



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Comet Assay: Ermittlung von personenbezogenen
Quantifizierungsunterschieden und Vergleich
verschiedener Zelltypen“

verfasst von / submitted by

Verena Sauer Moser BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Master of Science (MSc)

Wien, 2017 / Vienna 2017

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 660 838

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreut von / Supervisor:

Univ. Prof. Dr. Karl Heinz Wagner

Danksagung

Ich möchte mich hier an dieser Stelle bei all denjenigen bedanken, die mich während meines gesamten Studiums immer unterstützt, begleitet und motiviert haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Univ. Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner, der meine Arbeit betreut hat. Vielen Dank für die Übernahme des Masterthemas und die nette Betreuung.

Ein besonders großes Dankeschön gilt Dipl. troph. Annemarie Grindel. Vielen Dank für die nette und hilfsbereite Betreuung während der gesamten Zeit. Danke für deine Anregungen, Kritiken und Korrekturen. Ohne dich hätte ich diese Arbeit nicht geschafft. Vielen Dank!

Vor allem jedoch gilt der größte Dank meiner Familie. Meinen lieben Eltern, danke dafür, dass ihr mir dieses Studium überhaupt ermöglicht habt, dass ihr mich immer unterstützt und an mich geglaubt habt, und mir immer mit großem Verständnis beigestanden seid. Danke für den Mut und die Kraft und die liebevollen Worte in jeglichen Situationen.

Und natürlich meinen Geschwistern. Vielen Dank für das zahlreiche Korrektur lesen, für die ständigen aufbauenden und aufmunternden Worte, wenn ich an mir gezweifelt habe. Vielen Dank für euer offenes Ohr und die schönen Momente die wir zusammen in Wien hatten. Ohne euch hätte ich diese Zeit wahrscheinlich nicht überstanden.

Danke auch dir Johannes. Danke für deine grenzenlose Geduld mit mir, deine Unterstützung und deine aufmunternden Worte während der gesamten Zeit. Danke, dass du für mich da warst!

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1. Einleitung.....	1
2. Literaturüberblick.....	2
2.1. Der Comet Assay - Überblick.....	2
2.2. Messung von oxidativen DNA-Schäden	5
2.3. Messung des antioxidativen Status	7
2.4. Messung der DNA-Reparatur	7
2.4.1. Zelluläre Reparatur	7
2.4.2. In vitro Repair Assay.....	8
2.5. Anwendung des Comet Assays	8
2.5.1. Forschungsbereich Genotoxizitäts- Tests	9
2.5.2. Forschungsbereich Humane Biomonitoring-Studien.....	10
2.5.2.1. Ernährungsinterventionsstudien	11
2.5.2.2. Der Alterungsprozess und DNA-Reparatur	12
2.5.2.3. Krebs und andere Krankheiten	13
2.5.2.4. Das ComNet-Projekt.....	16
2.5.3. Forschungsbereich Ökotoxikologie.....	17
3. Material und Methoden.....	19
3.1. Studiendesign.....	19
3.2. Herstellung der Zellsuspensionen am Studientag	19
3.2.1. Lymphozytenisolierung (PBMC).....	19

3.2.2. Orale Leukozytenisolierung (OL).....	20
3.2.3. Vollblut.....	20
3.3. Verwendung der Zellsuspension am Tag des Comet Assays	21
3.3.1. PBMC.....	21
3.3.2. Orale Leukozyten (OL).....	21
3.3.3. Vollblut.....	21
3.4. Durchführung Comet Assay	21
3.4.1. Beschichtung der Objektträger	21
3.4.1. Herstellung der Lösungen	22
3.4.1.1. Low Melting Agarose (LMA) 0,8 %.....	22
3.4.1.2. Lyselösung.....	22
3.4.1.3. Elektrophoreselösung	22
3.4.1.4. Puffer F (enzyme reaction buffer for FPG).....	22
3.4.1.5. H ₂ O ₂	22
3.4.1.6. FPG	23
3.4.2. Aufbringung der Zellen auf die Objektträger.....	23
3.4.2.1. PBMC und OL	23
3.4.2.2. Vollblut.....	24
3.4.3. Enzymbehandlung mit FPG	24
3.4.4. Alkalische Behandlung und Elektrophorese	25
3.4.5. Neutralisation.....	25
3.4.6. Auszählung und Quantifizierung.....	25
3.5. Statistik.....	26
4. Ergebnisse	27
4.1. Vergleich der Quantifizierung durch verschiedene Personen	27
4.2. Vergleich der verschiedenen Matrices	28

4.3. Matrix-Korrelationen	31
4.4. Vergleich Vollblut	35
4.5. Vergleich Diabetesgruppe – Referenzgruppe	38
5. Diskussion.....	40
6. Schlussbetrachtung	56
7. Zusammenfassung	57
8. Summary	59
9. Literaturverzeichnis.....	61
10. Anhang	i
I. Materialien und Chemikalien.....	i
II. Protokoll	iv

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Auswertung einer Zelle mittels Fluoreszenzmikroskopie (Wang, Dai et al. 2014).	3
Abbildung 2: Schema der „supercoiled“-DNA	4
Abbildung 3: Bilder von Lymphozytenzellen, die mit dem Farbstoff DAPI eingefärbt wurden. Sie repräsentieren die Klassen 0-4 (0=kein Schaden, 4=maximaler Schaden) für die visuelle Analyse (Collins 2004).	5
Abbildung 4: Schema des Enzym-modifizierten Comet Assays (modifiziert nach (Collins 2014)).	6
Abbildung 5: Objektträger für den Enzym-modifizierten Comet Assay	23
Abbildung 6: Objektträger für den Comet Assay mit Vollblut	24
Abbildung 7: Vergleich der Matrices in der Gruppe „Alt“ (* signifikanter Unterschied).	29
Abbildung 8: Vergleich der Matrices in der Gruppe „Neu“ (* signifikanter Unterschied).	29
Abbildung 9: Vergleich der Matrices in der Referenzgruppe „Gesund“ (*signifikanter Unterschied).....	30
Abbildung 10: Bild 1-6: Vergleich der unterschiedlichen Matrices mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	31
Abbildung 11: schwach negative Korrelation zwischen Vollblut Lyse Neu und PBMC Lyse Neu ($r=-0,269^*$).	35
Abbildung 12: Vollblut Vergleich	36
Abbildung 13: Bild 1-2: Vergleich von FPG-behandelten Vollblutzellen nach einer Lagerung von einem oder zwei Jahren bei -80°C mittels Fluoreszenzmikroskopie; Bild 3-4: lysierte Vollblutzellen nach einer Lagerung von einem oder zwei Jahren bei -80°C mittels Fluoreszenzmikroskopie;	37
Abbildung 14: Korrelation zwischen der Auswertung mittels Software Programmen (%DNA im Schweif) und dem visuellem Auszählen von jeweils den gleichen humanen Lymphozyten (Collins 2004).	42
Abbildung 15: Effekte der unterschiedlichen Agarosekonzentrationen auf den Anteil der DNA im Schweif von Lymphozyten. (Azqueta, Gutzkow et al. 2011).	46

Abbildung 16: Effekte der unterschiedlichen alkalischen Inkubationszeiten auf den Anteil der DNA im Schweif von behandelten (mit H ₂ O ₂ ; helle Balken) und unbehandelten (dunkle Balken) Lymphozyten (Azqueta, Gutzkow et al. 2011).	48
Abbildung 17: Je höher der Spannungsgradient ist, desto höher ist der Anteil der DNA im Schweif. Die hellen Balken stellen die behandelten Lymphozyten und die dunklen Balken die unbehandelten Lymphozyten dar (Azqueta, Gutzkow et al. 2011).	48
Abbildung 18: Anstieg der DNA-Schäden mit zunehmender Elektrophorese-Dauer (Azqueta, Gutzkow et al. 2011).....	49
Abbildung 19: Erhöhte Schäden durch eine längere Lagerungszeit; bei 4°C, -20°C und -80°C (Al-Salmani et al., 2011).....	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich der Gruppe Alt (Zellen wurden von verschiedenen Personen ausgezählt) mit der Gruppe Neu (alle Zellen wurden von derselben Person ausgezählt) ($p < 0,05$).....	27
Tabelle 2: Vergleich der unterschiedlichen Matrices in den Gruppen „Neu“, „Alt“, und	28
Tabelle 3: Korrelationen innerhalb der Gruppe Neu; r =Korrelationskoeffizient; * $\alpha = 0,05$	32
Tabelle 4: Korrelationen innerhalb der Gruppe Alt; r =Korrelationskoeffizient; * $\alpha = 0,05$, ** $\alpha = 0,01$	33
Tabelle 5: Korrelation zwischen den Gruppen Alt und Neu; r = Korrelationskoeffizient; 34	
Tabelle 6: Korrelationen innerhalb der gesunden Referenzgruppe; r =Korrelationskoeffizient; * $\alpha = 0,05$	34
Tabelle 7: Mittelwerte und Standardabweichungen der DNA-Schäden im Schweiß ($p < 0,05$)	35
Tabelle 8: Korrelationen der unterschiedlichen Vollblut-Gruppen (VB Alt, VB Neu, VB 1 Jahr);.....	36
Tabelle 9: Vergleich der DNA-Schäden zwischen der Diabetesgruppe und der gesunden Referenzgruppe ($p < 0,05$)	38
Tabelle 10: Korrelationen zwischen der Diabetesgruppe (Neu) und der gesunden Referenzgruppe. (r = Korrelationskoeffizient, *signifikant)	39
Tabelle 11: Regelmäßigkeit der Mittelwerte durch die Auszählung von nur einer Person (Werte alle sehr gering und relativ ähnlich)	41

Abkürzungsverzeichnis

AgNp	Silbernanopartikel
AP	apurinic bzw. apyrimidinic
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMT2	Diabetes Mellitus Typ 2
ENDO III	Endonuklease III
ESCOOD	European Standards Committee on Oxidative DNA Damage
FPG	formamidopyrimidine DNA glycosylase
GST	Glutathion-S-Transferase
H ₂ O ₂	Hydrogen Peroxide
HepG2-Zellen	Leberkarzinomzellen
LMA	Low Melting Agarose
MMS	Miracle Mineral Supplement
NO _x	Nitrat/Nitrit
NMA	Normal Melting Agarose
OGG1	8-Oxoguanine glycosylase
OL	Orale Leukozyten
PAH	Polyzyklische aromatische Hydrocarbonate
PBMC'S	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	phosphate-buffered saline
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SCGE	Single Cell Gel Electrophoresis Assay
VB	Vollblut
8-oxoGua	8-oxo-7,8-dihydroguanine

1. Einleitung

Der Comet Assay, oder Einzelzellelektrophorese genannt, ist eine molekularbiologische Methode um DNA-Strangbrüche in eukaryotischen Zellen zu messen. Der Assay wird häufig in humanen Biomonitoring-Studien zur Detektion von oxidativen DNA-Schäden eingesetzt. Es können verschiedenste Zellen, wie Blutzellen, Epithelzellen, Spermata oder auch divers geschädigtes Gewebe, mit Hilfe des Comet Assays untersucht werden.

Die vorliegende Masterarbeit basiert auf der MIKRODIAB-Studie, die 2014 vom Department für Ernährungswissenschaften in Wien durchgeführt wurde. Dabei wurden weibliche Diabetes Mellitus Typ 2 Patienten in die Studie aufgenommen. Mittels Comet Assay wurden oxidative DNA-Schäden, DNA-Strangbrüche und H₂O₂-induzierte Brüche in Vollblutzellen, isolierten Lymphozyten (PBMC) und oralen Leukozyten (OL) ermittelt.

Mit Hilfe dieser Masterarbeit wurde untersucht, ob eine Quantifizierung durch verschiedene Personen, im Vergleich zur Auswertung durch nur eine Person, zu unterschiedlichen Ergebnissen führt. Zusätzlich wurde ermittelt, ob die Schäden (% DNA im Schweif) der unterschiedlichen Zelltypen positiv korrelieren, wenn nur eine Person alle Zellen auszählt und quantifiziert.

Zudem wurden Vollblutzellen ein Jahr lang bei -80°C aufbewahrt und der Comet Assay erst anschließend durchgeführt. Die zentrale Frage lautete, ob die Zellen dadurch einen erhöhten oxidativen DNA-Schaden aufweisen, oder ob sie noch quantifizierbar und mit anderen Zellen vergleichbar sind.

Da die Zellen dieser Arbeit von weiblichen Diabetespatienten stammen, deren metabolisches System beeinflusst ist, wurde eine gesunde Referenzgruppe hinzugezogen, um die oxidativen DNA-Schäden vergleichen zu können.

2. Literaturüberblick

2.1. Der Comet Assay - Überblick

Der Comet Assay, auch Single Cell Gel Electrophoresis Assay (SCGE) genannt, wurde vor fast 30 Jahren als Methode entwickelt um DNA-Strangbrüche zu messen (Ostling und Johanson, 1984). Heute zählt der Comet Assay zu den bekanntesten Untersuchungsverfahren um DNA-Schäden aller Arten *in vitro* und *in vivo*, sowie oxidative Schäden durch Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu messen. Anwendung findet der Assay vor allem bei Genotoxizitätsstudien, Humanstudien, Ökotoxikologische Studien und Studien rund um DNA-Schäden bzw. DNA-Reparatur (Collins, 2014). Dabei werden einzelne Zellen in Low-Melting-Agarose auf Objektträgern eingebettet und anschließend lysiert. Nach einer alkalischen Elektrophorese werden die Zellen eingefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt und quantifiziert (Singh et al., 1988).

Die Anfänge des Comet Assays gehen auf die Arbeit von Peter Cook und Kollegen zurück. 1976 publizierten sie eine Forschungsarbeit, indem sie die nukleare Struktur der DNA, basierend auf Zellen in Lyse, mit einem nichtionischen Detergens und einer hochmolaren Natriumchlorid Lösung präsentierten. Durch diese Behandlung werden Membrane, Zytoplasma und Nukleoplasma entfernt und sogar Histone durch den hohen Salzgehalt löslich gemacht. Übrig bleibt der Nukleoid, zusammen mit der „supercoiled“-DNA. Diese Struktur der DNA entsteht durch die Drehung der Doppelhelix-Struktur der DNA um die Histone der Nukleosomen. Durch die Bildung dieser DNA ist gut zu erkennen, dass eine freie Rotation der DNA nicht möglich ist (Cook et al., 1976).

Cook et al. (1976) schlugen ein Modell vor, bei dem die DNA nicht als lineares Molekül, sondern als eine Anordnung von Schlaufen dargestellt wird. Durch die Zugabe von bestimmten Einlagerungsmitteln, wie zum Beispiel Ethidiumbromid, weiten sich die Schlaufen aus. Ähnliche Effekte sind zu erkennen, wenn Strahlung zur Entspannung der Schlaufen eingesetzt wird, da Einzelstrangbrüche zur Ausweitung ausreichen (Cook et al., 1976).

Der früheste Versuch, DNA-Strangbrüche direkt zu quantifizieren wurde von Rydberg und Johanson 1978 durchgeführt. Dabei wurden Zellen in Agarose auf bestimmten Objektträgern eingebettet und unter milden alkalischen Bedingungen lysiert (Rydberg und Johanson, 1978). Der Comet Assay in seiner jetzigen Form, basierend auf der Vorgehensweise von Rydberg und Johanson, wurde anschließend von Ostling und Johanson 1984 erstmals durchgeführt (Ostling und Johanson, 1984). Ihre Methode bestand darin, die lysierten Zellen eingebettet in Agarose, unter neutralen Bedingungen in die Elektrophorese zu geben (Ostling und Johanson, 1984). Die Zellen wurden mit Akridinorange eingefärbt und ausgewertet, was zur Folge hatte, dass die erhaltenen Bilder wie Kometen aussahen. Von dieser Assoziation kommt der heutige Name „Comet Assay“. Der Kopfanteil zeigt die noch intakte DNA, wobei der Schweif (tail) die geschädigte DNA aufweist (Abb. 1) (Ostling und Johanson, 1984). Bei dieser Methode jedoch konnten nur Doppelstrangbrüche der DNA ermittelt werden, die charakteristisch für Strahlung oder radiomimetische Agenzien sind (Faust et al., 2004).

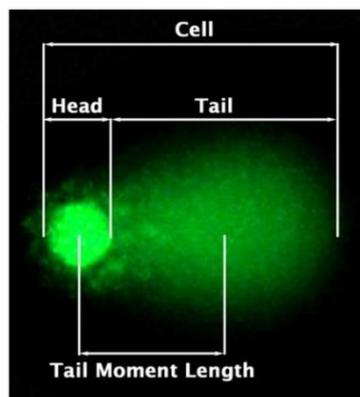


Abbildung 1: Auswertung einer Zelle mittels Fluoreszenzmikroskopie (Wang, Dai et al. 2014).

Später wurde der Comet Assay durch Singh et al. (1988) und Olive et al. (1994) wiederum neu modifiziert. Das Forschungsteam rund um Singh führte die Elektrophorese unter hohen alkalischen Bedingungen (pH=13) mit einem zusätzlichen UNWINDING-Schritt durch (Singh et al., 1988). Dies ermöglicht der „supercoiled“-DNA sich auszudrehen und somit können alkalisch instabile Stellen und Einzelstrangbrüche entdeckt werden (Abb. 2). Durch das entstehende elektrische Feld wird die geschädigte DNA zur Anode gezogen und folglich wird der DNA-Schweif geformt (Shaposhnikov et al., 2008). Diese

Form des Comet Assays wurde während der 1990er-Jahre sehr populär und ist heute noch eine der beliebtesten Methoden um DNA-Schäden zu ermitteln (Piperakis, 2009). Vor allem aber zeichnet den Comet Assay die schnelle, einfache und kosteneffiziente Durchführung, sowie die hohe Sensitivität aus (Collins et al., 1995).

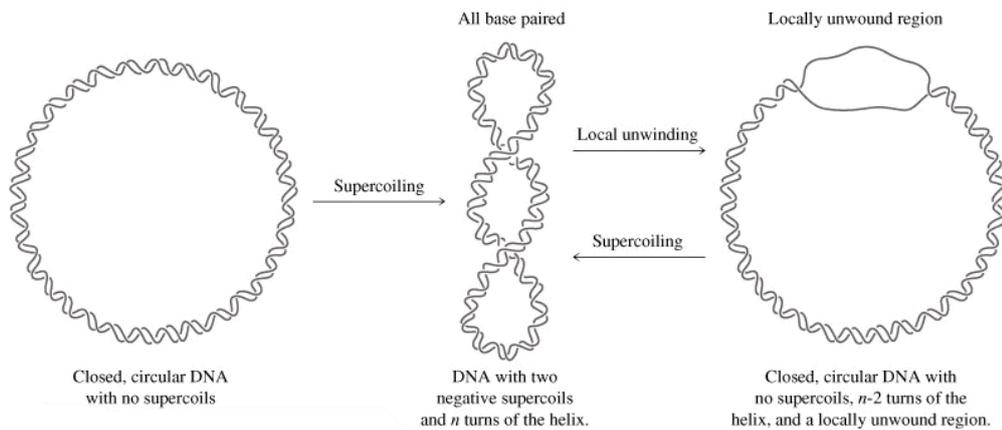


Abbildung 2: Schema der „supercoiled“-DNA

(Internet: <http://www.angelfire.com/sc3/toxchick/celmolbio/celmolbio06.html>; Stand: 05.09.2016)

Die Auswertung und Quantifizierung erfolgt mittels Fluoreszenzmikroskop, nachdem die Zellen mit einem Nukleinsäure-Farbstoff eingefärbt wurden (Collins, 2004). Dies kann auf zwei verschiedenen Arten erfolgen. Die Quantifizierung kann mittels Computer-Software oder mittels visueller Analyse erfolgen. Die Software Programme kalkulieren verschiedene Parameter für jede Zelle, wobei die am meisten verwendeten der Anteil der DNA im Schweif und der „tail moment“ sind. Der Parameter „tail moment“ kombiniert die Länge des Schweifes mit der Intensität (tail intensity), allerdings ist er nicht allzu aussagekräftig, da es dafür keine standardisierten Einheiten gibt. Deshalb wird meist der Prozentsatz der DNA im Schweif verwendet und interpretiert (Azqueta et al., 2009).

Die Auswertung kann auch ohne Software Programme visuell erfolgen. Dabei werden die Zellen in fünf Klassen, je nach Schweifintensität, eingeteilt. Die Kategorien ergeben sich aus der Gruppe 0 (keine Schäden) bis zur letzten Gruppe 4 (maximaler Schaden) (Abb. 3) (Azqueta et al., 2009).

Laut Collins (2004) gibt es zwischen den zwei Methoden eine sehr hohe Übereinstimmung bzw. Korrelation. Jedoch muss bei beiden Arten darauf geachtet werden, dass das gesamte Gel repräsentiert und somit systematisch ausgezählt wird (Collins, 2004).

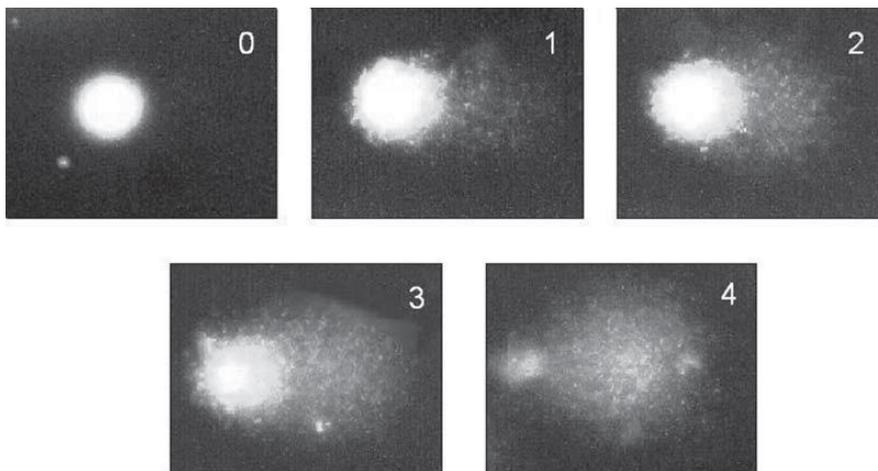


Abbildung 3: Bilder von Lymphozytenzellen, die mit dem Farbstoff DAPI eingefärbt wurden. Sie repräsentieren die Klassen 0-4 (0=kein Schaden, 4=maximaler Schaden) für die visuelle Analyse (Collins 2004).

2.2. Messung von oxidativen DNA-Schäden

DNA-Strangbrüche können durch ROS oder durch zahlreiche andere Agenzien entstehen. Sie können aber auch als Zwischenprodukte bei der DNA-Reparatur auftreten. Außerdem ist die Anwesenheit von oxidierten Purinen und Pyrimidinen ein spezifischer Indikator für das Vorhandensein von oxidativen Schäden (Collins et al., 1993).

Der Comet Assay wurde entwickelt, um genau diese oxidierten Basen, mit Hilfe eines zusätzlichen Inkubationsschrittes mit DNA-Reparaturenzymen zu entdecken (Collins et al., 1993). Diese Enzyme besitzen eine spezielle Glykosylase-Aktivität, bei der sie die geschädigten Basen entfernen und AP-Stellen (Apurinic/Apyrimidinic) bilden. Zusammen mit einer AP-Lyase werden diese Stellen dann zu Strangbrüchen umgewandelt. Das Enzym Endonuklease III (Endo III) ist spezifisch für oxidierte Pyrimidine, während Formamidopyrimidin DNA Glykosylase (FPG) mit 8-oxo-7,8-

dihydroguanine (8-oxoGua) reagiert. Die Zellen werden nach der Lyse mit dem Enzym bzw. einem Puffer für ca. 30 min inkubiert und erst anschließend in die Elektrophorese gegeben (Abb. 4). Eine Erhöhung des Schweifanteiles nach der Inkubation mit dem Enzym, verglichen mit der Inkubation mit dem Puffer alleine, weist auf das Vorhandensein von oxidierten Basen hin (Collins, 2014).

