

Projekt Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung (BWPLUS)

Forschungsbericht FZKA-BWPLUS

**Untersuchung der zellulären Wirkung von Ozon:
Entwicklung einer nicht-invasiven Methode zum Nachweis oxidativ
veränderter DNA-Basen.**

von

B. Spiegelhalder, A. Schönberger, F. Reetz

*Deutsches Krebsforschungszentrum
Abteilung Toxikologie und Krebsrisikofaktoren*

Heidelberg

Die Arbeiten des Projektes "Umwelt und Gesundheit" wurden mit Mitteln des Landes
Baden-Württemberg gefördert

Förderkennzeichen: PUG L 96003

44 Seiten
3 Tabellen
11 Abbildungen
94 Literaturstellen

August 1999

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	3
SUMMARY	5
1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG.....	6
1.1. Ozon und oxidativer Stress	7
1.2. MALDI-TOF Massenspektrometrie	10
1.3. Zielsetzung.....	11
2. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	13
2.1. In-vitro DNA-Schädigung durch Ozon.....	13
2.1.1. Ozoninduzierte DNA-Schäden in isolierter pBr322 Plasmid-DNA mittels Relaxations-Assay.....	13
2.1.2. Ozoninduzierte DNA-Schäden in zellulären Systemen mittels Comet-Assay.....	14
2.2. Methodenentwicklung zur nicht-invasiven Bestimmung von 8-oxodG.....	16
2.2.1. Immunoaffinitätschromatographische Aufreinigung von 8-oxodG.....	16
2.2.2. Entwicklung einer MALDI-TOF massenspektrometrischen Bestimmung von 8-oxodG	18
2.2.3. Bestimmung von 8-oxodG im Urin HPLC-ECD	23
2.2.4. Bestimmung von 8-oxodG in DNA aus Blut mittels HPLC-ECD	25
2.3. Tierversuch	26
2.3.1. Durchführung der tierexperimentellen Ozon-Inhalationsexpositionen	26
3. AUSBLICK	28
4. MATERIAL UND METHODEN	29
4.1. Einzelzellgelelektrophorese (SCGE, Comet-Assay).....	29
4.2. DNA-Isolierung und -Hydrolyse.....	29
4.3. Antikörperproduktion monoklonaler Antikörper 1F7.....	30
4.4. Immobilisierung von monoklonalem Antikörper 1F7	30
4.5. Immunoaffinitätschromatographie von Urin	30
4.6. HPLC-Analytik.....	31
DANKSAGUNG	32
VERÖFFENTLICHUNGEN	33
5. LITERATUR.....	34

Zusammenfassung

Unter der Fragestellung, ob Ozon bei Inhalation umweltrelevanter Konzentrationen in der Lage ist, oxidativen Streß und damit oxidierte DNA Basen zu verursachen, sollte ein neues Nachweisverfahren für oxidierte DNA Basen, insbesondere especially 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosine (8-oxodG), entwickelt werden. Dies sollte basierend auf der "matrix assisted laser desorption ionisation time of flight mass spectrometry" ("MALDI-TOF" MS) sowohl die Identifikation als auch die Quantifizierung des Analyten erlauben. Aus dem Potential von Ozon, oxidativen Streß zu verursachen und oxidierte DNA-Basen zu induzieren, welche Mutationen verursachen können und damit potentiell Krebs verursachen können, sollte eine Aussage über dessen Gentoxizität unter umweltrelevanten Bedingungen getroffen werden.

Im Rahmen von Vorversuchen wurden HL60 Zellen gegenüber verschiedenen Ozonkonzentrationen exponiert. Durch den mit FPG-Protein modifizierten Comet-Assay konnten ab einer Konzentration von 8 mg/m³ und einer Expositionszeit von 30 min eine Zunahme der DNA-Strangbrüche und der FPG-sensitiven Läsionen beobachtet werden. Daß der Effekt erst bei relativ hohen, nicht umweltrelevanten Konzentrationen auftritt, liegt an der geringen Empfindlichkeit dieser Zelllinie gegenüber oxidativer Schädigung, wie durch weitere Untersuchungen nachgewiesen werden konnte. Ferner wurde ein Schadensprofil durch Einsatz verschiedener Reparaturenzyme im Plasmid-Relaxation-Assay für die Ozonschädigung an isolierter Plasmid-DNA aufgenommen. Hier überwiegt die Bildung FPG- und Endonuklease-III sensitiver Läsionen. Ein solches Schadensprofil wurde bisher durch keinen anderen oxidativen Einfluß beobachtet. Durch weitere Untersuchungen ließe sich hieraus ein Einblick in die mechanistischen Aspekte der Ozonreaktion mit DNA gewinnen. Ebenfalls wurden die Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit des Effekts überprüft.

Zum massenspektrometrischen Nachweis von 8-oxodG aus Urin war es nötig, zunächst den Analyten aufzukonzentrieren und zu reinigen. Hierzu mußte eine neue Immunoaffinitätschromatographie entwickelt, da die in der Literatur beschriebene nicht verwendet werden konnte. Unter Verwendung eines neuen Aufreinigungsverfahrens zur Isolierung des monoklonalen Antikörpers 1F7 aus Zellkulturüberstand war es möglich, Immunoaffinitätssäulen mit hoher Kapazität und Spezifität herzustellen. Die immunoaffinitätschromatographische Aufreinigung wurde validiert und die Wiederfindung mit 85 % bestimmt.

Bei der Entwicklung der MALDI-TOF MS Methode mußte zunächst die Fragmentierung des Analyten, die zwar einerseits eine zusätzliche Identifikation erlaubt, aber andererseits die Nachweisgrenze verschlechtert, unterdrückt werden. Dies gelang durch Verwendung von 2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäure als Matrixmaterial und einen schichtförmigen Matrixaufbau (Laminat Matrix – Probe – Matrix). Hiermit konnte die Nachweisgrenze für synthetischen 8-oxodG Standard auf ca. 1 pmol gesenkt werden. Allerdings erhöhte sich die Nachweisgrenze nach Immunoaffinitätschromatographie durch zusätzliche Matrixeffekte auf über 5 pmol, so daß das Verfahren zur Messung von Urinproben unter den gegenwärtigen apparativen Bedingungen nicht empfindlich genug ist. Da das Verfahren jedoch eine gute Korrelation mit Vergleichsmethoden (HPLC mit elektrochemischer Detektion zeigt) ($R^2 = 0,90$), beinhaltet es noch ein großes Entwicklungspotential.

Als Vergleichsmethode wurde ein HPLC-Verfahren mit elektrochemischer Detektion zur Analyse von immunoaffinitätsaufgereinigtem Urin entwickelt. Unter Verwendung von Gradientenelution konnten zwei dicht beieinander eluierende, elektrochemisch aktive Peaks getrennt werden. Der erste wurde anhand seiner Retentionszeit und seines hydrodynamischen Voltammogramms als 8-oxodG identifiziert.

Zum Nachweis von 8-oxodG in lymphozytärer DNA wurde ein Verfahren entwickelt, welche die Artefaktbildung minimiert und eine exakte Quantifizierung des Analyten zulässt. Dies erfolgt durch HPLC mit elektrochemischer Detektion nachdem die DNA unter Verwendung eines speziellen Isolierungs- und Hydrolyseverfahrens aufbereitet wurde. Die gemessenen Werte lagen in der Größenordnungen $10 - 100 \text{ 8-oxodG} / 10^8 \text{ dG}$.

Im Rahmen der tierexperimentellen Arbeiten wurden vier Gruppen von je 8 männlichen Fischer F344-Ratten nach der Methode der "nose-only"-Applikation 1.5 Stunden pro Tag gegenüber Ozonkonzentrationen von 30 – 50 (Raumluft), 200, 500 und 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ exponiert. Wöchentlich wurde 24-h Urin gesammelt, vierzehntägig wurden Blutproben entnommen.

Die gesammelten Proben werden zur Zeit auf den 8-oxodG-Gehalt in lymphozytärer DNA und im Urin analysiert.

Summary

Knowledge about the potential of ozone to induce oxidative stress and oxidized DNA bases, which can lead to mutations and potentially cancer, should provide the possibility to predict its genotoxicity under environmentally relevant conditions.

Therefore a new analytical method to investigate whether in environmentally relevant concentrations, ozone, is able to induce oxidized DNA bases especially 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) and thereby oxidative stress has been developed. This is based on matrix assisted laser desorption ionisation time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) which not only confirms the identity, but also allows quantitation of the DNA-adduct. In initial experiments HL60 cells were exposed to varying concentrations of ozone. Using the FPG modified comet assay it was possible to show induction of DNA strand breaks and FPG sensitive lesions at an ozone concentration of 8 mg/m³ (lower concentrations were ineffective) and exposure time of 30 minutes. The high concentration necessary to cause damage was due to a low susceptibility of this cell line to oxidative damage, as could be shown by further experiments. Furthermore a damage profile for ozone induced damage in isolated plasmid DNA was recorded using different repair enzymes and the plasmid relaxation assay. The predominant lesions induced were endonuclease-III and FPG sensitive sites. This novel profile has not yet been observed with other oxidizing agents.

For the mass-spectrometric determination of 8-oxodG in urine it was necessary to isolate and concentrate the analyte. For this a new immunoaffinity chromatography method was developed due to the unreliability of published methods. Using this new procedure for the isolation of monoclonal antibody 1F7 from cell culture supernatants it was possible to build immunoaffinity columns with high affinity and capacity. The immunoaffinity chromatographic purification of urine was validated and recovery determined as 85 %.

When developing the MALDI-TOF MS method it was necessary to overcome the fragmentation of the analyte, which allows additional identification on the one hand but increases the detection limit on the other. This was achieved by using 2-hydroxy-5-methoxybenzoic acid as matrix material and a sandwich preparation technique (laminated matrix – sample – matrix) allowing the detection limit of synthetic 8-oxodG to be lowered to approx. 1 pmol. This detection limit however could not be achieved after immunoaffinity chromatography of urine but nevertheless the method shows a good correlation with other published works (HPLC with electrochemical detection) ($R^2 = 0.90$), and potential for further development is evident.

To overcome this, a HPLC-method with electrochemical detection was developed for the analysis of immunoaffinity purified urine. Using a gradient elution technique, two closely eluting electrochemically active peaks could be detected and separated the first of which was identified as 8-oxodG by its retention time and hydrodynamic voltammogramme.

For the determination of 8-oxodG in DNA from lymphocytes method was developed, which minimized artefactual oxidation and allowed exact quantitation of the analyte. This was done by HPLC with electrochemical detection after the DNA had been prepared using a special isolation method and hydrolytic protocol. The values thus determined were in the range of 10 – 100 8-oxodG / 10⁻⁸ dG.

Animal experiments were carried out by exposing four groups of 8 male Fischer F344 rats by nose-only application to ozone concentrations of 30 – 50 (ambient air), 200, 500 and 1000 µg/m³ for 1.5 h per day, five days a week. Urine (24 h) was collected weekly and blood samples were obtained every two weeks.

Analysis of 8-oxodG in DNA isolated from lymphocytes and urine from the control and exposed rats is currently in progress.

1. Einleitung und Zielsetzung

Durch reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) induzierte Zellschäden spielen eine wichtige Rolle beim Alterungsprozess (Lenaz *et al.* 1998; Roche and Romero Alvira, 1993; Bohr *et al.* 1998) und bei vielen Krankheiten (Aruoma *et al.* 1991; Knight, 1998), z. B. Krebs (Guyton and Kensler, 1993; Dreher and Junod, 1996; Wiseman *et al.* 1995), Herzkrankheiten (Kaul *et al.* 1993; Vogel, 1997) und Arthritis (Mapp *et al.* 1995). Neben anderen Biomolekülen stellt die DNA ein Haupttarget für den Angriff von ROS dar. Als charakteristische oxidative DNA-Läsion ist 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosin (8-OxodG) besonders gut untersucht (Kasai, 1997). Es hat sich in zahlreichen Studien als Biomarker im Bereich des oxidativen Stress bewährt (Helbock *et al.* 1999; Loft and Poulsen, 1998). Oxidativer Stress entsteht, wenn der Angriff von ROS nicht mehr von der körpereigenen Abwehr in Form von Antioxidantien oder Reparaturmechanismen, kompensiert werden kann (Sies, 1991; Spiteller, 1993). Insbesondere auch im Hinblick auf präventive Maßnahmen im Gesundheitswesen besteht Bedarf an einfachen Methoden zur zuverlässigen und schnellen Bestimmung oxidativer DNA-Schäden, wie beispielsweise 8-OxodG. Mittels solcher Methoden liesse sich ein effizientes und breitangelegtes "Population Monitoring" realisieren. Letzteres erlaubt die verlässliche Bestimmung des Expositionsausmaßes von Bevölkerungsgruppen und damit eine fundierte Risikoabschätzung mit der Chance für wirkungsvolle Präventionsmaßnahmen.

Bereits seit vielen Jahren nimmt die öffentliche Diskussion über gesundheitliche Auswirkung erhöhter Ozonkonzentrationen, insbesondere in den heissen Sommermonaten, einen breiten Raum ein. Ozon, ein starkes, gasförmiges Oxidationsmittel, gilt als Hauptkomponente des als Sommersmog oder Photosmog bezeichneten Luftschadstoffgemisches (Barnes and Becker, 1995). Aufgrund bisheriger Erkenntnisse werden vom Gesetzgeber Maßnahmen zum Schutz der Bevölkerung erlassen, beispielweise grenzwertabhängige Fahrverbote oder Empfehlungen über den Aufenthalt im Freien für bestimmte Bevölkerungsgruppen. Die toxikologische Beurteilung für Ozon gestaltet sich jedoch bis zum heutigen Zeitpunkt äusserst schwierig (Bock *et al.* 1998). Dies liegt sicherlich einerseits am bislang unzureichenden Kenntnisstand, insbesondere im umweltrelevanten Konzentrationsbereich, und an den vielfältigen Wechselwirkungen mit anderen Komponenten des Sommersmogs (z. B. Stickoxide, Partikel, Kohlenwasserstoffe). Andererseits sind die im Tierversuch erhaltenen Erkenntnisse über die Ozonwirkung schwer auf den Menschen übertragbar. Die beobachteten und bislang wenig untersuchten Adaptionsprozesse erschweren ein Urteil zusätzlich. Speziell was das genotoxische Potential von Ozon anbelangt sind die bisherigen Erkenntnisse ungenügend, teilweise widersprüchlich oder, aufgrund unrealistisch hoher Ozondosen, wenig aussagekräftig (Victorin, 1992; Victorin, 1996). Vereinzelt Ergebnisse deuten jedoch auf einen mutagenen Effekt von Ozon hin, was die MAK-Kommission veranlasst hat, Ozon in der neuen MAK-Werte Liste in den Abschnitt II B (Stoffe mit begründetem Verdacht auf krebserzeugendes Potential) einzustufen. Der MAK-Wert für Ozon wurde ausgesetzt. Allgemein besteht vorallem bezüglich der in-vivo Reaktivität von Ozon mit Nukleinsäuren ein dringender Bedarf zur Aufklärung der Wirkungsmechanismen, wobei der Bildung oxidierten DNA-Basen aufgrund ihres mutagenen Potentials eine besondere Rolle zufällt. Die Ausscheidung von DNA-Reparaturprodukten stellt hierfür sehr gut geeignete Marker dar, da diese nicht-invasiv auf einfache Weise zugänglich sind (Loft and Poulsen, 1998).

1.1. Ozon und oxidativer Stress

Während das stratosphärisch vorkommende Ozon eine Schutzfunktion ausübt, indem es den grössten Teil der von der Sonne emittierten kurzwelligeren UV-Strahlung absorbiert, besitzt das troposphärische Ozon eher nachteilige Wirkung für Menschen, Tiere und Pflanzen. Ozon (griech: das Riechende) ist ein Spurengas, was bereits in Konzentrationen ab 50 µg/m³ Luft vom Menschen geruchlich wahrgenommen werden kann. Aus physiologischer Sicht sind neben seiner hohen Oxidationskraft (+2,07 V), seine geringe Wasserlöslichkeit (1,09 g/kg bei 0°C, 0,27 g/kg bei 40°C) und seine Instabilität in Gegenwart anorganischer (z. B. katalytischer Mengen von Übergangsmetallen) oder organischer Verbindungen von Bedeutung (Kirschner, 1999). Die troposphärische Bildung von Ozon kann neben natürlichen auch anthropogenen Ursprungs sein. Bei diesem, Sommer- oder Photo-smog genannten Vorgang, wird aus zweiatomigen Sauerstoff (O₂) unter Lichteinwirkung in Gegenwart von Stickoxiden und Kohlenwasserstoffen, den sogenannten "Vorläufersubstanzen" oder "Präkursoren", die aus Landwirtschaft, Verkehr oder biogen emittiert werden, Ozon (O₃) gebildet. Da Ozon der mengenmässig bedeutendste Bestandteil des Photo-smogs ist, wird es auch als Leitsubstanz zur Einschätzung für dessen Intensität verwendet. Andere im Photo-smog enthaltene Substanzen sind beispielsweise Peroxyacetylnitrit (PAN) und Stickoxide in hohen Konzentrationen (Bayerisches Staatsministerium für Landesentwicklung und Umweltfragen, 1995).

