

Untersuchung von Markern für oxidativen Streß nach Ozonexposition

vom Fachbereich Chemie
der Universität Kaiserslautern
zur Erlangung des akademischen Grades
"DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN"
genehmigte Dissertation
(D386)

vorgelegt von
Diplom-Chemiker
Frank Reetz

Betreuer: **Prof. Dr. G. Eisenbrand**

Kaiserslautern 2003

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 31. Juli 2003

Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. R. Wortmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Eisenbrand

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Bartsch

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von März 1997 bis Juni 2000 in der Abteilung Toxikologie und Krebsrisikofaktoren des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) in Heidelberg. Sie wurde teilweise unterstützt durch das „Projekt Umwelt und Gesundheit“ (PUG L 96003).

Herrn Prof. Dr. H. Bartsch danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, sowie für seine wohlwollende Unterstützung und Diskussionsbereitschaft während meiner Promotionszeit.

Herrn Prof. Dr. G. Eisenbrand danke ich für die Übernahme der Betreuung der Arbeit auf universitärer Seite, sowie für seine Diskussionsbereitschaft und seinen wohlwollenden Rat.

Herrn Prof. Dr. R. Wortmann danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGEN	V
1 EINLEITUNG	1
2 GRUNDLAGEN	3
2.1 OZONPROBLEMATIK	3
2.1.1 ÖKOLOGISCHE BEDEUTUNG VON OZON	3
2.1.2 BILDUNG VON TROPOSPHÄRISCHEM OZON	4
2.1.3 EIGENSCHAFTEN VON OZON	8
2.1.4 MESSUNG VON OZON	8
2.1.5 TOXIKOLOGISCHE WIRKUNGEN VON OZON	10
2.1.6 MAßNAHMEN ZUR REDUKTION DES SOMMERSMOG	15
2.2 OXIDATIVER STREß	16
2.2.1 REAKTIVE SAUERSTOFFSPEZIES (ROS)	16
2.2.2 REAKTIVE STICKSTOFFSPEZIES (RNS)	17
2.2.3 ANTIOXIDATIVE ABWEHR	18
2.2.4 DEFINITION UND AUSWIRKUNG VON OXIDATIVEM STREß	19
2.3 MARKER FÜR OXIDATIVEN STREß	21
2.3.1 OXIDATIVE SCHÄDIGUNG VON DNA	21
2.3.2 METHODEN ZU BESTIMMUNG VON 8-OXODG IN DNA	25
2.3.3 METHODEN ZU BESTIMMUNG VON 8-OXODG IN URIN	36
2.3.4 LIPIDPEROXIDATION	37
2.3.5 OXIDATIVE SCHÄDIGUNG VON PROTEINEN	41
3 PROBLEMSTELLUNG	42
4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	44
4.1 PLASMID-RELAXATIONS-ASSAY	44
4.2 EINZELZELLGELELEKTROPHORESE (COMET-ASSAY)	47
4.3 ANALYSE VON 8-OXODG IN URIN	51

Inhaltsverzeichnis	II
4.4 ANALYSE VON 8-OXODG IN DNA	61
4.5 METHODENVERGLEICHE UND RINGVERSUCH ZUR ANALYSE VON 8-OXODG IN DNA	65
4.5.1 ESCODD	65
4.6 METHODENVERGLEICHE UND RINGVERSUCH ZUR ANALYSE VON 8-OXODG IN URIN	68
4.6.1 VERGLEICHSMESSUNGEN VON 8-OXODG IN URIN MITTELS LC-MS-MS	69
4.6.2 RINGVERSUCH ZUR MESSUNG VON 8-OXODG IN URIN	71
4.7 ANALYSE VON MALONDIALDEHYD IN PLASMA	82
4.8 IMMUNHISTOCHEMIE FÜR NITROTYROSIN	86
4.9 OZONEXPOSITION VON VERSUCHSTIEREN	88
4.10 PATHOLOGISCHE UND HISTOPATHOLOGISCHE BEFUNDE	91
4.11 BESTIMMUNG VON MARKERN FÜR OXIDATIVEN STREß NACH OZONEXPOSITION	94
4.11.1 8-OXODG IN URIN	94
4.11.2 8-OXODG IN DNA	98
4.11.3 MALONDIALDEHYD (MDA) IN BLUTPLASMA	103
4.11.4 ANALYSE VON NITROTYROSIN IN LUNGENGeweBE	108
4.11.5 BEWERTUNG DER ERGEBNISSE BEZÜGLICH OZONEXPOSITION	113
5 ZUSAMMENFASSUNG	117
6 MATERIAL UND METHODEN	119
6.1 VERWENDETE GERÄTE	119
6.2 VERWENDETE CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIALIEN	120
6.3 PLASMID-RELAXATIONS-ASSAY	122
6.3.1 EXPOSITION VON PLASMIDEN	122
6.3.2 REAGENZIEN UND PUFFER	122
6.3.3 DURCHFÜHRUNG	123
6.4 ZELLKULTUR	124
6.4.1 A-549 ZELLINIE	124
6.4.2 HL-60 ZELLINIE	125
6.4.3 1F7 ZELLINIE	125
6.5 EINZELZELLGELELEKTROPHORESE (COMET-ASSAY)	125
6.5.1 EXPOSITION VON ZELLEN	125
6.5.2 REAGENZIEN UND PUFFER	126
6.5.3 DURCHFÜHRUNG	127
6.6 PROTEINBESTIMMUNG MITTELS BCA-ASSAY	127
6.6.1 REAGENZIEN UND PUFFER	127

6.6.2	DURCHFÜHRUNG	127
6.7	ISOLIERUNG VON MAB 15A3 AUS ASCITES MITTELS AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE AN PROTEIN A	128
6.7.1	REAGENZIEN UND PUFFER	128
6.7.2	DURCHFÜHRUNG	128
6.8	ISOLIERUNG VON MAB 1F7 AUS ZELLKULTURÜBERSTAND MITTELS THIOPHILER ADSORPTION	129
6.8.1	REAGENZIEN UND PUFFER	129
6.8.2	DURCHFÜHRUNG	129
6.9	ISOLIERUNG VON MAB 1F7 AUS ZELLKULTURÜBERSTAND MITTELS AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE AN REKOMBINANTEM PROTEIN A (RPROTA)	130
6.9.1	REAGENZIEN UND PUFFER	130
6.9.2	DURCHFÜHRUNG	130
6.10	IMMOBILISIERUNG MONOKLONALER ANTIKÖRPER AN „HYDRA“	131
6.10.1	REAGENZIEN UND PUFFER	131
6.10.2	DURCHFÜHRUNG	131
6.11	IMMOBILISIERUNG MONOKLONALER ANTIKÖRPER AN CNBR-SEPHAROSE	132
6.11.1	REAGENZIEN UND PUFFER	132
6.11.2	DURCHFÜHRUNG	132
6.12	ANALYSE VON 8-OXODG IN URIN	133
6.12.1	REAGENZIEN UND PUFFER	133
6.12.2	DURCHFÜHRUNG	133
6.13	BESTIMMUNG VON KREATININ IN URIN	134
6.13.1	REAGENZIEN UND PUFFER	134
6.13.2	DURCHFÜHRUNG	134
6.14	ANALYSE VON 8-OXODG IN DNA AUS VOLLBLUT	135
6.14.1	REAGENZIEN UND PUFFER	135
6.14.2	DURCHFÜHRUNG	136
6.15	ANALYSE VON 8-OXODG IN DNA AUS LUNGENGeweBE	137
6.15.1	REAGENZIEN UND PUFFER	137
6.15.2	DURCHFÜHRUNG	137
6.16	RINGVERSUCH ANALYSE VON 8-OXODG STANDARDS (ESCODD)	138
6.17	RINGVERSUCH ANALYSE 8-OXODG IN URIN	138
6.18	ANALYSE VON MALONDIALDEHYD IN PLASMA	138
6.18.1	REAGENZIEN UND PUFFER	138
6.18.2	DURCHFÜHRUNG	139
6.19	IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON NITROTYROSIN	139

Inhaltsverzeichnis	IV
6.19.1 REAGENZIEN UND PUFFER	139
6.19.2 DURCHFÜHRUNG	139
6.20 OZONEXPOSITION	140
6.20.1 REAGENZIEN UND PUFFER	140
6.20.2 DURCHFÜHRUNG	141
7 LITERATURVERZEICHNIS	143
VERÖFFENTLICHUNGEN AUS DIESER ARBEIT	169
DANK	170
LEBENS LAUF	171

Abkürzungen

8-oxodG	8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosin
8-oxodGMP	8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosinmonophosphat
8-oxodGTP	8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosintri-phosphat
A	Adenin
ACD-A	Acidic Citrate Dextrose A (nach Europäischer Pharmakopöe)
ANOVA	Blockvarianzanalyse
ATP	Adenosintri-phosphat
BCA	Bicinonsäure
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CFC	chlorinated fluorinated carbohydrates
dA	2'-Desoxyadenosin
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
dAMP	2'-Desoxyadenosinmonophosphat
dC	2'-Desoxycytidin
dCMP	2'-Desoxycytidinmonophosphat
DFAM	Desferroxaminmesylat
dG	2'-Desoxyguanosin
dGMP	2'-Desoxyguanosinmonophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dT	2'-Desoxythymidin
dTMP	2'-Desoxythymidinmonophosphat
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent Assay
endoIII	Endonuklease III
endoIV	Endonuklease IV
ESCODD	European Standards Committee on Oxidative DNA Damage
exoIII	Exonuklease III
FCKW	Fluor-Chlor-Kohlenwasserstoffe
FEV 1.0	forciertes expiratorisches Volumen

FKS	Fötale Kälberserum
FPG	Formamidopyrimidinglykosylase
FVC	forcierte Vitalkapazität
G	Guanin
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HPLC-ECD	Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit elektrochemischer Detektion
HPLC-FID	Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit Fluoreszenzdetektion
IAC	Immunoaffinitätschromatographie
iNOS	induzierbare NO-Synthase
kDa	Kilodalton
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion
LC-MS-MS	Flüssigkeitschromatographie mit tandemmassenspektrometrischer Detektion
MALDI-TOF-MS	Matrix-assisted Laser-Desorption-Ionisation Time-of-Flight Mass Spectroscopy
MDA	Malondialdehyd
MS	Massenspektrometrie
NNK	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon
NTP	National Toxicology Program
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
pm	Pikometer
ppm	parts per million
RIA	Radioimmunassay
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SDS	Natriumdodecylsulfat
ssb	Einzelstrangbrüche
$S_{y \cdot x}$	Standardfehler der Vorhersage

T	Thymin
T4endoV	T4-Endonuklease V
TBA	Thiobarbitursäure
TBARS	Thiobarbitursäurereaktive Substanzen
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol, Trometamol
VK	Variationskoeffizient
VOC	volatile organic compounds

1 Einleitung

Ozon ist die Hauptkomponente und damit Leitsubstanz eines als Sommersmog bezeichneten Luftschadstoffgemisches. Bereits seit Jahren herrscht eine rege öffentliche Diskussion über die gesundheitlichen Auswirkungen erhöhter Ozonkonzentrationen in der Umwelt. Einen neuen Schub bekam diese Diskussion, als es 1998 basierend auf dem 1995 erlassenen Ozongesetz zur Verhängung großflächiger Fahrverbote für nicht schadstoffarme Fahrzeuge in Rheinland-Pfalz und Baden-Württemberg kam.

Zahlreiche Studien belegen gesundheitliche Beeinträchtigungen durch Ozonbelastung. Die häufig erfaßten physiologischen Parameter wie z. B. Atembeschwerden sind jedoch in der Regel nach einer kurzen Erholungsphase reversibel. Interessanter in diesem Zusammenhang sind jedoch nicht reversible Schäden, die z. B. bei der Initiation von Krebs eine Rolle spielen können. Ozon ist als hochreaktive Verbindung in der Lage, mit verschiedenen Biomolekülen zu reagieren. Auch eine Schädigung der DNA ist prinzipiell denkbar. Studien, die die molekulare Wirkungsweise von Ozon *in vivo* bezüglich einer oxidativen Schädigung von Biomolekülen nachweisen, fehlen bisher weitgehend. Insbesondere gibt es auch keine molekularen Marker, mit denen die bezüglich einer Schädigung effektive Ozondosis im Sinne eines Biomonitorings bestimmt werden kann (Cotgreave 1996).

Troposphärisches Ozon stellt einen potentiell schädlichen Umwelteinfluß auf den Menschen dar, der durch Umweltverschmutzung verursacht ist. Der Anteil der durch Umweltverschmutzung ausgelösten Krebserkrankungen an der Gesamtheit der Erkrankungen wird auf bis zu 5 % geschätzt (Doll u. Peto 1981). Dies ist sicherlich – insbesondere eingedenk der dahinterstehenden absoluten Zahlen – ein signifikanter Anteil. Allerdings handelt es sich um einen Ursachenkomplex, der nur schwierig zu kontrollieren ist verglichen mit Ursachen, die durch das persönliche Verhalten zu beeinflussen sind. Es ist möglich, daß sozio-ökonomische Kosten zur Reduktion von Umweltbelastungen den Benefit bezüglich einer Reduktion von Krebserkrankungen deutlich übersteigen (Doll 1996). Daher ist eine wesentliche Frage der Diskussion um die Ozonproblematik, ob von erhöhten Ozonkonzentrationen ein ausreichendes Gefährdungspotential ausgeht, um weitgehende Maßnahmen mit ausgeprägten wirtschaftlichen Folgen zu rechtfertigen. Zur Beantwortung dieser Frage ist die genaue Kenntnis des Gefährdungspotentials sowie der effektiven Expositionsdosis erforderlich.

Ozon besitzt als reaktive Sauerstoffspezies ein hohes Oxidationspotential. Aus diesem Grund kommt als Mechanismus für eine Krebsentstehung durch Ozon in erster Linie oxidativer Streß in Betracht. Oxidativer Streß ist gekennzeichnet durch ein Ungleichgewicht zwischen

Pro- und Antioxidantien und spielt bei zahlreichen Erkrankungen eine Rolle. In bezug auf die Krebsentstehung ist vor allem die mit oxidativem Streß einhergehende oxidative Schädigung der DNA von Bedeutung, da diese zu Mutationen und damit potentiell zur malignen Transformation von Zellen führt. Ein besonders prominenter Marker für diese Ereignisse ist die Oxidation von Guaninresten in der DNA zu 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosin (8-oxodG). Der verlässliche Nachweis einer solchen oxidativen Basenmodifikation stellt einen Biomarker von höchstem Wert für molekularepidemiologische Studien bezüglich oxidativem Streß, zur Evaluierung der Wirksamkeit von Antioxidantiengabe gegen oxidativen Streß und vor allen Dingen zur Abschätzung von Krebsrisiko und Exposition gegenüber Substanzen, die oxidativen Streß verursachen, dar (Collins *et al.* 1997a). Obwohl teilweise eine kontroverse Diskussion um 8-oxodG als Biomarker für oxidativen Streß herrschte, da sich die Schätzungen über die Häufigkeit seines Auftretens in der Zelle über eine Spanne von fünf Größenordnungen erstrecken, zeigt die exponentielle Entwicklung der Zahl von Publikationen über 8-oxodG das steigende Interesse an diesem Marker und damit – implizit – an oxidativem Streß (s. Abb. 1.1).

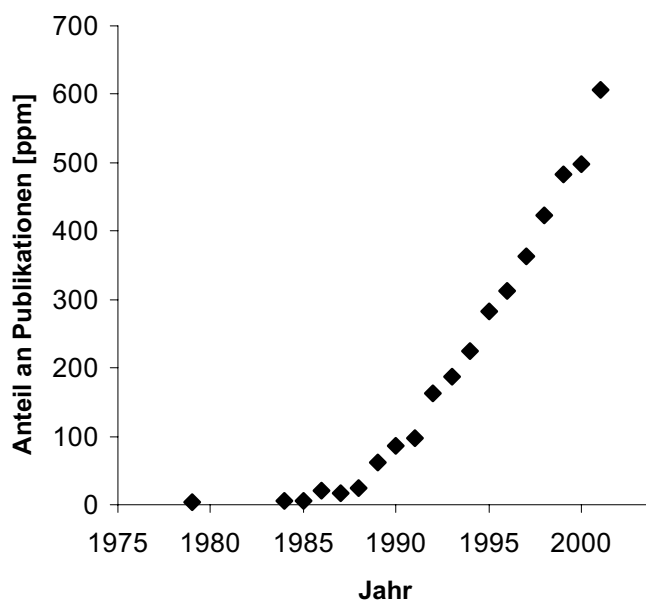


Abb. 1.1

Entwicklung des Anteils von Publikationen über 8-oxodG (und Synonyme) an der Gesamtzahl von Publikationen in Medline

2 Grundlagen

2.1 Ozonproblematik

Ozon ist der mengenmäßig bedeutendste Bestandteil eines allgemein als “Sommersmog”, “Photosmog” oder “Los-Angeles-Smog” bezeichneten Luftschadstoffgemischs und wird daher als Leitsubstanz hierfür verwendet. Der Sommersmog, der aus Abgasen von Verkehr und Industrie unter Sonneneinwirkung entsteht, ist seit mehreren Jahrzehnten vor allem aus Ballungsgebieten Kaliforniens und der Dritten Welt bekannt. Auch in einigen deutschen Regionen wurden bereits vor Jahrzehnten hohe Konzentrationen der Leitsubstanz Ozon gemessen. Über die gesundheitlichen Folgen der Ozonbelastung sowie über geeignete Maßnahmen zur Ozonreduktion und deren Notwendigkeit ist inzwischen eine kontroverse Diskussion entbrannt.

2.1.1 Ökologische Bedeutung von Ozon

Ozon ist ein Spurengas, welches sowohl in der Stratosphäre als auch in der Troposphäre vorkommt, wenn auch in unterschiedlicher Konzentration (Holleman u. Wiberg 1976). Mit ca. 90 % befindet sich der größte Anteil in einer Höhe von 20 - 25 Kilometern, wo Ozon den sogenannten “Ozongürtel” bildet. Durch Absorption des größten Teils der von der Sonne emittierten UV-Strahlung schützt er uns vor den schädlichen Einflüssen dieser Strahlung. In den letzten zwei Jahrzehnten wurde ein fortschreitender Rückgang der Ozonkonzentration im Ozongürtel beobachtet. Dieses Phänomen wird als Ausbildung eines “Ozonloches” beschrieben und ist zumindest teilweise auf die Einwirkung von Fluor-Chlor-Kohlenwasserstoffen (FCKW, engl. CFC) zurückzuführen.

Der troposphärische Anteil des vorhandenen Ozons schwankt saisonal und wirkt sich im Gegensatz hierzu unter bestimmten Umständen negativ auf Menschen, Tiere und Pflanzen aus. Insbesondere unter intensiver Sonneneinstrahlung und einem ausreichenden Angebot an anthropogenen Luftschadstoffen können bodennahe Ozonkonzentrationen erreicht werden, die die Gesundheit möglicherweise beeinträchtigen. Die Konzentration von troposphärischem Ozon hat sich in Deutschland in den vergangenen hundert Jahren im Jahresdurchschnitt von 20 – 40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ auf 60 – 80 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ verdoppelt (Kley u. Volz-Thomas 1990). Diese Verschiebung in Abhängigkeit von der Höhe ist auch in Abb. 2.1 dargestellt. Während die Ozonkonzentration in der Stratosphäre abgenommen hat („Ozonloch“), hat die bodennahe Konzentration zugenommen.

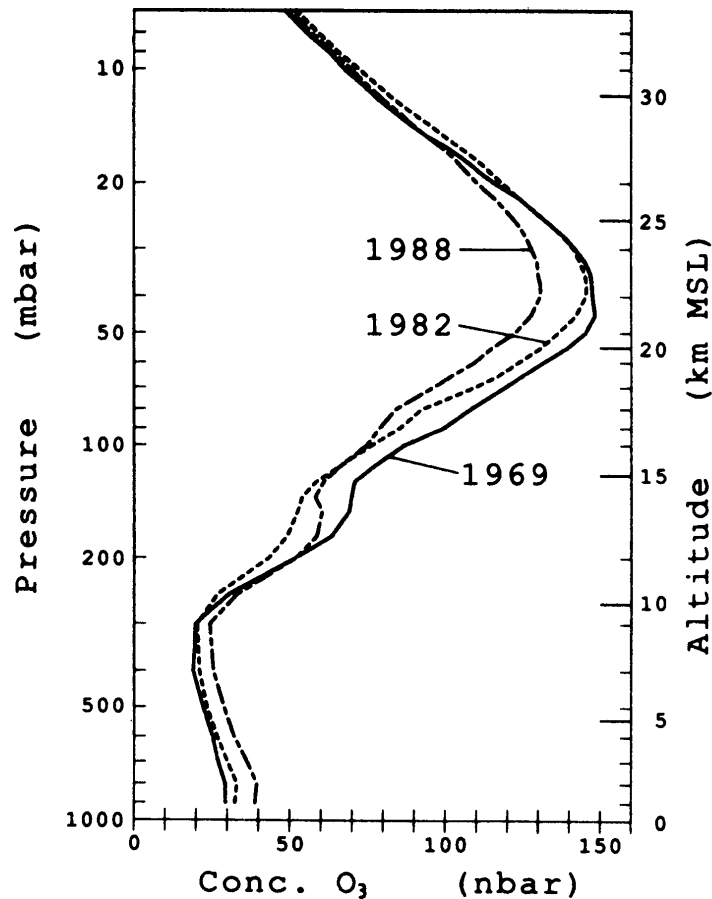
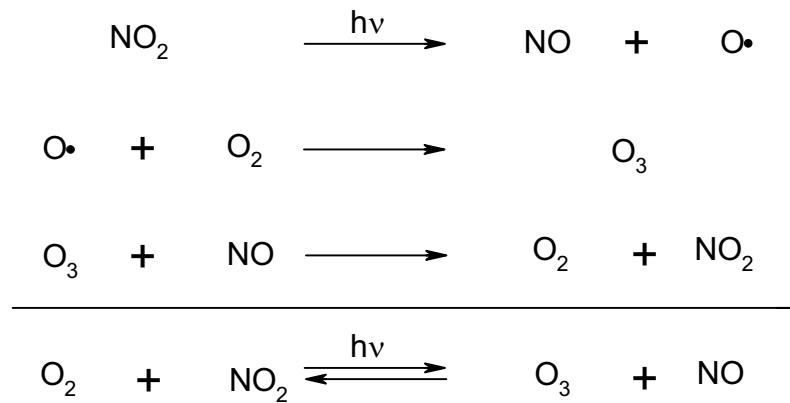


Abb. 2.1

Zeitliche Entwicklung der höhenabhängigen Ozonkonzentration in Payerne, Schweiz, gemessen mittels Wetterballon und Brewer-Mast Sonde (Stahlin u. Schmid 1991)

2.1.2 Bildung von troposphärischem Ozon

Durch im Frühjahr und Herbst auftretende Tropopausenfaltungen kann Ozon aus der Stratosphäre bis zur oberen Lage der bodennahen Mischungsschicht in ein- bis zweitausend Meter Höhe gelangen (Sonnemann 1992). Durch diese "Ozoneinbrüche" kommt es im Hochgebirge zu zeitlich eng begrenzten erhöhten Ozonkonzentrationen. Allerdings sind diese Transportvorgänge nur für einen Bruchteil der saisonal erhöhten Ozonkonzentrationen in Bodennähe verantwortlich. Der Hauptteil des troposphärischen Ozons wird dort durch die Reaktion von Sauerstoff mit Stickoxiden unter Sonneneinstrahlung gebildet. Die Bildung troposphärischen Ozons ist vereinfacht im Formelschema Abb. 2.2 gezeigt.

**Abb. 2.2****Formelschema zur Bildung von Ozon aus Disauerstoff und Stickstoffdioxid unter Einwirkung von UV-Strahlung**

Unter Einwirkung kurzwelliger Sonnenstrahlung (UV-Strahlung < 410 nm) wird vorhandenes Stickstoffdioxid in Stickstoffmonoxid und ein Sauerstoffatom gespalten. Dieses kann sich mit einem Molekül Disauerstoff zu Ozon umsetzen. Hierbei wird ein Teil der freiwerdenden Energie an umliegende Moleküle abgegeben, wie z. B. an den mengenmäßig überwiegend vorhandenen Stickstoff. Da Stickstoffmonoxid jedoch auch wieder Ozon abbauen kann, indem es mit diesem zu Disauerstoff und Stickstoffdioxid reagiert, wird ein Gleichgewicht erreicht, in dem es zu keiner Nettobildung von Ozon kommt. Dieser Zustand, in dem sich Ozonbildung und Ozonzersetzung die Waage halten, wird als "photostationäres Gleichgewicht" bezeichnet (Sonnemann 1992).

Zu einer Überproduktion von Ozon kommt es, wenn dieses Gleichgewicht z. B. durch Veränderung der Konzentration von Reaktionspartnern gestört wird. Dies erfolgt durch die Oxidation von Stickstoffmonoxid zu Stickstoffdioxid durch organische Peroxidradikale, die aus flüchtigen Kohlenwasserstoffen (engl. VOC) in der Luft bei starker Sonneneinstrahlung gebildet werden. Hierbei wird Stickstoffmonoxid aus dem Gleichgewicht verbraucht, ohne daß Ozon dabei zersetzt wird. Das entstehende Stickstoffdioxid kann weiteres Ozon bilden, wodurch es zu einer Ozonüberproduktion kommt. Die Bildung von stratosphärischem Ozon und dessen Überproduktion ist schematisch in Abb. 2.3 dargestellt.

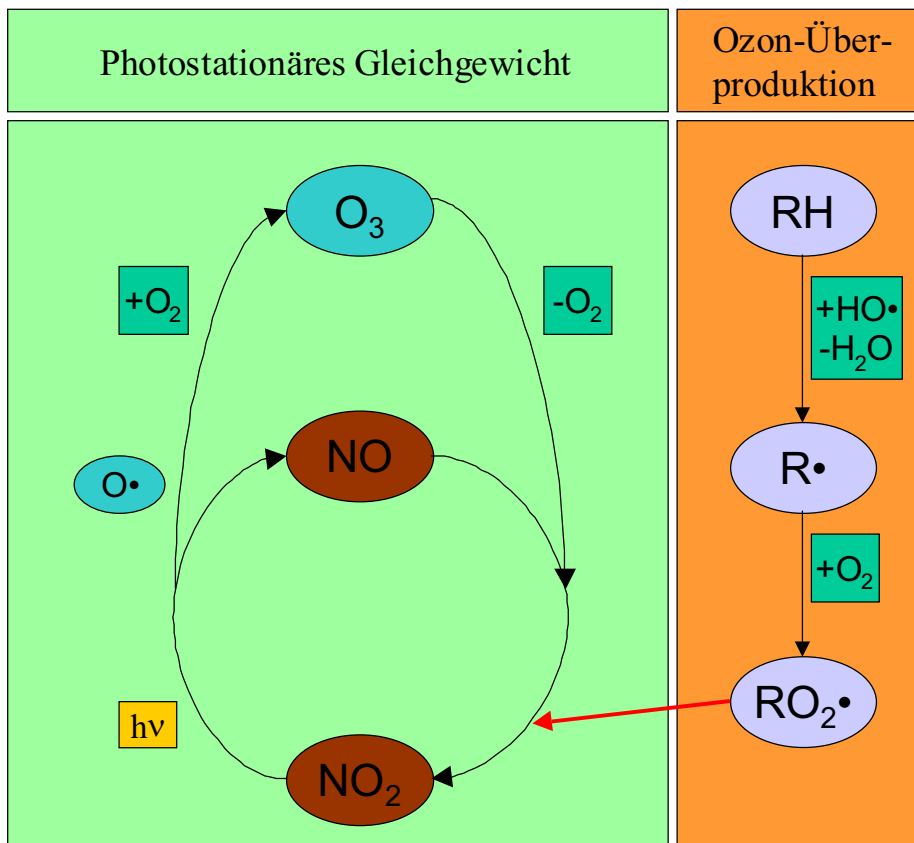
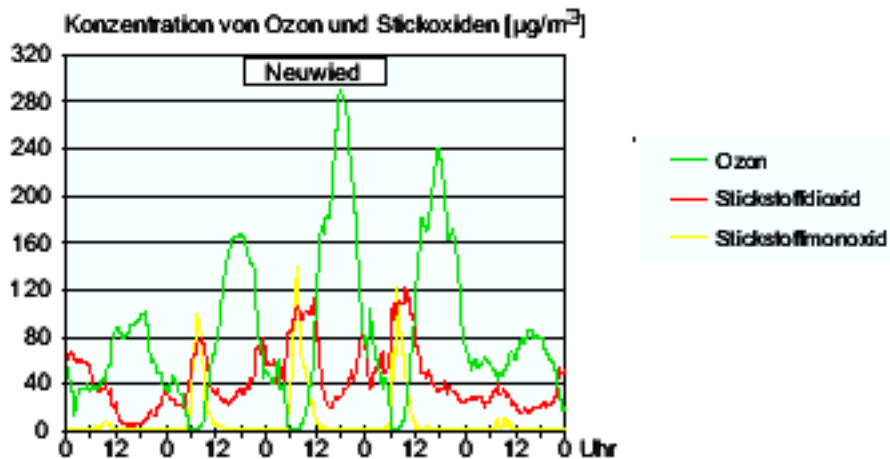


Abb. 2.3

Zusammenhang zwischen photostationärem Gleichgewicht und Ozonüberproduktion durch flüchtige Kohlenwasserstoffe (modifiziert nach StMLU 1997)

Für die zeitliche Entwicklung der Ozonkonzentration innerhalb eines Tages wird ein typischer Verlauf beobachtet, der beispielhaft in Abb. 2.4 gezeigt ist. Hierfür ist sowohl die Zeitabhängigkeit des anthropogenen Eintrags bestimmter Schadstoffe wie Stickoxide und Kohlenwasserstoffe, z. B. aus dem Verkehr, als auch die zeitliche Veränderung der Intensität der Sonneneinstrahlung verantwortlich. Ein morgendlicher Anstieg der Stickoxide als Vorläufersubstanzen geht den hohen Ozonkonzentrationen mittags und nachmittags voraus. Ohne Sonneneinstrahlung, d. h. abends und nachts, trägt Stickstoffmonoxid dann zur Ozonzersetzung bei. Durch Fehlen dieses Effekts nehmen in ländlichen Regionen (geringere Luftverschmutzung) die Ozonkonzentrationen nachts weniger stark ab als in urbanen Ballungsräumen (hohe Luftverschmutzung).

**Abb. 2.4****Tagesgänge von Ozon- und Stickoxidbelastung im Sommer im städtischen Ballungsraum (MinfUF 1999)**

Die Einträge von Vorläufersubstanzen für Photosmog in die Atmosphäre sind überwiegend, jedoch nicht ausschließlich, anthropogenen Ursprungs. So sind natürliche Quellen für Stickoxide z. B. Gewitter, bakterielle Umwandlung von Ammonium- und Nitratverbindungen, Vulkanausbrüche und Waldbrände. Der Großteil der Stickoxide stammt jedoch aus den Abgasen von Industrie und Verkehr. Ca. zehn Prozent der flüchtigen Kohlenwasserstoffe werden natürlich, insbesondere von Wäldern in Form von Terpenen oder Isopren, freigesetzt. Auch hier ist der größte Anteil des Eintrags anthropogen verursacht, hauptsächlich durch den Verkehr und den Einsatz von Lösemitteln in Industrie und Haushalt (Sonnemann 1992).

Photochemischer Smog enthält neben Ozon weitere Photooxidantien, wie z. B. Aldehyde, Wasserstoffperoxid und organische Peroxide, sowie vor allem Peroxyacetylnitrate (PAN), die ebenfalls unter Sonneneinstrahlung aus flüchtigen Kohlenwasserstoffen und Stickoxiden gebildet werden.

Die typische natürliche Hintergrundkonzentrationen ohne Bedingungen, die Sommersmog fördern, liegen bei $40 - 60 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Sonnemann 1992). Die höchste in Deutschland gemessene Ozonkonzentration lag bei $664 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Sie wurde 1976 in Mannheim gemessen (LASI 1996). Gegenwärtige sommerliche Höchstkonzentrationen in Rheinland-Pfalz liegen bei max. ca. $250 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (MinfUF 1999). Die höchsten dokumentierten Ozonkonzentrationen in urbanen Ballungsräumen lagen bei über $1000 \mu\text{g}/\text{m}^3$, gemessen Anfang der siebziger Jahre in Los Angeles (EPA 1996). Es ist jedoch anzunehmen, daß in Ländern der Dritten Welt diese Werte mangels effektiver Emissionsschutzmaßnahmen auch heute noch überschritten werden, jedoch undokumentiert bleiben.

Weitere Quellen der humanen Exposition mit Ozon sind Lichtbogenschweißen oder ältere Fotokopierer und Laserdrucker (LASI 1996, Sundell u. Zuber 1996). Diese berufliche Exposition ist keiner saisonalen Schwankung unterworfen.

2.1.3 Eigenschaften von Ozon

Ozon ist die dreiatomige Form des Sauerstoffs und hat eine relative Molmasse von 48. Es ist ein blaues, diamagnetisches Gas von charakteristischem, stechendem Geruch, der an Chlor erinnert. Daher kommt auch sein Name aus dem Griechischen οζειν (ozein = riechen). Die Geruchsschwelle für Ozon liegt bei $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$, wenn es nach Einatmung neutraler synthetischer Luft plötzlich beigemischt wird. Der Bindungslänge zwischen dem zentralen und den beiden terminalen Sauerstoffatomen beträgt 128 pm, was auf deutliche Doppelbindungsanteile hindeutet, und der Bindungswinkel beträgt 117° . Beim Abkühlen kondensiert Ozon zunächst zu einer tiefblauen Flüssigkeit (Siedepunkt -112°C), dann zu einem schwarz-violetten Feststoff (Schmelzpunkt -193°C). Die starke Absorption im UV-Bereich (220 bis 290 nm, λ_{max} 255 nm) ist für die Schutzfunktion des Ozongürtels vor der intensiven ultravioletten Strahlung der Sonne verantwortlich. Die Dichte bei 0°C und 1013 hPa beträgt $2,143 \text{ g/l}$ (Holleman u. Wiberg 1976).

Ozon ist eines der stärksten bekannten Oxidationsmittel und sehr reaktiv. Interessant ist insbesondere die Reaktion mit ungesättigten Verbindungen, z. B. Fettsäuren und Lipiden. Hierbei entstehen über die Zwischenstufen Primärozonid, Carbonyl/Carbonyloxid und Crigeozonid als Oxidationsprodukte bei reduktiver Spaltung Carbonyle und bei oxidativer Spaltung Carbonsäuren (Holleman u. Wiberg 1976).

In Wasser läßt sich ca. zehnmal mehr Ozon als Disauerstoff lösen (Falbe u. Regitz 1995). Mit $1,09 \text{ g/kg}$ ist die Wasserlöslichkeit dennoch gering. Bei Anwesenheit katalytisch wirkender Verunreinigungen wie z. B. Metallionen zersetzt sich Ozon in Lösung allerdings sehr rasch. Ozon reagiert aufgrund seines hohen Oxidationspotentials ($+2,07 \text{ V}$) mit den meisten Verbindungen und Elementen sofort. Insbesondere unter physiologischen Bedingungen kommt es zu einer raschen Zersetzung.

2.1.4 Messung von Ozon

Die Ozonkonzentration in der Umwelt wird in Deutschland in der Regel in der Einheit $\mu\text{g}/\text{m}^3$ angegeben. Im nordamerikanischen Raum ist die Angabe in ppm üblich. Da letztere auf die Teilchenzahl bezogen ist, ist sie von der Temperatur und vom Luftdruck und damit auch von der Höhe der Meßstation unabhängig. Die beiden Angaben lassen sich mittels der Formel

$$1 \text{ ppm} = 2143 \cdot \frac{273}{T} \cdot \frac{p}{1013 \text{ hPa}} \mu\text{g} / \text{m}^3$$

(nach Sundell u. Zuber 1996) umrechnen, wobei T die absolute Temperatur und p der Druck in Hektopascal sind. Näherungsweise wird in der Praxis der bei einer Temperatur in der Größenordnung von 20 °C geltende Faktor

$$1 \text{ ppm} \approx 2.0 \cdot 10^3 \mu\text{g} / \text{m}^3$$

verwendet.

Zur Messung von gasförmigem Ozon stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, von denen einige im Weiteren kurz dargestellt werden sollen. Zunächst ist das am häufigsten verwendete Verfahren der UV-Absorption bei 254 nm zu nennen. Hierbei wird die UV-Absorption in einem mit der zu untersuchenden Luft gefüllten Glasrohr (Küvette) definierter Länge gemessen. Der Grad der Absorption ist hierbei nach dem Lambert-Beerschen Gesetz abhängig von der Konzentration des Ozons in der Meßzelle, wobei als Referenzwert die gleiche Luftprobe dient, die jedoch vorher zur Zersetzung des enthaltenen Ozons durch ein Metallsieb geleitet wird. Auf diese Art ist die Absolutbestimmung von Ozon möglich, weshalb diese Methode als Referenzverfahren zur Kalibrierung von Meßgeräten ausgewählt wurde (VDI 1980).

Das zuerst angewandte Verfahren zur Messung des bodennahen Ozongehalts der Luft beruht auf der Verfärbung von zuvor mit einer Iodid-Stärkelösung behandelten Papierstreifen, welche über eine bestimmte Zeit der Luft ausgesetzt werden. Durch die Oxidation von Iodid zu Iod erhält man den blaugefärbten Iodid-Stärke-Komplex. Diese Methode wird nach ihrem Erfinder als Schönbein-Methode bezeichnet (Schönbein 1868) und wurde bereits vor über 100 Jahren zur systematischen Messung der Ozonkonzentration über einen längeren Zeitraum eingesetzt (Volz u. Kley 1988).

Das bekannteste Verfahren zur Ozonbestimmung ist die Kaliumiodidmethode. Auch dieses Verfahren beruht auf der Oxidation von Iodid zu Iod. Das entstandene Iod wird dann direkt photometrisch bestimmt. Bei diesem Verfahren handelt es sich ebenfalls um ein Normverfahren (VDI 1978). Es findet jedoch bei Routinemessungen in der Regel keine Verwendung mehr, da es zu unspezifisch ist und eine große Querempfindlichkeit zu oxidierenden oder

reduzierenden Stoffen wie Peroxiden oder Schwefeldioxid aufweist. Ferner ist eine kontinuierliche Ozonbestimmung nicht möglich und die erreichbaren Nachweisgrenzen liegen zu hoch.

Die Reaktion organischer Farbstoffe läßt sich ebenfalls zur Quantifizierung von Ozon heranziehen. Zur Messung der Konzentration in Lösungen werden Farbstofflösungen eingesetzt, zur Messung gasförmigen Ozons werden imprägnierte Papierstreifen verwendet, aus denen zur Quantifizierung der Farbstoff eluiert wird. Ein Beispiel für diese Verfahren ist das Indigoverfahren (Werner 1992). Hierbei wird Indigo zu Isatin oxidiert und photometrisch quantifiziert.

Auch bei der elektrochemischen Bestimmung nutzt man die oxidierende Wirkung von Ozon. Bei der ECC-Sonde (Electrochemical Concentration Cell) wird ozonhaltige Luft durch eine Zelle geleitet, die eine verdünnte Halogenidlösung enthält (Sonnemann 1992), z. B. Kaliumiodid bei der Brewer-Mast-Sonde. In beide Zellkammern, die durch eine Elektrolytbrücke verbunden sind, tauchen Platinelektroden. Die Änderung des Potentials infolge der Oxidation von Halogenid durch Ozon in einer der Zellkammern ist proportional zur Ozonkonzentration im eingeleiteten Gasgemisch.

Ein gänzlich anderes Verfahren stellt der Einsatz von Bioindikatoren dar. Hierbei wird eine durch Ozoneinwirkung verursachte, spezifische Änderung statistisch ausgewertet und zur Quantifizierung der Ozonimmission herangezogen (Keitel 1989). Ein Beispiel ist die Nekrosenbildung an den Blättern der Tabakpflanze Bel W 3. Diese Verfahren eignen sich vor allem für Langzeitbeobachtungen und Vergleichsstudien, liefern jedoch keine exakten Absolutwerte.

2.1.5 Toxikologische Wirkungen von Ozon

Bereits in frühen Studien konnte gezeigt werden, daß die toxische Wirkung von Ozon der von freien Radikalen ähnelt, obwohl Ozon *per se* kein Radikal ist (Menzel 1970). Aus diesem Grund wird Ozon auch als Radiomimetikum bezeichnet.

Die bei der Einwirkung von Ozon auf biologische Systeme entstehenden Reaktionsprodukte gehen zum einen auf die Reaktion von Ozon *per se* zurück, zum anderen aber vor allem auch auf die Bildung und Reaktion anderer, bei der Ozonzersetzung entstehender reaktiver Sauerstoffspezies. Hierbei spielt vor allem das extrem reaktive und kurzlebige Hydroxylradikal die Hauptrolle (Cotgreave 1996). Die komplexe Generierung von Hydroxylradikalen (Hoigne u. Bader 1979) und anderen reaktiven Sauerstoffspezies kann unter anderem initiiert

werden durch Hydroxylionen (Forni *et al.* 1982), Wasserstoffperoxid (Nakayama *et al.* 1979) oder UV-Strahlung (Hoigne u. Bader 1979, Peyton u. Glaze 1985).

Aufgrund der hohen Reaktivität reagiert ein Großteil des inhalierten Ozons bereits im oberen Respirationstrakt ab (Ultman *et al.* 1994). Ozon, welches die Lunge erreicht, durchdringt vermutlich nicht die epitheliale Schleimhautschicht der Lunge und ist damit nicht in der Lage, in Substanz systemisch zu zirkulieren. Es reagiert mit dem sogenannten Surfactant ("lung lining fluid layer" LLFL) ab, welches ein Gemisch aus Phospholipiden darstellt und neben Proteinen auch verschiedene Antioxidantien enthält. Hierbei kommt es zur Bildung weiterer reaktiver Spezies, welche, entsprechende Stabilität vorausgesetzt, dann auch systemisch zirkulieren können (Pryor 1992). Neben der Reaktion von Ozon oder daraus entstehenden anderen reaktiven Spezies mit Lipiden muß auch die Reaktion mit Aminosäuren und Proteinen, mit niedermolekularen Antioxidantien wie Glutathion oder Vitamin E und C, und Nukleinsäuren berücksichtigt werden. So wurden nach Ozonexposition neben Lipidperoxidationsprodukten auch Hydroxylierungsprodukte von Aminosäuren, oxidierte DNA-Basen, oxidierte Proteine in Form von Proteincarbonylen sowie Verbrauch von niedermolekularen Antioxidantien nachgewiesen (Cotgreave 1996).

2.1.5.1 Untersuchungen zur Gentoxizität von Ozon

Die in der nachfolgenden Zusammenstellung berücksichtigten Studien wurden mit physiologisch tolerablen Dosen von bis zu maximal 4 mg/m³ Ozon durchgeführt. Eine Reihe weiterer Untersuchungen mit unphysiologisch hohen Ozonkonzentration (bis zu 1,2 kg/m³) wurde nicht berücksichtigt, da unter diesen Bedingungen zytotoxische Effekte gentoxische Effekte überlagern und sie keinerlei Relevanz für eine tatsächliche Exposition besitzen (Victorin 1996).

Untersuchungen an prokaryontischen Zellen und Insekten

Wird Ozon durch eine Suspension von *Escherichia coli* oder *Bacillus subtilis* geleitet, kommt es zur Induktion von Vorwärts- und Rückwärtsmutationen (Hamelin u. Chung 1974, Hamelin u. Chung 1975, L'Hérault u. Chung 1984, Nover u. Botzenhart 1985). Im Amestest findet die Exposition von *Salmonella typhimurium* auf Agarplatten statt. Hierbei ist ein Problem, daß Ozon diese Matrix vermutlich nicht penetriert. Die Tests wurden mit und ohne metabolische Aktivierung mit S9-Mix durchgeführt. Ein positives Testergebnis liegt für den Stamm TA 102 vor (Dillon *et al.* 1992), negative Ergebnisse für die Stämme TA 98 (Dillon *et al.* 1992), TA 100 (Shepson *et al.* 1985, Victorin u. Ståhlberg 1988, Dillon *et al.* 1992), TA 104 (Dillon *et al.* 1992) und TA 1535 (Dillon *et al.* 1992).

In *Drosophila virilis* kam es zur Induktion von dominanten Lethalen im Nachwuchs (Chigusa u. Nakada 1972, Erdman u. Hernandez 1982).

Ergebnisse valider Studien an prokaryontischen Zellen und Insekten sind überwiegend positiv. Ebenfalls überwiegend positiv sind Befunde an Hefen und Pflanzen (Victorin 1996). Deshalb ist von einem gentoxischen Potential von Ozon in diesen Testsystemen auszugehen.

Untersuchungen an eukaryontischen Zellen

Wird Ozon durch eine Suspension humaner Lymphozyten geleitet, kommt es zu Aberrationen des chromatidalen Typs, nicht jedoch des chromosomalen Typs (Gooch *et al.* 1976). In humanen embryonalen WI-38 Fibroblasten kommt es zur Induktion von Schwesterchromatidaustauschen und ebenfalls zu Aberrationen des chromatidalen Typs, nicht jedoch des chromosomalen Typs (Guerrero *et al.* 1979). In V79 Zellen des chinesischen Hamsters wurden Schwesterchromatidaustausche (Shiraishi u. Bandow 1985) und Inhibierung der DNA-Replikation (Rasmussen 1986) beobachtet. Diese Effekte wurden bei einer niedrigen Ozonkonzentration im Bereich der natürlichen Hintergrundkonzentration ($70 \mu\text{g}/\text{m}^3$) nicht beobachtet (Rasmussen u. Crocker 1982). Experimente mit der Verwendung von ozoniertem Puffer liefern negative Ergebnisse. Dies ist vermutlich auf die rasche Zersetzung des Ozons bei der Herstellung der Lösung unter Anwesenheit von Verunreinigungen zurückzuführen. In primären Zellen aus dem Luftröhrenepithel von Ratten fand eine präneoplastische Transformation statt, wenn sie wiederholt zweimal wöchentlich exponiert wurden, nicht jedoch bei Einmalexposition (Thomassen *et al.* 1991).

Die Ergebnisse von Gentoxizitätsuntersuchungen an Eukaryonten sind überwiegend positiv. Deshalb ist von einem gentoxischen Potential von Ozon in diesen Testsystemen auszugehen.

Untersuchungen am Versuchstier

Am chinesischen Hamster konnten Aberrationen vom chromosomalen Typ in Lymphozyten nach Ozonexposition nachgewiesen werden (Zelac *et al.* 1971). Aberrationen vom chromosomalen Typ konnten in einer weiteren Studie nicht bestätigt werden, jedoch wurden Aberrationen vom chromatidalen Typ gefunden (Tice *et al.* 1978). Schwesterchromatidaustausche in Lymphozyten wurden im Rahmen dieser Untersuchungen nicht beobachtet, ebenfalls negativ waren zytogenetische Befunde in Knochenmarkszellen. In Mäusen ließen sich keine zytogenetischen Effekte induzieren, weder im Knochenmark noch in Lymphozyten (Gooch *et al.* 1976, Tice *et al.* 1978). Ebenfalls wurden keine reziproken Translokationen in Spermatozyten der Maus beobachtet (Gooch *et al.* 1976). In der Ratte konnten chromatidartige Aberrationen nach Ozonbehandlung in Lungenmakrophagen nachgewiesen werden

(Rithidech *et al.* 1990), nicht jedoch chromosomale Aberrationen oder präneoplastische Transformation epithelialer Zellen der Luftröhre (Thomassen *et al.* 1991).

In nach Ozonbehandlung auftretenden Lungentumoren in der Maus konnte eine erhöhte Mutationsrate im K-ras Onkogen nachgewiesen werden (Sills *et al.* 1995).

Mit zunehmender Komplexität des Testsystems fällt auf, daß die Ergebnisse der Gentoxizitätstests nicht mehr konsistent positiv sind. Eine Aussage darüber, ob Ozon in diesen Testsystemen insgesamt als gentoxisch klassifiziert werden kann, fällt unter dem Aspekt des ausgewogenen Verhältnisses zwischen positiven und negativen Befunden schwer.

Untersuchungen am Menschen

Ozonexposition von Menschen unter kontrollierten Bedingungen liefert Aberrationen vom chromatidalen Typ, nicht jedoch vom chromosomalen Typ (Merz *et al.* 1975). Dieser Befund konnte in unabhängigen Studien nicht bestätigt werden (McKenzie *et al.* 1977, McKenzie 1982), ebenfalls wurden keine Schwesterchromatidaustausche beobachtet (McKenzie *et al.* 1977, Guerrero *et al.* 1979, McKenzie 1982). In ozonexponierten Arbeitern wurden achromatische Läsionen beobachtet, jedoch keine anderen Aberrationen vom chromatidalen oder chromosomalen Typ (Sarto u. Viola 1980).

Die Untersuchungen bezüglich zytogenetischer Effekte am Menschen nach kontrollierter Ozonexposition zeichnen sich überwiegend durch geringe Fallzahlen und ein uneinheitliches Ergebnis aus. Studien mit Fallzahlen von ca. dreißig Teilnehmern zeigen negative Befunde.

2.1.5.2 Untersuchungen zur Kanzerogenität von Ozon

Das potentielle Zielorgan für die ozoninduzierte Kanzerogenese ist die Lunge. Nach Ozonexposition über 15 (Stoking 1965), 6 (Hassett *et al.* 1985) und 4 (Last *et al.* 1987) Monate wurden in A/J-Mäusen Adenome beobachtet. Die Bildung von Adenomen konnte in Swiss Webster Mäusen nach 4 Monaten nicht bestätigt werden (Last *et al.* 1987). Im Rahmen einer Studie des National Toxicology Programs (NTP) wurde die Induktion von Karzinomen und Adenomen in B6C3F Mäusen beobachtet (NTP 1994). Dieses Ergebnis wird jedoch relativiert, da unter sehr ähnlichen Bedingungen keine Erhöhung der Karzinom- oder Adenominzidenz in A/J-Mäusen beobachtet wurde (Witschi *et al.* 1999). Im Rahmen dieser NTP-Studie wurden in Fischer F344 Ratten weder eine Erhöhung der Zahl von Adenomen noch von Karzinomen beobachtet (NTP 1994). Diese wurden im syrischen Hamster ebenfalls nicht beobachtet (Witschi *et al.* 1993).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß es begrenzte Hinweise gibt, daß Ozon in der Maus möglicherweise kanzerogen ist, jedoch nicht in der Ratte.

Epidemiologisch wurde über ein erhöhtes Lungenkrebsrisiko in einer Gruppe von 17 Siebenten-Tags-Adventisten bei einer Ozonexposition von mehr als 500 Stunden pro Jahr über $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ berichtet (Mills *et al.* 1991, Abbey *et al.* 1995).

2.1.5.3 Akute und chronische toxische Wirkungen von Ozon

Zahlreiche Studien unter kontrollierten Bedingungen zeigen, daß es durch Ozonexposition zu einer Verringerung der Lungenfunktion des Menschen kommt. Nach einmaliger Exposition kommt es zu einer dosisabhängigen Verringerung aller Lungenfunktionsparameter (EPA 1996). Diese Effekte sind insgesamt sehr gut reproduzierbar (Gliner *et al.* 1983), insbesondere für die Meßgrößen FVC (forcierte Vitalkapazität) und FEV_{1.0} (forciertes expiratorisches Volumen) (McDonnell *et al.* 1985). Der Effekt ist unabhängig von der Art der Atmung. Ähnliche Effekte wurden in vergleichenden Studien zwischen Mund-, Nasen- und kombinierter Atmung gefunden (Adams *et al.* 1989, Hynes *et al.* 1988). Untersuchungen über die Interaktion zwischen Ozon und verschiedenen Pharmazeutika lassen die Schlußfolgerung zu, daß diese Ozonwirkung über verschiedene Mechanismen vermittelt wird. Hierzu gehören die Freisetzung von bronchokonstruktiven Mediatoren, wie z. B. Prostaglandinen, die Stimulation von afferenten Bronchialnerven mit reflektorischer Reaktion und die Stimulation von Schmerzrezeptoren in den oberen Atemwegen (Bylin 1996). Insgesamt sind die genauen Mechanismen bisher jedoch kaum bekannt.

Bei wiederholter kontrollierter Exposition kommt es zu einer Adaptation an die Ozonexposition, wodurch sich die Abnahme der Lungenfunktion verringert. Diese Adaptation hält für einige Tage an, die ursprüngliche Empfindlichkeit tritt nach einer Expositionspause von ca. einer Woche wieder auf (EPA 1996, Bylin 1996).

Diese Befunde aus Untersuchungen mit kontrollierter humaner Exposition werden durch epidemiologische Untersuchungen bestätigt (Nyberg u. Pershagen 1996).

Durch Ozonexposition kann es sowohl im oberen als auch im unteren Respirationstrakt zu Entzündungsreaktionen kommen. Dies wurde sowohl beim Menschen als auch in zahlreichen Tierexperimenten beobachtet (Hotchkiss *et al.* 1989, Bylin 1996, Gustafsson u. Cotgreave 1996). Bei einmaliger Exposition gegenüber Ozon fällt in der Ratte die Zahl der Lungenmakrophagen zunächst einmal unmittelbar ab. Nach wenigen Stunden kommt es jedoch zur Zunahme von Lungenmakrophagen und Granulozyten (Bhalla 1999). Diese kann mehrere Tage anhalten. Bei mehrfacher oder subchronischer Exposition zeigen sich bezüglich Entzündungsreaktionen häufig Adaptationsreaktionen, die mit einem Rückgang der Zahl von Lungenmakrophagen und Granulozyten gegenüber akuter Exposition bis hin zum Normalbe-

fund verbunden sind (Gustafsson u. Cotgreave 1996, Bhalla 1999). Besonders interessant in diesem Zusammenhang ist, daß durch Konditionierung von Ratten mit geringen Ozonkonzentrationen die Entzündungsreaktion bei akuter Ozonexposition reduziert wird (van der Wal *et al.* 1994).

2.1.6 Maßnahmen zur Reduktion des Sommersmog

Nachdem sich großräumige Tempolimits und regional begrenzte Verkehrssperrungen zur Bekämpfung erhöhter Ozonkonzentrationen als ungeeignet erwiesen hatten, trat am 26. Juli 1995 das Ozongesetz in Kraft. Seither werden als Kernmaßnahme bei erhöhten Ozonkonzentrationen Verkehrsverbote für nicht schadstoffarme Kraftfahrzeuge verhängt.

Nach dem Ozon-Gesetz bestehen Verkehrsverbote in einem Land oder Teilen davon dann, wenn bei mindestens drei Meßstationen (mindestens zwei davon in dem Land) im Bundesgebiet, die mehr als fünfzig Kilometer und weniger als 250 Kilometer voneinander entfernt liegen, die Ozonkonzentration von $240 \mu\text{g}/\text{m}^3$ Luft über eine Stunde lang an einem Tag erreicht wird. Zudem muß aufgrund der Erkenntnisse des Deutschen Wetterdienstes anzunehmen sein, daß die Ozonkonzentration von $240 \mu\text{g}/\text{m}^3$ im Laufe des nächsten Tages wieder erreicht wird. Ein solches Verkehrsverbot tritt um 06.00 Uhr des folgenden Tages in Kraft und ist auf zunächst 24 Stunden begrenzt.

Ab einer Konzentration von $180 \mu\text{g}/\text{m}^3$ werden Ozonwarnungen ausgegeben, die dazu dienen sollen, die Autofahrer zu informieren und an sie zu appellieren, ihre Fahrzeuge nicht zu benutzen.

Als es 1998 zur Verhängung eines Fahrverbotes u. a. in Baden-Württemberg und Rheinland-Pfalz kam, zeigte sich, daß das Ozon-Gesetz kein effizientes Mittel zur Bekämpfung des Sommersmogproblems ist (Rat der Sachverständigen für Umweltfragen 2000). Aufgrund der großzügigen Ausnahmeregelungen vom Verkehrsverbot war kein Verkehrsrückgang zu beobachten. Als einziges effizientes Mittel zur Minderung oder Vermeidung des Sommersmogproblems ist eine langfristige Verminderung der Emission von Vorläufersubstanzen der Ozonbildung. Hierzu sind Maßnahmen der Verkehrsvermeidung und -verlagerung dringend geboten. Außerdem müssen sie durch die verbindliche Einführung von Abgasreinigungssystemen für alle dieselgetriebenen Fahrzeuge und die Einbeziehung von Altfahrzeugen in die Emissionsminderung ergänzt werden (Rat der Sachverständigen für Umweltfragen 2000). Im wesentlichen wurden diese Forderungen bereits in einer Stellungnahme unmittelbar nach Inkrafttreten des Ozongesetzes gestellt (Rat der Sachverständigen für Umweltfragen 1995).

2.2 Oxidativer Streß

Ein Paradoxon des Lebens auf der Erde ist, daß das Molekül, welches das aerobe Leben ermöglicht, der Sauerstoff, nicht nur unerlässlich ist für den Energiemetabolismus und die Atmung, sondern auch bei zahlreichen Erkrankungen und degenerativen Prozessen beteiligt ist (Marx 1985).

2.2.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Für toxische Sauerstoffwirkungen ist die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies oder "freier Radikale" verantwortlich. Diese entstehen formal gesehen aus molekularem Disauerstoff durch Reduktion, d. h. Elektronenaufnahme (s. Abb. 2.5).

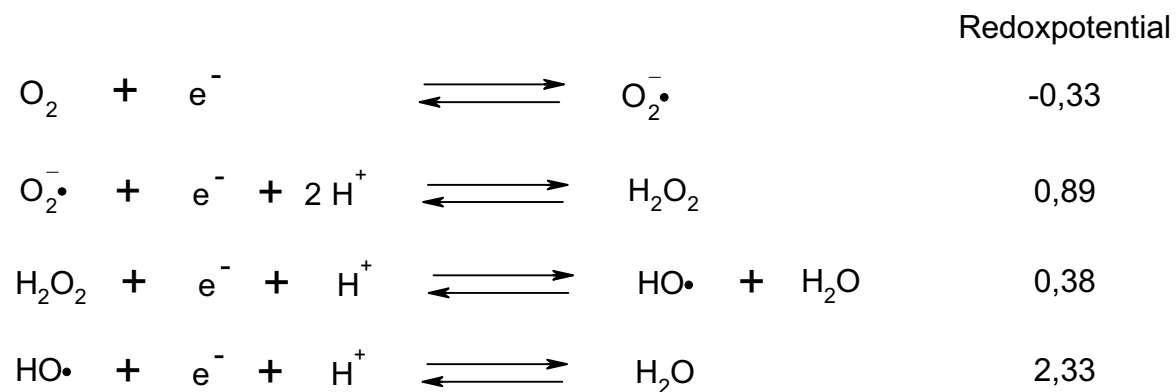


Abb. 2.5

Stufenweise Bildung reaktiver Sauerstoffspezies aus Disauerstoff durch Elektronenaufnahme (Eltner 1990)

Im ersten Schritt entsteht aus molekularem Disauerstoff das Superoxidradikalanion ($O_2^{\bullet -}$), welches energetisch höher liegt. Die weiteren Reduktionsschritte sind exotherm. Das Superoxidradikalanion selbst besitzt nur eine geringe Reaktivität und deshalb auch nur eine geringe Toxizität. Möglicherweise besitzt es jedoch wichtige Eigenschaften als Signalmolekül in der Zelle im Zusammenhang mit der Aktivierung von NF- κ B (Schreck *et al.* 1991; Bowie u. O'Neill 2000). Im nächsten Schritt entsteht durch Dismutation das stabile Wasserstoffperoxid. Diese Reaktion wird katalysiert durch die Superoxiddismutase. Wasserstoffperoxid ist chemisch stabiler als Sauerstoffradikale und kann über größere Strecken diffundieren und Membranen überwinden. Seine Hauptreaktivität geht zurück auf die Bildung von sehr kurzlebigen und deshalb sehr reaktiven Hydroxylradikalen. Diese entstehen z. B. katalysiert durch Fe^{2+} oder Cu^+ durch die Fenton-Reaktion bzw. Haber-Weiss-Reaktion (Silva *et al.*

1998, Imlay *et al.* 1988, Trenam *et al.* 1992, Gutteridge *et al.* 1998, Picardo u. Passi 1997) (s. Abb. 2.6):

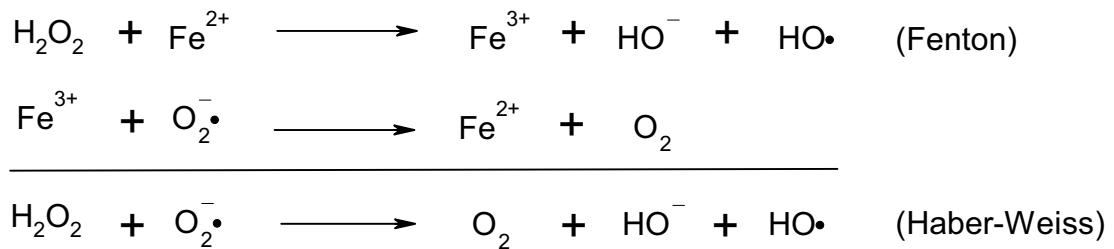


Abb. 2.6

Fenton- und Haber-Weiß-Reaktion zur eisenkatalysierten Bildung von Hydroxylionen aus Wasserstoffperoxid und Superoxidradikalanion

Eine andere Form reaktiven Sauerstoffs entsteht unabhängig von diesem Reaktionsweg. Der Singulett-Sauerstoff $^1\text{O}_2$ entsteht durch Einwirkung von Licht in Gegenwart von Photosensitizern, durch spontane Dismutation von Superoxidradikalanionen oder aus Wasserstoffperoxid katalysiert durch Myeloperoxidase (Picardo u. Passi 1997).

Reaktive Sauerstoffspezies können endogen gebildet werden. In Zellen sind die wichtigsten Quellen für Superoxidradikalanionen die Elektronentransportketten in Mitochondrien und im endoplasmatischen Retikulum. Ca. 1 – 3 % des Sauerstoffs werden in den Mitochondrien in Superoxidradikalanionen umgewandelt (Halliwell 1994). Darüber hinaus bilden reaktive Sauerstoffspezies einen wichtigen Teil der Immunabwehr und werden daher auch in diesem Rahmen von Neutrophilen und Makrophagen gebildet. Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies kann aber auch durch exogene Einflüsse verursacht sein. Neben der direkten Aufnahme von Oxidantien ist hier vor allem die Wirkung von Redoxcyclern zu nennen.

2.2.2 Reaktive Stickstoffspezies (RNS)

Neben reaktiven Sauerstoffspezies spielen auch reaktive Stickstoffspezies eine wichtige Rolle in bezug auf das Entstehen von oxidativem Streß. Stickstoffmonoxid NO – 1992 zum „Molekül des Jahres“ avanciert (Koshland 1992) – besitzt ein freies Elektron und hat damit auch radikalische Eigenschaften, die es sehr reaktiv machen.

NO wird im Organismus durch NO-Synthasen (NOS) gebildet. Von diesem Enzym sind bisher drei Isoformen beschrieben (Nathan u. Xie 1994), von denen zwei konstitutiv exprimiert werden (nNOS und ecNOS), welche jedoch NO nur kurzzeitig in geringen Mengen herstellen (Bredt u. Snyder 1992, Guo *et al.* 1995). Im Zusammenhang mit oxidativem Streß

ist jedoch die Expression der induzierbaren Form (iNOS) von Bedeutung (Stuehr 1991). Diese wird u. a. in Makrophagen durch Zytokinstimulation exprimiert. NO besitzt somit sowohl eine Rolle als physiologisches Signalmolekül als auch in der Immunabwehr. Durch weitere Oxidation entstehen höhere Oxide wie z. B. Stickstoffdioxid, Distickstofftrioxid oder Distickstofftetroxid. Prinzipiell sind alle diese Spezies reaktiv (Darley-Usmar *et al.* 1995). Stärker reaktive Verbindungen entstehen jedoch durch die Reaktion von NO mit reaktiven Sauerstoffspezies.

