Universitätsklinikum Ulm
Abteilung Humangenetik
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. W. Vogel

Untersuchungen zum Einsatz des Comet Assays im Biomonitoring

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

Thomas Lyn Witton-Davies
Aalen

Ulm, 2006

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Günter Speit
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Holger Barth
Tag der Promotion:	Freitag, den 15.12.2006

Abkürzungen V

1. Einleitung 1

1.1 Genotoxizität von Zigarettenrauch 1

1.2 Comet Assay 3

1.2.1 Comet Assay im Biomonitoring 5

1.3 Benzo[a]pyren (B[a]P) 9

1.4 Genetische Polymorphismen und Mutagensensitivität 11

1.4.1 *Cytochrom P450 1A1* 12

1.4.2 *Glutathion-S-Transferasen (GST)* 13

1.5 Fragestellung 15

2. Material und Methoden 16

2.1 Material 16

2.1.1 Zellen 16

2.1.2 Chemikalien 18

2.1.3 Geräte und Materialien 19

2.1.4 Lösungen, Medien und Puffer 20

2.1.5 Primer 22

2.2 Methoden 22

2.2.1 Comet Assay (Einzelzellgelelektrophorese) 22

2.2.2 Genotypisierung 26

2.2.3 Statistik 30

3. Ergebnisse 31

3.1 Vorversuche 31

3.1.1 Untersuchung zur Bestimmung eines sensitiven Protokolls für den Comet Assay 31

3.1.2 Induktion von DNA-Schäden durch BPDE und Hemmung von Reparatur durch APC 33

3.1.3 Versuch zum Nachweis der Reparatur von BPDE-induzierten DNA-Schäden und der Einfluß von APC 34

3.1.4 Stimulierung von Vollblut durch Phytohämagglutinin 35

3.2 Ergebnisse der Studie mit Rauchern und Nichtrauchern 37

3.2.1 Basale Effekte 37

3.2.2 BPDE-induzierte Effekte 39

3.2.3 Einfluss des Reparaturinhibitors APC 40

3.2.4 Reparatur von BPDE-induzierten DNA-Schäden 42
3.2.5 Referenzstandard 43
3.2.6 Einfluss der Frequenz des Rauchens 48
3.2.7 Korrelationsanalyse 49
3.3 Genotypisierungen 50
4. Diskussion 59
4.1 Der Comet Assay als Testsystem zum Nachweis genotoxischer Effekte im Blut von Rauchern 60
4.2 Zur Bedeutung des Versuchsprotokolls beim Einsatz des Comet Assay im Biomonitoring 63
4.3 Induzierbarkeit von DNA-Schäden im Blut von Rauchern und Nichtrauchern als Marker für Mutagensensitivität 67
4.4 Reparaturkapazität für DNA-Schäden bei Rauchern und Nichtrauchern 69
4.5 Zur Bedeutung genetischer Polymorphismen für die Effekte im Comet Assay 72
5. Zusammenfassung 76
6. Literatur 77
7. Anhang 88
7.1 Abbildungsverzeichnis 88
7.2 Tabellenverzeichnis 89
7.3 Ergebnisdarstellung weiterer Comet Assay Parameter 90

Abkürzungen

AHH	Aromatische Hydrocarbon Hydroxylase
APC	Aphidicolin
Ara-C	Cytosin Arabinosid
BER	Basen-Exzisions-Reparatur
B[a]P	Benzo[a]pyren
BPDE	7,8-Diol-9,10-epoxid-benzo[a]pyren
CYP1A1	*Cytochrom P450 1A1*
EDTA	Etylendiaminotetraacetat
FCS	Fetal calf serum
GSTM1	*Glutathion-S-Transferase M1*
IARC	International Agency for Research on Cancer
Ile	Isoleucin
IPCS	International Program on Chemical Safety
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur
PAH	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PHA	Phytohämagglutinin
ROS	Reactive oxygen spezies
Val	Valin

1 Einleitung

1.1 Genotoxizität von Zigarettenrauch

Von den zahlreichen Inhaltsstoffen, die man im Rauch von Zigaretten findet, konnten bislang rund 400 quantifiziert werden. Mindestens 200 wirken beim Menschen oder im Versuchstier toxisch und über 50 stehen im starken Verdacht kanzerogen zu sein (Husgafvel-Pursiainen, 2004). Das Rauchen von Zigaretten stellt ein zentrales Problem für die Gesundheit dar und die negativen Auswirkungen machen sich weltweit bemerkbar. Es ist ein wesentlicher Risikofaktor für Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems, der Haupttodesursache in entwickelten Ländern und spielt eine große Rolle in der Entstehung von Lungentumoren, eine der häufigsten tödlichen Krebserkrankungen. Eine mutagene Wirkung von Zigarettenrauchkondensat wurde in fast allen untersuchten Testsystemen beschrieben. Gemäß der „International Agency for Research on Cancer“ (IARC) führt Rauchen zur Entwicklung von malignen Neubildungen in mehr Organsystemen als jedes andere Human-Kanzerogen (IARC, 2004).

In einem aktuellen Übersichtsartikel wird umfassend die Wirkung von Zigarettenrauch als das extremste Beispiel eines systemischen Umwelt-Mutagens dargestellt (DeMarini, 2004). Die Genotoxizität von Zigarettenrauch wurde *in vitro* und *in vivo* untersucht und in zahlreichen Studien nachgewiesen. Bei *in vitro* Studien wurden z.B. die Induktion von DNA-Strangbrüchen, die Bildung von DNA-Addukten in Säugetierzellen sowie mutagene Effekte an Bakterien demonstriert. Im Versuchstier wurden DNA-Einzelstrangbrüche, aromatische Addukte, oxidative DNA-Schädigungen, Chromosomenaberrationen und die Bildung von Mikronuklei nachgewiesen. In Nagetieren induziert Zigarettenrauch Schwester-Chromatid-Austausche sowie Mikronuklei in Knochenmark und Lungenzellen.

In Untersuchungen am Menschen fand man bei Rauchern u.a. eine erhöhte Menge an Metaboliten von Kanzerogenen im Urin, eine mutagene Wirkung von Urin, sowie erhöhte Raten an Schwester-Chromatid-Austauschen und Mutationen im HPRT-Gen in Lymphozyten. Insbesondere bei Patienten mit Lungentumoren findet sich eine hohe Frequenz an TP53- und K-ras-Mutationen, für die Bestandteile des

Zigarettenrauchs mitverantwortlich gemacht werden. Neugeborene von rauchenden Müttern hatten erhöhte Frequenzen an HPRT-Mutationen, chromosomalen Translokationen und DNA-Strangbrüchen in ihren Lymphozyten. Sperma von Rauchern zeigte erhöhte Frequenzen an Aneuploidien, DNA-Addukten, Strangbrüchen und oxidativen DNA-Schäden. Bei der i*n vitro* Fertilisation führt Sperma von Rauchern zu einer geringern Rate an Schwangerschaften. Rauchen produziert auch mutagenen Speichel und genotoxische Amnionflüssigkeit (DeMarini, 2004).

DNA-Addukte führen zu Schäden an der DNA und konnten in verschiedenen Geweben, wie z.B. Herz, Blase, Lunge oder Blut nachgewiesen werden. Untersuchungen hierzu betreffen häufig Addukte mit Benzopyren-diol-epoxid (BPDE) (Husgafvel-Pursiainen, 2004). Es gibt außerdem Hinweise darauf, dass Zellen von männlichen Rauchern DNA-Schäden schlechter eliminieren und dass die Menge an DNA-Reparatur-Enzymen durch kurzzeitig zurückliegende Exposition von Zigarettenrauch beeinflußt wird. Dies lässt sich aus der Häufigkeit an chromosomalen Veränderungen schließen. Bei Rauchern wurden vermehrt chromosomale Aberrationen in Lymphozyten als Zeichen einer mißlungenen Reparatur gefunden (DeMarini, 2004). Polymorphismen in verschiedenen Genen können zusätzlich einen Einfluß auf die Verstoffwechselung von Zigarettenrauch und damit auf dessen mutagene Wirkung haben. Die kodierten Enzyme bauen einerseits schädliche Bestandteile ab, andererseits können sie einige zunächst harmlose Substanzen in toxische Metabolite umwandeln. Benzo[a]pyren (B[a]P) und andere prokanzerogene polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAHs) werden durch Phase I Enzyme, besonders Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1), metabolisch aktiviert und können dann Addukte mit der DNA bilden. Die reaktiven Intermediate werden ihrerseits durch Phase II Enzyme abgebaut, zu denen die Glutathion-S-Transferase M1 (GSTM1) gehört. Es liegen zahlreiche, zum Teil wiedersprüchliche Studien zur Bedeutung solcher Polymorphismen für toxische Effekte des Zigarettenrauchens vor (Husgafvel-Pursiainen, 2004).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Zigarettenrauch eine nachweisbare Belastung durch eine Vielzahl von potenziellen Mutagenen darstellt. Es ist die Aufgabe des Biomonitoring mutagene Belastungen z. B. am Arbeitsplatz oder allgemein in der Umwelt zu erfassen, um geeignete Schritte zur Vermeidung solcher Expositionen einzuleiten. Es gibt verschiedene methodische Ansätze solche

Umweltbelastungen oder Arbeitsplatzbelastungen durch Mutagene im Rahmen von Biomonitoring zu erfassen (Albertini et al., 2000). Man untersucht dabei unterschiedliche biologische Materialien und Gewebe des Menschen und analysiert verschiedene genetische Endpunkte. Eine Methode mit der sich relativ einfach DNA-Schäden nachweisen lassen, ist der Comet Assay. Er wird deshalb zunehmend in Studien zum Biomonitoring eingesetzt (Speit and Hartmann, 1999). Raucher stellen eine wichtige Untersuchungsgruppe dar, deren Mutagen-Exposition sich in Abgrenzung zu Nichtrauchern mit dem Comet Assay nachweisen lassen sollte. In zahlreichen Publikationen wurden Raucher und Nichtraucher bisher mit dem Comet Assay untersucht. Dabei wurde das Rauchen entweder als primäre Exposition analysiert oder als potenzieller Störfaktor im Rahmen von anderen genotoxischen Belastungen z. B. am Arbeitsplatz (Übersicht bei Hoffmann et al., 2005).

1.2 Comet Assay

Der Comet Assay (single cell gel electrophoresis) ist inzwischen ein etablierter Genotoxizitätstest für die *in vitro*- und *in vivo* Testung von chemischen Substanzen (Hartmann et al., 2003; Tice et al., 2000). Dabei handelt es sich um eine sehr sensitive Methode für die Messung von DNA-Strangbrüchen an einzelnen Zellen. Die Zellen, wie zum Beispiel aus peripherem Vollblut, werden in Agarose aufgenommen und zum Aushärten auf einen Objektträger aufgetragen. Nach einer Lyse, die Proteine und Membranstrukturen entfernt, verbleiben Nukleoide, die helikale DNA enthalten. Brüche in der DNA entspannen die gewundene Struktur. Die alkalische Umgebung des Elektrophoresepuffers bewirkt eine Denaturierung der DNA. Das führt dazu, dass DNA-Fragmente entstehen. Führt man mit dem Objektträger eine Elektrophorese durch, so können sich diese als „Kometenschweif“ auf die Anode zubewegen. Die „Kometen“ werden mit einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet, nachdem die DNA mit einem Fluoreszenzfarbstoff (z. B. Ethidiumbromid) angefärbt wurde. Die relative Intensität der Fluoreszenz im Schweif sowie dessen Länge ist ein Resultat der DNA-Brüche und kann mit einem computergestützten Auswertesystem registriert werden. Crosslinks (DNA-DNA oder DNA-Protein) können zu verringerter Ausbildung des Schweifes führen.

Als Maß für die DNA-Migration werden verschiedene Parameter bestimmt, von denen man vier in der Praxis besonders häufig verwendet: Tail Length (Entfernung der Peak-Position des Kopfes bis zum Ende des Schweifs), Tail Migration (Entfernung vom Kopfende bis zum Schweifende), Tail Intensity (Prozent DNA im Schweif) und Tail Moment (Produkt von Tail Length und Tail Intensity).

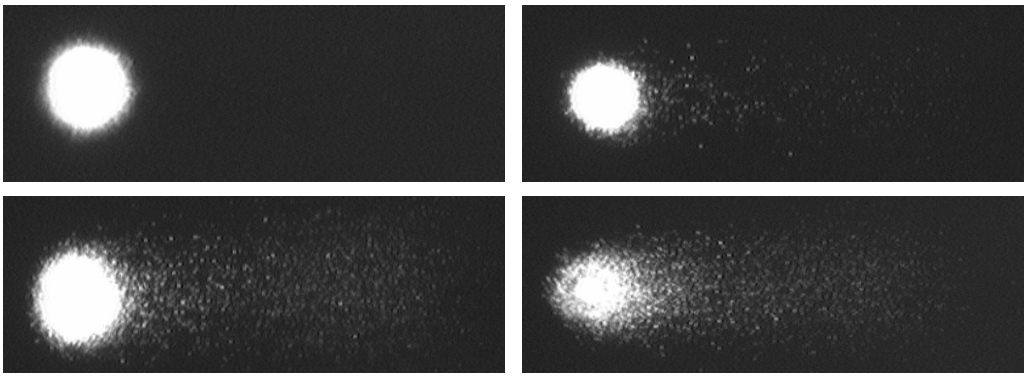


Abbildung 1: Beispiele für Zellen (Leukozyten) mit unterschiedlich starker DNA-Migration nach Durchführung des Comet Assays.

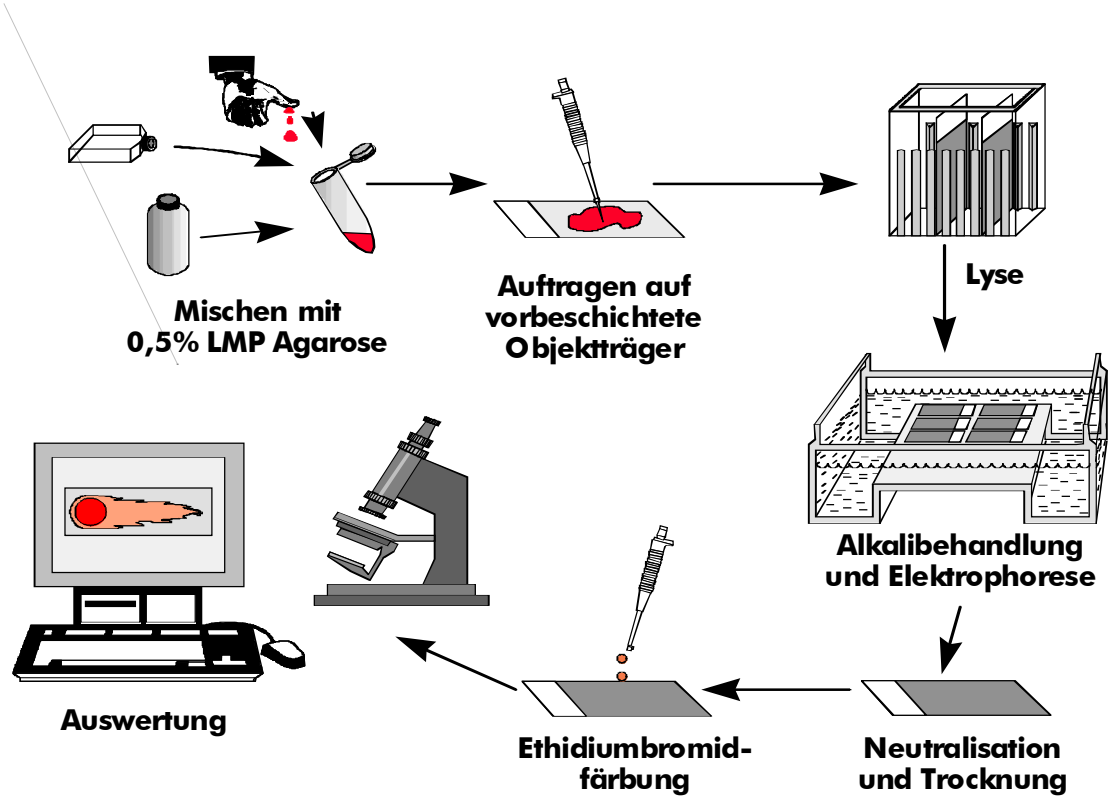


Abbildung 2: Schematischer Ablauf des Comet Assays.

Der Comet Assay kann durch geringfügige Modifikationen im technischen Ablauf in seiner Sensitivität und seinem Auflösungsvermögen verändert werden, um ihn für die

gegebene Aufgabenstellung zu optimieren. Von einer hohen Sensitivität kann ausgegangen werden, wenn unbehandelte Kontrollzellen einen kleinen Kometenschweif zeigen, d.h. der normale Hintergrund an DNA-Schäden bereits sichtbar wird. Wichtige Parameter, die hierzu modifiziert werden können, sind die Dauer der Alkalidenaturierung und der Elektrophorese sowie der Temperatur während der Durchführung.

1.2.1 Comet Assay im Biomonitoring

Die potentielle Verwendung des Comet Assays für das Biomonitoring wurde schnell erkannt, und man versucht mit dem Comet Assay die Exposition des Menschen gegenüber Genotoxinen nachzuweisen. Besonders die schnelle und kostengünstige Durchführbarkeit sprechen für die Anwendung des Comet Assays. Es ist nur wenig biologisches Material nötig. Ein Tropfen Blut reicht bereits für eine Messung aus, und so wurden vielfältige Studien zum Biomonitoring durchgeführt. Es wurden unter anderem Arbeitsplatz-Belastungen durch Styren, Vinylchlorid, 1,3-butadien, Pestizide, Haar-Färbemittel, antineoplastische Agenzien, organischen Lösungsmittel, Abwasser und Abfall, Holzstaub und ionisierende Strahlung untersucht (Übersicht bei Moller et al., 2000).

Aufgrund der Möglichkeit mit dem Comet Assay durch Modifikationen im Versuchsablauf verschiedene Formen von DNA-Schädigungen in Eukaryonten aufzuzeigen, sowie der einfachen Anwendung und hohen Sensitivität, wird diese Technik im menschlichen Biomonitoring zunehmend eingesetzt (Kassie et al., 2000; Moller et al., 2000).

Der Comet Assay wurde wiederholt zur Messung von DNA-Schäden in Bezug auf das Zigarettenrauchen eingesetzt. Der genotoxische Effekt von Zigarettenrauch, wie auch die modifizierende Wirkung auf genomische Schäden anderer Substanzen sind gut dokumentiert (Pryor, 1997; DeMarini, 1983).

In verschiedenen Arbeiten kam man zu widersprüchlichen Ergebnissen die von Moller et al. (2000) kritisch ausgewertet wurden. Neben der statistischen Analyse als einem einflussreichen Faktor für das Aufzeigen eines Effektes wurden verschiedene

andere Erklärungen (einschließlich saisonalen und regionalen Unterschieden) für die Diskrepanzen vorgeschlagen.

In einer aktuellen Meta-Analyse konnten 38 Studien zum Effekt des Rauchens auf DNA-Effekte im Comet Assay eingeschlossen werden. Die Auswertung deutet in ihrer Gesamtheit auf eine gesteigerte DNA-Schädigung bei Rauchern im Vergleich zu Nicht-Rauchern. Man kann diese Studien unterteilen in solche, die direkt den Effekt von Rauchen als genotoxische Exposition untersuchen, und solche, die Rauchen als potentielle Einflußgröße berücksichtigen. Es fand sich nur für die erste Gruppe ein signifikanter Unterschied. Das positive Ergebnis der Meta-Analyse zeigte sich stark durch eine kleine Subgruppe von Studien beeinflußt, in denen visuell und nicht mit Bildanalyse-Systemen ausgewertet wurde. Gefolgert wurde, dass ein Publikations-Bias und andere Fehlerquellen kleiner Studien das Gesamtergebnis beeinflussten (Hoffmann et al., 2005).

Richtlinien und Vorschläge für die geeignete Verwendung des Comet Assays sind veröffentlicht worden (Tice et al., 2000; Hartmann et al., 2003). Innerhalb des "International Programme on Chemical Safety" (IPCS) wurde eine Richtlinie für die Ausführung des Comet Assays im menschlichen Biomonitoring herausgegeben (Albertini et al., 2000). Bei der Auswahl der Probanden sollten Faktoren wie Lebensstil (Rauchen, Sport, Diät, Urlaub), Alter und Geschlecht berücksichtigt werden. Des weiteren können Medikamente, Strahlenbelastungen (z.B. medizinische Röntgenuntersuchungen) oder Behandlungen mit Chemotherapeutika einen Einfluss auf die Effekte im Comet Assay haben. Bei der Evaluation von Leukozyten im Comet Assay ist auch der Gesundheitszustand der Probanden wichtig, da bei bestimmten Krankeitszuständen aktivierte Granulozyten oxidative DNA-Schäden bewirken. Bei anderen Krankheiten entstehen DNA-Schäden durch freie Radikale. Da auch über eine jahreszeitliche Variation im Comet Assay berichtet wurde, sollte Probematerial von exponierten und nicht exponierten Probanden zeitnah gewonnen werden. (Kassie et al., 2000; Moller et al., 2000).

Trotz seiner Vorteile gegenüber anderen Methoden in Hinblick auf Einfachheit, Wirtschaftlichkeit, Sensitivität und der Möglichkeit, Daten an nicht-proliferierenden Zellen zu erfassen, liefert der Comet Assay limitierte Information, da nur Strangbrüche und alkali-labile Stellen gemessen werden können. Strangbrüche (insbesondere die überwiegend auftretenden DNA-Einzelstrangbrüche) sind jedoch üblicherweise nicht der bedeutendste DNA-Schaden, der durch Genotoxine induziert

wird, da sie schnell durch zelluläre Reparaturmechanismen beseitigt werden können. Einzelstrangbrüche sind allerdings auch Zwischenprodukte bei der Reparatur von DNA-Addukten. Dies kann man sich in bei der Verwendung des Comet Assays zunutze machen. Molekular-epidemiologische Studien zeigten, dass die DNA-Reparaturkapazität ein Risikomarker für Krebs ist (Berwick and Vineis, 2000). Der Comet Assay ist auch eine geeignete Methode um die DNA-Reparaturkapazität in menschlichen Blutzellen zu messen (Schmezer et al., 2001). Es gibt verschiedene methodische Ansätze, um DNA-Reparatur mit dem Comet Assay zu bestimmen. Der einfachste Ansatz ist es, Zellen von Probanden *ex vivo* mit einem Standardmutagen zu behandeln und die Abnahme des genotoxischen Effektes über einen gewissen Zeitraum zu verfolgen. Eine alternative Möglichkeit ist der Einsatz von Inhibitoren der DNA-Reparatur. Kultiviert man Zellen von Probanden in Gegenwart von Inhibitoren der DNA-Reparatur (wie z. B. Aphidicolin) führt Reparaturaktivität zu einer Akkumulation von Reparatureinschnitten, da der Inhibitor den ordnungsgemäßen Abschluss der Reparatur verhindert. Diese Reparatureinschnitte stellen Strangbrüche dar, die zu einer Verstärkung der DNA-Migration im Comet Assay führen (Speit and Hartmann, 1995).

Eine grundsätzliches Problem beim Nachweis genotoxischer Effekte im Biomonitoring ist die Tatsache, dass in den meisten Fällen nur geringe genotoxische Effekte erwartet werden können und es oft keine Möglichkeit gibt, eine Konzentrationsabhängigkeit oder Reproduzierbarkeit festzustellen. Daher könnte die große Sensitivität des Comet Assays für den Nachweis von DNA-Schäden auf der einen Seite einen großen Vorteil darstellen, da es mit dem Comet Assay möglich sein könnte auch geringe Expositionen nachzuweisen. Auf der anderen Seite geht die Sensitivität mit einer hohen Testvariabilität einher, die ein ernstes Problem des Comet Assays im Biomonitoring darstellt. Es sind viele Störgrößen identifiziert worden, die das Ergebnis des Comet Assays beeinflussen können (Speit and Hartmann, 1999; Speit et al., 1999; Tice, 1995). Die Qualität der Ergebnisse im Comet Assays hängt deshalb besonders von standardisierten und kontrollierten Testbedingungen ab. Maßnahmen zur Qualitätssicherung, wie Wiederholung der Auswertung durch einen zweiten Auswerter („Externer Standard“) und die Einbindung eines Referenzstandards („Interner Standard“) sind zwar vorgeschlagen, aber selten umgesetzt worden (Albertini et al., 2000; Hartmann et al., 2003).

Häufig werden mit dem Comet Assay Untersuchungen an isolierten Lymphozyten vorgenommen. Es wurde jedoch beschrieben, dass sich Vollblut dazu eignet, chronische Expositionen gegenüber Umweltmutagenen im Comet Assay zu untersuchen. Dann ist anzunehmen, dass entstehende DNA-Schäden und deren Reparatur sich im Gleichgewicht befinden (Albertini et al., 2000). Peripheres Blut wird im Rahmen des Biomonitoring vor allen Dingen aus praktischen Gründen (z. B. wegen der leichten Verfügbarkeit) als Indikatorgewebe untersucht. In der Literatur wird kontrovers diskutiert, ob Blutzellen in einem proliferativen oder nicht-proliferativen Stadium untersucht werden sollen. Einige Gruppen verwendeten ruhende Lymphozyten in G_0, andere benutzten stimulierte Lymphozyten. Nur wenige Arbeitsgruppen haben die DNA-Reparaturkapazität von ruhenden und stimulierten Lymphozyten verglichen. Mayer et al. (2002) haben gezeigt, dass die Fähigkeit von peripheren humanen Lymphozyten γ-Strahlungs-induzierte DNA-Schäden zu reparieren nicht von einer mitogenen Stimulation abhängt, wenn diese mit dem Comet Assay gemessen wird. Die durchgeführten Genexpressions-Analysen zeigten, dass alle benötigten Reparaturproteine bereits in ausreichender Menge im G_0-Stadium vorhanden sind. Vielmehr wird davon abgeraten, in großangelegten Studien PHA-stimulierte Lymphozyten zu verwenden, da der zusätzliche Untersuchungsschritt eine Zeitverzögerung, zusätzliche Kosten sowie ein gesteigertes Risiko für Versuchsvariabilität beinhaltet, ohne der Studie im Gegenzug eine höhere Aussagekraft zu verleihen.

Ein unkritischer Einsatz des Comet Assay im Biomonitoring ist problematisch, da er zu unzuverlässigen Ergebnissen führen kann. Die widersprüchlichen Ergebnisse, die zum Einfluss des Rauchens auf die Effekte im Comet Assay bisher publiziert wurden sind möglicherweise zum Teil auf eine inadäquate Durchführung der Untersuchungen zurückzuführen (Hoffmann et al., 2005). Deshalb erscheint es sinnvoll und notwendig durch systematische Untersuchungen Kriterien für ein geeignetes Versuchsprotokoll aufzuzeigen und notwendige Maßnahmen zur Qualitätssicherung zu definieren.

1.3 Benzo[a]pyren (B[a]P)

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH) stellen eine große Gruppe von Chemikalien mit vielfältigem Vorkommen in der Umwelt dar. Benzo[a]pyren (B[a]P) ist ein indirektes Mutagen, das von der International Agency for Research on Cancer (IARC) als potentielles humanpathogenes Kanzerogen eingestuft wird (IARC 1973, 1983, 1987). Als Verbrennungsprodukt ist B[a]P in Tabakrauch, Rauch von verbranntem Holz, Diesel- und Benzinabgasen, Motorölen, Stadtluft, Lebensmittelprodukten, Asphalt, Industrieansiedlungen der Aluminiumproduktion, Stahl- und Eisenhütten enthalten (IARC 1973, 1983, 1987; Hattemer-Frey and Travis, 1991). Die meisten Menschen sind wahrscheinlich ständig niedrigen Dosen von B[a]P und anderen genotoxischen PAHs ausgesetzt (Spurny, 1996; Cohen and Pope, III, 1995). Es wurde gezeigt, dass B[a]P Genmutationen, chromosomale Aberrationen und andere Formen genotoxischer Effekte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* induzieren kann (IARC 1973, 1983; Waters et al., 1991). B[a]P selbst ist jedoch nicht mutagen oder kanzerogen. Es muss metabolisch aktiviert werden, um als elektrophiler Metabolit mit der DNA reagieren zu können (Li et al., 1996). Verschiedene Metabolite von B[a]P sind genotoxisch. Der wichtigste Vertreter ist vermutlich das 7,8-Diol-9,10-epoxid-benzo[a]pyren (BPDE), welches in einer Sequenz metabolischer Reaktionen gebildet wird (Celotti et al., 1993). B[a]P wird in großem Maße von Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1), einer mikrosomalen Epoxid-Hydrolase und der Glutathion S-Transferase (GST) metabolisiert (Seidegard and Ekstrom, 1997). Zunächst wird B[a]P in 7,8-Epoxid-B[a]P umgewandelt, welches dann zum korrespondierenden Transhydrodiol hydrolysiert wird. Die folgende Epoxidierung an der Position 9 und 10 liefert dann 7,8-Diol-9,10-epoxid-benzo[a]pyren. Im Folgenden katalysiert GST den nukleophilen Angriff von Glutathion auf BPDE, welches dann als wasserlösliches Konjugat ausgeschieden wird (Jernström and Seidel, 1996; Robertson and Jernström, 1986). Da dieser Entgiftungsprozess sättigbar ist, kann ab einer bestimmten Exposition der toxische Metabolit nicht mehr eliminiert werden, so dass BPDE mit der DNA verschiedener Zellen Addukte bilden kann (Garry et al., 2003). Im Tierversuch wurde die Adduktbildung von PAHs auf verschiedene Gewebearten von Ratten untersucht.

Dabei konnte für B[a]P eine DNA-Addukt Bildung in Lungengewebe, in Lebergewebe und in peripheren Lymphozyten aus der Blutbahn nachgewiesen werden (Nesnow et al., 1993). Bei der metabolischen Aktivierung von B[a]P durch das CYP1A1 Enzym kommt es außerdem zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, reactive oxygen spezies), welche ebenfalls mit der DNA Addukte bilden können (Kim and Lee, 1997; Whitlock, Jr., 1999). Wenn entstehende DNA-Addukte nicht korrekt durch die Nukleotid-Exzisions- oder die Basen-Exzisions-Reparatur behoben werden (Celotti et al., 1993; Krokan et al., 2000), können DNA-Einzelstrangbrüche und die Induktion von Mutationen resultieren. Dabei kommt es insbesondere zur Transversion von Guanin→Thymin und Adenin→Thymin (Li et al., 1996; Eastman and Barry, 1992). Beide Vorgänge können Protoonkogene aktivieren oder Tumor Suppressor Gene wie p53 inaktivieren und sind vermutlich ursächlich an der Entstehung von Lungentumoren in Assoziation mit Rauchen beteiligt.

Im Comet Assay läßt sich der Effekt der DNA-Schädigung durch BPDE *in vitro* durch die Zugabe des Reparaturenzyminhibitors Aphidicolin (APC) noch steigern. APC inhibiert die DNA-Polymerasen α, β und ε. Wird an der Stelle von BPDE-DNA-Addukten durch Reparaturenzyme eine Exzisionsreparatur an der DNA vorgenommen, so kann der herausgeschnittene Bereich nicht wieder durch die Polymerasen aufgefüllt werden und es bleibt ein Einzelstrangbruch in der DNA bestehen. Auf diese Weise lassen sich mit dem Comet Assay indirekt BPDE-DNA-Addukte nachweisen (Speit und Hartmann 1995).

Obwohl B[a]P eine gut charakterisierte genotoxische Substanz darstellt, ist noch wenig über das Ausmaß von DNA-Effekten nach pulmonaler Exposition bekannt. In einer Studie an Sprague-Dawley Ratten, die wie Menschen B[a]P mit dem Cytochrom P450 1A1 Enzym metabolisieren, wurde bei wiederholter pulmonaler Exposition mit 3 mg B[a]P eine höhere Inzidenz an Lungentumoren nachgewiesen (Steinhoff et al., 1991). Ein weiterer Versuch mit Sprague-Dawley Ratten demonstrierte die Auswirkung einer endotrachealen Verabreichung von 3 mg B[a]P auf Alveolarmakrophagen, Lungenzellen, periphere Lymphozyten und Hepatozyten im Comet Assay. Effekte dieser hohen Konzentration konnten in allen Geweben gezeigt werden, am deutlichsten in peripheren Lymphozyten und Lungenzellen. In letzteren konnte zusätzlich eine klare Dosis-Effekt Beziehung nachgewiesen werden. Als Konsequenz dieser Studie wurde vermutet, dass periphere Lymphozyten

empfindliche Zielzellen im Comet Assay darstellen könnten, um eine pulmonale Exposition mit B[a]P beim Menschen nachzuweisen (Garry et al., 2003).

