

1. Titel:

Molekulartoxikologische Untersuchungen an weißen Blutzellen zur genotoxischen und gesundheitsschädigenden Wirkung von Dämpfen und Aerosolen aus Bitumen auf das respiratorische System der oberen und unteren Luftwege beruflich exponierter Arbeitnehmer

Laufzeit des Vorhabens:

Aufgrund von Schwierigkeiten entsprechende Baustellen für die Probengewinnung zu finden, hat sich das Projekt stark verzögert, so dass die ursprüngliche Laufzeit nicht eingehalten werden konnte.

Auftraggeber:

Hauptverband der Berufsgenossenschaft (HVBG)

ab 2007

Forschungsförderung Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung (DGUV)

Alte Heerstrasse 111

53754 Sankt Augustin

Inhaltsverzeichnis

1. Titel:	1
2. Problemstellung.....	4
3. Forschungszweck/-ziel	4
4. Methodik mit schematischer Darstellung der geplanten und tatsächlichen Arbeits- und Zeitabläufe.	5
4.1 DNA-Isolierung aus menschlichem Blut.....	5
4.2 DNA-Adduktbestimmung mittels ³² P-Postlabeling	6
4.3 Chemische Identifizierung der DNA-Addukte	7
4.3.1 Probenvorbereitung und Massenspektrometrie	7
4.4 Identifizierung von Mutationen mittels dHPLC und Sequenzanalysen.	8
5. Ergebnisse	12
5.1 ³² P Postlabelling.	12
5.2 Chemische Identifizierung der DNA-Addukte.	21
5.2.1 Charakterisierung der sechs ausgewählten DNA-Referenzaddukte mittels Massenspektrometrie und ³² P-Postlabeling.	21
5.2.2 Untersuchungen der DNA von Arbeitnehmern auf DNA-Adduktbildung mittels Massenspektrometrie.	22
5.2.3 Vergleichend Untersuchungen im Gewebe exponierter Ratten.	22
5.3 Bestimmung von Mutationen in ausgewählten Genen	23
5.3.1 Überblick	23
5.3.2 TP53.....	26
5.3.3 HRAS.....	29
5.3.4 HPRT1.....	31
5.3.5 EGFR	33
5.3.6 CDKN2A (INK4A).....	35
5.3.7 FHIT.....	35
5.3.8 CADM1 (TSLC1/IGSF4).....	35
5.3.9 TSG101	35
5.3.10 Übersicht über Proben ohne Ergebnisse bei den Mutationsanalysen.	35
6. Schutzrechte (erfolgt oder geplant).	35
7. Relevante Ergebnisse, Veröffentlichungen, Schutzrechtsanmeldungen und erteilte Schutzrechte Dritter.....	35
8. Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich des Forschungszwecks/-ziels, Schlussfolgerungen	35
8.1 Bestimmung von DNA-Addukten mittels ³² P-Postlabeling.....	35
8.2 Chemische Identifizierung der DNA-Addukte.	35
8.3 Nachweis von Mutationen in ausgewählten Genen.....	35
8.4 Schlussfolgerungen.....	35
9. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan möglichst mit Angabe der absehbaren Zeithorizonte.....	35
Literatur	35

Anlagen

Anlage 1: Übersicht über die relativen Adduktwerte (RAL) der einzelnen DNA-Addukte

Anlage 2A: Massenspektren der DNA-Referenzaddukte

Anlage 2B: Massenspektren der DNA-Addukte von Arbeitnehmern

Anlage 2C: Massenspektren der DNA-Addukte von Gewebe exponierter Ratten

Anlage 3A: Mutationsanalysen in TP53

Anlage 3B: Mutationsanalysen in HRAS

Anlage 3C: Mutationsanalysen in HPRT1

Anlage 3D: Mutationsanalysen in EGFR

Anlage 3E: Mutationsanalysen in DKN2A

Anlage 3F: Mutationsanalysen in FHIT

Anlage 3G: Mutationsanalysen in IGSF4

Anlage 3H: Mutationsanalysen in TSG101

2. Problemstellung

Seit den 1960er Jahren wird ein möglicher Zusammenhang zwischen der Exposition gegenüber Dämpfen und Aerosolen aus Bitumen und einem erhöhten Krebsrisiko sowie Atemwegserkrankungen diskutiert (Zorn, 1966; Hansen 1991; Stern et al., 2000). Andere Risikofaktoren (insbesondere Rauchen) können jedoch nicht ausreichend ausgeschlossen werden, einen erheblichen Beitrag im Sinne einer gesundheitlichen Gefährdung zu leisten (Stern et al., 2000; Cole et al., 1999). Eine eindeutige Abschätzung der Langzeitwirkung von Dämpfen und Aerosolen aus Bitumen ist bis heute nicht möglich. Aus diesem Grunde werden die Wirkungen von Dämpfen und Aerosolen aus Bitumen kontrovers diskutiert, so dass erheblicher Handlungsbedarf zur Klärung der komplexen Zusammenhänge besteht.

Relevante Inhaltsstoffe in Dämpfen und Aerosolen aus Bitumen, die u.a. für Atemwegserkrankungen verantwortlich gemacht werden, sind PAHs (DFG, 2001). Viele dieser PAHs sind in der Lage, durch Bindung an den Ah-Rezeptor die Bildung von Cytochrom P450 Monooxygenasen zu verstärken, die wiederum PAHs zu genotoxischen reaktiven Giftungsprodukten metabolisieren. Durch Oxidation werden Stoffe aus den Dämpfen und Aerosolen aus Bitumen metabolisch aktiviert und interagieren mit zahlreichen Prozessen und Regelkreisen der Zelle. Damit können biologische Programme gestört werden, die zu Stress und zu Entgleisungen metabolischer Funktionen führen. Von besonderer Bedeutung ist die metabolische Umwandlung der PAH in ultimative reaktive Karzinogene (Baum et al., 2001; Li et al., 2000; William et al., 2000; Shimada et al., 2001). PAH-Karzinogene sind genotoxisch, die DNA-Schäden (u.a. Chromosomenstrangbrüche) und Änderungen der DNA-Sequenz (Mutationen) induzieren können und wesentlich zur Toxizität und malignen Transformation beitragen.

3. Forschungszweck/-ziel

Im Rahmen dieser Studie wurden Blutproben vor und nach der Schicht gegenüber Dämpfen und Aerosolen aus Bitumen exponierten und nicht exponierter Arbeitnehmer entnommen. DNA wurde von den Blutproben extrahiert und auf DNA-Addukte mittels ³²P-Postlabeling und MALDI-TOF/TOF untersucht. Es sollte überprüft werden, ob

1. DNA-Addukte gebildet werden und durch massenspektroskopische Verfahren näher charakterisiert werden.
2. die Bildung von DNA-Addukten in Abhängigkeit von der Exposition gegenüber Dämpfen und Aerosolen aus Bitumen erfolgt.
3. Unterschiede vor und nach der Schicht der gegenüber Dämpfen und Aerosolen aus Bitumen exponierten Arbeitnehmern vorliegen.

Aufgrund einer Änderung des Prüfplans wurden nicht 150 Blutproben jeweils vor und nach der Schicht, sondern es sollten 300 Blutproben jeweils vor und nach der Schicht für das ³²P-Postlabeling eingesetzt werden. Für die Untersuchungen wurden etwas weniger, nämlich 292 Blutproben jeweils vor und nach der Schicht vom BGFA zur Verfügung gestellt.

Darüber hinaus wurden ausgewählte Genen auf Keimbahn und somatische Mutationen Mutationen überprüft; letztere sind möglicherweise durch Dämpfe und Aerosole aus Bitumen hervorgerufen worden, zumal DNA-Addukte Mutationen in der Nukleinsäuresequenz auslösen können. Mittels Kapillargelelektrophorese wurden nach Veränderungen in der Nukleotidsequenz gesucht. Von besonderem Interesse waren einzelne Zielgene, von denen bekannt ist, dass dort gehäuft Mutationen anzutreffen sind. Solche "hot spots" sind zum Beispiel vom Tumor Suppressor p53 und von der Ras Protoonkogenfamilie bekannt.

Zusätzlich sollte anhand von sechs DNA- Referenzaddukten überprüft werden, ob diese auch unter den DNA-Addukten in Blutzellen von Arbeitnehmern nachzuweisen sind, welche gegenüber Dämpfen und Aerosolen exponiert waren. In Kooperation mit Dr. S. Amin und S. Nesnow wurde Kalbsthymus-DNA mit sechs verschiedenen PAHs behandelt und in der Analyse eingesetzt. Es wurden folgende PAHs ausgewählt: Benzo[c]chrysen-9,10-dihydrodiol-11,12-epoxid, Benzo[g]chrysendiol-epoxid, Dibenz[a,l]pyrendiol-epoxid, Benzo[c]chrysen-1,2-dihydrodiol-3,4-epoxid, Benzo[a]pyrendiol-epoxid und Benzo[c]phenanthrendiol-epoxide.

4. Methodik mit schematischer Darstellung der geplanten und tatsächlichen Arbeits- und Zeitabläufe.

4.1 DNA-Isolierung aus menschlichem Blut

Vom BGFA wurden die Blutproben der Arbeitnehmer gewonnen und Aliquots in EDTA-Röhrchen an das Fh-ITEM auf Trockeneis verschickt. Aus den Blutproben

wurde DNA extrahiert. Hierzu wurde der QIAamp DNA Blood Midi der Firma Qiagen verwendet. Die DNA Konzentration wurde am NanoDrop ND-1000 durchgeführt. Die Bezeichnung der Proben wurden vom BGFA übernommen.

4.2 DNA-Adduktbestimmung mittels ^{32}P -Postlabeling

Der Nachweis der Adduktbildung zwischen aromatischen Kohlenwasserstoffen und Nukleotiden erfolgte durch Hydrolyse der DNA und einer anschließenden Markierung der freigesetzten Nukleotide/Nukleotidaddukte mittels $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP. Die markierten Nukleotide/Nukleotidaddukte wurden mittels Dünnschichtchromatografie auf PEI-Zellulose aufgetrennt. Anschließend wurden die DNA-Addukte durch Phosphoimaging sichtbar gemacht und mit dem Molecular Imager FX (BioRad) unter Verwendung der Quantity One Software quantitativ ausgewertet. Nach Hintergrundkorrektur wurde die Konzentration mittels einer Kalibrierkurve ermittelt, die mit dem Markierungsansatz und der Angabe zur spezifischen Aktivität des $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP erstellt wurde. Zur Kontrolle der vollständigen Hydrolyse wurde in einem Aliquot des Hydrolyseansatzes die freien Nukleotide mit ^{32}P markiert und mittels Dünnschichtchromatografie aufgetrennt und identifiziert.

Die Häufigkeit auftretender DNA-Addukte wird als relativer Adduktlevel (RAL) angegeben. Ein RAL-Wert von 1 bedeutet 1 DNA-Addukt unter 10^9 Basen. Die Nachweisgrenze liegt etwa bei einem Wert von 1 (Genevois-Charneau, 2001; Binet et al., 2002). Alle RAL-Werte unter 1 wurden in dieser Prüfung nicht weiter berücksichtigt.

Zeitliche Durchführung der Experimente

GUS 194 bis GUS 302: von Oktober 2005 bis Februar 2006

GUS 303 bis GUS 454: von März 2007 bis April 2008

GUS 455 bis GUS 515: von Juli 2008 bis Oktober 2008

Die Auswertung erfolgte nach Abschluss der jeweiligen Versuchsperioden mit einer abschließenden Überprüfung aller Ergebnisse nach Abschluss der Experimente.

Die letzten gesammelten Blutproben sind am 2.7.2008 am Fh-ITEM eingetroffen und wurden sofort aufgearbeitet.

4.3 Chemische Identifizierung der DNA-Addukte

In Zusammenarbeit mit Dr. S. Amin und Dr. S. Nesnow (NIH) wurden 6 PAHs ausgewählt, die als Kandidaten für die DNA-Adduktbildung aus Dämpfen und Aerosolen aus Bitumen in Betracht kamen. Mit diesen PAHs wurden DNA-Addukte in vitro erzeugt. Sie wurden als DNA-Referenzaddukte für die Identifizierung der entsprechenden DNA-Addukte in den Blutproben verwendet.

4.3.1 Probenvorbereitung und Massenspektrometrie

Die DNA wurde wie für das ³²P-Postlabeling Assay hydrolysiert und auf eine Endkonzentration von 0,5µg/µl eingestellt. Die hydrolysierte DNA wurde 1:100 mit Methanol/Wasser (20:80 v.v) verdünnt. Nukleoside ohne Addukte wurden durch Festphasenextraktion aus dem Hydrolyseansatz entfernt. Hierzu wurden 1 µl des verdünnten Hydrolyseansatzes mit 10 µl Trifluoressigsäure versetzt und anschließend die Festphasenextraktion durchgeführt. Die Elution der DNA-Addukte von der Festphase erfolgte mittels 1 µl Elutionspuffer (70 % Acetonitril; 0.1 % TFA).

Für die Massenspektrometrie wurde 2,5 Dihydroxybenzoesäure als Matrix verwendet und entsprechend vorbereitet (Garaguso et al. 2008). Ein Mikroliter eluierter DNA-Addukte wurden auf 0,5 µl getrockneter Matrix geladen, welche auf einem AnchorChip™ Target mit 600µm Durchmesser gespottet war. Die Massenspektren wurden mit einem Flugzeit-Massenspektrometer, Modell Ultraflex (Bruker, Bremen), das mit einem Smartbeam all-solid-state Laser System ausgestattet ist, ermittelt. Die Spektren sind die Summe von 600 Laserionisationen.

Bei der Massenspektrometrie wird zunächst das gesamte Spektrum aufgenommen (MS). Die interessanten Bereiche werden unabhängig voneinander in einer zweiten Analyse selektiv nochmals genauer untersucht (MS/MS). In Anlage 2 sind die Spektren entsprechend gekennzeichnet.

Zeitliche Durchführung der chemischen Identifizierung der DNA-Addukte

Eine Verzögerung um mehrere Monate ergab sich bei der Herstellung der DNA-Referenzaddukte mit den ausgewählten PAHs. Dies führte dazu, dass mit der DNA-Adduktidentifizierung erst im August/September 2008 begonnen wurde. Eine weitere Verzögerung um mehrere Wochen wurde durch einen Defekt des Massenspektrometers verursacht.

4.4 Identifizierung von Mutationen mittels dhPLC und Sequenzanalysen.

Die denaturierende Hochdruckflüssigkeitschromatografie (DHPLC: Denaturing High Performance Liquid Chromatography) ist ein Verfahren mit dem insbesondere Punktmutationen und kleine Deletionen sowie Insertionen mit hoher Zuverlässigkeit detektiert werden können (Xiao und Oefner 2001; Frueh und Noyer-Weidner 2003). Bei der Probenaufarbeitung wird die DNA zunächst mittels PCR amplifiziert. Bei der anschließenden Hybridisierung werden die doppelsträngigen, helikalen DNA-Moleküle im PCR-Produkt bei 95°C in zwei DNA-Einzelstränge geschmolzen (Denaturierung). Durch langsames Abkühlen auf ca. 12°C werden die DNA-Einzelstränge zufällig wieder zu doppelsträngiger DNA zusammengeführt (Reannealing). Doppelsträngige DNA, die sich aus zwei komplementären Einzelsträngen gebildet hat, wird als Homoduplex bezeichnet. Als Heteroduplex wird doppelsträngige DNA bezeichnet, die sich aus zwei unterschiedlichen DNA-Einzelsträngen gebildet hat. Bei heterozygoten Probanden entstehen bei der Hybridisierung Homo- und Heteroduplexe, bei Wildtypen und homozygoten Mutanten entstehen nur Homoduplexe. Homo- und Heteroduplexe haben unterschiedliche Schmelztemperaturen. Heteroduplexe schmelzen bei einer niedrigeren Temperatur in ihre DNA-Einzelstränge als Homoduplexe. Die Analysetemperatur für DHPLC-Sequenzanalysen wird so gewählt, dass die Homoduplexe eines PCR-Produktes noch als doppelsträngige DNA, die Heteroduplexe aber schon als einzelsträngige DNA vorliegen. Bei dieser Temperatur wird eine Ionenaustauschchromatografie an einer unpolaren Polystyrendivinylbenzol-Umkehrphase (DHPLC-Chromatographiesäule) durchgeführt. Als Laufmittel wird eine 0,5 molare Triethylammoniumacetatlösung (TEAA) mit einem Acetonitrilgradient verwendet. DNA-Einzelstränge haben unter diesen Bedingungen eine niedrigere Affinität zur DHPLC-Chromatographiesäule als doppelsträngige DNA. Sie werden deshalb bereits bei einer geringeren Acetonitrilkonzentration von der Chromatographiesäule verdrängt. So entsteht bei der DHPLC-Analyse eines PCR-Produktes von einem heterozygoten Probanden ein Chromatogramm mit einem Doppelpeak (Heteroduplexchromatogramm). Der Peak mit der kürzeren Retentionszeit entspricht der DNA der Heteroduplexe, der mit der längeren Retentionszeit der DNA der Homoduplexe.

Mittels Sequenz-spezifischen Primern wurden PCR Fragmente von ca 500 Basen-paaren aus der genomischen DNA der Probanden amplifiziert. Die Integrität der genomischen DNA wurde mittels 1% Agarosegelelektrophorese überprüft. Es wurde keine Degradation der DNA beobachtet. Für die PCR-Amplifikation wurde die DNA 1:5 verdünnt. Die Primer zur Amplifikation wurden so ausgewählt, dass Exonsequenzen der Kandidatengene amplifiziert wurden (Liste der Primersequenzen siehe unten).

Die PCR-Reaktion wurde mit T3-Thermocyclern der Firma (Biometra) durchgeführt. In der Regel bestand ein PCR-Reaktionsansatz aus folgenden Komponenten: 1 µl genomische DNA (etwa 20 ng/µl), 2.5 µl 10x PCR Puffer (Qiagen), 0.25 µl DNA Polymerase (1 U aus einer Mischung von 2/3 *Taq* Polymerase (Qiagen) und 1/3 *Pfu* Polymerase (Promega), 0.5 µl dNTP-Mix (10 mmol/L, Fermentas), 0.5 µl je Primer (10µmol/L) und mit dH₂O aufgefüllt zu einem Gesamtvolumen von 25 µl. Die PCR Bedingungen waren wie folgt: 94°C 15 min zur Denaturierung gefolgt von 35 Zyklen mit 94°C, 10 Sek. zur Denaturierung, 60°C, 30 Sek. für die Primerbindung and 68°C, 2 Min für die Elongation sowie eine abschließende Elongation bei 68 °C, 10 Min am Ende der 35 Zyklen. Zur Gelelektrophorese wurden 1% Agarosegele eingesetzt, die mit 5 µl des PCR-Reaktionsansatzes beladen wurden. Die Dokumentation der Gele erfolgte mittels GelDoc 2000 (Biorad). In Einzelfällen waren Modifikationen notwendig und betrafen den Einsatz von Q solution (Qiagen) insbesondere bei GC- reichen Fragmenten, der Einsatz der non-hot start *Taq* polymerase sowie Änderungen in der Schmelztemperatur der PCR Primer.