Dieser Enzym-modifizierte Comet Assay wird weitgehend genutzt und hat vor allem bei humanen Biomonitoring-Studien seine Beliebtheit gefunden (Azqueta und Collins, 2013). Hier geht es vor allem darum, oxidierte Purine und Pyrimidine in isolierten Lymphozyten zu ermitteln (Collins, 2014)

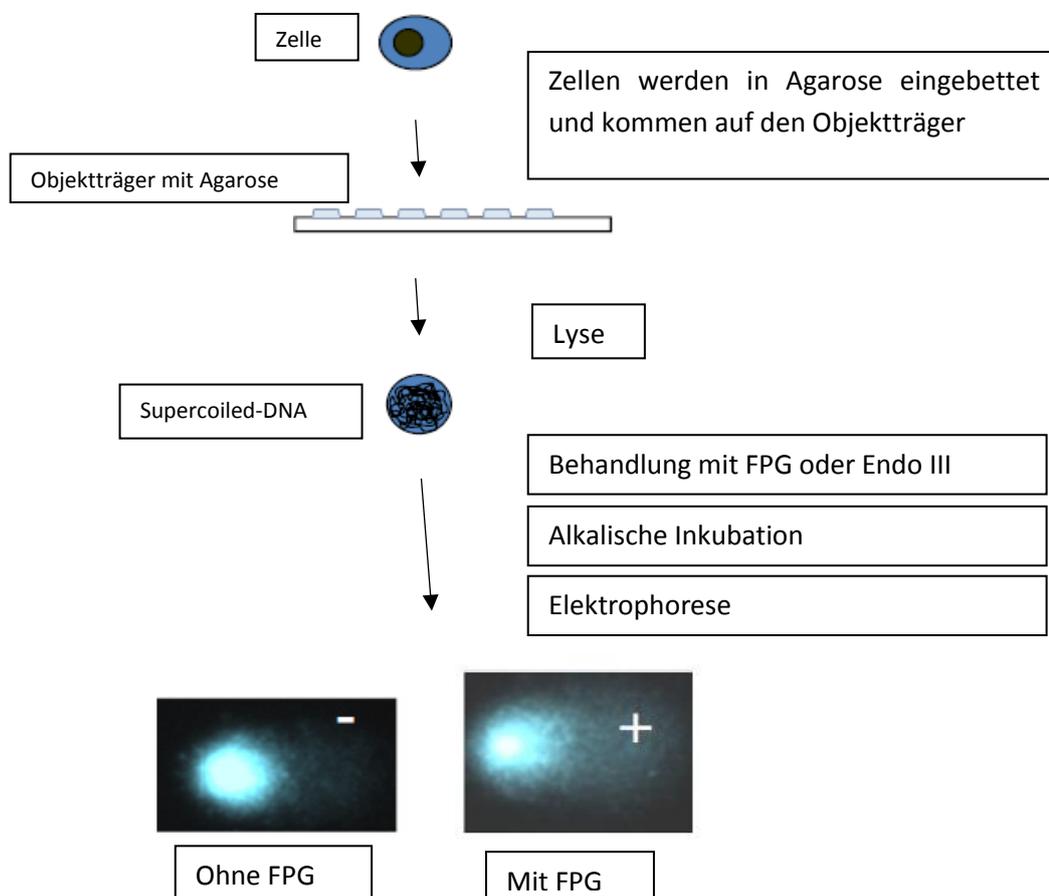


Abbildung 4: Schema des Enzym-modifizierten Comet Assays (modifiziert nach (Collins 2014)).

2.3. Messung des antioxidativen Status

Eine der frühesten Verwendungen des Comet Assays war die Bewertung des antioxidativen Status. Zellen werden mit H_2O_2 behandelt und in Folge werden Strangbrüche induziert. Die Effektivität der Bruchbildung hängt wiederum vom antioxidativen Schutz innerhalb der Zelle ab. Dieser antioxidative Status der Zelle steht im Zusammenhang mit zahlreichen Enzymen, wie Katalase und Superoxide Dismutase, Glutathionperoxidase, von verschiedenen Mikronährstoffen wie Vitamin C, Vitamin E, Carotinoide oder auch diversen Polyphenolen (Collins, 2014; Markovic et al., 2010). Der Comet Assay wird „normal durchgeführt“, mit einer zusätzlichen H_2O_2 Behandlung vor der Lyse der Zellen. Studien zeigten eine signifikante Abnahme der DNA-Strangbrüche bei H_2O_2 behandelten PBMC Zellen, wenn freiwillige Probanden eine Mischung aus Vitamin C, Vitamin E und β -Carotin für 20 Wochen einnahmen (Duthie et al., 1996).

2.4. Messung der DNA-Reparatur

Generell ist noch sehr wenig über den DNA-Reparaturmechanismus von unterschiedlichen Individuen bekannt, obwohl diese wahrscheinlich eine sehr große Rolle und wichtige Determinante für die Entstehung von Krebs darstellt. Ein angemessener bzw. geeigneter und sensitiver Assay steht nicht zur Verfügung, aber mit Hilfe des Comet Assays kann diese Lücke geschlossen werden (Collins, 2004).

In den folgenden zwei Unterkapiteln wird auf die verschiedenen Methoden zur Messung von DNA-Reparatur eingegangen.

2.4.1. Zelluläre Reparatur

Eine Möglichkeit die Reparaturkapazität der Zellen zu messen besteht darin, die Zellen zuerst zu schädigen. Danach wird beobachtet, wie schnell die Zellen die geschädigten Läsionen wieder entfernen. Lymphozyten können mittels Ionisierung, Strahlung oder H_2O_2 behandelt werden, danach folgt die Reparatur der Brüche (Collins, 2004). Bei den meisten Zelltypen ist das Zusammenführen bzw. Reparieren der Brüche ein sehr schneller Prozess von nur wenigen Minuten (Frankenberg-Schwager, 1989). Dieser Ablauf ist auch beim Comet Assay ersichtlich (Collins, 2004).

Frisch isolierte Lymphozyten können H_2O_2 -induzierte Brüche nur sehr langsam wieder reparieren. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass die Zellen unter einer zusätzlichen

DNA-Schädigung leiden, da sie plötzlich Luftsauerstoff ausgesetzt sind (Torbergsen und Collins, 2000). Auch die Reparatur von geschädigten Endonuklease III- oder FPG-Stellen ist ein langwieriger Prozess, der mehrere Stunden dauern kann (Collins und Horváthová, 2001).

Diese Bestimmung der zellulären Reparatur ist für humane Biomonitoring-Studien allerdings nicht ideal, da zum einen die Zellen für mehrere Stunden kultiviert werden müssen, und zum anderen sollte der Assay sofort nach dem Sammeln der Proben durchgeführt werden (Collins und Azqueta, 2012).

2.4.2. In vitro Repair Assay

Als Alternative kann die Reparaturkapazität eines Zellextraktes auch mit einem in vitro Assay bewertet und gemessen werden, der genau das Gegenteil des Enzym-modifizierten Comet Assays darstellt (Collins et al., 2001). Dabei werden Zellen gesunder Probanden, die einen spezifischen Schaden aufweisen, in Agarose eingebettet und anschließend mit einem Zellextrakt behandelt. Je nachdem, wie viele Reparaturenzyme im Extrakt vorhanden sind, werden die spezifischen Zellschäden erkannt und heraus geschnitten. Die dadurch entstehenden DNA-Bruchstücke führen dabei zu einem größeren Kometenschweif und dienen als Maß für die Reparaturkapazität (Collins und Azqueta, 2012).

2.5. Anwendung des Comet Assays

Der Comet Assay kann für diverse Zellkulturen, Blutzellen von Tieren und Menschen, Hämolymphe von Muscheln und Insekten, Sperma, zerstörtes Gewebe, Hefe oder freigesetzten Kernen aus Pflanzengewebe angewendet werden. Genauer gesagt kann von allen eukaryotischen Zelltypen gesprochen werden, die als einzelne Zellen auftreten oder nukleare Suspensionen darstellen (Azqueta und Collins, 2013). Sogar isolierte Chromosomen können verwendet werden (Cortés-Gutiérrez et al., 2011).

Heutzutage spricht man von vier großen Forschungsbereichen, in denen sich der Comet Assay durchgesetzt hat. Verwendung findet er bei Genotoxizitäts-Tests, um neue Medikamente, Kosmetika oder Sonstiges auf karzinogenes Potenzial in vivo oder in vitro zu testen. Die zweite große Gruppe bilden humane Biomonitoring-Studien. Dabei werden die arbeitsbedingten oder umweltbedingten Expositionen mit gefährlichen

Agenzien, oder auch bestimmte Krankheitseffekte untersucht. Der Comet Assay ist ebenso in der Ökotoxikologie vertreten. Dabei werden verschiedenste Organismen, wie Muscheln, Schnecken oder Pflanzen auf genetische Schäden durch Schadstoffe untersucht. Der letzte Forschungsbereich umfasst die Forschung rund um den Mechanismus der DNA-Schäden bzw. des DNA-Reparatursystems (Azqueta und Collins, 2013).

Die vier relevanten Forschungsbereiche im Zusammenhang mit dem Comet Assay werden in den nächsten Kapiteln näher erläutert.

2.5.1. Forschungsbereich Genotoxizitäts- Tests

Der Comet-Assay zählt heute zu den Standardmethoden um die Sicherheit neuartiger Arzneimittel oder Chemikalien festzustellen (Hartmann et al., 2003). Er wird in seiner einfachen Form zur Untersuchung von Strangbrüchen, allerdings mit erhöhter Sensitivität, verwendet (Collins, 2004). In einem Test mit zahlreichen Chemikalien und HepG2 Zellen (Leberzellkarzinom) stellte man fest, dass der Comet Assay die gleiche Sensitivität (Aufdeckung von Mutagenen/Karzinogenen) aufwies, wie zum Beispiel der Mikrokern-Assay oder Chromosomenaberrationen (Uhl et al., 1999). Jedoch ist die Sensitivität des Assays dadurch eingeschränkt, dass nur Strangbrüche detektiert werden. Viele genotoxische Chemikalien verursachen aber andere Schäden, wie bestimmte Basenmodifikationen, die erst durch chemischen Zerfall oder zellulären Prozess (DNA-Reparatur) als Strangbrüche auftreten. Es sollte daher möglich sein, die Sensitivität mittels FPG zu erhöhen, da dieses Enzym nicht nur oxidierte Purine, sondern auch andere Basenschäden in Strangbrüche umwandeln kann (Azqueta und Collins, 2013).

Azqueta et al. (2013) probierten genau diese Idee des Comet Assays mit der Verwendung von FPG aus. Sie verwendeten sechs bekannte genotoxische Chemikalien, zwei zytotoxische aber nicht-genotoxische Chemikalien und drei Chemikalien, die weder zytotoxisch noch genotoxisch waren. MMS, Methylnitrosourea (MNU), Benzo(a)pyren und 4-Nitrochinoline-1-oxide sind dafür bekannt, dass sie die DNA schädigen, aber nur eine geringe Anzahl von Strangbrüchen entsteht. Nach der Inkubation mit FPG war der Anteil der Strangbrüche deutlich höher. Wenn dieser Enzym-modifizierte Comet Assay regelmäßig als Genotoxizitäts-Test verwendet wird, können viele chemische Stoffe

besser klassifiziert werden und mögliche Risiken schneller erkannt werden (Azqueta und Collins, 2013).

Eine der jüngsten Verwendungen des Comet Assays ist die Ermittlung von genotoxischen Effekten von Nanomaterialien. Silbernanopartikel (AgNPs) sind die am häufigsten gefundenen Nanopartikel in Handels- und Medizinprodukten (Collins, 2015). Rinna et al. (2015) fanden heraus, dass AgNP die Bildung von reaktiven Sauerstoff und die Oxidation von DNA-Basen bei humanen embryonalen Epithelzellen bewirken. Zur Untersuchung verwendeten sie den modifizierten Comet Assay für die Erkennung spezifischer hOGG1 sensitiver-Stellen. Es zeigte sich, dass nach einer 30 minütigen Behandlung mit AgNP eine DNA-Oxidation zu erkennen war. Jedoch nach einer Inkubation von zwei Stunden keinerlei Schäden vorhanden waren. Der oxidative DNA-Schaden war aufgrund des DNA-Reparatursystems somit nur flüchtig vorhanden (Rinna et al., 2015).

2.5.2. Forschungsbereich Humane Biomonitoring-Studien

Ein Großteil der publizierten humanen Biomonitoring-Studien verwenden für den Comet Assay frische Vollblutzellen, isolierte Lymphozyten oder Leukozyten. Diese können zwar nicht direkt als typische somatische Zellen betrachtet werden, allerdings reflektiert ihr zellulärer, nuklearer und metabolischer Status sehr gut die gesamte Körperexposition, da sie im Körper zirkulieren (Dusinska und Collins, 2008). Nachteile sind, dass sie erstens kein Zielgewebe für Krebs darstellen und zweitens nicht ganz klar ist, ob die Schäden, die in den weißen Blutzellen ersichtlich sind, genau die Schäden des Zielgewebes reflektieren (Collins, 2004). Es können daher auch Epithelzellen, wie Mundschleimhautzellen, Zellen des Tränenkanals, Linsenzellen oder Sperma verwendet werden. Diese erfordern aber spezielle Techniken bzw. weichen vom normalen Standardprotokoll des Comet Assays ab (Azqueta und Collins, 2013). Der Vorteil besteht aber darin, dass die Epithelzellen Komponenten vieler menschlicher Organe sind und daher gut als Biomarker zur Evaluierung der Genotoxizität verwendet werden können. Zudem stammen 80 % der Karzinome aus epithelialeem Ursprung (Rojas et al., 2014).

Anwendung finden die humanen Biomonitoring-Studien vor allem bei der Beobachtung der beruflichen Exposition mit genotoxischen Chemikalien oder Strahlung (Somorovská et al., 1999), bei der Analyse von oxidativen Stress in Zusammenhang mit verschiedensten Krankheiten (Collins et al., 1998) und auch bei der Entdeckung

bestimmter DNA-Schäden, die mit dem Ernährungsstil assoziiert werden (Betti et al., 1994).

2.5.2.1. Ernährungsinterventionsstudien

Der Comet Assay erweist sich als eine passende Methode um den Zusammenhang zwischen verschiedenen Nährstoffen, Mikronährstoffen und DNA-Schäden zu erforschen (Collins, 2004). Eine intensive Forschung von fast 20 Jahren ergab eine beachtliche Anzahl von Publikationen, die den Zusammenhang zwischen sekundären Pflanzenstoffen und oxidativen DNA-Schäden in Leukozyten und PBMC's erforschten (Collins et al., 2014). Einige der gut kontrollierten Studien zeigten reduzierte Endo III- bzw. FPG-sensitive Stellen in Leukozyten nach einer mehrwöchigen regelmäßigen Aufnahme von Multivitamin-tabletten (Duthie et al., 1996), Kiwis (Collins et al., 2003), Gallussäure (Ferk et al., 2011) oder auch Sojamilch (Mitchel und Collins, 1999). Es gibt jedoch auch Studien, in denen keine statistisch signifikante Veränderung in Endo III- oder FPG-sensitiven Stellen in Blutzellen nach einer Supplementation mit Carotinoiden (Collins et al., 1998) oder Preiselbeersaft (Duthie et al., 2006) erfolgte. Zudem gab es auch zwei Studien die eine Ernährungsveränderung vorsahen. Dabei mussten von den Probanden 500/600g/d Obst oder Gemüse aufgenommen werden. Es zeigte sich jedoch keine Verbesserung der oxidierten DNA-Schäden in den Leukozyten (Van Den Berg et al., 2001). Daraufhin wurde spekuliert, ob die Größe des Effektes womöglich vom Ernährungsstatus der Studienteilnehmer abhängt. Personen mit erhöhtem oxidativem Stress erleben durch die Intervention mit Antioxidantien einen positiven Effekt (Møller und Loft, 2006).

In einer anderen Studie von Müllner et al. (2013) wurden durch eine gesunde Ernährungsform bzw. durch einen hohen Anteil an Antioxidantien in der Ernährung positive Effekte auf die DNA-Oxidation bei Diabetikern gezeigt. Dabei wurden 66 Diabetiker und 21 Nicht-Diabetiker in die Studie aufgenommen. Zu Beginn der Studie wurden generell alle Teilnehmer über eine gesunde Ernährungsform aufgeklärt. Zufällig wurde anschließend eine Interventionsgruppe gewählt, die zusätzlich 300g Gemüse und 25ml mehrfach ungesättigtes Pflanzenöl pro Tag verabreicht bekamen. Oxidative DNA-Schäden wurden mittels Comet Assay gemessen. Die Diabetiker in der

Interventionsgruppe zeigten sowohl eine signifikante Reduktion der DNA-Strangbrüche, als auch reduzierte HbA1c – Werte (Müllner et al., 2013).

Staruchova et al. (2008) haben mit einer großen Studie (383 Personen) gezeigt, dass die Aufnahme von Obst und Gemüse mit oxidierten DNA-Schäden negativ korreliert (Staruchova et al., 2008).

Eine weitere Placebo-kontrollierte Crossover Studie von Choi et al. (2015) bestätigte positive Effekte bei einer mehrwöchigen Einnahme von grünem Tee bei Diabetes Typ 2 Patienten. Nach einer 12-wöchigen Intervention konnte man eine Verringerung der DNA-Strangbrüche und eine Verringerung der oxidierten Purine feststellen. Zudem waren zwei Enzyme, OGG1 (Glykosylase, die 8-oxoGua von der DNA trennt) und Hämoxygenase 1 (schützt vor oxidativen Stress) durch die Intervention erhöht (Choi et al., 2015).

Ibero-Baraibar et al. (2015) führten einen 4-wöchigen Parallelversuch mit übergewichtigen bzw. adipösen Personen durch, um zu erforschen, ob die Zugabe von Kakaoextrakt in Fertiggerichten vor den Effekten des oxidativen Stress schützt. DNA-Strangbrüche, FPG-sensitive-Stellen und die Resistenz gegenüber H₂O₂-induzierten Strangbrüchen wurden in PBMC gemessen. Keiner der drei Biomarker wurde durch die Kakaoextrakt-Supplementation beeinflusst. Allerdings zeigte sich in der Kakao-Gruppe eine negative Korrelation der oxidierten Basen mit dem Anteil der Kakao-Metabolite im Plasma, was zu einem positiven Effekt führte (Ibero-Baraibar et al., 2015).

2.5.2.2. Der Alterungsprozess und DNA-Reparatur

Der Alterungsprozess wird im Allgemeinen mit dem Verlust der Muskelmasse, der Körperkraft und der Lebensqualität assoziiert (Johnston et al., 2008). Deshalb wird davon ausgegangen, dass die DNA-Schäden mit zunehmenden Alter ansteigen und auch mehr Strangbrüche bzw. oxidierte Basen in den PBMC's bei der Auswertung mittels Comet Assay bei älteren Personen zu erkennen sind. Die Ergebnisse sind nicht immer ganz einheitlich, doch meistens ist eine leichte Erhöhung der oxidierten DNA-Schäden zu erkennen (Dusinska und Collins, 2008).

In einer Studie von Humphreys et al. (2007) wurden DNA Strangbrüche und oxidierte Purine in verschiedenen Altersgruppen (20–35 (n = 40), 63–70 (n = 35), 75–82 (n = 22)) mittels Comet Assay gemessen. Die Forschergruppe bestätigte, dass bei den älteren

Personen ein erhöhter DNA-Schaden vorhanden war, allerdings resultierte dieser nicht durch die Abnahme des antioxidativen Status oder durch eine Verminderung der DNA-Reparaturkapazität. Vielmehr geht die Arbeitsgruppe davon aus, dass diese sich mit dem Alter erhöhen (Humphreys et al., 2007).

In einer Studie von Franzke et al. (2014) wurde der Effekt von körperlicher Aktivität und der Einnahme von Supplementen auf die DNA-Strangbrüche in PBMC's bei älteren, institutionalisierten Frauen und Männern aus Wien untersucht. Die Probanden hatten ein Durchschnittsalter von 83 Jahren und wurden je nach Trainingseinheit in drei Gruppen (Kraftsport, Kraftsport und Supplemente, kognitive Trainingseinheiten) unterteilt. Es konnten keine erhöhten oxidativen DNA-Schäden bei den älteren Personen festgestellt werden. Dies kann durch das hohe Durchschnittsalter (83 ± 6 Jahre) und dem begrenzten Altersbereich erklärt werden. Zudem zeigten die Forscher, dass vor allem die H_2O_2 -induzierten Strangbrüche signifikant verringert wurden (Franzke et al., 2014). Es ist aber durchaus auch möglich, dass bei älteren Personen der antioxidative Status und die DNA-Reparaturkapazität verringert sind, da die Mitochondrien mit dem Alter ihre Effizienz verlieren und mehr reaktiven Sauerstoff freisetzen. Zudem ist wahrscheinlich, dass diese Personen in ihren jüngeren Jahren einen sehr hohen antioxidativen Status und eine hohe Reparaturkapazität, im Vergleich zu denjenigen die dieses Alter nicht erreichten, aufwiesen (Humphreys et al., 2007).

2.5.2.3. Krebs und andere Krankheiten

Der Comet Assay als Methode für die Messung der oxidativen Schäden bzw. der DNA-Reparaturkapazität in Verbindung mit Krebs, wurde erstmals von McKenna et al. (2008) geprüft. Schäden der DNA und ein defektes Reparatursystem sind die zu Grunde liegenden treibenden Kräfte für die Initiation und Progression von Krebs. Es ist daher nicht überraschend, dass viele Studien auf den Comet Assay zur Untersuchung von Tumorzellen zurückgreifen (McKenna et al., 2008).

Mittels Comet Assay kann die Strahlenempfindlichkeit in einer Reihe von Tumorzelllinien, wie Gebärmutterhals (Gurská et al., 2007), Dickdarm (Dunne et al., 2003), Blase (McKeown et al., 2003), Brust (Niedbala et al., 2006) oder des Eierstockes

(Bacová et al., 2000) gemessen werden. Auch extrahierte Tumorzellen von Krebspatienten können für den Assay verwendet werden (McKenna et al., 2008).

Zunächst wurde der neutrale Comet Assay zur Untersuchung der Strahlenempfindlichkeit in einer Reihe von Tumorzelllinien untersucht (Olive et al., 1994). Jedoch benötigte man, im Vergleich mit anderen klinischen Methoden, eine viel höhere Strahlendosis, um einen messbaren Anteil an Doppelstrangbrüchen erkennen zu können. Mit Hilfe des alkalischen Comet Assays konnten Strahlungseffekte schon bei normalen, klinisch relevanten Dosen gemessen werden. Somit konnte bewiesen werden, dass die Strahlensensitivität in einer Reihe von Tumorzellen mittels Comet Assay erfolgreich gemessen werden kann (McKenna et al., 2008).

Zudem wiesen Patienten die unter Krebs litten, erhöhte DNA-Schäden in PBMC's auf, vor allem bei Brustkrebs (Smith et al., 2003), Nierenkrebs (Lin et al., 2007), Ösophagus Karzinom (Olliver et al., 2005) oder Lungenkrebs (Lou et al., 2007).

In einer Studie von Cuchra et al. (2016) wurden die oxidativen DNA-Schäden von Brustkrebspatienten mit einer gesunden Referenzgruppe verglichen. Dabei zeigten sich signifikant höhere DNA-Schäden bei den Krebspatienten, verglichen mit der gesunden Referenzgruppe ($p \leq 0,001$). Zudem konnte auch gezeigt werden, dass die Brustkrebspatienten deutlich mehr H_2O_2 -induzierte Strangbrüche aufwiesen (Cuchra et al., 2016).

PBMC's wurden auch aus Krebspatienten extrahiert (meist vor der Chemotherapie oder Strahlentherapie) und mit DNA-schädigenden Agenzien in vitro inkubiert, um signifikante Unterschiede bezüglich der DNA-Schäden und der Reparaturkapazität im Vergleich zu einer Kontrollgruppe herauszufinden. Dabei zeigte sich, dass erhöhte DNA-Schäden und eine verringerte DNA-Reparaturkapazität im Vergleich zur Kontrollgruppe vorhanden waren (McKenna et al., 2008).

Des Weiteren scheint oxidativer Stress eine Hauptrolle in der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen zu spielen. Bei Alzheimer und Parkinson Patienten wurde ein erhöhtes Level an oxidierten Purinen und Pyrimidinen in PBMC's und Leukozyten entdeckt (Kadioglu et al., 2004), (Migliore et al., 2002).