1.4 Genetische Polymorphismen und Mutagensensitivität

Gegen den Angriff durch toxische Substanzen hat unser Körper zahlreiche Schutzmechanismen entwickelt. Neben der Reparatur von induzierten Schäden ist die Entgiftung von schädlichen Agenzien im Metabolismus einer der wichtigsten Schutzmechanismen. Epidemiologische Studien haben herausgefunden, dass in verschiedenen Bevölkerungen das Krebsrisiko unterschiedlich hoch ist (Lai and Shields, 1999). Diese Unterschiede sind verbunden mit Lebensart, Ernährung, Umwelt und Rassenzugehörigkeit. Es ist jedoch auffällig, dass innerhalb einer Population nur wenige Menschen Krebs entwickeln, obwohl alle Menschen dieser Bevölkerungsgruppe ähnlichen Umwelteinflüssen ausgesetzt sind. Genetische Unterschiede scheinen dafür eine entscheidende Rolle zu spielen. Als eine mögliche Ursache wurden Polymorphismen in verschiedenen Genen ausgemacht, die für die unterschiedliche Anfälligkeit verantwortlich sind (Hengstler et al., 1998). Ein Polymorphismus ist definiert als Mutation in einer Population, die mit einer Frequenz von mehr als 1% auftritt (Murken und Cleve, 1996). Er wird verursacht durch Genmutationen wie beispielsweise Basenaustausche oder Deletionen, die sich in manchen Fällen in verringerter oder vollständig fehlender Aktivität des Genprodukts auswirken. Die besondere Aufmerksamkeit gilt deshalb polymorphen Enzymen, die beim Metabolismus von Kanzerogenen durch Aktivierung oder Detoxifizierung beteiligt sind. Manche Kanzerogene müssen zunächst aktiviert werden, um schädliche Eigenschaften zu erlangen. Die Aktivierung ist Teil des Entgiftungsprozesses, der zur Ausscheidung fremder Substanzen dient. Der Ablauf von Aktivierung und Konjugation wird beim Menschen von Phase I und Phase II Enzymen katalysiert. Zu Enzymen der Phase I zählen die Cytochrom P450 (CYP) Monooxygenasen, die durch Oxidationen aus Xenobiotika u.a. schädliche Kanzerogene machen können. Die Enzyme der Phase II entfernen die aktivierten Intermediate durch Konjugationsreaktionen (Hayes and Pulford, 1995; Lai and

Shields, 1999). Zu diesen Phase II Enzymen gehören beispielsweise die Glutathion-S-Transferasen (GST).

Ein wachsender Forschungszweig auf dem Gebiet der Mutations- und Krebsforschung beschäftigt sich mit dem Zusammenhang zwischen genetischen Polymorphismen, der Induktion von Mutationen und dem Krebsrisiko (Hu et al., 2001). So wird das Verhältnis zwischen CYP1A1- und GST-Enzymaktivitäten als ein bedeutender Faktor für die Auswirkungen von kanzerogenem BPDE und anderen DNA-reaktiven PAH Metaboliten beschrieben (Alexandrov et al., 2002). In einer aktuellen Studie an einer europäischen Population zeigte sich ein Zusammenhang zwischen DNA-Effekten im Comet Assay und genetischen Polymorphismen, aber kein Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern (Vodicka et al., 2004). Vermutet wird, dass die Kombination der Genotypen *GSTM1-Null* und *CYP1A1* das Risiko an Lungenkrebs zu erkranken steigert (Hengstler et al., 1998; Hung et al., 2003).

Eine Auswertung von DNA-Effekten in Abhängigkeit von Polymorphismen (hauptsächlich P450 und GST) wurde bei der Untersuchung von Lymphozyten im Comet Assay bereits in verschiedenen Studien vorgenommen. Dabei wurde kein signifikanter Einfluß der Polymorphismen auf die Ergebnisse des Comet Assays gefunden (Pitarque et al., 1999; Marczynski et al., 2002; Sram et al., 1999; Carere et al., 2002).

1.4.1 Cytochrom P450 1A1

Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1) gehört zu einer Gruppe von Enzymen, die an der Biotransformation von exogenen und endogenen Substanzen beteiligt sind*. CYP1A1* ist von toxikologischer Bedeutung, weil sein Genprodukt, die Aromatische Hydrocarbon Hydroxylase (AHH) den ersten Schritt im Metabolismus von polyaromatischen Kohlenwasserstoffen (PAH), die u.a. in Zigarettenrauch vorkommen, in Mutagene und Kanzerogene katalysiert (Sims et al., 1974; Crofts et al., 1994). Andere Aspekte von *CYP1A1* sind seine Induzierbarkeit durch Chemikalien und seine genetischen Polymorphismen. Unterschiedliche genetische Varianten von *CYP1A1* wurden charakterisiert und mit *m1, m2, m3* und *m4* etc.

bezeichnet. Sie resultieren aus verschiedenen Punktmutationen (Cascorbi et al., 1996). Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass die Anfälligkeit von Tabak-induziertem Lungenkrebs positiv mit der Induzierbarkeit und den verschiedenen Genotypen des Enzyms korreliert (Kawajiri et al., 1990).

Bei der *m2* Mutation handelt es sich um eine Punktmutation mit Austausch von Adenin zu Guanin (A4889G) an Position 4889 in Exon 7 des Gens. Daraus resultiert ein Austausch von Isoleucin durch Valin in Codon 462 (Ile462Val) nahe der katalytischen Region des Enzyms. Die Frequenz von m2 wurde von Cascorbi et al. (1998) bei den 1760 getesteten Allelen von 880 Probenden mit 2,67% angegeben. Raucher mit dem Exon 7 Polymorphismus weisen eine stärkere Induzierbarkeit der Genexpression und höhere enzymatische Aktivität auf als Raucher ohne diesen Polymorphismus (Crofts et al., 1994). *CYP1A1*–Polymorphismen werden in Zusammenhang mit einem gesteigerten Risiko für Lungenkarzinom bei Nichtrauchern gebracht (Hung et al., 2003).

1.4.2 Glutathion-S-Transferasen (GST)

Die Glutathion-S-Transferasen spielen eine zentrale Rolle bei zellulären Entgiftungsreaktionen im Metabolismus. Alle eukaryontischen Spezies besitzen viele zytosolische und membrangebundene GST-Isoenzyme. Die zytosolischen Enzyme lassen sich in fünf Klassen einteilen: α (A), μ (M), π (P), σ (S) und θ (T) (Hayes and Pulford, 1995). Die Mitglieder der gleichen Genfamilie weisen mehr als 65% Sequenzhomologie zueinander auf (Smith et al., 1995). Die GST katalysieren den Angriff von reduziertem Glutathion (GSH) auf elektrophile Substanzen, welche einerseits als Intermediate im oxidativen Stoffwechsel diverser Xenobiotika, aber auch im Zuge von oxidativem Stress entstehen (Ketterer and Coles, 1991; Hayes and Pulford, 1995). Der *GSTM1-Null*-Genotyp wird in 50% der Europäer, Japaner und weißen Amerikaner gefunden, aber nur in einem Viertel der Afro-Amerikaner. Ein Mangel am M1 Enzym kann sich in einer mangelhaften Detoxifikation von Kanzerogenen im Tabak Rauch auswirken, was zu einem leichten Anstieg in dem Risiko von Lungenkrebs führt (Dusinska et al., 2001; D'Errico et al., 1999).

Es wurde über signifikant mehr BPDE-DNA-Addukte bei Probanden mit *GSTM1-Null*-Genotyp im Vergleich zu *GSTM1*-Trägern berichtet (Rojas et al., 2000). Pavanello et al. (2005) fanden bei Hochofen-Arbeitern mit *GSTM1-Null*-Genotyp eine erhöhte Menge an DNA-Addukten in Leukozyten.

Insgesamt erscheint es daher sinnvoll, einen möglichen Einfluss von GST Polymorphismen auf genotoxische Effekte im Rahmen von Biomonitoring zu berücksichtigen. Da GST Polymorphismen relativ häufig auftreten, erlauben bereits Studien mit wenig Teilnehmern statistisch relevante Aussagen (Dusinska et al., 2001).

1.5 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollte der Comet Assays unter strenger Anwendung von Maßnahmen zur Qualitätssicherung kritisch auf die Einsetzbarkeit im Biomonitoring überprüft werden. Zigarettenrauch stellt eine relevante Belastung durch genotoxische Agenzien dar und Raucher sollten deshalb im Vergleich zu Nichtrauchern eine geeignete Untersuchungsgruppe darstellen. Es sollte geprüft werden, ob sich eine solche chronische Belastung unter kontrollierten Bedingungen im Comet Assay mit peripherem Blut als genotoxischer Effekt nachweisen lässt. Es sollte zunächst ein sensitives Protokoll für die Durchführung des Comet Assays mit peripherem Blut etabliert werden. Es sollten Maßnahmen zur Qualitätssicherung berücksichtigt werden, um ein hohes Maß an Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erreichen:

- Einführung eines Referenzstandards (interner Standard)
- unabhängige Zweitauswertung von Präparaten (externer Standard)
- Wiederholung der Untersuchung innerhalb von sechs Monaten

Es sollte eine Gruppe von Rauchern und Nichtrauchern mit Hilfe eines Fragebogens nach strengen Einschluss- und Ausschlusskriterien für die Studie ausgewählt werden. Dabei sollten potenzielle Störfaktoren, die einen Einfluss auf das Ergebnis im Comet Assay haben können, weitgehend ausgeschlossen werden.

Es sollte dann untersucht werden, ob sich Raucher und Nichtraucher hinsichtlich verschiedener mit dem Comet Assay nachweisbarer DNA-Effekte unterscheiden:

- Menge der vorhandenen DNA-Schäden
- Induzierbarkeit von DNA-Schäden *ex vivo* durch BPDE
- spontane Reparaturaktivität (in Anwesenheit von APC)
- Reparaturaktivität nach BPDE-Exposition (in Anwesenheit von APC)

Schließlich sollte untersucht werden, ob Polymorphismen der Gene *CYP1A1* und *GSTM1* einen Einfluss auf die DNA-Effekte im Comet Assay haben.

Die Ergebnisse sollten insgesamt einen Beitrag zu einer kritischen Bewertung des Comet Assay für den Einsatz im Biomonitoring liefern.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen

2.1.1.1 Blutproben

Die Experimente dieser Arbeit wurden an peripherem Vollblut durchgeführt. 40 Freiwillige (männliche Studenten und Mitarbeiter der Universität Ulm im Alter von 18 bis 42 Jahren, davon 20 Raucher) nahmen an der Studie teil (Tabelle 1). Das mittlere Alter der Raucher betrug 30,1 ± 6,0 Jahre und das der Nichtraucher 27,5 ± 2,4 Jahre. Die Raucher konnten anhand des Zigarettenkonsums in 3 Gruppen unterteilt werden: 5 – 10 Zigaretten pro Tag (n = 6), 10 – 20 Zigaretten pro Tag (n = 13) und etwa 40 Zigaretten pro Tag (n = 1).

Tabelle 1: Zigarettenkonsum und Alter der Probanden

Proband	Alter in Jahren	Zigaretten pro Tag
1	28	0
2	25	0
3	30	0
4	25	20
5	19	7
6	24	0
7	41	10
8	29	15
9	26	0
10	27	15
11	25	0
12	25	1
13	27	0
14	32	0
15	26	0
16	29	10
17	33	15
18	25	0
19	27	0
20	35	15

Proband	Alter in Jahren	Zigaretten pro Tag
21	38	10
22	25	40
23	27	0
24	27	0
25	24	19
26	29	10
27	28	15
28	28	0
29	32	0
30	32	0
31	27	7
32	34	20
33	33	20
34	27	15
35	27	0
36	25	12
37	42	20
38	28	0
39	27	0
40	37	20

Die Probandenauswahl erfolgte nach stringenten Kriterien. Potenzielle Probanden wurde nicht in die Studie einbezogen wenn einer der folgenden Gründe vorlag:

- Krebserkrankung
- Chemo-/Radiotherapien
- Röntgenuntersuchungen in den letzten 6 Monaten
- potentielle Mutagenexposition
- Exraucher seit weniger als einem Jahr
- intensiver Sport in der letzten Wochen
- Medikamenteneinnahme
- schwere Infekte innerhalb der letzten 6 Monaten
- Alkoholkonsum
- Einnahme von Vitaminen
- Diäten (z.B. vegetarisch)
- chronische Leberentzündung

Nach ausführlicher Information über die Verwendung der Blutproben gaben die Probanden ihr Einverständnis zur Blutentnahme. Die Zustimmung der Ethikkommission der Universität Ulm zu dieser Studie lag vor. Allen Probanden wurden im Zeitraum von 6 Monaten zweimal 10 ml Venenblut aus der Armbeuge entnommen und mit Heparin (0,1 ml Heparin bei einer 10 ml Spritze) versetzt. Die Blutproben wurden im unmittelbaren Anschluß an ihre Gewinnung gemäß der Methoden aus Kapitel 2.2 weiterverarbeitet, um sie im Comet Assay und für die Genotypisierung zu verwenden.

2.1.1.2 V79 Zellen

Als interner Standard im Comet Assay wurde die V79 Zelllinie des chinesischen Hamsters eingesetzt. Es handelt sich dabei um permanente Lungenfibroblasten, die aus einem männlichen Tier etabliert wurden. Die V79 Zelllinie findet weite Verbreitung in der Genotoxizitätsprüfung und ist zytogenetisch sehr gut charakterisiert (Schempp und Vogel, 1979).

Die Herstellung des internen Standards erfolgte einmalig zu Studienbeginn. Die V79 Zellen wurden mit Trypsin-EDTA (0,15%) für 2 min behandelt und aus der Kulturschale gelöst, in Medium mit 7.5% DMSO aufgenommen und in Aliquote von 10 µl aufgeteilt. Ein Aliquot enthielt dabei circa 10000 Zellen. Die Lagerung erfolgte bei –80°C. Für jede Elektrophorese wurde ein Aliquot vorsichtig auf Eis aufgetaut und für den Comet Assay verwendet.

2.1.2 Chemikalien

Actin	Interactiva, Ulm
Agarose LMA, Sea plaque, NuSieve GTG)	Biozym, Hameln
Agarose NEEO	Roth, Karlsruhe
APC (Aphidicolin)	Sigma, München
Aqua ad injectabilis	Braun, Melsungen
BPDE (Anti-Benzoapyrene-7,8-dihydriol-9,10-epoxide)	BIU, Grosshansdorf
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Borsäure	Serva, Heidelberg
BSA 100x	BioLabs, New England
BsrD1	BioLabs, New England
Chelex 100 Resin	BioRad, Hercules Californien
CYP1A1hayashi1 und CYP1A1-3	Interactiva, Ulm
Dimethylsulfoxid	Sigma, Steinheim
DNA-Standard 100 bp ladder (1 µg/ml)	Pharmacia, Freiburg
dNTPs (Nukleotid-Mix)	Pharmacia, Freiburg
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	AppliChem, Darmstadt
Ethanol, absolut	Riedel-de Haën, Seelze
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Fötales Kälberserum	Biochrom, Berlin
Gentamycin	Biochrom, Berlin
KT1 und KT2 (für *GSTM1*)	Interactiva, Ulm
Heparin-Natrium	Braun, Melsungen

“Hanks balanced salt solution” (HBSS)	Biochrom, Berlin
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
MEM-Earle (Minimal Essential Medium)	Biochrom, Berlin
NaCl	Fluka, Neu-Ulm
$NaHCO_3$	Merck, Darmstadt
NaOH-Plätzchen	Roth, Karlsruhe
Natrium-Ethylendiaminotetraacetat	Fluka, Neu-Ulm
NEBuffer2 10x	Biolabs, New England
Phosphate buffer saline (PBS, ohne Ca^{2+} und Mg^{2+})	Biochrom, Berlin
PCR 10x Puffer	Pharmacia, Freiburg
PHA, M-Form	Gibco BRL, Eggenstein
RPMI-1640 Medium mit Glutamax-I	Gibco BRL, Eggenstein
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Taq-Polymerase (5 U/µl)	Pharmacia, Freiburg
Tris	USB, Cleveland Ohio
Triton X-100	Sigma, Steinheim
Trypsin	Biochrom, Berlin
Wasser, steril	Delta Pharma, Pfullingen

2.1.3 Geräte und Materialien

Blutkulturröhrchen 10 ml	Greiner, Nürtingen
Brutschrank	Heraeus, Hanau
CO_2-Brutschrank	Heraeus, Hanau
CCD-Kamera 4910	Cohu, San Diego, USA
Comet Assay II Meßsystem V1.02;1.03	Perceptive Instruments, Haverhill, UK
Deckgläser (24 x 60 mm)	Menzel, Braunschweig
Elektrophorese Spannungsgerät	rtf Labortechnik, Wasserburg
Elektrophoresekammer DNA Sub Cell™	BioRad, München
Fluoreszenzmikroskop Axiophot	Zeiss, Oberkochen

Geldokumentationssystem Image Store 5000	Ultra Violet Products Ltd. Cambridge, UK
Heitzplatte	Medax, Kiel
Laminar Air Flow HB2448K	Heraeus, Hanau
Lichtmikroskop	Zeiss, Oberkochen
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 1,5 ml	Roth, Karlsruhe
Spritzen (5, 10 ml)	BectonDickinson, Heidelberg
Sterilfilter 0,2 µm	Millipore, Eschborn
Thermal Controller PTC 100	MJ Research Inc., Waterhouse, USA
Thermomixer Model 5436	Eppendorf, Hamburg
UV-Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe	Osram, München
Umkehrmikroskop	Zeiss, Oberkochen
UV-Schirm	Bachofer, Reutlingen
γ-Strahlenquelle Gammacell 2000	Nuclear Data, Frankfurt
Zellkulturflaschen 25, 75, 185 cm^2	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturschalen ∅ 100 mm	Falcon, Heidelberg
Zentrifuge Modell Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Modell Labofuge 400	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Modell 5402	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugenröhrchen 10 ml	Nunc, Wiesbaden

2.1.4 Lösungen, Medien und Puffer

Agarosegel	0,75 g Agarose (NEEO) 50 ml TBE-Puffer

Alkali – Elektrophoresepuffer (pH>13)	300 mM NaOH 1 mM EDTA
Bromphenolblau-Ladepuffer	3 g Sucrose 25 mg Bromphenolblau 2,5 ml EDTA (0,2 M , pH 7,6); ad 10 ml A. dest.
Ethidiumbromidfärbelösung	10 µg/ml in A. dest.
Lyselösung (pH 10)	2,5 M NaCl 100 mM EDTA 10 mM Tris 1 % Triton X-100 und 10 % DMSO frisch zugeben
Neutralisationspuffer	0,4 M Tris; pH 7,5 mit 37 % HCl einstellen
RPMI-10	500 ml RPMI-1640 mit Glutamax-I 50 ml Pferdeserum 2,5 ml Gentamycin (10mg/ml)
serumhaltiges MEM	1x MEM-Earle 2 nM L-Glutamin 2,2 g/L $NaHCO_3$ 50 µg / ml Gentamycin 10 % FKS
10x TBE, pH8,0	900 mM Tris 900 mM Borsäure 20 mM EDTA, pH 8,0

Trypsin-EDTA	60 ml 2,5 % Trypsin (0,15 %) 80 ml 1 % EDTA (0,001 % 86 ml 10 x PBS ad 1000 ml A.bidest + 15ml 7,5 % $NaHCO_3$ (0,056 %)

2.1.5 Primer

Die Sequenzen der Primer und die Größe des amplifizierten Produkts sind in der nachfolgenden Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Primer und Größe des amplifizierten Produkts

Primer	Sequenz 5' → 3'	Größe der PCR-Produkte
Actin H	TCA CCA ACT GGG ACG ACA TG	349bp
Actin R	TCA TGA GGT AGT CAG TCA GGT	
KT2 (GSTM1)	GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G	217bp
KT1 (GSTM1)	GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C	
CYP1A1hayashi1	GAA CTG CCA CTT CAG CTG TCT	411bp
CYP1A1-3	GGC TGA ACC TTA GAC CAC ATA	

2.2 Methoden

2.2.1 Comet Assay (Einzelzellgelelektrophorese)

Mit Hilfe des Comet Assay (Einzelzellgelelektrophorese) ist es möglich, DNA-Schäden auf Einzelzellebene zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurde die

alkalische Version des Comet Assays verwendet, die einen Nachweis von DNA-Strangbrüchen und alkalilabilen Stellen erlaubt (Speit und Hartmann, 1999).

2.2.1.1 Herstellung der Präparate

Objektträger mit Mattrand wurden an der dem Mattrand gegenüberliegenden Querseite mit einem Diamantstift angeritzt und bis zur Hälfte des Mattrandes in 1,5 % Agarose (NEEO, in 1xPBS) getaucht, wodurch eine bessere Haftung der Agarose erzielt wurde. Die Unterseite des Objektträgers wurde abgewischt und die Objektträger dann horizontal bei Raumtemperatur getrocknet. So hergestellte Objektträger lassen sich bis zu ihrer Verwendung über Monate aufbewahren. 5 µl Vollblut bzw. 10 µl V79 Zellsuspension wurden in 120 µl LMP-Agarose (0,5 % in 1xPBS; 37℃) aufgenommen, gleichmäßig auf die Basal schicht des Objektträgers pipettiert und mit einem Deckglas eingedeckt. Es sollten 10000-15000 Zellen auf einen Objektträger gebracht werden, um eine geeignete Zelldichte für die Auswertung zu erhalten. Nach 5 minütigem Aushärten der Agarose wurde das Deckglas abgezogen und die Objektträger für mindestens eine Stunde in einer lichtgeschützten Küvette mit 4℃ kalter Lyselösung im Kühlschrank inkubiert.

2.2.1.2 Alkalidenaturierung und Elektrophorese

Nach der Lyse wurden die Objektträger in eine horizontale, durch ein Eiswasserbad gekühlte, Gelelektrophoresekammer gelegt und für die Alkalidenaturierung mit dem auf 4℃ gekühlten Alkali-Elektrophoresepuffer (pH>1 3) überschichtet. Sofern nicht anders beschrieben, erfolgte die alkalische Denaturierung für 35 min unter Vermeidung von direkter Lichtbestrahlung (Abdecken der Elektrophoresekammer mit einem Kartondeckel). Anschließend wurde eine Elektrophorese bei einer Spannung von 25 V (0,86 V/cm) und einer Stromstärke von 300 mA für 25 min durchgeführt.

2.2.1.3 Neutralisation und Anfärben der DNA

Nach der Elektrophorese wurden die Präparate aus der Kammer genommen, auf horizontale Färbebänke gelegt und für 5 min mit Neutralisationspuffer überschichtet. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Die Objektträger wurden anschließend für 5 min in 100 % Ethanol dehydriert und vertikal bei Raumtemperatur getrocknet. Unmittelbar vor der Auswertung wurden die Präparate mit Ethidiumbromid gefärbt, indem 50 µl einer Ethidiumbromidlösung (10 µg/ml) auf die Objektträger pipettiert wurde. Die Objektträger wurden mit einem Deckglas eingedeckt und in einer feuchten, dunklen Kammer aufbewahrt.

2.2.1.4 Mikroskopie und Auswertung

Die Auswertung erfolgte bei 400-facher Vergrößerung unter einem Fluoreszenzmikroskop (Anregungsfilter: 515-560 nm; Sperrfilter: 590 nm). Mit Hilfe eines PC-gestützten Bildanalysesystems (Comet Assay II; Perceptive Instruments), das über eine CCD-Kamera an das Mikroskop angeschlossen war. Damit konnten verschiedene Parameter der DNA-Migration bestimmt werden.
Parallelauswertungen durch einen zweiten Auswerter wurden mit einem typgleichen Bildanalysesystem durchgeführt, das jedoch auf Grund der spezifischen Konfiguration (Mikroskop, Kamera, etc.) für dieselbe Zelle nicht zu identischen Werten führt.
Um festzustellen, ob sich ein Parameter der Bildanalyse für die Auswertung besonders gut eignet, wurden vier Parameter vergleichend betrachtet: „Tail Migration“ (Entfernung Kopfende bis Schweifende), „Tail Length“ (Entfernung der Peak-Position des Kopfes bis zum Ende des Schweifs) als Maß für die Länge der Migration, „Tail Intensity“ (Prozent DNA im Schweif) als Maß für die Menge der gewanderten DNA und „Tail Moment“ (Produkt aus Länge und Intensität) als Maß, in das beide Effekte einfließen.
Es wurden nur Zellen berücksichtigt, deren Zellkern eine runde Form aufwies. Zellkerne an den Randbereichen des Objektträgers wurden nicht ausgewertet, da sie unspezifische DNA-Effekte aufweisen können.

Pro Objektträger wurden 50 zufällig ausgewählte Zellen ausgewertet. Der Mittelwert der Parameter der DNA-Migration von 50 gemessenen Zellen wurde als Maß für die Schädigung bestimmt. Die Objektträger wurden vor der Auswertung kodiert, um eine Beeinflussung des Ergebnisses durch den Auswerter zu vermeiden.

2.2.1.5 Behandlung von Blutproben mit BPDE zur Induktion von DNA-Schäden

Die polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffverbindung Benzo[a]pyren (B[a]P), die auch als Verbrennungsprodukt im Zigarettenrauch auftritt, wird intrazellulär durch die mikrosomale Epoxid-Hydrolase zum reaktiven Mutagen BPDE aktiviert. Das aktivierte BPDE wird in *in vitro*-Studien verwendet wenn die Zellen B[a]P nicht in ausreichendem Maße metabolisieren können. In dieser Studie wurde die DNA-schädigende Wirkung von BPDE auf Blutzellen von Rauchern und Nichtrauchern *in vitro* vergleichend getestet.

Die Behandlung des Blutes wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen mit 500 µl Vollblut durchgeführt, welches unmittelbar zuvor durch Venenpunktion den Probanden entnommen wurde. Um eine Endkonzentration von 5 µM BPDE (sowie 1 µM, 2 µM, 10 µM) im Blut zu erzielen, wurde je 2,5 µl BPDE (bzw. 0,5 µl, 1 µl, 5 µl) der 1 mM Stammlösung zu 500 µl Blut pippetiert. Anschließend wurden die Proben invertiert, 2 h bei 37℃ inkubiert und für die Herstellung der ersten Objektträger auf Eis zwischengelagert. Das BPDE-inkubierte Blut wurde nun mit 1 ml RPMI-Medium (4℃) aufgefüllt, invertiert und zentrifugiert (3 min, 3000 UPM, 4℃). 1 ml Überstand wurde abpippetiert und der Waschschritt wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in 200 µl RPMI-Medium (mit 10% FKS) resuspendiert. Die Proben wurden dann bei 37℃ inkubiert und nach 30 min und 60 min wurden we itere Objektträger hergestellt.

2.2.1.6 Behandlung von Blutproben mit APC zur Hemmung der DNA-Reparatur

Aphidicolin (APC) inhibiert die DNA-Polymerasen α, β und ε und unterbricht die Exzisionsreparatur. Dies führt zu einer Verstärkung der Comet Assay Parameter

durch eine Anhäufung Reparatureinschnitten ("DNA-Strangbrüchen") von nicht vollständig reparierten DNA-Schäden. In dieser Arbeit wurde der Effekt von APC auf unbehandeltes Vollblut von Rauchern und Nichtrauchern untersucht, sowie auf Blutproben, die mit BPDE behandelt wurden.
Zunächst wurde eine 1:100 Verdünnung der APC Stammlösung (5 mg/ml) mit Hanks hergestellt. Die Behandlung des Blutes (evtl. in Kombination mit BPDE) wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen mit 500 µl Vollblut durchgeführt. Zu den 500 µl Blut wurden 5 µl (50 µl) aus der APC-Verdünnung gegeben, so dass sich eine Endkonzentration von 0,5 (5 µg/ml) APC im Blut ergibt. Anschließend wurden die Proben 2 h bei 37℃ inkubiert und für die Herstellung der Objektträger auf Eis gelagert.

2.2.2 Genotypisierung

Es wurden genetische Polymorphismen für die *Glutathion-S-Transferase M1 (GSTM1)* und das *Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1)* mittels PCR nachgewiesen. Durch die Wahl von komplementären Primern wird die Zielsequenz festgelegt. Während eines sich wiederholenden Zyklus von Denaturierung, Primeranheftung (Annealing) und Synthese wird die zwischen den Primern liegende Sequenz exponentiell amplifiziert.
Da der Polymorphismus im Gen der *GSTM1* auf einer Deletion eines Genabschnitts beruht (Hayes und Pulford, 1995), muß eine Multiplex-PCR durchgeführt werden. Bei der Multiplex PCR werden multiple definierte DNA-Sequenzen in einer PCR Reaktion amplifiziert. Das in der selben PCR amplifizierte Actin-Produkt dient dabei als interne Kontrolle. Ist nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der gewonnenen DNA und Färbung mittels Ethidiumbromid keine Bande zu sehen, so handelt es sich um eine homozygote Deletion und es ist keine Enzymaktivität vorhanden. Ist eine Bande existent, so liegt das Normalallel homozygot oder heterozygot vor und Enzymaktivität ist vorhanden.
Die Bestimmung des *CYP1A1*-Genotyps wurde mit der Analyse des Restriktionsfragmentlängen Polymorphismus (RFLP) nach dem von Cascorbi et al. (1996) beschriebenen Protokoll vorgenommen. Bei der *m2* Mutation handelt es sich um eine Punktmutation mit Austausch von Adenin zu Guanin (A4889G) an Position

4889 in Exon 7 des Gens, woraus auf der Proteinebene ein Austausch von Isoleucin durch Valin in Codon 462 (Ile462Val) resultiert. Das *CYP1A1*-Gen wurde mittels PCR unter der Verwendung der Primer CYP1A1hayashi1 und CYP1A1-3 amplifiziert. Die Zielsequenz hatte dabei eine Länge von 411 bp. Mit dem PCR-Produkt wurde ein Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym *BsrD1* durchgeführt. Bei homozygotem Vorliegen der Mutation kann das Restriktionsenzym die DNA nicht schneiden. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung des Restriktionsverdaus und Anfärbung des Gels mit Ethidiumbromid findet man eine Bande bei 411bp. Liegt der Wild-Typ vor, so schneidet das Restriktionsenzym die DNA und es resultieren Fragmente der Länge 251 bp und 160 bp. Im Falle von heterozygoter DNA findet man folglich 3 Banden bei der Auswertung des Gels (160 bp, 251 bp, 411 bp).

2.2.2.1 DNA-Isolierung

Eine schnelle und effiziente Methode der DNA-Extraktion ist Chelex 100. Chelex ist ein Chelatbildner mit hoher Affinität zu polyvalenten Metall-Ionen. In Anwesenheit von Chelex wird der Abbau der DNA durch chelatbildende Metallionen verhindert und Polymerase-Inhibitoren zudem inaktiviert. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass kein DNA-Verlust auftritt, da die DNA nicht weiter aufgereinigt werden muss. Von dem im Rahmen der Comet Assay-Untersuchung venös entnommenen Blut wurden 10 µl zur Lyse der Erythrozyten für 15 - 30 Minuten mit 1,5 ml sterilem Wasser bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren in einer Eppendorfzentrifuge (3 min; 13000 UPM) wurde der Überstand bis auf 30 µl verworfen. Das Pellet wurde in 270 µl Chelex 100 (5% in Aqua bidest., frisch angesetzt) gelöst und 15 - 30 Minuten bei 56℃ inkubiert. Danach wurden die Proben 5 - 10 Sekunden gevortext und es folgte eine Inkubation bei 95℃ für 8 Minuten. Nach erneutem Vortexen (5 - 10 Sekunden) und Abzentrifugieren konnte die DNA dem Überstand entnommen werden und in die PCR eingesetzt werden. Der Rest der Proben wurde bei 4℃ aufbewahrt.

2.2.2.2 Amplifikation der Gene *GSTM1* und *CYP1A1*

Die Amplifikation von *GSTM1* (mit Primern KT1 und KT2) erfolgte zusammen mit der des Actin-Gens als interner Kontrolle in einer Multiplex-PCR.
Als Template wurden jeweils 20 µl der isolierten DNA eingesetzt. Das Endvolumen der Ansätze von 50 µl wurde erreicht durch die Zugabe von:

Aqua bidest.,	20 µl
10xPCR-Puffer	5 µl
dNTP-Mix	0,5 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl
KT1 (20 pmol/µl)	1 µl
KT2 (20 pmol/µl)	1 µl
Actin H (20 pmol/µl)	1 µl
Actin R (20 pmol/µl)	1 µl

Nach Zugabe der Taq-Polymerase wurden die Ansätze in den Thermal Controller PTC 100 gegeben, wo sie zunächst für 5 min bei 94℃ denaturierten. Die PCR erfolgte in 33 Zyklen, die im einzelnen aus folgenden Schritten bestanden:

Denaturierung	94℃	20 sec
„Annealing“	58℃	30 sec
Elongation	72℃	30 sec

Mit sieben Minuten Synthese bei 72℃ und Abkühlung des PCR-Mixes auf 8℃ wurde die PCR beendet. Bis zur gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die Ansätze bei 4℃ gelagert.

Bei der PCR von *CYP1A1* wurden jeweils 22 µl der isolierten DNA eingesetzt. Das Endvolumen der Ansätze von 50 µl wurde erreicht durch die Zugabe von

Aqua bidest.,	20 µl
10xPCR-Puffer	5 µl
dNTP-Mix	0,5 µl

Taq-Polymerase	0,5 µl
CYP1A1hayashi1 (20 pmol/µl)	1 µl
CYP1A1-3 (20 pmol/µl)	1 µl

Nach Zugabe der Taq-Polymerase wurden die Ansätze in den Thermal Controller PTC 100 gegeben, wo sie zunächst für 5 min bei 93℃ denaturiert wurden. Die PCR erfolgte in 30 Zyklen, die im einzelnen aus folgenden Schritten bestanden:

Denaturierung	93℃	1 min
„Annealing“	56℃	1 min
Elongation	72℃	1 min

Mit zehn Minuten Synthese bei 72℃ und Abkühlung des PCR-Mixes auf 8℃ wurde die PCR beendet.

2.2.2.3 Restriktionsverdau

Bis zum Restriktionsverdau wurden die Ansätze der PCR von *CYP1A1* bei 4℃ gelagert. Für die Restriktion wurde ein Ansatz von 25 µl gewählt, der sich wie folgt zusammensetzte:

10 µl PCR-Produkt
2,5 µl 10x NEBuffer 2
0,25 µl BSA 100x (= 10 mg/ml)
2 µl *BsrD1* (2000 U/ml)
10,25 µl Aqua bidest.

Die Ansätze wurden im Thermal Controller für 6 h bei 65℃ und danach für 20 min bei 80℃ (Inaktivierung des Enzyms) inkubiert. Anschließend wurde auf 10℃ abgekühlt.

