
***XRCC1, GSTM1 EN EPHX1* POLYMORFISMEN ZIJN PREDICTIEF VOOR
MICRONUCLEUSFREQUENTIES IN MENSELIJKE POPULATIES :**

resultaten van een 'pooled analysis' van de gegevens van het Human MicroNucleus project.

Addendum

M. Kirsch-Volders¹, A. Tremp¹

in samenwerking met S. Bonassi², M. Roelants³, N. Holland⁴, W. P. Chang⁵, E. Zeiger⁶, P. Aka¹, L. Godderis⁷, H. Ishikawa⁸, B. Laffon⁹, P. Leopardi¹⁰, L. Lucero¹¹, R. Mateuca¹, L. Migliore¹², H. Norppa¹³, M. Pitarque¹¹, J. P. Teixeira¹⁴ and M. Fenech¹⁵

¹ Laboratorium voor Cellulaire Genetica, Vrije Universiteit Brussel, Pleinlaan 2, B-1050
Brussel, Belgium

² Department of Environmental Epidemiology, Instituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro,
Genoa, Italy

³ Laboratorium voor Antropogenetica, Vrije Universiteit Brussel, Pleinlaan 2, B-1050
Brussel, Belgium

⁴ School of Public Health, University of California, Berkeley, CA 94720-7360, USA

⁵ Institute of Environmental Health Sciences, National Yang Ming University Medical
School, Taipei, Taiwan, ROC

⁶ Errol Zeiger Consulting, Chapel Hill, NC, USA

⁷ Laboratorium voor Arbeidshygiëne en -Toxicologie, Katholieke Universiteit Leuven,
Kapucijnenvoer 35/6, 3000 Leuven, Belgium

⁸ Department of Public Health and Preventive Medicine, Mie University School of
Medicine, Edobashi 2-174, Tsu 514-8507, Japan

⁹ Dpto. Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidade da Coruña,
Campus A Zapateira s/n, 15071 La Coruña, Spain

¹⁰ Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, I-00161, Rome, Italy

¹¹ Grup de Mutagènesi, Departament de Genètica I de Microbiologia, Facultat de Ciències,
Edifici Cn, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

¹² Dipartimento di Scienze dell'Uomo e dell' Ambiente e del Territorio, Università di Pisa,
Via San Giuseppe 22, 65100 Pisa, Italy

¹³ Laboratory of Molecular and Cellular Toxicology, department of Industrial Hygiene and
Toxicology, Finnish Institute of Occupational Health, Topeliuksenkatu 41 aA, FIN-00250
Helsinki, Finland

¹⁴ National Institute of Health, Environmental Health and Toxicology Department, Largo 1
de de Dezembro, 4000 Porto, Portugal

¹⁵ CSIRO Health Sciences and Nutrition, Gouger Street, P.O. Box 10041, Adelaide, SA
5000, Australia

INLEIDING

De micronucleustest werd in menselijke biomonitoringstudies toegepast in perifere lymfocyten, en in mindere mate in buccale of nasale epitheelcellen (voor review zie Kirsch-Volders *et al.*, 1997, 2000; Surrallés and Natarajan, 1997; Fenech, 1998; Fenech *et al.*, 1999). Deze assay wordt gebruikt om: (i) de mate aan genetisch schade tussen populaties blootgesteld aan verschillende omgevings-, beroeps- en levensstijlfactoren te vergelijken (Fenech *et al.*, 1999); (ii) de verschillen in radiosensitiviteit te evalueren tussen individuen die risico lopen op kanker, zowel als predictor van kankerrisico als voor de optimalisering van radiotherapie (Scott *et al.*, 1998; Bonassi *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003).

Een micronucleus (MN) kan ontstaan uit een acentrisch chromosoomfragment of geheel chromosoom dat verloren gaat uit de metafaseplaat, daarom verschaft de MN assay een maat voor zowel chromosoombreuken als chromosoomverlies. Een MN vereist dat er kerndeling plaatsvindt na de inductie van schade en/of het falen van de celcyclus checkpoints. Hierom is kennis van de delingskinetiek van het bestudeerde weefsel en het beperken van het scoren tot cellen die een volledige kerndeling hebben ondergaan de eerste vereisten om de geobserveerde MN frequenties correct te interpreteren. De relatieve eenvoudigheid van het scoren van MN en de uitgebreide toepasbaarheid van de *in vitro* MN test in verschillende celtypen maken het een aantrekkelijk eindpunt om cytogenetische abnormaliteiten te evalueren. De beperkte kennis van de inductiemechanismen van MN en de afwezigheid van adequate methodes om gelijktijdig celproliferatie en MN inductie te bepalen hebben echter de validatie van de *ex vivo/in vitro* vertraagd.

De ontwikkeling van de cytokinesis-block micronucleus (CBMN) methodologie door Fenech en Morley (1986) door het toevoegen van de actine polymerisatie inhibitor cytochalasine-B gedurende de *in vitro* mitose liet de identificatie toe van eenmaal gedeelde cellen als binucleairen, en bleek een efficiënte aanpak om de mechanismen die leiden tot de inductie van MN te bestuderen. Door het scoren van MN in cellen die slechts eenmaal deelden (binucleairen) en optioneel in niet-gedeelde cellen (mononucleairen) loste de CBMN het probleem op van de variatie in MN frequenties veroorzaakt door veranderingen in de proportie aan cellen die deelden in cultuur te wijten aan suboptimale cultuur omstandigheden of, in het geval van lymfocyten, aan verschillen in mitogene respons. Een MN in een mononucleaire primaire lymfocyt wijst op chromosoomschade die *in vivo* aanwezig was alvorens de start van de cultuur, en binucleairen kunnen zowel eerder bestaande MN bevatten als MN gevormd tijdens de *in vitro* cultuur (Kirsch-Volders en Fenech, 2001).