Obwohl Ozon kein freies Radikal ist, wurde bereits in frühen Studien gezeigt, daß die toxische Wirkung von Ozon mit der von freien Radikalen vergleichbar ist (Menzel, 1970). Heute besteht allgemeines Einverständnis darin, daß die Reaktivität von Ozon mit organischen Molekülen unter physiologischen Bedingungen eine Kombination ist aus den Reaktivitäten des Ozons an sich und verschiedener reaktiver Sauerstoffmetabolite, insbesondere der von Hydroxylradikalen (Cotgreave, 1996). Morphometrische Untersuchungen an Menschen zur Ozon-Absorption in der Lunge, dem Haupttarget der toxischen Wirkung, zeigten, daß 90 % des eingeatmeten Ozons vom Respirationstrakt absorbiert werden, wobei 30 – 40 % im oberen Atemtrakt verbleiben (Ultman *et al.* 1994). Allerdings wurde von Pryor postuliert, daß Ozon nicht die epitheliale Schleimhautschicht der Lunge durchdringt, und somit nicht in der Lage ist, systemisch zu zirkulieren, sondern an der "lung lining fluid layer" (LLFL) unter Bildung reaktiver aber stabilerer Spezies abreagiert, welche als solche physiologisch wirksam sind (Pryor, 1992). So kann Ozon mit ungesättigten Kohlenwasserstoffen, mit Aminen, mit endogenen Elektronendonoren, welche als Antioxidantien agieren (z. B. Glutathion) und mit Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren reagieren. Die regulatorische Anpassung der endogenen Oxidantienabwehr ist vermutlich verantwortlich für die im Tierversuch beobachteten Adaptionserscheinungen (Bassett *et al.* 1988). In vitro Studien bezüglich der Reaktion von Ozon mit Lipiden zeigen, daß die, in der Zellmembran verestert vorliegenden, mehrfach ungesättigte Fettsäuren von Ozon unter Bildung freier Radikale angegriffen werden (Pryor *et al.* 1991). Es wird diskutiert, inwieweit dieser Reaktionsweg bei chronisch auftretenden Entzündungen infolge von Ozoninhalation eine Schlüsselrolle spielen könnte. Inwieweit die, an isolierten Verbindungen nachgewiesene Ozon-induzierte Oxidation von Proteinen, wie z. B. Cystein, Methionin, Tryptophan und Tyrosin, auch physiologisch relevant ist, konnte bislang nicht abschliessend geklärt werden (DeLucia *et al.* 1975). Daß Ozon mit isolierten Nukleinsäuren reagiert, ist bereits länger bekannt (Ishizaki *et al.* 1981). In doppelsträngiger Plasmid DNA wurden Einzel- und Doppelstrangbrüche festgestellt (Hamelin, 1985), welche zur Linearisierung bzw. dem Bruch des Plasmids führen. Mit isolierten Nukleosiden (dT, dC) sind eine Vielzahl von Produkten charakterisiert worden (Girault *et al.* 1994; Girault *et al.* 1997). In intakten Zellen wurde neben Einzelstrangbrüchen, interstrand crosslinks und DNA-Protein crosslinks nachgewiesen (Van der Zee *et al.* 1987). Allerdings wurden für diese Studien für

Umweltbedingungen irrelevant hohe Ozondosen eingesetzt. Da bekannt ist, daß reaktive Sauerstoffspezies eine Vielzahl von Modifikationen am DNA-Strang hervorrufen können, erhält die Frage nach Ozon-induzierten DNA-Läsionen ein besonderes Augenmerk hinsichtlich der Ozonproblematik, gerade auch bezüglich mechanistischer Aspekte Ozon-induzierter Gentoxizität (Cotgreave, 1996).

Aufgrund der Reaktivität von Ozon mit DNA, welche in-vitro zur Bildung von DNA-Modifikationen führt bzw. deren Abbau direkt oder indirekt über radikalische Spezies induziert, wurde eine Reihe von Untersuchungen bezüglich der Gentoxizität von Ozon durchgeführt (Victorin, 1996). So wurden nach Durchleiten von Ozon durch Bakteriensuspensionen Rück- und Vorwärtsmutationen sowie DNA-Strangbrüche nachgewiesen. Im Ames Test liegt ein positives Ergebnis an Salmonella TA 102 vor, während andere Stämme (TA 100, 98, 104 und 1535) keine mutagenen Effekte zeigten (Dillon *et al.* 1992). Gentoxizitätsstudien an isolierten Zellen zeigten, daß Chromatid- und Chromosomenschäden durch Ozon induziert werden (Gooch *et al.* 1976). So wurden in verschiedenen tierischen und menschlichen Zelllinien Schwesterchromatidaustausch (sister chromatid exchange, SCE) nachgewiesen (Guerrero *et al.* 1979). Insgesamt zeigen die in-vitro Studien, in Übereinstimmung mit der Reaktivität von Ozon gegenüber isolierter DNA, daß Ozon in Mikroorganismen und kultivierten Zellen gentoxische Effekte induziert. In Zellkulturen tritt SCE beispielsweise bei Ozonkonzentrationen ab 0.3 – 2 mg/m³ auf (Shiraishi and Bandow, 1985).

In-vivo Gentoxizität-Studien wurden an verschiedenen Nagetieren und an Menschen durchgeführt. Diese Versuche zeigen ein uneinheitliches Bild und sind teilweise widersprüchlich. So wurden in frühen Inhalationsversuchen mit weiblichen chinesischen Hamstern (0.48 und 0.6 mg/m³ Ozon, 5 h Expositionsdauer) chromosomenartige Aberrationen in Lymphozyten beobachtet (Zelac *et al.* 1971). In späteren Versuchen konnten hingegen nur chromatidartige Aberrationen nachgewiesen werden (Tice *et al.* 1978). Zusätzlich wurde in diesen Versuchen, im Gegensatz zu zahlreichen Befunden der in-vitro Studien, kein durch Ozon induzierter lymphozytärer Schwesterchromatidaustausch (SCE) festgestellt. Bei Inhalationsversuchen mit Mäusen (bis 2 mg/m³ für 2 h, bzw. 0,42 mg/m³ für 5 h) konnten keine Aberrationen bzw. SCE nachgewiesen werden, weder in Lymphocyten, noch in Knochenmarkszellen (Tice *et al.* 1978). Nach Exposition weiblicher F334/N-Ratten ab 0.43 mg/m³ bei 6 h Expositionsdauer zeigt eine Studie die Bildung chromatidartiger Aberrationen in Lungenmakrophagen (Rithidech *et al.* 1990). Chromosomenartige Aberrationen konnten in diesen Versuchen allerdings nicht detektiert werden. Experimentelle und epidemiologische Studien an Menschen sind bisher nicht aussagekräftig genug, um cytogenetische Effekte in Lymphocyten abschätzen zu können (Merz *et al.* 1975; Sarto and Viola, 1980).

Es besteht allgemeiner Konsens darüber, daß die physiologische Reaktivität von Ozon, auch die teilweise beobachteten gentoxischen Effekte, auf die Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zurückzuführen ist (Cotgreave, 1996). Beobachtungen der letzten Jahre haben die Schlüsselrolle bestätigt, die ROS und reaktive Stickstoffspezies (RNS) beim Alterungsprozess und bei der Entwicklung verschiedener Krankheiten spielen (Knight, 1998). Ein Schwerpunkt diesbezüglicher Untersuchungen liegt bei entzündlichen Prozessen (Chapple, 1997) und in der Kanzerogenese (Dreher and Junod, 1996). Die Bezeichnung ROS umfasst radikalische und nichtradikalische Sauerstoffmoleküle, wie z. B. Superoxidradikalanionen (O₂^{•-}), Hydroxylradikale (HO[•]), Peroxyl- (ROO[•]) und Alkoxyradikale (RO[•]) sowie Peroxynitrit (ONOO⁻), Singulett-Sauerstoff (¹O₂), Ozon (O₃) Hypochlorit (HOCl) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂). Als RNS bezeichnet man Stickstoffradikale, beispielsweise NO[•], NO₂[•] und das

nichtradikalische ONOO⁻ inklusive der Reaktionsprodukte des Stickstoffoxids (NO[•]) mit O₂^{•-}, ONOO⁻, ROO[•] oder RO[•]. Freigesetzt werden ROS und RNS einerseits metabolisch (endogen), andererseits kann ihre Bildung auch durch exogene Einflüsse (Strahlung, Chemikalien) initiiert werden (Cadet *et al.* 1997). Obwohl die Reaktivität dieser Moleküle sehr unterschiedlich ist, vom eher wenig reaktiven H₂O₂, NO[•] oder O₂^{•-} bis zum stark reaktiven und kurzlebigen HO[•], hat sich gezeigt, daß ihre biologische Wirksamkeit in vielen Aspekten derjenigen kanzerogener Stoffe ähnelt. Nach dem Dreistufenmodell der Krebsentstehung wird den ROS/RNS sowohl bei der Krebsinitiation als auch bei der Krebspromotion und Progression eine wichtige Rolle zugeschrieben. Bezüglich der Krebsentwicklung kann die Reaktivität von ROS/RNS gegenüber Biomolekülen einerseits zu strukturellen Veränderungen der DNA führen, andererseits sind ROS/RNS in der Lage, die Aktivität verschiedener Proteine und Gene oder die zellulären Signalübertragungswege zu beeinflussen (Wiseman and Halliwell, 1996). Unter den zahlreichen Möglichkeiten der oxidativen DNA-Modifizierung, wie z. B. Basenpaarung, Strangbruch oder Adduktbildung stellt letztere, d.h. die Bildung oxidativer DNA-Basenmodifikationen ein intensiv untersuchtes Gebiet dar. Bislang sind ungefähr 20 oxidative DNA-Addukte strukturell charakterisiert (Henle *et al.* 1996). Am besten untersucht und als charakteristischer DNA-Oxidationsmarker etabliert ist die Guaninmodifikation 8-OxodG (Kasai, 1997). Dieses Addukt führt zu G:C nach T:A Transversionen und besitzt damit mutagene Eigenschaften (Cunningham, 1997). Allerdings existiert für diese DNA-Läsion ein spezifisches DNA-Reparaturenzymsystem, so daß in-vivo ein Grossteil des Schadens in Form des monomeren Reparaturproduktes ohne weiteren Metabolismus mit dem Urin ausgeschieden wird. Zwei spezifische Reparaturenzyme, eines mit Glykosylase- und eines mit Nukleotidexcisionsaktivität, wurden in menschlichen Zelllinien extrahiert (Dianov *et al.* 1998; Le Page *et al.* 1998). Ausserdem kann das mittels einer 8-oxodGMP Nukleotidase freigesetzte Nukleotid durch 8-oxodG-Phosphatase schnell und selektiv zum oxidierten Nukleosid dephosphorylieren. Das Monitoring von 8-oxodG im Urin stellt somit eine exzellente Möglichkeit dar, auf nicht-invasivem Weg die oxidative Gesamtbelastung von Individuen zu bestimmen (Loft and Poulsen, 1998). Zusätzlich lässt sich der oxidative Status durch die Bestimmung der DNA-Adduktfrequenz in Gewebe-DNA oder DNA aus Blut bestimmen (Wiseman *et al.* 1995).

Zum Nachweis von 8-oxodG im Urin sind eine Reihe von Nachweismethoden entwickelt worden (Collins *et al.* 1997). Neben GC/MS, welche erlaubt, die Gesamtheit oxidativer DNA-Basen zu bestimmen (Dizdaroglu and Bergtold, 1986; Teixeira *et al.* 1993), stellt die hochleistungsflüssigkeitschromatographische (HPLC) Auftrennung mit elektrochemischer Detektion (ECD) eine spezifische und die weitverbreiteste Methode für die Quantifizierung von 8-oxodG dar (Floyd *et al.* 1990). Speziell beim Nachweis im Urin ist die selektive Abtrennung der vergleichsweise geringen Menge an 8-oxodG eine Herausforderung, die extensive Aufreinigungsschritte notwendig macht (Shigenaga *et al.* 1990; Loft *et al.* 1992; Tagesson *et al.* 1995; Germadnik *et al.* 1997). Hierfür sind mehrstufige Festphasenextraktion, mehrdimensionale HPLC oder Immunoaffinitätschromatographie mit spezifisch an 8-oxodG-bindenden Antikörpern im Einsatz (Toyokuni *et al.* 1997; Yin *et al.* 1995; Park *et al.* 1992). Diese komplexen Aufreinigungsschritte können allerdings Probleme mit der Wiederfindung des Analyten zur Folge haben und limitieren aufgrund des hohen Zeitaufwandes einen hohen Analysendurchsatz. Ein vor kurzem entwickelter ELISA-Test, basierend auf einem spezifischen, monoklonalen Antikörper, liefert mit Urinproben von Ratten um das vier- bis fünffache und mit menschlichen Urinproben sogar um das achtfache höhere Werte, als die bereits veröffentlichten (Loft and Poulsen, 1998). Ausserdem korrelieren die mittels ELISA gewonnenen Werte nur ungenügend mit den mittels HPLC gewonnenen Daten ($r^2 = 0.42$). Die auch in HPLC-Messungen beobachtete interindividuelle Varianz sowie starke Schwankungen der

Analysenergebnissen verschiedener Labors erschweren eine zuverlässige Aussage über die wahre Menge an 8-oxodG und führten dazu, ähnlich wie im Fall der lymphozytären 8-oxodG-Bestimmung, nach Alternativmethoden zu suchen (Collins *et al.* 1997; Helbock *et al.* 1998). Eine solche Alternativmethode könnte die Detektion über MALDI-TOF-MS nach vorheriger Immunoaffinitätsaufreinigung darstellen.

1.2. MALDI-TOF Massenspektrometrie

Matrix-assisted-laser desorption ionization (MALDI) time of flight (TOF) Massenspektrometrie (MS) ist eine relativ junge "weiche" Ionisierungstechnik, die es erlaubt quasimolekulare Ionen grosser Moleküle bis zu einigen hunderttausend Dalton massenspektrometrisch zu bestimmen (Karas and Hillenkamp, 1988; Costello, 1997). Das Prinzip der MALDI-TOF MS beruht auf der Anregung chromophorer, kristallin auf einem Target vorliegenden Matrixmoleküle (meist organische Säuren) mittels Laserlicht. Die absorbierte Energie wird an die, in der Matrix eingebetteten, Probenmoleküle weitergegeben, wodurch diese desorbiert und ionisiert werden. Im Flugrohr werden diese ionisierten Probenmoleküle durch ein elektrisches Feld beschleunigt. Durch ihren masseabhängigen Impuls legen sie die Flugstrecke bis zum Detektor in unterschiedlicher Zeit zurück. Durch Computerauswertung kann die Molekularmasse der Probenmoleküle über die Flugzeit sehr genau ermittelt werden.

Die Effizienz des MALDI-Prozesses und damit die Signalstärke hängt wesentlich von der Effizienz der Energieübertragung zwischen Matrix- und Probenmolekül ab. Die Wahl der Matrix entscheidet daher grundsätzlich über den Erfolg einer Messung, wobei unterschiedliche Substanzen meist verschiedene Matrizes verlangen (Fitzgerald *et al.* 1993). In jüngster Zeit wurde erkannt, daß nicht allein die Wahl der Matrixsubstanz entscheidenden Einfluss auf die Signalausbeute und Auflösung der Spektren hat, zum Teil die Aufnahme eines Spektrums erst ermöglicht, sondern daß zusätzlich die Präparation der Probe aus Matrix-Analyt von elementarer Bedeutung ist (Cohen and Chait, 1996). Desweiteren sind in den letzten Jahren Modifikationen in Form von Zusätzen entwickelt worden sowie die Targetoberflächen modifiziert worden, was in Einzelfällen zu Verbesserungen der Spektrenqualität geführt hat (Hung *et al.* 1998). Ziel dieser Maßnahmen ist die Herstellung definierter, möglichst homogener, mikrokristalliner bzw. polykristalliner Oberflächen. Neben diesen qualitativen Maßnahmen, bietet die MALDI-TOF MS durch Verwendung interner Standards die Möglichkeit Kalibrationskurven zu erstellen und damit Quantifizierungen durchzuführen (Bruenner *et al.* 1996).