Übersicht über die verwendeten Primersequenzen

Genname	Exon	Primersequenz 5'	Primersequenz 3'
TP53	Exon 5	gtgccctgactttcaactctgtct	gagcaatcagtgaggaatcagagg
	Exon 6	cctctgattcctcactgattgtct	atctcatggggttatagggaggtc
	Exon 7	ctcatctgggcctgtgttatctc	ggggatgggtagtagtatggaag
	Exon 8 + 9	ggtaggacctgattccttactgc	ccacttgataagagggtccaagac
HRAS	Exon 2	gcaggagaccctgtaggaggag	tctagaggaagcaggagacagg
	Exon 3	gagaggctggctgtgtgaactc	gtggaaagcgagagctggctac
HPRT1	Exon 1	gcttctcctcctgagcagtc	cgtgacgtaaagccaacc
	Exon 2	tccaatcaaattgtgtatcctg	gaacagctgctgatgtttgaa
	Exon 3	agggtttgttataaagttaatg	aagaaaacctactgttgccact
	Exon 4	tgaagttgtgtgtacataagg	tgattgattgaaagcacactgtt
	Exon 5	gactgcccgaagattagacctc	ctggctacctttaggatggg
	Exon 6	catgggggtttgttacttt	ccccctcaaagaggaaa
	Exon 7	cccctcctagtaatcccata	actggcaaagtgcctctctac
	Exon 8	acagctgtggtgaaaaggac	gaggtgctggaaggagaaaaca
	Exon 9	gctattctgccttcattca	aagcagatggccacagaact
EGFR	Exon 18	cctgtctctgtgttctgtcc	atacagcttgaaggactctgg
	Exon 19	gccagttaacgtcttcttctctc	ctgtcttaaggggagggagttat
	Exon 20	gtaaacgtccctgtgctaggctc	ccgtatctccctccctgattac
	Exon 21	ctcacagcagggtcttctctgttt	caagtactgttccaaagcagctc
CDKN2A	Exon 1	cggagagggggagagcag	aactcgtcctccagagtcg
	Exon 2	cctggctctgaccattctgt	ttggaagctctcaggggtaca
FHIT	Exon 1	agcatgggccttaacagacc	caatgccgggatatgaaagg
	Exon 2	ttcaatggcatcctctctgc	acctggtgtctccgaagtgg
	Exon 3	acttactctcaggcggaaatgg	aacctgaggggtctctctgacc
	Exon 4	cttgcttagtgactcttctctcg	gccttattgccacttccaagtc
	Exon 5	cccctcagcctcagtagatgatta	cattctgagagtgacgctctttc
CADM1	Exon 9	ctcgattgttctctgtgactcctc	ctgcttctgtctgctgaagctttg
	Exon 10	agcaagttgccatctctgtacc	ttacacagcaaataccaagc
TSG101	Exon 1	gtgtagtgggcccgacttcc	ctccacgcctttgttgactg
	Exon 2	ttatgcgattttgctttcag	tattaggcgggtgtgcaatc
	Exon 3	aggtcagcccccttcaaggata	cctctggtgaacttaggcactt
	Exon 4	tactgactttgctattgcctcag	ctatcctacctcgaatcctcctg
	Exon 5	ctgaaaagcaactctgtagctg	caaaggtttctgttctctttg
	Exon 6	tgatgtatatcttattcagtagcc	aagtttatcttccactaaattgc
	Exon 7	cttctgaatgggggtcttc	atgccctggtagaagggtca
	Exon 8	ccccttttctgaagggtcctgt	ctactatgccacaacatccag
	Exon 9	gtgtttaggtgtctgacaagtgg	gtcagtgctctacaaccaagtt
	Exon 10	gtaggtcaaactcctgagccagat	agagctcaacctccagctggatc

Anschließend wurde mittels DHPLC mit der WAVE MD system (Transgenomic), die einzelnen Amplifikate auf Punktmutationen untersucht. Die Bestimmung der Temperatur, die zur Identifizierung von Hetero- oder Homoduplexen führte, wurde anhand eines Software-Programms des Herstellers ermittelt (z.B. basierend auf dem GC-Gehalt).

Im wesentlichen wurden Heteroduplexe oder Homoduplexe bei Temperaturen von 95°C, 10 Min; 93°C 1 Min, gefolgt durch Abkühlen auf 12°C im Intervall von 1° pro Minute erzeugt. Während der Renaturierung durch Abkühlen bilden sich auch Heteroduplexe zwischen Wildtyp und variablen Sequenzen, sobald neben Wildtyp auch variante Sequenzen vorliegen und sich zumindest in einem Nukleotid unterscheiden. Solche Heteroduplexe eluieren bei bestimmten Temperaturen schneller als Homoduplexe, da beide unterschiedliche Affinitäten zur Säule der dHPLC besitzen. Analysen mittels dHPLC werden häufig für den Nachweis von Nukleotidpolymorphismen genutzt aber auch für die Identifizierung von DNA-Methylierungen (Betz et al. 2004; Reamon-Buettner et al. 2008).

Bei begründetem Verdacht auf Mutationen erfolgte eine detaillierte DNA-Sequenzanalyse mittels Kapillargelelektrophorese (ABI 3100 DNA Genetic Analyzer, Applied Biosystems) der entsprechenden Amplifikate. Mutationen in den Sequenzen wurden durch Vergleich mit den in Datenbanken vorliegenden Ursprungs- bzw. Referenzsequenzen bestimmt.

Zeitliche Durchführung der Mutationsanalysen

Die Experimente wurden in den Zeiträumen vom Januar 2007 bis November 2007 und vom Juni 2008 bis November 2008 durchgeführt.

5. Ergebnisse

5.1 ^{32}P Postlabelling.

Insgesamt wurden jeweils 286 Blutproben von Arbeitnehmern vor und nach der Schicht mittels ^{32}P -Postlabelling untersucht. Zum Nachweis der vollständigen Hydrolyse der isolierten DNA wurde vor der Butanolextraktion ein Aliquot aus dem Hydrolyseansatz mit $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP markiert und mittels Dünnschichtchromatografie aufgetrennt: In Abbildung 1 ist eine solche Hydrolysekontrolle dargestellt.

Abbildung 1: Kontrolle der Hydrolyse durch Markierung der Einzelnukleotide nach Hydrolyse der DNA .



Die Anzahl der DNA-Addukte für die einzelnen Arbeitnehmer und die relativen Adduktlevel (RAL) wurden anhand einer Kalibrierkurve berechnet (Abb. 2). Das Muster der DNA-Addukte im Autoradiogramm wurde herangezogen, um die DNA-Addukte unterschiedlicher Arbeitnehmer miteinander zu vergleichen und die Anzahl der unterschiedlichen DNA Addukte zu bestimmen. In Abbildung 3 sind Beispiele zweier Arbeitnehmer gezeigt. Die Kreise links und rechts in den Autoradiogrammen geben den Ausschnitt an, der für die Messung der Intensität des jeweiligen Addukts festgelegt wurde. Die beiden mittig liegenden Autoradiogramme sind identisch mit den benachbarten äußeren Autoradiogrammen ohne Kreise. Unterschiede im Muster der DNA-Addukte sind mit blauen Kreisen hervorgehoben.

Abbildung 2: Kalibrierkurve: Vom Markierungsansatz wurden verschiedene Verdünnungsstufen auf die Dünnschichtchromatografieplatten aufgetragen und ein Autoradiogramm erstellt. Die Intensität der Schwarzfärbung wurde gemessen. Dieser Wert wurde zusammen mit der spezifischen Aktivität des zur Markierung eingesetzten γ -³²P-ATP für die Erstellung einer Kalibrierkurve verwendet. Mittels dieser Kalibrierkurve wurden die RAL-Werte der DNA-Addukte bestimmt.

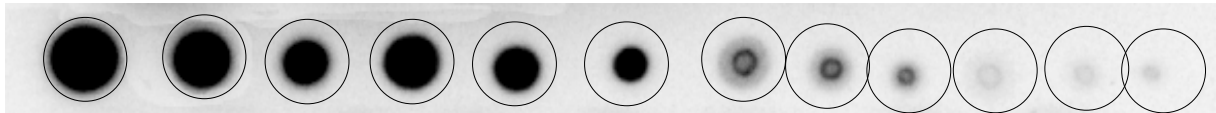
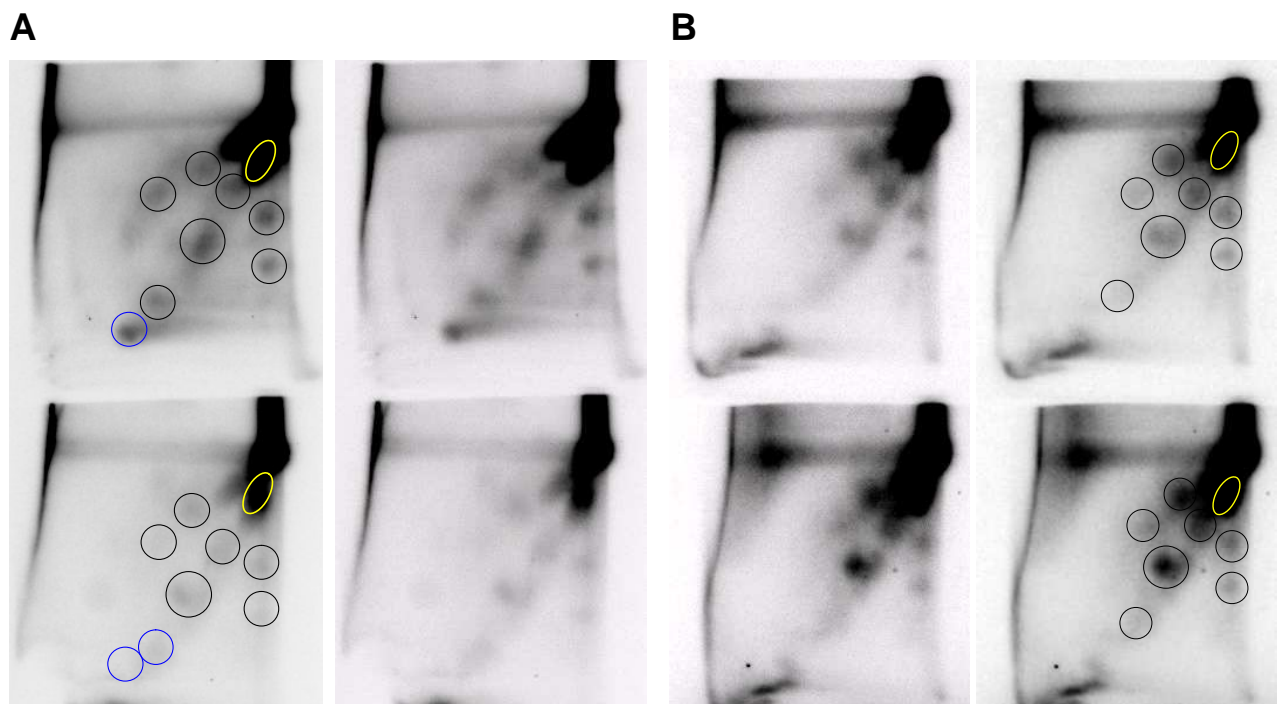


Abbildung 3: DNA-Addukte von 2 Arbeitnehmern . Obere Reihe zeigt die Autoradiogramme von Blutproben vor und die untere Reihe nach der Schicht. A: Arbeitnehmer (GUS 250); B: Arbeitnehmer (GUS 262). Kreise geben die Bereiche der DNA-Addukte an, die für die Bestimmung der RAL-Werte ausgemessen wurden.



Insgesamt wurden 22 DNA-Addukte unterschieden. Von den ursprünglich 584 untersuchten Proben zeigten 373 keine DNA Addukte. In den restlichen Proben wurden zwischen 1 und 22 Addukte identifiziert. In Tabelle 1 ist ein Überblick über die Anzahl der DNA-Addukte in den Proben angegeben.

Tabelle 1: Übersicht über die Häufigkeit von DNA-Addukten in den untersuchten Proben.

Proben vor und nach der Schicht	373	49	13	9	16	16	26	28	22	18	7	5	2
%	63.9	8.4	2.2	1.5	2.7	2.7	4.5	4.8	3.8	3.1	1.2	0.9	0.3
Adduktanzahl/Probe	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Die RAL Werte der einzelnen DNA-Addukte wurden mittels einer Kalibrierkurve ermittelt. Mit dieser Kalibrierkurve konnte eine Abhängigkeit der Schwarzfärbung im Autoradiogramm mit der eingesetzten Menge an Radioaktivität hergestellt werden (Abb. 2). Anhand der spezifischen Menge an Radioaktivität und der eingesetzten Gesamtmenge an hydrolysiertes DNA pro Markierungsansatz lies sich der RAL-Wert der DNA-Addukte ermitteln.

Die einzelnen DNA-Addukte zeigten bezüglich des RAL-Wertes starke Schwankungen in den einzelnen Proben. Ein Überblick, in welchem Bereich sich die RAL-Werte der DNA-Addukte bewegen, ist in Tabelle 2 aufgeführt. Diese Tabelle zeigt ebenfalls als Übersicht, wie häufig die 22 verschiedenen DNA-Addukte in den Proben nachgewiesen wurden. Von den 22 DNA-Addukten wurden 10 in 9 und weniger analysierten Proben identifiziert. Andererseits wurden 8 DNA Addukte in mindestens 50 Proben nachgewiesen.

In der nachfolgenden Tabelle 3 ist aufgeführt, ob vor oder nach der Schicht die RAL-Werte höher oder niedriger lagen. Als Kriterium wurde eine 10% Differenz zwischen beiden Werten, ausgehend vom höheren Wert, festgelegt. Die RAL-Werte waren häufiger vor als nach der Schicht erhöht.

Tabelle 2: Übersicht über die DNA-Addukte: Anzahl der identifizierten DNA-Addukte (22) und Informationen zu den RAL-Werten. Die Häufigkeit des DNA-Addukts gibt an, wie viele untersuchte Proben das entsprechende DNA-Addukt zeigten.

DNA-Addukt	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Häufigkeit des DNA-Addukts	99	57	130	142	145	121	58	189	19	21	9	3	2	5	47	5	6	1	19	2	4	1
Summe der RAL-Werte	393	149.8	670.2	698.3	655.5	409.0	147.8	3110.7	71.1	82.8	38.2	6.1	4.4	9.8	211.4	10.6	32.2	14.9	28.7	3.0	5.5	3.2
RAL-Wert (Durchschnitt)	4.0	2.6	5.2	4.9	4.5	3.4	2.5	16.5	3.7	3.9	4.2	2.0	2.2	2.0	4.5	2.1	5.4	14.9	1.5	1.5	1.4	3.2
höchster RAL-Wert	13.36	6.7	23.65	24.13	22.36	13.17	10.71	110.6	10.7	11.2	8.52	2.6	1.95	2.72	15.2	3.06	10.83	14.9	2.55	2.02	1.75	3.2
niedrigster RAL-Wert	1.03	1.02	1.05	1	1.02	1.01	1	1.09	1.7	1.3	1.09	1.7	2.5	1.22	1.04	1.21	2.49	14.9	1.01	1.02	1.05	3.2
RAL >20	0	0	1	1	1	0	0	54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(%)	0	0	1	1	1	0	0	29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RAL >10<20	3	0	13	16	9	4	1	45	2	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
(%)	3	0	10	11	6	3	2	24	11	5	0	0	0	0	2	0	17	100	0	0	0	0
RAL >5 <10	27	3	37	34	34	21	4	33	1	4	3	0	0	0	12	0	1	0	0	0	0	0
(%)	27	5	28	24	23	17	7	17	5	19	33	0	0	0	26	0	17	0	0	0	0	0
RAL >1<5	69	54	79	91	101	96	53	57	16	16	6	3	2	5	34	5	4	0	19	2	4	1
(%)	70	95	61	64	70	79	91	30	84	76	67	100	100	100	72	100	67	0	100	100	100	100

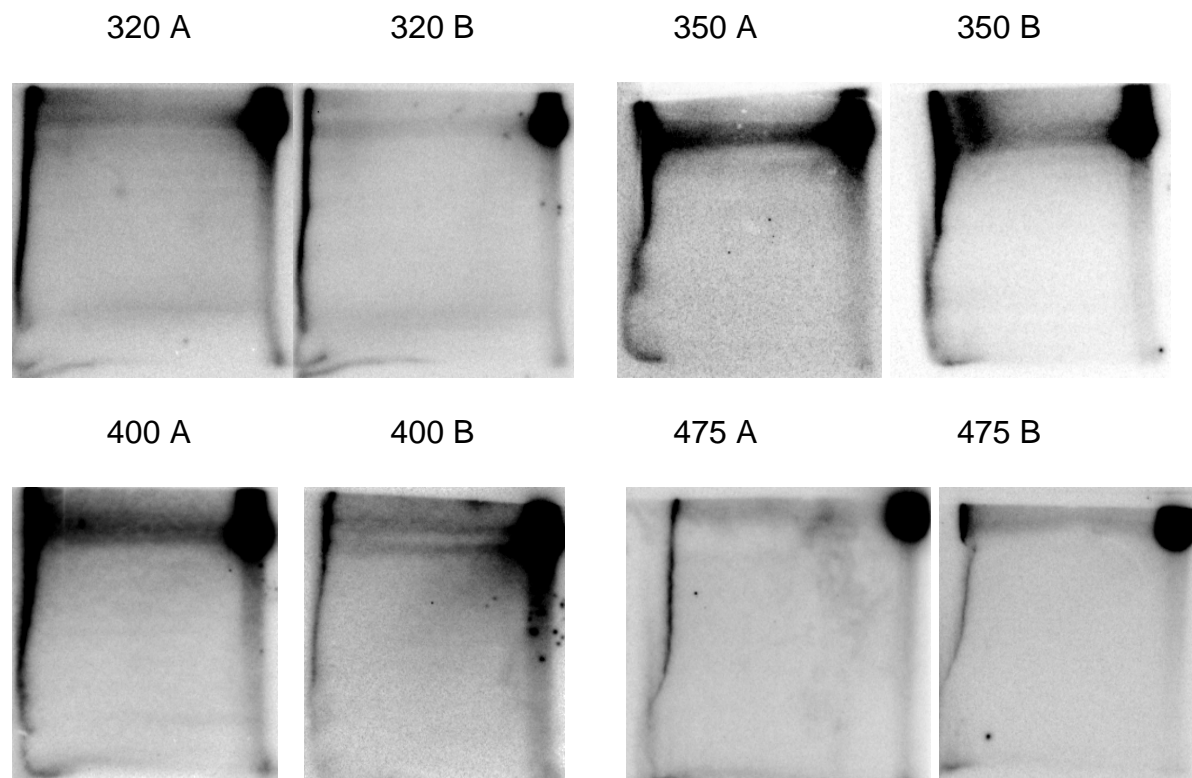
Tabelle 3: Vergleich der RAL-Werte vor und nach der Schicht