2.2.2.4 Gelelektrische Auftrennung

Die Auftrennung erfolgte in einem 1,5%igen Agarosegel. Es wurden dazu 0,75 g Agarose (NEEO) in 50 ml TBE-Puffer aufgekocht; die Lösung wurde nach Abkühlen auf etwa 60℃ mit 4 µl Ethidiumbromid (10 µg/ml) versetzt und sofort in eine Gelkammer gegossen. Nach Erstarren des Gels wurden je 20 µl der PCR- und der Restriktions-Ansätze mit 2 µl Blaumarker aufgetragen. Eine 100-Basenpaar-Leiter (1 µg/ml) diente als Längenstandard. Die Elektrophorese erfolgte für 45 min bei 80 V. Das Gel wurde anschließend unter Bestrahlung durch UV-Licht photographiert.

2.2.3 Statistik

In den Säulendiagrammen sind in der Regel die Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Versuchen dargestellt, deren Werte mittels der Tabellenkalkulation Microsoft Exel berechnet wurden.
Die Ergebnisse der Biomonitoringstudie wurden graphisch in Form von Box-and-Whisker Plots veranschaulicht, wobei der Median, die 10., 25., 75. und 90. Perzentile und Ausreißer dargestellt wurden. Die Berechnungen wurden mit dem Statistikprogramm StatView durchgeführt.
Die Korrelationskoeffizienten R wurden nach Pearson mit der „Correlation Matrix“ des Statistikprogramms StatView errechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Vorversuche

3.1.1 Untersuchung zur Bestimmung eines sensitiven Protokolls für den Comet Assay

Von einer hohen Sensitivität im Comet Assay kann dann ausgegangen werden, wenn unbehandelte Kontrollzellen einen kleinen Kometenschweif zeigen, d.h. der normale Hintergrund an DNA-Schäden bereits sichtbar wird. In Vorversuchen wurde zunächst durch Variation der Zeiten für die Alkalidenaturierung und die Elektrophorese von unbehandeltem Blut ein sensitives Protokoll definiert.
Es wurde bei einer konstanten Elektrophoresezeit von 25 min die Alkalidenaturierungszeit in 10 min Schritten von 25 min bis 55 min gesteigert. Dies wurde in 3 Vorversuchen durchgeführt.

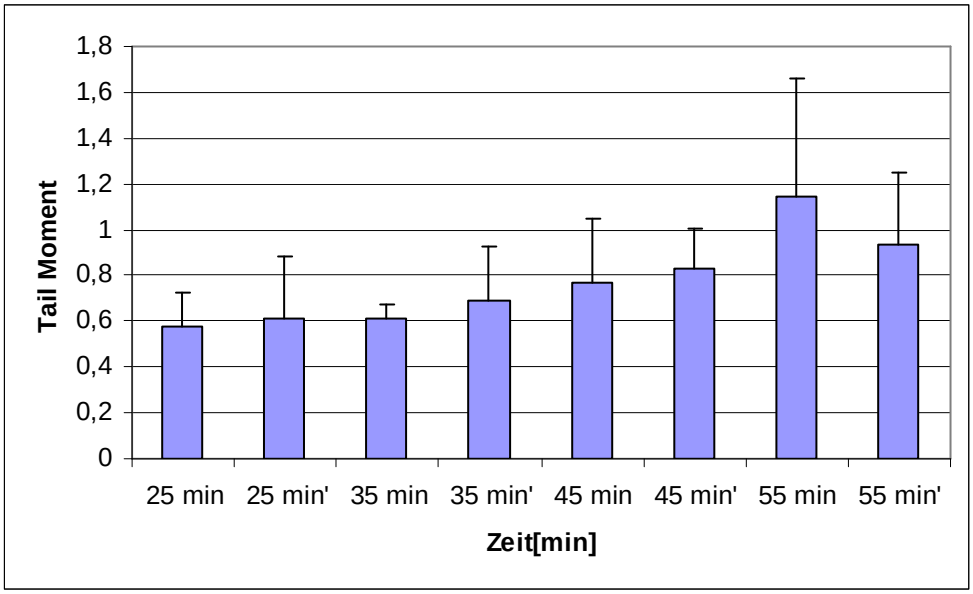


Abbildung 3: Einfluss der Alkalibehandlungszeit auf die DNA-Migration (Tail Moment). Die Elektrophoresezeit betrug 25 min. Es wurden 2 Parallelpräparate ausgewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen Tail Moments von 3 Versuchen.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen des Tail Moments als Einheit der DNA-Migration sind in Abbildung 3 zu sehen. Mit steigender Alkalidenaturierungszeit steigt

auch das Tail Moment. Zu jedem Zeitpunkt wurden 2 Parallelpräparate ausgewertet (z.B. 25 min und 25 min‘).

Wurde im Comet Assay bei einer konstanten Alkalizeit von 25 min die Elektrophoresezeit von 25 min auf 45 min gesteigert, so resultierte ebenfalls ein Anstieg des Tail Moments. Abbildung 4 stellt die Mittelwerte der gemessenen Tail Moments von drei Probanden dar.

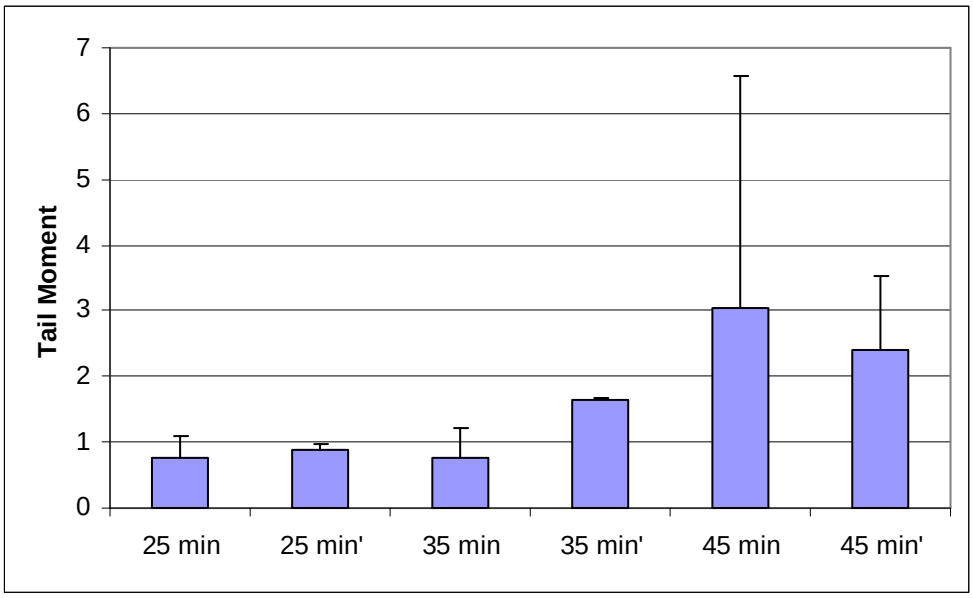


Abbildung 4: Einfluss der Elektrophoresedauer auf die DNA-Migration (Tail Moment). Die Alkalibehandlungszeit betrug 25 min. Es wurden 2 Parallelpräparate ausgewertet. Es sind die Mittelwerte der Tail Moments von 3 Versuchen dargestellt.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, dass bei einer Alkalibehandlungszeit von 35 min und einer anschließenden Elektrophoresezeit von 25 min an Kontrollzellen von Nichtrauchern bereits eine kleine Zunahme des Tail Moments zu messen ist. Der natürliche Hintergrund an DNA-Schäden wird schon registriert. Eine eventuelle Steigerung oder Abnahme der DNA-Migration kann unter diesen Bedingungen sicher erfasst werden. Dieses Protokoll wurde deshalb in der Studie mit Rauchern verwendet.

3.1.2 Induktion von DNA-Schäden durch BPDE und Hemmung von Reparatur durch APC

Im Folgenden wurden geeignete Konzentrationen für die Behandlung mit 7,8-Diol-9,10-epoxid-benzo[a]pyren (BPDE) und Aphidicolin (APC) bestimmt. Die Behandlung erfolgte jeweils für 2h bei 37℃.

In Abbildung 5 sieht man die Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen DNA-Migration (Tail Moment) von Blutproben von drei Probanden bei der Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen an BPDE (1 µM, 2 µM, 5 µM, 10 µM). Man sieht sehr deutlich einen konzentrationsabhängigen Anstieg des Tail Moments. Es wurden 2 Parallelpräparate ausgewertet. Die BPDE-Konzentration von 5 µM wurde ausgewählt, da sich im Vergleich zu den Kontrollzellen bereits eine deutliche Erhöhung des Tail Moments zeigte. Diese wurde dann mit unterschiedlichen Konzentrationen an APC (0,5 µg/ml; 5 µg/ml) kombiniert. Abbildung 6 stellt wieder die Zusammenfassung der gemessenen Tail Moments von 3 Versuchen dar. Bei einer APC-Konzentration von 0,5 µg/ml zeigt sich zusammen mit 5 µM BPDE-Behandlung ein deutlicher Anstieg des Tail Moments gegenüber der alleinigen BPDE-Behandlung.

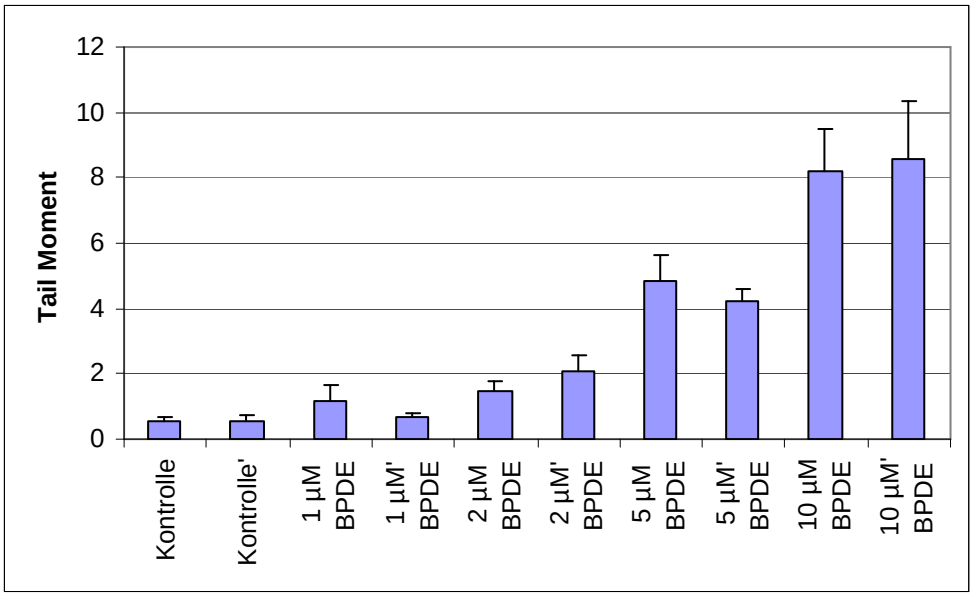


Abbildung 5: Effekt der Behandlung von Vollblut mit BPDE auf die DNA-Migration (Tail Moment) im Comet Assay. Es wurden 2 Parallelpräparate ausgewertet. Es sind die Mittelwerte von 3 Versuchen dargestellt.

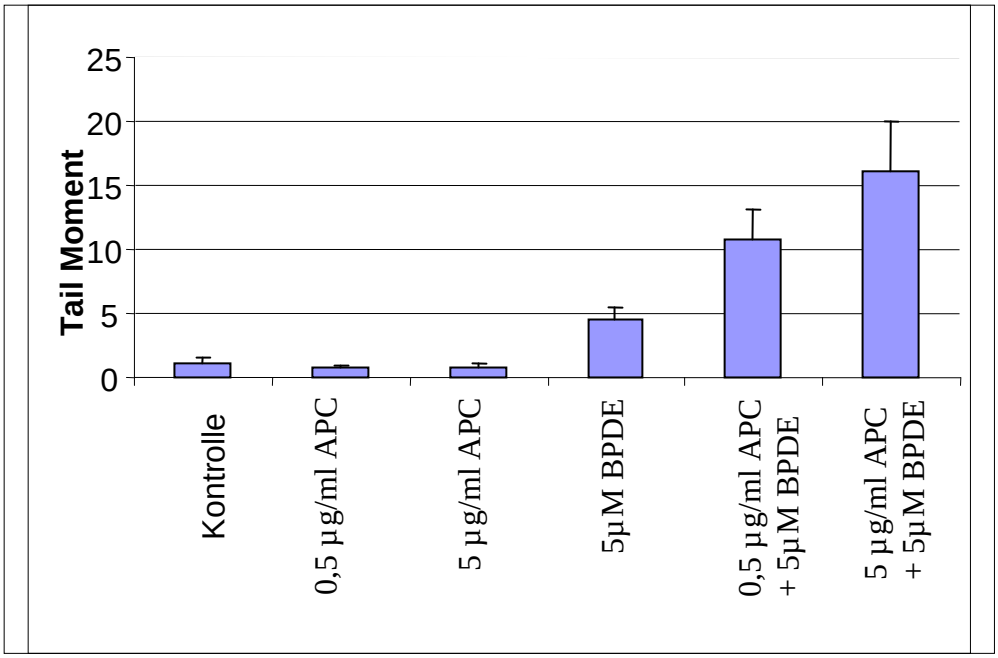


Abbildung 6: Effekt der Behandlung von Vollblut mit BPDE und APC auf die DNA-Migration (Tail Moment) im Comet Assay. Es sind die Mittelwerte der Tail Moments von 3 Versuchen dargestellt.

3.1.3 Versuch zum Nachweis der Reparatur von BPDE-induzierten DNA Schäden und der Einfluß von APC

Um die Reparatur von BPDE-induzierten Schäden zu bestimmen, wurde Vollblut nach Inkubation mit BPDE für 2h bei 37℃ zweimal mit 4℃ RPMI gewaschen und dann weiter inkubiert. In definierten Zeitabständen (15 min, 30 min, 60 min, 120 min, 180 min, 240 min) wurden Präparate hergestellt und ausgewertet. Die Zusammenfassung der gemessenen Tail Moments von 3 Versuchen ist in Abbildung 7 zu sehen. Auf unbehandeltes Kontrollblut hatte der Waschvorgang und die längere Inkubationszeit keine Auswirkung. Nach anfangs hohen BPDE-induzierten Tail Moments, findet zwischen 30 min und 60 min ein deutlicher Abfall statt, so dass diese Zeitpunkte für die Untersuchung der Reparatureffekte in der Studie gewählt wurden.

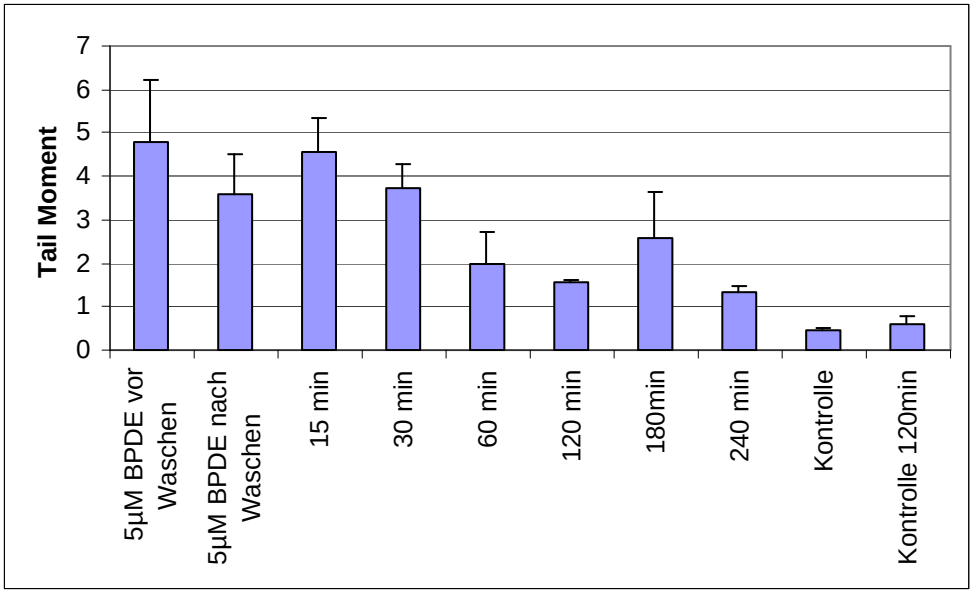


Abbildung 7: Reparatur BPDE-induzierter DNA-Schäden über einen Zeitraum von 4 Stunden. Dargestellt ist die Abnahme der DNA-Migration (Tail Moment) der Mittelwerte von 3 Versuchen.

3.1.4 Stimulierung von Vollblut durch Phytohämagglutinin

In einer weiteren Serie von Vorversuchen wurden vergleichende Tests durchgeführt mit unstimuliertem Blut einerseits, sowie mit Blut, das für 24 h mit 2% Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert worden war. Hierbei wurden unterschiedliche Konzentrationen an APC (0,5 µg/ml bzw. 5 µg/ml) in Kombination mit 5 µM BPDE getestet. Abbildung 8 zeigt die Zusammenfassung der gemessenen Tail Moments von 3 Versuchen. In beiden Ansätzen war eine Induktion von DNA-Schäden durch BPDE und eine Verstärkung des Effekts durch APC zu sehen. Kontrollblut welches nur mit APC behandelt wurde zeigte bei stimuliertem und unstimuliertem Blut kein verändertes Tail Moment. Die Stimulation des Vollbluts mit PHA führte also zu keiner Intensivierung der Effekte. Deshalb wurden alle weitere Versuche unmittelbar mit unstimuliertem Blut durchgeführt.

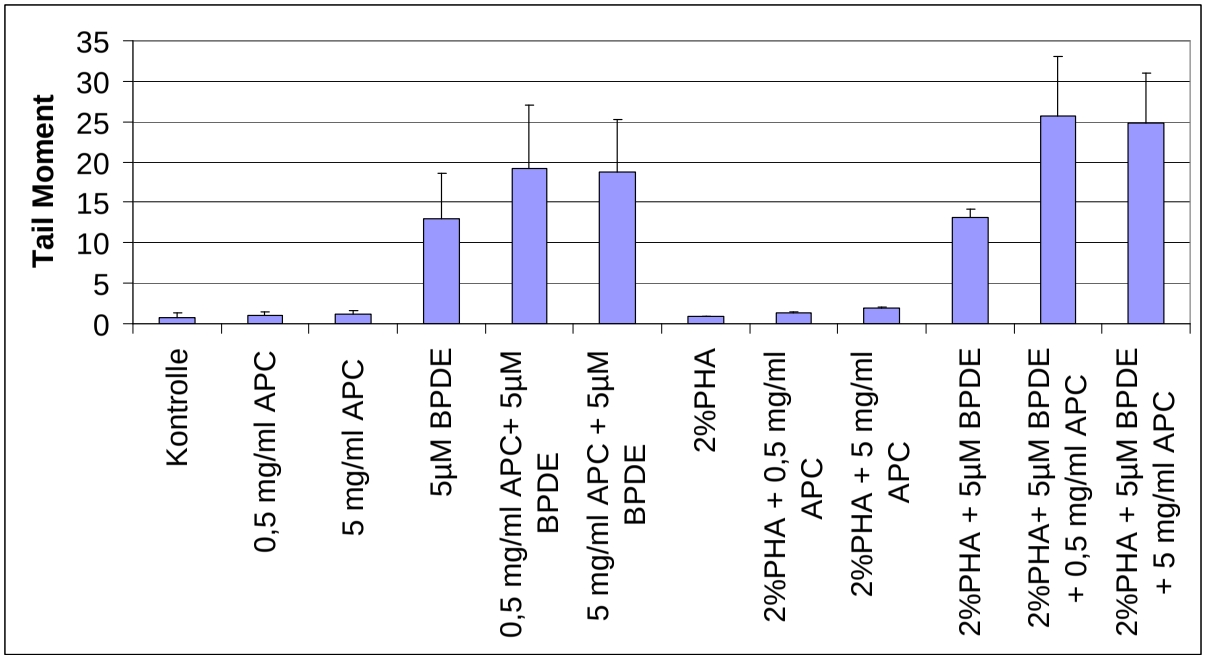


Abbildung 8: Induktion von DNA-Effekten durch BPDE und der Einfluss von APC ohne (links) bzw. mit (rechts) PHA Stimulation. Mittelwerte von 3 Versuchen.

3.2 Ergebnisse der Studie mit Rauchern und Nichtrauchern

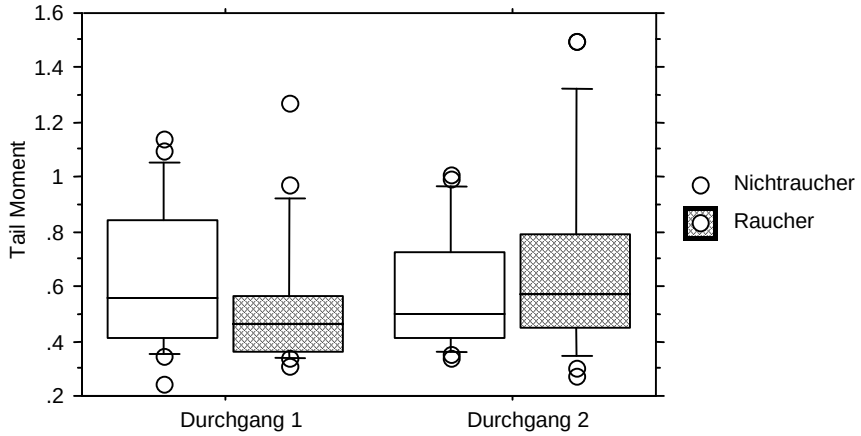
Die Ergebnisse der Studie an Rauchern (n=20) und Nichtrauchern (n=20) sind in den Abbildungen 9-24 zusammengefasst. Hierbei wird die Messung des Tail Moments als Einheit der DNA-Migration dargestellt, da in dessen Berechnung sowohl die Tail Intensity als auch die Tail Migration eingehen. Es wurden im Rahmen der Studie noch weitere Parameter wie Tail Intensity, Tail Migration und Tail Length gemessen. Die Verwendung dieser Einheiten der DNA-Migration führte jedoch grundsätzlich zu keiner anderen Aussage als die des Tail Moments. Sofern Unterschiede festgestellt wurden, wird bei der Beschreibung der Ergebnisse darauf eingegangen. Die entsprechenden Abbildungen der Ergebnisse für die zusätzlichen Comet Assay Parameter finden sich im Anhang (Kapitel 7.3).
Um den Qualitätskriterien für die Verwendung des Comet Assays im Biomonitoring zu entsprechen, wurden in der Studie die 40 Teilnehmer innerhalb von 6 Monaten zwei Mal untersucht (Durchgang 1 und Durchgang 2). Bestimmte Präparate wurden dabei in doppelter Ausfertigung für den Comet Assay hergestellt und von zwei unterschiedlichen Auswertern (Auswerter A und Auswerter B) an typgleichen Auswertesystemen ausgewertet. Es handelte sich dabei um Objektträger zur Bestimmung der basalen DNA-Effekte im Vollblut von Rauchern und Nichtrauchern und um die BPDE-induzierten Effekte.

3.2.1 Basale Effekte

In Abbildung 9 sind die basalen DNA-Effekte in unbehandeltem Vollblut von Rauchern und Nichtrauchern im Comet Assay in Form von Box-Plots zusammengestellt. In der Teilabbildung 9A sind die Ergebnisse für den Untersucher A dargestellt. Es sind beide Durchgänge aufgeführt und innerhalb eines Durchganges wurden die Werte nach Raucher und Nichtraucher unterschieden. Für beide Gruppen zeigte sich eine vergleichbare Streuung der Werte und kein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten. Während im ersten Durchgang

die Nichtraucher leicht erhöhte Werte aufwiesen, zeigten im zweiten Durchgang die Raucher minimal höhere Effekte. Dieser Unterschied ist in Abbildung 25A im Anhang bei der Tail Migration noch deutlicher zu erkennen. Die parallel durchgeführte Auswertung von zusätzlich hergestellten Präparaten durch den Auswerter B an einem typgleichen Bildanalysegerät erbrachte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Dies kann man der Abbildung 9B entnehmen. Im ersten Durchgang haben Raucher und Nichtraucher nahezu identische Mittelwerte, im zweiten Durchgang ist der Mittelwert der Nichtraucher leicht erhöht. Durch Auswerter B wurden wurden mit dem zweiten Bildanalysesystem tendenziell niedrigere Tail Moments gemessen.

A



B

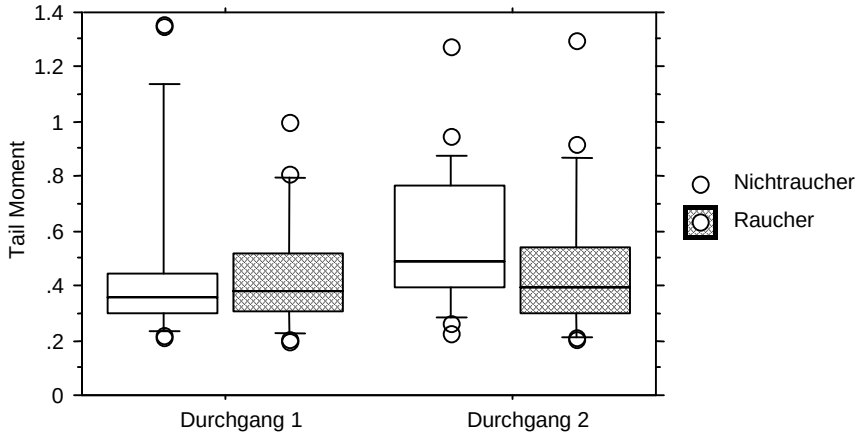


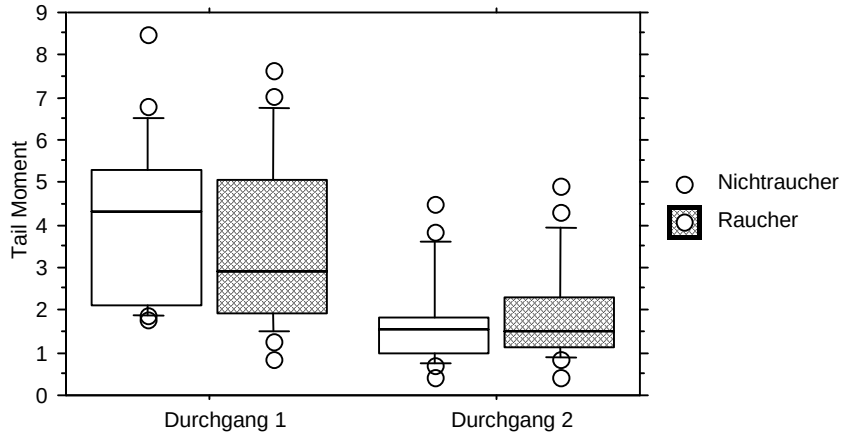
Abbildung 9: **A:** Effekte der basalen DNA-Schäden (Tail Moment) im Comet Assay gemessen durch Auswerter A dargestellt als Boxplots. Die vertikalen Striche der Box-Plots reichen von der 10. bis zur 90. Perzentile. Die untere Begrenzung der Box liegt bei der 25. Perzentile, die obere bei der 75. Perzentile. Der

Median ist durch einen waagerechten Strich in der Box angegeben. Ausreißer sind durch Kreise markiert. **B:** Entsprechend der Abbildung A sind hier die Ergebnisse für den Auswerter B aufgeführt.

3.2.2 BPDE-induzierte Effekte

Im Folgenden wurde Vollblut von Rauchern und Nichtrauchern mit 5µM BPDE für 2h bei 37℃ behandelt. In Abbildung 10 sind die BPDE-induzierten DNA-Effekte im Comet Assay von Rauchern und Nichtrauchern dargestellt. Dabei konnte innerhalb der beiden Durchgänge kein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der Tail Moments von Rauchern und Nichtrauchern sowie der Streuung der Messwerte festgestellt werden.

A



B

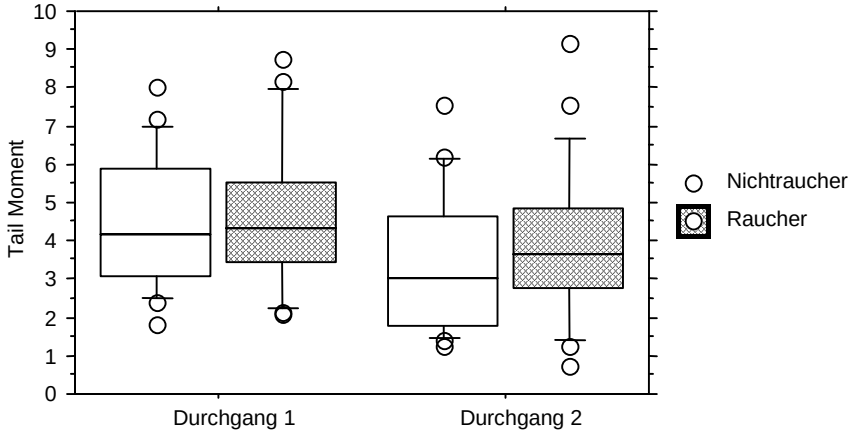


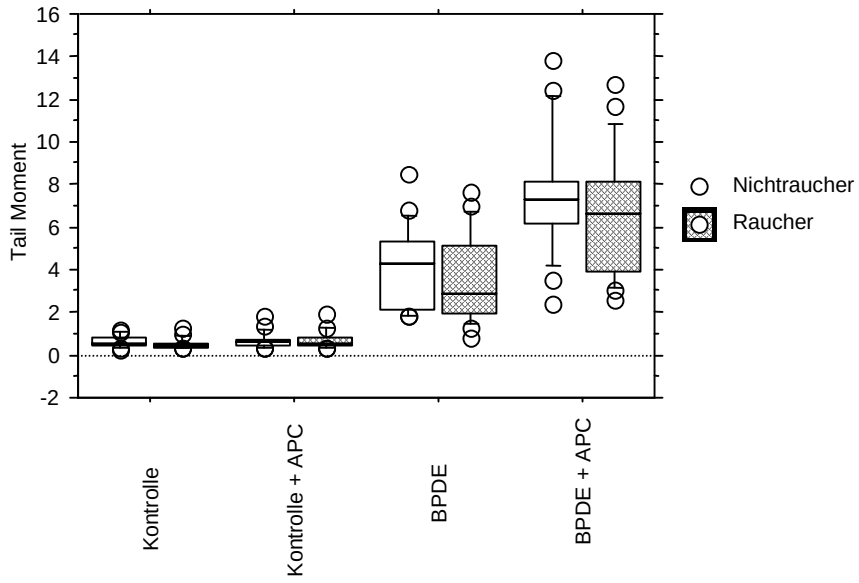
Abbildung 10: **A:** Effekte der BPDE-induzierten DNA-Schäden im Comet Assay gemessen durch Auswerter A. Vollblut von Rauchern und Nichtrauchern wurde mit 5µM BPDE behandelt. Dargestellt sind Box Plots der gemessenen Tail Moments. **B:** Entsprechend der Abbildung A sind hier die Ergebnisse für den Auswerter B aufgeführt.

Im ersten Durchgang ist beim Auswerter A der Mittelwert der gemessenen Tail Moments der Nichtraucher gegenüber den Rauchern erhöht, beim Auswerter B sind die Mittelwerte nahezu identisch. Der zweite Durchgang lieferte beim Auswerter A insgesamt niedrigere Messwerte des Tail Moments bei gleichen Mittelwerten von Rauchern und Nichtrauchern. Dies könnte jedoch ein Artefakt sein, hervorgerufen durch die altersbedingt verminderte Intensität der Fluoreszenzlampe. Beim Auswerter B sind die Messwerte des Durchgang 2 gegenüber Durchgang 1 leicht erniedrigt und der Mittelwert der Nichtraucher liegt geringfügig unter dem der Raucher.

3.2.3 Einfluss des Reparaturinhibitors APC

Zusätzlich zur Behandlung von Vollblut mit 5 µM BPDE für 2h bei 37℃ wurde noch eine kombinierte Behandlung mit dem Reparaturinhibitor APC durchgeführt. Nach der Zugabe von 0,5µg/ml APC zum Vollblut konnte keine Veränderung der basalen DNA-Schäden beobachtet werden. BPDE-induzierte Effekte wurden in Rauchern und Nichtrauchern durch APC verstärkt, jedoch führte diese Verstärkung nicht zu signifikanten Unterschieden zwischen den beiden Gruppen (Abbildung 11A). Die Wiederholungsversuche bestätigten dieses Ergebnis (Abbildung 11B). Wie schon die BPDE-induzierten Messwerte, so zeigten auch die zusätzlich mit APC behandelten Zellen beim zweiten Durchgang niedrigere Messwerte als im ersten.