In den letzten Jahren hat sich die MALDI-TOF MS zu einem äusserst wirkungsvollen Instrument für die Detektion und Charakterisierung von Biopolymeren entwickelt (Kaufmann, 1995). Neben den klassischen Anwendungsbereichen Peptiden und Proteinen (Hillenkamp and Karas, 1990; Yates, 1998) erlebt die Methode gerade im Bereich der Oligonukleotide und DNA-Addukte eine rasante Entwicklung (Fitzgerald and Smith, 1995; Stemmler *et al.* 1994). Die Methode bietet zahlreiche Vorteile, die durch geeignete Wahl der Matrixgestaltung optimiert werden können. Neben der hohen Sensitivität (1-10 fmol), sind die hohe Toleranz gegenüber organischen und anorganischen Verunreinigungen (z. B. Puffersalze), die hohe Messgenauigkeit (bis zu 0.001% bei kleinen Biomolekülen), die Schnelligkeit und die Automatisierbarkeit der Messung wesentliche Merkmale der MALDI-TOF MS, welche neue Anwendungsgebiete für diese Methode eröffnen.

Seit kurzem werden die Möglichkeiten der MALDI-TOF Analytik in den Bereich der Immunoassays weiterentwickelt, wobei grundsätzlich zwei Strategien verfolgt werden, die "on-line" oder "off-line" Konzepte zur Grundlage haben. Beide Kombinationen erlauben es,

die derzeit selektivste Separationstechnik - die Immunoaffinitätschromatographie (IAC) - mit der momentan empfindlichsten Detektionsmethode - der MALDI-TOF MS - zu verbinden.

Bei "on-line" Varianten wird der immobilisierte Antikörper gemeinsam mit dem Analyten auf das Target aufgebracht. Hierzu sind bislang zwei Methoden entwickelt worden. Einerseits die "surface-enhanced affinity capture" (SEAC) Methode, bei der an Agarose immobilisierte Antikörper (*beads*) mit Analysenlösung (z. B. Urin) versetzt werden (Hutchens and Yip, 1993). Nach Inkubation werden die *beads* abgetrennt, gewaschen und direkt auf das MALDI-Target aufgebracht. Diese Methode wurde anhand der Bestimmung von Lactoferrin im Urin von Frühgeborenen erprobt. Eine weitere "on-line" Variante ist die als "probe affinity mass spectrometry" (PAMS) Technologie bezeichnete Methode (Brockman and Orlando, 1995), bei der die Antikörper direkt auf dem MALDI-Target immobilisiert sind. Diese Methode wurde anhand der Bestimmung von Lysozym in Tränenflüssigkeit demonstriert.

Die "off-line" Versionen sind dadurch charakterisiert, daß der Analyt nach der Immunoaffinitätsaufreinigung isoliert, gesammelt und dann massenspektrometrisch analysiert wird. Man unterscheidet prinzipiell zwei "off-line" Varianten. Einerseits wird der Analyt nach Immunopräzipitation bestimmt (Nakanishi *et al.* 1994). Andererseits kann nach herkömmlicher IAC das Eluat mit dem aufgereinigten und aufkonzentrierten Analyten direkt auf das MALDI-Target verbracht und dieser direkt analysiert werden. Diese Methode wird allgemein als "mass spectrometric immunoassay" (MSIA) bezeichnet (Nelson *et al.* 1995). Sie wurde anhand der Bestimmung von Myotoxin A demonstriert.

Trotzdem in den oben genannten Fällen Proteine oder zumindest grössere Moleküle detektiert werden, sollten diese Verfahrensweisen prinzipiell auch zur Bestimmung des niedermolekularen 8-oxodG in Körperflüssigkeiten (Urin, Blutplasma) zu nutzen sein. Mittlerweile sind hochspezifische monoklonale Antikörper (monoclonal antibody, mAb) gegen 8-oxodG verfügbar, wobei der in der Arbeitsgruppe von R.M. Santella entwickelte mAb 1F7 einen der sensitivsten und selektivsten Varianten darstellt (Yin *et al.* 1995). Die Affinität für das unmodifizierte Nukleosid dG ist 20.000 fach geringer als für 8-oxodG. Die Anwendbarkeit des mAb 1F7 zur Quantifizierung von 8-oxodG konnte in einer Untersuchung (IAC und ELISA) mit Plazentagewebe unter Beweis gestellt werden. Allerdings lagen die immunologisch bestimmten Werte um das ca. 6-fache höher als die im Vergleich ermittelten Werte mit HPLC-ECD. Dieser erhöhte Wert wird auf Kreuzreaktivität des mAb mit anderen modifizierten DNA-Basen begründet. Für den Fall einer nachgeschalteten Massenspektrometrischen Bestimmung spielt diese Kreuzreaktivität allerdings eine untergeordnete Rolle, da die Substanzen zusätzlich über Ihre Molekularmasse charakterisiert werden.

1.3. Zielsetzung

Ziel des Projektes ist ein Beitrag zur Aufklärung der *in-vivo* Wirkungsweise von Ozon auf zellulärer Ebene. In diesem Bereich liegen derzeit nur ungenügende Kenntnisse vor. Im Vordergrund interessiert die Fragestellung, ob durch Ozon oxidative DNA-Modifikationen induziert werden. Als spezifischer Marker für oxidative DNA-Schädigung wird allgemein die oxidierte Purinmodifikation 8-oxodG betrachtet und in zahlreichen Studien als Biomarker für oxidativen Stress nachgewiesen. Die Tatsache, daß derzeit gängige Nachweismethoden für 8-oxodG zunehmend kontrovers diskutiert werden und der Aufwand für die Einzelanalyse zu hoch ist, um grösser angelegte Studien auf effiziente Weise durchzuführen, macht eine

methodische Neuentwicklung auf dem Gebiet der 8-oxodG-Analytik insgesamt äußerst attraktiv. Im Rahmen des Projektes soll eine neue Methode entwickelt werden, die als sogenannter massenspektrometrischer Immunoassay für 8-oxodG unter Verwendung von IAC und MALDI-TOF MS, eine zuverlässige und schnelle Quantifizierung von 8-oxodG in Körperflüssigkeiten, wie Urin oder Blutplasma, ermöglicht. Die IAC soll mit mAb 1F7 entwickelt werden, einem Antikörper aus den Labors von R. M. Santella, der bisher für IAC von Urin nicht etabliert ist. Die MALDI-TOF MS soll eine sensitive, einfache und genaue Quantifizierung von 8-oxodG in einem Analysenbereich praktikabler Probenmengen ermöglichen. Um die Zuverlässigkeit der Messungen zu überprüfen soll die neuartige MALDI-TOF MS Methode mit bereits etablierten HPLC-ECD Analyseverfahren verglichen werden.

Ob die Exposition mit Ozon in umweltrelevanten Dosen die Bildung von 8-oxodG induziert, soll in einem Inhalationsexperiment mit Ratten nachgewiesen werden. Während des Experiments gesammelte Urin und Blutproben werden auf die Menge an 8-oxodG hin untersucht. Nach Ende des Experiments sollen diese Daten mit dem Ausmaß an oxidativer DNA-Schädigung in den Zielgeweben (Lunge, oberer Atemtrakt) verglichen werden, um ein Gesamtbild über die DNA-Basen-oxidierende Wirkung der Ozoninhalation zu erhalten.

2. Ergebnisse und Diskussion

2.1. *In-vitro* DNA-Schädigung durch Ozon

2.1.1. Ozoninduzierte DNA-Schäden in isolierter pBr322 Plasmid-DNA mittels Relaxations-Assay

Mittels Untersuchungen an isolierter pBr322 Plasmid DNA kann allgemein überprüft werden, ob die DNA ein Target für die zu untersuchende Substanz ist. Aus der in Abb. 2.1.1.1

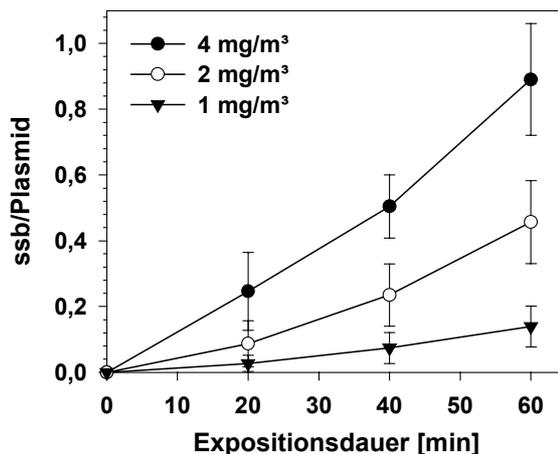


Abb. 2.1.1.1: Zeit-/Konzentrationsprofil der DNA-Einzelstrangbruchbildung (ssb) an *pBr322* DNA nach Ozonexposition. Bedingungen: 10 µg/mL DNA in PBS (pH 7,4), Gasfluß 6,8 mL/min, 20°C.

gezeigten dosisabhängigen DNA-Strangbruchbildung erkennt man einen nahezu linearen Anstieg der Einzelstrangbrüche mit der eingeleiteten Ozonkonzentration. Erste deutliche Strangbruchbildung an pBr322 konnte nach 60 minütiger Exposition mit 500 µg/m³ Ozon nachgewiesen werden. Unter Annahme quantitativer Ozonaufnahme ins Reaktionsmedium läßt sich errechnen, daß unter diesen Versuchsbedingungen 19 ± 6 Strangbrüche pro µmol eingeleitetes Ozon an einem Plasmid (ca. 5000 Basenpaare) gebildet werden.

Wird die ozonbehandelte DNA im Anschluss mit spezifischen DNA-Reparaturenzymen inkubiert, kann man auf die Art der Ozon-induzierten DNA-Modifikationen rückschliessen und erhält ein, für die am DNA-Schaden beteiligten reaktiven Spezies, charakteristisches DNA-Schadensprofil (Pflaum *et al.* 1997). Diese Versuche wurden in enger Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. B. Epe, Institut für Pharmazie/Universität Mainz durchgeführt. Für Ozon ist das Schadensprofil in Abb. 2.1.1.2 gezeigt. Deutlich ist eine überwiegende Bildung von FPG-Protein- und

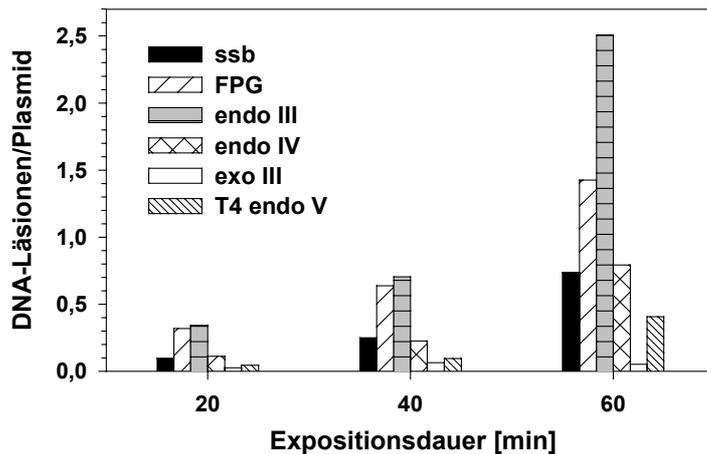


Abb. 2.1.1.2: DNA-Schadensprofil von PM_2 -DNA nach Exposition mit 2 mg/m^3 Ozon. Bedingungen siehe Abb. 3.1.1.1.1. Reparatursensitive Läsionen sind nach Abzug spontaner ssb angegeben.

Endonuklease-III sensitive DNA-Läsionen zu erkennen. Endonuklease-IV sensitive Läsionen und Einzelstrangbrüche werden signifikant weniger gebildet, während Exonuklease-III und T4-Endonuklease-V sensitive Läsionen keinen wesentlichen Anteil am gesamten DNA-Schaden beitragen. Im zeitlichen Verlauf bleibt die relative Verteilung der DNA-Schäden annähernd konstant.

Die Untersuchungen mit isolierter Plasmid-DNA als Modellsubstanz zeigen, daß Reaktionen zwischen Ozon und DNA bislang erst oberhalb von $500 \text{ } \mu\text{g/m}^3$ Ozon effizient verlaufen. Dabei überwiegt die Bildung von FPG-sensitiven und Endonuklease III-sensitiven Läsionen deutlich die Anzahl der DNA-Einzelstrangbrüche. Dies weist auf die signifikante Bildung oxidierter Basenmodifikationen beispielsweise in Form von 8-oxodG bzw. Thyminglycol hin (Milligan *et al.* 1999).

2.1.2. Ozoninduzierte DNA-Schäden in zellulären Systemen mittels Comet-Assay

Zur Evaluierung der DNA-schädigenden Wirkung von Ozon in zellulären Systemen bietet sich neben der alkalischen Elutionsmethode (Haring *et al.* 1994), der FPG-Protein-modifizierter Comet-Assay an (Piperakis *et al.* 1999; Kruszewski *et al.* 1998). Zusätzlich zu Strangbrüchen gibt die FPG-Behandlung Aufschluss darüber, wieviel oxidativer DNA-Schaden an Purinbasen der DNA, z. B. in Form von 8-oxodG, gebildet wird. Diese Arbeitstechnik wurde im Labor neu eingeführt und an verschiedenen Zellsystemen angewandt. Mit *HL60*-Zellen konnte bei durchleitender Ozonapplikation mit 1 mg/m^3 (30 min) keine DNA-Strangbruchbildung festgestellt werden (Tab. 2.1.2.1).

Tabelle 2.1.2.1: Bildung von DNA-Strangbrüchen und FPG-sensitiven Läsionen nach Exposition mit Ozon, H₂O₂ und γ -Bestrahlung, bestimmt mittels Comet-Assay.^{a)}

Zell- linie	Applikation	Modifikations- bedingungen	DNA- Strangbrüche	FPG-sensitive Läsionen ^{b)}
HL60	durchleiten ^{c)}	1 mg/m ³ Ozon, 30 min	0.0	0.0
HL60	überblasen ^{d)}	8 mg/m ³ Ozon, 30 min	0.32	0.69
HL60	-	γ -Rays (5 Gy) ^{e)}	6.69	7.14
HL60	-	H ₂ O ₂ (75 μ M), 30 min ^{f)}	0.14	0.37
A549	-	H ₂ O ₂ (100 μ M), 30 min ^{g)}	1.85	3.64

a) Je Wert wurden auf drei Objektträgern à 100.000 Zellen jeweils 50 Zellen ausgewertet. Angegeben als Tailmoment nach Abzug der Kontrollwerte. b) Werte nach Abzug der DNA-Strangbrüche. c) 2 Mio. Zellen in 5 mL HBSS, 0°C, Gasfluß 100 mL/min. d) 2 Mio. Zellen in 1 mL PBS, 20°C, Gasfluß 3.3 L/min. e) 100.000 Zellen in Agarose auf Objektträger. f) 2 Mio. Zellen in 1 mL serumfreiem RPMI-1640, 0°C, Lichtausschluß. g) 100 mm Ø Zellkulturschale, 70% konfluent bewachsen, ca. 3 Mio. Zellen, 10 mL 100 μ M H₂O₂ in serumfreiem RPMI-1640, 0°C, Lichtausschluß.

Die überblasende Ozonexposition führte erst bei sehr hoher Ozonkonzentration (8 mg/m³, 30 min) zu geringfügiger Schädigung der nuklearen DNA. Im Vergleich hierzu bewirkte die γ -Bestrahlung mit 5 Gy eine deutliche Bildung von DNA-Strangbrüchen und FPG-sensitiven Läsionen (Positivkontrolle). Auffallend ist, daß *HL60*-Zellen nach Behandlung mit H₂O₂ (75 μ M) nur geringfügige DNA-Schädigung aufweisen. Im Gegensatz hierzu zeigte die Behandlung adhärenter *A549*-Zellen mit H₂O₂ unter ähnlichen Versuchsbedingungen eine deutliche Bildung sowohl von Strangbrüchen als auch von FPG-sensitiven Läsionen. Weiterhin fällt auf, daß sowohl mit *HL60*-Zellen bei 8 mg/m³ Ozonexposition als auch bei der H₂O₂-Modifizierung von *A549*-Zellen ein ca. zweifacher Überschuß von FPG-sensitiven Läsionen relativ zu DNA-Strangbrüchen gefunden wird, während die γ -Bestrahlung ein etwa gleiches Verhältnis beider DNA-Schadensformen erzeugt.