DNA-Addukt	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Häufigkeit des DNA-Addukts	99	57	130	142	145	121	58	189	19	21	9	3	2	5	47	5	6	1	19	2	4	1
vor > nach	35	26	43	47	36	33	17	62	6	5	4	2	2	5	9	3	3	1	9	1	3	1
vor = nach	8	1	4	10	14	13	6	4	0	1	0	0	0	0	5	0	0	0	2	0	0	0
vor < nach	12	12	31	23	27	23	17	35	6	6	1	0	0	0	11	0	0	0	3	1	1	0

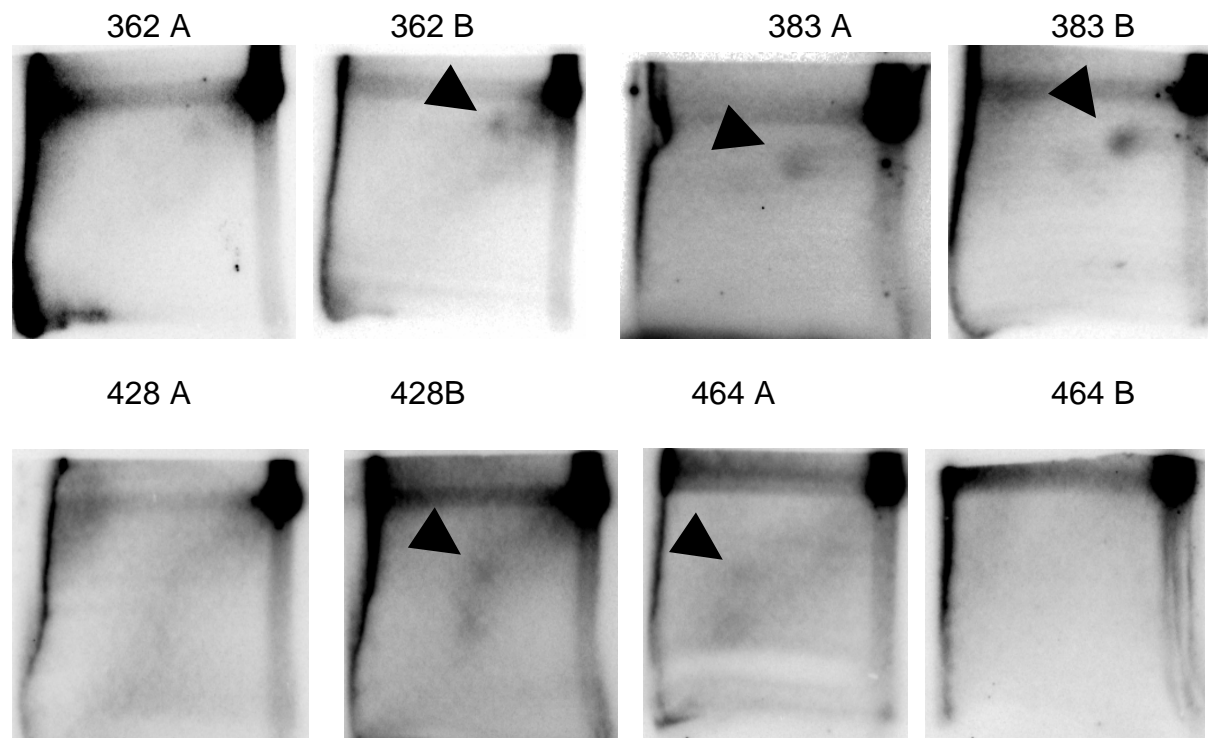
Beispiele von Arbeitnehmern mit chromatografisch unterschiedlichen DNA-Addukten werden in Abbildung 3 aufgeführt. Im Laufe der Untersuchungen haben sowohl die Anzahl als auch die Menge (RAL-Werte) der Addukte abgenommen. Während unter den Arbeitnehmern zwischen GUS 196 und GUS 290 nur in wenigen Fällen keine Addukte nachweisbar waren, konnten Arbeitnehmer ab GUS 324 nur noch in wenigen Fällen maximal 2 DNA-Addukte nachgewiesen werden, deren RAL-Werte zumeist unter 3 lagen. In Abbildung 4 sind Beispiele der 2-D-Dünnschichtchromatogramme von untersuchten DNA-Extrakten gezeigt.

Unterschiede sowohl in der Anzahl als auch der Intensität einzelner DNA-Addukte vor und nach der Schicht wie auch zwischen unterschiedlichen Arbeitnehmern sind in Abbildung 4 beispielhaft zusammengefasst. Die RAL-Werte aller untersuchten DNA-Extrakte sind in Anlage 1 zusammengefasst.

Abbildung 4: Autoradiogramme von Arbeitnehmern vor (A) und nach (B) der Schicht.
I. Beispiele für Proben, die keine DNA Addukte zeigen.



II: Beispiele für Proben mit vereinzelt auftretenden DNA-Addukten (Addukte mit Pfeil markiert).



Desweiteren wurde in Kooperation mit Dr. S. Amin und Dr. S. Nesnow chromosomale DNA aus Kalbsthymus mit sechs verschiedenen PAHs behandelt, um DNA-Referenzaddukte für die Analysen zur Verfügung zu haben. Es wurden solche PAHs ausgewählt, von denen die biologische Relevanz bereits dokumentiert wurde, insbesondere für Benzo[c]chrysen-9,10-dihydrodiol-11,12-epoxid, Benzo[g]chrysendiolepoxid, Dibenz[a,l]pyrenediolepoxide, Benzo[c]chrysen-1,2-dihydrodiol-3,4-epoxid, Benzo[a]pyrenediolepoxid und Benzo[c]phenanthrendiol-epoxid. Die DNA-Referenzaddukte wurden zunächst mittels ^{32}P -Postlabeling analysiert. Abbildung 5 zeigt die Ergebnisse des ^{32}P -Postlabeling, die nach Inkubation der DNA mit den sechs verschiedenen PAHs entstanden sind. Diese wurden mittels Massenspektrometrie weiter charakterisiert und die Ergebnisse in Abbildung 5 exemplarisch dargestellt. Auffällig sind die unterschiedlichen Messergebnisse nach ^{32}P -Postlabeling und der MALDI-TOF/TOF Analysen der DNA-Referenzaddukte (siehe Abbildung 5, E und F). Einer der DNA-Referenzaddukte wurde als positive Kontrolle, beginnend mit dem DNA-Extrakt des Arbeitnehmers GUS 383 eingesetzt (Abbildung 6).

Abb. 5: ^{32}P -Postlabeling von DNA-Addukten nach Reaktion von verschiedenen PAHs mit DNA. A: Benzo[c]chrysen-9,10-dihydrodiol-11,12-epoxid; B, Benzo[g]chrysen-diolepoxide; C, Dibenzo[a,l]pyrendiolepoxid; D, Benzo[c]chrysen-1,2-dihydrodiol-3,4-epoxid; E, Benzo[a]pyrendiolepoxid; F, Benzo[c]phenanthrendiolepoxid. Die an der DNA-Adduktbildung beteiligten Nukleotide sind unter den einzelnen Abbildungen angegeben.

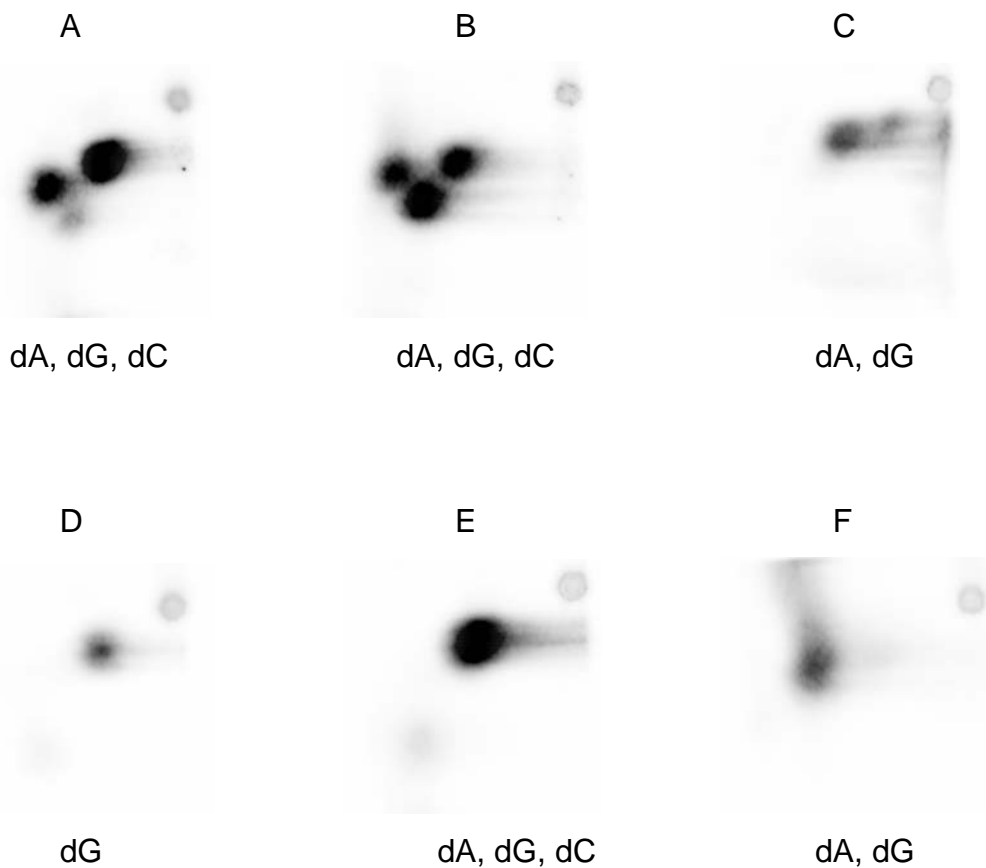
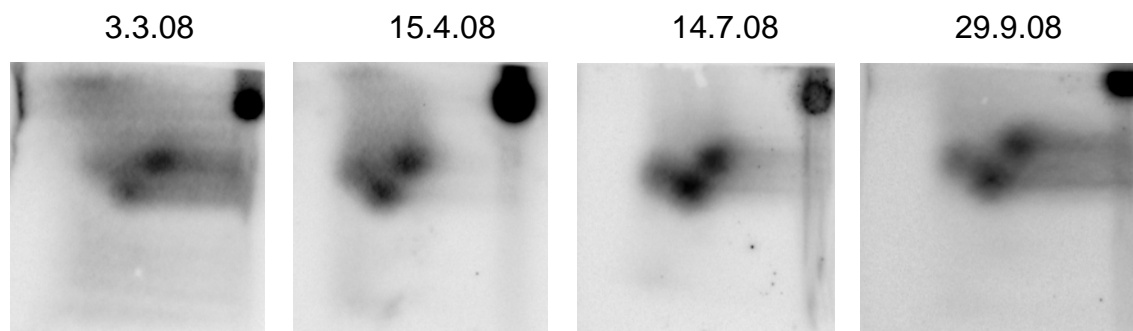


Abbildung 6: Beispiele positiver Kontrollen beim ^{32}P -Postlabeling. Verwendet wurde DNA nach Inkubation mit Benzo[g]chrysen-diol-epoxid zu unterschiedlichen Zeitpunkten.



5.2 Chemische Identifizierung der DNA-Addukte.

Die chemische Identifizierung der DNA-Addukte erfolgte mittels Massenspektrometrie (Maldi-TOF-TOF). Da nicht bekannt ist, wie viele PAHs in Dämpfen und Aerosolen aus Bitumendämpfen vorliegen, die DNA-Addukte induzieren können, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. S. Amin und Dr. S. Nesnow (NIH) 6 PAHs ausgewählt, die als bevorzugte Kandidaten für die DNA-Adduktbildung aus Dämpfen und Aerosolen aus Bitumen betrachtet wurden. Mit diesen PAHs wurden DNA-Addukte in vitro erzeugt. Diese sechs PAHs wurden als Referenzproben zur chemischen Identifizierung der DNA-Addukte in den Blutproben bei der Massenspektrometrie verwendet.

5.2.1 Charakterisierung der sechs ausgewählten DNA-Referenzaddukte mittels Massenspektrometrie und ³²P-Postlabeling.

In Abbildung 5 sind die Ergebnisse des ³²P-Postlabelings mit den 6 Referenzproben abgebildet. Anhand des ³²P-Postlabelings konnte zunächst die Anzahl der entstandenen DNA-Addukte in den Referenzproben ermittelt werden. Mittels Massenspektrometrie wurden die entstanden DNA-Addukte identifiziert und konnten die Nukleotide ermittelt werden, die DNA-Addukte bilden und in der Abbildung für das jeweilige Chromatogramm angegeben sind.

Die Massenspektren der sechs DNA-Referenzaddukte sind in Anlage 2A abgebildet. Von den einzelnen DNA-Addukten konnten verschiedene Zerfallsprodukte identifiziert werden. Das kleinste Fragment bestand nur aus dem Nukleosid, das nächst größere aus dem PAH, gefolgt vom Fragment, bestehend aus Nukleosid und dem PAH (mit Stern in Anlage 2A markiert). Das größte Fragment bestand aus Nukleotid und PAH (jeweils mit dem Namen der Base gekennzeichnet).

Es war erstaunlich, dass beim ³²P-Postlabelling - Auftrennung der DNA-Addukte mittels Dünnschichtchromatografie -, in einigen Fällen weniger unterschiedliche DNA Addukte in den DNA-Referenzaddukten erkennbar waren (Abb. 5E und F) als mittels Massenspektrometrie identifiziert werden konnten. So bildete Benzo[a]pyrendiolepoxid und Benzo[c]phenanthrendiolepoxid mit DNA nur ein Addukt, während die Massenspektrometrie zur Identifizierung von 3 DNA-Addukten mit Adenin, Guanin und Cytosin für Benzo[a]pyrendiolepoxid und von 2 DNA-Addukte mit Adenin, Guanin für Benzo[c]phenanthrendiolepoxid führte.

5.2.2 Untersuchungen der DNA von Arbeitnehmern auf DNA-Adduktbildung mittels Massenspektrometrie.

Insgesamt wurden 86 DNA-Proben von Arbeitnehmern mittels Massenspektrometrie analysiert. Die Summe der RAL-Werte dieser Proben lag über 20. Die aufgenommenen Massenspektren wurden mit denen der DNA-Addukte der DNA-Referenzaddukte verglichen. Die Massenspektren zeigten jedoch keine Übereinstimmung. Deshalb musste davon ausgegangen werden, dass entweder die Konzentration der entsprechenden DNA-Referenzaddukte in den DNA-Blutproben zu gering oder nicht vorhanden sind. Die Massenspektren der DNA-Blutproben wiesen auf mögliche DNA-Addukte, die möglicherweise nicht durch PAHs induziert wurden. In Anlage 2 B sind Beispiele der Massenspektrometrie gezeigt (die größten Molekülmassen sind mit Stern markiert).

5.2.3 Vergleichend Untersuchungen im Gewebe exponierter Ratten.

In der isolierten DNA aus humanen Blutproben konnten keine DNA-Addukte mittels Massenspektrometrie identifiziert werden, die den sechs DNA-Referenzaddukten entsprechen. Weiterhin wiesen die Massen der identifizierten Addukte darauf hin, dass möglicherweise DNA-Addukte ohne Beteiligung von PAHs vorlagen.

Aus diesem Grunde wurden aus einer anderen Studie, in denen Ratten Dämpfen und Aerosolen aus Bitumen exponiert wurden, extrahierte DNA aus Nasenepithel ebenfalls massenspektrometrisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass jeweils drei DNA-Addukte identifiziert werden konnten. Aufgrund ihrer Molekülmassen lassen sie den Schluss zu, dass PAHs an der Adduktbildung beteiligt sind, die größer als die PAHs der sechs DNA-Referenzaddukte sind. Anlage 2 C zeigt das Massenspektrum dieser Untersuchung (die drei DNA Addukte sind mit Stern markiert). Mittels ³²P-Postlabeling wurden im Nasenepithel ebenfalls 3 DNA-Addukte identifiziert (Halter et al., 2007), so dass hier eine Übereinstimmung vorlag.

5.3 Bestimmung von Mutationen in ausgewählten Genen

5.3.1 Überblick

Für die Bestimmung von Mutationen wurde DNA aus Blutproben nach der Schicht verwendet. Ein Vergleich vor und nach der Schicht wurde nicht durchgeführt, da Mutationen nicht innerhalb einer Arbeitsschicht auftreten und nachweisbar sind. Insgesamt wurden 230 verschiedene Proben analysiert.

Für die Mutationsanalysen wurden acht Gene ausgewählt, nämlich fünf Tumorsuppressorgene (TP53, CDKN2A (INK4A), FHIT, CADM1, TSG101) und zwei Protoonkogene (HRAS, EGFR), denen eine Beteiligung an der Entstehung des Lungenkrebs zugeschrieben wird. Zusätzlich wurde das Gen HPRT1 in die Untersuchungen miteinbezogen. Tabelle 4 zeigt einen Überblick über die untersuchten Gene und ihre allgemeine genomische Struktur. Von diesen wurden jene Sequenzabschnitte untersucht, die in der Literatur als so genannte "hot spots" für Mutationen insbesondere in Lungentumoren angesehen werden oder solche die wichtige Bindungsstellen für andere regulatorische Proteine besitzen. So wurde beispielsweise für *TP53*, das für 11 Exons kodiert, die Exons 5 bis 8 untersucht, die wiederum Bindungsstellen kodieren und "hot spots" für Mutationen sind ("hot spots" sind Nukleotidpositionen eines Gens, in denen bevorzugt Mutationen beobachtet werden) (Toyooka et al., 2003).

Tabelle 4: Übersicht über die ausgewählten Gene für die Sequenzanalysen.

Gen	Funktion	Chromosomale Lokalisation	Genomische Struktur	Codierende Exons
<i>TP53</i> Tumorprotein p53	Tumorsupressor	17p13.1	11 Exons, mRNA 2640 bp, 393 Aminosäuren	10
<i>HRAS</i> v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog	Protoonkogen	11p15.5	7 Exons, mRNA 1095bp, 189 Aminosäuren	4
<i>HPRT</i> Hypoxanthine phosphoribosyltransferase	Reportergen für Umwelt induzierte Mutationen	Xq26.1	9 Exons, mRNA 1323 bp, 218 Aminosäuren	9
<i>EGFR</i> Epidermaler wachstumsfaktor-rezeptor	Protoonkogen	7p12	28 Exons, mRNA 5599 bp, 1210 Aminosäuren	28
<i>CDKN2A (p16^{Ink4a})</i> Cyclin-abhängige Kinaseinhibitor 2A	Tumorsupressor	9p21	3 exons, mRNA 1160 bp, 156 Aminosäuren (Isoform INK4a)	3
<i>FHIT</i> Fragile histidine triad	Tumorsupressor	3p14.2	5 exons mRNA 444 bp, 147 Aminosäuren	5
<i>CADM1 (TSLC1)</i> Zelladhäsionsmolekül 1	Tumorsupressor	11q23.2	10 exons, mRNA 1329-bp, 442 Aminosäuren	10
<i>TSG101</i> Tumor susceptibility gene 101	ursprünglich Tumorsupressor, neuere Arbeiten zeigen Gen- und Proteinüberexpression in Krebs	11p15	10 exons, mRNA 1530 bp, 390 Aminosäuren	10

Hinweise zur Nomenklatur von Einzelnukleotidpolymorphismen finden sich bei "den Dunnen und Antonarakis, 2001".

