lieferten keinen Hinweis darauf, dass ein genotoxischer Effekt des Zigarettenrauchs über den Nachweis von DNA-Schäden mit dem FPG-Protein möglich ist. Auch eine italienische Arbeitsgruppe konnte keine erhöhten oxidativen DNA-Schäden bei Rauchern feststellen [30]. In einer umfangreichen Studie, die verschiedene Biomarker untersuchte, wurde bei den Rauchern weder ein erhöhter oxidativer DNA-Schaden im Comet Assay noch erhöhte Werte von 8-Oxoguanin mittels „high performance liquid chromatography“ (HPLC) nachgewiesen [104]. Dusinska et al. [39] hingegen zeigten, dass Raucher sowohl mehr oxidierte Purin- als auch Pyrimidinbasen aufwiesen als Nichtraucher. Ein großes Problem des FPG-modifizierten Comet Assay ist die stärkere Versuchsvariabilität, die geringe DNA-Effekte überdecken kann. Die FPG-Behandlung wird mit lysierten Zellen durchgeführt. Allein die mechanische Schädigung beim Auftragen der Enzymlösung führt zu einer verstärkten DNA-Migration im Comet Assay. Dieser Effekt muss immer mitberücksichtigt werden, indem man Präparate herstellt, die nur mit Enzym-Puffer behandelt werden. Auch in meinen Untersuchungen kann man eine geringe Zunahme der DNA-Effekte im Comet Assay

bei den Pufferkontrollen entdecken. Raucher und Nichtraucher unterscheiden sich hinsichtlich oxidativer Basenschäden weder in Leukozyten des Vollbluts noch in isolierten Lymphozyten statistisch signifikant (Abbildung 3.18). Meiner Meinung nach eignet sich der FPG-modifizierte Comet Assay nicht für Biomonitoring-Untersuchungen, da die Versuchsvariabilität noch stärker als beim unmodifizierten Comet Assay ausgeprägt ist.

Die Ursachen, warum ich keinen genotoxischen Effekt des Zigarettenrauchs mit dem Comet Assay nachweisen konnte, sind spekulativ. Ein Aspekt, der in diesem Zusammenhang diskutiert wird, ist das Passivrauchen. Meines Wissens existiert nur eine Arbeit, die den Einfluss des Passivrauchens auf das Ergebnis des Comet Assay direkt untersucht hat [78]. In dieser chinesischen Studie wurde sowohl das Rauchen als auch das Passivrauchen mit dem Comet Assay untersucht und ein geringer Einfluss des Passivrauchens auf die DNA-Migration konnte nachgewiesen werden. Da ich allerdings keinen genotoxischen Effekt des Zigarettenrauchs im Comet Assay bei starken Rauchern fand, erscheint mir der Einfluss des Passivrauchens als unplausibel. Sardas et al. [131] untersuchten Babies, deren Mütter Passivrauch ausgesetzt waren. Sie fanden bei den Kleinkindern keine erhöhte DNA-Migration im Comet Assay. Meiner Meinung nach kann das Passivrauchen nicht mit dem Comet Assay erfasst werden, da selbst starke Raucher ($>$ 20 Zigaretten am Tag) in meiner Untersuchung keine erhöhten Tailmoment-Werte aufwiesen. Die Exposition mit genotoxischen Substanzen des Zigarettenrauchs beim gelegentlichen Passivrauchen ist viel geringer als beim aktiven Rauchen und ist daher meiner Meinung nach nicht mit dem Comet Assay nachweisbar.

Mein Comet Assay-Protokoll weist sensitiv BPDE-induzierte DNA-Schäden in Leukozyten ab 1 μM nach. Eventuell ist die BPDE-Konzentration in den Leukozyten der Raucher geringer, so dass ein vorhandener DNA-schädigender Effekt übersehen wird. Eventuell sind andere Zellen stärker exponiert und daher besser geeignet um einen genotoxischen Effekt des Zigarettenrauchs zu untersuchen. In Mundschleimhautzellen zum Beispiel wiesen Osswald et al. [107] eine stärkere DNA-Migration bei Rauchern als bei Nichtrauchern nach. Diesen Effekt fanden auch Rojas et al. [129]. Aus einer anderen Studie derselben Arbeitsgruppe geht allerdings hervor, dass eine erhöhte DNA-Migration von Personen, die hoher Luftverschmutzung ausgesetzt waren, nicht in Mundschleimhautzellen sondern in Nasenschleimhautzellen gefunden wurde [160]. Eine deutlich erhöhte DNA-Wanderung in Nasenschleimhautzellen im Comet Assay bei Rauchern fanden auch Gluck und Gebers [52]. Rojas et al. [128] berichten auch, dass Tränennasengangzellen für Biomonitoring-Untersuchungen durchaus geeignet sind. Alle diese Zelltypen stellen potenzielle Zielzellen für die Untersuchungen der Genotoxizität

des Zigarettenrauchs dar. Die Zellen sind aber teilweise sehr heterogen, was sich negativ auf die Qualität der Präparate auswirkt. Außerdem ist deren Entnahme nicht immer ganz schmerzfrei, was diese Zellen für den Einsatz im Biomonitoring eher unpraktikabel erscheinen lässt.

In meiner Studie wurde sehr auf die Qualität der Durchführung des Comet Assay geachtet und ich konnte keinen genotoxischen Effekt des Zigarettenrauchs nachweisen. Um der Klärung der Frage nach dem Nachweis eines genotoxischen Effekts des Zigarettenrauchs nachzugehen, führte ich daher auch eine Meta-Analyse an bisher publizierten Studien durch. Für die Meta-Analyse wurden nur Studien herangezogen, die Untersuchungen an peripheren Leukozyten durchführten. Dieser Ansatz wird hauptsächlich im Biomonitoring verwandt. Ferner wurden nur Arbeiten berücksichtigt, die das Standardprotokoll des alkalischen Comet Assay verwendet haben. Es wäre durchaus denkbar, dass die Berücksichtigung von oxidativen Schäden den Comet Assay sensitiver machen könnte. Ich kann jedoch sagen, dass die Testvariabilität des Comet Assay mit dem FPG-Protein wesentlich größer ist als beim Standardprotokoll. Außerdem existieren in der Literatur nur wenige Arbeiten, die Leukozyten von Rauchern mit dem FPG-modifizierten Comet Assay untersucht haben. Die Ergebnisse der in die Meta-Analyse einfließenden Biomonitoring-Studien wurden normiert und anschließend zusammengefasst. Die Meta-Analyse kommt zu dem Schluss, dass der Zigarettenrauch die DNA-Migration im Comet Assay statistisch signifikant erhöht (siehe Abbildung 3.34).

Interessanterweise verliert sich dieser Effekt, wenn man die Analyse aufteilt. Der Einfluss des Rauchens im Comet Assay war nur eindeutig ausgeprägt bei Studien, die den Zigarettenrauch als direkte Expositionsquelle betrachteten („Typ A“-Studien). Die „Typ B“-Studien, welche das Rauchen als potenziellen Störfaktor mit untersucht haben, finden keinen Einfluss des Zigarettenrauchs im Comet Assay. Dieser Gegensatz ist überraschend, da es keinen fundamentalen Unterschied zwischen den Studien gibt. Es ist denkbar, dass die statistische Power der „Typ A“-Studien höher ist, da diese Studien geplant wurden, um Unterschiede zu entdecken. Ferner liegt die durchschnittliche Raucheranzahl bei „Typ A“-Studien (20 Personen) über denen der „Typ B“-Studien (15 Personen). Allerdings wurden in den „Typ B“-Studien mehr als doppelt so viele Personen untersucht als in den „Typ A“-Studien. Dies sollte die geringere statistische Power der „Typ B“-Studien kompensieren. Außerdem haben die Konfidenzintervalle der beiden Studientypen ungefähr die gleiche Größe, was auch auf eine Vergleichbarkeit der Gruppen hindeutet.

Des Weiteren zeigten Studien, die ein Bildanalysesystem für die Auswertung benutzten oder eine exakte Längenmessung durchführten, keine erhöhte DNA-Migration

im Comet Assay. Studien, die durch Bildung eines „Scores“ ausgewertet wurden, finden allerdings einen genotoxischen Effekt des Zigarettenrauchs. Auch dieser Befund ist auf den ersten Blick überraschend, da die visuelle Auswertung nicht sensitiver als die exakte Auswertung ist. Eine vergleichende Untersuchung mit Bildanalyse und „Score“-Bildung von Objektträgern zeigte, dass beide Auswertemethoden relativ gut übereinstimmen [28]. Die visuelle Auswertung wies allerdings eine etwas geringere Sensitivität auf. Um eine vergleichbare Sensitivität bei beiden Auswertemethoden zu erzielen, müssen wesentlich mehr Individuen bei der „Score“-Methode untersucht werden. In meiner Meta-Analyse ist das jedoch nicht der Fall. Die Studien, die das Bildanalysesystem und exakte Längenmessungen verwendet haben, bestanden durchschnittlich aus 20 Personen pro Gruppe, die „Score“-Studien nur aus 15 Probanden pro Gruppe. Außerdem wurden auch bei kleinen Studien positive Ergebnisse berichtet [6, 87].

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass eine Meta-Analyse über 38 Studien eine erhöhte DNA-Migration bei Rauchern statistisch signifikant im Comet Assay nachweist. Dieser positive Befund wird allerdings durch die Tatsache relativiert, dass der Effekt vorwiegend in Studien entdeckt wurde, die das Rauchen als direkte Exposition untersuchten und die visuelle Auswertemethoden benutzten. Meiner Meinung nach müsste ein „echter“ genotoxischer Effekt des Zigarettenrauchs klar in jeder Art von Studie und mit jeder Auswertemethode nachzuweisen sein. Die Tatsache, dass das klar positive Ergebnis der Meta-Analyse durch Gruppenbildung verschwindet, legt die Vermutung nahe, dass es zusätzliche unbekannte Faktoren gibt, die die Ergebnisse beeinflussen. Anhand einer „Funnel Plot“-Analyse wird deutlich (Abbildung 3.35), dass es ein Publikationsbias zu Gunsten von positiven, großen Studien gibt.

4.1.3 Mutagensensitivität bei Rauchern und Nichtrauchern

Unter Mutagensensitivität versteht man die unterschiedliche Toleranz von Zellen gegenüber Mutagenen. Für die Untersuchung der Mutagensensitivität wählte ich BPDE und γ-Strahlung als Expositionsquellen. Für BPDE entschied ich mich, da der aktive Metabolit des Benzo[a]pyrens zu den wichtigsten Mutagenen/ Kanzerogenen im Zigarettenrauch gehört. Obwohl im Vollblut eine deutliche *Cyp1A1*-Expression nachgewiesen wurde [35], zeigte sich, dass die Exposition von Leukozyten mit Benzo[a]pyren nicht zu einer deutlichen Erhöhung der DNA-Migration im Comet Assay führt. Daher verwendete ich den aktiven Metaboliten BPDE. BPDE induziert hauptsächlich DNA-Addukte. Es wurden auch Untersuchungen zur Mutagensensitivität mit γ-Strahlung durchgeführt. Ionisierende Strahlung wird häufig für die Untersuchung von Mutagensensitivität verwendet [133, 175]. γ-Strahlung führt zu DNA-Strangbrüchen und oxidativen

Basenschäden. Somit wird ein breites Spektrum an DNA-Schäden und Reparaturmechanismen abgedeckt, das sich eventuell bei Rauchern und Nichtrauchern unterscheiden könnte. Die Addukte werden über die NER, die oxidativen Basenschäden über die BER und die Strangbrüche über die DSB-Reparatur entfernt. Meine Ergebnisse (Abbildungen 3.10 und 3.11) zeigen deutlich, dass es keine Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern in der Mutagensensitivität gegenüber BPDE und γ-Strahlung gibt. Allerdings finden mehrere Arbeitsgruppen eine erhöhte Sensitivität der Raucher gegenüber BPDE, Bleomycin und anderen Mutagenen bei verschiedenen genetischen Endpunkten (Übersicht bei Au et al. [9]). Diese Befunde lassen den Schluss zu, dass die Reparaturmechanismen der Raucher durch die permanente Belastung mit Schadstoffen überlastet sein könnten. Diese Vermutung wurde durch meine Untersuchungen nicht bestätigt. Wu et al. [171] finden zum Beispiel geringfügig erhöhte Chromosomenaberrationsraten in Leukozyten von Rauchern nach BPDE-Inkubation. Schabath et al. [133] entdeckten bei der Untersuchung von Blasenkrebspatienten mit dem Comet Assay eine erhöhte Sensitivität gegenüber γ-Strahlung, nicht allerdings gegenüber BPDE. Ferner wurden unterschiedliche Bleomycin-Sensitivitäten bei Rauchern und Nichtrauchern mit dem Comet Assay nachgewiesen [136] und auch Lungenkrebspatienten unterschieden sich hinsichtlich ihrer Mutagensensitivität von Kontrollpersonen. Dieser Befund wurde in einer zweiten Studie derselben Gruppe bestätigt [125]. Die Bleomycin-induzierte Mutagensensitivität ist für mich sehr von Interesse, da Bleomycin ein Radiomimetikum ist und somit hauptsächlich DNA-Doppelstrangbrüche induziert. Warum andere Gruppen Unterschiede in der Induzierbarkeit von Doppelstrangbrüchen bei Rauchern und Nichtrauchern mit dem Comet Assay finden, bleibt unklar. Meist fehlen bei den publizierten Studien Angaben darüber, ob das Ergebnis unabhängig reproduziert werden konnte und ob die Auswertung der Präparate blind erfolgte. Auch die Tatsache, dass bei vielen Studien kein Referenzstandard benutzt wurde, macht es schwer, die Qualität der Studien zu beurteilen.

4.1.4 Reparaturaktivität bei Rauchern und Nichtrauchern

Ein weiterer Ansatz, um Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern im Comet Assay nachzuweisen, ist die Untersuchung von Reparaturaktivitäten. Die genotoxische Wirkung von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen im Zigarettenrauch wird hauptsächlich durch DNA-Addukte hervorgerufen. Dieser Schadenstyp wird im Comet Assay hauptsächlich indirekt erfasst. Während der Alkalidenaturierung bricht die DNA an den Stellen, an denen sich die Addukte befinden. Diese Stellen werden als alkalilabile Stellen (ALS) bezeichnet. Wesentlich sensitiver scheinen Untersuchungen

der Reparaturaktivität der Zellen zu sein [23, 119, 169], da durch aktive Reparatur DNA-Strangbrüche erzeugt werden. Das Reparaturverhalten der Leukozyten von Rauchern und Nichtrauchern wurde anhand von zwei Protokollen untersucht. Dabei wurden sowohl Reparaturkinetiken der Leukozyten verfolgt, als auch die Reparaturkapazitäten von Leukozyten bei Rauchern und Nichtrauchern bestimmt. Unter einer Reparaturkinetik versteht man die zeitliche Abnahme von DNA-Effekten der Leukozyten im Comet Assay nach Mutagenexposition. Um Reparaturkapazitäten bestimmen zu können, werden Leukozyten mit Reparaturinhibitoren inkubiert, die zu einer Akkumulation von Reparatureinschnitten führen. Umso stärker die Reparaturkapazität der Zellen ist, desto größer sind die DNA-Effekte im Comet Assay. Um eine Reparaturkinetik der Leukozyten verfolgen zu können, wurden diese *ex vivo* mit BPDE oder ionisierender Strahlung behandelt. Unter physiologischen Bedingungen kommt es zur Reparatur. Solche physiologischen Vorgänge sind schwer zu interpretieren, da es Mechanismen gibt, die im Comet Assay zu genau gegensätzlichen Effekten führen, welche sich teilweise aufheben können. DNA-Schädigung führt zu einer Erhöhung der Comet Assay-Parameter. Auch aktive Reparatur erhöht die DNA-Migration im Comet Assay. Erst bei vollständiger Reparatur der Schäden geht die DNA-Migration zurück. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Reparatur wurden Proben entnommen und in den Comet Assay eingesetzt. Diese Zeitpunkte wurden in Vorversuchen bestimmt. Die Abbildungen 3.12 und 3.13 zeigen die Reparaturkinetiken nach Schadensinduktion durch BPDE und ionisierender Strahlung. Nach BPDE-Exposition blieb die DNA-Migration im Comet Assay über eine Stunde relativ konstant. Diese Beobachtung lässt sich dadurch erklären, dass aktive Reparatur mit Exzissionseinschnitten stattgefunden hat, die die DNA-Migration auf hohem Niveau hält. Die entstandenen BPDE-DNA-Addukte werden über die NER, die zu DNA-Einschnitten führt, entfernt. Die Unterschiede bezüglich der Reparaturkinetiken zwischen Rauchern und Nichtrauchern waren nicht statistisch signifikant, so dass davon auszugehen ist, dass es keine unterschiedliche Mutagensensitivität gibt. Die DNA-Schäden, die durch ionisierende Strahlung induziert wurden, waren bereits nach 15 Minuten sowohl bei Rauchern als auch bei Nichtrauchern stark minimiert. Die DSB-Reparatur ist ein sehr schneller Reparaturmechanismus und die meisten Schäden werden bereits wenige Minuten nach der Exposition entfernt. Nach der ersten sehr schnellen Reparaturantwort verläuft die DSB-Reparatur allerdings langsamer und das Basisniveau wird erst nach längerer Zeit erreicht. Die Verlangsamung der Reparatur ist auch an meinem Messwert nach 30 Minuten zu erkennen. Auch nach γ-Strahlung war kein statistisch signifikanter Unterschied in der Mutagensensitivität der Leukozyten von Rauchern und Nichtrauchern vorhanden. Insgesamt lässt sich anhand der Reparaturki-

