

Forschungsberichtsblatt zum Förderkennzeichen PUG L 96003:

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

Kurzbeschreibung:

Im Rahmen des Projektes wurde ein neues Nachweisverfahren für oxidierte DNA Basen, insbesondere 8-oxodG, entwickelt werden. Dies ermöglicht 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.

Zur Aufreinigung von 8-oxodG aus Urin wurde eine neue Immunoaffinitätschromatographie entwickelt. 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 8-oxodG Standard auf ca. 1 pmol gesenkt werden. Allerdings erhöhte sich die Nachweisgrenze nach Immunoaffinitätschromatographie durch zusätzliche Matrixeffekte auf über 5 pmol.

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 $10 - 100 \text{ 8-oxodG} / 10^{-8} \text{ dG}$.

Fortschritt:

Die von uns entwickelten Methoden lassen sich auch im Rahmen eines Populationsmonitorings zum Nachweis von 8-oxodG sowohl in der DNA als auch im Urin einsetzen.

Empfehlungen:

Zum Effektmonitoring von Einflüssen, die oxidativen Streß verursachen, sollten in zukünftigen Studien leistungsfähige Meßmethoden wie die von uns entwickelten eingesetzt werden.