A



B

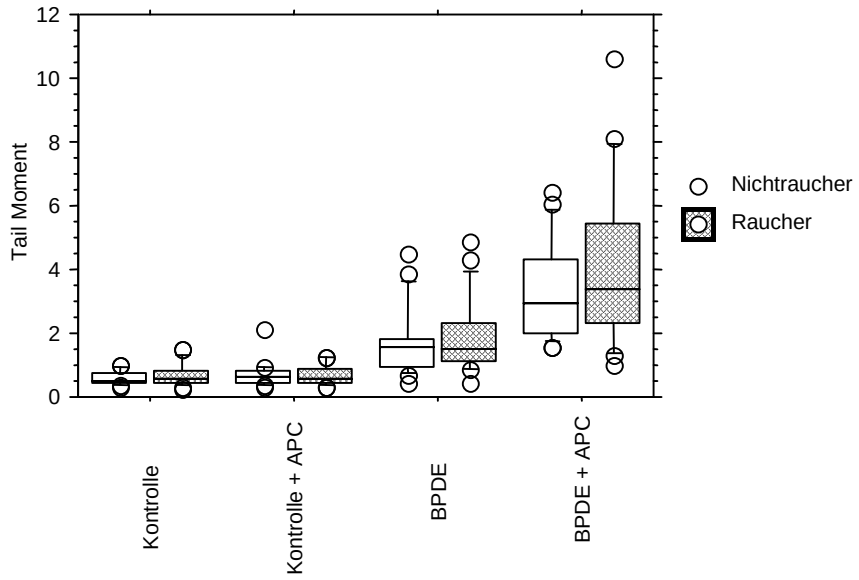
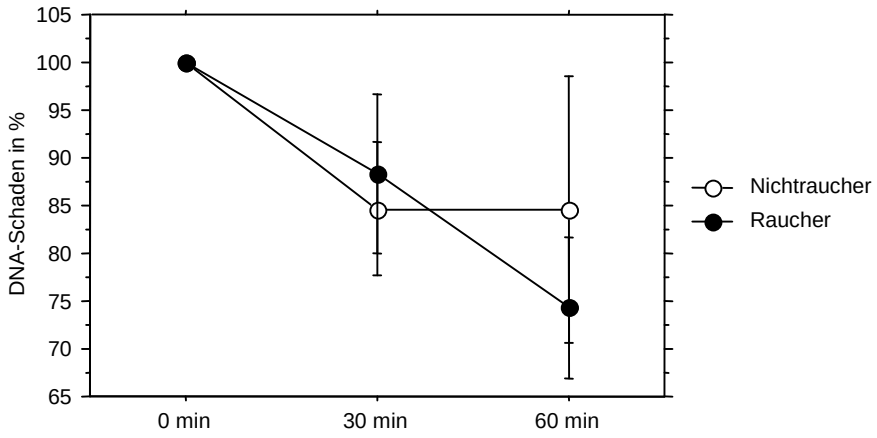


Abbildung 11: **A:** Vollblut von Rauchern und Nichtrauchern wurde mit BPDE und APC behandelt. Dargestellt sind Box Plots der gemessenen Tail Moments. **B:** Abgebildet ist die Wiederholung des Experiments.

3.2.4 Reparatur von BPDE-induzierten DNA-Schäden

Vollblut wurde für 2h bei 37℃ mit 5µM BPDE inkubiert, dann zweimal mit 4℃ RPMI gewaschen und weiterhin bei 37℃ inkubiert. Eine Reparatur von BPDE induzierten DNA-Brüchen sollte sich in einer zeitlichen Abnahme der Tail Moments äußern. Abbildung 12A fasst die Ergebnisse nach Inkubation der Zellen für 30 und 60 Minuten zusammen. Diese Untersuchung wurde zu einem späteren Zeitpunkt vollständig wiederholt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12B zusammengefasst.

A



B

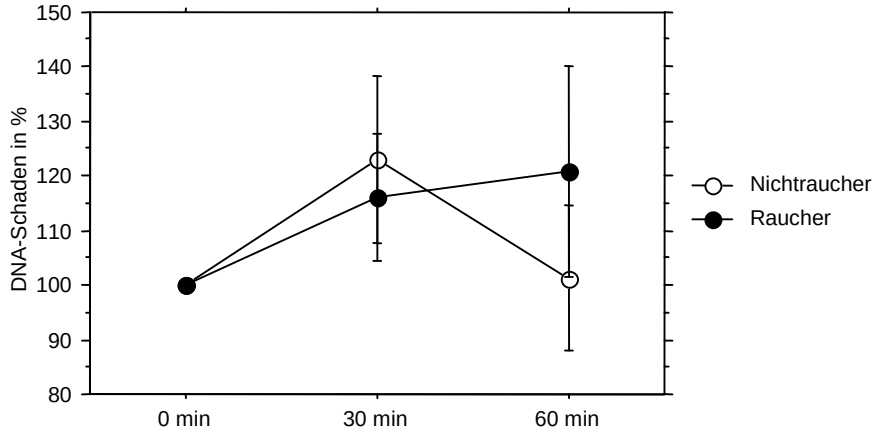


Abbildung 12: **A:** Reparatur der BPDE-induzierten DNA-Effekte in Vollblut von Rauchern und Nichtrauchern. Dargestellt ist die prozentuale Veränderung der Tail Moments im Vergleich zum Startzeitpunkt. **B:** Abgebildet ist die Wiederholung des Experiments.

Beim ersten Durchgang wurden nach 30 min und nach 60 min abnehmende Tail Moments festgestellt, die nach 60 min bei den Rauchern größer war als bei den Nichtrauchern (Abbildung 12A).
Die zweite Untersuchung zeigte ein anderes Ergebnis (Abbildung 12B). Hier liegen die Tail Moments bei Nichtrauchern, nach einer zwischenzeitlichen Zunahme, nach 60 min wieder beim Ausgangswert. Bei den Rauchern wurde sogar eine kontinuierliche Zunahme der Tail Moments gemessen. Bei den Darstellungen der Tail Migration und der Tail Length in Abbildung 28B im Anhang kam es im zweiten Durchgang ebenfalls zu einer Abnahme der DNA-Schäden, die diesmal jedoch im Gegensatz zum ersten Durchgang für Nichtraucher ausgeprägter war.
Insgesamt zeichneten sich diese Versuche durch eine extrem hohe Variabilität der Messergebnisse aus. Zwar ergibt sich in keinem Fall ein signifikanter Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern, aber die Aussagekraft dieser Versuche ist aufgrund der Variabilität und der widersprüchlichen Kinetik in den beiden Ansätzen sehr begrenzt.

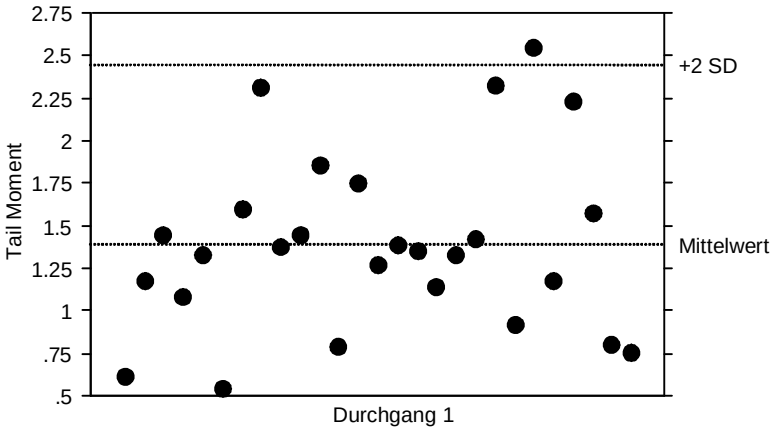
3.2.5 Referenzstandard

Für die Auswertung der Studie ist es unerlässlich, dass die Rahmenbedingungen bei der Durchführung der einzelnen Comet Assays identisch sind. Um dies zu gewährleisten, wurde zu Studienbeginn als Referenzstandard eine ausreichend große Menge an V79 Zellen tiefgefroren. Für jeden Durchlauf im Comet Assay wurde je ein Objektträger mit frisch aufgetauten V79 Zellen hergestellt und parallel zu den anderen Präparaten im Comet Assay mitgeführt. In Abbildung 13 sind die Tail Moments der Referenzstandards für jeden Comet Assay zu sehen. In beiden Durchgängen liegt nur eine Probe außerhalb von zwei Standardabweichungen. Die Daten der Comet Assays, in denen diese abweichenden Standards gemessen wurden, werden nun von der Auswertung ausgeschlossen. In den Abbildung 14 und Abbildung 15 sind die Tail Moments des unbehandelten und des mit BPDE behandelten Bluts für den Auswerter A aufgeführt. Der Ausschluß führt zu keinen grundsätzlichen Unterschieden in den Ergebnisse, wie man im Vergleich mit den Abbildung 9 und Abbildung 10 sehen kann. Eine Auffälligkeit besteht allerdings bei der Korrektur der Reparatureffekte. Dies wird ersichtlich beim Vergleich der

Abbildung 16A mit Abbildung 12A. Das gemittelte Tail Moment der Nichtraucher fällt nach 60 min Reparaturzeit nun geringer aus.

Auch unter Berücksichtigung eines Referenzstandards finden sich demnach in dieser Studie im Comet Assay keine signifikanten Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern in den spontanen und BPDE-induzierten DNA-Effekten sowie in der Reparatur der DNA-Schäden über einen Zeitraum von 60 min.

A



B

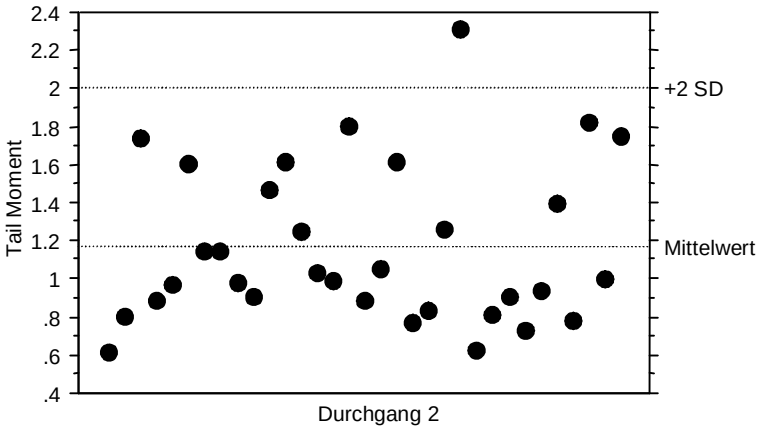


Abbildung 13: **A:** Tail Moments der Referenzstandards für jeden Comet Assay im ersten Durchgang der Studie. Der erlaubte Bereich der Tail Moment Werte der V79 Zellen wurde als Mittelwert ± 2 Standardabweichungen definiert. **B:** Dargestellt ist die Wiederholung des Experiments.

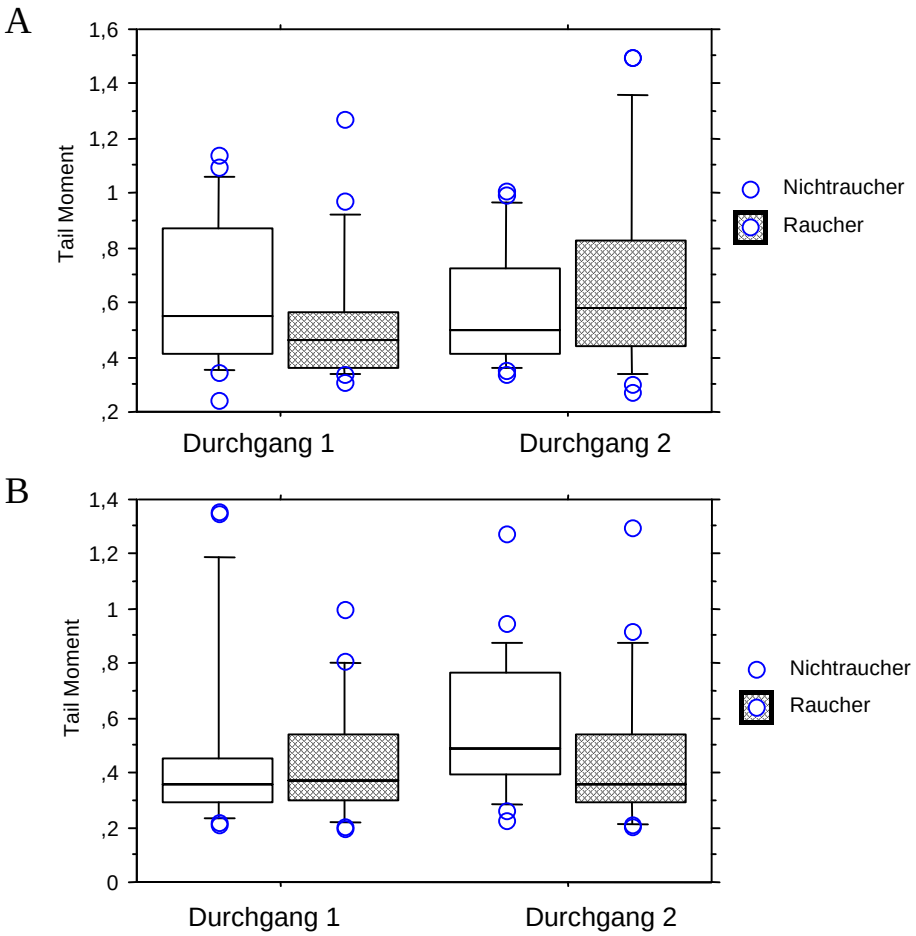


Abbildung 14: **A:** Korrigierte Effekte der basalen DNA-Schäden im Comet Assay gemessen durch Auswerter A. Es wurden die Daten des Comet Assays ausgeschlossen, dessen Referenzstandard ein Tail Moment außerhalb von 2 Standardabweichungen ergab. **B:** Entsprechend der Abbildung A sind hier die Ergebnisse für den Auswerter B aufgeführt.

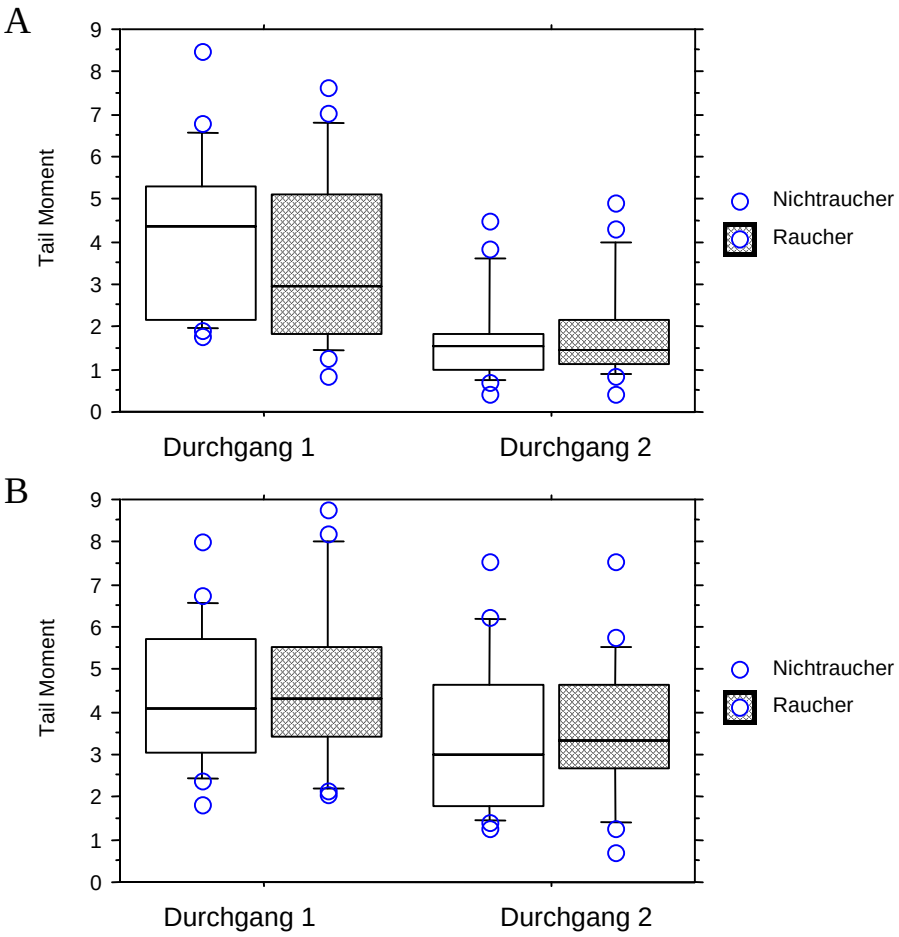


Abbildung 15: **A:** Korrigierte Effekte der BPDE-induzierten DNA-Schäden im Comet Assay gemessen durch Auswerter A. Vollblut von Rauchern und Nichtrauchern wurde mit 5µM BPDE behandelt. Es wurden die Werte des Comet Assays ausgeschlossen, dessen Referenzstandard ein Tail Moment außerhalb von 2 Standardabweichungen ergab. **B:** Entsprechend der Abbildung A sind hier die Ergebnisse für den Auswerter B aufgeführt.

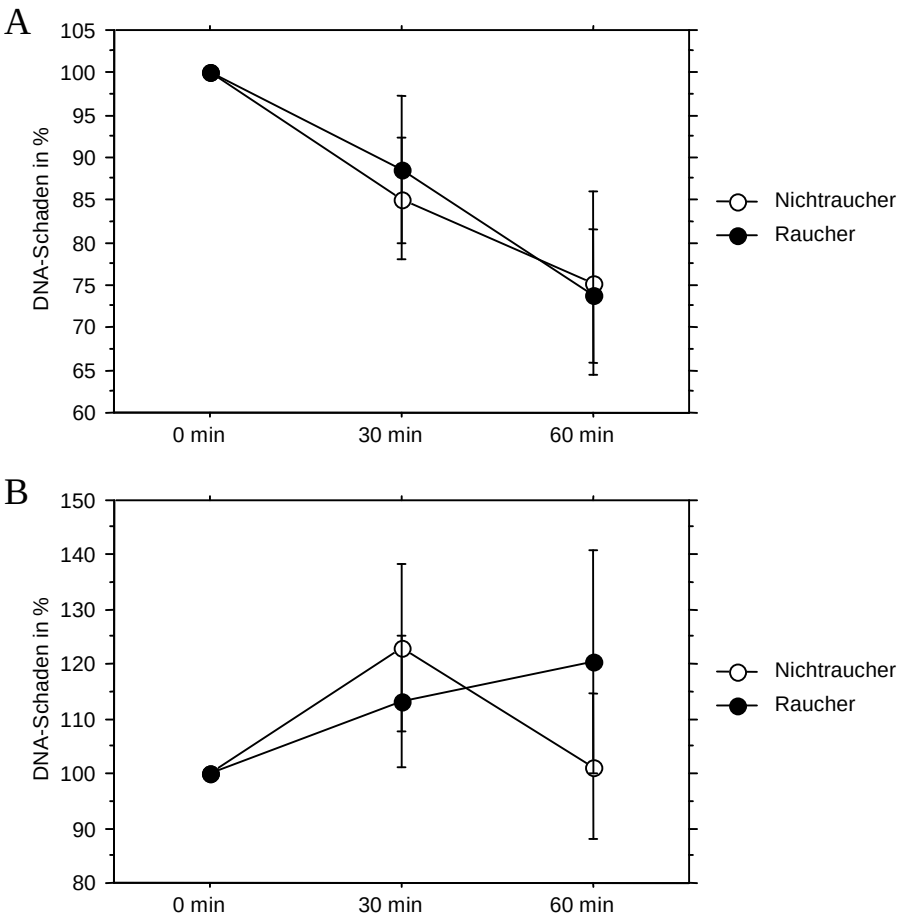
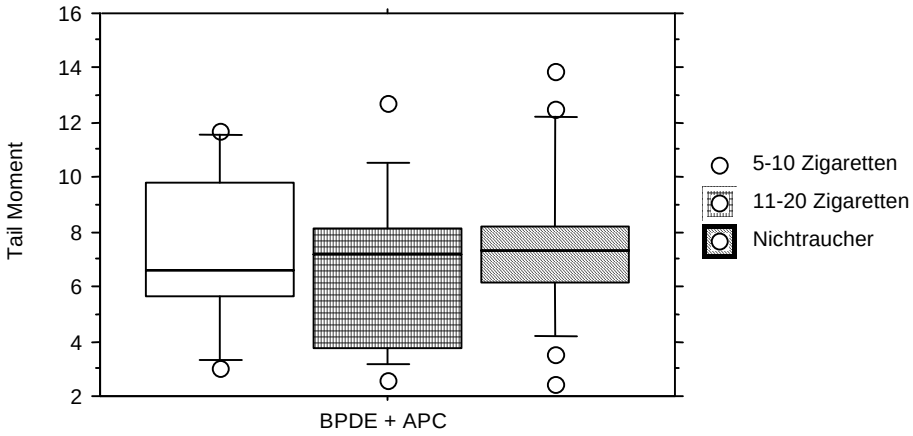


Abbildung 16: **A:** Korrigierte Darstellung der Reparatur von BPDE-induzierten DNA-Effekte in Vollblut von Rauchern und Nichtrauchern. Es wurden die Daten des Comet Assays ausgeschlossen, dessen Referenzstandard ein Tail Moment außerhalb von 2 Standardabweichungen ergab. Dargestellt ist die prozentuale Veränderung der Tail Moments im Vergleich zum Startzeitpunkt. **B:** Entsprechend der Abbildung A sind hier die Ergebnisse des Wiederholungsexperiments dargestellt.

3.2.6 Einfluss der Frequenz des Rauchens

Um den Einfluss der Frequenz des Rauchens auf die Ergebnisse im Comet Assay zu prüfen, wurden die Raucher in Untergruppen unterteilt, in denen jeweils 5-10 Zigaretten pro Tag (n = 6) oder 11-20 Zigaretten pro Tag (n = 13) geraucht wurden. In Abbildung 17 sind die Tail Moments der kombinierten Behandlung von Vollblut mit 5µM BPDE und 0,5µg/ml APC dargestellt.

A



B

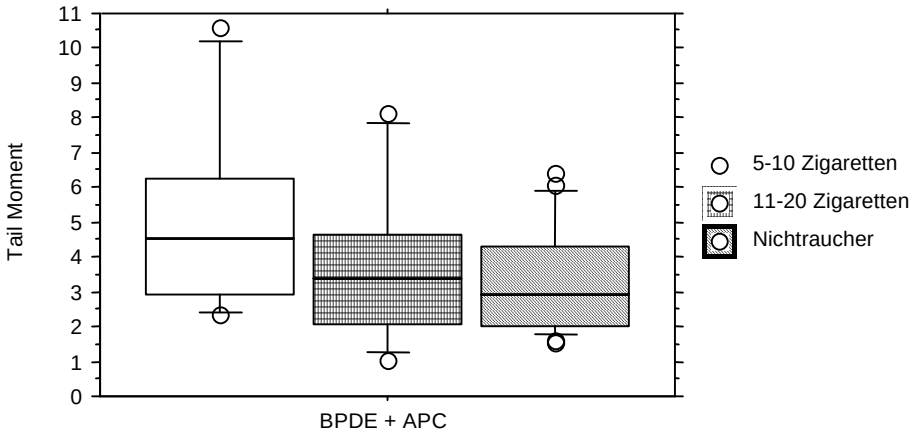


Abbildung 17: **A:** Einfluß der Frequenz des Rauchens auf das Tail Moment im Comet Assay. Das Vollblut der Probanden wurde mit BPDE und APC behandelt. Die Probanden wurden nach Anzahl der gerauchten Zigaretten pro Tag in 3 Gruppen geteilt (0; 5-10; 11-20). **B:** Dargestellt sind die Ergebnisse des zweiten Durchgangs.

Im ersten Durchgang (Abbildung 17A) waren die Mittelwerte der Subgruppen nahezu identisch. Im zweiten Durchgang fand sich bei Rauchern mit 5-10 Zigaretten ein leicht erhöhter Mittelwert des Tail Moments. Die Betrachtung der basalen Werte

aufgetrennt nach der Frequenz des Rauchens ergab für beide Auswerter ebenfalls keine reproduzierbaren Ergebnisse (nicht abgebildet).

3.2.7 Korrelationsanalyse

Diese Studie mit 40 Teilnehmern wurde zweimal durchgeführt (Durchgang 1 und 2). Die Präparate bestimmter Versuchsserien wurden doppelt angefertigt und von zwei Auswertern (A und B) ausgewertet. Jedem Auswerter stand dazu ein eigenes typgleiches Bildanalysesystem zur Verfügung, das jedoch auf Grund der spezifischen Konfiguration (Mikroskop, Kamera, etc.) für dieselbe Zelle nicht zu identischen Werten führt. Um herauszufinden, inwieweit die Messungen der beiden Versuchsdurchgänge und die Messungen durch zwei Auswerter übereinstimmen, wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Beim Vergleich zwischen Durchgang 1 und Durchgang 2 wurden die Werte für die basalen DNA-Effekte verglichen (Kontrolle), BPDE-induzierte Effekte, BPDE-induzierte Effekte in Anwesenheit von APC und die Werte nach 30 bzw. 60 Minuten Reparaturzeit. Für den Vergleich zwischen Auswerter A und Auswerter B wurden die basalen Werte (Kontrolle) und die BPDE-induzierten Effekte herangezogen. Die Korrelationswerte R können Werte zwischen +1 und –1 annehmen, je nachdem ob eine positive oder negative Korrelation vorliegt. Im allgemeinen ist dabei die Korrelation um so größer, je näher der Betrag von R bei 1 liegt. Bei der Betrachtung der erhaltenen R-Werte meiner Studie fällt jedoch auf, dass die Korrelationen insgesamt niedrig ausfallen. Bei der Korrelation von Durchgang 1 mit Durchgang 2 für den Auswerter A ergibt sich z.B. ein R-Wert von 0.306. Wenn also die Durchführung des Comet Assays für einen Probanden im ersten Versuchsdurchlauf ein im Vergleich zu den anderen Probanden niedriges Tail Moment hervorgebracht hat, so kann nicht davon ausgegangen werden, dass diese Tendenz im zweiten Durchgang reproduziert werden kann.

Tabelle 3: Korrelationsanalyse von einigen Parametern der Studie: Kontrolle, unbehandeltes Vollblut; BPDE (5µM); APC (0.5 µg/ml); 30/60 min, Reparatur der BPDE-induzierten DNA Effekte nach 30 und 60 min

	R
(1) Durchgang 1 vs. Durchgang 2	
Kontrolle; Auswerter A	0.306
Kontrolle; Auswerter B	0.019
BPDE; Auswerter A	0.439
BPDE; Auswerter B	0.301
BPDE + APC, Auswerter A	0.273
Reparatur, 30 min, Auswerter A	0.126
Reparatur, 60 min, Auswerter A	0.043
(2) Auswerter A vs. Auswerter B	
Kontrolle; Durchgang 1	0.214
Kontrolle; Durchgang 2	0.113
BPDE; Durchgang 1	0.169
BPDE; Durchgang 2	0.723

3.3 Genotypisierungen

Alle Probanden wurden in Bezug auf das *Cytochrome P450 1A1* Gen *(CYP1A1)* und das *Glutathion-S-Transferase M1* Gen *(GSTM1)* genotypisiert. Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) können Polymorphismen dieser Gene detektiert werden.

Im *GSTM1*-Gen erlaubt diese Methode den Nachweis von homozygoten Deletionen, wohingegen heterozygote Träger nicht von homozygot normalen unterschieden werden können. Das Ergebnis einer PCR ist in Abbildung 18 dargestellt. Tabelle 4 zeigt, daß bei der Untersuchung 21 der 40 Probanden Träger des *GSTM1-Null*-Genotyps sind.

Tabelle 4: Genotypisierung der Probanden: Ile, homozygot für Allel Isoleucin; Ile/Val heterozygot für Allele Isoleucin und Valin; 0, *GSTM1*-Null-Genotyp

Proband	*CYP1A1*	*GSTM1*	Proband	*CYP1A1*	*GSTM1*
1	Ile	+	21	Ile/Val	0
2	Ile	0	22	Ile	0
3	Ile	+	23	Ile	+
4	Ile/Val	0	24	Ile	0
5	Ile	+	25	Ile	0
6	Ile	+	26	Ile	+
7	Ile	0	27	Ile	0
8	Ile/Val	0	28	Ile	+
9	Ile	+	29	Ile	0
10	Ile	0	30	Ile	0
11	Ile	+	31	Ile/Val	+
12	Ile	+	32	Ile	+
13	Ile	0	33	Ile	0
14	Ile	+	34	Ile	+
15	Ile	0	35	Ile	+
16	Ile	0	36	Ile	+
17	Ile	0	37	Ile	0
18	Ile	+	38	Ile	0
19	Ile	+	39	Ile	0
20	Ile	+	40	Ile	0

Vom *CYP1A1*-Gen wurde zunächst ein definierter Gen-Abschnitt mit der PCR amplifiziert und danach mit Hilfe eines Restriktionsenzyms, das für einen Austausch von Adenin nach Guanin sensibel ist, ein Restriktionsverdau durchgeführt. Beim Vorhandensein von Adenin schneidet das Enzym die DNA und es resultieren Fragmente mit der Länge von 251bp und 160bp. Hat dagegen ein Austausch nach Guanin stattgefunden, schneidet das Enzym nicht, und es resultiert ein ungeschnittenes DNA-Fragment mit einer Länge von 411bp.

Bei Homozygoten für Ile ergeben sich bei der PCR zwei Banden, bei Heterozygoten drei Banden und bei Homozygoten für Val lediglich eine Bande des ungeschnittenen

Genabschnitts. Abbildung 19 demonstriert das Ergebnis nach einem Restriktionsverdau. Tabelle 4 zeigt, dass von 40 Probanden bei 36 Ile homozygot vorlag. 4 Probanden waren heterozygot für den Austausch von Ile und Val. Bei keinem der Probanden konnte Val homozygot nachgewiesen werden. Aufgrund dieser ungleichen Verteilung der Genotypen in meinem Probandenkollektiv wurde darauf verzichtet, einen Einfluss dieses Polymorphismus auf die DNA-Effekte im Comet Assay zu analysieren.

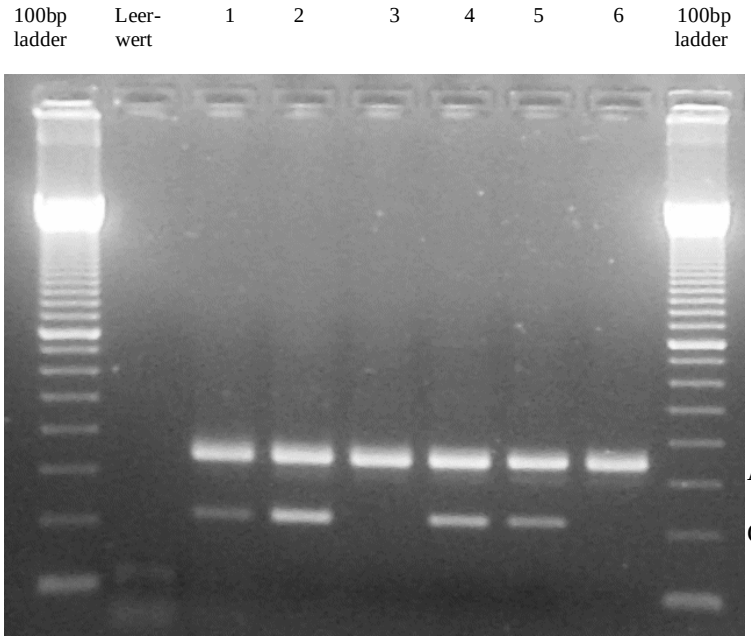


Abbildung 18: *GSTM1*-Genotypisierung. Als Längenstandard dient eine 100bp-Leiter. Mit den Primern *KT1* und *KT2* wurde eine PCR mit DNA durchgeführt, die zuvor aus dem Vollblut der Probanden isoliert wurde. Im Gel findet man die *GSTM1*-Bande bei 217bp. In den Linien 1 ,2 ,4 und 5 wurde PCR-Produkt aufgetragen, welches aus Probanden gewonnen wurde, die homo- oder heterozygot für *GSTM1* sind. In den Linien 3 und 6 war kein *GSTM1* nachzuweisen (*GSTM1-Null*-Genotyp). Zur Qualitätskontrolle wurde in der PCR auch das *Actin*-Gen mit den Primern *Actin H* und *Actin R* vervielfältigt. Die *Actin*-Bande findet man im Gel bei 349bp.

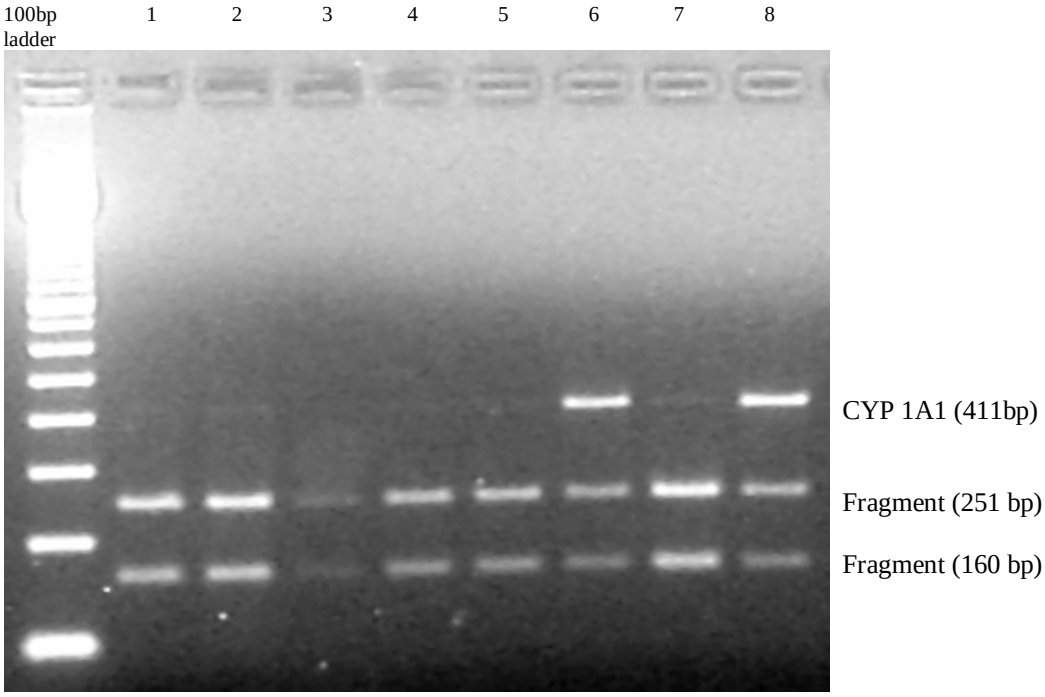


Abbildung 19: *CYP1A1*-Genotypisierung. Mit den Primern CYP1A1hayashi1 und CYP1A1-3 wurde eine PCR mit DNA durchgeführt, die zuvor aus dem Vollblut der Probanden isoliert wurde. Mit dem PCR-Produkt wurde dann ein Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym *BsrD1* durchgeführt. In den Linien 6 und 8 wurde Restriktions-Produkt aufgetragen, welches aus Probanden gewonnen wurde, die heterozygot für den Ile-Val Polymorphismus sind. Im Gel finden sich 3 Banden. Bei homozygotem Vorliegen von Ile kann das Restriktionsenzym *BsrD1* die DNA vollständig schneiden, und es resultieren 2 Banden im Gel.