netiken sagen, dass in meiner Untersuchung die DNA-Migration nach BPDE-Exposition wesentlich langsamer verringert wird als nach Exposition mit γ-Strahlung. Raucher und Nichtraucher unterschieden sich hinsichtlich ihrer Reparaturkinetiken nicht. Cebulska-Wasilewska et al. [23] fanden unterschiedliche Reparaturkinetiken bei PAH-exponierten Straßenpolizisten und Kontrollpersonen nach Röntgenbestrahlung. Besonders bei den exponierten Straßenpolizisten zeigten sie, dass das Rauchen die zelluläre Reparatur reduziert. Bei den Kontrollpersonen wurde jedoch nur ein nicht statistisch signifikanter, sehr geringer Effekt des Zigarettenrauchens beschrieben. Dennoch empfehlen die Autoren die Untersuchung von Reparaturkinetiken für PAH-induzierte DNA-Schäden. Da sich aber auch im Zigarettenrauch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe befinden und sie die DNA-Effekte dieser Substanzen im Comet Assay nicht bei den Kontrollpersonen nachweisen konnten, eignet sich dieses Protokoll meiner Meinung nach nicht für den Einsatz im Biomonitoring. Die Arbeitsgruppe von Müller et al. untersuchte ebenfalls Reparaturkinetiken bei Tumorpatienten und Kontrollpersonen [98]. Auch Sie fanden nach 2 Gy-Bestrahlung der Lymphozyten keinen Raucher-Status-abhängigen Unterschied. Eine positive Korrelation zwischen dem Rauchen und der Reparaturkinetik fand Vodicka et al. nach Bestrahlung der Lymphozyten mit 5 Gy bei Arbeitern einer Reifenfabrik [163]. Von der gleichen Arbeitsgruppe wurde im selben Jahr noch eine Studie zur Untersuchung von Reparaturkinetiken veröffentlicht, in welcher eine größere Probandenzahl untersucht wurde. Diese Studie konnte die erhöhte Reparaturaktivität in Leukozyten der Raucher jedoch nicht bestätigen [164]. Auch wurden Reparaturaktivitäten von Rauchern und Nichtrauchern nach UV-Bestrahlung untersucht [99]. 10 Minuten nach Expositionsende wiesen die Zellen der Raucher eine statistisch signifikant erhöhte Reparaturaktivität auf, die sich aber 30 Minuten nach Exposition abschwächte. Es wurden aber auch verringerte Reparaturaktivitäten bei Rauchern berichtet [136]. Eine zweite Studie derselben Gruppe bestätigte die reduzierte Reparaturaktivität bei Rauchern nach Bleomycin-Exposition [125]. Bisher ist man davon ausgegangen, dass das Rauchen Reparaturenzyme induziert und somit andere Schäden relativ schnell repariert werden. Dies sollte zu relativ hohen Reparaturaktivitäten bei Rauchern führen. Dieser adaptive Schutz wird vor allem für oxidative DNA-Schäden vermutet, da Nia et al. bei Rauchern weniger oxidierte Pyrimidinbasen fand als bei Nichtrauchern [104]. Diese These wird jedoch durch die widersprüchlichen Daten in Frage gestellt. Die Ergebnisse aus meiner Arbeit zeigen, dass der Comet Assay nicht eindeutig in der Lage ist, Unterschiede bezüglich der Reparaturkinetiken in Leukozyten von Rauchern und Nichtrauchern festzustellen.

Ferner wurde die Reparaturkapazität der Zellen von Rauchern und Nichtrauchern

bestimmt. Der Reparaturinhibitor Aphidicolin hemmt die DNA-Polymerasen α, δ und ϵ. Bei der Reparatur von DNA-Schäden erfolgt der DNA-Einschnitt, der zu Einzelstrangbrüchen führt. Die Neusynthese der DNA wird in Gegenwart von Aphidicolin gehemmt, da es an die Polymerase bindet und sie funktionsunfähig macht [24]. Ein weiterer DNA-Reparaturinhibitor ist das AraC. Es wird in der Zelle phosphoryliert und in die DNA eingebaut. Kommt es nun zur Reparatur, so werden die Polymerasen α und β an den Stellen des eingebauten AraC gehemmt. Werden also Reparaturmechanismen in der Zelle in Gegenwart der Hemmstoffe Aphidicolin und AraC induziert, kommt es zur Akkumulation von Exzissionseinschnitten, die die DNA-Migration im Comet Assay erhöhen. Durch die Inkubation der Leukozyten mit Aphidicolin konnte kein Unterschied bezüglich der Reparaturkapazität von Rauchern und Nichtrauchern festgestellt werden (Abbildung 3.14). Das Fehlen eines Unterschiedes kann nicht auf eine schlechte Sensitivität des Aphidicolins zurückgeführt werden, denn in Vorversuchen wurde gezeigt, dass Aphidicolin die Reparatur von verschiedensten DNA-Schäden äußerst sensitiv hemmt [145]. Eine italienische Arbeitsgruppe zeigte, dass Unterschiede in den Reparaturkapazitäten von Personen, die gegenüber PAHs exponiert waren, und Kontrollpersonen erst nach 16-stündiger Inkubation nachweisbar waren [30]. Es könnte also sein, dass das Fehlen eines Unterschieds in den Reparaturkapazitäten von Rauchern und Nichtrauchern aufgrund eines nicht optimalen Zeitprotokolls hervorgerufen wurde. Nach 16-stündiger Inkubation mit Aphidicolin und AraC wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede in der DNA-Migration im Comet Assay bei Rauchern und bei Nichtrauchern nachgewiesen (siehe Abbildungen 3.15 und 3.16).

Nach Behandlung der Leukozyten mit BPDE wurden keine Unterschiede in der Reparaturkapazität bei Rauchern und Nichtrauchern entdeckt (siehe Abbildung 3.17). Durch weitere Arbeiten muss sichergestellt werden, dass der Zeitpunkt der APC-Inkubation optimal war, damit keine geringen Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern übersehen werden. Des Weiteren müssen große und gut geplante Studien einen potenziellen Unterschied hinsichtlich der Reparaturkapazitäten von Leukozyten bei Rauchern und Nichtrauchern aufklären. Es muss ferner der Frage nachgegangen werden, ob geringe Unterschiede in den Reparaturkapazitäten von biologischer Relevanz sind.

4.2 Assoziation von genetischen Polymorphismen und Comet Assay-Befunden

Viele Untersuchungen deuten darauf hin, dass genetische Polymorphismen von Genen des Fremdstoffmetabolismus und der DNA-Reparatur die Ergebnisse von Genotoxizi-

tätstests beeinflussen können. Es wurde daher von Au et al. [10] empfohlen, die Polymorphismen der *Glutathion-S-Transferase M1* und des *Cytochrom P450 1A1* in die Biomonitoring-Untersuchungen mit einzubeziehen. In einem Übersichtsartikel über das Krebsrisiko von Rauchern wird angeregt, neben Polymorphismen in fremdstoffmetabolisierenden Genen auch Polymorphismen in Reparaturgenen zu untersuchen [172]. Der Einfluss dieser Varianten auf die Induzierbarkeit von DNA-Schäden im Comet Assay ist noch unklar, da in der Literatur widersprüchliche Daten existieren. In meiner Arbeit wurden Polymorphismen der Gene *GSTM1, Cyp1A1, Cyp2E1, XPD, XRCC1* und *XRCC3* bei den Probanden typisiert. Die Genotypen wurden mit den Comet Assay-Befunden assoziiert, um einen möglichen Einfluss der Polymorphismen aufzudecken. Außerdem wurde untersucht, ob sich durch die Berücksichtigung der Genotypen Unterschiede in den DNA-Schäden von Rauchern und Nichtrauchern ergeben. Ich entschied mich für diese Gene, da sie entweder an der Verstoffwechselung von Substanzen im Zigarettenrauch (*GSTM1, Cyp1A1, Cyp2E1*) oder an der Reparatur von Rauch-induzierten DNA-Schäden (*XPD, XRCC1*) beteiligt sind. Darüber hinaus gehören sie zu den am häufigsten untersuchten Polymorphismen und es existieren mehrere Publikationen, die einen Einfluss dieser Polymorphismen auf verschiedene genetische Endpunkte nachwiesen. Es gibt in der Literatur viele Hinweise, dass auch Polymorphismen des *XRCC3*-Gens das Ergebnis des Comet Assay beeinflussen könnten. Deshalb wurde in meiner Arbeit auch ein Polymorphismus im *XRCC3*-Gen untersucht. Allerdings ist das XRCC3-Protein an der Doppelstrangbruchreparatur beteiligt und sollte keinen Einfluss auf Zigarettenrauch-induzierte Comet Assay-Effekte haben.

Genetische Polymorphismen sind verschiedene Varianten eines Gens, die durch Mutationen entstanden sind und die bei mindestens 1 % der jeweiligen Population vorkommen. Diese Mutationen haben allerdings für das Individuum keine starken negativen Auswirkungen, so dass sie weitervererbt werden, da kein Selektionsdruck auf ihnen lastet. Unter Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen versteht man Einzelbasenaustausche der DNA, die zu einem veränderten Restriktionsmuster führen. Polymorphismen können aber auch Deletionen sein (z. B. *Glutathion-S-Transferase M1*). Den Einfluss von Polymorphismen auf diverse Prozesse erklärt man sich durch eine veränderte Enzymaktivität, die durch Aminosäurenaustausche zu Stande kommen. Polymorphismen in aktiven Zentren von Enzymen können so die Substratbindung verbessern oder verschlechtern. Im Zuge von Suszeptibilitätsuntersuchungen wird genetischen Polymorphismen große Bedeutung beigemessen. Interindividuell unterschiedliche Suszeptibilitäten führen bei gleicher Schadstoffbelastung zu unterschiedlichen Gesundheitsrisiken. Enzympolymorphismen haben deshalb bei der Prävention und der Abschätzung von

schadstoffbedingten Gesundheitsrisiken große Bedeutung.

Polymorphismen in Genen des Fremdstoffwechsels

Ca. 50 % der kaukasischen Bevölkerung haben den *GSTM1*-null-Genotyp. Eine ähnliche Allelfrequenz fand ich auch in meiner Arbeit. Der *GSTM1*-null-Genotyp wurde mit der Entstehung von Lungen-, Blasen- und Darmkrebs assoziiert. Außerdem waren Protein-Addukte und Schwesterchromatidaustauschraten mit dem *GSTM1*-Genotyp assoziiert. Es wurde ferner gezeigt, dass die Exkretion von PAH-Metaboliten bei *GSTM1*-positiven Individuen stärker war als bei Nichtträgern (Übersichten bei Pavanello und Clonfero [112], Sram [149] und Wu et al. [172]). Sram et al. [150] fanden erhöhte DNA-Adduktmengen bei *GSTM1*-negativen Müttern, die starker Luftverschmutzung durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe ausgesetzt waren. Auch bei Kokerei-Arbeitern, die gegenüber PAH exponiert waren, wurden signifikant erhöhte DNA-Adduktmengen bei *GSTM1*-negativen Individuen festgestellt [114]. Eine weitere Studie an PAH-exponierten Kokerei-Arbeitern konnte diesen Befund reproduzieren [162], eine dritte Studie hingegen nicht [161]. Laut Kato et al. [73] wiesen PAH-exponierte *GSTM1*-null-Träger vermehrt das PAH-dGMP-Addukt auf. Es gibt aber auch mehrere Publikationen, die keinen Einfluss des *GSTM1*-Genotyps auf PAH-bedingte Adduktmengen finden. Peluso et al. [115] fanden zwar erhöhte Mengen von DNA-Addukten in Lymphozyten von Rauchern, ein Einfluss des Genotyps der *Glutathion-S-Transferase M1* wurde allerdings nicht nachgewiesen. Ich untersuchte den Einfluss des Polymorphismus auf die DNA-Migration im Comet Assay bei Rauchern, die u. a. dem polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoff Benzo[a]pyren im Zigarettenrauch ausgesetzt waren, und Nichtrauchern und fand keine Assoziation (siehe Abbildung 3.21). Das Fehlen eines Effektes des Polymorphismus kann nicht auf die Studiengröße zurückzuführen sein, die mit 142 Personen ausreichend groß war. Generell lässt sich sagen, dass es bisher in Comet Assay-Untersuchungen keinen Hinweis darauf gibt, dass der *GSTM1*-Genotyp die DNA-Migration beeinflusst. So zeigten Sram et al. [151] an schwangeren Frauen, die gegenüber PAHs durch starke Luftverschmutzung exponiert waren, dass der *GSTM1*-Genotyp das Comet Assay-Ergebnis nicht beeinflusst. Auch Polasa et al. [120] fanden keinen Zusammenhang zwischen dem *GSTM1*-Genotyp und der DNA-Migration im Comet Assay nach Benzo[a]pyren-Exposition bei Rauchern und Nichtrauchern. Mit dem Comet Assay wurde ferner kein Zusammenhang zwischen dem *GSTM1*-Polymorphismus und der DNA-Migration in Lymphozyten von PAH-exponierten Arbeitern in der Graphitelektroden- bzw. Reifenindustrie [89, 163] und bei Straßenverkehrspolizisten [22] nachgewiesen. Neben den Studien, die den Einfluss

des *GSTM1*-Polymorphismus auf das Ergebnis des Comet Assay nach Exposition mit polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen untersuchten, wurden auch andere Expositionsquellen untersucht. In einer Studie wurden Arbeiter einer Schuhfabrik, die regelmäßig gegenüber organischen Lösungsmitteln wie z. B. Toluol exponiert waren, untersucht und kein Einfluss des polymorphen *GSTM1*-Gens auf den Comet Assay entdeckt [118]. Falls der *GSTM1*-Polymorphismus einen Einfluss auf den Comet Assay ausübt, sollte dieser sehr gering sein. Die Funktion der Glutathion-S-Transferase M1 muss meiner Meinung nach von anderen Enzymen übernommen werden. Nur so erklärt sich die hohe Inzidenz des Polymorphismus in der Bevölkerung. Ob der Comet Assay allerdings in der Lage ist, diese sehr geringen Effekte nachzuweisen ist äußerst fraglich. Weitere Untersuchungen müssen klären, ob andere Methoden mit geringerer Nachweisgrenze, wie z. B. das ^{32}P-Postlabeling zur Bestimmung von DNA-Addukten, besser geeignet sind, um individuelle Suszeptibilität zu untersuchen, die eventuell auf dem *GSTM1*-Genotyp beruht.