In recente jaren hebben de programma's van het International Collaborative Project on Micronucleus Frequency in Human Populations, ook gekend als het HUMN project (<http://www.humn.org>) de *ex vivo/in vitro* cytokinesis-block micronucleustest gevalideerd door het opstellen van scoringscriteria, intra- en interlaboratorium vergelijkingen van scoring van slides, definiëring van background frequenties van MN in controle populaties, en het evalueren van de invloed van vele variabelen zoals leeftijd, geslacht en rookgedrag op MN frequenties, gebruik makende van gegevens van verschillende laboratoria over het hele wereld (Fenech *et al.*, 1999, 2003a, 2003b; Bonassi *et al.*, 2001, 2003). De predictiviteit van de CBMN assay voor het bepalen van kankerrisico is nog niet gekend, maar maakt deel uit van de doelstellingen van het HUMN project en het momenteel lopend EU programma over predictiviteit van cytogenetische biomarkers voor kanker (CancerRiskBiomarkers QLK4-CT-2000-00628). Eerder werd al een poging gedaan om de predictiviteit van MN in menselijke lymfocyten te bestuderen (Hagmar *et al.*, 1994). De associatie tussen MN frequenties in lymfocyten en algemeen kankerrisico was niet statistisch significant, in tegenstelling tot chromosoomaberraties, die de eerste genotoxiciteitsbiomarker was waarvoor een statistisch

significant verband werd aangetoond met het algemeen kankerrisico. Deze MN studie werd echter uitgevoerd in een relatief kleine populatie, en op MN geanalyseerd in lymfocyten alvorens de cytokinesis-block assay beschikbaar was. Een ander huidig doel van het HUMN project is om gegevens te verzamelen afkomstig van studies waarin de impact van genetische polymorfismen en omgevingsfactoren zoals beroepsblootstelling aan carcinogenen en/of voeding werden bestudeerd, zodat de impact van genetische en omgevingsfactoren op MN frequenties zou kunnen verduidelijkt worden in een ‘pooled analysis’.

Het doel van deze studie was om een ‘pooled analysis’ uit te voeren om de predictiviteit te bestuderen van genetische polymorfismen betrokken in metabolisatie (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *EPHX1*, *CYP2E1*) en DNA repair (*hOGG1*, *XRCC1*, *XRCC3*) voor de spontane background frequenties aan MN in de algemene bevolking en voor MN *in vivo* geïnduceerd door beroepsblootstelling aan mutagenen, geanalyseerd met de CBMN assay. Deze data zouden een wetenschappelijke basis moeten verschaffen voor de interpretatie van MN variatie op individueel niveau gebaseerd op genetische informatie. Deze informatie zal ook nuttig zijn voor donorselectie in *in vitro* genotoxiciteitsassays en voor een betere opvolging van arbeiders blootgesteld aan mutagenen.

Aangezien acentrische chromosoomfragmenten resulterend uit dubbelstrengige breuken MN kunnen vormen, kan men veronderstellen dat genetische polymorfismen betrokken in de metabolisatie van pro-clastogenen tot actieve clastogenen en in de repair van enkelstrengige en dubbelstrengige breuken zouden kunnen leiden tot verhoogde MN frequenties. Men verwacht dat de MN frequenties resulterend uit chromosoomverlies beïnvloed worden door genetische polymorfismen die de reactiviteit van aneugenen controleren, bv. tubuline inhibitoren, topoisomerases, cyclines, evenals genetische veranderingen die de activiteit van celcyclus checkpoint genen zoals hCDC4 veranderen die, wanneer disfunctioneel, leiden tot verhoogde MN frequenties (Rajagopalan *et al.*, 2004). Momenteel zijn deze polymorfismen echter niet geïdentificeerd, en zullen dus niet beschouwd worden in deze studie.

In deze studie verzamelden we gegevens van 861 individu's (655 mannen en 206 vrouwen), afkomstig van 7 laboratoria in Europa. We analyseerden alle data via Poisson regressie op het verband tussen genetische polymorfismen en MN frequenties bekomen met de *ex vivo/in vitro* CBMN assay in menselijke lymfocyten. We toonden aan dat de polymorfismen voor *EPHX1*¹¹³, *EPHX1*¹³⁹, *GSTM1* en *XRCC1*³⁹⁹ een significante invloed hebben op MN frequenties in binucleaire lymfocyten.

MATERIAAL EN METHODES

Populaties, laboratoria en studies

Data werd verzameld uit zeven verschillende laboratoria in Europa, resultaten verschaffend die reeds werden gepubliceerd (Godderis *et al.*, 2004; Ishikawa *et al.*, 2003; Laffon *et al.*, 2002, 2003; Leopardi *et al.*, 2003; Lucero *et al.*, 2000; Pitarque *et al.*, 2002; Teixeira *et al.*, 2004), ingediend (Aka *et al.*, Mateuca *et al.*) of ongepubliceerd zijn (Migliore, persoonlijke mededeling) (zie tabel 1). Deze data waren afkomstig uit studies van beroepsblootstelling of *in vitro* blootstelling aan genotoxische agentia, en werden bekomen uit perifeer bloed lymfocyten gebruik makende van de cytokinesis-block methodologie (Fenech en Morley, 1985). Informatie over individuele kenmerken (leeftijd, geslacht, rookgedrag, ziekte, ...), blootstelling aan genotoxische agentia, het laboratoriumprotocol voor genotypering en de micronucleustest, scoringscriteria en MN frequenties werden verzameld via een gedetailleerde

questionnaire, aangepast van een in een eerdere HUMN studie gebruikte questionnaire (Bonassi *et al.*, 2001). Alle individu's waren Cauciërs. Een totaal van 662 individu's werd gebruikt voor *GSTM1* (457 mannen, 205 vrouwen), 660 voor *GSTT1* (455 mannen, 205 vrouwen), 86 voor *GSTP1*¹⁰⁵ (51 mannen, 35 vrouwen), 143 voor *CYP2E1 DraI* (123 mannen, 20 vrouwen), 173 voor *EPHX1*¹¹³ en *EPHX1*¹³⁹ (138 mannen, 35 vrouwen), 262 voor *XRCC1*³⁹⁹ (enkel mannen), 220 voor *XRCC3*²⁴¹ (enkel mannen), en 221 voor *XRCC1*¹⁹⁴, *XRCC1*²⁸⁰ en *hOGG1*³²⁶ (enkel mannen)(zie tabel 2).