Die Positionen der Sequenzunterschiede innerhalb der kodierenden Region in Exons beziehen sich auf das 1. Nukleotid A des Startkodons ATG. Beispielsweise bedeutet c.63A>G, dass Adenin 63 gegen G ausgetauscht wurde (gerechnet wurde vom Startkodon ATG).

Sequenzunterschiede in Introns werden wie folgt angegeben. c.672 +62 A>G *TP53* bedeutet, dass 62 Basen von der Nukleotidposition 672 (ist das letzte Nukleotid im Exon 6 des TP53 Gens) ein Basenaustausch im Intron erfolgte. Sofern die Einzelnukleotidpolymorphismen (single nucleotide polymorphism = SNP) in der

Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) registriert sind, werden die entsprechende Referenznummern aus der Datenbank angegeben. Die Referenznummer für dbSNP c.672 +62 A>G TP53 ist rs1625895. Das Kürzel db (database) vor SNP bedeutet, dass dieser SNP in der Datenbank registriert ist. Die identifizierten Substitutionen werden wie folgt dargestellt. A > G bedeutet, dass Nukleotid A vollständig durch G ersetzt wird. Erscheint der Buchstabe R, M, S, K, W und Y zeigt die Sequenzanalyse an der gleichen Position einen Doppelpeak jeweils für zwei verschiedene Nukleotide, wobei R das Symbol für A + G, M für A + C, S für G + C, K für G + T, W für A + T und Y für C + T darstellt.

In den Anlage 3A bis 3H sind beispielhaft Chromatogramme für einzelne Probanden dargestellt. Probanden mit dem gleichen Chromatogramm sind in den Tabellen zusammengefasst. In den Tabellen sind die identifizierten SNPs angegeben. Nummern unter den jeweiligen Exons geben eine Kurzbeschreibung der Chromatogramme wieder, die in Tabelle 5 aufgelistet sind. Sofern keine veränderte Nukleotidsequenz vorliegt, sind diese gelb markiert.

Tabelle 5: Kodenummern und die dazu gehörige Beschreibung
der Chromatogramme

Kode	Beschreibung des Chromatogramms
1	identisch mit Referenz
2	Doppelpeak vor dem Hauptpeak
3	Doppelpeak vor dem Hauptpeak , näher am Hauptpeak als 2
4	Peak nach links verschoben
5	3 Peaks
6	Peak nach rechts verschoben
7	4 Peaks
8	Peak vor dem Hauptpeak
9	Welle vor dem Hauptpeak
10	Welle vor den Hauptpeak und Hauptpeak nach links verschoben
11	Welle vor den Hauptpeak und Hauptpeak nach rechts verschoben
12	ein Doppelpeak der nach links verschoben ist
13	Doppeleak
14	Welle vor dem Doppelpeak
15	Doppelpeak und nach rechts verschoben
17	2 Wellen vor dem Hauptpeak, der Hauptpeak nach links verschoben
18	Hauptpeak ist sehr breit
19	Welle nach links verschoben, kein Hauptpeak
20	Schulter am Hauptpeak
21	Schulter am Hauptpeak und Hauptpeak nach rechts verschoben
22	Schulter am Hauptpeak und Hauptpeak nach links verschoben
23	5 Peaks
24	Peak vor dem Hauptpeak und der Hauptpeak ist nach rechts verschoben
25	viele Peaks
26	viele Peaks, abweichend von Nr. 25

In den folgenden Abschnitten sind die Ergebnisse der untersuchten Gene beschrieben.

5.3.2 TP53

TP53 ist ein Tumorsupressorgen, das für einen Transkriptionsfaktor kodiert, der an der Kontrolle vieler verschiedener zellulärer Prozesse beteiligt ist. Hierzu zählen u.a. die Zellproliferation, Homeostase, Apoptose und DNA-Reparatur. Veränderungen im TP53 sind häufig in verschiedenen menschlichen Tumoren anzutreffen (Petitjean et al. 2007a; Petitjean et al. 2007b). In der IARC TP53 DATABASE (<http://www-p53.iarc.fr>) sind alle bekannten genetische Variationen für TP53 aufgeführt. Bisher sind 24810 Fälle von somatischen Mutationen und 399 Keimbahnmutationen

beschrieben. Somatische Mutationen werden häufig in menschlichen Tumoren vorgefunden. Keimbahnmutationen führen zur frühen Ausbildung von Krebs und wird als Li-Fraumeni Syndrom (LFS) bezeichnet.

Für TP53 werden häufig "missense" Mutationen vorgefunden, das zu fehlerhaftem TP53 Protein führt. Diese Mutationen treten vornehmlich in der DNA-Bindungsdomäne auf. Die Mutationshäufigkeit in den einzelnen Kodons variiert jedoch beträchtlich zwischen den Tumortypen und hängt von der Zugänglichkeit und Exposition der einzelnen Kodons gegenüber Mutagenen ab.

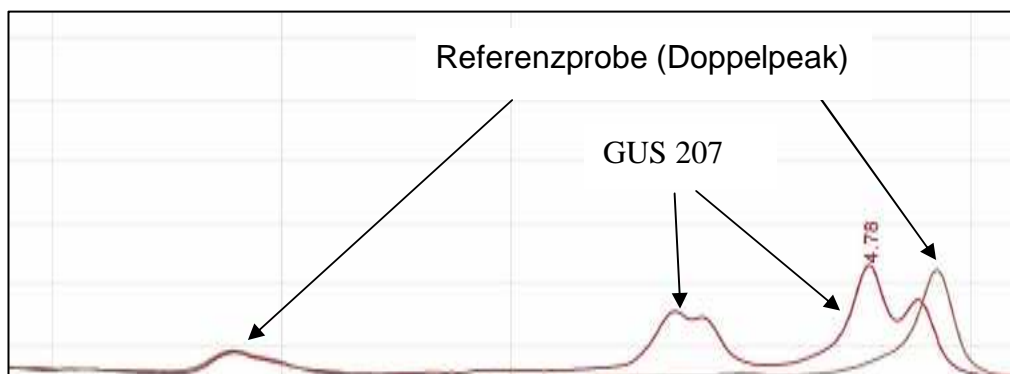
Lungentumore werden zu 90% durch Karzinogene in Zigarettenrauch induziert. Dabei binden im Zigarettenrauch vorliegende polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH) an Nukleotide in verschiedenen Kodons des TP53 Gens, die in Lungentumoren mutiert sind (Denissenko et al. 1996;Smith et al. 2000b). So ist bekannt, dass beispielsweise Benzo[a]pyrene diol epoxide (B[a]PDE, BPDE), Transversionen von G nach A im TP53 Gen induziert und zwar bevorzugt mit den Guaninen in den Kodons 157 and 158 im Exon 5, 245 and 248 im Exon 7 und im Kodon 273 im Exon 8. Diese Positionen sind so genannte "hot spots" im TP53 Gen. Weitere PAHs, die im TP53 Gen an Exon 5, 7 und 8 bevorzugt an bestimmte Positionen binden, sind Chrysen (CDE), 5-Methylchrysen (5-MCDE), 6-Methylchrysen (6-MCDE), Benzo[c]phenanthren (B[c]PDE), and Benzo[g]chrysen (B[g]CDE) (Smith et al. 2000a). Neben den bereits erwähnten Positionen unterscheiden sich die PAHs dadurch, dass einige zusätzlich Addukte in den Kodons 154, 156, and 159 im Exon 5 und im Kodon 237 im Exon 7 bilden können und deshalb ebenfalls "hot spots" darstellen. Diese "hot spots" liegen alle innerhalb von CpG Nukleotidklustern, die gewöhnlich methyliert sind und deshalb vermuten lassen, dass methylierte CpG Dinukleotide bevorzugte Ziele für exogene chemische Karzinogene darstellen (Denissenko et al. 1997;Yoon et al. 2001;Chen et al. 1998).

Das humane TP53 Gen befindet sich auf Chromosom 17 an Position 17p13.1, besteht aus 11 Exons mit einer Transkriptlänge von 2640 bp und kodiert 393 Aminosäuren (siehe http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/). Auf Grund der Datenlage (siehe oben), dass die meisten Mutationen im TP53 in den Exons 5-9 identifiziert wurden, wurden für die dHPLC Analysen diese Exons und ihre flankierenden Introns ausgewählt. Da Exon 8 und 9 sehr klein sind und auch das dazwischen liegende Intron sehr klein ist, konnte dieser Bereich in einem Fragment untersucht werden.

Exon 5 zeigte kein auffallendes dHPLC Chromatogramme. Jedoch zeigten die Einzelpeaks im Vergleich zur Referenz eine Verschiebung des Einzelpeaks vor oder hinter den Referenzpeak. (Anlage 3A). Diese Verschiebung wurde in 109 Proben beobachtet; in 7 Fällen nach rechts und in 102 Fällen nach links. Die exemplarisch durchgeführten Sequenzanalysen einzelner Proben mit solche verschobenen Einzelpeaks zeigte jedoch das Fehlen jeglicher Sequenzunterschiede.

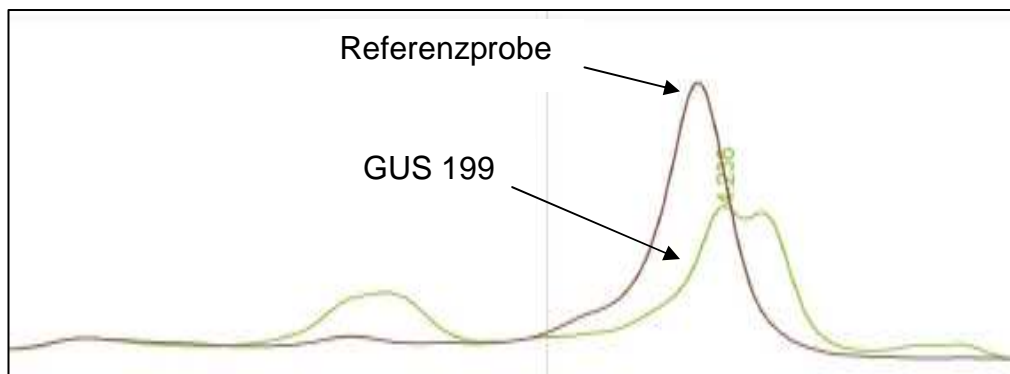
Die Referenzprobe für Exon 6 war positiv für einen bekannten im Intron liegenden dbSNP (rs1625895, NM_000546.3:c.672+62A>G) und zeigte deshalb einen charakteristischen Doppelpeak im Chromatogramm. Dieser dbSNP wird häufig auch unter Europäern vorgefunden. Die dHPLC Analysen haben neben den erwarteten Doppelpeaks auch Einzelpeaks wie auch zusätzliche Muster gezeigt. Auch hier ergab die Sequenzanalyse repräsentativer unterschiedlicher Chromatogramme keine Sequenzabweichungen im Exon 6. Die verschiedenen Chromatogramme sind auf den dbSNP rs1625895 zurückzuführen sowie einer weiteren identifizierten Sequenzvariation im Intron c.672+93 C>T. Diese neue Sequenzvariation wurde bislang nicht als dbSNP beschrieben. Auch hier traten ebenfalls wieder Verschiebungen der Chromatogramme in 162 Proben auf, die jedoch nicht durch Sequenzvariationen verursacht wurden. Abbildung 7 zeigt das Chromatogramm von GUS 207, wo in der Intronsequenz um Exon6 der bekannte dbSNP c. 672+62A>R (rs1625895) sowie ein bislang unbekannter SNP c.672+93C>Y identifiziert wurde.

Abbildung 7: Chromatogramm (TP53/Exon6) der Probe GUS207: Die Referenzprobe zeigt aufgrund des Vorliegens eines dbSNPs einen Doppelpeak (mit Pfeil markiert). Die Probe GUS207 zeigt zusätzlich 2 Peaks.



Exon 7 zeigt im Chromatogramm Doppelpeaks (Abbildung 7). Obwohl hier in Einzelfällen die Amplifikate auch kloniert und sequenziert wurden, konnten keine Sequenzveränderungen identifiziert werden. In zwei untersuchten Proben war es jedoch nicht möglich, mittels PCR das entsprechende Fragment zu amplifizieren.

Abbildung 8: Chromatogramm der Probe GUS199,T353 Exon7. Die Probe GUS199 zeigt zusätzliche Peaks, aber keine Sequenzvariation.



Für Exon 8 und 9 wurden jeweils unterschiedliche Chromatogramme und verschobene Peaks vorgefunden. Aber auch hier zeigten repräsentative Sequenzanalysen keine Sequenzunterschiede (Anlage 3A).

5.3.3 HRAS

HRAS (v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog) gehört zur RAS Familie der Protoonkogene zu denen auch K(Kirsten)RAS und N(Neuroblastoma)RAS zählen. Diese Genfamilie kodiert Proteine mit 21 kD, die an der Innenseite der Zellmembran liegen und eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung spielen. Dieser RAS-Signalweg ist an der Tumorinitiation, des Tumorwachstums und der Metastasebildung beteiligt (Giehl 2005). Eine Aktivierung des RAS-Signalweges durch Mutation der RAS Proteine begünstigt die Tumorbildung indem zahlreiche zelluläre Prozesse wie Genexpression, Zellzyklus, Zellteilung und das Überleben der Zelle gestört werden. HRAS kodiert ein Protein, dass die Zellteilung nach Stimulierung durch Wachstumsfaktoren reguliert (siehe <http://0-ghr.nlm.nih.gov.-catalog.llu.edu/gene=hras>).

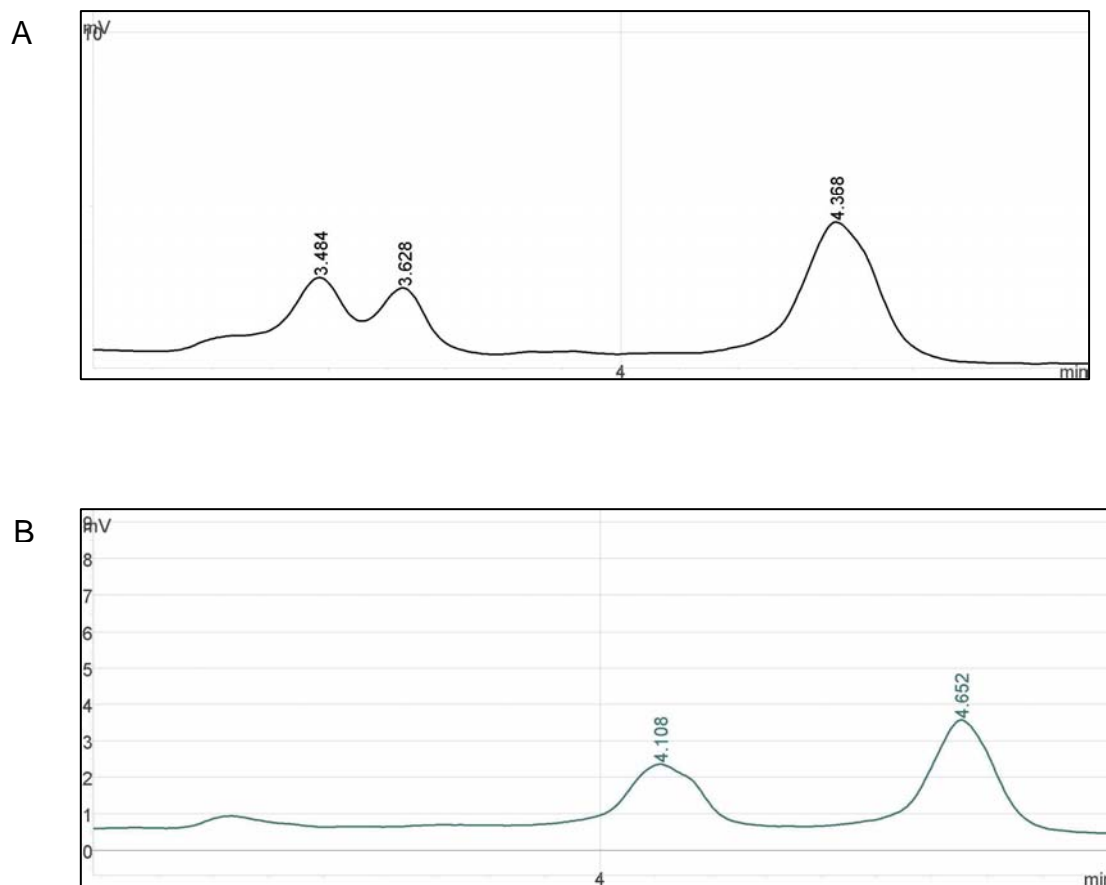
Keimbahnmutationen von HRAS wurden in Patienten mit dem Costello Syndrom vorgefunden und zeigen Entwicklungsstörungen, Wachstumsstörungen, Anomalien des Herzens und Skeletts und eine Neigung zur Entwicklung von sowohl gutartigen als auch bösartigen Neoplasien (Rauen 2007). Die Mutation im HRAS Gen beim Costello Syndrom hat dazu geführt, dass das HRAS Protein konstitutiv in der aktiven Form vorliegt und selbst nicht mehr reguliert werden kann. Die meisten Mutationen im HRAS Gen betreffen Kodons der Aminosäure Glycin an Position 12 oder 13 (Gly12 and Gly13). Somatische Mutationen im HRAS Gen in den Kodons 12, 13 und 61 wurden ebenfalls in Karzinomen, bevorzugt im Blasenkarinom (Jebar et al. 2005), im Schilddrüsenkarzinom (Nikiforova et al. 2003) und Nierentumoren (Fujita et al. 1988) gefunden.

Das HRAS Gen befindet sich auf Chromosom 11 an Position 11p15.5. Die Länge des Transkripts beträgt 1095 bp und kodiert ein Protein von 189 Aminosäuren (siehe http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/). Für die dHPLC Analyse wurden Exon 2 und 3 ausgewählt, da sie die Kodons 12 / 13, und 61 "hot spots" beinhalten. Hinweise dafür lieferte eine Studie, in der gezeigt wurde, dass Mutationen in den Kodons 12 und 13 mit den RAL-Werten von PAH-Addukten korrelierte (Chakravarti et al. 2008).