Das Cytochrom P450 1A1 ist an der Giftung von Benzo[a]pyren zum BPDE beteiligt. Auch dieses Enzym ist polymorph [172]. Der Ile462Val-Polymorphismus in Exon 7 des *Cyp1A1*-Gens tritt in der japanischen Bevölkerung relativ häufig (> 30 %), in der kaukasischen Bevölkerung jedoch nur sehr selten auf (< 10 %). In meiner Studienpopulation trugen 131 Personen homozygot das Wildtypallel und nur 11 Personen waren heterozygot. Der Aminosäureaustausch von Isoleucin nach Valin soll zu einer erhöhten Enzymaktivität des Cyp1A1 führen, welche mit einem erhöhten Lungenkrebsrisiko bei japanischen Rauchern und Passivrauchern assoziiert ist [61, 106]. Die Assoziationsstudien in der kaukasischen Bevölkerung fallen hingegen widersprüchlich aus (Übersicht bei Wu et al. [172], Pavanello und Clonfero [112]). In vielen Studien wurde der Einfluss des Polymorphismus auf verschiedene genetische Endpunkte untersucht. Eine positive Assoziation fanden zum Beispiel Carere et al. [22]. Sie genotypisierten Polizisten, die während ihrer Arbeit polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen ausgesetzt waren, bezüglich des *Cyp1A1*-Polymorphismus und fanden eine statistisch signifikante Assoziation zwischen dem Polymorphismus und Schwesterchromatidaustauschraten. Auch bezüglich eines Zusammenhangs zwischen dem Polymorphismus und DNA-Adduktmengen wurden Studien durchgeführt. Peluso et al. [115] entdeckten keinen Einfluss des varianten *Cyp1A1*-Allels auf die Adduktmengen in Nasen- bzw. Bronchialzellen und Lymphozyten bei Rauchern und Nichtrauchern. Mit dem Comet Assay wurde bisher in nur wenigen Studien der Einfluss des Polymorphismus untersucht. Deshalb führte ich Experimente bei PAH-exponierten Rauchern und Nichtrauchern durch. In meiner Studienpopulation zeigte sich keine Assoziation zwischen dem vari-

anten *Cyp1A1*-Allel und der DNA-Migration im Comet Assay (siehe Abbildung 3.23). Allerdings ist dieser Befund aufgrund der geringen Allelfrequenz nur eingeschränkt gültig. Auch in der Literatur existieren Arbeiten, die keinen Einfluss des Polymorphismus auf die DNA-Wanderung im Comet Assay nachweisen konnten. In einer Studie an Arbeitern einer Reifenfabrik, die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen und organischen Lösungsmitteln, wie z. B. Styrol, ausgesetzt waren, wurde auch keine Assoziation zwischen dem Polymorphismus und der DNA-Migration im Comet Assay nachgewiesen [163]. Und auch bei Gärtnern, die häufig Pestizide versprühten, wurde kein Zusammenhang zwischen der DNA-Migration im Comet Assay und dem *Cyp1A1*-Genotyp gefunden [94]. In den beiden negativen Assoziationsstudien ([94, 163]) wurden auch nur wenige, 110 bzw. 45, Kaukasier untersucht, so dass aufgrund der geringen Allelfrequenz die Aussagekraft der Assoziationsstudie eher als gering einzuschätzen ist. Weitere große gut geplante Studien sind nötig, um einen möglichen Einfluss des *Cyp1A1*-Polymorphismus auf die DNA-Wanderung im Comet Assay zu untersuchen. Die Untersuchung von zu kleinen Populationen könnte zu Zufallsbefunden führen, die die widersprüchliche Datenlage in der Literatur erklären.

Das *Cytochrom P450 2E1* ist an der Metabolisierung von vielen indirekten Kanzerogenen, wie z. B. Nitrosaminen im Zigarettenrauch, und kleinen organischen Verbindungen, wie Ethanol und Benzol, beteiligt. Auch für das *Cyp2E1*-Gen sind Polymorphismen beschrieben worden [60]. Ähnlich dem Polymorphismus des *Cyp1A1*-Gens ist auch der *Cyp2E1*-Polymorphismus sehr selten in der kaukasischen Bevölkerung, in der orientalischen Bevölkerung jedoch relativ häufig. Unter den 102 untersuchten Probanden aus meiner Studie waren nur 7 Personen heterozygot für den Polymorphismus. Der Polymorphismus des *Cyp2E1*-Gens liegt in der 5'-untranslatierten Region des Gens und mehrere Punktmutationen sind dort durch Sequenzierung beschrieben worden [60]. Der Promotor liegt bei allen Varianten unverändert vor. Der Polymorphismus beeinträchtigt die Bindung von trans-aktivierenden Faktoren und führt daher zu einer unterschiedlichen *Cyp2E1*-Expression je nach Genotyp [61]. In der Literatur existieren viele Assoziationsstudien, die den Einfluss des Polymorphismus auf diverse genetische Endpunkte untersuchen und zu widersprüchlichen Ergebnissen kommen. So wurde zum Beispiel in einer japanischen Arbeit gezeigt, dass es eine Assoziation zwischen dem *Cyp2E1*-Genotyp und der basalen Mikronukleusfrequenz gibt [70]. Aufgrund der hohen Allelfrequenz des *Cyp2E1*-Polymorphismus in der asiatischen Bevölkerung erscheint mir diese Assoziation plausibel. Auch wurde der Einfluss des Polymorphismus auf DNA-Adduktmengen untersucht. Kato et al. [73] wiesen zum Beispiel erhöhte DNA-Adduktmengen, vor allem das 7-methyl-dGMP-Addukt, in Lungenge-

weben von Krebspatienten mit dem varianten Allel nach. Eine Assoziation zwischen dem *Cyp2E1*-Polymorphismus und einem anderen genetischen Endpunkt, den Schwesterchromatidaustauschraten, wiesen Carere et al. [22] bei PAH-exponierten Straßenpolizisten nach. In einer anderen Studie wurde auch der Einfluss des Polymorphismus auf Schwesterchromatidaustauschraten von PHA-exponierten Arbeitern einer Reifenfabrik untersucht [163]. Diese Untersuchung jedoch konnte keinen statistisch signifikanten Einfluss nachweisen. Es wurde ferner untersucht, ob der Polymorphismus mit der Konzentration von Fremdstoffmetaboliten im Urin assoziierte. Kawamoto et al. [74] zeigten in einer Studie, dass es keinen Zusammenhang zwischen der Exkretion von Metaboliten des Toluols und dem *Cyp2E1*-Polymorphismus gibt. Meines Wissens nach gibt es keine Untersuchungen mit dem Comet Assay, die eine durch den *Cyp2E1*-Genotyp hervorgerufene Suszeptibilität untersuchten. Deshalb bin ich dieser Frage nachgegangen. Da sich in meiner untersuchten Gruppe allerdings nur 7 heterozygote Personen bezüglich des Polymorphismus in *Cyp2E1* befanden, kann ich keine verlässliche Aussage über dessen Einfluss auf den Comet Assay treffen.

Ob der Einfluss eines einzelnen Polymorphismus in Biomonitoring-Untersuchungen nachzuweisen ist, ist fragwürdig. Deshalb werden in immer mehr Untersuchungen Kombinationen von Polymorphismen untersucht. Besonders die Kombination der Polymorphismen von *Cyp1A1* und *GSTM1* ist interessant. *Cyp1A1* ist ein Phase I-Enzym, *GSTM1* ein Phase II-Enzym. Beide Enzyme sind an dem Abbau von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen beteiligt. Es ist durchaus denkbar, dass manche Polymorphismenkombinationen den PAH-Abbau wenig beeinflussen, andere hingegen können den PAH-Abbau behindern. Auch über synergistische Effekte von Polymorphismenkombinationen wird spekuliert [172]. So weisen vor allem japanische Arbeitsgruppen einen starken Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus des *Cyp1A1*-Gens in Kombination mit dem *GSTM1*-null-Genotyp und Lungenkrebs nach [172]. Interessanterweise werden aber in den verschiedenen Studien einmal der Ile-Val- und ein anderes Mal der Val-Val-Polymorphismus des *Cyp1A1* mit Lungenkrebs assoziiert. Meiner Meinung nach relativiert dieser Befund die Assoziation. Bei einem „echten“ Zusammenhang dürfte immer nur ein Genotyp die Assoziation hervorrufen. Die Ursache dieser Diskrepanz könnte die meist kleinen Studiengröße sein. In einer Meta-Analyse über 14 Fall-Kontroll-Studien aus der kaukasischen Bevölkerung wurde auch eine Assoziation der beiden Polymorphismen mit dem Auftreten von Lungenkrebs bei Nichtrauchern festgestellt [67]. In dieser Analyse flossen die Daten von 302 Patienten und 1631 Kontrollpersonen ein. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass von der Untersuchung einzelner Polymorphismen mit dem Comet Assay abzuraten ist, da deren Einfluss auf die

DNA-Migration als sehr gering einzuschätzen ist. Erfolgversprechender erscheint die kombinierte Untersuchung möglichst vieler Polymorphismen. Diese Vermutung muss aber in weiteren großen und gut geplanten Studien noch geklärt werden.

Polymorphismen in Reparaturgenen

Das menschliche Genom besteht in etwa aus drei Milliarden Basenpaaren und kodiert für mehr als 30000 Gene. Die DNA ist ständig endogenen und exogenen chemischen Angriffen ausgesetzt, die zu Mutationen führen können. Nur durch das Vorhandensein von effektiven Reparaturmechanismen kann die genetische Stabilität aufrechterhalten werden. Die Nukleotidexzissionsreparatur entfernt DNA-Addukte, die u. a. durch PAHs im Zigarettenrauch hervorgerufen werden. Die Basenexzissionsreparatur ist an der Beseitigung von modifizierten Basen beteiligt. Dies können z. B. oxidierte Basen sein, die durch das Zigarettenrauchen entstehen. Basenfehlpaarungen werden mittels der „Mismatch"-Reparatur entfernt. Ferner gibt es die Doppelstrangbruchreparatur, die in die homologe Rekombination und in das nicht homologe „End joining" unterteilt wird. Mutationen in Reparaturgenen führen zum Verlust der Reparatur und enden in der Krebsentstehung (Übersicht bei Berwick et al. [15] und Christmann et al. [25]). Es wurden unterschiedliche Reparaturkapazitäten in Populationen entdeckt, die durch Polymorphismen in den Reparaturgenen hervorgerufen werden sollen. Es wird davon ausgegangen, dass der Polymorphismus zu einem Aminosäureaustausch im Protein führt und dessen Funktion sowohl negativ als auch positiv beeinflussen kann. Diese Funktionsveränderung soll das Krebsrisiko modulieren [91, 137].

Das *XPD*-Gen ist an der Nukleotidexzissionsreparatur beteiligt. Es kodiert für eine ATP-abhängige Helikase, die Teil des Transkriptionsfaktors TFIIH ist [134]. Dieser Faktor ist an der Strangseparation während der Reparatur beteiligt. Bisher wurden fünf Polymorphismen des *XPD*-Gens beschrieben [41]. Besonders der Lys751Gln-Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus in Exon 23 wird häufig in der Literatur in Assoziationsstudien untersucht. In meiner Studienpopulation hat der Polymorphismus eine Allelfrequenz von 0,35. Diese wird aus der Anzahl der Probanden pro Genotyp berechnet. 49 Personen trugen homozygot das Wildtypallel, 35 Probanden waren heterozygot bezüglich des Polymorphismus und 18 Personen hatten beide variante Allele. Meine berechnete Allelfrequenz stimmt gut mit der von Dybdahl et al. [41] von 0,32 überein. Es handelt sich also um einen in der kaukasischen Bevölkerung weit verbreiteten Polymorphismus. In diversen Studien wurde der Polymorphismus mit dem Auftreten von Basalzellkarzinomen, Melanomen, Lungenkrebs, Hals- und Nackenkrebs assoziiert [20, 41, 153, 158] (Übersicht bei Benhamou und Sarasin [14]). Eine

der Arbeitsgruppen, die von einer positiven Assoziation des Polymorphismus mit Basalzellkarzinomen berichtet hatten, konnten diesen Effekt allerdings nicht reproduzieren [165]. In einem anderen Übersichtsartikel wurde keine Assoziation zwischen dem *XPD*-Polymorphismus und dem Krebsrisiko gefunden [54]. Anhand dieser Beispiele sieht man, wie widersprüchlich die Datenlage ist. Goode et al. [54] regten an, dass zur Klärung dieser Diskrepanz gut geplante große Studien von Nöten sind, denn kleine Studien können falsch-positive bzw. -negative Ergebnisse liefern. Aus einer Studie an 31 Frauen ging hervor, dass das variante 751Gln-Allel im Zusammenhang mit erhöhten Chromosomenaberrationsraten nach Exposition mit Röntgen-Strahlung steht [86]. Auch wurden mehr Chromosomenbrüche nach Röntgenbestrahlung bei Trägern des varianten *XPD*-Allels gefunden als bei Wildtypallel-Trägern [11]. Es gibt auch Untersuchungen, die den Einfluss des Polymorphismus auf die Reparatur von DNA-Addukten untersuchen. So verschlechterte das variante Allel signifikant die Adduktreparatur bei schwedischen Lungenkrebspatienten und Kontrollpersonen [65]. In einer anderen Studie hingegen wurde keine verminderte Reparatur von BPDE-DNA-Addukten bei rauchenden Lungenkrebspatienten festgestellt [111]. Mit dem Comet Assay wurde der Einfluss des *XPD*-Polymorphismus bisher nur selten untersucht. Ich fand bei 102 Rauchern und Nichtrauchern keinen Einfluss des Lys751Gln-Polymorphismus des *XPD*-Gens auf die DNA-Migration im Comet Assay. Homozygote Träger des varianten Allels hatten zwar eine geringfügig höhere DNA-Migration, diese war aber bei weitem nicht statistisch signifikant (siehe Tabelle 3.1). Auch die Tatsache, dass die heterozygoten Personen keine stärkere DNA-Wanderung als die homozygoten Wildtypallel-Träger aufwiesen, spricht gegen einen „echten“ Effekt des varianten Allels. Die geringen Unterschiede der Tailmoment-Werte sind meiner Meinung nach zufällig und deuten auf die normale Versuchsvariabilität des Tests hin. Anhand von historischen Kontrollen kann ich abschätzen, dass diese geringen Unterschiede durchaus bei Mehrfachauswertung eines Objektträgers entstehen können und keinen biologisch relevanten Effekt darstellen. Vodicka et al. [164] hingegen stellten eine Modulation der Comet Assay-Ergebnisse durch den *XPD*-Polymorphismus fest. Eine neuere Studie der gleichen Arbeitsgruppe verifizierte dieses Ergebnis, indem sie zeigte, dass Personen, die homozygot bezüglich des varianten Allels waren, weniger Einzelstrangbrüche als heterozygote bzw. homozygote Wildtypallel-Träger [101] aufwiesen. Eine eventuelle Assoziation zwischen dem *XPD*-Polymorphismus und der DNA-Migration im Comet Assay könnte nur durch die Untersuchung von vielen Probanden geklärt werden. Meiner Meinung nach wäre es sinnvoll, die vielen publizierten Daten mit Hilfe einer Meta-Analyse zusammenzufassen, um die Frage nach einer Assoziation des Lys751Gln-Polymorphismus des *XPD*-Gens

mit diversen genetischen Endpunkten klären zu können.

Das *XRCC1*-Gen ist an der Auffüllung von fehlenden Basen während der Basenexzissionsreparatur beteiligt. Mit der BRCT-Domäne am C-Terminus komplexiert das XRCC1-Protein die DNA-Ligase III. Der N-Terminus bindet an die DNA-Polymerase β. An die zentrale Domäne des XRCC1 bindet die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) [85]. Shen et al. [137] identifizierten drei Polymorphismen in den Codons 194, 280 und 399. Diese Polymorphismen führen zu nichtkonservativen Aminosäurewechseln. Besonders der Polymorphismus im Codon 399 (Arg399Gln) erscheint mir für Assoziationsstudien interessant, da er in der PARP-Bindedomäne lokalisiert ist. Dies deutet auf eine funktionelle Relevanz hin, aber der Einfluss auf den Phänotyp ist noch umstritten. In der Literatur werden Allelfrequenzen des varianten Gln-Allels von 0,25 und 0,37 beschrieben [85]. In meiner Studie lag die Allelfrequenz des varianten Allels bei 0,36. Diese errechnet sich aus 43 homozygoten Wildtypallel-Trägern, 44 heterozygoten Probanden und 15 Personen, die homozygot bezüglich des varianten Allels waren. Die Häufigkeit des Polymorphismus erleichtert Assoziationsstudien. Jedoch existieren in der Literatur widersprüchliche Daten über die Assoziation zwischen dem Polymorphismus und verschiedenen genetischen Endpunkten. Die Frage, ob der Arg399Gln-Polymorphismus in Exon 10 mit diversen Krebsarten assoziiert ist, konnte noch nicht abschließend geklärt werden (Übersicht bei Goode et al. [54] und Wu et al. [172]). Widersprüchliche Befunde existieren auch für die Assoziation des Polymorphismus mit Chromosomenaberrationen [11, 75] und der Induktion von Mikronuklei [53, 90]. Ferner soll der Arg399Gln-Polymorphismus des *XRCC1*-Gens das Ergebnis des Comet Assay beeinflussen. Ich stellte keine Assoziation zwischen dem varianten Gln-Allel und der DNA-Migration bei Rauchern und Nichtrauchern im Comet Assay fest. Bei Personen, die homozygot das variante Allel trugen, war die DNA-Migration zwar geringer ausgeprägt als bei Wildtypallel-Trägern. Falls das variante Allel allerdings signifikant die DNA-Migration im Comet Assay verringern sollte, so dürften heterozygote Personen keine stärkere DNA-Wanderung haben als homozygote Wildtypallel-Träger. Auch diese geringen Unterschiede deuten auf eine normale Versuchsvariabilität ohne biologische Relevanz hin. In einer anderen Studie an PAH-exponierten Kokerei-Arbeitern wurde auch keine Assoziation des Polymorphismus und der DNA-Migration im Comet Assay nachgewiesen [82]. Vodicka et al. [164] hingegen fanden eine Modulation der basalen DNA-Schäden im Comet Assay durch den Arg399Gln-Polymorphismus des *XRCC1*-Gens. In einer neueren Studie der gleichen Arbeitsgruppe konnte dieser Befund allerdings nicht reproduziert werden [101]. Weitere große Studien müssen einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus im *XRCC1*-Gen und der

DNA-Migration im Comet Assay näher untersuchen.