Es wurde auch eine erhöhte DNA-Oxidation in Patienten mit Down-Syndrom festgestellt (Dusinska et al., 1999).

Eine große Studie von Cristiana Pereira et al. (2016) beschreibt den Zusammenhang von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und oxidativen DNA-Schäden (Pereira et al., 2016). Bei diesen Darmerkrankungen (Morbus Chron und Colitis ulcerosa) herrscht ein symbiotisches Ungleichgewicht (Christophi et al., 2012). Dadurch ist ein erhöhtes Risiko für die Bildung von ROS und den daraus entstehenden Folgen, wie zum Beispiel ein lebenslanges Risiko für die Entwicklung von Krebs, gegeben (Bartsch und Nair, 2006). In die Studie wurden 638 Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen aufgenommen und mit einer gesunden Referenzgruppe verglichen. Die oxidativen DNA-Schäden und FPG-sensitiven Stellen wurden mittels Comet Assay ermittelt. Die Ergebnisse zeigten erhöhte DNA-Schäden in der Gruppe der Darmerkrankungen, verglichen mit der Referenzgruppe. Vor allem das Diagnosealter, die entzündliche Belastung und die therapeutischen Möglichkeiten spielen eine große Rolle hinsichtlich der DNA-Schäden (Pereira et al., 2016).

Einige Comet Assay Studien wurden mit Diabetespatienten durchgeführt. Viele davon wiesen erhöhte DNA-Schäden in Zusammenhang mit der Krankheit auf. Es waren erhöhte Anteile an Strangbrüchen und oxidierte Läsionen bei Diabetes Typ 2 Patienten in den PBMC's ersichtlich (Collins et al., 1998). Zudem wurde eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber H_2O_2 und eine verringerte DNA-Reparaturkapazität, im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe, entdeckt (Blasiak et al., 2004).

In einer Studie von Müllner et al. (2013) konnte allerdings kein signifikanter Unterschied der oxidativen DNA-Schäden in den Lymphozyten zwischen Diabetespatienten und Nichtdiabetikern festgestellt werden. Allerdings konnte durch die Supplementation mit Gemüse und Pflanzenöl (300g Gemüse, 25ml Pflanzenöl) eine Reduktion der Strangbrüche bei den DMT2 Patienten erzielt werden (Müllner et al., 2013).

Diabetische Kinder hatten im Vergleich zu gesunden Kindern eine erhöhte DNA-Reparaturkapazität in PBMC. Dies hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass sie ständig einem erhöhten oxidativen Stress ausgesetzt sind (Varvařovská et al., 2004).

Die Verwendung des Comet Assays zur Messung der Reparaturkapazität der oxidativen DNA-Schäden öffnet viele neue Perspektiven in der Medizin. Viele strahlenempfindliche Syndrome werden mit defekter Reparatur von Einzel- oder Doppelstrangbrüche assoziiert. Zudem scheint der Comet Assay auch gut dafür geeignet zu sein,

strahlensensitive Personen, die einer erhöhten ionisierenden Strahlung während diversen medizinischen Prozessen ausgesetzt sind, zu testen (McKenna et al., 2008).

2.5.2.4. Das ComNet-Projekt

„ComNet“ beschreibt ein Netzwerk, das während des 9. Internationalen Comet Assay Workshops in Kusadasi (Türkei) im September 2011 gegründet wurde. Das Netzwerk besteht aus Forschern, die den Comet Assay für humane Biomonitoring-Studien verwenden (Collins et al., 2012). Ziel ist die Etablierung des Comet Assay als eine zuverlässige, validierte Methode für humane Biomonitoring-Studien. Es geht vor allem darum, die Auswertung des Comet Assays durch verschiedenen Laboratorien zu vereinheitlichen und die Ergebnisse vergleichbar zu machen. Nur so kann der Comet Assay als Biomonitoring Methode verwendet werden. Daten von schon existierenden Studien werden gesammelt und zusammengefasst und Protokolleigenschaften, die das Ergebnis beeinflussen, werden geprüft (Collins et al., 2014).

Die Ziele und Aufgaben des ComNet-Projektes sind (Collins et al., 2014):

- Forscher mit einem Interesse am Comet Assay für das Netzwerk anzuwerben. Im Mai 2013 waren bereits 100 Labore weltweit auf der Projektseite registriert.
- Sammeln von Informationen über die Verwendung von technischen Protokollen von humanen Populationsstudien mittels Fragebogen.
- Die Schaffung einer grundlegenden Basis der DNA-Oxidationsschäden für zukünftige Literatur sowie Zusammenhänge mit Geschlecht, Alter, Ernährung, Lebensstil usw. zu erforschen.
- Die Festlegung der experimentellen Faktoren, die die Handhabung und dadurch auch die Verlässlichkeit und Robustheit des Comet Assay beeinflussen.
- Die Durchführung von regelmäßigen diversen Ringversuchen mit identischen Proben, um die Variabilität zu reduzieren und den Comet Assay zur Messung von DNA-Schäden und der DNA-Reparaturkapazität zu überprüfen.
- Das Zusammenstellen von Richtlinien für die Planung und Durchführung des Comet Assay, in Bezug auf Lagerung, Transport und Analysierung der Proben, sowie für die Interpretation der Daten.

- Die weitere Forschung über den Zusammenhang der DNA-Schäden bzw. der DNA-Reparaturmechanismen mit der menschlichen Gesundheit bzw. Krankheit.

2.5.3. Forschungsbereich Ökotoxikologie

Der Comet Assay ist eine wichtige und nützliche Methode, um die oxidativen DNA-Schäden, die durch arbeits- oder umweltbedingte Belastung mit genotoxischen Agenzien entstehen, zu quantifizieren (Collins et al., 2014). Studien von Valverde und Rojas (2009) zeigten, dass Personen die einer erhöhten Umweltbelastung, Strahlung oder Pestiziden ausgesetzt sind, erhöhte DNA-Schäden aufweisen (Valverde und Rojas, 2009). Die gleichen Effekte sind bei Studien mit belasteter Luft, vor allem spezialisiert auf polycyclische aromatische Hydrocarbonate (PAH) und Schwermetalle (Wilhelm et al., 2007), Sonneneinstrahlung (Møller et al., 2002), Benzen (Navasumrit et al., 2005) oder Passivrauchen (Piperakis und Petrakou, 2000) zu sehen.

Coronas et al. (2009) untersuchten die Auswirkungen von genotoxischen Effekten auf Menschen in Brasilien, die in Windrichtung einer Ö raffinerie leben oder darin arbeiten. PBMC und Mundschleimhautzellen wurden mittels Comet Assay und Mikronukleus Assay ausgewertet und mit einer Referenzgruppe, die weniger Verkehr und industriellen Einfluss ausgesetzt war, verglichen. Die Gruppe, die der Ö raffinerie ausgesetzt war, zeigte deutlich höhere oxidative DNA-Schäden in den Lymphozyten, verglichen mit der Referenzgruppe (Coronas et al., 2009).

Die meisten Forschungsarbeiten über Umweltbelastung, die den Comet Assay verwenden, untersuchen den Zusammenhang der Luftverschmutzung bzw. der Inhalation mit schädlichen Stoffen und DNA-Schäden. Der Assay erweist sich zudem als sehr hilfreich, um das oxidative Potenzial der Feinstaubbelastung zu analysieren (Valverde und Rojas, 2009).

Umweltüberwachungsstudien wurden früher eher selten durchgeführt, heute steigt die Anzahl jedoch enorm. Die Ermittlung der experimentellen Exposition von Fischen oder Muscheln mit diversen Giftstoffen, gemessen mit dem Comet Assay, gibt nützliche Informationen über die Dosis-Wirkungsbeziehung an. Aber die Anwendung der Methoden und Extrapolation der Ergebnisse sind eine Herausforderung. Zum einen müssen entwickelte Standardprotokolle abgeändert werden und zum anderen stellt die

Anpassung von wilden Organismen an die belasteten Umweltstressoren ein Problem dar (Collins, 2015).

Martins und Costa (2015) beschrieben genau diese Probleme bei der Überprüfung der Literatur, basierend auf der Arbeit mit einer Reihe von verschiedenen Organismen. Sie verglichen den Comet Assay mit anderen Genotoxizitätstests und betonten, dass für die Verwendung des Assays in der Risikobewertung spezifische Richtlinien und standardisierte Protokolle notwendig sind. Zudem sollte parallel immer auf Zytotoxizität geprüft werden (Martins und Costa, 2015).

In einer Studie von Amaeze et al. (2015) wurde die Verschmutzung der Lagos Lagune (Nigeria) mit Hilfe von kultivierten Fischkiemenzellen ermittelt. Diese wurden Extrakten von Bodensatzproben von elf verschiedenen Stellen ausgesetzt und anschließend die Zytotoxizität, DNA-Strangbrüche, oxidierte Basen und endokrine Disruptoren gemessen. Zudem wurden chemische Analysen der Extrakte durchgeführt. Es wurden deutlich erhöhte DNA-Schäden in den Kiemenzellen bei allen elf verschiedenen Bodenproben festgestellt. Die Autoren gehen davon aus, dass der Assay eine gut durchführbare Alternative zur chemischen Analyse von Schadstoffen bzw. Verunreinigungen darstellt (Amaeze et al., 2015).

3. Material und Methoden

3.1. Studiendesign

Die vorliegende Masterarbeit basiert auf der MIKROBIAB-Studie, die in Zusammenarbeit mit der Diabetesambulanz des Gesundheitszentrums Süd der Wiener Gebietskrankenkasse und dem Department für Ernährungswissenschaften der Universität Wien 2014 durchgeführt wurde. Dabei wurden 146 weibliche Patienten mit diagnostiziertem Diabetes Mellitus Typ 2 in die Studie aufgenommen. Alle Studienteilnehmerinnen waren über 30 Jahre alt, standen unter Medikation (orale Antidiabetiker oder Insulin) und waren Nicht-Raucher. Die Blut- und Speichelproben wurden während der regulären Gesundheitschecks in der Diabetesklinik gesammelt. Die DNA-Schäden wurden mittels Comet Assay ermittelt, wobei in dieser Masterarbeit für die Diabetesgruppe die schon hergestellten Reserve-Objektträger (Backup Slides) verwendet und ausgezählt wurden.

Als Referenzgruppe dienten 24 übergewichtige Lehrerinnen ohne diagnostizierten Diabetes Mellitus Typ 2, welche an einem einjährigen multidisziplinären Interventionsprogramm zur Gewichtsreduktion der LKUF Oberösterreich teilnahmen. Die in dieser Arbeit verwendeten Proben wurden jeweils entweder vor- oder 1 Jahr nach der Intervention gesammelt (Zeitpunkt1/ Zeitpunkt5). Für diese Proben wurde der Comet Assay (Protokoll laut Anhang) neu durchgeführt (Strangbrüche, Resistenz gegenüber H_2O_2 , FPG-sensitive-Stellen) und die Zellen anschließend ausgezählt.

3.2. Herstellung der Zellsuspensionen am Studientag

3.2.1. Lymphozytenisolierung (PBMC)

Die mittels Venenpunktur gesammelten Blutproben wurden zuerst in Leukosept-Röhrchen überführt und bei Raumtemperatur zentrifugiert (1000 rcf/g, 15min, RT, ohne Bremse). Anschließend wurde das Plasma abgenommen und die Lymphozytenwolke in ein neues 50 ml Röhrchen überführt (jeweils 2 pro Proband) und mit kaltem PBS auf 40-50ml aufgefüllt. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Proben wurden 5x über dem Kopf geschwenkt und nochmals zentrifugiert (1300 rpm, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde abgesaugt, mit kaltem PBS wieder aufgefüllt und erneut zentrifugiert.

Zum Schluss wurde der Überstand wieder abgesaugt und die Zellen in 1ml PBS gelöst. Danach wurde mit PBS auf genau 10ml aufgefüllt. Für die anschließende Zellzahlbestimmung mittels Countess wurden 20µl von der Zellsuspension mit 60µl PBS in einem Cup gemischt und davon wiederum 10µl herausgenommen und mit 10µl Trypanblau vermischt. Daraus wurden insgesamt 10µl in eine spezielle Zählkammer für die Countess gegeben. Die lebenden und toten Zellen wurden gemessen und notiert. Zum Schluss wurden die Proben mit dem Einfriermedium (FBS + 10 % DMSO) vermischt, anschließend langsam heruntergekühlt und bei -80°C gelagert.

3.2.2. Orale Leukozytenisolierung (OL)

Für die Gewinnung des Speichels wurden 50ml Rörchen mit 10ml 4-fach konzentrierter Kochsalzlösung vorbereitet. Die Patientinnen mussten den Mund 2-mal kräftig mit 15ml Leitungswasser ausspülen. Das Mundspülwasser wurde direkt in die 50ml Rörchen gespuht. Für die OL Isolierung wurden zunächst pro Proband 5ml Histopaque in 15ml Rörchen gefüllt. Die auf Eis lagernden 50ml Rörchen mit dem Mundspülwasser wurden zentrifugiert, anschließend der Überstand abgesaugt und mit 15ml physiologische Kochsalzlösung resuspendiert. Nach weiterem Zentrifugieren (649rcf/g, 10min, RT) wurde der Überstand nochmals abgenommen und 4ml RPMI Zellkultur Medium dazu pipettiert. Die Zellsuspension wurde danach vorsichtig auf das Histopaque geschichtet, sodass 2 Phasen erkennbar waren. Nach erneuter Zentrifugation (400rcf/g, 30min, RT/mind., 16°C, ohne Bremse) wurde die Leukozytenwolke möglichst vollständig in ein neues 15ml Rörchen überführt und sofort auf Eis gelagert. In weiterer Folge wurde mit kaltem PBS auf 7ml aufgefüllt, bei 4°C zentrifugiert, der Überstand möglichst genau entfernt und mit 50µl PBS aufgefüllt. Zum Schluss wurde die Zellzahl mittels Countess bestimmt (10µl Zellsuspension und 10µl Trypanblau). Bei einer Zellzahl von über 5×10^5 Zellen wurde die Suspension mit PBS auf diesen Wert verdünnt. Wenn die Zellzahl niedriger war, wurde die Suspension direkt verwendet. Die Aufarbeitung für sich wurde direkt am Tag der Blutabnahme durchgeführt.

3.2.3. Vollblut

Jeweils 100µl Vollblut der Patientinnen wurden in einen Cup pipettiert und anschließend mit Stickstoff begast. Die Proben wurden graduell mit Hilfe von „Mr. Frosty“ heruntergekühlt und bei -80°C gelagert.

3.3. Verwendung der Zellsuspension am Tag des Comet Assays

3.3.1. PBMC

Die PBMC-Cups wurden aus dem Tiefkühlschrank (-80°C) geholt und schnell in den Händen bzw. Wasserbad aufgetaut und zentrifugiert (3000 rpm, 5 min, 4°C). Danach wurden die Proben sofort auf Eis gegeben und der Überstand wurde abgenommen. Vorsichtig wurden wieder 400µl PBS dazugegeben und solange resuspendiert, bis sich das Zellpellet löste. Danach wurden die Proben ein weiteres Mal zentrifugiert, der Überstand wieder abgenommen und zwischen 200 und 400µl PBS wurden hinzugefügt. Wichtig ist, diese Schritte schnell durchzuführen, da das Einfriermedium DMSO enthält, welches bei Raumtemperatur zytotoxisch wird.

Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Countess bestimmt. Dabei wurden 10µl Zellsuspension und 10µl Trypanblau vermengt und in die Zählkammer gegeben. Die Lebendzellen sowie Lebensfähigkeit wurden gemessen und notiert. Für jede Probe wurde eine Zellzahl zwischen $3-6 \times 10^5$ Lebendzellen berechnet und dementsprechend mit PBS aufgefüllt bzw. erneut zentrifugiert und mit geringer Menge PBS verdünnt.

3.3.2. Orale Leukozyten (OL)

Für die Verwendung der oralen Leukozyten wurde der Comet Assay direkt am Studientag durchgeführt.

3.3.3. Vollblut

Die Vollblutproben wurden aus dem -80°C Tiefkühlschrank geholt, in der Hand aufgetaut und bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

3.4. Durchführung Comet Assay

3.4.1. Beschichtung der Objektträger

200mg Normal Melting Point Agarose (NMA) wurden mit 20ml destilliertem Wasser vermischt und langsam in der Mikrowelle erhitzt, bis die Agarose ganz klar und flüssig war. Das Wasserbad wurde auf 55°C erwärmt und die Agarose während des gesamten Vorganges hineingestellt, damit sie heiß und flüssig blieb. Die Slides wurden nacheinander in die Agarose getaucht, die Hinterseite mit einem Papiertuch sorgfältig gesäubert und über Nacht zum Trocknen ausgelegt.

3.4.1. Herstellung der Lösungen

3.4.1.1. Low Melting Agarose (LMA) 0,8 %

160mg Low Melting Agarose (LMA) wurden mit 20ml PBS vermischt, um eine 0,8%ige Agaroselösung zu erhalten. Danach wurde sie in der Mikrowelle zur Gänze aufgelöst und anschließend à 10ml aliquotiert. Während der Verwendung wurde die Agarose ins Wasserbad (37°C) gestellt und der Rest im Kühlschrank gelagert (genaues Protokoll siehe Anhang).

3.4.1.2. Lyselösung

Die Lyselösung wurde immer am Anfang der Woche frisch hergestellt und in der Zwischenzeit im Kühlhaus bzw. Kühlschrank gelagert. Es wurde jeweils 1 Liter hergestellt (2.5 M NaCl, 0.1M EDTA, 10 mM Tris base mit 1% Triton X-100, pH 10) (genaues Protokoll siehe Anhang).

3.4.1.3. Elektrophoreselösung

Da die Elektrophoreselösung immer frisch sein muss, wurde sie am Tag der Verwendung gleich in der Früh frisch hergestellt und im Kühlschrank gelagert. Für die Elektrophorese wurden 2,5 Liter hergestellt (0,3 M NaOH, 0,001 M EDTA), am Magnetrührer durchgemischt und anschließend sofort gekühlt (genaues Protokoll siehe Anhang).

3.4.1.4. Puffer F (enzyme reaction buffer for FPG)

Die 10-fach konzentrierte Puffer F Stocklösung wurde aus 40 mM HEPES, 0,1 M KCl, 0,5 M EDTA und 0,2mg/ml BSA hergestellt und danach gleich in 50ml Röhrchen aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Der pH-Wert wurde mit Hilfe von 1 M KOH auf pH 8 eingestellt.

Zur Verwendung wurde der Inhalt des Röhrchens im Wasserbad aufgetaut, in einen 500ml Messkolben überführt, und mit destilliertem Wasser zu einer 1:10 Verdünnung aufgefüllt. Anschließend wurde der pH-Wert mit Hilfe von KOH auf pH = 8 eingestellt und der genaue Wert notiert (genaues Protokoll siehe Anhang).

3.4.1.5. H₂O₂

Mittels H₂O₂ und destilliertem Wasser wurde eine 0,1 molare Stocklösung hergestellt. Diese ist eine Woche haltbar und wurde immer am Beginn der Woche frisch hergestellt. Für die Verwendung direkt am Tag wurden jeweils 100µl Stocklösung auf 100ml

destilliertem Wasser aufgefüllt, um eine Konzentration von 0,1µmol/L zu erhalten. (genaues Protokoll siehe Anhang).

3.4.1.6. FPG

FPG-Stock wurde auf 50µl 1:10 verdünnt (5µl FPG und 45µl Puffer F), in Cups aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Am Tag der Verwendung wurde die 50µl FPG-Verdünnung kurz runter zentrifugiert und dann eine 1:3000 Verdünnung mit dem Puffer F hergestellt (+1450µl Puffer).

3.4.2. Aufbringung der Zellen auf die Objektträger

3.4.2.1. PBMC und OL

Während des gesamten Comet Assays wurde die 12-Gel Methode verwendet, das heißt pro Objektträger 6 Probanden und pro Proband jeweils 2 Gele. Die beschichteten Objektträger wurden vor der Verwendung gut beschriftet (Abb. 5).

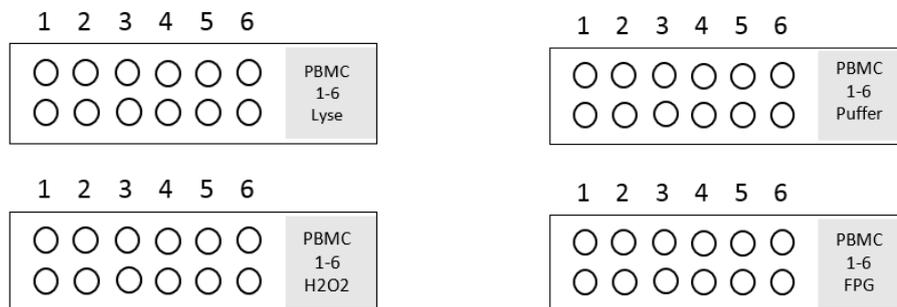


Abbildung 5: Objektträger für den Enzym-modifizierten Comet Assay

Für die Lymphozyten und oralen Leukozyten wurden jeweils ein Objektträger für Lyse, H₂O₂, Puffer und FPG vorbereitet und auch jeweils einen zusätzlichen Objektträger (Backup Slide) dazu hergestellt, falls das eine oder andere Gel verschwand oder nicht auszählbar war.

Die im Kühlschrank lagernde LMA Agarose wurde in der Mikrowelle solange erhitzt, bis sie klar und flüssig war und anschließend gleich ins Wasserbad (37°C) gestellt. Küvetten mit Lyse, H₂O₂ und Puffer wurden ebenfalls vorbereitet und auf Eis gestellt. Die darauffolgenden Schritte wurden auf den silbernen Kammern auf Eis durchgeführt und

mussten schnell ausgeführt werden. In einem Cup wurden jeweils 15µl Agarose mit 10µl Zellsuspension gemischt und anschließend mit Hilfe der Multipipette 12x5µl der Suspension auf die Objektträger aufgetragen, damit die Gele entstanden. Die H₂O₂-Objektträger wurden, bevor sie in die Lyse kamen, 5 min in H₂O₂ inkubiert, gleich darauf mit PBS gewaschen und dann erst in die Lyse gegeben. Alle anderen Objektträger wurden gleich danach in die Lyse gestellt und für mindestens 1 Stunde im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Das genaue Protokoll befindet sich im Anhang.

3.4.2.2. Vollblut

Die mit NMA beschichteten Objektträger wurden zuerst beschriftet und dann jeweils ein Objektträger (mit einem zusätzlichen Reserve Stück) für Lyse, FPG und Puffer hergestellt (Abb. 6).

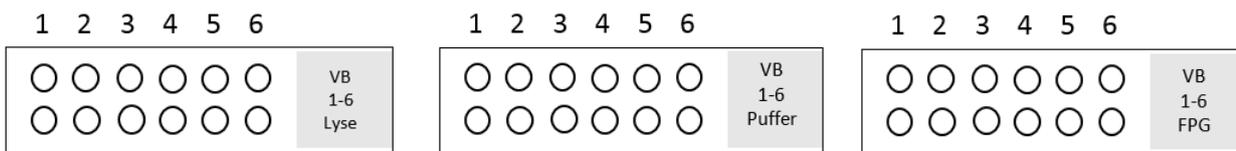


Abbildung 6: Objektträger für den Comet Assay mit Vollblut

Die LMA Agarose (0,8%) wurde in der Mikrowelle erhitzt und gelöst und gleich darauf ins Wasserbad (37°C) gestellt. Die silbernen Kammern mit den Objektträgern und die Küvette mit der Lyse wurden auf Eis gestellt, um die Suspension auf die Objektträger zu pipettieren. In einem Cup wurden 10µl der Zellsuspension und 200µl Agarose vermischt und sofort 12x5µl auf die Objektträger aufgetragen. Sobald die Gele hart waren, kamen diese in die Lyse und wurden für mindestens 1 Stunde im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Das genaue Protokoll befindet sich im Anhang.