Im Cometassay zeigen Expositionen von *HL60*-Zellen mit Ozondosen unter 1 mg/m³ bei 30 minütiger Expositionsdauer bislang keine signifikante Bildung von DNA-Strangbrüchen bzw. FPG-sensitiven Läsionen. Die ebenfalls nur geringe DNA-Schädigung dieser Zelllinie durch H₂O₂-Behandlung, eine ozonverwandte Oxidation, spricht jedoch für die niedrige Suszeptibilität von *HL60*-Zellen gegenüber dieser Art von oxidativem Stress. Bestätigt wird diese Annahme durch die deutlich höhere Induktion von DNA-Schäden durch H₂O₂ in adhärennten *A549*-Zellen. Auf Gemeinsamkeiten zwischen Ozon- und H₂O₂-induzierter DNA-Oxidation läßt sich aus den ähnlichen Verhältnissen zwischen DNA-Strangbrüchen und FPG-sensitiven Läsionen (0.46 für Ozon, 0.51 für H₂O₂) schließen. Vergleichbar ist auch das DNA-Schadensmuster von Ozon im zellulären System (*HL60* mit 8 mg/m³, 30 min) mit dem an isolierter DNA erhaltenen Schadensprofil, zumindest was das Verhältnis von Strangbrüchen zu FPG-Läsionen anbelangt (Abb. 2.1.1.2, ssb/FPG = 0.33 - 0.52). Allgemein besitzt das angewandte Testsystem (*HL60*-Zellen) eine zu geringe Empfindlichkeit für umweltrelevante Studien. Die Versuche mit *A549*-Zellen haben jedoch gezeigt, daß durch Variation der untersuchten Zelllinie (hier *A549*) eine beachtliche Steigerung der oxidativen Empfindlichkeit zu erreichen ist. Effekte bei Ozonkonzentrationen deutlich kleiner als 1 mg/m³ sollten hiermit eher nachzuweisen sein. Desweiteren dürfte eine Verlängerung der bislang relativ kurzen Expositionsdauer (30 min) auf umweltrelevante Applikationszeiten (mehrere Stunden) eine zusätzliche Empfindlichkeitssteigerung zur Folge haben.

2.2. Methodenentwicklung zur nicht-invasiven Bestimmung von 8-oxodG

2.2.1. Immunoaffinitätschromatographische Aufreinigung von 8-oxodG

Urin enthält eine Vielzahl niedermolekularer Substanzen. Um eine einfache massenspektroskopische Untersuchung zu erlauben und eine exakte Quantifizierung ohne störende Verunreinigungen im gleichen Massenbereich mitzuerfassen zu ermöglichen, muß 8-oxodG zunächst weitgehend von dieser störenden Matrix befreit werden. Hierzu ist die Immunoaffinitätschromatographie am besten geeignet, da sie gleichzeitig auch eine Aufkonzentrierung des Analyten ermöglicht.

Zu Beginn des Projektes stand ein Antikörper gegen 8-oxodG kommerziell als Ascites zur Verfügung (15A3). Dieser wurde bereits zur Immunoaffinitätschromatographie von Urin mit anschließender Analyse mittels HPLC und elektrochemischer Detektion eingesetzt (Park *et al.* 1992). Im Zuge unserer Untersuchungen stellten wir jedoch fest, daß der Antikörpergehalt wesentlich geringer ist, als der in der Publikation beschriebene. Teilweise zeigten die mit diesem Ascites hergestellten Immunoaffinitätssäulen auch keinerlei Affinität für 8-oxodG.

Von R. M. Santella (Columbia University, New York) wurde uns eine Hybridoma Zelllinie auf Basis einer wissenschaftlichen Kooperation zur Verfügung gestellt, welche den monoklonalen Antikörper 1F7 produziert. Dieser Antikörper wurde bereits zur immunoaffinitätschromatographischen Aufreinigung von 8-oxodG aus hydrolysierten DNA-Proben beschrieben (Yin *et al.* 1995). Anschließend wurde hier durch ELISA mit einem weiteren monoklonalen Antikörper quantifiziert. Allerdings waren gemessenen Werte höher als bei Vergleichsmessungen mit HPLC und elektrochemischer Detektion, was auf die Kreuzreaktivität vor allem mit dG zurückzuführen ist. Basierend auf dem monoklonalen Antikörper N45.1, für den beschrieben ist, daß er nicht mit dG kreuzreagiert (Toyokuni *et al.* 1997), ist ein weiterer Elisa-Test kommerziell erhältlich. Dennoch liegen auch die mit diesem Test gemessenen Konzentrationen von 8-oxodG höher als die durch chromatographische Vergleichsmethoden ermittelten Werte (Loft and Poulsen, 1998). Die Werte korrelieren nur schlecht miteinander.

Bisher wurde der den monoklonalen Antikörper enthaltenden Überstand aus der Hybridomazellkultur direkt verwendet. Da dieser jedoch einen großen Überschuß an anderen Proteinen enthält, die ebenfalls an das Matrixmaterial binden, ist mit einer starken unspezifischen Wechselwirkung bei der Immunoaffinitätschromatographie zu rechnen, wodurch die Aufreinigungsleistung verringert wird. Aus diesem Grund suchten wir ein Verfahren, welches eine möglichst selektive Aufreinigung des Antikörpers ermöglicht. Während der monoklonale Antikörper 15A3 als IgG_{2b} durch einfache Affinitätschromatographie an Protein A aufgereinigt werden konnte, mußten für den monoklonalen Antikörper 1F7 als IgG₁ verschiedene Verfahren getestet werden. IgG₁ der Maus werden häufig durch Affinitätschromatographie an Protein G aufgereinigt. Für manche Antikörper dieser Klasse hat Protein G jedoch keine Affinität. Für andere sind sehr drastische Elutionsbedingungen erforderlich. Aus diesem Grund wurde zunächst eine Aufreinigung durch thiophile Adsorption getestet. Hierzu wurde T-Gel von Pierce verwendet. Die Reinheit des Antikörpers wurde durch nicht reduzierende SDS-PAGE ermittelt. Die abgeschätzte Reinheit lag bei ca. 50 % und war für Vorversuche zunächst ausreichend. Eine sehr hohe Reinheit wurde durch Verwendung eines Hochsalzprotokolls für Affinitätschromatographie an rekombinantem Protein A (Amersham Pharmacia Biotech) erreicht. Dies konnte durch MALDI-TOF-MS bestätigt werden (s. Abb. 2.2.1.1.).

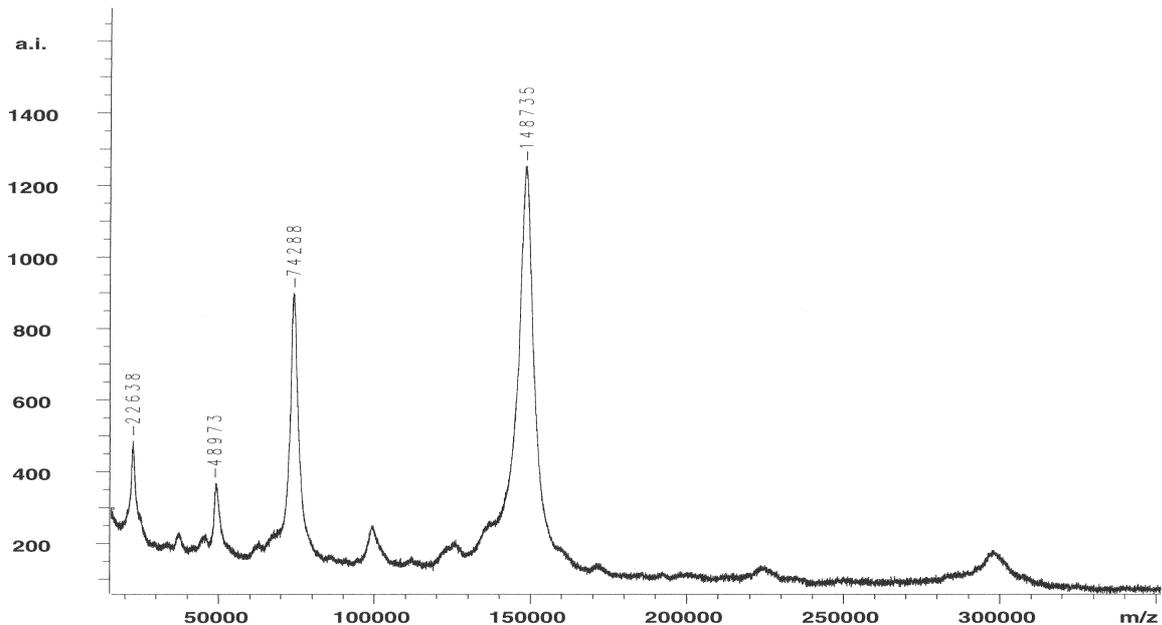


Abb. 2.2.1.1.: MALDI-TOF-MS Spektrum von monoklonalem Antikörper 1F7 aufgereinigt aus Zellkulturüberstand mittels Affinitätschromatographie an rekombinantem Protein A.

Die Verunreinigung bei 22638 Da wurde durch Ultrafiltration mit einer Ausschlußgröße von 30 kDa entfernt. Die weiteren Peaks stellen mehrfach geladene Molekülpeaks des Antikörpers dar. Dieser ist nur noch durch Antikörper aus dem zum Zellkulturmedium zugegebenen fötalen Kälberserum verunreinigt, wodurch eine niedrige unspezifische Wechselwirkung bei der Immunoaffinitätschromatographie gewährleistet ist.

Bei der Entwicklung wurden zwei verschiedene Matrixmaterialien getestet. Neben cyanbromidaktivierter Sepharose, dem verbreitetsten Material bei der Immunoaffinitätschromatographie, wurde ein neues, auf einer polymeren Methacrylatmatrix (Hydra®, Immunotec, Marl) basierendes Säulenmaterial verwendet. Dieses ist mit Quadratsäureethylester als aktiver Gruppe über einen Spacer aktiviert (Squarelink). Durch Kopplung mit Proteinen entsteht anstelle eines protonierbaren Isoharnstoffes wie im Falle der Cyanbromidaktivierung ein nicht protonierbares disubstituiertes Quadratsäurediamid. Hierdurch lassen sich unspezifische ionische Wechselwirkungen minimieren. Allerdings resultierte die Verwendung dieses Materials in zusätzlichen Peaks bei der Analyse. Deshalb wurde zum Bau der Immunoaffinitätssäulen cyanbromidaktivierte Sepharose verwendet. Typischerweise ergab die Verwendung von 2 mg monoklonalem Antikörper 1F7 eine Kapazität von 6 nmol, die unter Verwendung von synthetischem 8-oxodG Standard ermittelt und nach ca. zehnmaliger Verwendung der Säulen regelmäßig verifiziert wurde.

Die Durchführung der Immunoaffinitätschromatographie erfolgte nach einem Protokoll, welches in Anlehnung an die publizierten Protokolle (Yin *et al.* 1995; Park *et al.* 1992) entwickelt wurde. Die Wiederfindung dieser Aufreinigung wurde mittels tritiummarkierten 8-oxodGs auf 85 % bestimmt. Die Meßwerte wurden hierauf bezogen.

2.2.2. Entwicklung einer MALDI-TOF massenspektrometrischen Bestimmung von 8-oxodG

Die Sensitivität der Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionisation Time of Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) basiert im wesentlichen auf einer effizienten Energieübertragung zwischen der laserangeregten Feststoffmatrix (meist eine organische Säure) und dem darin eingebetteten Analyten. Theoretische Grundlagen dieses Prozesses sind derzeit erst wenig vorhanden, so daß bei der Suche nach einer geeigneten Matrix generell noch empirisch vorgegegangen werden muss. Es ist aus einer Vielzahl von Publikationen bekannt, daß die Signalstärke neben einstellbaren Geräteparametern auch stark von der Art der Probenpräparation abhängig ist (Gusev *et al.* 1995). Es wurden daher verschiedene in der Literatur beschriebene Probenpräparationsverfahren empirisch durchgetestet (dried-drop, film-, laminate-, fast evaporation, warmed-target-preparation). Aus folgender Reihe (Tabelle 2.2.2.1) getesteter Matrices wurde unter herkömmlichen Probenpräparationsbedingungen nur

- 2,5-Dihydroxybenzoesäure (**DHB**)
- 2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäure (**HMB**)
- 4-Hydroxy-3-methoxyzimtsäure (Ferulasäure)
- 3,5-Dimethoxy-4-hydroxymethylsäure (Sinapinsäure)
- α -Cyano-4-hydroxymethylsäure
- 3-Hydroxy-pyridin-2-carbonsäure (3-Hydroxy-picolinsäure)
- 2,4,6-Trihydroxyacetophenon
- 3-Aminochinolin
- 2-Amino-4-methyl-5-nitropyridin

Tabelle 2.2.2.1: Reihe getesteter Matrixsubstanzen.

mit 2,5-Dihydroxybenzoesäure (**DHB**) ein Signal beobachtet. Die restlichen Matrices erwiesen sich selbst unter variierten Aufnahmebedingungen (Laser-Energie, Empfindlichkeit), unterschiedlichen Matrix/8-oxodG-Konzentrationsverhältnissen (10000 : 1 bis 100:1) und verschiedenen Präparationsverfahren als ungeeignet für den eindeutigen und empfindlichen Nachweis von 8-oxodG. Einerseits erzeugten sie als pure Substanz (ohne 8-oxodG) bereits bei niedriger Laserenergie (< 60%) signifikante Massenpeaks im relevanten Massenbereich, andererseits konnten selbst 40 pmol 8-oxodG nicht desorbiert, bzw. ionisiert werden, ohne daß störende Matrixpeaks im relevanten Massenbereich entstanden.

Einzig 2,5-Dihydroxybenzoesäure (**DHB**) erwies sich als geeignete Matrix, um 8-oxodG eindeutig zu detektieren. Ein repräsentatives Überlagerungsspektrum von reiner Matrix und 8-oxodG/ Matrix-Gemisch zeigt Abb. 2.2.2.1. Das Spektrum wurde mit 10 pmol 8-oxodG auf 100 nmol **DHB** aufgenommen. Man erkennt deutlich den Peak bei $m/z = 283$ (8-oxodG), welcher im puren Matrixspektrum fehlt. Die zusätzlichen Peaks bei $m/z = 167$ (8-oxoGua) und $m/z = 116$ (2'-dRib) machen deutlich, daß 8-oxodG unter diesen Bedingungen fragmentiert und dabei die modifizierte Purinbase und 2'-Deoxyribose freigesetzt werden.