Statistische methodes

The invloed van genotype, leeftijd, geslacht, blootstelling, rookgedrag en studie op MNCB (de frequentie aan gemicronucleëerde cellen per 1000 binucleairen) werd bepaald door Poisson regressie analyse. Om te standaardiseren voor interlaboratorium variatie werd een 'mixed model' gebruikt, met genotype, geslacht, blootstelling en rookgedrag als 'fixed factors', en studie als 'random factor'. Zo wordt elke studie als een cluster beschouwd. Elke analyse werd uitgevoerd op de gehele populaties, en de controle en blootgestelde populaties afzonderlijk. Een frequency ratio (F.R.), het 95% betrouwbaarheidsinterval van de F.R. (C.R.) en een p waarde werden bekomen. Voor categorische variabelen wijst deze F.R. op de proportionele toename van de MN frequentie in de studiegroep, een F.R. van bv. 1.23 betekent dat er een toename van de MN frequentie met 23% was in deze individu's met de vermelde parameter, in vergelijking met individu's in de referentiecategorie. Voor continue variabelen betekent de F.R. een proportionele toename van de MN frequentie die te wijten is aan een toename van één eenheid van de geëvalueerde parameter, een F.R. van bv. 1.013 voor leeftijd betekent dat er een 1.3% toename is van de MN frequentie per leeftijdsjaar. De statistische analyse werd uitgevoerd met R versie 1.9.0. (<http://www.r-project.org/>)

RESULTATEN

De resultaten van de Poisson logistische regressie analyse zijn samengevat in tabellen 3 en 4. Voor elke groep studies met data over MN frequenties in verband met een gegeven genetisch polymorfisme werden de significante predictieve parameters vermeld, met hun F.R., C.I. en p waarde in de totale populaties, en de controle en blootgestelde populaties afzonderlijk. De genotypefrequenties verschilden niet op significante wijze van deze voorspeld door de Hardy-Weinberg formule (chi-kwadraat test).

Wat de controle populaties betreft was leeftijd een predictieve parameter in alle studies gegroepeerd voor genetische polymorfismen van alle DNA repair genen, *GSTM1*, *GSTT1* en *CYP2E1*. Geslacht beïnvloedde MN frequenties in de *GSTM1*, *GSTT1* en *CYP2E1* studiegroepen; vrouwen hadden hogere MN frequenties dan mannen. Rookgedrag beïnvloedde MN frequenties op significante wijze in de *GSTM1*, *GSTT1* en *EPHX1* studiegroepen. Rokers hadden lagere MN frequenties dan niet-rokers. In de *EPHX1*¹³⁹ studiegroep hadden ex-rokers hogere MN frequenties dan niet-rokers. We namen waar dat individu's met het heterozygote *Tyr/His EPHX1*¹¹³ genotype 24% hogere MN frequenties hebben dan *wild type Tyr/Tyr EPHX1*¹¹³ individu's (F.R. = 1.240, C.I. 1.044-1.473, p = .014). Individu's met het homozygote variant *Arg/Arg EPHX1*¹³⁹ genotype hebben 90% hogere MN frequenties dan deze met het *wild type His/His EPHX1*¹³⁹ genotype (F.R. = 1.904, C.I. 1.328-2.730, p < .001).

In de blootgestelde populaties was leeftijd een predictieve parameter in alle studiegroepen voor genen betrokken in metabolische activatie/desactivatie. Geslacht beïnvloedde de MN frequenties in de *GSTT1*, *GSTP1*, *EPHX1* en *CYP2E1* studiegroepen, en weeral hadden vrouwen hogere MN frequenties dan mannen. Rookgedrag beïnvloedde MN frequenties in de DNA repair genen, *EPHX1* en *CYP2E1* studiegroepen. In elk geval hadden rokers hogere MN frequenties dan niet-rokers. Significantie van genetische polymorfismen werd gevonden in de *XRCCI*³⁹⁹ en *GSTM1* studiegroepen. Individu's met het *Arg/Gln* genotype voor *XRCCI*³⁹⁹ hebben 26% hogere MN frequenties dan *wild type Arg/Arg* individu's (F.R. = 1.260, C.I. 1.033-1.536, p = .023), terwijl *GSTM1 null* individu's 9.4 % lagere MN frequenties hebben dan *wild type* individu's (F.R. = 0.904, C.I. 0.852-0.960, p = .001).

Analyse van de totale populaties toonde aan dat blootstelling een predictieve parameter is voor de inductie van MN (significant in alle studiegroepen) en dat leeftijd een belangrijke rol speelt in de inductie van MN (significant in alle studiegroepen behalve *EPHX1* en *GSTP1*). Rookgedrag beïnvloedde ook MN frequenties in de *GSTP1* en *EPHX1* studiegroepen. In de *GSTM1* en *GSTT1* studiegroepen hadden blootgestelde rokers hogere MN frequenties dan controle niet-rokers. In de *EPHX1* studiegroepen hadden ex-rokers hogere MN frequenties dan niet-rokers. Wat genetische polymorfismen betreft, bleken drie genotypes een risicofactor voor hoge MN frequenties: het *XRCCI*³⁹⁹ *Arg/Gln* genotype, het *GSTM1 null* genotype en het homozygoot variant *EPHX1*¹³⁹ *Arg/Arg* genotype. *XRCCI*³⁹⁹ *Arg/Gln* heterozygoten hadden 15.6% hogere MN frequenties dan *wild type Arg/Arg* individu's (F.R. = 1.156 (C.I. 1.003-1.332), p=.045), en *EPHX1*¹³⁹ *Arg/Arg* variant homozygoten hadden 58.4% hogere MN frequenties dan *His/His wild type* homozygoten (F.R. = 1.584 (C.I. 1.148-2.186), p=.005). Individu's met het *GSTM1 null* genotype anderzijds, hadden 6% lagere MN frequenties dan *GSTM1 wild type* individu's (F.R. = 0.940 (C.I. 0.898-0.984), p=.011).

DISCUSSIE

Het doel van onze pooled analysis was het bestuderen van de predictiviteit van genetische polymorfismen in genen betrokken in DNA repair en metabolische activatie/desactivatie op MN frequenties in menselijke perifeer bloed lymfocyten gemeten met de CBMN assay. De verzamelde data werden gecombineerd in studiegroepen per genetisch polymorfisme. We toonden aan dat de polymorfismen voor *EPHX1*¹¹³, *EPHX1*¹³⁹, *GSTM1* en *XRCCI*³⁹⁹ een significante invloed hebben op MN frequenties in binucleaire lymfocyten.

De pooled analysis wees erop dat blootstelling MN frequenties beïnvloedde in alle bestudeerde studiegroepen, waarbij blootgestelde individu's significant hogere MN frequenties hadden dan controles. In de individuele studies namen de auteurs slechts in vijf studies een significante toename (Aka *et al.*, 2004; Godderis *et al.*, 2004, Laffon *et al.*, 2002; Mateuca *et al.*, 2004; Pitarque *et al.*, 2002). Over het algemeen suggereert dit dat de geselecteerde blootgestelde populaties blootgesteld werden aan relatief hoge niveaus aan mutagenen, en de interactie van genotypes/fenotypes met blootstelling moeten daarom vanuit dit perspectief beschouwd worden.