3.4.3. Enzymbehandlung mit FPG

Die FPG- und Puffer-Objektträger wurden aus der Lyse genommen und 3-mal, jeweils für 5 min, mit Puffer F gewaschen. Die Hinterseite der Slides wurde mit einem Papiertuch gut gesäubert und anschließend wurden sie wieder in die silbernen Kammern zurück gelegt, mit einer speziellen Silikonabdichtung mit genau 12 Löchern abgedichtet und mit einem harten Plastik-Deckglas, ebenfalls mit genau 12 Löchern,

verschlossen. Bei diesem Vorgang muss sehr vorsichtig gearbeitet werden, sodass die 12 Löcher jeweils exakt über den 12 Gelen der Slides liegen, da es ansonsten zu Verlusten der Gele kommen kann. Zum Schluss wurde das Ganze noch mit Eisenschrauben gut verschlossen und sofort auf Eis gestellt. Jeweils 30µl Puffer bzw. FPG, je nach Slide, wurden exakt in die Löcher auf die Gele pipettiert. Mit einem Silikondeckel abgedichtet, kamen sie für 30 min bei 37°C in den Inkubator. Die Objektträger mit den Lyse- und H₂O₂-Zellen blieben währenddessen in der Lyse im Kühlschrank bis die Inkubation vorbei war. Das genaue Protokoll befindet sich im Anhang.

3.4.4. Alkalische Behandlung und Elektrophorese

Nach der 30-minütigen Inkubation kamen alle Objektträger Seite an Seite in die Elektrophorese, die freien Flächen wurden mit leeren Objektträgern ausgefüllt, damit immer dieselben Bedingungen herrschen. Der bereits gekühlte Elektrophoresepuffer wurde in die Elektrophorese geleert, sodass alle Objektträger bedeckt waren. Anschließend folgte für 20 min die UNWINDING Phase, bei der die Elektrophorese abgedeckt wurde. Danach wurde der Power Supply angeschlossen und die Elektrophorese für 30 min bei 25V und maximalem Strom gestartet. Das genaue Protokoll befindet sich im Anhang.

3.4.5. Neutralisation

Nach dem Beenden der Elektrophorese wurden die Objektträger für 5 min in kaltes PBS gegeben. Nach dem PBS wurden sie für 5 min in eine Küvette mit destilliertem H₂O gestellt, anschließend für 15 min in 70%igem Ethanol dehydriert und zum Schluss in Ethanol absolut gewaschen. Die Gele wurden über Nacht getrocknet, am nächsten Tag in Boxen eingeordnet und so bis zum Mikroskopieren und Auszählen im Kühlschrank gelagert. Das genaue Protokoll befindet sich im Anhang.

3.4.6. Auszählung und Quantifizierung

Für das Auszählen der Comet Slides wurde zum Färben 3µl Gelred mit 10ml destilliertem Wasser vermischt. Jeweils die Hälfte des Objektträgers, 6 Gele, wurde angefärbt, mit einem Deckglas abgedeckt und zum Mikroskopieren verwendet. Da der Farbstoff lichtempfindlich ist, wurde immer im Dunkeln gearbeitet. Die ersten 6 Gele wurden

ausgezählt, immer 100 Zellen pro Proband, bzw. 50 Zellen pro Gel. Danach folgten die weiteren 6 Gele. Für die Quantifizierung wurde die Software „Comet IV–Video Imaging System“ verwendet. Über eine Kamera war das Programm mit dem Fluoreszenzmikroskop verbunden. Das Programm berechnet die DNA-Schäden, indem es den Anteil der DNA in % im Kopf bzw. Schweif angab. Für die Auswertung wurde der Mittelwert der jeweils 50 Zellen berechnet und anschließend der allgemeine Mittelwert aus diesen zwei Werten angegeben. Das genaue Protokoll befindet sich im Anhang.

3.5. Statistik

Für die statistische Auswertung wurde IBM SPSS Statistics 23 für Windows 7 verwendet. Aus den Ergebnissen des Comet Software Programmes wurden mit den Intensitätswerten des Kopfes und des Schweifes verschiedene Excel-Tabellen für das Statistik Programm erstellt. Zuerst wurde der Kolmogorov-Smirnov Test durchgeführt, um die Daten auf Normalverteilung zu überprüfen. Für nicht normalverteilte Daten wurde der Mann Whitney U Test oder Kruskal-Wallis Test angewendet, wobei für normalverteilte Daten der unabhängige T-Test verwendet wurde, um Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen herauszufinden. Des Weiteren wurden die Korrelationen der Daten mit Hilfe der Pearson und Spearman Korrelation (nicht normalverteilte Daten) ermittelt. Die Signifikanz wurde mit einem p-Wert von $<0,05$ angenommen.

4. Ergebnisse

4.1. Vergleich der Quantifizierung durch verschiedene Personen

In der vorliegenden Masterarbeit wurden die DNA-Schäden der Diabetikerinnen mittels Comet Assay gemessen. Für diese Gruppe wurden die Reserve-Objektträger(Backups) nochmals ausgezählt, um personenbezogene Unterschiede beim Auszählen der Zellen zu erfassen. Dafür wurden Vollblutproben, PBMC's und orale Leukozyten verwendet, die in der Gruppe „Alt“ jeweils von verschiedenen Personen ausgezählt wurden. Wobei in der Gruppe „Neu“, alle Zellen von derselben Person ausgezählt und ausgewertet wurden. Einzel- und Doppelstrangbrüche wurden mit Hilfe der Lyse gemessen, H₂O₂ Resistenz bzw. exogene Schäden mittels Behandlung mit H₂O₂ und oxidierte Purine wurden mit dem Enzym-modifizierten Comet Assay (FPG) ermittelt.

Die Mittelwerte der DNA-Schäden im Schweif der Gruppe „Alt“ und „Neu“ unterscheiden sich alle signifikant voneinander ($p < 0,05$). Es konnten also bei allen Behandlungen Personenunterschiede bei der Quantifizierung festgestellt werden (Tabelle 1).

Tabelle 1: Vergleich der Gruppe Alt (Zellen wurden von verschiedenen Personen ausgezählt) mit der Gruppe Neu (alle Zellen wurden von derselben Person ausgezählt) ($p < 0,05$).

% DNA im Schweif	ALT MW±SA	NEU MW±SA	p-Wert
PBMC (n=76)			
○ Lyse	7,09±2,98	0,56±0,11	p<0,001
○ FPG	4,28±3,1	5,71±0,72	p<0,001
○ H ₂ O ₂	16,13±4,17	6,47±1,18	p<0,001
VB (n=79)			
○ Lyse	5,73±3,33	0,62±0,29	p<0,001
○ FPG	4,13±3,64	6,64±0,67	p<0,001
OL (n=58)			
○ Lyse	4,85±1,10	1,18±0,27	p<0,001
○ FPG	14,40±3,97	9,41±4,74	p<0,001

Mittelwertvergleich der Gruppe Alt und Neu mittels Mann Whitney U Test und unabhängigem T-Test, n = Anzahl der Probanden. In allen drei Zellmatrices sind signifikante Unterschiede der Gruppe „Alt“ und „Neu“ ersichtlich.

4.2. Vergleich der verschiedenen Matrices

Obwohl es sich jeweils um dieselben Personen handelt und nur verschiedene Zellen daraus isoliert wurden, kann man einen deutlichen Unterschied zwischen den verschiedenen Matrices (PBMC, VB, OL) erkennen (Abb. 7-9). Auch zwischen der Gruppe „Alt“ und der Gruppe „Neu“ konnten signifikante Quantifizierungsunterschiede festgestellt werden.

Die Mittelwerte der unterschiedlichen Matrices (PBMC, VB) der gesunden Referenzgruppe wurden ebenfalls miteinander verglichen, und auch diese unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) (Tabelle 2).

Tabelle 2: Vergleich der unterschiedlichen Matrices in den Gruppen „Neu“, „Alt“, und „Gesund“ ($p < 0,05$).

% DNA im Schweif	PBMC n=76 MW±SA	VB n=79 MW±SA	OL n=58 MW±SA	p-Wert
Alt				
○ Lyse	7,09±2,98	5,73±3,33	4,85±1,10	p<0,001
○ FPG	4,28±3,1	4,13±3,64	14,40±3,97	p<0,001
Neu				
○ Lyse	0,56±0,11	0,62±0,29	1,18±0,27	p<0,001
○ FPG	5,71±0,72	6,64±0,67	9,41±4,74	p<0,001
Gesund				
○ Lyse	1,05±0,18	0,92±0,21		p=0,021
○ FPG	5,03±1,05	4,16±0,95		p=0,04

Mittelwertvergleich der einzelnen Zellmatrices mittels Kruskal Wallis Test und unabhängigem T-Test, n = Anzahl der Probanden. Die verschiedenen Matrices unterscheiden sich in allen drei Gruppen signifikant voneinander.

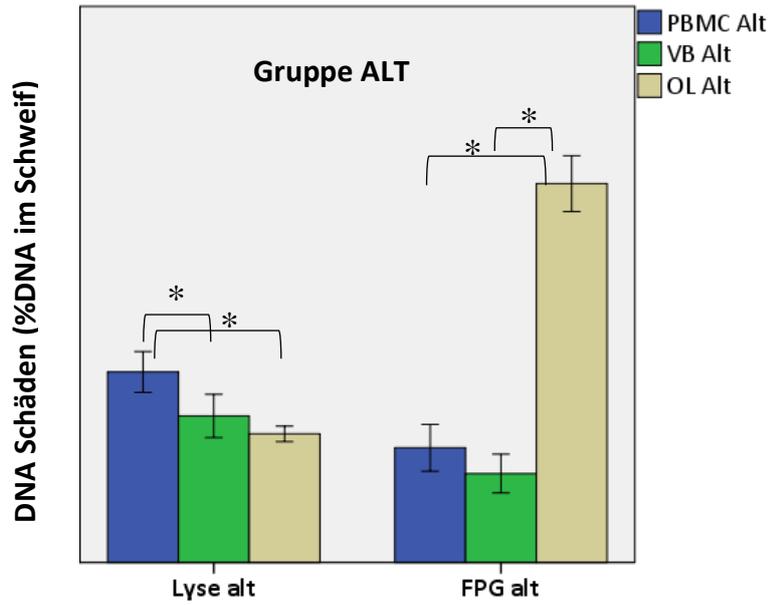


Abbildung 7: Vergleich der Matrices in der Gruppe „Alt“ (* signifikanter Unterschied).

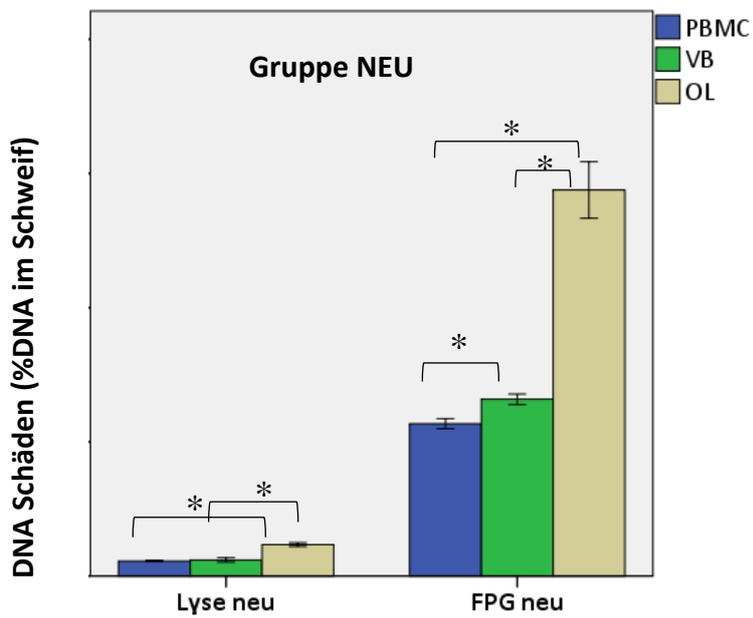


Abbildung 8: Vergleich der Matrices in der Gruppe „Neu“ (* signifikanter Unterschied).

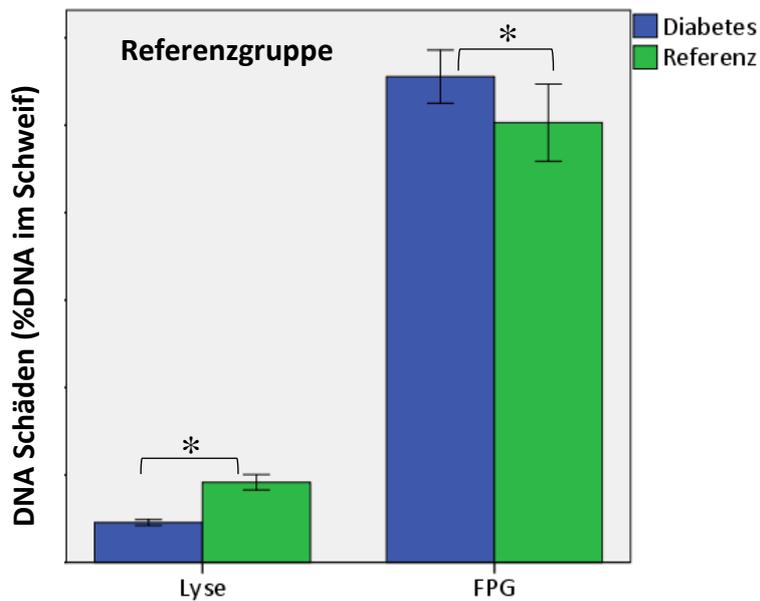


Abbildung 9: Vergleich der Matrices in der Referenzgruppe „Gesund“ (*signifikanter Unterschied).

Schon während der Auszählung und Quantifizierung kann man leichte Unterschiede zwischen den Zellen der verschiedenen Matrices unter dem Fluoreszenzmikroskop feststellen. Vollblutzellen bzw. Zellen der isolierten Lymphozyten sind meist zu genüge auf dem Gel vorhanden, während die Zellen der oralen Leukozyten (OL) sehr spärlich auf dem Gel verteilt sind und auch zahlreiche andere Zellen, wie zum Beispiel Epithelzellen, bzw. auch gewisse Hintergrundschäden zu finden sind (Abb. 10).

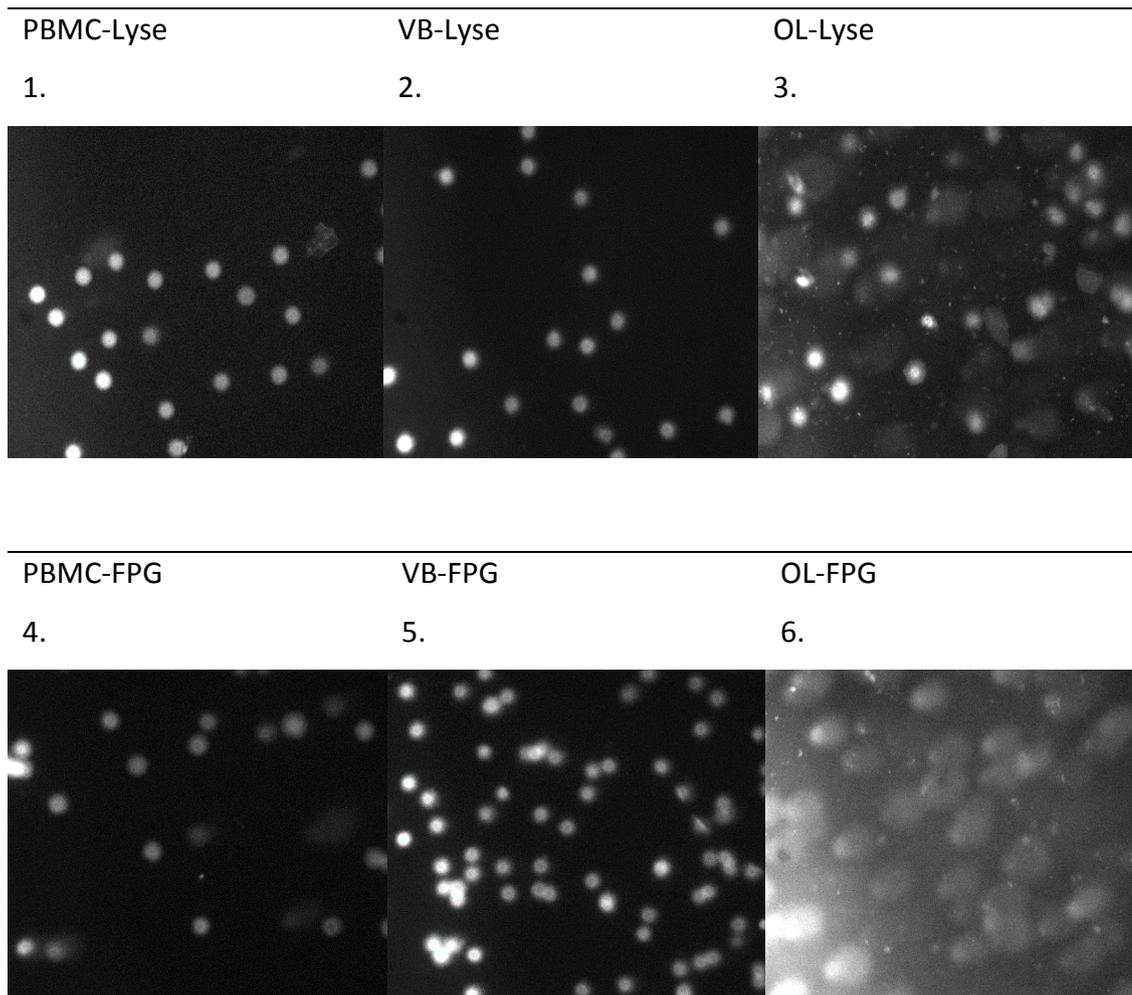


Abbildung 10: Bild 1-6: Vergleich der unterschiedlichen Matrices mittels Fluoreszenzmikroskopie. Bild 1: lysierte PBMC's; Bild 2: lysierte Vollblutzellen; Bild 3: lysierte orale Leukozyten; Bild 4: FPG-behandelte PBMC's, FPG-behandelte Vollblutzellen, FPG-behandelte orale Leukozyten (Fotos: V. Sauermoser).

4.3. Matrix-Korrelationen

In der vorliegenden Arbeit wurden weder signifikante Korrelationen zwischen den verschiedenen Matrices, noch zwischen den Gruppen „Neu“ und „Alt“ gefunden. Auch in der gesunden Referenzgruppe konnten keine positiven Korrelationen zwischen den Zelltypen festgestellt werden (Tabelle 3-6).

In der Gruppe „Neu“, deren Zellen von der ein und derselben Person ausgezählt wurden, konnten wir eine schwach negative Korrelation ($r = -0,269^*$) zwischen Vollblut Lyse und PBMC Lyse feststellen ($p=0,016$) (Abb. 11).

Tabelle 3: Korrelationen innerhalb der Gruppe Neu; r=Korrelationskoeffizient; * $\alpha=0,05$

		PBMC NEU Lyse n=76	PBMC NEU FPG n=76	PBMC NEU H2O2 n=76	VB NEU Lyse n=79	VB NEU FPG n=79	OL NEU Lyse n=58	OL NEU FPG n=58
PBMC NEU Lyse	r	1	0,068	-0,076	-0,269*	-0,095	0,248	-0,266*
PBMC NEU FPG	r	0,068	1	0,261*	0,029	-0,090	-0,042	0,044
PBMC NEU H2O2	r	-0,076	0,261*	1	0,041	0,087	-0,016	-0,101
VB NEU Lyse	r	-0,269*	0,029	0,041	1	0,129	-0,016	0,243
VB NEU FPG	r	-0,095	-0,090	0,087	0,129	1	-0,027	-0,020
OL NEU Lyse	r	0,248	-0,042	-0,016	-0,016	-0,027	1	-0,102
OL NEU FPG	r	-0,266*	0,044	-0,101	0,243	-0,020	-0,102	1

* = signifikante Korrelation; n = Anzahl der Probanden; keine positiven signifikanten Korrelationen zwischen den einzelnen Zellmatrices, nur innerhalb eines Zelltyps (*); schwach negative Korrelation zwischen Vollblut Lyse Neu und PBMC Lyse Neu (*).

Tabelle 4: Korrelationen innerhalb der Gruppe Alt; r=Korrelationskoeffizient; * $\alpha=0,05$, ** $\alpha=0,01$

		PBMC ALT Lyse n=76	PBMC ALT FPG n=76	PBMC ALT H ₂ O ₂ n=76	VB ALT Lyse n=79	VB ALT FPG n=79	OL ALT Lyse n=58	OL ALT FPG n=58
PBMC ALT Lyse	r	1	0,305**	0,462**	-0,180	0,164	-0,233	0,110
PBMC ALT FPG	r	0,305**	1	0,352**	-0,040	0,042	-0,226	-0,091
PBMC ALT H ₂ O ₂	r	0,462**	0,352**	1	-0,294*	0,090	-0,242	0,083
VB ALT Lyse	r	-0,180	-0,040	-0,294	1	0,167	0,077	-0,117
VB ALT FPG	r	0,164	0,042	0,090	0,167	1	0,047	-0,087
OL ALT Lyse	r	-0,233	-0,226	-0,242	0,077	0,047	1	0,211
OL ALT FPG	r	0,110	-0,091	0,083	-0,117	-0,087	0,211	1

* = signifikante Korrelation; n = Anzahl der Probanden; keine positiven signifikanten Korrelationen zwischen den einzelnen Zellmatrices; nur signifikante Korrelationen innerhalb eines Zelltyps (*).

Tabelle 5: Korrelation zwischen den Gruppen Alt und Neu; r= Korrelationskoeffizient;

*** $\alpha=0,05$**

		PBMC ALT Lyse n=76	PBMC ALT FPG n=76	PBMC ALT H2O2 n=76	VB ALT Lyse n=79	VB ALT FPG n=79	OL ALT Lyse n=58	OL ALT FPG n=58
PBMC NEU Lyse	r	-0,263 *	-0,35	-0,206	-0,053	-0,094	0,146	0,136
PBMC NEU FPG	r	-0,159	0,021	-0,178	0,141	0,159	-0,16	-0,059
PBMC NEU H2O2	r	0,061	0,089	0,212	-0,006	0,057	-0,029	0,293 *
VB NEU Lyse	r	0,168	0,002	0,125	0,322 *	0,190	0,249	-0,146
VB NEU FPG	r	-0,067	0,067	0,077	0,079	0,052	0,010	-0,215
OL NEU Lyse	r	-0,227	-0,158	-0,262	-0,099	-0,040	0,193	0,047
OL NEU FPG	r	-0,068	0,080	-0,050	0,246	-0,064	0,012	0,313 *

* = signifikante Korrelation; n = Anzahl der Probanden; keine positiven signifikanten Korrelationen zwischen den einzelnen Zellmatrices; nur innerhalb eines Zelltyps (*).

Tabelle 6: Korrelationen innerhalb der gesunden Referenzgruppe; r=Korrelationskoeffizient;

*** $\alpha=0,05$**

		PBMC Lyse n=24	PBMC FPG n=24	PBMC H2O2 n=24	VB Lyse n=24	VB FPG n=24
PBMC Lyse	r	1	0,272	0,467 *	0,248	0,208
PBMC FPG	r	0,272	1	0,136	-0,065	-0,314
PBMC H2O2	r	0,467*	0,136	1	0,336	0,354
VB Lyse	r	0,248	-0,065	0,336	1	0,352
VB FPG	r	0,208	-0,314	0,354	0,352	1

* = signifikante Korrelation; n = Anzahl der Probanden, keine signifikanten Korrelationen zwischen den einzelnen Zellmatrices, sondern nur innerhalb eines Zelltyps (*).

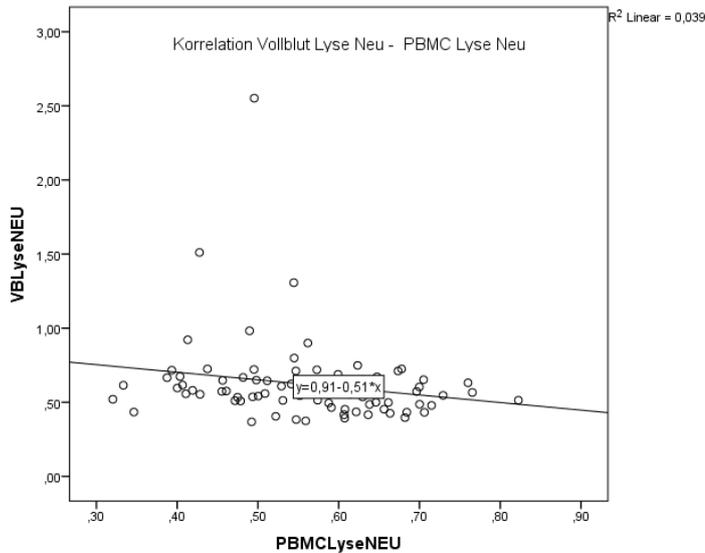


Abbildung 11: schwach negative Korrelation zwischen Vollblut Lyse Neu und PBMC Lyse Neu ($r=-0,269^*$).