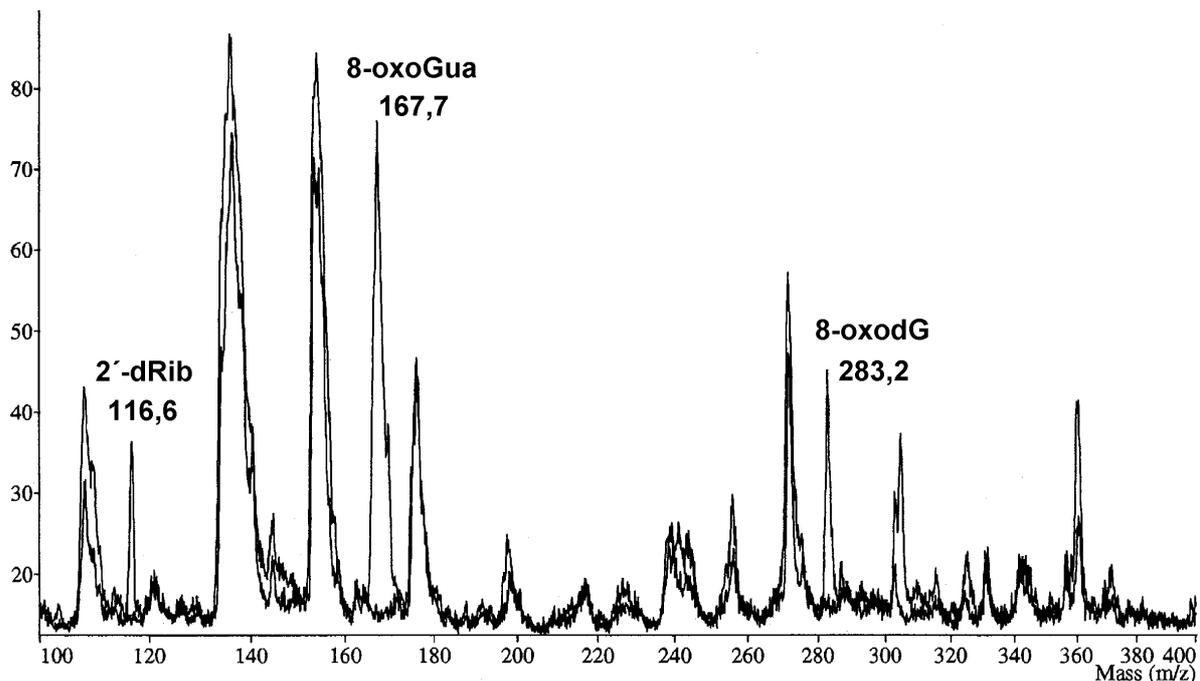


Abb. 2.2.2.1: Überlagerte MALDI-TOF MS Spektren von 2,5-Dihydroxybenzoesäure (**DHB**) und **DHB**/8-oxodG-Gemisch (100 nmol **DHB** mit 10 pmol 8-oxodG). Aufnahme mit Finnigan MAT VISION 2000 Reflektor-Massenspektrometer (N₂ Puls-Laser) im positiven Modus, Laserenergie 61%. Je Spektrum wurden 50 Laser-Schüsse addiert.

Es zeigte sich, daß diese Fragmentierung einerseits die Reproduzierbarkeit und andererseits die Nachweisempfindlichkeit erheblich herabsetzt, so daß der, zumindest für Urinproben, erforderliche Massenbereich im einstelligen pmol-Bereich, nicht zuverlässig nachgewiesen werden kann. Diese Fragmentierung konnte auch durch Variation der Aufnahmebedingungen (delayed-extraction) nicht verhindert werden.

In Zusammenarbeit mit Herrn Dr. R. Woisch (GSG Mess- und Analysengeräte, Karlsruhe) wurde eine spezielle Probenpräparationsmethode mit den in Tabelle 2.2.2.1 genannten Matrixes ausgetestet. Diese Methode stellt eine Verbindung zwischen schichtförmigem Matrixaufbau (Laminat: Matrix-Analyt-Matrix) mit sehr schneller Vakuumtrocknung (10⁻⁵ Torr) dar. Zwar fragmentierte auch in diesem Fall der Analyt mit **DHB** als Matrix, jedoch zeigte unter diesen Präparationsbedingungen die Matrix 2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäure (**HMB**) keine Fragmentierung. Zusätzlich traten in diesem Fall keine Na⁺-Addukte von 8-oxodG auf und es konnte ein stetiger Anstieg der Signalstärke mit wachsender Konzentration des Analyten beobachtet werden. Zusätzlich zeigten die Probenspots feinkristalline und homogene Oberflächen. In Abbildung 2.2.2.2 ist ein exemplarisches Spektrum gezeigt.

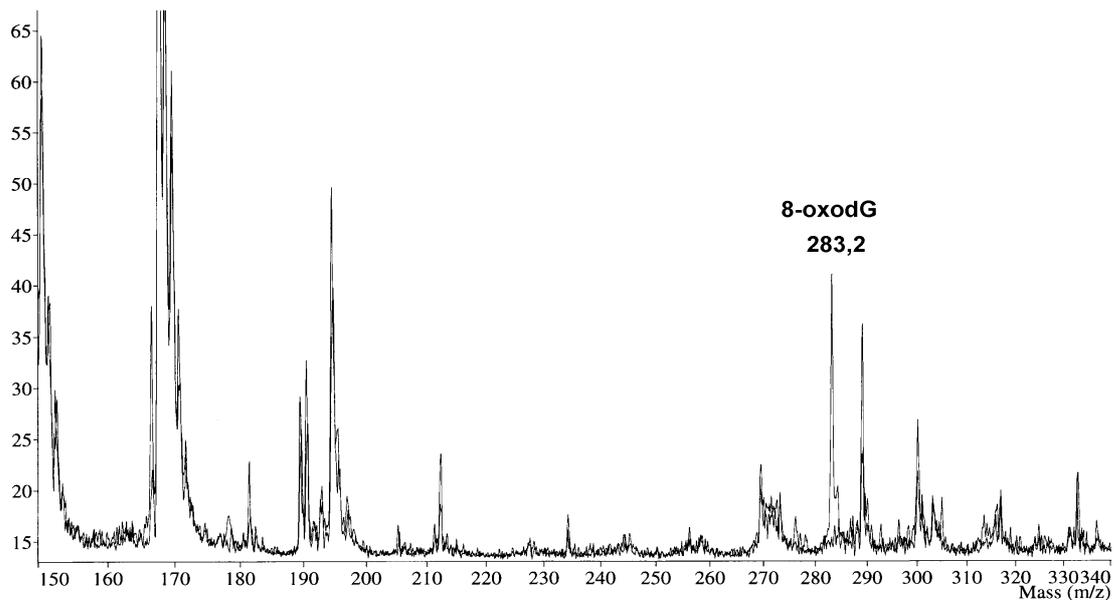


Abb. 2.2.2.2: Überlagerte MALDI-TOF MS Spektren von 2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäure (**HMB**) und **HMB**/8-oxodG-Gemisch (60 nmol **HMB** mit 17 pmol 8-oxodG). Aufnahme mit Finnigan MAT VISION 2000 Reflektor-Massenspektrometer (N₂ Puls-Laser) im positiven Modus, Laserenergie 53%. Je Spektrum wurden 50 Laser-Schüsse addiert.

Eine deutliche Steigerung der Empfindlichkeit wurde durch verschiedene Optimierungsmaßnahmen in der Probenpräparation erreicht. Einerseits wurde das Cosolvens der Matrixlösung (Aceton, Isopropanol, Methanol, Acetonitril) variiert, wobei sich Methanol und Acetonitril als bestgeeignetste Cosolventien erwiesen haben. Das Auftragen der Probe auf eine Nitrocellulose-Unterschicht brachte hingegen schwächere Signale und inhomogenere Kristallisation. Die Verwendung eines goldgesputterten Targets brachte gegenüber dem herkömmlichen Edelmetalltarget keine Vorteile bezüglich Signalstärke und Reproduzierbarkeit. Auch erwies sich die abschliessende Rekristallisation des Probenspots mit Acetonitril oder Wasser bezüglich einer homogenen Kristallisation als unnötig. Als optimale Matrixkonzentration hat sich 20 mg/mL für die zweite (Deck-) Schicht herausgestellt. Für die erste Schicht genügt eine Konzentration von 10 mg/mL HMB.

Zur Quantifizierung wurde die 8-oxodG-Lösung mit internem Standard *IS* (und/oder 2'-Desoxyadenosin) versetzt. Zur Überprüfung der Homogenität der 8-oxodG-Verteilung innerhalb eines Probenspots wurden auf einem Spot 10 Punkte an verschiedenen Stellen des Spots jeweils 15 mal laserangeregt und die Spektren additiv aufgenommen. Die einzelnen Punkte wurden verglichen. Insgesamt wurden 215 Spektren ausgewertet und die Mittelwerte 8-oxodG/*IS* berechnet. Hierbei zeigte sich, daß 2'-Desoxyguanosin mit nur 10 % Standardabweichung den geeigneteren internen Standard verglichen zu dA (28 %) darstellt. Die Standardabweichungen zwischen verschiedenen Spots liegen in derselben Grössenordnung (dG: 11%, dA: 25%, Mittelwerte aus 30 Spots). Im Vergleich zeigten die mittels Ölpumpenvakuum (ÖP) präparierten Proben geringere Standardabweichungen als die mittels Membranpumpenvakuum (MP) erhaltenen (7% ÖP versus 20% MP).

Die Kalibration wurde im Mengenbereich von 1 bis 10 pmol 8-oxodG durchgeführt. Kleinere Mengen 8-oxodG waren unter den apparativen Bedingungen nicht mehr zuverlässig bestimmbar. Beginnend bei 1 pmol wurde in 20 % Schritten aufsteigend gemessen. Es wurde die, in Abb. 2.2.2.3 dargestellte, nicht-lineare Kalibrationskurve erhalten.

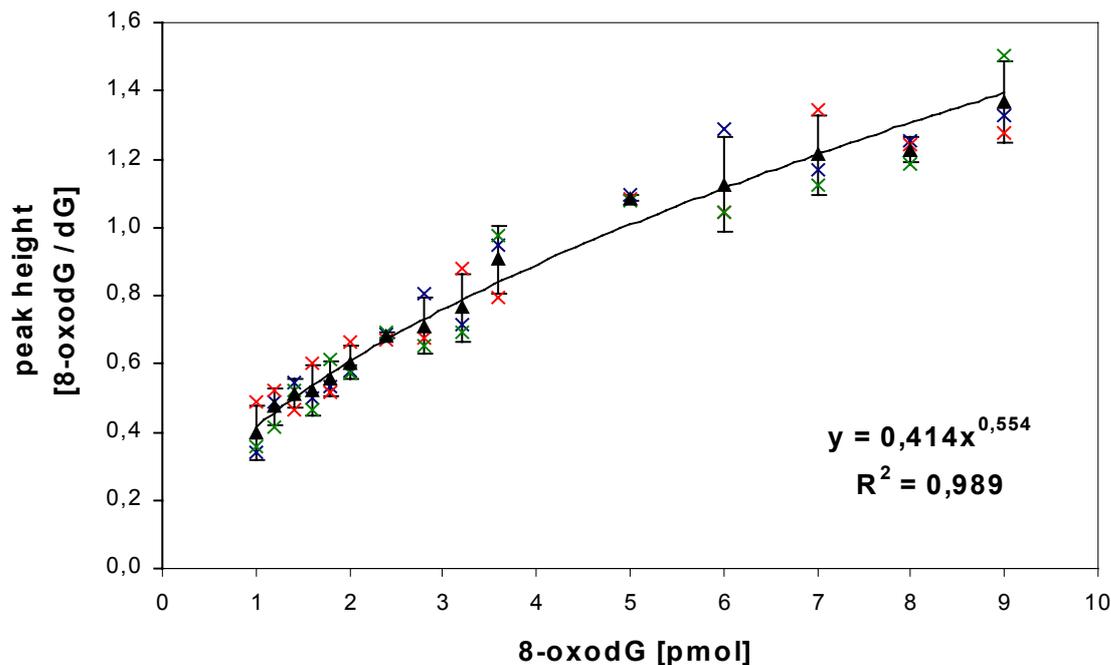


Abb. 2.2.2.3: Kalibrationskurve für 8-oxodG. Gemessen mit 10 pmol 2'-Desoxyguanosine als interner Standard. Matrix: 2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäure (HMB). Vakuum-Sandwich-Präparation mit Ölpumpenvakuum.

Für 10 pmol 2'-Desoxyguanosin als zugesetzter Menge interner Standard erhielt man die beste Korrelation mit $r^2 = 0.989$ in Form einer Potenzfunktion mit unganzzahligem Exponenten (Wurzelfunktion) nach der Gleichung $8\text{-oxodG/dG} = 0.414 \times 8\text{-oxodG}^{0.554}$.

Für die Messung von 8-oxodG in Urinproben, muss dieser aufgereinigt und die geringe Menge an 8-oxodG aufkonzentriert werden. Hierzu wurde vor der MALDI-Messung eine Festphasenextraktion (solid phase extraction, SPE) an C18-Material mit anschließender Immunoaffinitätschromatographischer Aufreinigung (IAC) durchgeführt. Die mittels MALDI-TOF MS ermittelten Werte wurden mit den durch HPLC-ECD gemessenen verglichen. Die Korrelation ist in Abb. 2.2.2.4 gezeigt.

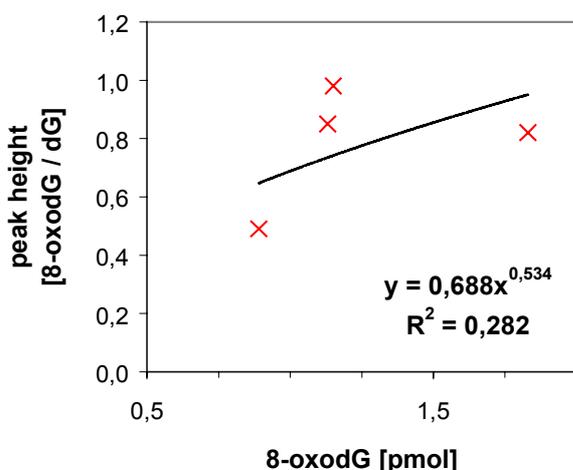


Abb. 2.2.2.4: Messung der 8-oxodG-Konzentration nach SPE und IAC nach Abgleich mit HPLC-ECD-Bestimmung. Gemessen mit 10 pmol internem Standard 2'-Desoxyguanosin. Matrix: 2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäure (HMB). Vakuum-Sandwich-Präparation mit Ölpumpenvakuum.

Die schlechte Korrelation machte es notwendig, einen zusätzlichen Reinigungsschritt vor der MALDI-Messung durchzuführen. Nach Filtration über C18 HPLC-Kartuschen (1 cm) konnte der Korrelationskoeffizient auf $r^2=0.897$ verbessert werden. Die entsprechende Korrelationskurve ist in Abb. 2.2.2.5 gezeigt.

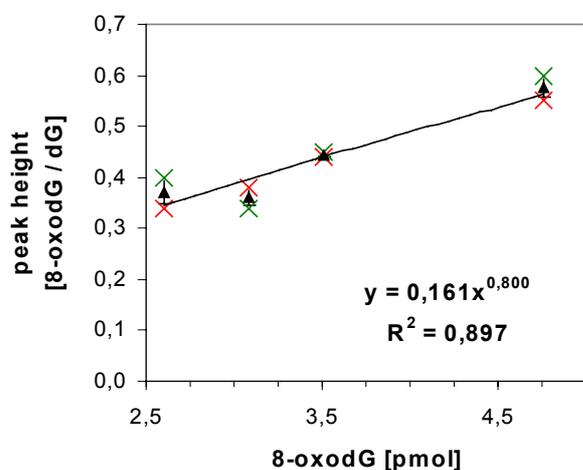


Abb. 2.2.2.5: Messung der 8-oxodG-Konzentration nach SPE, IAC und C18-Filtration nach Abgleich mit HPLC-ECD-Bestimmung. Gemessen mit 10 pmol internem Standard 2'-Desoxyguanosin. Matrix: 2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäure (**HMB**). Vakuum-Sandwich-Präparation mit Ölpumpenvakuum.

Durch die notwendigen Aufreinigungsschritte verringern sich die Signalstärken für 8-oxodG und IS drastisch bis an die untere Grenze des für Urinproben praktikablen Maßes. Die Nachweisgrenze lag unter den apparativen Bedingungen bei über 5 pmol 8-oxodG, was für Messungen von Urinproben nicht mehr praktikabel durchführbar ist.