XRCC3 ist ein *Rad51*-Paralog und ist an der homologen Rekombination, einem Weg der Doppelstrangbruchreparatur, beteiligt. XRCC3 stabilisiert Rad51C, ein weiteres Paralog von Rad51, und wahrscheinlich auch Rad51 selbst. In Untersuchungen wurde gezeigt, dass der XRCC3-Rad51C-Komplex mit höherer Affinität an einzelsträngiger als an doppelsträngiger DNA bindet [8]. In Populationsuntersuchungen konnten genetische Varianten des *XRCC3*-Gens charakterisiert werden [137]. Ein stark untersuchter Polymorphismus des *XRCC3*-Gens ist im Exon 7 lokalisiert und führt im Codon 241 zu einem Aminosäureaustausch von Threonin nach Methionin. Winsey et al. [168] berichten von einer Met-Allelfrequenz von 0,3 in der kaukasischen Bevölkerung. In meiner Studienpopulation von 102 Personen lag diese bei 0,35. Auch dieser Polymorphismus ist häufig in der kaukasischen Bevölkerung zu finden und erleichtert somit Assoziationsstudien. Bisher wurde für das XRCC3-Protein nur eine funktionelle Domäne (ATP-Bindedomäne) entdeckt. Der Polymorphismus liegt allerdings nicht in dieser Domäne [92], seine Relevanz ist deshalb unklar. Araujo et al. [8] zeigten sogar, dass bei rekombinanten Zellen, die das variante Protein exprimieren, keine Defizienz bezüglich der homologen Rekombination nachweisbar ist. Allerdings existieren in der Literatur etliche Studien, die den Polymorphismus mit diversen genetischen Endpunkten assoziieren. Ähnlich wie beim *XRCC1*-Gen gibt es für den Thr241Met-Polymorphismus des *XRCC3*-Gens widersprüchliche Befunde bezüglich einer Assoziation mit Krebserkrankungen (Übersicht bei Goode et al. [54] und Wu et al. [172]). Interessanterweise wurde der Polymorphismus des *XRCC3*-Gens sogar mit Adduktmengen assoziiert. Meiner Meinung nach ist diese Assoziation unplausibel, da das Gen nicht an der NER, die DNA-Addukte entfernt, beteiligt ist. Varianten des Gens dürften sich daher nicht auf Adduktmengen auswirken. Auch die Tatsache, dass der Polymorphismus in keiner aktiven Domäne des Proteins lokalisiert ist, spricht eher dafür, dass es sich bei den Assoziationen um Zufallsbefunde handelt. Die Arbeitsgruppe um Vodicka konnte in zwei unabhängigen Studien keine Assoziation des Thr241Met-Polymorphismus mit Chromosomenaberrationen bzw. Comet Assay-Befunden nachweisen [163, 164]. Auch ich entdeckte keinen Einfluss des Polymorphismus auf die DNA-Migration bei Rauchern und Nichtrauchern im Comet Assay. Die DNA-Migration war zwar bei Personen, die homozygot für das variante Met-Allel waren, stärker als bei Wildtypallel-Trägern. Gegen einen signifikanten, die DNA-Migration verstärkenden Effekt des varianten Allels spricht aber, dass die heterozygoten Personen die stärkste DNA-Wanderung aufwiesen. Auch hier waren die geringen Migrationsunterschiede der DNA auf die normale Testvariabilität zurückzuführen.

Individuelle Suszeptibilität gegenüber bestimmten Agenzien lässt sich meiner Meinung nach nicht durch die Untersuchung einzelner Polymorphismen erklären. Dazu sind die Aktivierungs-, Abbau- und Reparaturprozesse viel zu komplex. Es sind viele verschiedene Proteine beteiligt, von denen die meisten polymorph sind. Es ist durchaus denkbar, dass einzelne Polymorphismen sich in ihrer Wirkung auslöschen, wohingegen andere sich synergistisch verhalten können [172]. Auch der Ansatz von Pastorelli et al. und Popanda et al. [111, 122], die Assoziationen durch Kombination zweier polymorpher Gene erzielten, erscheint mir wenig aussagekräftig. Besser für die Untersuchung von individueller Suszeptibilität wäre die Verwendung des so genannten „MetaboChips“ geeignet [79]. Dabei handelt es sich um einen durch die „primer extention“ (APEX)-Technologie hergestellten DNA-Chip. Es sind 93 „single nucleotide polymorphisms“ (SNP) von 42 verschiedenen Genen repräsentiert, die im Rahmen des „SNP500 cancer projects“ charakterisiert wurden. Auf dem Chip sind Polymorphismen von fremdstoffmetabolisierenden Genen, Reparaturgenen, Genen die den Zellzyklus kontrollieren bzw. Apoptose auslösen und Genen, die an Entzündungsprozessen beteiligt sind, vertreten. Der Mehraufwand bei Assoziationsstudien ist gering, da die DNA der Probanden auch für die Restriktionsfragmentlängenanalysen isoliert werden muss. Die DNA der Probanden wird auf den Chip hybridisiert. Dadurch können die Probanden relativ schnell für 42 Gene genotypisiert werden. Durch „cluster“-Bildung von verschiedenen Personen, die z. B. alle an Lungenkrebs erkrankt sind, könnten bei genügend großen Stichproben dann Risikogenotypen abgeleitet werden. Momentan sind die Kosten für die Durchführung einer „DNA-Microarray“-Analyse allerdings noch relativ hoch. Dennoch denke ich, dass dieser Ansatz durchaus geeignet ist, um Risikogruppen zu identifizieren, die dann besonders medizinisch überwacht werden müssen.

4.3 Einfluss der Reparaturgenexpression auf Comet Assay-Ergebnisse

Neben klassischen genetischen Endpunkten rückt in der toxikologischen Substanzprüfung immer mehr die Genexpressionsanalyse in den Vordergrund. Man erhofft sich charakteristische Genexpressionsprofile von Zellen nach Substanzbehandlung zu finden, die dann mit bestimmten Wirkmechanismen der Substanzen korreliert werden können. Ziel ist es, in Screening-Versuchen zu einem frühen Zeitpunkt der Substanzentwicklung mögliche adverse Effekte nachzuweisen [2, 170]. In Versuchen an einer primären Blasenzelllinie konnte mittels Real Time-PCR eine Erhöhung der *Cyp1A1*-Expression nach Benzo[a]pyren-Behandlung nachgewiesen werden. Dies verdeutlicht,

dass Expressionsanalysen in der Lage sind, Regulationsunterschiede von Genen, die am Abbau von Substanzen des Zigarettenrauchs beteiligt sind, sensitiv zu detektieren. Auch wurde eine Modulation der Expression von verschiedenen Genen bei HeLa-Zellen nach BPDE-Exposition festgestellt [174]. Genexpressionsanalysen sind also sensitiv in der Lage, zelluläre Regulationsveränderungen nach Exposition mit Benzo[a]pyren und seinem Metaboliten BPDE in kultivierten, proliferierenden Zellen nachzuweisen. Falls Genexpressionsanalysen auch im Biomonitoring, z. B. für Suszeptibilitätsuntersuchungen, herangezogen werden sollten, so muss zunächst sichergestellt werden, dass Leukozyten geeignete Zielzellen darstellen. Mayer et al. [93] konnten an PHA-stimulierten Leukozyten nach 72 Stunden bei zwölf Genen eine mehr als zweifach erhöhte Expression nachweisen. Drei der Gene wiesen eine mehr als zehnfach erhöhte Expression auf. Dabei handelte es sich um die Topoisomerase 2A, die GAP-Dehydrogenase und das „proliferating cell nuclear antigen“ (PCNA), die alle drei für die Zellproliferation benötigt werden. Somit wurde nachgewiesen, dass auch in Leukozyten messbare Expressionsunterschiede durch äußere Faktoren induziert werden können.

Bisher wurde die individuelle Suszeptibilität meist auf genetische Variabilität zurückgeführt und viele Assoziationsstudien wurden mit diversen genetischen Endpunkten und Polymorphismen (siehe oben) durchgeführt. Der Genotyp liefert jedoch keine Aussage darüber, wie viel des benötigten Enzyms in der Zelle vorliegt. Wichtig für die Reparatur eines DNA-Schadens ist nicht nur die volle Funktionsfähigkeit des Reparaturenzyms sondern auch, dass es in ausreichender Menge in der Zelle vorliegt. Es ist durchaus denkbar, dass sich Individuen bezüglich der Menge an gebildetem Enzym unterscheiden. Diese unterschiedlichen Mengen an Proteinen sind auf individuelle Expressionsunterschiede zurückzuführen, die mit Hilfe eines DNA-Chips oder mittels Real Time-PCR-Untersuchungen aufgedeckt werden können. Zu diesem Thema existieren in der Literatur bisher wenige Arbeiten. Mir ist nur eine Arbeit bekannt, in der basale Expressionsunterschiede einer Population von 93 Personen anhand eines „DNA-Microarrays“ untersucht wurden [148]. Ziel dieser Arbeit war es, individuelle Expressionsunterschiede u. a. in Fremdstoffwechselgenen nachzuweisen und dadurch Personen zu identifizieren, die ein erhöhtes Krebsrisiko besitzen. Die untersuchte Population setzte sich aus Rauchern, Nichtrauchern und Exrauchern zusammen, die nach der Expressionsanalyse für ein Jahr gesundheitlich überwacht wurden. Interessanterweise ähnelten sich die Individuen pro Gruppe in ihren Expressionsprofilen bis auf wenige Ausnahmen. Es konnten „Cluster“ gebildet werden. Die Expression der Gene war bei den Rauchern und Nichtrauchern entgegengesetzt. Bei den Rauchern waren z. B. Gene des Fremdstoffwechsels und der Sekretion sowie Gene, die auf oxidativen

Stress reagieren, hochreguliert und Gene, die an Entzündungsprozessen beteiligt sind und Tumorsuppressorgene herrunterreguliert. Bei den Nichtrauchern war das Expressionsprofil genau umgekehrt. Besonders interessant waren die Individuen, die sich hinsichtlich ihres Expressionsprofils deutlich von dem ihrer Gruppe unterschieden. So gab es unter den Rauchern 7 Personen, die eher das Expressionsprofil der Nichtraucher besaßen. Zwei dieser Personen entwickelten im folgenden Jahr Lungenkrebs. Ein Nichtraucher ähnelte in seiner Expression eher der Gruppe der Raucher, was auf eine passive Exposition mit Zigarettenrauch schließen lässt. Diese sehr interessante Arbeit zeigte, dass die Genexpressionsanalyse auch basale Unterschiede zwischen Personengruppen aufzulösen und sogar individuelle Suszeptibilität zu prognostizieren vermag. Meine Expressionsanalyse zeigt deutlich, dass es individuelle Expressionsunterschiede gibt, die allerdings nicht Raucher-Status abhängig sind (Abbildung 3.30). Meiner Meinung nach wäre eine erhöhte *XPD*-Expression bei Rauchern zu erwarten gewesen, da die BPDE-DNA-Addukte über die Nukleotidexzissionsreparatur, an der das *XPD*-Gen beteiligt ist, entfernt werden. Anscheinend sind aber auch Nichtraucher genügend Substanzen ausgesetzt, die über die Nukleotidexzissionsreparatur entfernt werden. Benzo[a]pyren ist zum Beispiel ein Verbrennungsprodukt und kommt auch in der Luft (Auto- und Fabrikabgase) und im Essen (gut durchgegarte Speisen) in großen Mengen vor. Eine Benzo[a]pyren-Exposition ist also auch bei Nichtrauchern gegeben und dies könnte eine hohe Expression des *XPD*-Gens erklären.

Auch die *XRCC1*-Expression scheint nicht durch das Zigarettenrauchen induziert worden zu sein. Dies ist verwunderlich, da angenommen wird, dass das Zigarettenrauchen zu oxidativen Schäden der DNA führt, die über die BER repariert werden. Die Tatsache, dass auch Nichtraucher das *XRCC1*-Gen teilweise relativ stark exprimieren, legt die Vermutung nahe, dass auch sie ständig oxidative Basenschäden reparieren müssen. Diese können zum Beispiel durch reaktive Sauerstoffspezies, die exo- oder endogen entstehen, induziert werden. Da solche Substanzen auch nicht vermehrt in Zigarettenrauch vorgefunden werden, sollte das Rauchen hier zu keinen Unterschieden führen.

Das an der Doppelstrangbruchreparatur beteiligte Gen *XRCC3* scheint bei beiden Gruppen nicht induziert worden zu sein. Dies ist auch plausibel, da nur wenige Agenzien Doppelstrangbrüche erzeugen können, denen man normalerweise nicht ausgesetzt ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass individuelle Unterschiede in der Expression dreier Reparaturgene nachgewiesen werden konnten, die allerdings nicht direkt mit dem Zigarettenrauchen zusammenhängen. Anhand der Datenlage können allerdings keine Suszeptibilitäten prognostiziert werden. Fraglich ist, ob die durch Zigarettenrauch induzierten DNA-Schäden ausreichen, um die Genexpression zu verändern. Da

aber Spira et al. [148] einen statistisch signifikanten Einfluss des Zigarettenrauchens auf das Transkriptom nachweisen konnten, ist davon auszugehen, dass dieser Effekt auch mit der Real Time-PCR-Technik nachzuweisen ist, weil die Sensitivität der Real Time-PCR als höher eingeschätzt wird. In der Studie von Spira et al. [148] wurden unterschiedliche Genexpressionen zwischen Rauchern und Nichtrauchern hauptsächlich in fremdstoffmetabolisierenden Enzymen festgestellt. Sie berichten nicht über die Expression aller auf den Chip „gespotteten“ Gene, sondern nur von denen, die bei Rauchern und Nichtrauchern unterschiedlich reguliert waren. Es ist durchaus möglich, dass keine Expressionsunterschiede in Reparaturgenen nachzuweisen waren. Yu et al. [174] fanden sogar nach BPDE-Behandlung keine Induktion von Reparaturgenen in TK6-Zellen. In Folgeexperimenten sollte man die Gene untersuchen, die bei Spira et al. [148] bei Rauchern und Nichtrauchern unterschiedlich reguliert waren.

Mich hat ferner interessiert, ob die jeweilige Stärke der Genexpression charakteristisch für den Probanden ist oder ob die Genexpression nur eine Aufnahme der momentanen Situation der Zellen widerspiegelt und über die Zeit variieren kann. Durch drei weitere unabhängige Analysen zeigte sich ein uneinheitliches Bild (siehe Tabellen 3.2 bis 3.4). In der Regel waren mittlere und niedrige Expressionen reproduzierbar. Sehr starke Genexpressionen wurden dagegen nicht reproduziert. Dies deutet auf eine Momentaufnahme hin, die zum Beispiel durch Zigarettenkonsum kurz vor der Blutentnahme erklärt werden könnte. Problematisch empfand ich die Interpretation der erhaltenen Real Time-PCR-Daten. Um die Daten richtig verstehen zu können, wäre ein mathematisches Modell ähnlich dem der „DNA-Microarray“-Auswertung hilfreich. Über die Reproduzierbarkeit von Expressionsanalysen ist meinem Wissen nach noch nicht viel bekannt. Die meisten Genexpressionsanalysen waren mechanistische Arbeiten, um einen *in vitro*-Test zur Substanzprüfung mit Zelllinien zu etablieren [2, 170, 174]. Zelllinien wachsen unter sehr kontrollierten Bedingungen und stellen daher ein sehr stabiles System dar, das nur wenig durch Störfaktoren beeinflusst wird. Unter diesen Umständen ist von einer guten Reproduzierbarkeit auszugehen. Akerman et al. [2] zeigten jedoch, dass auch bei TK-Zellen keine reproduzierbaren Expressionsveränderungen durch BPDE in Konzentrationen, die zu DNA-Addukten führen und Mutationen induzieren, erreicht werden konnten. Ob es „echte“ individuelle Expressionsunterschiede beim Menschen gibt oder nicht, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Solche Studien müssen sehr gut geplant sein und es müssen viele Probanden untersucht werden.