NO reagiert mit Superoxidradikalanionen mit hoher Geschwindigkeit (Huie u. Padmaja 1993), da es sich um die Kombination von zwei Radikalen handelt. Es entsteht Peroxynitrit. Dieses ist kein Radikal, zeigt jedoch eine wesentlich höhere Reaktivität als seine Vorläufer (Beckman *et al.* 1990). Peroxynitrit kann mit DNA, Proteinen und Lipiden reagieren und diese so schädigen (Pryor u. Squadrito 1995). Ferner kann Peroxynitrit nach Protonierung zu Stickstoffdioxid und Hydroxylradikalen zerfallen (Beckman *et al.* 1990).

2.2.3 Antioxidative Abwehr

Wenn bereits 1 – 3 % des aufgenommenen Sauerstoffs endogen in Mitochondrien in reaktive Sauerstoffspezies umgewandelt werden, ist es eine Voraussetzung für das Leben, daß aerobe Organismen Abwehrmechanismen gegen oxidative Schädigung besitzen müssen. In erster Linie geht diese Abwehr auf Antioxidantien zurück, welche die reaktiven Spezies abfangen und unschädlich machen können. Besonders interessant im Zusammenhang mit der dargestellten stufenweisen Entstehung verschiedener reaktiver Sauerstoffspezies ist ein System von Enzymen, welches gezielt bestimmte reaktive Sauerstoffspezies entgiftet (Bankson 1997).

- **Superoxiddismutase** katalysiert die Reaktion von Superoxidradikalanionen mit Protonen zu Wasserstoffperoxid und Disauerstoff.
- **Catalase** katalysiert die Zersetzung von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Disauerstoff.
- **Glutathionperoxidase/Glutathionreductase** entgiften organische Peroxide bzw. Wasserstoffperoxid zu Alkoholen und Wasser bzw. Wasser.

Neben diesen Enzymsystemen gibt es niedermolekulare nicht-enzymatische Antioxidantien (Stocker u. Frei 1991):

Fettlöslich:

- α -Tocopherol
- Ubichinon 10
- Lycopon
- Carotinoide
- Lutein
- Zeaxanthin

Wasserlöslich:

- Glukose
- Pyruvat
- Harnsäure
- Ascorbinsäure
- Bilirubin
- Glutathion

Ferner haben auch Proteine ohne unmittelbare Enzymfunktion bezüglich reaktiver Sauerstoffspezies eine antioxidative Funktion, indem sie z. B. Eisen oder Kupfer binden und so Fenton-Reaktionen verhindern. Ein Beispiel hierfür ist Transferrin (Stocker u. Frei 1991).

Neben der antioxidativen Abwehr, welche die oxidative Schädigung verhindern soll, bestehen auch Reparaturmechanismen für oxidative Schäden.

2.2.4 Definition und Auswirkung von oxidativem Streß

Eine Definition für oxidativen Streß ist:

„Eine Störung des Prooxidans-Antioxidans-Gleichgewichts zu Gunsten des ersteren, die zu einer möglichen Schädigung führt. Indikatoren für oxidativen Streß schließen geschädigte DNA-Basen, Proteinoxidationsprodukte und Lipidperoxidationsprodukte ein.“ (Sies 1991)

Die Beteiligung von oxidativem Streß ist bei verschiedensten Erkrankungen und pathologischen Prozessen nachgewiesen, z. B. bei (nach Möller *et al.* 1998, ergänzt):

- | | | |
|-----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|
| • Diabetes | • Morbus Crohn | • Morbus Alzheimer |
| • Alterungsprozessen | • Atherosklerose | • Morbus Parkinson |
| • Herz-Kreislauf-
Erkrankungen | • Hauterkrankungen | • Katarakt |
| • Infektion | • Ischämische
Erkrankungen | • Septischer Schock |
| • Entzündungen | • Zystische Fibrose | • Virushepatitis |
| • Rheuma | • Immunologische
Erkrankungen | • Leberzirrhose |
| • Krebs | | • Toxische Wirkung
von Xenobiotica |

Primäre Auswirkung von oxidativem Streß ist neben dem Verbrauch von niedermolekularen Antioxidantien die Schädigung von zellulären Bestandteilen. Ziele hierfür stellen vor allem die DNA, Proteine und Lipide dar (Cotgreave 1996).

In bezug auf die Krebsentstehung kommt der Schädigung von DNA hierbei besondere Bedeutung zu, da sie ein potentiell genotoxisches Ereignis darstellt, durch welches es zu Mutationen kommen kann. Sie kann entweder direkt durch den Angriff reaktiver Sauerstoffspezies an der DNA oder aber durch die Bildung von DNA-Addukten aus Reaktionsprodukten reaktiver Sauerstoffspezies (z. B. Lipidperoxidationsprodukte) verursacht werden. Aber auch der Einfluß reaktiver Sauerstoffspezies auf zytoplasmatische und nukleäre Signaltransduktionskaskaden, wie z. B. NF- κ B (Schreck *et al.* 1992), sowie die Modulation streßinduzierter Gene mit Einfluß auf Zellproliferation, -differenzierung und Apoptose spielen eine Rolle (Wiseman u. Halliwell 1996, Payne *et al.* 1995, Mates u. Sanchez-Jimenez 2000). Somit hat oxidativer Streß sowohl Einfluß auf die Initiations- als auch auf die Promotionsphase bei der Krebsentstehung. Die mechanistischen Einflüsse reaktiver Sauerstoffspezies sind grob in Abb. 2.7 dargestellt.

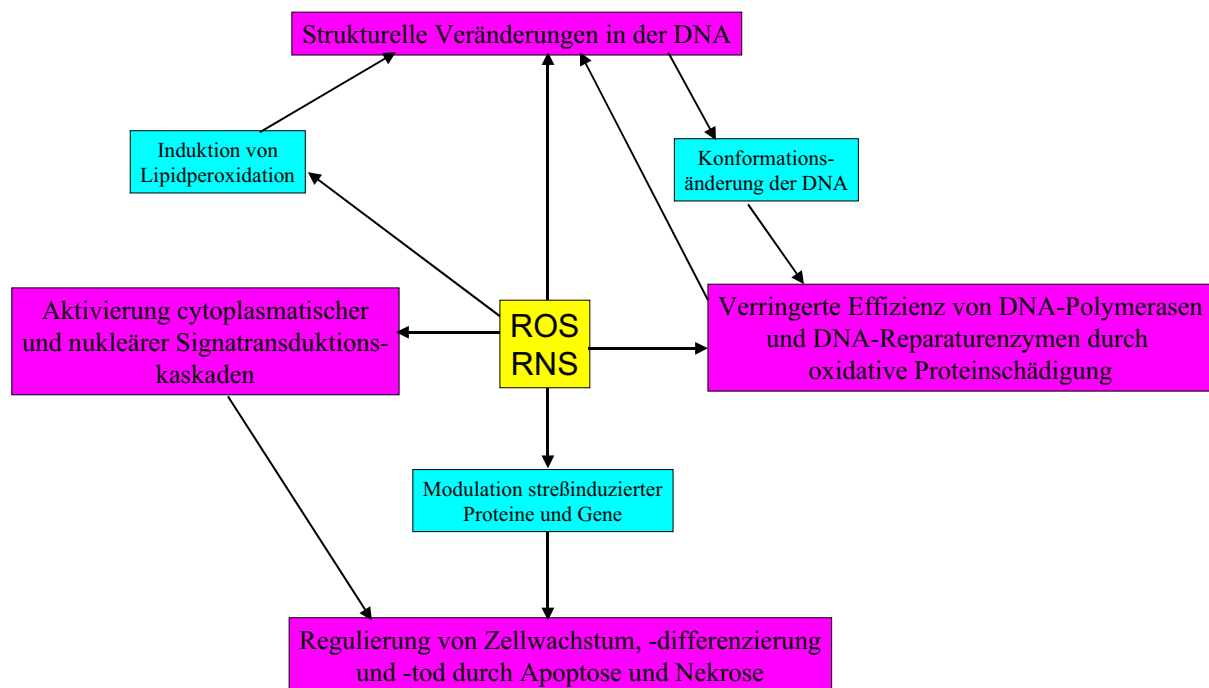


Abb. 2.7

Einfluß reaktiver Sauerstoffspezies auf die Krebsentstehung (Wiseman u. Halliwell 1996)

Da reaktive Sauerstoffspezies auch unter normalen, nicht pathologischen Bedingungen gebildet werden und auch ohne oxidativen Streß nicht vollständig durch die antioxidativen

Abwehrmechanismen abgefangen werden können, liegt immer eine gewisse Hintergrundschädigung durch reaktive Sauerstoffspezies vor. Diese manifestiert sich u. a. in einer gewissen Anzahl von Mutationen, die zur malignen Entartung von Zellen führen können. Aus diesem Grund werden reaktive Sauerstoffspezies für die Entstehung von Spontantumoren mitverantwortlich gemacht (Totter 1980, Ames 1989, Feig *et al.* 1994).

2.3 Marker für oxidativen Streß

2.3.1 Oxidative Schädigung von DNA

Der Angriff reaktiver Sauerstoffspezies auf die DNA kann zum einen am Zucker oder an der Nukleobase erfolgen. Ein Angriff von Hydroxylradikalen in C3', C4' oder C5'-Position hat die Bildung von Strangbrüchen zur Folge, während sich bei Angriff auf die C1'-Position ein Lakton bildet (Cadet *et al.* 1999). Besonders kritische Modifikationen bilden sich beim Angriff an der Nukleobase, da diese Basenläsionen potentiell mutagen sind. Einige Reaktionsprodukte aus der Reaktion von Nukleobasen mit reaktiven Sauerstoffspezies sind in Abb. 2.8 gezeigt.

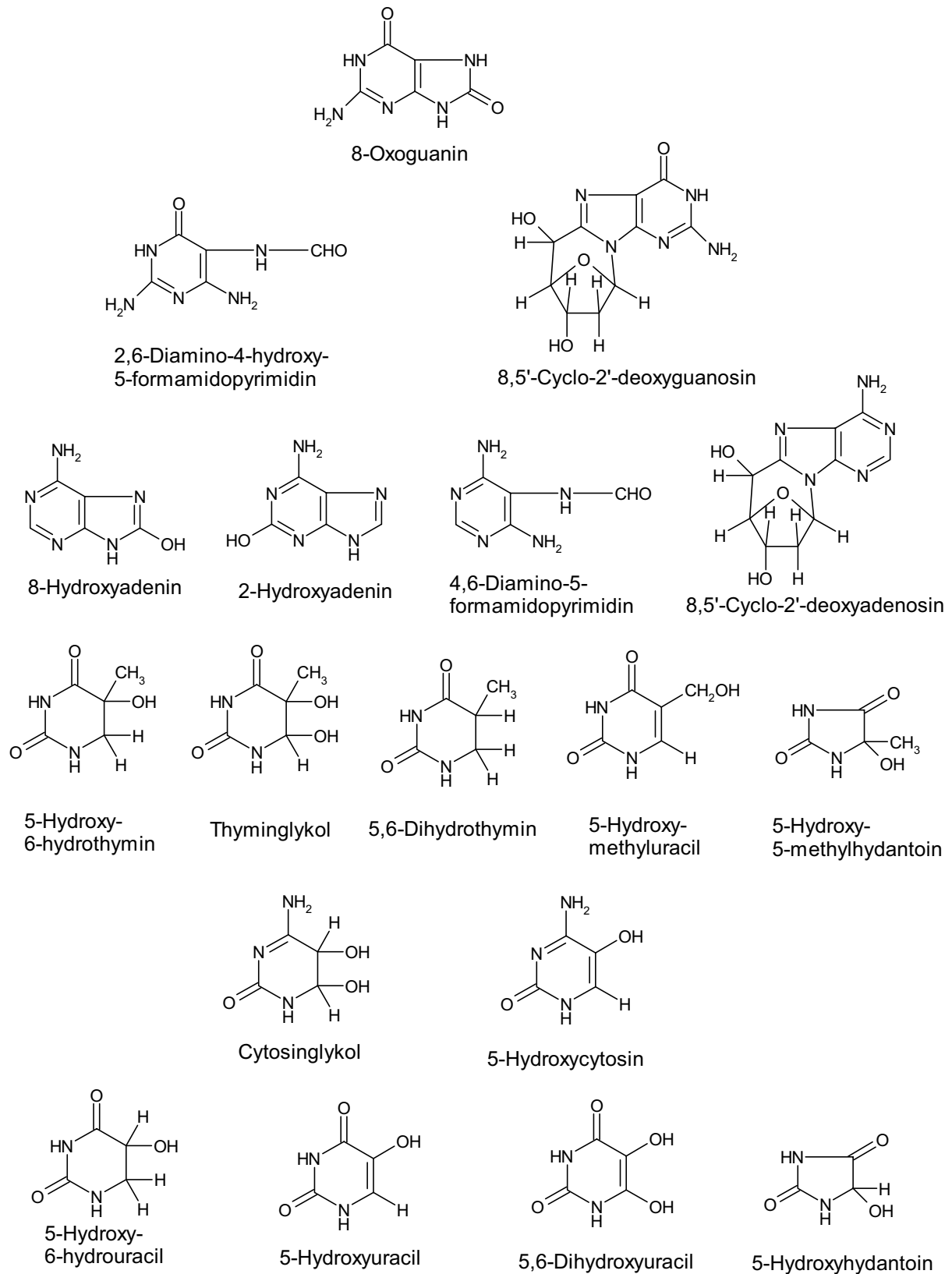


Abb. 2.8
Struktur einiger Oxidationsprodukte von Nucleobasen, überwiegend durch Angriff von Hydroxylradikalen gebildet (Wiseman u. Halliwell 1996)

Die am häufigstens untersuchte Basenläsion ist 8-oxodG. Ihr Anteil an der Gesamtheit der auftretenden oxidativen Basenmodifikationen wird auf ca. 5 % geschätzt (Dizdaroglu 1992, Beckman u. Ames 1997), womit sie die höchste Häufigkeit besitzt. Sie ist auch der am häufigsten eingesetzte Marker für die Messung der oxidativen Schädigung von DNA.

Die Bildung von 8-oxodG in der DNA ist besonders kritisch, da 8-oxodG nicht wie dG bevorzugt mit dC paart, sondern mit dA. Aus diesem Grund führt die Bildung von 8-oxodG in starkem Maße zu GC-zu-TA-Transversionen (Wood *et al.* 1990, Grollman u. Moriya 1993). Um sich vor diesen Mutationen zu schützen, besitzen humane Zellen neben der antioxidativen Abwehr weitere Schutz- und Reparaturmechanismen.

Am besten beschrieben ist die Basenexzisionsreparatur. Hierbei wird die Läsion aus der DNA entfernt, indem zunächst eine Glykosylase eine apurine Stelle in der DNA durch Ausschneiden der Base erzeugt und diese anschließend durch eine Endonuklease entfernt wird. Die entstehende Lücke wird durch DNA-Polymerase geschlossen. Die Formamido-pyrimidinglykosylase (FPG-Protein) aus *E. coli* besitzt sowohl eine Glykosylase- als auch eine Endonukleaseaktivität für die Reparatur von 8-oxodG-Läsionen (Boiteux *et al.* 1992, Tchou u. Grollman 1993). Für den Menschen sind Enzyme mit vergleichbarer Funktion beschrieben. Das humane Analog des Enzyms Oxoguaninglykosylase-1 (hOGG1) (Arai *et al.* 1997, Lu *et al.* 1997, Rosenquist *et al.* 1997, Aburatani *et al.* 1997) entfernt 8-Oxoguanin, welches mit Cytosin gepaart ist. Das Enzym hOGG2 entfernt 8-Oxoguanin, welches während der DNA-Replikation gegenüber Adenin in die DNA eingebaut wurde (Hazra *et al.* 1998). Da letzteres nur während der Replikation auftritt, wird vermutet, daß hOGG2 nur während der DNA-Replikation aktiv ist, während hOGG1 für die globale Reparatur im nicht replizierenden Genom zuständig ist (Hazra *et al.* 2001). Das Enzym hMYH entfernt mit 8-oxodG fehlgepaartes Adenin oder Guanin (Holmes *et al.* 1992, McGoldrick *et al.* 1995, Zhang *et al.* 1998). 8-oxodG wird anschließend durch hOGG2 entfernt. Zu beachten ist bei allen diesen Reparaturwegen, daß nicht die Nukleotide, sondern nur die Nukleobase 8-Oxoguanin freigesetzt wird. Somit kommen sie nicht als Quellen für 8-oxodG im Urin in Betracht.

Nukleotidexzisionsreparatur ist als Zusatz- bzw. Reservesystem für die Reparatur oxidativer Läsionen beschrieben (Huang *et al.* 1994, Dianov *et al.* 1998). Die Nukleotidexzisionsreparatur wird als spezifisch für große DNA-Addukte angesehen. Aufgrund der fehlenden Spezifität der DNA-Bindungseinheiten gegenüber kleinen DNA-Läsionen kommt es nur aufgrund unspezifischer Bindungen zur Nukleotidexzisionsreparatur dieser Läsionen. In Hefen konnte jedoch gezeigt werden, daß dieser Weg einen wesentlichen Anteil an der Reparatur dieser Läsionen hat (Scott *et al.* 1999). Deutliche Hinweise, daß die Beteiligung der

Nukleotidexzissionsreparatur an der Reparatur von 8-oxodG auch beim Menschen unterschätzt wurde, sind dadurch gegeben, daß Zellextrakte aus Zelllinien von *Xeroderma pigmentosa*-Patienten, einer Erkrankung, bei der die Nukleotidexzissionsreparatur gestört ist, deutlich geringere Reparaturkapazität gegenüber FPG-sensitiven Läsionen zeigen als Zellextrakte aus Zelllinien von gesunden Spendern (Jaiswal *et al.* 1998, Lipinski *et al.* 1999). ERCC1-Knockout-Mäuse zeigen erhöhte 8-oxodG-Konzentrationen in der Leber, welche durch ein ERCC1-Transgen auf die normalen Werte von Kontrolltieren sinken (Selfridge *et al.* 2000). Es konnte gezeigt werden, daß die Entfernung von 8-oxodG aus der DNA durch Nukleotidexzissionsreparatur mit ca. 1,5-facher Geschwindigkeit gegenüber der Entfernung von Cyclobutan-Thymidindimeren, einer großen DNA-Läsion, die als Referenz eingesetzt wird, geschieht (Reardon *et al.* 1997). Dies unterstreicht die biologische Signifikanz dieses Reparaturweges. Typischerweise entstehen bei Nukleotidexzissionsreparatur Oligomere mit einer Länge von bis zu 30 Nukleotiden (Huang *et al.* 1992). Für die Reparatur von 8-oxodG gibt es jedoch Hinweise, daß die durchschnittliche Länge bei nur 3 – 4 Nukleotiden liegt (Jaiswal *et al.* 1998). Durch den Angriff von Exonukleasen (Galloway *et al.* 1994) ist es denkbar, daß diese bis zum Mononukleotid hydrolysiert werden, welches nach Hydrolyse durch eine Nukleotidase zum Nukleosid durch die Zellwand transportiert werden kann und im Urin ausgeschieden wird (Hayakawa *et al.* 1995).

Zum Schutz vor der fälschlichen Inkorporation von 8-oxodG während der DNA-Replikation hydrolysiert hMTH im Nukleotidpool vorhandenes 8-oxodGTP zu 8-oxodGMP (Bialkowski u. Kasprzak 1998, Maki u. Sekiguchi 1992). Dieses ist kein Substrat für die DNA-Polymerase und kann wie oben beschrieben als Nukleosid im Urin ausgeschieden werden (Hayakawa *et al.* 1995).

Auch wenn die Mechanismen, die zur Präsenz von 8-oxodG im Urin führen, weniger gut beschrieben sind als die für 8-Oxoguanin, ist dennoch 8-oxodG als Marker im Urin für oxidativen Streß zu bevorzugen, da hierfür sichergestellt ist, daß er nicht durch die Nahrungsaufnahme beeinflusst ist. Bezüglich 8-Oxoguanin gibt es widersprüchliche Ergebnisse (Park *et al.* 1992, Helbock *et al.* 1998, Gackowski *et al.* 2001). Trotz der Unklarheiten bezüglich des Ursprungs von 8-oxodG im Urin ist allgemein anerkannt, daß dieser Marker die Belastung mit oxidativem Streß gut reflektiert (Collins *et al.* 1997a). Es ist jedoch zu beachten, daß die Ausscheidung von 8-oxodG im Urin ein Maß für die Belastung des Gesamtorganismus mit oxidativem Streß ist, nicht für die Belastung eines einzelnen Organs. Ferner stellt bei Annahme eines "Steady-State"-Modells, welche durch gegebene Reparaturmechanismen gerechtfertigt ist, die Ausscheidung von 8-oxodG im Urin ein Maß

für dessen Bildung dar, nicht für dessen Menge in der DNA in einem bestimmten Organ oder im Gesamtorganismus (Loft u. Poulsen 1998).

2.3.2 Methoden zu Bestimmung von 8-oxodG in DNA

2.3.2.1 DNA-Isolierung und -Hydrolyse

Um die Konzentration von 8-oxodG in der DNA als Marker für oxidativen Streß einsetzen zu können, sind Bestimmungsmethoden erforderlich, die eine exakte, reproduzierbare und einfache Analyse im verwendeten Testsystem (z. B. isolierte DNA, isolierte Plasmid-DNA, Zellen *in vitro*, Organe, periphere Blutzellen) erlauben. Die meisten Analysenverfahren erfordern die Isolierung der DNA aus dem Testsystem. Die DNA-Isolierung und -Hydrolyse muß mittels geeigneter Methoden durchgeführt werden, um eine artifizielle Oxidation von in großem Überschuß vorhandenem nicht modifiziertem dG zu 8-oxodG zu verhindern, die zu erhöhten Werten führen würde.

Die klassische Methode der DNA-Isolierung verwendet eine Phenol- und/oder Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion, um nach einem Verdau mit Proteinase K Proteinfragmente zu entfernen. Anschließend wird die DNA, die in der wäßrigen Phase verbleibt, mit Ethanol präzipitiert. Dieses Verfahren wurde in den Anfängen der Bestimmung von 8-oxodG vielfach eingesetzt. Jedoch schon bald wurden kritische Stimmen laut, daß in den Phenol-Zubereitungen grundsätzlich Phenoxyradikale enthalten sind, welche zu einer artifiziellen Oxidation von dG zu 8-oxodG führen können (Frenkel *et al.* 1991). Bereits früh wurde dies auch quantitativ nachgewiesen (Claycamp 1992; Finnegan *et al.* 1995), dennoch wurde noch lange eine kontroverse Diskussion geführt, insbesondere da das im Vergleich zur Phenoxyradikalen in großem Überschuß enthaltene Phenol ein Antioxidans in bezug auf die Bildung von 8-oxodG aus dG ist, da sein Oxidationspotential niedriger liegt (Shigenaga *et al.* 1994).

Alternativverfahren zur DNA-Isolierung ersetzen die Phenol-Extraktion durch Extraktion mit Sevag (Chloroform-Isoamylalkohol) (Frenkel *et al.* 1991), wobei auch hier reaktive Abbauprodukte enthalten sein können. Die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln läßt sich umgehen, wenn zur DNA-Isolierung eine Prozedur mit Pronase E und anschließender direkter Ethanol-Präzipitation verwendet wird (Kendall *et al.* 1991). Dieses Verfahren läßt sich zur Bestimmung von 8-oxodG anwenden (Finnegan *et al.* 1995), insbesondere wenn Antioxidantien wie z. B. butyliertes Hydroxytoluol während der Inkubation mit Pronase E zugesetzt werden (Adachi *et al.* 1995). Die Einschätzung, ob dieses Verfahren zu einer Verminderung der artifiziellen Oxidation führt, ist je nach Labor unterschiedlich (Finnegan

et al. 1995; Adachi *et al.* 1995; Helbock *et al.* 1998). Eine mögliche Quelle für eine artifizielle Oxidation bei diesem Verfahren ist die zur vollständigen Hydrolyse der Proteine nötige längere Inkubationszeit bei erhöhter Temperatur (Helbock *et al.* 1998).

Auch Luftsauerstoff kann zu einer artifiziellen Oxidation beitragen, weshalb die DNA-Isolierung unter sauerstofffreien Bedingungen durchgeführt werden sollte. Bei Verwendung einer DNA-Isolierungsmethode, die eine Phenol-Extraktion einschließt, kann Exposition gegenüber Luft zu einer vierfachen Erhöhung der 8-oxodG Werte führen (Claycamp 1992). Wird die Phenolextraktion durch direkte Präzipitation mit Ethanol umgangen, führen sauerstofffreie Bedingungen zwar nicht zu konsistent niedrigeren 8-oxodG Werten, aber die Werte sind besser reproduzierbar und präziser (Nakajima *et al.* 1996).

Die Diskussion, ob Phenolextraktion eine artifizielle Oxidation verursacht, endete erst, als in Laboratorien, welche diese Methode favorisierten, niedrigere 8-oxodG Werte mit einer alternativen Methode im Vergleich erhalten wurden (Helbock *et al.* 1998; Helbock *et al.* 1999). Mittlerweile besteht allgemeines Einvernehmen darüber, daß die DNA-Isolierung mittels Isopropanolfractionierung mit konzentrierter Natriumiodidlösung und SDS (Wang *et al.* 1994) die Methode der Wahl ist. Zur Bestimmung von 8-oxodG wurde diese Methode erstmals unter Verwendung eines Kits von WAKO Pure Chemical Industries Ltd. (Amagasaki, Japan) eingesetzt (Nakae *et al.* 1995). Sie kommt mit einer kurzen Inkubationszeit mit Proteinase K bei niedriger Temperatur (37 °C) aus. Durch die chaotropen Eigenschaften des Natriumiodids wird die zur Solvataion der DNA nötige Käfigstruktur des Wassers aufgehoben, wodurch diese in Gegenwart von Isopropanol ausfällt, während die nur teilweise verdauten Proteine in Lösung bleiben. Diese Methode läßt sich durch den Zusatz von 1 oder 0,1 mM DFAM, einem inkaktivierenden Eisenchelator, weiter optimieren (Helbock *et al.* 1998; Helbock *et al.* 1999). Dieser verhindert, daß bei der Zellyse oder beim Proteinverdau freigesetztes Eisen zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies durch Fenton-Reaktionen führt.

Eine andere Möglichkeit, die Artefaktbildung zu verhindern, ist, isolierte Zellen vor der DNA-Isolierung mit Antioxidantien zu inkubieren, so daß bei der Lyse freigesetzte reaktive Sauerstoffspezies nicht zu einer artifiziellen Oxidation von dG führen. Hierzu wurden DFAM, Histidin und reduziertes Glutathion erfolgreich eingesetzt (Kvam u. Tyrrell 1997). Diese Methode ist jedoch nicht für die DNA-Isolierung aus Geweben geeignet, weswegen sie sich nicht durchgesetzt hat. Ebenfalls nicht durchgesetzt hat sich der Einsatz von TEMPO (2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-N-oxyl), einem stabilen Radikal, welches auch als Spinfalle

eingesetzt wird, als Antioxidans in Kombination mit Phenol-Extraktion (Hofer u. Möller 1998).

Paradox ist, daß mit all den hier vorgestellten DNA-Isolierungsmethoden Unterschiede in verschiedenen Studien zwischen Kontroll- und Belastungsgruppen gemessen wurden, unabhängig davon, ob und wie stark artefaktanfällig sie sind. Besonders offensichtlich ist dieses Paradoxon in Hinblick auf die 8-oxodG-Gehalte in der DNA von Rattenlebern junger und alter Tiere, welche im gleichen Labor zu unterschiedlichen Zeitpunkten erst mit der klassischen Phenol-Chloroform-Methode (Fraga *et al.* 1990) und später mit der chaotropen Natriumiodid-Methode (Helbock *et al.* 1998) untersucht wurden. Während die Werte bei Verwendung der letzteren Methode um ca. den Faktor 35 unter den zuvor bestimmten Werten lagen, zeigt der Vergleich zwischen jungen (2 – 4 Monate) und alten (24 Monate) Ratten in beiden Fällen jeweils eine Erhöhung um einen Faktor in der Größenordnung 2,5. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, daß DNA alter Tiere stärker anfällig für artifizielle Oxidation während der Aufarbeitung ist, als die junger Tiere (Helbock *et al.* 1998). Dies wäre möglicherweise zurückzuführen auf eine größere Menge anwesender redoxaktiver Metalle wie z. B. Eisen im Gewebe älterer Tiere (Yip 1994). Die experimentelle Bestätigung dieser Hypothese steht jedoch noch aus. Insgesamt betrachtet bleibt bislang das angesprochene Paradoxon in vollem Umfang bestehen.

Einen weiteren kritischen Punkt stellt die enzymatische Hydrolyse der DNA dar. Als Einschränkung dieser Methode wurde wiederholt angeführt, daß möglicherweise die häufig verwendete Hydrolyse mittels Nuklease P1 und alkalischer Phosphatase nicht das gesamte 8-oxodG freisetzt. Studien an Modellsubstraten zeigen jedoch, daß diese Kombination zur Bestimmung von 8-oxodG sehr gut geeignet ist und die Basenmodifikation quantitativ freigesetzt wird (Maccubbin *et al.* 1991, Falcone u. Box 1997)

2.3.2.2 HPLC mit elektrochemischer Detektion

Der wesentliche Durchbruch, um die Bestimmung von 8-oxodG in biologischen Systemen und vor allem *in vivo* zu ermöglichen, wurde 1986 publiziert (Floyd *et al.* 1986). Durch die Verwendung von HPLC mit elektrochemischer Detektion im Oxidationsmodus konnte zum einen die Nachweisgrenze gegenüber der bisher verwendeten Detektion durch UV-Absorption bei 245 nm (Kasai u. Nishimura 1984) um den Faktor 1000 gesenkt werden. Zum anderen ist die elektrochemische Oxidation bei einem Potential in der Größenordnung von 400 mV selektiver als die UV-Absorption bei 245 oder 254 nm, so daß weniger störende Peaks bei der Chromatographie auftreten. Die Nachweisgrenze von Floyd *et al.* lag bei Verwendung eines

amperometrischen elektrochemischen Detektors im oberen Femtomolbereich. Bei der amperometrischen elektrochemischen Detektion findet keine quantitative elektrochemische Reaktion des Analyten statt. Da die elektrochemische Zelle aus einem Metallblech besteht, welches angespült wird, kommt nicht die Gesamtmenge des Analyten mit der Elektrode in Kontakt. Deshalb ist lediglich die fließende Stromstärke proportional der Konzentration des Analyten in der elektrochemischen Zelle, daher die Bezeichnung amperometrische Detektion. Bei den später von ESA (Chelmsford, USA) entwickelten coulometrischen Detektoren findet die elektrochemische Reaktion in einer Zelle aus Kohlenstoffritzen statt, welche eine um ein Vielfaches größere Oberfläche haben, wodurch eine quantitative elektrochemische Umsetzung des Analyten erreicht wird. In diesem Fall ist die Konzentration des Analyten in der elektrochemischen Zelle nicht nur proportional zur fließenden Stromstärke, sondern die Stoffmenge entspricht der Gesamtmenge der geflossenen Ladung gemäß dem 1. Faradayschen Gesetz (Vielstich 1975):

$$m = \text{const} \cdot Q = \text{const} \cdot I \cdot t$$

$$n = F \cdot Q = F \cdot I \cdot t$$

Hierbei ist m die Masse eines Stoffes bzw. Analyten, Q die Ladung, I die Stromstärke, t die Zeit, n die Stoffmenge und F die Faradaysche Konstante (96494 As), die einem Mol Elektronen entspricht. Auf dieser Eigenschaft beruht die Bezeichnung coulometrisch. Durch die quantitative Umsetzung ist die Stromstärke höher als beim amperometrischen Verfahren, wodurch die Nachweisempfindlichkeit bis in den unteren Femtomolbereich hinein verbessert wird. In der Regel werden bei Verwendung von Umkehrphasen zur chromatographischen Trennung die Nukleoside analysiert, da die Nukleobasen nahe dem Totvolumen der Säule eluieren, wodurch es zu Störungen durch koeluierende, elektrochemisch aktive Verbindungen kommt.

2.3.2.3 HPLC mit Tandemmassenspektrometrie (LC-MS-MS)

Erstmals wurde dieses Verfahren in Kombination mit einer DNA-Isolierung unter Verwendung eines Phenol-Chloroform-Extraktionsschritts eingesetzt (Serrano *et al.* 1996). Aufgrund der hierdurch bedingten Artefaktbildung lagen die gemessenen Werte hoch. Wird die Phenol-Extraktion umgangen, findet man die gleichen Werte wie mittels HPLC-ECD (Ravanat *et al.* 1998). Auch die mit LC-MS-MS erreichten Nachweisgrenzen liegen in der gleichen Größenordnung wie bei der Verwendung von HPLC und coulometrischer elektrochemischer

Detektion (Ravanat *et al.* 1998). Beim LC-MS-MS-Verfahren wird im ersten Quadrupol das Nukleosid ($[M+H]^+$ $m/z = 284$) isoliert, welches im zweiten zu Zucker und Base fragmentiert wird. Im dritten Quadrupol wird nun das Basenbruchstück ($[B+H_2]^+$ $m/z = 168$) detektiert, wodurch eine hohe Selektivität der Detektion erreicht wird. Die Ansprüche an die chromatographische Trennung werden hierdurch geringer. Zur exakten Quantifizierung muß mit dem Isotopenverdünnungsverfahren gearbeitet werden, um unterschiedliche Matrixeffekte und Ionisierungsausbeuten ausgleichen zu können. Dies wird so bisher nicht immer durchgeführt (Serrano *et al.* 1996). Hierin liegt auch ein wesentlicher Nachteil dieser Methode begründet. Der hierzu erforderliche M+4 interne 8-oxodG Standard steht bisher kommerziell nicht zur Verfügung und die Synthese ist sehr aufwendig (Ravanat *et al.* 1995). Ferner stellt die Anschaffung eines LC-MS-MS ein hohes Investitionsvolumen dar.

2.3.2.4 GC mit Massenspektrometrie (GC-MS)

Bevor 8-oxodG in DNA mittels HPLC-ECD quantifiziert werden konnte (Floyd *et al.* 1986), wurde eine andere empfindliche Nachweismethode entwickelt. Die Ausdehnung des Nachweises verschiedener oxidativer DNA-Modifikationen mittels GC mit massenspektrometrischer Detektion (Dizdaroglu 1984) auf 8-oxodG (Dizdaroglu 1985; Dizdaroglu u. Bergtold 1986) wurde zunächst ebenfalls als Durchbruch bei der Etablierung von 8-oxodG als Marker für oxidativen Streß gewertet, allerdings mußte dieses Verfahren später große Rückschläge hinnehmen (Cadet *et al.* 1998).

Nach Isolierung der DNA werden in der Regel durch saure Hydrolyse die Nukleobasen freigesetzt. Der Nachweis erfolgt in der Regel auf der Ebene der Nukleobasen, da er empfindlicher ist als der Nachweis der Nukleoside (Dizdaroglu 1993). Die Hydrolyse zu den Nukleobasen wird häufig mit Ameisensäure oder Salzsäure bei 140 °C in evakuierten versiegelten Probengefäßen durchgeführt. Unter diesen drastischen Bedingungen kann es zu einer Zersetzung oxidativ modifizierter Nukleobasen kommen. Eine Zyklisierung wurde vor allem für Formamidopyrimidinguanin (Swarts *et al.* 1996; Douki *et al.* 1997) und zu einem geringeren Ausmaß für Formamidopyrimidinadenin (Douki *et al.* 1997) beschrieben. Die Angaben, ob 8-Oxoguanin unter diesen Bedingungen stabil ist, sind kontrovers (Swarts *et al.* 1996; Douki *et al.* 1997), jedoch ist die Stabilität auf jeden Fall größer als bei den obengenannten Modifikationen. Zersetzungsreaktionen lassen sich durch Einsatz von HF-Pyridin zur Hydrolyse umgehen, was wesentlich schonender ist (Douki *et al.* 1997). Um eine gaschromatographische Auftrennung zu ermöglichen, müssen die nicht flüchtigen Nukleobasen durch Derivatisierung in flüchtige Verbindungen umgewandelt werden. Hierfür wird in der Regel

das in der GC-MS weitverbreitete Silylierungsreagenz Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA) eingesetzt. Hierbei stellen unterschiedliche Derivatisierungsausbeuten einen weiteren kritischen Punkt dar. Um diese auszugleichen, muß mit dem Isotopenverdünnungsverfahren (Dizdaroglu 1993) gearbeitet werden, was vor 1993 nicht und auch heute nicht immer durchgeführt wurde bzw. wird. Weitaus kritischer ist jedoch die artifizielle Oxidation von nicht modifiziertem Guanin zu 8-Oxoguanin während der Silylierungsreaktion. Es konnte gezeigt werden, daß dies zu einer zehn- bis fünfzigfachen Überschätzung des 8-oxodG-Gehalts der DNA verglichen mit den mittels HPLC-ECD ermittelten Werten führen kann (Hamberg u. Zhang 1995; Ravanat *et al.* 1995). Grundsätzlich gilt dies auch für die artifizielle Bildung anderer oxidierter DNA-Basen aus den nicht modifizierten Nucleobasen, wie für 8-Oxoadenin, 5-OH-Cytosin, 5-Formyluracil und 5-Hydroxymethyluracil gezeigt wurde (Douki *et al.* 1996).

Die effizienteste Art, diese Artefaktbildung zu umgehen, ist die Abtrennung der zu untersuchenden Basenmodifikation vom großen Überschuß der nicht modifizierten Base mittels HPLC oder Immunoaffinitätschromatographie (Ravanat *et al.* 1995). Die Verwendung von HPLC/GC-MS führt zu ähnlichen Werten für 8-oxodG wie die Verwendung von HPLC-ECD (Cadet *et al.* 1997; Douki *et al.* 1996). Eine andere Möglichkeit, die Artefaktbildung zu reduzieren, ist, die Derivatisierung bei Raumtemperatur statt bei 130 °C durchzuführen (Hamberg u. Zhang 1995). Die Zugabe von Antioxidantien wie Ethanthiol (Jenner *et al.* 1998) oder N-Phenyl-1-naphthylamin (Hong *et al.* 1998) ggf. zusätzlich zur Reduktion der Derivatisierungstemperatur wurde ebenfalls vorgeschlagen.

Unbestrittener Vorteil der GC-MS-Methode ist die Möglichkeit, verschiedene oxidative Basenmodifikationen gleichzeitig zu messen, wobei eine eindeutige Identifikation des Analyten über das Moleküllion möglich ist (Dizdaroglu 1998). Unbestritten ist jedoch auch, daß es durch den Derivatisierungsschritt unter konventionellen Bedingungen zur Bildung eines starken Artefakts kommen kann, welcher zu einer großen Überschätzung des 8-Oxoguaningehalts führt. Die Abtrennung der nicht modifizierten Nucleobasen, um dies zu vermeiden, ist aufwendig. Andere Methoden, wie Temperaturabsenkung oder Zusatz von Antioxidantien sind bisher nicht ausreichend validiert und werden teilweise kontrovers diskutiert (Dizdaroglu 1998). Aufgrund dieser Beschränkungen und Unsicherheiten wird der Einsatz von GC-MS zur Messung von 8-Oxoguanin in DNA in der gegenwärtigen Literatur wenig favorisiert.

2.3.2.5 ^{32}P -Postlabeling

Das ^{32}P -Postlabeling ist eines der sensitivsten Analysenverfahren zur Messung von DNA-Basenschäden in zellulärer DNA. Es basiert auf dem enzymatischen radioaktiven Postlabeling der 3'-Monophosphate der modifizierten Nukleoside mittels Polynukleotidkinase und $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ und anschließender analytischer Auftrennung durch Dünnschichtchromatographie oder HPLC und Radioaktivitätsmessung. Auch der Einsatz dieses Verfahrens ist aufgrund einer Artefaktbildung limitiert. Die mittels dieses Verfahrens bestimmten Werte lagen anfänglich hundertfach über den Werten, die man bei Verwendung von HPLC-ECD erhält (Devanaboyina u. Gupta 1996; Randerath *et al.* 1997). Dies ist, wie in voneinander unabhängigen, zeitgleich publizierten Arbeiten gezeigt werden konnte, zurückzuführen auf die Radiolyse von Wasser durch den Zerfall von ^{32}P und die damit verbundene Generierung von Hydroxylradikalen (Schuler *et al.* 1997; Möller u. Hofer 1997). Durch Einwirken der β -Strahlung aus dem Zerfall von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ kam es zur dosisabhängigen Bildung von 8-oxodG aus dG, bestimmt mittels HPLC-ECD. Die Verwendung von energieärmer strahlendem $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ resultierte in einer noch höheren Bildungsrate (Schuler *et al.* 1997), was vermutlich auf einen höheren Energieübertrag bei niedrigerer β -Energie zurückzuführen ist, der zu einer höheren Energiedichte in der Reaktionsmischung führt. Ein naheliegender Lösungsansatz ist auch hier die chromatographische Abtrennung nicht modifizierter Nukleotide bzw. Anreicherung von 8-oxodG-3'-monophosphat. Dies kann durch Dünnschichtchromatographie (Gupta u. Arif 1998), HPLC (Möller u. Hofer 1997; Schuler *et al.* 1997; Cadet *et al.* 1998; Zeisig *et al.* 1999) oder Kapillarelektrophorese (Podmore *et al.* 1997) erfolgen. Mittels einer ^{32}P -Postlabeling Methode mit HPLC-Separation (^{32}P -HPLC) nach vorheriger Abtrennung von nicht modifiziertem dG-3'-monophosphat mittels HPLC wurden 8-oxodG-Gehalte in DNA humaner Lymphozyten ermittelt, die in der gleichen Größenordnung lagen wie mit HPLC-ECD ermittelte Werte, und mit diesen gut korrelierten (Cadet *et al.* 1998). Ein weiterer Ansatz ist, enzymatische Verfahren anzuwenden, welche gezielt nur die modifizierten Nukleoside in labelbare Spezies überführen. Dies kann zum Beispiel durch Schlangengiftphosphodiesterase (SVPD) geschehen, die bestimmte oxidierte Läsionen in labelbare Dimere überführt, während nicht modifizierte Nukleotide zu nicht labelbaren Mononukleosiden hydrolysiert werden (Jones *et al.* 1999). Auch eine spätere artifizielle Oxidation von dG zu 8-oxodG führt damit nicht zu einer Erhöhung des Analyseergebnisses, da dieses als Mononukleosid in einer nicht labelbaren Form vorliegt. Allerdings wurde dieses Verfahren bisher nur mit Kalbsthymus-DNA durchgeführt. Eine Validierung mit authentischen biologischen Proben steht bisher aus.

Ein großer Vorteil des Nachweises mittels ^{32}P -Postlabeling liegt in der hohen Empfindlichkeit des Verfahrens. Beim beschriebenen ^{32}P -HPLC-Verfahren sind zum Nachweis von 8-oxodG nur wenige Mikrogramm DNA erforderlich, wobei allerdings bei DNA-Mengen unter fünf Mikrogramm eine zunehmende Artefaktbildung zu beobachten war. Diese geringe Nachweisgrenze macht das Verfahren geeignet zur Anwendung in Fällen, in denen nur geringe DNA-Mengen zur Verfügung stehen, z. B. im Falle von Biopsien. Der große Aufwand, der mit dieser Methode verbunden ist, schränkt andererseits die Anwendung auf große Probenzahlen, wie sie häufig bei molekularepidemiologischen oder toxikologischen Studien zu bewältigen sind, weiter ein.

2.3.2.6 Immunchemische Nachweisverfahren

Immunchemische Nachweisverfahren wie ELISA oder Immunoslotblot bieten den Vorteil, bei geringem Aufwand einen hohen Probendurchsatz zu ermöglichen. Ein auf dem monoklonalen Antikörper 1F11 basierender ELISA lieferte gegenüber HPLC-ECD um den Faktor 10 höhere Werte, die jedoch mit diesen gut korrelierten (Yin *et al.* 1995). Allerdings ist eine Probenvorbereitung mittels Immunoaffinitätschromatographie erforderlich. Ein auf dem Antikörper N45.1 basierender, kommerziell erhältlicher ELISA (Japan Institute for the Control of Aging, Fukuroi; GENOX Corp., Baltimore) (Kantha *et al.* 1996) kann laut Herstellerangaben ebenfalls für die Analyse von 8-oxodG in DNA eingesetzt werden. Untersuchungen, die diese Methoden verwenden, wurden bisher jedoch nicht publiziert. Die Verwendung eines Immunoslotblots mit einem polyklonalen Antiserum erlaubt die Quantifizierung in genomischer DNA ohne vorherige Hydrolyse zu Nukleotiden oder Nukleobasen (Musarrat u. Wani 1994). Die gemessenen Werte lagen um zwei bis drei Größenordnungen über den üblicherweise mit HPLC-ECD ermittelten Werten. Generelles Problem bei diesen immunchemischen Nachweisverfahren ist die Kreuzreaktivität der Antikörper. Bereits eine geringe Kreuzreaktivität gegenüber nicht modifizierten DNA-Basen oder anderen zellulären Molekülen führt aufgrund des großen Überschusses zur Verfälschung des Meßergebnisses. Um solche Nachweisverfahren routinemäßig in Studien einsetzen zu können, ist zunächst die Entwicklung neuer Antikörper erforderlich, welche höchste Spezifität aufweisen.

Ein anderer Ansatz ist der Nachweis an Gewebeschnitten oder in fixierten Zellkulturen mittels Immunhistochemie. Hierzu wurde sowohl der monoklonale Antikörper 1F7 (Yarborough *et al.* 1996) als auch der monoklonale Antikörper N45.1 (Toyokuni *et al.* 1997), der nicht mit dG kreuzreagiert, erfolgreich eingesetzt. Dieses Verfahren erlaubt jedoch keine

exakte Quantifizierung, sondern nur einen relativen Vergleich zwischen einzelnen Proben, und soll daher in diesem Rahmen nicht weiter erörtert werden.

2.3.2.7 Indirekte Bestimmung mittels Reparaturenzymen

Dieses Verfahren liegt ein grundsätzlich anderes Prinzip als bei der chemischen Analyse der Basenmodifikationen zu Grunde. Sie beruhen darauf, unter Verwendung isolierter bakterieller Reparaturenzyme Basenmodifikationen in zusätzliche Strangbrüche oder abasische Läsionen zu überführen, welche unter alkalischen Bedingungen zu Strangbrüchen werden. Diese werden dann mit unterschiedlichen Verfahren detektiert. Zur Messung oxidativer DNA-Läsionen werden vor allem FPG-Protein und Endonuklease III verwendet. Das FPG-Protein ist ein Reparaturenzym aus *E. coli*, welches als Substrat vor allem 8-oxodG und die seltener auftretenden Formamidopyrimidine hat. Es besitzt sowohl eine Glykosylaseaktivität, die für die Abspaltung und Freisetzung der modifizierten Base verantwortlich ist, als auch eine Endonukleaseaktivität, welche anschließend durch Elimination der Desoxyribose die apurine Stelle in einen Einzelstrangbruch überführt (Boiteux *et al.* 1992; Cunningham 1997). Endonuklease III erkennt vor allem Thyminglykol (Asahara *et al.* 1989).

Das einfachste Testsystem zum Nachweis von Strangbrüchen ist der Plasmid-Relaxations-Assay (Seawell u. Ganesan 1981) an isolierter Plasmid-DNA, entweder nach Exposition der isolierten Plasmide oder nach Exposition plasmidhaltiger Bakterien und Plasmidisolierung. Hierbei wird ausgenutzt, daß die DNA ungeschädigter Plasmide in der supercoiled-Form vorliegt, die durch Einzelstrangbrüche in die offen zirkuläre Form und durch Doppelstrangbrüche in die lineare Form überführt werden. Diese unterschiedlichen DNA-Formen lassen sich durch Elektrophorese in einem Agarosegel auftrennen, wobei die supercoiled-Form die höchste elektrophoretische Mobilität und die offen zirkuläre Form die niedrigste elektrophoretische Mobilität besitzt. Nach Färbung mit Ethidiumbromid läßt sich ein solches Gel unter Verwendung eines UV-Transilluminators videodensitometrisch quantitativ auswerten. Unter Verwendung verschiedener Reparaturenzyme mit unterschiedlicher Substratspezifität lassen sich mit diesem Verfahren auch sogenannte Schadensprofile erstellen, die für einige schädigende Noxen spezifisch sein können (Epe u. Hegler 1994; Epe 1996).

Ein weiteres Verfahren zur Messung von Strangbrüchen ist die alkalische Filterelution (Kohn *et al.* 1976). Bei diesem Verfahren werden isolierte Zellen auf einem Membranfilter lysiert und die so freigelegte DNA mittels eines alkalischen Elutionspuffers eluiert. Je stärker die DNA durch Strangbrüche fragmentiert ist, umso schneller eluiert sie vom Filter. Trägt man den DNA-Gehalt auf dem Filter gegen die Elutionszeit auf, läßt sich aus der Steigung der

Geraden die Fragmentierungsstärke der DNA bestimmen. Auch dieses Verfahren läßt sich modifizieren, indem nach der Zellyse auf dem Filter mit geeigneten Reparaturenzymen inkubiert wird, um die erkannten Läsionen in Strangbrüche zu überführen, bevor die alkalische Elution durchgeführt wird (Epe u. Hegler 1994; Epe 1996). Dieses Verfahren wird ebenfalls unter Verwendung verschiedener Reparaturenzyme mit unterschiedlicher Substratspezifität zur Erstellung von Schadensprofilen eingesetzt.

Ähnlich läßt sich auch die alkalische Einzelzellgelelektrophorese (Comet-Assay) modifizieren. Beim Comet-Assay werden in Agarosegele eingebettete Zellen lysiert und die hierbei resultierende strukturierte DNA (Nukleioide) im alkalischen Milieu einer Elektrophorese unterworfen (Singh *et al.* 1988; McKelvey-Martin *et al.* 1993). Hierbei wandern nicht wie bei einer "normalen" Gelelektrophorese DNA-Bruchstücke, dazu sind die mittels des Comet-Assays untersuchten Fragmente zu groß. Bei der DNA, die aus dem Kern auswandert, handelt es sich vermutlich um relaxierte Schleifen, welche vormals um Histone gewickelt waren und nach deren Entfernung durch Strangbrüche relaxieren. Die Natur der Kometen und die physikalisch-chemischen Vorgänge, die zu Ihrer Bildung führen, sind jedoch noch nicht abschließend geklärt (Collins *et al.* 1997b). Nach Färbung z. B. mit Ethidiumbromid entsteht unter dem Fluoreszenzmikroskop durch die aus dem Kern auswandernde DNA das Bild eines der DNA-Wanderungsrichtung entgegengesetzt fliegenden Kometen. Der vom Kopf abgesetzte Schweif ist hierbei das Maß für die Stärke der DNA-Schädigung. Die Auswertung erfolgt entweder visuell durch Einteilung in Schadensklassen oder computergestützt. Im letzteren Fall stehen unterschiedliche Meßgrößen wie Schweiflänge und DNA-Gehalt im Schweif zur Verfügung, sowie hieraus abgeleitet gewichtete Meßgrößen, wie z. B. das sogenannte "Tailmoment" (McKelvey-Martin *et al.* 1993). Auch hier läßt sich die DNA nach der Zellyse mit Reparaturenzymen inkubieren, wodurch geeignete Läsionen in zusätzliche Strangbrüche überführt werden. Dies erfolgte zunächst mit Endonuklease III (Collins *et al.* 1993). Später fand auch das 8-oxodG-erkennende FPG-Protein Einsatz (Collins *et al.* 1997b). Seltener angewendet wird das Verfahren der alkalischen Entwindung ("alkaline unwinding"). Dieses Verfahren beruht darauf, daß doppelsträngige DNA im alkalischen Milieu beginnt, sich von den Einzelstrangbrüchen her zu entwinden (Ahnström u. Erixon 1973). Die nach Zellyse erhaltene strukturierte DNA (Nukleioide) wird nach der alkalischen Entwindung durch Ultraschallbehandlung fragmentiert. Fragmente, die aus entwundener DNA stammen, liegen nun als Einzelstränge vor, nicht entwundene DNA als doppelsträngige Fragmente, die sich durch Chromatographie an Hydroxylapatit trennen und anschließend z. B. fluorimetrisch quantifizieren lassen. Auch hier lassen sich geeignete Basenläsionen durch die Inkubation der

Nukleotide mit Reparaturenzymen vor der alkalischen Entwindung in zusätzliche Strangbrüche überführen (Hartwig *et al.* 1996).

Um die aus solchen Experimenten erhaltenen Kennzahlen in Strangbruchzahlen bzw. Anzahl von Basenmodifikationen umrechnen zu können, ist eine externe Standardisierung erforderlich. Diese erfolgt in der Regel durch Behandlung mit Röntgenstrahlung. Für Röntgenstrahlung ist die Zahl direkt induzierter Strangbrüche bekannt (Ahnstrom u. Edvardsson 1974; Goodhead 1989; Roots *et al.* 1990). Ein Problem hierbei ist, daß Röntgenstrahlung ein anderes Schadensmuster verursacht als andere oxidative Einflüsse. Während bei Röntgenstrahlung aufgrund ihrer physikalischen Natur Strangbrüche gleichmäßig verteilt sind, kann es bei anderen oxidativen Einflüssen zu einer Häufung oxidativ veränderter Basen in einzelnen DNA-Abschnitten kommen. Insbesondere werden benachbarte Läsionen, wie für 8-oxodG als naheliegend beschrieben (Buettner *et al.* 1999), bei diesen Methoden als nur ein Strangbruch erfaßt. Die Eichung mittels Röntgenstrahlung wird in der Regel als externes Experiment durchgeführt und nur selten in regelmäßigen Abständen wiederholt. Durch kleine Änderungen bei der Durchführung des Nachweisverfahrens kann es zu einer Verschiebung gegenüber der Eichung kommen. Da das Substratspektrum der Reparaturenzyme in der Regel mehrere Läsionen umfaßt, lassen sich keine exakten Werte für bestimmte Läsionen angeben. Aufgrund dieser fehlenden Spezifität sind Ergebnisse aus solchen Experimenten als Obergrenze für eine bestimmte Läsion anzusehen (Pflaum *et al.* 1997). Andererseits kann es durch mangelnde Effizienz des Reparaturenzyms zu einer Unterschätzung des Schadens kommen, z. B. wenn ein Schaden in bestimmten Sequenzen nicht erkannt wird (Collins *et al.* 1997). Der Nachweis, daß der Einsatz einer höheren Enzymkonzentration nicht zu einer Erhöhung der detektierten Läsionen führt, schließt dies nicht aus. Diese Probleme schränken die Anwendung dieser Methoden für eine exakte Quantifizierung stark ein und können eine Erklärung für die gegenüber HPLC-ECD um den Faktor 3 – 10 niedrigeren Werte für 8-oxodG sein. Andererseits kann auch eine zusätzliche Artefaktminimierung bei diesen Verfahren vorliegen, da die DNA nicht vollständig in Substanz isoliert werden muß (Pouget *et al.* 1999). Insbesondere für den relativen Vergleich unterschiedlicher Proben innerhalb eines Experimentes sind diese bereits auf eine geringe Schädigung ansprechenden Methoden dennoch gut geeignet.

2.3.2.8 Kombination enzymatischer Methoden mit chemischer Analytik

Bakterielle Reparaturenzyme lassen sich auch nutzen, um gezielt oxidativ veränderte Basenmodifikationen aus genomischer DNA für eine chemische Analyse zu erhalten, so daß

der potentiell artefaktanfällige Hydrolyseschritt in Gegenwart eines großen Überschusses nicht modifizierter Basen umgangen wird. Anschließend werden die ausgeschnittenen Basen durch Ultrafiltration abgetrennt und analysiert. Die DNA muß extern z. B. durch fluorimetrische Verfahren quantifiziert werden. Während die Kombination dieses Verfahrens mit HPLC-ECD 8-oxodG-Werte in der gleichen Größenordnung lieferten wie HPLC-ECD (Beckman u. Ames 1999), lagen die mit GC-MS detektierten Werte um eine halbe Größenordnung darunter (Jaruga *et al.* 2000), obwohl hier eine verlängerte Inkubationszeit bei der DNA-Isolierung eingesetzt wurde, was zu einer zusätzlichen Artefaktbildung führen kann. Dieser Widerspruch sowie die fehlende Validierung der Methoden lassen sie gegenwärtig für den Routineeinsatz als noch nicht geeignet erscheinen.

2.3.3 Methoden zu Bestimmung von 8-oxodG in Urin

Bei der Bestimmung von 8-oxodG in DNA stellt die Artefaktbildung aus in großem Überschuß vorhandenem dG das größte Problem dar. Dies kann bei der Messung im Urin weitgehend vernachlässigt werden, da Urin im Verhältnis weniger dG enthält. Hier liegt die Schwierigkeit vielmehr in der Abtrennung des Analyten von seiner komplexen Matrix.

2.3.3.1 Instrumentell-analytische Nachweisverfahren

Der Nachweis von 8-oxodG in Urin mittels HPLC-ECD wurde erstmals nach einer fünfstufigen Festphasenextraktion durchgeführt, wozu Aliquots von ca. 200 ml Urin erforderlich waren (Cundy *et al.* 1988; Shigenaga *et al.* 1989). Die Aufarbeitung durch Festphasenextraktion für den Nachweis mittels HPLC-ECD kann bei Einsatz von Immunoaffinitätschromatographie auf eine Stufe verkürzt werden. Die Immunoaffinitätschromatographie wurde zunächst mit einem polyklonalen Antiserum aus dem Kaninchen durchgeführt (Degan *et al.* 1991). Durch den Einsatz eines monoklonalen Antikörpers lassen sich Immunoaffinitätschromatographiesäulen prinzipiell reproduzierbarer herstellen. Mit dem monoklonalen Antikörper 15A3 wurde ein solcher entwickelt und für ein entsprechendes Verfahren zur Aufreinigung von 8-oxodG aus Urin etabliert (Park *et al.* 1992; Shigenaga *et al.* 1994). Der Antikörper wird als Ascites produziert und steht kommerziell zur Verfügung. Dennoch fand dieses Verfahren nur einmal Anwendung im Rahmen einer Studie (Klaunig *et al.* 1999). Zwei mehrdimensionale HPLC-ECD Verfahren wurden unabhängig voneinander entwickelt. Nach automatisierter Festphasenextraktion ist es möglich, mittels zweidimensionaler HPLC-ECD 8-oxodG zu quantifizieren (Tagesson *et al.* 1992; Tagesson *et al.* 1995). Alternativ kann durch dreidimensionale HPLC-ECD die automatische

Festphasenextraktion ersetzt werden, indem die erste Säule als Extraktionssäule dient und zurückgespült wird (Loft *et al.* 1992; Loft *et al.* 1993). Durch mehrfache Festphasenextraktion an derselben Säule und anschließende HPLC-ECD ist ebenfalls die Quantifizierung möglich. Der Analyt liegt hierbei jedoch in einem großen Volumen vor, weshalb vor der Analyse große Mengen Lösungsmittel entfernt werden müssen (Germadnik *et al.* 1997). Ein kommerzieller Assay verwendet für die HPLC ein spezielles Säulenmaterial ("Carbon Column") und zur Detektion einen elektrochemischen Arraydetektor (Bogdanov *et al.* 1999). Dieses Verfahren steht allerdings nur im Rahmen von Auftragsanalytik zur Verfügung, da diese Säulen bisher nicht kommerziell erhältlich sind.

Der Nachweis mittels GC-MS erfordert eine Probenvorbereitung durch Festphasenextraktion und die Aufreinigung und -konzentration mittels semipräparativer HPLC nach Derivatisierung (Teixeira *et al.* 1995). Ebenfalls durch GC-MS nach präparativer HPLC gelang der parallele Nachweis verschiedener oxidierter Basen (Ravanat *et al.* 1999). Erstmals wurde 8-Oxoguanin in Urin mittels GC-MS gemessen (Stillwell *et al.* 1989).

Mittels LC-MS-MS und dem Isotopenverdünnungsverfahren ist die Quantifizierung ohne anspruchsvolle chromatographische Trennung möglich, wozu allerdings ein interner deuterierter Standard (M+4) erforderlich ist, der nicht kommerziell zur Verfügung steht (Weimann *et al.* 1999).

2.3.3.2 Immunchemische Nachweisverfahren

Der bereits genannte kommerziell erhältliche ELISA (s. 2.3.2.6), der auf dem monoklonalen Antikörper N45.1 (Toyokuni *et al.* 1997) basiert, wird auch zum Nachweis von 8-oxodG in Urin verwendet. Er fand bisher vor allem in klinischen Studien Anwendung (z. B. Erhola *et al.* 1997; Witherell *et al.* 1998).

2.3.4 Lipidperoxidation

Durch Peroxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren werden eine Reihe von Substanzen, die DNA-schädigende Wirkung zeigen, gebildet. Neben der Aufnahme solcher Produkte z. B. mit der Nahrung (Shamberger *et al.* 1977) spielen sie auch eine große Rolle als endogen gebildete Stoffe. Dies wird durch Untersuchungen von DNA-Addukten, die als Reaktionsprodukte dieser Spezies entstehen können, in Tieren und Menschen, die nicht gegenüber einer erhöhten Konzentration von Karzinogenen exponiert waren, belegt (Nair *et al.* 1995; Chen *et al.* 1996). Reaktive Sauerstoffspezies können im zellulären Umfeld verschiedene Ziele angreifen. Neben Nukleinsäuren und Proteinen kommen hier insbesondere mehrfach ungesättigte Lipide in

Betracht, da sie zum einen in großer Menge in den Zellmembranen vorliegen und zum anderen besonders empfindlich gegenüber Autoxidation sind (Chaudhary *et al.* 1994; Lokesh *et al.* 1981). Gegenüber einfach ungesättigten Lipiden liegt die Dissoziationsenergie für bis-allylische Wasserstoffatome mehrfach ungesättigter Lipide um ca. 10 kcal/mol niedriger (Porter *et al.* 1995).

Da es sich um eine radikalische Kettenreaktion handelt, läßt sich auch die Lipidperoxidation in drei formelle Phasen aufteilen. In der *Initiationsphase* kommt es durch das Einwirken einer reaktiven Sauerstoffspezies zur Abstraktion eines Wasserstoffatoms. Hierdurch entsteht ein Lipidradikal. Durch die Addition eines Sauerstoffmoleküls kommt es in der *Propagationsphase* zur Bildung eines Lipidperoxyradikals, welches durch Abstraktion eines Wasserstoffatoms von weiteren Lipidmolekülen unter Bildung eines Lipidhydroperoxids den Fortgang der Kettenreaktion aufrecht erhält. Weitere Reaktionen in dieser Phase können Fragmentierung, Umlagerung und Zyklisierung sein (Porter *et al.* 1995). Zur *Terminierung* kann es durch Reaktion von Radikalen miteinander oder mit Radikalfängern wie z. B. Antioxidantien kommen.