Die dHPLC Chromatogramme von Exon 2 zeigten in 14 Fällen Doppelpeaks. In 3 Fällen lagen die Doppelpeaks links und in 11 Fällen rechts vom Hauptpeak. In 91 Fällen wurden Dreifach- und Vierfachpeaks beobachtet. Nach direkter Sequenzanalyse von PCR Fragmenten bzw. nach vorheriger Klonierung der Fragmente wurde ein bekannter und häufig beobachteter SNP, dbSNP rs12628 (NM_005343.2:c.81T>C, NP_005334.1:p.H27H) identifiziert. Dieser SNP kodiert für die Aminosäure Histidin, führt aber trotz Nukleotidaustausch nicht zu einem Aminosäureaustausch. Er wird in verschiedenen Populationen einschließlich Europäern vorgefunden und taucht anhand der Gruppierung der Chromatogramme in gleichen Gruppen in etwa der Hälfte der untersuchten Probanden auf. Ein exemplarisches Chromatogramm ist in Abbildung 9A für GUS199 gezeigt .

Darüber hinaus traten weitere abweichende Chromatogramme mit zusätzlichen Peaks bzw. Peakverschiebungen auf. Hier zeigten entsprechende Sequenzanalysen aber keine Veränderungen (Abbildung 9B). In den als "hot spots" bekannten Kodons 12 und 13 wurden keine Veränderungen festgestellt.

Abbildung 9: A, Chromatogramm von GUS199 mit einer Sequenzabweichung (c.81T>Y); B, Chromatogramm von GUS 247 ohne Sequenzabweichung.



Exon 3 zeigte in 153 Fällen eine Verschiebung von Peaks, die jedoch nicht durch Nukleotidaustausche hervorgerufen wurden (Anlage 3B).

5.3.4 HPRT1

Hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT1) ist auf dem X-Chromosom an Position Xq26.1 kodiert. Es besteht aus 9 relativ kurzen Exons und bildet ein Transcript von 1323 bp, welches für ein Protein von 218 Aminosäuren kodiert (siehe http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/). Keimbahnmutationen des HPRT1 Gens führen zum Lesch-Nyhan Syndrom mit neurologischen und psychiatrischen Behinderungen sowie Stoffwechselstörungen.

HPRT wurde als Reporter gen für somatische Mutationen nach Exposition gegenüber Umweltkarzinogenen eingesetzt (Albertini 2001). HPRT1 spielt eine zentrale Rolle im Purinstoffwechsel durch Phosphoribosylierung von Hypoxanthin and Guanin, aber

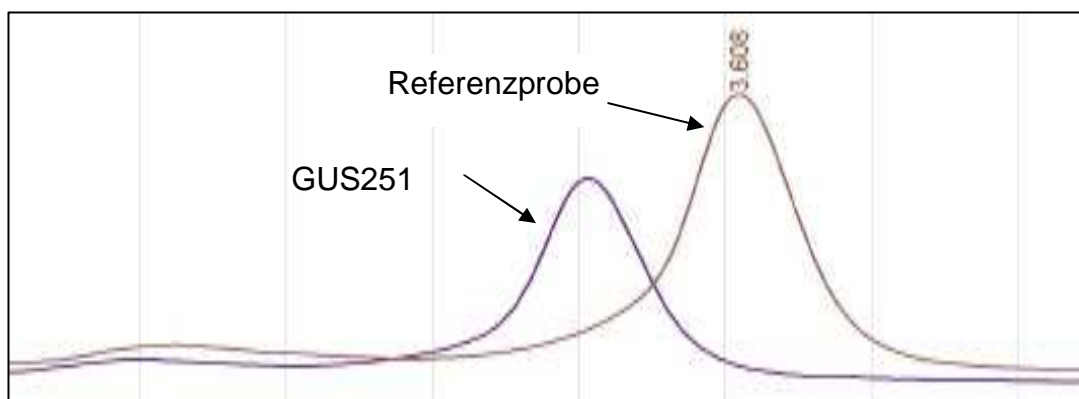
auch beispielsweise von 8-Azaguanin, 6-Thioguanin und 6-Mercaptopurin, die dann aber den Zelltod induzieren. Diese Eigenschaft wird in Studien verwendet, um HPRT1-negative T Lymphozyten für anschließende Mutationsanalysen zu selektieren. Die Bestimmung der Mutationshäufigkeit im HPRT1 Gen wird als ein Maß für die Exposition gegenüber Mutagenen und Karzinogenen verwendet (Perera et al. 1994b; Hou et al. 1995b; Hou et al. 1999b; Liu et al. 2008).

Eine positive Korrelation zwischen aromatischen DNA-Addukten und der Häufigkeit von HPRT1 Mutationen wurde bei Arbeitnehmern in Gießereien und Autowerkstätten gefunden (Perera et al. 1994a; Hou et al. 1995a) und in Lungentumoren von Rauchern (Hou et al. 1999a).

Mutationen im HPRT1 Gen können die Exon-Intron Übergänge betreffen (Hennig et al. 1995). Mutationen wurden aber auch im Exon 3 an der Nukleotidposition 212 und 229 gefunden (Wei et al. 1995). Die Mutationshäufigkeit ist höher, wenn die Zellen sich gerade teilen und das HPRT1 Gen repliziert wird.

Vom HPRT1 Gen wurden alle 9 Exons einschließlich der Exon-Intronübergänge analysiert. Für die dHPLC Analysen für die Exons 4, 7 und 9 wurden zwei unterschiedliche Programme verwendet. Neben den Verschiebungen in den Chromatogrammen nach links oder rechts zeigten viele Proben einen Peak vor der Referenzprobe (Abbildung 10). Die Sequenzanalyse repräsentativer Proben mit verschiedenen Chromatogrammen zeigte keine Veränderungen in der Nukleotidsequenz (Anlage 3C).

Abbildung 10: Chromatogramm von GUS 251, HPRT1, Exon1.



5.3.5 EGFR

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) kodiert ein Transmembranglykoprotein der Rezeptor-Tyrosinkinasefamilie. Die Bindung von Liganden an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors führt zur Aktivierung der Tyrosinkinase-Domäne des Rezeptors. Tyrosinkinasen (TKs) regulieren Signalwege, die sensible zelluläre Abläufe kontrollieren. Eine durch Mutation konstitutiv aktive TK oder auch eine Überexpression kann zur Krebsbildung beitragen. In Nichtkleinzellkarzinomen der Lunge (NSCLC) wird EGFR häufig überexprimiert (Suzuki et al. 2005). Weiterhin wurde eine Genamplifikation sowie Mutationen in der Tk-Domäne des EGFR Gens in Lungentumoren festgestellt.

In einer Datenbank, basierend auf 26 Publikationen, wurden in 809 Fällen somatische Mutationen im EGFR Gen in NSCLCs gefunden (Gu et al. 2007).

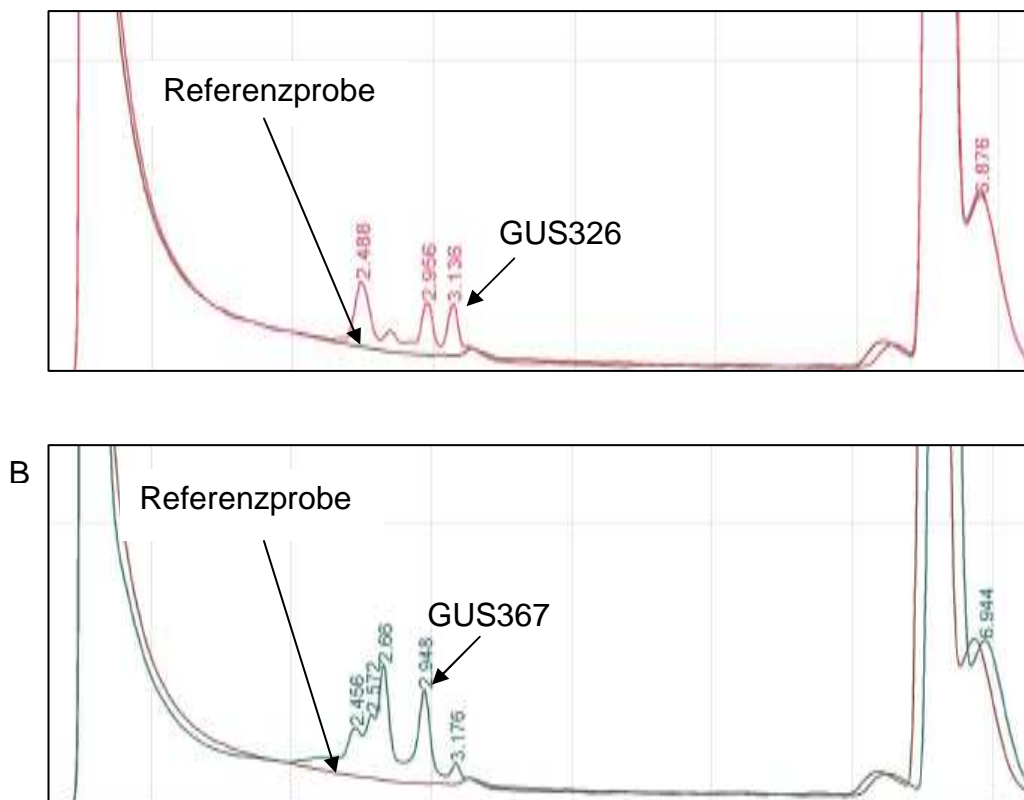
Vier "super hotspots" stellen 70% aller bekannten Mutationen während Zweidrittel von 131 Mutationen nur einmal in NSCLCs gefunden wurden und nur 11% aller Mutationen ausmachten. Die meisten Mutationen sind Austausch einzelner Aminosäuren, Mikrodeletionen und Mikroinsertionen ohne Unterbrechung des Leserasters oder Insertionen bei gleichzeitiger Deletion (können zum Verlust oder Zunahme von 1 bis 50 Nukleotiden führen).

Das EGFR Gen liegt auf Chromosome 7 (7p12) und besteht aus 28 Exons mit einer Transkriptlänge von 5599, die für ein Protein aus 1210 Aminosäuren kodieren (siehe http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/). Mutationsanalysen im EGFR Gen wurden in den Exons 18 bis 21 durchgeführt. Diese Region kodiert die intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne und liegt häufig durch Mutationen in einer konstitutiv aktiven Form vor.

Die Chromatogramme von Exon 18 ergaben keine Hinweise für Sequenzunterschiede. Es wurde nur Verschiebungen des Hauptpeaks in drei Fällen nach rechts bzw. in 98 Fällen nach links beobachtet (Anlage 3D).

Die Analysen von Exon 19 zeigten neben den Verschiebungen zusätzliche Peaks (Anlage 3D). Die Sequenzanalyse einzelner Probanden führte zur Identifizierung von drei in Introns vorliegenden dbSNPs: rs2017000 (NM_005228.3:c.2283+96A>G), rs17337135 (NM_005228.3:c.2283+69G>A) und rs17290378 (NM_005228.3:c.2283+125T>C). Das Muster in den Chromatogrammen war von der jeweils vorliegenden Kombination dieser dbSNPs abhängig (Abbildung 11).

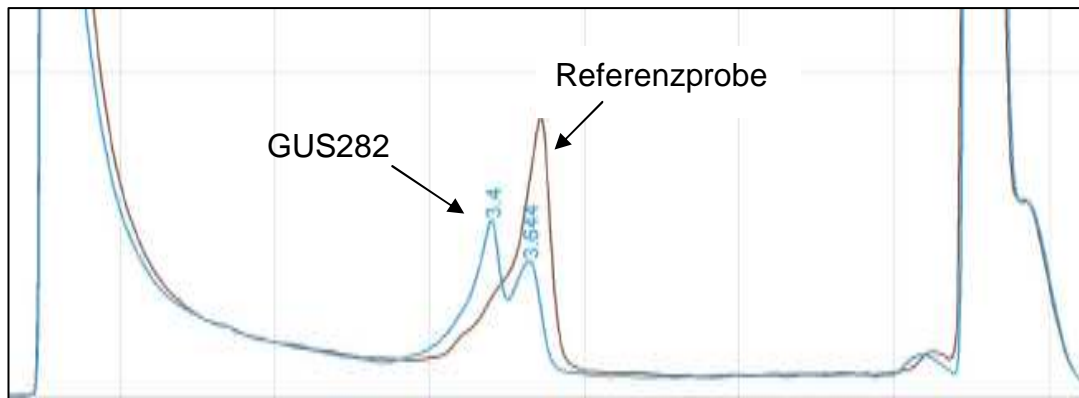
Abbildung 11: Chromatogramme mit abweichenden Peaks von der Referenzprobe A id die dazu gehörigen Sequenzvariationen. A, GUS 326 mit dbSNPrs2017000 und rs17290378; B, Gus 367 mit dbSNP rs17337135 und rs17290378.



Auch in den Chromatogrammen von Exon 20 tauchten häufig 2 bis 3 Peaks zusätzlich auf. Auch hier waren diese Zusatzpeaks auf drei genetische Variationen zurückzuführen. Zwei lagen in Intronsequenzen, davon war ein SNP in der Datenbank registriert: dbSNP rs10241451 (c.2284-60T>C): Ein weiterer SNP (c.2284-21C>Y) ist nicht in der Datenbank aufgeführt. Ein dbSNP rs1050171 (c.2361G>A, p.Q787Q) lag im Exon, das jedoch nicht zum Austausch der Aminosäure Glutamin führte.

Die dHPLC Chromatogramme von Exon 21 zeigten Verschiebungen und zusätzliche Wellen vor dem Hauptpeak (Anlage 3D). In vier Fällen wurden weitere Peaks identifiziert. Durch Sequenzanalysen konnte gezeigt werden, dass GUS282 heterozygot für dbSNP rs41420046 (c.2487G>A, p.E829E) ist (Abbildung 12) und GUS287 heterozygot für dbSNP rs17290559 (c.2508C>T, NP_005219.2:p.R836R). Beide Sequenzunterschiede liegen im Exon, führen aber nicht zum Austausch der codierten Aminosäuren (Abbildung 12).

Abbildung 12: Chromatogramm von GUS 282 mit abweichenden Peaks von der Referenzprobe als Folge des identifizierten dbSNP.



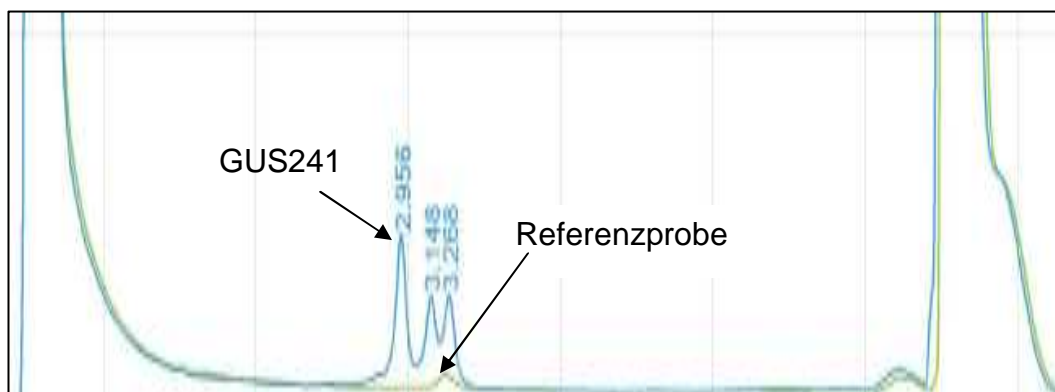
5.3.6 CDKN2A (INK4A)

CDKN2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A), ist ein Tumorsuppressorgen auf Chromosom 9p21. Dieser Bereich ist häufig in Lungenkrebs deletiert (Sato et al. 2005; Blons et al. 2008b). Das Gen kodiert zwei verschiedene Transkriptvarianten, die sich im ersten Exon (Exon 1 α und Exon 1 β) unterscheiden (Ruas and Peters 1998). Die kodierten Proteine, p16^{Ink4a} und p14^{ARF} hemmen den Zellzyklus. p16^{Ink4a} hemmt die Phosphorylierung des Retinoblastomproteins (RB) und verhindert so dessen Inaktivierung. Daher führt der Verlust von p16^{Ink4a} auch zur Inaktivierung von RB. *CDKN2A*/p14^{ARF} stabilisiert den Tumorsuppressor TP53. Der Verlust beider Proteine kann deshalb zu unkontrolliertem Zellwachstum führen.

In einer Vielzahl von Tumoren wie der Lunge, Blase, Pankreas und in Melanomen, Gliomen und Gebärmutterhalskrebs, ist das *CDKN2A* Gen häufig durch Mutationen und Deletionen verändert. Eine Datenbank wurde zusammengestellt, die beispielsweise zeigt, dass in 97 Fällen Keimbahnmutationen sowie 776 somatische Mutationen in 30 verschiedenen Tumortypen identifiziert wurden (Murphy et al. 2004). In NSCLCs ist *CDKN2A* (p16^{Ink4a}) häufig durch Hypermethylierung des Promotors inaktiviert (Feng et al. 2008; Tsou et al. 2007; Ota et al. 2006). Eine Methylierung des Promotors wurde auch in Lungentumoren von mit Chrom exponierten Arbeitnehmern gefunden, wodurch kein *CDKN2A* (p16^{Ink4a}) Protein gebildet wurde (Kondo et al. 2006). Darüber hinaus ist bekannt, dass in NSCLCs *CDKN2A* (p16^{Ink4a}) in beiden Allelen Exon 2 deletiert sein kann (Kraunz et al. 2006).

Die hier durchgeführten Untersuchungen betrafen die Sequenzen, die p16^{Ink4a} kodieren, das ein Transkript von 1160 bp bildet und ein Protein von 156 Aminosäuren kodiert (siehe http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/). Die PCR Primer für Exon 2 lagen in den Introns, um mögliche Deletionen zu finden. Für Exon 1, konnte in 2 Fällen für GUS332 und GUS387 kein PCR-Fragment amplifiziert werden. Neben den Verschiebungen des Hauptpeaks wurde häufig eine Welle oder ein zusätzlicher Peak vor dem Hauptpeak in den Chromatogrammen beobachtet (Anlage 3E). Sequenzunterschiede wurden aber nicht nachgewiesen. Die Chromatogramme von Exon 2 zeigten in zehn Fällen drei Peaks (siehe Abbildung 13). Nach Sequenzanalyse wurde im Arbeitnehmer GUS241 eine in der Datenbank vorliegende Sequenzvariante im Exon 2 nachgewiesen (dbSNP rs3731249, NM_000077.3:c.442G>A, NP_000068.1:p.A148T). In diesem Fall führte die genetische Variation zum Austausch einer Aminosäure. In diesem bekannten dbSNP wird Alanin durch Threonin ersetzt. Gesundheitliche Folgen sind bislang nicht bekannt.