Es wurde ferner untersucht, ob die gemessene Genexpression mit den Befunden des Comet Assay korreliert. Dadurch wären individuelle Unterschiede in der Induzierbarkeit von DNA-Schäden oder Reparaturkapazitäten zu erklären. Es wurden sowohl basale

als auch induzierte DNA-Effekte im Comet Assay und auch die Reparatur von DNA-Schäden mit den Expressionsdaten verglichen (siehe Abbildungen 3.31 bis 3.33). Die Schadensinduktion wurde jeweils mit einem Mutagen durchgeführt, das einen für den jeweiligen Reparaturweg spezifischen Schaden hervorruft. Es zeigte sich keine Korrelation zwischen den Comet Assay-Befunden und den Genexpressionsdaten. Vielleicht wird ein die DNA-Migration modulierender Effekt durch die Versuchsvariabilität des Comet Assay überdeckt. Ein weiteres Problem bei Genexpressionsanalysen ist das Festlegen eines adäquaten Zeitpunktes für die Analyse. Manche Expressionsunterschiede werden erst nach längerer Zeit deutlich. So wurden in der Studie von Mayer et al. [93] erst 72 Stunden nach PHA-Stimulation deutliche Expressionsunterschiede in Leukozyten sichtbar. Wenn man seine Studie zeitlich falsch plant, können manche Effekte übersehen werden. Es ist daher sinnvoll, mehrere Expressionsanalysen zu verschiedenen Zeitpunkten durchzuführen. Insgesamt lässt sich sagen, dass für Suszeptibilitätsuntersuchungen in Zukunft auch immer die Expression von Genen mit einbezogen werden muss. Ich denke, dass DNA-Chips die Methode der Wahl sein sollten, da damit wesentlich mehr Information über Probanden generiert werden können. Der komplexe Stoffwechsel des Menschen lässt sich nicht durch das Herausgreifen von Polymorphismen oder Expressionen einzelner Gene beschreiben. Um die Daten interpretieren zu können, benötigt man auch geeignete mathematische Analysen. Da sich meiner Meinung nach die individuelle Suszeptibilität sowohl aus dem Genom als auch aus dem Transkriptom des Probanden zusammensetzt, sollten mathematische Modelle entwickelt werden, die den kombinierten Einfluss simulieren können.

4.4 Schlussfolgerungen im Hinblick auf den Einsatz des Comet Assay im Biomonitoring

Der Comet Assay ist in der Genotoxizitätsprüfung als sensitiver *in vitro*- und *in vivo*-Test anerkannt. Aufgrund seiner einfachen Handhabung und der Möglichkeit, dass praktisch jeder Zelltyp damit untersucht werden kann, wird er auch für viele andere Fragestellungen, z. B. im Biomonitoring, eingesetzt. Für den Einsatz des Comet Assay im Biomonitoring wurden bereits Empfehlungen von Albertini et al. [3] und Speit et al. [143] gegeben und in meiner Arbeit berücksichtigt. Darüber hinaus hat meine Arbeit zu Erkenntnissen geführt, die eine Erweiterung dieser Empfehlungen nahe legen. Ein Problem im Biomonitoring ist, dass meist die Stärke der Exposition der untersuchten Personen unbekannt ist. Es wurde deshalb in Empfehlungen gefordert, eine möglichst genaue Expositionsabschätzung durchzuführen. Nur bei Vorliegen einer relevanten ge-

notoxischen Exposition können überhaupt positive Ergebnisse erwartet werden und nur bei gut definierter Exposition können verschiedene Untersuchungen von Probandengruppen verglichen und so richtig beurteilt werden. Die Ergebnisse meiner Arbeit haben Grenzen des Comet Assay an menschlichen Leukozyten im Biomonitoring aufgezeigt, da selbst bei starken Rauchern kein genotoxischer Effekt nachweisbar war.

Auch die sorgfältige Probandenauswahl ist für Biomonitoring-Studien äußerst wichtig. In den Empfehlungen wurde darauf hingewiesen, ein möglichst homogenes Probandenkollektiv zu untersuchen, um den Einfluss möglicher Störfaktoren zu minimieren. Meine Ergebnisse haben gezeigt, dass es selbst unter optimierten experimentellen Bedingungen (stringente Ein- und Ausschlusskriterien) nicht möglich war, einen genotoxischen Effekt des Zigarettenrauchens nachzuweisen. Bei den meisten publizierten Studien (insbesondere bei der Untersuchung genotoxischer Expositionen am Arbeitsplatz) war die Probandenauswahl nicht so streng, weshalb mit einer größeren Variabilität der DNA-Effekte zu rechnen ist, die auch zufällig zu scheinbar positiven Effekten führen kann.

Ferner ist es notwendig, für jede Biomonitoring-Untersuchung ein sensitives Comet Assay-Protokoll zu etablieren. Das Protokoll muss an die in der Studie verwendeten Zelltypen und die apparative Ausstattung angepasst werden. Durch parallele *in vitro*-Tests mit dem vermuteten Genotoxinen können Nachweisgrenzen für bestimmte Substanzen festgestellt werden. Diese zusätzliche Information erleichtert die Beurteilung der Studie, da deren Qualität besser eingeschätzt werden kann. Es sollte auch gefordert werden, dass im Rahmen von Biomonitoring-Studien mit dem Comet Assay stets eine Positivkontrolle (d. h. die *ex vivo*-Behandlung der Blutprobe mit einem bekannten Mutagen) mitgeführt wird. Dadurch würde einerseits die Sensitivität des verwendeten Protokolls demonstriert und andererseits könnten die Ergebnisse direkt mit denen anderer Studien verglichen werden. Ein solcher Ansatz ist bisher praktisch überhaupt nicht verwirklicht.

Die Spezifität und Sensitivität des Comet Assay kann durch Modifizierungen des Comet Assay erhöht werden. So weisen zum Beispiel Endonukleasen wie das FPG-Protein modifizierte DNA-Basen sensitiv nach. Der Einsatz des FPG-modifizierten Comet Assay im Biomonitoring wurde von Speit et al. [143] empfohlen. Allerdings zeigten meine Untersuchungen, dass die FPG-Behandlung die Versuchsvariabilität stark erhöhte. Auf die Verwendung adäquater Positiv- und Negativkontrollen (Pufferkontrolle) ist deshalb besonderer Wert zu legen. Da im Rahmen von Biomonitoring kaum mit Expositionen zu rechnen ist, die nur spezifische Basenmodifizierungen induzieren, würde ich von einem routinemäßigen Einsatz des FPG-modifizierten Comet Assay im

Biomonitoring abraten.

Aber nicht nur die Sensitivität des Comet Assay-Protokolls sondern auch seine Robustheit muss sichergestellt sein. Da viele Schritte im Versuchsablauf das Ergebnis beeinflussen können, wurde empfohlen, einen Referenzstandard aus aliquotierten Zellen in den Elektrophoresen mitzuführen. Dies erwies sich in meinen Untersuchungen als sinnvoll und praktikabel. Allerdings war der Comet Assay in meinen Händen so stabil, dass nur sehr wenige Proben auf Grund eines zu stark abweichenden Referenzstandards ausgeschlossen werden müssten. Wären diese Proben nicht ausgeschlossen worden, hätte dies keine grundsätzlichen Auswirkungen auf die Ergebnisse meiner Studien gehabt. Außerdem zeigte sich eine lagerungsbedingte Zunahme der DNA-Migration im Comet Assay der Referenzzellen. Ein solcher Effekt wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Er sollte deshalb in zukünftigen Studien beachtet und gegebenenfalls bei der statistischen Auswertung und dadurch auch bei der Auswahl der in die Studie einfließenden Versuche berücksichtigt werden.

Sehr wichtig für die Zuverlässigkeit von Biomonitoring-Studien sind Maßnahmen zur Qualitätssicherung, die auch in den entsprechenden „Guidelines“ gefordert werden. Um den Einfluss subjektiver Faktoren auf das Testergebnis auszuschließen, muss die Auswertung der Comet Assay-Präparate blind erfolgen. Dass bedeutet nicht nur, dass die Präparate kodiert sein müssen, sondern setzt auch voraus, dass Präparate von exponierten Personen und Kontrollen zusammen im Comet Assay prozessiert und ausgewertet werden. Tatsächlich wurde bei vielen der von mir analysierten Biomonitoring-Studien mit dem Comet Assay überhaupt nicht angegeben, ob die Präparate blind und gleichzeitig mit den Kontrollzellen ausgewertet wurden.

Im Unterschied zu experimentellen Studien *in vitro* und *in vivo* ist es bei Biomonitoring-Studien aus praktischen Gründen oft nicht möglich, die ganze Studie zu wiederholen und ein Ergebnis unabhängig zu reproduzieren. Deshalb wurde im Rahmen des IPCS [3] empfohlen, Parallelpräparate von Personen anzufertigen und in zwei unabhängigen Elektrophoresen zu untersuchen. Nur wenn ein Unterschied in den Parallelpräparaten bestätigt wird, sollte man von einem relevanten Effekt ausgehen. Durch die Auswertung von Parallelpräparaten kann eine Überbewertung isolierter (Zufalls-) Befunde vermiedenen werden. Auch in meiner Arbeit waren bei der Untersuchung eines Teilkollektivs die basalen DNA-Schäden der Leukozyten bei Rauchern statistisch signifikant erhöht. Dieser Effekt war allerdings in den Parallelpräparaten nicht reproduzierbar. Eine weitere Möglichkeit einen Comet Assay-Effekt zu reproduzieren ist die Zweitauswertung der Präparate durch einen unabhängigen Auswerter. Auch dieser Ansatz trägt dazu bei, die biologische Relevanz eines Comet Assay-Effektes besser zu

beurteilen.

In der Literatur wurde gezeigt, dass die Untersuchung von zellulärer Reparaturaktivität mit dem Comet Assay zu statistisch signifikanten Unterschieden zwischen Personengruppen führen kann. Diese Unterschiede waren allerdings nicht anhand der Menge an nachweisbaren DNA-Schäden direkt mit dem Comet Assay nachweisbar [119]. Von Speit et al. [143] wurde deshalb gefordert, die Untersuchung von Reparaturaktivitäten in Biomonitoring-Studien mit einzubeziehen. In meinen Untersuchungen habe ich versucht, Unterschiede in der DNA-Reparatur zwischen Rauchern und Nichtrauchern mit verschiedenen Ansätzen zu erfassen. Die durchweg negativen Ergebnisse können als Bestätigung angesehen werden, dass Rauchen nicht zu genotoxischen Effekten in peripherem Blut führt. Es ist bisher unklar, welcher dieser Ansätze zum Nachweis von Reparaturaktivitäten am besten geeignet ist, um zwischen Exponierten und Kontrollen zu unterscheiden. Da ich ausschließlich negative Ergebnisse erhalten habe, konnten meine Untersuchungen zur Klärung dieser Frage nichts beitragen. Dennoch erscheint mir dieser Ansatz als erfolgversprechend. Neben der Untersuchung basaler DNA-Schäden sollte im Biomonitoring die Möglichkeit zur Untersuchung von zellulärer Reparaturaktivität im Comet Assay routinemäßig berücksichtigt werden.

Von IPCS [3] wurde die Berücksichtigung von genetischen Polymorphismen in Comet Assay Biomonitoring-Untersuchungen empfohlen. Jedoch erscheint mir die Aussagekraft einzelner Polymorphismen begrenzt. Auch die Auswahl der zu untersuchenden Polymorphismen ist problematisch. Meiner Meinung nach sollten nur Polymorphismen untersucht werden, über deren Funktionalität Daten existieren. Zunächst sollte in weiteren großen, gut geplanten Studien, die simultan möglichst viele Polymorphismen untersuchen, der Einfluss von genetischen Polymorphismen auf genotoxische Effekte im Comet Assay (und auch in anderen Genotoxizitätstests) festgestellt werden, bevor allgemeine Empfehlungen für die Berücksichtigung bestimmter Polymorphismen gegeben werden.

Generell sollte in Biomonitoring-Untersuchungen überlegt werden, ob die Kombination einer Comet Assay-Studie mit anderen Genotoxizitätstests sinnvoll ist. Je nach Art der Exposition und Fragestellung ließe sich der Comet Assay mit anderen Tests zum Nachweis von DNA-Effekten (zum Beispiel dem sehr empfindlichen Nachweis von DNA-Addukten) oder dem Nachweis von Mutationen auf chromosomaler Ebene (zum Beispiel mit dem Mikronukleustest) kombinieren. Damit könnte ein positiver Effekt bestätigt und/oder hinsichtlich seiner biologischen Relevanz charakterisiert werden.

5 Zusammenfassung

Der Comet Assay ist ein gut etablierter *in vitro*- und *in vivo*-Genotoxizitätstest und wird zunehmend in der Substanzprüfung eingesetzt. Aufgrund seiner einfachen Durchführung und seiner hohen Sensitivität gegenüber verschiedensten DNA-schädigenden Agenzien findet er auch immer mehr Verwendung in Biomonitoring-Untersuchungen. Die Eignung des Comet Assay für Biomonitoring-Studien wurde bisher kaum systematisch untersucht und bisher durchgeführte Studien haben häufig zu widersprüchlichen Ergebnissen geführt. Deshalb sollte in meiner Arbeit die Eignung des Comet Assay für den Einsatz im Biomonitoring im Rahmen einer experimentellen Studie untersucht werden. Es wurden vergleichende Untersuchungen am peripheren Blut von Rauchern und Nichtrauchern durchgeführt, da das Zigarettenrauchen als relevante genotoxische Exposition angesehen wird. Es wurde zunächst geprüft, ob Raucher gegenüber Nichtrauchern erhöhte Raten an DNA-Schäden in peripheren Leukozyten aufweisen. In einem *ex vivo*-Ansatz wurde dann untersucht, ob sich Blut von Rauchern und Nichtrauchern hinsichtlich der Induzierbarkeit von DNA-Schäden unterscheidet. Ferner wurde die DNA-Reparaturaktivität von Leukozyten vergleichend untersucht. Schließlich wurde der Frage nachgegangen, ob genetische Polymorphismen in Genen des Fremdstoffwechsels (*GSTM1*, *Cyp1A1* und *Cyp2E1*) und der DNA-Reparatur (*XPD*, *XRCC1* und *XRCC3*) das Ergebnis im Comet Assay beeinflussen. Es wurde außerdem untersucht, ob das Zigarettenrauchen die Expression von DNA-Reparaturgenen verändert, und ob ein Zusammenhang zwischen der Genexpression und den Ergebnissen des Comet Assay besteht. In meiner Studie wurde in keinem dieser Ansätze ein statistisch signifikanter Unterschied der DNA-Effekte im Comet Assay in Leukozyten von Rauchern und Nichtrauchern nachgewiesen. Demnach induziert Zigarettenrauch keine genotoxischen Effekte, die mit dem Comet Assay im peripheren Blut eindeutig nachgewiesen werden können.

Da bereits mehrere Comet Assay Biomonitoring-Studien publiziert wurden, in denen der genotoxische Effekt des Rauchens entweder direkt oder als potenzieller Störfaktor bei der Untersuchung einer anderen Exposition untersucht wurde, sollte eine Meta-Analyse der publizierten Daten weitere Erkenntnisse zu genotoxischen Effekten

des Rauchens im Comet Assay liefern. Die Meta-Analyse von 38 publizierten Studien zeigte insgesamt einen genotoxischen Effekt des Zigarettenrauchens. Allerdings war dieser Effekt nur deutlich in den Studien ausgeprägt, die das Rauchen direkt untersucht haben, während sich in Studien, in denen das Rauchen als potenzielle Störgröße untersucht wurde, kein signifikanter Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern fand. Außerdem zeigten nur die Gruppe der Studien, in denen die DNA-Effekte visuell ohne Bildanalysesystem ausgewertet wurden, einen signifikanten Unterschied, während dies bei der Auswertung mit einem Bildanalysesystem nicht der Fall war. Dieses Ergebnis legt den Schluss nahe, dass auch andere Faktoren die Ergebnisse im Comet Assay beeinflusst haben und ein direkter Zusammenhang mit dem Rauchen nicht gesichert ist.