Je nach Art der ursprünglichen Lipide kann eine Vielzahl von stabilen Lipidperoxidationsprodukten entstehen, die toxische Eigenschaften haben. Vor dem Hintergrund der Krebsentstehung sind vor allem solche Lipidperoxidationsprodukte interessant, die ein mutagenes Potential besitzen. Nach Exposition von DNA gegenüber Lipidhydroperoxiden wurde die Bildung von 8-oxodG beobachtet (Kasai und Nishimura 1989; Park und Floyd 1992). Ein generelles Problem bei der Interpretation dieser Befunde ist jedoch, daß diese Schäden möglicherweise nicht durch die Lipidhydroperoxide *per se* verursacht wurden, sondern durch deren Zersetzungsprodukte (Vaca *et al.* 1988).

Besser untersucht sind Substanzen, die vor allem in der Terminationsreaktion (Frankel 1985) entstehen könne. Hierbei handelt es sich um eine Vielzahl von Carbonylverbindungen (Esterbauer 1982):

- Malondialdehyd (MDA)
- Alkanale (z. B. Pentanal, Hexanal, Heptanal, Oktanal etc.)
- Alkenale (z. B. 2-Propenal, 2-Butenal, 2-Pentenal, 2-Hexenal, 2-Heptenal, 2-Oktanal etc.)
- Ketone (z. B. Butanon, 2-Pentanon, 3-Pentanon, 2-Oktanon etc.)
- 2,4-Alkadienale (z. B. Heptadienal, Nonadienal, Decadienal etc.)
- 4,5-Dihydroxydecanal, 4-Hydroxy-2,5-nonadienal, 5-Hydroxyoktanal
- 4-Hydroxy-2-alkenale (z. B. 4-Hydroxy-2-nonenal (4-HNE), 4-hydroxy-2-octenal).

Von toxikologischem Interesse sind hiervon vor allem Malondialdehyd, 4-Hydroxynonenal und verschiedene 2-Alkenale.

2.3.4.1 Malondialdehyd (MDA)

Quantitativ ist Malondialdehyd das Hauptprodukt der Lipidperoxidation. Es entsteht aus allen Fettsäuren, die mehr als zwei ungesättigte Bindungen enthalten. Die exogene Exposition durch Nahrungsmittel spielt ebenfalls eine große Rolle, da es sich auch um ein Zersetzungsprodukt von Fetten in Nahrungsmitteln handelt (Shamberger *et al.* 1977).

Der größte Teil des in Organismen vorhandenen Malondialdehyds liegt aufgrund seiner hohen Reaktivität an Proteine gebunden vor. MDA ist auch in der Lage, mit Guanin (M_1G), Adenin (M_1A) und Cytosin (M_1C) DNA-Addukte zu bilden, die mutagen sind (Marnett 1994). Die Struktur dieser Addukte ist in Abb. 2.9 gezeigt.

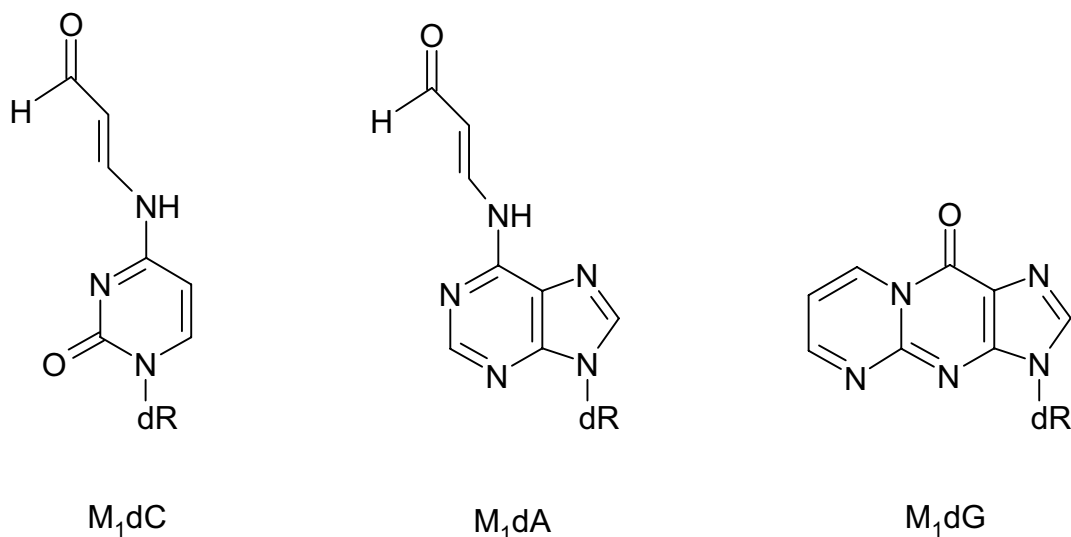


Abb. 2.9
Strukturformel Malondialdehyd-DNA-Addukte (Marnett 1994)

Von diesen Addukten ist vor allem M_1G bisher ausführlich untersucht worden. Es läßt sich mittels GC-MS (Chaudhary *et al.* 1994) oder ^{32}P -Postlabelling (Vaca *et al.* 1992) messen. Eine immunchemische Methode ermöglicht den Durchsatz auch großer Probenzahlen mittels Immunodotblot (Leuratti *et al.* 1998).

Vor allem der einfache Nachweis von Malondialdehyd in Blutplasma und Gewebehomogenaten hat dazu beigetragen, daß „die Detektion und Messung von Lipidperoxidation der Beweis ist, der am häufigsten herangezogen wird, um die Rolle von Reaktionen freier Radikale in der Toxikologie und bei menschlichen Erkrankungen zu belegen“ (Halliwell u.

Gutteridge 1990). Dieser einfache Nachweis beruht auf der Derivatisierung von Malondialdehyd mittels Thiobarbitursäure im sauren Milieu zu einem violetten Farbkomplex, der durch UV-Absorption quantifizierbar ist. Die Reaktion ist in Abb. 2.10 dargestellt. Die Detektion kann hierbei direkt photometrisch oder mittels HPLC-UV erfolgen.

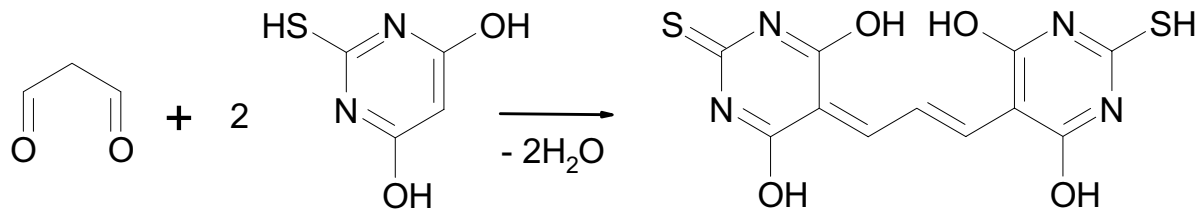


Abb. 2.10
Derivatisierungsreaktion zum Nachweis von Malondialdehyd mit Thiobarbitursäure

2.3.4.2 4-Hydroxy-2-nonenal

4-Hydroxy-2-nonenal (4-HNE) ist ein Produkt der Lipidperoxidation der zwei häufigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren Linolsäure und Arachidonsäure (Chung *et al.* 1996). Dennoch ist das Ausmaß der Bildung von 4-Hydroxy-2-nonenal im allgemeinen geringer als das von Malondialdehyd; sie kann um den Faktor 80 geringer sein (Poli *et al.* 1985). Von besonderem Interesse in bezug auf Mutagenität sind die verschiedenen Läsionen, die 4-Hydroxy-2-nonenal auf DNA-Ebene auslösen kann. 4-Hydroxy-2-nonenal reagiert, wie andere 2-Alkenale, direkt mit den Nukleobasen der DNA in einer Michaeladdition, wodurch Propanoaddukte entstehen. Ethenoaddukte entstehen nach der Aktivierung von 4-Hydroxy-2-nonenal zu 2,3-Epoxy-4-hydroxynonanal. Diese Aktivierung kann durch Autoxidation oder Hydroperoxide erfolgen (Chung *et al.* 1996). Auch eine Epoxidierung durch Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen wird diskutiert. Typische Addukte sind $N^2,3$ -Ethenodeoxyguanosin (ϵ dG), $1,N^6$ -Ethenodeoxyadenosin (ϵ dA) und $3,N^4$ -Ethenodeoxycytidin (ϵ dC) (Nair *et al.* 1999).

Die Messung kann mittels GC-MS (Eberle *et al.* 1989), HPLC/RIA (Fedtke *et al.* 1990) oder – sehr empfindlich – mittels ^{32}P -Postlabelling nach immunoaffinätschromatographischer Aufreinigung (Guichard *et al.* 1993, Nair *et al.* 1995) erfolgen. Sowohl Propano- als auch Ethenoaddukte besitzen ein hohes Mutagenitätspotential.

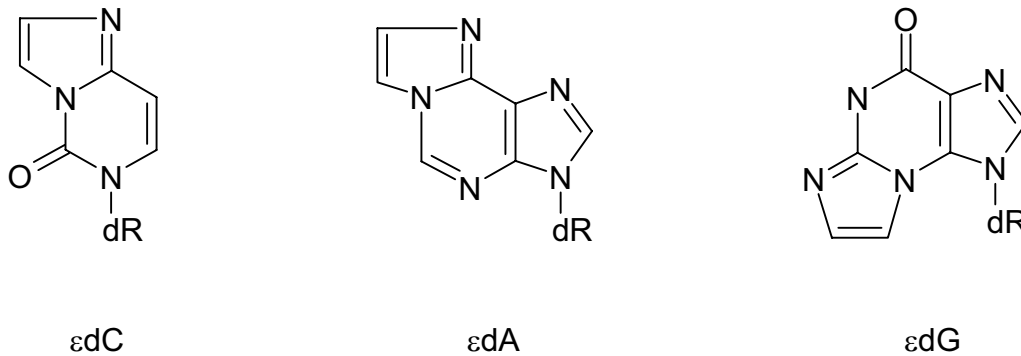


Abb. 2.11
Strukturformel Etheno-DNA-Addukte (Nair *et al.* 1999)

2.3.5 Oxidative Schädigung von Proteinen

2.3.5.1 3-Nitrotyrosin

Nitrotyrosin entsteht durch die Reaktion von Peroxynitrit mit Tyrosinresten in Proteinen. Der Angriff von Peroxynitrit erfolgt vermutlich nicht direkt, sondern wird durch Kohlendioxid katalysiert. Es bildet sich ein Nitrosoperoxy-carbonatanion (ONOOCO_2^-), welches sich zum Nitrocarbonatanion ($\text{O}_2\text{NOCO}_2^-$) umlagert (Lyman *et al.* 1996, Uppa *et al.* 1996). Die Oxidation von Tyrosin verläuft dann über eine Zwischenstufe von Tyrosyl- und Stickstoffdioxidradikal (Maruyama *et al.* 1996).

Chromatographische Methoden können freies Nitrotyrosin direkt erfassen. Proteingebundenes Nitrotyrosin wird nach Hydrolyse der Proteine gemessen. Prinzipiell sind verschiedene HPLC- und GC-Methoden beschrieben (Liu *et al.* 1998, Ohshima *et al.* 1999, Ohshima *et al.* 1991). Immunchemische Nachweisverfahren wie ELISA, Western- und Dotblot erlauben die Quantifizierung von proteingebundenem Nitrotyrosin (Radi *et al.* 2001).

Immunhistochemie erlaubt die Bestimmung von proteingebundenem Nitrotyrosin an Gewebeschnitten (Viera *et al.* 1999). Es stehen verschiedene kommerziell erhältliche Antikörper zu Verfügung. Vorteil dieser Methode ist, daß die Lokalisation der Schädigung angegeben werden kann. Andererseits handelt es sich um eine semiquantitative Methode.

3 Problemstellung

Ozon stellt die Leitsubstanz des Sommersmogs dar. Bisher ist nur wenig bekannt über die zellulären und mechanistischen Aspekte der genotoxischen Ozonwirkung *in vivo*. Insbesondere fehlen Studien mit molekularen Endpunkten und Biomarkern. Als reaktive Sauerstoffspezies ist Ozon potentiell in der Lage, oxidativen Streß zu verursachen. Daher ist es von besonderem Interesse abzuklären, ob es unter Ozoneinwirkung im umweltrelevanten Konzentrationsbereich zur Ausbildung von oxidativem Streß und zu oxidativen Veränderungen an DNA-Basen, Proteinen oder Lipiden kommt und welche Biomarker geeignet sind, eine solche Wirkung zu erfassen. Als ein Marker, der in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse ist, wurde die Ausscheidung von 8-oxodG im Urin vorgeschlagen (Cotgreave 1996).

Um die Wirkung von Ozon auf zelluläre Bestandteile im Hinblick auf eine oxidative Schädigung zu untersuchen, sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit Analysenverfahren für Marker von oxidativem Streß in unterschiedlichen Testsystemen etabliert bzw. entwickelt werden. Die Marker sollten anschließend in Testsystemen mit Ozonexposition nachgewiesen werden, um mechanistische Einblicke in die Ozonwirkung zu erhalten.

Die Wirkung von Ozon bezüglich oxidativer DNA-Schädigung sollte in *in vitro* Testsystemen getestet werden. Zum Nachweis oxidativer Schädigung an isolierter Plasmid-DNA sollte ein modifizierter Plasmid-Relaxations-Assay etabliert werden, der durch Inkubation mit Reparaturenzymen die Detektion modifizierter DNA-Basen erlaubt. Zur Detektion oxidativer Schäden im isolierten Zellsystem sollte der bereits etablierte Comet-Assay ebenfalls entsprechend modifiziert werden.

Um die Auswirkungen von *in vivo* Ozonexposition zu untersuchen, wurden Nachweisverfahren für verschiedene Indikatoren oxidativer Schädigung *in vivo* etabliert und weiterentwickelt, wobei der Schwerpunkt besonders auf Probenmaterial liegen sollte, welches nicht-invasiv oder minimal-invasiv gewonnen werden kann, wie z. B. Urin oder Blut. Der Nachweis von 8-oxodG in Urin sollte mittels Immunoaffinitätschromatographie und HPLC-ECD erfolgen. Das Verfahren sollte für einen hohen Probendurchsatz geeignet sein und hohe Spezifität für den Nachweis des Analyten aus der komplexen Matrix Urin aufweisen. Zur Messung von 8-oxodG in DNA aus *in vivo* Probenmaterial mittels HPLC-ECD sollte eine Methode entwickelt werden, die die Isolierung und Hydrolyse der DNA unter dem Gesichtspunkt der

Artefaktminimierung optimiert. Aufgrund der kontroversen Diskussion um die Messung von 8-oxodG als prominenten Marker oxidativer DNA-Schädigung sollten die Verfahren soweit möglich durch Vergleichsmessungen und Ringversuche validiert werden. Diese Versuche sollten gleichzeitig zur Evaluierung der Eignung anderer Nachweisverfahren dienen. Zum Nachweis von Malondialdehyd sollte ein Verfahren entwickelt werden, welches basierend auf der bekannten Thiobarbitursäurederivatisierung die exakte Quantifizierung im Gegensatz zur Bestimmung der Summe des thiobarbitursäurereaktiven Materials erlaubt. Als Marker für reaktive Stickstoffspezies sollte ein immunhistochemisches Verfahren zur Detektion von Nitrotyrosin an Gewebeschnitten etabliert werden.

In einem Tierexperiment an Ratten sollte der Einfluß subchronischer Ozonexposition auf die verschiedenen Marker für oxidativen Streß *in vivo* untersucht werden. Hierbei sollte ein für die Sommersmogbelastung realistisches Expositionsszenario mit umweltrelevanten und höheren Konzentrationen simuliert werden. Aus der Analyse der im Rahmen des Tierexperiments gewonnen Proben mittels der o. g. Methoden sollte eine Aussage darüber abgeleitet werden, ob diese als Biomarker für molekulare Endpunkte der Ozonwirkung herangezogen werden können.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Plasmid-Relaxations-Assay

Um einen Einblick in die mechanistischen Aspekte der Ozonwirkung auf isolierte DNA zu erhalten, wurde ozonexponierte Plasmid-DNA mittels des Plasmid-Relaxations-Assays untersucht. Aus intakten Plasmiden, die in der „supercoiled“ Form vorliegen, entstehen durch Einzelstrangbrüche offen zirkuläre und durch Doppelstrangbrüche lineare Formen, die durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt werden können (Epe u. Hegler 1994).

Das Durchleiten ozonierter Luft mit einer Ozonkonzentration von 1 bis 4 mg/m³ durch eine Lösung von pBr322-DNA für 20 bis 60 Minuten führte zur Induktion von Einzelstrangbrüchen, die mittels des Plasmid-Relaxationsassays nachgewiesen wurden (s. Abb. 4.1).

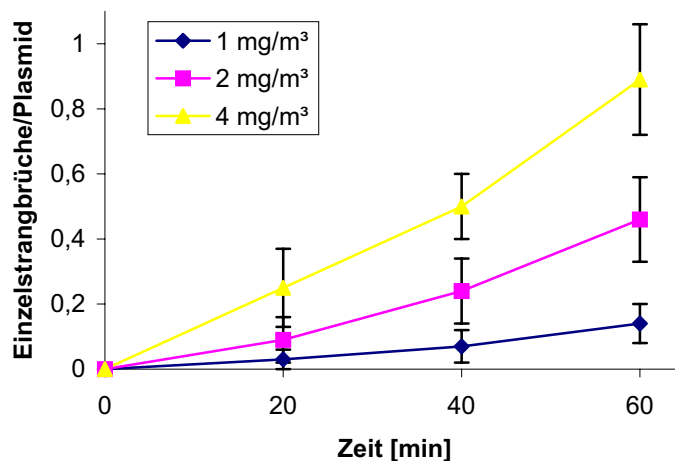


Abb. 4.1

Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Bildung von DNA-Einzelstrangbrüchen an pBr322-DNA durch Ozonexposition

Die Schädigung der Plasmide zeigt eine deutliche Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit.

Durch Behandlung ozonexponierter DNA (PM₂-Plasmide) mit verschiedenen Reparaturenzymen, die unterschiedliche DNA-Läsionen in Strangbrüche überführen, wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. B. Epe (Universität Mainz) ein Schadenprofil nach 20, 40 und 60 Minuten aufgenommen. Hierbei wurde ein zeitabhängiges kontinuierliches Ansteigen der für die jeweiligen Reparaturenzyme spezifischen Läsionen beobachtet (s. Abb. 4.2).

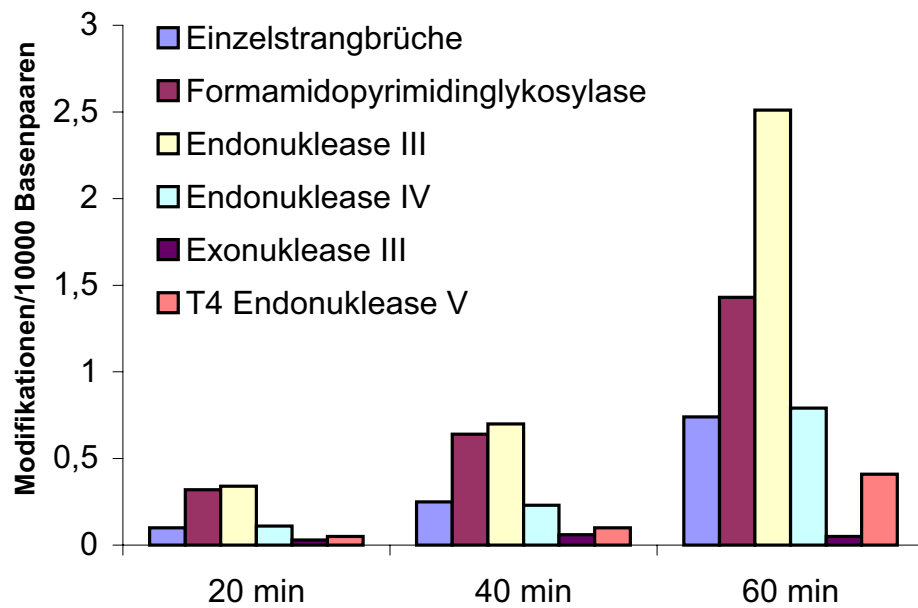


Abb. 4.2
Zeitabhängigkeit des Schadenprofils von Ozon (2 mg/m^3) an PM_2 -DNA

In Abb. 4.3 ist das für Ozon erhaltene Schadenprofil verschiedenen aus der Literatur bekannten Profilen gegenübergestellt.

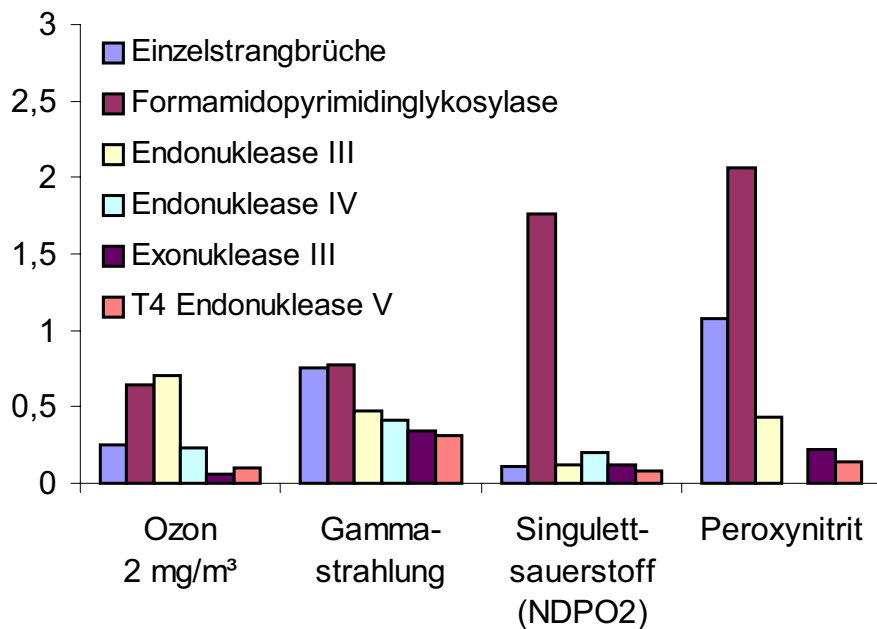


Abb. 4.3
Schadensprofile unterschiedlicher Noxen an PM_2 -DNA (Vergleichswerte aus Epe *et al.* 1996)

Der größte Anteil der durch Ozon induzierten Läsionen sind FPG- und Endonuklease III sensitive Läsionen. Strangbrüche und Endonuklease IV sensitive Läsionen treten deutlich weniger auf, T4 Endonuklease V und Exonuklease III sensitive Läsionen sind vernachlässigbar. Das Verhältnis zwischen Strangbrüchen und FPG-sensitiven Läsionen liegt in der Größenordnung 1 : 2. Damit unterscheidet sich das Schadenprofil von Ozon deutlich von den Profilen anderer oxidierender Agentien.

Sowohl FPG- (8-oxodG, Formamidopyrimidine) als auch Endonuklease III (Dihydropyrimidine, z. B. Thyminglykol) sensitive Läsionen können durch Hydroxylradikale verursacht werden. Jedoch deutet die geringe Anzahl von Strangbrüchen gegenüber oxidierten DNA-Basen im Vergleich zu γ -Strahlung, die ihre Wirkung überwiegend durch Hydroxylradikale entfaltet, darauf hin, daß in diesem Testsystem die Wirkung von Ozon nicht überwiegend durch Hydroxylradikale vermittelt wird. Dieser Befund ist konsistent mit der Literatur, wonach sich die Zersetzung der Nucleobasen der Nucleotide dGMP, dTMP und dCMP durch Ozon nicht durch Zugabe der Radikalfänger Isopropyl- oder tertiärem Butylalkohol inhibieren läßt (van der Zee *et al.* 1987). Im Gegensatz hierzu konnte die Zersetzung der Desoxyriboseeinheit durch Radikalfänger inhibiert werden.

Auf Basis der vorliegenden Ergebnisse ist davon auszugehen, daß bei der Reaktion von Ozon mit isolierter DNA Ozon vor allem *per se* reagiert und Hydroxylradikale nur zu einem geringeren Teil für die Schädigung der DNA verantwortlich sind.

Das gefundene Schadenprofil ist konsistent mit einem durch ^{32}P -Postlabelling ermittelten Produktprofil modifizierter DNA-Basen in ozonbehandelter DNA aus HeLa-Zellen und Kalbsthymus-DNA, wo überwiegend 8-oxodG, Hydroxymethyluracil und Thyminglykol neben weiteren unbekanntem Addukten in geringerem Ausmaß beobachtet wurden (Cajigas *et al.* 1994).

Das nach Abschluß der vorliegenden Arbeiten publizierte Mutationsspektrum von Ozon an isolierter Plasmid-DNA, die nach Exposition in humane Zellen transfiziert wurde (Jorge *et al.* 2002), kann ebenfalls auf Basis dieser Ergebnisse erklärt werden, wobei die Ozonkonzentration mit 20 ppm dort zehnfach höher lag als in den hier durchgeführten Experimenten. Die beobachteten Mutationen waren GC zu TA (28 %), GC zu CG (23 %) und GC zu AT (23 %). Sie stimmen mit den beschriebenen Mutationen für 8-oxodG überein, wobei auch hier GC zu TA Transversionen die Hauptmutation darstellen, während GC zu CG Transversionen und GC zur AT Transitionen nur zu einem geringeren Ausmaß auftraten (Tan *et al.* 1999). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtete Zahl von FPG-sensitiven Läsionen manifestiert sich also als 8-oxodG induzierte Mutationen an GC. Das Ausbleiben von Mutationen an TA

trotz der im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachteten Zahl von Endonuklease III-sensitiven Läsionen kann erklärt werden durch die geringe Mutagenität von Thyminglykol (Hayes *et al.* 1988; Essigmann *et al.* 1989).

4.2 Einzelzellgelelektrophorese (Comet-Assay)

Zum Nachweis der Induktion oxidativer DNA-Basenmodifikationen an isolierten Zellen in Kultur wurde ein mittels Reparaturenzymen modifizierter Comet-Assay etabliert. Da im Rahmen dieses Projektes hauptsächlich 8-oxodG untersucht werden sollte, wurde als Reparaturenzym FPG-Protein verwendet. Eines der Hauptsubstrate von FPG-Protein ist 8-oxodG. Der Comet-Assay wird wie üblich durchgeführt. Um die modifizierten DNA-Basen zu detektieren, wird jedoch zusätzlich nach der Zellyse eine Inkubation mit dem Reparaturenzym durchgeführt, wobei die entsprechende Modifikation in abasische Stellen oder Strangbrüche überführt wird.

Bei der Etablierung des reparaturenzymmodifizierten Comet-Assays stellte sich zunächst heraus, daß es durch Inkubation mit dem Puffer, in dem das Reparaturenzym verdünnt wird, zu einer in ihrem Ausmaß von der Art des Puffers abhängigen Artefaktbildung kommt. Zum einen bedeutet dies, daß in jedem Experiment zu jeder Behandlung eine Kontrolle durch Inkubation mit dem Enzympuffer durchgeführt werden muß. Diese kann nicht als die Zahl von Strangbrüchen angesehen werden. Umgekehrt kann die Messung der Strangbrüche, die ohne zusätzliche Inkubation zwischen Lyse und Entwindung erfolgt, nicht als der Kontrollwert bei der Ermittlung der enzymsensitiven Basenmodifikationen in Abzug gebracht werden. In jedem Experiment müssen für jede Behandlung also zur Messung der Strangbrüche ein Assay ohne zusätzliche Inkubation und zur Ermittlung der enzymsensitiven Basenmodifikationen zwei Assays mit zusätzlicher Inkubation mit Puffer oder Puffer und Reparaturenzym durchgeführt werden. Diese Kontrolle wird in der Literatur nicht immer durchgeführt (Pool-Zobel *et al.* 1999, Collins *et al.* 1996). Wird die Inkubation mit Puffer ohne Reparaturenzym als spontane oder durch die Testsubstanz direkt induzierte Strangbrüche verwendet, kann dies zu einer Überschätzung der Strangbrüche führen. Wird als Kontrolle bei Inkubation mit Reparaturenzymen die Zahl der Strangbrüche ohne zusätzliche Inkubationen abgezogen, führt dies zu einer Überschätzung der enzymsensitiven Basenmodifikationen.

Da die Induktion artifizieller Strangbrüche vom verwendeten Enzympuffer abhängig ist, wurden verschiedene Puffer getestet. Die geringste Artefaktbildung wurde bei Verwendung eines für die Modifikation des Comet-Assays mit Endonuklease III publizierten Puffers (Collins *et al.* 1993) beobachtet, der aus HEPES und EDTA mit Kaliumchlorid besteht. Als

ungeeignet erwiesen sich Tris/EDTA (Oberreuther, Bundesanstalt für Ernährungsforschung: persönliche Mitteilung) oder Phosphat/EDTA Puffer (Dennog *et al.* 1996). Inkubation der Objektträger bei 37 °C ohne Puffer führte nicht zu einer Artefaktbildung. Durch den Zusatz von Rinderalbumin kann die unspezifische Bindung des Reparaturenzyms und die mikrobielle Zersetzung verringert werden.

Um zu ermitteln, in welcher Konzentration das FPG-Protein eingesetzt werden mußte, wurden durch 5 Gy γ -Strahlung stark geschädigte HL-60 Zellen bei der Durchführung des Assays mit unterschiedlichen Protein-Konzentrationen inkubiert. Ab einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ wurde keine weitere Zunahme der detektierten Läsionen beobachtet (s. Abb. 4.4). Diese Konzentration wurde zukünftig bei der Versuchsdurchführung verwendet.

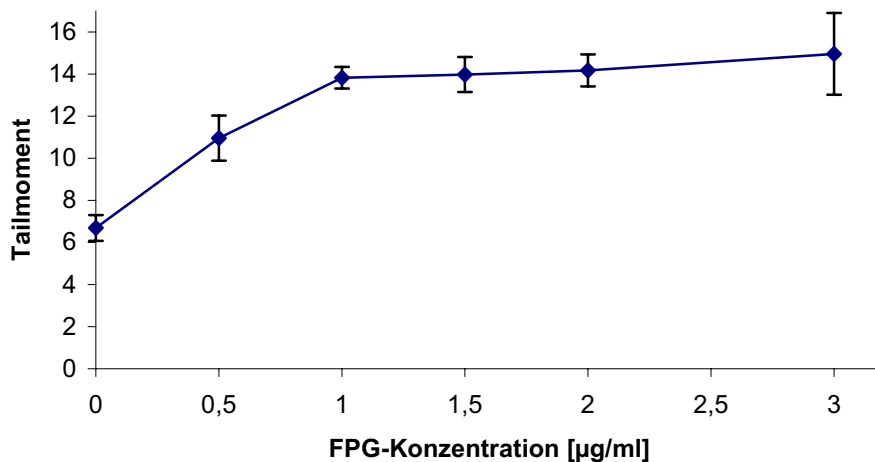


Abb. 4.4

Abhängigkeit der Detektion FPG-sensitiver Läsionen in stark geschädigten HL-60 Zellen von der Enzymkonzentration (Ermittlung der Sättigungskonzentration)

Um Zellen *in vitro* mit gasförmigem Ozon exponieren zu können, mußte zunächst ein geeignetes System entwickelt werden. Die Exposition von Suspensionszellen mittels Durchleitung durch die Zellsuspension versprach die beste Durchmischung und somit höchste Ozonexposition, stellte sich aber als ungeeignet heraus, da hierbei die Zellen mechanisch zerstört werden. Bei einer Einleitungsgeschwindigkeit in der Größenordnung von einigen hundert ml/min und eines spitzen Einleitungsrohres treten Geschwindigkeit in der Größenordnung von 100 m/s auf, welche Scherkräfte und Stoßwellen verursachen, die zu einer Zerstörung der Zellen an der Gefäßwand führen. Teilweise waren bei Einsatz von 10^7 Zellen in einem Volumen von 10 ml nach 30 min lichtmikroskopisch keine Zellfragmente mehr nachweisbar. Einleitung durch eine Gasfritte führte zur Zersetzung des Ozons. Aus diesem

Grund wurden Suspensionszellen auf einem Uhrglas durch Überblasen mit ozonierter Luft exponiert, wobei die Durchmischung durch Verwendung eines Taumlers sichergestellt wurde. Verdunsteter Puffer wurde diskontinuierlich ersetzt. Die Aufnahme von Ozon in die Expositionssuspension wurde durch Entfärben einer Indigosulfatlösung in einem Vorversuch nachgewiesen.

Als Testzelle wurde zunächst die in Suspension wachsende Zelllinie HL-60 (humane akute myeloide Leukämie Zelllinie) verwendet. Bei Überblasen der Zellsuspension für 30 min konnte die Induktion von Strangbrüchen und FPG-sensitiven Läsionen erst ab 8 mg/m^3 , nicht jedoch darunter beobachtet werden (s. Tab. 4.1). Die Induktion von Schäden durch diese hohe Ozonkonzentration fällt gegenüber der Induktion durch direkt wirkende γ -Strahlung nur gering aus (s. Tab. 4.1). Um die Ursache der geringen Wirkung von Ozon im Vergleich zu γ -Strahlung im verwendeten Testsystem mit HL-60 Zellen zu klären, wurden die Zellen mit $75 \text{ }\mu\text{M}$ Wasserstoffperoxid für 30 min inkubiert. Auch diese Behandlung führte nur zu einer geringen Induktion von von FPG-sensitiven Läsionen (s. Tab. 4.1). Dies ist ein Hinweis darauf, daß die verwendete Zelllinie HL-60 eine starke antioxidative Abwehr besitzt. Die untersuchten Noxen Wasserstoffperoxid und Ozon, sowie deren reaktive Zersetzungsprodukte, müssen zunächst durch die Zellmembran und das Zytoplasma diffundieren, bevor sie eine schädigende Wirkung an der DNA entfalten können. Im Zytoplasma reagieren die reaktiven Spezies jedoch mit den vorhandenen Antioxidantien und werden so detoxifiziert. Durch γ -Strahlung entstehen im Gegensatz hierzu auch reaktive Spezies, v. a. Hydroxylradikale in der Nähe der DNA, wo sie unmittelbar zu einer Schädigung führen können, ohne daß die Möglichkeit einer Detoxifizierung durch Antioxidantien gegeben ist.

Vor diesem Hintergrund mußte ein anderes, geeigneteres Testsystem identifiziert werden. A549 Zellen (humanes Lungenzellkarzinom) reagieren mehr als zehnfach empfindlicher auf die Behandlung mit $100 \text{ }\mu\text{M}$ Wasserstoffperoxid für 30 min (s. Tab. 4.1), was eine geringere antioxidative Kapazität belegt. Diese Zelllinie wächst allerdings adhärent, was die Durchführung des Comet-Assays durch die notwendige artefaktanfällige Trypsinbehandlung erschwert. Ferner mußte für die Ozonbehandlung eine andere Expositionsmethode gewählt werden. Exposition in Petrischalen auf einem Taumler durch Überblasen führte bei einer Konzentration von 2 mg/m^3 für 30 min nicht zu einer Induktion von Strangbrüchen oder FPG-sensitiven Läsionen, wenn sich auf den Zellen Puffer befand. Durch Exposition auf Membraneinsätzen für die Zellkultur, wobei sich nur auf der Unterseite der Membraneinsätze Puffer befand, konnten bei der gleichen Behandlung eine Induktion von FPG-sensitiven Läsionen

nachgewiesen werden (s. Tab. 4.1). Aufgrund experimenteller Schwierigkeiten waren Strangbrüche bei diesem Versuch nicht quantitativ auswertbar.

Tab. 4.1
Ergebnisse im enzymmodifizierten Comet-Assay für unterschiedliche Zelllinien und Behandlungen

Zelllinie	Behandlung	Tailmoment			
		Strangbrüche		FPG-sensitive Läsionen	
		Kontrolle	behandelt	Kontrolle	behandelt
HL60	γ -Strahlung 5 Gray	-	6,7	-	7,1
HL60	8 mg/m ³ Ozon, 30 min	0,1	0,4	0,2	0,9
HL60	75 μ M H ₂ O ₂ , 30 min	0,1	0,3	0,2	0,6
A549	100 μ M H ₂ O ₂ , 30 min	0,2	2,0	0,1	3,8
A549	2 mg/m ³ Ozon, 30 min	nicht auswertbar		0,0	0,4

Diese Ergebnisse zeigen, daß es prinzipiell möglich ist, durch Ozon Strangbrüche und FPG-sensitive DNA-Läsionen in isolierten Zellen zu induzieren und mittels des Comet-Assay nachzuweisen. Auch Lee *et al.* (1996) wiesen das Auftreten von Strangbrüchen in ozonexponierten BEAS-2B Zellen (0,2 und 0,8 mg/m³ bis zu 2 Stunden) mittels des Comet-Assays nach. Die Analyse von Basenmodifikationen erfolgte hier jedoch nicht.

Das Verhältnis zwischen Strangbrüchen und FPG-sensitiven Läsionen ist vergleichbar mit dem für Plasmid-DNA gefundenen, d. h. es werden ca. doppelt so viele FPG-sensitive Läsionen wie Strangbrüche induziert. Auch in isolierten Zellen ist das durch γ -Strahlung, bzw. Hydroxylradikale, induzierte Verhältnis typischerweise 1:1. Dies bedeutet, daß auch im isolierten zellulären System bei den für eine Schädigung von HL-60 Zellen hier benötigten hohen Konzentrationen die Wirkung von Ozon nicht ausschließlich auf Hydroxylradikalbildung beruht. Eine Aussage, ob Ozon in diesem System *per se* oder z. B. durch Bildung von Wasserstoffperoxid (ebenfalls Verhältnis Strangbrüche/FPG-sensitive Läsionen 1:2) reagiert, ist auf Basis der vorliegenden Experimente nicht möglich. Die Bildung von Wasserstoffperoxid bei Ozonexposition ist jedoch für zelluläre oder isolierte DNA-Systeme bisher nicht beschrieben (Cotgreave 1996).

Mit der A549-Zelllinie konnte ein System identifiziert werden, welches empfindlicher auf oxidative Schädigung reagiert. Um jedoch eine längere Expositionszeit untersuchen zu

können, reicht die Befeuchtung der Zellkultur durch Puffer auf der Unterseite der Transwell-filter nicht aus. Um Expositionszeiten von länger als 30 min zu ermöglichen, müsste die Gasmischung befeuchtet werden.

Der hier beschriebene Comet-Assay stellt prinzipiell auch eine Möglichkeit zur Messung von ozoninduzierten Schäden *in vivo* dar. So konnte in Zellen aus bronchioalveolärer Lavage von gegenüber 0,5 und 1 mg/m³ Ozon für 3 Stunden exponierten Mäusen eine Zunahme der Strangbrüche gezeigt werden (Haney *et al.* 1999). Das gleiche gilt für Mäuse, die für 90 min gegenüber 1 oder 2 ppm Ozon exponiert wurden (Bornholdt *et al.* 2002). Eine Induktion von Strangbrüchen im Lungengewebe konnte hier jedoch nicht nachgewiesen werden. Strangbrüche konnten mittels des Comet-Assays in der Nasenschleimhaut von Personen nachgewiesen werden, die der Luftverschmutzung in Mexico City ausgesetzt waren (Calderon-Garciduenas *et al.* 1996, Calderon-Garciduenas *et al.* 1997, Calderon-Garciduenas *et al.* 1999), wobei in diesem Fall die Schädigung allerdings nicht ausschließlich auf Ozon sondern auch auf weitere Schadstoffe zurückzuführen ist.

Die Analyse von DNA-Läsionen mittels des modifizierten Comet-Assays wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter verfolgt.

4.3 Analyse von 8-oxodG in Urin

Zur Analyse von 8-oxodG in Urin wurde ein Verfahren entwickelt, bei dem zunächst 8-oxodG aus der komplexen Matrix Urin abgetrennt und angereichert wird und anschließend die Messung mittels HPLC-ECD erfolgt. Zur Aufreinigung sollte eine Immunoaffinitätschromatographie mit dem monoklonalen Antikörper 15A3, dessen Einsatz für diesen Zweck beschrieben ist (Park *et al.* 1992), etabliert und weiterentwickelt werden. Um unspezifische Wechselwirkungen zu minimieren, wurde abweichend von der ursprünglichen Publikation der in Ascites kommerziell erhältliche Antikörper mittels Affinitätschromatographie an Protein A aufgereinigt. Die isolierte Menge Gesamtantikörper lag bei der ersten verwendeten Charge bei 0,5 mg/0,2 ml Ascites als Gesamtprotein im BCA-Assay. Die Reinheit des isolierten Antikörpers in bezug auf andere Proteine wurde vor Immobilisierung durch Gelfiltration mit UV-Detektion bestätigt.

Die isolierten Antikörper wurden an einer Polymethacrylatmatrix mit Quadratsäure als Kopplungsgruppe (HYDRA[®], Kopplungsprinzip SQUARELINK[®]) in Zusammenarbeit mit Immunotec, Marl, immobilisiert. Dieses Säulenmaterial hat gegenüber der häufiger eingesetzten Sepharose den Vorteil einer besseren mikrobiellen Resistenz. Außerdem sollen

durch die nicht protonierbare Kopplungsgruppe die unspezifischen Wechselwirkungen im Vergleich zum protonierbaren Isoharnstoff der CNBr-Sepharose minimiert werden.

Die Kapazitätsbestimmung mit 8-oxodG Standard ergab für die so erhaltene Säule bei Einsatz von 0.5 mg Antikörper eine Bindungskapazität der Säule von ca. 0.5 nmol 8-oxodG. Der Anteil der „aktiven“, d. h. 8-oxodG bindenden, Antikörper liegt somit in der Größenordnung von 10 %.

In der Originalpublikation wird beschrieben, daß Säulen mit 2 ml Bettvolumen eine Bindungskapazität von 2 nmol besitzen. Diese werden basierend auf den Angaben der Publikation aus 60 µl Ascites gewonnen (unter Annahme eines Quellvolumens der gefriergetrockneten CNBr-Sepharose von 3,5 ml/g). Dieser wird ohne Aufreinigung direkt an das Trägermaterial immobilisiert. Hieraus ergibt sich, daß die Konzentration an Antikörper, welcher später auf der Säule aktiv ist, 2,5 mg/ml im Ascites beträgt. Diese liegt verglichen mit der wie oben beschrieben gefundenen Gesamtkonzentration an Antikörpern von 2,5 mg/ml Ascites, von denen ca. 10 % später auf der Säule aktiv sind, um den Faktor 10 höher als in der ersten verwendeten Partie des kommerziell erhältlichen Ascites. Die aus einer weiteren Partie des kommerziell erhältlichen Ascites gewonnen Säulen zeigten keine Bindungsaffinität für 8-oxodG. Dieses Ergebnis mit aufgereinigten Antikörpern wurde durch direkte Verwendung des nicht aufgereinigten Ascites zur Immobilisierung an CNBr-Sepharose analog dem Vorgehen der Originalpublikation bestätigt.

Auf Basis der vorliegenden Ergebnisse war davon auszugehen, daß aufgrund von Produktionsschwierigkeiten die Qualität des Ascites nicht reproduzierbar und schlechter ist als die des in der Originalpublikation verwendeten. Da keine Qualitätskontrolle für den kommerziell erhältlichen Ascites durchgeführt wird (persönliche Mitteilung der vertreibenden Firma Pharmingen, Hamburg), kann dies nicht definitiv bestätigt werden. Die Eignung des Produktes ist hierdurch soweit eingeschränkt, daß die geplanten Versuche nicht mit dem monoklonalen Antikörper 15A3 durchgeführt werden konnten. Im Rahmen verschiedener Diskussionen während der 4th Winter Research Conference of CERLIB (1999) wurde bestätigt, daß die Etablierung der Immunoaffinitätschromatographie mit dem monoklonalen Antikörper 15A3 auch in anderen Instituten fehlschlug.

Als Alternative wurde der zur Isolierung von 8-oxodG aus DNA-Hydrolysaten mittels Immunoaffinitätschromatographie eingesetzte monoklonale Antikörper 1F7 (Yin *et al.* 1995) identifiziert. Durch Prof Dr. R. Santella (Columbia University, New York) wurde zunächst eine Probe Antikörper enthaltenden Zellkulturüberstands und später die Hybridomazelllinie 1F7 zur Verfügung gestellt. Aus 10 ml Zellkulturüberstand wurden 0,5 mg Antikörper durch

Affinitätschromatographie bei der Firma Immunotec (Marl) isoliert und an der o. g. Polymethacrylatmatrix (HYDRA[®]) immobilisiert. Diese Säule hatte eine Kapazität von 2 nmol, was einer Antikörperaktivität von 60 % entspricht und in der zu erwartenden Größenordnung liegt.

Im Rahmen einer Methodenoptimierung stellte sich heraus, daß bei Verwendung von CNBr-aktivierter Sepharose zur Immobilisierung des Antikörpers die Reinheit des Eluats vergleichbar ist mit der Verwendung der Polymethacrylatmatrix. Unspezifische Wechselwirkung durch Protonierung der Isoharnstoffgruppe sind also im vorliegenden Fall vernachlässigbar. Da die chromatographischen Eigenschaften bei Durchführung der Immunoaffinitätschromatographie bei Verwendung von Sepharose besser sind, wurde für Immunoaffinitätssäulen zum Routineeinsatz dieses Material verwendet.

Um die Immunoaffinitätschromatographie für die Aufreinigung von 8-oxodG aus Urin zu etablieren, wurde basierend auf den für die Antikörper 15A3 und 1F7 publizierten Protokollen Park *et al.* 1992, Yin *et al.* 1995) eine geeignete Prozedur entwickelt. Diese beinhaltet eine Festphasenextraktion an C₁₈-Material zur teilweisen Vorabtrennung der komplexen Matrix. Die Elution des Analyten von der Immunoaffinitätssäule erfolgt mit reinem Methanol, was ein rasches Lyophilisieren der Probe ermöglicht. Im Detail ist die Prozedur zur Isolierung von 8-oxodG aus Urin in Abb. 4.5 graphisch dargestellt.

Nachdem die prinzipielle Eignung des monoklonalen Antikörpers 1F7 zur Aufreinigung von 8-oxodG aus Urin nachgewiesen war, mußte dieser in ausreichender Menge produziert werden. Zunächst erfolgte die Kultivierung der entsprechenden Maus-Hybridomazelllinie in RPMI 1640 Medium (Roswell Park Memorial Institute) mit 10 % FKS. Die Kultur in einem serumfreien Spezialmedium für die Antikörperproduktion (Hybrimax, Sigma Deisenhofen) stellte sich als ungeeignet heraus, es war keine Zellproliferation oder Antikörperseznierung zu erkennen. IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Iscove u. Melchers 1978) hat einen höheren Nährstoffgehalt als RPMI 1640 und ist für schnell proliferierende Zellkulturen mit hoher Zelldichte gut geeignet. Eine hohe Zelldichte ist erforderlich, um eine möglichst hohe Antikörperkonzentration im Zellkulturmedium zu erreichen. IMDM mit 10 % FKS stellte sich als geeignetes Zellkulturmedium heraus. Das Medium wurde erst entfernt, wenn es stark verbraucht war, um eine möglichst hohe Antikörperkonzentration zu erreichen. Versuche, die Antikörperkonzentration durch ein kompartimentiertes System bestehend aus Medienmodul und Produktionsmodul (MiniPerm Zellreaktor, Heraeus, Hanau) zu erhöhen, schlugen fehl.

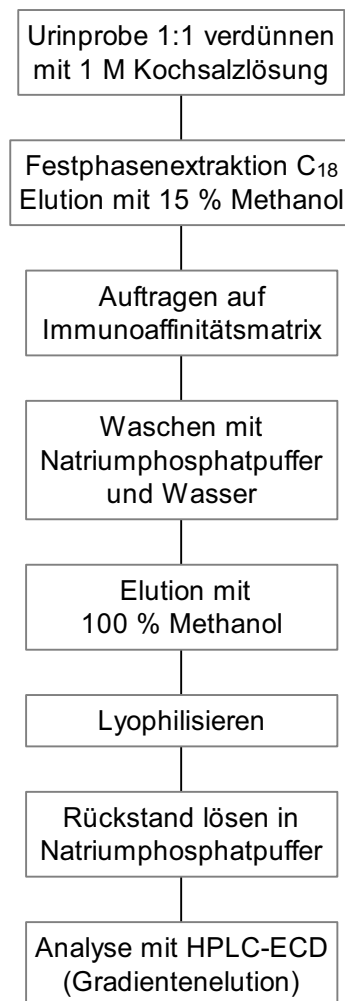


Abb. 4.5
Prozedur zur Aufreinigung von 8-oxodG aus Urin (Probenvorbereitung für HPLC-ECD)

Zur Aufreinigung der Antikörper aus dem Zellkulturüberstand wurde zunächst die thiophile Adsorption (Porath *et al.* 1985) an T-Gel (Pierce) getestet. Dieses Verfahren beruht auf einer salzunterstützten lyotropen Protein-Ligand-Wechselwirkung. Als Liganden eignen sich Materialien mit einer Sulfongruppe in Nachbarschaft zu einer Thioethergruppe. Zur Unterstützung der Antikörperbindung wird Ammonium- oder Kaliumsulfat eingesetzt (Nopper *et al.* 1989). Die so isolierten Antikörper zeigten jedoch nur einen Reinheitsgrad in der Größenordnung von 50 %, wie aus der Bandenintensität einer SDS-PAGE mit nicht-reduzierender Probenvorbereitung zu erkennen war. Die Proben wurden nicht reduziert, um die Spaltung der Antikörper zu umgehen. Neben einer sehr starken, wenig migrierenden Bande, welche den Antikörper darstellt, sind insgesamt vier Banden schwächerer Intensität zu erkennen (s. Abb. 4.6).

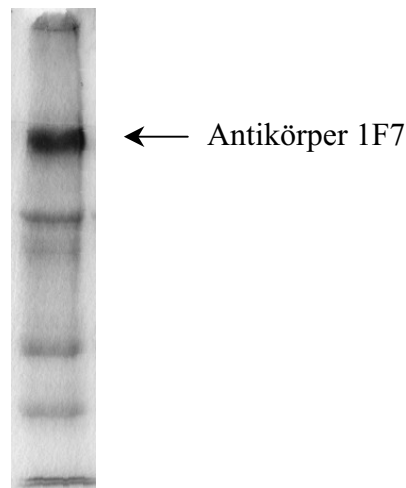


Abb. 4.6
Antikörper 1F7 isoliert aus Zellkulturmedium durch thiophile Adsorption: SDS-PAGE (nicht reduziert)

Der monoklonale Antikörper 1F7 ist ein Immunglobulin der Klasse IgG₁. Antikörper dieser Klasse lassen sich im allgemeinen nicht durch Affinitätschromatographie an Protein A aufreinigen, wie dies für den monoklonalen Antikörper 15A3 (IgG₂) möglich ist. Für IgG₁ wird häufig Affinitätschromatographie an Protein G durchgeführt. Hierbei ist jedoch ein glycinhaltiger Puffer zur Elution erforderlich. Die so gereinigten Antikörper eignen sich erst nach vollständigem Entfernen des Glycins zur Immobilisierung, da das Matrixmaterial sonst mit Glycin reagiert und so blockiert wird. Da auch mehrere Dialyseschritte keine vollständige Entfernung des in hohem Überschuß vorhandenen Glycin garantieren, ist dieses Verfahren zur Reinigung von Antikörpern für die Immunoaffinitätschromatographie wenig geeignet.

Ein geeignetes Verfahren stellt die Affinitätschromatographie an rekombinantem Protein A (Amersham Pharmacia Biotech) dar, wobei ein spezielles Protokoll zum Einsatz kommt, welches die Verwendung einer hohen Salzkonzentration (2,5 M NaCl) zur Bindung des Antikörpers beinhaltet (Amersham Pharmacia Application Note: Rapid optimisation and development of an automated two-step purification procedure for monoclonal IgG antibodies). Das rekombinante Protein A steht in HiTrap Säulen zur Verfügung, wodurch ein konstant hoher Durchfluß möglich ist. Das im Eluat noch teilweise vorhandene Kochsalz wird durch Dialyse gegen Wasser entfernt. Die so isolierten Antikörper weisen eine hohe Reinheit auf, wie durch MALDI-TOF-MS Analyse gezeigt wurde (s. Abb. 4.7).

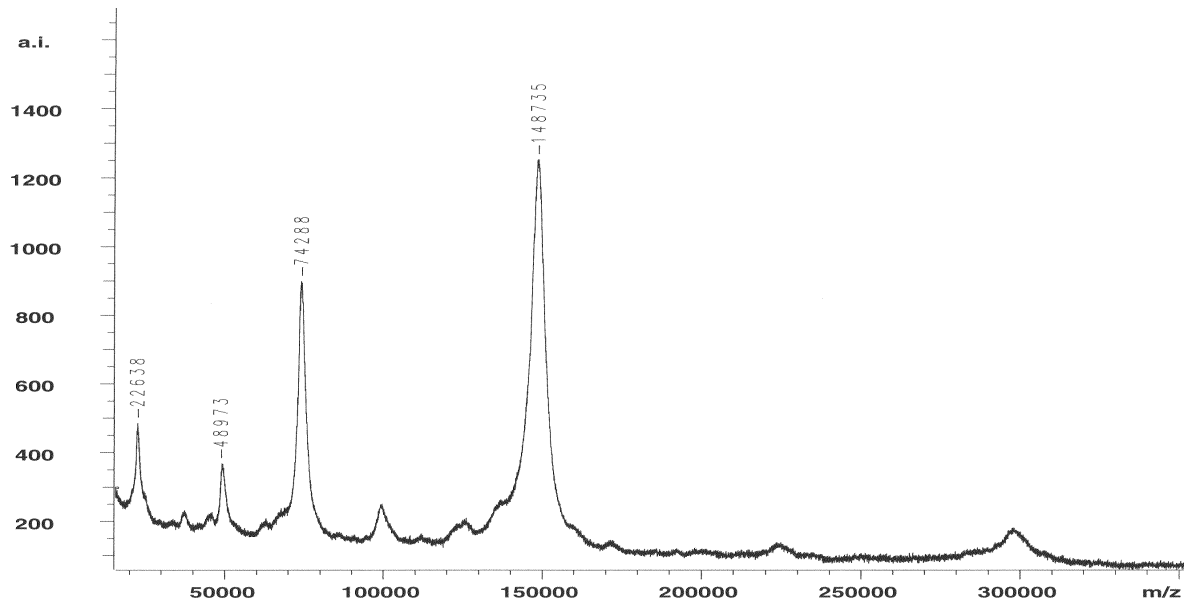


Abb. 4.7
Antikörper 1F7 isoliert aus Zellkulturmedium durch Affinitätschromatographie an rekombinantem Protein A: MALDI-TOF-MS

Der Peak mit einem Molekulargewicht von 149 kDa stellt das einfach geladene Molekülion dar, die Peaks bei 74 und 49 kDa die zwei- und dreifach geladenen Molekülionen. Bei dem Peak mit einer Masse von 23 kDa handelt es sich vermutlich um eine Verunreinigung, die jedoch vor Immobilisierung des Antikörpers durch Ultrafiltration entfernt werden konnte. Typischerweise konnten aus 500 ml Zellkulturüberstand ca. 130 mg Antikörper isoliert werden. Der Anteil an Immunglobulinen aus dem FKS lag berechnet auf Basis der Spezifikation des Serums bei weniger als 10 %. Werden die Antikörper nicht zeitnah immobilisiert, können sie nach Isolierung und Entsalzen lyophilisiert und so bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

Für die Immunoaffinitätsäulen wurden jeweils für 20 Säulen ca. 40 mg Antikörper an 2,5 g CNBr-Sepharose immobilisiert. Diese Säulen hatten eine Kapazität von ca. 5 nmol 8-oxodG, was die dichte Beladung des Säulenmaterials zeigt und einer Antikörperaktivität von ca. 40 % entspricht und in der zu erwartenden Größenordnung liegt. Hierdurch ist es möglich, Säulen mit kleinem Bettvolumen herzustellen, wodurch sich die chromatographischen Eigenschaften wie vor allem die Durchflußgeschwindigkeit verbessern.

Die Analyse des durch Immunoaffinitätschromatographie aufgereinigten Urins durch HPLC mit elektrochemischer Detektion erfolgte zunächst mit isokratischer Elution. Durch Aufnahme hydrodynamischer Voltammogramme wurde jedoch eine Koelution nachgewiesen,

d. h. die Voltammogramme von Standard und Probe stimmen nicht überein (s. Abb. 4.8 links). Dieses Problem konnte durch Verwendung von Gradientenelution behoben werden. Als organische Komponente kommt hierbei ein Lösungsmittelgemisch aus Methanol und Acetonitril im Verhältnis 1:1 zum Einsatz. Dieses wurde bereits zur Analyse von 8-oxodG in Urin eingesetzt, wobei hier die Probenaufarbeitung durch eine Serie von Festphasenextraktionen erfolgte (Shigenaga *et al.* 1989), sowie auch zur Auftrennung weiterer oxidativer Basenaddukte aus Urin (Helbock *et al.* 1996). Als wässrige Komponente wurde 50 mM Natriumacetatpuffer pH 5,0 als geeignet identifiziert. Die Eignung des chromatographischen Systems, d. h. die vollständige Auftrennung der zu analysierenden Probe, bzw. die Reinheit des 8-oxodG Peaks, wurde durch die Aufnahme hydrodynamischer Voltammogramme bestätigt (s. Abb. 4.8 rechts).

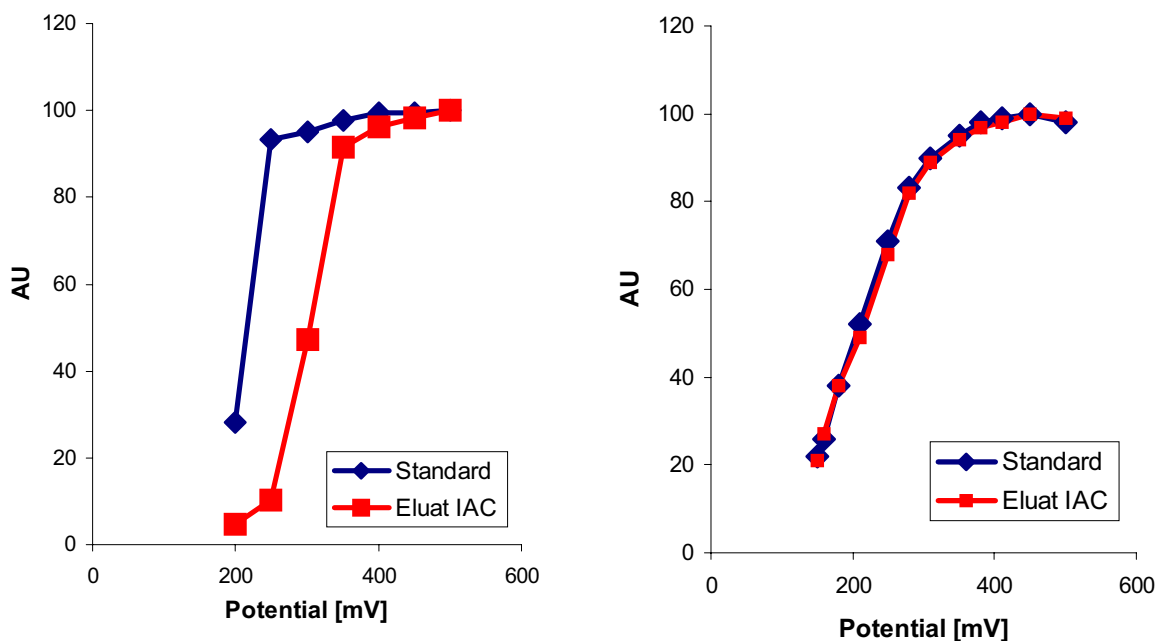


Abb. 4.8

Analyse von Urin auf 8-oxodG mittels HPLC-ECD nach Immunoaffinitätschromatographie mit mAb 1F7: Strom-Spannungs-Kurven des 8-oxodG-Peaks mit isokratischer Elution (links) und Gradientenelution (rechts).

Auch Helbock *et al.* (1998) berichteten zwischenzeitlich über einen großen elektrochemisch aktiven Peak, der in ihrem chromatographischen System nahe dem 8-oxodG Peak eluierte und ggf. mit diesem bei Verwendung der isokratischen Methode interferierte. Dieser wurde ebenfalls durch Verwendung von Gradientenelution mit dem Acetonitril-Methanol-Gemisch aufgelöst, wobei die HPLC Bedingungen von Helbock *et al.* (1996) verwendet wurden. Der

so isolierte unbekannte Peak, der sich mit zunehmendem Alter der Immunoaffinitätsäulen vergrößerte, wurde durch GC-MS als Disaccharid, also einem Zersetzungsprodukt des Säulenmaterials identifiziert. Dies kann jedoch nicht als Erklärung für den in der vorliegenden Arbeit gefundenen abgetrennten Peak herangezogen werden, da dieser auch bei Verwendung der oben beschriebenen Polymethacrylatmatrix auftritt. Vielmehr muß es sich bei der unbekannt Substanz um eine Verbindung handeln, die aus dem Probenmaterial stammt, da sie bei Verwendung von in Wasser gelöstem 8-oxodG-Standard als Probe nicht auftritt.

Abb. 4.9 zeigt typische Chromatogramme, wie sie durch Verwendung von Gradientenelution bei der Analyse von immunoaffinitätschromatographisch aufgereinigtem Urin erhalten wurden.

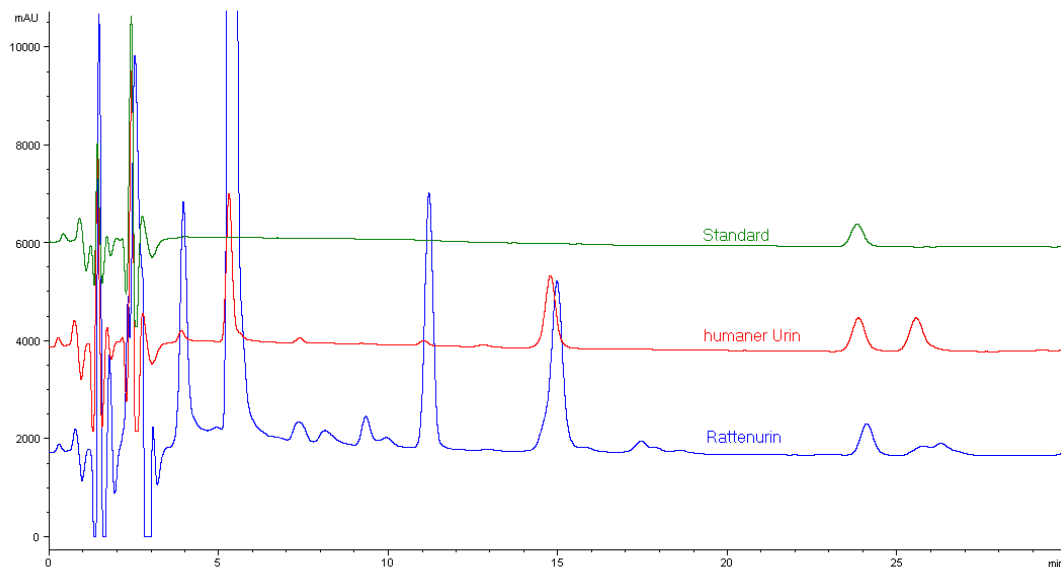


Abb. 4.9

Typische HPLC-ECD Chromatogramme für immunoaffinitätsgereinigten Urin (Mensch/Ratte) bei Verwendung von Gradientenelution; Probenvorbereitung durch Festphasenextraktion und Immunoaffinitätschromatographie mit monoklonalem Antikörper 1F7 immobilisiert an CNBr-Sepharose

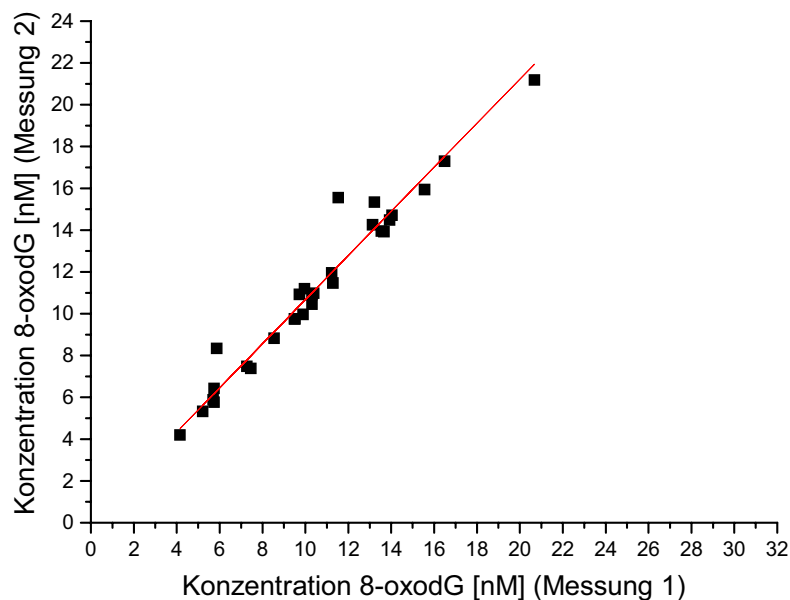
Um die Methode zur Absolutbestimmung von 8-oxodG in Urin einsetzen zu können, wurde die Wiederfindung des Verfahrens unter Verwendung von tritiummarkiertem 8-oxodG bestimmt. Sie betrug 85 % für die gesamte Prozedur.