In controles werden MN frequenties beïnvloed door genetische polymorfismen voor epoxide hydrolase (EPHX1). EPHX1 katalyseert het toevoegen van een watermolecule aan een epoxide, met vorming van een dihydrodiol als gevolg (Pavanello en Clonfero, 2000). Deze reactie produceert metaboliëten die minder reactief en meer wateroplosbaar zijn, en makkelijk geconjugeerd en geëxcreteerd worden (Seidegard end Ekström, 1997). Alhoewel EPHX1 beschouwd wordt als een detoxifiërend enzym, kunnen de dihydrodiols afgeleid van

polyaromatische koolwaterstoffen (PAK's) verder getransformeerd worden door specifieke P450 cytochromen tot nog reactievere dihydrodiol epoxides, die de meest mutagene en carcinogene PAK's metaboliëten zijn. Een *Tyr* tot *His* polymorfisme in codon 113 van exon 3 reduceert de enzymatische activiteit van EPHX1, terwijl een *His* tot *Arg* polymorfisme in codon 139 van exon 4 geassocieerd is met een verhoogde activiteit (Pavanello en Clonfero, 2000).

Ondanks het feit dat beide polymorfismen geassocieerd zijn met een verschillende EPHX1 activiteit, vonden we in de pooled analysis dat de aanwezigheid van elk variant allel (*His* op codon 113 op *Arg* op codon 139) geassocieerd zijn met verhoogde MN frequenties (tabel 3). Een mogelijke verklaring voor deze tegenstrijdige resultaten zou kunnen zijn dat de controles toch blootgesteld werden aan een waaier van promutagene stoffen in hun normale omgeving (bv. Passieve blootstelling aan sigarettenrook, diesel uitlaatgassen) die efficiënter geactiveerd worden in aanwezigheid van mutant EPHX1.

In blootgestelde individu's werden MN frequenties beïnvloed door de *GSTM1* en *XRCC1* genotypes. Glutathion conjugatie is een belangrijke metabolische pathway voor een waaier aan hydrofobische en electrofiële stoffen. Het zijn voornamelijk detoxificatie enzymen, alhoewel metabolische activatieroutes waarin GST-gemedieerde glutathion conjugatie betrokken is beschreven werden voor bepaalde gechlorineerde substraten (Falck *et al.*, 1999). *GSTM1* is geassocieerd met de detoxificatie van verschillende stoffen die bulky adducten veroorzaken, zoals benzo[α]pyreen, styreen 7,8-oxide en styreen, maar vertoont geen hoge affiniteit voor substraten die veroorzaakt worden door radicalen op lipiden of DNA (Salama *et al.*, 2001; Shield and Sanderson, 2001; Bernardini *et al.*, 2002; Ketterer, 1998). In mensen werden polymorfismen aangetoond en gekenmerkt in het klasse mu enzym *GSTM1*, het klasse theta enzym *GSTT1* en het klasse pi enzym *GSTP1*. Door een homozygote deletie (*null* genotype), ontbreekt het *GSTM1* gen in 40 à 50% van de bestudeerde populaties. De afwezigheid van *GSTM1* werd geassocieerd met een verhoogde susceptibiliteit voor longkanker and andere kwaadaardige aandoeningen (Rebbeck, 1997). In onze pooled analysis vonden we dat *GSTM1 null* individu's lagere MN waardes hadden dan *GSTM1 wild type* individu's in de blootgestelde populatie (blootstellingen: styreen, organische solventen, verkeersuitlaat, pesticiden) en de totale populatie (9.4% en 6% respectievelijk), maar niet in de controles. Gelijkaardige resultaten werden bekomen in één van de studies gebruikt in de pooled analysis, die MN bestudeerde in Italiaanse verkeersagenten (Leopardi *et al.*, 2003). Zij vonden een zwakke associatie tussen lagere MN frequenties en het *GSTM1 null* genotype ($p = .02$). De auteurs verwezen naar een werk van Marcon *et al.* (2002), die een grotere efficiëntie waarnamen in de repair van DNA schade geïnduceerd door ioniserende stralen in individu's deficiënt voor *GSTM1*, en suggereerden dat dit te wijten was aan adaptieve repair activiteit. Anderzijds vond een andere studie gebruikt in de pooled analysis hogere MN frequenties in rokende *GSTM1 null* arbeiders blootgesteld aan solventen (Pitarque *et al.*, 2002). Het aantal individu's in de eerder vernoemde studie (192 totaal: 134 blootgesteld en 58 controles) is echter groter dan in de andere (88 totaal: 52 blootgesteld en 36 controles). In een andere studie op arbeiders blootgesteld aan pesticiden vonden Falck *et al.* (1999) dat hoge MN frequenties geassocieerd waren met het *GSTM1 wild type* genotype. De individu's uit deze studie waren dezelfde als deze bestudeerd in de ongepubliceerde data (Lucia Migliore, persoonlijke mededeling) maar de studie door Falck *et al.* (1999) gebruikte de anti-BrdU techniek voor het identificeren van eenmaal gedeelde cellen in plaats van de CBMN assay. Geen andere studies waarvan resultaten in onze analyse werden gebruikt vonden een invloed van het *GSTM1* genotype op MN frequenties.

De repair van DNA schade is kritisch voor het overleven van een cel. Vele polymorfismen in genen betrokken in DNA repair werden waargenomen in individu's met DNA repair

gerelateerde ziektes, evenals in de algemene bevolking (de Boer, 2002). *XRCC1* speelt een belangrijke rol in base excisie repair (BER). De *XRCC1* proteïne complexeert met DNA ligase III en DNA polymerase β om gaps te herstellen die tijdens BER gevormd werden. Shen *et al.* (1998) identificeerden drie coderende polymorfismen in het *XRCC1* gen, in codons 194 (*Arg* tot *Trp*), 280 (*Arg* tot *His*) en 399 (*Arg* tot *Gln*). In de pooled analysis vonden we dat individu's met het *Arg/Gln XRCC1*³⁹⁹ hogere MN frequenties hadden dan *wild type Arg/Arg* individu's, zowel in de totale als de blootgestelde populatie (blootstellingen: styreen, ioniserende stralen, kobalt-bevattende stoffen). Een studie op arbeiders blootgesteld aan styreen (Godderis *et al.*, 2004) vond eveneens dat individu's met het *Gln* allel hogere MN frequenties vertoonden in mononucleairen and binucleairen (Godderis *et al.*, in revision). De andere studies gebruikt in onze analyse detecteerden geen invloed van het *XRCC1*³⁹⁹ genotype op MN frequenties.

Een verklaring voor de invloed van het polymorfisme in codon 399 zou zijn dat zijn locatie in het PARP-bindend domein van het *XRCC1* gen mogelijk het vermogen van de *XRCC1* proteïne om met PARP te binden beïnvloedt. Op deze manier zou het polymorfisme de efficiëntie van BER kunnen veranderen.