Es konnte gezeigt werden, daß, ergänzend zum herkömmlichen Anwendungsgebiet grosser Moleküle, MALDI-TOF-Analytik auch für die massenspektrometrische Detektion kleiner Moleküle anwendbar ist, sofern eine Matrix gefunden wird, die im relevanten Massenbereich signalfrei ist und welche die Desorption/Ionisation des Analyten gewährleistet. Durch Variation der Probenpräparation lässt sich die Signalstärke deutlich optimieren. Die im Fall von DHB als Matrix beobachtete Fragmentierung von 8-oxodG ist vermutlich auf dessen Acidität zurückzuführen. Mit dem weniger aciden HMB als Matrix wird demzufolge keine Fragmentierung des säurelabilen Analyten erzeugt. Für quantitative Zwecke ist die Bildung homogener mikrokristalliner Proben-Spots wichtig. Die Vakuum-Sandwich-Probenpräparation mit Ölpumpenvakuum hat sich hierfür als sehr geeignet erwiesen. Die Reproduzierbarkeit ist in Anbetracht der manuellen Präparation sehr gut und wird sich bei automatischer Durchführung sicherlich noch entscheidend verbessern. Auch die quantitative Genauigkeit wird sich durch automatische Probenpräparation verbessern lassen. Die gute Korrelation der Signalstärke mit der 8-oxodG-Konzentration zeigt, daß die MALDI-TOF Massenspektrometrie durchaus für quantitative Anwendung bei der 8-oxodG-Bestimmung geeignet ist. Der nicht-lineare Verlauf der Korrelationskurve ist vermutlich auf Quenching-Effekte zurückzuführen mit der Konsequenz, daß mit steigender 8-oxodG-Konzentration die Effizienz des Energieübergangs von Matrix zu Analyt abnimmt. Dennoch zeigt die Kalibrationskurve, insbesondere im Niedrigkonzentrationsbereich, eine genügende Dynamik, um Messungen ausreichend zuverlässig zu machen. Die nach SPE und IAC reduzierte Signalstärken könnten auf Auswaschungen des

Säulenmaterials zurückzuführen sein, die den MALDI-Prozess behindern. Durch einen zusätzlichen Reinigungsschritt ließe sich die Korrelation mit HPLC-ECD Daten deutlich verbessern, wohingegen die Signalstärke sich nur unwesentlich veränderte. Insgesamt reduziert sich durch diese notwendigen Aufreinigungsschritte die Signalstärke soweit, daß die Nachweisempfindlichkeit unter den aktuellen apparativen Bedingungen an der Untergrenze des für Urinproben notwendigen Maßes liegt. Zusätzlich werden die Proben durch die Aufreinigung wiederholt verdünnt und müssen wieder eingengt werden. Hierdurch besteht die Gefahr einer drastisch reduzierten Wiederfindung des Analyten. Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Methode bezüglich einer Anwendung im Biomonitoring von Urinproben sicherlich noch entwicklungsfähig ist.

2.2.3. Bestimmung von 8-oxodG im Urin HPLC-ECD

Eine Reihe von Veröffentlichungen beschrieben die Messung von 8-oxodG im Urin mittels HPLC und elektrochemischer Detektion. Der Nachweis der Peakreinheit wird jedoch selten mittels Aufnahme hydrodynamischer Voltammogramme geführt. Dies ist jedoch die einzige Möglichkeit, eine potentielle Koelution auszuschließen.

Bei Analyse des gelösten lyophilisierten Eluats aus der Immunoaffinitätschromatographie mittels HPLC und elektrochemischer Detektion wurde zunächst nur ein Peak mit gleicher Retentionszeit wie synthetischer 8-oxodG Standard beobachtet. Jedoch war das hydrodynamische Voltammogramm nicht identisch mit dem von synthetischem Standard, was auf eine Koelution schließen läßt (Abb. 2.2.3.1.).

Basierend auf einem HPLC-Gradientensystem für die Analyse von 8-oxoG, 8-oxodG und N²-Methyl-8-oxoguanin aus mit dem monoklonalen Antikörper 15A3 aufgereinigten Urin (Helbock *et al.* 1996), wurde von uns ein Gradientensystem entwickelt, welches die Auftrennung zweier elektrochemisch aktiver Peaks erlaubt, aber dennoch nicht die elektrochemische Detektion stört. Der erste dieser Peaks konnte aufgrund seiner Retentionszeit und seines hydrodynamischen Voltammogramms als 8-oxodG identifiziert werden. (Abb. 2.2.3.1., 2.2.3.2.).

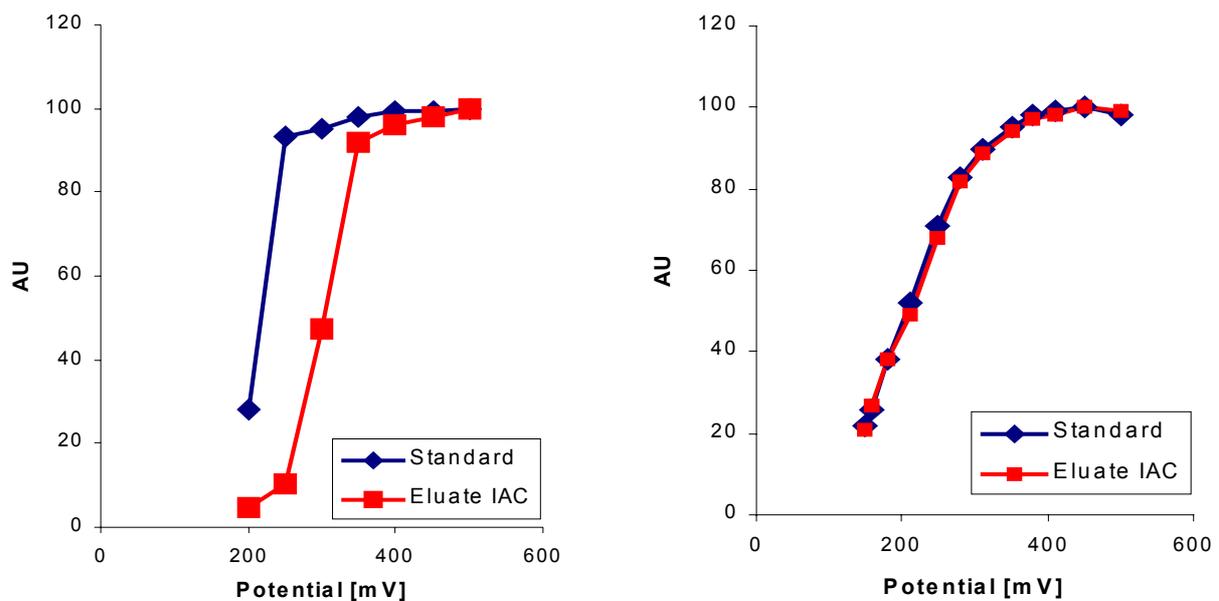


Abb. 3.3.2.1. Analyse von Urin auf 8-oxodG mittels HPLC-ECD nach Immunoaffinitätschromatographie mit mAb 1F7: Strom-Spannungs-Kurven des 8-oxodG-Peaks mit isokratischer Elution (links) und Gradientenelution (rechts).

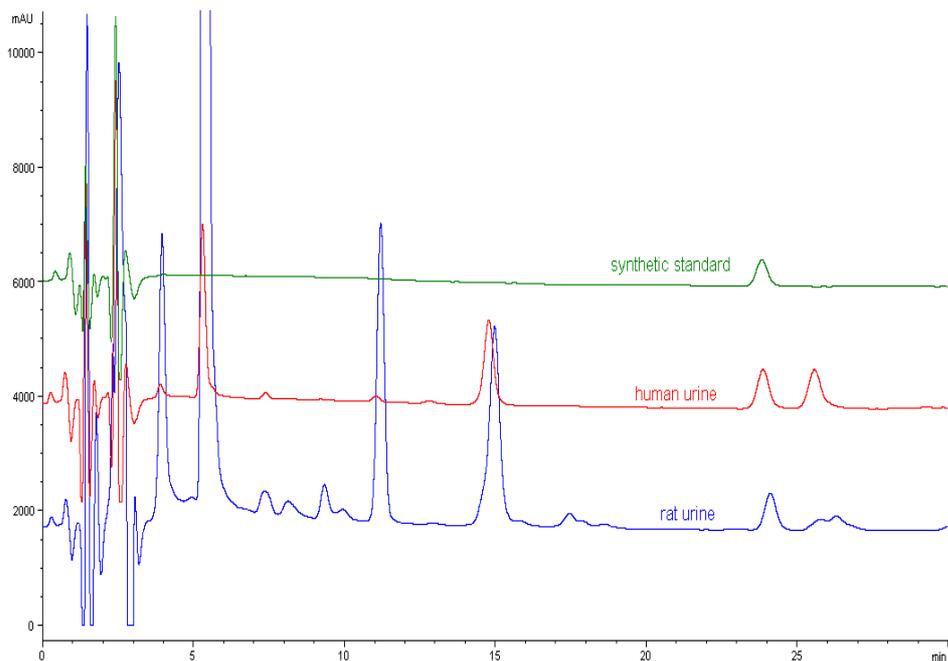


Abb. 3.3.2.2. Chromatogramme von synthetischem 8-oxodG Standard und immunoaffinitätsaufgereinigtem humanem und Rattenurin (Gradientenelution).

Zur Validierung der Methode wurde eine Verdünnungsreihe von mit 8-oxodG dotiertem humanem Urin analysiert. Das Ergebnis ist in Abb. 3.3.2.3. gezeigt. Die Analyse zeigt eine ausgezeichnete lineare Korrelation ($R^2 = 0,995$).

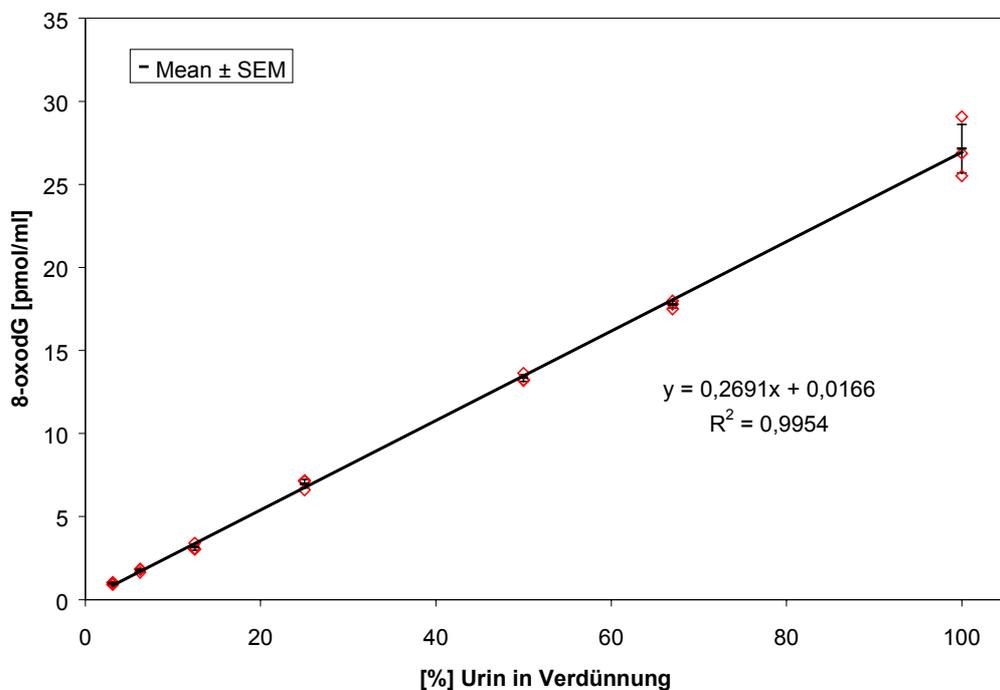


Abb. 3.3.2.3. Methodenvalidierung der Immunoaffinitätschromatographie mittels HPLC und elektrochemischer Detektion: Analyse verschiedener Verdünnung einer humanen, mit 8-oxodG dotierten Urinprobe.

Ferner wurden mehrfach Sätze unterschiedlichen Umfangs des gleichen Urins analysiert. Dies ergab eine Standardabweichung der Reproduzierbarkeit innerhalb einer Messung von 3 - 8 % und zwischen verschiedenen Messungen von 5 % (Tab. 3.3.2.1.).

Probenzahl (gleiche Probe)	8-oxodG [pmol/ml]	Standardabweichung [pmol/ml]	Standardabweichung [%]
8	12,16	0,88	7
10	14,52	0,50	3
29	16,46	1,38	8
1	15,32	-	-
1	15,87	-	-
1	16,03	-	-
1	13,92	-	-
1	14,79	-	-
1	14,16	-	-
1	15,45	-	-

Tab. 3.3.2.1. Methodenvalidierung der Immunoaffinitätschromatographie mittels HPLC und elektrochemischer Detektion: Analyse der gleichen humanen Urinprobe.

Zur Kontrolle der einzelnen Aufarbeitungen der Urinproben aus dem Tierversuch wurde jeweils eine Probe des gleichen Humanurins mitgeführt. Lag der Wert für diese Probe außerhalb der zweifachen Standardabweichung, wurde die Aufarbeitung und Messung wiederholt.

2.2.4. Bestimmung von 8-oxodG in DNA aus Blut mittels HPLC-ECD

In den vergangenen zwei Jahren wurde der Nachweis von 8-oxodG aus zellulärer DNA sehr kontrovers diskutiert. Insbesondere die Artefaktbildung stellt ein großes Problem dar, welches minimiert werden muß, um zu gewährleisten, daß vorhandene Effekte sichtbar werden und nicht durch Artefakte überdeckt werden. Aufgrund der Artefaktbildung erstreckt sich Spannweite der gemessenen 8-oxodG Werte in DNA über fünf Größenordnungen (Collins *et al.* 1997), was zu einem Großteil in den Meßmethoden selbst begründet liegt. So sind zum Beispiel Postlabelling Methoden (Schuler *et al.* 1997; Moller and Hofer, 1997) und GC-MS (Ravanat *et al.* 1995) mit Derivatisierung weitgehend ungeeignet, da es hier während der Messung zu einer starken Artefaktbildung kommt. Aus diesem Grund bietet sich auch hier die Messung mittels HPLC und elektrochemischer Detektion an. Hier ist bei der Messung selbst keine Artefaktbildung zu erwarten, jedoch ist auch hier die Artefaktbildung bei der DNA-Isolierung und -Hydrolyse zu minimieren. Vor allem die Verwendung von Phenol zur DNA-Extraktion stellt einen kritischen Punkt dar, was jedoch ebenfalls kontrovers diskutiert wird (Claycamp, 1992; Shigenaga *et al.* 1994; Helbock *et al.* 1998). Einen wesentlich Durchbruch lieferte die Verwendung einer Isopropanolfractionierung in Gegenwart von chaotropem Natriumjodid zur Isolierung der DNA (Wang *et al.* 1994; Nakae *et al.* 1995). Durch Einsatz des inaktivierenden Eisenchelators Desferroxaminmesylat (DFAM) bei der Lyse von Vollblut konnten die gemessenen Werte weiter gesenkt werden (Helbock *et al.* 1998). Dieses Verfahren wurde zunächst von uns verwendet. Die so gewonnene DNA wurde in zwei Stufen zu den Nukleosiden hydrolysiert (Shigenaga *et al.* 1994). Die im ersten Schritt verwendete Temperatur von 65 oder 70 °C verursachte jedoch starke Schwankungen der Meßwerte. Durch ein neues Hydrolyseverfahren, welches vollständig bei 37 °C arbeitet, konnten diese Schwankungen minimiert werden. Dieses Verfahren wurde bisher in Kombination mit einer anderen DNA-Isolierungsmethode eingesetzt (Hofer and Moller, 1998). Ferner sanken die Meßwerte auf eine Größenordnung von 10 – 100 8-oxodG / 10⁸ dG. Diese Größenordnung stimmt mit den niedrigsten durch HPLC mit elektrochemischer Detektion ermittelten Werten überein

(Pouget *et al.* 1999), allerdings bringt sie das Problem mit sich, daß bei begrenzter Probenmenge (1 ml Blut) die Nachweisgrenze des HPLC-Verfahrens erreicht wird. Die Nachweisgrenze läßt sich nur durch neue Detektionsverfahren senken, wie z. B. LC-MS und LC-MS-MS, welche sich zur Zeit im Entwicklungsstadium befinden und einen hohen apparatechnischen Aufwand erfordern (Ravanat *et al.* 1998).

2.3. Tierversuch

2.3.1. Durchführung der tierexperimentellen Ozon-Inhalationsexpositionen

Die Auswirkung von Ozoninhalation auf die Bildung oxidativer DNA-Basenmodifikationen in Form von 8-oxodG wurde anhand eines Inhalationsexperimentes an Ratten untersucht.

Die inhalativen Expositionen wurden im Aerosol-Labor der Abteilung Toxikologie und Krebsrisikofaktoren in der Arbeitsgruppe von Dr. R. G. Klein *et al.* durchgeführt. Die technische Auslegung der Inhalationsapparaturen gestattet sowohl länger andauernde bis „life-span“- Untersuchungen an kleinen Nagetieren (bis zu 60 Tieren) nach der Methode der Ganzkörperexposition als auch Applikationen von gasförmigen oder flüchtigen Arbeitsstoffen, ebenso wie von Aerosolen und Stäuben umweltrelevanter Gefahrstoffe, in „nose-only“-Verabreichung an kleineren Tiergruppen in Zeitintervallen zu einigen Stunden. Nach den genannten Methoden wurden in diesem Labor bereits verschiedene Nitrosamine, Schwefeldioxid, Stickoxide, halogenierte Kohlenwasserstoffe einschließlich Vinylchlorid, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe und Schwermetallverbindungen als Stäube und Aerosole untersucht.