Park *et al.* (1992) berichten bei Probenvorbereitung durch Festphasenextraktion und Immunoaffinitätschromatographie am monoklonalen Antikörper 15A3 eine schwankende Wiederfindung typischerweise im Bereich von 60 - 90 %. Dies kann bei der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode nicht bestätigt werden. Eine Koelution in der HPLC-

Analyse ist bei der Arbeit von Park *et al.* als wahrscheinlich anzusehen, da die Peakreinheit nicht durch hydrodynamische Voltammogramme belegt wurde und Helbock *et al.* (1992) von einer Peakinterferenz bei Verwendung dieser Methode berichten (s. o.). Diese kann jedoch nicht für die teilweise geringe und schwankende Wiederfindung verantwortlich sein, da die Quantifizierung des Radiotracers hiervon unabhängig ist. Eine mögliche Erklärung wären unterschiedliche Kapazitäten der Immunoaffinitätssäulen, wie sie möglicherweise durch schwankende Qualität des Ascites zustandekommen, wobei teilweise Affinitätssäulen überladen wurden, so daß der Analyt nicht vollständig gebunden wurde.

Zur Überprüfung der Wiederholpräzision der Methode wurde die gleiche Probe (24-Stundenurin eines gesunden männlichen Probanden, „Kontrollurin“) zehnmal am gleichen Tag analysiert. Es ergab sich ein Mittelwert für die 8-oxodG-Konzentration von $14,5 \pm 0,5$ nM, was einem Variationskoeffizienten von 3,5 % entspricht.

Als zusätzlicher Beleg der Wiederholbarkeit der Methode wurde im Rahmen der Routineanalytik ein Satz von Rattenurinproben zweimal an unterschiedlichen Tagen analysiert. Die Korrelation wurde durch lineare Regression nach Deming (Cornbleet u. Gochman 1979, Deming 1964, siehe auch Kapitel 4.6) ermittelt und ist in Abb. 4.10 gezeigt.



Steigung (Konfidenzintervall 95 %)	1,06 (0,96 – 1,15)
Achsenabschnitt (Konfidenzintervall 95 %)	0,12 nM (-0,90 – 1,13)
Korrelationskoeffizient r^2	0,95
Standardfehler Vorhersage $S_{y \cdot x}$	0,61 nM

Abb. 4.10
Korrelation der Ergebnisse bei Wiederholanalyse desselben Probensatzes (Rattenurinproben)

Die Konfidenzintervalle der Regressionskoeffizienten zeigen, daß weder der Achsenabschnitt signifikant unterschiedlich von Null noch die Steigung signifikant unterschiedlich von 1 ist ($p < 0,05$).

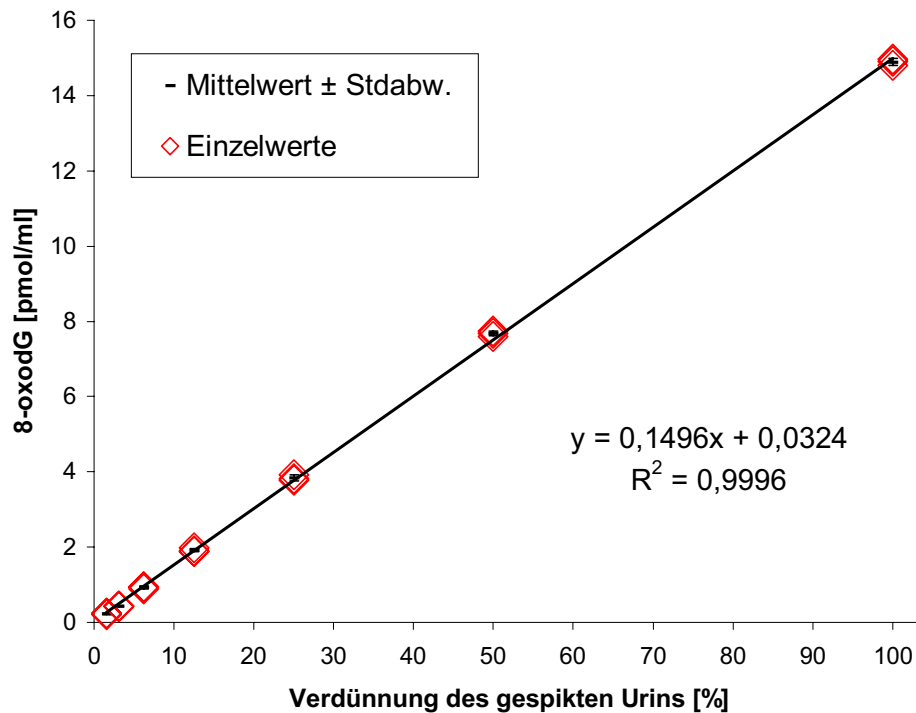
Der Korrelationskoeffizient von 0,95 und der Standardfehler der Vorhersage von 0,61 nM sind ein Maß für die gute Korrelation der in beiden Messungen erhaltenen Einzelwerte miteinander. Nach Durchführung eines Ausreißertests mit dem Akzeptanzkriterium Residue kleiner $4 S_{y \cdot x}$ (Cornbleet u. Gochman 1979) steigt der Korrelationskoeffizient auf 0,9981 und der Standardfehler der Vorhersage fällt auf 0,13 nM.

Um den Einsatz von Radiotracern im Routinebetrieb zu vermeiden, wurde eine Probe des Kontrollurins in jeder Analysensequenz analysiert. Es ergab sich bei 22-facher Analyse in unterschiedlichen Sequenzen ein Mittelwert der 8-oxodG-Konzentration $15,2 \pm 0,9$ nM (VK 5,6 %). Dieser Wert läßt sich mit der Einschränkung, daß es sich um Einzelbestimmungen an verschiedenen Tagen handelt, als intermediäre Wiederholpräzision der Methode interpretieren. Basierend auf diesen Werten wurde ein Akzeptanzkriterium für die einzelne Analysensequenz festgelegt. Die Konzentration an 8-oxodG im Kontrollurin mußte im Intervall von ± 10 % um den langfristigen Mittelwert liegen. Dieses Intervall liegt innerhalb der 2σ -Umgebung des langfristigen Mittelwertes. Lag der in einer Sequenz gefundene Wert für die Kontrollprobe außerhalb dieses Intervalls, wurden die Werte verworfen und die Sequenz wiederholt.

Die Reproduzierbarkeit der Methode wurde zusätzlich auch durch die wiederholte Analyse eines Satzes humaner Urinproben im Rahmen eines Ringversuches gezeigt.

Zur weiteren Validierung der Methode über einen größeren Konzentrationsbereich wurde eine Verdünnungsreihe aus einem mit 8-oxodG gespickten Urin mehrfach analysiert. Das Ergebnis ist in Abb. 4.11 gezeigt.

Die Methode zeigt eine hervorragende Linearität bis in den niedrigsten Konzentrationsbereich hinein ($r^2 = 0,9996$). Das Konfidenzintervall des Achsenabschnitts schließt Null mit ein (Achsenabschnitt $0,03 \pm 0,03$ nM). Dies bestätigt die Richtigkeit der Methode, da sich Artefakte aus der Immunoaffinitätschromatographie bei niedrigeren Konzentrationen des Analyten stärker auswirken würden. Die Standardabweichungen im Bereich physiologischer Konzentrationen und darüber betrug bei Dreifachbestimmung weniger als 1 %. Bei allen Verdünnungen bis hinab zu 1 : 32 betrug die Standardabweichung weniger als 4 %.

**Abb. 4.11**

Analyse einer Verdünnungsreihe von mit 8-oxodG gespiktem Urin (Dreifachbestimmung)

4.4 Analyse von 8-oxodG in DNA

Zur Isolierung von DNA aus frischem oder gefrorenem Vollblut wurde zunächst das Kristal Kit von MWG Biotech getestet. Dieses beruht auf dem Prinzip des Aussalzens der zuvor enzymatisch freigelegten DNA. Die so isolierte DNA zeigte jedoch keine ausreichende Reinheit, die Extraktionsausbeute war zu gering und die DNA ließ sich nach dem Fällern nicht mehr vollständig in Lösung bringen.

Deshalb sollte zur Analyse von 8-oxodG in DNA aus kernhaltigen Blutzellen zunächst das Verfahren nach Adachi (Adachi *et al.* 1995) etabliert werden. Hierbei wird die DNA aus kernhaltigen Zellen durch Proteinverdau mit Pronase E isoliert und ohne organische Extraktion direkt mit Ethanol gefällt (Pronase/Ethanol-Methode: Kendall *et al.* 1991). Adachi *et al.* setzten dieses Verfahren zur Isolierung von DNA aus Gewebeproben ein und modifizierten es, indem sie butyliertes Hydroxytoluol als Antioxidans zugaben. Ein potentiell Problem ist die lange Inkubationszeit von 6 Stunden bei 45 °C. Im Rahmen dieser Arbeit zeigte diese Methode eine große Schwankungsbreite bei der Ausbeute, und die Reinheit der erhaltenen DNA war nicht ausreichend.

Aus diesem Grund wurde die DNA-Isolierungsmethode nach Wang (Wang *et al.* 1994) etabliert, welche erstmals von Nakae (Nakae *et al.* 1995) für den Nachweis von 8-oxodG in DNA-Proben aus Gewebe eingesetzt wurde. Diese Methode beruht auf Isopropanolfractionierung in Anwesenheit von chaotropem NaI nach Zellyse und Proteinverdau mit Proteinase K und erlaubt eine rasche Isolierung der DNA unter milden Bedingungen (Inkubation 1 h bei 37 °C). Die Methode wurde von Helbock (Helbock *et al.* 1998) modifiziert, indem bei der Zellyse der inaktivierende Eisenchelator Desferroxaminmesylat (Desferal, DFAM) in einer Konzentration von 1 mM zugesetzt wurde. Im Rahmen der dieser Arbeit zugrundeliegenden Methodenentwicklung stellte sich heraus, daß der Zusatz zu allen Lösungen während der DNA-Isolierung und -Hydrolyse in einer Konzentration von 0,1 mM ausreichend ist. Die zur DNA-Isolierung nach diesem Verfahren notwendigen Lösungen sind kommerziell als WB Kit (WAKO Pure Chemical, Neuss) erhältlich. Um jedoch eine bessere Kontrolle über Qualität und Reinheit der eingesetzten Chemikalien zu haben, wurden die Lösungen grundsätzlich selbst hergestellt. Insbesondere ist die Qualität des verwendete Natriumiodids kritisch, da es als Verunreinigung Iodat enthalten kann, welches oxidierend wirkt und somit zu einer Artefaktbildung führen kann. Als Qualität der Wahl wurde hochreines Natriumiodid von Aldrich (99,999 %) verwendet. Die Natriumiodidlösung wurde immer frisch angesetzt. Hierzu wurde ein 1 : 1 Pufferkonzentrat hergestellt, in welchem das Natriumiodid gelöst wurde. Anschließend wurde mit Wasser aufgefüllt. Um die Puffer bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank lagern zu können, wurde das Desferroxaminmesylat als 0,1 M Lösung im Verhältnis 1:1000 in der Regel erst unmittelbar vor Einsatz der Puffer dazugegeben. Um eine potentielle Artefaktbildung durch gelösten Sauerstoff oder Luftsauerstoff zu minimieren, wurden alle Puffer mit Helium entgast und die gesamte DNA-Isolierung und -Hydrolyse unter Argon als Schutzgas durchgeführt. Unter Verwendung dieser Methode wurden typischerweise aus 1 ml Blut ca. 50 µg DNA gewonnen.

Anfänglich wurde die DNA vor Hydrolyse über Nacht bei 6 °C gelöst. Die Hydrolyse selbst wurde zunächst nach der Methode von Shigenaga (Shigenaga *et al.* 1994) durchgeführt. Hierbei wird in Natriumacetatpuffer bei pH 5,0 zunächst mit Nuklease P1 für 10 min bei 70 °C behandelt. Anschließend wird durch Zugabe von 1 M Tris/HCl Puffer (pH 8,5) der pH-Wert auf ca. 8 eingestellt und mit Alkalischer Phosphatase für 1 Stunde bei 37 °C behandelt. Die Lösung der Nukleotide wird mit 3 M Natriumacetatpuffer (pH 5) neutralisiert. Die Enzyme und nicht hydrolysierte DNA werden durch Ultrafiltration abgetrennt, was die Lebenszeit der HPLC-Säule verlängert. Hierzu sollten aber nicht die in der Originalpublikation eingesetzten Filter mit einer Ausschlußgröße von 30 kDa verwendet werden, da diese die

Alkalische Phosphatase (ca. 22 kDa) nicht zurückhalten, sondern Filter mit einer Ausschlußgröße von 10 kDa.

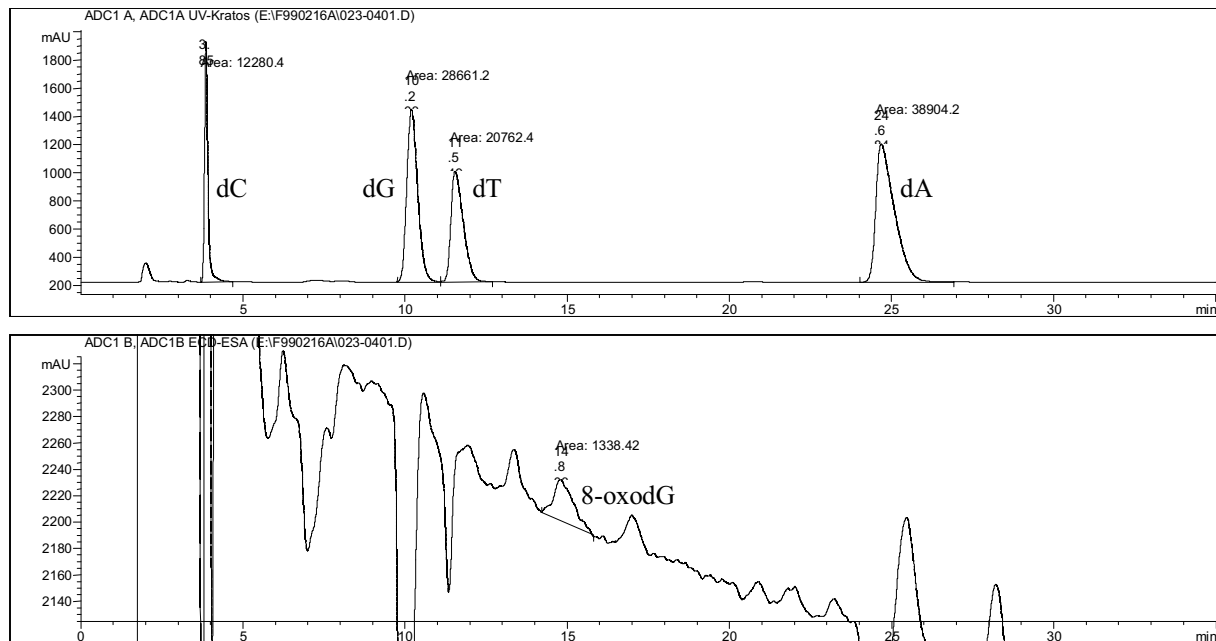
Die Analyse mittels HPLC-ECD wurde mit isokratischer Elution mit 8 % Methanol in 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 5,0) durchgeführt. Für den Eluenten wurde hochreines Milli Q Wasser verwendet, aus dem elektrochemisch aktive Verunreinigungen mittels einer C₁₈-Festphasenextraktionskartusche entfernt worden waren, um das Rauschen der Basislinie zu minimieren.

Die Verwendung dieser Hydrolysemethode lieferte Konzentrationen in der Größenordnung von 1 8-oxodG/10⁵ dG. Dies deutete auf Artefaktbildung hin.

Zwischenzeitlich hatten Hofer und Möller publiziert, daß sowohl die Inkubation bei Temperaturen über 50 °C für 1,5 Stunden als auch die Inkubation bei höheren pH-Werten zu einer artifiziellen Bildung von 8-oxodG aus dG führen kann (Hofer u. Möller 1998). Shigenaga hatte berichtet, daß bei 70 °C eine Artefaktbildung bei pH 8,5 erst bei einer Inkubationszeit von länger als 15 min zu beobachten war. Aus diesem Grund wurde das Hydrolyseverfahren nach Hofer und Möller getestet. Die frisch isolierte DNA wird hierbei im gleichen Puffer aufgenommen und direkt mit Alkalischer Phosphatase und Nuklease P1 für 1,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit stellte sich durch Methodenoptimierung heraus, daß sich die Inkubationszeit auch auf 1 Stunde verkürzen läßt. Vorteil der Methode ist neben Vermeidung der hohen Inkubationstemperatur von 70 °C, daß die Hydrolyse in einem Schritt durchgeführt werden kann, ohne daß die DNA vorher vollständig gelöst sein muß, da sich diese im Laufe der einstündigen Inkubation bei 37 °C löst. Obwohl Nuklease P1 außerhalb des Temperaturoptimums von 65 – 70 °C und Alkalische Phosphatase außerhalb des pH-Optimums von 8,5 eingesetzt wurden, waren die Hydrolyseausbeuten vergleichbar mit den Ausbeuten bei Verwendung des Verfahrens nach Shigenaga (70 – 80 %). Die Konzentration von 8-oxodG lag jedoch niedriger, so auch die Streubreite der Werte. Der Einsatz dieses Hydrolyseverfahrens reduzierte den Gehalt an 8-oxodG in der DNA um ca. den Faktor 10.

Zur Überprüfung des Verfahrens wurden 3 Aliquots (1 ml) einer humanen Blutprobe eines gesunden männlichen Probanden parallel auf ihren Gehalt an 8-oxodG analysiert. Der Mittelwert wurde auf $0,22 \pm 0,03$ 8-oxodG/10⁵ dG (VK 16 %) festgelegt. Dies belegt die prinzipielle Eignung der Methode.

Typische Chromatogramme sind in Abb. 4.12 gezeigt.

**Abb. 4.12****Chromatographische Analyse von DNA-Hydrolysaten: Nukleosidquantifizierung durch UV-Detektion (oben) und Quantifizierung von 8-oxodG durch elektrochemische Detektion (unten)**

Zum Nachweis von 8-oxodG in DNA aus Gewebeproben der Lunge, dem primären Zielgewebe im durchzuführenden Tierversuch, mußte das Verfahren zur DNA-Isolierung angepaßt werden. Zur Homogenisierung wurden zwei unterschiedliche Verfahren getestet: Zum einen wurden die gefrorenen Lungen in flüssigem Stickstoff in einem Porzellanmörser pulverisiert, zum anderen wurde die Homogenisierung mit einem Glas/Teflon-Potter vorgenommen, wobei anschließend größere Gewebestücke mit einer Kunststoffpinzette entfernt wurden. Die DNA-Ausbeute lag bei Verwendung des Potters höher. Um die weitgehende Resuspendierung des nukleinhaltigen Pellets nach Zellyse zu erleichtern, wurde die Reaktionslösung zunächst ohne SDS zugesetzt, so daß ein Schäumen vermieden wurde. Die Menge an Proteinase K für den Proteinverdau wurde auf das eineinhalbfache erhöht. Da zur DNA-Isolierung keine Collagenase eingesetzt wurde, enthielt das DNA-Hydrolysat später teilweise hydrolysierte Proteine als Verunreinigung, was die Bestimmung der nicht modifizierten Nukleotide mittels UV-Detektion erschwerte. Die elektrochemische Bestimmung von 8-oxodG war hiervon nicht beeinflusst. Die Bestimmung der nicht modifizierten Nukleoside in der Probe erfolgte daher in einer getrennten Analyse mittels LC-MS mit einer hierfür entwickelten Methode. Die Quantifizierung erfolgte durch Verwendung des Standardadditionsverfahrens, um die Verfälschung der Ergebnisse durch unterschiedliche Matrixeffekte in Probe und Standard zu vermeiden.

4.5 Methodenvergleiche und Ringversuch zur Analyse von 8-oxodG in DNA

4.5.1 ESCODD

Der Name ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage) bezeichnet einen weltweiten losen Zusammenschluß von Laboratorien unter der Koordination von Dr. Andrew Collins (DNA Instability Group, Rowett Research Institute, Schottland). ESCODD beschäftigt sich mit der Evaluierung und Validierung von unterschiedlichen Methoden zur Bestimmung von 8-oxodG vor allem in DNA in den verschiedenen teilnehmenden Laboratorien (HPLC-ECD, GC-MS, LC-MS-MS). Zur Vorbereitung eines größeren Projektes wurden zunächst die in den verschiedenen Laboratorien etablierten Methoden miteinander durch Messung der gleichen Standards verglichen. Hierzu wurden pro Laboratorium und Methode ein 8-oxodG-Standard als Triplikat verschickt, welcher an drei verschiedenen Tagen, die mindestens zwei Tage auseinanderlagen, in den verschiedenen Laboratorien jeweils als Dreifachbestimmung unter Verwendung des üblicherweise in diesem Laboratorium verwendeten Standards analysiert werden sollten. Die Ergebnisse wurden vom Koordinator gesammelt und bezüglich Standardabweichung der Messung an einem Tag und der Mittelwerte an den unterschiedlichen Tagen ausgewertet. Ferner wurden die Werte mit dem Sollwert, der durch UV-Absorption in der konzentrierten Stammlösung sowie wiederholte Analysen der verdünnten Proben durch das koordinierende Laboratorium mittels HPLC-ECD ermittelt worden war, verglichen. Die Rohdaten wurden an alle Laboratorien verteilt, so daß eigene Auswertungen möglich waren. Die Ergebnisse aller Laboratorien sind in Abb. 4.13 dargestellt.

Der Sollwert der zu analysierenden Standardlösung betrug $6,9 \pm 0,5 \mu\text{M}$. Die meisten HPLC-Methoden lagen innerhalb von $\pm 40 \%$ um diesen Wert, ebenso die beiden LC-MS-MS-Methoden und zwei von vier GC-MS-Methoden.

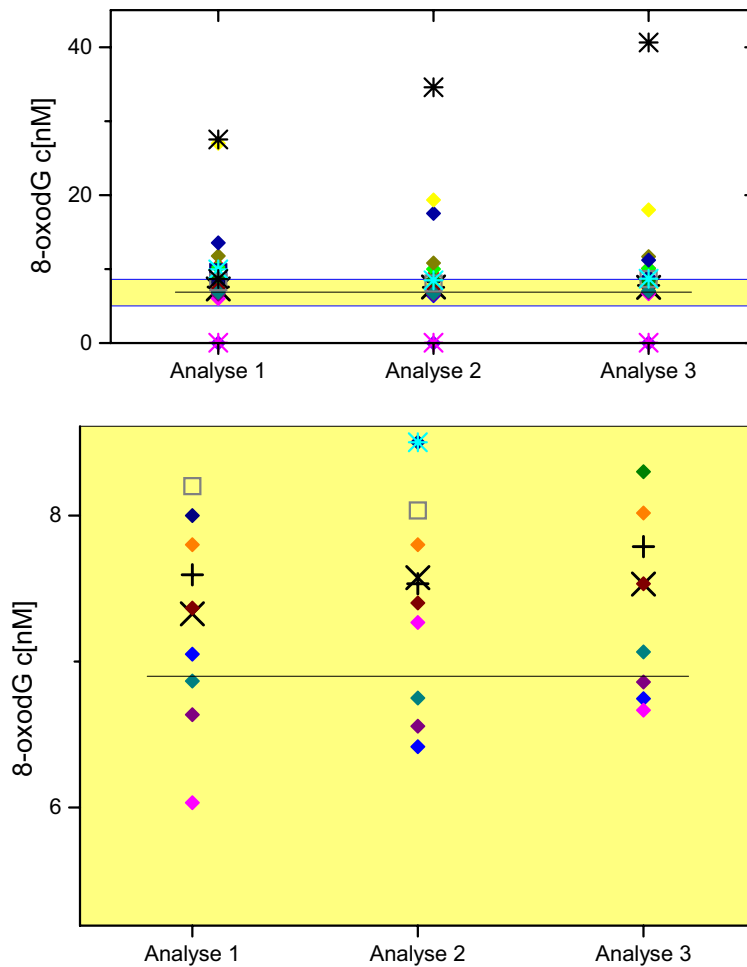


Abb. 4.13

Analyse von 8-oxodG-Standard in verschiedenen Instituten (jeweils Dreifachbestimmung pro Analyse): HPLC-ECD \blacklozenge (eigene Werte: DNA \times , Urin \oplus), GC-MS $*$, LC-MS-MS \square

Betrachtet man die Ergebnisse der HPLC-ECD Methoden insgesamt, fällt zunächst auf, daß ein Laboratorium den Gehalt an 8-oxodG um den Faktor 1000 unterschätzt. Hier liegt die Annahme eines Rechen- oder Verdünnungsfehlers nahe. Zwei Laboratorien zeichnen sich durch hohe relative Standardabweichungen (bis zu 51 % innerhalb eines Tages und 19 % an verschiedenen Tagen) aus. Beide Methoden zeigen eine Überschätzung der 8-oxodG Konzentration um 100 bzw. 300 %. Mit diesen Ausnahmen sind die Standardabweichungen bei HPLC-ECD im allgemeinen niedriger als bei MS-Kopplungstechniken wie GC-MS oder LC-MS-MS. Die relativen Standardabweichungen bei der Dreifachbestimmung mittels GC-MS waren trotz Verwendung eines internen (M+4)-Standards in der Regel höher als die bei der Verwendung von HPLC-ECD, welche weitgehend unter 10 % lagen. Dies ist

vermutlich auf den zusätzlichen Schritt der Hydrolyse und Derivatsierung zurückzuführen. Ferner überrascht, daß die beiden LC-MS-MS-Methoden die 8-oxodG-Konzentration deutlich überschätzen (19 und 39 %). Die Standardabweichung innerhalb eines Tages ist trotz interner Standardisierung mittels des (M+4)-Standards mit bis zu 6,8 % auffallend hoch.

Die verbreitetste Methode zur Quantifizierung von 8-oxodG ist HPLC mit elektrochemischer Detektion. Diese Methode zeigt sich im allgemeinen den MS-Kopplungstechniken überlegen und stellt somit zur Zeit das geeignetste Verfahren zur Quantifizierung dar. Daß in einigen wenigen Laboratorien die eigentlich sehr präzise und reproduzierbaren HPLC-ECD-Methoden zu sehr starken Überschätzungen (bis zu 300 %) und großen Standardabweichungen (bis zu 50 %) führte, zeigt, daß ohne eine ausführliche Methodenüberprüfung die Messung von 8-oxodG nicht verlässlich erfolgen kann.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Methoden zeigten im ESCODD-Ringversuch relative Standardabweichungen für Analysen am gleichen Tag zwischen 0,1 und 1,6 % und zwischen verschiedenen Tagen von 1,4 %. Die Konzentration von 8-oxodG in der zu analysierenden Lösung wurde als $7,5 \pm 0,1 \mu\text{M}$ bestimmt und lag damit 8,3 % über der vorgegebenen Konzentration. Basierend auf diesen Ergebnissen gehören die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten HPLC-ECD Methoden zu den Methoden mit der höchsten Präzision, Reproduzierbarkeit und Richtigkeit.

Zwischenzeitlich wurden im Rahmen von ESCODD weitere Versuche durchgeführt. Anhand von Kalbsthymus-DNA wurden Hydrolyseverfahren sowie anhand von unterschiedlich stark oxidiertem Kalbsthymus-DNA die Fähigkeit der Methoden, Dosis-Wirkungs-Abhängigkeiten zu detektieren, getestet. Standards wurden für diese Experimente zentral verteilt, wodurch ein Teil der oben beschriebenen Probleme umgangen wurde. Die Ergebnisse zeigen eine Verbesserung gegenüber dem oben beschriebenen Ringversuch. Die überwiegende Zahl der Ergebnisse war vergleichbar. Teilweise konnte jedoch die Zunahme von 8-oxodG in stark geschädigter DNA nicht detektiert werden, teilweise wurde diese auch überschätzt. (ESCODD 2002a). Die Hydrolyseverfahren wurden zusätzlich mittels synthetischer Oligonukleotide, die kein dG enthielten, überprüft. Die Ergebnisse zeigen, daß die meisten Verfahren 8-oxodG vollständig freisetzen (Jensen u. ESCODD 2002). Die im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit interessantesten Ergebnisse liefert ESCODD für die Analyse biologischer DNA-Proben aus HeLa-Zellen und Schweineleber (ESCODD 2002b). Der Median für 8-oxodG in Schweineleber lag bei $1 \text{ 8-oxodG}/10^5 \text{ dG}$, für HeLa DNA bei $0,5 \text{ 8-oxodG}/10^5 \text{ dG}$. Allerdings lagen höchste und niedrigste Werte um den Faktor 200 bzw.

100 auseinander. Insbesondere fällt die starke Überschätzung durch GC-MS und eine LC-MS-MS Methode auf. Interessant ist jedoch, daß die niedrigsten Werte für HeLa-DNA, die durch HPLC-ECD ermittelt wurden, von Werten, die mit enzymatischen Methoden bestimmt wurden und um den Median dieser Methoden lagen, nur um den Faktor 2 – 3 auseinander lagen. Hierdurch zeichnet sich der Weg zu einem Konsens zwischen den beiden methodischen Ansätzen ab. Die Schlußfolgerung der Autoren ist, daß davon auszugehen ist, daß für die Analyse mittels HPLC-ECD die niedrigsten Werte als die glaubwürdigsten, also „richtigen“, Werte angesehen werden müssen. Die erhaltenen Werte von 0,1 – 0,5 8-oxodG/10⁵ dG für HeLa-DNA sind konsistent mit Literaturwerten für lymphozytäre DNA (Nakajima *et al.* 1996, Lenton *et al.* 1999, Bianchini *et al.* 2001). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten Werte von 0,2 8-oxodG/10⁵ dG für lymphozytäre DNA sind konsistent mit diesen Ergebnissen und liegen verglichen mit den ESCODD-Werten für HeLa-DNA im untersten Bereich der Methoden. Auf Basis der o. g. Argumentation ist somit belegt, daß die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode zu Bestimmung von 8-oxodG in DNA verlässliche Werte liefert.

4.6 Methodenvergleiche und Ringversuch zur Analyse von 8-oxodG in Urin

In der vorliegenden Arbeit wurden Vergleichsmessungen mit verschiedenen Methoden für die Bestimmung von 8-oxodG im Urin durchgeführt.

Zur Auswertung der Vergleichsmessungen, die vor allem Proben über einen Konzentrationsbereich enthielten, wurde die lineare Regression nach Deming (Cornbleet u. Gochman 1979, Deming 1964) durchgeführt. Die übliche Regression der kleinsten Fehlerquadrate ist nicht geeignet, da diese davon ausgeht, daß nur die abhängige Variable mit einem Fehler behaftet ist. Dies trifft jedoch auf Methodenvergleiche nicht zu, da beide Variablen einen Meßfehler aufweisen (Cornbleet und Gochman 1979). Die Regression nach Deming minimiert daher nicht die Summe der Fehlerquadrate in y-Richtung, sondern in x- und y-Richtung, also senkrecht zur Regressionsgeraden. Die Berechnung enthält als Maß für unterschiedliche Varianzen der Meßmethoden den Ausdruck λ . Dieser wird in der Regel aus den Standardabweichungen von Wiederholmessungen bestimmt. Liegen die Meßergebnisse beider Methoden in einem vergleichbaren Bereich, können diese auch durch die relativen Standardabweichungen ersetzt werden, da der Einfluß der Unterschiede vernachlässigbar ist. Fehlen Angaben zur Varianz eines Meßverfahrens, wird λ als 1 angenommen (Smith *et al.*

1980). Der Standardfehler der Vorhersage $S_{y \cdot x}$ kann zum Vergleich verschiedener Methoden herangezogen werden. Wie der Korrelationskoeffizient r^2 zeigt er die Größenordnung des zufälligen Fehlers im Methodenvergleich an. Da jedoch die Empfindlichkeit des Korrelationskoeffizienten r^2 bestimmt wird durch die Spannweite des im Methodenvergleich untersuchten Konzentrationsbereiches, ist er kein geeignetes Maß für den Vergleich mehrerer Methoden, insbesondere wenn unterschiedliche Konzentrationsbereiche für verschiedene Methodenvergleiche vorliegen (Stöckl *et al.* 1998, Sachs 1997).

4.6.1 Vergleichsmessungen von 8-oxodG in Urin mittels LC-MS-MS

Als Pilotstudie wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst Vergleichsmessungen an Rattenurinproben im Laboratorium von Prof. H. E. Poulsen, Rigshospitalet Kopenhagen, durchgeführt. Die dort etablierte LC-MS-MS-Methode (Weimann *et al.* 2001; Weimann *et al.* 2002) beruht auf Analyse direkt aus der Probe nach Zusatz eines internen M+4-Standards. Es wurden verschiedene Vergleichsmessungen durchgeführt, von denen hier im Einzelnen nur eine gezeigt ist (s. Abb. 4.14). In diesem Fall wurden die Analysen mit den verschiedenen Methoden jeweils in einer Sequenz durchgeführt.

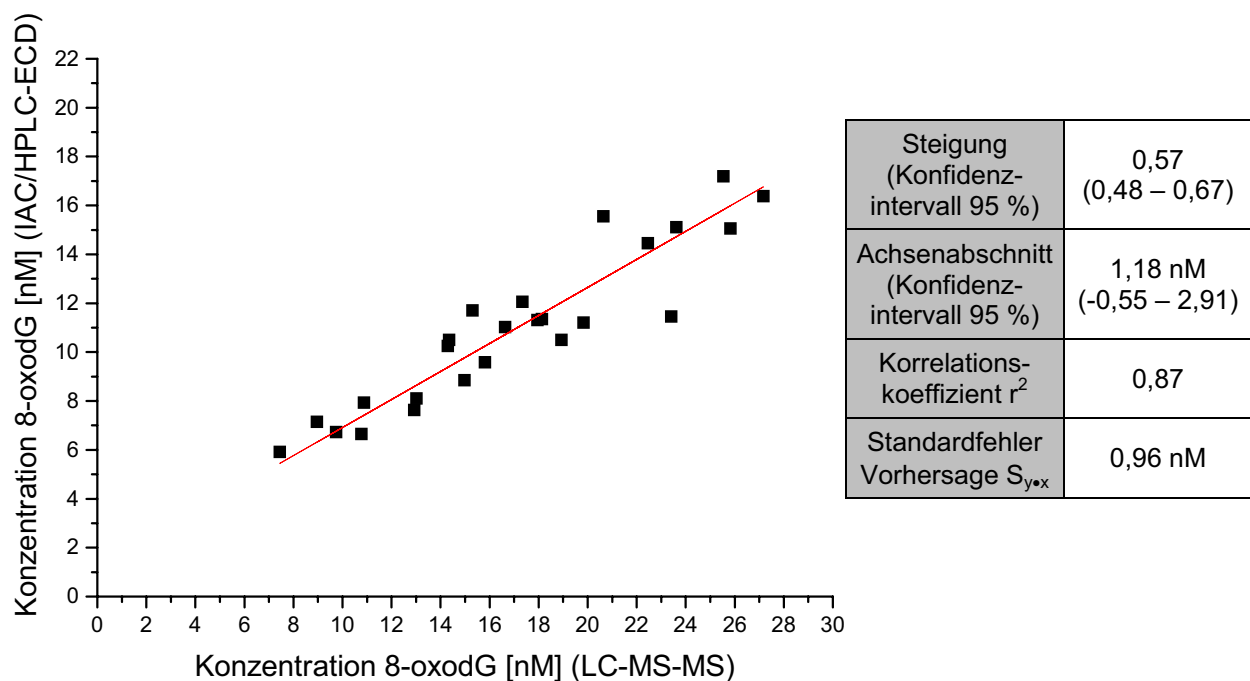


Abb. 4.14

Vergleichende Analyse von Rattenurinproben auf 8-oxodG (Einzelversuch) mit Immunoaffinitätschromatographie (IAC) und HPLC-ECD gegenüber LC-MS-MS

Alle Einzelergebnisse aus Vergleichsmessungen sind zusammen in Abb. 4.15 gezeigt.

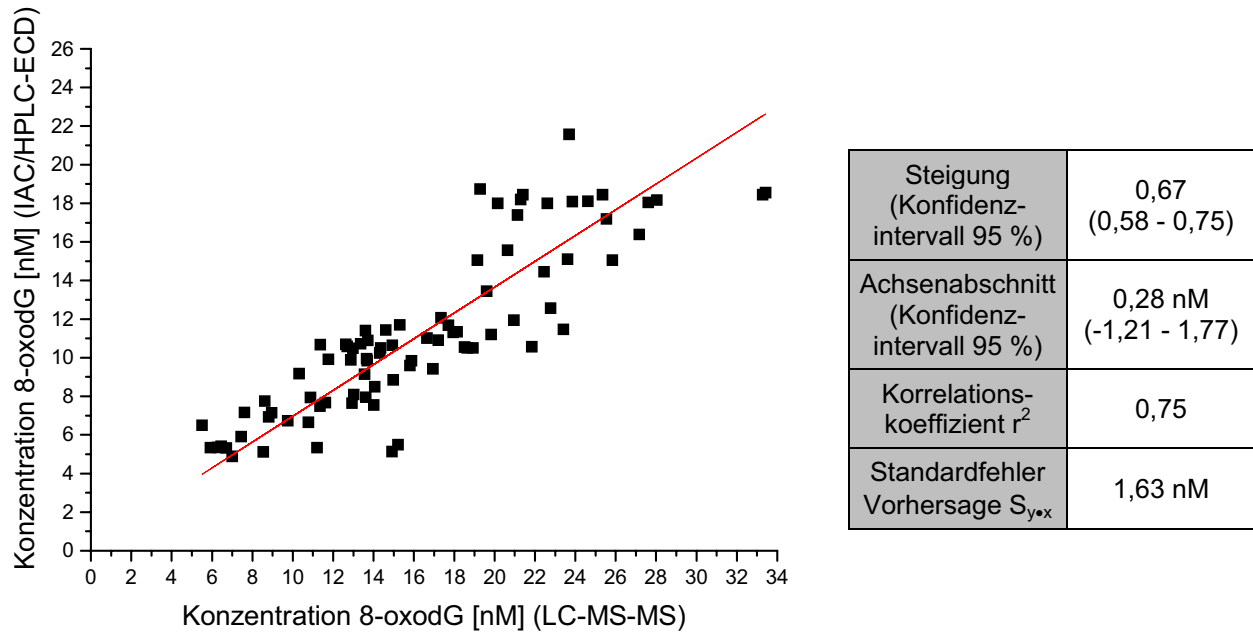


Abb. 4.15

Vergleichende Analyse von Rattenurinproben auf 8-oxodG (Zusammenfassung aller Ergebnisse) mit Immunoaffinitätschromatographie (IAC) und HPLC-ECD gegenüber LC-MS-MS

Da im Rahmen dieser Vergleichsmessungen keine Wiederholanalysen durchgeführt wurden, wurden zur Auswertung als Maß für die Methodenvarianz die Variationskoeffizienten aus der Methodenvalidierung für die Immunoaffinitätschromatographie mit HPLC-ECD und der publizierte Wert für die LC-MS-MS-Methode (Weimann *et al.* 2002) verwendet.

Beide Methoden liefern Ergebnisse in der gleichen Größenordnung. Es liegt eine gute Korrelation vor, der Standardfehler beträgt bei Analyse in der gleichen Sequenz 0,96 nM ($r^2 = 0,87$), bei Berücksichtigung der intermediären Präzision, d. h. bei Analyse an unterschiedlichen Tagen, 1,63 nM ($r^2 = 0,75$). Der Achsenabschnitt ist nicht signifikant von Null verschieden. Die Steigung der Regressionsgeraden ist jedoch von 1 signifikant verschieden. Dies bedeutet eine systematische Überschätzung der Meßergebnisse durch die LC-MS-MS-Methode oder eine systematische Unterschätzung durch die Immunoaffinitätschromatographie mit HPLC-ECD. Dieser Effekt liegt in der Größenordnung von 30 – 40 % (Konfidenzintervall (95 %) 25 - 50 %). Eine mögliche Erklärung hierfür ist die im Rahmen des ESCODD-Standardvergleichs festgestellte Überschätzung von ca. 10 bzw. 30 % für die beiden dort verwendeten LC-MS-MS-Methoden im Vergleich zu den mit Immunoaffinitäts-

chromatographie und HPLC-ECD erhaltenen Ergebnissen. Da die Methoden zur Bestimmung von 8-oxodG im Urin in der Regel jedoch zum Vergleich von Gruppen z. B. mit unterschiedlicher Exposition herangezogen werden, ist die Absolutbestimmung von sekundärer Bedeutung. Vor diesem Hintergrund ist ein Unterschied in den Meßergebnissen von 30 - 40 %, dem kein konstanter, sondern ein proportionaler Fehler zugrundeliegt, akzeptabel.

Beim Betrachten der Daten fällt auf, daß es im oberen Konzentrationsbereich einige Punkte gibt, die gegenüber der Regressionsgeraden über die Streuung hinaus hin zu höheren Konzentrationen bei der Immunoaffinitätschromatographie mit HPLC-ECD abweichen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, daß bei der LC-MS-MS-Methode die Proben vor Verwendung zentrifugiert werden, während die Probenvorbereitung für die Immunoaffinitätschromatographie Erwärmen und Verdünnen beinhaltet. Im letzteren Fall wird vorhandener Niederschlag weitgehend gelöst, wodurch auch adsorbierter Analyt gelöst wird. Ausschluß von adsorbiertem 8-oxodG durch Abzentrifugieren von Präzipitat aus der Probe kann zu signifikanten Fehlern führen (Bogdanov *et al.* 1999). Im höheren Konzentrationsbereich tritt bei den Rattenurinproben prinzipiell eine starke Präzipitation auf.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß beide Methoden gut miteinander korrelieren und vergleichbare Meßergebnisse liefern.

4.6.2 Ringversuch zur Messung von 8-oxodG in Urin

Nach den erfolgreichen Ergebnissen im Rahmen der Vergleichsstudie zwischen der hier entwickelten Methode und der LC-MS-MS-Methode wurde ein Protokoll für einen umfangreicheren Ringversuch für die Bestimmung von 8-oxodG in Urin mit unterschiedlichen Methoden erarbeitet. Dieser Ringversuch wurde im Rahmen dieser Arbeit koordiniert.

Geplante Teilnehmer und Methoden des Ringversuchs waren die Laboratorien von:

- Prof. H. E. Poulsen, Rigshospitalet Kopenhagen (LC-MS-MS)
- Prof. S. Loft, Panum Institut Kopenhagen (3D-HPLC-ECD)
- Prof. S. Toyokuni, Universität Kyoto (ELISA mit mAb N45.1)
- ESA Inc., Chelmsford MA USA („Carbon Column“ HPLC-ECD)
- Prof. H. Bartsch, DKFZ Heidelberg (Immunoaffinätschromatographie mit HPLC-ECD und Gradientenelution)

Der zu untersuchende Probensatz wurde auf Trockeneis mittels Kurierdienst verschickt und beinhaltet:

- 1 Standard 8-oxodG in 50 mM Natriumphosphat (pH 7,4) 114,5 μM
- 4 humane Urinproben (humaner „Kontrollurin“)
- 7 Proben einer Verdünnungsreihe aus mit 8-oxodG gespickten humanem Kontrollurin
- 28 Rattenurinproben (Ozonversuch)
- 2x 28 humane Urinproben (Prof. Poulsen, Rigshospitalet Kopenhagen)

Der Standard sollte, verdünnt auf eine Konzentration von 1 μM , im Vergleich mit den Standards in den jeweiligen Laboratorien einmal gemessen werden. In jeden Satz zu analysierender Proben sollte eine Probe des humanen Kontrollurins einbezogen werden, so daß dieser Wert an vier unterschiedlichen Tagen bestimmt werden sollte. Die Verdünnungsreihe war einmal zu analysieren. Die Rattenurinproben sollten einmal analysiert werden, die humanen Urinproben zweimal an verschiedenen Tagen. Die ermittelten Daten sollten in eine vorbereitete Excel-Tabelle eingetragen und im koordinierenden Laboratorium gesammelt werden. Die statistische Auswertung sollte zusammen mit den Einzelergebnissen an alle teilnehmenden Laboratorien verteilt werden.

Da nicht alle teilnehmenden Laboratorien die Anweisungen für die Analysen befolgten und einige Laboratorien keine Daten zur Verfügung stellten, kann im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur eine teilweise Auswertung des Versuchs durchgeführt werden. Vollständige Ergebnisse für alle Analysen gemäß den Anweisungen zur Versuchsdurchführung liegen nur für den ELISA und die Immunoaffinitätschromatographie mit HPLC-ECD vor. Für die Carbon Column HPLC-ECD liegen nur Ergebnisse für die Rattenurinproben und die Verdünnungsreihe vor.

Für den Vergleich der Standards liegen nur Daten von Prof. S. Toyokuni für den ELISA vor. Die von ihm verwendeten Standards zeigen auf dem Niveau 100 nM eine Abweichung von 6 % nach unten und auf dem Niveau 50 nM eine Abweichung von 20 % nach unten. Die Größenordnung dieser Abweichung ist basierend auf den Ergebnissen des ESCODD Standardvergleiches akzeptabel. Der Unterschied auf den beiden Niveaus deutet jedoch auf eine suboptimale Linearität der Eichung oder der Methode hin. Auch eine zufällige Schwankung aufgrund der höheren Streuung der Methode ist eine mögliche Erklärung, da es sich um eine Einzelbestimmung handelt.

Die Messung der humanen Kontrollurinproben ergab jeweils Schwankungen in der Größenordnung von 10 % bei Verwendung von ELISA und Carbon Column HPLC-ECD, während sie bei Verwendung der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode unter 3 % lag. Die große Streuung ist vor allem im Falle der Carbon Column HPLC-ECD erstaunlich, da hier die Proben nicht nach Anweisung in unterschiedlichen Analysensätzen an verschiedenen Tagen analysiert wurden, sondern die Schwankung die Streuung innerhalb einer Analysensequenz angibt. Ferner handelt es sich hierbei um eine Methode, bei der die Probe ohne weitere Aufarbeitung direkt zur Analyse verwendet wird. Die einzelnen Ergebnisse sind in Tab. 4.2 dargestellt.

Tab. 4.2

Ringversuch zu 8-oxodG in Urin: Wiederholte Analyse einer humanen Urinproben an vier verschiedenen Tagen (¹Proben im gleichen Analysensatz an einem Tag analysiert.)

	Konzentration 8-oxodG [nM]		
	IAC HPLC-ECD	Carbon Column HPLC-ECD ¹	ELISA
Analyse 1	14,74	15,37	38,58
Analyse 2	15,23	16,09	30,30
Analyse 3	15,72	12,58	40,17
Analyse 4	14,79	17,78	41,76
Mittelwert ± Standardabweichung (± VK)	15,12 ± 0,40 (± 2,6 %)	15,46 ± 1,88 (± 12,2 %)	37,70 ± 4,42 (± 11,7 %)

Die mit Immunoaffinitätschromatographie und HPLC-ECD ermittelten Werte sind sehr gut mit den mittels Carbon Column/HPLC-ECD ermittelten Werten vergleichbar und zeigen im Mittelwert eine Abweichung von nur 2 %. Demgegenüber ist die durch ELISA ermittelte Konzentration um den Faktor 2,5 höher. Die Immunoaffinitätschromatographie mit HPLC-ECD zeigt die höchste Präzision.

Die Analyse der Verdünnungsreihe ergab für alle Methoden eine gute Linearität der Meßergebnisse über einen großen Konzentrationsbereich. Die einzelnen Ergebnisse sind in Abb. 4.16 dargestellt.

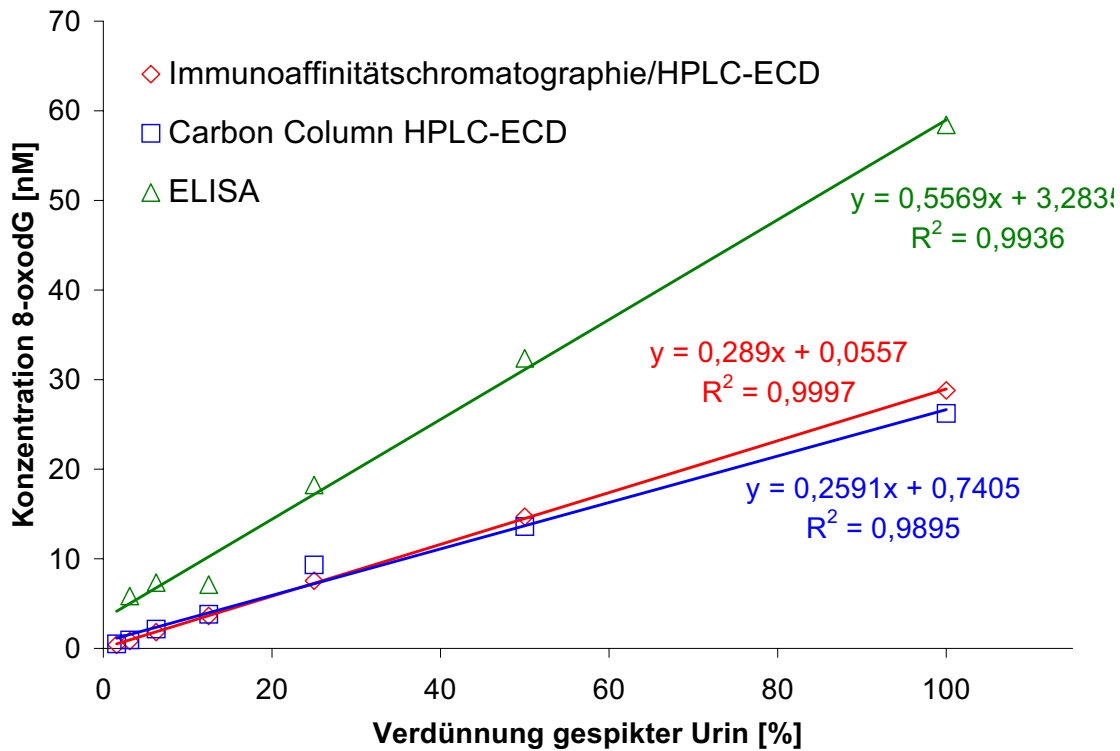
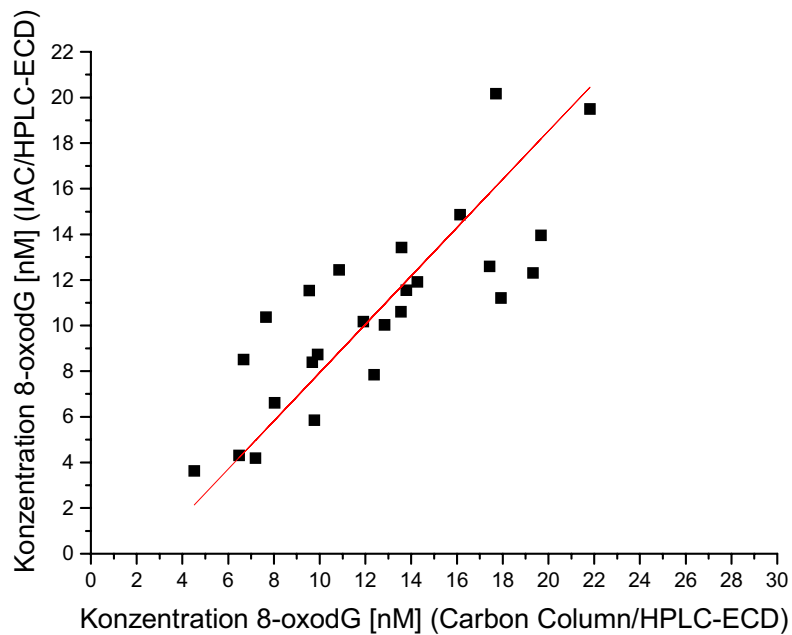


Abb. 4.16
Ringversuch zu 8-oxodG in Urin: Analyse der Verdünnungsreihe

Sowohl ELISA als auch Carbon Column HPLC-ECD zeigten im Gegensatz zur Immunoaffinitätschromatographie mit HPLC-ECD Ausreißer. Dies spiegelt die höhere Präzision der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode wieder, die auch bereits durch die höhere Wiederholpräzision bei Analyse des humanen Kontrollurins belegt wurde. Auch hier sind die mit ELISA ermittelten Werte ungefähr doppelt so hoch wie die beiden mit HPLC-ECD ermittelten Werte.

Die Ergebnisse für die vergleichende Analyse von Rattenurinproben sind in Abb. 4.17 bis Abb. 4.19 dargestellt.



Steigung (Konfidenzintervall 95 %)	1,06 (0,74 – 1,59)
Achsenabschnitt (Konfidenzintervall 95 %)	-2,66 nM (-6,91 – 1,59)
Korrelationskoeffizient r^2	0,69
Standardfehler Vorhersage $S_{y \cdot x}$	0,56 nM

Abb. 4.17**Ringversuch zu 8-oxodG in Urin: Analyse von Rattenurinproben mit Immunoaffinitätschromatographie (IAC) und HPLC-ECD gegenüber Carbon Column HPLC-ECD**

Immunoaffinitätschromatographie mit HPLC-ECD und Carbon Column HPLC-ECD liefern vergleichbare Ergebnisse. Weder Achsenabschnitt noch Steigung weisen auf einen systematischen Fehler hin. Der Standardfehler ist mit 0,56 nM ($r^2 = 0,69$) gering.

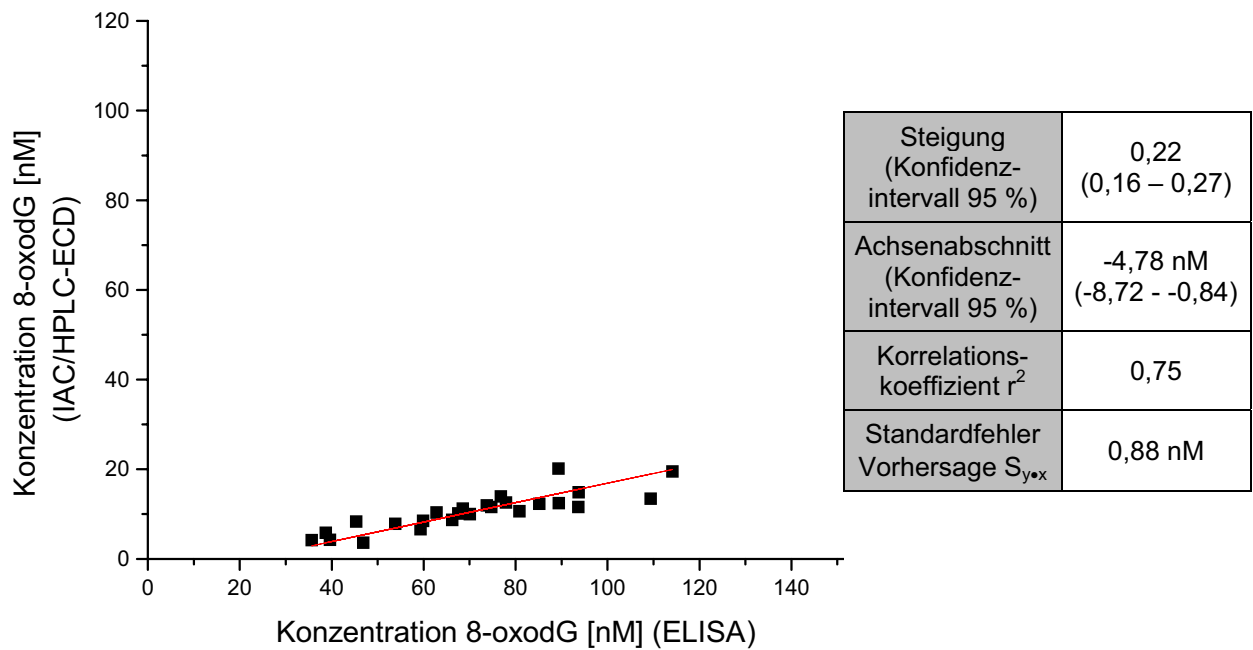


Abb. 4.18

Ringversuch zu 8-oxodG in Urin: Analyse von Rattenurinproben mit Immunoaffinitätschromatographie (IAC) und HPLC-ECD gegenüber ELISA

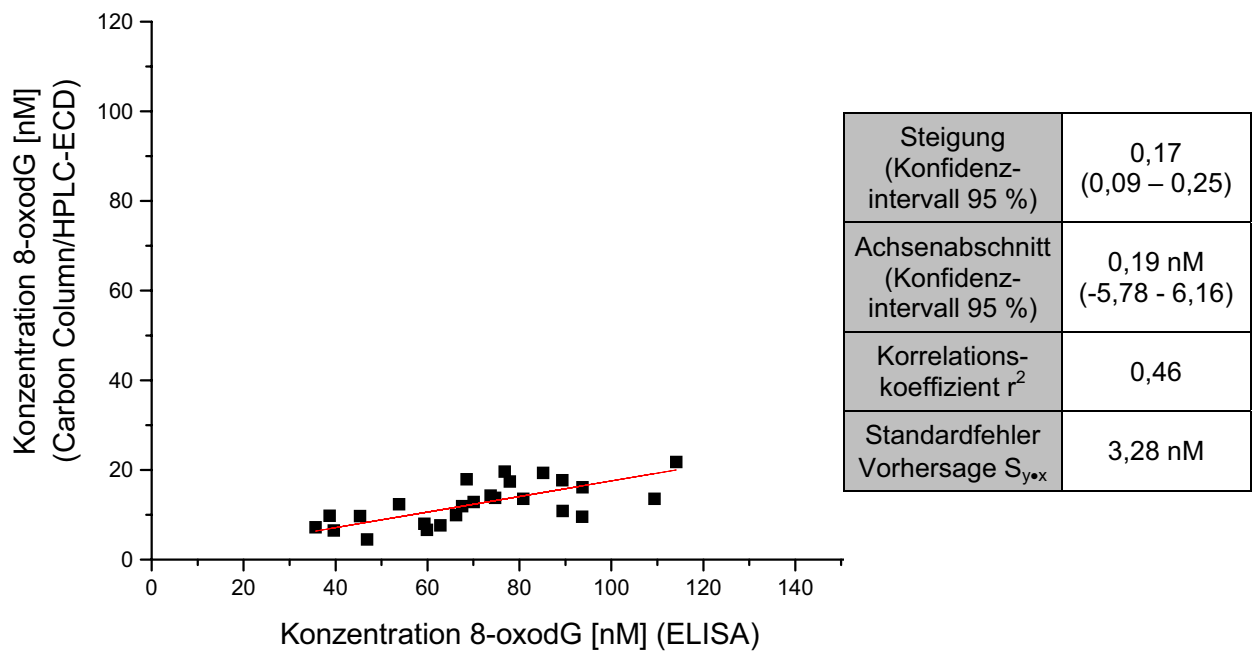


Abb. 4.19

Ringversuch zu 8-oxodG in Urin: Analyse von Rattenurinproben mit Carbon Column-HPLC-ECD gegenüber ELISA

Bei einem Vergleich der Analyseergebnisse für Rattenurinproben der beiden HPLC-ECD-Methoden mit dem ELISA fällt die starke Überschätzung durch den ELISA auf. Die proportionale Abweichung, also die Steigung zeigt eine Überschätzung gegenüber den HPLC-ECD-Methoden um ca. den Faktor 5 an. Im Falle der Immunoaffinitätschromatographie ist der Achsenabschnitt von Null grenzwertig signifikant verschieden. Die geringe Abweichung ist jedoch akzeptabel. Die Korrelation des ELISA mit Immunoaffinitätschromatographie und HPLC-ECD ist gut, der Standardfehler liegt bei 0,88 nM ($r^2 = 0,88$). Für die Werte aus ELISA und Carbon Column HPLC-ECD ist nur eine schwache Korrelation nachweisbar. Der Standardfehler ist mit 3,28 nM ($r^2 = 0,46$) recht hoch. Bei graphischer Darstellung der Daten fällt auf, daß die Residuen nicht normalverteilt sind und daher für diesen Datensatz die Regressionsanalyse nur eine begrenzte Aussagekraft besitzt. Ein am Rande einer Studie berichteter Methodenvergleich für Carbon Column HPLC-ECD und ELISA zeigt für Rattenurinproben eine akzeptable Korrelation von $r^2 = 0,66$ (Toraason *et al.* 1999).

Der Methodenvergleich zwischen ELISA und Immunoaffinitätschromatographie mit HPLC-ECD an humanen Urinproben zeigt ähnliche Ergebnisse (s. Abb. 4.20) wie der an Rattenurinproben.