Natuurlijk zijn de specifieke genetische polymorfismen die MN frequenties zullen beïnvloeden afhankelijk van het type blootstelling. De genotoxische effecten van stoffen die niet geactiveerd/gedeactiveerd worden via GST-gemedieerde glutathion conjugatie zullen niet beïnvloed worden door het *GSTM1* genotype. Zo ook is het onwaarschijnlijk dat MN frequenties in individu's blootgesteld aan mutagenen die bv. preferentieel dubbelstrengige breuken induceren beïnvloed worden door het *XRCC1*³⁹⁹ genotype, aangezien de bijdrage van *XRCC1* tot de DSBR pathway waarschijnlijk klein is (Caldecott, 2003). Dus is het belangrijk dat men bij het selecteren van genotypes als bijkomende informatie in studies van beroeps-/omgevingsblootstelling rekening houdt met de enzymatische stappen via dewelke het mutagen wordt gemetaboliseerd, en de betrokken DNA repair pathways.

De observaties waargenomen in de blootgestelde populaties werden bevestigd in de totale populaties, waar MN frequenties beïnvloed werden door de *GSTM1*, *XRCC1*³⁹⁹ en *EPHX1*¹³⁹ genotypes. *GSTM1 null* individu's vertoonden lichte verlaagde MN frequenties vergeleken met *GSTM1 wild type* individu's, terwijl *Arg/Arg EPHX1*¹³⁹ en *Arg/Gln XRCC1*³⁹⁹ individu's hogere MN frequenties hadden dat homozygoot wild type individu's voor deze genotypes.

Over het algemeen komen onze resultaten betreffende leeftijd, geslacht en rookgedrag overeen met wat gevonden kan worden in de literatuur. MN frequenties nemen toe met de leeftijd, en vrouwen hebben hogere MN frequenties dan mannen (Fenech *et al.*, 1994; Bonassi *et al.*, 2001). Dit is gedeeltelijk te wijten aan de leeftijdsgebonden micronucleatie van de X en Y chromosomen. Het X chromosoom in het bijzonder heeft de neiging achter te blijven tijdens de vrouwelijke lymfocyt anafase, en wordt efficiënter gemicronucleëerd dan autosomen (Norppa en Falck, 2003).

In de controles hadden huidige rokers lagere MN frequenties dan niet-rokers. Dit stemt overeen met de resultaten van Bonassi *et al.* (2003), die een kleine afname aan MN waarnamen in huidige rokers in vergelijking met niet-rokers in niet-blootgestelde individu's ($n = 2674$, F.R. = 0.92, C.I. 0.88-0.96). Terwijl zij ook een toename aan MN vonden in niet-blootgestelde zware rokers (30 of meer sigaretten per dag), waren wij niet in staat dit aspect te evalueren, aangezien informatie over dagelijkse sigaretconsumptie niet voor elke studie van de pooled analysis beschikbaar was. Bonassi *et al.* (2003) stelden voor dat de lagere MN frequenties geobserveerd in de lichte-middelmatige rokers te wijten zou kunnen zijn aan ofwel adaptieve respons, ofwel het differentieel overleven van beschadigde lymfocyten in cultuur. In de blootgestelde populaties observeerden we echter dat rokers hogere MN

frequenties vertonen dan niet-rokers, wat zou kunnen betekenen dat het genotoxische effect van roken duidelijker wordt wanneer DNA repair systemen in lymfocyten reeds onder druk staan door beroepsblootstelling aan carcinogenen. Ook vonden we in de *EPHX1* studiegroepen hogere MN frequenties in ex-rokers vergeleken met niet-rokers, wat suggereert dat ex-rokers een zelf-propagerende chromosomale instabiliteit zouden kunnen hebben ondergaan, of dat ze een minder optimaal dieet hebben in vergelijking met niet-rokers op gebied van de micronutriënten die nodig zijn voor DNA metabolisatie en repair of anti-oxidantia respons.

Als algemene conclusies kunnen we stellen dat we herbevestigden dat MN een goede biomarker is voor late genetische effecten in beroepsblootstelling aan mutagenen/carcinogenen, en dat we aantoonde dat de genetische polymorfismen in *EPHX1*¹¹³, *EPHX1*¹³⁹, *GSTM1* en *XRCC1*³⁹⁹ duidelijke MN frequenties kunnen beïnvloeden. Deze genetische polymorfismen kunnen dus aangeraden worden als nuttige informatie voor het begrijpen van onverwacht hoge MN frequenties op individueel niveau na blootstelling aan mutagenen waarvan verwacht wordt dat hun effect afhankelijk zou kunnen zijn van deze enzymen.

Tabel 1: Overzicht van de studies gebruikt in de pooled analysis

Author, year	Exposure	n		Genotypes used in pooled analysis	Influence of genotype on MN frequencies	Studied confounding factors				
		C	E			Age	Gender	Smoking	Alcohol	Diet
Aka et al., 2004 (submitted)	ionising radiation (occupational)	31 ?	32 ?	hOGG1 codon 326, XRCC1 codons 194, 280, 399, XRCC3 codon 241	- Higher MNCB/MNMC in XRCC3 ²⁴¹ Thr/Met - Higher MNMC in XRCC1 ²⁸⁰ Arg/His	x	x	x	-	-
Mateuca et al., 2004 (submitted)	cobalt/hard metal (occupational)	Co: 16 ? WC-Co: 11 ?	Co: 25 ? WC-Co: 26 ?	hOGG1 codon 326, XRCC1 codons 194, 280, 399, XRCC3 codon 241		x	x	x	x	-
Godderis et al., 2004	styrene (occupational)	44 ?	44 ?	hOGG1 codon 326, XRCC1 codons 194, 280, 399, XRCC3 codon 241, EPHX1 codons 113, 139, CYP2E1 DraI	- Higher MNCB/MNMC in XRCC1 ³⁹⁹ Gln/ * - Higher MNMC in XRCC3 ²⁴¹ Met/ *	x	x	x	x	-
Ishikawa et al., 2003		42 ?	/	XRCC1 codon 399	No	x	x	x	x	-
Laffon et al., 2002	styrene (occupational)	30 ?	14 ?	GSTM1, GSTT1	No	x	x	x	x	-
Pitarque et al., 2002	organic solvents (occupational)	36 ?	52 ?	GSTM1, GSTT1	Higher MNCB in smoking exposed GSTM1 null subjects	x	x	x	-	-
Leopardi et al., 2003	traffic fumes (occupational)	41 ? 17 ?	100 ? 34 ?	GSTM1, GSTT1	Lower MNCB in GSTM1 null subjects	x	x	x	x	x
Lucero et al., 2000	pesticides (occupational)	50 ?	64 ?	GSTM1, GSTT1	No	x	x	x	x	x
Laffon et al., 2003		15 ? 15 ?	/	GSTM1, GSTT1, GSTP1 codon 105, EPHX1 codons 113, 139	Higher MNCB in EPHX1 low-activity donors	x	x	x	x	-
Teixeira et al., 2004	styrene (occupational)	18 ? 10 ?	18 ? 10 ?	GSTM1, GSTT1, GSTP1 codon 105, EPHX1 codons 113, 139, CYP2E1 DraI	No	x	x	x	-	-
Migliore, personal communication	pesticides (occupational)	17 ? 16 ?	17 ? 16 ?	GSTM1, GSTT1	/	x	x	x	-	-