4.4. Vergleich Vollblut

Zusätzlich zu den drei unterschiedlichen Matrixtypen wurden dieselben Vollblutzellen nochmals ausgezählt, allerdings nach einer Aufbewahrung von einem Jahr. Die Vollblutzellen wurden für ein Jahr im Tiefkühlschrank bei -80°C gelagert und dann zusammen mit den Zellen der Gruppe „Neu“ ausgezählt (Tabelle 7).

Auch die Korrelation zwischen den drei verschiedenen Vollbluttypen wurde ermittelt. Eine signifikante positive Korrelation konnte aber nur zwischen der Vollblutgruppe Lyse „Neu“ und Lyse „Alt“ gezeigt werden (Tabelle 8).

Tabelle 7: Mittelwerte und Standardabweichungen der DNA-Schäden im Schweiß ($p<0,05$)

% DNA im Schweiß	Vollblut ALT	Vollblut NEU	Vollblut 1 Jahr	p-Wert
	MW±SA n=79	MW±SA n=79	MW±SA n=79	
Lyse	5,73±3,33	0,62±0,29	1,19±0,55	p<0,001
FPG	4,13±3,64	6,64±0,67	6,62±1,38	p<0,001

n = Anzahl der Probanden; Mittelwertvergleich mittels Kruskal Wallis Test und unabhängigen T-Test; die lysierten-, als auch die FPG-behandelten Zellen zeigen signifikante Unterschiede, allerdings unterscheiden sich Vollblut Lyse Neu und Vollblut 1 Jahr nicht signifikant voneinander!

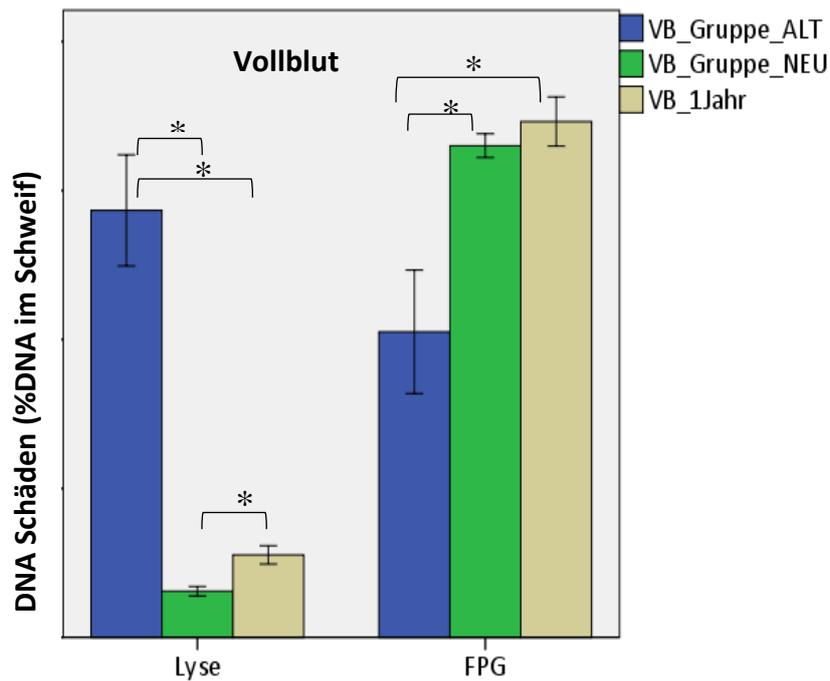


Abbildung 12: Vollblut Vergleich

Tabelle 8: Korrelationen der unterschiedlichen Vollblut-Gruppen (VB Alt, VB Neu, VB 1 Jahr); r= Korrelationskoeffizient, * signifikant

		VB ALT Lyse n=79	VB ALT FPG n=79	VB NEU Lyse n=79	VB NEU FPG n=79	VB 1 Jahr Lyse n=79	VB 1 Jahr FPG n=79
VB ALT Lyse	r	1	0,167	0,322**	0,079	-0,252*	0,081
VB ALT FPG	r	0,167	1	0,190	0,052	-0,015	-0,073
VB NEU Lyse	r	0,322**	0,190	1	0,129	0,000	0,004
VB NEU FPG	r	0,079	0,052	0,129	1	-0,045	0,113
VB 1 Jahr Lyse	r	-0,252*	-0,015	0,000	-0,045	1	0,050
VB 1 Jahr FPG	r	0,081	-0,073	0,004	0,113	0,050	1

* = signifikante Korrelation; n = Anzahl der Probanden; positive signifikante Korrelation zwischen Lyse Neu und Lyse Alt; schwach negative Korrelation zwischen Lyse 1 Jahr und Lyse Alt.

Je länger die Vollblutproben aufbewahrt werden, desto größer ist auch der optische Unterschied, der unter dem Fluoreszenzmikroskop ersichtlich ist. Vollblutproben, die zwei Jahre oder länger aufbewahrt worden sind, waren nicht mehr auszählbar. Die Zellen waren nur noch sehr spärlich vorhanden und wiesen einen erhöhten Schaden auf (Abb. 13).

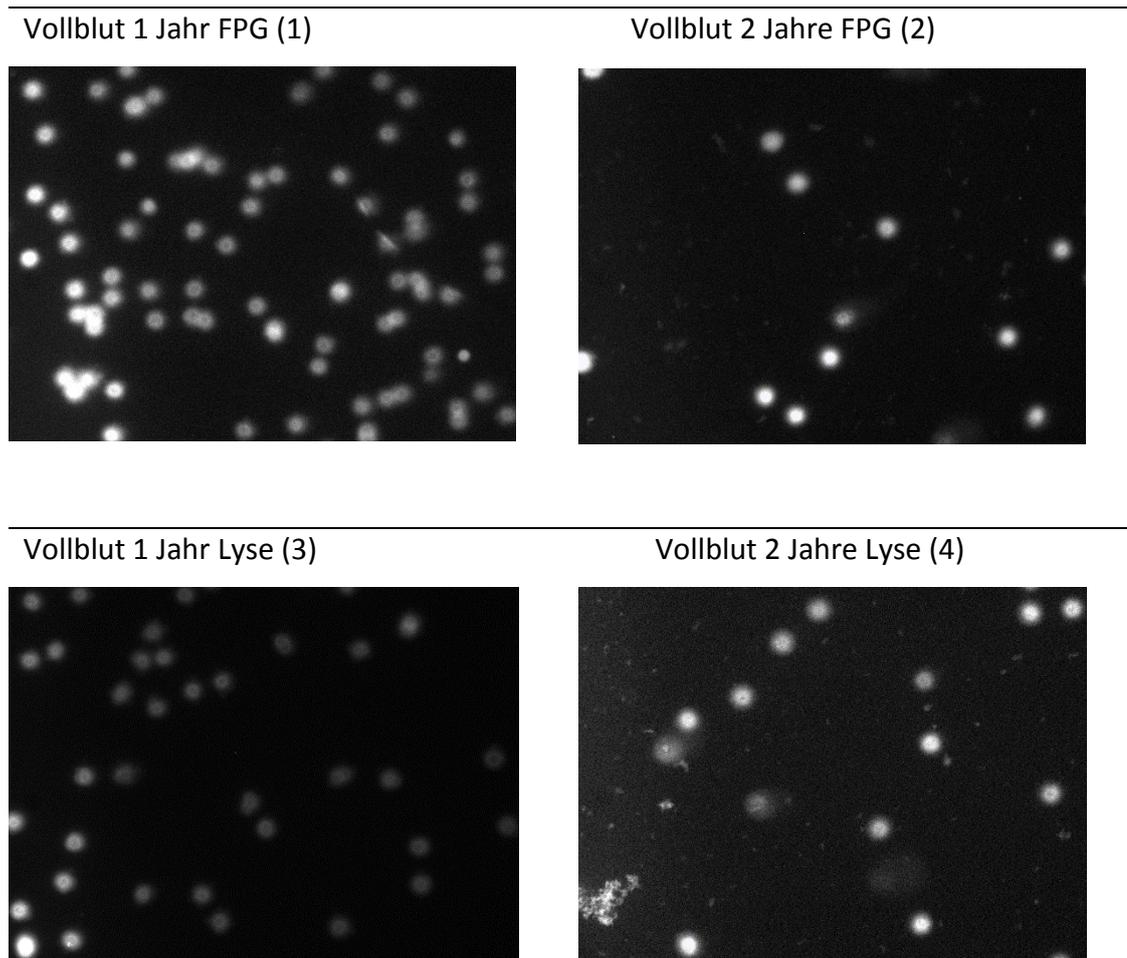


Abbildung 13: Bild 1-2: Vergleich von FPG-behandelten Vollblutzellen nach einer Lagerung von einem oder zwei Jahren bei -80°C mittels Fluoreszenzmikroskopie; Bild 3-4: lysierte Vollblutzellen nach einer Lagerung von einem oder zwei Jahren bei -80°C mittels Fluoreszenzmikroskopie; Zellen nach einem Jahr noch gut auszählbar und quantifizierbar, nach zweijähriger Lagerung deutlich mehr Hintergrundschäden und weniger Zellen ersichtlich und daher nicht mehr quantifizierbar!

4.5. Vergleich Diabetesgruppe – Referenzgruppe

Um die DNA-Schäden der Diabetesgruppe vergleichen zu können, wurde eine Referenzgruppe herangezogen. Diese bestand aus übergewichtigen oberösterreichischen Lehrerinnen, bei denen aber kein Diabetes Mellitus Typ 2 festgestellt worden ist. Alle Zellen wurden von derselben Person ausgezählt.

Beide Gruppen zeigten signifikante Unterschiede (Tabelle 9). Die größten Schäden wurden jeweils in der Diabetesgruppe bei den FPG-behandelten Zellen gesehen.

Zusätzlich wurde die Korrelation zwischen der Diabetikergruppe (Gruppe Neu) und der gesunden Referenzgruppe berechnet. Es konnte nur eine signifikante positive Korrelation zwischen der Gruppe Vollblut Neu FPG und der Gruppe Referenz Vollblut Lyse ($r = 0,498^*$) festgestellt werden (Tabelle 10).

Tabelle 9: Vergleich der DNA-Schäden zwischen der Diabetesgruppe und der gesunden Referenzgruppe ($p < 0,05$)

	Diabetesgruppe NEU MW±SA n=76	Referenzgruppe MW±SA n=24	p-Wert
PBMC			
○ Lyse	0,56±0,11	1,05±0,18	p<0,001
○ FPG	5,71±0,72	5,03±1,05	p<0,001
VB			
○ Lyse	0,62±0,29	0,92±0,21	p<0,001
○ FPG	6,64±0,69	4,16±0,95	p<0,001

n = Anzahl der Probanden; Mittelwertvergleich mittels Mann Withney U Test und unabhängigen T-Test; signifikanter Unterschied zwischen der Diabetesgruppe und der gesunden Referenzgruppe bei den lysierten-, als auch FPG-behandelten Zellen.

Tabelle 10: Korrelationen zwischen der Diabetesgruppe (Neu) und der gesunden Referenzgruppe. (r= Korrelationskoeffizient, *signifikant)

	Referenz VB Lyse n=24	Referenz VB FGP n=24	Referenz PBMC Lyse n=24	Referenz PBMC FPG n=24	Referenz PBMC H2O2 n=24
Diabetes VB Lyse n=79	r 0,304	0,352	0,098	-0,356	-0,070
Diabetes VB FPG n=79	r 0,498*	0,146	0,241	-0,153	0,160
Diabetes PBMC Lyse n=76	r -0,220	0,040	-0,162	-0,073	-0,049
Diabetes PBMC FPG n=76	r -0,199	-0,168	-0,069	0,335	0,077
Diabetes PBMC H2O2 n=76	r 0,210	-0,288	0,322	0,359	0,353

* = signifikante Korrelation; n = Anzahl der Probanden; keine positiven signifikanten Korrelationen zwischen den einzelnen Zellmatrices; positive signifikante Korrelation zwischen Referenz VB Lyse und Diabetes VB FPG.

5. Diskussion

Der Comet Assay wurde während der letzten Jahre zu einer beliebten und wichtigen Methode, die in verschiedenen wissenschaftlichen Bereichen zum Einsatz kommt. Neben den vielen Vorteilen, gibt es aber auch Nachteile und Limitationen bei der Verwendung des Assays. Ein großes Problem stellt der Vergleich der mittels Comet Assay gemessenen und ermittelten Daten, vor allem von humanen Biomonitoring-Studien, dar. Zum einen aufgrund der oft unterschiedlichen technischen Protokolle und zum anderen durch die Auswertung und Quantifizierung durch verschiedene Personen (Forchhammer et al., 2008).

Zwischen den Gruppen „Neu“ und „Alt“ gibt es signifikante Unterschiede, obwohl es sich um dieselben Proben von denselben Personen handelt (Tabelle 1). In der Gruppe „Alt“ wurden die unterschiedlichen Matrices (VB, PBMC, OL) von verschiedenen Personen ausgezählt und quantifiziert, während in der Gruppe „Neu“ die Reserve-Objektträger (Backups) von denselben Proben von nur einer Person ausgewertet wurden. Dies bedeutet, dass obwohl es sich um die gleichen Blutproben handelt und diese am gleichen Tag mittels Comet Assay analysiert wurden, verschiedene Ergebnisse aufgrund personenspezifischer Quantifizierung erzielt wurden.

Auch Forchhammer et al. berichteten 2008 in ihrer Studie von unterschiedlichen Ergebnissen bei der Quantifizierung der Proben durch verschiedene Personen. Sie gliederten ihre Studie in zwei verschiedene Bereiche. Zum einen untersuchten sie die Variation der Ergebnisse durch visuelles Auszählen an zwei verschiedenen Terminen mit einer unterschiedlichen Anzahl von Zellen pro Gel, und zum anderen ermittelten sie die Variation der DNA-Schäden durch acht verschiedene Forscher. Es wurden acht identische PBMC-Proben von sieben gesunden Probanden mit einer zusätzlichen Referenzprobe ausgezählt und bewertet. Die Lyselösung, sowie der Enzympuffer waren bei allen gleich und auch die alkalische Behandlung und Elektrophorese wurden jeweils identisch durchgeführt. Eine wichtige Erkenntnis dieser Studie ist, dass die Forscher ihre Zellen alle unterschiedlich auszählten, aber jeder von ihnen eine auffällige Beständigkeit während des gesamten Zählens entwickelte (Forchhammer et al., 2008). Aus der Arbeit zugrunde liegenden Studie ist sehr deutlich ersichtlich, dass die Gruppe

„Neu“(Quantifizierung durch eine Person) eine Beständigkeit bzw. Regelmäßigkeit beim Zählen der Objektträger aufweist. Zum Beispiel sind die Mittelwerte der Lyse in allen drei Matrices sehr gering und weisen eine niedere Standardabweichung auf. Dasselbe ist in der Referenzgruppe zu beobachten (Tabelle 11).

Tabelle 11: Regelmäßigkeit der Mittelwerte durch die Auszählung von nur einer Person (Werte alle sehr gering und relativ ähnlich)

	<i>PBMC</i> <i>MW±SA</i>	<i>VB</i> <i>MW±SA</i>	<i>OL</i> <i>MW±SA</i>
<i>Lyse Diabetes Neu</i>	0,56±0,11 (n=76)	0,62±0,29 (n=79)	1,18±0,27 (n=58)
<i>Lyse Referenz</i>	1,05±0,18 (n=24)	0,92±0,21 (n=24)	

n = Anzahl der Probanden; Mittelwerte und Standardabweichung gering.

In der Studie von Forchhammer et al. (2008) wurden die Zellen mit visueller Analyse, einem 5-Klassen-Zählsystem, ausgewertet. Viele Arbeitsgruppen empfehlen die Verwendung von Software Programmen, welche aber keine Voraussetzung für die Ermittlung von DNA- Schäden mittels Comet Assay sind (Forchhammer et al., 2008). Laut Collins (2004) gibt es eine sehr große Übereinstimmung zwischen den beiden Arbeitsweisen. Es zeigt sich daher eine positive Korrelation zwischen den zwei Methoden (Abb. 14). In einer weiteren Studie von Collins wurden Objektträger vorbereitet und anschließend unabhängig voneinander mit beiden Methoden ausgezählt (Collins, 2004).

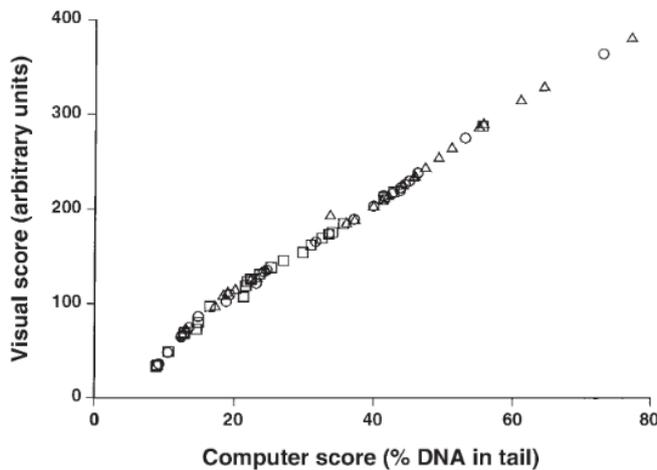


Abbildung 14: Korrelation zwischen der Auswertung mittels Software Programme (%DNA im Schweif) und dem visuellen Auszählen von jeweils den gleichen humanen Lymphozyten (Collins 2004).

Der Comet Assay kann, wie schon erwähnt, mit verschiedenen Zellen durchgeführt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Vollblutzellen, PBMC's und orale Leukozyten ausgezählt und quantifiziert (Tabelle 2). Obwohl es sich um dieselben Personen bzw. Proben handelt, gibt es zwischen den einzelnen Matrices signifikante Unterschiede. Auch die gesunde Referenzgruppe weist statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Vollblutzellen und den PBMC's auf.

Collins et al. (2014) erklären dieses Verhalten dadurch, dass die DNA-Schäden von Vollblutzellen mit denen der Lymphozyten aufgrund ihrer Lebensdauer nicht gut zu vergleichen sind. Da entweder Vollblutproben oder Fraktionen von isolierten Leukozyten verwendet werden, müssen die Zellen getrennt werden. Mononukleare Zellen werden durch bestimmte Methoden (z. B. Lymphoprep) in Monozyten und Lymphozyten aufgeteilt. Diese kernhaltigen Zellen im Vollblut bestehen aus ca. 60-75 % aus neutrophilen Granulozyten und nur zu 20-30 % aus Lymphozyten, während bei der Lymphozyten-Isolierung ca. 95-98 % Lymphozyten vorhanden sind. Da die neutrophilen Zellen aber kurzlebige Zellen sind und nur ein paar Tage überleben, sind diese DNA-Schäden mit den Schäden der relativ langlebigen Lymphozyten möglicherweise nicht vergleichbar (Collins et al., 2014).

Morillas et al. (2002) beobachteten zudem eine unterschiedliche Sensitivität der verschiedenen Subpopulationen der weißen Blutkörperchen. T-Lymphozyten reagieren demnach empfindlicher gegenüber H_2O_2 als das T-Lymphozyten-arme Vollblut (Morillas et al., 2002). Auch wurde gezeigt, dass T-Lymphozyten empfindlicher gegenüber ionisierender Strahlung reagieren als die B-Lymphozyten (Wojewo´ dzka et al., 2008). Allerdings können durch die mechanische Isolation der Lymphozyten erhöhte DNA-Schäden auftreten und somit die Variabilität der Ergebnisse beeinflusst werden (McConnell et al., 2002).

Diese Limitationen sollten bei der Verwendung des Comet Assays alle beachtet werden, vor allem wenn Vollblutproben und isolierte Lymphozyten untersucht und ausgewertet werden (Collins et al., 2014). Auch in unserem Fall weisen die PBMC, im Vergleich zu den Vollblutzellen, in der Gruppe „Alt“ (Lyse und FPG) und in der gesunden Referenzgruppe (Lyse und FPG) höhere DNA-Schäden auf.

Der Comet Assay mit Vollblutzellen ist in der Durchführung zwar einfacher, aber es kann dadurch zu einer geringeren Homogenität in der Zellpopulation kommen. Zudem können auch Probleme bei der Messung der Reparaturkapazität, aufgrund der Empfindlichkeit der Erythrozyten, entstehen. Außerdem funktioniert die Messung des antioxidativen Status mit Vollblutzellen nicht, da durch H_2O_2 kein DNA-Schaden induziert wird. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass die Peroxide sofort durch die Katalase der Erythrozyten aufgebrochen werden (Giovannelli et al., 2003).

In dieser Studie wurden daher auch PBMC Zellen verwendet, um den antioxidativen Status der Zellen mittels H_2O_2 -, ebenso wie die FPG-sensitiven Stellen zu messen. Zusätzlich zu den Vollblutzellen und den PBMC's verwendeten wir orale Leukozyten. Früher wurden diese vor allem in den Genotoxizitätsstudien verwendet (Pinhal et al., 2006). Es wurde angenommen, dass sie bessere Ergebnisse in Bezug auf die Lebensfähigkeit und Reinheit liefern und dadurch ein guter Ersatz für die peripheren Blutzellen im Comet Assay darstellen (Oßwald et al., 2003).

Allerdings fanden Szeto et al. (2012) heraus, dass die Hintergrundschäden bei den bukkalen- bzw. Schleimhautzellen, extrem hoch sind (Szeto et al., 2012). Sie bestehen aus Epithelzellen, Leukozyten, Erythrozyten und Fibroblasten. Der Ertrag und auch das

Verhältnis der Zellen hängen von dem Isolierungsverfahren sowie dem physiologischen Zustand des Spenders ab (Oßwald et al., 2003).

Bei der Auszählung der isolierten Zellen konnten auch in dieser Arbeit erhöhte Hintergrundschäden bzw. andere Zellen beobachtet werden (Abb. 10). Die FPG-behandelten Zellen wiesen bei den oralen Leukozyten in der Gruppe „Alt“, mit $14,40 \pm 3,97$ % DNA im Schweif, und in der Gruppe „Neu“, mit $9,41 \pm 4,74$ % DNA im Schweif, die größten Schäden auf. Eren et al. (2002) untersuchten in ihrer Studie DNA-Schäden durch Chlorhexidin mit Hilfe von bukkalen Zellen und isolierten Lymphozyten von 13 zahnmedizinischen Studenten. Diese Zellen sind ein gutes Maß dafür, um zytogenetische Schäden durch verschiedene giftige Substanzen zu ermitteln. Auch diese Ergebnisse zeigen, dass sich die Schäden der bukkalen Zellen statistisch von den Schäden der Lymphozyten komplett unterscheiden. Die Schäden, die nach der Behandlung mit Chlorhexidin in den bukkalen Zellen entstanden ($15,47 \pm 4,6$ % DNA im Schweif) waren deutlich höher als die Schäden in den Lymphozyten ($6,08 \pm 4,44$ % DNA im Schweif) (Eren et al., 2002).

Eren et al. (2002) erklären diese unterschiedlichen Schäden damit, dass die bukkalen Zellen, ähnlich wie die neutrophilen Zellen aufgrund ihrer ständigen Erneuerung als relativ kurzlebig betrachtet werden können. Im Gegensatz dazu sind die Lymphozyten, wie schon erwähnt, langlebige Zellen. Wenn diese bukkalen Zellen als „Kometen“ bzw. in geschädigter Form auftreten, kann von einer erst kürzlichen Exposition mit einer bestimmten Substanz ausgegangen werden. Diese Überlegung würde die unterschiedlichen Schäden der beiden Zelltypen erklären (Eren et al., 2002).