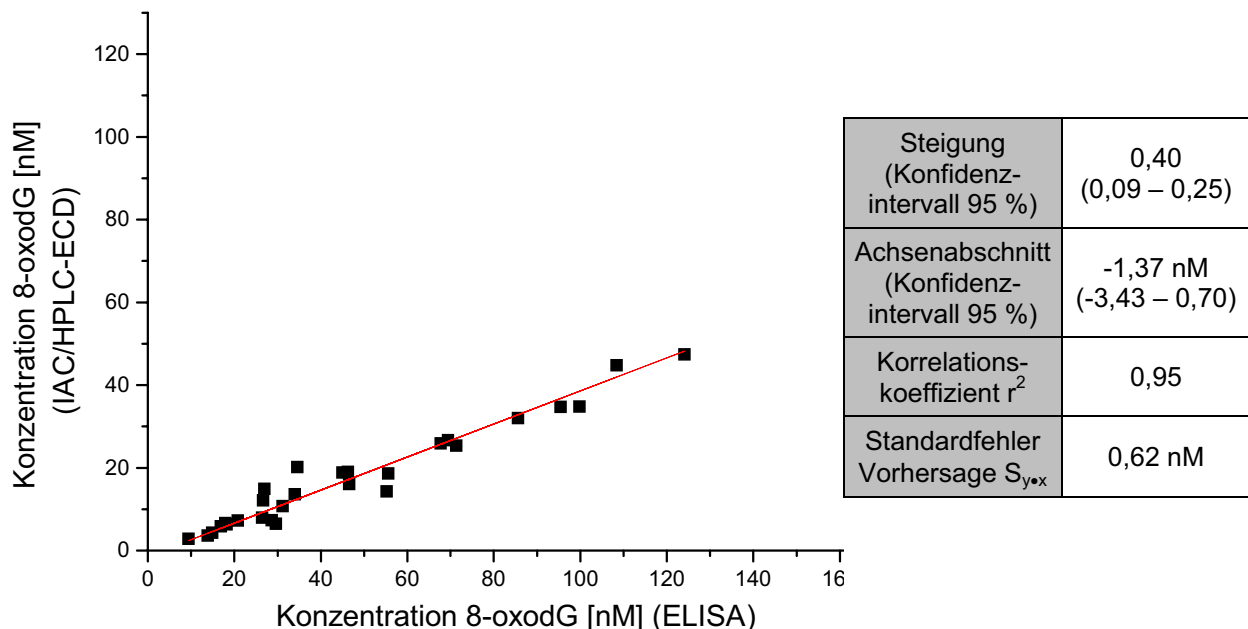


Abb. 4.20

Ringversuch zu 8-oxodG in Urin: Analyse von humanen Urinproben mit Immunoaffinitätschromatographie (IAC) und HPLC-ECD gegenüber ELISA

Die Korrelation bei Analyse von humanen Urinproben ist höher als bei Analyse von Rattenurinproben. Der Standardfehler beträgt nur 0,62 nM ($r^2 = 0,95$). Ferner fällt auf, daß die Überschätzung durch den ELISA um den Faktor 2,5 dem Faktor für die Überschätzung bei wiederholter Analyse des humanen Kontrollurins entspricht.

Die Standardfehler der Vorhersage und die Korrelationskoeffizienten sind in Tab. 4.3 und Tab. 4.4 zusammengefaßt. Die im Rahmen der Vorversuche ermittelten Ergebnisse für den Vergleich zwischen LC-MS-MS und Immunoaffinitätschromatographie mit HPLC-ECD sind im weiteren in die Betrachtung der Ergebnisse mit eingeschlossen, da für LC-MS-MS keine Daten aus dem Ringversuch vorliegen.

Tab. 4.3

Methodenvergleiche zur Analyse von 8-oxodG in Urin: Zusammenfassung der Standardfehler der Vorhersage; ¹unterschiedlicher Probensatz

Vorhergesagter Wert (Verfahren)	Rattenurinproben	ELISA	Carbon Column HPLC-ECD	LC-MS-MS ¹
	IAC/HPLC-ECD	0,88	0,56	0,96
	Carbon Column HPLC-ECD	3,28	---	---
	Humane Urinproben	ELISA		
	IAC/HPLC-ECD	0,62		

Tab. 4.4

Methodenvergleiche zur Analyse von 8-oxodG in Urin: Zusammenfassung der Korrelationskoeffizienten; ¹unterschiedlicher Probensatz

Rattenurinproben	ELISA	Carbon Column HPLC-ECD	LC-MS-MS ¹
IAC/HPLC-ECD	0,75	0,69	0,87
Carbon Column HPLC-ECD	0,46	---	---
Humane Urinproben	ELISA		
IAC/HPLC-ECD	0,95		

Die Methoden zeigen im allgemeinen eine gute bis akzeptable Korrelation (Standardfehler $< 1 \text{ nM}$, $r^2 > 0,7$). Lediglich zwischen Carbon Column HPLC-ECD und ELISA wurde eine schwache Korrelation beobachtet.

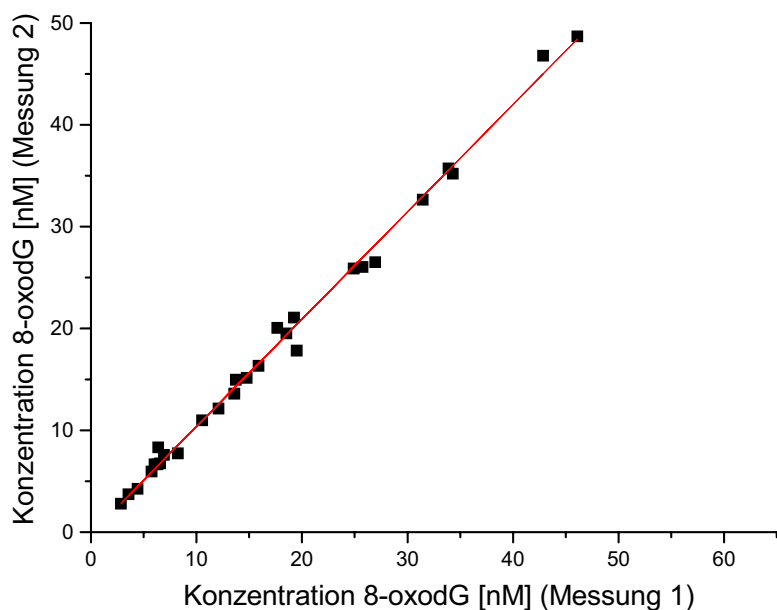
Die HPLC-Verfahren liefern prinzipiell vergleichbare Ergebnisse. Allerdings wurde zwischen Immunoaffinitätschromatographie mit HPLC-ECD und LC-MS-MS ein systematischer Unterschied beobachtet, der jedoch die Eignung beider Verfahren zum Vergleich unterschiedlicher Gruppen mit derselben Methode nicht einschränkt.

Der ELISA zeigt eine deutliche signifikante Überschätzung der Konzentration gegenüber den beiden HPLC-ECD Verfahren. Diese ist für humane Urinproben 2,5-fach, für Rattenurinproben 5-fach. Der Effekt ist also von der Natur der Probe abhängig. Die Ursache der hohen mittels ELISA ermittelten Werte ist vermutlich auf eine Kreuzreaktivität des verwendeten Antikörpers N45.1 zurückzuführen. Er zeigt keine Kreuzreaktivität mit den nicht modifizierten Nukleosiden und anderen DNA Addukten. Es ist jedoch eine Kreuzreaktivität mit der modifizierten Nukleobase 8-Oxoguanin beschrieben (Toyokuni *et al.* 1997). Somit ist die unterschiedliche Ausprägung der Überschätzung bei Rattenurinproben und humanen Urinproben vermutlich auf ein unterschiedliches Verhältnis zwischen 8-oxodG und 8-Oxoguanin zurückzuführen. Es ist beschrieben, daß Rattenurin im Verhältnis zu 8-oxodG mehr 8-Oxoguanin enthält als humaner Urin (Weimann *et al.* 2002). Eine definitive Aussage hierüber ist jedoch ohne Kenntnis der Affinitätskonstanten nicht möglich. Die Kreuzreaktivität mit der modifizierten Nukleobase darf ferner nicht dahingehend interpretiert werden, daß der ELISA die Summe von 8-oxodG und 8-Oxoguanin erfaßt. Die Eichung wird mittels 8-oxodG-Standard durchgeführt. Desoxynukleosid und Nukleobase haben jedoch unterschiedliche Affinitätskonstanten. Aufgrund der vorhandenen Korrelation mit den Vergleichsmethoden ist der ELISA für Gruppenvergleiche prinzipiell geeignet. Soweit möglich sollten jedoch die instrumentell-analytischen Nachweisverfahren wegen der vorhandenen Spezifität bevorzugt werden. Da 8-Oxoguanin anderen Einflußfaktoren unterliegt als 8-oxodG (Helbock *et al.* 1998) können bei Einsatz des ELISA eventuell Ergebnisse unschärfer werden, da als zusätzliche Quelle der Streuung das quantitative Verhältnis zwischen 8-oxodG und 8-Oxoguanin das Ergebnis beeinflusst.

Die beobachtete Korrelation für den ELISA mit instrumentell-analytischen Verfahren überrascht vor dem Hintergrund, daß zwischen ELISA und dreidimensionaler HPLC-ECD die Abwesenheit einer Korrelation berichtet wurde (Priemé *et al.* 1996). Eine Aussage, inwieweit eine Korrelation zwischen den hier getesteten HPLC-ECD Methoden mit der dreidimensionalen HPLC-ECD besteht, kann nicht getroffen werden, da aus dem betreffenden Laboratorium

keine Daten vorliegen. Es wurde bisher auch kein Vergleich zwischen dreidimensionaler HPLC-ECD und LC-MS-MS publiziert.

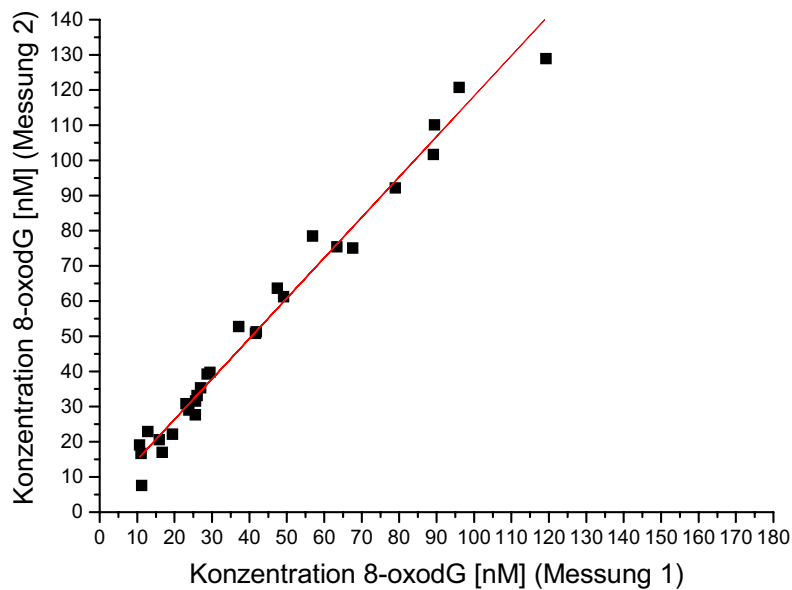
Die Korrelation zwischen zwei Analysen der gleichen humanen Urinproben mit derselben Methode ist sowohl für ELISA als auch für die Immunoaffinitätschromatographie mit HPLC-ECD sehr gut. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.21 und Abb. 4.22 dargestellt. Der Korrelationskoeffizient beträgt für die Immunoaffinitätschromatographie mit HPLC-ECD $r^2 = 0,99$ und für den ELISA $r^2 = 0,98$. Die für die Immunoaffinitätschromatographie mit HPLC-ECD im Rahmen der Methodenüberprüfung (s. Kap. 4.3) ermittelte Korrelation für eine Wiederholanalyse an Rattenurinproben ist mit einem Korrelationskoeffizienten von $r^2 = 0,95$ schlechter. Eine mögliche Ursache hierfür ist, daß die Rattenurinproben im Vergleich zu humanen Urinproben häufiger eine größere Menge Präzipitat zeigen. Um eine valide Aliquotierung zu erlauben, muß dieses vollständig homogen verteilt werden, was nicht immer gewährleistet werden kann. Es ist bekannt, daß dies zu Schwankungen bei den Meßwerten führen kann (Bogdanov *et al.* 1999).



Steigung (Konfidenzintervall 95 %)	1,05 (1,02 – 1,09)
Achsenabschnitt (Konfidenzintervall 95 %)	-0,18 nM (-0,82 – 0,47)
Korrelationskoeffizient r^2	0,99
Standardfehler Vorhersage $S_{y \cdot x}$	0,65 nM

Abb. 4.21

Ringversuch zu 8-oxodG in Urin: Wiederholanalyse von humanen Urinproben mit Immunoaffinitätschromatographie und HPLC-ECD



Steigung (Konfidenzintervall 95 %)	1,15 (1,08 – 1,21)
Achsenabschnitt (Konfidenzintervall 95 %)	3,38 nM (-0,02 – 6,77)
Korrelationskoeffizient r^2	0,98
Standardfehler Vorhersage $S_{y \cdot x}$	3,22 nM

Abb. 4.22**Ringversuch zu 8-oxodG in Urin: Wiederholanalyse von humanen Urinproben mit ELISA**

Für die Immunoaffinitätschromatographie mit HPLC-ECD ist der Achsenabschnitt mit einer unteren Grenze des Konfidenzintervalls von 1,02 nur geringfügig von 1 verschieden. Aufgrund der hohen Präzision der Meßergebnisse kommt es zu einem kleinen Konfidenzintervall, wodurch die statistische Gleichheit der beiden Meßergebnisse nur schwer zu etablieren ist. Der beobachtete Unterschied ist jedoch unter praktischen Gesichtspunkten vernachlässigbar. Es liegt kein signifikanter konstanter Fehler vor. Beim ELISA fällt auf, daß die Steigung mit 1,15 signifikant von 1 verschieden ist. Aus diesem Grund sollten bei Verwendung dieser Analysenmethode für Gruppenvergleiche alle Analysen in einem Testansatz analysiert werden. Der Achsenabschnitt ist grenzwertig nicht signifikant von Null verschieden.

Zusammenfassend läßt sich bezüglich der Präzision der getesteten Verfahren auf Basis der Analyse des humanen Kontrollurins sowie der Wiederholanalyse der humanen Urinproben sagen, daß die Immunoaffinitätschromatographie mit HPLC-ECD die höchste Methodenpräzision besitzt. Dies verwundert etwas vor dem Hintergrund, daß eigentlich zu erwarten wäre, daß die Carbon Column HPLC-ECD die höchste Präzision hätte, da es sich hierbei um ein direktes HPLC-Verfahren ohne zusätzliche Probenaufarbeitung handelt. Andererseits ist dies der Nachweis der hohen Reproduzierbarkeit der Probenaufarbeitung mittels Immunoaffinitätschromatographie.

4.7 Analyse von Malondialdehyd in Plasma

Malondialdehyd wird als Lipidperoxidationsprodukt häufig mit Thiobarbitursäure im sauren Milieu derivatisiert und direkt durch UV-Absorption quantifiziert. Im sauren Milieu kommt es zum einen zur Freisetzung von proteingebundenem MDA als auch zur Präzipitation von Proteinen, die die Quantifizierung stören würden.

Dieser einfache und schnelle Assay hat jedoch den Nachteil, daß bei der Derivatisierungsreaktion auch andere endogene Aldehyde und Ketone wie z. B. Bilirubin gefärbte Verbindungen ergeben (Knight *et al.* 1988). Bei den so ermittelten Konzentration handelt es sich daher nicht um die Konzentration von MDA, sondern vielmehr von thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS), die auch als solche angegeben werden sollte (Draper *et al.* 1993). Die eigentliche Konzentration an MDA wird hierbei durch die störenden Substanzen überschätzt. Durch den Bias können Veränderungen des Markers weniger empfindlich festgestellt werden. Prinzipiell läßt sich dieses Problem lösen, indem die Quantifizierung durch UV-Absorption nicht direkt aus der Reaktionslösung zur Derivatisierung erfolgt, sondern der Analyt – das MDA-TBA Derivat – zuvor durch HPLC aufgetrennt wird. Ein generelles Problem bei diesen Methoden ist jedoch, daß durch den sauren pH-Wert der Probe sowie die vorhandenen Verunreinigungen die HPLC-Säule häufig regeneriert werden muß und nur eine sehr beschränkte Lebenszeit hat (Draper u. Hadley 1990).

Zur Erhöhung der Spezifität der Methode kann die UV-Absorptionsmessung durch Fluoreszenzmessung ersetzt werden. Die Sensitivität dieser Methode kann erhöht werden, indem die Fluoreszenz nicht direkt in der Reaktionsmischung erfolgt, sondern das MDA-TBA-Derivat in 1-Butanol extrahiert wird (Yagi 1976). HPLC Analysen mit Fluoreszenzdetektion (FID) direkt aus der Reaktionsmischung zeigten den Analyten als einzigen Peak, wodurch prinzipiell die Spezifität der Methode zunächst belegt schien. Ferner zeigte die Quantifizierung mittels HPLC-FID eine sehr gute Korrelation mit der direkten fluoreszenzspektroskopischen Quantifizierung aus dem 1-Butanolextrakt (Fukunaga *et al.* 1995, Fukunaga *et al.* 1998).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Quantifizierung von MDA im Blutplasma ein auf HPLC-FID basierendes Verfahren entwickelt. Um die Lebenszeit der HPLC-Säule zu verlängern, wurde die Quantifizierung aus dem 1-Butanolextrakt der Reaktionsmischung vorgenommen. Zur Trennung wurde zunächst als isokratisches System 30 % Methanol in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 eingesetzt, wobei nur ein Peak beobachtet wurde (s. Abb. 4.23 oben), was mit den publizierten Beobachtungen übereinstimmte. Im Rahmen einer eingehenden Untersuchung der HPLC Methode u. a. durch Spektralanalyse (Spektratools HP-Chemstation)

stellte sich heraus, daß bei diesem einzelnen Peak eine Koelution vorlag, d. h. es sich nicht um reines MDA-TBA-Derivat handelte. Durch Veränderung des HPLC-Eluenten (37 % Methanol in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4) konnte ein zweiter, interferierender Peak abgetrennt werden (s. s. Abb. 4.23 unten).

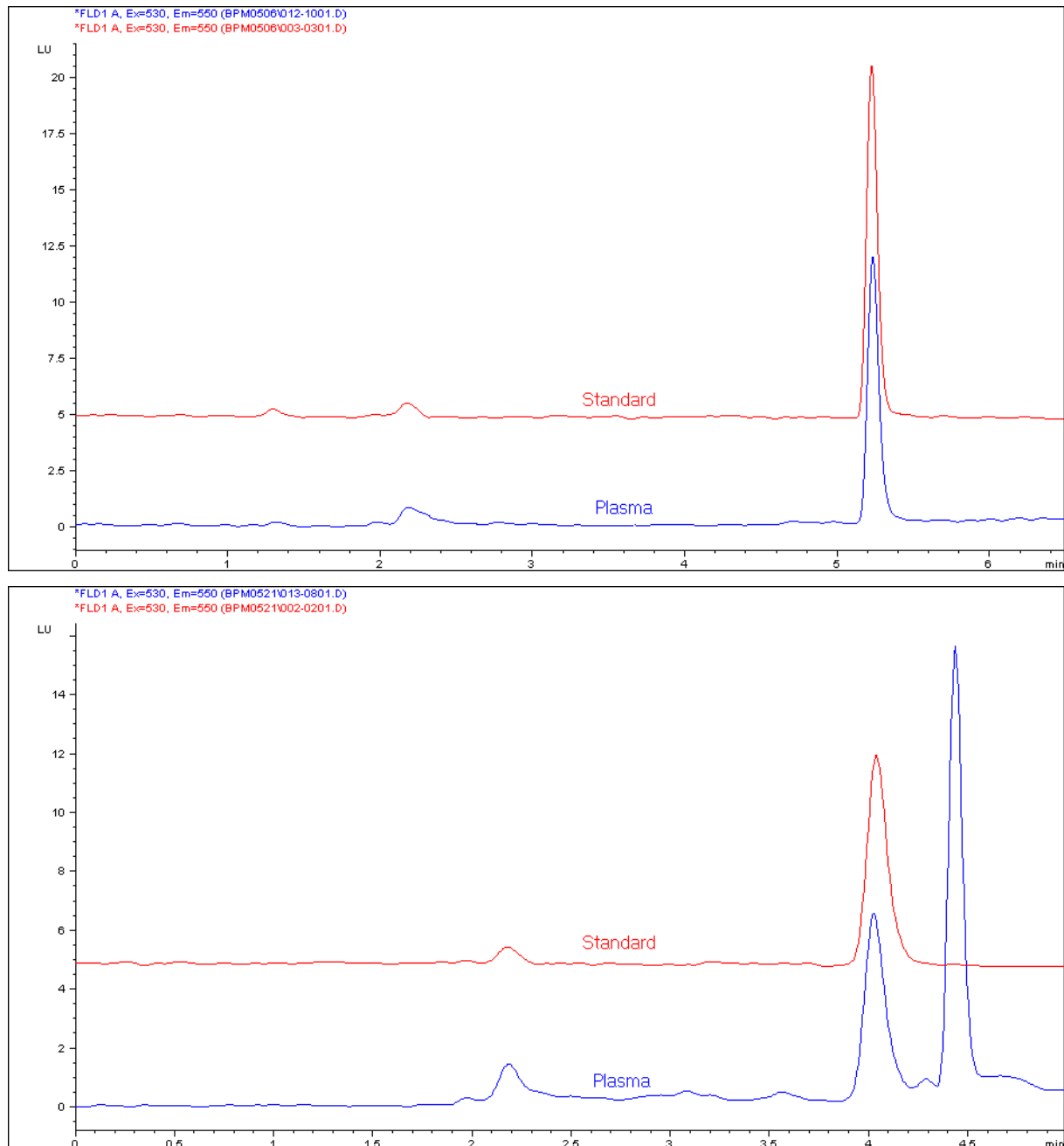


Abb. 4.23

Typische Chromatogramme bei Analyse von Malondialdehyd in Plasma: Elution mit 30 % Methanol (oben) und 37 % Methanol (unten)

Auf den ersten Blick ungewöhnlich ist, daß es durch Erhöhung der Konzentration der organischen Komponente zu einer Auftrennung von koelutierenden Peaks kommt, obwohl sich

die Retentionszeiten verkürzen. Dies ist darauf zurückzuführen, daß bei geringerem organischem Lösungsmittelgehalt es nicht sofort zu einer Durchmischung der in 1-Butanol injizierten Probe mit dem Eluenten kommt, so daß nicht die vollständige Trennstrecke der HPLC-Säule genutzt wird.

Der abgetrennte Peak wurde sowohl bei der Analyse von Rattenplasma als auch bei der Analyse von humanem Plasma beobachtet. Seine Identität konnte nicht geklärt werden, es handelt sich jedoch nicht um ein Reaktionsprodukt von 4-Hydroxynonenal mit Thiobarbitursäure, wie durch Untersuchungen mit dem entsprechenden Standard gezeigt werden konnte. Bei Analyse der Proben aus dem Tierversuch zeigte sich keine Korrelation zwischen dem MDA-Gehalt und dem unbekanntem Peak.

Die entwickelte Methode zeigt eine ausgezeichnete Linearität. Die Standardkurve, die bei jeder Messung aufgenommen wurde, zeigt typischerweise eine Korrelation von $R^2 > 0,999$ (s. Abb. 4.24).

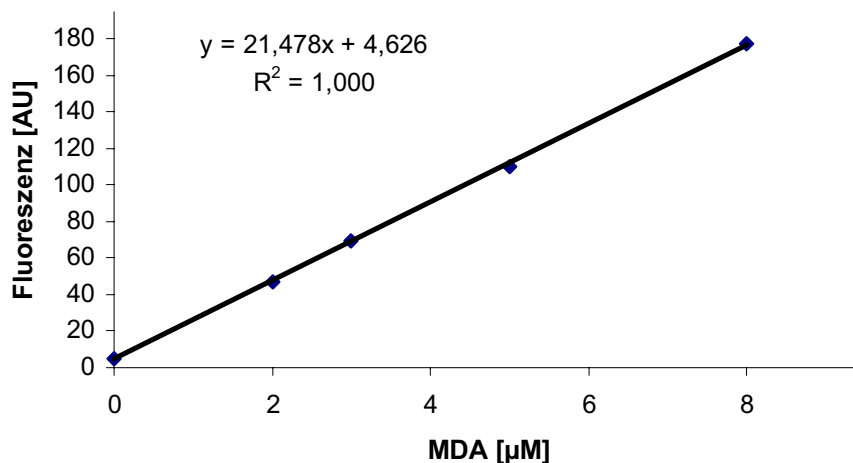


Abb. 4.24
Eichgerade für Analyse von Malondialdehyd

Ebenfalls ausgezeichnet war die Linearität bei Zusatz unterschiedlicher Standardkonzentrationen zu einer Plasmaprobe zur Bestimmung der MDA-Konzentration mittels des Standardadditionsverfahrens, wobei der Korrelationskoeffizient ebenfalls $R^2 > 0,999$ (s. Abb. 4.25) war. Hierbei wurde zusätzlich die MDA-Konzentration in der Plasmaprobe durch externe Standardisierung bestimmt. Sie zeigte eine Abweichung von 1 %, was ein zusätzlicher indirekter Beleg für die Reinheit des MDA-Peaks ist.

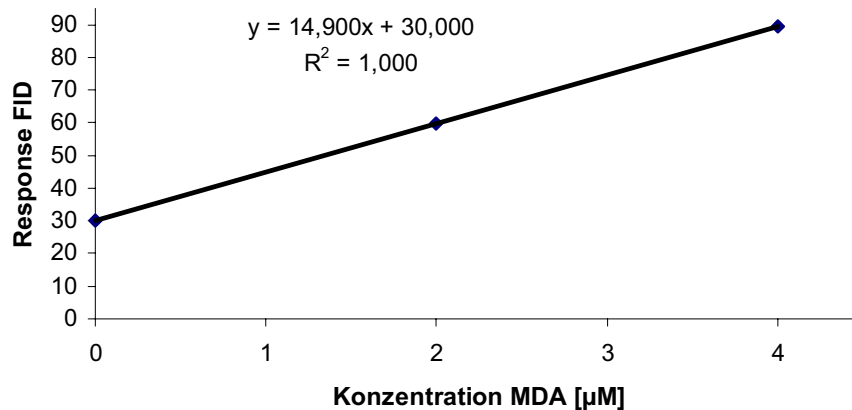


Abb. 4.25
Analyse von MDA in Plasma durch Standardadditionsverfahren

Die dreifache Analyse einer Verdünnungsreihe aus einer mit 1,1,2,2-Tetraethoxypropan gespikten Plasmaprobe zeigte ebenfalls die sehr gute Linearität des Analysenverfahrens (s. Abb. 4.26).

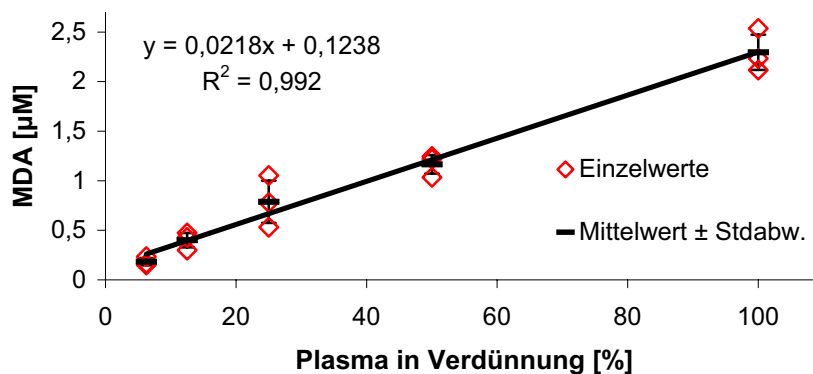


Abb. 4.26
Analyse einer Verdünnungsreihe von mit 1,1,2,2-Tetraethoxypropan gespikten Plasma auf Malondialdehyd

Die Analyse von sechs Aliquots der gleichen Plasmaproben ergab eine relative Standardabweichung von 6 % innerhalb derselben Sequenz und eine relative Standardabweichung der Mittelwerte von 5 % an unterschiedlichen Tagen.

Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte Verfahren zur Analyse von MDA ist nicht nur für die Analyse von Plasmaproben geeignet, sondern auch für den Nachweis in Gewebehomogenaten. Zum Beispiel wurde es auch zum Nachweis von MDA in verdünnten Leberhomogenaten eingesetzt, die durch Homogenisieren in einem Glas-Teflon-Potter gewonnen wurden.

Die Vorzüge des neu entwickelten Verfahrens lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Die sehr empfindliche fluorimetrische Detektion erlaubt den Einsatz geringster Probenmengen. Zur Analyse von Plasmaproben ist eine Probenmenge von 10 µl erforderlich. Diese Menge ist nach unten nicht durch das Meßverfahren, sondern durch die Pipettiergenauigkeit beschränkt.
- Durch Extraktion des Analyten in eine organische Phase wird die Injektion der sehr sauren Reaktionslösung, die reaktive Substanzen enthält, umgangen. Hierdurch wird die Lebenszeit der HPLC-Säulen verlängert. Ausführliche Regenerierung der HPLC-Säule ist nicht erforderlich.
- Die Extraktion des Analyten verhindert den Verlust des Analyten durch Adsorption an abzentrifugierten Proteinniederschlag.
- Das entwickelte Verfahren besitzt höchste Spezifität und ausgezeichnete Linearität.
- Das entwickelte Verfahren ist für einen hohen Probendurchsatz geeignet. Die Materialkosten sind äußerst gering.

4.8 Immunhistochemie für Nitrotyrosin

Für die Immunhistochemie wurden Mikrotomschnitte von paraformaldehydfixierten Gewebeproben der Lunge verwendet. Diese Fixierung ist gegenüber der klassischen Formaldehyd-Fixierung schonender, da sie schneller und bei niedrigerer Temperatur erfolgt. Da die Quervernetzung geringer ist als bei der klassischen Formaldehyd-Fixierung, bietet sie sich vor allem für die Immunhistochemie an.

Zunächst sollte zum immunhistochemischen Nachweis von Nitrotyrosin ein affinitätsgereinigtes polyklonales Kaninchenserum verwendet werden (Upstate Biotechnology, Beckman *et al.* 1994). Das Serum wurde zunächst in einer Verdünnung von 1:40 eingesetzt, was einer Antikörperkonzentration von 7 µg/ml entspricht. Durch Titration wurde eine Antikörperkonzentration von 5 µg/ml als geeigneter identifiziert. Zur Methodenentwicklung und als Positivkontrolle wurden Gewebeschnitte mit einer 1 mM Peroxynitritlösung für 10 min

inkubiert und anschließend in PBS gespült. Zur Negativkontrolle wurde unspezifisches Kaninchen-IgG verwendet. Zur Kontrolle der Spezifität wurde mit Nitrotyrosin präinkubiertes polyklonales Kaninchenserum verwendet (gesättigter Antikörper).

Bei Verwendung der polyklonalen Kaninchenantikörper wurde eine starke Hintergrundreaktivität am Gewebe beobachtet. Insbesondere Versuche, eine Antigendemaskierung durchzuführen, indem die deparaffinierten Gewebeschnitte in der Mikrowelle in einer 10 mM Natriumcitratlösung (pH 6,0) erhitzt wurden, zeigten eine so starke Hintergrundreaktivität, daß sie nicht auswertbar waren. Auch mehrfache Heiz- und Kühlzyklen führten nicht zur Lösung des Problems.

Aus diesem Grund wurde auf Empfehlung von Dr. Elliott Kagan (Uniformed Services University of the Health Sciences, Bethesda MD, USA) ein neuer monoklonaler Mausantikörper getestet (Cayman Chemical Company), der vom Hersteller vor allem für Western Blot Analyse angeboten wird. Durch Titration wurde als geeignete Arbeitskonzentration 2 µg/ml identifiziert. Diese weicht von der Herstellerangabe von 10 µg/ml (für Western Blot) ab. Auch hier wurden zur Methodenentwicklung und als Positivkontrolle Gewebeschnitte mit einer 1 mM Peroxynitritlösung für 10 min inkubiert und anschließend in PBS gespült. Zur Negativkontrolle wurde unspezifisches Maus-IgG verwendet. Zur Kontrolle der Spezifität wurde der Antikörper mit gesättigter Nitrotyrosinlösung präinkubiert und nach Zentrifugation eingesetzt.

Bei Verwendung dieses Antikörpers zeigte sich keine Hintergrundreaktivität, wenn keine Antigendemaskierung mit Natriumcitratlösung in der Mikrowelle durchgeführt wurde. Aus diesem Grund und da ausreichende Reaktivität gegeben war, wurde auf eine Antigendemaskierung grundsätzlich verzichtet. Das mit Peroxynitrit behandelte Gewebe zeigte nach Färbung mit DAB eine deutliche Braunfärbung der proteinhaltigen Gewebeteile, die bei Verwendung von unspezifischen Antikörpern oder von mit Nitrotyrosin präinkubiertem Anti-Nitrotyrosinantikörper nicht zu beobachten war. Unbehandelte Gewebeschnitte von Kontrolltieren zeigten diese Färbung nicht.

Somit stellt die entwickelte immunhistochemische Methode ein geeignetes, spezifisches Verfahren zum Nachweis von Nitrotyrosin in Gewebeproben (v. a. Lunge) dar.

4.9 Ozonexposition von Versuchstieren

Als Versuchstiere wurden männliche Fischer F344-Ratten mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 250 g gewählt.

Im Rahmen von Vorversuchen wurde die optimale Methode zur Exposition von Ratten gegenüber Ozon ermittelt. Bei Ganzkörperexposition kam es zu starken Schwankungen der Ozonkonzentration in der Expositionskammer, sobald die Tiere sich bewegten. Dies ist auf die hohe Reaktivität des Ozon zurückzuführen, wodurch es zu einer Zersetzung an der Felloberfläche kommt. Gleichzeitig bedeutet dies, daß die Tiere sich durch zusammenkauern dem Gas entziehen können, da es in dieser Haltung nicht direkt ohne Fellkontakt eingeatmet wird. Als geeignete Expositionsart wurde daher die „nose-only“ Applikation gewählt. Hierbei befinden sich die Tiere in einem röhrenartigen Gebilde, welches vorne eine Öffnung für die Schnauze hat, die in den Expositionsraum ragt. Dieser besteht aus zwei exsikkatorartigen Gefäßen, an deren Seite Schliffe zum Einsetzen der Expositionsröhren eingelassen sind, sowie Öffnungen für Gaszufuhr, -ableitung und Eingänge für Meßleitungen (s. Abb. 4.27). Durch einen Schieber werden die Tiere während der Exposition fixiert. Diese Art der Applikation ermöglicht eine gut reproduzierbare Exposition, da es nicht zu einer unkontrollierten Zersetzung des Ozons kommt und die Tiere sich nicht der Exposition entziehen können. Zusätzlich wurde mit hohen Gaswechselzahlen gearbeitet. Zur Kontrolle der Atemaktivität der Tiere wurde eine kontinuierliche Kohlendioxidmessung in der Gesamtabluft durchgeführt. Es ergaben sich Atemvolumina zwischen 4 und 10 l/h pro Ratte. Dies war abhängig von der körperlichen Aktivität der Tiere, wobei Schnupern und Knabbern am Rand der Expositionsröhren und Bewegungen in der Expositionsröhre teilweise ansteckend auf die anderen Tiere wirkte. Die Messung der Ozonkonzentration erfolgte mittels eines Ozonmonitors zur Umweltüberwachung, der eine direkte Absolutbestimmung durch UV-Absorption ermöglicht.

Die Versuchstiere wurden in vier Gruppen zu je 8 Tieren eingeteilt. Die Dosisgruppen erhielten Ozondosen von 200, 500 und 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ jeweils für 1,5 Stunden an fünf Tagen pro Woche für 12 Wochen. Die Kontrollgruppe wurde ebenfalls täglich für 1,5 Stunden an fünf Tagen pro Woche in die Expositionsapparatur eingebracht und gegenüber Raumluft exponiert, um den Einfluß von psychischem Streß auf die Belastung mit Markern für oxidativen Streß auszugleichen und Einflüsse auf die Exkretion von 8-oxodG durch eine unterschiedliche psychische Streßbelastung (Adachi *et al.* 1993) auszuschließen. Die Hintergrundkonzentration an Ozon in der Raumluft betrug 30 – 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

Die Gruppen wurden jeweils in zwei Expositionsteilgruppen geteilt, deren Exposition um eine Woche versetzt startete. Es wurden jeweils wöchentlich 24-Stundenurinproben in Metabolismuskäfigen gesammelt. Wöchentlich wurden jeweils von einer Expositionsteilgruppe direkt nach Exposition Blutproben entnommen, d. h. jedem Tier wurde alle zwei Wochen Blut entnommen. Von den Blutproben wurden Plasmaproben abgetrennt und gelagert. Terminal wurden Blut- und Organproben durch Nekropsie gewonnen. Der Ablauf des Versuchs ist in Abb. 4.28 graphisch dargestellt.

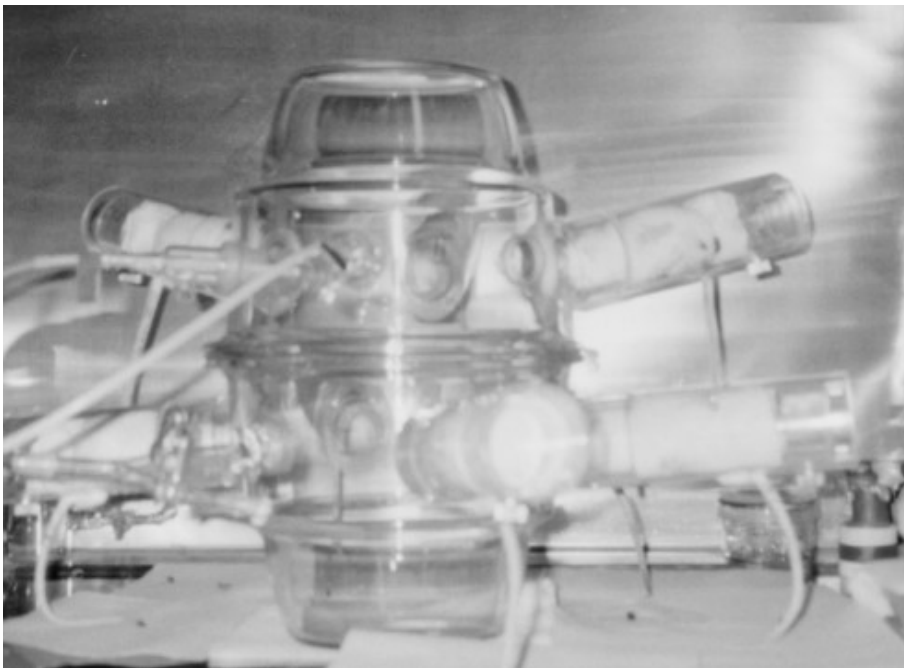


Abb. 4.27
Expositionsapparatur zur „nose-only“ Exposition von Ratten

Zur Entnahme von Blutproben stellte sich das Anritzen des retrobulbären Venenplexus mittels einer Glaspipette als ungeeignet heraus, da hierbei Verunreinigungen wie Fell- oder Gewebestücke in die Probe gelangten. Aus diesem Grund wurde auf die Entnahme aus der Schwanzvene umgestellt. Hierbei mußte mit sehr feinen Kanülen gearbeitet werden, wodurch es aufgrund der starken Scherkräfte zur teilweisen Hämolyse des Blutes kommen kann (Rotfärbung des Plasmas). Ferner kam es teilweise zu Koagulation der Proben, da die Dauer der Blutentnahme bis zu ca. 5 min betrug und in dieser Zeit eine vollständige Durchmischung mit Antikoagulanz nicht möglich war. Solche Proben sind zu Isolierung von kernhaltigen Zellen bzw. DNA der erforderlichen Qualität nicht verwendbar.

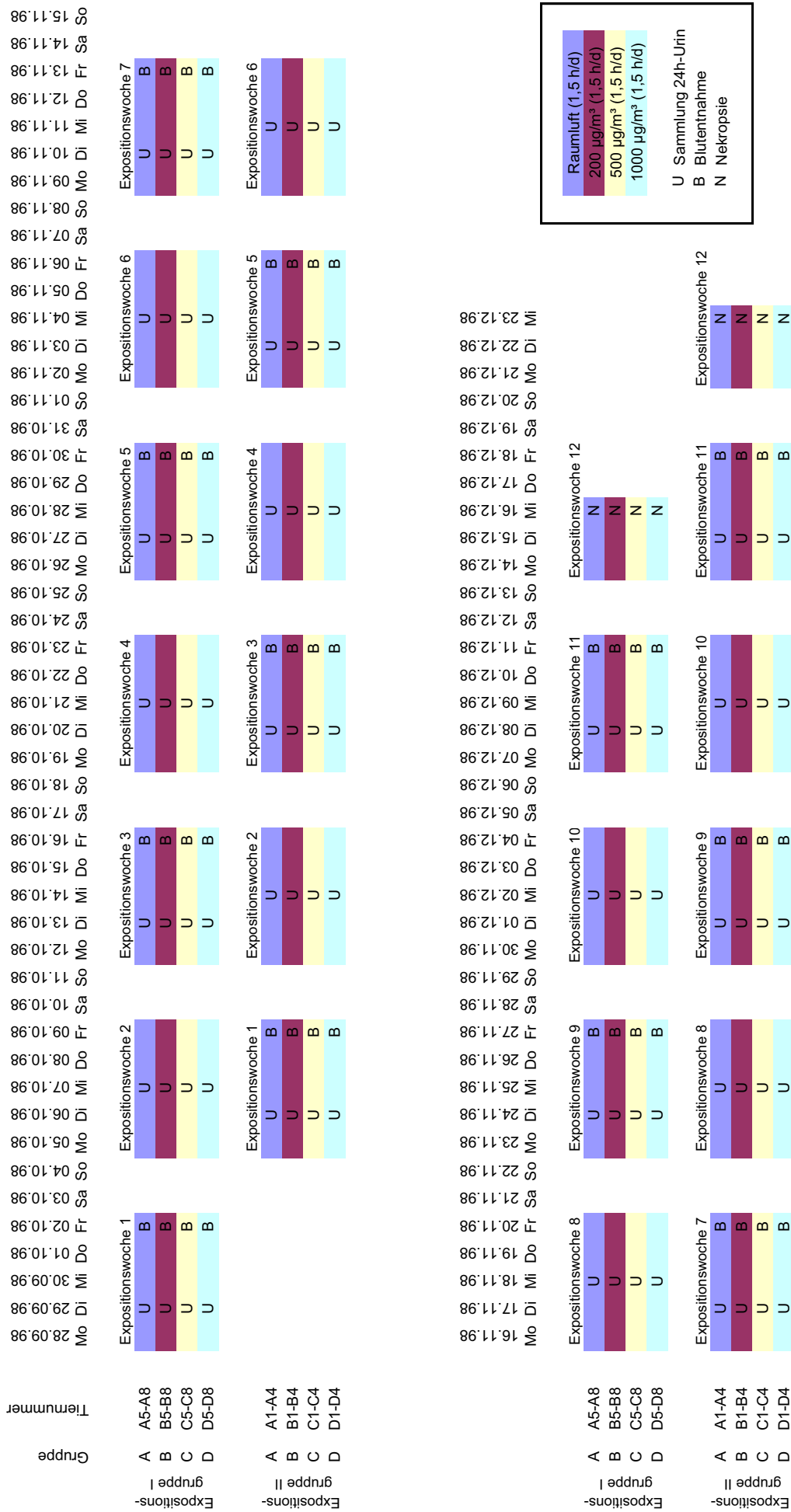


Abb. 4.28
Übersicht zum Tierversuch: Expositions- und Probenschema

4.10 Pathologische und Histopathologische Befunde

Bei der wöchentlichen Gewichtskontrolle war kein Einfluß der Ozonexposition auf das Wachstum erkennbar. Dies belegt, daß die Exposition unterhalb des akut-toxischen Bereichs erfolgte.

Nach Beendigung des Versuchs wurden die Tiere getötet und der Schädel *in toto*, sowie die Organe Lunge, Trachea, Herz, Magen, Darm, Leber, Pankreas, Nieren mit Nebennieren, Harnblase, Prostata, Milz, Thymus und einige Lymphknoten sofort entnommen und in 10 % Formaldehyd fixiert. Makroskopisch fanden sich bei Öffnung der Brust- und Bauchhöhle keine pathologischen Befunde.

Mikroskopisch waren alle Organe bis auf Gaumenschleimhaut, vorderer Anteil der Nasenschleimhaut, Luftröhrenschleimhaut und Lunge ohne pathologische Veränderungen. In wenigen Fällen zeigte sich eine Entzündung einzelner Zahntaschen bzw. Zahnwurzeln; bei einem Tier wurde eine leichte chronifizierte Entzündung beider großen Nasennebenhöhlen nachgewiesen. Bei mehreren Tieren wurden unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit leichte Veränderungen einer oder beider Nieren beobachtet, ohne daß daraus ein Krankheitsbefund abgeleitet werden konnte.

Gaumenschleimhaut: Ein Teil der Tiere zeigte in allen Gruppen eine Hyperplasie der Plattenepithelien der Gaumenschleimhaut, teils mit Verhornung. Vermutlich ist dies durch Provokation während des Fressen durch das trockene und harte Futter bedingt.

Nasenhöhle: Die Gruppe mit unbelasteter Atemluft zeigte keine Schleimhautveränderungen des respiratorischen Epithels. In allen 3 anderen Gruppen läßt sich eine fokale Atrophie unterschiedlichen Grades und Ausdehnung nachweisen, ohne daß hierbei eine systemische Veränderung ableitbar wäre, die auf die steigende Belastung hinweist. In vier Fällen war eine mikrofokale bis fokale leichte Becherzellhyperplasie erkennbar (1/4 Fall unbelastete Gruppe, 3/4 Fälle Hochdosisgruppe).

Trachea: Die Gruppe ohne Ozonbelastung zeigte bis auf ein Tier keine Veränderung der Schleimhaut. In allen anderen Gruppen mit unterschiedlicher Belastung wurde mit geringer Variation stellenweise fokale Atrophie des respiratorischen Epithels nachgewiesen, ohne daß eine Dosisabhängigkeit erkennbar ist.

Lunge: Zahlreiche Tiere zeigten histopathologisch diskrete bis leichte peribronchioläre und subpleurale fokale und mikrofokale entzündliche Infiltrate, Veränderungen, die als diskrete

Pneumonie zu interpretieren sind. Der Befund ist jedoch grenzwertig. Diese Diagnose war über alle Gruppen verteilt, 4 - 8 Tiere je Gruppe zeigten jeweils diesen Befund, ohne daß eine Abhängigkeit von der Höhe der Ozondosis zu erkennen ist.

Zusammenfassung: Die Tiere zeigen in allen anderen als den Organen der Atemwege altersentsprechende Veränderungen ohne Krankheitscharakter. Die Schleimhäute der Atemwege der Kontrolltiere sind in der Regel im Normbereich oder grenzwertig verändert. In den Atemwegen der Belastungsgruppen läßt sich eine partielle Nasenschleimhaut- und Tracheaschleimhautatrophie mit unterschiedlicher – zumeist geringer – Ausprägung unabhängig von der Höhe der Belastung diagnostizieren.

In den Lungen zahlreicher Tiere der Belastungs- und Kontrollgruppen war eine diskrete Pneumonie (mikrofokale entzündliche Infiltrate) zu beobachten, ohne daß eine Abhängigkeit von der Ozonexposition zu erkennen war.

Nach kurzzeitiger, in der Regel einmaliger Ozonexposition ist die Infiltration von Entzündungszellen in das Lungengewebe beschrieben. Pino *et al.* (1992a und 1992b) fanden in SD-Ratten nach Ozonexposition von 2 mg/m³ bis zu 24 h die Zunahme von Entzündungszellen in der Lunge. In Hunden, die 5 min 2 mg/m³ Ozon, direkt in die Lunge eingeleitet, ausgesetzt waren, wurde der gleiche Befund 24 h nach Exposition festgestellt (Kleeberger *et al.* 1989). Rhesusaffen, 8 h gegenüber 1,9 mg/m³ exponiert, zeigten ebenfalls entzündliche Infiltrate, am stärksten 12 h nach Exposition (Hyde *et al.* 1992). Unmittelbar nach Exposition war bei Hartley-Meerschweinchen, die 4 h gegenüber 4 mg/m³ exponiert waren, die stärkste Infiltration von Entzündungszellen zu beobachten. Im Gegensatz zu diesen Befunden nach kurzzeitiger Exposition wird nach länger andauernder Exposition nur selten eine entzündliche Reaktion im Lungengewebe beobachtet. In der Regel wird die Abwesenheit dieser Reaktion jedoch nicht explizit festgestellt. Nach kontinuierlicher Exposition gegenüber Ozonkonzentrationen zwischen 0,2 und 8 mg für 1 bis zu 12 Wochen wurde in Wistar-Ratten die Abwesenheit entzündlicher Infiltrate beschrieben (Mochitate *et al.* 1992). Exposition gegenüber einem Konzentrations-Zeit-Profil mit einer Höchstkonzentration von ca. 0,6 mg/m³ über 60 Tage verursachte in Fischer F344 Ratten einen Anstieg der Lungenmakrophagen nach einer Woche. Der Effekt war nach drei Wochen ununterbrochener Exposition nicht mehr nachweisbar (Chang *et al.* 1992). In Wistar Ratten ist bei Exposition gegenüber 0,8 mg/m³ die Zunahme von Entzündungszellen in Flüssigkeit aus Lungenlavage nach einem Tag Exposition beschrieben. Der Effekt war nach einem Tag am stärksten ausgeprägt und hatte sich bis zum

sechsten Tag zurückgebildet. Im Gegensatz hierzu nahm die Zahl der Makrophagen über den gesamten Expositionszeitraum von 56 Tagen zu. Es lag auch eine centracinäre Entzündung vor (van Bree *et al.* 2001). Allerdings war diese Studie nicht durch eine Kontrollgruppe abgesichert, wodurch die kausale Zuordnung der persistierenden Infiltration des Gewebes zur Ozonexposition nicht als gesichert angenommen werden kann.

Die entzündliche Reaktion im Lungengewebe wird vor allem bei kurzzeitiger hoher Ozonexposition beobachtet, teilweise erst nach einer Ruhephase nach der Exposition. Sie stellt also eine Reaktion auf akute Expositionen, weniger auf subchronische und chronische Exposition dar. Die o. g. Berichte aus der Literatur über den Verlauf von Entzündungsmarkern im Rahmen subchronischer Studien belegen, daß prinzipiell eine Adaptationsreaktion bezüglich dieses Parameters erfolgt. Der im Rahmen der hier durchgeführten Experimente vorliegende Befund mikrofokaler Entzündungsreaktionen ist als grenzwertiger Befund anzusehen und kann auch als die Abwesenheit massiver Entzündungsreaktionen interpretiert werden. Dieser Befund ist vor dem Hintergrund der beschriebenen Adaptationsprozesse zu erklären.

Unter Atrophie versteht man die Rückbildung von Organen, Geweben oder Zellen (Thews *et al.* 1991). Diese kann durch Verminderung der Zellzahl, durch Verringerung der Zellgröße oder durch Verlust der Differenzierung einer bestimmten Zellpopulation bedingt sein. Im Fall der Nasenschleimhaut ist häufig der Verlust der Differenzierung des Flimmerepithels durch längeranhaltende Reizwirkung die Ursache für eine Atrophie. Für Ozon ist diese Wirkung bei längeranhaltender Exposition beschrieben. In SD-Ratten wurde nach Ozonexposition gegenüber $1,9 \text{ mg/m}^3$ für 8 h/d über 3 und 60 Tage Schleimhautatrophie beobachtet, die im Vergleich zu den Kontrolltieren nach 3 Tagen ausgeprägter war als nach 60 Tagen (Nikula *et al.* 1988). Im Gegensatz hierzu waren nach täglicher Exposition von F344 Ratten für 20 Stunden gegenüber bis zu 1 mg/m^3 nach 2 Jahren keine histopathologischen Veränderungen des Nasenepithels zu beobachten (Smiler *et al.* 1988). Nach kurzzeitiger Exposition (6 h) gegenüber bis zu 3 mg/m^3 waren ebenfalls keine Nekrosen im Nasenepithel oder ein Verlust von Zilien nachweisbar (Hotchkiss *et al.* 1989). In Schafen wurde ebenfalls eine Abnahme der Zilienzellen nach Exposition gegenüber 2 mg/m^3 für 5 Tage bei einer Exposition von 4h/d beobachtet (Mariassy *et al.* 1989). In Makakenaffen wurde nach einer Exposition von täglich 8 Stunden gegenüber $0,3 \text{ mg/m}^3$ für 6 oder 90 Tage und gegenüber $0,6 \text{ mg/m}^3$ für 90 Tage Nekrose von Zilienzellen im Nasenraum beobachtet (Harkema *et al.* 1987).

Da der Befund im vorliegenden Experiment wenig ausgeprägt ist und keine Dosisdifferenzierung der gegenüber unterschiedlichen Ozonkonzentrationen exponierten Gruppen zuläßt, ist vermutlich zum einen auf die im Vergleich zu anderen Studien verhältnismäßig geringe Ozonkonzentration von max. 1 mg/m³ und kurze tägliche Expositionszeit von 1,5 Stunden zurückzuführen. Zum anderen deuten insbesondere die beschriebenen Befunde von Nikula *et al.* (1988, s. o.) auf eine Adaptationsreaktion hin. Die Experimente von Harkema *et al.* (1987, s. o.) über zwei Jahre an Ratten zeigen, daß es ggf. nach einer chronischen Exposition zu einer vollständigen Adaptation ohne Nachweisbarkeit histopathologischer Veränderung kommen kann. Die vergleichsweise kurze tägliche Expositionszeit und die geringe Ozonkonzentration im vorliegenden Experiment stellen einen schwächeren Reiz dar, so daß eine Adaptation erleichtert wird. Hierin liegt vermutlich ein weiterer Grund für die erhaltenen, nur grenzwertig positiven Befunde.

4.11 Bestimmung von Markern für oxidativen Streß nach Ozonexposition

4.11.1 8-oxodG in Urin

Im Rahmen des Tierversuchs wurden ca. 500 24-Stundenurinproben gewonnen und bei -80 °C gelagert. Diese Proben wurden mittels der im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Methode auf ihren Gehalt an 8-oxodG analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.29 zusammengefaßt.

Die Exkretion von 8-oxodG im 24-Stundenurin zeigt eine starke Streuung. Daher wurde als Bezugsgröße zur Normierung die Kreatininkonzentration im Urin eingesetzt. Die Kreatininausscheidung ist proportional der Muskelmasse des Organismus. In Humanstudien ist als Bezugsgröße das Körpergewicht und die Ausscheidung in 24 Stunden geeigneter, da die Kreatininausscheidung eine zusätzliche, indirekte Bezugsgröße darstellt, die selbst der metabolischen Aktivität unterliegt (Poulsen *et al.* 1998). Da jedoch das Sammeln von 24-Stundenurin bei Versuchstieren wegen der fehlenden bewußten Urinabgabe mit zeitlichen Fehlern behaftet ist, stellt diese Bezugsgröße im vorliegenden Fall das geeignetere Maß dar.

Zur Kreatininbestimmung wurde der enzymatische Farbttest Crea PAP (Boehringer Mannheim/Roche Diagnostics) ausgewählt. Dieser Test zeigte sich der Methode nach Jaffé in unterschiedlichen Modifikationen überlegen bezüglich Spezifität und Reproduzierbarkeit.

In Abb. 4.30 sind die Ergebnisse normiert auf Kreatininausscheidung dargestellt.

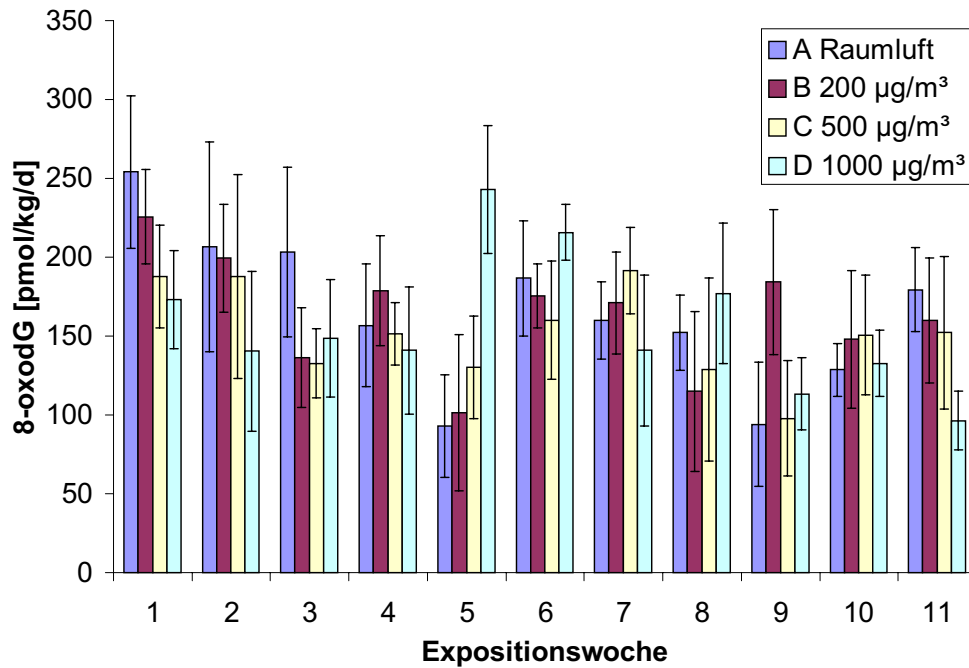


Abb. 4.29

Zeitlicher Verlauf der 8-oxodG-Ausscheidung im Urin ozonexponierter Ratten; Mittelwerte \pm Konfidenzintervall 95 %

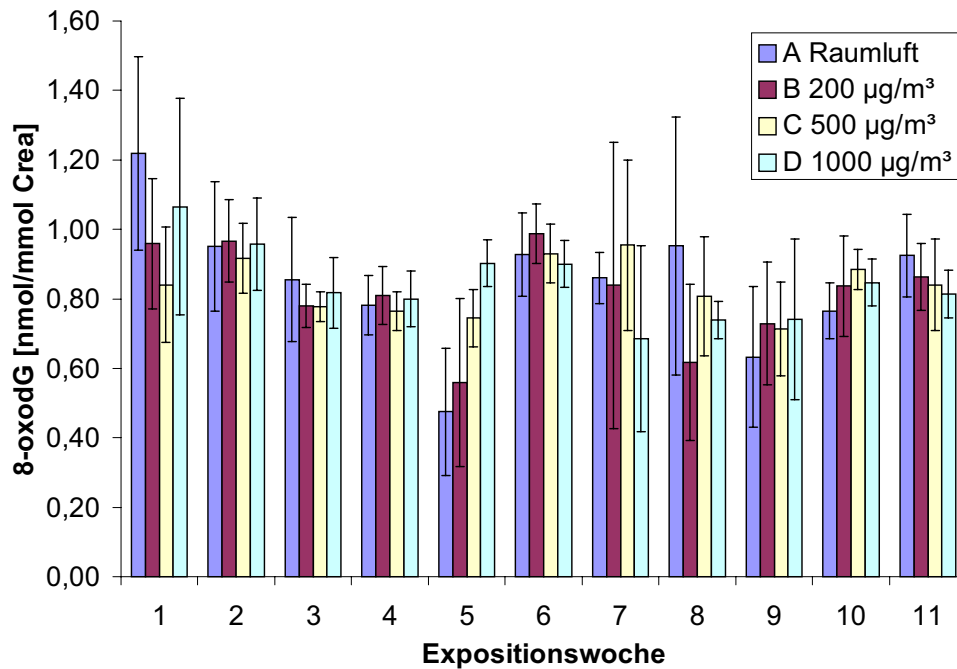


Abb. 4.30

Zeitlicher Verlauf der 8-oxodG-Ausscheidung im Urin ozonexponierter Ratten normiert auf Kreatiningehalt; Mittelwerte \pm Konfidenzintervall 95 %

Bei Betrachtung der Gesamtheit der Daten ist kein dosisabhängiger Trend bezüglich einer Zunahme von 8-oxodG im Urin durch Ozonexposition zu beobachten. Zwar ist in einzelnen Wochen (z. B. Expositionswoche 5) ein offensichtlicher Trend vorhanden, jedoch ist vor dem Hintergrund des Fehlens dieses Trends in anderen Expositionswochen hierbei von einem zufälligen Ereignis im Rahmen der statistischen Streuung auszugehen. Die Abwesenheit von Unterschieden zwischen den unterschiedlich exponierten Gruppen im zeitlichen Verlauf der Studie wurde auch durch Blockvarianzanalyse (ANOVA) auf dem Signifikanzniveau $p < 0,05$ bestätigt. Auch die Betrachtung von Einzelwerten gibt keinen Hinweis auf ein Ansprechen des Markers bei einzelnen Tieren innerhalb der Gruppen.

Die Variationskoeffizienten liegen für die Gruppen in den einzelnen Expositionswochen zwischen 5 und 59 %. Der Variationskoeffizient für alle Werte beträgt 30 %. Diese Werte sind konsistent mit Werten aus der Literatur. Typischerweise beträgt der Variationskoeffizient für die 8-oxodG-Ausscheidung 30 – 40 % (Loft *et al.* 1993). Auffällig ist die starke Streuung der Variationskoeffizienten. Dies deutet darauf hin, daß die Probensammlung optimiert werden könnte. Ein großes Problem im Rahmen der Sammlung der 24-Stundenurinproben bei den Ratten war, daß die ausgeschiedene Urinmenge zwischen 0,5 und 22 ml stark schwankte. Einige Tiere gaben in Einzelfällen keinen Urin. In den kleinen Urinmengen kommt es zu einer höheren Konzentration an harnpflichtigen Substanzen, wodurch es auch zu einer stärkeren Präzipitatbildung während der Lagerung kommt. Eine Möglichkeit, dies zu umgehen, wäre es, die Proben in verdünntem Zustand einzufrieren. Dies würde zusätzlich erlauben, die Metabolismuskäfige direkt nach der Sammlung von Urin nachzuspülen, um anhaftende getrocknete Urinreste mit zu erfassen.

Den Marker 8-oxodG im Urin nachzuweisen, ist bezüglich einer Dosis-Wirkungsbeziehung unempfindlicher als in Geweben, da er, wie bereits besprochen, den Status des Gesamtorganismus bezüglich oxidativem Streß widerspiegelt. So kommt es nach Behandlung mit 2-Nitropropan zu einer 8- bzw. 4-fachen Erhöhung von 8-oxodG in der DNA aus den Zielgeweben Leber bzw. Niere und Knochenmark, während es im Urin nur zu einer 1,4-fachen Erhöhung kommt (Loft *et al.* 1998). Dies ist auf einen Verdünnungseffekt zurückzuführen. Während der Nachweis in der DNA ein begrenztes Organ einzeln erfaßt, kann im Urin der Marker nur für den Gesamtorganismus nachgewiesen werden. Gegebenenfalls steht ein oxidativ geschädigtes Organ dem ansonsten nicht geschädigten Gesamtorganismus gegenüber, so daß es im Mittelwert nur zu einer geringen Erhöhung der Ausscheidung an 8-oxodG kommt. Dies stellt eine wesentliche Limitierung des Markers 8-oxodG in Urin dar.

Vor dem Hintergrund des eher unempfindlichen Ansprechens des Markers 8-oxodG im Urin bei einer auf nur ein Organ beschränkten Einwirkung von oxidativem Streß ist die Gruppengröße von 8 Tieren recht klein. So konnte beispielsweise in einer Gruppe von 7 Tieren ein Anstieg von 20 % im Mittelwert nur grenzwertig signifikant nachgewiesen werden, obwohl in dieser Studie der Variationskoeffizient in der Größenordnung von nur 10 % lag (Topp *et al.* 2000). In einer Gruppe von 8 Tieren konnte keine signifikante Erhöhung der 8-oxodG-Ausscheidung durch Paraquat, einer allgemein anerkannten Quelle für oxidativen Streß, in Ratten nachgewiesen werden (Sörensen u. Loft 2000). Der Variationskoeffizient lag in dieser Studie in der Größenordnung von 40 – 50 %. Aufgrund der hohen Streuung der Meßwerte ist die Gruppengröße also prinzipiell kritisch für den signifikanten Nachweis von Effekten mit diesem Marker. Daher eignet sich 8-oxodG im Urin als Marker für oxidativen Streß eher für die Untersuchung von Effekten, die auf oxidativen Streß im Gesamtorganismus zurückzuführen sind, sowie für größere Gruppen und Humanstudien. In Humanstudien ist die Sammlung von 24-Stundenurin einfacher und weniger fehlerbehaftet als in Tierstudien. So konnten zum Beispiel Unterschiede in der Ausscheidung von 8-oxodG im Urin zwischen Rauchern und Nichtrauchern (Loft *et al.* 1992, Loft *et al.* 1994, Tagesson *et al.* 1992) nachgewiesen werden.