Die Abbildungen 20-24 sind Darstellungen der Ergebnisse des Comet Assays mit Unterteilung nach dem *GSTM1*-Genotyp. In Abbildung 20 wurden die basalen DNA-Effekte in Vollblutproben zusammengestellt und nach *GSTM1*-Genotyp unterschieden. Für beide Gruppen zeigt sich eine vergleichbare Streuung der Werte und kein signifikanter Unterschied der Mittelwerte. Die parallel durchgeführte Auswertung von zusätzlich hergestellten Präparaten durch einen anderen Auswerter an einem typgleichen Bildanalysegerät erbrachte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

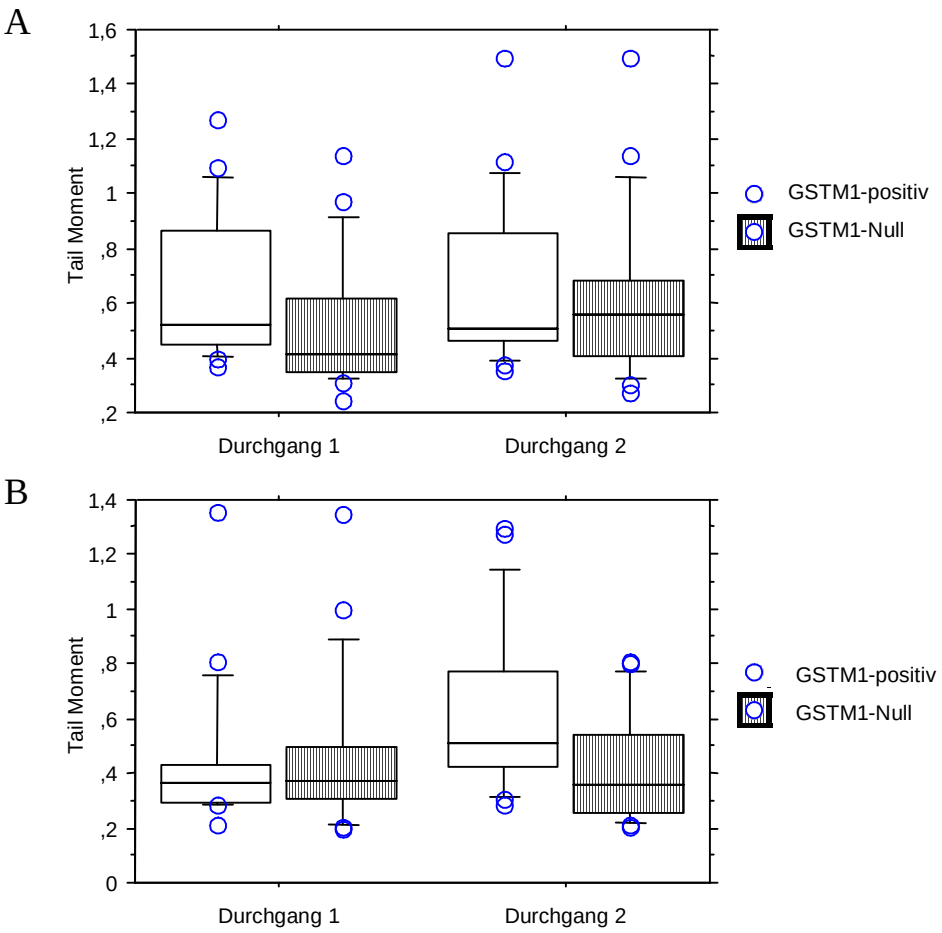


Abbildung 20: **A:** Einfluß des *GSTM1*-Genotyps auf die Effekte der basalen DNA-Schäden im Comet Assay gemessen durch Auswerter A. Es wurde unbehandeltes Vollblut der Probanden verwendet. Dargestellt sind Boxplots der gemessenen Tail Moments. **B:** Entsprechende Darstellung für die Ergebnisse von Auswerter B.

In Abbildung 21 werden die BPDE-induzierten DNA-Effekte von Probanden mit *GSTM1-positiv-* und *GSTM1-Null*-Genotyp verglichen. Dabei konnte innerhalb der beiden Durchgänge kein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten von Probanden mit *GSTM1-positiv-* und *GSTM1*-Null-Genotyp festgestellt werden. In beiden Durchgängen ist der Mittelwert der Probanden mit *GSTM1-Null*-Genotyp bei beiden Auswertern gegenüber den Probanden mit *GSTM1-positiv*-Genotyp leicht erhöht. Diese Unterschied sind jedoch minimal und bewegen sich im Rahmen der üblichen Variabilität.

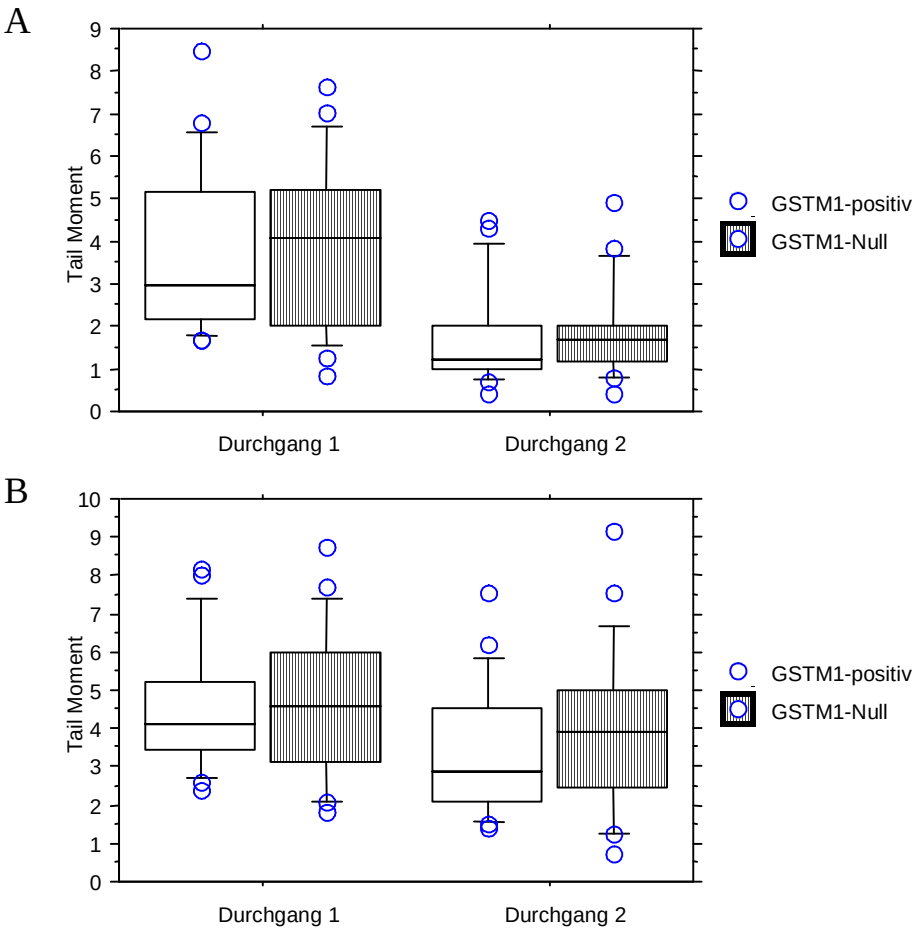


Abbildung 21: **A:** Einfluß des *GSTM1*-Genotyps auf die Effekte der BPDE-induzierten DNA-Schäden im Comet Assay gemessen durch Auswerter A. Vollblut von Rauchern und Nichtrauchern wurde mit 5µM BPDE behandelt. Dargestellt sind Box Plots der gemessenen Tail Moments. **B:** Entsprechende Darstellung der Ergebnisse für Auswerter B.

In Abbildung 22 sind die basalen DNA-Effekte im Comet Assay im Vollblut von Rauchern und Nichtrauchern zusammengestellt. Die Ergebnisse sind zusätzlich nach dem *GSTM1*-Genotyp unterschieden. Die Mittelwerte der Tail Moments in beiden Durchgängen weisen bei den beiden Auswertern keinen signifikanten Unterschied auf. Durch Auswerter A wurde im zweiten Durchgang bei den Rauchern mit *GSTM1-positiv*-Genotyp ein erhöhter Mittelwert gemessen, der aber durch den zweiten Auswerter nicht bestätigt wurde.

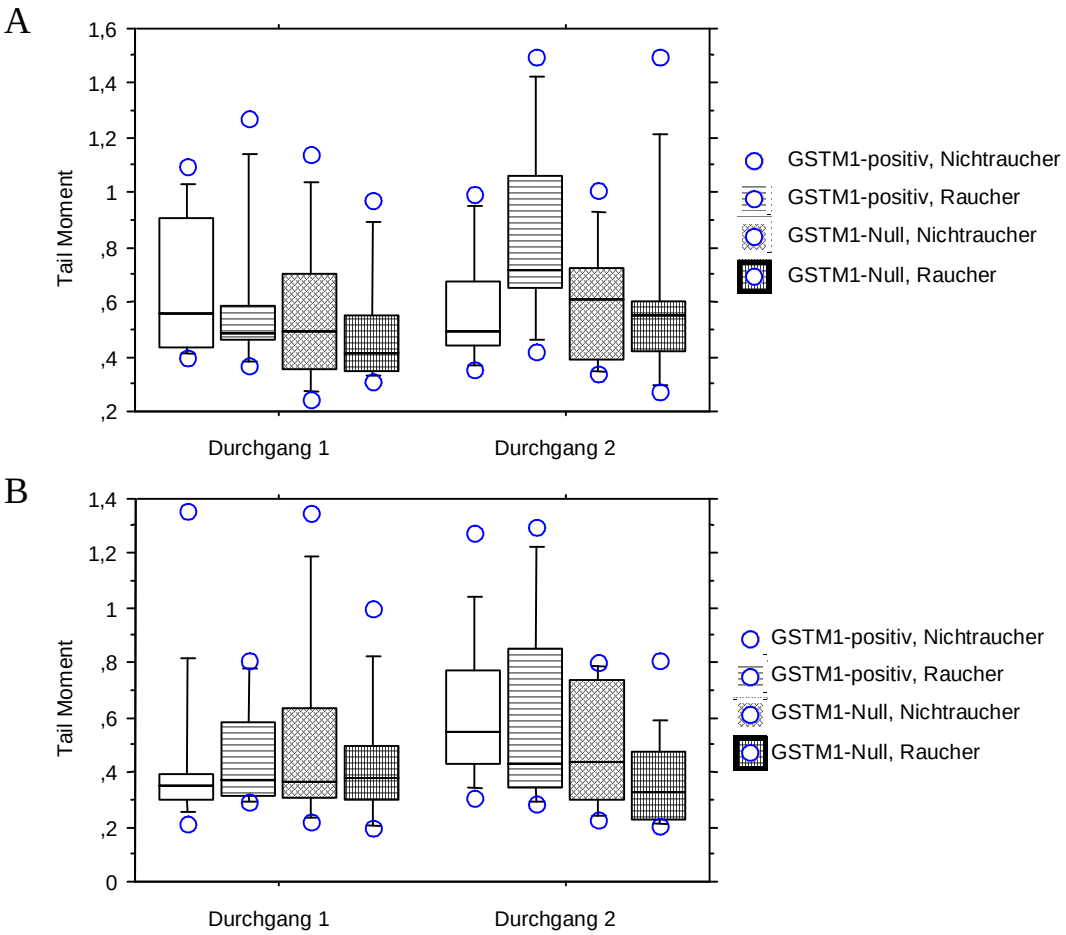


Abbildung 22: **A:** Einfluß des *GSTM1*-Genotyps und des Raucherstatus auf die Effekte der basalen DNA-Schäden im Comet Assay gemessen durch Auswerter A. Es wurde unbehandeltes Vollblut der Probanden verwendet. Dargestellt sind Boxplots der gemessenen Tail Moments. **B:** Entsprechende Darstellung der Ergebnisse für Auswerter B.

In Abbildung 23 sind die BPDE-induzierten DNA-Effekte – unterteilt nach Rauchern und Nichtrauchern sowie nach dem GSTM1-Genotyp - dargestellt. Für die Auswerter A und B sind jeweils beide Durchgänge dargestellt. Die einzelnen Mittelwerte der Tail Moments innerhalb der Durchgänge weisen in Abhängigkeit vom Raucherstatus und dem *GSTM1*-Genotyp keine signifikanten Unterschiede auf.

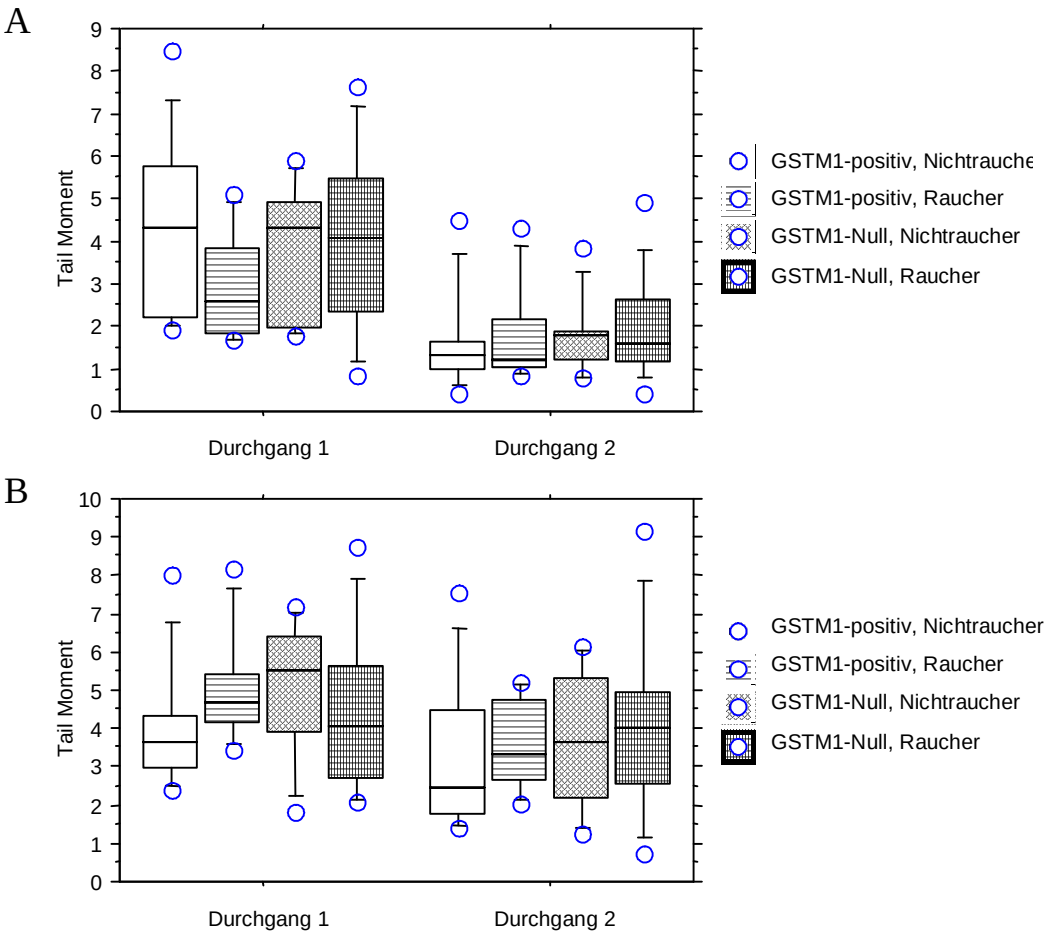


Abbildung 23: **A:** Einfluß des *GSTM1*-Genotyps und des Raucherstatus auf die Effekte der BPDE-induzierten DNA-Schäden im Comet Assay gemessen durch Auswerter A. Das Vollblut der Probanden wurde mit 5µM BPDE behandelt. Dargestellt sind Box Plots der gemessenen Tail Moments. **B:** Entsprechend der Abbildung für Auswerter A sind hier die Ergebnisse für den Auswerter B aufgeführt.

Auch unter dem Einfluss von APC konnte kein Unterschied zwischen den beiden *GSTM1*-Genotypen und dem Raucherstatus festgestellt werden (Abbildung 24).

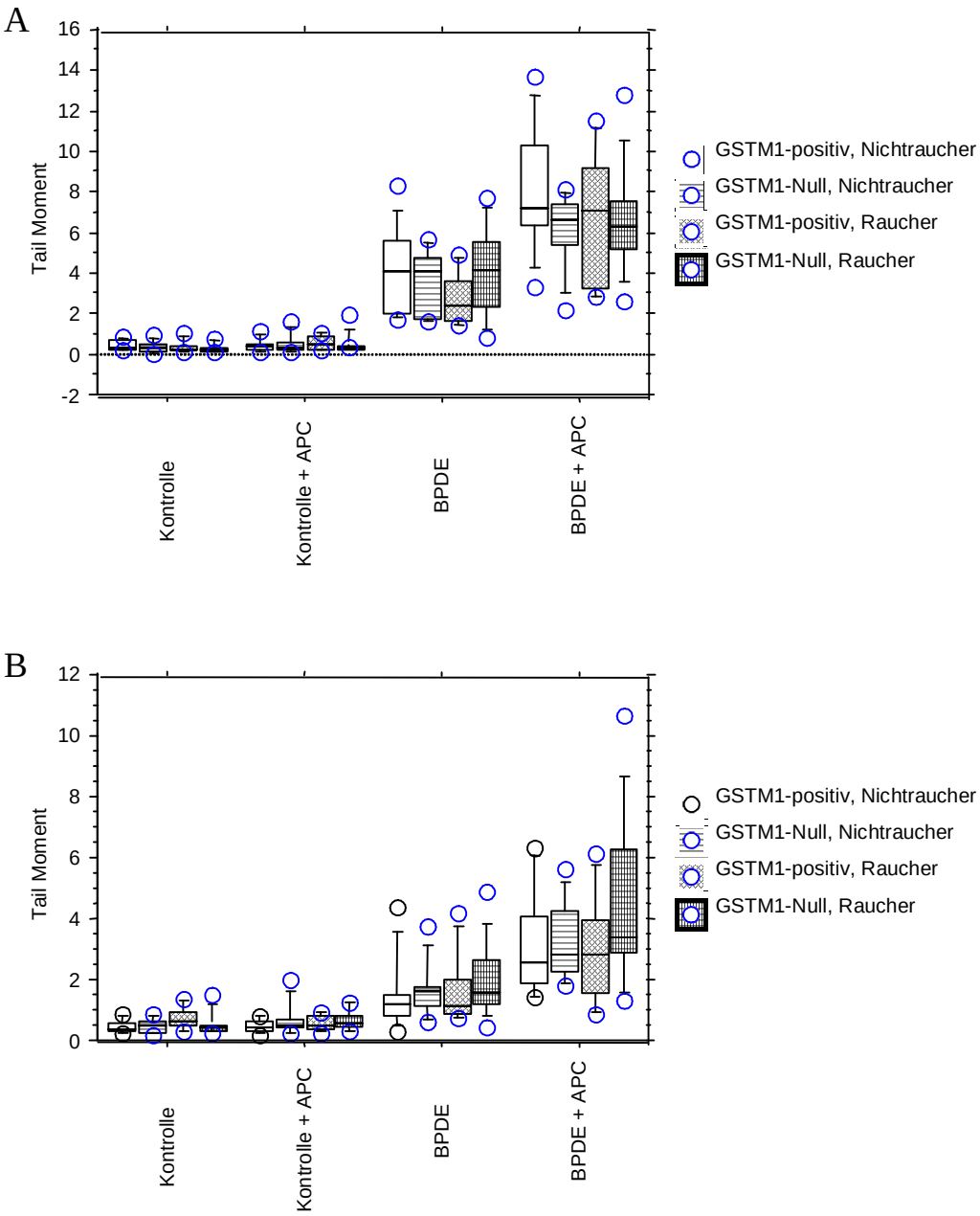


Abbildung 24: **A:** Vollblut von Rauchern und Nichtrauchern wurde mit BPDE und APC behandelt. Dargestellt sind Box Plots der gemessenen Tail Moments. **B:** Abgebildet ist die Wiederholung des Experiments.

4 Diskussion

In meiner Arbeit wurde unter besonderer Berücksichtigung von strengen Qualitätskriterien die Verwendbarkeit des Comet Assays für das Biomonitoring untersucht. Zunächst wurde hierzu ein sensitives Protokoll erarbeitet, mit dem Ziel in einer anschließenden Studie Unterschiede in DNA-Effekten zwischen Rauchern und Nichtrauchern nachzuweisen. Es wurden bisher schon mehrere Arbeiten publiziert, die den Einfluss des Rauchens auf DNA-Schäden im Comet Assay untersucht haben. Diese Untersuchungen haben hinsichtlich der basalen DNA-Schäden zu widersprüchlichen Ergebnissen geführt.

In einer kürzlich publizierten Meta-Analyse wurden die Ergebnisse von 38 Studien zusammengefasst. Die Auswertung deutete insgesamt auf eine gesteigerte DNA-Schädigung bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern hin. Unterteilte man diese Studien jedoch in solche, die direkt den Effekt von Rauchen als genotoxische Exposition untersuchten und Studien, die Rauchen als potenzielle Einflussgröße im Rahmen einer anderen Exposition berücksichtigten, so fand sich nur für erstere ein signifikanter Unterschied. Das positive Ergebnis der Meta-Analyse war stark durch eine kleine Subgruppe von Studien beeinflusst, in denen visuell und nicht mit Bildanalyse-Systemen ausgewertet wurde. Es ergaben sich ausserdem Hinweise darauf, dass eine bevorzugte Publikation von Studien mit positivem Ergebnis und andere Fehlerquellen kleiner Studien das Gesamtergebnis beeinflussten (Hoffmann et al., 2005). Insgesamt konnte die Meta-Analyse einen Einfluss des Rauchens auf die DNA-Effekte im Comet Assay nicht eindeutig belegen.

Um eine zuverlässigere Aussage zur Eignung des Comet Assays im Biomonitoring machen zu können, wurden in meiner Studie mehrere Aspekte untersucht, die hier diskutiert werden sollen:

- Der Comet Assay als Testsystem zum Nachweis genotoxischer Effekte im Blut von Rauchern
- Zur Bedeutung des Versuchsprotokolls beim Einsatz des Comet Assays im Biomonitoring
- Induzierbarkeit von DNA-Schäden im Blut von Rauchern und Nichtrauchern als Marker für Mutagensensitivität

- Reparaturkapazität für DNA-Schäden bei Rauchern und Nichtrauchern
- Zur Bedeutung genetischer Polymorphismen für die Effekte im Comet Assay

4.1 Der Comet Assay als Testsystem zum Nachweis genotoxischer Effekte im Blut von Rauchern

In der Literatur wurde berichtet, dass bereits Belastungen durch geringe Konzentrationen von verschiedenen genotoxischen Agenzien am Arbeitsplatz zu Effekten im Comet Assay führen. In einem Übersichtsartikel von Moller et al. (2000) findet sich eine Zusammenstellung verschiedener Studien zum Biomonitoring mit dem Comet Assay. In diesen wurden unter anderem Expositionen gegenüber Luftverschmutzung, Pestiziden, Haarfärbemitteln, ionisierender Strahlung, organischen Lösungsmitteln, Arbeitsplatzbelastungen in der Gummiindustrie usw. mit Hilfe des Comet Assays untersucht. Die Datenlage ist jedoch insgesamt widersprüchlich. Wenn man mit dem Comet Assay Expositionen am Arbeitsplatz sicher erfassen will, müssten auch die genotoxischen Effekte des Rauchens nachzuweisen sein.

Obwohl der Comet Assay als sensitiver *in vitro* und *in vivo* Genotoxizitätstest etabliert ist, ist seine Sensitivität in Untersuchungen zum Biomonitoring, in denen er häufig verwendet wird, nicht nachgewiesen und muss kritisch hinterfragt werden. Der Comet Assay misst nur Strangbrüche und alkalilabile Stellen, dass heißt primäre DNA-Läsionen, welche überwiegend kurzlebig sind und in Säugerzellen schnell repariert werden. DNA-Addukte, welche durch viele Mutagene/Kanzerogene (die auch in Zigarettenrauch vorhanden sind) gebildet werden, verursachen nicht direkt Effekte im Comet Assay, sondern verstärken die DNA-Migration nur, wenn sie persistieren und in den untersuchten Zellen durch Exzisionsreparatur repariert werden (Speit and Hartmann, 1995). Daher könnte der Comet Assay für die Detektion von schwacher chronischer Exposition gegenüber Genotoxinen schlecht geeignet sein und es wäre verständlich, dass Raucher keine deutlichen Effekte im Comet Assay aufweisen. Die Gründe der widersprüchlichen Ergebnisse für den Effekt des Rauchens im Comet Assay wurden in kürzlich veröffentlichten Übersichtsartikeln diskutiert (Moller et al.,

2000; Faust et al., 2004) und deuten auf eine eingeschränkte Verwendbarkeit des Comet Assays im Biomonitoring hin.
In meiner Studie wurde bewußt das Rauchen als zu untersuchende Größe gewählt, da Zigarettenrauch in umfangreichen Studien als relevantes Genotoxin und Mutagen nachgewiesen wurde. Im Zigarettenrauch wurde eine Vielzahl an genotoxischen Bestandteilen nachgewiesen, so dass Rauchen ein geeignetes Model für die humane Exposition gegenüber Genotoxinen darstellt (DeMarini, 2004; Husgafvel-Pursiainen, 2004). Rauchen ist auch eine gut dokumentierte Ursache von Krebs (IARC, 2004; Peto et al., 1996). Als Hauptgrößen der schädigenden Substanzen seien polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAHs), aromatische Amine, N-Nitrosamine und Aldehyde genannt (Hecht, 1999; Stabbert et al., 2003). In bislang verfügbaren Studien wurde kein Zusammenhang zwischen der Anzahl der gerauchten Zigaretten und dem Effekt im Comet Assay aufgezeigt (Hoffmann et al., 2005). Während eine Arbeitsgruppe über einen signifikanten Anstieg der DNA-Schäden bei Rauchern von einer oder mehrerer Zigaretten berichteten (Zhu et al., 1999), fanden andere Studien keine Unterschiede zwischen Nicht-Rauchern und Rauchern die mehr als 10 Zigaretten pro Tag rauchten (Maluf et al., 2001; Touil et al., 2002). Kürzlich wurde in einer sehr sorgfältig durchgeführten Studie bei starken Rauchern (>20 Zigaretten pro Tag) kein Unterschied in den DNA-Effekten im Vergleich zu Nichtrauchern gefunden (Hoffmann and Speit, 2005).

Der Mensch ist dem Zigarettenrauch vornehmlich durch den Atemtrakt ausgesetzt. Der Rauch wird inhaliert und seine Toxine werden über die Lunge aufgenommen, wo sie in das Blut gelangen und im Folgenden eine Vielzahl an Organen schädigen können. Einer der zahlreichen Inhaltsstoffe von Zigarettenrauch ist Benzo[a]pyren (B[a]P). B[a]P gehört zu den polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAH) und ist per se noch nicht toxisch. Ein Hauptmetabolit von B[a]P im menschlichen Organismus ist Benzopyren-diol-epoxid (BPDE). Zusätzlich können bei der metabolischen Aktivierung von B[a]P durch *Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1)* auch reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, „reactive oxygene spezies“) entstehen. BPDE und ROS können mit der DNA reagieren und Schäden induzieren. Wenn diese Schäden nicht korrekt repariert werden, kann dies zur Bildung von Mutationen (insbesondere Transversionen G→ T und A→ T) führen und damit kanzerogen wirken (Mitra et al., 2001; Li et al., 1996). In einem Tierversuch konnte gezeigt werden, dass nach

Exposition der Lunge gegenüber B[a]P genotoxische Effekte auch in Lymphozyten nachgewiesen werden können (Garry et al., 2003). In dieser Studie wurden die DNA-Effekte nach endotrachealer Gabe einer Maximaldosis von 3 mg B[a]P bei Sprague-Dawley Ratten über einen Zeitraum von 48h im Comet Assay untersucht. Diese hohe Dosis wurde gewählt, um auch Organe untersuchen zu können, die bei einer pulmonalen Exposition nur indirekt betroffen sind. Deutliche Effekte konnten in Lungenzellen und peripheren Lymphozyten gezeigt werden, moderate in Alveolarmakrophagen und Hepatozyten. Lungenzellen, wie die sogenannten Clara Zellen (Stammzellen des Bronchialepithels und der Hauptträger vom Cytochrom P450 Isoenzym System der Lunge) und auch Pneumozyten Typ II, enthalten eine hohe *CYP1A1* Aktivität (Boyd, 1984) und bilden ein Abwehrsystem gegen Xenobiotika der Umwelt. Diese spezifischen Zellen sind befähigt B[a]P zu metabolisieren und elektrophile Metabolite wie BPDE und ROS zu bilden (Albrecht et al., 2001). Das produzierte BPDE kann die alveolo-kapillare Barriere überwinden und erreicht das zirkulierende Blut, wo es DNA in peripheren Blutzellen schädigen kann. Lungengewebe und Blutzellen sind damit direkt B[a]P oder seinen Metaboliten ausgesetzt. Zusätzlich wurde die katalytische Aktivität und Expression von *CYP1A1* in Lymphozyten aus dem Blut von Ratten klar demonstriert (Dey et al., 2001). Lymphozyten haben also eine gewisse Kapazität Xenobiotika wie B[a]P zu metabolisieren.

Die Studie von Garry et al. (2003) kam zu dem Schluss, dass B[a]P bei pulmonaler Exposition DNA-Schäden auch in peripheren Lymphozyten induziert und das der Comet Assay zum Biomonitoring für die pulmonale Exposition durch B[a]P verwendet werden kann. Insgesamt lässt sich also feststellen, dass der Comet Assay grundsätzlich geeignet sein sollte, genotoxische Effekte des Rauchens im peripheren Blut nachzuweisen, da das Blut exponiert wird und die induzierten Schäden zu Effekten im Comet Assay führen können. Es ist jedoch unklar, ob die realen Expositionsbedingungen bei Rauchern ausreichen, um genotoxische Effekte im Blut sicher nachzuweisen. Es ist deshalb von entscheidender Bedeutung, dass bei Untersuchungen mit dem Comet Assay ein optimales Versuchsprotokoll verwendet wird.

4.2 Zur Bedeutung des Versuchsprotokolls beim Einsatz des Comet Assay im Biomonitoring

Ziel der vorliegenden Studie war nicht, das Gewicht der bisherigen Studienlage numerisch in die ein oder andere Richtung zu bewegen, sondern generell den Einsatz des Comet Assays im Biomonitoring kritisch zu hinterfragen. Im Biomonitoring geht es darum, mit dem Comet Assay die Auswirkungen von potenziell genotoxischen Substanzen nachzuweisen, beispielsweise Holzstaub, Pestizide oder polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH). Oft handelt es sich um kleine Konzentrationsbereiche der untersuchten Substanzen. In vielen Fällen sind die Expositionsbedingungen nicht gut definiert und es liegen komplexe Mischexpositionen vor. Es ist dann oft problematisch, einen gefundenen Effekt tatsächlich auf die Exposition zurückzuführen. Deshalb haben die Studienplanung und das Versuchsprotokoll bei solchen Untersuchungen eine besonders große Bedeutung.

Es ist nicht generell üblich, Maßnahmen zur Qualitätssicherung zu ergreifen, auch wenn dies in den aktuellen Richtlinien empfohlen wird. Im Rahmen des „International Program on Chemical Safety (IPCS)“ wurden konkrete Hinweise zur Planung und Durchführung des Comet Assays gegeben (Albertini et al., 2000).

Problematische Aspekte bei der Beurteilung von Comet Assay Studien im Biomonitoring sind neben der geringen Qualität vieler Studien die Variabilität der Effekte, die sich u.a. dadurch erklärt, dass viele Parameter der Testdurchführung das Testergebnis beeinflussen können. Viele Studien geben nicht ausdrücklich an, dass die Auswertung auf kodierten Objektträgern basiert und das Objektträger von Rauchern und Nicht-Rauchern gleichzeitig hergestellt, im Comet Assay prozessiert und ausgewertet wurden. Ein unzureichendes Studiendesign (z.B. keine Verblindung der Auswertung) öffnet die Möglichkeit, dass die Ergebnisse durch andere Faktoren (z.B. psychologische) verfälscht werden. Auch kleine und triviale Veränderungen im Ablauf des Comet Assays (z.B. Abnahme der Leuchtkraft der Fluoreszenzlampe) können zu einer veränderten Sensitivität im Zuge der Untersuchung führen.

Ein zusätzliches Problem des Comet Assays ist, dass verschiedene Modifikationen des Protokolls verwendet werden und das viele Testvariablen identifiziert wurden, die die Effekte des Comet Assays beeinflussen (Tice et al., 2000; Speit and Hartmann, 1999). Dies begründet sich unter anderem in unterschiedlicher Ausstattung (z.B.