Da in dieser Arbeit die Zellen von denselben Proben in drei verschiedenen Matrices untersucht und quantifiziert wurden, wurde zusätzlich getestet, ob die Daten miteinander korrelieren. Jedoch wurde festgestellt, dass weder in der Gruppe mit den Diabetikerinnen, noch in der gesunden Referenzgruppe die verschiedenen Matrices miteinander korrelieren. In der Gruppe „Alt“ zeigten sich nur positive signifikante Korrelationen innerhalb der PBMC (PBMC Lyse-FPG, Lyse-H₂O₂). Dies deutet aber nur daraufhin, dass durch erhöhte Schäden, die schon in der Lyse sichtbar sind, auch erhöhte

Werte (% DNA im Schweif) in FPG und H₂O₂ zu erwarten sind. Auch in der Gruppe „Neu“ beobachteten wir eine signifikante positive Korrelation zwischen PBMC FPG und PBMC H₂O₂ mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,261* (p=0,023; α=0,05). Zusätzlich wurde jedoch eine signifikant negative Korrelation zwischen Vollblut Lyse und PBMC Lyse, mit einem Koeffizienten von -0,269*(p=0,016; α=0,05), festgestellt. Die gesunde Referenzgruppe zeigte keinerlei signifikante Korrelationen zwischen den verschiedenen Matrices.

Herrera et al. (2009) führten eine Studie mit 23 Krebspatienten durch, bei der sie die Reparaturkapazität der DNA-Schäden von verschiedenen isolierten Zellen verglichen. Sie verwendeten dafür den in vitro Comet Repair Assay mit Lymphozyten, normalen und Tumordickdarmzellen. Auch sie beobachteten keine signifikante Korrelation zwischen den zwei Zelltypen (Herrera et al., 2009). Allerdings betonten Herrera und seine Arbeitsgruppe sehr stark, dass es sich bei den isolierten Lymphozyten generell um kein Krebs-Zielgewebe handelt. Zudem ist unklar, ob die Schäden die in den Lymphozyten ersichtlich sind, jene Schäden die in den Tumorzellen vorhanden sind, repräsentieren. Dennoch werden PBMC regelmäßig und häufig in Krebsstudien verwendet. Zusätzlich konnten Herrera et al. (2009) durch den in vitro Repair Assay eine höhere Reparaturkapazität in den Epithelzellen im Vergleich zu den Blutzellen feststellen (Herrera et al., 2009).

In einer anderen Studie von Kleinsasser et al. (2000) wurden periphere Lymphozyten mit Schleimhautzellen des oberen Aerodigestivtraktes miteinander verglichen. Ziel war es herauszufinden, ob beide Zelltypen gleich empfindlich auf bestimmte genotoxische Agenzien, wie Dibutylphtalat (DBP), Benzo[*a*]pyren (B[*a*]P), oder *N'*-nitrosodiethylamin, reagieren. Des Weiteren untersuchten sie auch die Korrelationen zwischen den Zelltypen. Dabei wurden keine statistisch signifikanten positiven Korrelationen zwischen Lymphozyten und Epithelzellen gefunden (Kleinsasser et al., 2000).

Allgemein gibt es nur sehr wenige Daten über die Korrelationen der verschiedenen Matrices. Aufgrund der unterschiedlichen Sensitivität und der unterschiedlichen Lebensdauer ist ein Vergleich der verschiedenen Zelltypen oft nicht möglich und auch keine Korrelation zwischen ihnen ersichtlich.

Ein großer limitierender Faktor, der den Vergleich der Comet Daten stark beeinträchtigt, ist die starke Variation der unterschiedlichen technischen Comet Assay Protokolle, denn dadurch können die Ergebnisse stark beeinflusst werden (Collins, 2014). Bestimmte kritische Faktoren sind dabei mit Sorgfalt zu beachten.

Der Erste wichtige Faktor ist die Agarosekonzentration (Collins, 2014). Je höher die Konzentration ist, desto weniger DNA befindet sich zum Schluss im Schweif. Konzentrationen unter 0,5 % sind zu vermeiden, empfohlen werden jene zwischen 0,6 und 0,8 %. Wichtig ist dabei auch die Verwendung derselben Konzentration während des gesamten Versuches (Collins, 2014).

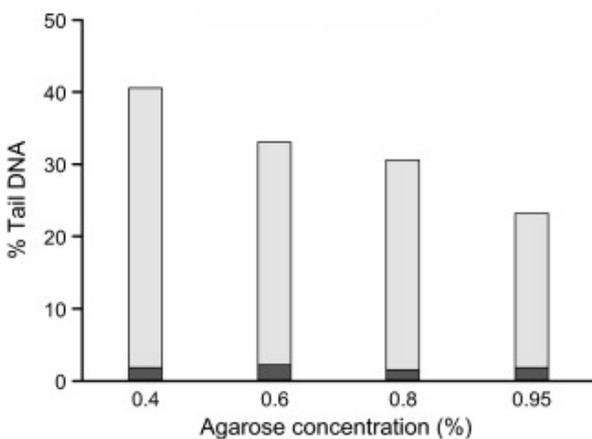


Abbildung 15: Effekte der unterschiedlichen Agarosekonzentrationen auf den Anteil der DNA im Schweif von Lymphozyten. Der dunkle Teil des Balkens zeigt die Kontrollgruppe mit den unbehandelten Zellen, der helle Teil zeigt die behandelten Zellen mit H₂O₂ (Azqueta, Gutzkow et al. 2011).

Azqueta et al. (2011) untersuchten die Effekte von verschiedenen Agarosekonzentrationen auf die Anteile der DNA im Schweif (Abb. 15). Dafür verwendeten sie unbehandelte Lymphozyten als Kontrollgruppe und Zellen die mit H₂O₂ behandelt wurden. Die unterschiedlichen Konzentrationen der Agarose hatten keinen Einfluss auf die Mittelwerte der Kontrollgruppe (dunkler Balken in der Abbildung). Bei den behandelten Zellen (heller Balken) sinkt der Anteil der DNA im Schweif mit steigender Agarosekonzentration. Bei Konzentrationen von 0,4 % oder weniger werden die Gele brüchig und eine Auswertung ist nicht mehr möglich (Azqueta et al., 2011).

Der zweite wichtige Punkt ist die Zelldichte. Es sollten nicht zu viele Zellen auf dem Gel vorhanden sein, da es ansonsten zu Überlappungen der Zellen kommt und das Gel nicht mehr auszählbar ist. Allerdings sollte die Zelldichte auch nicht zu niedrig sein, da es ansonsten fast unmöglich ist 100 Zellen pro Proband, bzw. 50 Zellen pro Gel auszuzählen (Collins, 2014). Collins et al. (2014) empfehlen ein paar tausend Zellen pro Gel. Alle Proben sollten an dieselbe Zellkonzentration angepasst werden, sodass schlussendlich ein einheitliches Volumen der Zellsuspension mit dem standardisierten Volumen der Agarose zu einer einheitlichen Konzentration führt (Collins, 2014). Wir verwendeten bei der Durchführung des Comet Assays eine Zellkonzentrationen von $3-6 \times 10^5$ Zellen (Lymphozyten) pro Proband.

Die Dauer der Lyse ist laut Collins nicht relevant, allerdings sollte es sich um mindestens eine Stunde handeln. Die Dauer von einer Stunde ist daher meist Standard, sie kann aber auch auf mehrere Stunden oder sogar Tage ausgeweitet werden. Jedoch scheint die Phase der alkalischen Inkubation (UNWINDING-Phase) vor der Elektrophorese von besonderer Bedeutung zu sein (Collins, 2014). Azqueta et al. (2011) berichteten von verschiedenen Effekten bei einer unterschiedlichen Dauer der alkalischen Inkubation. Sie stellten fest, dass je länger die alkalische UNWINDING-Phase andauerte, desto höher war der Anteil der DNA im Schweif (Abb. 16). Wahrscheinlich hängt die Erhöhung der Strangbrüche, die während der alkalischen Behandlung auftreten, damit zusammen, dass eine vermehrte Umwandlung von alkalilabilen Stellen in Strangbrüche stattfindet. Eine Inkubation von 40 min wäre optimal, jedoch reichen auch, bei regelmäßiger Durchführung, 20 min aus (Azqueta et al., 2011).

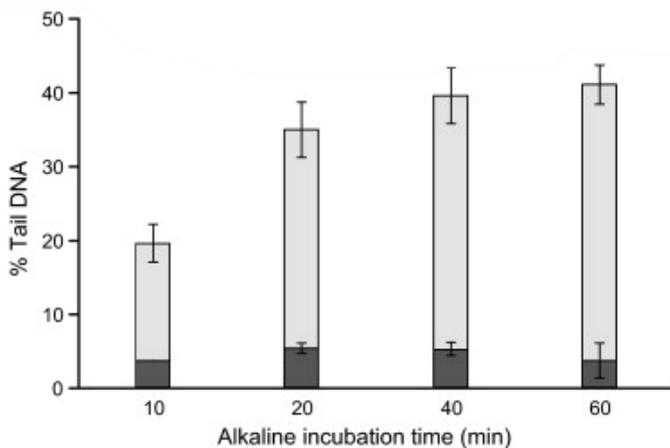


Abbildung 16: Effekte der unterschiedlichen alkalischen Inkubationszeiten auf den Anteil der DNA im Schweif von behandelten (mit H₂O₂; helle Balken) und unbehandelten (dunkle Balken) Lymphozyten (Azqueta, Gutzkow et al. 2011).

Es ist nicht überraschend, dass die Elektrophorese den wichtigsten und auch kritischsten Punkt während des gesamten Comet Assays darstellt, da während dieser Phase die Kometenschweife gebildet werden. Die Variation der Spannung stellt dadurch eine der größten Einflüsse auf die Bildung der Schweife dar. Wird der Spannungsgradient zum Beispiel von 0,5 auf 1,5 V/cm, oder die Dauer der Elektrophorese von 10 min auf 40 min erhöht, bewirkt dies einen proportionalen Anstieg der oxidativen DNA-Schäden (Azqueta et al., 2011).

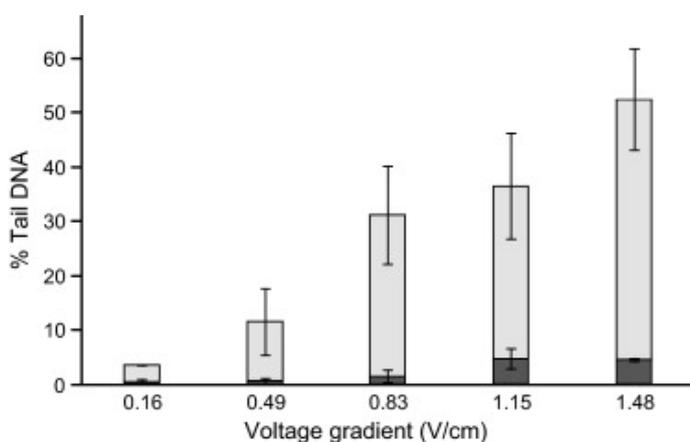


Abbildung 17: Je höher der Spannungsgradient ist, desto höher ist der Anteil der DNA im Schweif. Die hellen Balken stellen die behandelten Lymphozyten und die dunklen Balken die unbehandelten Lymphozyten dar (Azqueta, Gutzkow et al. 2011).

Bei einem Gradienten von 0,16 V/cm verhalten sich die behandelten sowie die unbehandelten Zellen gleich (Abb. 17). Der Anteil der DNA-Schäden steigt mit einer Erhöhung des Spannungsgradienten, vor allem bei den behandelten Lymphozyten (Azqueta et al., 2011).

Auch die Dauer der Elektrophorese ist von großer Bedeutung. Mit einer 0,8%igen Agarose, einer Spannung von 0,83V/cm und einer steigenden Elektrophorese-Dauer ist eine Erhöhung der DNA-Schäden bei H₂O₂-behandelten und unbehandelten Lymphozyten ersichtlich (Abb. 18) (Azqueta et al., 2011).

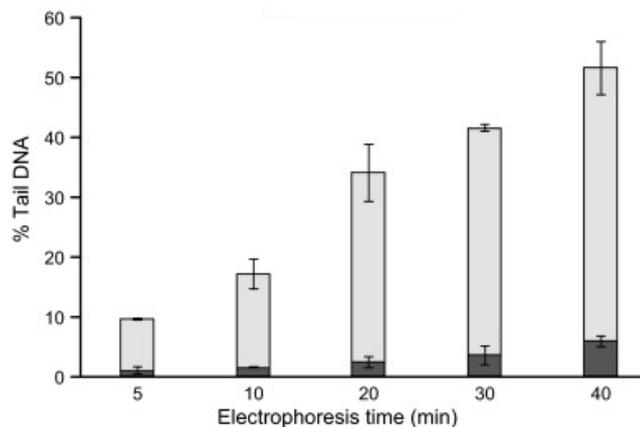


Abbildung 18: Anstieg der DNA-Schäden mit zunehmender Elektrophorese-Dauer (helle Balken – behandelte Lymphozyten, dunkle Balken – unbehandelte Zellen) (Azqueta, Gutzkow et al. 2011).

Azqueta et al. (2013) betonen, dass durch einen konstanten Spannungsgradienten und einer regelmäßigen Elektrophorese-Dauer, die DNA jedes Mal konstant zur Anode gezogen wird. Dies bedeutet, dass ein niedriger Spannungsgradient mit einer längeren Elektrophorese Zeit kompensiert werden kann (Azqueta et al., 2011). Viele Forscher zielen zusätzlich auf eine Stromstärke von über 300mA ab, die aber mit Hilfe des Elektrophoresepuffers eingestellt und variiert werden kann (Azqueta und Collins, 2013). Zusammengefasst geht man davon aus, dass eine Agarosekonzentration von 0,6 bis 0,8 %, eine alkalische Inkubationszeit von 40 min und eine Elektrophorese von 20 min mit einem Spannungsgradienten von 1,15 V/cm, oder 30 min Elektrophorese mit einem

Gradienten von 0,83 V/cm die optimalen Bedingungen des Comet Assays darstellen (Azqueta et al., 2011).

Wir verwendeten in der vorliegenden Studie für die PBMC's ein Protokoll basierend auf Azqueta et al. (Azqueta et al., 2009) und für die Vollblutproben ein Protokoll laut Al-Salmani et al. (Al-Salmani et al., 2011), beide mit leichten Veränderungen.

Bei der Verwendung des Enzym-modifizierten Comet Assays sind ebenfalls einige kritische Punkte zu beachten. Wichtig sind vor allem die Konzentration und die Dauer der Inkubation, da es ansonsten zu nicht-spezifischen Brüchen kommen kann.

Wie schon erwähnt, ist die Auswertung und Quantifizierung ein wichtiges Kriterium, das häufig zu Variationen der Comet Daten führt. Verschiedene Farbstoffe, unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten oder eine unterschiedliche Qualität der Mikroskope können die Ergebnisse beeinflussen (Azqueta und Collins, 2013).

Aufgrund der vielen verschiedenen Ansichten, Protokolle und Variationen wurde 1997 im Zuge eines Meetings von europäischen Forschern das „Europäische Standard Komitee für oxidative DNA-Schäden“ (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage – ESCODD) gegründet. Die Aufgabe des Komitees liegt darin, die Fehlerquellen und auch die Variabilität der Messung von 8-oxo-Gua zu identifizieren und zu verbessern sowie standardisierte und validierte Protokolle zu erstellen (Collins et al., 2004).

Die erste Ringstudie des Comet Assays wurde als ESCOOD Projekt durchgeführt. Dabei wurden die Ergebnisse verschiedener Labore miteinander verglichen (Collins, 2014). Später führte die „European Comet Assay Validation Group“ (ECVAG) immer wieder Versuche durch, bei denen beispielsweise Quantifizierungsmethoden oder die Ergebnisse verschiedener Labore miteinander verglichen wurden. Die Daten wurden aber auch innerhalb der Labore gegenüber gestellt, um mögliche Fehlerquellen zu identifizieren (Collins, 2014). Zusammengefasst kommen Ersson et al. (2013) zu dem Schluss, dass die größte Herausforderung die Variation zwischen den einzelnen Laboren darstellt und deshalb der Vergleich der Comet Assay Daten schwierig ist (Ersson et al., 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurden zusätzlich zu dem Vergleich der unterschiedlichen Zellmatrices, dem Vergleich von personenbezogenen Quantifizierungsunterschieden, verschiedene Vollblutproben miteinander verglichen. Vollblutzellen wurden ein Jahr lang bei -80°C aufbewahrt und anschließend wurde erst der Comet Assay durchgeführt. Ziel war es zu erkennen, ob dadurch erhöhte oxidative DNA-Schäden in den Zellen vorhanden sind. Es zeigte sich, dass die Vollblutzellen nach einem Jahr immer noch auszählbar bzw. quantifizierbar waren (Tabelle 7). FPG-behandelte Zellen der Gruppe „Neu“ und Vollblutzellen nach einem Jahr unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Dies hängt damit zusammen, dass die Zellen durch die Aufbewahrung keinen erhöhten oxidativen DNA-Schaden aufweisen und von derselben Person ausgezählt wurden. Die Zellen in Lyse weisen alle einen signifikanten Unterschied auf. Auch wurden diverse Vollblutzellen, die schon 2 Jahre im Tiefkühlschrank (-80°C) aufbewahrt wurden, ausgezählt. Eine gute Quantifizierung und anschließender Vergleich von diesen Zellen mit den anderen war nicht mehr möglich, da die Zellen nur mehr sehr spärlich vorhanden waren und sehr hohe Schäden in der Lyse festgestellt werden konnten (Abb. 13).

Al-Salmani et al. (2011) zeigten in ihrer Studie, dass bereits nach einem Monat signifikant erhöhte DNA Strangbrüche bei lysierten Zellen durch die Aufbewahrung von Vollblutproben zu je 5 ml vorhanden waren. Diese Schäden traten vor allem bei einer Temperatur von 4°C auf, es konnten jedoch auch signifikante Schäden bei -80°C festgestellt werden (Abb.19) (Al-Salmani et al., 2011).

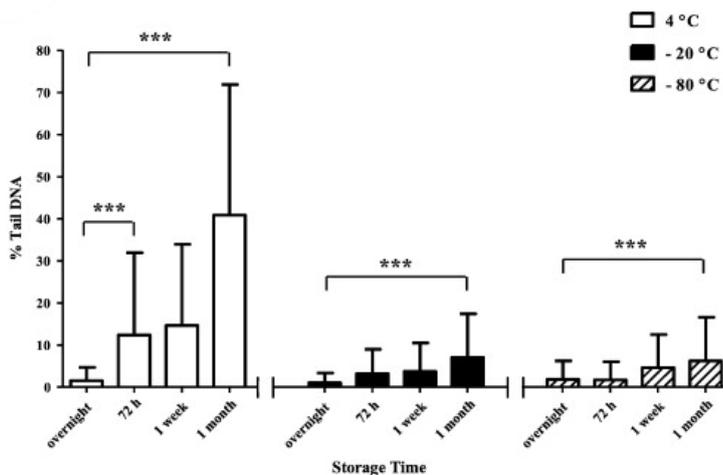


Abbildung 19: Erhöhte Schäden durch eine längere Lagerungszeit; bei 4°C, -20°C und -80°C (Al-Salmi et al., 2011).

Die Vollblutzellen dieser Masterarbeit wurden ebenfalls bei -80°C eingelagert, allerdings zu deutlich niedrigeren Mengen. Dennoch konnte ein signifikanter Unterschied zwischen Vollblut Lyse der Gruppe „Neu“ und Vollblut Lyse „nach einem Jahr“ festgestellt werden ($0,62 \pm 0,29$; $1,19 \pm 0,55$).

Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass FPG-behandelte Vollblutzellen, die ein Jahr lang aufbewahrt wurden, noch ausgewertet und auch mit anderen Proben verglichen werden können, da keine erhöhten oxidativen DNA-Schäden bei den FPG-behandelten Zellen zu erkennen waren. Die Proben, die bereits zwei Jahre oder länger gelagert wurden, sind nicht mehr quantifizierbar.

In einer Studie von Del Bo' et al. (2015) wurden frisch isolierte Zellen mit eingefrorenen Zellen (Zeitraum von 12 Monaten bei -80°C) verglichen. Es handelt sich hierbei um isolierte PBMC's. Da in den meisten Studien nur eingefrorene Zellen verwendet werden, lag das Ziel der Studie darin, zu ermitteln, ob es dadurch auch zu unterschiedlichen DNA-Schäden kommt. Die Forscher betonen, dass meistens keine Informationen über den Lagerungsprozess, Dauer der Lagerung oder die Methode der Kältekonservierung der Zellen publiziert wird. Oxidative DNA-Schäden wurden anhand von H₂O₂-induzierten Schäden und FPG-sensitiven Stellen in frisch isolierten Lymphozyten und kältekonservierten PBMC's gemessen. Die Forschungsgruppe fand heraus, dass die eingefrorenen Zellen signifikant höhere DNA-Schäden aufweisen als die frisch isolierten

Zellen. Das bedeutet, dass die Dauer der Lagerung durchaus Einfluss auf die DNA-Schäden haben kann (Del Bo' et al., 2015).

Andere Untersuchungen weisen darauf hin, dass über 10 % der DNA-Schäden in PBMC's wahrscheinlich durch DNA-Brüche während der Lagerung entstehen (Akor-Dewu et al., 2014).

Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch zahlreiche andere Mechanismen für die erhöhten Schäden während der Kältekonservierung verantwortlich sind, wie zum Beispiel eine mechanische Beschädigung der Probe aufgrund der Eiskristallbildung (Mallone et al., 2011). Al-Salmani et al. (2011) betonen, dass die DNA-Schäden durch die Bildung von kleineren Aliquoten (je 200µl) oder durch die Zugabe von einem Kältekonservierungsmittel (z. B. DMSO) verringert werden können (Al-Salmani et al., 2011).

Um die Schäden der Diabetikerinnengruppe überhaupt vergleichen zu können, wurde eine gesunde Referenzgruppe, bestehend aus 24 Frauen, hinzugezogen. Für die Zellen (VB und PBMC) dieser Gruppe wurde der Comet Assay neu durchgeführt und von derselben Person (Auszählung Gruppe NEU) ausgezählt und quantifiziert. Es konnten signifikant höhere Schäden bei den FPG-behandelten Zellen in der Diabetikergruppe festgestellt werden, sowohl in den PBMC's ($5,71 \pm 0,72^*$) als auch beim Vollblut ($6,64 \pm 0,69^*$).

In einer Studie von Blasiak et al. (2004) wurden ebenfalls 52 DMT2 Patienten (41 Männer und 11 Frauen) mit 55 gesunden Kontrollpersonen verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Diabetesgruppe signifikant höhere DNA-Schäden in den Lymphozyten aufwies. Vor allem bei den FPG-behandelten Zellen konnten große Unterschiede festgestellt werden. Die Forscher gehen davon aus, dass DMT2 Patienten nicht nur erhöhte DNA-Schäden aufweisen, sondern auch eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Mutagenen und eine verminderte DNA-Reparaturkapazität (Blasiak et al., 2004).

Tatsch et al. (2012) untersuchten in einer ähnlichen Studie die DNA-Schäden von Diabetespatienten. Dabei wurden die DNA-Strangbrüche auch mittels Comet Assay gemessen und die Assoziation der oxidativen, inflammatorischen und endothelialen

Biomarker mit Diabetes relevanten Parametern untersucht. In dieser Fall-Kontroll-Studie mit 30 gesunden Kontrollpersonen und 32 Diabetespatienten konnten auch erhöhte DNA-Schäden bei den Diabetikern, verglichen mit der Referenzgruppe, nachgewiesen werden. Vor allem bei den Patienten mit einer schwachen glykämischen Kontrolle. Zudem fanden sich signifikante Korrelationen zwischen den DNA-Schäden und NOx (Nitrat/Nitrit)($r=-0,303^*$), Interleukin 6 ($r=0,845^*$), Albumin ($r= 0,496^*$) oder der Nüchtern glukose ($r=0,449^*$) (Tatsch et al., 2012).