Im vorliegenden Versuch konnte 8-oxodG in Urin nicht als geeigneter Biomarker für eine Ozonexposition identifiziert werden. Dies liegt möglicherweise am Versuchdesign und an der Versuchsdurchführung. Die Eignung des Markers für Humanstudien sollte deshalb hier nicht ausgeschlossen werden. Allerdings zeigt sich 8-oxodG im Urin als eher unempfindlicher Marker, der einer hohen inter- und intraindividuellen Streuung unterworfen ist. Daher ist in jedem Fall auf eine ausreichende Gruppengröße zu achten, wenn dieser Marker eingesetzt werden soll.

4.11.2 8-oxodG in DNA

Aus den ersten Blutproben des Tierversuchs wurde die DNA zur Analyse auf ihren Gehalt an 8-oxodG nach Abtrennung von 200 µl Plasma mit dem Verfahren nach Adachi *et al.* (1995) isoliert und hydrolysiert (Expositionswoche 1 und 3). Die gemessenen Werte lagen in der Größenordnung $2 \text{ 8-oxodG}/10^5 \text{ dG}$ und zeigten eine große Schwankungsbreite, sowohl innerhalb einer Analyse als auch insbesondere zwischen den verschiedenen Analysen. Dies ist ein Hinweis, daß wie bereits beschrieben bei Verwendung dieses Verfahrens eine nicht reproduzierbare Artefaktbildung auftritt.

Durch Anwendung der DNA-Isolierung mittels Isopropanolfractionierung (Expositionswoche 7 – 11) sanken die beobachteten Werte in die Größenordnung von $0,2 \text{ 8-oxodG}/10^5 \text{ dG}$.

Der Unterschied wird aus Abb. 4.31 deutlich, in der Ergebnisse mit beiden Verfahren gegenübergestellt sind. Die Werte aus Expositionswoche 7 – 11 sind nochmals in Abb. 4.32 vergrößert dargestellt.

Beim Betrachten der Werte fällt auf, daß teilweise die Konfidenzintervalle des Mittelwertes und auch die Standardabweichungen (Daten nicht gezeigt) größer sind als die Mittelwerte. Ein klarer dosisabhängiger Trend ist nicht zu erkennen, kann aber aufgrund der starken Streuung der Meßwerte auch nicht ausgeschlossen werden.

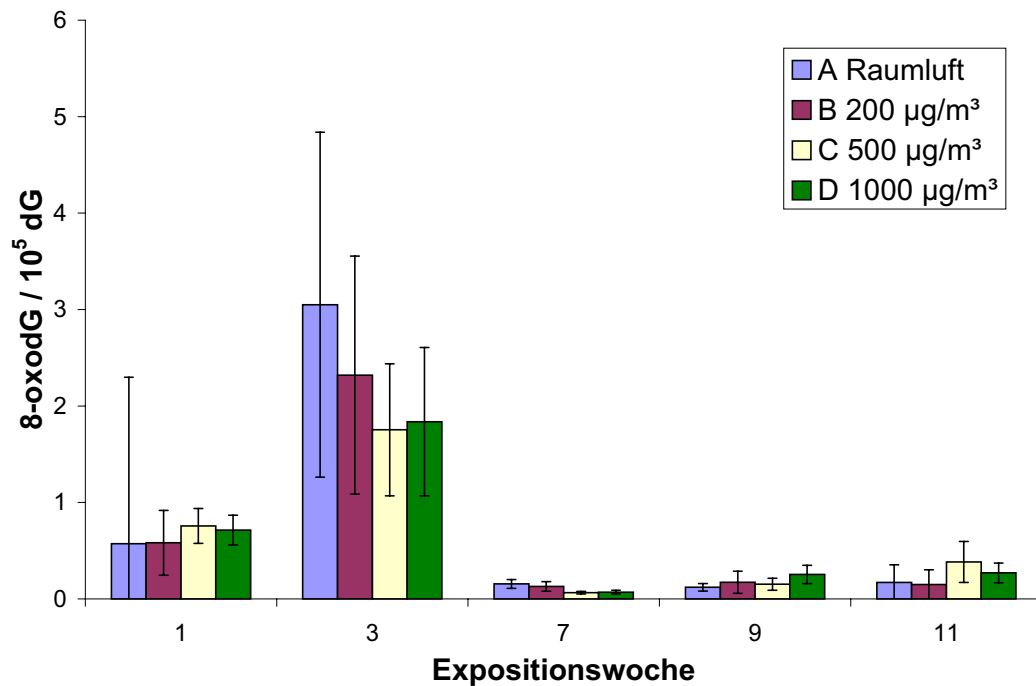


Abb. 4.31

8-oxodG-Gehalt in lymphozytärer DNA ozonexponierter Ratten (Mittelwerte \pm Konfidenzintervall 95 %): Gegenüberstellung der beiden DNA-Isolierungs und -Hydrolyse Verfahren (Expositionswoche 1 u. 3 vs. 7 – 11)

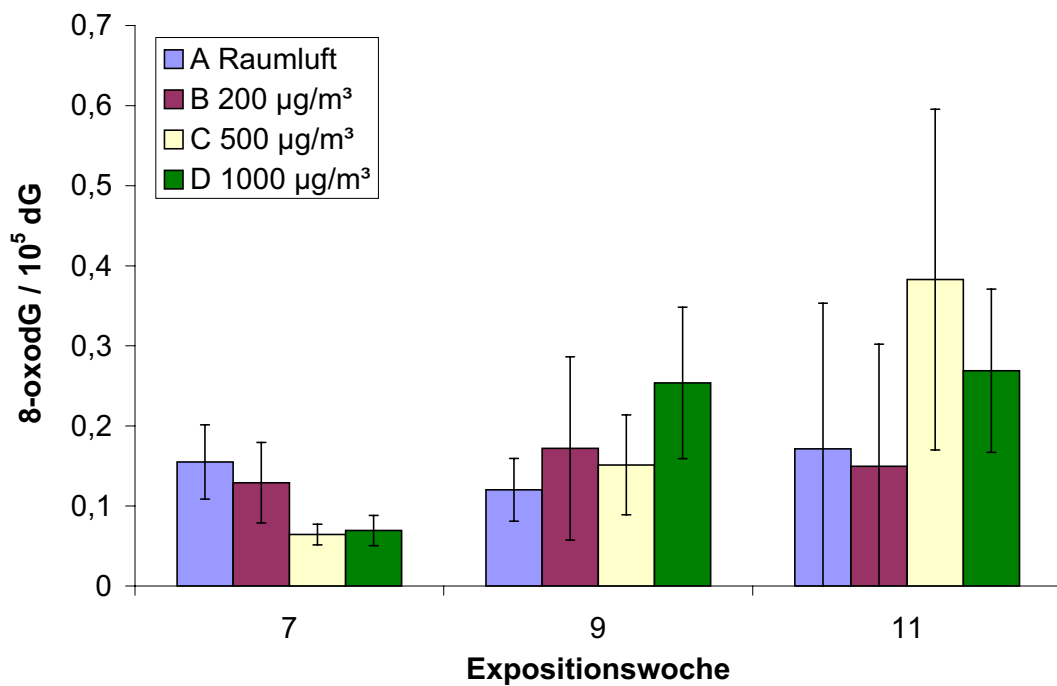


Abb. 4.32

8-oxodG-Gehalt in lymphozytärer DNA ozonexponierter Ratten (Mittelwerte \pm Konfidenzintervall 95 %)

Die Methode zur Bestimmung von 8-oxodG ist prinzipiell geeignet, wie während der Methodenentwicklung gezeigt wurde. Die Standardabweichung, die im Rahmen der Methodenentwicklung ermittelt wurde, ist mit 16 % akzeptabel. Die beobachteten Werte liegen in einer Größenordnung von 0,1 - 0,2 8-oxodG/10⁵ dG. Dies zeigt, daß die Artefaktbildung beim verwendeten Verfahren minimiert ist. Die hohe Varianz der Meßwerte ist also nicht in der Methode der DNA-Isolierung und -Hydrolyse begründet. Auf Basis der Vergleichsstudien zwischen verschiedenen Laboratorien sind Werte dieser Größenordnung als vertrauenswürdig einzustufen (ESCODD 2002b).

Es ist davon auszugehen, daß die Qualität der verwendeten Blutproben ursächlich ist für die hohe Varianz der Meßwerte. Das Blut wurde aus der Schwanzvene entnommen. Bei Ratten sind hierzu sehr feine Kanülen erforderlich und die Prozedur dauert mehrere Minuten. Aus diesem Grund wiesen die Proben oftmals deutliche Spuren von Hämolyse auf (rotes Plasma) sowie häufig auch koagulierte Anteile. Bei der Hämolyse wird Eisen freigesetzt, welches bei der unvermeidbaren kurzzeitigen Lagerung der Proben in die Zellen diffundieren kann, wodurch sich die intrazelluläre Eisenkonzentration erhöht und ggf. Fenton-Reaktionen stattfinden. Koagulierte Anteile lassen sich während der Zellyse nicht entfernen, so daß während des Proteinase K Verdaus aus ihnen ebenfalls Eisen freigesetzt wird. Zwar wird dieses durch den inaktivierenden Eisenchelator DFAM abgefangen, es ist jedoch fraglich, ob dies bei längerer Inkubation und größeren Eisenkonzentrationen ausreichend ist. In beiden Fällen muß davon ausgegangen werden, daß die mangelnde Qualität der gewonnenen Blutproben zu einer artifiziellen Erhöhung der 8-oxodG-Konzentrationen in der lymphozytären DNA führt. Bei Durchsicht der Literatur fällt auf, daß es nur wenige Arbeiten gibt, die sich mit der Messung von 8-oxodG in lymphozytärer DNA in Blutproben aus Tierversuchen insbesondere von Nagern beschäftigen. Insbesondere gibt es keine Studien, die Blutproben von Nagern unter dem Aspekt der Artefaktminimierung auf 8-oxodG in der DNA untersuchen. Literaturwerte für 8-oxodG in lymphozytärer DNA von Ratten liegen bei 1 – 4 8-oxodG/10⁵ dG (Yamano *et al.* 1995, Toraason *et al.* 1999). Beide Autoren berichten über keine signifikante Erhöhung der 8-oxodG Konzentration in lymphozytärer DNA durch die jeweils untersuchten Noxen. In beiden Fällen mußten die Blutproben durch Nekropsie gewonnen werden. Vermutlich sind die hier genannten Gründe bezüglich der Schwierigkeiten, aus Nagern Blutproben geeigneter Qualität zu gewinnen, dafür verantwortlich, daß keine Berichte über den erfolgreichen Einsatz des Markers 8-oxodG in lymphozytärer DNA in diesen Versuchssystemen vorliegen. Die Messung von 8-oxodG in DNA in Tierversuchen

beschränkt sich vielmehr auf die Analyse von Gewebeproben, vor allem Leber, die sich leicht homogenisieren läßt.

Bei Abschluß des Tierversuches nach 12 Wochen Expositionszeit wurden unter anderem die Lungen der Ratten durch Nekropsie gewonnen und die Teile, die nicht zur histopathologischen Beurteilung fixiert wurden, bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und bis zur Analyse gelagert. Die Konzentration an 8-oxodG in der Lungen-DNA ist in Abb. 4.33 dargestellt.

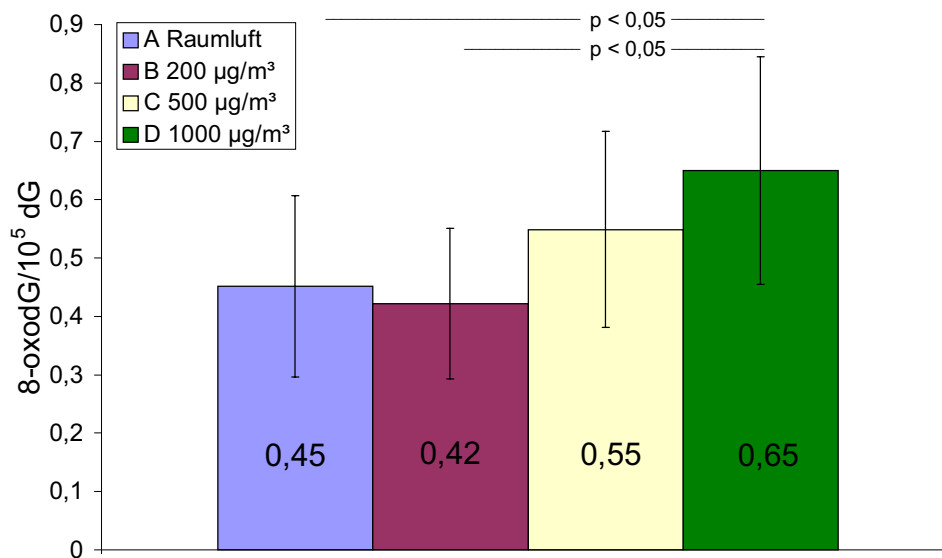


Abb. 4.33

8-oxodG-Gehalt in DNA aus der Lunge ozonexponierter Ratten (Mittelwerte \pm Konfidenzintervall 95 %)

Man erkennt einen dosisabhängigen Anstieg der 8-oxodG Konzentration in der Lunge ab einer Ozonkonzentration von $500\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Gruppe C). Bei einer Konzentration von $1000\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Gruppe D) ist der Anstieg gegenüber der Kontrollgruppe (Gruppe A) und der mit $200\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Gruppe B) exponierten Gruppe signifikant (ANOVA, jeweils $p < 0,05$). Der Anstieg zwischen der Kontrollgruppe und Gruppe D beträgt 44 %, zwischen Kontrollgruppe und Gruppe C 22 %.

Die Werte liegen in der gleichen Größenordnung wie die niedrigsten für DNA aus Rattenlungengewebe (Asami *et al.* 1998, Seike *et al.* 2003, Arif *et al.* 2001) und humanem Lungengewebe beschrieben ist (Asami *et al.* 1997, Inoue *et al.* 1998). Dies ist zusätzlich zu den bereits beschriebenen Vergleichsstudien im Rahmen von ESCODD ein Hinweis auf die Eignung des gewählten Nachweisverfahrens und damit auf die Richtigkeit der Werte.

Die Erhöhung um den Faktor 1,4 durch Ozonexposition gegenüber einer Konzentration von 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ist in einer Größenordnung, wie sie auch für Zigarettenrauch (Park *et al.* 1998) oder NNK (Rosa *et al.* 1998) im Tierexperiment beschrieben ist. Ferner wurde dieser Faktor auch für den 8-oxodG-Gehalt in DNA aus Lungengewebe von Rauchern gegenüber Nichtrauchern gefunden (Asami *et al.* 1997). Allerdings ist oxidativer Streß nicht der Hauptmechanismus der Tabakkarzinogenese, so daß dies keinen Rückschluß auf die tumorinduzierende Wirkung zuläßt.

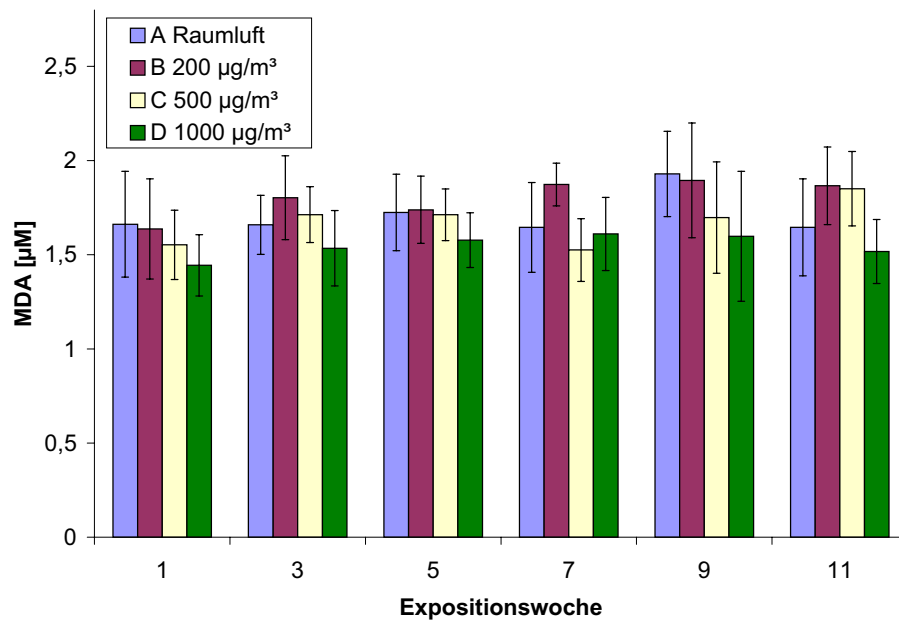
Daß Ozon in der Lage ist, *in vitro* 8-oxodG in Plasmid-DNA und isolierten Zellen zu erzeugen, konnte u. a. in dieser Arbeit gezeigt werden. Erhöhter Gehalt an 8-oxodG konnte in der DNA des Nasenschleimhautepithels von Personen, die in Mexico City einer erhöhten Belastung von Luftschadstoffen, darunter auch Ozon, ausgesetzt waren, nachgewiesen werden (Calderon-Garciduenas *et al.* 1999). Der Nachweis erfolgte immunhistochemisch. Patienten, die Ozontherapie in Form von intravenöser Infusion ozonierter Kochsalzlösung erhielten, zeigten in der Hälfte der Fälle nach dieser Therapie eine Erhöhung des 8-oxodG-Gehalts in lymphozytärer DNA (Foksinski *et al.* 1999). Allerdings handelt es sich um eine kleine Gruppe von 6 Patienten und die Werte vor Behandlung sind im Bereich von 6 – 14 8-oxodG/ 10^5 dG sehr hoch. Es gibt keine Kontrollgruppe mit gesunden Probanden und der Argumentation, daß dies ein Effekt der zugrunde liegenden Krankheit Arteriosklerose sei, kann nicht uneingeschränkt gefolgt werden. Der im Rahmen dieser Arbeit vorliegende Befund über die Induktion von 8-oxodG im Lungengewebe der Ratte durch Ozonexposition ist der erste Befund über die Induktion von 8-oxodG in der Lunge durch Ozon. Zwischenzeitlich publizierte Arbeiten weisen keine Erhöhung der 8-oxodG-Konzentration in der Lunge ozonexponierter Mäuse (1 – 2 ppm, 90 min) nach, während es zu einer Induktion von Strangbrüchen in Zellen aus bronchioalveolärer Lavage kommt (Bornholdt *et al.* 2002). Die Autoren konnten bei Exposition der MutaTMMouse gegenüber 2 ppm für 90 min/d an 5 Tagen keine Erhöhung der Mutationsrate in der Lunge nachweisen. Sie schließen jedoch nicht aus, daß zur Induktion solcher Schäden eine längere wiederholte Exposition erforderlich ist. Analog gilt dies auch für die Induktion von 8-oxodG, das eine mutagene Läsion darstellt. Diese Erklärung wird bestätigt durch die positiven Befunde für 8-oxodG-Induktion aus dieser Arbeit mit subchronischer Exposition. Die Einschränkung von Bornholdt *et al.*, daß bei wiederholter Exposition Mutationen auf histologische Veränderungen zurückzuführen sein können, relativieren diese Befunde nicht, da solche Veränderungen im hier durchgeführten Versuch nicht beobachtet wurden.

Auffällig ist, daß bei der Exposition gegenüber $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ noch keine Erhöhung der 8-oxodG-Konzentration zu beobachten ist. Erst beginnend mit $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$ steigt die Konzentration, bei $1000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ist die Erhöhung statistisch signifikant. Dies ist dadurch zu erklären, daß im unteren Konzentrationsbereich die körpereigene antioxidative Abwehr die entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies entgiftet, wodurch es nicht zu oxidativem Streß und zur Induktion von DNA-Schäden in Form von 8-oxodG kommt. Mit zunehmender Konzentration reicht die antioxidative Kapazität immer weniger aus, die entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies zu entgiften, wodurch es zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der 8-oxodG Konzentration in der DNA kommt. Dieses Übergewicht reaktiver Sauerstoffspezies gegenüber Antioxidantien stellt oxidativen Streß dar.

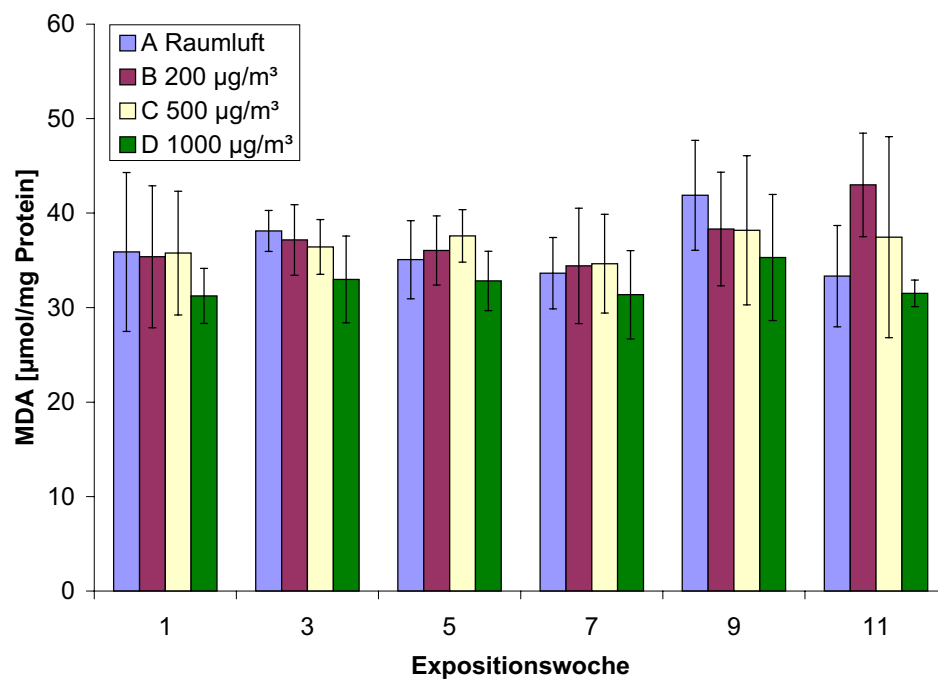
4.11.3 Malondialdehyd (MDA) in Blutplasma

Von den im zweiwöchigen Rhythmus entnommenen Blutproben wurden jeweils $200 \mu\text{l}$ Blutplasma abgenommen und bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Aus diesen Proben wurde mittels der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode Malondialdehyd bestimmt. Da es teilweise erforderlich war, die Blutentnahme bei einem einzelnen Tier in mehreren Ansätzen durchzuführen, wodurch es zur Verdünnung mit unterschiedlichen Mengen Antikoagulans kommt, wurde die MDA-Konzentration zusätzlich auf den Gehalt an Plasmaproteinen normiert. Ferner ist der größte Teil des MDA im Plasma an Plasmaproteine gebunden, so daß z. B. durch einen vermehrten Abbau oder eine vermehrte Ausscheidung von Proteinen es zu einer vermehrten Ausscheidung von MDA kommen kann. Ein solcher Effekt wird durch die verwendete Normierung ebenfalls weitgehend neutralisiert. Die Bestimmung der Plasmaproteinkonzentration erfolgte mittels eines BCA-Microassays.

Die Entwicklung der absoluten Konzentration an MDA im Plasma ist in Abb. 4.34 für die einzelnen Gruppen über den Expositionszeitraum gezeigt. In Abb. 4.35 ist die Konzentration normiert auf die Plasmaproteinkonzentration dargestellt. Es fällt auf, daß es durch die Normierung nur teilweise zu einer Verkleinerung der Konfidenzintervalle kommt. Teilweise kommt es auch zu einer Vergrößerung. Dies ist vermutlich auf den zusätzlichen Meßfehler bei der Bestimmung der Plasmaproteinkonzentration zurückzuführen.

**Abb. 4.34**

Zeitlicher Verlauf der Malondialdehydkonzentration (absolute Konzentration) im Plasma ozonexponierter Ratten; Mittelwerte \pm Konfidenzintervall 95 %

**Abb. 4.35**

Zeitlicher Verlauf der Malondialdehydkonzentration (normiert auf Plasmaprotein-gehalt) im Plasma ozonexponierter Ratten; Mittelwerte \pm Konfidenzintervall 95 %

Zunächst ist auffällig, daß die Ozonbehandlung nicht zu einer dosisabhängigen Erhöhung der MDA-Konzentration im Plasma führt. Auch die Betrachtung von Einzelwerten gibt keinen Hinweis auf das positive Ansprechen des Markers bei einzelnen Tieren innerhalb der Gruppen. Vielmehr zeigt die mit der höchsten Ozonkonzentration exponierte Gruppe immer die niedrigsten MDA-Konzentrationen. Die Ausprägung dieses Effektes ist bei den auf die Plasmaproteinkonzentration normierten Werten etwas besser zu erkennen. Wochenweise betrachtet ist der Effekt nur in Einzelfällen statistisch signifikant ($p < 0,05$). Da jedoch keine Zeitabhängigkeit des Effekts zu erkennen ist und auch keine Altersabhängigkeit der MDA-Konzentration im Wochenbereich beschrieben ist, können die Einzelwerte über die Expositionszeit vereinigt werden und die Auswertung auf Gruppenbasis über alle Wochen erfolgen. Bei Betrachtung der absoluten MDA-Konzentration zeigt sich, daß die Gruppe der gegenüber $1000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ Ozon exponierten Ratten signifikant niedrigere Plasmaspiegel von MDA zeigen als die Kontrolltiere und die gegenüber $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ exponierten Tiere (ANOVA, $p < 0,05$). Für die auf die Plasmaproteinkonzentration normierte MDA-Konzentration ist der Effekt zusätzlich auch gegenüber den mit $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$ exponierten Tieren signifikant. Die Mittelwerte der gruppenweise zusammengefaßten Ergebnisse sind in Abb. 4.36 und Abb. 4.37 dargestellt.

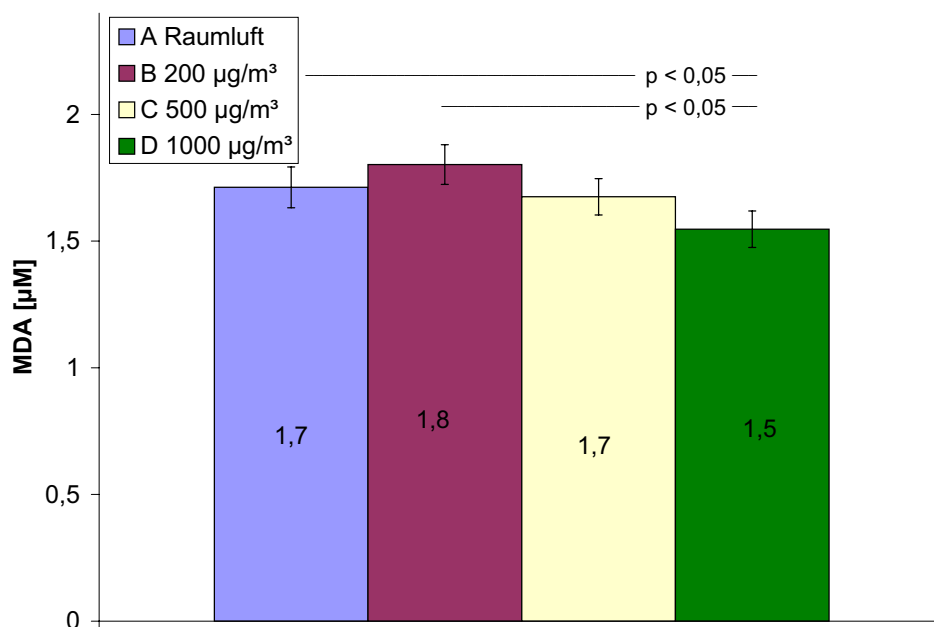
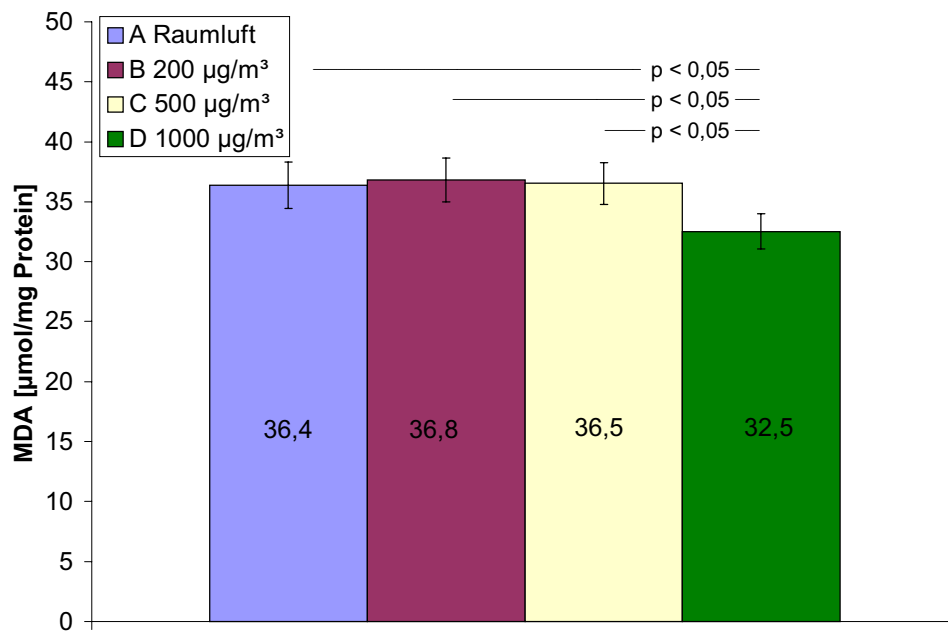


Abb. 4.36

Malondialdehydkonzentration (absolute Konzentration) im Plasma ozonexponierter Ratten, gemittelt über den Expositionszeitraum; Mittelwerte \pm Konfidenzintervall 95 %

**Abb. 4.37**

Malondialdehydkonzentration (normiert auf Plasmaproteinkonzentration) im Plasma ozonexponierter Ratten, gemittelt über den Expositionszeitraum; Mittelwerte \pm Konfidenzintervall 95 %

Der Befund, daß keine dosisabhängige Zunahme für Malondialdehyd im Plasma als Marker für Lipidperoxidation zu beobachten ist, überrascht zunächst. Zwar liegen nur wenige Studien vor, die Effekte von inhalativer Ozonexposition auf das Blutplasma untersuchen, dennoch ist die Bildung von Lipidperoxidationsprodukten in der Lunge nach Ozonexposition beschrieben. In Mäusen kommt es nach Exposition gegenüber 0,5 und 4 mg/m³ Ozon über 3 Stunden zur Ausbildung von 4-Hydroxynonenal-Proteinaddukten. Gleichzeitig ist eine Entzündungsreaktion nachweisbar (Kirichenko *et al.* 1996). Auch beim Menschen spielt 4-Hydroxynonenal eine Rolle bei der Wirkung von Ozon auf Lungenzellen (Hamilton *et al.* 1998). Durch 4-Hydroxynonenal läßt sich auch die Wirkung von Ozon auf Makrophagen *ex vivo* simulieren (Hamilton *et al.* 1996). In Ratten und Menschen, die gegenüber 440 µg/m³ Ozon über 4 Stunden bei körperlicher Aktivität exponiert waren, wurden in Bronchiallavageflüssigkeit die Aldehyde Nonanal und Hexanal nachgewiesen (Frampton *et al.* 1999a, Frampton *et al.* 1999b). In Ratten, die gegenüber 100 µg/m³ Ozon exponiert waren, wurde nach 9 Monaten erhöhte Werte für thiobarbitursäurereaktives Material in der Lunge festgestellt. Die Werte

nach 18 und 22 Monaten lagen jedoch unter den Werten der Kontrollgruppe (Sagai u. Ichinose 1991).

Ozon induziert die Bildung von Lipidperoxidationsprodukten in der Lunge. Eine mögliche Erklärung, warum diese Bildung nicht im Plasma nachweisbar ist, ist ein Verdünnungseffekt. Die Bildung ist lokal begrenzt und geht im Grundrauschen des Gesamtorganismus unter, wenn sie außerhalb des Kompartiments, in dem die Bildung stattfindet, nachgewiesen werden soll. Das Plasma stellt insbesondere ein Kompartiment dar, welches mit zahlreichen anderen Kompartimenten des Organismus, in denen Lipidperoxidation stattfinden kann, in direkter Verbindung steht. Dies ist zwar eine Erklärung dafür, warum keine Erhöhung der Plasmakonzentration von MDA nachgewiesen werden konnte. Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die MDA-Konzentration im Plasma keinen geeigneten Biomarker für Ozonexposition darstellt.

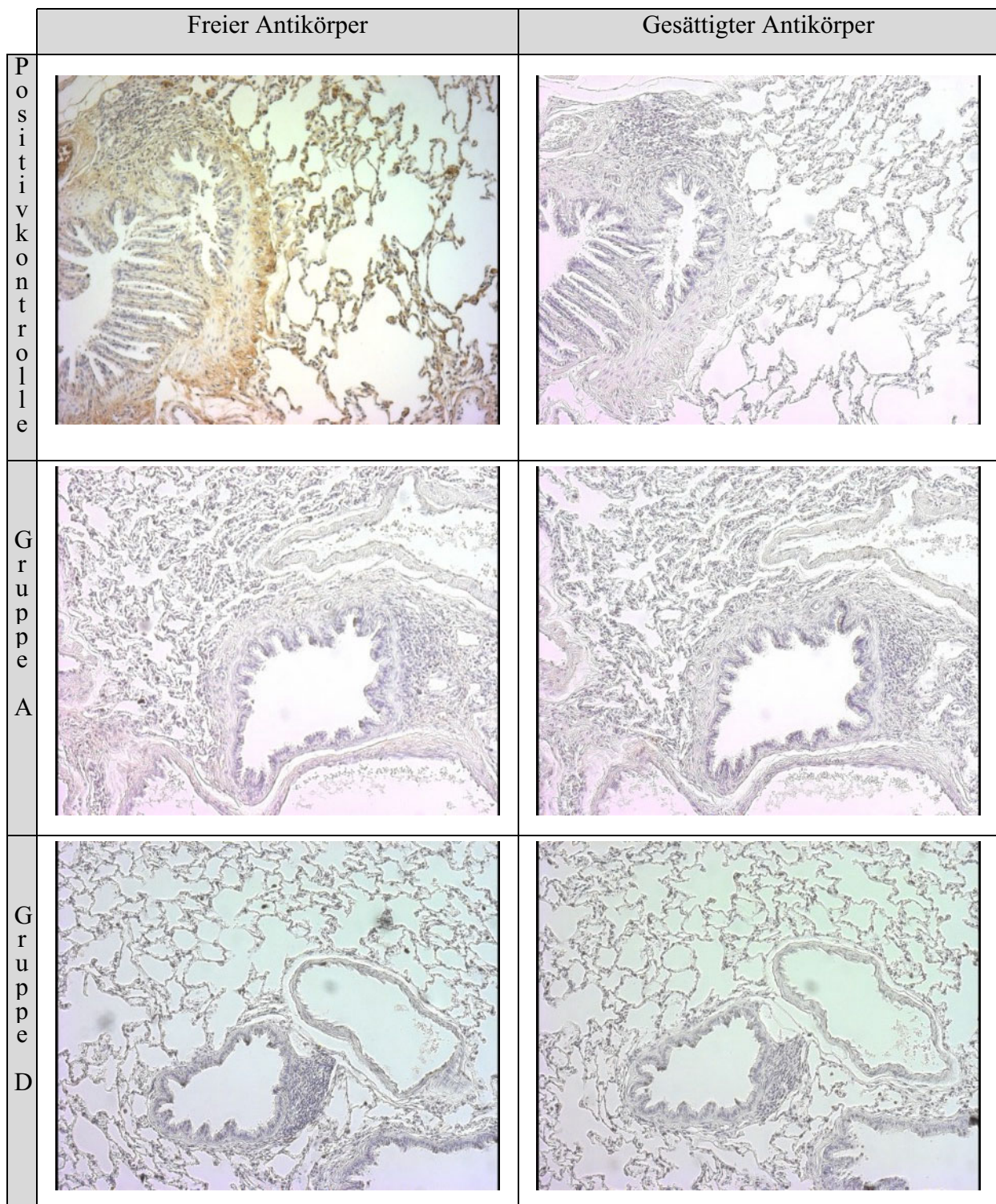
Eine mögliche Erklärung für die statistisch signifikante Reduktion in der am höchsten exponierten Gruppe ist die Induktion der antioxidativen Abwehr. Durch Konditionierung mit Ozon konnten sowohl beim Menschen als auch im Tiermodell die Einflüsse von Noxen, die typischerweise oxidativen Streß verursachen, abgemildert oder sogar eine Schädigung vollständig verhindert werden, so z. B. bei Leberreperfusion (Ajamieh *et al.* 2002, Peralta *et al.* 1999), Diabetes (Al-Dalain 2001) oder tetrachlorkohlenstoffinduziertem Leberschaden (Candelario-Jalil *et al.* 2001, Leon *et al.* 1998). In Tuberkulosepatienten konnte nach Ozonexposition ein Absinken der Plasmamalondialdehydkonzentration sowie ein Anstieg der Superoxiddismutaseaktivität nachgewiesen werden (Belianin u. Abdullaev 2000). Ein Abfallen der Plasmamalondialdehydkonzentration, bestimmt als thiobarbitursäurereaktives Material, konnte auch in Personen festgestellt werden, die in Mexiko City für vier Monate einer erhöhten Sommersmogbelastung ausgesetzt waren (Medina-Navarro *et al.* 1997). Zusätzlich konnte eine Erhöhung der antioxidativen Kapazität des Blutplasmas gegen *ex vivo* Lipidperoxidation nachgewiesen werden. Der im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Effekt der Abnahme der Malondialdehydkonzentration im Plasma in der am höchsten exponierten Gruppe ist vor dem Hintergrund dieser Beobachtungen erklärbar. Die Ozonexposition stellt einen oxidativen Reiz dar, der die antioxidative Abwehr des Organismus anregt. Infolgedessen kann es zu einer verstärkten antioxidativen Kapazität und hierdurch auch zu einem Absinken von Markern für oxidativen Stress gegenüber nicht konditionierten Tieren kommen.

4.11.4 Analyse von Nitrotyrosin in Lungengewebe

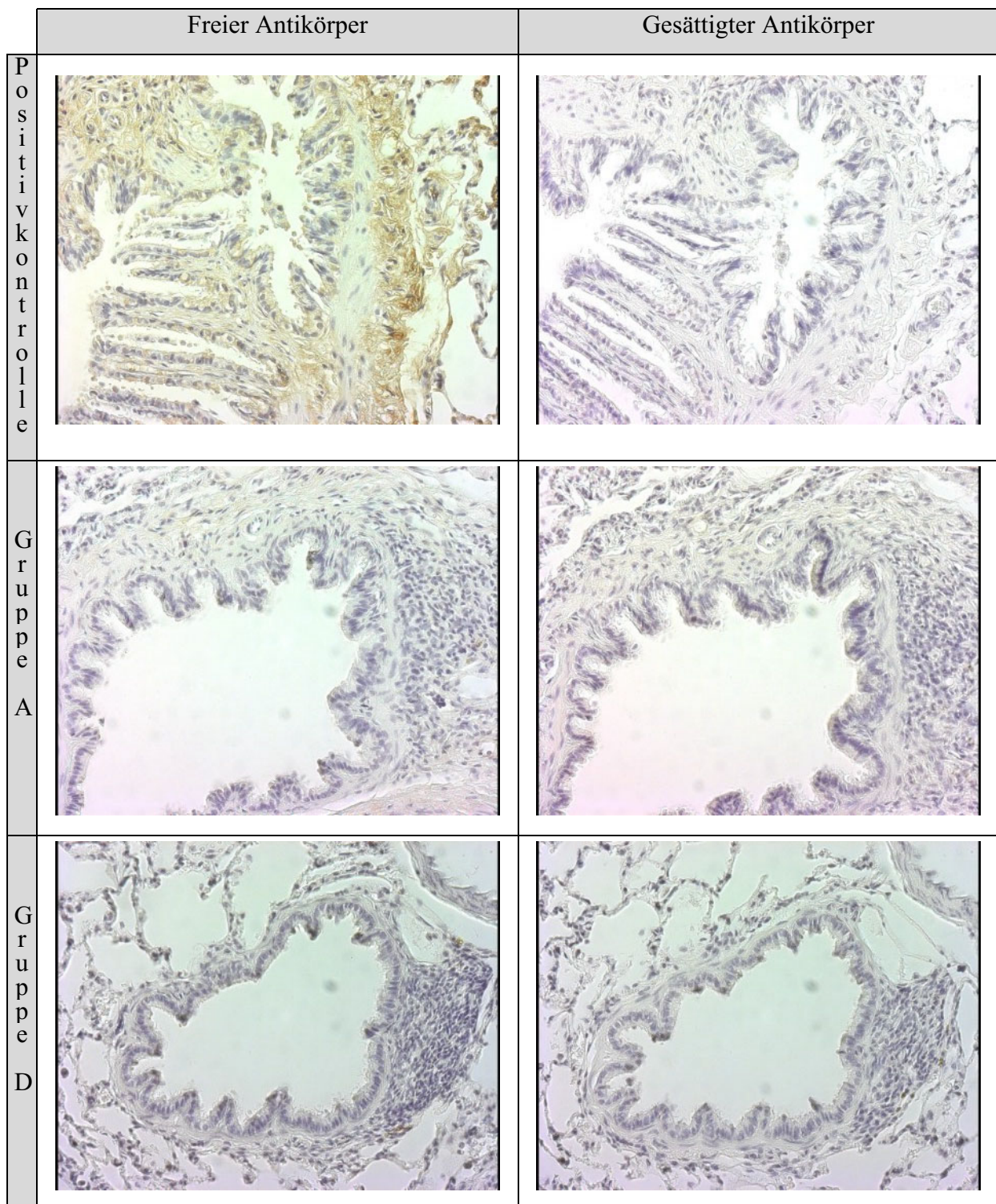
Die nach 11 Wochen Expositionszeit terminal gewonnen Gewebeproben der Lunge von je vier Tieren der Kontrollgruppe (Raumluft) und der höchsten Expositionsgruppe (1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) wurden mittels der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten immunhistochemischen Methode auf Nitrotyrosin untersucht. In jedem Experiment wurde eine Positivkontrolle (mit Peroxynitrit behandelte Gewebeschnitte) und für jede Probe eine Negativkontrolle (mit Nitrotyrosin gesättigter Antikörper) durchgeführt.

Abb. 4.38 bis Abb. 4.40 zeigen typische Ergebnisse für jeweils ein Tier aus den beiden untersuchten Gruppen und die Positivkontrolle. Dargestellt sind Übersichtsaufnahmen, Bronchiolen und Alveolargewebe.

Während die Positivkontrolle jeweils eine spezifische Braunfärbung zeigt, die bei der Inkubation mit gesättigtem Antikörper verschwindet, zeigte keine der Proben der exponierten Tiere oder der Kontrollgruppe eine Farbreaktion. Dies bedeutet, daß weder in der Kontrollgruppe noch in den mit 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ Ozon exponierten Tieren eine Nitrotyrosinbildung nachgewiesen werden konnte.

**Abb. 4.38**

Immunhistochemische Färbung zum Nitrotyrosinnachweis (Übersichtsaufnahmen Lunge): Positivkontrolle, Gruppe A und Gruppe D; rechts Spezifitätskontrolle durch gesättigten Antikörper

**Abb. 4.39**

Immunhistochemische Färbung zum Nitrotyrosinnachweis (Bronchiolen): Positivkontrolle, Gruppe A und Gruppe D; rechts Spezifitätskontrolle durch gesättigten Antikörper

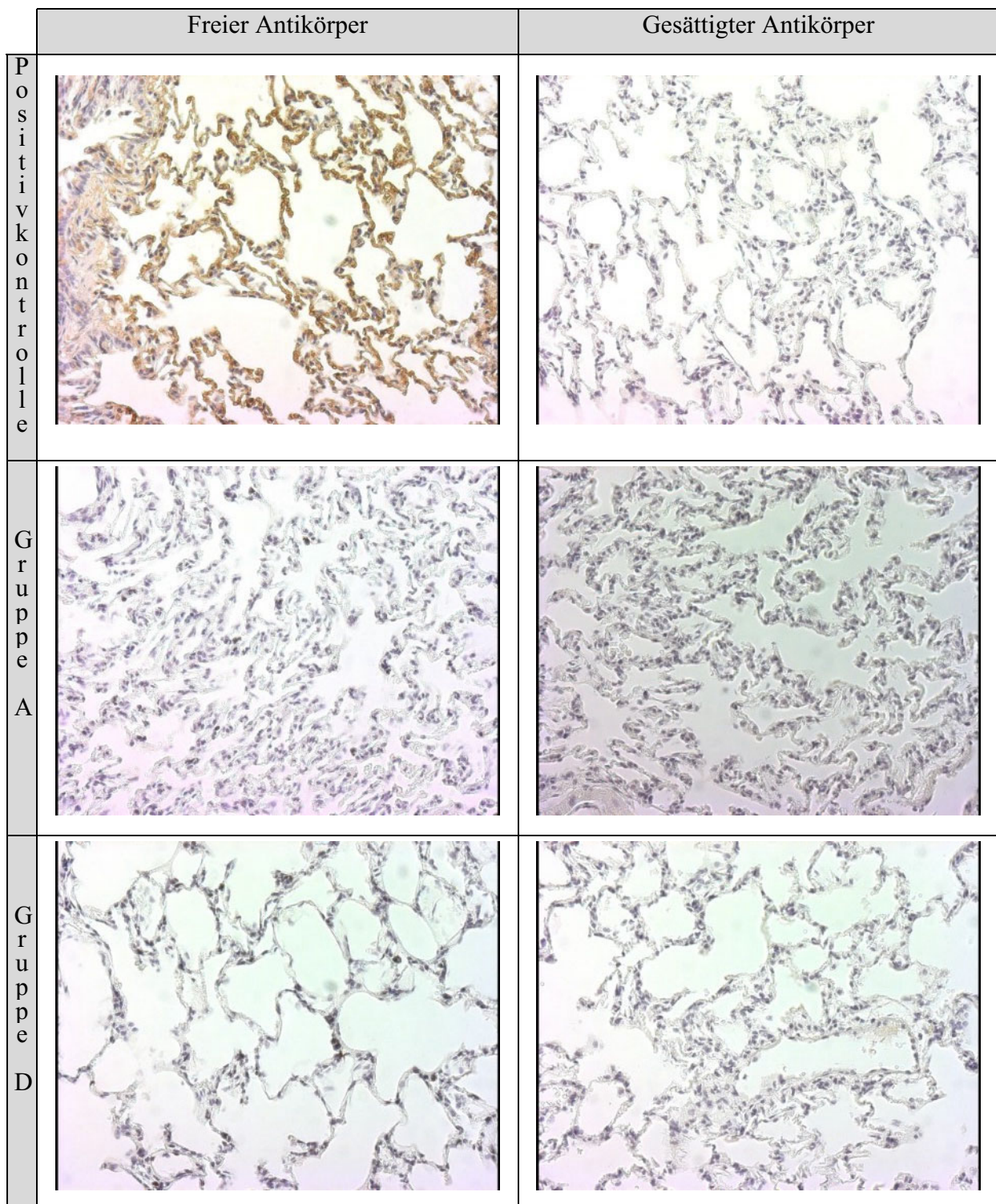


Abb. 4.40
Immunhistochemische Färbung zum Nitrotyrosinnachweis (Alveoli): Positivkontrolle, Gruppe A und Gruppe D; rechts Spezifitätskontrolle durch gesättigten Antikörper

Oxidative Einflüsse sind prinzipiell in der Lage, die Bildung von Nitrotyrosin in Lungengewebe auszulösen. Nach Inhalation von reinem Sauerstoff über 60 Stunden wurde in Ratten Nitrotyrosin im Lungengewebe nachgewiesen (Haddad *et al.* 1994). Nach Inhalation von 85 % Sauerstoff über 24 und 72 Stunden konnte in Ratten sowohl ein Influx von Alveolarmakrophagen als auch von Granulozyten beobachtet werden. Es kam auch zu einer Induktion der iNOS in diesen Zellen und zu einer signifikanten Erhöhung der NO-Konzentration in der Ausatemluft (Cucchiaro 1999). Asbestinhalation induziert in Rattenlungen die Expression von iNOS und die Bildung von Nitrotyrosin (Tanaka *et al.* 1998). Die iNOS-Expression wurde vor allem in Makrophagen in Lungenlavageflüssigkeit (Tanaka *et al.* 1998) und in Granulozyten (Dorger *et al.* 2002) beobachtet. Sie spielt vor allem eine Rolle bei der frühen Entzündungsreaktion (Dorger *et al.* 2002). Bei Entzündungsreaktionen in der Lunge wird typischerweise iNOS in Alveolarmakrophagen exprimiert (Kobzik *et al.* 1993).

Auch Ozoninhalation führt zur Produktion von NO in der Lunge. In Alveolarmakrophagen aus *in vivo* exponierten Ratten kam es nach Exposition gegenüber 2 oder 4 mg/m³ Ozon für drei Stunden zu einer dosisabhängigen Produktion von NO (Laskin *et al.* 1996). In Mäusen konnte nach einer Exposition gegenüber 1,6 mg/m³ Ozon über 3 Stunden die Induktion von iNOS sowie die Bildung von NO, Peroxynitrit und Nitrotyrosin nachgewiesen werden (Laskin *et al.* 2001, Laskin *et al.* 2002). Diese Effekte waren eng verbunden mit Einwanderung von Entzündungszellen in das Lungengewebe. In transgenen iNOS-Knock-Out-Mäusen waren diese Effekte nicht nachweisbar.

Die Bildung von Nitrotyrosin in der Lunge ist eng verbunden mit Entzündungsprozessen. Auch wenn in der Lunge prinzipiell reaktive Sauerstoffspezies, z. B. aus Ozoninhalation zur Verfügung stehen, bedarf es einen NO-Lieferanten zur Bildung von Peroxynitrit und hieraus Nitrotyrosin. Im vorliegenden Versuch waren im Gegensatz zu den oben zitierten Versuchen keine Entzündungsreaktionen zu beobachten. Dies ist auf eine Adaptationsreaktion aufgrund der mehrwöchigen, jeweils kurzzeitigen Exposition gegenüber vergleichsweise niedrigeren Konzentrationen zurückzuführen. Vor diesem Hintergrund ist der negative Befund bezüglich des Nachweises von Nitrotyrosin zu erklären.

4.11.5 Bewertung der Ergebnisse bezüglich Ozonexposition

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß Ozon in der Lage ist, oxidative Veränderung an DNA-Basen in Form von 8-oxodG Bildung zu bewirken. Die Bildung dieser mutagenen Basenläsion ist prinzipiell als kritisch zu bewerten. Um aus den vorliegenden Ergebnissen eine qualitative Risikoabschätzung für den Menschen ableiten zu können, ist es erforderlich, verschiedene Punkte zu bewerten.

Für die Toxizität wiederholter Ozonexposition ist eine ausgeprägte Interspeziesvariabilität beschrieben (Dormans *et al.* 1999). Die Maus zeigte sowohl morphologisch als auch biochemisch die ausgeprägteste Reaktion auf Ozonexposition, gefolgt vom Meerschweinchen. Die Ratte ist unter den drei Spezies am unempfindlichsten. Dies wird bestätigt durch Parameter, die in Bronchiallavageflüssigkeit untersucht wurden und als Reihenfolge abfallender Empfindlichkeit die Spezies Meerschweinchen, Maus, Hamster, Ratte und Kaninchen ergaben (Hatch *et al.* 1986). Die Adaptation bis hin zu völliger Toleranz ist für die Ratte beschrieben (Jackson u. Frank 1984, van der Wal *et al.* 1994), jedoch nicht für die Maus. Basierend auf der Messung der Collagensynthese in der Lunge sind Affen empfindlicher als Ratten (Last *et al.* 1981). Die höhere Empfindlichkeit von Primaten gegenüber Ratten konnte durch morphometrische Überlegungen bezüglich des gesamten Respirationstraktes erklärt werden (Hyde *et al.* 1994).

Die antioxidative Abwehr des Säugerorganismus ist prinzipiell induzierbar. Für Ozon ist in Ratten eine adaptative Reaktion bezüglich der enzymatischen antioxidativen Abwehr für Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase und Glutathiontransferase beschrieben (Plopper *et al.* 1994). Im Lungengewebe erhöht sich die Konzentration von Vitamin E durch Ozonexposition (Elsayed *et al.* 1990). Im Surfactant spielt im Rahmen der antioxidativen Adaptation vor allem Vitamin C eine Rolle (Wiester *et al.* 1996). Die Konzentration kann sich im Rahmen der Adaptation um ein mehrfaches Erhöhen. Auch im Menschen reagiert Ozon mit Antioxidantien im Respirationstrakt. Für Ozon ist von den niedermolekularen Antioxidantien vor allem Vitamin C und Harnsäure Hauptreaktionspartner (Mudway *et al.* 1996, Blomberg 2000). Nach akuter Ozonexposition wurde im Surfactant des Menschen ein deutlicher Verbrauch an Vitamin C gemessen (Mudway *et al.* 1999). Da der Mensch im Gegensatz zur Ratte Vitamin C nicht selbst synthetisiert, sondern auf Zufuhr über die Nahrung angewiesen ist, ist denkbar, daß dieser Weg der antioxidativen Abwehr beim Menschen schneller erschöpft ist und die Konzentration im Surfactant nicht wie bei der Ratte im Rahmen der Adaptation erhöht werden kann.

Die Art und Dauer der Exposition stellt einen wesentlichen Einflußfaktor auf die Ozonwirkung, die nicht ausschließlich durch die Dosis bestimmt wird, dar (Mustafa 1990). Prinzipiell wurde im Rahmen des hier durchgeführten Tierversuchs ein Expositionsschema gewählt, welches die Adaptationsreaktion begünstigt, da es sich um eine subchronische Applikation handelt, wobei die einzelnen Expositionszeiten mit 1,5 Stunden pro Tag eher kurz und die Konzentrationen für eine akut-toxische Wirkung eher niedrig waren. Dieses Expositionsschema stellt prinzipiell die denkbare Exposition des Menschen dar. Unterschiedlich stark erhöhte Ozonkonzentrationen werden über einen längeren Zeitraum beobachtet. Der tägliche Aufenthalt im Freien, wo es zur Exposition gegenüber dem Sommersmog kommt, über 1,5 Stunden pro Tag ist realistisch. Akute Expositionen, ggf. gegenüber höheren Konzentrationen, hätten in den vorliegenden Experimenten vermutlich zu einer stärkeren Schädigung geführt. Solche Ereignisse sind bezüglich einer ökologischen Belastung des Menschen eher nicht denkbar. Sie kommen aber prinzipiell im Hinblick auf eine berufliche Exposition in Frage.

Zusammenfassend läßt sich bezüglich der Auswahl des Tiermodells feststellen, daß die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Spezies sicherlich keinen „worst-case“ Ansatz bietet. Die Ratte ist im Vergleich mit anderen Spezies, insbesondere Primaten, aufgrund ihrer geringeren Empfindlichkeit und starken Adaptationsreaktion möglicherweise kein geeignetes Versuchstier, um eine Ozonschädigung empfindlich nachweisen zu können. Gerade vor diesem Hintergrund ist davon auszugehen, daß die positiven Befunde auch für den Menschen Relevanz besitzen können und hier eine Schädigung möglicherweise bereits bei niedrigeren Expositionskonzentrationen auftreten kann.

Nach Abschluß unserer Untersuchungen veröffentlichte Arbeiten bestätigen, daß Ozonexposition von Mäusen (Einmalexposition: 90 min, 1 - 2 ppm) in Zellen aus bronchioalveolärer Lavage zur Induktion von Strangbrüchen führt (Bornholdt *et al.* 2002). Eine Induktion von 8-oxodG im Lungengewebe konnte hier nicht nachgewiesen werden. Das Ausbleiben der Induktion von Mutationen in der Lunge der MutaTMMouse nach wiederholter Exposition (5 Tage, 90 min/d, 2 ppm) bestätigt diesen Befund. Die in diesen Experimenten gewählte Ozonkonzentration ist im Vergleich zu umweltrelevanten Konzentrationen hoch. Die Induktion von Strangbrüchen in Zellen aus bronchioalveolärer Lavage von Mäusen nach Ozonexposition ist jedoch durch eine unabhängige Studie mit niedrigerer Konzentration (Einmalexposition 3 h, 0,5 ppm) bestätigt (Haney *et al.* 1999). Der positive Befund aus der hier vorliegenden Arbeit bezüglich der Induktion von 8-oxodG in der Lunge von Ratten nach einer Ozonexposition von 12 Wochen gegenüber Ozonkonzentrationen von 0,25 und 0,5 ppm

bestätigt den Diskussionsansatz von Bornholdt *et al.*, daß zur Induktion von Mutationen, die aus oxidativen DNA-Läsionen resultieren können, eine längere Exposition erforderlich ist. Vor diesem Hintergrund erscheinen trotz beschriebener Adaptationsreaktionen insbesondere längere Ozonbelastungen, wie sie während Sommersmogepisoden auftreten können, besonders kritisch.

Ebenfalls nach Abschluß unserer Arbeiten wurde ein Mutationsspektrum von Ozon an isolierter Plasmid DNA, die nach Exposition in humane Zellen transfiziert wurde, veröffentlicht (Jorge *et al.* 2002). Die hohen verwendeten Konzentrationen von 20 ppm sind vor dem Hintergrund zu rechtfertigen, daß es sich um ein artifizielles System zur Untersuchung von Wirkungsmechanismen handelt und nicht eine quantitative Risikoabschätzung das Ziel ist. Ferner schlagen die Autoren vor, beim Übergang vom zellulären System zu isolierten Plasmiden die Konzentration der untersuchten Noxe um den Faktor 100 zu erhöhen, um vergleichbare Effekte an der kleineren Plasmid-DNA zu erzielen (Jorge *et al.* 2002, Marionnet *et al.* 1995). Die Ergebnisse, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit isolierter Plasmid-DNA und einer Ozonkonzentration von 1 ppm erhalten wurden, sind mit den Befunden von Jorge *et al.* konsistent.

Das beobachtete Mutationsspektrum zeigt eine ungefähr gleiche Verteilung der möglichen Mutationen an G. Dieses Spektrum ist vergleichbar mit dem Mutationsspektrum für *p53*-Mutationen in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen aus Nichtrauchern (Takagi *et al.* 1998, Jorge *et al.* 2002). Ferner wurde die Sequenzspezifität ozoninduzierter GC zu AT Transitionen in 75 % der Lungenkarzinome beobachtet. Dies läßt die Induktion durch Ozonbelastung als möglich erscheinen. Einschränkend ist hierbei jedoch festzustellen, daß das beschriebene Mutationsspektrum auf einer *in vitro*-Exposition von Plasmiden basiert. In diesem System wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit für Ozon ein spezifisches Schadensprofil gezeigt. Die Übertragung des Mutationsspektrums auf die *in vivo* Situation setzt voraus, daß Ozon auch hier in der gleichen Weise reagiert, was bisher wie bereits beschrieben, als nicht wahrscheinlich angesehen wurde. Ob die Übereinstimmung des Mutationsspektrums und der Sequenzspezifität ein Beleg dafür ist, daß die o. g. Tumoren ozoninduziert sind, oder ob die Postulation, daß Ozon *in vivo* nicht *per se* reagiert, eher den kausalen Zusammenhang fraglich erscheinen läßt, kann auf Basis der verfügbaren Daten nicht beurteilt werden. Das Mutationsspektrum für 8-oxodG (Tan *et al.* 1999) stimmt mit dem Mutationsspektrum für Hydroxylradikale (Jeong *et al.* 1998) überein. Beide unterscheiden sich jedoch leicht vom Mutationsspektrum für Ozon dadurch, daß im letzteren Fall der Anteil der Mutationen an G ungefähr gleich verteilt ist und nicht dominiert wird durch GC zu TA Transversionen. Dies kann

dahingehend interpretiert werden, daß das ozoninduzierte Mutationsspektrum durch mehrere reaktive Spezies entsteht, was auch in der *in vivo* Situation der Fall sein könnte.

Auf Basis dieser Ergebnisse und Überlegungen ist davon auszugehen, daß Ozon in Form von Sommersmog im untersuchten Konzentrationsbereich in der Lage sein kann, *in vivo* die Bildung von 8-oxodG in der Lunge und damit Mutationen durch oxidativen Streß auszulösen. Eine quantitative Risikoabschätzung kann auf Basis der vorliegenden Daten nicht erfolgen.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Analysenverfahren für Marker von oxidativem Streß in unterschiedlichen Testsystemen etabliert bzw. entwickelt. Die Marker wurden anschließend verwendet, um eine oxidative Schädigung durch Ozon *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen.

Durch den Plasmid-Relaxations-Assay wurde an isolierter Plasmid-DNA eine zeitabhängige Schädigung durch Ozon nachgewiesen. Das durch zusätzliche Inkubation mit Reparaturenzymen erhaltene Schadensprofil unterscheidet sich von bisher beschriebenen Profilen dahingehend, daß es überwiegend zur Induktion von FPG- und Endonuklease III sensitiven Läsionen kommt. Dies deutet auf eine Reaktion von Ozon *per se* in diesem Testsystem hin. Das erhaltene Schadensprofil kann als Erklärung für das zwischenzeitlich veröffentlichte Mutationsspektrum von Ozon an isolierter Plasmid-DNA, die nach Exposition in humane Zellen transfiziert wurde (Jorge *et al.* 2002), dienen. An isolierten HL-60 Zellen, die gegenüber 8 mg/m³ Ozon für 30 min exponiert waren, wurde die Induktion von Strangbrüchen und FPG-sensitiven Läsionen mittels eines mit Reparaturenzymen modifizierten Comet-Assays nachgewiesen. Das Verhältnis zwischen Strangbrüchen und FPG-sensitiven Läsionen betrug 1 : 2, was auch in diesem Testsystem auf die Reaktion von Ozon *per se* hindeutet.

Zur Messung von 8-oxodG im Urin wurde eine Methode mit hoher Präzision (VK 3,5 % für Wiederholanalysen) entwickelt, welche auf Immunoaffinitätschromatographie am bisher für diesen Einsatz nicht beschriebenen Antikörper 1F7 kombiniert mit HPLC-ECD (Gradientenelution) basiert. Zur Validierung der Methode wurden Vergleichsmessungen im Rahmen eines internationalen Ringversuchs durchgeführt. Die Ergebnisse belegen die prinzipielle Vergleichbarkeit des hier beschriebenen Verfahrens mit LC-MS-MS, Carbon Column HPLC-ECD und ELISA, wobei es mit ELISA zu einer bis zu fünffachen Überschätzung der Meßwerte kam, die jedoch gut mit den anderen Methoden korrelierten.

Zum Nachweis von 8-oxodG in DNA wurde eine Methode entwickelt, welche die Artefaktbildung während der DNA-Isolierung mittels Isopropanolfractionierung in Anwesenheit von NaI sowie während der DNA-Hydrolyse minimiert und die Quantifizierung mittels HPLC-ECD erlaubt. Die für humane Kontrollproben (Blut) erhaltenen Werte lagen in einer

Größenordnung, welche auf Basis eines Vergleichs mit Daten aus einem internationalen Ringversuch die Richtigkeit der Werte belegt.