Aufgrund der hohen Reaktivität des Ozon wurde bei der vorliegenden Fragestellung nach der „nose-only“-Methode unter Anwendung einer hohen Luftwechselzahl verfahren. Vier Gruppen (A bis D) von je 8 männlichen Fischer F344-Ratten von durchschnittlich 250 g Körpergewicht wurden 1,5 Stunden pro Tag, 5 Tage pro Woche unterschiedlich abgestuften Ozonkonzentrationen für insgesamt 12 Wochen ausgesetzt:

Kontrollgruppe mit einer umweltrelevanten Hintergrund-Konzentration von Ozon im Bereich von 30-50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ in der Atemluft. Diese Tiere wurden ebenfalls für 1.5 Stunden pro Tag in den Applikationsröhren der nose-only Apparatur exponiert unter versuchsidentischen Bedingungen wie die Ozon-behandelten Tiere der höheren Dosierungen.

Niedrige Dosierung bei einem Ozonwert von 200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$

Mittlere Konzentration von 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$

Hohe Exposition bei 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$

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 von Expositionsatmosphäre zur kontinuierlichen analytischen Überwachung der Konzentrationen an verschiedenen Stellen der Apparatur und der gemittelten Atemaktivität der Tiere mittels Kohlendioxid-Messung der Gesamtabluft. Es ergaben sich mittlere Atemvolumina von 4 bis 10 l/h für eine Ratte unter aktuellen Versuchs-

bedingungen, je nach der körperlichen Aktivität der Tiere (Schnuppern und Knabbern am Rand der Expositionsrohren und körperliche Bewegungen innerhalb der zylindrischen Röhren, was von einem Tier ausgehend mitunter ansteckend auf die anderen wirkte). Die Luftwechselzahl im Expositionsraum betrug 80 mal pro Stunde. Das benötigte Ozon wurde von einem Generator, Laborozonisator 300.2 für Niederkonzentrationen, der Firma 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 Verdünnungsluft so beigemischt, daß die gewünschte O₃-Dosierung über die Versuchszeit konstant gehalten werden konnte. Die Ozonkonzentration wurde mit einem Analysengerät, Environment s.a O₃ 41 M, der Firma Ansyco, Analytische Systeme und Komponenten, Karlsruhe, kontinuierlich während der Versuchszeiten gemessen und dokumentiert. Die CO₂-Messung erfolgte fortlaufend während der Applikationen mit einem kalibrierten Messgerät, Deltagas, DG01026, der Firma Crowcon, Abingdon, Oxon, England, Messbereich 0 – 3000 ppm CO₂.

Die Gesamtapplikationszeit erstreckte sich über 12 Wochen.

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 Blutgewinnung erfolgte in 2-wöchentlichem Abstand am Ende des wöchentlichen Inhalationszyklus (Freitag) unmittelbar nach den einzelnen Applikationen der verschiedenen Dosierungen. Den Tieren wurde aus der Schwanzvene ca. 1 mL Blut nach Inhalationsnarkose mit Methoxyfluoran (Metofane®) entnommen. Die Tiere zeigten während der Ozonbehandlung und auch danach keinerlei äußere Anzeichen einer akut toxischen Einwirkung durch das verabreichte Ozon.

Die im Rahmen dieses Versuchs gewonnen Proben (Urin, Blut, Gewebe) werden mit den o. g. methoden untersucht. Die resultierenden Daten werden später separat publiziert.

3. Ausblick

Im Rahmen der im Projekt durchgeführten Arbeiten konnten Biomonitoringverfahren für die Untersuchung oxidierter DNA-Basen in Körperflüssigkeiten entwickelt und etabliert werden. Insbesondere die MALDI-Methode in Kombination mit Immunoaffinitätschromatographie ist entwicklungsfähig in Hinblick auf Automation und Senkung der Nachweisgrenze. Hieraus könnte ein massenspektroskopischer Immunoassay mit hohem Probendurchsatz geschaffen werden. Die von uns entwickelten Methoden lassen sich auch im Rahmen eines Populationsmonitorings zum Nachweis von 8-oxodG sowohl in der DNA als auch in Urin einsetzen.

Die vollständige Auswertung des zuvor beschriebenen Tierversuchs ist z. Z. noch nicht möglich. Die Arbeiten am Tierversuch wurden trotz Mittelkürzung durch den Projektgeber weitergeführt und von anderer Seite finanziert. Eine Aussage über das gentoxische Potential von Ozon wird erst nach Auswertung des Tierversuchs möglich sein.

4. Material und Methoden

4.1. Einzelzellgelelektrophorese (SCGE, Comet-Assay)

Lysepuffer

2,5 M NaCl, 10 mM Tris, 100 mM EDTA (pH 10,0), 1 % Sarkosyl

Inkubationspuffer

40 mM HEPES, 100 mM KCl, 0,5 mM EDTA (pH 7,5 (1 M KOH)), 0,2 g/l BSA

Elektrophoresepuffer

3,3 M NaOH, 1 mM EDTA

Neutralisationspuffer

0,4 M Tris/HCl pH 7,5

Vollständig mattierte Objektträger wurden mit einer 1 %igen Lösung normal schmelzender Agarose überzogen, welche nach dem Erstarren abgestrichen wurde. Es wurde mit 85 µl einer 0,5 %igen Lösung normal schmelzender Agarose gleichmäßig überschichtet. Die Zellen 50 – 100000 Zellen wurden in 65 µl einer 0,7 %igen Lösung niedrig schmelzender Agarose gleichmäßig resuspendiert und aufgetragen. Zum Schutz wurde mit 75 µl 0,7 %iger Lösung niedrig schmelzender Agarose gleichmäßig überschichtet. Nach dem Erstarren wurden die Objektträger in eine Lösung aus 89 % Lysepuffer, 10 % DMSO und 1 % Triton X-100 (frisch angesetzt) gebracht und die Zellen 1 h bei 4 °C lysiert. Falls eine Enzyminkubation erfolgen sollte, wurden die Objektträger dreimal mit Inkubationspuffer 5 min gewaschen und mit 100 µl einer Lösung von 1 µg FPG-Protein pro ml Inkubationspuffer oder mit Inkubationspuffer 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 20 min in Elektrophoresepuffer wurden die Objektträger einer 20 minütigen Elektrophorese bei einer Spannung von 25 V und 300 mA unterzogen. Anschließend wurde mit Neutralisationspuffer neutralisiert und die DNA mit einer 0,002 % wässrigen Ethidiumbromidlösung angefärbt. Die Auswertung erfolgte computergestützt mittels Fluoreszenzmikroskopie (Komet 3.1).

4.2. DNA-Isolierung und -Hydrolyse

Lysepuffer

0,32 M Saccharose, 5mM MgCl₂, 10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 0,1 mM DFAM, 1 % Triton

Reaktionspuffer

5 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl (pH 8,0), 0,1 mM DFAM, 1 % SDS

Natriumjodidlösung

7,6 M NaI, 20 mM EDTA, 40 mM Tris/HCl (pH 8,0), 0,1 mM DFAM

Hydrolysepuffer

20 mM NaOAc (pH 5.0), 0,1 mM DFAM, 0,2 mM ZnSO₄

Ca. 1 ml Vollblut wurden 10 min bei 1500 g zentrifugiert und 400 µl Plasma entfernt und bei –80 °C eingelagert. Durch Auffüllen mit Lysepuffer auf ein Volumen von 2 ml wurden Zellen lysiert und Nuklei durch 20 s Zentrifugation bei 10000 g präzipitiert. Dieses Pellet wurde zweimal mit 2 ml Lysepuffer gewaschen und in 400 µl Reaktionspuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 30 µl Proteinase K (ca. 500 U/ml, Boehringer Mannheim) wurde unter leichtem Schütteln 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 600 µl Natriumjodidlösung und Invertieren wurde die DNA mit 1 ml Isopropanol präzipitiert und durch 10 min Zentrifugation bei 14000 g pelletiert. Das DNA Pellet wurde mit 40 %igem Isopropanol und 70 %igem Ethanol gewaschen, restliches Ethanol mit einem Wattestäbchen entfernt und 5 min unter Argon

getrocknet. Nach Zugabe von 100 µl Hydrolysepuffer, 13 µl Nuklease P1 (300 U/ml, Boehringer Mannheim) und 4 µl Alkalischer Phosphatase (1000 U/ml, Boehringer Mannheim) wurde 1 h bei 37 °C inkubiert. Das Hydrolysat wurde durch eine Ultrafiltrationseinheit mit einer Ausschlußgröße von 10 kDa (Ultrafree-MC, Millipore) filtriert und 100 µl mittels HPLC-ECD analysiert.

4.3. Antikörperproduktion monoklonaler Antikörper 1F7

Klon 1F7 wurde in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Life Technologies) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Der zellfreie Zellkulturüberstand wurde auf eine Konzentration von 2,5 M NaCl eingestellt und durch einen 0,2 µm Filter filtriert. Aliquots von 180 ml wurden bei einer Flußrate von 1,5 ml/min auf äquilibrierte 1 ml Säulen mit rekombinantem Protein A (Amersham Pharmacia) aufgetragen. Es wurde mit 10 ml Puffer (100 mM Na-phosphat pH 7,4, 2,5 M NaCl) gewaschen und mit 6 ml 100 mM Na-citrat Puffer, pH 3,0 eluiert, wobei zur Neutralisation 1,5 ml 1 M Na₂CO₃ Lösung vorgelegt wurden. Im Eluat wurde eine Proteinbestimmung mittels des BCA-Kits (Pierce) durchgeführt.

4.4. Immobilisierung von monoklonalem Antikörper 1F7

Kopplungspuffer

0,5 M NaCl, 0,1 M NaHCO₃ (pH 8,4)

Waschpuffer

0,5 M NaCl, 0,1 M Na-acetat (pH 4)

Das Eluat (Proteingehalt 40 mg) aus der Affinitätschromatographie an rekombinantem Protein A wurde mittels Ultrafiltration (15 ml Centricon, Amicon) auf Kopplungspuffer umgepuffert. 2,5 g gefriergetrockneter CNBr-aktivierter Sepharose 4B (Amersham Pharmacia) wurden in kalter 1 mM Salzsäure quellen gelassen und binnen 30 min mit insgesamt 500 ml 1 mM Salzsäure gewaschen. Nachdem das Gel mit Wasser gewaschen wurde, wurde mit Kopplungspuffer äquilibriert und der gelöste Antikörper in 12 ml Kopplungspuffer über Nacht bei 4 °C immobilisiert. Nicht abreagierte CNBr-Gruppen wurden durch zweistündige Inkubation mit 1 M Ethanolin in Kopplungspuffer bei Raumtemperatur blockiert. Das Gel wurde fünfmal abwechselnd mit Kopplungspuffer und Waschpuffer gewaschen und in 18 Polystyrolsäulen (Pierce) verteilt. Die Säulen wurden unter phosphatgepufferter Salzlösung mit 0,02 % Na₃ gelagert.

4.5. Immunoaffinitätschromatographie von Urin

0,5 ml Urin wurden mit 0,5 ml 1 M NaCl-Lösung verdünnt und auf konditionierte Festphasenextraktionskartuschen (Bond Elut C18-OH, Varian) mittels Stickstoffdrucks aufgetragen. Es wurde mit 5 ml 50 mM Na-phosphatpuffer pH 7,4 gewaschen und mit 3 ml 15 % Methanol eluiert. Das Eluat wurde auf die mit 50 mM Na-phosphatpuffer pH 7,4 äquilibrierten Immunoaffinitätssäulen aufgegeben. Nach Durchlaufen mittels Schwerkraft wurde mit je 5 ml 50 mM Na-phosphat pH 7,4 und Wasser gewaschen und mit 5 ml Methanol eluiert. Die Säulen wurden mit weiteren 10 ml Methanol regeneriert. Das Eluat wurde über Nacht in einer Vakuumzentrifuge lyophilisiert, in 100 µl 50 mM Natriumphosphatpuffer gelöst und 20 µl mittels HPLC-ECD mit Gradientenelution analysiert.

4.6. HPLC-Analytik

Zur HPLC Analyse wurde ein Hewlett Packard 1100 HPLC-System ausgestattet mit einem ESA Coulochem Model 5100 coulometrischen elektrochemischen Detektor mit einer hochsensitiven analytischen Zelle und einem Kratos Spectroflow 757 UV-Detektor verwendet. Die elektrochemischen Potentiale wurden auf 450 mV für die Konditionierungszelle, sowie auf 150 und 350 mV für die analytischen Zellen eingestellt. Die UV-Dektection erfolgte bei 254 nm. Der Probengeber wurde auf 6 °C thermostatisiert. Die analytische Auftrennung wurde auf einer 150 x 3,0 mm Prontosil 120-3-C18-AQ 3 µm Säule (Bischoff Analystechnik) erreicht.

Analyse von DNA-Hydrolysaten

Zur Analyse von DNA-Hydrolysaten wurde zusätzlich eine Vorsäule verwendet. Hier wurde als mobile Phase 50 mM Na-acetat (pH 5,0) mit 8 % Methanol bei isokratischer Elution mit einer Flußrate von 0,5 ml/min verwendet.

Analyse von immunoaffinitätschromatographisch aufgereinigtem Urin

Zur Analyse des durch Immunoaffinitätschromatographie aufgereinigten Urins wurde ein Gradient von 100 % 50 mM Na-acetat (pH 5,0) mit 0,3 % Methanol und 0,3 % Acetonitril auf 50 % 50 mM Na-acetat (pH 5,0) mit 3 % Methanol und 3 % Acetonitril in 25 min gefolgt von einer isokratischen Elution von 3 min bei einer Flußrate von 0,5 ml/min verwendet.

Danksagung

Wir danken Frau Dr. M. Schnölzer und Frau S. Fiedler für die Aufnahmen der MALDI-TOF MS Spektren der Antikörperproben.

Besonderer Dank gebührt Herrn Dr. R. Klein, Frau M. Bonrouhi, Herrn P. Waas, Herrn H. Eskerski, Frau Dr. C. Zwerger und Herrn Dr. W. Nicklas für die Unterstützung bei der Durchführung des Tierversuchs, sowie Herrn A. Benner für die biometrische Versuchsplanung.

Herrn G. Würtele danken wir für die Unterstützung bei der Durchführung der Immunoaffinitätschromatographie von Urinproben.

Veröffentlichungen

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

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

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

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

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

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

5. Literatur

Aruoma, O.I.; Kaur, H.; Halliwell, B.

Oxygen free radicals and human diseases.

J R Soc Health 111 (1991) 172-177.

Barnes, I.; Becker, K.H.

Bodennahes Ozon in der Troposphäre: Entstehungs- und Abbaumechanismen.

BIA-Report 8/95 (1995) 15-24.

Bassett, D.J.; Bowen Kelly, E.; Brewster, E.L.; Elbon, C.L.; Reichenbaugh, S.S.; Bunton, T.; Kerr, J.S.

A reversible model of acute lung injury based on ozone exposure.

Lung 166 (1988) 355-369.

Bayerisches Staatsministerium für Landesentwicklung und Umweltfragen:

Ozon: Wirkung auf Mensch und Umwelt.

Umwelt & Entwicklung 1/1995 (1995)

Bock, K.W.; Degen, G.H.; Foth, H.; Kahl, R.; Kappus, H.; Neumann, H.G.; Oesch, F.; Schulte Hermann, R.

[Ozone--position of the the Advisory Commission of the Toxicology Section of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology (DGPT)].

Pneumologie 52 (1998) 358-365.

Bohr, V.; Anson, R.M.; Mazur, S.; Dianov, G.

Oxidative DNA damage processing and changes with aging.

Toxicol Lett 102-103 (1998) 47-52.

Brockman, A.H.; Orlando, R.

Probe-immobilized affinity chromatography/mass spectrometry.

Anal Chem 67 (1995) 4581-4585.

Bruenner, B.A.; Yip, T.T.; Hutchens, T.W.

Quantitative analysis of oligonucleotides by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry.

Rapid Commun Mass Spectrom 10 (1996) 1797-1801.

Cadet, J.; Berger, M.; Douki, T.; Ravanat, J.L.

Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance.

Rev Physiol Biochem Pharmacol 131 (1997) 1-87.

Chapple, I.L.

Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases.

J Clin Periodontol 24 (1997) 287-296.

Claycamp, H.G.