Allgemein wird Diabetes durch eine chronische Hyperglykämie charakterisiert (Rolo und Palmeira, 2006). Diese ist dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Reihe von freien Radikalen durch verschiedene Mechanismen induziert (Sliwinska et al., 2008). Oxidativer Stress zerstört daher nicht nur zelluläre Proteine, sondern beeinflusst auch stark die DNA und führt zu mehreren Basenmodifikationen (Dinçer et al., 2002). Die Ergebnisse von Tatsch et al. (2012) zeigen, dass die gesunde Referenzgruppe die kompakteste DNA vorweisen konnte, und die eigentliche runde Form des Zellkerns beibehalten werden konnte, während die Zellen der Diabetes Patienten eine Verzerrung der Zellkerne zeigten was auf diverse DNA-Schäden durch oxidativen Stress hindeutete (Tatsch et al., 2012).

In einer weiteren Studie von Xavier et al. (2014) wurden die DNA-Schäden in Vollblutzellen von zehn Diabetes Patienten mit einer gesunden Referenzgruppe verglichen. Die DMT2 Patienten hatten ein Durchschnittsalter von 46 Jahren und eine durchschnittliche Diabetesdauer von sieben Jahren. Die Diabetiker wurden für sieben Tage stationär aufgenommen um die glykämische Kontrolle zu verbessern. Jeweils vor und nach der Hospitalisierung zeigten die Diabetiker signifikant höhere DNA-Schäden verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe. Überraschend war, dass nach der Hospitalisierung signifikant geringere Werte wie vor der Hospitalisierung vorhanden waren. Da die Patienten während der sieben Tage eine Ernährungsintervention bekamen, geht Xavier et al. (2014) davon aus, dass bereits eine Woche Intervention ausreicht, um DNA-Schäden zu verringern (Xavier et al., 2014). Vergleicht man die oxidativen DNA-Schäden des Enzym-modifizierten Comet Assays von beiden Gruppen (8.51 ± 3.17 ; 6.06 ± 1.69) mit der vorliegenden Diabetesgruppe ($6,64 \pm 0,69$), können

ähnliche Werte festgestellt werden. Auch die Referenzgruppen zeigen ähnliche Anteile an DNA-Schäden (4.33 ± 1.91 ; $4,16 \pm 0,95$).

Allerdings sollte auch erwähnt werden, dass nicht immer signifikant höhere Schäden bei Diabetepatienten im Vergleich zu gesunden Personen evaluiert werden.

Ibarra-Costilla et al. (2010) führten eine Studie mit 71 mexikanischen DMT2 Patienten durch, die je nach Alter in drei verschiedene Gruppen eingeteilt wurden. Die DNA-Schäden wurden mittels Comet Assay ermittelt und anschließend mit einer gesunden Referenzgruppe (14 Personen) verglichen. Die Ergebnisse zeigen leichte, aber nicht signifikant höhere oxidative DNA-Schäden in zwei der drei Diabetesgruppen (zwischen 40 und 60 Jahre). Die Forschergruppe weist aber darauf hin, dass in ihren Ergebnissen allgemeine Assoziationen zwischen Diabetes und allgemein erhöhten DNA-Schäden fehlen. Zudem interpretieren sie ihre Ergebnisse so, dass Diabetes eine sehr komplexe Krankheit ist, die mit zahlreichen physiologischen Störungen einhergehen kann und diese dann oftmals schwer zu diagnostizieren sind. Des Weiteren betonen sie, dass Diabetes Typ 1 und Typ 2 unterschiedlich betrachtet werden müssen (Ibarra-Costilla et al., 2010).

Die Studie von Müllner et al. (2013) weist ebenfalls keine erhöhten oxidativen DNA-Schäden bei Diabetikern, verglichen mit Nichtdiabetikern, auf. Allerdings konnten durch eine Ernährungsintervention in der Diabetikergruppe die DNA-Strangbrüche nach vier Wochen um 13,8% und nach acht Wochen um 17,1% reduziert werden. In der gesunden Referenzgruppe konnte durch die Zugabe von Gemüse und Pflanzenöl keine Verringerung der DNA-Strangbrüche festgestellt werden. Diese Studie zeigt wiederum, dass eine gesunde Ernährungsform, reich an Gemüse, mit einem hohen Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, einen wichtigen Bestandteil bei der Behandlung von DMT2 darstellt und dadurch auch DNA-Strangbrüche bzw. FPG-sensitive Stellen reduziert werden können (Müllner et al., 2013).

6. Schlussbetrachtung

In dieser Methodenarbeit wurden signifikante Unterschiede der Ergebnisse (% DNA im Schweif) zwischen den zwei Gruppen „Gruppe ALT“ (Quantifizierung von mehreren Personen) und „Gruppe NEU“ (Quantifizierung von nur einer Person) festgestellt. Es ist daher von großer Bedeutung, ob die unterschiedlichen Zelltypen von verschiedenen Personen oder von nur einer Person ausgezählt und quantifiziert werden. Sowohl innerhalb einer Zellmatrix (Lyse – FPG – H₂O₂) als auch zwischen den Zelltypen (VB – PBMC – OL) sind signifikante Unterschiede zu erkennen. Es sollte somit bei der Verwendung des Comet Assays und beim Vergleich der ausgewerteten Daten sehr darauf geachtet werden, von wie vielen Personen die Zellen ausgezählt werden. Wie in der Masterarbeit hervorgeht, zählt jeder individuell und auf seine Art und Weise, jedoch relativ konstant die Zellen aus. In der vorliegenden Arbeit konnten in der Gruppe „Neu“ generell niedrigere, jedoch konstante Mittelwerte in allen drei Zelltypen beobachtet werden. Auch der Vergleich der einzelnen Zellmatrices miteinander ergab signifikante Unterschiede und es konnten kaum signifikante Korrelationen zwischen den Zelltypen festgestellt werden, bis auf eine schwach negative signifikante Korrelation zwischen Vollblut Lyse Neu und PBMC Lyse Neu. Dies führt wiederum zu der Aussage, dass ein Vergleich der ausgewerteten Daten sich als schwierig erweist und man Vergleiche zwischen unterschiedlichen Matrices vermeiden sollte.

Die oxidativen DNA-Schäden der Vollblutzellen (VB Gruppe NEU) und die Vollblutzellen nach einem Jahr zeigten einen signifikanten Unterschied bei den lysierten Zellen ($0,62 \pm 0,29$; $1,19 \pm 0,55^*$), allerdings war keiner bei den FPG-behandelten Zellen ($6,64 \pm 0,67$; $6,62 \pm 1,38$) zu erkennen. Wir können daraus schließen, dass die Vollblutzellen bei -80°C für ein Jahr gut aufbewahrt werden können. Jedoch sollten diese nicht länger als ein Jahr gelagert werden, da sonst erhöhte oxidative DNA-Schäden auftreten und die Zellen nicht mehr auswertbar bzw. vergleichbar sind. Zudem wurde ein signifikanter Unterschied zwischen der Diabetesgruppe (Gruppe NEU) und der gesunden Referenzgruppe festgestellt. Die Diabetikerinnen zeigten erhöhte oxidative DNA-Schäden in den FPG-behandelten Zellen, was auf einen erhöhten oxidativen Stress hindeuten kann.

7. Zusammenfassung

Der Comet Assay ist eine schnelle molekularbiologische Methode um DNA-Strangbrüche, oxidative DNA-Schäden und H₂O₂-induzierte DNA-Strangbrüche zu ermitteln. Aufgrund seiner einfachen und kosteneffizienten Durchführung wird er in vielen verschiedenen wissenschaftlichen Sparten verwendet. Heutzutage stellen die vier großen Hauptbereiche Genotoxizitätstests, humane Biomonitoring-Studien, ökotoxikologische Tests und Tests rund um den Mechanismus der DNA-Schäden bzw. der DNA-Reparatur dar. Allerdings ist der Vergleich der ausgewerteten Daten nach wie vor sehr schwierig, da oft unterschiedliche Protokolle verwendet werden und die Auswertung von verschiedenen Personen erfolgt.

In der vorliegenden Studie wurden personenbezogene Quantifizierungsunterschiede bei der Auswertung von Vollblutzellen, PBMC's und oralen Leukozyten von Diabetes Typ 2 Patientinnen mittels Comet Assay ermittelt. Hierfür wurden die Reserve-Objektträger (Backup Slides) der Querschnittsstudie „MIKRODIAB“ verwendet und quantifiziert. Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe „Neu“ (Quantifizierung durch eine Person) und der Gruppe „Alt“ (Quantifizierung durch mehrere Personen). Zudem wurden die DNA-Schäden (% DNA im Schweif) aller drei Zelltypen miteinander verglichen und auf Korrelation untersucht. Alle 3 Zelltypen (PBMC, VB, OL) wiesen signifikant unterschiedliche Ergebnisse auf, sowohl in der Gruppe „Alt“ als auch in der Gruppe „Neu“. Zusätzlich wurde keine positive Korrelation zwischen den Zelltypen beobachtet. Der Vergleich der Comet Assay Daten erweist sich dadurch als sehr schwierig, da die DNA-Schäden der einzelnen Zellen aufgrund ihrer Lebensdauer und Sensitivität möglicherweise nicht zu vergleichen sind. Zudem scheint es von großer Bedeutung zu sein, von wie vielen Personen die verschiedenen Zellen ausgezählt werden.

Des Weiteren wurden Vollblutzellen ein Jahr bei -80°C aufbewahrt und der Comet Assay erst anschließend durchgeführt. Diese Zellen wurden mit den Vollblutzellen der Gruppe „Neu“ verglichen. Es konnten signifikante Unterschiede der Mittelwerte bei den lysierten Zellen festgestellt werden ($0,62 \pm 0,29$; $1,19 \pm 0,55^*$). Die Enzym-behandelten

Zellen wiesen keinen signifikanten Unterschied auf. Vollblutzellen können somit für ein Jahr bei -80°C gut aufbewahrt werden.

Zum Vergleich der DNA-Schäden der Diabetikergruppe wurde eine gesunde Referenzgruppe ($n=24$) herangezogen. Es konnten in beiden Zelltypen (PBMC und VB) signifikante Unterschiede festgestellt werden, wobei die Diabetikergruppe sowohl im Vollblut ($6,64 \pm 0,69$) als auch in den PBMC's ($5,71 \pm 0,72$) erhöhte oxidative DNA-Schäden bei den FPG-behandelten Zellen aufwies ($p < 0,05$). Auch in der gesunden Referenzgruppe wurde keinerlei signifikante Korrelation zwischen den Zelltypen beobachtet.

Es kann somit die Hypothese bestätigt werden, dass Diabetiker aufgrund verschiedener metabolischer Einflüsse erhöhte DNA-Schäden in den Enzym-behandelten Zellen aufweisen.

Wir kommen daher zu dem Schluss, dass der Comet Assay eine einfache und schnelle Methode darstellt, um DNA-Schäden und Strangbrüche zu messen. Allerdings stellt der Vergleich der Daten aufgrund des individuellen Auszählens von verschiedenen Personen und der unterschiedlichen technischen Durchführungsprotokolle ein großes Problem dar. Zudem gibt es noch sehr wenig Literatur über den Zusammenhang der verschiedenen Zelltypen bzw. der Korrelationen zwischen den einzelnen Zellmatrices.

8. Summary

The Comet Assay (SCGE) has become one of the best known methods to detect oxidative DNA damage (FPG), DNA strand breaks (lysis) or H₂O₂ induced strand breaks. Due to the rapid, simple, sensitive and cost-effective way of the assay, it can be used in many different areas and represents a commonly used method. The four main sectors are genotoxicity tests, human biomonitoring studies, ecotoxicological tests and the research of mechanisms around DNA damage and repair. However, the variety of the results is one of most critical factors of the comet assay as the evaluation of the comet data is sometimes done by different investigators and by various of technical protocols.

In the present master thesis the comet assay was used for whole blood cells, PBMC'S and oral leucocytes from female diabetes-type-2 patients. Therefore the backup slides from the cross-sectional study "MIKRODIAB" were re-evaluated and quantified and DNA strand breaks, FPG-sensitive sites and H₂O₂ induced strand breaks were analysed.

There are four main hypotheses that we aimed to verify. First, are there differences in the results if different persons count the cells, compared to one counter? Second, is there a positive correlation between the different cell types? The third hypothesis proves, if slides with whole blood cells could be stored at -80 °C for one year and fourth, are there differences in DNA damage between diabetes patients and a healthy reference group.

To verify the first hypothesis we compared the results gathered from group "Neu" (only one person counted the cells) with the group "Alt" (more people has been counting the cells). Significant differences emerged between the two groups in all three cell types. Concerning the second hypothesis, the % DNA in tail was compared to all three cell types (VB, PBMC, and OL) and the correlation between all types was evaluated. No significant positive correlation was found.

Generally, it seems to be relevant whether one person is counting and quantifying the cells, or more investigators are involved, especially for the comparison of the data. However, there is no positive correlation, neither in group "Neu", nor in the group "Alt" between the cell types. The reason might be that the different properties of cell types make any comparison between them not feasible.

Furthermore, whole blood cells, which have been stored for one year at a temperature of -80°C , were compared to whole blood cells from group "Neu". The only significant difference found throughout this comparison was in the cells from lysis (0.62 ± 0.29 ; $1.19\pm 0.55^*$). Cells which were treated with FPG showed no significant difference. This proves that whole blood cells can be stored at -80 degrees up to one year without increased DNA damage.

For comparison of the oxidative DNA damage of the diabetes patients, a healthy reference group was consulted. A significant difference was observed in both cell types (PBMC and VB) with the enzyme-modified comet assay. Through the present study, we conclude that Diabetes-Type-2 patients show higher oxidative DNA damage compared to healthy subjects.

Finally we can say, that the Comet Assay is a simple and rapid method for measuring DNA-strand breaks and DNA-damage. However, one of the major problems of the assay is the comparison of the evaluated data, especially if more investigators are involved. Furthermore, comparatively few literature is available on the correlation between the different cell types.

9. Literaturverzeichnis

Akor-Dewu M, Yamani N, Bilyk O, Holtung L, Tjelle TE, Blomhoff R, Collins AR. Leucocytes isolated from simply frozen whole blood can be used in human biomonitoring for DNA damage measurement with the comet assay. *Cell Biochem Funct* 2014;32:299-302.

Al-Salmani K, Abbas HHK, Schulpen S, Karbaschi M, Abdalla I, Bowman KJ, So KK, Evans MD, Jones GDD, Godschalk RW, Cooke MS. Simplified method for the collection, storage, and comet assay analysis of DNA damage in whole blood. *Free Radical Biology and Medicine* 2011;51(3):719-25.

Amazeze NH, Schnell S, Sozeri O, Otitolaju AA, Egonmwan RI, Arlt VM, Bury NR. Cytotoxic and genotoxic responses of the RTgill-W1 fish cells in combination with the yeast estrogen screen to determine the sediment quality of Lagos lagoon, Nigeria. *Mutagenesis* 2015;30:117-27.

Azqueta, Shaposhnikov A, Sergey, Collins AR. DNA oxidation: Investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2009;674(1–2):101-8.

Azqueta A, Collins AR. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Archives of Toxicology* 2013;87(6):949-68. doi: 10.1007/s00204-013-1070-0.

Azqueta A, Gutzkow KB, Brunborg G, Collins AR. Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2011;724(1–2):41-5.

Bacová G, Hunáková L, Chorváth M, Boljesíková E, Chorváth B, Sedlák J, Gábelová A. Radiation-induced DNA damage and repair evaluated with 'comet assay' in human ovarian carcinoma cell lines with different radiosensitivities. *Neoplasma* 2000;47(6):367-74.

Bartsch H, Nair J. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. *Langenbeck's Archives of Surgery* 2006;391(5):499-510.

Betti C, Davini T, Giannessi L, Loprieno N, Barale R. Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat Res* 1994;307:323-33.

Blasiak J, Arabski M, Krupa R, Wozniak K, Zadrozny M, Kasznicki J, Zurawska M, Drzewoski J. DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2004;554(1–2):297-304.

Choi S-W, Yeung VTF, Collins AR, Benzie IFF. Redoxlinked effects of green tea on DNA damage and repair, and influence of microsatellite polymorphism in HMOX-1: results of a human intervention trial. *Mutagenesis* 2015;30:129-37.

Christophi GP, Rong R, Holtzapple PG, Massa PT, Landas SK. Immune markers and differential signaling networks in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases* 2012;18(12):2342-56.

Collins, Duthie SJ, Dobson VL. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* 1993;14:1733-5.

Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology* 2004;26(3):249-61.

Collins AR. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 2014;1840(2):794-800.

Collins AR. The comet assay: a heavenly method! *Mutagenesis* 2015;30(1):1-4.

Collins AR, Horváthová E. Oxidative DNA damage, antioxidants and DNA repair: applications of the comet assay. *Biochem Soc Trans* 2001;29(2):337-41.

Collins AR, Azqueta A. DNA repair as a biomarker in human biomonitoring studies; further applications of the comet assay. *Mutat Res* 2012; 736:122-9.

Collins AR, Ma AG, Duthie SJ. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 1995;336:: 69-77.

Collins AR, Rašlová K, Somorovská M. DNA damage in diabetes: correlation with a clinical marker. *Free Radic Biol Med* 1998;25:373-7.

Collins AR, Harrington V, Drew J, Melvin R. Nutritional modulation of DNA repair in a human intervention study. *Carcinogenesis* 2003;24(3):511-5.

Collins AR, Olmedilla B, Southon S, Granado F, Duthie SJ. Serum carotenoids and oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Carcinogenesis* 1998;19(12):2159-62.

Collins AR, Cadet J, Møller L, Poulsen HE, Viña J. Are we sure we know how to measure 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA from human cells? *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2004;423(1):57-65.

Collins AR, Dušinská M, Horváthová E, Munro E, Savio M, Štetina R. Inter-individual differences in repair of base oxidation, measured in vitro with the comet assay. *Mutagenesis* 2001;16:297-301.

Collins AR, Rašlová Kn, Somorovská M, Petrovská H, Ondrušová A, Vohnout B, Fábry R, Dušinská M. DNA Damage in Diabetes: Correlation with a Clinical Marker. *Free Radical Biology and Medicine* 1998;25(3):373-7.

Collins AR, Anderson D, Coskun EA, Dhawan M, Dusinska G, Koppen M, Kruszewski M, Moretti E, Rojas G, Speit M, Valverde S, Bonassi. Launch of the ComNet (comet network) project on the comet assay in human population studies during the International Comet Assay Workshop meeting in Kusadasi, Turkey (September 13-16, 2011). *Mutagenesis* 2012.

Collins AR, Koppen G, Valdiglesias V, Dusinska M, Kruszewski M, Møller P, Rojas E, Dhawan A, Benzie I, Coskun E, Moretti M, Speit G, Bonassi S. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: The ComNet Project. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 2014;759:27-39.

Cook PR, Brazell IA, Jost E. Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *Journal of Cell Science* 1976;22(2):303-24.

Coronas MV, Pereira TS, Rocha JAV, Lemos AT, Fachel JMG, Salvadori DMF, Vargas VMF. Genetic biomonitoring of an urban population exposed to mutagenic airborne pollutants. *Environment International* 2009;35(7):1023-9.

Cortés-Gutiérrez E, Dávila-Rodríguez M, Fernández J, López-Fernández C, Gosálbez A, Gosálvez J. New application of the comet assay: chromosomeGÇôComet assay. *Histochem Cytochem* 2011;59:655-60.

Cuchra M, Mucha B, Markiewicz L, Przybyłowska-Sygut K, Pytel D, Jeziorski A, Kordek R, Majsterek I. The role of base excision repair in pathogenesis of breast cancer in the Polish population. *Molecular Carcinogenesis* 2016;55(12):1899-914. doi: 10.1002/mc.22436.

Del Bo' C, Fracassetti D, Lanti C, Porrini M, Riso P. Comparison of DNA damage by the comet assay in fresh versus cryopreserved peripheral blood mononuclear cells obtained following dietary intervention. *Mutagenesis* 2015;30(1):29-35.

Diñçer Y, Akçay T, Alademir Z, İlkova H. Assessment of DNA base oxidation and glutathione level in patients with type 2 diabetes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2002;505(1–2):75-81.

Dunne AL, Price ME, Mothersill C, McKeown SR, Robson T, Hirst DG. Relationship between clonogenic radiosensitivity, radiation-induced apoptosis and DNA damage/repair in human colon cancer cells. *British Journal of Cancer* 2003;89(12):2277-83.

Dusinska M, Collins AR. The comet assay in human biomonitoring: gene–environment interactions. *Mutagenesis* 2008;23(3):191-205.

Dusinska M, Smorovska M, Vallova BPH, Horska A, Stupakova A, Raslova KSM, Lietava J, Mezencevova Spustova V, Stefikova K, Krivosikova Z, Dzurik R, Gazdikova K, Rojkova K, Collins AR. Oxidative DNA damage in human diseases. Clinical application of the comet assay. *Neoplasma* 1999;46

Duthie SJ, Ma A, Ross MA, Collins AR. Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Res* 1996;56:1291-5.

Duthie SJ, Jenkinson AM, Crozier A, Mullen W, Pirie L, Kyle J, Yap LS, Christen P, Duthie GG. The effects of cranberry juice consumption on antioxidant status and biomarkers relating to heart disease and cancer in healthy human volunteers. *European Journal of Nutrition* 2006;45(2):113-22.

Eren K, Özmeriç N, Şardaş S. Monitoring of buccal epithelial cells by alkaline comet assay (single cell gel electrophoresis technique) in cytogenetic evaluation of chlorhexidine. *Clinical Oral Investigations* 2002;6(3):150-4.

Ersson C, Møller P, Forchhammer L, Loft S, Azqueta A, Godschalk RWL, van Schooten F-J, Jones GDD, Higgins JA, Cooke MS, Mistry V, Karbaschi M, Phillips DH, Sozeri O,

Routledge MN, Nelson-Smith K, Riso P, Porrini M, Matullo G, Allione A, Stępnik M, Ferlińska M, Teixeira JP, Costa S, Corcuera L-A, López de Cerain A, Laffon B, Valdiglesias V, Collins AR, Möller L. An ECVAG inter-laboratory validation study of the comet assay: inter-laboratory and intra-laboratory variations of DNA strand breaks and FPG-sensitive sites in human mononuclear cells. *Mutagenesis* 2013;28(3):279-86.

Faust F, Kassie F, Knasmüller S, Boedecker RH, Mann M, Mersch-Sundermann V. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 2004;566(3):209-29.

Ferk F, Chakraborty A, Jäger W, Kundi M, Bichler J, Mišík M, Wagner K-H, Grasl-Kraupp B, Sagmeister S, Haidinger G, Hoelzl C, Nersesyan A, Dušinská M, Simić T, Knasmüller S. Potent protection of gallic acid against DNA oxidation: Results of human and animal experiments. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2011;715(1-2):61-71.

Forchhammer L, Bräuner EV, Folkmann JK, Danielsen PH, Nielsen C, Jensen A, Loft S, Friis G, Møller P. Variation in assessment of oxidatively damaged DNA in mononuclear blood cells by the comet assay with visual scoring. *Mutagenesis* 2008;23(3):223-31.

Frankenberg-Schwager M. Review of repair kinetics for DNA damage induced in eukaryotic cells in vitro by ionizing radiation. *Radiother Oncol* 1989;14:307-20.

Franzke B, Halper B, Hofmann M, Oesen S, Jandrasits W, Baiertl A, Tosevska A, Strasser E-M, Wessner B, Wagner K-H. The impact of six months strength training, nutritional supplementation or cognitive training on DNA damage in institutionalised elderly. *Mutagenesis* 2014;30(1):147-53.

Giovannelli L, Pitozzi V, Riolo S, Dolara P. Measurement of DNA breaks and oxidative damage in polymorphonuclear and mononuclear white blood cells: a novel approach using the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2003;538(1-2):71-80. doi: h.

Gurská S, Farkasová T, Gábelová A. Radiosensitivity of cervical cancer cell lines: the impact of polymorphisms in DNA repair genes. *Neoplasma* 2007;54(3):195-201.

Hartmann A, Agurell E, Beevers C. Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. *Mutagenesis* 2003;18:45-51.

Herrera M, Dominguez G, Garcia JM, Peña C, Jimenez C, Silva J, Garcia V, Gomez I, Diaz R, Martin P, Bonilla F. Differences in Repair of DNA Cross-links between Lymphocytes and Epithelial Tumor Cells from Colon Cancer Patients Measured In vitro with the Comet Assay. *Clinical Cancer Research* 2009;15(17):5466-72.