Die Richtigkeit der chromatographischen Analysenergebnisse für 8-oxodG wurde durch Teilnahme an einem internationalen Ringversuch mit Vergleichsmessungen von Standards gezeigt.

Zum Nachweis von Malondialdehyd im Blutplasma wurde ein spezifisches Verfahren entwickelt, welches die Messung durch HPLC-FID nach Derivatisierung mit Thiobarbitursäure erlaubt.

Um die Induktion von oxidativem Streß durch Ozon *in vivo* zu untersuchen, wurde ein Tierexperiment an Ratten durchgeführt, welche gegenüber unterschiedlichen Ozonkonzentrationen für max. 12 Wochen exponiert wurden.

Für die Ausscheidung von 8-oxodG im wöchentlich gewonnen 24-Stundenurin konnte kein Unterschied zwischen den verschiedenen Expositionsgruppen nachgewiesen werden. Dies ist möglicherweise auch auf die hohe Streuung der Einzelwerte zurückzuführen, die nicht methodisch begründet ist. Der Nachweis von 8-oxodG in lymphozytärer DNA schlug fehl, was auf die schlechte Qualität der Blutproben zurückzuführen ist. Im terminal gewonnen Lungengewebe wurde ein dosisabhängiger Anstieg der 8-oxodG Konzentration ab einer Ozonkonzentration von 500 µg/m³ beobachtet, der für eine Expositionskonzentration von 1000 µg/m³ gegenüber Raumluft und 200 µg/m³ statistisch signifikant war ($p < 0,05$).

Für Malondialdehyd im Blutplasma konnte keine dosisabhängige Zunahme durch Ozonexposition nachgewiesen werden. Die gegenüber 1000 µg/m³ Ozon exponierten Tiere zeigten jedoch eine gegenüber den anderen Gruppen signifikant niedrigere Malondialdehydkonzentration im Plasma ($p < 0,05$). Dies ist vermutlich auf die Induktion der antioxidativen Abwehr zurückzuführen, wie sie für ozonexponierte Ratten bereits beschrieben wurde.

Die Induktion von Nitrotyrosin im Lungengewebe ozonexponierter Tier konnte nicht nachgewiesen werden. Dies ist auf die Abwesenheit der Entzündungsreaktion, die für akute Ozonexposition beschrieben ist, zurückzuführen.

Fazit: Auf Basis der Ergebnisse aus dieser Arbeit läßt sich feststellen, daß Ozon im untersuchten Konzentrationsbereich bei subchronischer Applikation in der Lage ist, *in vitro* Strangbrüche und oxidative DNA-Läsionen sowie *in vivo* ab 500 µg/m³ 8-oxodG-Bildung in der Lunge zu induzieren. Der nicht- oder minimal-invasive Nachweis dieser Effekte *in vivo* in Körperflüssigkeiten war mit den untersuchten Biomarkern nicht möglich.

6 Material und Methoden

6.1 Verwendete Geräte

γ -Strahlenquelle (Cs ¹³⁷ Gammacell 1000D)	Atomic Energy of Canada
Festphasenextraktionseinheit Adsorbex SPU	Merck
Fluoreszenzmikroskop Olympus BX40 Auswertesoftware Komet 3.1	Olympus Kinetic Imaging
Gelelektrophoresekammer mit Spannungsversorgung	AGS/Gibco AGS
HPLC 1100 mit Fluoreszenzdetektor	Hewlett Packard/Agilent
mit massenspektrometrischem Detektor MSD	Hewlett Packard/Agilent
mit UV-Detektor Spectroflow 757	Agilent
mit elektrochemischem Detektor Coulochem 5100A (Zelle 5011)	Kratos ESA
Inkubator	Heraeus
Kohlendioxidmessgerät Deltagas DG01026	Crowcon
Lichtmikroskop Axioskop 2 MOT mit Auswertesoftware Axiovision	Zeiss
Mikromischer Thermomixer comfort	Eppendorf
Mikrotiterplattenphotometer EL _x 800	BIOTEK Industries
Ozonisator Laborozonisorator 300.2	Erwin Sander GmbH
Ozonmonitor Environment s.a. O ₃ 41 M	Ansyco
Perfusor V mit Spritzen	Braun
pH-Meter 761 Calimatic	Knick
Photometer Ultrospec 3000	Pharmacia
Strömungsmesser	Fischer u. Porter
Taumler	Heidolph
Transilluminator E.A.S.Y. mit E.A.S.Y.-Win Auswertesoftware	Herolab
Ultraschallbad	URG
Umkehrmikroskop DiaVERT	Leitz
Vakuumentrifuge	Bachofer
Wasserbad	Memmert
Zentrifugen	Heraeus/Sigma

6.2 Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

1-Butanol	Aldrich
3-Nitro-L-tyrosin	Sigma
8-Oxo-2'-deoxyguanosin	Sigma
ACD-A	Fresenius
Acetonitril	SDS
Agarose (niedrig schmelzend)	FMC
Agarose (normal schmelzend)	FMC
Agarose SERVA	Serva
Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics
Ammoniaklösung 25 %	Merck
Ammoniumsulfat p. a.	Merck
Antikörperverdünnungsmedium	DAKO
BCA Proteinassay	Pierce
Bromphenolblau	Merck
BSA	Serva
Calciumchlorid p. a.	Merck
Chloroform	Merck
Citronensäure p. a.	Merck
CNBr-Sepharose 4B	Pharmacia
Creatinin PAP Analysenkit	Roche Diagnostics
Deferroxaminmesylat (DFAM)	Sigma
Deoxyadenosin	Merck
Deoxycytosin	Merck
Deoxyguanosin	Merck
Deoxythymidin	Merck
Diaminobenzidin Peroxidase Substrattablettenset	Sigma
Dinatrium-EDTA	GERBU
DMSO	Merck
Dulbecco's MEM Medium	Life Technologies
EDTA/Trypsin-Lösung	Sigma
Essigsäure p. a.	Merck
Ethanol p. a.	Riedel-de-Haën
Ethanolamin	Fluka
Ethidiumbromid	Merck
Eukit	Kindler

Festphasenextraktionskartuschen Bond Elut C18-OH	Varian
Formalin	Sigma
Fötale Kälberserum	Greiner
Glycerin p. a.	Sigma
Guanidinhydrochlorid	Sigma
HEPES	GERBU
HPLC-Säulen	
- Prontosil 120-3-C18 AQ3 (150 x 3,0 mm)	Bischoff Analystechnik
- Hypersil ODS (250 x 3,0 mm)	Latek
HYDRA-Matrix	Immunotec
Imunhistochemisches Detektionssystem LSAB2 (Maus/Kaninchen für Rattengewebe)	DAKO
Iscove's Modified Dulbecco's Medium	Life Technologies
Isopentan	Merck
Kaliumchlorid p. a.	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat p. a.	Merck
Kaliumsulfat	Merck
Leersäulen für Affinitätschromatographie	Pierce
Magnesiumchlorid p. a.	Merck
MDA (T. B. A. R. S.) Analysenkit	Sobioda
Methanol	Merck
Metofane	Janssen
Meyer's Hämatoxylin	Sigma
Natriumacetat p. a.	Merck
Natriumazid	Merck
Natriumborat	Sigma
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid p. a.	Fluka
Natriumdihydrogensulfat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	GERBU
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydrogenphosphat p. a.	Merck
Natriumhydroxid p. a.	Merck
Natriumiodid p. a. 99,999%	Sigma
NF-κB	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
Nitrotyrosine Monoclonal Antibody	Cayman Chemical Company
Nuklease P1	Roche Diagnostics
Objektträger Histobond	Marienfeld
Paraformaldehyd	Merck

Paraplast Einbettungsmittel	Sherwood
Pronase	Roche Diagnostics
Protein A-Sepharose	Pharmacia
Proteinase K	Roche Diagnostics
Rekombinantes Protein A (HiTrap)	Pharmacia
RPMI 1640 Medium	Life Technologies
Saccharose	Merck
Salzsäure p. a.	Merck
Sarkosyl	Sigma
T-Gel	Pierce
Transwellfilter	Costar
Trikalium-EDTA	Sigma
Tris-Base	Sigma
Triton X-100	GERBU
Ultrafiltrationseinheiten	Millipore/Pall
Wasserstoffperoxid p. a.	Merck
Zellkulturartikel	Greiner /Falcon
Zinkchlorid p. a.	Merck

6.3 Plasmid-Relaxations-Assay

6.3.1 Exposition von Plasmiden

Die Exposition von Plasmidlösungen in PBS gegenüber Ozon wird in Inserts für HPLC-Vials durchgeführt. Die Einleitung von Ozon erfolgt mittels eines dünnen Teflonschlauchs bei geringem Gasdurchfluß, der getrennt zu bestimmen ist. Typischerweise werden 2 µg DNA in 200 µl PBS mit einem Gasfluß von 6,8 ml/min für 20 – 60 min exponiert.

6.3.2 Reagenzien und Puffer

<u>PBS</u>	8 g	NaCl
	0,2 g	KCl
	1,44 g	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O
	0,24 g	KH ₂ PO ₄
		HCl pH 7,4
	ad 1000,0 ml	bidest. Wasser

<u>BE₁-Puffer</u>	5,84 g	NaCl (100 mM)
	0,37 g	Na ₂ -EDTA·2H ₂ O (1 mM)
	2,42 g	Tris-Base (20 mM)
		HCl pH 7,5
	0,10 g	BSA
	ad 1000,0 ml	bidest. Wasser
<u>BE₁₅-Puffer</u>	5,84 g	NaCl (100 mM)
	5,58 g	Na ₂ -EDTA·2H ₂ O (15 mM)
	2,42 g	Tris-Base (20 mM)
		HCl pH 7,5
	0,10 g	BSA
	ad 1000,0 ml	bidest. Wasser
<u>TC-Puffer</u>	5,84 g	NaCl (100 mM)
	3,28 g	CaCl ₂ ·6H ₂ O (15 mM)
	2,42	Tris-Base (20 mM)
		HCl pH 8,0
	0,10 g	BSA
	ad 1000,0 ml	bidest. Wasser
<u>Stoppuffer</u>	1,0 g	SDS
	ad 10,0 ml	bidest. Wasser
<u>TAE-Puffer (10x)</u>	6,80 g	Natriumacetat·3H ₂ O (50 mM)
	3,72 g	Na ₂ -EDTA·2H ₂ O (10 mM)
	48,44 g	Tris-Base (400 mM)
		HCl pH 7,8
	ad 1000,0 ml	bidest. Wasser
<u>Agarosegel</u>	0,8 g	Agarose (Serva)
	100 ml	TAE-Puffer
<u>Ladepuffer</u>	0,22 g	Na ₂ -EDTA·2H ₂ O (60 mM)
	20 mg	Bromphenolblau
	7 ml	Glycerin
	ad 10,0 ml	bidest. Wasser
<u>Ethidiumbromidlösung</u>	0,50 g	Ethidiumbromid
	ad 50,0 ml	bidest. Wasser
<u>Färbelösung</u>	75 µl	Ethidiumbromidlösung
	ad 300,0 ml	bidest. Wasser

6.3.3 Durchführung

Nach Ozonexposition wird die Plasmid-DNA durch Zugabe von 2,5 Teilen absolutem Ethanol gefällt und abzentrifugiert. Die gefällte DNA (je 0,2 µg/20 µl) wird jeweils im geeigneten Puffer für die Reparaturenzyme aufgenommen und nach Zugabe der Enzyme für 30 min bei

37 °C inkubiert. Die Bestimmung der Strangbrüche erfolgt nach Aufnahme in BE₁-Puffer ohne Enzymzugabe.

Tab. 6.1
Pufferauswahl und Enzymkonzentrationen für den reparaturenzymmodifizierten Plasmis-Relaxations-Assay

Enzym	Puffer	Konzentration
FPG-Protein	BE ₁	1 µg/ml
Endonuklease III	BE ₁	10 ng/ml
Endonuklease IV	BE ₁	1 µg/ml
T4-Endonuklease V	BE ₁₅	30 ng/ml
Exonuklease III	TC	200 U/ml

Die Inkubation wird durch Zugabe von Stoppuffer beendet. Jeweils 100 ng DNA pro Spur werden nach Zugabe von Ladepuffer im Verhältnis 1:5 in einem 0,8 %igen Agarosegel in TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wird das Gel in Färbelösung gefärbt und die Banden durch UV-Transillumination sichtbar gemacht und mittels eines Videodensitometers quantitativ ausgewertet.

6.4 Zellkultur

Alle Zellkulturen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Zellzählung erfolgte lichtmikroskopisch mittels Trypanblaufärbung und Neubauer-Zählkammer. Zellkulturen werden mit Kulturmedium und 10 % DMSO eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert. Beim Auftauen der Zellen wird das zytotoxische DMSO durch Waschen mit Kulturmedium entfernt.

6.4.1 A-549 Zelllinie

A-549 Zellen entstammen einem explantierten Lungencarcinom, das einem 58-jährigen Mann kaukasischer Abstammung entnommen wurde. Die Zellen werden als Monolayer in

Zellkulturflaschen kultiviert. Als Medium wird Dulbecco's MEM mit 10 % FKS verwendet. Die Passage erfolgt ca. einmal wöchentlich, wobei die Zellen im Verhältnis 1:10 gesplittet werden, mittels EDTA/Trypsin. Zur Exposition werden die Zellen in Petrischalen oder Transwellfilter ausgesät und verwendet, wenn diese ca. 80 % konfluent bewachsen sind.

6.4.2 HL-60 Zelllinie

HL-60 Zellen wurden aus dem peripheren Blut einer an akuter myeloider Leukämie leidenden 35-jährigen Frau etabliert. Die Zellen wachsen in Suspension und werden in Zellkulturflaschen kultiviert. Als Medium wird RPMI 1640 mit 10 % FKS verwendet. Die Zellen werden alle 2 – 3 Tage in Verhältnis 1:2 bis 1:5 gesplittet. Sie werden zum Experiment verwendet, wenn sie eine Zelldichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml erreicht haben.

6.4.3 1F7 Zelllinie

Bei 1F7 Zellen handelt es sich um eine Hybridomazelllinie aus der Maus. Sie wurde durch Fusion von Milzzellen aus Mäusen, die mit 8-oxodG und KLH als Trägerprotein immunisiert worden waren, mit einer Myelomzelllinie (P3X63-AG.8.653) gewonnen. Die Zellen wachsen in Suspension und werden in Zellkulturflaschen kultiviert. Als Medium wird Iscove's Modified Dulbecco's Medium mit 10 % FKS verwendet. Zur Antikörperproduktion werden die Zellen im Verhältnis 1:20 gesplittet, wenn das Medium stark verbraucht ist (Gelbfärbung).

6.5 Einzelzellelektrophorese (Comet-Assay)

6.5.1 Exposition von Zellen

Suspensionszellen wurden gegenüber Ozon auf einem Uhrglas exponiert, wobei das Ozon durch einen umgedrehten Trichter über die Zellsuspension in PBS geleitet wurde. Die Suspension wurde mittels eines Taumlers bewegt und durchmischt. Verdunstetes Wasser wurde während der Exposition alle 5 min ersetzt. Adhärenente Zellen wurden auf Transwellfiltern exponiert, auf deren Unterseite sich PBS befand, um eine Austrocknung zu verhindern. Exposition gegenüber H_2O_2 wurde bei Suspensionszellen in Zellkulturröhrchen und bei adhärenenten Zellen in Petrischalen unter Lichtausschluß in PBS durchgeführt.

Die Exposition gegenüber ionisierender Strahlung erfolgte nach Einbetten der Zellen in Agarose auf den Objektträgern vor der Zellyse. Nach der Bestrahlung wurden die Objektträger sofort auf Eis gelagert, um die Reparaturaktivität zu reduzieren.

6.5.2 Reagenzien und Puffer

<u>PBS</u>	8 g	NaCl
	0,2 g	KCl
	1,44 g	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O
	0,24 g	KH ₂ PO ₄
		HCl pH 7,4
	ad 1000,0 ml	bidest. Wasser
<u>Lysepuffer</u> (Voransatz)	146,4 g	NaCl (2,5 M)
	1,2 g	Tris-Base (10 mM)
	37,2 g	Na ₂ -EDTA·2H ₂ O (100 mM)
	10 g	Sarkosyl
	ca. 80 Stück	NaOH _{fest} pH 10,0
	ad 1000,0 ml	bidest. Wasser
<u>Lysepuffer</u> (fertige Lösung)	89 %	Voransatz Lysepuffer
	10 %	DMSO
	1 %	Triton X-100
<u>Elektrophoresepuffer</u>	24 g	NaOH
	0,744 g	Na ₂ -EDTA·2H ₂ O
	ad 2000,0 ml	bidest. Wasser
<u>Neutralisationspuffer</u>	48,5 g	Tris-Base
		HCl _{konz.} pH 7,5
	ad 1000,0 ml	bidest. Wasser
<u>FPG-Puffer</u>	9,53 g	HEPES (40 mM)
	7,46 g	KCl (100 mM)
	0,19 g	Na ₂ -EDTA·2H ₂ O (0,5 mM)
	0,2 g	BSA
		KOH pH 7,5
	ad 1000,0 ml	bidest. Wasser
<u>Ethidiumbromidlösung</u>	10 mg	Ethidiumbromid
	ad 50,0 ml	bidest. Wasser
<u>Färbelösung</u>	1 ml	Ethidiumbromidlösung
	ad 10,0 ml	bidest. Wasser

6.5.3 Durchführung

Vollständig mattierte Objektträger werden mit einer 1 %igen Lösung normal schmelzender Agarose in PBS überzogen, welche nach dem Erstarren abgestrichen wird. Anschließend wird der Objektträger mit 85 µl einer 0,5 %igen Lösung normal schmelzender Agarose in PBS gleichmäßig überschichtet. 50.000 – 100.000 der zu untersuchenden Zellen werden in 65 µl einer 0,7 %igen Lösung niedrig schmelzender Agarose gleichmäßig resuspendiert und aufgetragen. Zum Schutz der zelltragenden Schicht wird mit 75 µl 0,7 %iger Lösung niedrig schmelzender Agarose gleichmäßig überschichtet. Nach dem Erstarren werden die Objektträger in frisch angesetzten Lysepuffer eingebracht und die Zellen 1 h bei 4 °C lysiert. Die weiteren Arbeiten bis nach der Elektrophorese sind unter Rotlicht durchzuführen. Falls eine Enzyminkubation durchzuführen ist, werden die Objektträger dreimal 5 min mit Inkubationspuffer gewaschen und mit 100 µl einer Verdünnung von 1 µg FPG-Protein pro ml Inkubationspuffer oder mit Inkubationspuffer (Kontrolle) 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach einer anschließenden Inkubation von 20 min in Elektrophoresepuffer werden die Objektträger einer 20 minütigen Elektrophorese bei einer Spannung von 25 V und 300 mA unterzogen. Anschließend wird mit Neutralisationspuffer neutralisiert und die DNA mit einer 0,002 % wässrigen Ethidiumbromidlösung angefärbt. Die quantitative Auswertung erfolgt fluoreszenzmikroskopisch mittels computergestützter Bildauswertung (Komet 3.1).

6.6 Proteinbestimmung mittels BCA-Assay

6.6.1 Reagenzien und Puffer

<u>Verdünnungsmedium</u>	10 ml	Triton X-100
	ad 1000,0 ml	bidest. Wasser
<u>BCA-Lösung</u> (Pierce BCA-Kit)	50 ml	Lösung A (Na ₂ CO ₃ , Bicinonsäure, Natriumtartrat)
	1 ml	Lösung B (4 % CuSO ₄)

6.6.2 Durchführung

Aus dem im Kit enthaltenen BSA-Standard (2 mg/ml) wird durch Verdünnung mit Verdünnungsmedium eine Konzentrationsreihe von 0, 5, 25, 50, 125 und 250 µg/ml hergestellt. Diese Standards sowie die Testlösungen, die mit Verdünnungsmedium auf eine Konzentration im Bereich der Standardgeraden verdünnt wurden, werden jeweils in Aliquots von 10 µl dreifach in 96-Lochplatten pipettiert und mit je 200 µl BCA-Lösung versetzt. Es

wird über Nacht im Dunklen inkubiert und anschließend bei 562 nm UV-photometrisch mittels eines ELISA-Lesegerätes vermessen. Die Auswertung erfolgt über lineare Regression, wobei der Korrelationskoeffizient mindestens 0,999 betragen sollte.

6.7 Isolierung von mAb 15A3 aus Ascites mittels Affinitätschromatographie an Protein A

Der monoklonale Antikörper 15A3 wird aus dem kommerziell erhältlichen Ascites mittels Affinitätschromatographie isoliert. Da es sich um die Antikörperklasse IgG_{2b} handelt, ist hierfür Protein A geeignet.

6.7.1 Reagenzien und Puffer

<u>Startpuffer</u>	2,76 g	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (20 mM)
		NaOH pH 7,0
	ad 1000,0 ml	bidest. Wasser
<u>Elutionspuffer</u>	21,01 g	Citronensäure·1H ₂ O (100 mM)
		NaOH pH 3,0
	ad 1000,0 ml	bidest. Wasser
<u>Neutralisationspuffer</u>	10,60 g	Na ₂ CO ₃ (wasserfrei) (1 M)
	ad 100,0 ml	bidest. Wasser

6.7.2 Durchführung

Die gesamte Aufreinigung wird bei 6 °C durchgeführt. Die Affinitätssäule mit Protein A (1 ml), welche unter 20 % Ethanol in PBS gelagert ist, wird zunächst mit Startpuffer äquilibriert. Anschließend werden 100 µl Ascites, verdünnt mit 2 ml Startpuffer aufgetragen. Es wird mit 6 ml Startpuffer gewaschen und anschließend mit Elutionspuffer eluiert. Es werden Fraktionen von 1 ml gesammelt, wobei jeweils 200 µl Neutralisationspuffer vorgelegt werden und sofort nach Sammeln der Fraktion gemischt wird. Die einzelnen Fraktionen werden zunächst durch UV-spektroskopische Absorptionsmessung bei 280 nm auf Proteingehalt überprüft. In den relevanten Fraktionen wird eine Proteinbestimmung mittels BCA-Assays durchgeführt. Puffersalze können durch Dialyse gegen bidest. Wasser entfernt werden, oder es wird bei der Vorbereitung der Immobilisierung durch Ultrafiltration direkt auf Kopplungspuffer umgepuffert.

6.8 Isolierung von mAb 1F7 aus Zellkulturüberstand mittels thiophiler Adsorption

Unter thiophiler Adsorption versteht man einen hoch selektiven Typ von lyotroper salzunterstützter Protein-Ligand-Interaktion. Diese Art der Interaktion wird als thiophil bezeichnet, da sie sich dadurch auszeichnet, daß die Proteine eine Sulfongruppe erkennen, die sich in enger Nachbarschaft zu einer Thioethergruppe befindet.

6.8.1 Reagenzien und Puffer

<u>Startpuffer</u>	87,13 g	K ₂ SO ₄ (500 mM)
	6,90 g	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (50 mM)
		NaOH pH 8,0
	ad 1000,0 ml	bidest. Wasser
<u>Elutionspuffer</u>	6,90 g	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (50 mM)
		NaOH pH 8,0
	ad 1000,0 ml	bidest. Wasser
<u>Regenerationspuffer</u>	230 g	Guanidin-HCl (8 M)
	124 ml	bidest. Wasser
<u>Lagerpuffer</u>	15,14 g	Tris-Base (500 mM)
		HCl pH 7,4
	0,13 g	NaN ₃
	ad 250,0 ml	bidest. Wasser

6.8.2 Durchführung

Die gesamte affinitätschromatographische Aufreinigung wird bei Raumtemperatur durchgeführt. Zunächst wird das T-Gel (10 ml) mit Startpuffer äquilibriert. Anschließend werden 100 ml Zellkulturüberstand, welchem 8,71 g K₂SO₄ zugegeben wurden, aufgetragen. Alternativ können, um das aufzutragende Volumen zu reduzieren, zunächst durch eine Ammoniumsulfatfällung (292 g/l) die Antikörper aus dem Zellkulturüberstand gefällt und so vorkonzentriert werden. Das Präzipitat ist dann in einer ausreichenden Menge Startpuffer aufzunehmen, so daß es sich vollständig löst. Es wird mit 100 ml Startpuffer gewaschen und anschließend mit Elutionspuffer eluiert, wobei 5 ml Fraktionen gesammelt werden. Die einzelnen Fraktionen werden zunächst durch UV-spektroskopische Absorptionsmessung bei 280 nm auf Proteingehalt überprüft. In den relevanten Fraktionen wird eine Proteinbestimmung mittels BCA-Assays durchgeführt. Puffersalze können durch Dialyse gegen bidest.

Wasser entfernt werden, oder es wird bei der Vorbereitung der Immobilisierung durch Ultrafiltration direkt auf Kopplungspuffer umgepuffert.

6.9 Isolierung von mAb 1F7 aus Zellkulturüberstand mittels Affinitätschromatographie an rekombinantem Protein A (rProtA)

Der monoklonale Antikörper 1F7 gehört zur Familie der IgG₁. Die Aufreinigung ist daher prinzipiell an Protein G möglich. Die Familie der Maus-IgG₁ ist jedoch recht heterogen und zeigt unterschiedliche Bindungsaffinität zu Protein G. Ferner erfolgt die Elution mit einem glycinhaltigen Puffer. Da das Glycin Kopplungsgruppen bei der Immobilisierung belegt, muß es vollständig entfernt werden, was sich experimentell schwierig gestaltet.

Aus diesem Grund wurde die Aufreinigung an rekombinantem Protein A (Pharmacia) gewählt. Durch Verwendung eines speziellen Hochsalzprotokolls erreicht man eine hohe Affinität von IgG₁ zu diesem Protein.

6.9.1 Reagenzien und Puffer

<u>Startpuffer</u>	7,12 g	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	(50 mM)
	1,38 g	NaH ₂ PO ₄ ·1H ₂ O	
		pH 7,5	
	ad 1000,0 ml	bidest. Wasser	
<u>Elutionspuffer</u>	21,01 g	Citronensäure·1H ₂ O (100 mM)	
		NaOH pH 3,0	
	ad 1000,0 ml	bidest. Wasser	
<u>Neutralisationspuffer</u>	10,60 g	Na ₂ CO ₃ (wasserfrei) (1 M)	
	ad 100,0 ml	bidest. Wasser	

6.9.2 Durchführung

Die Affinitätssäule (1 ml, HiTrap), welche unter 20 % Ethanol in PBS gelagert wird, wird zunächst mit Startpuffer äquilibriert. Anschließend werden 140 ml Zellkulturüberstand mit 20,45 g NaCl versetzt und nach Filtration (0,2 µm) mittels einer Perfusorspritze (Flußrate 2 ml/min) auf die Affinitätssäule mit rProtA aufgetragen. Es wird mit 10 ml Startpuffer gewaschen und anschließend mit Elutionspuffer eluiert. Es werden Fraktionen von 6 ml gesammelt, wobei jeweils 1,5 ml Neutralisationspuffer vorgelegt wird und sofort nach Sammeln der Fraktion gemischt wird. Die einzelnen Fraktionen werden zunächst durch UV-spektroskopische Absorptionsmessung bei 280 nm auf Proteingehalt überprüft. In den

relevanten Fraktionen wird eine Proteinbestimmung mittels BCA-Assays durchgeführt. Soll der Antikörper gelagert werden, werden Puffersalze durch Dialyse gegen bidest. Wasser entfernt und die Lösung anschließend lyophilisiert und der Rückstand bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Alternativ kann bei alsbaldiger Verwendung bei der Vorbereitung der Immobilisierung durch Ultrafiltration direkt auf Kopplungspuffer umgepuffert werden.

6.10 Immobilisierung monoklonaler Antikörper an „HYDRA“

6.10.1 Reagenzien und Puffer

<u>Kopplungspuffer</u>	84,25 g	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (150 mM) NaOH pH 9,3 bidest. Wasser
	ad 1000,0 ml	
<u>Blockpuffer</u>	1,22 g	Ethanolamin (200 mM) HCl pH 9,3 bidest. Wasser
	ad 100,0 ml	
<u>PBS</u>	8 g	NaCl
	0,2 g	KCl
	1,44 g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
	0,24 g	KH_2PO_4 HCl pH 7,4
	ad 1000,0 ml	bidest. Wasser
<u>Lagerpuffer</u>	0,2 g	NaN_3
	ad 1000,0	PBS

6.10.2 Durchführung

600 mg Säulenmaterial „Hydra“ werden unter Vakuum am Rotationsverdampfer vollständig getrocknet. Unter Verwendung einer Ultrafiltrationseinheit (Ausschlußgröße 30 kDa), deren Oberfläche durch Spülen mit BSA-Lösung inaktiviert wurde, werden ca. 500 μg monoklonaler Antikörper auf Kopplungspuffer umgepuffert und in 2 – 3 ml Kopplungspuffer zum Säulenmaterial gegeben. Es wird ca. 20 h inkubiert, wobei die Mischung mittels eines Rotationsverdampfers leicht bewegt wird. Anschließend werden 2 ml Blockpuffer zugegeben und es wird nochmals für 9 h inkubiert. Anschließend wird das Gel in eine Chromatographiesäule gefüllt und ausgiebig mit PBS gespült. Die Säule wird unter Lagerpuffer gelagert.

6.11 Immobilisierung monoklonaler Antikörper an CNBr-Sepharose

6.11.1 Reagenzien und Puffer

<u>Kopplungspuffer</u>	29,22 g	NaCl (500 mM)
	8,40 g	NaHCO ₃ (100 mM)
		NaOH pH 8,4
	ad 1000,0 ml	bidest. Wasser
<u>Blockpuffer</u>	6,11 g	Ethanolamin (1 M)
	ad 100,0 ml	Kopplungspuffer
<u>Waschpuffer</u>	13,61 g	Natriumacetat·3H ₂ O (100 mM)
	ad 1000,0 ml	bidest. Wasser
<u>PBS</u>	8 g	NaCl
	0,2 g	KCl
	1,44 g	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O
	0,24 g	KH ₂ PO ₄
		HCl pH 7,4
	ad 1000,0 ml	bidest. Wasser
<u>Lagerpuffer</u>	0,2 g	NaN ₃
	ad 1000,0	PBS

6.11.2 Durchführung

2,5 g gefriergetrockneter CNBr-aktivierter Sepharose 4B werden in 1 mM Salzsäure quellen gelassen und binnen 30 min mit 500 ml 1 mM Salzsäure auf einem Glasfilter gewaschen. Unter Verwendung einer Ultrafiltrationseinheit (Ausschlußgröße 30 kDa), deren Oberfläche durch Spülen mit BSA-Lösung inaktiviert wurde, werden ca. 40 mg monoklonaler Antikörper auf Kopplungspuffer umgepuffert und in 12 ml Kopplungspuffer zum Säulenmaterial gegeben. Es wird über Nacht inkubiert und anschließend der Überstand verworfen. Durch zweistündige Inkubation mit 10 ml Blockpuffer bei Raumtemperatur werden nicht abreagierte Kopplungsgruppen inaktiviert. Das Gel wird fünfmal abwechselnd mit Kopplungspuffer und Waschpuffer gewaschen und auf 20 chromatographische Polystyrolsäulen verteilt. Die Säulen werden unter Lagerpuffer gelagert.

6.12 Analyse von 8-oxodG in Urin

6.12.1 Reagenzien und Puffer

<u>Verdünnungsmedium</u>	58,45 ad 1000,0	NaCl (1 M) bidest. Wasser
<u>Phosphatpuffer</u>	7,12 g 1,38 g ad 1000,0 ml	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O NaH ₂ PO ₄ ·1H ₂ O (50 mM) pH 7,5 bidest. Wasser
<u>Natriumacetatpuffer</u>	5,77 ml ad 2000,0 ml	Essigsäure (50 mM) NaOH pH 5,0 bidest. Wasser
<u>Eluent A</u>	3 ml 3 ml ad 1000,0 ml	Methanol Acetonitril Natriumacetatpuffer
<u>Eluent B</u>	30 ml 30 ml ad 1000,0 ml	Methanol Acetonitril Natriumacetatpuffer

6.12.2 Durchführung

Die Urinproben werden 10 min bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und erwärmt. Anschließend wird ein evtl. vorhandenes Präzipitat durch vortexen gelöst oder resuspendiert. 0,5 ml Urin werden mit 1 ml Verdünnungsmedium verdünnt und auf konditionierte Festphasenextraktionskartuschen (Bond Elut C18-OH, Varian) mittels Stickstoffdrucks aufgetragen. Es wird mit 5 ml Phosphatpuffer gewaschen und mit 3 ml 15 %igem Methanol eluiert. Das Eluat wird bei 6 °C auf die mit Phosphatpuffer äquilibrierten Immunoaffinitätssäulen aufgetragen. Nach Durchlaufen mittels Schwerkraft wird mit je 5 ml Phosphatpuffer und Wasser gewaschen und mit 5 ml Methanol eluiert. Die Säulen werden mit weiteren 10 ml Methanol regeneriert. Das Eluat wird über Nacht in einer Vakuumzentrifuge lyophilisiert und in 100 µl Phosphatpuffer aufgenommen. Die weitere Analyse erfolgt mittels HPLC-ECD mit Gradientenelution.

Gradientenprogramm:

<u>Zeit [min]</u>	<u>Anteil Eluent A [%]</u>	<u>Anteil Eluent B [%]</u>
0	100	0
15	50	50
30	50	50
35	100	100
40	100	100

Die analytische Trennung wird auf einer 150 x 3,0 mm Prontosil 120-3-C18-AQ 3 µm Säule (Bischoff Analystechnik) mit einer Flußrate von 0,5 ml/min durchgeführt. Die Potentiale für die analytische Zelle liegen bei 150 und 350 mV und für die Konditionierungszelle bei 450 mV. Der Probengeber wird auf 6 °C thermostatisiert.

6.13 Bestimmung von Kreatinin in Urin

6.13.1 Reagenzien und Puffer

Analysenkit Creatinin PAP (Boehringer Mannheim/Roche)

<u>Reaktionsgemisch I</u>	1x	Inhalt Flasche 1 (Enzymlyophilisat/4-Aminophenazon)
	1x	Inhalt Flasche 2 (Puffer/2,4,6-Tribrom-3-hydroxybenzoesäure)
<u>Reaktionsgemisch II</u>	1 Tablette 50 ml	Creatininase (Flasche 3) Reaktionsgemisch I
<u>Creatininstandard</u>		177 µM Creatinin (Flasche 4)

6.13.2 Durchführung

50 µl Urin werden mit 1 ml Wasser in einer 24-Lochplatte verdünnt und gemischt. 50 µl dieser Verdünnung sowie für jeden Ansatz einmal 50 µl Wasser als Blindwert werden jeweils mit Reaktionsgemisch I oder II in einer 24-Lochplatte versetzt und 20 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Quantifizierung durch UV-Absorption erfolgt

mittels eines Mikrotiterplattenphotometers bei einer Wellenlänge von 515 nm. Die Auswertung erfolgt mittels der Formel:

$$\Delta E_{\text{Probe/Standard}} = (E_{\text{Probe}} - E_{\text{RLII}}) - (E_{\text{PL}} - E_{\text{RLI}})$$

$$c[\mu\text{M}] = 177 \times \frac{\Delta E_{\text{Probe}}}{\Delta E_{\text{Standard}}}$$

$E_{\text{Probe/Standard}}$: Extinktion von Probe/Standard mit Reaktionsgemisch II
 $E_{\text{RL II}}$: Extinktion Blindwert mit Reaktionsgemisch II
 E_{PL} : Extinktion von Probe/Standard mit Reaktionsgemisch I
 $E_{\text{RL I}}$: Extinktion Blindwert mit Reaktionsgemisch I

6.14 Analyse von 8-oxodG in DNA aus Vollblut

6.14.1 Reagenzien und Puffer

<u>Lysepuffer</u> (Lagerung bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$)	219,07 g 2,03 g 0,12 g 0,066 1 g ad 1000,0 ml	Saccharose (320 mM) $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (5 mM) Tris-Base (10 mM) DFAM (0,1 mM) HCl pH 7,5 Triton X-100 bidest. Wasser
<u>Reaktionspuffer</u>	0,19 g 0,12 g ad 1000,0 ml	$\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5 mM) Tris-Base (10 mM) HCl pH 8,0 bidest. Wasser
<u>SDS-Lösung</u>	1 g ad 10,0 ml	Natriumlaurylsulfat Reaktionspuffer
<u>NaI-Puffer</u>	1,49 g 0,97 g ad 100,0 ml	$\text{Na}_2\text{-EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (40 mM) Tris-Base (80 mM) HCl pH 8,0 bidest. Wasser
<u>NaI-Lösung</u>	5,7 g 5 ml ad 10,0 ml	NaI (7,6 M) NaI-Puffer bidest. Wasser

<u>DNA-Puffer</u> (Lagerung bei -18 °C)	10,9 g 0,066 g 0,014 g ad 1000,0 ml	Natriumacetat·3H ₂ O (20 mM) DFAM (0,1 mM) ZnCl ₂ (0,2 mM) HCl pH 5,0 bidest. Wasser
<u>DFAM-Lösung</u> (Lagerung bei -18 °C)	0,131 g ad 2,0 ml	DFAM (0,1 M) bidest. Wasser
<u>Natriumacetatpuffer</u>	5,77 ml ad 2000,0 ml	Essigsäure (50 mM) NaOH pH 5,0 bidest. Wasser
<u>Eluent</u>	80 ml ad 1000,0 ml	Methanol Natriumacetatpuffer

6.14.2 Durchführung

Ca. 1 ml Vollblut, welches durch Zusatz von K₃-EDTA und/oder ACD-A antikoaguliert wurde, wird 10 min bei 2000 g zentrifugiert. 200 µl Plasma werden abgenommen und bei -80 °C eingefroren. Die weitere Aufarbeitung bis zur DNA-Hydrolyse erfolgt bei 6 °C, um die Aktivität von DNA-Nukleasen weitgehend zu minimieren. Ferner wird weitgehend unter Argon gearbeitet, um eine artifizielle Oxidation durch Luftsauerstoff zu verhindern. Der Rückstand wird mit 1 ml Lysepuffer versetzt, geschüttelt und 30 s bei 10.000 g zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und verworfen, das Pellet in 2 ml Lysepuffer weitgehend resuspendiert. Es wird nochmals zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Schritt wird noch einmal wiederholt. Anschließend wird das Pellet in 360 µl Reaktionspuffer resuspendiert und 40 µl SDS-Lösung und 20 µl Proteinase K (17 mg/ml) zugegeben. Unter gelegentlichem Schütteln wird 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden 600 µl NaI-Lösung zugegeben und durch Invertieren gemischt. Nach Zugabe von 1 ml Isopropanol wird die DNA durch Invertieren gefällt. Es wird 10 min bei 10.000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die DNA wird mit 40 %igem Isopropanol und 70 %igem Ethanol gewaschen, wobei jeweils 5 min bei 10.000 g zentrifugiert wird. Anschließend wird überschüssiges Ethanol mit einem Wattestäbchen entfernt, die DNA unter Argon leicht getrocknet und in 100 µl DNA-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 13 µl Nuklease P1 (300 U/ml) und 4 µl Alkalischer Phosphatase (1000 U/ml) wird 1 h bei 37 °C inkubiert. Das Hydrolysat wird durch eine Ultrafiltrationseinheit mit einer Ausschlußgröße von 10 kDa filtriert und 100 µl mittels HPLC-ECD analysiert.

Ca. 200 – 300 mg Lungengewebe werden in einem Glas/Teflonhomogenisator in 1 ml Lysepuffer 1 min homogenisiert. Nicht zerkleinerte Anteile werden mittels einer Kunststoffpinzette entfernt. Es wird zentrifugiert und zweimal mit Lysepuffer gewaschen. Zur Hydrolyse von Proteinen wird die zugesetzte Menge an Proteinase K auf 40 µl verdoppelt. Die weitere Aufarbeitung und Analyse erfolgt wie oben für Blut angegeben.

Die Detektion nicht modifizierter Nukleoside erfolgt getrennt durch LC-MS mittels Standardadditionsverfahren. Die analytische Trennung wird auf einer 150 x 3,0 mm ProntoSil 120-3-C18-AQ 3 µm Säule (Bischoff Analystechnik) mit Vorsäule bei einer Flußrate von 0,5 ml/min durchgeführt. Die Ionisation erfolgt mittels API-ES bei einer Gastemperatur von 350 °C, einem Vernebelungsdruck von 30 psig (2,1 bar) und einem Gasfluß von 10 l/min mit einer Spannung von 3100 V. Es werden im SIM-Modus die Fragmente 228, 252, 265 und 268 erfaßt und über den Gesamtionenstrom ausgewertet.

6.16 Ringversuch Analyse von 8-oxodG Standards (ESCODD)

Durch die koordinierende Stelle wurden Lösungen unbekannter Konzentration von 8-oxodG und dG in ultrareinem Wasser verschickt. Die Konzentrationen wurden gegen die in den jeweiligen Labors verwendeten Standards mit den jeweils etablierten Methoden an drei unterschiedlichen Tagen analysiert und die Ergebnisse gesammelt und statistisch aufbereitet.

6.17 Ringversuch Analyse 8-oxodG in Urin

An die teilnehmenden Labors wurden aliquotierte humane und Rattenurinproben, 8-oxodG Standards (ca. 100 µM), Aliquots des verwendeten humanen Kontrollurins sowie eine Verdünnungsreihe einer mit 8-oxodG gespickten humanen Urinprobe auf Trockeneis verschickt. Die Proben wurden von den verschiedenen Labors mittels der jeweils etablierten Methoden analysiert und die zurückgesendeten Ergebnisse gesammelt und statistisch aufbereitet.

6.18 Analyse von Malondialdehyd in Plasma

6.18.1 Reagenzien und Puffer

<u>Reagenzlösung</u>	1,2 ml	Reagenz 1 (Thiobarbitursäure)
MDA (T.B.A.R.S) Kit	0,6 ml	Reagenz 2 (Perchlorsäure)

<u>Natriumphosphatpuffer</u>	1,725 g	NaH ₂ PO ₄ ·1H ₂ O (12,5 mM)
		NaOH pH 7,4
	ad 1000,0 ml	bidest. Wasser
<u>Eluent</u>	370 ml	Methanol
	ad 1000,0 ml	Natriumphosphatpuffer

6.18.2 Durchführung

Zur Standardisierung werden Lösungen von 0 bis 10 µM 1,1,2,2,-Tetraethoxypropan in Wasser verwendet, welches durch saure Hydrolyse MDA freisetzt. 5 µl Plasma oder Standard werden mit 75 µl Reagenzlösung in dicht schließenden 0,5 ml Reagiergefäßen mit Schraubverschluß unter Schütteln 1 h bei 95 °C inkubiert. Anschließend wird auf Eis abgekühlt, zentrifugiert und die Mischung mit 200 µl 1-Butanol extrahiert. Nach Phasentrennung durch Zentrifugation werden 5 µl zur Analyse mittels HPLC mit Fluoreszenzdetektion verwendet. Die Trennung wird auf einer 250 x 3,0 mm Hypersil ODS Säule bei einem Fluß von 1 ml/min durchgeführt. Die Excitation erfolgt bei 532 nm, die Emission wird bei 553 nm gemessen.

6.19 Immunhistochemischer Nachweis von Nitrotyrosin

6.19.1 Reagenzien und Puffer

<u>PBS</u>	8 g	NaCl
	0,2 g	KCl
	1,44 g	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O
	0,24 g	KH ₂ PO ₄
		HCl pH 7,4
	ad 1000,0 ml	bidest. Wasser
<u>Primärantikörper</u>	5 µl	Antikörperlösung
	1,25 ml	DAKO Verdünnungsmedium
<u>Sättigungsmedium</u>	22 mg	3-Nitro-L-tyrosin (10 mM)
	10 ml	Antikörperverdünnungsmedium

6.19.2 Durchführung

Zur Durchführung der immunhistochemischen Untersuchungen werden die mit 4 % Paraformaldehyd fixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebeproben verwendet. Mittels eines

Schlitten- oder Rotationsmikrotoms werden 6 µm dicke Schnitte angefertigt und auf beschichtete Objektträger für die Histologie aufgebracht und fixiert. Das Paraffin wird durch dreimalige 10-minütige Behandlung mit Xylol entfernt. Anschließend werden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe rehydratisiert (100, 96, 80, 60 % Ethanol, 2x Wasser, PBS). Nachdem die Objektträger 10 min in frischem PBS äquilibriert wurden, werden die Positivkontrollen 10 min bei Raumtemperatur mit 10 mM Peroxynitritlösung in Wasser inkubiert. Anschließend wird das Peroxynitrit 5 min in PBS inaktiviert. Zur Inaktivierung der endogenen Peroxidaseaktivität werden alle Objektträger für 30 min in 0,3 %ige Wasserstoffperoxidlösung in Methanol bei Raumtemperatur eingebracht und anschließend 5 min in PBS äquilibriert. Zur Reduktion der Hintergrundreaktivität wird 30 min mit 2 %igem Ziegen Serum in PBS inkubiert und anschließend in PBS gespült. Zur Kontrolle der Spezifität der Antikörperinkubation wird jeder untersuchte Schnitt zusätzlich parallel mit nitrotyrosingesättigtem Antikörper inkubiert. Hierzu wird dem Medium für die Antikörperverdünnung 1 mM Nitrotyrosin zugesetzt und der Antikörper 30 min präinkubiert. Die Schnitte werden über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper/gesättigten Primärantikörper inkubiert. Die Lösung wird mit PBS abgespült und es wird zweimal 5 min in PBS gewaschen. Es wird 10 min mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (gelbe Lösung) inkubiert und anschließend nach dem Abspülen mit PBS 5 min in PBS gewaschen. Es folgt die 10 min Inkubation mit dem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (rote Lösung), das ebenfalls mit PBS abgespült wird. Nach 5 minütigem Waschen der Objektträger in PBS erfolgt die Inkubation der Objektträger mit der DAB-Substratlösung für 3 min. Nach dem Abspülen und Waschen der Objektträger erfolgt die Gegenfärbung mit Mayers Hämatoxylin für 2,5 min. Anschließend wird 10 min unter fließendem Leitungswasser (!) gewässert. Die Schnitte werden durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert (60, 80, 96, 3x 100 %, je 5 min) und ein Deckglas mit Eukit fixiert.

6.20 Ozonexposition

6.20.1 Reagenzien und Puffer

<u>PBS</u>	8 g	NaCl
	0,2 g	KCl
	1,44 g	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O
	0,24 g	KH ₂ PO ₄
		HCl pH 7,4
	ad 1000,0 ml	bidest. Wasser

<u>10 % Formaldehyd</u>	250 ml	Formalin
	750 ml	PBS
<u>4 % Paraformaldehyd</u>	40 g	Paraformaldehyd
	ad 1000,0 ml	PBS, unter Rühren erwärmen
<u>Carnoy-Fixativ</u>	600 ml	Ethanol
	300 ml	Chloroform
	100 ml	Essigsäure

6.20.2 Durchführung

Vier Gruppen (A bis D) von je 8 männlichen Fischer F344-Ratten von durchschnittlich 250 g Körpergewicht wurden nach der Methode der "nose-only"-Applikation 1,5 Stunden pro Tag, 5 Tage pro Woche unterschiedlich abgestuften Ozon-Konzentrationen für insgesamt 12 Wochen ausgesetzt. Auch die Kontrollgruppe, die einer Hintergrund-Konzentration von Ozon im Bereich von 30-50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ in der Atemluft ausgesetzt war, wurde ebenfalls für 1,5 Stunden pro Tag unter versuchsidentischen Bedingungen wie die mit erhöhten Ozonkonzentrationen behandelten Tiere in den Applikationsröhren der nose-only Apparatur gehalten.

Die Behandlung der Tiere (täglich wechselnd mit einer anderen Gruppe beginnend) erfolgte unter ständiger visueller Aufsicht durch technisches Personal in einer vollständig aus Duran-Glas bestehenden Versuchsanordnung. Diese bestand aus zwei Exsikkator-ähnlichen Glaszylindern von zusammen 16 l Volumen mit je 6 sternförmigen Glasschliffen, in denen sich je 4 Expositionsröhren mit den Tieren befanden. Die restlichen Öffnungen dienten als Ozonzufuhr, Abluftauslaß und zur Probenahme in der Expositionsatmosphäre zur kontinuierlichen analytischen Überwachung der Konzentrationen an verschiedenen Stellen der Apparatur und der gemittelten Atemaktivität der Tiere mittels Kohlendioxid-Messung der Gesamtabluft.

Im Expositionsraum fanden 80 Luftwechsel pro Stunde statt. Ozon wurde mittels eines Generators „Laborozonisorator 300.2“ für Niederkonzentrationen (Erwin Sander GmbH, Uetze-Eltze) mit getrockneter Laborluft hergestellt unter kontrollierter Luftzufuhr mittels Strömungsmesser (Fischer & Porter, Göttingen). Über einen aus Glas gefertigten dynamischen Gasverdünner wurde dem ozonhaltigen Luftstrom geregelte Umluft zur Verdünnung so beigemischt, daß die gewünschte Ozonkonzentration über die Versuchszeit konstant gehalten werden konnte. Die Ozonkonzentration wurde mit einem Analysengerät „Environment s.a O₃ 41 M“ (Ansyco, Karlsruhe) kontinuierlich während der Versuchszeiten gemessen und

dokumentiert. Die CO₂-Messung in der Abluft zur Schätzung der Atemvolumina erfolgte fortlaufend während der Applikationen mit einem kalibrierten Messgerät „Deltagas DG01026“ (Crowcon, Abingdon)

Für die Gewinnung des 24 h-Urins wurden die Tiere unmittelbar nach den Expositionen in entsprechende Stoffwechsellkäfige gesetzt. Die Uringewinnung erfolgte für jedes Tier wöchentlich in wechselnder Reihenfolge. Die Urinmengen wurden dokumentiert und das Probenmaterial bei -78 °C gelagert.

Die Blutentnahme erfolgte in 2-wöchentlichem Abstand am Ende des wöchentlichen Inhalationszyklus unmittelbar nach den einzelnen Applikationen der verschiedenen Dosierungen. Den Tieren wurde aus der Schwanzvene ca. 1 ml Blut unter Inhalationsnarkose mit Methoxyfluoran (Metofane®) entnommen. In der Entnahmespritze wurden als Antikoagulans ca. 50 µl ACD-A (Braun, Melsungen) vorgelegt.

Die Terminal gewonnen Gewebeproben für die histopathologische Begutachtung wurden ca. zwei Wochen bei Raumtemperatur in 10 % Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Für immunhistochemische Untersuchungen wurden Proben in 4 % Paraformaldehyd und in Carnoy-Fixativ ca. 24 Stunden bei 4 °C fixiert und in Paraffin eingebettet. Ferner wurden für Cryostatschnitte Proben bei -140 °C in Isopentan schockgefroren und bei -78 °C gelagert.

7 Literaturverzeichnis

Abbey DE, Lebowitz MD, Mills PK, Petersen FF, Beeson WL, Burchette RJ (1995): Long-term ambient concentrations of particulates and oxidants and development of chronic disease in a cohort of nonsmoking California residents; *Inhal Toxicol* **7** 19-34

Aburatani H, Hippo Y, Takashima T, Matsuba C, Kodama T, Takao M, Yasui A, Yamamoto K, Asano M, Fukasawa K, Yoshinari H, Inoue H, Ohtsuka E, Nishimura S (1997): Cloning and characterisation of mammalian 8-hydroxyguanine-specific DNA glycosylase/apurinic, apyrimidinic lyase, a functional mutM homologue; *Cancer Res* **57** 2151-5156

Adachi S, Kawamura K, Takemoto K (1993): Oxidative damage of nuclear DNA in liver of rats exposed to psychological stress; *Cancer Res* **53** 4153-4155

Adachi S, Zeisig M, Möller L (1995): Improvements in the analytical method for 8-hydroxydeoxyguanosine in nuclear DNA; *Carcinogenesis* **16** 253-258

Adams WC, Schlegle ES, Shaffrath JD (1989): Oral and oronasal breathing during continuous exercise produce similar responses to ozone inhalation; *Arch Environ Health* **44** 311-316

Ahnstrom G, Edvardsson KA (1974): Radiation-induced single-strand breaks in DNA determined by rate of alkaline strand separation and hydroxylapatite chromatography: an alternative to velocity sedimentation; *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* **26** 493-497

Ahnström G, Erixon K (1973): Radiation induced strand breakage in DNA from mammalian cells. Strand separation in alkaline solution; *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* **23** 285-289

Ajamieh H, Merino N, Candelario-Jalil E, Menendez S, Marinez-Sanchez G, Re I, Giuliani A, Leon OS (2002) Similar protective effect of ischaemic and ozone oxidative preconditionings in liver ischaemia/reperfusion injury; *Pharmacol Res* **45** 333-339

Al-Dalain SM, Martinez G, Candelario-Jalil E, Menendez S, Re I, Giuliani A, Leon OS (2001): Ozone treatment reduces markers of oxidative and endothelial damage in an experimental diabetes model in rats; *Pharmacol Res* **44** 391-396

Ames BN (1989): Endogenous DNA damage as related to cancer and aging; *Mutat Res* **214** 41-46

Arai K, Morishita K, Shinmura K, Kohno T, Kim SR, Nohmi T, Taniwaki M, Ohwada S, Yokota (1997): Cloning of human homolog of the yeast OGG1 gene that is involved in the repair of oxidative DNA damage; *Oncogene* **14** 2857-2861

Arif JM, Vadhanam MV, De Groot AJ, van Zeeland AA, Gairola CG, Gupta RC (2001): Effect of cigarette smoke exposure on the modulation of 8-oxo-2'-deoxyguanosine in rat lungs as analyzed by ³²P-postlabelling and HPLC-ECD; *Int J Oncol* **19** 763-766

Asahara H, Wistort PM, Bank JF, Bakerian RH, Cunningham RP (1989): Purification and characterization of Escherichia coli endonuclease III from the cloned nth gene; *Biochemistry* **28** 4444-4449

Asami S, Hirano R, Yamaguchi R, Tsurudome Y, Itoh H, Kasai H (1998): Effects of forced and spontaneous exercise on 8-hydroxyguanosine levels in rat organs; *Biochem Biophys Res Comm* **243** 678-682

Asami S, Manabe H, Miyake J, Tsurudome Y, Hirano T, Yamaguchi R, Itoh H, Kasai H (1997): Cigarette smoking induces an increase in oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in a central site of the human lung; *Carcinogenesis* **18** 1763 - 1766

Bankson DD (1997): Micronutrient antioxidants and oxidative stress; *Diag Endo Metab* **15** 273-287

Beckman KB, Ames BN (1997): Oxidative decay of DNA; *J Biol Chem* **272** 19633-19636

Beckman KB, Ames BN (1999): Oxidative DNA damage and aging: the assay of 8-oxoguanine in DNA by FPG-HPLC. 4th Winter Research Conference of CERLIB (Abstract)

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA (1990): Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide; *Proc Natl Acad Sci USA* **87** 1620-1624

Beckman JS, Ye YZ, Anderson PG, Chen J, Accavitti MA, Tarpey MM, White CR (1994): Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry; *Biol Chem Hoppe-Seyler* **375** 81-88

Belianin II, Abdullaev RI (2000): Use of soluble ozone in combined treatment of pulmonary tuberculosis: lipid peroxidation and blood antioxidative defense systems; *Probl Tuberk* **3** 41-44 (russisch mit englischem Abstract)

Bhalla DK (1999): Ozone-induced lung inflammation and mucosal barrier disruption: toxicology, mechanisms and implications; *J Toxicol Environ Health B* **2** 31-86

Bialkowski K, Kasprzak KS (1998): A novel assay of 8-oxo-2'-deoxyguanosine-5'-triphosphate-pyrophosphohydrolase (8-oxo-dGTPase) activity in cultured cells and its use for evaluation of cadmium(II) inhibition of this activity; *Nucleic Acids Res* **26** 3194-3201

Bianchinin F, Jaeckel A, Vineis P, Martinez-Garcia C, Elmstahl S, van Kappel AL, Boeing H, Ohshima H, Riboli E, Kaaks R (2001): Inverse correlation between alcohol consumption and lymphocyte levels of 8-hydroxyguanosine in humans; *Carcinogenesis* **22** 885-890

Blomberg A (2000): Airway inflammatory and antioxidant responses to oxidative and particulate air pollutants – experimental exposure studies in humans; *Clin Exp Allergy* **30** 310-317

Bogdanov MB, Beal MF, McCabe DR, Griffin RM, Matson WR (1999): A carbon column-based liquid chromatography electrochemical approach to routine 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine measurements in urine and other biologic matrices: a one-year evaluation of methods; *Free Radic Biol Med* **27** 647-666

Boiteux S, Gajewski E, Laval J, Dizdaroglu M (1992): Substrate specificity of the Escherichia coli Fpg protein (formamidopyrimidine-DNA glycosylase): excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization; *Biochemistry* **31** 106-110

Bornholdt J, Dybdahl M, Vogel U, Hansen M, Loft S, Wallin H (2002): Inhalation of ozone induces DNA strand breaks and inflammation in mice; *Mutat Res* **520** 63-72

Bowie A, O'Neill LA (2000): Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries; *Biochem Pharmacol* **59** 13-23

Bredt DS, Snyder SH (1992): Nitric oxide, a novel neuronal messenger; *Neuron* **8** 3-11

Buettner VL, Hill KA, Halangoda A, Sommer SS (1999): Tandem-base mutations occur in mouse liver and adipose tissue preferentially as G:C to T:A transversions and accumulate with age; *Environ Mol Mutagen* **33** 320-324

Bylin G (1996): Controlled human studies of ozone exposure; *Scand J Work Environ Health* **22** suppl 3 52-71

Cadet J, Bianchini F, Girault I (1998): Measurement of base damage to DNA by the use of HPLC/³²P-postlabeling, immunological and non-invasive assays; 285-300
In: Aruoma OI, Halliwell B (Hrsg.): DNA and Free Radicals: Techniques, Mechanisms and Applications; OICA International, Saint Lucia

Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget JP, Ravanat JL, Sauvaigo S (1999): Hydroxyl radicals and DNA base damage; *Mutat Res* **424** 9-21

Cadet J, Douki T, Ravanat JL (1997): Artifacts associated with the measurement of oxidized DNA bases; *Environ Health Perspect* **105** 1034-1039

Cadet J, D'Ham C, Douki T, Pouget JP, Ravanat JL, Sauvaigo S (1998): Facts and artifacts in the measurement of oxidative base damage to DNA; *Free Radic Res* **29** 541-550

Cajigas A, Gayer M, Beam C, Steinberg J (1994): Ozonation of DNA forms adducts: A ³²P-DNA labeling and thin-layer chromatography technique to measure DNA environmental biomarkers; *Arch Environ Health* **49** 25-36

Calderon-Garciduenas L, Osuaya-Brizuela N, Ramirez-Marinez L, Villarreal-Calderon A (1996): DNA strand breaks in human nasal respiratory epithelium are induced upon exposure to urban pollution; *Environ Health Perspect* **104** 160-168

Calderon-Garciduenas L, Osuaya N, Rodriguez-Alcaraz A, Villarreal-Calderon A (1997): DNA damage in nasal respiratory epithelium from children exposed to urban pollution; *Environ Mol Mutagen* **30** 11-20

Calderon-Garciduenas L, Wen-Wang L, Zhang YJ, Rodriguez-Alcaraz A, Osnaya N, Villarreal-Calderon A, Santella R (1999): 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine, a major mutagenic oxidative DNA lesion, and DNA strand breaks in nasal respiratory epithelium of children exposed to urban pollution; *Environ Health Perspect* **107** 469-474

Candelario-Jalil E, Mohammed-Al-Dalain S, Fernandez OS, Menendez S, Perez-Davison G, Merino N, Sam S, Ajamieh HH (2001): Oxidative preconditioning affords protection against carbon tetrachloride-induced glycogen depletion and oxidative stress in rats; *J Appl Toxicol* **21** 297-301

Chang LY, Huang Y, Stockstill BL, Grahm JA, Grose EC, Menache MG, Miller FJ, Costa DL, Crapo JD (1992): Epithelial injury and interstitial fibrosis in the proximal alveolar regions of rats chronically exposed to a simulated pattern of urban ambient ozone; *Toxicol Appl Pharmacol* **115** 241-252

Chaudhary AK, Nokubo M, Reddy GR, Yeola AN, Morrow JD, Blair IA, Marnett LJ (1994): Detection of endogenous malondialdehyde-deoxyguanosine adducts in human liver; *Science* **265** 1580-1582

Chigusa M, Nakada E (1972): Genetic effects of ozone on fecundity, hatchability, emergence rate and longevity on *Drosophila melanogaster*; *Tokyo Toritsu Eisei Kenkyusho Nempo* **24** 331-335 (japanisch mit englischem Abstract)

Chung FL, Chen HJ, Nath RN (1996): Lipid peroxidation as a potential endogenous source for the formation of exocyclic DNA adducts; *Carcinogenesis* **17** 2105-2111

Claycamp HG (1992): Phenol sensitization of DNA to subsequent oxidative damage in 8-hydroxyguanine assays; *Carcinogenesis* **13** 1289-1292

Collins AR, Cadet J, Epe B, Gedik C (1997a): Problems in the measurement of 8-oxoguanine in human DNA; *Carcinogenesis* **18** 1833-1836

Collins AR, Dobson VL, Dusinska M, Kennedy G, Stetina R (1997b): The comet assay: what can it really tell us?; *Mutat Res* **375** 183-193

Collins AR, Dusinska M, Gedik C, Stetina R (1996): Oxidative damage to DNA: Do we have a reliable biomarker?; *Environ Health Perspect* **104** suppl3 465-469

Collins AR, Duthie SJ, Dobson VL (1993): Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA; *Carcinogenesis* **14** 1733-1735

Collins AR, Duthie SJ, Fillion L, Gedik CM, Vaughan N, Wood SG (1997): Oxidative DNA damage in human cells: the influence of antioxidants and DNA repair; *Biochem Soc Trans* **25** 326-331

Cooke MS, Evans MD, Herbert KE, Lucec J (2000): Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine – source significance and supplements; *Free Radic Res* **32** 381-397

Cooke MS, Evans MD, Lucec J (2002): DNA-Repair: insights from urinary lesion analysis; *Free Radic Res* **36** 929-932

- Cornbleet PJ, Gochman N (1979): Incorrect least-square regression coefficients in method-comparison analysis; *Clin Chem* **25** 432-438
- Cotgreave I (1996): Absorption and metabolic fate of ozone – molecular basis of ozone-induced toxicity; *Scand J Work Environ Health* **22** suppl 3 15-26
- Cucchiario G, Tatum AH, Brown MC, Camporesi E, Daucher JW, Hakim TS (1999): Inducible nitric oxide synthase in the lung an exhaled nitric oxide after hyperoxia; *Am J Physiol* **277** (3Pt1): L636-L644
- Cundy KC, Kohen R, Ames BN (1988): Determination of 8-hydroxydeoxyguanosine in human urine: a possible assay for in vivo oxidative DNA damage; *Basic Life Sci* **49** 479-482
- Cunningham RP (1997): DNA glycosylases; *Mutat Res* **383** 189-196
- Darley-USmar V, Wiseman H, Halliwell B (1995): Nitric oxide and oxygen radical: a question of balance; *FEBS Letters* **369** 131-135
- Degan P, Shigenaga MK, Park EM, Alperin PE, Ames BN (1991): Immunoaffinity isolation of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 8-hydroxyguanine and quantitation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA by polyclonal antibodies; *Carcinogenesis* **12** 865-871
- Deming WE (1964): Statistical adjustment of data; Dover Publications New York
- Dennog C, Harmann A, Frey G, Speit G (1996): Detection of DNA damage after hyperbaric oxygen (HBO) therapy; *Mutagenesis* **11** 605-659
- Devanaboyina U, Gupta RC (1996): Sensitive detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA by ³²P-postlabeling assay and the basal levels in rat tissues; *Carcinogenesis* **17** 917-924
- Dianov G, Bischoff C, Piotrowski J, Bohr VA (1998): Repair pathways for processing of 8-oxoguanine in DNA by mammalian cell extracts; *J Biol Chem* **273** 33811-33816
- Dillon D, Combes R, McConville M, Zeiger E (1992): Ozone is mutagenic in Salmonella; *Environ Mol Mutagen* **19** 331-337
- Dizdaroglu M (1984): The use of capillary gas chromatography-mass spectrometry for identification of radiation-induced DNA base damage and DNA base-amino acid cross-links; *J Chromatogr* **295** 103-121
- Dizdaroglu M (1992): Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin; *Mutat Res* **275** 331-342
- Dizdaroglu M (1985): Formation of an 8-hydroxyguanine moiety in deoxyribonucleic acid on gamma-irradiation in aqueous solution; *Biochemistry* **24** 4476-4481
- Dizdaroglu M (1993): Quantitative determination of oxidative base damage in DNA by stable isotope-dilution mass spectrometry; *FEBS Lett* **315** 1-6