Phenol sensitization of DNA to subsequent oxidative damage in 8-hydroxyguanine assays.

Carcinogenesis 13 (1992) 1289-1292.

Cohen, S.L.; Chait, B.T.

Influence of matrix solution conditions on the MALDI-MS analysis of peptides and proteins.

Anal Chem 68 (1996) 31-37.

Collins, A.; Cadet, J.; Epe, B.; Gedik, C.

Problems in the measurement of 8-oxoguanine in human DNA. Report of a workshop, DNA oxidation, held in Aberdeen, UK, 19-21 January, 1997.

Carcinogenesis 18 (1997) 1833-1836.

-
- Costello, C.E.
Time, life ... and mass spectrometry. New techniques to address biological questions.
Biophys Chem 68 (1997) 173-188.
- Cotgreave, I.A.
Absorption and metabolic fate of ozone--the molecular basis of ozone-induced toxicity.
Scand J Work Environ Health 22 Suppl 3 (1996) 15-26.
- Cunningham, R.P.
DNA repair: caretakers of the genome?
Curr Biol 7 (1997) R576-9.
- DeLucia, A.J.; Mustafa, M.G.; Hussain, M.Z.; Cross, C.E.
Ozone interaction with rodent lung. III. Oxidation of reduced glutathione and formation of mixed disulfides between protein and nonprotein sulfhydryls.
J Clin Invest 55 (1975) 794-802.
- Dianov, G.; Bischoff, C.; Piotrowski, J.; Bohr, V.A.
Repair pathways for processing of 8-oxoguanine in DNA by mammalian cell extracts.
J Biol Chem 273 (1998) 33811-33816.
- Dillon, D.; Combes, R.; McConville, M.; Zeiger, E.
Ozone is mutagenic in Salmonella.
Environ Mol Mutagen 19 (1992) 331-337.
- Dizdaroglu, M.; Bergtold, D.S.
Characterization of free radical-induced base damage in DNA at biologically relevant levels.
Anal Biochem 156 (1986) 182-188.
- Dreher, D.; Junod, A.F.
Role of oxygen free radicals in cancer development.
Eur J Cancer 32A (1996) 30-38.
- Fitzgerald, M.C.; Parr, G.R.; Smith, L.M.
Basic matrices for the matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins and oligonucleotides.
Anal Chem 65 (1993) 3204-3211.
- Fitzgerald, M.C.; Smith, L.M.
Mass spectrometry of nucleic acids: the promise of matrix-assisted laser desorption-ionization (MALDI) mass spectrometry.
Annu Rev Biophys Biomol. Struct. 24 (1995) 117-140.
- Floyd, R.A.; West, M.S.; Eneff, K.L.; Schneider, J.E.; Wong, P.K.; Tingey, D.T.; Hogsett, W.E.
Conditions influencing yield and analysis of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in oxidatively damaged DNA.
Anal Biochem 188 (1990) 155-158.
- Germadnik, D.; Pilger, A.; Rudiger, H.W.
Assay for the determination of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection.
J Chromatogr B Biomed Sci Appl 689 (1997) 399-403.
- Girault, I.; Fort, S.; Molko, D.; Cadet, J.
Ozonolysis of 2'-deoxycytidine: isolation and identification of the main oxidation products.
Free Radic Res 26 (1997) 257-266.

-
- Girault, I.; Molko, D.; Cadet, J.
Ozonolysis of thymidine: isolation and identification of the main oxidation products.
Free Radic Res 20 (1994) 315-325.
- Gooch, P.C.; Creasia, D.A.; Brewen, J.G.
The cytogenetic effects of ozone: inhalation and in vitro exposures.
Environ Res 12 (1976) 188-195.
- Guerrero, R.R.; Rounds, D.E.; Olson, R.S.; Hackney, J.D.
Mutagenic effects of ozone on human cells exposed in vivo and in vitro based on sister chromatid exchange analysis.
Environ Res 18 (1979) 336-346.
- Gusev, A.I.; Wilkinson, W.R.; Proctor, A.; Hercules, D.M.
Improvement of signal reproducibility and matrix/comatrix effects in MALDI analysis.
Anal Chem 67 (1995) 1034-1041.
- Guyton, K.Z.; Kensler, T.W.
Oxidative mechanisms in carcinogenesis.
Br Med Bull. 49 (1993) 523-544.
- Hamelin, C.
Production of single- and double-strand breaks in plasmid DNA by ozone.
Int J Radiat Oncol Biol. Phys. 11 (1985) 253-257.
- Haring, M.; Rudiger, H.; Demple, B.; Boiteux, S.; Epe, B.
Recognition of oxidized abasic sites by repair endonucleases.
Nucleic Acids Res 22 (1994) 2010-2015.
- Helbock, H.J.; Beckman, K.B.; Ames, B.N.
8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage.
Methods Enzymol 300 (1999) 156-166.
- Helbock, H.J.; Beckman, K.B.; Shigenaga, M.K.; Walter, P.B.; Woodall, A.A.; Yeo, H.C.; Ames, B.N.
DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine.
Proc Natl Acad Sci U S A 95 (1998) 288-293.
- Helbock, H.J.; Thompson, J.; Yeo, H.; Ames, B.N.
N2-methyl-8-oxoguanine: a tRNA urinary metabolite--role of xanthine oxidase.
Free Radic Biol Med 20 (1996) 475-481.
- Henle, E.S.; Luo, Y.; Gassmann, W.; Linn, S.
Oxidative damage to DNA constituents by iron-mediated fenton reactions. The deoxyguanosine family.
J Biol Chem 271 (1996) 21177-21186.
- Hillenkamp, F.; Karas, M.
Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization.
Methods Enzymol 193 (1990) 280-295.
- Hofer, T.; Moller, L.
Reduction of oxidation during the preparation of DNA and analysis of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine.
Chem Res Toxicol 11 (1998) 882-887.
- Hung, K.C.; Rashidzadeh, H.; Wang, Y.; Guo, B.
Use of paraffin wax film in MALDI-TOF analysis of DNA.
Anal Chem 70 (1998) 3088-3093.

-
- Hutchens, T.W.; Yip, T.T.
New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules.
Rapid Commun Mass Spectrom 7 (1993) 576-580.
- Ishizaki, K.; Shinriki, N.; Ikehata, A.; Ueda, T.
Degradation of nucleic acids with ozone. I. Degradation of nucleobases, ribonucleosides and ribonucleoside-5'-monophosphates.
Chem Pharm Bull Tokyo. 29 (1981) 868-872.
- Karas, M.; Hillenkamp, F.
Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons.
Anal Chem 60 (1988) 2299-2301.
- Kasai, H.
Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis.
Mutat Res 387 (1997) 147-163.
- Kaufmann, R.
Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectrometry: a novel analytical tool in molecular biology and biotechnology.
J Biotechnol 41 (1995) 155-175.
- Kaul, N.; Siveski Iliskovic, N.; Hill, M.; Slezak, J.; Singal, P.K.
Free radicals and the heart.
J Pharmacol Toxicol Methods 30 (1993) 55-67.
- kirschner, M.J.
Ozon.
Ullmann Enzyklopädie der industriellen Chemie 20 (1999) 400-409.
- Knight, J.A.
Free radicals: their history and current status in aging and disease.
Ann Clin Lab Sci 28 (1998) 331-346.
- Kruszewski, M.; Wojewodzka, M.; Iwanenko, T.; Collins, A.R.; Szumiel, I.
Application of the comet assay for monitoring DNA damage in workers exposed to chronic low-dose irradiation. II. Base damage.
Mutat Res 416 (1998) 37-57.
- Le Page, F.; Guy, A.; Cadet, J.; Sarasin, A.; Gentil, A.
Repair and mutagenic potency of 8-oxoG:A and 8-oxoG:C base pairs in mammalian cells.
Nucleic Acids Res 26 (1998) 1276-1281.
- Lenaz, G.; Cavazzoni, M.; Genova, M.L.; D'Aurelio, M.; Pich, M.M.; Pallotti, F.; Formiggini, G.; Marchetti, M.; Castelli, G.P.; Bovina, C.
Oxidative stress, antioxidant defences and aging.
Biofactors 8 (1998) 195-204.
- Loft, S.; Poulsen, H.E.
Estimation of oxidative DNA damage in man from urinary excretion of repair products.
Acta Biochim Pol. 45 (1998) 133-144.
- Loft, S.; Vistisen, K.; Ewertz, M.; Tjonneland, A.; Overvad, K.; Poulsen, H.E.
Oxidative DNA damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in humans: influence of smoking, gender and body mass index.
Carcinogenesis 13 (1992) 2241-2247.

-
- Mapp, P.I.; Grootveld, M.C.; Blake, D.R.
Hypoxia, oxidative stress and rheumatoid arthritis.
Br Med Bull 51 (1995) 419-436.
- Menzel, D.B.
Toxicity of ozone, oxygen, and radiation.
Annu Rev Pharmacol 10 (1970) 379-394.
- Merz, T.; Bender, M.A.; Kerr, H.D.; Kulle, T.J.
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 (1975) 299-302.
- Milligan, J.R.; Aguilera, J.A.; Nguyen, T.T.; Ward, J.F.; Kow, Y.W.; He, B.; Cunningham, R.P.
Yield of DNA strand breaks after base oxidation of plasmid DNA.
Radiat Res 151 (1999) 334-342.
- Moller, L.; Hofer, T.
[32P]ATP mediates formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine from 2'-deoxyguanosine, a possible problem in the 32P-postlabeling assay.
Carcinogenesis 18 (1997) 2415-2419.
- Nakae, D.; Mizumoto, Y.; Kobayashi, E.; Noguchi, O.; Konishi, Y.
Improved genomic/nuclear DNA extraction for 8-hydroxydeoxyguanosine analysis of small amounts of rat liver tissue.
Cancer Lett 97 (1995) 233-239.
- Nakanishi, T.; Okamoto, N.; Tanaka, K.; Shimizu, A.
Laser desorption time-of-flight mass spectrometric analysis of transferrin precipitated with antiserum: a unique simple method to identify molecular weight variants.
Biol Mass Spectrom 23 (1994) 230-233.
- Nelson, R.W.; Krone, J.R.; Bieber, A.L.; Williams, P.
Mass spectrometric immunoassay.
Anal Chem 67 (1995) 1153-1158.
- Park, E.M.; Shigenaga, M.K.; Degan, P.; Korn, T.S.; Kitzler, J.W.; Wehr, C.M.; Kolachana, P.; Ames, B.N.
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 (1992) 3375-3379.
- Pflaum, M.; Will, O.; Epe, B.
Determination of steady-state levels of oxidative DNA base modifications in mammalian cells by means of repair endonucleases.
Carcinogenesis 18 (1997) 2225-2231.
- Piperakis, S.M.; Visvardis, E.E.; Tassiou, A.M.
Comet assay for nuclear DNA damage.
Methods Enzymol 300 (1999) 184-194.
- Pouget, J.P.; Ravanat, J.L.; Douki, T.; Richard, M.J.; Cadet, J.
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 (1999) 51-58.
- Pryor, W.A.
How far does ozone penetrate into the pulmonary air/tissue boundary before it reacts?
Free Radic Biol Med 12 (1992) 83-88.

-
- Pryor, W.A.; Das, B.; Church, D.F.
The ozonation of unsaturated fatty acids: aldehydes and hydrogen peroxide as products and possible mediators of ozone toxicity.
Chem Res Toxicol 4 (1991) 341-348.
- Ravanat, J.L.; Duretz, B.; Guiller, A.; Douki, T.; Cadet, J.
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 (1998) 349-356.
- Ravanat, J.L.; Turesky, R.J.; Gremaud, E.; Trudel, L.J.; Stadler, R.H.
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 (1995) 1039-1045.
- Rithidech, K.; Hotchkiss, J.A.; Griffith, W.C.; Henderson, R.F.; Brooks, A.L.
Chromosome damage in rat pulmonary alveolar macrophages following ozone inhalation.
Mutat Res 241 (1990) 67-73.
- Roche, E.; Romero Alvira, D.
Oxidative stress in some dementia types.
Med Hypotheses 40 (1993) 342-350.
- Sarto, F.; Viola, A.
Aberrazioni cromosomiche in soggetti esposti cronicamente ad ozono.
G Ital Med Lav (1980) 59-61.
- Schuler, D.; Otteneder, M.; Sagelsdorff, P.; Eder, E.; Gupta, R.C.; Lutz, W.K.
Comparative analysis of 8-oxo-2'-deoxyguanosine in DNA by 32P- and 33P-postlabeling and electrochemical detection.
Carcinogenesis 18 (1997) 2367-2371.
- Shigenaga, M.K.; Aboujaoude, E.N.; Chen, Q.; Ames, B.N.
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 (1994) 16-33.
- Shigenaga, M.K.; Park, J.W.; Cundy, K.C.; Gimeno, C.J.; Ames, B.N.
In vivo oxidative DNA damage: measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA and urine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection.
Methods Enzymol 186 (1990) 521-530.
- Shiraishi, F.; Bandow, H.
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 (1985) 531-538.
- Sies, H.
Oxidative stress: from basic research to clinical application.
Am J Med 91 (1991) 31S-38S.
- Spiteller, G.
Review: on the chemistry of oxidative stress.
J Lipid Mediat 7 (1993) 199-221.

-
- Stemmler, E.A.; Buchanan, M.V.; Hurst, G.B.; Hettich, R.L.
Structural characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon dihydrodiol epoxide DNA adducts using matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform mass spectrometry.
Anal Chem 66 (1994) 1274-1285.
- Tagesson, C.; Kallberg, M.; Klintonberg, C.; Starkhammar, H.
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 (1995) 934-940.
- Teixeira, A.J.; Gommers Ampt, J.H.; Van de Werken, G.; Westra, J.G.; Stavenuiter, J.F.; de Jong, A.P.
Method for the analysis of oxidized nucleosides by gas chromatography/mass spectrometry.
Anal Biochem 214 (1993) 474-483.
- Tice, R.R.; Bender, M.A.; Ivett, J.L.; Drew, R.T.
Cytogenetic effects of inhaled ozone.
Mutat Res 58 (1978) 293-304.
- Toyokuni, S.; Tanaka, T.; Hattori, Y.; Nishiyama, Y.; Yoshida, A.; Uchida, K.; Hiai, H.; Ochi, H.; Osawa, T.
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 (1997) 365-374.
- Ultman, J.S.; Ben Jebria, A.; Hu, S.C.
Noninvasive determination of respiratory ozone absorption: the bolus-response method.
Res Rep Health Eff Inst discussion 29-42 (1994) -42.
- Van der Zee, J.; Van Beek, E.; Dubbelman, T.M.; Van Steveninck, J.
Toxic effects of ozone on murine L929 fibroblasts. Damage to DNA.
Biochem J 247 (1987) 69-72.
- Victorin, K.
Review of the genotoxicity of ozone.
Mutat Res 277 (1992) 221-238.
- Victorin, K.
Genotoxicity and carcinogenicity of ozone.
Scand J Work Environ Health 22 Suppl 3 (1996) 42-51.
- Vogel, R.A.
Coronary risk factors, endothelial function, and atherosclerosis: a review [see comments].
Clin Cardiol 20 (1997) 426-432.
- Wang, L.; Hirayasu, K.; Ishizawa, M.; Kobayashi, Y.
Purification of genomic DNA from human whole blood by isopropanol-fractionation with concentrated NaI and SDS.
Nucleic Acids Res 22 (1994) 1774-1775.
- Wiseman, H.; Halliwell, B.
Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer.
Biochem J 313 (1996) 17-29.
- Wiseman, H.; Kaur, H.; Halliwell, B.
DNA damage and cancer: measurement and mechanism.
Cancer Lett 93 (1995) 113-120.

Yates, J.R.

Mass spectrometry and the age of the proteome.

J Mass Spectrom 33 (1998) 1-19.

Yin, B.; Whyatt, R.M.; Perera, F.P.; Randall, M.C.; Cooper, T.B.; Santella, R.M.

Determination of 8-hydroxydeoxyguanosine by an immunoaffinity chromatography-monoclonal antibody-based ELISA.

Free Radic Biol. Med 18 (1995) 1023-1032.

Zelac, R.E.; Cromroy, H.L.; Bolch, W.E., Jr.; Dunavant, B.G.; Bevis, H.A.

Inhaled ozone as a mutagen. I. Chromosome aberrations induced in Chinese hamster lymphocytes.

Environ Res 4 (1971) 262-282.