Tabel 2: Aantal (en percentage van het totaal) individu's per genotype in de pooled analysis

XRCC1												
codon 194				codon 280				Codon 399				
	Arg/Arg	Arg/Trp	Trp/Trp	Tot.	Arg/Arg	Arg/His	His/His	Tot.	Arg/Arg	Arg/Gln	Gln/Gln	Tot.
C	86 (38.9%)	15 (6.8%)	0	101 (45.7%)	95 (43.0%)	5 (2.3%)	0	100 (45.2%)	54 (20.6%)	64 (24.4%)	25 (9.5%)	143 (54.6%)
E	103 (46.6%)	17 (7.7%)	0	120 (54.3%)	112 (50.7%)	8 (3.6%)	1 (0.5%)	121 (54.8%)	44 (16.8%)	49 (18.7%)	26 (9.9%)	119 (45.4%)
Tot.	189 (85.5%)	32 (14.5%)	0	221 (100%)	207 (93.7%)	13 (5.9%)	1 (0.5%)	221 (100%)	98 (37.4%)	113 (43.1%)	51 (19.5%)	262 (100%)

XRCC3 codon 241				hOGG1 codon 326				
	Thr/Thr	Thr/Met	Met/Met	Tot.	Ser/Ser	Ser/Cys	Cys/Cys	Tot.
C	38 (17.3%)	50 (22.7%)	12 (5.5%)	100 (45.5%)	64 (29.0%)	34 (15.4%)	2 (0.9%)	100 (45.2%)
E	53 (24.1%)	102 (46.4%)	15 (6.8%)	120 (54.5%)	70 (31.7%)	48 (21.7%)	3 (1.4%)	121 (54.8%)
Tot.	91 (41.4%)	102 (46.4%)	27 (12.3%)	220 (100%)	134 (60.6%)	82 (37.1%)	5 (2.3%)	221 (100%)

GSTM1			GSTT1			
	WT	null	Tot.	WT	Null	Tot.
C	144 (21.8%)	161 (24.3%)	305 (46.1%)	242 (36.7%)	63 (9.5%)	305 (46.2%)
E	164 (24.8%)	193 (29.2%)	357 (53.9%)	294 (44.5%)	61 (9.2%)	355 (53.8%)
Tot.	308 (46.5%)	354 (53.5%)	662 (100%)	536 (81.2%)	124 (18.8%)	660 (100%)

GSTP1 codon 105				CYP2E1 DraI				
	Ile/Ile	Ile/Val	Val/Val	Tot.	D/D	CD	C/C	Tot.
C	22 (25.6%)	34 (39.5%)	2 (2.3%)	58 (67.8%)	55 (38.5%)	16 (11.2%)	0	71 (49.7%)
E	17 (19.8%)	9 (10.5%)	2 (2.3%)	28 (32.6%)	54 (37.8%)	17 (11.9%)	1 (0.7%)	72 (50.3%)
Tot.	39 (45.3%)	43 (50.0%)	4 (4.7%)	86 (100%)	109 (76.2%)	33 (23.1%)	1 (0.7%)	143 (100%)

EPHX1								
codon 113				codon 139				
	Tyr/Tyr	Tyr/His	His/His	Tot.	His/His	His/Arg	Arg/Arg	Tot.
C	49 (28.3%)	45 (26.0%)	7 (4.0%)	101 (58.4%)	63 (36.4%)	35 (20.2%)	3 (1.7%)	101 (58.4%)
E	44 (25.4%)	21 (12.1%)	7 (4.0%)	72 (41.6%)	53 (30.6%)	17 (9.8%)	2 (1.2%)	72 (41.6%)
Tot.	93 (53.8%)	66 (38.2%)	14 (8.1%)	173 (100%)	116 (67.1%)	52 (30.1%)	5 (2.9%)	173 (100%)

Tabel 3: Statistisch significante predictieve parameters geïdentificeerd door de Poisson regressie analyse van de studiegroepen voor DNA repair genen

Study group	Control population			Exposed population			Total population		
	parameter	F.R. (C.I.)	p	parameter	F.R. (C.I.)	p	parameter	F.R. (C.I.)	p
hOGG1 codon 326	<i>n subjects</i>	100			121			221	
	1. age	1.026 (1.012-1.040)	<.001	1. smoking status ^a smoker	1.367 (1.141-1.638)	<.001	1. age 2. exposure status	1.013 (1.005-1.020) 1.230 (1.068-1.417)	<.001 .004
XRCC1 codon 194	<i>n subjects</i>	101			120			221	
	1. age	1.025 (1.012-1.039)	<.001	1. smoking status ^a smoker	1.334 (1.116-1.596)	.002	1. age 2. exposure status	1.013 (1.006-1.020) 1.223 (1.063-1.408)	<.001 .004
XRCC1 codon 280	<i>n subjects</i>	100			121			221	
	1. age	1.025 (1.012-1.039)	<.001	1. smoking status ^a smoker	1.342 (1.124-1.602)	.001	1. age 2. exposure status	1.013 (1.006-1.020) 1.230 (1.068-1.417)	<.001 .004
XRCC1 codon 399	<i>n subjects</i>	143			119			262	
	1. age	1.028 (1.018-1.037)	<.001	1. smoking status ^a smoker 2. genotype ^b Arg/Gln	1.373 (1.148-1.643) 1.260 (1.033-1.536)	<.001 .023	1. age 2. exposure status 3. genotype ^b Arg/Gln	1.017 (1.010-1.023) 1.250 (1.087-1.437) 1.156 (1.003-1.332)	<.001 .002 .045
XRCC3 codon 241	<i>n subjects</i>	100			120			220	
	1. age	1.025 (1.011-1.040)	<.001	1. smoking status ^a smoker	1.356 (1.121-1.639)	<.001	1. age 2. exposure status	1.013 (1.006-1.020) 1.232 (1.069-1.419)	<.001 .004