Abbildung 13: Chromatogramm von GUS241 mit abweichenden Peaks von der Referenzprobe als Folge des identifizierten dbSNP rs3731249



5.3.7 FHIT

FHIT (fragile histidine triad) ist ein Tumorsuppressorgen auf Chromosome 3p14.2, dessen molekulare Organisation aus fünf Exons, einem Transkript von 444 bp und einem Protein aus 147 Aminosäuren besteht (siehe http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/). Das Gen befindet sich an einer Stelle des Chromosoms, welche als äußerst instabil gilt. Dies führt dazu, dass intragenische, hemi- und homozygote Deletionen vorkommen, die in vielen Krebserkrankungen,

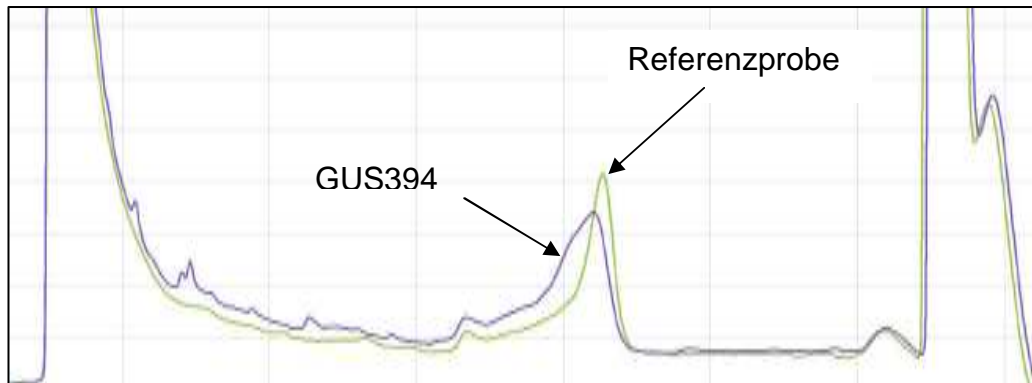
vornehmlich in Lungenkrebs (Smith et al. 2007) beobachtet werden. Der Verlust der Proteinexpression wird nicht nur durch Deletion des Gens verursacht, sondern auch durch Hypermethylierung des Promotors sowie abnormale Transkriptionen (Zochbauer-Muller et al. 2001; Kim et al. 2004; Tzao et al. 2004; Wali et al. 2006). Über den Mechanismus der Tumorsupressorwirkung von FHIT ist wenig bekannt. Es gibt Hinweise, dass FHIT am Ras/Rho Signalweg beteiligt ist (Jayachandran et al. 2007).

Von FHIT wurden alle 5 Exons mittels dHPLC analysiert. Die Chromatogramme zeigten für Exon 1 in allen untersuchten Proben einen Einzelpeak, der manchmal nach links oder rechts verschoben war. Sequenzanalysen zeigten aber keine Nukleotidaustausche.

Für Exon 2 wurden 2 Programme mit unterschiedlichen Schmelztemperaturen eingesetzt, um möglichst alle möglichen Mutationen im Fragment erfassen zu können. In 30 Fällen konnten jedoch keine Ergebnisse erzielt werden. Die erhaltenen Chromatogramme zeigten Verschiebungen des Hauptpeaks (Anlage 3F). Nach Klonierung des PCR-Produkts vom Arbeitnehmer GUS242 wurden in vier Klonen keine Sequenzvarianten identifiziert. Ein fünfter Klon zeigte den Austausch eines Nukleotids im kodierenden Bereich, der jedoch nicht zum Austausch einer Aminosäure führte (c. 138C>T, R46R).

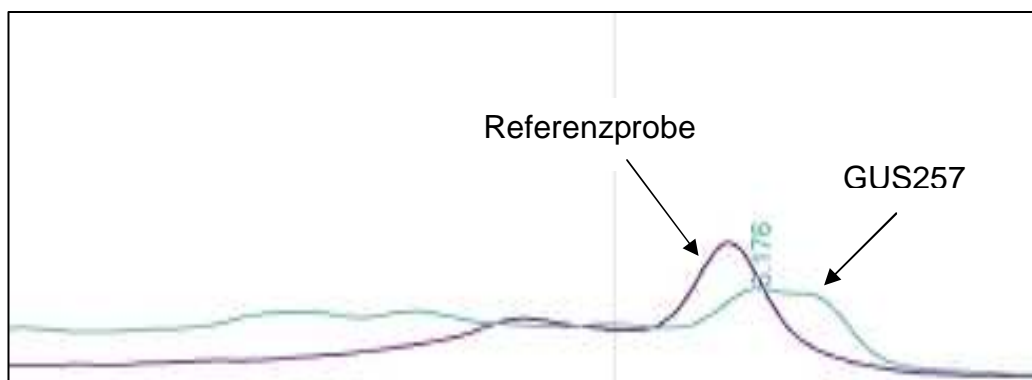
Exon 3, zeigte in vielen Chromatogrammen eine Welle vor dem Hauptpeak (Abbildung 14). Die Sequenzanalyse einer repräsentativen Probe führte zur Identifizierung eines bekannten SNP: dbSNP rs255497 (c.264C>T, p.A88A) im Exon 3, der häufig unter Europäern vorkommt.

Abbildung 14: Chromatogramm mit eine Welle vor dem Hauptpeak im Vergleich zur Referenz.



Abnormale Chromatogramme wurden bei der Analyse des Exon 4 vorgefunden (Abbildung 15). Sequenzanalysen repräsentativer Proben führte zur Identifizierung eines bekannten SNP, der im kodierenden Bereich des Exons liegt, aber keinen Aminosäureaustausch hervorruft: dbSNP rs1385816 (c.294T>C, p.H98H). Zwei weitere Nukleotidaustausche wurde im Intronbereich nachgewiesen: c.280-142G>R und c.280-125T>K. Diese SNPs sind bislang in der Datenbank nicht aufgeführt.

Abbildung 15: Chromatogramm von GUS257 mit abweichenden Peaks von der Referenzprobe, die auf einem Nukleotidaustausch im Intronbereich und einem Austausch im Exon 4 zurückzuführen ist: dbSNP rs1385816 (c.294T>C, p.H98H) und c.280-125T>K



Auch bei der Analyse des Exon 5 wurden abnormale Chromatogramme vorgefunden. Sequenzanalysen repräsentativer Proben führte zur Identifizierung zweier

Nukleotidaustausche im Intronbereich; c.349-17 T>W und c.349-27 T>Y, die ebenfalls bislang in der Datenbank nicht vorlagen.

5.3.8 CADM1 (TSLC1/IGSF4)

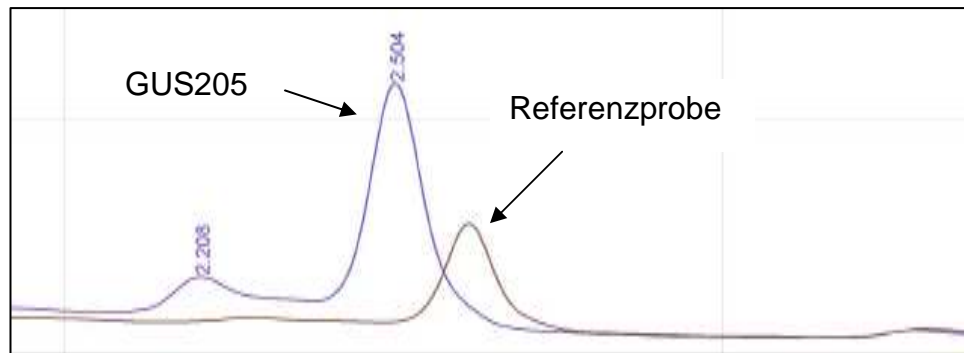
CADM1 (Cell adhesion molecule 1), ein Tumorsuppressorgen auf Chromosom 11q23.2, besteht aus 10 Exons, einer Transkriptlänge von 1329 bp and einem Protein aus 442 Aminosäuren (siehe http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/). In menschlichen Adenokarzinomen der Lunge wurde eine Abnahme wie auch der Verlust der Proteinexpression beobachtet (Ito et al. 2003; Goto et al. 2005). Unter 47 analysierten menschlichen Lungenadenokarzinomen zeigten 40% verminderte CADM1 Expression (Ito et al. 2003). In einer anderen Studie zeigten unter 93 Adenokarzinomen der Lunge 65% einen Verlust der CADM1 Expression (Goto et al. 2005).

CADM1 gehört zur Immunoglobulin-Superfamilie der Zelladhäsionsmoleküle und ist an Zell-Zell Interaktionen beteiligt (Masuda et al. 2002). Das CADM1 Protein ist ein Transmembranglykoprotein, welches mit einer extrazellulären Domäne, der Transmembrandomäne und der zytoplasmatischen Domäne ausgestattet ist (Kuramochi et al. 2001; Masuda et al. 2002). Eine Deletion der zytoplasmatischen Domäne führt zum Verlust der Tumorsuppressoraktivität (Mao et al. 2003). Eine epigenetisch bedingte Abnahme der Proteinmenge wird durch Promotor Hypermethylierung bewirkt und wurde in Lungenkrebs beobachtet (Kuramochi et al. 2001; Fukami et al. 2003 ; Kikuchi et al. 2006). Untersuchungen an 103 NSCLCs haben in 45% der Fälle eine Methylierung des Promotors gezeigt (Kikuchi et al. 2006).

Mittels dHPLC wurden Exon 9 und 10 mit angrenzenden Intronbereichen untersucht. Diese beiden Exons kodieren die zytoplasmatische Domäne.

Exon 9 wurde mit 2 Programmen mit unterschiedlichen Schmelztemperaturen analysiert, um alle möglichen Mutationen erfassen zu können. Sowohl in Analysen der Exon 9 (Abbildung 16) wie auch Exon 10 wurde eine Verschiebung nach rechts oder links des Hauptpeaks im Vergleich zur Referenz DNA beobachtet (Anlage 3G). Sequenzanalysen ergaben aber keine Hinweise auf Sequenzunterschiede (Anlage 3G)

Abbildung 16: Chromatogramm von GUS205 mit einer Verschiebung des Hauptpeaks. Sequenzanalysen ergaben aber keinen Nukleotidaustausch.



5.3.9 TSG101

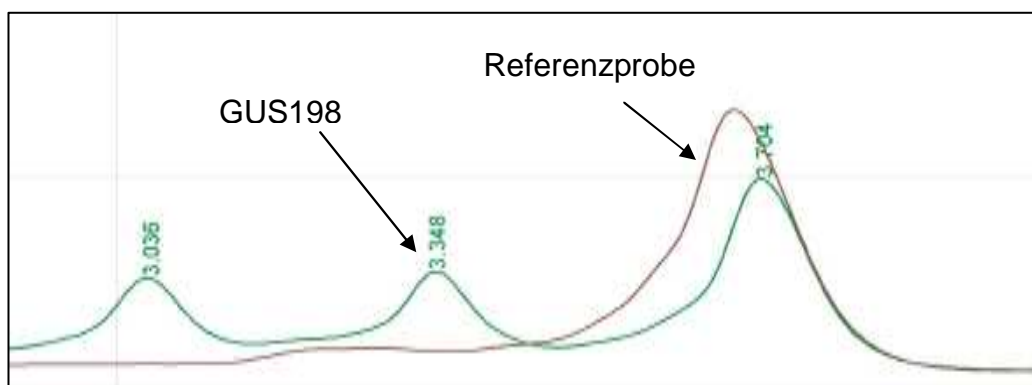
TSG101 (Tumor susceptibility gene 101) liegt auf Chromosom 11p15 und besteht aus 10 Exons. Das Transkript ist 1530- bp lang und kodiert ein 390 Aminosäure großes Protein (siehe http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/). Abnormale Transkripte wurden in verschiedenen menschlichen Tumoren einschließlich Kleinzellkarzinomen der Lunge gefunden (Oh et al. 1998a), die sich jedoch teilweise als alternative und natürlich vorkommende Transkriptvarianten entpuppten (Wagner et al. 1998). TSG101 ist in Mäusen für die Zellproliferation, Überleben der Zelle und der Embryonalentwicklung essentiell (Ruland et al. 2001; Krempler et al. 2002; Wagner et al. 2003; Carstens et al. 2004).

Die Rolle von *TSG101* in der Tumorbildung wird kontrovers diskutiert. *TSG101*, dem Tumorsupressoraktivität zugesprochen wird, ist in menschlichen Krebserkrankungen überexprimiert vorgefunden worden, so bspw. in Schilddrüsenkrebs (Liu et al. 2002), in Bindegewebstumoren des Magen-Darmtrakts (Koon et al. 2004) und im Brustkrebs (Oh et al. 2007). Eine Reduktion von TSG101 Protein inhibiert das Wachstum von Tumorzellen (Zhu et al. 2004). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass in Ovarialkarzinomen TSG101 hochreguliert vorliegt und über den Ras-Signalweg reguliert wird (Young et al. 2007). Mittels dHPLC wurden sämtliche 10 Exon mit angrenzenden Intronbereichen untersucht.

Exon 1 lieferte in 23 Fällen keine Ergebnisse. 13 Probanden zeigten eine Verschiebung des Hauptpeaks nach rechts. Sehr häufig wurden abnormale Chromatogramme beobachtet. So hatten 95 Proben drei Peaks, die nach Sequenzanalyse repräsentativer Proben zur Identifizierung zweier in der Datenbank registrierter, häufig

vorkommender SNP führte, nämlich dbSNP rs1395320 (c.42+127G>C) und dbSNP rs1395319 (c.42+139A>C) (Abbildung 17). dbSNP rs1395320 mit der Base C im Allel findet sich häufig unter Europäern, während das Allel mit der Base G in asiatischen Volksgruppen vorzufinden ist. dbSNP rs1395319 mit der Base A im Allel liegt vornehmlich in asiatischen Volksgruppen vor (Anlage 3H).

Abbildung 17: Chromatogramm von GUS198 mit abweichenden Peaks von der Referenzprobe, die auf die dbSNP r rs1395320 und rs1395319 zurückzuführen sind.

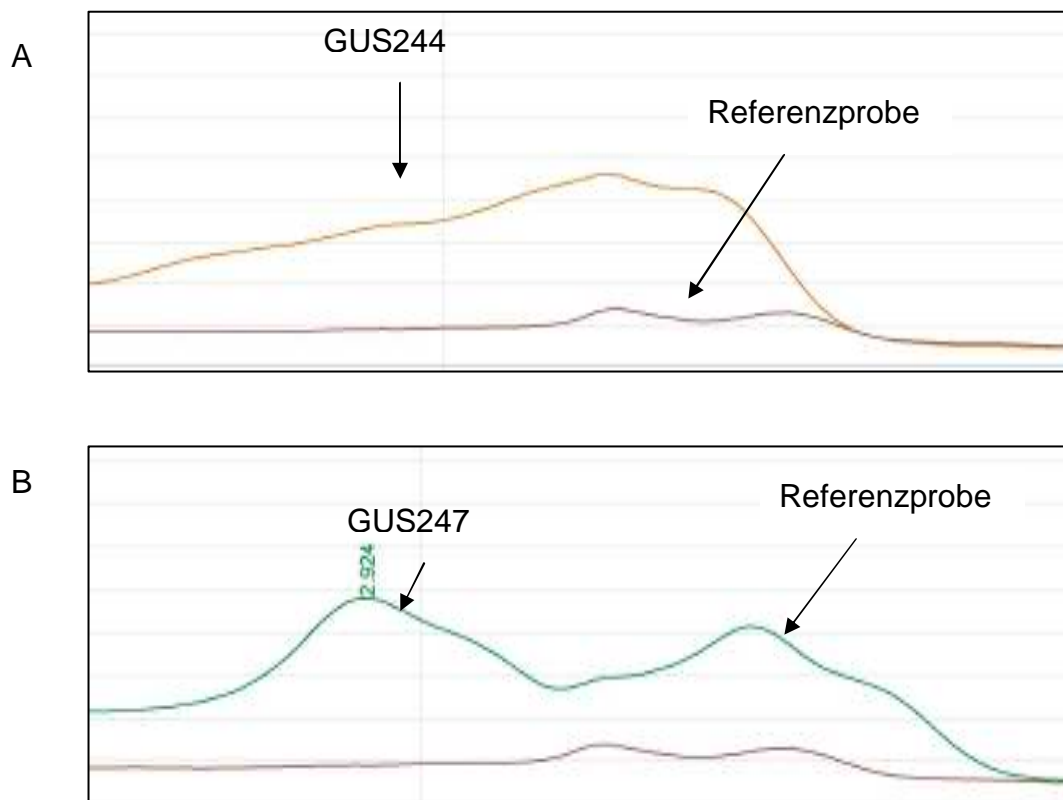


Analysen des Exon 2 zeigte in 178 Fällen einen kleinen Peak vor dem Hauptpeak und in 50 Fällen eine Welle vor dem Hauptpeak. Es wurden aber nach Sequenzierung keine Unterschiede in repräsentativen Analysen gefunden (Anlage 3H). Exon 3 zeigte in 88 Fällen einem Peak vor dem Hauptpeak und in 90 Fällen eine Welle vor dem Hauptpeak. Auch hier wurden keine Sequenzunterschiede in repräsentativen Proben gefunden. Darüber hinaus traten in einigen Fällen abnormale Chromatogramme auf, die in der Sequenzanalyse auch zur Identifizierung zweier bekannter dbSNPs im Intronbereich führte: dbSNP rs7942548 (c.128-89G>A) und dbSNP rs7928872 (c.128-90T>C). Für den dbSNP rs7928872 ist das Allel mit der Base T häufig unter Europäern und Schwarzafrikanern zu finden, während das Allel mit der Base C häufig in asiatischen Volksgruppen vorzufinden ist (siehe Anlage 3H).

Eine Analyse des Exon 4 ergab folgendes Bild: In 135 Proben wurde eine Welle vor dem Hauptpeak gefunden. Die Sequenzanalyse zeigte aber keine Änderungen. Andere abweichende Chromatogramme hatten eine Welle vor dem nach links verschobenen Hauptpeak (37 Proben), eine Welle vor dem Doppelpeak (48 Proben),

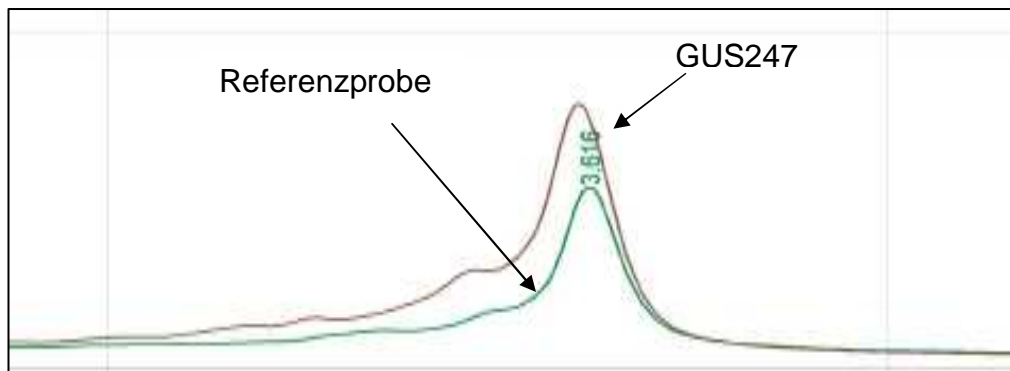
einen sehr breiten Hauptpeak (5 Proben) und ein Peak vor dem Hauptpeak (3 Proben). Die Sequenzanalysen jeweils einer Probe mit einem dieser vier unterschiedlichen Chromatogramme führte zur Identifizierung des intronischen dbSNP rs12574333 (c.357+10C>A) (Abbildung 18).