Humphreys V, Martin RM, Ratcliffe B, Duthie S, Wood S, Gunnell D, Collins AR. Age-related increases in DNA repair and antioxidant protection: A comparison of the Boyd Orr Cohort of elderly subjects with a younger population sample. *Age and Ageing* 2007;36(5):521-6.

Ibarra-Costilla E, Cerda-Flores RM, Dávila-Rodríguez MI, Samayo-Reyes A, Calzado-Flores C, Cortés-Gutiérrez EI. DNA damage evaluated by comet assay in Mexican patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetologica* 2010;47(1):111-6.

Ibero-Baraibar I, Azqueta A, Lopez de Cerain A, Martinez JA, Zulet MA. Assessment of DNA damage using comet assay in middle-aged overweight/obese subjects after following a hypocaloric diet supplemented with cocoa extract. *Mutagenesis* 2015;30:139-46.

Johnston AP, De Lisio M, Parise G. Resistance training, sarcopenia, and the mitochondrial theory of aging. *Appl Physiol Nutr Metab* 2008;33:191-9.

Kadioglu E, Sardas S, Aslan S, Isik E, Karakaya AE. Detection of oxidative DNA damage in lymphocytes of patients with Alzheimer's disease. *Biomarkers* 2004;9(2):203-9.

Kleinsasser NH, Wallner BC, Kastenbauer ER, Muenzenrieder RK, Harréus UA. Comparing the genotoxic sensitivities of human peripheral blood lymphocytes and mucosa cells of the upper aerodigestive tract using the Comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2000;467(1):21-30.

Lin X, Wood C, Shao L, Huang M, Yang H, Dinney CWX. Risk assessment of renal cell carcinoma using alkaline comet assay. *Cancer* 2007;110(2):282-8.

Lou J, He J, Zheng W, Jin L, Chen Z, Chen S, Lin Y, Xu S. Investigating the genetic instability in the peripheral lymphocytes of 36 untreated lung cancer patients with comet assay and micronucleus assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2007;617(1-2):104-10.

Mallone R, Mannering SI, Brooks-Worrell BM, Durinovic-Belló I, Schloot NC. Isolation and preservation of peripheral blood mononuclear cells for analysis of islet antigen-

reactive T cell responses: position statement of the T-Cell Workshop Committee of the Immunology of Diabetes Society. . Clin Exp Immunol 2011;163:33-49.

Markovic J, Garcia-Gimenez JL, Gimeno AJV, Pallardo FV. Role of glutathione in cell nucleus. Free Rad Res 2010; 44:721-33.

Martins M, Costa P. The comet assay in ecological risk assessment of marine pollutants: applications, assets and handicaps of surveying genotoxicity in non-model organisms. Mutagenesis 2015;30:89-106.

McConnell JR, Crockard AP, Cairns ALB. Neutrophils from systemic lupus erythematosus patients demonstrate increased nuclear DNA damage. Clin Exp Rheumatol 2002;20:653-60.

McKenna DJ, McKeown SR, McKelvey-Martin VJ. Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer. Mutagenesis 2008;23(3):183-90.

McKeown SR, Robson T, Price ME, Ho ETS, Hirst DG, McKelvey-Martin VJ. Potential use of the alkaline comet assay as a predictor of bladder tumour response to radiation. Br J Cancer 2003;89(12):2264-70.

Migliore L, Petrozzi L, Lucetti C, Gambaccini G, Bernardini S, Scarpato R, Trippi F, Barale R, Frenzilli G, Rodilla V, Bonuccelli U. Oxidative damage and cytogenetic analysis in leukocytes of Parkinson's disease patients. Neurology 2002;58(12):1809-15.

Mitchel JH, Collins AR. Effects of a soy milk supplement on plasma cholesterol levels and oxidative DNA damage in men-a pilot study. Eur J Nutr 1999;38:138-43.

Møller P, Loft S. Dietary antioxidants and beneficial effect on oxidatively damaged DNA. Free Radical Biology and Medicine 2006;41(3):388-415.

Møller P, Wallin H, Holst E, Knudsen LE. Sunlight-induced DNA damage in human mononuclear cell. FASEB J 2002;16:45-53.

Morillas MJ, Guillamet E, Surrallés J, Creus A, Marcos R. Spontaneous and induced genetic damage in T lymphocyte subsets evaluated by the Comet assay. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 2002;514(1-2):39-48.

Müllner E, Brath H, Pleifer S, Schiermayr C, Baierl A, Wallner M, Fastian T, Millner Y, Paller K, Henriksen T, Enghusen Poulsen H, Forster E, Wagner K-H. Vegetables and PUFA-rich plant oil reduce DNA strand breaks in individuals with type 2 diabetes. *Mol Nutr Food Res* 2013;57:328-38.

Navasumrit P, Chanvaivit P, Intarasunanont M, Arayasiri N, Lauhareungpanya V, Parnlob D, Settachan M, Ruchirawat. Environmental and occupational exposure to benzene in Thailand. *Chem Biol Interact* 2005;153-154 75-83.

Niedbala M, McNamee JP, Raaphorst GP. Response to pulsed dose rate and low dose rate irradiation with and without mild hyperthermia using human breast carcinoma cell lines. *International Journal of Hyperthermia* 2006;22(1):61-75.

Olive PL, Banath JP, MacPhail HS. Lack of a correlation between radiosensitivity and DNA double-strand break induction or rejoining in six human tumor cell lines. *Cancer Res* 1994;54:3939-46.

Olliver JR, Hardie LJ, Gong Y, Dexter S, Chalmers D, Harris KM, Wild CP. Risk factors, DNA damage, and disease progression in Barrett's esophagus. *Cancer Epidemiology, Biomarkers, & Prevention* 2005;14(3):620-5.

Oßwald K, Mittas A, Gleis M, Pool-Zobel B. New revival of an old biomarker: characterization of buccal cells and determination of genetic damage in the isolated fraction of viable leucocytes. *Mutat Res* 2003;544:321-9.

Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;123:291-8.

Pereira C, Coelho R, Grácio D, Dias C, Silva M, Peixoto A, Lopes P, Costa C, Teixeira JP, Macedo G, Magro F. DNA Damage and Oxidative DNA Damage in Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Crohn's and Colitis* 2016;10(11):1316-23.

Pinhal D, Gontijo AdM, Reyes V, MF. S. Viable human buccal mucosa cells do not yield typical nucleoids: impacts on single-cell gel electrophoresis/ comet assay. *Environ Mol Mutagen* 2006;47:117-26.

Piperakis SM. Comet assay: A brief history. *Cell Biology and Toxicology* 2009;25(1):1-3.

Piperakis SME, Petrakou ST. Effects of air pollution and smoking on DNA damage of human lymphocytes. *Environ Mol Mutagen* 2000;36:243-9.

Rinna A, Magdolenova Z, Hudecova A, Kruszewski M, Refsnes M, Dusinska M. Effect of silver nanoparticles on mitogen-activated protein kinases activation: role of reactive oxygen species and implication in DNA damage. *Mutagenesis* 2015;30(1):59-66.

Rojas E, Lorenzo Y, Haug K, Nicolaissen B, Valverde M. Epithelial cells as alternative human biomatrices for comet assay. *Frontiers in Genetics* 2014;5(386).

Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2006;212(2):167-78.

Rydberg B, Johanson K. Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In: *DNA Repair Mechanisms*, Friedberg EC, Fox CF (eds). Academic Press, New York 1978:465-8.

Shaposhnikov SA, Salenko VB, Brunborg G, Nygren J, Collins AR. The comet assay: loops or fragments? *Electrophoresis*, 2008;29:3005-12.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 1988;175(1):184-91.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research* 1988;175::184-91.

Sliwinska A, Blasiak J, Kasznicki J, Drzewoski J. In vitro effect of gliclazide on DNA damage and repair in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM). *Chemico-Biological Interactions* 2008;173(3):159-65.

Smith TR, Miller MS, Lohman KK, Case LD, Hu JJ. DNA damage and breast cancer risk. *Carcinogenesis* 2003;24(5):883-9.

Somorovská M, Szabová E, Vodicka P. Biomonitoring of genotoxic risk in workers in a rubber factory: comparison of the Comet assay with cytogenetic methods and immunology. *Mutat Res* 1999;445:181-92.

Staruchova M, Collins AR, Volkovova K, Mislanová C, Kovacikova Z, Tulinska J, Kocan A, Staruch L, Wsolova L, Dusinska M. Occupational exposure to mineral fibres. Biomarkers of oxidative damage and antioxidant defence and associations with DNA damage and repair. *Mutagenesis* 2008;23(4):249-60.

Szeto Y, Lee A, Benzie I, Obied H. Optimized noninvasive procedures to measure DNA damage in comet assay. *Human and Experimental Toxicology* 2012;31(11):1144-50.

Tatsch E, Bochi GV, Piva SJ, De Carvalho JAM, Kober H, Torbitz VD, Duarte T, Signor C, Coelho AC, Duarte MMMF, Montagner GFFS, Da Cruz IBM, Moresco RN. Association between DNA strand breakage and oxidative, inflammatory and endothelial biomarkers in type 2 diabetes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2012;732(1-2):16-20.

Torbergesen AC, Collins AR. Recovery of human lymphocytes from oxidative DNA damage: the apparent enhancement of DNA repair by carotenoids is probably simply an antioxidant effect. *Eur J Nutr* 2000;39:80-5.

Uhl M, Helma C, Knasmüller S. Single-cell gel electrophoresis assays with human-derived hepatoma (Hep G2) cells. *Mutat Res* 1999;441:215-24.

Valverde M, Rojas E. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 2009;681(1):93-109.

Van Den Berg R, Van Vliet T, Broekmans WMR, Cnubben NHP, Vaes WHJ, Roza L, Haenen GRMM, Bast A, Van Den Berg H. A vegetable/fruit concentrate with high antioxidant capacity has no effect on biomarkers of antioxidant status in male smokers. *Journal of Nutrition* 2001;131(6):1714-22.

Varvařovská J, Racek J, Štětina R, Sýkora J, Pomahačová R, Rušavý Z, Lacigová S, Trefil L, Siala K, Stožický F. Aspects of oxidative stress in children with Type 1 diabetes mellitus. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2004;58(10):539-45.

Wilhelm M, Ebarwein G, Holzer J, Gladtko D, Angerer J, Marezynski B, Behrendt H, Ring J, Sugiri D, Ranft U. Influence of industrial sources on children's health-Hot spot studies in North Rhine Westphalia, Germany. *Int J Hyg Environ Health* 2007.

Wojewoć dzka M, Machaj K, GoY" dzik A, Iwanen~ko T, Oldak T, Kruszewski M, Pojda Z. DNA damage in subpopulations of human lymphocytes irradiated with doses in the range of 0-1 Gy of X-radiation. *Nukleonika* 2008;53:145-9.

Xavier DJ, Takahashi P, Manoel-Caetano FS, Foss-Freitas MC, Foss MC, Donadi EA, Passos GA, Sakamoto-Hojo ET. One-week intervention period led to improvements in glycemic

control and reduction in DNA damage levels in patients with type 2 diabetes mellitus.
Diabetes Research and Clinical Practice 2014;105(3):356-63.

10. Anhang

I. Materialien und Chemikalien

Materialien	Hersteller	Produktnummer
Objektträger	VWR	20x20 / 24x32 ECN 631-1551
Objektgläser	VWR	ECN631-1568
Mikrowelle	ELTA	
Inkubator	Memmert	Modell 500 43017003
Wasserbad	GFL – Gesellschaft für Labortechnik	No.: 10673394c
Magnetrührer	Heidolph	No.: 504.10.100.00
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 547R	
Pipetten:		
Multipipette	Eppendorf	N81016
Pipette 10-100	Gilson	022119J
Pipette 20-200	PEQLAB	
Pipette 100-1000	Gilson	K25846N
Countess – automated cell counter	Invitrogen	09073-024

Countess Objektträger – (chamber slides)	Invitrogen	2C09222A
Elektrophorese	PEQLAB – Biotechnologie GmbH	029342
Elektrophorese Power Supply	PEQLAB - Biotechnologie GmbH	85239
UV-Lampe Lummen 200	Prior	83953
Fluoreszenzmikroskop	NIKON	Eclipse CiL 951358
PC-Comet Programm	COMET IV	
PH-Meter	Metrohm Inula	1827001024264
Waage	Sartorius	
Vortex	Heidolph	No.: 541-1000-00- 0

Chemikalien	Hersteller	Produktnummer
Normal Melting Agarose (NMP)	Invitrogen	0000383045
Low Melting Agarose (LMP)	Invitrogen	0000321536
Dulbecco's Phosphate buffered saline (PBS)	Sigma-Aldrich	Lot: RNBF3793
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich	Lot: SZBE1630V
Trizma base (TRIS)	Sigma-Aldrich	Lot: BCBD2752V
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma- Aldrich	Lot: SZBE3030V
Triton X - 100	Sigma - Aldrich	Lot: STBG1336V
Kaliumhydroxid (KOH)	Sigma-Aldrich	82470
2—ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich	Lot: SLBL9312V

Kaliumchlorid (KLC)	Sigma-Aldrich	Lot: SZBC2460V
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich	CAS: 9048-46-8
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Sigma-Aldrich	Lot: SZBF2870V
Formamidopyrimidin- DNA-Glykosylase (FPG)	New England Biolabs	M02402 Lot: 0061402
Ethanol Absolut 99,9%	AustrAlca	AAAH-5020-07025-290512
Gel Red – Fluoreszenzfarbstoff	Botum	Lot: 14G1204 No.: 41003
Trypanblau	Molecular prober by life technologies	Lot: 1633080

II. Protokoll

Herstellen der Lösungen

- Normal Melting Agarose (NMA)

200mg NMP Agarose in 20 ml bidest. Wasser in der Mikrowelle lösen (bis zur Verwendung im Kühlschrank lagern)

Auftragen auf die Slides:

1. NMA in der Mikrowelle flüssig machen (ca. 800 Watt) und in Wasserbad (55°C) stellen, damit sie flüssig bleibt
2. Slides eintauchen
3. Rückseite gut mit Papier säubern
4. Über Nacht/ Wochenende trocknen lassen

- Low Melting Agarose (LMA) 0,8%

160 mg LMP Agarose in 20ml PBS in Mikrowelle lösen und eventuell aliquotieren (sollte man nur max. dreimal erwärmen → je höher die Konzentration, desto weniger % tail) → bis zur Verwendung in Kühlschrank lagern

Verwendung:

In Mikrowelle lösen und ins Wasserbad stellen (37°C) und von dort zur Verwendung entnehmen.

- Lyselösung (pH=10)

Für 1 Liter:

- 2,5 M NaCL 146,1g
- 0,1 M EDTA 29,2g
- 10 mM TRis 1,211g
- Ca. 8g NAOH zum Einstellen von PH (kann man gleich dazu geben)
- Triton X 100µl pro 100ml

(aber erst immer am Tag der Verwendung dazu!! (Pasteurpipette))

Wichtig: EDTA löst sich erst nach Zugabe von NaOH!

Langsame Zugabe von 10M NaOH bis pH 9,95-10,05

LyseLösung kann immer am Beginn der Woche für die ganze Woche hergestellt werden!

- Alles am Magnetrührer gut mischen

- 10M NaOH (für pH-Einstellung der Lyse)

1 Mol NaOH → 40g NaOH

10 Mol NaOH → 400g NaOH in 1 Liter Wasser auflösen (Wichtig: Langsam und löffelweise dazugeben - wird sehr heiß!)

- Elektrophoreselösung (pH=13)

Muss immer am Tag der Verwendung frisch hergestellt werden (in der Früh herstellen) und sofort in den Kühlschrank/ Kühlhaus geben, damit er für die Elektrophorese kalt ist.

2 Liter:

0,3M NaOH 24g
0,001M EDTA 0,58g

2,5 Liter:

30g
0,725g

Immer 2,5 Liter herstellen, aber nur 2 Liter in Elektrophorese leeren! Nur wenn die Stromstärke zu gering ist, noch was drauf geben!

- Puffer F (10fach konzentrierte Stocklösung)

1 Liter:

- 40mM Hepes 93,3g
- 0,1M KCL 74,56g
- 0,5mM EDTA 1,46g

pH-Wert mit KOH auf pH 8,0 einstellen (7,95-8,05).

Aliquotieren à 40-50ml und bei -20°C lagern.

- Puffer F (enzyme reaction buffer for FPG)
 - Puffer F Stocklösung in Wasserbad (37°C) auftauen
 - Je nachdem wie viel in Stocklösung ist, mit dest. Wasser im 500ml Messzylinder auffüllen (50 ml → 500ml auffüllen; 1:10 Verdünnung)
 - Mit 1M KOH den pH auf 8,0 einstellen (7,95-8,05)

- 1M KOH

1Mol KOH 56,11g → in 1 Liter dest. H₂O lösen
(zum Einstellen von pH-Wert)

- 100μM H₂O₂

0,1M Stocklösung herstellen:

 - 103μl H₂O₂
 - 10ml dest. H₂O

(Stocklösung ca. eine Woche haltbar)

→ 100μl Stocklösung auf 100ml dest. H₂O auffüllen

- FPG

Verdünnung 1:3000

 - Zuerst 1:10 Verdünnung: 5μl FPG originale + 45μl Puffer
 - 5μl 1:10 Verdünnung + 1495μl Puffer

Comet Assay

1. PBMC auftauen und waschen
 - Zentrifuge einschalten und runterkühlen auf 4°C
 - Cup mit Lymphozyten aus dem -80°C Tiefkühler holen und in den Händen schnell auftauen

- Sobald aufgetaut, Zentrifugieren: 3000 rpm für 5min bei 4°C
- Überstand mit der 200µl Pipette abnehmen
- 400µl PBS dazugeben und gut resuspendieren (besser mit 200µl Pipette)
- Wieder zentrifugieren: 3000 rpm für 5 min und 4°C
- Überstand abnehmen (PBS)
- 200-400µl drauf pipettieren und gut resuspendieren
- Countess einschalten
- Farbstoff in Cups vorlegen (je 10µl)
- 10µl Zellsuspension und 10µl Farbstoff mischen und Zellzahl bestimmen
- Konzentration von $3-6 \times 10^5$ herstellen (entweder mehr PBS dazu oder nochmal ab-zentrifugieren und weniger PBS dazu)

2. Aufbringung der Zellen auf die Slides

- Beschichtete Slides gut beschriften (Nummer, Zellen, Studie) und in silberne Kammern legen (alles auf Eis, falls zu viel Kondenswasser entsteht, Eis weggeben und die Kammern erst nach dem Pipettieren wieder aufs Eis stellen)
- LMA in der Mikrowelle lösen und ins Wasserbad stellen (37°C) → max. 3-mal erwärmen!

	Zellzahl in Suspension	Zellsuspension	Agarose
PBMCs	$3-6 \times 10^5$	15 µl	70 µl
Orale Leukozyten	6×10^5	15 µl	70 µl
Vollblut	-	10 µl	200 µl

- Zellsuspension laut Tabelle mit LMP Agarose in Cup mischen
- Mithilfe der Multipipette 12 x 5µl der Suspension auf Slides auftragen um Gele herzustellen
- Sobald alles pipettiert ist, Slides in Lyselösung stellen (min. 1h)

→ außer H₂O₂ – Slides: kommen davor für 5min in H₂O₂ und werden mit PBS gewaschen und werden dann erst in die Lyselösung gegeben (min. 1h)

- Lyse: für mindestens 1 Stunde im Kühlschrank inkubieren (bis max. 24h, sollte aber jedes Mal ca. gleich lang sein)
- Während Inkubation der Lyse kann man Puffer F herstellen → Wichtig: immer pH Wert notieren

3. Behandlung mit FPG und Puffer:

- Moist box mit etwas Wasser befüllen und in Brutschrank (37°C) geben
- Puffer und FPG Slides aus der Lyse nehmen – Lyse Slides bleiben bis zur Elektrophorese im Kühlschrank!
- 3 mal mit Puffer F waschen und für jeweils 5 min in Kühlschrank (Lyse ausleeren und Puffer F drauf)
- Slides aus der Küvette nehmen und vorsichtig den restlichen Puffer F mit Papier von der Unterseite der Slides entfernen
- In silberne Kammern legen
- Mit Silikoneinsatz richtig einspannen und sofort auf Eis legen
- Jeweils 30µl Puffer oder 30µl FPG auf jedes Gel pipettieren
- Mit Silikondeckel abdecken
- Fertige Kammern in Moist box geben und 30 min bei 37°C inkubieren
- In der Zwischenzeit Elektrophorese und Power Supply in den Kühlraum geben und alles einstellen → auch Elektrophorese Puffer muss kalt sein!

4. Alkalibehandlung mit Elektrophorese:

- Moist box aus dem Inkubator nehmen und in Kühlraum bringen (Elektrophorese)
- Kammern wieder auseinander bauen und Slides vorsichtig in Elektrophorese legen (matte Seite links!) → Lyse Slides nicht vergessen!

- Jede Reihe muss voll sein, falls zu wenige Slides, mit leeren Objektträgern auffüllen
- Elektrophorese Puffer in Elektrophorese leeren, meist 2 Liter, so dass alles gut bedeckt sind
- 20 min Inkubieren → UNWINDING PHASE
- Danach Elektrophorese starten
- Elektrophoresekammer anstecken (Rot zu Rot, Schwarz zu Schwarz, Rot = Pluspol)
- Power Supply einschalten
- Manuell wählen und SET drücken
- Spannung: 25 Volt, SET drücken
- Strom auf Maximum, SET drücken
- Leistung auf Maximum (150), SET drücken
- Zeiteinheit: h, SET drücken
- Zeit: 30 min
- RUN drücken

Immer noch eine Minute ca. warten und schauen, ob alles funktioniert und ob Stromstärke über 300 mA liegt! (Wenn sie unter 300 mA liegt, Puffer dazu) → Stromstärke immer auch notieren

5. Neutralisation:

- Nach 30 min Slides aus der Elektrophorese nehmen (2 Paar Handschuhe anziehen weil Puffer stark basisch!)
- Slides für 5 min in Küvette mit PBS geben
- Danach für 5 min in destilliertes Wasser geben
- 15 min in 17% Ethanol dehydrieren lassen
- 15 min in Ethanol absolut dehydrieren lassen
- Slides aus Küvette geben, schauen ob alle Gele da sind (falls nicht, alles auf Protokoll notieren)
- Slides über Nacht trockenen lassen, Gele werden eben

- Am nächsten Tag Gele in blaue Box geben und im Kühlschrank bis zum Mikroskopieren lagern (in diesem Zustand halten Gele lange!)

6. Auszählen der Slides – Comet Assay IV

- Auszählen der Slides erfolgt immer im Dunkeln → Jalousie herunter!
- PC starten
- Comet Assay IV starten (Desktop Verknüpfung)
- User: Supervisor
- PW: password
- Select configuration → passende auswählen (derzeit febr. 2014) → OK
- UV-Lampe des Mikroskops aufdrehen (Kippschalter am schwarzen Kasten)
ACHTUNG: Lampe ist sehr empfindlich!
- 20er Objektiv auswählen (sollte eigentlich nicht verstellt werden)
- Gel am Objektträger färben (Farbstoff: GelRed-solution 1:3.300 verdünnt) → Hälfte des Slides (6 Gele) anfärben
- Deckglas auf Objektträger legen
- Objektträger in Mikroskop legen → Shutter am Mikroskop öffnen
- Mikroskop richtig einstellen (Grobtrieb, Feintrieb zum „scharf stellen“)
- Zellen auszählen:
 - Immer 50 Zellen pro Gel zählen → da 2 Gele = 100 Zellen pro Proband → nach jedem Probanden Daten abspeichern
 - Zellen durch Mausclick auswählen
 - Software erkennt und berechnet automatisch
 - Falls Zellen von Software nicht erkannt werden: Edit → 4-Eck so zurechtziehen, dass komplette Cometzelle umhüllt ist. Grüne Linie ins Zentrum schieben, blaue Linie am linken Rand und pinke Linie am rechten Rand setzen → confirm edit
 - Durch das Markieren einer Zelle schaltet Software in den „Frozen Status“

- Durch F5 oder Rechtsklick mit der Maus wieder in den „Live Status“ wechseln
- Nächste Zelle auswählen
- Mikroskop abschalten
- Shutter schließen (ganz nach links schieben)
- Zuerst Lampe, dann Computer abdrehen