F.R.: frequency ratio, C.I.: 95% betrouwbaarheidsinterval van F.R., a: Referentie categorie: non-smokers, b: Referentie genotype: Arg/Arg

Tabel 4: Statistisch significante predictieve parameters geïdentificeerd door de Poisson regressie analyse van de studiegroepen voor genen betrokken in metabolische activatie/desactivatie

Study group	Control population			Exposed population			Total population		
	parameter	F.R. (C.I.)	p	parameter	F.R. (C.I.)	p	parameter	F.R. (C.I.)	p
GSTM1	<i>n subjects</i>	305			357			662	
	1. age	1.013 (1.009-1.017)	<.001	1. age	1.015 (1.011-1.018)	<.001	1. age	1.014 (1.012-1.017)	<.001
	2. smoking status ^a smoker	0.812 (0.900-1.050)	<.001	2. genotype ^c null	0.904 (0.852-0.960)	.001	2. exposure-smoking interaction ^d exposed smokers	1.278 (1.159-1.410)	<.001
	3. gender ^b female	1.221 (1.096-1.361)	<.001				3. gender ^b female	1.357 (1.277-1.470)	<.001
							4. genotype ^c null	0.940 (0.898-0.984)	.011
GSTT1	<i>n subjects</i>	305			355			660	
	1. age	1.013 (1.009-1.017)	<.001	1. age	1.014 (1.011-1.018)	<.001	1. age	1.014 (1.011-1.017)	<.001
	2. smoking status ^a smoker	0.816 (0.755-0.881)	<.001	2. gender ^b female	1.499 (1.357-1.656)	<.001	2. exposure-smoking interaction ^d exposed smokers	1.283 (1.163-1.416)	<.001
	3. gender ^b female	1.218 (1.094-1.357)	<.001				3. gender ^b female	1.373 (1.275-1.478)	<.001
GSTP1 codon 105	<i>n subjects</i>	58			28			86	
	/	(the algorithm for this model failed to converge)		1. age	1.019 (1.002-1.036)	.028	1. smoking status ^a smoker	0.655 (0.530-0.811)	<.001
				2. gender ^b female	2.427 (1.559-3.702)	<.001	2. gender ^b female	1.303 (1.077-1.576)	.006
EPHX1 codon 113	<i>n subjects</i>	101			72			173	
	1. smoking status ^a smoker	0.758 (0.614-0.935)	.010	1. age	1.016 (1.005-1.026)	.004	1. exposure status	1.436 (1.190-1.733)	<.001
	2. genotype ^c Tyr/His	1.240 (1.044-1.473)	.014	2. smoking status ^a smoker	1.395 (1.071-1.815)	.013	2. smoking status ^a ex-smoker	1.358 (1.012-1.822)	.041
				3. gender ^b female	1.812 (1.325-2.479)	<.001			
EPHX1 codon 139	<i>n subjects</i>	101			72			173	
	1. smoking status ^a ex-smoker	1.417 (1.035-1.939)	.030	1. age	1.016 (1.006-1.027)	.003	1. exposure status	1.397 (1.158-1.685)	<.001
	smoker	0.774 (0.631-0.950)	.014	2. smoking status ^a smoker	1.379 (1.064-1.787)	.015	2. smoking status ^a ex-smoker	1.430 (1.059-1.931)	.020
	2. genotype ^f Arg/Arg	1.904 (1.328-2.730)	<.001	3. gender ^b female	1.827 (1.364-2.446)	<.001	3. genotype ^f Arg/Arg	1.584 (1.148-2.186)	.005
CYP2E1 DraI	<i>n subjects</i>	71			72			143	
	1. age	1.020 (1.005-1.035)	.008	1. age	1.017 (1.006-1.028)	.003	1. age	1.014 (1.005-1.023)	.002
	2. gender ^b female	1.663 (1.146-2.298)	.006	2. smoking status ^a smoker	1.411 (1.088-1.830)	.009	2. exposure status	1.432 (1.186-1.730)	<.001
				3. gender ^b female	1.824 (1.341-2.483)	<.001	3. gender ^b female	2.015 (1.540-2.636)	<.001

F.R.: frequency ratio, C.I.: 95% betrouwbaarheidsinterval van F.R., a: Referentie categorie: non-smokers, b: Referentie categorie: males, c: Referentie genotype: wild type, d: Referentie

categorie: non-smoking controls, e: Referentie genotype: Tyr/Tyr, f: Referentie genotype: His/His

REFERENTIES

Bernardini, S., Hirvonen, A., Jarventaus, H., Norppa, H. (2002) Influence of GSTM1 and GSTT1 genotypes on sister chromatid exchange induction by styrene in cultured human lymphocytes. *Carcinogenesis*, 23(5):893-897.

Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y.P., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L.R., Fucic, A., Lima, O.G., Hrelia, P., Krishnaja, A.P., Lee, T.K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Muller, W.U., Odagiri, Y., Scarffi, M.R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A., Zijno, A. (2001) HUMAN MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ. Mol. Mutagen.*, 37(1):31-45.

Bonassi, S., Neri, M., Lando, C., Ceppi, M., Lin, Y.P., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Fenech, M.; HUMN collaborative group. (2003) Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. *Mutat. Res.*, 543(2):155-166.

Caldecott, K.W. (2003) XRCC1 and DNA Strand Break Repair. *DNA Repair*, 2(9):955-969.

de Boer, J.G. (2002) Polymorphisms in DNA repair and environmental interactions. *Mutat. Res.*, 509(1-2), 201-210.

Falck, G.C., Hirvonen, A., Scarpato, R., Saarikoski, S.T., Migliore, L., Norppa, H. (1999) Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism for GSTM1, GSTT1 and NAT2 in pesticide-exposed greenhouse workers. *Mutat. Res.*, 441(2), 225-237.

Fenech, M., Morley, A.A. (1985) Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res.*, 147(1-2), 29-36.

Fenech, M., Neville, S., Rinaldi, J. (1994) Sex is an important variable affecting spontaneous micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes. *Mutat. Res.*, 313(2-3):203-207.

Fenech, M. (1998) Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes - a biomarker for DNA damage in human populations. *Mutat. Res.*, 404(1-2):155-165.

Fenech, M., Holland, N., Chang, W.P., Zeiger, E., Bonassi, S. (1999) The HUMAN MicroNucleus Project--An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat. Res.*, 428(1-2):271-283.