Aus meiner Studie ließen sich allgemeine Schlussfolgerungen für den Einsatz des Comet Assay im Biomonitoring ableiten. Um aussagekräftige Ergebnisse mit dem Comet Assay im Biomonitoring zu erhalten, ist es einerseits wichtig, den Test unter streng standardisierten Bedingungen durchzuführen. Dabei sollten sowohl ein Referenzstandard als auch eine Positivkontrolle mitgeführt werden. Ferner sollten Maßnahmen zur Qualitätssicherung Berücksichtigung finden. Als Minimalanforderungen sind die kodierte und parallele Auswertung der Präparate von Exponierten und Kontrollen anzusehen sowie die unabhängige Durchführung des Comet Assay mit einem zweiten Präparat und/oder eine unabhängige zweite Auswertung der Präparate durch einen anderen Auswerter.

6 Literaturverzeichnis

[1] Affatato, A., Wolfe, K., Lopez, M., Hallberg, C., Ammenheuser, M., und Abdel-Rahman, S. Effect of XPD/ERCC2 polymorphisms on chromosome aberration frequencies in smokers and on sensitivity to the mutagenic tobacco-specific nitrosamine NNK. *Environ. Mol. Mutagen. 44*, 65–73 (2004).

[2] Akerman, G., Rosenzweig, B., Domon, O., McGarrity, L., Blankenship, L., Tsai, C., Culp, S., MacGregor, J., Sistare, F., Chen, J., und Morris, S. Gene expression profiles and genetic damage in benzo(a)pyrene diol epoxide-exposed TK6 cells. *Mutat. Res. 549*, 43–64 (2004).

[3] Albertini, R., Anderson, D., Douglas, G., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A., Norppa, H., Shuker, D., Tice, R., Waters, M., und Aitio, A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. international programme on chemical safety. *Mutat. Res. 463*, 111–172 (2000).

[4] Anderson, D., Phillips, B., Yu, T., Edwards, A., Ayesh, R., und Butterworth, K. The effects of vitamin C supplementation on biomarkers of oxygen radical generated damage in human volunteers with "low" or "high" cholesterol levels. *Environ. Mol. Mutagen. 30*, 161–174 (1997).

[5] Anderson, D., Yu, T., Hambly, R., Mendy, M., und Wild, C. Aflatoxin exposure and DNA damage in the comet assay in individuals from the Gambia, West Africa. *Teratog. Carcinog. Mutagen. 19*, 147–155 (1999).

[6] Anderson, D., Yu, T., Phillips, B., und Schmezer, P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutat. Res. 307*, 261–271 (1994).

[7] Angerer, J. Biological Monitoring in Occupational and Environmental Medicine - The Present State of the Art and Future Prospects. In: *Deutsche Forschungsgemeinschaft; Biological Monitoring; Prospects in Occupational and Environmental Medicine*, Hrsg.: Angerer, J. und Weiá, T. (Wiley-VCH, Weinheim) Bd. 2.1, S. 5–15 (2002).

[8] Araujo, F. D., Pierce, A. J., Stark, J. M., und Jasin, M. Variant XRCC3 implicated in cancer is functional in homology-directed repair of double-strand breaks. *Oncogene 21*, 4176–4180 (2002).

[9] Au, W. Mutagen sensitivity assays in population studies. *Mutat. Res. 544*, 273–277 (2003).

[10] Au, W., Cajas-Salazar, N., und Salama, S. Factors contributing to discrepancies in population monitoring studies. *Mutat. Res. 400*, 467–478 (1998).

[11] Au, W., Salama, S., und Sierra-Torres, C. Functional characterization of polymorphisms in DNA repair genes using cytogenetic challenge assays. *Environ. Health Perspect. 111*, 1843–1850 (2003).

[12] Bajpayee, M., Dhawan, A., Parmar, D., Pandey, A., Mathur, N., und Seth, P. Gender-related differences in basal DNA damage in lymphocytes of a healthy Indian population using the alkaline Comet assay. *Mutat. Res. 520*, 83–91 (2002).

[13] Basaran, N., Shubair, M., Undeger, U., und Kars, A. Monitoring of DNA damage in foundry and pottery workers exposed to silica by the alkaline comet assay. *Am. J. Ind. Med. 43*, 602–610 (2003).

[14] Benhamou, S. und Sarasin, A. ERCC2/XPD gene polymorphisms and cancer risk. *Mutagenesis 17*, 463–469 (2002).

[15] Berwick, M., Matullo, G., und Vineis, P. Studies of DNA repair and human cancer: an update. In: *Biomarkers of environmentally associated disease*, Hrsg.: Wilson, S. und Suk, W. (Lewis Publisher, New York) Bd. 7, S. 83–106 (2002).

[16] Betti, C., Davini, T., Giannessi, L., Loprieno, N., und Barale, R. Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat. Res. 307*, 323–333 (1994).

[17] Biri, A., Civelek, E., Karahalil, B., und Sardas, S. Assessment of DNA damage in women using oral contraceptives. *Mutat. Res. 521*, 113–119 (2002).

[18] Bonassi, S., Neri, M., Lando, C., Ceppi, M., Lin, Y., Chang, W., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., und Fenech, M. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. *Mutat. Res. 543*, 155–166 (2003).

[19] Brendler-Schwaab, S., Hartmann, A., Pfuhler, S., und Speit, G. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis 20*, 245–254 (2005).

[20] Butkiewicz, D., Rusin, M., Enewold, L., Shields, P., Chorazy, M., und Harris, C. Genetic polymorphisms in DNA repair genes and risk of lung cancer. *Carcinogenesis 22*, 593–597 (2001).

[21] Caldecott, K. W. XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair 2*, 955–969 (2003).

[22] Carere, A., Andreoli, C., Galati, R., Leopardi, P., Marcon, F., Rosati, M., Rossi, S., Tomei, F., Verdina, A., Zijno, A., und Crebelli, R. Biomonitoring of exposure to urban air pollutants: analysis of sister chromatid exchanges and DNA lesions in peripheral lymphocytes of traffic policemen. *Mutat. Res. 518*, 215–224 (2002).

[23] Cebulska-Wasilewska, A., Wieche, A., Panek, A., Binková, B., Srám, R. J., und Farmer, P. B. Influence of environmental exposure to PAHs on the susceptibility of lymphocytes to DNA-damage induction and on their repair capacity. *Mutat. Res. 588*, 73–81 (2005).

[24] Cheng, C. und Kuchta, R. DNA polymerase epsilon: aphidicolin inhibition and the relationship between polymerase and exonuclease activity. *Biochemistry 32*, 8568–8574 (1993).

[25] Christmann, M., Tomicic, M., Roos, W., und Kaina, B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology 193*, 3–34 (2003).

[26] Collins, A. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol. 26*, 249–261 (2004).

[27] Collins, A., Dobson, V., Dusinska, M., Kennedy, G., und Stetina, R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutat. Res. 375*, 183–193 (1997).

[28] Collins, A., Dusinska, M., Franklin, M., Somorovska, M., Petrovska, H., Duthie, S., Fillion, L., Panayiotidis, M., Raslova, K., und Vaughan, N. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environ. Mol. Mutagen. 30*, 139–146 (1997).

[29] Collins, A., Ma, A., und Duthie, S. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat. Res. 336*, 69–77 (1995).

[30] Crebelli, R., Carta, P., Andreoli, C., Aru, G., Dobrowolny, G., Rossi, S., und Zijno, A. Biomonitoring of primary aluminium industry workers: detection of micronuclei and repairable DNA lesions by alkaline SCGE. *Mutat. Res. 516*, 63–70 (2002).

[31] Danadevi, K., Rozati, R., Banu, B., und Grover, P. Genotoxic evaluation of welders occupationally exposed to chromium and nickel using the Comet and micronucleus assays. *Mutagenesis 19*, 35–41 (2004).

[32] Danadevi, K., Rozati, R., Saleha, B. B., Hanumanth, R. P., und Grover, P. DNA damage in workers exposed to lead using comet assay. *Toxicology 187*, 183–193 (2003).

[33] De Boeck, M., Touil, N., De Visscher, G., Vande, P., und Kirsch-Volders, M. Validation and implementation of an internal standard in comet assay analysis. *Mutat. Res. 469*, 181–197 (2000).

[34] DeMarini, D. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutat. Res. 567*, 447–474 (2004).

[35] Dey, A., Parmar, D., Dayal, M., Dhawan, A., und Seth, P. K. Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) in blood lymphocytes evidence for catalytic activity and mRNA expression. *Life Sci. 69*, 383–393 (2001).

[36] Dhawan, A., Mathur, N., und Seth, P. The effect of smoking and eating habits on DNA damage in Indian population as measured in the Comet assay. *Mutat. Res. 474*, 121–128 (2001).

[37] Diem, E., Ivancsits, S., und Rudiger, H. Basal levels of DNA strand breaks in human leukocytes determined by comet assay. *J. Toxicol. Environ. Health 65*, 641–648 (2002).

[38] Dusinska, M., Collins, A., Kazimirova, A., Barancokova, M., Harrington, V., Volkovova, K., Staruchova, M., Horska, A., Wsolova, L., Kocan, A., Petrik, J., Machata, M., Ratcliffe, B., und Kyrtopoulos, S. Genotoxic effects of asbestos in humans. *Mutat. Res. 553*, 91–102 (2004).

[39] Dusinska, M., Ficek, A., Horska, A., Raslova, K., Petrovska, H., Vallova, B., Drlickova, M., Wood, S., Stupakova, A., Gasparovic, J., Bobek, P., Nagyova, A., Kovacikova, Z., Blazicek, P., Liegebel, U., und Collins, A. Glutathione S-transferase

polymorphisms influence the level of oxidative DNA damage and antioxidant protection in humans. *Mutat. Res. 482*, 47–55 (2001).

[40] Duthie, S., Ma, A., Ross, M., und Collins, A. Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Res. 56*, 1291–1295 (1996).

[41] Dybdahl, M., Vogel, U., Frentz, G., Wallin, H., und Nexo, B. Polymorphisms in the DNA repair gene XPD: correlations with risk and age at onset of basal cell carcinoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 8*, 77–81 (1999).

[42] Ellahuene, M., Perez-Alzola, L., Farfan-Urzua, M., Gonzalez-Hormazabal, P., Garay, M., Olmedo, M., und Last, J. Preliminary evaluation of DNA damage related with the smoking habit measured by the comet assay in whole blood cells. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 13*, 1223–1229 (2004).

[43] Faust, F., Kassie, F., Knasmuller, S., Boedecker, R., Mann, M., und Mersch-Sundermann, V. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat. Res. 566*, 209–229 (2004).

[44] Faust, F., Kassie, F., Knasmuller, S., Kevekordes, S., und Mersch-Sundermann, V. Use of primary blood cells for the assessment of exposure to occupational genotoxicants in human biomonitoring studies. *Toxicology 198*, 341–350 (2004).

[45] Fenech, M. The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environ. Health Perspect. 101*, 101–107 (1993).

[46] Fenech, M. The Cytokinesis-Block Micronucleus Technique. In: *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations*, Hrsg.: Pfeifer, G. (Plenum Press, New York) Bd. 2, S. 25–36 (1996).

[47] Fenech, M. und Morley, A. A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res. 147*, 29–36 (1985).

[48] Garaj-Vrhovac, V. und Kopjar, N. The alkaline comet assay as biomarker in assessment of DNA damage in medical personnel occupationally exposed to ionizing radiation. *Mutagenesis 18*, 265–271 (2003).

[49] Garry, S., Nesslany, F., Aliouat, E., Haguenoer, J., und Marzin, D. Assessment of genotoxic effect of benzo[a]pyrene in endotracheally treated rat using the comet assay. *Mutat. Res. 534*, 33–43 (2003).

[50] Georgiadis, P., Topinka, J., Vlachodimitropoulos, D., Stoikidou, M., Gioka, M., Stephanou, G., Autrup, H., Demopoulos, N., Katsouyanni, K., Sram, R., und Kyrtopoulos, S. Interactions between CYP1A1 polymorphisms and exposure to environmental tobacco smoke in the modulation of lymphocyte bulky DNA adducts and chromosomal aberrations. *Carcinogenesis 26*, 93–101 (2005).

[51] Giovannelli, L., Pitozzi, V., Moretti, S., Boddi, V., und Dolara, P. Seasonal variations of DNA damage in human lymphocytes: Correlation with different environmental variables. *Mutat. Res. 593*, 143–152 (2006).

[52] Gluck, U. und Gebbers, J. The comet assay of nasal epithelia: measurement of DNA damage for the assessment of genotoxic air pollution. *Laryngoscope 110*, 123–125 (2000).

[53] Godderis, L., De Boeck, M., Haufroid, V., Emmery, M., Mateuca, R., Gardinal, S., Kirsch-Volders, M., Veulemans, H., und Lison, D. Influence of genetic polymorphisms on biomarkers of exposure and genotoxic effects in styrene-exposed workers. *Environ. Mol. Mutagen. 44*, 293–303 (2004).

[54] Goode, E., Ulrich, C., und Potter, J. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 11*, 1513–1530 (2002).

[55] Grover, P., Danadevi, K., Mahboob, M., Rozati, R., Banu, B., und Rahman, M. Evaluation of genetic damage in workers employed in pesticide production utilizing the Comet assay. *Mutagenesis 18*, 201–205 (2003).

[56] Hanelt, S., Helbig, R., Hartmann, A., Lang, M., Seidel, A., und Speit, G. A comparative investigation of DNA adducts, DNA strand breaks and gene mutations induced by benzo[a]pyrene and (+/-)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-diol 9,10-oxide in cultured human cells. *Mutat. Res. 390*, 179–188 (1997).

[57] Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V., und Tice, R. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis 18*, 45–51 (2003).

[58] Hartmann, A., Fender, H., und Speit, G. Comparative biomonitoring study of workers at a waste disposal site using cytogenetic tests and the comet (single-cell gel) assay. *Environ. Mol. Mutagen. 32*, 17–24 (1998).

[59] Hartmann, A., Plappert, U., Raddatz, K., Grünert-Fuchs, M., und Speit, G. Does physical activity induce DNA damage? *Mutagenesis 9*, 269–272 (1994).

[60] Hayashi, S., Watanabe, J., und Kawajiri, K. Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIE1 gene. *J. Biochem. 110*, 559–565 (1991).

[61] Hayashi, S., Watanabe, J., Nakachi, K., und Kawajiri, K. Genetic linkage of lung cancer-associated MspI polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P450IA1 gene. *J. Biochem. 110*, 407–411 (1991).

[62] Hecht, S. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst. 91*, 1194–1210 (1999).

[63] Hininger, I., Chollat-Namy, A., Sauvaigo, S., Osman, M., Faure, H., Cadet, J., Favier, A., und Roussel, A. Assessment of DNA damage by comet assay on frozen total blood: method and evaluation in smokers and non-smokers. *Mutat. Res. 558*, 75–80 (2004).

[64] Hoffmann, H. und Speit, G. Assessment of DNA damage in peripheral blood of heavy smokers with the comet assay and the micronucleus test. *Mutat. Res. 581*, 105–114 (2005).

[65] Hou, S., Falt, S., Angelini, S., Yang, K., Nyberg, F., Lambert, B., und Hemminki, K. The XPD variant alleles are associated with increased aromatic DNA adduct level and lung cancer risk. *Carcinogenesis 23*, 599–603 (2002).

[66] Hu, J., Smith, T., Miller, M., Mohrenweiser, H., Golden, A., und Case, L. Amino acid substitution variants of APE1 and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity. *Carcinogenesis 22*, 917–922 (2001).

[67] Hung, R., Boffetta, P., Brockmoller, J., Butkiewicz, D., Cascorbi, I., Clapper, M., Garte, S., Haugen, A., Hirvonen, A., Anttila, S., Kalina, I., Le Marchand, L., London, S., Rannug, A., Romkes, M., Salagovic, J., Schoket, B., Gaspari, L., und Taioli, E. CYP1A1 and GSTM1 genetic polymorphisms and lung cancer risk in Caucasian non-smokers: a pooled analysis. *Carcinogenesis 24*, 875–882 (2003).

[68] Husgafvel-Pursiainen, K. Genotoxicity of environmental tobacco smoke: a review. *Mutat. Res. 567*, 427–445 (2004).

[69] International Agency for Research on Cancer. Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 83*, 1–1438 (2004).

[70] Ishikawa, H., Yamamoto, H., Tian, Y., Kawano, M., Yamauchi, T., und Yokoyama, K. Evidence of association of the CYP2E1 genetic polymorphism with micronuclei frequency in human peripheral blood. *Mutat. Res. 546*, 45–53 (2004).

[71] Jianlin, L., Jiliang, H., Lifen, J., Wei, Z., Baohong, W., und Hongping, D. Measuring the genetic damage in cancer patients during radiotherapy with three genetic end-points. *Mutagenesis 19*, 457–464 (2004).