Mikroskop, Kamera) und in der Verwendung unterschiedlicher Software (z.B. verschiedene Formeln zur Kalkulation des Tail Moments). Zum Teil werden Auswertungen auch ohne Bildanalysesystem vorgenommen und sind verglichen zur elektronischen Auswertung wenig standardisiert und stärker von subjektiven Auswertungstendenzen abhängig. Daher ist ein direkter quantitativer Vergleich der Effekte des Comet Assays verschiedener Studien generell unmöglich. Zum einen induzieren diese Faktoren eine beträchtliche Variabilität zwischen Arbeitsgruppen, aber auch die Comet Assay Effekte selbst können schwer zu interpretieren sein.
Moller et al. (2000) führt wesentliche Kriterien an, die bei Comet Assay Studien im Biomonitoring für die Rekrutierung von Probanden zu berücksichtigen sind. Es handelt sich hauptsächlich um Faktoren wie Alter, Geschlecht, Raucherstatus, sportliche Betätigung, Diät (Antioxidantien), genetische Unterschiede (genetische Polymorphismen in Genen die in die Metabolisierung von Xenobiotika und die DNA-Reparatur eingreifen) und zurückliegende Infektionen, welche die Effekte im Comet Assay beeinflussen. Es wurde beobachtet, dass positive Studien sich scheinbar in Süd-Europa häufen und dies führte zu der Spekulation, das geographische Variationen der Rauchgewohnheiten relevant sein könnten.
Auch wenn in Untersuchungen Standardprotokolle verwendet werden, so wird häufig deren Sensitivität für den untersuchten Zelltyp und die jeweiligen experimentellen Rahmenbedingungen nicht demonstriert. Für die *in vitro* und *in vivo* Anwendung des Comet Assays stellt dies kein größeres Problem dar, da die Dosis der Testsubstanz beliebig erhöht werden kann, bis eine nachweisbare Toxizität erreicht wird. So können auch positive Kontrollen einbezogen werden. Im Biomonitoring ist man jedoch auf den Nachweis kleiner Expositionen an Genotoxinen festgelegt. Oft kann deshalb keine Dosis-Effekt Beziehung hergestellt und keine positive Kontrolle einbezogen werden. Die Qualität des Comet Assays beruht daher auf standardisierten und kontrollierten Testbedingungen.

In meiner Studie wurde deshalb ein Schwerpunkt auf die Qualitätssicherung gelegt. In Vorversuchen zu dieser Studie wurde ein sensitives Protokoll des Comet Assays etabliert. Dies ist essentiell, um bei der Studiendurchführung den kleinen zu erwartenden Unterschied in den Comet Assay Paramtern zwischen Rauchern und Nichtrauchern zu detektieren. Es wurde dazu eine Alkalibehandlungszeit von 35 min und eine anschließenden Elektrophoresezeit von 25 min gewählt.

In vielen Studien mit dem Comet Assay werden isolierte Lymphozyten untersucht. Diese haben einen Anteil von 20-30% an den kernhaltigen Zellen des peripheren Bluts. Albertini et al. (2000) beschrieb in den Leitlinien zur Verwendung des Comet Assay die Verwendung von Vollblut als ausreichend. Dies gestaltet sich einfacher und es wird vermieden, zusätzliche DNA-Schäden (z.B. oxidative) durch den Vorgang der Lymphozytenisolierung zu induzieren. Erfahrungsgemäß zeigen die Ergebnisse mit Vollblut weniger Variabilität und eine bessere Reproduzierbarkeit als mit frisch isolierte Lymphozyten. Die vorliegende Studie wurde deshalb mit Vollblut der Probanden durchgeführt.

Es ist möglich Blutzellen zu stimulieren und zur Proliferation anzuregen, um die Wirkung von Mutagenen nach Exposition der Zellen *ex vivo* zu untersuchen. Bei stimulierten Blutzellen von Rauchern wurde zunächst eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem Radiomimetikum Bleomycin beobachtet (Schmezer et al., 2001). Neuere Erfahrungen derselben Arbeitsgruppe belegen jedoch keine generelle Zunahme der DNA-Reparaturkapazität nach Stimulation von peripheren Blutzellen mit Phytohämagglutinin (PHA) (Mayer et al., 2002). In Vorexperimenten zu dieser Studie konnte kein bedeutender Einfluss einer PHA Simulation auf unbehandeltes Vollblut sowie auf die Behandlung von Vollblut mit BPDE und dem Reparaturinhibitor Aphidicolin (APC) nachgewiesen werden. In dieser Studie bot sich vielmehr die Verwendung von unstimuliertem Blut an.

Eine Abschätzung der statistischen Aussagekraft für unsere Studie ergab, dass bei einer Anzahl von 12 Probanden je Gruppe und 50 Zellen pro Proband ein Anstieg des Tail Moments um 0,5 (unter den beschriebenen Versuchsbedingungen) sicher festgestellt wird (Hoffmann and Speit, 2005). Nach unserer Einschätzung sind kleinere Unterschiede nicht biologisch relevant – insbesondere bei Berücksichtigung der hohen Testvariabilität. Albertini et al. (2000) wiesen darauf hin, dass bei der statistischen Auswertung darauf geachtet werden muss, als Untersuchungseinheit den Probanden zu wählen, und nicht die untersuchte Einzelzelle. Letzteres führt aufgrund der hohen Stichprobenzahl schneller zu statistisch signifikanten Unterschieden bei minimalen Effekten. In vielen publizierten Studien ist nicht eindeutig nachzuvollziehen, ob der Proband oder die Zelle als experimentelle Einheit angesehen wurde.

Um das Kollektiv der Probanden eindeutig zu charakterisieren, lagen meiner Studie sehr strenge Einschluss- und Ausschlusskriterien zugrunde. Die Teilnehmer waren

männlich und jung, wurden zeitnah untersucht und waren keiner hohen sportlichen Belastung ausgesetzt. Probanden mit potenziell mutagenen Belastungen durch Medikamente oder Chemotherapie wurden von der Studie ausgeschlossen. Prinzipiell sollten sich die Studienteilnehmer möglichst nur durch die Frequenz des Rauchens unterscheiden, um andere Einflussfaktoren so weit wie möglich auszuschließen oder zu parallelisieren. Damit sollte gewährleistet werden, dass das Rauchen als zu untersuchende Größe nicht durch andere Faktoren überlagert wird. Die Exposition der Probanden definierte sich durch die Anzahl der gerauchten Zigaretten pro Tag.

Es wurden zwei komplette Versuchsreihen innerhalb von 6 Monaten durchgeführt, um eine Aussage über die Reproduzierbarkeit des gesamten Ansatzes treffen zu können. Der zweite Durchlauf lieferte in der Zusammenfassung der Messwerte im Wesentlichen dasselbe Ergebnis. In beiden Serien konnte in keinem der experimentellen Ansätze ein genotoxischer Effekt des Rauchens nachgewiesen werden. Die Variabilität der Einzelmesswerte entspricht den Erfahrungen unseres Labors und publizierten Daten (Collins et al., 1997).

Die angefertigten Präparate wurden codiert ausgewertet, um eine unterbewusste Beeinflussung des Auswerters zu vermeiden. Darüber hinaus wurden Präparate doppelt angefertigt und von einem zweiten erfahrenen Auswerter an einem typgleichen Auswertesystem untersucht. Durch diese externe Kontrolle sollte die Unabhängigkeit von persönlichen subjektiven Tendenzen bei der Auswertung geprüft werden. Es zeigte sich keine Identität der Messwerte der beiden Auswerter, wohl aber vergleichbare Tendenzen, auf die noch eingegangen wird. In keinem Fall gab es einen grundsätzlichen Unterschied im Gesamtergebnis zwischen den beiden Auswertern.

Um die Qualität der Abläufe der einzelnen Comet Assay Durchläufe zu gewährleisten, wurde bei jeder durchgeführten Elektrophorese ein Präparat mit frisch aufgetauten V79 Zellen als interne Kontrolle (Referenzstandard) mitgeführt. Es handelte sich dabei um unbehandelte V79 Zellen, die sich im Gegensatz zu bestrahlten V79 in Vorversuchen als stabiler erwiesen. Entsprechende Beobachtungen wurden mit K562 Zellen als Refernzstandard veröffentlicht (De Boeck et al., 2000). Die Messwerte der internen Kontrolle lagen in meiner Studie innerhalb angemessener Grenzen. Die Variabilität der Ergebnisse kann also in diesem Fall nicht durch eine Variabilität in der Durchführung des Comet Assays

begründet werden. Die Daten der Versuchsdurchläufe, in denen die Comet Assay Parameter der V79 Zellen mehr als 2 Standardabweichungen vom Mittelwert abwichen wurden aus der Wertung genommen. Im Falle des Tail Moments handelte es sich dabei in jedem Durchgang der Studie um einen Elektrophoresedurchlauf. Die Berücksichtigung der internen Kontrolle, d.h. der Ausschluss dieser Werte vom Gesamtergebnis, führte allerdings zu keiner Veränderung in der Aussage der Studie.

Bei der Untersuchung mit unbehandeltem Blut konnte in meiner Studie kein signifikanter Unterschied der Comet Assay Parameter zwischen Rauchern und Nichtrauchern festgestellt werden. Dabei waren die Gesamtergebnisse der beiden Auswerter in den beiden Durchgängen konsistent und reproduzierbar. Es ist deshalb davon auszugehen, dass Rauchen mit dem Comet Assay unter streng kontrollierten Bedingungen nicht eindeutig nachweisbar ist, da die Effekte vermutlich unter dessen Nachweisgrenze liegen. Man könnte einwenden, dass die Exposition der Probanden nicht hoch genug war. Hoffmann and Speit (2005) zeigten jedoch dass auch Raucher mit mehr als 20 Zigaretten am Tag sich im Comet Assay unter streng kontrollierten Bedingungen sich nicht von Nichtrauchern unterscheiden lassen.
Insgesamt haben meine Untersuchungen gezeigt, dass es unter streng kontrollierten Bedingungen mit einem sensitiven Comet Assay Protokoll in einem sehr homogenen Kollektiv von Rauchern und Nichtrauchern nicht möglich ist, genotoxische Effekte des Rauchens im peripheren Blut nachzuweisen. Aufgrund meiner Ergebnisse erscheinen die berichteten positiven Effekte nicht plausibel und sind möglicherweise keine direkte Folge des Rauchens.

4.3 Induzierbarkeit von DNA-Schäden im Blut von Rauchern und Nichtrauchern als Marker für Mutagen-sensitivität

Es wurde gezeigt, dass ionisierende Strahlung und die radiomimetische Substanz Bleomycin mehr Chromosomenschäden in Lymphozyten von Rauchern als von Nichtrauchern induzieren (Au et al., 1991; Albrecht et al., 2004). Solche Ergebnisse können als Hinweis darauf gewertet werden, dass Lymphozyten von Rauchern als

Folge der chronischen Belastung eine höhere Sensitivität gegenüber Mutagenen aufweisen (Au, 2003).
Unterschiede in der Sensitivität gegenüber Mutagenen sind in der Literatur hauptsächlich im Zusammenhang mit Krebserkrankungen beschrieben. Es wird dabei versucht relevante Biomarker zu identifizieren, welche die Abschätzung inter-individueller Unterschiede in der Reaktion gegenüber kanzerogenen Substanzen erlauben und es ermöglichen, anfällige Personen zu ermitteln. Diese Biomarker können mit dem Comet Assays so untersucht werden, das Blut von Probanden *ex vivo* gegenüber einem Mutagen exponiert wird, um eine DNA-Schädigung herbeizuführen und anschließend geprüft wird, ob sich Probanden im Ausmaß der induzierten Schäden unterscheiden. Häufig verwendete Agenzien zum Nachweis von Mutagensensitivität sind ionisierende Strahlung, Bleomycin aber auch BPDE. Schmezer et al. (2001) zeigten, dass in einer Untersuchung von 100 Patienten mit Lungenkarzinom und 110 Kontrollen eine höhere Sensitivität gegenüber dem Mutagen Bleomycin im Comet Assay bei den Karzinompatienten bestand und das diese auch eine reduzierte DNA-Reparaturkapazität aufwiesen. Bleomycin induziert als Radiomimetikum Einzel- und Doppelstrangbrüchen in der DNA. Des weiteren wurde berichtet, dass sowohl unter den Patienten als auch den Kontrollen bei Rauchern eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem Mutagen Bleomycin im Comet Assay im Vergleich zu Nichtrauchern nachweisbar war. Signifikante Unterschiede in der basalen DNA-Schädigung zwischen Rauchern und Nichtrauchern wurden weder bei Patienten, noch bei Kontrollen gemessen.

In der vorliegenden Arbeit führte eine Behandlung von Vollblut mit 5 µM BPDE zur Zunahme aller gemessenen Comet Assay Parameter (Tail Moment, Tail Length, Tail Intensity und Tail Migration). Es konnte allerdings kein signifikanter Unterschied der Comet Assay Parameter zwischen Rauchern und Nichtrauchern nach Behandlung von Vollblut mit BPDE festgestellt werden. Regelmäßiges Rauchen lässt sich unter strengen Qualitätskriterien bei einem sensitiven Versuchsprotokoll nicht durch BPDE-induzierte DNA-Schäden im Comet Assay nachweisen.
Auffällig ist, das der Auswerter A im zweiten Durchgang der Studie niedrigere Comet Assay Werte für Raucher und Nichtraucher registrierte. Diese Beobachtung wird allerdings nicht durch die Messwerte des 2. Auswerters gestützt. Es könnte sich um einen systematischen Fehler handeln. Denkbar ist eine im Verlauf der Zeit

schwächer werdende Leuchtkraft der Fluoreszenzlampe am Mikroskop bei der Auswertung. Meine negativen Ergebnisse werden durch eine Folgeuntersuchung an starken Rauchern unterstützt, bei der weder im Comet Assay noch im Mikronukleustest eine verstärkte Induktion von DNA- und Chromosomenschäden bei Rauchern nachgewiesen wurde (Hoffmann und Speit, 2005). Die Induzierbarkeit von DNA-Schäden scheint demnach kein brauchbarer Ansatz zu sein, um Effekte des Rauchens an Blutzellen mit dem Comet Assay nachzuweisen.

4.4 Reparaturkapazität für DNA-Schäden bei Rauchern und Nichtrauchern

Die Belastung von Zellen mit genotoxischen Agenzien führt zur Induktion von DNA-Schäden, die wiederum eine gesteigerte Reparaturaktivität auslösen können. Mit dem Comet Assay kann man nicht nur DNA-Schäden nachweisen, es gibt auch verschiedene Möglichkeiten, die Reparaturaktivität von Zellen zu untersuchen (Speit and Hartmann, 1999). Es wurde vorgeschlagen, dass die DNA-Reparaturkapazität ein besserer Indikator für die Mutagensenitivität der Zelle ist, als die Analyse der induzierten DNA-Schäden selbst (Plappert et al., 1997). Mit dem Comet Assay kann man einerseits die Abnahme induzierter DNA-Schäden mit der Zeit als Maß der Reparaturkapazität Zeit messen. Andererseits kann man Inhibitoren der DNA-Reparatur einsetzen. Der Einsatz von Reparaturinhibitoren wurde vorgeschlagen, um die Sensitivität des Comet Assays im Biomonitoring zu steigern (Albertini et al., 2000). Aphidicolin (APC) inhibiert die DNA-Polymerasen α, β und ε. Wird an der Stelle von BPDE-DNA-Addukten durch Reparaturenzyme eine Exzisionsreparatur an der DNA vorgenommen, so kann der herausgeschnittene Bereich nicht wieder durch die Polymerasen aufgefüllt werden und es bleibt ein Einzelstrangbruch in der DNA bestehen. Dieses führt zu einer Akkumulation von Inzisionsstellen bei ablaufender Exzisionsreparatur und einer Zunahme der DNA-Migration im Comet Assay (Speit and Hartmann, 1995). So gewinnt man eine indirekte Aussage darüber, in welchem Umfang die untersuchten Zellen Exzisionsreparatur durchführen.
In meiner Studie konnte kein Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern in Bezug auf die APC Behandlung allein und in Kombination mit BPDE festgestellt

werden. Die Zunahme durch BPDE induzierten Effekte im Comet Assay konnte durch APC sowohl bei Rauchern als auch bei Nichtrauchern signifikant gesteigert werden. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass in Leukozyten von Rauchern und Nichtrauchern DNA-Reparatur stattfindet und zusätzlich Reparaturaktivität durch *ex vivo* Behandlung mit BPDE induziert werden und mit dem Reparaturinhibitor APC nachgewiesen werden kann. Die Verwendung von APC ermöglichte es in dieser Studie jedoch nicht, eine Modifikation des Comet Assays zu etablieren, mit der Unterschiede in den Parametern des Comet Assays zwischen Rauchern und Nichtrauchern detektierbar gemacht werden können. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Rauchen die Reparaturkapazität von Leukozyten nicht so verändert, dass sie mit dem Comet Assay nachgewiesen werden kann.

In einer Studie zum Biomonitoring mit dem Comet Assay bei Arbeitern in der Aluminiumindustrie, die gegenüber polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAH) exponiert waren, wurde als Reparaturinhibitor Cytosin Arabinosid (Ara-C) verwendet. Es zeigten sich dabei insgesamt keine signifikanten Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern im Standard Comet Assay. Jedoch ließ sich nach 16 stündiger Inkubation stimulierter Lymphozten mit Ara-C ein signifikanter Unterschied zwischen Arbeitern und Kontrollen feststellen, mit erhöhter DNA-Schädigung in der Auswertung des Comet Assays bei den Aluminiumarbeitern. Als Grund für diese Differenz werden stabile BPDE Addukte der DNA angeführt, deren Reparatur längere Zeit benötigt und die erst durch den Einsatz des DNA-Reparatur Inhibitors Ara-C nachweisbar werden (Crebelli et al., 2002). Unklar bleibt, warum es nach Stimulation und Behandlung mit Ara-C dann nicht auch zu signifikanten Unterschieden in der DNA-Schädigung im Comet Assay zwischen Rauchern und Nichtrauchern kommt, da auch Rauchen eine deutliche und chronische Belastung mit PAHs darstellt. Möglicherweise ist die Exposition gegenüber PAHs für den beobachteten Unterschied gar nicht verantwortlich. In Übereinstimmung mit meinen Ergebnissen ließen sich Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern mit diesem Ansatz nicht nachweisen.

Interessanterweise wurde in einer anderen Studie ein Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern gefunden (Mohankumar et al., 2002). Die Autoren untersuchten 16 Raucher und 10 Nichtraucher vergleichend auf DNA-Schäden bei Lymphozyten im Comet Assay. Betrachtet wurden die basalen Tail-Length Werte sowie die Werte 10 min und 30 min nach Exposition gegenüber UV Strahlung. Nach

jeder Inkubationszeit wurde für 5 min mit 15 µM APC behandelt. Es zeigten sich höhere basale Werte der DNA-Schädigung bei Rauchern, sowie eine deutlich herabgesetzte DNA-Reparatur bei den Lymphozyten von Rauchern nach einem Reparaturintervall von 10 min. Als Grund wird eine Blockade der Inzisionsstellen durch Addukte angeführt, welche sich aus den Bestandteilen des Zigarettenrauchs bilden. Im Gegensatz zum Protokoll meiner Studie handelt es sich um einen sehr kurzen und frühen Reparaturzeitraum. Darüber hinaus wurden isolierte Lymphozyten verwendet, während in meiner Arbeit Vollblut untersucht wurde. Nicht diskutiert wird die erstaunliche Beobachtung, dass 30 min nach UV Bestrahlung die Tail Length Werte der Raucher trotz APC Zusatz unter den basalen Werten der Raucher liegen. Dieser Befund widerspricht allen bisherigen Erfahrungen aus Untersuchungen mit dem Comet Assay in Kombination mit Inhibitoren der DNA-Reparatur. Möglicherweise handelt es sich bei den beobachteten Unterschieden um zufällige Testvariabilität.

In meiner Arbeit wurde noch ein zweiter Ansatz zur Reparatur von DNA-Schäden verfolgt. Dazu wurde die Reparatur BPDE-induzierter Schäden über einen definierten Zeitraum beobachtet. In den Vorexperimenten zur Studie wurde eine Reparatur über 4 Stunden ausgewertet und daraus folgend für die Studie an Rauchern und Nichtrauchern die Beobachtungszeitpunkte 30 min und 60 min gewählt. Entgegen der Erfahrung aus den Vorexperimenten konnte in der Studie keine eindeutige Reparatur im Sinne einer Abnahme der Comet Assay Parameter über den Zeitraum von einer Stunde nachgewiesen werden. Die Effekte erwiesen sich in den Wiederholungsexperimenten als äußerst variable und schlecht reproduzierbar. Zwischen Rauchern und Nichtraucher konnte kein eindeutiger Unterschied festgestellt werden. Jedoch ist diese Aussage aufgrund des begrenzten Umfangs der Daten und der Variabilität der Effekte nur von begrenztem Wert. Der Grund für die Unterschiede zwischen dem ersten und dem zweiten Durchgang der Studie bleibt unklar. Eventuell war der Beobachtungszeitraum von einer Stunde noch zu kurz. Für künftige Studien bietet sich deshalb an, auch noch spätere Zeitpunkte zu berücksichtigen.

Es bleibt zu prüfen, ob der Ansatz über den indirekten Nachweis der Exzisionsreparatur mittels Reparaturinhibitoren oder der direkte Nachweis der Reparatur von Strangbrüchen der verlässlichere Weg ist, um mit dem Comet Assay

die individuelle Reparaturkapazität zu bestimmen. Weitere Studien müssen zeigen, ob mit solchen Ansätzen genotoxische Effekte des Rauchens im peripheren Blut nachgewiesen werden können.
Eine zusätzliche Einschränkung des Comet Assays ist die Tatsache, dass zwar eine Aussage über die Schnelligkeit der Beseitigung von Strangbrüchen getroffen werden kann, es aber nicht klar ist, ob dabei Fehler begangen werden. Denkbar ist, dass es im Rahmen der Reparatur zur Bildung von Deletionen und strukturellen Chromosomenaberrationen kommt. Die Reparaturgenauigkeit läßt sich mit anderen genetischen Endpunkten (z. B. Mikronuklei) besser erfassen, weshalb solche Endpunkte auch besser zum Nachweis von Mutagensensitivität z. B. bei Tumorpatienten geeignet sind als der Comet Assay (Rothfuss et al., 2000; Trenz et al., 2002).

4.5 Zur Bedeutung genetischer Polymorphismen für die Effekte im Comet Assay

Die Probanden dieser Studie wurden in Hinblick auf Polymorphismen des *CYP1A1* Gens und *GSTM1*-Gens genotypisiert, da diese am Metabolismus von Genotoxinen beteiligt sind, die sich im Zigarettenrauch finden. Keine der in dieser Arbeit durchgeführten Ansätze ermöglichte es, einen signifikanten Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern festzustellen.
Ein kritischer Aspekt beim Biomonitoring ist die genetische Vielfalt von Menschen. Genetische Unterschiede in der Fähigkeit Xenobiotica zu aktivieren oder inaktivieren, sowie Unterschiede in der Kapazität, umweltbedingte DNA Schäden zu beseitigen könnten die Ergebnisse von Genotoxizitätstests im Biomonitoring beeinflussen (Pavanello and Clonfero, 2000; Wiencke, 2002). Polymorphismen solcher Gene könnten für die inter-individuelle Ausprägung von biologischen Effekten verantwortlich sein, die im Zusammenhang mit Rauchen stehen (Wiencke, 2002; DeMarini, 2004). Diese Heterogenität der Probanden könnte einen nachweisbaren Effekt im Comet Assay überlagern. Es ist daher denkbar, dass eine Differenzierung der Probanden nach ihren Polymorphismen den Nachweis eines Effekts im Comet Assay ermöglicht.

PAHs werden im Stoffwechsel durch die Phase I und Phase II Enzyme metabolisiert und wieder aus dem Körper ausgeschieden. Dabei kommt es im Falle des B[a]P und dem Phase I Enzym Aromatische Hydrocarbon Hydroxylase, kodiert durch *CYP1A1,* zu einer Toxifikation, nämlich der Umwandlung in das Epoxid BPDE. Dieses wird anschließend durch das Phase II Enzym GSTM1 mit Glutathion gekoppelt und aus dem Körper ausgeschieden. In der Literatur wurde vielfach über den Einfluß von Polymorphismen dieser Enzyme berichtet. Das Fehlen des *GSTM1*-Enzyms könnte in einer mangelnden Detoxifikation von Kanzerogenen des Zigarettenrauchs resultieren und zu einem leichten Anstieg des Risikos für ein Lungenkarzinom führen (Spitz et al., 1999).

Bei der Untersuchung des *CYP1A1* Polymorphismus Ile462Val im Exon 7 lag bei 36 Probanden Isoleucin homozygot vor. 4 Probanden waren heterozygot für den Austausch von Isoleucin nach Valin. Das entspricht einer Frequenz von 0,1. Bei keinem der Probanden konnte Valin homozygot nachgewiesen werden.

Die Frequenz der unterschiedlichen Allele wurde in einer früheren Arbeit mit 0,58 für (Ile/Ile), 0,34 für (Ile/Val) und 0,08 für (Val/Val) bestimmt (Hayashi et al., 1991). In einer neueren Arbeit mit Daten die aus 14 Studien zusammengefasst wurden, wurde die Frequenz der *CYP1A1* Ile462Val Varianten (Ile/Val und Val/Val) zwischen 0,04 und 0,18 angegeben (Hung et al., 2003). Aufgrund der geringen Fallzahl für die Anwesenheit des Allels für Valin, wurde die Rolle des *CYP1A1* Status in dieser Studie nicht weiter untersucht. Hierzu ist eine Erweiterung der Anzahl der Probanden nötig.

In mehreren Publikationen über Biomonitoring-Studien mit dem Comet Assay wurden die Probanden (Raucher oder am Arbeitsplatz gegenüber PAH exponiert) für den *CYP1A1* Polymorphismus genotoypisiert (Vodicka et al., 2004; Peluso et al., 2004; Carere et al., 2002; Marczynski et al., 2002). Es wurde in keiner dieser Arbeiten eine Assoziation zwischen dem Genotyp und dem Effekt im Comet Assay gefunden. In einer Gruppe von 45 Pestizidsprühern wurden erhöhte Werte im Comet Assay gemessen, es fand sich aber keine Assoziation zwischen den Comet Assay Effekten und dem *CYP1A1* Polymorphismus (Mino et al., 2004). Insgesamt findet sich in der Literatur bisher kein Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang zwischen DNA-Schäden in PHA exponierten Personen und dem *CYP1A1* Genotyp.

Von den 40 von mir untersuchten Probanden konnten 21 mit dem *GSTM1*-Null-Genotyp identifiziert werden, davon waren 13 Raucher. Dies enspricht der bekannten Verteilung dieser Deletion, die für Kaukasier mit 50% angegeben wird (Seidegard et al., 1988; Zhong et al., 1991).

Es wurde eine Darstellungen der Tail Moment Werte mit Unterteilung nach dem *GSTM1*-Genotyp bei den basalen DNA-Effekten in Vollblut durchgeführt. Für beide Gruppen zeigte sich eine vergleichbare Streuung der Werte und kein signifikanter Unterschied der Mittelwerte. Die parallel durchgeführte Auswertung von zusätzlich hergestellten Präparaten durch einen zweiten Auswerter an einem anderen Bildanalysegerät erbrachte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

Ähnliches ergab sich für die Unterteilung nach dem *GSTM1*-Genotyp bei den BPDE-induzierten DNA-Effekten. Allerdings war in beiden Durchgängen der Mittelwert der *GSTM1*-Null-Genotypen bei beiden Auswertern gegenüber den *GSTM1*-Trägern leicht erhöht. Dies könnte für eine protektive Wirkung von *GSTM1* sprechen.

Zusätzlich zur Aufteilung der DNA-Effekte nach *GSTM1*-Tägerstatus wurde auch nach Raucher-Status aufgetrennt. Dabei kam es weder bei den basalen, noch bei den BPDE-induzierten sowie bei APC-Behandlung zu signifikanten Unterschieden des Tail Moments.

Bei den in dieser Studie durchgeführten Experimenten an Rauchern und Nichtrauchern ließ sich trotz hoher Qualitätsstandards keine Assoziation zwischen den Comet Assay Effekten und dem *GSTM1*-Genotyp nachweisen.

In der Literatur werden wiedersprüchliche Ergebnisse über den Beitrag des *GSTM1*-Genotyps zu den genotoxischen Effekten im Comet Assay berichtet.

Eine Studie (van Delft et al., 2001) fand keine Induktion von DNA-Addukten oder DNA-Effekten im Comet Assay bei Hochofen-Arbeitern, die beruflich PAHs ausgesetzt waren und auch keinen signifikanten Einfluß des *GSTM1*-Genotyps. Die Auswertung von DNA-Schäden im Comet Assay bei Arbeitern, die organischen Lösungsmitteln ausgesetzt waren, zeigte keine gesteigerten DNA-Schäden und auch keinen Einfluß des *GSTM1*-Genotyps auf die DNA-Effekte bei Nichtrauchern und Rauchern (Pitarque et al., 1999). Kein Zusammenhang zwischen der Menge an gemessenen DNA-Schäden im Comet Assay bei PAH-Exponierten Probanden und deren *GSTM1*-Status fand sich in weiteren Studien an Verkehrspolizisten (Carere et al., 2002), einer Studie an Hochofenarbeitern (Marczynski et al., 2002), sowie in einer Studie mit Arbeitern einer Reifenfabrik (Vodicka et al., 2004).

Marcon et al. (2003) führten einen Mutagen-Sensitivitätstest an 31 gesunden Probanden durch und untersuchten die Blutzellen auf DNA-Reparaturkapazität nach Bestrahlung mit 2 Gy. Dabei wurde nach Raucher- und *GSTM1*-Status unterschieden und die Reparatur nach 15 min und 30 min registriert. Es fanden sich signifikant mehr strahlungsinduzierte Aberrationen bei Nichtrauchern im Vergleich zu schweren Rauchern und bei *GSTM1*-Plus-Probanden im Vergleich zu *GSTM1*-Null-Probanden. Es wurde vermutet, dass dafür ein modulierender Effekt des Rauchens und des *GSTM1*-Gens verantwortlich sei, verbunden mit einer stärkeren Expression von Reparaturenzymen bei Rauchern und *GSTM1*-Null-Probanden.

Es wurde darüber berichtet, dass die Kombination der *GSTM1*- und *CYP1A1*-Genotypen einen Einfluß auf die Menge der BPDE-DNA-Addukte hat (Alexandrov et al., 2002). In der *GSTM1*-Null-Gruppe wurde bei einem bestimmten *CYP1A1*-Polymorphismus eine erhöhte Adduktmenge gefunden.

Insgesamt konnte bisher nicht überzeugend gezeigt werden, dass ein einzelner genetischer Polymorphismus mit den DNA-Effekten im Comet Assay bei Rauchern oder PAH-Exponierten assoziiert ist. Bedenkt man einerseits die Komplexität der Stoffwechselwege und die Vielzahl der Gene, die an der Metabolisierung von PAH beteiligt sind und andererseits die Häufigkeit genetischer Polymorphismen in allen Genen, so ist ein solcher Zusammenhang auch eher unwahrscheinlich. Zukünftige Studien müssen zeigen, ob die Analyse einer Kombination mehrerer Polymorphismen geeignet ist, funktionelle Unterschiede aufzudecken. Neben Genen des Fremdstoffmetabolismus sollten dabei auch Gene der DNA-Reparatur berücksichtigt werden (Vineis, 2004).

5 Zusammenfassung

Der Comet Assay (Einzelzellgelelektrophorese) ist eine etablierter Test in der Genotoxizitätsprüfung und wird auch zunehmend im Biomonitoring eingesetzt. Untersuchungen mit dem Comet Assay im Biomonitoring haben zu widersprüchlichen Ergebnissen geführt und systematische Untersuchungen zur Eignung des Comet Assays für solche Untersuchungen wurden bisher kaum durchgeführt.

In dieser Arbeit wurden 20 männliche Raucher und 20 männliche Nichtraucher vergleichend mit dem Comet Assay untersucht. Rauchen stellt eine relevante Exposition gegenüber genotoxischen Substanzen dar und induzierte DNA-Schäden sollten zu Effekten im Comet Assay führen. Für die Teilnahme an der Studie wurden strenge Einschluss- bzw. Ausschlusskriterien festgelegt und es wurden umfangreiche Maßnahmen zur Qualitätssicherung berücksichtigt. Die Versuche wurden durch zwei Auswerter unabhängig voneinander an zwei Bildanalysesystemen ausgewertet. Bei allen Versuchen wurde ein Referenzstandard (ein Präparat mit V79 Zellen) mitgeführt, um die Testvariabilität zu bestimmen. Die gesamte Studie wurde innerhalb von sechs Monaten wiederholt. Es wurden einerseits die DNA-Schäden im peripheren Blut vergleichend untersucht. Ausserdem wurde geprüft, ob es Unterschiede in der Induzierbarkeit von DNA-Schäden durch Benzoapyrendiolepoxid (BPDE) gibt und ob sich Raucher von Nichtrauchern in der Reparaturaktivität der Leukozyten oder in der Reparaturkapazität für induzierte DNA-Schäden unterscheiden. Schließlich wurde der Frage nachgegangen, ob genetische Polymorphismen in den Genen der *Glutathion-S-Transferase M1 (GSTM1)* und des *Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1)* die DNA-Effekte im Comet Assay beeinflussen. In keinem dieser Ansätze wurde ein signifikanter Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern gemessen. Die Ergebnisse zeigen, dass der Comet Assay nicht geeignet ist, genotoxische Effekte des Rauchens im peripheren Blut sicher zu erfassen. Der Einsatz des Comet Assays im Biomonitoring kann deshalb nicht uneingeschränkt empfohlen werden.