Abbildung 18: Zwei von vier unterschiedlicher Chromatogramm, bei denen die Sequenzanalyse einer Probe zur Identifizierung des gleichen dbSNP führte. A, sehr breiter Hauptpeak (GUS244); B, Peak vor dem Hauptpeak (GUS247).



Untersuchungen des Exon 5 ergab in wenigen Proben eine Verschiebung des Peaks. In 30 Fällen wurde eine Welle vor dem Hauptpeak, der selbst verschoben sein konnte, vorgefunden. Sequenzunterschiede in repräsentativen Proben wurden nicht gefunden. Für eine Probe konnten keine Ergebnisse erzielt werden. Eine Analyse des Exon 6 führte in 166 Fällen zu einer Welle vor dem Hauptpeak. 50 Chromatogramme zeigten eine Welle vor dem Hauptpeak, der selbst nach links verschoben war (Abbildung 19) und 11 eine Welle vor dem Hauptpeak, der nach rechts verschoben war. Eine Sequenzanalyse ergab jedoch keine Veränderung.

Abbildung 19: Chromatogramm von GUS198, das in weiteren 165 Proben vorgefunden wurde ohne nachweisbare Sequenzunterschiede.

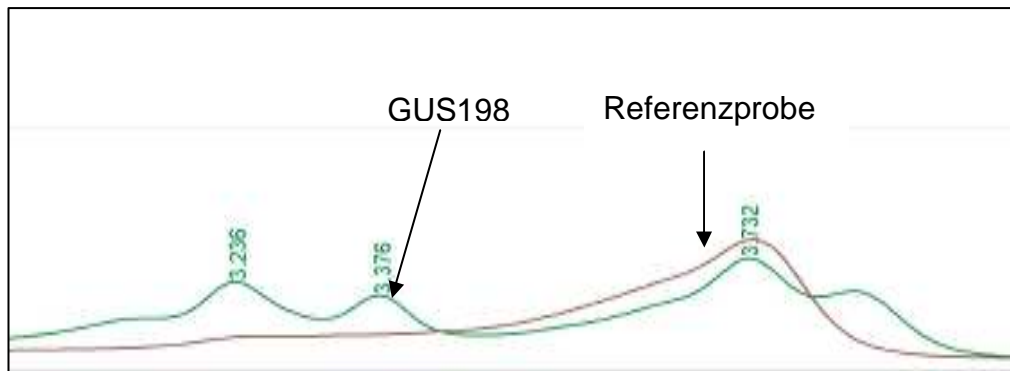


Für Exon 7 und 8 wurden 2 Programme mit unterschiedlichen Schmelztemperaturen eingesetzt, da mit einem Programm nicht alle möglichen Mutationen im gesamten Bereich des PCR-Fragments identifiziert werden konnten. Exon 7 zeigte abnormale Chromatogramme, aber keine veränderte Nukleotidsequenz (Anlage3H).

Hingegen konnte in einer repräsentativen Probe mit auffälligem Chromatogramm von Exon 8 ein im Intron liegender SNP identifiziert werden (dbSNP rs rs2279902 (c.641-13C>T)) (Anlage 3H).

Chromatogramme von Exon 9 zeigten multiple Peaks. Mittels Sequenzanalysen in repräsentativen Proben wurden SNPs identifiziert. SNP (c.895A>T, p.S292S) liegt im kodierenden Exon, ist aber nicht in der Datenbank registriert. Der Nukleotidaustausch hat aber keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz. Zusätzlich wurde ein im Intron liegender und auch in der Datenbank registrierter SNP (dbSNP rs2279900 (c.1083+18G>A)) nachgewiesen (Abbildung 20).

Abbildung 20: Chromatogramm von GUS198, Unterschiede zur Referenz lassen sich auf die identifizierten SNPs zurückführen.



Auch für PCR-Amplifikate des Exon 10 wurden Unregelmäßigkeiten beobachtet. Zwei Proben zeigten Chromatogramme mit vier Peaks. Die Sequenzanalyse einer Probe ließ aber keine Sequenzunterschiede erkennen. Zwei weitere Proben mit einem Zusatzpeak zur Referenz zeigten in der Sequenzanalyse jeweils einer Probe den gleichen bislang nicht registrierten SNP c226-25 T>Y (Anlage 3H).

5.3.10 Übersicht über Proben ohne Ergebnisse bei den Mutationsanalysen.

In 89 Analysen konnten nicht für alle 39 untersuchten Exons PCR-Fragmente amplifiziert werden. Für einen Probanden konnte in 3 Fällen kein PCR-Amplifikat erhalten werden, in allen übrigen Fällen beschränkte sich dies auf ein oder zwei Exons. Vier Exons konnten in 12, 13, 23 und 30 Proben nicht amplifiziert werden (Tabelle 6). Die entsprechenden DNA-Extrakte stammten jedoch von unterschiedlichen Arbeitnehmern. In den übrigen Fällen konnten Exons in höchstens 5 Proben nicht amplifiziert werden.

In wenigen Fällen konnten in einer Probe für zwei Exons pro Gen kein PCR-Amplifikat erhalten werden (Tabelle 6).

Eine Korrelation der Ergebnisse mit der Anzahl und den RAL-Werten aus den ³²P-Postlabeling Analysen war nicht möglich.

Für das Exon2 des FHIT-Gens wurden die dHPLC mit zwei Programmen durchgeführt, um alle möglichen Mutationen erfassen zu können. Die dHPLC hat mit dem zweiten Programm keine Ergebnisse gezeigt, obwohl die entsprechenden PCR-Amplifikate vorlagen.

Tabelle 6: Übersicht über die Gene und Exons, die keine PCR-Amplifikate zeigten. Angaben in Klammern geben an, wie viele Proben in mehr als einem Exon des gleichen Gens keine PCR-Amplifikation ermöglichten und welches weitere Exon davon betroffen war.

Gen	Exon	Anzahl der Proben ohne PCR-Fragmente
TP53	7	2
EGFR	19	2
	20	3
CDKN2A	1	2
	2	1
HPRT1	1	12 (1 Probe zusätzlich in Exon 8)
	2	5
	4	2
	6	2
	7	1
	8	1
FHIT	2	30 (3 Proben zusätzlich in Exon 3)
	3	4
	5	1
TSG101	1	23 (1 Probe zusätzlich in Exon 8)
	5	1
	6	1
	7	13
	8	4

6. Schutzrechte (erfolgt oder geplant).

trifft nicht zu

7. Relevante Ergebnisse, Veröffentlichungen, Schutzrechtsanmeldungen und erteilte Schutzrechte Dritter.

(Konsequenzen für das Vorhaben.)

trifft nicht zu

8. Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich des Forschungszwecks/-ziels, Schlussfolgerungen

8.1 Bestimmung von DNA-Addukten mittels ³²P-Postlabeling

Die DNA-Adduktidentifizierung an weißen Blutzellen im Blut ergab ein überraschendes Bild bezüglich dem Auftreten von DNA-Addukten. Auffällig war, dass zu Beginn der untersuchten Arbeitnehmern mehrere zum Teil prominente DNA-Addukte nachgewiesen wurden. Hierzu gehörten DNA-Extrakte von GUS 196 bis GUS 208 und GUS 238 bis 290. In dieser Gruppe befanden sich auch sechs nicht exponierte Personen, die ebenfalls DNA-Addukte aufwiesen (GUS 273 bis Gus 278) (Anlage 1). Die Anzahl und die Höhe der RAL-Werte dieser Referenzgruppe zeigte aber keine Spitzenwerte.

Es folgte eine weitere Gruppe mit GUS291 bis GUS 312, die bereits eine deutliche Reduktion der RAL-Werte und der Anzahl der DNA-Addukte zeigten. Die darauf folgenden Proben ab GUS 313 bis GUS 515 zeigten nur noch sporadisch DNA-Addukten (max. drei) mit niedrigen RAL-Werten (max. 6). Zumeist konnten in den Proben keine DNA-Addukte identifiziert werden. Insbesondere zeigte auch die Referenzgruppe mit einer Ausnahme (GUS 436: ein DNA-Addukt mit einem niedrigen RAL-Wert von 1.28), keine DNA-Addukte. Die Entnahme der Blutproben erfolgte vor bzw. nach der Schicht. In etwa 56% der Fälle waren die RAL-Werte vor der Schicht höher als nach der Schicht. Eine Abhängigkeit vom Entnahmezeitpunkt ist deshalb unwahrscheinlich.

Keines der mittels ³²P-Postlabeling identifizierten DNA Addukte konnte mittels Massenspektrometrie den sechs DNA-Referenzaddukten zugeordnet werden. Im Vergleich hierzu zeigten Ratten, die Dämpfen und Aerosole aus Bitumen ausgesetzt wurden, in weißen Blutzellen auch nach einem Jahr keine DNA-Addukte. DNA-Addukte konnten hier in der Lunge, in Zellen des Alveolarepithels und im Nasenepithel nachgewiesen werden (Halter et al., 2006). Die Untersuchung der DNA aus Nasenepithel mittels Massenspektrometrie ergab auch hier keine Übereinstimmung mit den sechs DNA-Referenzaddukte. Jedoch konnten hier eindeutig DNA-Addukte identifiziert werden, die größer als die der DNA-Referenzaddukte waren. Dies lässt darauf schließen, dass auch in den untersuchten Proben der Arbeitnehmer die PAHs der DNA-Referenzaddukte nicht an der DNA-Adduktbildung beteiligt sind.

Welchen Einfluss andere Faktoren wie u.a. Ernährung oder Rauchen eine Rolle auf die DNA-Adduktbildung spielen, ist nicht bekannt. So berichtete Arif et al (Arif et al., 2006) über DNA-Addukte in der Lunge von Rauchern, die keinem typischen PAH des Tabaks zuzuordnen sind und die Bildung dieser DNA-Addukte nicht durch PAHs verursacht wurden.

8.2 Chemische Identifizierung der DNA-Addukte.

Für die chemische Identifizierung der DNA-Addukte wurden sechs DNA-Referenzaddukte eingesetzt, die durch Reaktion bekannter PAHs mit chromosomaler DNA erzeugt wurden. Sowohl die DNA-Proben der Arbeitnehmer als auch die DNA-Referenzaddukte wurden massenspektrometrisch analysiert. Es konnten jedoch keine gemeinsamen Muster in den Massenspektren gefunden werden. Die Massenspektren in den DNA-Proben der Arbeitnehmer wiesen auf DNA-Addukte mit kleineren Molekulargewichten als die der DNA-Referenzaddukte und sind möglicherweise auf endogene DNA-Addukte zurückzuführen.

Ein interessanter Befund zeigte die Massenspektrometrie der DNA-Referenzaddukte. In zwei Fällen konnte mittels Massenspektrometrie gezeigt werden, dass im Vergleich zum ^{32}P -Postlabeling mehrere Nukleotide DNA-Addukte bilden. Das Auflösungsvermögen mittels Dünnschichtchromatografie, welches beim ^{32}P -Postlabeling eingesetzt wird, ist doch sehr begrenzt.

Darüber hinaus wurden zum Vergleich Gewebe von Ratten, die Dämpfen und Aerosolen aus Bitumen ausgesetzt waren, massenspektrometrisch untersucht. Hier wurden, wie beim ^{32}P -Postlabeling, drei DNA-Addukte identifiziert. Aber auch hier konnte keine Übereinstimmung mit den sechs DNA-Referenzaddukten gefunden werden, die zur Verfügung standen. Die Massen der identifizierten DNA-Addukte zeigten größere Werte als die der DNA-Referenzaddukte.

8.3 Nachweis von Mutationen in ausgewählten Genen

Die Sequenzanalyse haben zur Identifizierung zahlreicher bekannte und einiger unbekannter SNPs geführt. Unter den unbekanntenen SNPs wurden Nukleotidaustausche in kodierenden Exons gefunden, die nicht zu einer veränderten Aminosäuresequenz führen. Ein bekannter dbSNP, der einen Aminosäureaustausch

bewirkt, muss wiederum nicht unbedingt zu einem Funktionsverlust des Proteins führen. Die meisten SNPs befanden sich im nicht kodierendem Intronbereich. Eine Bewertung dieser Ergebnisse ist schwierig, da Intronsequenzen durchaus für die Genregulation von Bedeutung sein können. Bislang liegen aber über die hier identifizierten und in der Datenbank registrierten dbSNPs keine Informationen über klinische Auffälligkeiten vor. Da Nukleotidaustausche nicht an den Exon-Intronübergängen beobachtet wurden, ist nicht davon auszugehen, dass ein Prozessierungsvorgang der mRNA gestört ist.

Eine ethnische Zuordnung der bekannten SNPs konnte nicht gefunden werden. Da vornehmlich die Arbeitnehmer aus Europa stammten und nur wenige afrikanischer oder asiatische Herkunft waren, war eine Bestimmung des Hardy-Weinberg-Equilibrium aufgrund der begrenzten Fallzahl nicht möglich. Die Chromatogramme der dHPLC-Analysen ließen ebenfalls keine Korrelation mit verschiedenen Ethnien zu, da die Muster der unterschiedlichen Chromatogramme unabhängig von der Nationalität der Arbeitnehmer vorgefunden wurden (Anlage 3A bis 3H).

Unklar ist, weshalb in Einzelfällen keine PCR-Produkte identifiziert werden konnten, da die gleiche DNA-Probe für Exons anderer Gene problemlos Amplifikate lieferte. Auch die Verwendung eines weiteren Primerpaares führte in diesen Fällen nicht zum Erfolg. Ob tatsächlich in diesem Falle Deletionen vorliegen, die eine Bindung der Primer nicht ermöglichen, ist offen. Eine andere Möglichkeit, die eine Amplifikation blockieren kann, ist das Vorliegen von DNA Addukten, die die Bindung der Primer für die Amplifikation sterisch blockieren (Laws et al., 2001; Neher und Stürzenbaum, 2006). Auffällig waren zahlreiche Verschiebungen in den Chromatogrammen der dHPLC-Analysen, die möglicherweise auf Hypermethylierungen bzw. weitere epigenetische Modifikationen der DNA zurückzuführen sind. Eine chemische Modifizierung der einzelnen Basen ist ebenfalls nicht auszuschließen.

8.4 Schlussfolgerungen

Mittels ³²P-Postlabeling wurden DNA-Addukten in etwa einem Drittel der untersuchten Kohorte identifiziert. Die Massenspektrometrie hat gezeigt, dass keine DNA-Addukte vorliegen, die den sechs ausgewählten Referenz-PAHs (DNA-Referenzaddukten) zugeordnet werden können. Darüber hinaus hat die MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie ergeben, dass an der DNA-Adduktbildung nicht

unbedingt typische PAHs beteiligt sein müssen und lässt deshalb deshalb auf die Beteiligung anderer Substanzen an der Adduktbildung zu wie sie etwa in Arif et al (Arif et al., 2006) für Lungenaddukte bei Rauchern beschrieben wurde. Deshalb ist davon auszugehen, dass zumindest ein Teil der nachgewiesenen DNA-Addukte durch andere Faktoren wie z.B. Rauchen induziert werden. Demgegenüber konnten in Gewebe von Ratten, die Dämpfen und Aerosolen aus Bitumen exponiert waren, eindeutig die Beteiligung von PAHs an der Adduktbildung mittels MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie gezeigt werden. Im Blut dieser Ratten konnten aber mit ³²P-Postlabeling keine lymphozytären DNA-Addukte nachgewiesen werden (Halter et al., 2006).

Die Mutationsanalysen haben zur Identifizierung von Nukleotidaustauschen in den untersuchten Genen geführt. Da in der Regel diese aber bekannte Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP) sind, kann daraus eine zu Dämpfen und Aerosolen aus Bitumen expositionsbedingte Sequenzvariation nicht abgeleitet werden.

9. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan möglichst mit Angabe der absehbaren Zeithorizonte

entfällt

Literatur

- Arif JM, Dresler C, Clapper ML, Gairola CG, Srinivasan C, Lubet RA, Gupta RC (2006). Lung DNA adducts detected in human smokers are unrelated to typical polyaromatic carcinogens. *Chem Res Toxicol.* 9:295-9.
- Albertini RJ (2001) HPRT mutations in humans: biomarkers for mechanistic studies. *Mutat Res* 489:1-16.
- Bardeesy N, Aguirre AJ, Chu GC, Cheng KH, Lopez LV, Hezel AF, Feng B, Brennan C, Weissleder R, Mahmood U, Hanahan D, Redston MS, Chin L, Depinho RA (2006) Both p16(Ink4a) and the p19(Arf)-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.*103:5947-52.
- Baum M, Amin S, Guengerich FP, Hecht SS, Kohl W, Eisenbrand G. Metabolic activation of benzo[c]phenanthrene by cytochrome P450 enzymes in human liver and lung (2001). *Chem Res Toxicol.* 14:686-93.
- Beland FA, Churchwell MI, Von Tungeln LS, Chen S, Fu PP, Culp SJ, Schoket B, Gyorffy E, Minarovits J, Poirier MC, Bowman ED, Weston A, Doerge DR (2005) High-performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry for the detection and quantitation of benzo[a]pyrene-DNA adducts. *Chem Res Toxicol.* 18:1306-15.
- Binet S, Pfohl-Leszkowicz A, Brandt H, Lafontaine M, Castegnaro M. Bitumen fumes: review of work on the potential risk to workers and the present knowledge on its origin (2002) *Sci Total Environ.* 300:37-49.
- Blons H, Pallier K, Le Corre D, Danel C, Tremblay M, Houdayer C, Fabre-Guillevin E, Riquet M, Dessen P, Laurent-Puig P (2008b) Genome wide SNP comparative analysis between EGFR and KRAS mutated NSCLC and characterization of two models of oncogenic cooperation in non-small cell lung carcinoma. *BMC Med Genomics* 1:25
- Brown VL, Harwood CA, Crook T, Cronin JG, Kelsell DP, Proby CM. p16INK4a and p14ARF tumor suppressor genes are commonly inactivated in cutaneous squamous cell carcinoma (2004). *J Invest Dermatol.* 122:1284-92.
- Carstens MJ, Krempler A, Triplett AA, Van Lohuizen M, Wagner KU (2004) Cell cycle arrest and cell death are controlled by p53-dependent and p53-independent mechanisms in Tsg101-deficient cells. *J Biol Chem* 279:35984-35994
- Chakravarti D, Venugopal D, Mailander PC, Meza JL, Higginbotham S, Cavalieri EL, Rogan EG (2008) The role of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in inducing mutations in mouse skin. *Mutat Res* 649:161-178
- Chen JX, Zheng Y, West M, Tang MS (1998) Carcinogens preferentially bind at methylated CpG in the p53 mutational hot spots. *Cancer Res* 58:2070-2075
- Cole P, Green LC, Lash TL (1999) Lifestyle determinants of cancer among Danish mastic asphalt workers *Regul Toxicol Pharmacol.* 30:1-8
- Cordone I, Masi S, Mauro FR, Soddu S, Morsilli O, Valentini T, Vegna ML, Guglielmi C, Mancini F, Giuliacci S, Sacchi A, Mandelli F, Foa R (1998). p53 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a marker of disease progression and poor prognosis. *Blood.* 91:4342-9.
- den Dunnen JT, Antonarakis SE (2001) Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet* 109:121-124

- Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP (1996) Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science* 274:430-432
- Denissenko MF, Chen JX, Tang MS, Pfeifer GP (1997) Cytosine methylation determines hot spots of DNA damage in the human P53 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3893-3898
- DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft): Bitumen (Dampf und Aerosol). In: Greim H (Hrsg.) *Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe – Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten*. Wiley-VCH-Verlag, Weinheim, 32. Lfg., 2001
- Engelbergs J, Thomale J, Rajewsky MF. Role of DNA repair in carcinogen-induced ras mutation (2000). *Mutat Res.* 450:139-53.
- Feng Q, Hawes SE, Stern JE, Wiens L, Lu H, Dong ZM, Jordan CD, Kiviat NB, Vesselle H (2008) DNA methylation in tumor and matched normal tissues from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17:645-654
- Frueh FW, Noyer-Weidner M (2003). The use of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) for the analysis of genetic variations: impact for diagnostics and pharmacogenetics. *Clin Chem Lab Med.* 41:452-61
- Fujita J, Kraus MH, Onoue H, Srivastava SK, Ebi Y, Kitamura Y, Rhim JS (1988) Activated H-ras oncogenes in human kidney tumors. *Cancer Res* 48:5251-5255
- Fukami T, Fukuhara H, Kuramochi M, Maruyama T, Isogai K, Sakamoto M, Takamoto S, Murakami Y (2003) Promoter methylation of the TSLC1 gene in advanced lung tumors and various cancer cell lines. *Int J Cancer* 107:53-59
- Garaguso I, Borlak J. (2008) Matrix layer sample preparation: an improved MALDI-MS peptide analysis method for proteomic studies. *Proteomics* 8:2583-95.
- Gaskell M, McLuckie KI, Farmer PB. Genotoxicity of the benzene metabolites para-benzoquinone and hydroquinone (2005) *Chem Biol Interact.* 153-154:267-70.
- Genevois-Charneau, S. Binet, P. Bonnet, M. Lafontaine, H. Brandt, A.J. Kriech, P.C. de Groot, H. Wissel, L. Garren, Y. Morele, H. Nunge and M. Castegnaro (2001) Inhalation study on exposure to bitumen fumes formation of DNA adducts in various rat tissues following nose-only inhalation. *Polycycl Aromat Comp* 18, pp. 427–449.
- Giehl K (2005) Oncogenic Ras in tumour progression and metastasis. *Biol Chem* 386:193-205
- Goto A, Niki T, Chi-Pin L, Matsubara D, Murakami Y, Funata N, Fukayama M (2005) Loss of TSLC1 expression in lung adenocarcinoma: relationships with histological subtypes, sex and prognostic significance. *Cancer Sci* 96:480-486
- Gu D, Scaringe WA, Li K, Saldivar JS, Hill KA, Chen Z, Gonzalez KD, Sommer SS (2007) Database of somatic mutations in EGFR with analyses revealing indel hotspots but no smoking-associated signature. *Hum Mutat* 28:760-770
- Halter R; Hansen T; Seidel A; Ziemann C; Borlak J (2007) Importance of DNA-adduct formation and gene expression profiling of disease candidate genes in rats exposed to bitumen fumes. *Journal of occupational and environmental hygiene* 4: Supplement 1:44-46.
- Hansen ES (1991). Mortality of mastic asphalt workers. *Scand J Work Environ Health* 17:20-4

Hennig EE, Conney AH, Wei SJ (1995) Characterization of hprt splicing mutations induced by the ultimate carcinogenic metabolite of benzo[a]pyrene in Chinese hamster V-79 cells. *Cancer Res* 55:1550-1558

Hou SM, Lambert B, Hemminki K (1995a) Relationship between hprt mutant frequency, aromatic DNA adducts and genotypes for GSTM1 and NAT2 in bus maintenance workers. *Carcinogenesis* 16:1913-1917

Hou SM, Lambert B, Hemminki K (1995b) Relationship between hprt mutant frequency, aromatic DNA adducts and genotypes for GSTM1 and NAT2 in bus maintenance workers. *Carcinogenesis* 16:1913-1917

Hou SM, Yang K, Nyberg F, Hemminki K, Pershagen G, Lambert B (1999a) Hprt mutant frequency and aromatic DNA adduct level in non-smoking and smoking lung cancer patients and population controls. *Carcinogenesis* 20:437-444

Hou SM, Yang K, Nyberg F, Hemminki K, Pershagen G, Lambert B (1999b) Hprt mutant frequency and aromatic DNA adduct level in non-smoking and smoking lung cancer patients and population controls. *Carcinogenesis* 20:437-444

Ito T, Shimada Y, Hashimoto Y, Kaganoi J, Kan T, Watanabe G, Murakami Y, Imamura M (2003) Involvement of TSLC1 in progression of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 63:6320-6326

Jayachandran G, Sasaki J, Nishizaki M, Xu K, Girard L, Minna JD, Roth JA, Ji L (2007) Fragile histidine triad-mediated tumor suppression of lung cancer by targeting multiple components of the Ras/Rho GTPase molecular switch. *Cancer Res* 67:10379-10388

Jebar AH, Hurst CD, Tomlinson DC, Johnston C, Taylor CF, Knowles MA (2005) FGFR3 and Ras gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma. *Oncogene* 24:5218-5225

Kikuchi S, Yamada D, Fukami T, Maruyama T, Ito A, Asamura H, Matsuno Y, Onizuka M, Murakami Y (2006) Hypermethylation of the TSLC1/IGSF4 promoter is associated with tobacco smoking and a poor prognosis in primary nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 106:1751-1758

Kim JS, Kim H, Shim YM, Han J, Park J, Kim DH (2004) Aberrant methylation of the FHIT gene in chronic smokers with early stage squamous cell carcinoma of the lung. *Carcinogenesis* 25:2165-2171

Kondo K, Takahashi Y, Hirose Y, Nagao T, Tsuyuguchi M, Hashimoto M, Ochiai A, Monden Y, Tangoku A (2006) The reduced expression and aberrant methylation of p16(INK4a) in chromate workers with lung cancer. *Lung Cancer* 53:295-302

Koon N, Schneider-Stock R, Sarlomo-Rikala M, Lasota J, Smolkin M, Petroni G, Zaika A, Boltze C, Meyer F, Andersson L, Knuutila S, Miettinen M, El Rifai W (2004) Molecular targets for tumour progression in gastrointestinal stromal tumours. *Gut* 53:235-240

Kraunz KS, Nelson HH, Lemos M, Godleski JJ, Wiencke JK, Kelsey KT (2006) Homozygous deletion of p16INK4a and tobacco carcinogen exposure in nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer* 118:1364-1369

Krempler A, Henry MD, Triplett AA, Wagner KU (2002) Targeted deletion of the Tsg101 gene results in cell cycle arrest at G1/S and p53-independent cell death. *J Biol Chem* 277:43216-43223

- Kumar K, Rahman Q, Schipper H, Matschegewski C, Schiffmann D, Papp T (2005) Mutational analysis of 9 different tumour-associated genes in human malignant mesothelioma cell lines. *Oncol Rep.* 14:743-50.
- Kuramochi M, Fukuhara H, Nobukuni T, Kanbe T, Maruyama T, Ghosh HP, Pletcher M, Isomura M, Onizuka M, Kitamura T, Sekiya T, Reeves RH, Murakami Y (2001) TSLC1 is a tumor-suppressor gene in human non-small-cell lung cancer. *Nat Genet* 27:427-430
- Laws GM, Skopek TR, Reddy MV, Storer RD, Glaab WE (2001) Detection of DNA adducts using a quantitative long PCR technique and the fluorogenic 5' nuclease assay (TaqMan). *Mutat Res* 484:3-18
- Lin PM, Liu TC, Chang JG, Chen TP, Lin SF. Aberrant TSG101 transcripts in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 1998 Aug;102(3):753-8.
- Li DN, Seidel A, Pritchard MP, Wolf CR, Friedberg T (2000) Polymorphisms in P450 CYP1B1 affect the conversion of estradiol to the potentially carcinogenic metabolite 4-hydroxyestradiol. *Pharmacogenetics.* 10:343-53
- Liu RT, Huang CC, You HL, Chou FF, Hu CC, Chao FP, Chen CM, Cheng JT (2002) Overexpression of tumor susceptibility gene TSG101 in human papillary thyroid carcinomas. *Oncogene* 21:4830-4837
- Liu S, Ao L, Du B, Zhou Y, Yuan J, Bai Y, Zhou Z, Cao J (2008) HPRT mutations in lymphocytes from 1,3-butadiene-exposed workers in China. *Environ Health Perspect* 116:203-208
- Luan X, Ramesh KH, Cannizzaro LA (1998) FHIT gene transcript alterations occur frequently in myeloproliferative and myelodysplastic diseases. *Cytogenet Cell Genet.* 81:183-8.
- Mao X, Seidlitz E, Ghosh K, Murakami Y, Ghosh HP (2003) The cytoplasmic domain is critical to the tumor suppressor activity of TSLC1 in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 63:7979-7985
- Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, Harada K, Virmani AK, Zochbauer-Muller S, Farinas AJ, Vakar-Lopez F, Minna JD, Sagalowsky A, Czerniak B, Gazdar AF (2001) Aberrant promoter methylation profile of bladder cancer and its relationship to clinicopathological features. *Cancer Res.* 61:8659-63.
- Masuda M, Yageta M, Fukuhara H, Kuramochi M, Maruyama T, Nomoto A, Murakami Y (2002) The tumor suppressor protein TSLC1 is involved in cell-cell adhesion. *J Biol Chem* 277:31014-31019
- Murphy JA, Barrantes-Reynolds R, Kocherlakota R, Bond JP, Greenblatt MS (2004) The CDKN2A database: Integrating allelic variants with evolution, structure, function, and disease association. *Hum Mutat* 24:296-304
- Neher DA, Stürzenbaum SR (2006) Extra-long PCR, an identifier of DNA adducts in single nematodes (*Caenorhabditis elegans*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 144:279-85
- Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, Alexander EK, Dorn GW, Tallini G, Kroll TG, Nikiforov YE (2003) RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2318-2326

Oh KB, Stanton MJ, West WW, Todd GL, Wagner KU (2007) Tsg101 is upregulated in a subset of invasive human breast cancers and its targeted overexpression in transgenic mice reveals weak oncogenic properties for mammary cancer initiation. *Oncogene* 26:5950-5959

Ota N, Kawakami K, Okuda T, Takehara A, Hiranuma C, Oyama K, Ota Y, Oda M, Watanabe G (2006) Prognostic significance of p16(INK4a) hypermethylation in non-small cell lung cancer is evident by quantitative DNA methylation analysis. *Anticancer Res* 26:3729-3732

Perera FP, Dickey C, Santella R, O'Neill JP, Albertini RJ, Ottman R, Tsai WY, Mooney LA, Savela K, Hemminki K (1994a) Carcinogen-DNA adducts and gene mutation in foundry workers with low-level exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis* 15:2905-2910

Perera FP, Dickey C, Santella R, O'Neill JP, Albertini RJ, Ottman R, Tsai WY, Mooney LA, Savela K, Hemminki K (1994b) Carcinogen-DNA adducts and gene mutation in foundry workers with low-level exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis* 15:2905-2910

Petitjean A, Achatz MI, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M (2007a) TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene* 26:2157-2165

Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, Olivier M (2007b) Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat* 28:622-629

Toyooka S, Tsuda T, Gazdar AF (2003) The TP53 gene, tobacco exposure, and lung cancer. *Hum Mutat.* 21:229-39.

Rauen KA (2007) HRAS and the Costello syndrome. *Clin Genet* 71:101-108

Reamon-Buettner SM, Mutschler V, Borlak J (2008) The next innovation cycle in toxicogenomics: Environmental epigenetics. *Mutat Res* 659:158-65

Ruas M, Peters G (1998) The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta* 1378:F115-F177

Ruland J, Sirard C, Elia A, MacPherson D, Wakeham A, Li L, de la Pompa JL, Cohen SN, Mak TW (2001) p53 accumulation, defective cell proliferation, and early embryonic lethality in mice lacking tsg101. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:1859-1864

Sasaki H, Endo K, Konishi A, Takada M, Kawahara M, Iuchi K, Matsumura A, Okumura M, Tanaka H, Kawaguchi T, Shimizu T, Takeuchi H, Yano M, Fukai I, Fujii Y (2005) EGFR Mutation status in Japanese lung cancer patients: genotyping analysis using LightCycler. *Clin Cancer Res.* 11:2924-9.

Sato M, Takahashi K, Nagayama K, Arai Y, Ito N, Okada M, Minna JD, Yokota J, Kohno T (2005) Identification of chromosome arm 9p as the most frequent target of homozygous deletions in lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 44:405-414

Shibutani S, Ravindernath A, Suzuki N, Terashima I, Sugarman SM, Grollman AP, Pearl ML (2000). Identification of tamoxifen-DNA adducts in the endometrium of women treated with tamoxifen. *Carcinogenesis* 21:1461-7.

Shimada T, Oda Y, Gillam EM, Guengerich FP, Inoue K (2001) Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons and other procarcinogens by cytochromes P450

1A1 and P450 1B1 allelic variants and other human cytochromes P450 in *Salmonella typhimurium* NM2009. *Drug Metab Dispos.* 29:1176-82

Smith DI, McAvoy S, Zhu Y, Perez DS (2007) Large common fragile site genes and cancer. *Semin Cancer Biol* 17:31-41

Smith LE, Denissenko MF, Bennett WP, Li H, Amin S, Tang M, Pfeifer GP (2000a) Targeting of lung cancer mutational hotspots by polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Natl Cancer Inst* 92:803-811

Smith LE, Denissenko MF, Bennett WP, Li H, Amin S, Tang M, Pfeifer GP (2000b) Targeting of lung cancer mutational hotspots by polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Natl Cancer Inst* 92:803-811

Steffensen IL, Schut HA, Alexander J (2005) Age at exposure and Apc status influence the levels of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-DNA adducts in mouse intestine and liver. *Mutat Res.* 587:73-89.

Stern FB, Ruder AM, Chen G (2000) Proportionate mortality among unionized roofers and waterproofers. *Am J Ind Med.* 37:478-92

Suzuki M, Shigematsu H, Hiroshima K, Iizasa T, Nakatani Y, Minna JD, Gazdar AF, Fujisawa T (2005) Epidermal growth factor receptor expression status in lung cancer correlates with its mutation. *Hum Pathol* 36:1127-1134

Tsou JA, Galler JS, Siegmund KD, Laird PW, Turla S, Cozen W, Hagen JA, Koss MN, Laird-Offringa IA (2007) Identification of a panel of sensitive and specific DNA methylation markers for lung adenocarcinoma. *Mol Cancer* 6:70

Tzao C, Tsai HY, Chen JT, Chen CY, Wang YC (2004) 5'CpG island hypermethylation and aberrant transcript splicing both contribute to the inactivation of the FHIT gene in resected non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 40:2175-2183

Wagner KU, Dierisseau P, Rucker EB, III, Robinson GW, Hennighausen L (1998) Genomic architecture and transcriptional activation of the mouse and human tumor susceptibility gene TSG101: common types of shorter transcripts are true alternative splice variants. *Oncogene* 17:2761-2770

Wagner KU, Krempler A, Qi Y, Park K, Henry MD, Triplett AA, Riedlinger G, Rucker III EB, Hennighausen L (2003) Tsg101 is essential for cell growth, proliferation, and cell survival of embryonic and adult tissues. *Mol Cell Biol* 23:150-162

Wali A, Srinivasan R, Shabnam MS, Majumdar S, Joshi K, Behera D (2006) Loss of fragile histidine triad gene expression in advanced lung cancer is consequent to allelic loss at 3p14 locus and promoter methylation. *Mol Cancer Res* 4:93-99

Wang JJ, Marshall WD, Frazer DG, Law B, Lewis DM (2003). Characterization of DNA adducts from lung tissue of asphalt fume-exposed mice by nanoflow liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Anal Biochem.* 322:79-88.

Wei D, Maher VM, McCormick JJ (1995) Site-specific rates of excision repair of benzo[a]pyrene diol epoxide adducts in the hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene of human fibroblasts: correlation with mutation spectra. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:2204-2208

Williams JA, Martin FL, Muir GH, Hewer A, Grover PL, Phillips DH (2000) Metabolic activation of carcinogens and expression of various cytochromes P450 in human prostate tissue. *Carcinogenesis.* 21:1683-9

- Xiao W, Oefner PJ (2001) Denaturing high-performance liquid chromatography. *Hum Mutat.* 17:439-74
- Yoon JH, Smith LE, Feng Z, Tang M, Lee CS, Pfeifer GP (2001) Methylated CpG dinucleotides are the preferential targets for G-to-T transversion mutations induced by benzo[a]pyrene diol epoxide in mammalian cells: similarities with the p53 mutation spectrum in smoking-associated lung cancers. *Cancer Res* 61:7110-7117
- Young TW, Mei FC, Rosen DG, Yang G, Li N, Liu J, Cheng X (2007) Up-regulation of tumor susceptibility gene 101 protein in ovarian carcinomas revealed by proteomics analyses. *Mol Cell Proteomics* 6:294-304
- Zhao B, Wang J, Geacintov NE, Wang Z (2006) Poleta, Polzeta and Rev1 together are required for G to T transversion mutations induced by the (+)- and (-)-trans-anti-BPDE-N2-dG DNA adducts in yeast cells. *Nucleic Acids Res.* 34:417-25.
- Zhu G, Gilchrist R, Borley N, Chng HW, Morgan M, Marshall JF, Camplejohn RS, Muir GH, Hart IR (2004) Reduction of TSG101 protein has a negative impact on tumor cell growth. *Int J Cancer* 109:541-547
- Zochbauer-Muller S, Fong KM, Maitra A, Lam S, Geradts J, Ashfaq R, Virmani AK, Milchgrub S, Gazdar AF, Minna JD (2001) 5' CpG island methylation of the FHIT gene is correlated with loss of gene expression in lung and breast cancer. *Cancer Res* 61:3581-3585
- Zorn H. [Carcinoma of the discharging urinary tract in tar, asphalt, and bitumen workers] *Zentralbl Arbeitsmed.* 1966 Dec;16(12):366-71