Fenech, M., Bonassi, S., Turner, J., Lando, C., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Cao, J., De Luca, G., Di Giorgio, M., Ferguson, L.R., Fucic, A., Lima, O.G., Hadjidekova, V.V., Hrelia, P., Jaworska, A., Joksic, G., Krishnaja, A.P., Lee, T.K., Martelli, A., McKay, M.J., Migliore, L., Mirkova, E., Muller, W.U., Odagiri, Y., Orsiere, T., Scarfi, M.R., Silva, M.J., Sofuni, T., Surrallés J., Trentas G., Vorobtsova I., Vral A., Zijno A., Surrallés J.; HUMAN MicroNucleus project. (2003a) Intra- and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes. Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project. *Mutat. Res.*, 534(1-2):45-64.

Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E.; HUMAN MicroNucleus project. (2003b) HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.*, 534(1-2):65-75.

Godderis, L., De Boeck, M., Haufrond, V., Emmery, M., Mateuca, R., Gardinal S., Kirsch-Volders, M., Veulemans, H., Lison, D. (2004) Influence of genetic polymorphisms on biomarkers of exposure and genotoxic effects in styrene-exposed workers. To be published in *Environmental and Molecular Mutagenesis*.

Hagmar, L., Brogger, A., Hansteen, I.L., Heim, S., Hogstedt, B., Knudsen, L., Lambert, B., Linnainmaa, K., Mitelman, F., Nordenson, I., et al. (1994) Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. *Cancer. Res.*, 54(11):2919-2922.

- Ishikawa, H., Yamamoto, H., Tian, Y., Kawano, M., Yamauchi, T., Yokoyama, K. (2003) Effects of ALDH2 gene polymorphisms and alcohol-drinking behavior on micronuclei frequency in non-smokers. *Mutat. Res.*, 541(1-2), 71-80.
- Ketterer, B. (1998) Glutathione S-transferases and prevention of cellular free radical damage. *Free Radic. Res.*, 28(6):647-58.
- Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E., Van Hummelen, P. (1997) The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutat. Res.*, 392(1-2):19-30.
- Kirsch-Volders, M., Fenech, M. (2001) Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. *Mutagenesis*, 16(1):51-58.
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr., Lorge, E., Norppa, H., Surralles, J., von der Hude, W., Wakata, A. (2000) Report from the In Vitro Micronucleus Assay Working Group. *Environ. Mol. Mutagen.*, 35(3):167-172.
- Laffon, B., Pasaro, E., Mendez, J. (2002) Evaluation of genotoxic effects in a group of workers exposed to low levels of styrene. *Toxicology*, 171(2-3):175-186.
- Laffon, B., Perez-Cadahia, B., Pasaro, E., Mendez, J. (2003) Effect of epoxide hydrolase and glutathione S-transferase genotypes on the induction of micronuclei and DNA damage by styrene-7,8-oxide in vitro. *Mutat. Res.*, 536(1-2): 49-59.
- Lee, T.K., Allison, R.R., O'Brien, K.F., Johnke, R.M., Christie, K.I., Naves, J.L., Kovacs, C.J., Arastu, H., Karlsson, U.L. (2003) Lymphocyte radiosensitivity correlated with pelvic radiotherapy morbidity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 57(1): 222-229.
- Leopardi, P., Zijno, A., Marcon, F., Conti, L., Carere, A., Verdina, A., Galati, R., Tomei, F., Baccolo, T.P., Crebelli, R. (2003) Analysis of micronuclei in peripheral blood lymphocytes of traffic wardens: effects of exposure, metabolic genotypes, and inhibition of excision repair in vitro by ARA-C. *Environ. Mol. Mutagen.*, 41(2), 126-130.
- Lucero, L., Pastor, S., Suarez, S., Durban, R., Gomez, C., Parron, T., Creus, A., Marcos, R. (2000) Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. *Mutat. Res.*, 464(2):255-262.
- Marcon, F., Andreoli, C., Rossi, S., Crebelli R. (2002) Modulator effect of smoking habits and GSTM1 null genotype on DNA sensitivity to gamma radiation in a healthy population. 32th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society, Warsaw (Poland), September 3-7
- Norppa, H., Falck, G.C. (2003) What do human micronuclei contain? *Mutagenesis*, 18(3):221-233.
- Pavanello, S., Clonfero, E. (2000) Biological indicators of genotoxic risk and metabolic polymorphisms. *Mutat. Res.*, 463(3), 285-308.
- Pitarque, M., Vaglenov, A., Nosko, M., Pavlova, S., Petkova, V., Hirvonen, A., Creus, A., Norppa, H., Marcos, R. (2002) Sister chromatid exchanges and micronuclei in peripheral lymphocytes of shoe factory workers exposed to solvents. *Environ. Health Perspect.*, 110(4):399-404.
- Rajagopalan, H., Jallepalli, P.V., Rago, C., Velculescu, V.E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Lengauer, C. (2004) Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability. *Nature*428(6978):77-81
- Rebbeck, T.R. (1997) Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 6(9), 733-743.

Salama, S.A., Sierra-Torres, C.H., Oh, H.Y., Hamada, F.A., Au, W.W. (2001) Variant metabolizing gene alleles determine the genotoxicity of benzo[a]pyrene. *Environ. Mol. Mutagen.*, 37(1):17-26.

Scott, D., Barber, J.B., Levine, E.L., Burrill, W., Roberts, S.A. (1998) Radiation-induced micronucleus induction in lymphocytes identifies a high frequency of radiosensitive cases among breast cancer patients: a test for predisposition? *Br. J. Cancer*, 77(4):614-620.

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

Shen, M.R., Jones, I.M., Mohrenweiser, H. (1998) Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res.*, 58(4), 604-608.

Shield, A.J., Sanderson, B.J. (2001) Role of glutathione S-transferase mu (GSTM1) in styrene-7,8-oxide toxicity and mutagenicity. *Environ. Mol. Mutagen.*, 37(4):285-289.

Surralles, J., Natarajan, A.T. (1997) Human lymphocytes micronucleus assay in Europe. An international survey. *Mutat. Res.*, 392(1-2):165-174.

Teixeira, J.P., Gaspar, J., Silva, S., Torres, J., Silva, S.N., Azevedo, M.C., Neves, P., Laffon, B., Mendez, J., Goncalves, C., Mayan, O., Farmer, P.B., Rueff J. (2004) Occupational exposure to styrene: modulation of cytogenetic damage and levels of urinary metabolites of styrene by polymorphisms in genes CYP2E1, EPHX1, GSTM1, GSTT1 and GSTP1. *Toxicology*, 195(2-3), 231-242.