[72] Kalaiselvi, K., Rajaguru, P., Palanivel, M., Usharani, M., und Ramu, G. Chromosomal aberration, micronucleus and Comet assays on peripheral blood lymphocytes of leprosy patients undergoing multidrug treatment. *Mutagenesis 17*, 309–312 (2002).

[73] Kato, S., Bowman, E., Harrington, A., Blomeke, B., und Shields, P. Human lung carcinogen-DNA adduct levels mediated by genetic polymorphisms in vivo. *J. Natl. Cancer Inst. 87*, 902–907 (1995).

[74] Kawamoto, T., Koga, M., Murata, K., Matsuda, S., und Kodama, Y. Effects of ALDH2, CYP1A1, and CYP2E1 genetic polymorphisms and smoking and drinking habits on toluene metabolism in humans. *Toxicol. Appl. Pharmacol. 133*, 295–304 (1995).

[75] Kiuru, A., Lindholm, C., Heilimo, I., Ceppi, M., Koivistoinen, A., Ilus, T., Hirvonen, A., Norppa, H., und Salomaa, S. Influence of DNA repair gene polymorphisms on the yield of chromosomal aberrations. *Environ. Mol. Mutagen. 46*, 198–205 (2005).

[76] Kopjar, N. und Garaj-Vrhovac, V. Assessment of DNA damage in nuclear medicine personnel–comparative study with the alkaline comet assay and the chromosome aberration test. *Int. J. Hyg. Environ. Health 208*, 179–191 (2005).

[77] Laffon, B., Pasaro, E., und Mendez, J. Evaluation of genotoxic effects in a group of workers exposed to low levels of styrene. *Toxicology 171*, 175–186 (2002).

[78] Lam, T., Zhu, C., und Jiang, C. Lymphocyte DNA damage in elevator manufacturing workers in Guangzhou, China. *Mutat. Res. 515*, 147–157 (2002).

[79] Landi, S., Gemignani, F., Gioia-Patricola, L., Chabrier, A., und Canzian, F. Evaluation of a microarray for genotyping polymorphisms related to xenobiotic metabolism and DNA repair. *Biotechniques 35*, 816–817 (2003).

[80] Leanderson, P. und Tagesson, C. Cigarette smoke-induced DNA-damage: role of hydroquinone and catechol in the formation of the oxidative DNA-adduct, 8-hydroxydeoxyguanosine. *Chem. Biol. Interact. 75*, 71–81 (1990).

[81] Lebailly, P., Vigreux, C., Lechevrel, C., Ledemeney, D., Godard, T., Sichel, F., LeTalaer, J., Henry-Amar, M., und Gauduchon, P. DNA damage in mononuclear leukocytes of farmers measured using the alkaline comet assay: discussion of critical parameters and evaluation of seasonal variations in relation to pesticide exposure. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 7*, 917–927 (1998).

[82] Leng, S., Cheng, J., Pan, Z., Huang, C., Niu, Y., Dai, Y., Li, B., He, F., und Zheng, Y. Associations between XRCC1 and ERCC2 polymorphisms and DNA damage in peripheral blood lymphocyte among coke oven workers. *Biomarkers 9*, 395–406 (2004).

[83] Lovell, D., Thomas, G., und Dubow, R. Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of in vivo and in vitro comet studies. *Teratog. Carcinog. Mutagen. 19*, 109–119 (1999).

[84] Lowe, G., Booth, L., Young, A., und Bilton, R. Lycopene and beta-carotene protect against oxidative damage in HT29 cells at low concentrations but rapidly lose this capacity at higher doses. *Free Radic. Res. 30*, 141–151 (1999).

[85] Lunn, R. M., Langlois, R. G., Hsieh, L. L., Thompson, C. L., und Bell, D. A. XRCC1 polymorphisms: effects on aflatoxin B1-DNA adducts and glycophorin A variant frequency. *Cancer Res. 59*, 2557–2561 (1999).

[86] Lunn, R., Helzlsouer, K., Parshad, R., Umbach, D., Harris, E., Sanford, K., und Bell, D. XPD polymorphisms: effects on DNA repair proficiency. *Carcinogenesis 21*, 551–555 (2000).

[87] Maluf, S. und Erdtmann, B. Follow-up study of the genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by cytokinesis-block micronuclei analysis and single cell gel electrophoresis assay. *Mutat. Res. 471*, 21–27 (2000).

[88] Maluf, S., Passos, D., Bacelar, A., Speit, G., und Erdtmann, B. Assessment of DNA damage in lymphocytes of workers exposed to X-radiation using the micronucleus test and the comet assay. *Environ. Mol. Mutagen. 38*, 311–315 (2001).

[89] Marczynski, B., Rihs, H., Rossbach, B., Holzer, J., Angerer, J., Scherenberg, M., Hoffmann, G., Bruning, T., und Wilhelm, M. Analysis of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine and DNA strand breaks in white blood cells of occupationally exposed workers: comparison with ambient monitoring, urinary metabolites and enzyme polymorphisms. *Carcinogenesis 23*, 273–281 (2002).

[90] Mateuca, R., Aka, P., De Boeck, M., Hauspie, R., Kirsch-Volders, M., und Lison, D. Influence of hOGG1, XRCC1 and XRCC3 genotypes on biomarkers of genotoxicity in workers exposed to cobalt or hard metal dusts. *Toxicol. Lett. 156*, 277–288 (2005).

[91] Matullo, G., Guarrera, S., Carturan, S., Peluso, M., Malaveille, C., Davico, L., Piazza, A., und Vineis, P. DNA repair gene polymorphisms, bulky DNA adducts in white blood cells and bladder cancer in a case-control study. *Int. J. Cancer 92*, 562–567 (2001).

[92] Matullo, G., Palli, D., Peluso, M., Guarrera, S., Carturan, S., Celentano, E., Krogh, V., Munnia, A., Tumino, R., Polidoro, S., Piazza, A., und Vineis, P. XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and (32)P-DNA adducts in a sample of healthy subjects. *Carcinogenesis 22*, 1437–1445 (2001).

[93] Mayer, C., Popanda, O., Zelezny, O., von Brevern, M., Bach, A., Bartsch, H., und Schmezer, P. DNA repair capacity after gamma-irradiation and expression profiles of DNA repair genes in resting and proliferating human peripheral blood lymphocytes. *DNA Repair 1*, 237–250 (2002).

[94] Mino, C., Arevalo, M., Sanchez, M., und Leone, P. Chromosome and DNA damage analysis in individuals occupationally exposed to pesticides with relation to genetic polymorphism for CYP 1A1 gene in Ecuador. *Mutat. Res. 562*, 77–89 (2004).

[95] Møller, P., Knudsen, L., Frentz, G., Dybdahl, M., Wallin, H., und Nexo, B. Seasonal variation of DNA damage and repair in patients with non-melanoma skin cancer and referents with and without psoriasis. *Mutat. Res. 407*, 25–34 (1998).

[96] Møller, P., Knudsen, L., Loft, S., und Wallin, H. The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 9*, 1005–1015 (2000).

[97] Møller, P. Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA. *Mutat. Res. 612*, 84–104 (2006).

[98] Müller, W., Bauch, T., Stuben, G., Sack, H., und Streffer, C. Radiation sensitivity of lymphocytes from healthy individuals and cancer patients as measured by the comet assay. *Radiat. Environ. Biophys. 40*, 83–89 (2001).

[99] Mohankumar, M., Janani, S., Prabhu, B., Kumar, P., und Jeevanram, R. DNA damage and integrity of UV-induced DNA repair in lymphocytes of smokers analysed by the comet assay. *Mutat. Res. 520*, 179–187 (2002).

[100] Moretti, M., Villarini, M., Scassellati-Sforzolini, G., Monarca, S., Libraro, M., Fatigoni, C., Donato, F., Leonardis, C., und Perego, L. Biological monitoring of genotoxic hazard in workers of the rubber industry. *Environ. Health Perspect. 104*, 543–545 (1996).

[101] Naccarati, A., Soucek, P., Stetina, R., Haufroid, V., Kumar, R., Vodickova, L., Trtkova, K., Dusinska, M., Hemminki, K., und Vodicka, P. Genetic polymorphisms and possible gene-gene interactions in metabolic and DNA repair genes: effects on DNA damage. *Mutat. Res. 593*, 22–31 (2006).

[102] Nakayama, T., Kaneko, M., Kodama, M., und Nagata, C. Cigarette smoke induces DNA single-strand breaks in human cells. *Nature 314*, 462–464 (1985).

[103] Narayanan, S., O'Donovan, M., und Duthie, S. Lysis of whole blood in vitro causes DNA strand breaks in human lymphocytes. *Mutagenesis 16*, 455–459 (2001).

[104] Nia, A., Van Schooten, F., Schilderman, P., De Kok, T., Haenen, G., Van Herwijnen, M., Van Agen, E., Pachen, D., und Kleinjans, J. A multi-biomarker approach to study the effects of smoking on oxidative DNA damage and repair and antioxidative defense mechanisms. *Carcinogenesis 22*, 395–401 (2001).

[105] Niess, A. M., Hartmann, A., Grünert-Fuchs, M., Poch, B., und Speit, G. DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. *Int. J. Sports. Med. 17*, 397–403 (1996).

[106] Okada, T., Kawashima, K., Fukushi, S., Minakuchi, T., und Nishimura, S. Association between a cytochrome P450 CYPIA1 genotype and incidence of lung cancer. *Pharmacogenetics 4*, 333–340 (1994).

[107] Osswald, K., Mittas, A., Glei, M., und Pool-Zobel, B. New revival of an old biomarker: characterisation of buccal cells and determination of genetic damage in the isolated fraction of viable leucocytes. *Mutat. Res. 544*, 321–329 (2003).

[108] Palli, D., Russo, A., Masala, G., Saieva, C., Guarrera, S., Carturan, S., Munnia, A., Matullo, G., und Peluso, M. DNA adduct levels and DNA repair polymorphisms in traffic-exposed workers and a general population sample. *Int. J. Cancer 94*, 121–127 (2001).

[109] Palus, J., Dziubaltowska, E., und Rydzynski, K. DNA damage detected by the comet assay in the white blood cells of workers in a wooden furniture plant. *Mutat. Res. 444*, 61–74 (1999).

[110] Palus, J., Rydzynski, K., Dziubaltowska, E., Wyszynska, K., Natarajan, A., und Nilsson, R. Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium. *Mutat. Res. 540*, 19–28 (2003).

[111] Pastorelli, R., Cerri, A., Mezzetti, M., Consonni, E., und Airoldi, L. Effect of DNA repair gene polymorphisms on BPDE-DNA adducts in human lymphocytes. *Int. J. Cancer 100*, 9–13 (2002).

[112] Pavanello, S. und Clonfero, E. Biological indicators of genotoxic risk and metabolic polymorphisms. *Mutat. Res. 463*, 285–308 (2000).

[113] Pavanello, S., Pulliero, A., Siwinska, E., Mielzynska, D., und Clonfero, E. Reduced nucleotide excision repair and GSTM1-null genotypes influence anti-B[a]PDE-DNA adduct levels in mononuclear white blood cells of highly PAH-exposed coke oven workers. *Carcinogenesis 26*, 169–175 (2005).

[114] Pavanello, S., Siwinska, E., Mielzynska, D., und Clonfero, E. GSTM1 null genotype as a risk factor for anti-BPDE-DNA adduct formation in mononuclear white blood cells of coke-oven workers. *Mutat. Res. 558*, 53–62 (2004).

[115] Peluso, M., Neri, M., Margarino, G., Mereu, C., Munnia, A., Ceppi, M., Buratti, M., Felletti, R., Stea, F., Quaglia, R., Puntoni, R., Taioli, E., Garte, S., und Bonassi, S. Comparison of DNA adduct levels in nasal mucosa, lymphocytes

and bronchial mucosa of cigarette smokers and interaction with metabolic gene polymorphisms. *Carcinogenesis 25*, 2459–2465 (2004).

[116] Piperakis, S., Petrakou, E., und Tsilimigaki, S. Effects of air pollution and smoking on DNA damage of human lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen. 36*, 243–249 (2000).

[117] Pitarque, M., Creus, A., Marcos, R., Hughes, J., und Anderson, D. Examination of various biomarkers measuring genotoxic endpoints from Barcelona airport personnel. *Mutat. Res. 440*, 195–204 (1999).

[118] Pitarque, M., Vaglenov, A., Nosko, M., Hirvonen, A., Norppa, H., Creus, A., und Marcos, R. Evaluation of DNA damage by the Comet assay in shoe workers exposed to toluene and other organic solvents. *Mutat. Res. 441*, 115–127 (1999).

[119] Plappert, U., Stocker, B., Fender, H., und Fliedner, T. Changes in the repair capacity of blood cells as a biomarker for chronic low-dose exposure to ionizing radiation. *Environ. Mol. Mutagen. 30*, 153–160 (1997).

[120] Polasa, K., Naidu, A., Ravindranath, I., und Krishnaswamy, K. Inhibition of B(a)P induced strand breaks in presence of curcumin. *Mutat. Res. 557*, 203–213 (2004).

[121] Poli, P., Buschini, A., Spaggiari, A., Rizzoli, V., Carlo-Stella, C., und Rossi, C. DNA damage by tobacco smoke and some antiblastic drugs evaluated using the Comet assay. *Toxicol. Lett. 108*, 267–276 (1999).

[122] Popanda, O., Schattenberg, T., Phong, C., Butkiewicz, D., Risch, A., Edler, L., Kayser, K., Dienemann, H., Schulz, V., Drings, P., Bartsch, H., und Schmezer, P. Specific combinations of DNA repair gene variants and increased risk for non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis 25*, 2433–2441 (2004).

[123] Price, E. A., Bourne, S. L., Radbourne, R., Lawton, P. A., Lamerdin, J., Thompson, L. H., und Arrand, J. E. Rare microsatellite polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1, XRCC3 and XRCC5 associated with cancer in patients of varying radiosensitivity. *Somat. Cell Mo. Genet. 23*, 237–247 (1997).

[124] Qiao, Y., Spitz, M., Shen, H., Guo, Z., Shete, S., Hedayati, M., Grossman, L., Mohrenweiser, H., und Wei, Q. Modulation of repair of ultraviolet damage in the host-cell reactivation assay by polymorphic XPC and XPD/ERCC2 genotypes. *Carcinogenesis 23*, 295–299 (2002).

[125] Rajaee-Behbahani, N., Schmezer, P., Risch, A., Rittgen, W., Kayser, K., Dienemann, H., Schulz, V., Drings, P., Thiel, S., und Bartsch, H. Altered DNA repair capacity and bleomycin sensitivity as risk markers for non-small cell lung cancer. *Int. J. Cancer 95*, 86–91 (2001).

[126] Review Manager (RevMan). [Computer program]. Version 4.2 for Windows. Oxford, England: The Cochrane Collaboration. (2003).

[127] RevMan Analyses. [Computer program]. Version 1.0 for Windows. In: Review Manager (RevMan) 4.2. Oxford, England: The Cochrane Collaboration. (2003).

[128] Rojas, E., Valverde, M., Lopez, M., Naufal, I., Sanchez, I., Bizarro, P., Lopez, I., Fortoul, T., und Ostrosky-Wegman, P. Evaluation of DNA damage in exfoliated tear duct epithelial cells from individuals exposed to air pollution assessed by single cell gel electrophoresis assay. *Mutat. Res. 468*, 11–17 (2000).

[129] Rojas, E., Valverde, M., Sordo, M., und Ostrosky-Wegman, P. DNA damage in exfoliated buccal cells of smokers assessed by the single cell gel electrophoresis assay. *Mutat. Res. 370*, 115–120 (1996).

[130] Sardas, S., Aygun, N., und Karakaya, A. Genotoxicity studies on professional hair colorists exposed to oxidation hair dyes. *Mutat. Res. 394*, 153–161 (1997).

[131] Sardas, S., Walker, D., Akyol, D., und Karakaya, A. Assessment of smoking-induced DNA damage in lymphocytes of smoking mothers of newborn infants using the alkaline single-cell gel electrophoresis technique. *Mutat. Res. 335*, 213–217 (1995).

[132] Sardas, S., Yilmaz, M., Oztok, U., Cakir, N., und Karakaya, A. Assessment of DNA strand breakage by comet assay in diabetic patients and the role of antioxidant supplementation. *Mutat. Res. 490*, 123–129 (2001).

[133] Schabath, M., Spitz, M., Grossman, H., Zhang, K., Dinney, C., Zheng, P., und Wu, X. Genetic instability in bladder cancer assessed by the comet assay. *J. Natl. Cancer Inst. 95*, 540–547 (2003).