6 Literatur

Albertini,R.J., Anderson,D., Douglas,G.R., Hagmar,L., Hemminki,K., Merlo,F., Natarajan,A.T., Norppa,H., Shuker,D.E., Tice,R.R., Waters,M.D., and Aitio,A. (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. Mutat. Res. *463*, 111-172.

Albrecht,C., Adolf,B., Weishaupt,C., Hohr,D., Zeittrager,I., Friemann,J., and Borm,P.J. (2001). Clara-cell hyperplasia after quartz and coal-dust instillation in rat lung. Inhal. Toxicol. *13*, 191-205.

Albrecht,T., Deng,C.Z., Abdel-Rahman,S.Z., Fons,M., Cinciripini,P., and El Zein,R.A. (2004). Differential mutagen sensitivity of peripheral blood lymphocytes from smokers and nonsmokers: effect of human cytomegalovirus infection. Environ. Mol. Mutagen. *43*, 169-178.

Alexandrov,K., Cascorbi,I., Rojas,M., Bouvier,G., Kriek,E., and Bartsch,H. (2002). CYP1A1 and GSTM1 genotypes affect benzo[a]pyrene DNA adducts in smokers' lung: comparison with aromatic/hydrophobic adduct formation. Carcinogenesis *23*, 1969-1977.

Au,W.W. (2003). Mutagen sensitivity assays in population studies. Mutat. Res. *544*, 273-277.

Au,W.W., Walker,D.M., Ward,J.B., Jr., Whorton,E., Legator,M.S., and Singh,V. (1991). Factors contributing to chromosome damage in lymphocytes of cigarette smokers. Mutat. Res. *260*, 137-144.

Berwick,M. and Vineis,P. (2000). Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: an epidemiologic review. J. Natl. Cancer Inst. *92*, 874-897.

Boyd,M.R. (1984). Metabolic activation and lung toxicity: a basis for cell-selective pulmonary damage by foreign chemicals. Environ. Health Perspect. *55*, 47-51.

Carere,A., Andreoli,C., Galati,R., Leopardi,P., Marcon,F., Rosati,M.V., Rossi,S., Tomei,F., Verdina,A., Zijno,A., and Crebelli,R. (2002). 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.

Cascorbi,I., Brockmoller,J., and Roots,I. (1996). A C4887A polymorphism in exon 7 of human CYP1A1: population frequency, mutation linkages, and impact on lung cancer susceptibility. Cancer Res. *56*, 4965-4969.

Celotti,L., Ferraro,P., Furlan,D., Zanesi,N., and Pavanello,S. (1993). DNA repair in human lymphocytes treated in vitro with (+)-anti- and (+/-)-syn-benzo[a]pyrene diolepoxide. Mutat. Res. *294*, 117-126.

Cohen,A.J. and Pope,C.A., III (1995). Lung cancer and air pollution. Environ. Health Perspect. *103 Suppl 8*, 219-224.

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

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

Crofts,F., Taioli,E., Trachman,J., Cosma,G.N., Currie,D., Toniolo,P., and Garte,S.J. (1994). Functional significance of different human CYP1A1 genotypes. Carcinogenesis *15*, 2961-2963.

D'Errico,A., Malats,N., Vineis,P., and Boffetta,P. (1999). Review of studies of selected metabolic polymorphisms and cancer. IARC Sci. Publ. 323-393.

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

DeMarini,D.M. (1983). Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate. Mutat. Res. *114*, 59-89.

DeMarini,D.M. (2004). Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. Mutat. Res. *567*, 447-474.

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

Dusinska,M., Ficek,A., Horska,A., Raslova,K., Petrovska,H., Vallova,B., Drlickova,M., Wood,S.G., Stupakova,A., Gasparovic,J., Bobek,P., Nagyova,A., Kovacikova,Z., Blazicek,P., Liegebel,U., and Collins,A.R. (2001). Glutathione S-transferase polymorphisms influence the level of oxidative DNA damage and antioxidant protection in humans. Mutat. Res. *482*, 47-55.

Eastman,A. and Barry,M.A. (1992). The origins of DNA breaks: a consequence of DNA damage, DNA repair, or apoptosis? Cancer Invest *10*, 229-240.

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

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

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

Hattemer-Frey,H.A. and Travis,C.C. (1991). Benzo-a-pyrene: environmental partitioning and human exposure. Toxicol. Ind. Health *7*, 141-157.

Hayashi,S., Watanabe,J., Nakachi,K., and Kawajiri,K. (1991). 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. (Tokyo) *110*, 407-411.

Hayes,J.D. and Pulford,D.J. (1995). The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. Crit Rev. Biochem. Mol. Biol. *30*, 445-600.

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

Hengstler,J.G., Arand,M., Herrero,M.E., and Oesch,F. (1998). Polymorphisms of N-acetyltransferases, glutathione S-transferases, microsomal epoxide hydrolase and sulfotransferases: influence on cancer susceptibility. Recent Results Cancer Res. *154*, 47-85.

Hengstler,J.G., Kett,A., Arand,M., Oesch-Bartlomowicz,B., Oesch,F., Pilch,H., and Tanner,B. (1998). Glutathione S-transferase T1 and M1 gene defects in ovarian carcinoma. Cancer Lett. *130*, 43-48.

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

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

Hu,J.J., Smith,T.R., Miller,M.S., Mohrenweiser,H.W., Golden,A., and Case,L.D. (2001). Amino acid substitution variants of APE1 and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity. Carcinogenesis *22*, 917-922.

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

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

IARC (2004). Tobacco smoke and involuntary smoking. IARC Monogr Eval. Carcinog. Risks Hum. *83*, 1-1438.

International Agency for Research on Cancer (IARC) (1973). Certain polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic compounds., pp. 91-136.

International Agency for Research on Cancer (IARC) (1983). Polynuclear aromatic compounds. Part 1. Chemical, environmental and experimental data., pp. 211-224.

International Agency for Research on Cancer (IARC),L. (1987). Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monograps vols. 1-42.

Jernström,B. and Seidel,A. (1996). Glutathione S-transferase A1-1-catalysed conjugation of bay and fjord region diol epoxides of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons with glutathione. Carcinogenesis *17*, 1491-1498.

Kassie,F., Parzefall,W., and Knasmuller,S. (2000). Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. Mutat. Res. *463*, 13-31.

Kawajiri,K., Nakachi,K., Imai,K., Hayashi,S., and Watanabe,J. (1990). Individual differences in lung cancer susceptibility in relation to polymorphisms of P-450IA1 gene and cigarette dose. Princess Takamatsu Symp. *21*, 55-61.

Ketterer,B. and Coles,B. (1991). Glutathione transferases and products of reactive oxygen. In Sies, H. (Ed.): Oxidative stress. Oxidants and antioxidants., Academic Press, London.), pp. 171-193.

Kim,K.B. and Lee,B.M. (1997). Oxidative stress to DNA, protein, and antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) in rats treated with benzo(a)pyrene. Cancer Lett. *113*, 205-212.

Krokan,H.E., Nilsen,H., Skorpen,F., Otterlei,M., and Slupphaug,G. (2000). Base excision repair of DNA in mammalian cells. FEBS Lett. *476*, 73-77.

Lai,C. and Shields,P.G. (1999). The role of interindividual variation in human carcinogenesis. J. Nutr. *129*, 552S-555S.

Li,D., Wang,M., Cheng,L., Spitz,M.R., Hittelman,W.N., and Wei,Q. (1996). In vitro induction of benzo(a)pyrene diol epoxide-DNA adducts in peripheral lymphocytes as a susceptibility marker for human lung cancer. Cancer Res. *56*, 3638-3641.

Maluf,S.W., Passos,D.F., Bacelar,A., Speit,G., and Erdtmann,B. (2001). 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.

Marcon,F., Andreoli,C., Rossi,S., Verdina,A., Galati,R., and Crebelli,R. (2003). Assessment of individual sensitivity to ionizing radiation and DNA repair efficiency in a healthy population. Mutat. Res. *541*, 1-8.

Marczynski,B., Rihs,H.P., Rossbach,B., Holzer,J., Angerer,J., Scherenberg,M., Hoffmann,G., Bruning,T., and Wilhelm,M. (2002). 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.

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

Mino,C., Arevalo,M., Sanchez,M.E., and Leone,P.E. (2004). 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.

Mitra,S., Boldogh,I., Izumi,T., and Hazra,T.K. (2001). Complexities of the DNA base excision repair pathway for repair of oxidative DNA damage. Environ. Mol. Mutagen. *38*, 180-190.

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

Moller,P., Knudsen,L.E., Loft,S., and Wallin,H. (2000). 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.

Murken,J., Cleve, H.(Eds.): Humangenetik. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, 1996

Nesnow,S., Ross,J., Nelson,G., Holden,K., Erexson,G., Kligerman,A., and Gupta,R.C. (1993). Quantitative and temporal relationships between DNA adduct formation in target and surrogate tissues: implications for biomonitoring. Environ. Health Perspect. *101 Suppl 3*, 37-42.

Pavanello,S. and Clonfero,E. (2000). Biological indicators of genotoxic risk and metabolic polymorphisms. Mutat. Res. *463*, 285-308.

Pavanello,S., Pulliero,A., Siwinska,E., Mielzynska,D., and Clonfero,E. (2005). 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.

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., and Bonassi,S. (2004). 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.

Peto,R., Lopez,A.D., Boreham,J., Thun,M., Heath,C., Jr., and Doll,R. (1996). Mortality from smoking worldwide. Br. Med. Bull. *52*, 12-21.

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

Plappert,U.G., Stocker,B., Fender,H., and Fliedner,T.M. (1997). 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.

Pryor,W.A. (1997). Cigarette smoke radicals and the role of free radicals in chemical carcinogenicity. Environ. Health Perspect. *105 Suppl 4*, 875-882.

Robertson,I.G.C. and Jernström,B. (1986). The enzymatic conjugation of glutathione with bay-region diol-epoxides of benzo[a]pyrene, benz[a]anthracene and chrysene. Carcinogenesis *7*, 1633-1636.

Rojas,M., Cascorbi,I., Alexandrov,K., Kriek,E., Auburtin,G., Mayer,L., Kopp-Schneider,A., Roots,I., and Bartsch,H. (2000). Modulation of benzo[a]pyrene diolepoxide-DNA adduct levels in human white blood cells by CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphism. Carcinogenesis *21*, 35-41.

Rothfuss,A., Schutz,P., Bochum,S., Volm,T., Eberhardt,E., Kreienberg,R., Vogel,W., and Speit,G. (2000). Induced micronucleus frequencies in peripheral lymphocytes as a screening test for carriers of a BRCA1 mutation in breast cancer families. Cancer Res. *60*, 390-394.

Schempp,W., Vogel,W. (1979): Difference between diploid and aneuploid Chinese hamster cells in replication at mid-S-phase. Chromosoma, 73:109-115.

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

Seidegard,J. and Ekstrom,G. (1997). The role of human glutathione transferases and epoxide hydrolases in the metabolism of xenobiotics. Environ. Health Perspect. *105 Suppl 4*, 791-799.

Seidegard,J., Vorachek,W.R., Pero,R.W., and Pearson,W.R. (1988). Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A *85*, 7293-7297.

Sims,P., Grover,P.L., Swaisland,A., Pal,K., and Hewer,A. (1974). Metabolic activation of benzo(a)pyrene proceeds by a diol-epoxide. Nature *252*, 326-328.

Smith,G., Smith,C., and Wolf,R. (1995). Pharmacogenetic polymorphisms. In Environmental Mutagenesis, BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford), pp. 83-106.

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

Speit,G. and Hartmann,A. (1999). 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.

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

Spitz,M.R., Wei,Q., Li,G., and Wu,X. (1999). Genetic susceptibility to tobacco carcinogenesis. Cancer Invest *17*, 645-659.

Spurny,K.R. (1996). Chemical mixtures in atmospheric aerosols and their correlation to lung diseases and lung cancer occurence in the general population. Toxicol. Lett. *88*, 271-277.

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

Stabbert,R., Voncken,P., Rustemeier,K., Haussmann,H.J., Roemer,E., Schaffernicht,H., and Patskan,G. (2003). Toxicological evaluation of an electrically heated cigarette. Part 2: Chemical composition of mainstream smoke. J. Appl. Toxicol. *23*, 329-339.

Steinhoff,D., Mohr,U., and Hahnemann,S. (1991). Carcinogenesis studies with iron oxides. Exp. Pathol. *43*, 189-194.

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

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

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

Trenz,K., Rothfuss,A., Schutz,P., and Speit,G. (2002). Mutagen sensitivity of peripheral blood from women carrying a BRCA1 or BRCA2 mutation. Mutat. Res. *500*, 89-96.

van Delft,J.H., Steenwinkel,M.S., van Asten,J.G., de Vogel,N., Bruijntjes-Rozier,T.C., Schouten,T., Cramers,P., Maas,L., Van Herwijnen,M.H., van Schooten,F., and Hopmans,P.M. (2001). 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.

Vineis,P. (2004). Individual susceptibility to carcinogens. Oncogene *23*, 6477-6483.

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., and Hemminki,K. (2004). Markers of individual susceptibility and DNA repair rate in workers exposed to xenobiotics in a tire plant. Environ. Mol. Mutagen. *44*, 283-292.

Waters,M.D., Stack,H.F., Garrett,N.E., and Jackson,M.A. (1991). The Genetic Activity Profile database. Environ. Health Perspect. *96*, 41-45.

Whitlock,J.P., Jr. (1999). Induction of cytochrome P4501A1. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. *39*, 103-125.

Wiencke,J.K. (2002). DNA adduct burden and tobacco carcinogenesis. Oncogene *21*, 7376-7391.

World Health Organization,R.O.f.E.E.S.No.2.C. (1987). World Health Organization (WHO): Polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH). In Air quality Guidelines for Europe, WHO Regional Publications, ed., pp. 105-117.

Zhong,S., Howie,A.F., Ketterer,B., Taylor,J., Hayes,J.D., Beckett,G.J., Wathen,C.G., Wolf,C.R., and Spurr,N.K. (1991). Glutathione S-transferase mu locus: use of genotyping and phenotyping assays to assess association with lung cancer susceptibility. Carcinogenesis *12*, 1533-1537.

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

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: DNA-Migration nach Durchführung des Comet Assays. 4
Abbildung 2: Schematischer Ablauf des Comet Assays. 4
Abbildung 3: Einfluss der Alkalibehandlungszeit auf die DNA-Migration 31
Abbildung 4: Einfluss der Elektrophoresedauer auf die DNA-Migration..... 32
Abbildung 5: Effekt der Behandlung von Vollblut mit BPDE auf die DNA-Migration 33
Abbildung 6: Effekt der Behandlung von Vollblut mit BPDE und APC auf die DNA-Migration 34
Abbildung 7: Reparatur BPDE-induzierter DNA-Schäden über einen Zeitraum von 4 Stunden 35
Abbildung 8: Induktion von DNA-Effekten durch BPDE und der Einfluss von APC ohne bzw. mit PHA Stimulation..... 36
Abbildung 9: Effekte der basalen DNA-Schäden (Tail Moment) im Comet Assay 38
Abbildung 10: Effekte der BPDE-induzierten DNA-Schäden im Comet Assay von Rauchern und Nichtrauchern 39
Abbildung 11: Behandlung von Vollblut von Rauchern und Nichtrauchern mit BPDE und APC..... 41
Abbildung 12: Reparatur der BPDE-induzierten DNA-Effekte in Vollblut von Rauchern und Nichtrauchern 42
Abbildung 13: Tail Moments der Referenzstandards für jeden Comet Assay..... 44
Abbildung 14: Korrigierte Effekte der basalen DNA-Schäden im Comet Assay.... 45
Abbildung 15: Korrigierte Effekte der BPDE-induzierten DNA-Schäden im Comet Assay 46
Abbildung 16: Korrigierte Darstellung der Reparatur von BPDE-induzierten DNA-Effekte in Vollblut von Rauchern und Nichtrauchern..... 47
Abbildung 17: Einfluß der Frequenz des Rauchens auf das Tail Moment im Comet Assay 48
Abbildung 18: *GSTM1*-Genotypisierung 52
Abbildung 19: *CYP1A1*-Genotypisierung..... 53

Abbildung 20: Einfluß des *GSTM1*-Genotyps auf die Effekte der basalen DNA-Schäden 54
Abbildung 21: Einfluß des *GSTM1*-Genotyps auf die Effekte der BPDE-induzierten DNA-Schäden 55
Abbildung 22: Einfluß des *GSTM1*-Genotyps und des Raucherstatus auf die Effekte der basalen DNA-Schäden 56
Abbildung 23: Einfluß des *GSTM1*-Genotyps und des Raucherstatus auf die Effekte der BPDE-induzierten DNA-Schäden 57
Abbildung 24: Behandlung von Vollblut von Rauchern und Nichtrauchern mit BPDE und APC 58
Abbildung 25: Effekte der basalen DNA-Schäden. Boxplots der gemessenen Parameter Tail Intensity, Tail Length und Tail Migration. 90
Abbildung 26: Effekte der BPDE-induzierten DNA-Schäden. Box Plots der gemessenen Parameter Tail Intensity, Tail Length und Tail Migration. 92
Abbildung 27: Behandlung von Vollblut von Rauchern und Nichtrauchern mit BPDE und APC. Box Plots der gemessenen Parameter Tail Intensity, Tail Length und Tail Migration 94
Abbildung 28: Reparatur der BPDE-induzierten DNA-Effekte in Vollblut von Rauchern und Nichtrauchern. Prozentuale Veränderung der Parameter Tail Intensity, Tail Length und Tail Migration im Vergleich zum Startzeitpunkt. 96
Abbildung 29: Tail Moments der Referenzstandards der Parameter Tail Intensity, Tail Length und Tail Migration 98
Abbildung 30: Einfluß der Frequenz des Rauchens auf verschiedene Parameter im Comet Assay nach Behandlung mit BPDE und APC 100

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zigarettenkonsum und Alter der Probanden 16
Tabelle 2: Primer und Größe des amplifizierten Produkts 22
Tabelle 3: Korrelationsanalyse von einigen Parametern der Studie 50
Tabelle 4: Genotypisierung der Probanden 51

7.3 Ergebnisdarstellung weiterer Comet Assay Parameter

A

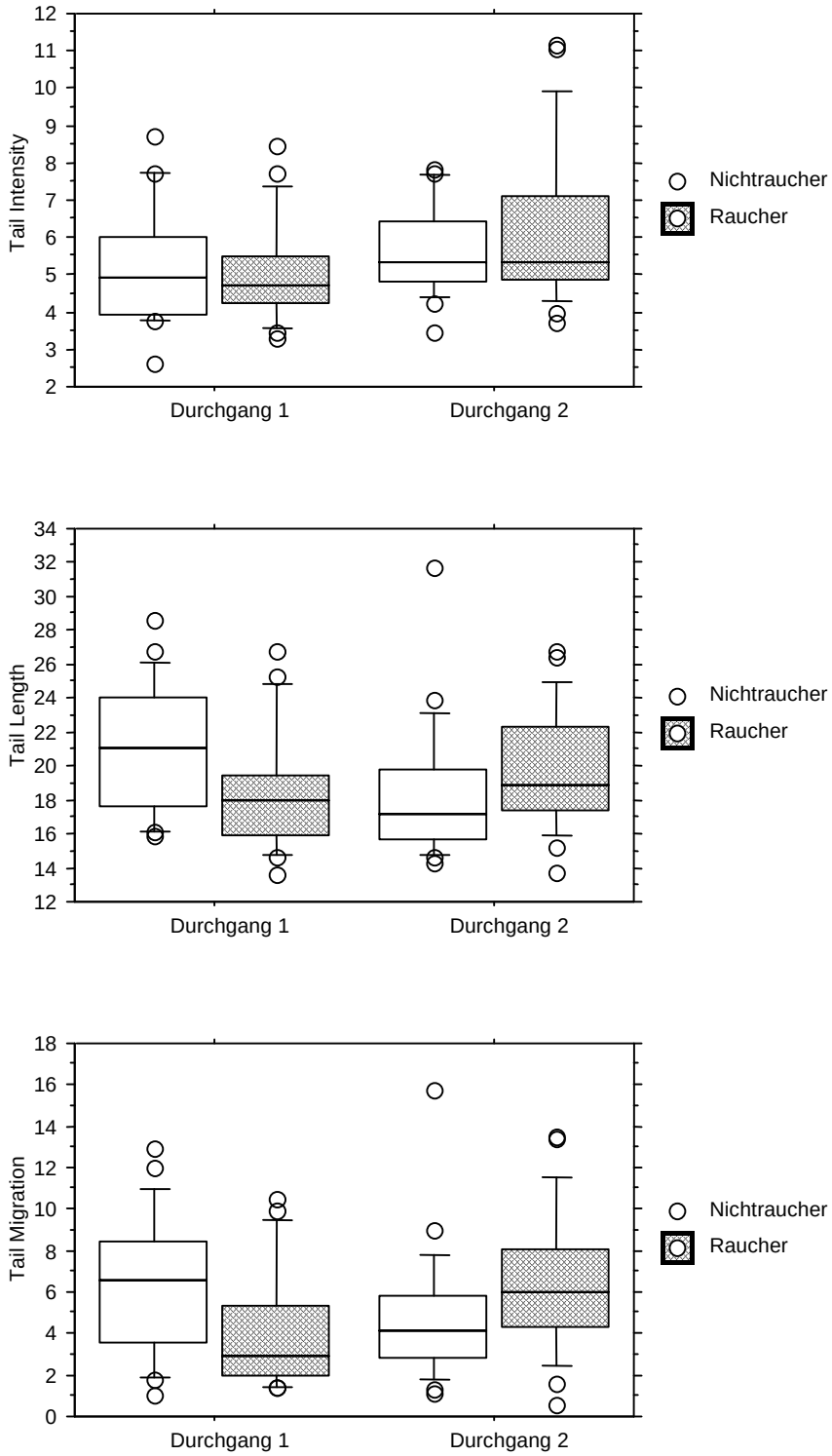


Abbildung 25A: Effekte der basalen DNA-Schäden im Comet Assay gemessen durch Auswerter A. Es wurde unbehandeltes Vollblut von Rauchern und Nichtrauchern verwendet. Dargestellt sind Boxplots der gemessenen Parameter Tail Intensity, Tail Length und Tail Migration.

B

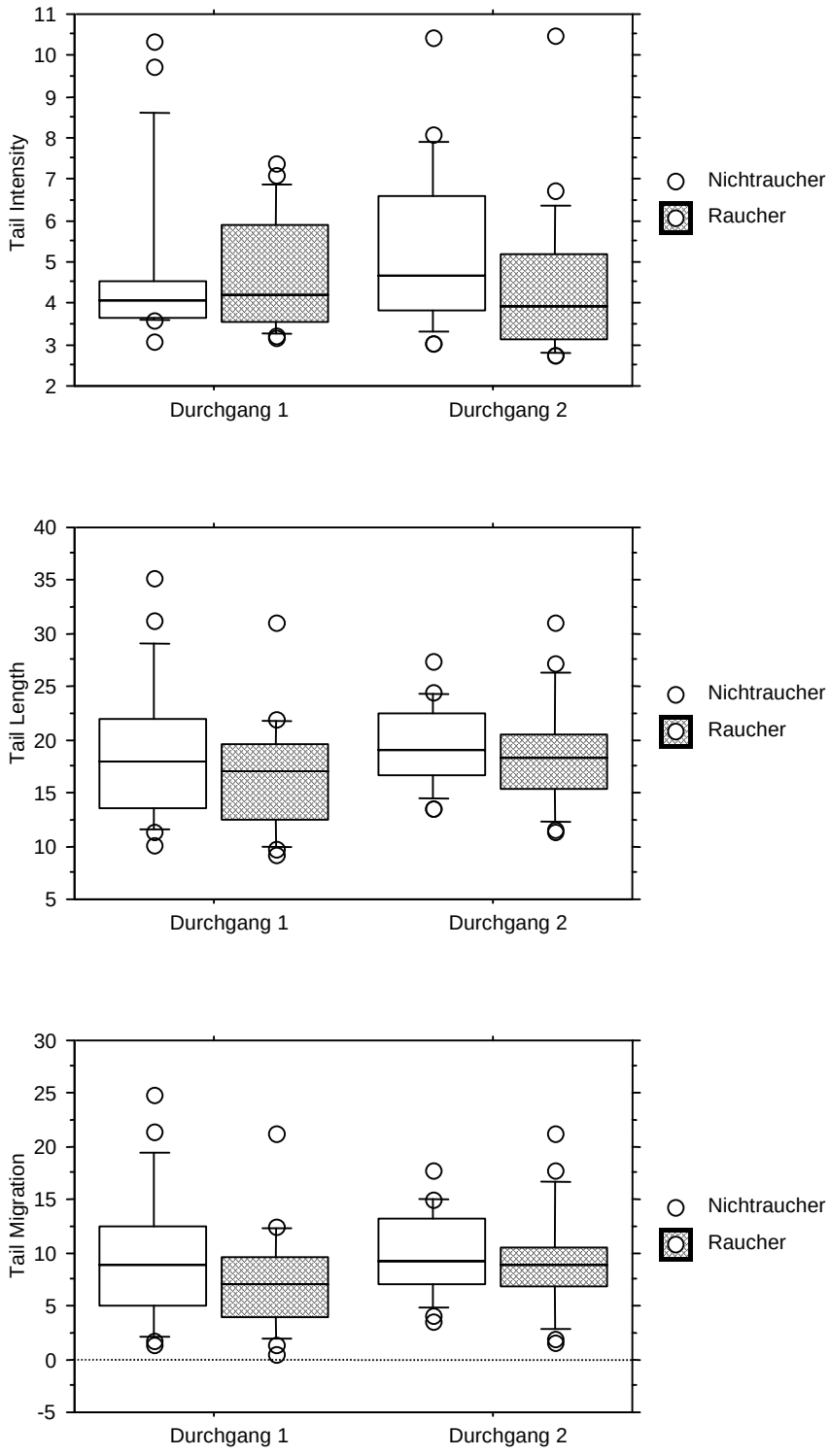


Abbildung 25B: Effekte der basalen DNA-Schäden im Comet Assay gemessen durch Auswerter B. Es wurde unbehandeltes Vollblut von Rauchern und Nichtrauchern verwendet. Dargestellt sind Boxplots der gemessenen Parameter Tail Intensity, Tail Length und Tail Migration.

A

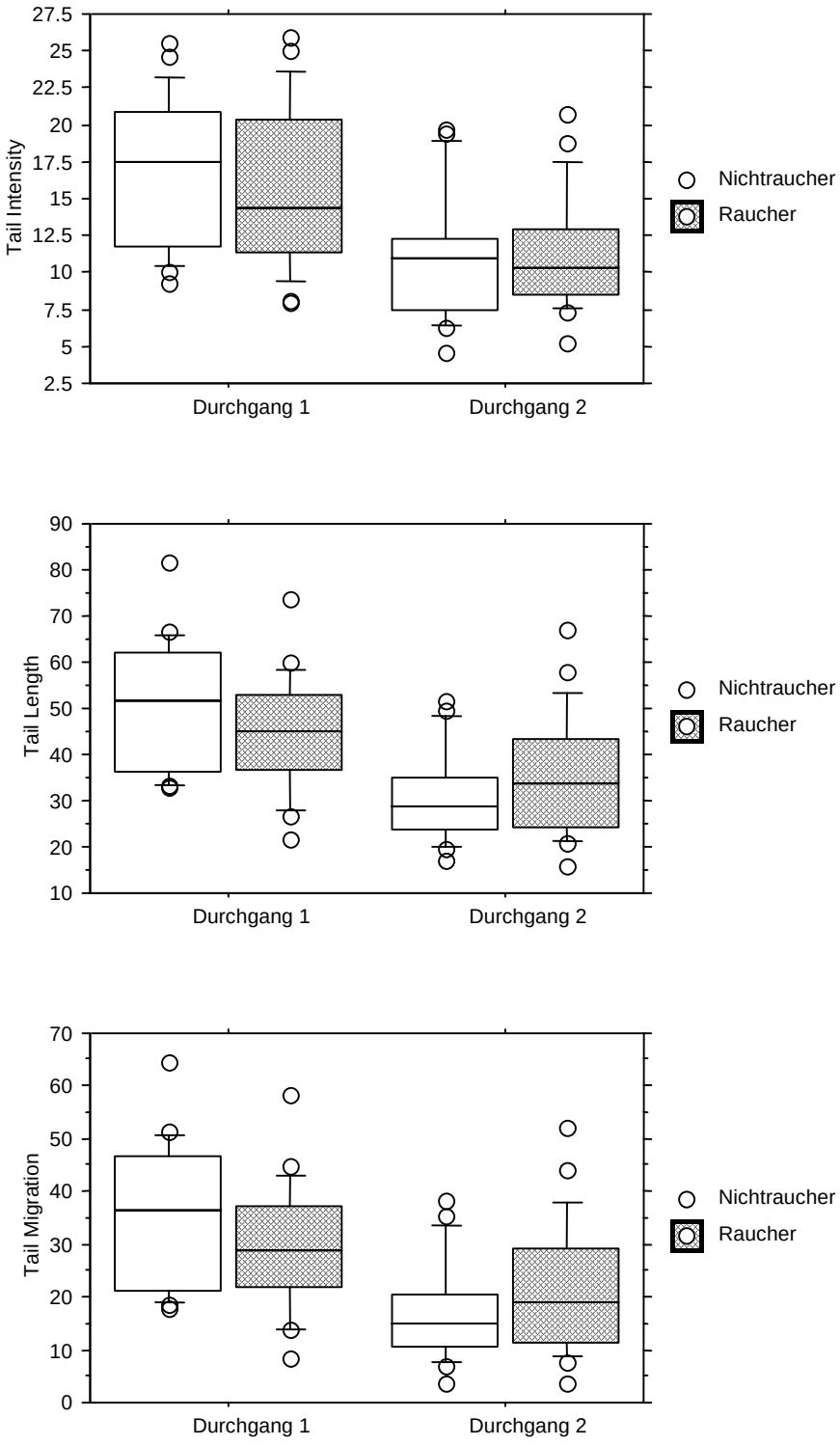


Abbildung 26A: Effekte der BPDE-induzierten DNA-Schäden im Comet Assay gemessen durch Auswerter A. Vollblut von Rauchern und Nichtrauchern wurde mit 5µM BPDE behandelt. Dargestellt sind Box Plots der gemessenen Parameter Tail Intensity, Tail Length und Tail Migration.

B

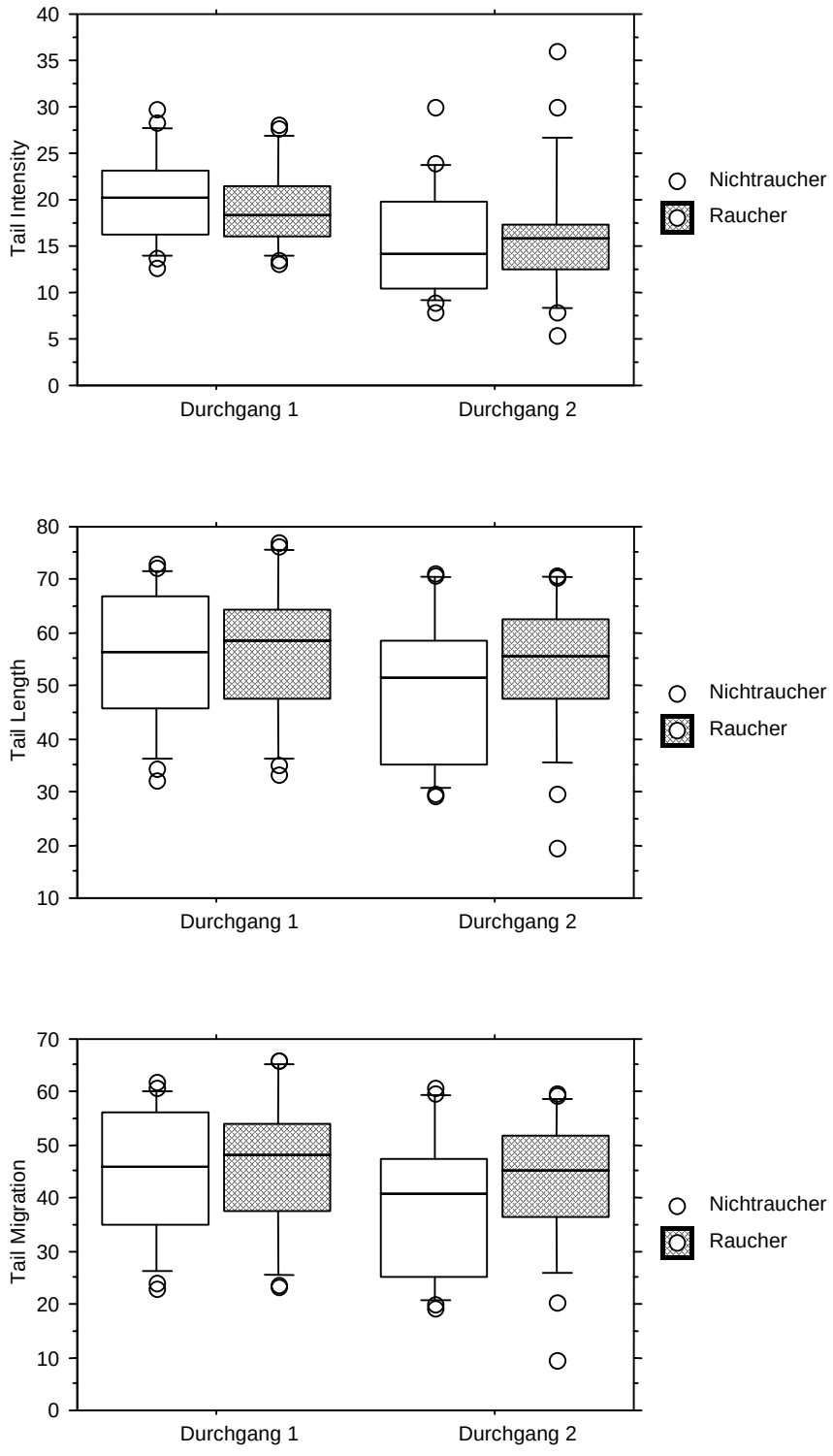


Abbildung 26B: Effekte der BPDE-induzierten DNA-Schäden im Comet Assay gemessen durch Auswerter B. Vollblut von Rauchern und Nichtrauchern wurde mit 5µM BPDE behandelt. Dargestellt sind Box Plots der gemessenen Parameter Tail Intensity, Tail Length und Tail Migration.