- Dizdaroglu M (1998): Facts about the artifacts in the measurement of oxidative DNA base damage by gas chromatography-mass spectrometry; *Free Radic Res* **29** 551-563
- Dizdaroglu M, Bergtold DS (1986): Characterization of free radical-induced base damage in DNA at biologically relevant levels; *Anal Biochem* **156** 182-188
- Doll R (1996): Nature and nurture: possibilities for cancer control; *Carcinogenesis* **17** 177-184
- Doll R, Peto R (1981): The causes of cancer: Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today; *J Natl Cancer Inst* **66** 1191-1308
- Dorger M, Allmeling AM, Kiefmann R, Munzing S, Messmer K, Krombach F (2002): Early inflammatory response to asbestos exposure in rat and hamster lungs: role of inducible nitric oxide synthase; *Toxicol Appl Pharmacol* **181** 93-105
- Dormans JA, van Bree L, Boere AJ, Marra M, Rombout PJ (1999): Interspecies differences in time course of pulmonary toxicity following repeated exposure to ozone; *Inhal Toxicol* **11** 309-329
- Douki T, Delatour T, Bianchini F, Cadet J (1996): Observation and prevention of an artefactual formation of oxidized DNA bases and nucleosides in the GC-EIMS method; *Carcinogenesis* **17** 347-353
- Douki T, Martini R, Ravanat JL, Turesky RJ, Cadet J (1997): Measurement of 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine and 8-oxo-7,8-dihydroguanine in isolated DNA exposed to gamma radiation in aqueous solution; *Carcinogenesis* **18** 2385-2391
- Draper HH, Hadley M (1990): Malondialdehyde Determination as index of lipid peroxidation; *Methods Enzymol* **186** 421-431
- Draper HH, Squires EJ, Mahmooch H, Wu J, Agarwal S, Hadley MA (1993): A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials; *Free Radic Biol Med* **15** 353 - 363
- Eberle G, Barbin A, Laib RJ, Ciroussel F, Thomale J, Bartsch H, Rajewsky MF (1989): 1,N⁶-etheno-2'-deoxyadenosine and 3,N⁴-etheno-2'-deoxycytidine detected by monoclonal antibodies in lung and liver DNA of rats exposed to vinyl chloride; *Carcinogenesis* **10** 209-212
- Elsayed NM, Mustafa MG, Mead JF (1990): Increased vitamin E content in the lung after ozone exposure: A possible mobilization in response to oxidative stress; *Arch Biochem Biophys* **282** 263-269
- Elstner EF (1990): *Der Sauerstoff*; BI Wissenschaftsverlag, Mannheim
- EPA (1996): *Air Quality Criteria for Ozone and Related Photochemical Oxidants: Vol. I+III*; Environmental Protection Agency, Research Triangle Park

- Epe B (1996): DNA damage profiles induced by oxidizing agents; *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **127** 223-249
- Epe B, Ballmaier D, Roussyn I, Brivba K, Sies H (1996): DNA damage by peroxynitrite characterized with DNA repair enzymes; *Nucleic Acids Res* **24** 4105-4110
- Epe B, Hegler J (1994): Oxidative DNA damage: endonuclease fingerprinting; *Methods Enzymol* **234** 122-131
- Erdman HE, Hernandez T (1982): Adult toxicity and dominant lethals induced by ozone at specific stages in spermatogenesis in *Drosophila virilis*; *Environ Mutagen* **4** 657-666
- Erhola M, Toyokuni S, Okada K, Tanaka T, Hiai H, Ochi H, Uchida K, Osawa T, Nieminen MM, Alho H, Kellokumpu Lehtinen P (1997): Biomarker evidence of DNA oxidation in lung cancer patients: association of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine excretion with radiotherapy, chemotherapy, and response to treatment; *FEBS Lett* **409** 287-291
- ESCODD (2002a): Inter-laboratory validation of procedures measuring 8-oxo-7,8-dihydroguanine/8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanosine in DNA; *Free Radic Res* **36** 239-245
- ESCODD (2002b): Comparative analysis of baseline 8-oxo-7,8-dihydroguanine in mammalian cell DNA, by different methods in different laboratories: an approach to consensus; *Carcinogenesis* **23** 2129-2133
- Essigmann JM, Basu AK, Loechler EL (1989): Mutagenic specificity of alkylated and oxidized DNA bases as determined by site-specific mutagenesis; *Ann Ist Super Sanita* **25** 155-161
- Esterbauer H (1982): Aldehydic products of lipid peroxidation; 101-128
In: McBrien DC; Slaughter TF: Free radicals, lipid peroxidation and cancer; Academic Press London
- Falbe J, Regitz M (1995): *Römpp Chemie Lexikon; 9. Auflage, Thieme Stuttgart*
- Falcone JM, Box HC (1997): Selective hydrolysis of damaged DNA by nuclease P1; *Biochim Biophys Acta* **1337** 267-275
- Fasman GD ed. (1976): *CRC Handbook of Biochemistry and Molecular Biology Vol. I; 3. Auflage; CRC Press Boca Raton*
- Fedtke N, Boucheron JA, Walker VE, Swenberg JA (1990): Vinyl chloride-induced DNA adducts. II: Formation and persistence of 7-(2'-oxoethyl)guanine and N²,3-ethenoguanine in rat tissue DNA; *Carcinogenesis* **11** 1287-1292
- Feig DI, Reid TM, Loeb LA (1994): Reactive oxygen species in tumorigenesis; *Cancer Res* **54** 1890S-1894S
- Finnegan MT, Herbert KE, Evans MD, Lunec J (1995): Phenol isolation of DNA yields higher levels of 8-oxodeoxyguanosine compared to pronase E isolation; *Biochem Soc Trans* **23** 430S

Floyd RA, Watson JJ, Wong PK, Altmiller DH, Rickard RC (1986): Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine: sensitive detection and mechanisms of formation; *Free Radic Res Commun* **1** 163-172

Fokinski M, Bialkowski K, Skiba M, Ponikowska I, Szumurlo W, Olinski R (1999): Evaluation of 8-oxodeoxyguanosine, typical oxidative DNA damage, in lymphocytes of ozone-treated arteriosclerotic patients; *Mutat Res* **438** 23-27

Forni L, Bahnemann D, Hart EJ (1982): Mechanisms of the hydroxide ion initiated decomposition of ozone in aqueous solution; *J Phys Chem* **86** 255-259

Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN (1990): Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine; *Proc Natl Acad Sci U S A* **87** 4533-4537

Frampton MW, Pryor WA, Cueto R, Cox C, Morrow PE, Utell MJ (1999a): Ozone exposure increases aldehydes in epithelial lining fluid in human lung; *Am J Respir Crit Care Med* **159**(4Pt1) 1134-1137

Frampton MW, Pryor WA, Cueto R, Cox C, Morrow PE, Utell MJ (1999b): Aldehydes (nonanal and hexanal) in rat and human bronchoalveolar lavage fluid after ozone exposure; *Res Rep Health Eff Inst* **90** 1-18

Frankel EN (1985): Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids; *Prog Lipid Res* **23** 197-221

Frenkel K, Zhong ZJ, Wei HC, Karkoszka J, Patel U, Rashid K, Georgescu M, Solomon JJ (1991): Quantitative high-performance liquid chromatography analysis of DNA oxidized in vitro and in vivo; *Anal Biochem* **196** 126-136

Fukunaga K, Takama K, Suzuki T (1995): High performance liquid chromatographic determination of plasma malondialdehyde level without a solvent extraction procedure; *Anal Biochem* **230** 20-23

Fukunaga K, Yoshida M, Nakazono N (1998): A simple, rapid, highly sensitive and reproducible quantification method for plasma malondialdehyde by high-performance liquid chromatography; *Biomed Chromatogr* **12** 300-303

Gackowski D, Rozalski R, Roszkowski K, Jawien A, Fokinski M, Olinski R (2001): 8-Oxo-7,8-dihydroguanine and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine levels in human urine do not depend on diet; *Free Radic Res* **35** 825-832

Galloway AM, Liuzzi M, Paterson MC (1994): Metabolic processing of cyclobutyl pyrimidine dimers and (6-4) photoproducts in UV-treated human cells. Evidence for distinct excision-repair pathways; *J Biol Chem* **269** 974-980

Germadnik D, Pilger A, Rudiger HW (1997): Assay for the determination of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection; *J Chromatogr B Biomed Appl* **689** 399-403

Gliner JA, Horvath SM, Folinsbee LJ (1983): Preexposure to low ozone concentrations does not diminish the pulmonary function response on exposure to higher ozone concentrations; *Am Rev Respir Dis* **127** 51-55

Gooch PC, Creasia DA, Brewen JG (1976): The cytogenetic effects of ozone: Inhalation and in vitro exposures; *Environ Res* **12** 188-195

Goodhead DT (1989): The initial physical damage produced by ionizing radiations; *Int J Radiat Biol* **56** 623-634

Grollman AP, Moriya M (1993): Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within; *Trends Genet* **9** 246-249

Gross KB, White HJ (1986): Pulmonary functional and morphological changes induced by a 4-week exposure to 0.7 ppm ozone followed by a 9-week recovery period; *J Toxicol Environ Health* **17** 143-157

Guerrero RR, Rounds DE, Olson RS, Hackney JD (1979): Mutagenic effects of ozone on human cells exposed in vivo and in vitro based on sister chromatid exchange analysis; *Environ Res* **18** 336-346

Guichard Y, Nair J, Barbin A, Bartsch H (1993): Immunoaffinity clean-up combined with ³²P-postlabelling analysis of 1,N⁶-ethenoadenine and 3,N⁴-ethenocytosine in DNA; 263-269
In: Phillips DH, Castegnaro M, Bartsch H (Hrsg.): Postlabelling methods for detection of DNA adducts; IARC Scientific Publications Vol 124, IARC Lyon

Guo FH, DeRaeve HR, Rice TW, Stuehr DJ, Thunnissen FB, Erzurum SC (1995): Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 7809-7813

Gupta RC, Arif JM (1998): A TLC enrichment mediated ³²P-postlabeling assay for the sensitive detection of 8-oxodeoxyguanosine (8-oxodG) in human tissues. *Proc AACR* **39** 1960 (Abstract)

Gustafsson LE, Cotgreave I (1996): Ozone-induced toxicity in experimental animals and isolated cell systems; *Scand J Work Environ Health* **22** suppl 3 27-41

Gutteridge JM, Quinlan GJ, Kovacic P (1998): Phagomimetic action of antimicrobial agents; *Free Radic Res* **28** 1-14

Haddad IY, Pataki G, Hu P, Galliani C, Beckman S, Matalon S (1994): Quantitation of nitrotyrosine levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury; *J Clin Invest* **94** 2407-2413

Halliwell B (1994): Free radicals and antioxidants: A personal view; *Nutr Rev* **52** 253-265

Halliwell B (1998): Can oxidative DNA damage be used as a biomarker of cancer risk in human? Problems, resolutions and preliminary results from nutritional supplementation studies; *Free Radic Res* **29** 469-486

- Halliwell B, Gutteridge JM (1990): Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview; *Methods Enzymol* **186** 1-85
- Hamberg M, Zhang LY (1995): Quantitative determination of 8-hydroxyguanine and guanine by isotope dilution mass spectrometry; *Anal Biochem* **229** 336-344
- Hamelin C, Chung YS (1974): Optimal conditions for mutagenesis by ozone in *Escherichia coli* chromosome; *Mutat Res* **24** 253-255
- Hamelin C, Chung YS (1975): The effect of low concentrations of ozone in *Escherichia coli* chromosome; *Mutat Res* **28** 131-132
- Hamilton RF, Hazbun ME, Jumper CA, Eschenbachee WL, Holian A (1996): 4-Hydroxy-nonenal mimics ozone-induced modulation of macrophage function ex vivo; *Am J Respir Cell Mol Biol* **15** 275-282
- Hamilton RF, Li L, Eschenbacher WL, Szweda L, Holian A (1998): Potential involvement of 4-hydroxynonenal in the response of human lung cells to ozone; *Am J Physiol* **274** L8-L16
- Haney JT, Connor TH, Li L (1999): Detection of ozon-induced DNA single strand breaks in murine bronchoalveolar lavage cells acutely exposed to ozone; *Inhal Tox* **11** 331-341
- Harkema JR, Plopper CG, Hyde MD, St. George JA, Wilson DW, Dungworth DL (1987): Response of the macaque nasal epithelium to ambient levels of ozone: a morphologic and morphometric study of the transitional and respiratory epithelium; *Am J Pathol* **128** 29-44
- Hartwig A, Dally H, Schlepegrell R (1996): Sensitive analysis of oxidative DNA damage in mammalian cells: use of the bacterial Fpg protein in combination with alkaline unwinding; *Toxicol Lett* **88** 85-90
- Hassett C, Mustafa MG, Coulson WF, Elashoff RM (1985): Murine lung carcinogenesis following exposure to ambient ozone concentrations; *JNCI* **75** 771-777
- Hatch GE, Slade R, Stead AG, Graham JA (1986): Species comparison of acute inhalation toxicity of ozone and phosgene; *J Toxicol Environ Health* **19** 43-53
- Hayakawa H, Taketomi A, Sakumi K, Kuwano M, Sekiguchi M (1995): Generation and elimination of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate, a mutagenic substrate for DNA synthesis, in human cells; *Biochemistry* **34** 89-95
- Hayes RC, Petruccio LA, Huang HM, Wallace SS, LeClerc JE (1988): Oxidative damage in DNA. Lack of mutagenicity by thymine glycol lesions; *J Mol Biol* **201** 239-246
- Hazra TK, Hill JW, Izumi T, Mitra S (2001): Multiple DNA glycosylases for repair of 8-oxoguanine and their potential role in vivo functions; *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **68** 193-205
- Hazra TK, Izumi T, Maitt L, Floyd RA, Mitra S (1998): The presence of two distinct 8-oxoguanine repair enzymes in human cells, their potential complementary role in preventing mutation; *Nucleic Acids Res* **26** 5116-5122

- Helbock HJ, Beckman KB, Ames BN (1999): 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage; *Methods Enzymol* **300** 156-166
- Helbock HJ, Beckman KB, Shigenaga MK, Walter PB, Woodall AA, Yeo HC, Ames BN (1998): DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine; *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** 288-293
- Helbock HJ, Thompson J, Yeo H, Ames BN (1996): N²-Methyl-8-oxoguanine: A tRNA urinary metabolite – Role of xanthine oxidase; *Free Radic Biol Med* **20** 475-481
- Hofer T, Möller L (1998): Reduction of oxidation during the preparation of DNA and analysis of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; *Chem Res Toxicol* **11** 882-887
- Hofer T, Möller L (2002): Optimization of the workup procedure for the analysis of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine with electrochemical detection; *Chem Res Toxicol* **15** 426-432
- Holleman AF, Wiberg E (1976): Ozon; in *Lehrbuch der anorganischen Chemie*; Seite 291ff. 81. – 90. Auflage, de Gruyter, Berlin
- Hoigne J, Bader H (1979): The role of hydroxyl radical reactions in ozonation processes in aqueous solutions; *Water Res* **10** 377-386
- Holmes J, Clark S, Modrich P (1992): Strand-specific mismatch repair correction in nuclear extracts of human and *Drosophila melanogaster* cell lines; *Proc Natl Acad Sci USA* **87** 5837-5841
- Hong J, Oh CH, Johnson F, Iden CR (1998): Suppression of adventitious formation of 8-oxoguanine(TMS)₄ from guanine during trimethylsilylation; *Analytical Biochem* **261** 57-63
- Hotchkiss JA, Harkema JR, Sun JD, Henderson RF (1989): Comparison of acute ozone-induced nasal and pulmonary inflammatory responses in rats; *Toxicol Appl Pharmacol* **98** 289-302
- Huang JC, Hsu DS, Kazantsev A, Sancar A (1994): Substrate spectrum of human excinuclease, repair of abasic sites, methylated bases, mismatches and bulky adducts; *Proc Natl Acad Sci USA* **91** 12213-12217
- Huang JC, Svoboda DL, Reardon JT, Sancar A (1992): Human nucleotide excision nuclease removes thymine dimers from DNA incising the 22nd phosphodiester bond 5' and the 6th phosphodiester bond 3' to the photodimer; *Proc Natl Acad Sci* **89** 3664-3668
- Huie RE, Padmaja S (1993): The reaction of NO with superoxide; *Free Radic Res Commun* **18** 195-199
- Hyde DM, Bolender RP, Harkema JR, Plopper CG (1994): Morphometric approaches for evaluating pulmonary toxicity in mammals: Implications for risk assessment; *Risk Anal* **14** 293-302

- Hyde DM, Hubbard WC, Wong V, Wu R, Pinkerton K, Popper CG (1992): Ozone-induced acute tracheobronchial epithelial injury: relationship to granulocyte emigration in the lung; *Am J Respir Cell Mol Biol* **6** 481-97
- Hynes B, Silverman F, Cole P, Corey P (1988): Effects of ozone exposure: A comparison between oral and nasal breathing; *Arch Environ Health* **43** 357-60
- Imlay JA, Chin SM, Linn S (1988): Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro; *Science* **240** 640-642
- Inoue M, Osaki R, Noguchi M, Hirohashi S, Yasumoto K, Kasai H (1998): Lung cancer patients have increased 8-hydroxydeoxyguanosine levels in peripheral lung tissue DNA; *Jpn J Cancer Res* **89** 691-695
- Jackson RM, Frank L (1984): Ozone-induced tolerance to hyperoxia in rats; *Am Rev Respir Dis* **129** 425-429
- Jaiswal M, Lipinski LJ, Bohr VA, Mazur SJ (1998): Efficient in vitro repair of 7-hydro-8-oxodeoxyguanosine by human cell extracts: involvement of multiple pathways; *Nucleic Acids Res* **26** 2184-2191
- Jaruga P, Speina E, Gackowski D, Tudek B, Olinski R (2000): Endogenous oxidative DNA base modifications analysed with repair enzymes and GC/MS technique. *Nucleic Acid Res* **28** e16
- Jenner A, England TG, Aruoma OI, Halliwell B (1998): Measurement of oxidative DNA damage by gas chromatography-mass spectrometry: ethanethiol prevents artifactual generation of oxidized DNA bases; *Biochem J* **331** 365-369
- Jensen BR, ESCODD (2002): Comparison of results from different laboratories in measuring 8-oxo-2'-deoxyguanosine in synthetic oligonucleotides; *Free Radic Res* **36** 649-659
- Jeong JK, Juedes MJ, Wogan GN (1998): Mutations induced in the supF gene of pSP189 by hydroxyl radical and singlet oxygen: Relevance to peroxynitrite mutagenesis; *Chem Res Tox* **11** 550-556
- Jones GD, Dickinson L, Lunec J, Routledge MN (1999): SVPD-post-labeling detection of oxidative damage negates the problem of adventitious oxidative effect during ³²P-labeling; *Carcinogenesis* **20** 503-507
- Jorge SA, Menck CF, Sies H, Osborne MR, Phillips DH, Sarasin A, Stary A (2002): Mutagenic fingerprint of ozone in human cells; *DNA Repair* **1** 369-378
- Kadlubar FF, Anderson KE, Häussermann S, Lang NP, Barone GW, Thompson PA, MacLeod SL, Chou MW, Mikhailova M, Plastaras J, Marnett LJ, Nair J, Velic I, Bartsch H (1998): Comparison of DNA adduct levels associated with oxidative stress in human pancreas; *Mutat Res* **405** 125-133

- Kantha SS, Wada S, Tanaka H, Takeuchi M, Watabe S, Ochi H (1996): Carnosine sustains the retention of cell morphology in continuous fibroblast culture subjected to nutritional insult; *Biochem Biophys Res Commun* **223** 278-282
- Kasai H, Nishimura S (1984): Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents; *Nucleic Acids Res* **12** 2137-2145
- Kasai H, Nishimura S (1989): Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA by auto-oxidised unsaturated fatty acids; 1021-1023
In: Hayaishi O, Niki E, Kondo M, Yoshikawa T; Medical biochemical and chemical aspects of free radicals; Elsevier Amsterdam
- Keitel A (1989): Praxiserprobte Bioindikationsverfahren; *Staub Reinh Luft* **49** 29-34
- Kendall TL, Byerley DJ, Dean R (1991): Isolation of DNA from Blood; *Anal Biochem* **195** 74-76
- Kirichenko A, Li L, Morandi MT, Holian A (1996): 4-Hydroxy-2-nonenal-protein adducts and apoptosis in murine lung cells after acute ozone exposure; *Toxicol Appl Pharmacol* **141** 416-424
- Klaunig JE, Xu Y, Han C, Kamendulis LM, Chen J, Heiser C, Gordon MS, Mohler ER (1999): The effect of tea consumption on oxidative stress in smokers and nonsmokers; *Proc Soc Exp Biol Med* **220** 249-254
- Kleeberger SR, Kolbe J, Turner C, Spannhake EW (1989): Exposure to 1ppm ozone attenuates the immediate antigenic response of canine peripheral airways; *J Toxicol Environ Health* **28** 349-362
- Kley D, Volz-Thomas A (1990): Die Belastung der Umwelt durch troposphärisches Ozon; 25-35
In: Jahresbericht 1990 des Forschungszentrums Jülich GmbH
- Knight JA, Pieper RK, McClellan L (1988): Specificity of the thiobarbituric acid reaction: Its Use in studies of lipid peroxidation; *Clin Chem* **34** 2433-2438
- Kobzik L, Brecht DS, Lowenstein CJ, Drazen J, Gaston B, Sugarbaker D, Stamler J (1993): Nitric oxide synthase in human and rat lung: Immunocytochemical and histochemical localization; *Am J Respir Cell Mol Biol* **9** 371-377
- Kohn KW, Erickson LC, Ewig RA, Friedman CA (1976): Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution; *Biochemistry* **15** 4629-4637
- Koshland DE (1992): The molecule of the year; *Science* **258** 1861
- Kvam E, Tyrrell RM (1997): Artificial background and induced levels of oxidative base damage in DNA from human cells; *Carcinogenesis* **18** 2281-2283
- Last JA, Warren DL, Pecquet-Goad E, Witschi H (1987): Modification by ozone of lung tumor development in mice; *JNCI* **78** 149-154

- LASI (1996): Arbeitsschutzmaßnahmen bei Ozonbelastung am Arbeitsplatz; Ländderauschuß für Arbeitsschutz und Sicherheitstechnik, Wiesbaden
- Laskin DL, Fakhrzadeh L, Heck DE, Gerecke D, Laskin JD (2002): Upregulation of phosphoinositide 3-kinase and protein kinase B in alveolar macrophages following ozone inhalation. Role of NF-kappaB and STAT-1 in ozone-induced nitric oxide production and toxicity; *Mol Cell Biochem* **234-235** 91-98
- Laskin DL, Fakhrzadeh L, Laskin JD (2001): Nitric oxide and peroxynitrite in ozone-induced lung injury; *Adv Exp Med Biol* **500** 183-190
- Laskin JD, Heck DE, Laskin DL (1996): Nitric oxide production in the lung and liver following inhalation of the pulmonary irritant ozone; 141-146
In: Snyder R (Hrsg.): Biological reactive intermediates V; Plenum Press, New York
- Last JA, Hesterberg TW, Reiser KM, Cross CE, Amis TC, Gunn C, Steffey EP, Grandy J, Henrickson R (1981): Ozone induced alterations in collagen metabolism of monkey lungs: Use of biopsy-obtained lung tissue; *Toxicol Appl Pharmacol* **72** 111-118
- Lee JG, Madden MC, Reed W, Adler K, Devlin R (1996): The use of single cell gel electrophoresis assay in detecting DNA single strand breaks in lung cells in vitro; *Toxicol Appl Pharmacol* **14** 195-204
- Lenton KJ, Therriault H, Fulop T, Payette H, Wagner JR (1999): Glutathione and ascorbate are negatively correlated with oxidative DNA damage in human lymphocytes; *Carcinogenesis* **20** 607-613
- Leon OS, Menendez S, Merino N, Castillo R, Sam S, Perez L, Cruz E, Bocci V (1998): Ozone oxidative preconditioning: a protection against cellular damage by free radicals; *Mediators Inflamm* **7** 289-294
- Leuratti C, Singh R, Lagneau C, Farmer PB, Plastaras JP, Marnett LJ, Shuker DE (1998): Determination of malondialdehyde-induced DNA damage in human tissues using an immunoslot blot assay; *Carcinogenesis* **19** 1919-1924
- L'Héroult P, Chung YS (1984): Mutagenicity of ozone in different repair-deficient strains of *Escherichia coli*; *Mol Gen Genet* **197** 472-477
- Liu H, Huang T, Kissinger CB, Kissinger PT (1998): Comparison of detection methods for liquid chromatographic determination of 3-nitro-L-tyrosine; *J Chromatogr B* **713** 289-295
- Lipinski LJ, Hoehr N, Mazur SJ, Dianov GL, Sentürker S, Dizdaroglu M, Bohr VA (1999): Repair of oxidative DNA base lesions induced by fluorescent light is defective in xeroderma pigmentosum group A cells; *Nucleic Acids Res* **27** 3153-3158
- Loft S, Astrup A, Buemann B, Poulsen HE (1994): Oxidative DNA damage correlates with oxygen consumption in humans; *FASEB J* **8** 534-537
- Loft S, Fischer Nielsen A, Jeding IB, Vistisen K, Poulsen HE (1993): 8-Hydroxydeoxyguanosine as a urinary biomarker of oxidative DNA damage; *J Toxicol Environ Health* **40** 391-404

- Loft S, Poulsen HE (1998): Estimation of oxidative DNA damage in man from urinary excretion of repair products; *Acta Biochim Pol* **45** 133-144
- Loft S, Vistisen K, Ewertz M, Tjønneland A, Overvad K, Poulsen HE (1992): Oxidative DNA damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in humans: influence of smoking, gender and body mass index; *Carcinogenesis* **13** 2241-2247
- Loft S, Deng XS, Tuo J, Wellejus A, Sørensen M, Poulsen HE (1998): Experimental Study of oxidative DNA damage; *Free Radic Res* **29** 525-539
- Lokesh BR, Mathur SN, Spector AA (1981): Effect of fatty acid saturation on NADPH-dependent lipid peroxidation in rat liver microsomes; *J Lipid Res* **22** 905-615
- Loyd PH (1978): A scheme for the evaluation of diagnostic kit; *Ann Clin Biochem* **15** 136-145
- Lu R, Nash HM, Verdine GL (1997): A mammalian DNA repair enzyme that excises oxidatively damaged guanines maps to a locus frequently lost in lung cancer; *Current Biol* **7** 397-407
- Lymar SV, Jiang Q, Hurst JK (1996): Mechanism of carbon dioxide-catalyzed oxidation of tyrosine by peroxynitrite; *Biochemistry* **35** 7855-7861
- Maccubbin A, Evans M, Paul CR, Budzinski EE, Przybyszewski J, Box HC (1991): Enzymatic excision of radiation-induced lesions from DNA model compounds; *Radiat Res* **126** 21-26
- Maki H, Sekiguchi M (1992): Mut T protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis; *Nature* **355** 273-275
- Mariassy AT, Sielczak MW, McCray MN, Abraham WM, Wanner A (1989): Effects of ozone on lamb tracheal mucosa: quantitative glycoconjugate histochemistry; *Am J Pathol* **135** 871-879
- Marionnet C, Benoit A, Benhamou S, Sarasin A, Sary A (1995): Characteristics of UV-induced mutation spectra in human XP-D/ERCC2 gene-mutated Xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy cells; *J Mol Biol* **252** 550-562
- Marnett LJ (1994): DNA adducts of α,β -unsaturated aldehydes and dicarbonyl compounds; 151-163
In: Hemminki K, Dipple A, Shuker DE, Kadlubar FF, Segerbäck D, Bartsch H: DNA-adducts: Identification and biological significance; IARC Scientific Publication No. 125; IARC Lyon
- Marionnet C, Benoit A, Benhamou S, Sarasin A, Sary A (1995): Characteristics of UV-induced mutation spectra in human XP-D/ERCC2 gene-mutated Xeroderma Pigmentosum and Trichothiodystrophy cells; *J Mol Biol* **252** 550-562
- Maruyama W, Hashizume Y, Matsubara K, Maoi M (1996) Identification of 3-nitro-L-tyrosine, a product of nitric oxide and superoxide, as an indicator of oxidative stress in the human brain; *J Chromatogr B* **676** 153-158

- Marx JL (1985): Oxygen free radicals linked to many diseases; *Science* **235** 529-531
- Mates JM, Sanchez-Jimenez FM (2000): Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy; *Int J Biochem Cell Biol* **32** 157-170
- McDonnell WF, Horstmann DH, Abdul-Salaam S, House DE (1985): Reproducibility of individual responses to ozone exposure; *Am Rev Respir Dis* **131** 36-40
- McGoldrick JP, Yeh YC, Solomon M, Essigman JM, Lu AL (1995): Characterisation of a mammalian homolog of the *Escherichia coli* Mut Y mismatch repair protein; *Mol Cell Biol* **15** 989-996
- McKelvey-Martin VJ, Green MH, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Meo MP, Collins A (1993): The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review; *Mutat Res* **288** 47-63
- McKenzie WH (1982): Controlled human exposure studies: Cytogenetic effects of ozone inhalation; *Banbury Rep* **13** 319-324
- McKenzie WH, Knelson JH, Rummo NJ, House DE (1977): Cytogenetic effects of inhaled ozone in man; *Mutat Res* **48** 95-102
- Medina-Navarro R, Lifshitz A, Wachter N, Hicks JJ (1997): Changes in human serum antioxidant capacity and peroxidation after four months of exposure to air pollutants; *Arch Med Res* **28** 205-208
- Merz T, Bender MA, Kerr HD, Kulle TJ (1975): Observations of aberrations in chromosomes of lymphocytes from human subjects exposed to ozone at a concentration of 0.5 ppm for 6 and 10 hours; *Mutat Res* **31** 299-302
- Menzel DB (1970): Toxicity of ozone, oxygen and radiation; *Annu Rev Pharmacol* **10** 379-394
- Mills PK, Abbey D, Beeson WL, Petersen F (1991): Ambient air pollution and cancer in California Seventh-day Adventists; *Arch Environ Health* **46** 271-280
- MinfUF (1999): Ozon in Rheinland-Pfalz; Ministerium für Umwelt und Forsten, Mainz
- Mochitate K, Ishida K, Ohsumi T, Miura T (1992): Long-term effects of ozone and nitrogen dioxide on the metabolism and population of alveolar macrophages; *J Toxicol Environ Health* **35** 247-260
- Möller L, Hofer T (1997): [³²P]ATP mediates formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine from 2'-deoxyguanosine, a possible problem in the ³²P-postlabeling assay; *Carcinogenesis* **18** 2415-2419
- Möller L, Hofer T, Zeisig M (1998): Methodological considerations and factors affecting 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine analysis; *Free Radic Res* **29** 511-524

- Mudway IS, Housley D, Eccles R, Richards RJ, Datta AK, Tetley TD, Kelly FJ (1996): Differential depletion of human respiratory tract antioxidants in response to ozone challenge; *Free Radic Res* **25** 499-413
- Mudway IS, Krishna MT, Frew AJ, MacLeod D, Sandstrom T, Holgate ST, Kelly FJ (1999): Compromised concentrations of ascorbate in fluid lining the respiratory tract in human subjects after exposure to ozone; *Occup Environ Med* **56** 473-481
- Musarrat J, Wani AA (1994): Quantitative immunoanalysis of promutagenic 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in oxidized DNA; *Carcinogenesis* **15** 2037-2043
- Mustafa M (1990): Biochemical basis of ozone toxicity; *Free Radic Biol Med* **9** 245-265
- Nair J, Barbin A, Guichard Y, Bartsch H (1995): 1,*N*⁶-Ethenodeoxyadenosine and 3,*N*⁴-ethenodeoxycytidine in liver DNA from humans and untreated rodents detected by immunoaffinity/³²P-postlabelling; *Carcinogenesis* **16** 613-617
- Nair J, Barbin A, Velic I, Bartsch H (1999): Etheno DNA-base adducts from endogenous reactive species; *Mutat Res* **424** 59-69
- Nakae D, Mizumoto Y, Kobayashi E, Noguchi O, Konishi Y (1995): Improved genomic/nuclear DNA extraction for 8-hydroxydeoxyguanosine analysis of small amounts of rat liver tissue; *Cancer Lett* **97** 233-239
- Nakajima M, Takeuchi T, Morimoto K (1996): Determination of 8-hydroxydeoxyguanosine in human cells under oxygen-free conditions; *Carcinogenesis* **17** 787-791
- Nakayama S, Esaki K, Taniguchi Y, Tabata N (1979): Improved ozonation in aqueous solutions; *Ozone Sci Eng* **1** 119-131
- Nathan C, Xie Q (1994): Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* **269** 13725-13728
- Nikula KJ, Wilson DW, Giri SN, Plopper CG, Dungworth DL (1988): The response of the rat tracheal epithelium to ozone exposure: injury, adaptation and repair; *Am J Pathol* **131** 373-384
- Nopper B, Kohen F, Wilchek M (1989): A thiophilic adsorbent for the one-step high-performance liquid chromatography purification of monoclonal antibodies; *Anal Biochem* **180** 66-71
- Nover H, Botzenhart K (1985): Bactericidal effects of photochemical smog constituents produced by a flow reactor, III: Communication: Determination of Mutagenic effects of photochemical smog on *E. coli* K 12 343/113; *Zbl Bakt Hyg I Abt Orig B* **181** 71-80
- (NTP) National Toxicology Program (1994): Toxicology and carcinogenesis studies of ozone and ozone/NNK in F344/n rats and B6C3F1 mice [Zusammenfassung]; NTP Technical Report 440
- Nyberg F, Pershagen G (1996): Epidemiologic studies on ozone; *Scand J Work Environ Health* **22** suppl 3 72-98

Ohshima H, Brouet I, Friesen M, Bartsch H (1991): Nitrotyrosine as a new marker for endogenous nitrosation and nitration; 443-448

In: O'Neill IK; Chen J, Bartsch H: Relevance to human cancer of N-nitroso compounds, tobacco smoke and mycotoxins; IARC Lyon

Ohshima H, Celan I, Chazotte L, Pignatelli B, Mower HF (1999): Analysis of 3-nitrotyrosine in biological fluids and protein hydrolyzates by high-performance liquid chromatography using a postseparation, on-line reduction column and electrochemical detection: results with various nitrating agent; *Nitric Oxide* **3** 132-141

Park JW, Floyd RA (1992): Lipid peroxidation products mediate the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA; *Free Radic Biol Med* **12** 245-250

Park EM, Park YM, Gwak YS (1998): Oxidative damage in tissues of rats exposed to cigarette smoke; *Free Radic Biol Med* **25** 79-86

Park EM, Shigenaga MK, Degan P, Korn TS, Kitzler JW, Wehr CM, Kolachana P, Ames BN (1992): Assay of excised oxidative DNA lesions: isolation of 8-oxoguanine and its nucleoside derivatives from biological fluids with a monoclonal antibody column; *Proc Natl Acad Sci U S A* **89** 3375-3379

Payne CM, Berstein C, Bernstein H (1995): Apoptosis overview emphasizing the role of oxidative stress, DNA damage and signal-transduction pathways; *Leukemia Lymphoma* **19** 43-93

Peralta C, Leon OS, Xaus C, Prats N, Jalil EC, Sala Planell E, Puig-Parellada P, Gelp E, Rosello-Catafau (1999): Protective effect of ozone treatment on the injury associated with hepatic ischemia-reperfusion: antioxidant-prooxidant balance; *Free Radic Res* **31** 191-196

Peyton GR, Glaze WH (1985): Photolytic ozonation: A mechanistic perspective; *Ozonews* **13** 21-24

Pflaum M, Will O, Epe B (1997): Determination of steady-state levels of oxidative DNA base modifications in mammalian cells by means of repair endonucleases; *Carcinogenesis* **18** 2225-2231

Picardo M, Passi S (1997): Free radicals, 207-226.

In: Bos JD (Hrsg.): Skin immune system (SIS); CRC Press, Boca Raton, N.Y.

Pino MV, McDonald RJ, Berry JD, Joad JP, Tarkington BK, Hyde DM (1992a): Functional and morphologic changes caused by acute ozone exposure in the isolated and perfused rat lung; *Am Rev Respir Dis* **145** 882-889

Pino MV, Stovall MY, Levin JR, Devilin RB, Koren HS, Hyde DM (1992b): Acute ozone-induced lung injury in neutrophil-depleted rats; *Toxicol Appl Pharmacol* **114** 268-276

Plopper CG, Duan X, Buckpitt AR, Pinkerton KE (1994): Dose-Dependent Tolerance to Ozone. IV. Site-specific elevation in antioxidant enzymes in the lungs of rats exposed for 90 days or 20 months; *Toxicol Appl Pharmacol* **127** 124-131

- Podmore K, Farmer PB, Herbert KE, Jones GD, Martin EA (1997): ^{32}P -postlabelling approaches for the detection of 8-oxo-2'-deoxyguanosine-3'-monophosphate in DNA; *Mutat Res* **378** 139-149
- Poli G, Dianzani MU, Cheeseman KH, Slater TF, Lang J, Esterbauer H (1985): Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by carbon tetrachloride or ADP-iron in isolated hepatocytes and rat liver microsomal suspensions; *Biochem J* **227** 629-638
- Pool-Zobel BL, Abrahamse SL, Collins AR, Kark W, Gugler R, Oberreuther D, Siegel EG, Treptow-van Lishaut S, Rechkemmer G (1999): Analysis of DNA strand breaks, oxidized bases, and glutathione S-transferase P1 in human colon cells from biopsies; *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **8** 609-614
- Porath J, Maisano F, Belew M (1985): Thiophilic adsorption – A new method for protein fractionation; *FEBS Lett* **185** 306-310
- Porter NA, Caldwell SE, Mills KA (1995): Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids; *Lipids* **30** 277-290
- Pouget JP, Ravanat JL, Douki T, Richard MJ, Cadet J (1999): Measurement of DNA base damage in cells exposed to low doses of gamma-radiation: comparison between the HPLC-EC and comet assays; *Int J Radiat Biol* **75** 51-58
- Poulsen HE, Loft S, Prieme H, Vistisen K, Lykkesfeldt J, Nyssonen K, Salonen JT (1998): Oxidative DNA Damage in vivo: Relationship to age, plasma antioxidants, drug metabolism, Glutathione-S-transferase activity and urinary creatinine excretion; *Free Radic Res* **29** 565-571
- Priemé H, Loft S, Cutler RG (1996): Measurement of oxidative DNA injury in humans: Evaluation of a commercially available ELISA assay; 78-82
In: Kumpulainen JT, Salonen JT (Hrsg.): Natural antioxidants and food quality in atherosclerosis and cancer prevention; The Royal Society of Chemistry, Cambridge
- Pryor WA, Squadrito GL (1995): The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide; *Am J Physiol* **268** L699-L722
- Radi R, Peluffo G, Alvarez MN, Naviliat M, Cayota A (2001): Unrevealing peroxynitrite formation in biological systems; *Free Radic Biol Med* **30** 463-488
- Randerath K, Zhou GD, Monk SA, Randerath E (1997): Enhanced levels in neonatal rat liver of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-hydroxydeoxyguanosine), a major mutagenic oxidative DNA lesion; *Carcinogenesis* **18** 1419-1421
- Rasmussen RE (1986): Inhibition of DNA replication by ozone in Chinese hamster V79 cells; *J Toxicol Environ Health* **17** 119-128
- Rasmussen RE, Crocker TT (1982): Lung cells grown on cellulose membrane filters as an in vitro model of the respiratory epithelium; *Environ Sci Res* **25** 105-120

- Rat der Sachverständigen für Umweltfragen (1995): Sommersmog: Drastische Reduktion der Vorläufersubstanzen des Ozons notwendig; *Angew Umweltforschung* **8** 153-167
- Rat der Sachverständigen für Umweltfragen (2000): Umweltgutachten 2000; Bundestagsdrucksache 14/3363
- Ravanat JL, Duret B, Guiller A, Douki T, Cadet J (1998): Isotope dilution high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry assay for the measurement of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in biological samples; *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **715** 349-356
- Ravanat JL, Guicherd P, Tuce Z, Cadet J (1999): Simultaneous determination of five oxidative DNA lesions in human urine; *Chem Res Toxicol* **12** 802-808
- Ravanat JL, Turesky RJ, Gremaud E, Trudel LJ, Stadler RH (1995): Determination of 8-oxoguanine in DNA by gas chromatography-mass spectrometry and HPLC-electrochemical detection: overestimation of the background level of the oxidized base by the gas chromatography-mass spectrometry assay; *Chem Res Toxicol* **8** 1039-1045
- Reardon JT, Bessho T, King HC, Bolton PH, Sancar A (1997): In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair systems, possible explanation for neurodegeneration in Xeroderma pigmentosum patients; *Proc Natl Acad Sci USA* **294** 9463-9468
- Rithidech K, Hotchkiss JA, Griffith WC, Henderson RF, Brooks AL (1990): Chromosome damage on rat pulmonary alveolar macrophages following ozone inhalation; *Mutat Res* **241** 67-73
- Roots R, Holley W, Chatterjee A, Irizarry M, Kraft G (1990): The formation of strand breaks in DNA after high-LET irradiation: a comparison of data from in vitro and cellular systems; *Int J Radiat Biol* **58** 55-69
- Rosa JG, Prokopczyk B, Desai DH, Amin SG, El-Bayoumy K (1998): Elevated 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in lung DNA of A/J mice and F344 rats treated with 4-(methylamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and inhibition by dietary 1,4-phenylenebis(methylene)-selenocyanate; *Carcinogenesis* **19** 1783-1788
- Rosenquist RA, Zharkov DO, Grollman AP (1997): Cloning and characterisation of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase; *Proc Natl Acad Sci USA* **94** 7429-7434
- Sachs L (1997): *Angewandte Statistik*; 8. Auflage, Springer Berlin
- Sagai M, Ichinose T (1991): Biochemical effects of combined gases of nitrogen dioxide and ozone: IV. Changes of lipid peroxidation and antioxidative protective systems in rat lungs upon life span exposure; *Toxicology* **66** 121-132
- Sarto F, Viola A (1980): Aberrazioni cromosomiche in soggetti esposti cronicamente ad ozono; *G Ital Med Lav* **2** 59-61 (italienisch mit englischem Abstract)

Schönbein CF (1868): Über die Erzeugnisse der langsamen Verbrennung des Aethers; Journal Prakt Chem **105** 232-242

Schreck R, Albermann K, Bäuerle PA (1992): Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive factor of eukaryotic cells (a review); Free Radic Res Commun **17** 221-237

Schreck R, Rieber P, Bäuerle PA (1991): Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1; EMBO J **10** 2247-2258

Schuler D, Otteneder M, Sagelsdorff P, Eder E, Gupta RC, Lutz WK (1997): Comparative analysis of 8-oxo-2'-deoxyguanosine in DNA by ³²P- and ³³P-postlabeling and electrochemical detection; Carcinogenesis **18** 2367-2371

Scott AD, Neishabury M, Jones DH, Reed SH, Boiteux S, Water R (1999): Spontaneous mutation, oxidative DNA damage and the roles of base and nucleotide excision repair in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*; Yeast **15** 205-218

Seawell PS, Ganesan AK (1981): Measurement of strand breaks in supercoiled DNA by gel electrophoresis; 425-438

In: Friedberg EC, Hanawalt PC (Hrsg.): DNA Repair: A Laboratory Handbook of Research Procedures; Marcel Dekker, New York

Seike N, Wanibuchi H, Morimura K, Wie M, Nishikawa R, Hirata K, Yoshikawa J, Fukushima S (2003): Enhancement of lung carcinogenesis by nonylphenol and genistein in a F344 rat multiorgan carcinogenesis model; Cancer Lett **192** 25-36

Selfridge J, Hsia KT, Redhead N, Melton DW (2001): Correction of liver dysfunction in DNA repair-deficient mice with an *ERCCI* transgene; Nucleic Acids Res **29** 4541-4550

Serrano J, Palmeira CM, Wallace KB, Kuehl DW (1996): Determination of 8-hydroxydeoxyguanosine in biological tissue by liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry/mass spectrometry; Rapid Commun Mass Spectrom **10** 1789-1791

Shamberger RJ, Shamberger BA, Willis CE (1977): Malondialdehyde content in food; J Nutr **107** 1404-1409

Shepson PB, Kleindienst TE, Edney EO, Namie GR, Pirman JH, Cupitt LT, Claxton LD (1985): The mutagenic activity of irradiated toluene/NO_x/H₂O/air mixtures; Environ Sci Technol **19** 249-255

Shigenaga MK, Aboujaoude EN, Chen Q, Ames BN (1994): Assays of oxidative DNA damage biomarkers 8-oxo-2'-deoxyguanosine and 8-oxoguanine in nuclear DNA and biological fluids by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection; Methods Enzymol **234** 16-33

Shigenaga MK, Gimeno CJ, Ames BN (1989): Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage; Proc Natl Acad Sci U S A **86** 9697-9701

Shiraishi F, Bandow H (1985): The genetic effects of the photochemical reaction products of propylene plus NO₂ on cultured Chinese hamster cells exposed in vitro; *J Toxicol Environ Health* **15** 31-38

Sies H (1991): *Oxidative stress*; Academic Press London

Sills RC, Hong HL, Greenwell A, Herbert RA, Boorman GA, Devereux TR (1995): Increased frequency of *K-ras* mutations in lung neoplasms from female B6C3F1 mice exposed to ozone for 24 or 30 months; *Carcinogenesis* **16** 1623-1628

Silva CR, Balsa JO, Caniné MS, Caldeira-de-Araújo A, Bernardo-Filho M (1998): Evaluation of Technetium-99m decay on *Escherichia coli* inactivation: Effects of physical or chemical agents; *Yale J Biol Med* **71** 7-14

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988): A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells; *Exp Cell Res* **175** 184-191

Smiler KL, Brady AN, Anver MR (1988): Histopathological effects of chronic exposure of Fischer 344 rats to low-levels of ozone; General Motors Research Laboratories research publication GMR 6355

Smith DS, Pourfarzaneh M, Kamer RS (1980): Linear Regression Analysis by Deming's Method; *Clin Chem* **26** 1105-1106

Sörensen M, Loft S (2000): No significant paraquat-induced oxidative DNA damage in rats; *Free Radic Res* **32** 423-428

Sonnemann G (1992): *Ozon*; Akademie Verlag Berlin

Staehlin J, Schmid W (1991): Trend analysis of tropospheric ozone concentrations utilizing the 20-year data set of ozone balloon soundings over Payerne (Switzerland); *Atmos Environ* **25A** 1739-1749

Stillwell WG, Xu HX, Adkins JA, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1989): Analysis of methylated and oxidized purines in urine by capillary gas chromatography-mass spectrometry; *Chem Res Toxicol* **2** 94-99

StMLU (1997): *Ozon*; 2. Auflage, Bayerisches Staatsministerium für Landesentwicklung und Umweltfragen München

Stocker R, Frei B (1991): Endogenous antioxidant defences in human blood plasma; *In: Sies H (Hrsg.): Oxidative stress*; Academic Press London

Stöckl D, Dewitte K, Thienpont LM (1998): Validity of linear regression in method comparison studies: Is it limited by the statistical model or the quality of the analytical input data; *Clin Chem* **44** 2340-2346

Stokinger HE (1965): *Ozone toxicology*; *Arch Environ Health* **10** 719-731

- Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise M, Nathan CF (1991): Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase; an FAD- and FMN-containing flavoprotein; *Proc Natl Acad Sci USA* **88** 7773-7777
- Sundell J, Zuber A (1996): Ozone and other photochemical oxidants in ambient and indoor air – properties, sources and concentrations; *Scand J Work Environ Health* **22** suppl 3 5-14
- Swartz SG, Smith GS, Miao L, Wheeler KT (1996): Effects of formic acid hydrolysis on the quantitative analysis of radiation-induced DNA base damage products assayed by gas chromatography/mass spectrometry; *Radiat Environ Biophys* **35** 41-53
- Tagesson C, Källberg M, Klintonberg C, Starkhammar H (1995): Determination of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine by automated coupled-column high performance liquid chromatography: a powerful technique for assaying in vivo oxidative DNA damage in cancer patients; *Eur J Cancer* **31A** 934-940
- Tagesson C, Källberg M, Leanderson P (1992): Determination of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine by coupled-column high-performance liquid chromatography with electrochemical detection: A noninvasive assay for in vivo oxidative DNA damage in humans; *Toxicol Methods* **1** 242-251
- Takagi Y, Osada H, Kuroishi T, Mitsudomi T, Kondo M, Miimi T, Saji S, Gazdar AF, Takahashi T, Minna JD, Takahashi T (1998): p53 Mutations in non-small-cell lung cancers occurring in individuals without a past history of active smoking; *Br J Cancer* **77** 1568-1572
- Tan X, Grollman AP, Shibutani S (1999): Comparison of the mutagenic properties of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyadenosine and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine DNA lesions in mammalian cells; *Carcinogenesis* **20** 2287-2292
- Tanaka S, Choe N, Hemenway DR, Zhu S, Matalon S, Kagan E (1998): Asbestos inhalation induces reactive nitrogen species and nitrotyrosine formation in the lungs and pleura of the rat; *J Clin Invest* **102** 445-454
- Tchou J, Grollman AP (1993): Repair of DNA containing the oxidatively-damaged base 8-oxoguanine; *Mutat Res* **299** 277-287
- Teixeira AJ, Ferreira MR, van Dijk WJ, van de Werken G, de Jong AP (1995): Analysis of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat urine and liver DNA by stable isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry; *Anal Biochem* **226** 307-319
- Thews G, Mutscher E, Vaupel P (1991): *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*; 4. Aufl. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart
- Thomassen DG, Harmema JR, Stephens ND, Griffith WS (1991): Preneoplastic transformation of rat tracheal epithelial cells by ozone; *Toxicol Appl Pharmacol* **109** 137-48
- Tice RR, Bender MA, Ivett JL, Drew RT (1978): Cytogenetic effects of inhaled ozone; *Mutat Res* **58** 293-304

Topp H, Lengger C, Schöch G, Werner J, Mietzsch E (2000): Renal excretion of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in Wistar rats with increase O₂ consumption due to cold stress; Arch Biochem Biophys **376** 328-332

Toraason M, Clark J, Dankovic D, Mathias P, Skaggs S, Walker C, Werren D (1999): Oxidative stress and DNA damage in Fischer rats following acute exposure to trichloroethylene or perchloroethylene; Toxicology **138** 43-53

Totter JR (1980): Spontaneous cancer and its possible relationship to oxygen metabolism; Proc Natl Acad Sci USA **77** 1763-1767

Toyokuni S, Tanaka T, Hattori Y, Nishiyama Y, Yoshida A, Uchida K, Hiai H, Ochi H, Osawa T (1997): Quantitative immunohistochemical determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by a monoclonal antibody N45.1: its application to ferric nitrilotriacetate-induced renal carcinogenesis model; Lab Invest **76** 365-374

Trenam CW, Blake DR, Morris CJ (1992): Skin inflammation: reactive oxygen species and the role of iron; J Invest Dermatol **99** 675-682

Ultman JS, Ben-Hebria A, Hu SC (1994): Noninvasive determination of respiratory ozone absorption: The bolus-response method; Res Rep Health Eff Inst **69** 1-42

Uppa RM, Squadrito GL, Pryor WA (1996): Acceleration of peroxynitrite oxidations by carbon dioxide; Arch Biochem Biophys **327** 335-343

Vaca CE, Wilhelm J, Harms-Ringdahl M (1988): Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review; Mutat Res **195** 137-149

Vaca CE, Vodicka P, Hemminki K (1992): Determination malonaldehyde-modified 2'-deoxyguanosine-3'-monophosphate and DNA by ³²P-postlabelling; Carcinogenesis **13** 593-599

Van Bree L, Dormans JA, Boere AJ, Rombout PJ (2001): Time study on development and repair of lung injury following ozone exposure in rats; Inhal Toxicol **13** 703-717

Van der Wal WA, van Bree L, Marra M, Robour PF (1994): Attenuation of acute lung injury by ozone inhalation. The effect of low level pre-exposure; Toxicol Lett **72** 291-298

Van der Zee J, Dubbelman TM, van Steveninck J (1987): The role of hydroxyl radicals in the degradation of DNA by ozone; Free Radic Res Commun **2** 279-284

VDI (1978): VDI-Richtlinie 2468 Blatt 1: Messen der Ozon- und Peroxid-Konzentration, Manuelles photometrisches Verfahren, Kaliumjodid-Methode (Basisverfahren); Beuth Berlin

VDI (1980): Messen gasförmiger Immissionen; Messen der Ozonkonzentration; Direktes UV-photometrisches Verfahren (Basisverfahren); Beuth Berlin

Victorin K, Ståhlberg M (1988): A method for studying the mutagenicity of some gaseous compounds in *Salmonella typhimurium*; Environ Mol Mutagen **65-77**

- Victorin K (1996): Genotoxicity and carcinogenicity of ozone; *Scand J Work Environ Health* **22** suppl 3 42-51
- Vielstich W (1975): Leitfähigkeit, Potentiale, Phasengrenzen, *In: Hamann CH (Hrsg.): Elektrochemie; Verlag Chemie, Weinheim*
- Viera L, Ye YZ, Estevez AG, Beckman JS (1999): Immunohistochemical methods to detect nitrotyrosine; *Methods Enzymol* **301** 373-381
- Volz A, Kley D (1988): Evaluation of the Montsouris series of ozone measurements made in the nineteenth century; *Nature* **332** 240-242
- Wakkers PJ, Hellendoorn HB, op de Weegh GJ (1975): Applications of statistics in clinical chemistry: A critical evaluation of regression lines; *Clin Chim Acta* **64** 173-184
- Wang L, Hirayasu K, Ishizawa M, Kobayashi Y (1994): Purification of genomic DNA from human whole blood by isopropanol-fractionation with concentrated NaI and SDS; *Nucleic Acids Res* **22** 1774-1775
- Weimann A, Belling D, Poulsen HE (1999): Measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 2'-deoxyadenosine and 8-hydroxy-2'-deoxyadenosine in urine by direct injection high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry. *EMMSOEHG (Abstract)*
- Weimann A, Belling D, Poulsen HE (2001): Measurement of 8-oxo-2'-deoxyguanosine and 8-oxo-2'-deoxyadenosine in DNA and human urine by high performance liquid chromatography - electrospray tandem mass spectrometry; *Free Radic Biol Med* **30** 757-764
- Weimann A, Belling D, Poulsen HE (2002): Quantification of 8-oxo-guanine and guanine as the nucleobase, nucleoside and deoxynucleoside forms in human urine by high performance liquid chromatography - electrospray tandem mass spectrometry; *Nucleic Acids Res* **30** e7
- Werner H (1992): Das Indigopapier – Sensitives Element zum Aufbau von Passivsammlern zur Messung von Ozonimmissionen; *Forstliche Forschungsberichte München* **122** (Reihentitel)
- Wiester MJ, Tepper JS, Winsett DW, Crissman KM, Tichard JH, Costa DL (1996): Adaption to ozone in rats and its association with ascorbic acid in the lung; *Fundam Appl Toxicol* **31** 56-64
- Wiseman H, Halliwell B (1996): Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer; *Biochem J* **313** 17-29
- Witherell HL, Hiatt RA, Replogle M, Parsonnet J (1998): Helicobacter pylori infection and urinary excretion of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine, an oxidative DNA adduct; *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **7** 91-96
- Witschi H, Espiritu I, Pinkerton KE, Murphy K, Maronpot RR (1999): Ozone carcinogenesis revisited; *Toxicol Sci* **52** 162-167

Witschi H, Wilson DW, Plopper CG (1993): Modulation of N-nitrosodiethylamine-induced hamster lung tumors by ozone; *Toxicology* **77** 193-202

Wood ML, Dizdaroglu M, Gajewski E, Essigman JM (1990): Mechanistic studies of ionizing radiation and oxidative mutagenesis: genetic effects of single 8-hydroxyguanine (7-hydroxy-8-oxoguanine) residue inserted at a unique site in a viral genome; *Biochemistry* **29** 7024-7032

Yagi K (1976): A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma; *Biochem Res* **15** 212-216

Yamano Y, Kagawa J, Hanaoka T, Takahashi T, Kasai H, Tsugane S, Watanabe S (1995): Oxidative DNA damage induced by silica in vivo; *Environ Res* **69** 102-107

Yarborough A, Zhang YJ, Hsu TM, Santella RM (1996): Immunoperoxidase detection of 8-hydroxydeoxyguanosine in aflatoxin B1-treated rat liver and human oral mucosal cells; *Cancer Res* **56** 683-688

Yin B, Whyatt RM, Perera FP, Randall MC, Cooper TB, Santella RM (1995): Determination of 8-hydroxydeoxyguanosine by an immunoaffinity chromatography-monoclonal antibody-based ELISA; *Free Radic Biol Med* **18** 1023-1032

Yip R (1994): Changes in Iron Metabolism with age; 427-448
In: Brock JH, Halliday JW, Pippard MJ, Powell LW (Hrsg.): Iron metabolism in health and disease; WB Saunders London

Zeisig M, Hofer T, Cadet J, Moller L (1999): ³²P-Postlabeling high-performance liquid chromatography (³²P-HPLC) adapted for analysis of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; *Carcinogenesis* **20** 1241-1245

Zelac RE, Cromroy HL, Bolch WE, Dunavant BG, Bevis HA (1971): Inhaled ozone as a mutagen, I: Chromosome aberrations induced in Chinese hamster lymphocytes; *Environ Res* **4** 262-282

Zhang QM, Ishikawa N, Nakahra R, Yonei S (1998): *Escherichia coli* Mut Y protein has a guanine-DNA glycosylase that acts on 7,8-dihydro-8-oxoguanine, guanine mispair to prevent spontaneous GC to CG transversions; *Nucleic Acids Res* **26** 4669-4675

Veröffentlichungen aus dieser Arbeit

ESCODD

Free Radic Res **32** (2000) 333-341

“Comparison of different methods of measuring 8-oxoguanine as a marker of oxidative DNA damage”

F. Reetz, A. Schönberger, B. Spiegelhalder, H. Bartsch

Cancer Res Clin Oncol **125S** (1999) 33

“Analysis of urinary 8-oxodeoxyguanosine by immunoaffinity chromatography and HPLC-ECD with gradient elution.”

10. AEK Symposium, Heidelberg 24. – 26. März 1999 (Poster)

A. Schönberger, **F. Reetz**, B. Spiegelhalder, H. Bartsch

“Detection and quantification of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by MALDI-TOF mass spectrometry.”

10. AEK Symposium, Heidelberg 24. – 26. März 1999 (Poster)

F. Reetz, A. Schönberger, B. Spiegelhalder, H. Bartsch

“Analysis and identification of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by immunoaffinity chromatography and HPLC-ECD with gradient elution.”

4th Winter Research Conference of Club d'Etude des RADICAUX LIBRES en Biologie, Valloire 23. – 24. März 1999 (Poster)

F. Reetz, A. Schönberger, B. Spiegelhalder, H. Bartsch

“Markers of oxidative stress in rats after medium term ozone exposure”

Oxygen Club of California 2000 World Congress; Oxidants and Antioxidants in Biology Santa Barbara 1. – 4. März 2000 (Poster)

Dank

Ich danke allen, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, auch wenn sie im Einzelnen nicht genannt sind.

Herrn Prof. Dr. H. Bartsch und Herrn Dr. B. Spiegelhalder danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit am DKFZ durchführen zu können, für ihre jederzeit vorhandene Diskussionsbereitschaft und ihre wohlwollende Unterstützung, nicht nur in wissenschaftlichen Fragen.

Herrn Dr. A. Schönberger danke ich für die gute Zusammenarbeit im Labor, beim Tierexperiment und im ganzen Projekt, sowie die Durchführung des Plasmid-Relaxations-Assays in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von Prof. B. Epe.

Herrn G. Würtele danke ich für seinen „HPLC-Notdienst“ und die Aufarbeitung unzähliger Urinproben.

Herrn Dr. R. Klein, Frau M. Bonrouhi, Herrn P. Waas sowie Herrn H. Eskerski danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung des Tierversuchs. Herrn Dr. F. Amelung danke ich für die pathologische und histopathologische Begutachtung.

Herrn Prof. H. Poulsen und Herrn Dr. A. Weimann danke ich für die freundliche Aufnahme in Ihrem Institut und die Möglichkeit, die Vergleichsmessungen mit LC-MS-MS durchzuführen.

Frau Dr. M. Schnölzer danke ich für die Aufnahme der MALDI-TOF-MS Spektren.

Frau Prof. D. Maier danke ich für einen Crashkurs in Immunhistochemie.

Bei meinen Kollegen aus dem „Technopark“ bedanke ich mich für eine schöne Zeit.

Frau Dr. S. Meiers danke ich für das Korrekturlesen des Manuskripts, sowie jahrelange Freundschaft und ihre aufmunternden Worte.

Herrn Prof. G. Eisenbrand danke ich dafür, daß er während meines Studiums mein Interesse an der Toxikologie geweckt hat, sowie seine Diskussionsbereitschaft und seinen wohlwollenden Rat.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, ohne die ich nie so weit gekommen wäre.

Lebenslauf

Name: Frank Reetz
Adresse: Jakob-Böhme-Straße 8
51065 Köln
Geburtsdatum: 11. Mai 1971
Geburtsort: Ludwigshafen am Rhein
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

08/1977 – 07/1980 Grundschule Albert-Schweitzer-Schule
Ludwigshafen am Rhein
08/1980 – 06/1990 Carl-Bosch-Gymnasium
Ludwigshafen am Rhein
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife
07/1990 – 06/1991 Wehrdienst

Studium:

10/1991 – 02/1997 Universität Kaiserslautern
Chemie (Diplom)
12/1993 Vordiplom
09/1994 – 12/1994 Auslandsaufenthalt (ERASMUS-Programm)
Odense Universität, Dänemark
05/1996 – 02/1997 Diplomarbeit Ciba-Geigy AG, Basel, Schweiz
Abteilung Toxikologie/Zellbiologie
02/1997 Diplom
03/1997 – 06/2000 Doktorand am
Deutschen Krebsforschungszentrum, Heidelberg
Abteilung Toxikologie und Krebsrisikofaktoren

Berufstätigkeit

seit 07/2000 Laborleiter BAYER AG, Leverkusen
Geschäftsbereich Pharma, Produktentwicklung