[134] Schaeffer, L., Moncollin, V., Roy, R., Staub, A., Mezzina, M., Sarasin, A., Weeda, G., Hoeijmakers, J., und Egly, J. The ERCC2/DNA repair protein is associated with the class II BTF2/TFIIH transcription factor. *EMBO J. 13*, 2388–2392 (1994).

[135] Schempp, W. und Vogel, W. Difference between diploid and aneuploid Chinese hamster cells in replication at mid-S-phase. *Chromosoma 73*, 109–115 (1979).

[136] Schmezer, P., Rajaee-Behbahani, N., Risch, A., Thiel, S., Rittgen, W., Drings, P., Dienemann, H., Kayser, K., Schulz, V., und Bartsch, H. Rapid screening assay for mutagen sensitivity and DNA repair capacity in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis 16*, 25–30 (2001).

[137] Shen, M., Jones, I., und Mohrenweiser, H. Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res. 58*, 604–608 (1998).

[138] Shields, P. Molecular epidemiology of smoking and lung cancer. *Oncogene 21*, 6870–6876 (2002).

[139] Singh, N., McCoy, M., Tice, R., und Schneider, E. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res. 175*, 184–191 (1988).

[140] Spadari, S., Focher, F., Sala, F., Ciarrocchi, G., Koch, G., Falaschi, A., und Pedrali-Noy, G. Control of cell division by aphidicolin without adverse effects upon resting cells. *Arzneimittelforschung 35*, 1108–1116 (1985).

[141] Speit, G. und Hartmann, A. The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis 10*, 555–559 (1995).

[142] Speit, G. und Hartmann, A. The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol. Biol. 113*, 203–212 (1999).

[143] Speit, G., Merk, O., und Rothfuss, A. The Comet Assay as a Biological Monitoring Test. In: *Deutsche Forschungsgemeinschaft; Biological Monitoring; Prospects in Occupational and Environmental Medicine*, Hrsg.: Angerer, J. und Weiá, T. (Wiley-VCH, Weinheim) Bd. 5.3, S. 130–139 (2002).

[144] Speit, G., Schutz, P., Bonzheim, I., Trenz, K., und Hoffmann, H. Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay. *Toxicol. Lett. 146*, 151–158 (2004).

[145] Speit, G., Schutz, P., und Hoffmann, H. Enhancement of genotoxic effects in the comet assay with human blood samples by aphidicolin. *Toxicol. Lett. 153*, 303–310 (2004).

[146] Speit, G., Trenz, K., Schutz, P., Rothfuss, A., und Merk, O. The influence of temperature during alkaline treatment and electrophoresis on results obtained with the comet assay. *Toxicol. Lett. 110*, 73–78 (1999).

[147] Speit, G., Witton-Davies, T., Heepchantree, W., Trenz, K., und Hoffmann, H. Investigations on the effect of cigarette smoking in the comet assay. *Mutat. Res. 542*, 33–42 (2003).

[148] Spira, A., Beane, J., Shah, V., Liu, G., Schembri, F., Yang, X., Palma, J., und Brody, J. Effects of cigarette smoke on the human airway epithelial cell transcriptome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101*, 10143–10148 (2004).

[149] Sram, R. Effect of glutathione S-transferase M1 polymorphisms on biomarkers of exposure and effects. *Environ. Health Perspect. 106*, 231–239 (1998).

[150] Sram, R., Binkova, B., Rossner, P., Rubes, J., Topinka, J., und Dejmek, J. Adverse reproductive outcomes from exposure to environmental mutagens. *Mutat. Res. 428*, 203–215 (1999).

[151] Sram, R., Podrazilova, K., Dejmek, J., Mrackova, G., und Pilcik, T. Single cell gel electrophoresis assay: sensitivity of peripheral white blood cells in human population studies. *Mutagenesis 13*, 99–103 (1998).

[152] Sram, R., Rossner, P., Peltonen, K., Podrazilova, K., Mrackova, G., Demopoulos, N., Stephanou, G., Vlachodimitropoulos, D., Darroudi, F., und Tates, A. Chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges, cells with high frequency of SCE, micronuclei and comet assay parameters in 1, 3-butadiene-exposed workers. *Mutat. Res. 419*, 145–154 (1998).

[153] Sturgis, E., Zheng, R., Li, L., Castillo, E., Eicher, S., Chen, M., Strom, S., Spitz, M., und Wei, Q. XPD/ERCC2 polymorphisms and risk of head and neck cancer: a case-control analysis. *Carcinogenesis 21*, 2219–2223 (2000).

[154] Sul, D., Oh, E., Im, H., Yang, M., Kim, C., und Lee, E. DNA damage in T- and B-lymphocytes and granulocytes in emission inspection and incineration workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat. Res. 538*, 109–119 (2003).

[155] Thompson, L. H. und West, M. G. XRCC1 keeps DNA from getting stranded. *Mutat. Res. 459*, 1–18 (2000).

[156] Tice, R. The single cell gel / comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: *Environmental Mutagenesis*, Hrsg.: Phillips, D. und Venitt, S. (BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford), S. 315–339 (1995).

[157] Tice, R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J., und Sasaki, Y. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen. 35*, 206–221 (2000).

[158] Tomescu, D., Kavanagh, G., Ha, T., Campbell, H., und Melton, D. Nucleotide excision repair gene XPD polymorphisms and genetic predisposition to melanoma. *Carcinogenesis 22*, 403–408 (2001).

[159] Touil, N., Aka, P., Buchet, J., Thierens, H., und Kirsch-Volders, M. Assessment of genotoxic effects related to chronic low level exposure to ionizing radiation using biomarkers for DNA damage and repair. *Mutagenesis 17*, 223–232 (2002).

[160] Valverde, M., del Carmen, L. M., Lopez, I., Sanchez, I., Fortoul, T., Ostrosky-Wegman, P., und Rojas, E. DNA damage in leukocytes and buccal and nasal epithelial cells of individuals exposed to air pollution in Mexico City. *Environ. Mol. Mutagen. 30*, 147–152 (1997).

[161] van Delft, J., Steenwinkel, M., van Asten, J., de Vogel, N., Bruijntjes-Rozier, T., Schouten, T., Cramers, P., Maas, L., Van Herwijnen, M., van Schooten, F., und Hopmans, P. Biological monitoring the exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons of coke oven workers in relation to smoking and genetic polymorphisms for GSTM1 and GSTT1. *Ann. Occup. Hyg. 45*, 395–408 (2001).

[162] Viezzer, C., Norppa, H., Clonfero, E., Gabbani, G., Mastrangelo, G., Hirvonen, A., und Celotti, L. Influence of GSTM1, GSTT1, GSTP1, and EPHX gene polymorphisms on DNA adduct level and HPRT mutant frequency in coke-oven workers. *Mutat. Res. 431*, 259–269 (1999).

[163] Vodicka, P., Kumar, R., Stetina, R., Musak, L., Soucek, P., Haufroid, V., Sasiadek, M., Vodickova, L., Naccarati, A., Sedikova, J., Sanyal, S., Kuricova, M., Brsiak, V., Norppa, H., Buchancova, J., und Hemminki, K. Markers of individual

susceptibility and DNA repair rate in workers exposed to xenobiotics in a tire plant. *Environ. Mol. Mutagen. 44*, 283–292 (2004).

[164] Vodicka, P., Kumar, R., Stetina, R., Sanyal, S., Soucek, P., Haufroid, V., Dusinska, M., Kuricova, M., Zamecnikova, M., Musak, L., Buchancova, J., Norppa, H., Hirvonen, A., Vodickova, L., Naccarati, A., Matousu, Z., und Hemminki, K. Genetic polymorphisms in DNA repair genes and possible links with DNA repair rates, chromosomal aberrations and single-strand breaks in DNA. *Carcinogenesis 25*, 757–763 (2004).

[165] Vogel, U., Hedayati, M., Dybdahl, M., Grossman, L., und Nexo, B. Polymorphisms of the DNA repair gene XPD: correlations with risk of basal cell carcinoma revisited. *Carcinogenesis 22*, 899–904 (2001).

[166] Wiencke, J. DNA adduct burden and tobacco carcinogenesis. *Oncogene 21*, 7376–7391 (2002).

[167] Wiklund, S. und Agurell, E. Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay. *Mutagenesis 18*, 167–175 (2003).

[168] Winsey, S., Haldar, N., Marsh, H., Bunce, M., Marshall, S., Harris, A., Wojnarowska, F., und Welsh, K. A variant within the DNA repair gene XRCC3 is associated with the development of melanoma skin cancer. *Cancer Res. 60*, 5612–5616 (2000).

[169] Wojewodzka, M., Kruszewski, M., Iwanenko, T., Collins, A., und Szumiel, I. Lack of adverse effect of smoking habit on DNA strand breakage and base damage, as revealed by the alkaline comet assay. *Mutat. Res. 440*, 19–25 (1999).

[170] Wolf, A., Kutz, A., Plottner, S., Behm, C., Bolt, H., Follmann, W., und Kuhlmann, J. The effect of benzo(a)pyrene on porcine urinary bladder epithelial cells analyzed for the expression of selected genes and cellular toxicological endpoints. *Toxicology 207*, 255–269 (2005).

[171] Wu, X., Gu, J., Amos, C., Jiang, H., Hong, W., und Spitz, M. A parallel study of in vitro sensitivity to benzo[a]pyrene diol epoxide and bleomycin in lung carcinoma cases and controls. *Cancer 83*, 1118–1127 (1998).

[172] Wu, X., Zhao, H., Suk, R., und Christiani, D. Genetic susceptibility to tobacco-related cancer. *Oncogene 23*, 6500–6523 (2004).

[173] Yang, Q., Hergenhahn, M., Weninger, A., und Bartsch, H. Cigarette smoke induces direct DNA damage in the human B-lymphoid cell line Raji. *Carcinogenesis 20*, 1769–1775 (1999).

[174] Yu, Z., Ford, B., und Glickman, B. Identification of genes responsive to BPDE treatment in HeLa cells using cDNA expression assays. *Environ. Mol. Mutagen. 36*, 201–205 (2000).

[175] Zhang, H., Buchholz, T., Hancock, D., Spitz, M., und Wu, X. Gamma-radiation-induced single cell DNA damage as a measure of susceptibility to lung cancer: a preliminary report. *Int. J. Oncol. 17*, 399–404 (2000).

[176] Zhu, C., Lam, T., und Jiang, C. Lymphocyte DNA damage in bus manufacturing workers. *Mutat. Res. 491*, 173–181 (2001).

[177] Zhu, C., Lam, T., Jiang, C., Wei, B., Lou, X., Liu, W., Lao, X., und Chen, Y. Lymphocyte DNA damage in cigarette factory workers measured by the Comet assay. *Mutat. Res. 444*, 1–6 (1999).

[178] Zhu, C., Lam, T., Jiang, C., Wei, B., Xu, Q., und Chen, Y. Increased lymphocyte DNA strand breaks in rubber workers. *Mutat. Res. 470*, 201–209 (2000).

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich während dieser Arbeit unterstützt haben.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. G. Speit für die Vergabe des Themas und für seine kompetente Betreuung bedanken. Seine Diskussionsbereitschaft war mir eine große Hilfe. Auch dass ich mit allen Fragen zu ihm kommen konnte und dass er sich immer sofort Zeit für mich nahm, empfand ich als sehr schön. Außerdem ermöglichte er mir die Teilnahme an zahlreichen Tagungen, Workshops und Fortbildungen. Vielen Dank Günter, dass Du Dich immer für mich eingesetzt hast und für die zahlreichen lustigen Stunden!

Herrn Prof. Dr. W. Vogel danke ich für die Aufnahme in die Abteilung Humangenetik und sein Interesse an dieser Arbeit. Er förderte auch finanziell die Teilnahme an Tagungen und Fortbildungen, wofür ich mich bedanken möchte.

Herrn Prof. Dr. P. Radermacher danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Kollegen bedanken, die stets für ein sehr angenehmes Arbeitsklima gesorgt haben. Petra Schütz danke ich besonders für die unendlich vielen Blutentnahmen, die sie für mich Durchgeführt hat und dafür, dass sie immer „sofort“ mithalf kleinere Problemchen zu lösen. Bei Oliver Schmid möchte ich mich für das schnelle Korrekturlesen und viele netten Gespräche bedanken. Ein Dank geht auch an Evelyn Jäger, die durch ihre lustige Art den Alltag verschönert hat.

Danken möchte ich auch Thomas Witton-Davies und Caroline Isner, die an diesem Projekt mitgearbeitet haben und deren Daten mit in diese Arbeit eingeflossen sind.

Ein großer Dank gebührt auch Herrn PD Dr. J. Högel, der mir stets bei mathematischen Problemen zur Seite stand. Auch Herrn Herbert Heinz möchte ich für seine Hilfe bei Computerproblemen danken.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitgliedern der „Mittagsrunde“ für lustige

Stunden bedanken und dass sie meine manchmal „essensunwürdigen“ Themen mit viel Humor mit mir ausdiskutiert haben.

Meinem „Lieblingskaukasier“ möchte ich ganz besonders herzlich danken.

Zuletzt geht mein ausdrücklicher Dank an meine Eltern, die mich während meiner gesamten Ausbildung unterstützt haben.

Publikationsverzeichnis

1. Publikationen, die im Zusammenhang mit dieser Arbeit entstanden sind:

Speit, G., Witton-Davies, T., Heepchantree, W., Trenz, K., und Hoffmann, H. Investigations on the effect of cigarette smoking in the comet assay. *Mutat.Res. 542*, 33-42 (2003).

Speit, G., Schütz, P., Bonzheim, I., Trenz, K., und Hoffmann, H. Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay. *Toxicol.Lett. 146*, 151-158 (2004).

Speit, G., Schütz, P., und Hoffmann, H. Enhancement of genotoxic effects in the comet assay with human blood samples by aphidicoline. *Toxicol.Lett. 153*, 303-310 (2004).

Hoffmann, H. und Speit, G. Assessment of DNA damage in peripheral blood of heavy smokers with the comet assay and the micronucleus test. *Mutat.Res. 581*, 105-114 (2005).

Hoffmann, H., Isner, C., Högel, J., und Speit, G. Genetic polymorphisms and the effect of cigarette smoking in the comet assay. *Mutagenesis 20*, 359-364 (2005).

Hoffmann, H., Högel, J., und Speit, G. The effect of smoking on DNA effects in the comet assay: a meta-analysis. *Mutagenesis 20*, 455-466 (2005).

2. Tagungsbeiträge:

Hoffmann, H. und Speit, G. Comparative investigations with the comet assay and the micronucleus test on the genotoxic effect of smoking. *GUM-Tagung in Würzburg*, 5. - 8. Oktober 2004.

Hoffmann, H., Witton-Davies, T., Isner, C., und Speit, G. Comparative investigations on DNA damage, mutagen sensitivity and DNA repair capacity in smokers and non-smokers with the comet assay. *DNA repair-Tagung in Ulm*, 28. September - 1. Oktober 2004.

Hoffmann, H., Högel, J., und Speit, G. Is the comet assay a useful tool for detecting smoking-related DNA damage? *Comet Assay Workshop in Warschau*, 22. - 24. September 2005.

Hoffmann, H. und Speit, G. Genetic polymorphisms, expression of repair genes and the effect of smoking in the comet assay. *GUM-Tagung in Darmstadt*, 21. - 24. Februar 2006.

Lebenslauf

Persönliches:

Name	Heike Hoffmann
Geburtsdatum	12. Juni 1977
Geburtsort	Augsburg

Schulausbildung:

September 1983 - Juli 1987	Blériot-Volksschule Augsburg
September 1987 - Juli 1989	Kerschensteiner-Volksschule Augsburg
September 1989 - Juli 1993	Maria-Ward-Realschule Augsburg
September 1993 - Juli 1997	Holbein-Gymnasium Augsburg

Akademische Ausbildung:

Oktober 1997 - September 1999	Grundstudium der Biologie an der Universität Ulm
Oktober 1999 - Mai 2001	Hauptstudium der Biologie an der Universität Ulm mit den Studienschwerpunkten Mikrobiologie, Genetik, Medizinische Mikrobiologie und Analytische Chemie
Mai 2001 - April 2002	Mikrobiologische Diplomarbeit mit dem Thema: Identifizierung und Charakterisierung des *crc*-Gen-Homologen bei *Acinetobacter sp.* Stamm ADP1
seit Januar 2003	Promotion in der Abteilung Humangenetik des Universitätsklinikums Ulm mit dem Thema: Der Comet Assay als Test im Biomonitoring - Untersuchungen zur Genotoxizität des Rauchens