A

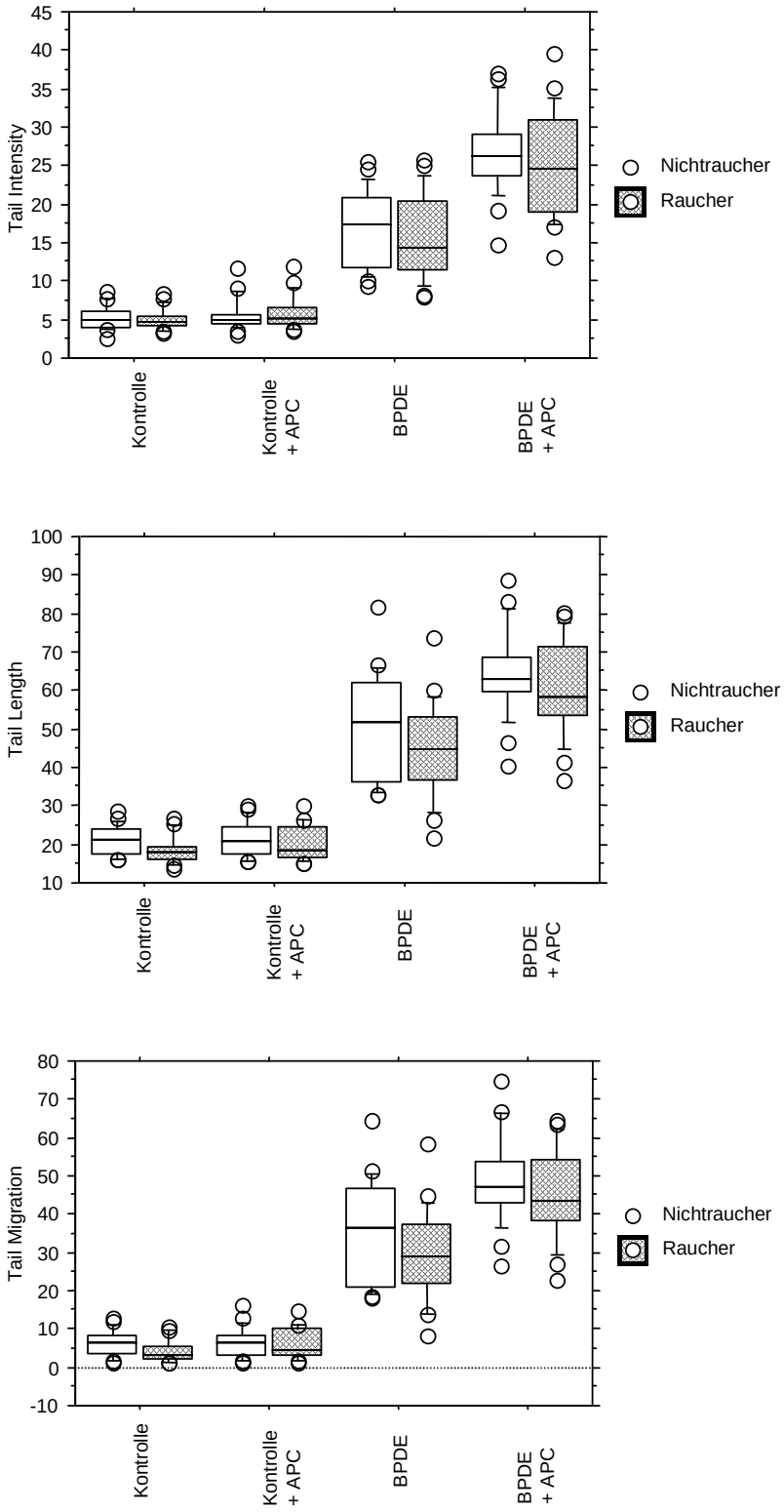


Abbildung 27A: Vollblut von Rauchern und Nichtrauchern wurde mit BPDE und APC behandelt. Dargestellt sind Box Plots der gemessenen Parameter Tail Intensity, Tail Length und Tail Migration des ersten Durchgangs bei Auswerter A.

B

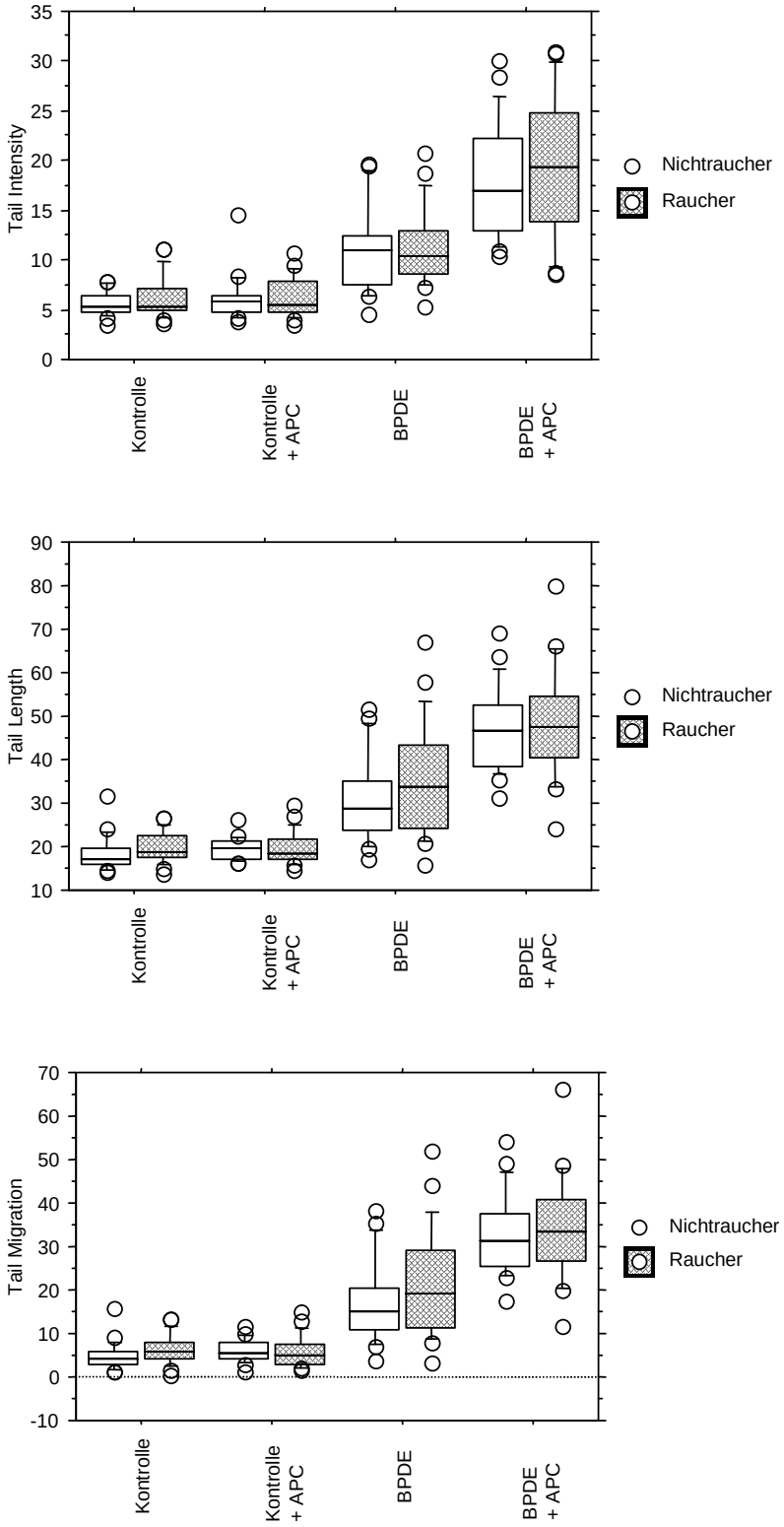
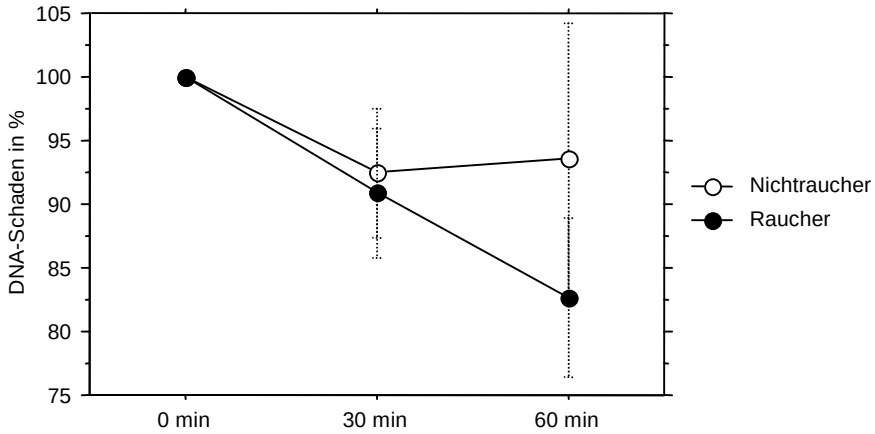


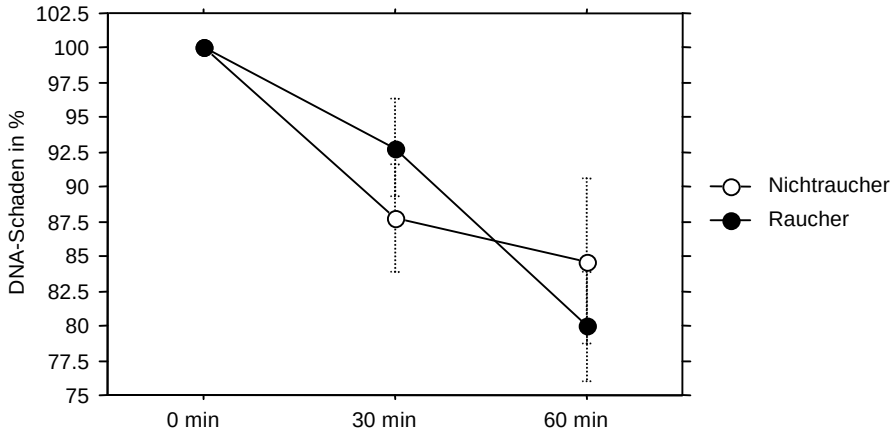
Abbildung 27B: Vollblut von Rauchern und Nichtrauchern wurde mit BPDE und APC behandelt. Dargestellt sind Box Plots der gemessenen Parameter Tail Intensity, Tail Length und Tail Migration des zweiten Durchgangs bei Auswerter A.

A

Tail Intensity



Tail Length



Tail Migration

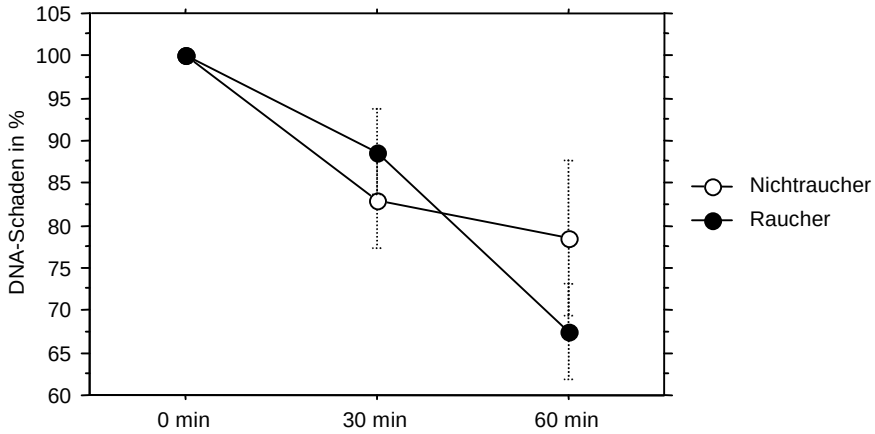
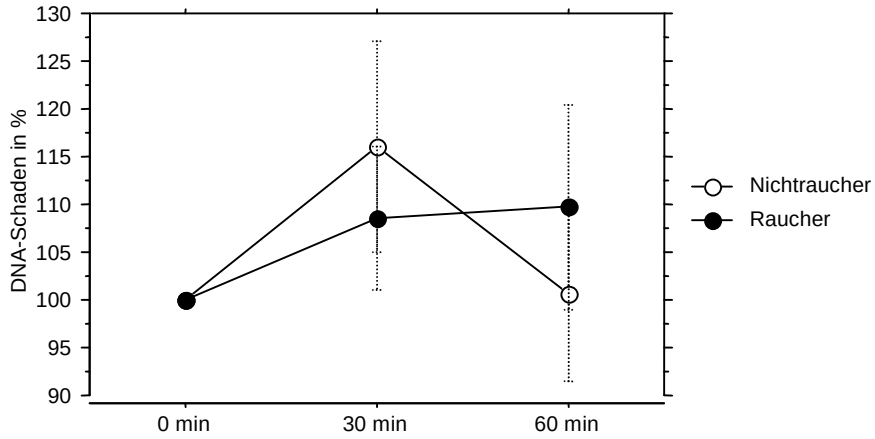


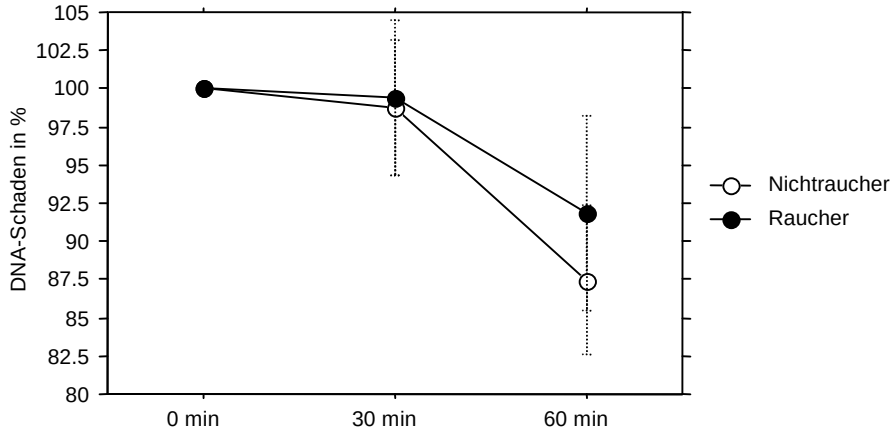
Abbildung 28A: Reparatur der BPDE-induzierten DNA-Effekte in Vollblut von Rauchern und Nichtrauchern im ersten Durchgang. Dargestellt ist die prozentuale Veränderung der Parameter Tail Intensity, Tail Length und Tail Migration im Vergleich zum Startzeitpunkt.

B

Tail Intensity



Tail Length



Tail Migration

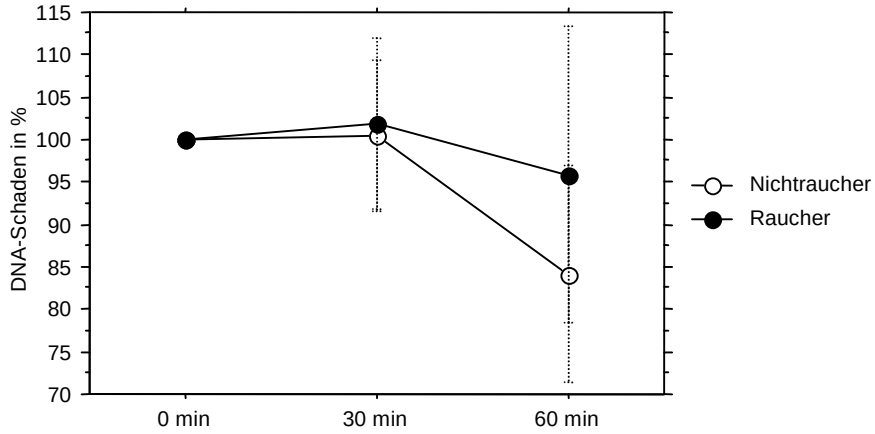


Abbildung 24B: Reparatur der BPDE-induzierten DNA-Effekte in Vollblut von Rauchern und Nichtrauchern im zweiten Durchgang. Dargestellt ist die prozentuale Veränderung der Parameter Tail Intensity, Tail Length und Tail Migration im Vergleich zum Startzeitpunkt.

A

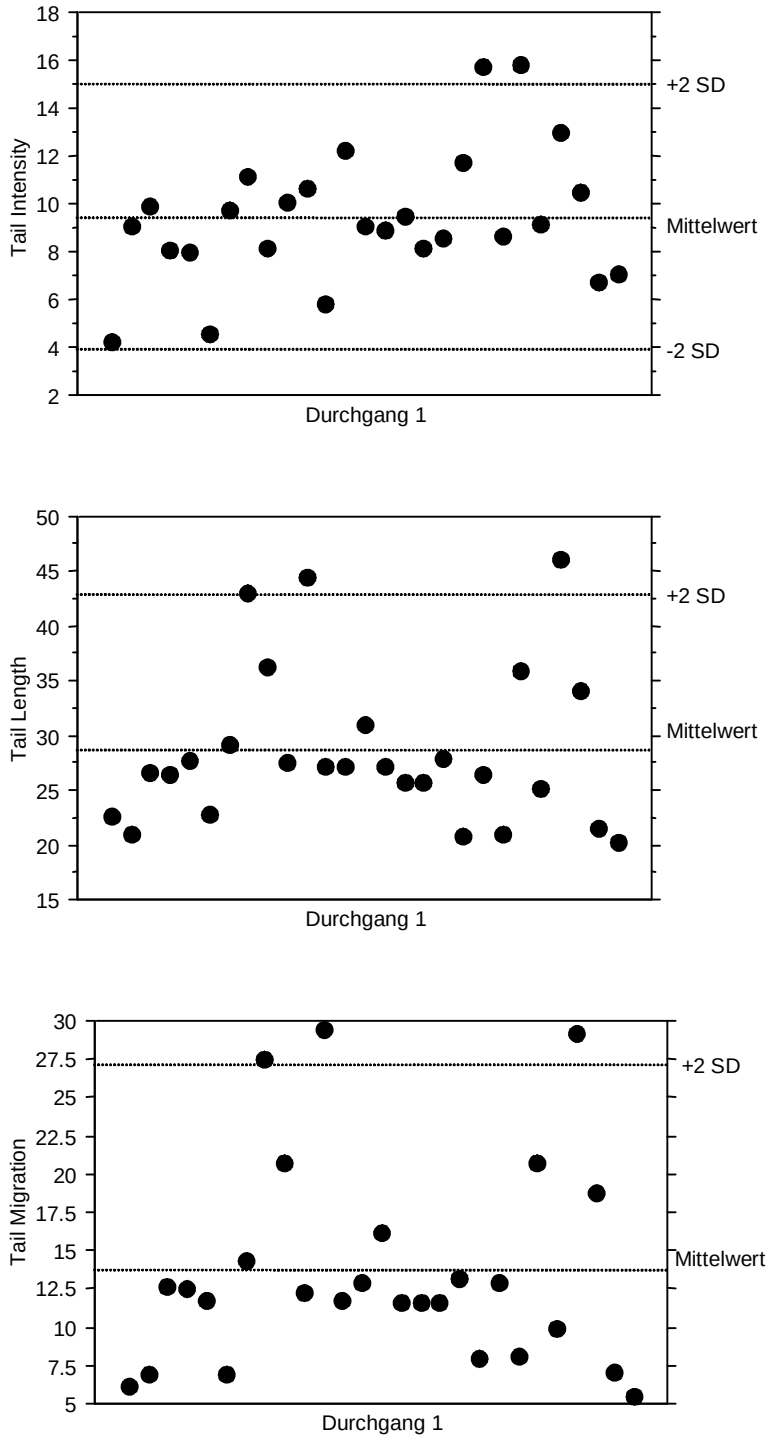


Abbildung 29A: Tail Moments der Referenzstandards für jeden Comet Assay im ersten Durchgang der Studie. Der erlaubte Bereich der Tail Parameter der V79 Zellen wurde als Mittelwert ± 2 Standardabweichungen definiert.

B

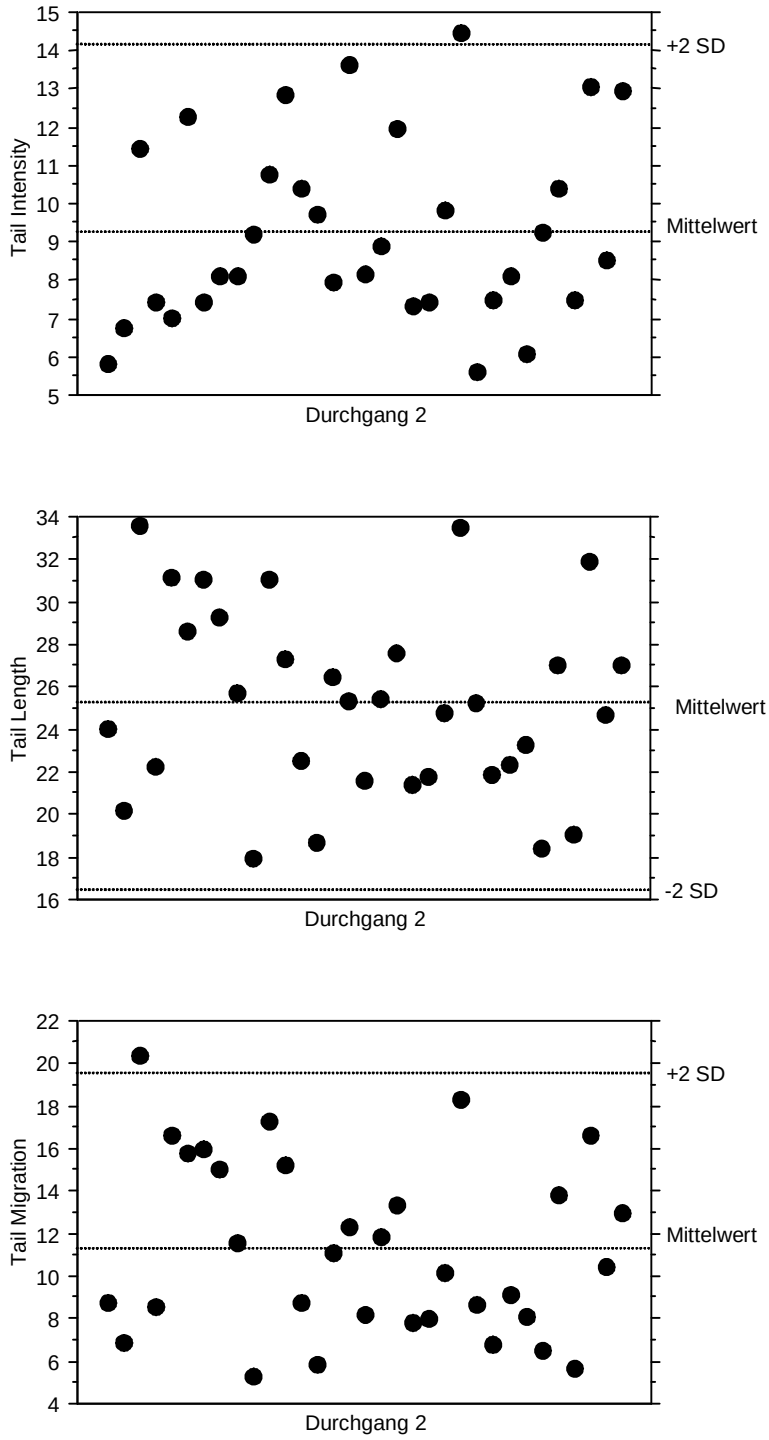


Abbildung 29B: Tail Moments der Referenzstandards für jeden Comet Assay im zweiten Durchgang der Studie. Der erlaubte Bereich der Tail Parameter der V79 Zellen wurde als Mittelwert ± 2 Standardabweichungen definiert.

A

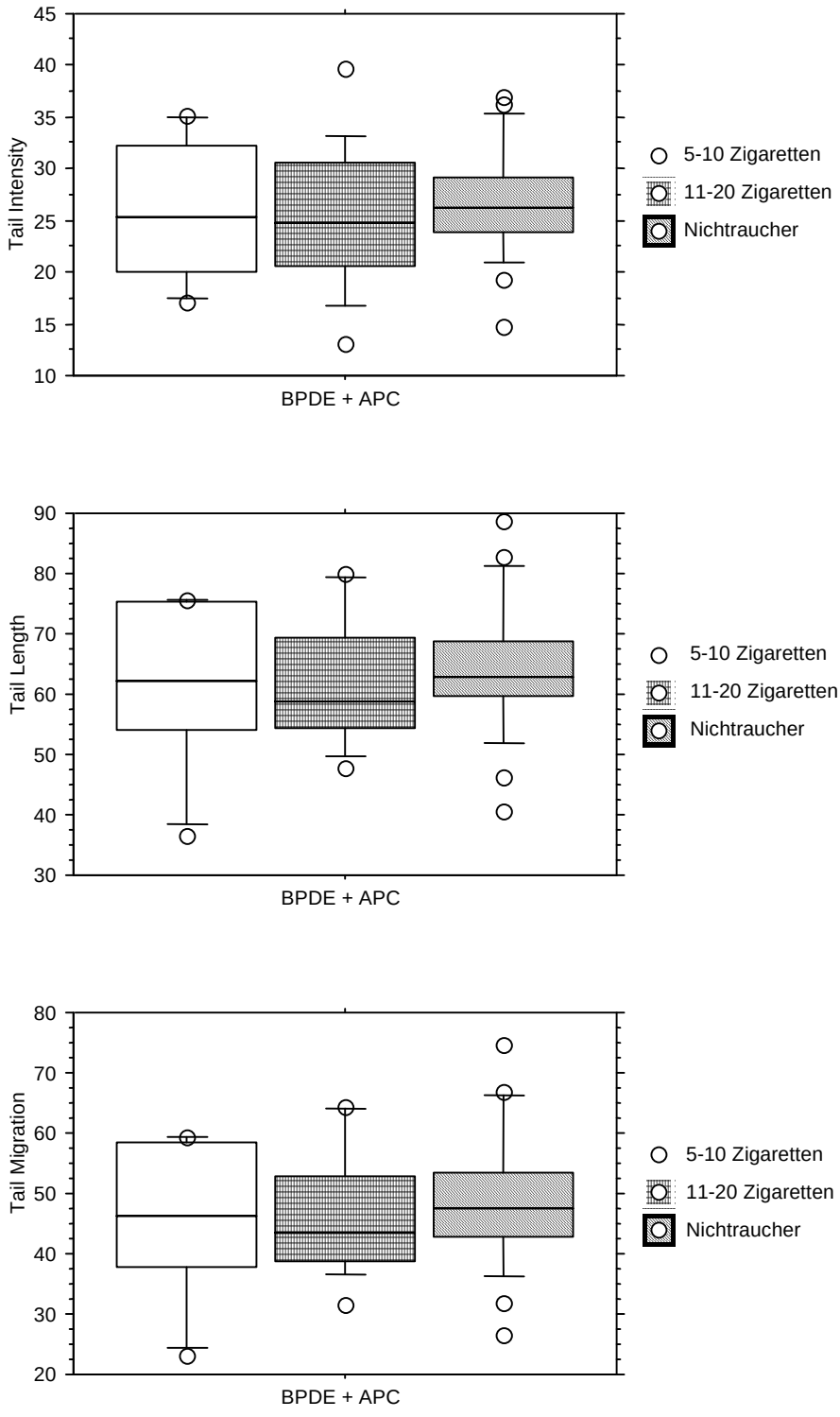


Abbildung 30A: Einfluß der Frequenz des Rauchens auf verschiedene Parameter im Comet Assay. Das Vollblut der Probanden wurde mit BPDE und APC behandelt. Die Probanden wurden nach Anzahl der gerauchten Zigaretten pro Tag in 3 Gruppen geteilt (0; 5-10; 11-20).

B

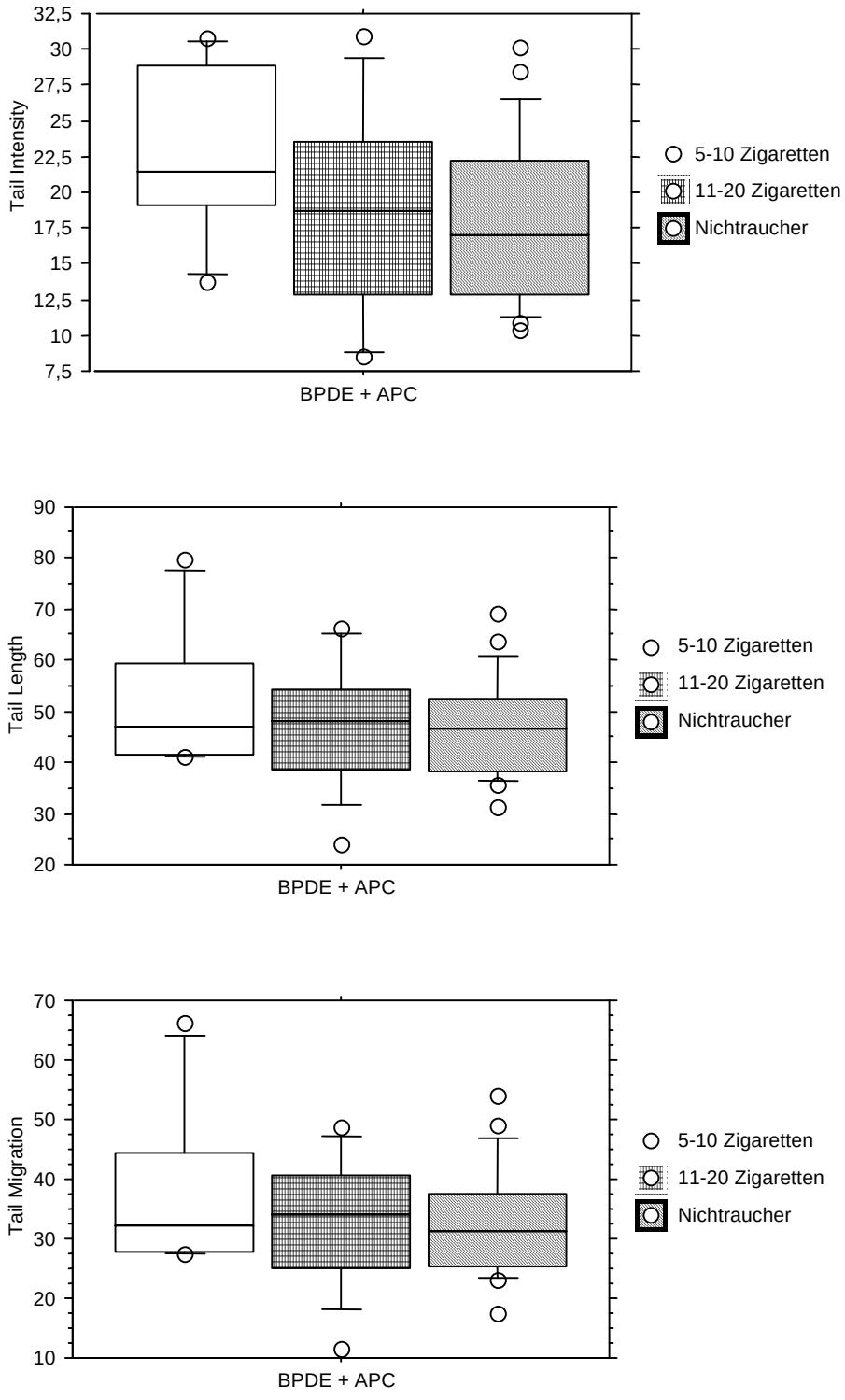


Abbildung 30B: Einfluß der Frequenz des Rauchens auf verschiedene Parameter im Comet Assay. Das Vollblut der Probanden wurde mit BPDE und APC behandelt. Die Probanden wurden nach Anzahl der gerauchten Zigaretten pro Tag in 3 Gruppen geteilt (0; 5-10; 11-20).

Danksagung

Bei der Durchführung dieser Dissertation hatte ich die Möglichkeit in einer motivierten, dynamischen und freundlichen Arbeitsgruppe wissenschaftliches Arbeiten zu lernen. Für meine Fragen fand ich stets ein offenes Ohr und konstruktive Antworten. Ich verbrachte spannende und interessante Stunden im Labor und blicke sehr gerne auf diese Zeit zurück. Bedanken möchte ich mich daher vor allem bei Petra Schütz, Heike Hoffmann, Kristina Trenz und Irina Bonzheim, deren fachlicher Rat für mich unerlässlich war. Mein Dank gilt auch allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik der Universität Ulm.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Günter Speit für die Vergabe des Themas und für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung meiner Dissertation bedanken. Vielen Dank auch für die lustige, schöne und lehrreiche Zeit, die es über die Arbeit im Labor hinaus gab!

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, deren Unterstützung mir vieles im Leben erleichtert und möglich gemacht hat.