INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

DER

$Naturwissenschaftlich-Mathematischen \ Gesamt fakult \ \" at the mathematischen \ Gesamt \ fakult \ \ at the mathematischen \ \ at the mathemathema$

DER

Ruprecht – Karls – Universität

HEIDELBERG

VORGELEGT VON Apotheker Michael Günter Cornelius aus Mannheim

TAG DER MÜNDLICHEN PRÜFUNG: 4. MAI 2006

ANALYSE VON DNA- UND RNA-MODIFIKATIONEN DURCH FLUORESZENZ-POSTLABELING MIT BODIPY UND KAPILLARELEKTROPHORESE MIT LASER-INDUZIERTER FLUORESZENZDETEKTION

Gutachter: PD Dr. Heinz H. Schmeiser Prof. Dr. Gert Fricker

AUS DER ABTEILUNG MOLEKULARE TOXIKOLOGIE LEITER: PROF. DR. RER. NAT. MANFRED WIEßLER AM DEUTSCHEN KREBSFORSCHUNGSZENTRUM HEIDELBERG

DIESE ARBEIT WURDE DURCH EIN PROMOTIONSSTIPENDIUM DER DEUTSCHEN BUNDESSTIFTUNG UMWELT GEFÖRDERT AZ: 264/2002

Meinen Eltern

Zusammenfassung

Michael Günter Cornelius, Apotheker, Tag der mündlichen Prüfung: 04.05.2006

Analyse von DNA- und RNA-Modifikationen durch Fluoreszenz-Postlabeling mit BODIPY und Kapillarelektrophorese mit Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion

Referent:	PD Dr. Heinz H. Schmeiser
Koreferent:	Prof. Dr. Gert Fricker

90% aller Substanzen, die beim Menschen Krebs auslösen, verursachen strukturelle Veränderungen an der DNA, sie wirken genotoxisch durch Bildung von Addukten bzw. Modifikationen. Diese DNA-Modifikationen können endogenen oder exogenen Ursprungs sein. Die Detektion und Analyse von DNA-Modifikationen ist daher von großer Bedeutung, nicht nur für die Bestimmung der biologisch effektiven Dosis der genotoxischen Substanz, sondern auch für die Aufklärung des Zusammenhangs zwischen Exposition und Krebsrisiko. Da DNA-Addukte *in vivo* nur in geringen Konzentrationen auftreten, ergeben sich höchste Anforderungen an eine Analysen-Methode zu ihrem Nachweis.

In dieser Arbeit wurde eine neue Methode zum Nachweis von DNA- und RNA-Modifikationen entwickelt und validiert.

Sie beruht auf der enzymatischen Hydrolyse von DNA bzw. RNA zu Nukleosid-5'-Monophosphaten, deren chemischer Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff (BODIPY-FL-EDA), sich anschließender Trennung mit mizellarer elektrokinetischer Chromatographie und Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion (CE-LIF).

Zur Methodenentwicklung wurden sowohl synthetische Standardverbindungen der Modifikationen, modifizierte 2'-Desoxy- und Ribo-Oligonukleotide, als auch definiert modifizierte Lambda-DNA eingesetzt. Die neue Methode ist in der Lage verschiedene, durch oxidativen Stress und Deaminierungen verursachte DNA-Modifikationen (8-Oxo-Guanin, 8-Oxo-Adenin, Uracil, Inosin), sowie die epigenetisch interessanten Methyl-Modifikationen von Cytosin und Adenin (5-Methylcytosin, N⁶-Methyladenin) mit hoher Präzision, Selektivität und Empfindlichkeit nachzuweisen. Die Nachweisgrenze der DNA-Modifikationen lag bei 100pM (50attomol, 3 Addukte je 10⁷ normale Nukleotide) für Uracil und Inosin und 1nM für 8-Oxo-Guanin und 8-Oxo-Adenin (0.3 Addukte je 10⁷ normale Nukleotide), die der RNA-Modifikationen bei 80pM (40attomol, 2 Addukte je 10⁷ normale Nukleotide) für Pseudouracil und 2'-O-Methyladenin. Die schlechtere Detektierbarkeit der Guanin-Modifikationen konnte auf eine basenspezifische Fluoreszenzlöschung des Farbstoffes zurückgeführt werden.

Mit der validierten Methode wurden verschiedene Basenmodifikationen in *in vitro* modifizierter Kalbsthymus-DNA und der Anteil der natürlich vorkommenden, seltenen Base Pseudouracil in RNA verschiedener Organismen bestimmt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Analysenbedingungen der älteren Variante der Methode, die auf dem Verdau von DNA zu 2'-Desoxynukleosid-3'-Phosphaten mit anschließender Fluoreszenzmarkierung und CE-LIF Analyse beruht, optimiert. Hiermit gelang es verschiedene Deaminierungsprodukte und oxidative Schäden in *in vitro* behandelter Kalbsthymus-DNA zu bestimmen. In Bezug auf ihre Empfindlichkeit und Genauigkeit erwiesen sich beide Varianten als gleichwertig. Des Weiteren wurde speziell für N⁶-Methyladenin eine Analysenmethode ausgearbeitet und validiert, und so der Adenin-Methylierungsgrad von Lambda-DNA aus Wildtyp *E. coli* bestimmt (0.59%).

Summary

Michael Günter Cornelius, Pharmacist, Oral Examination: 04.05.2006

Analysis of DNA and RNA modifications using fluorescence postlabeling and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection

Supervisor:	PD Dr. Heinz H. Schmeiser
Co-Supervisor:	Prof. Dr. Gert Fricker

90% of all substances that cause cancer in humans are genotoxic by exerting their biological effects through the formation of structural changes of DNA, so called DNA modifications or DNA adducts. Detection and analysis of these DNA modifications resulting from endogenous or exogenous exposures to carcinogens is essential not only for quantifying biologically effective doses, but also for establishing relationships between exposure and cancer risk. Since DNA adducts are only present in minute quantities *in vivo*, analytical methods for their detection have to meet high demands.

In this work a new analytical method for the detection of DNA and RNA modifications was developed and validated.

The method is based on enzymatic hydrolysis of DNA or RNA to nucleoside-5'monophosphates, chemical derivatization with a fluorescent dye (BODIPY-FL-EDA) and subsequent separation by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection (CE-LIF).

Method development was carried out using synthetic DNA adduct standards, modified 2'deoxy- and ribooligonucleotides as well as defined modified lambda-phage DNA. The new method has the ability to detect a wide range of DNA modifications caused by oxidative stress and deamination (8-oxo-guanine, 8-oxo-adenine, uracil, inosine) as well as the epigenetically important methyl modifications of cytosine and adenine (5-methylcytosine, N⁶methyladenine) with high precision, selectivity and sensitivity. The limit of detection for the examined DNA modifications was found to be in a range from 100pM (ca. 50attomole, 3 adducts per 10⁷ normal nucleotides) for N⁶-methyladenine, 200pM (ca. 100attomole, 6 adducts per 10⁷ normal nucleotides) for uracil and inosine to 1nM for 8-oxo-guanine, 8-oxoadenine (3 adducts per 10⁶ normal nucleotides). For RNA modifications the limit of detection was approximately 80pM (40attomole, 2 adducts per 10⁷ normal nucleotides) for pseudouracil and 2'-O-methyladenosine. The higher detection limit for modifications of the nucleobase guanine could be ascribed to a base specific fluorescence quenching effect.

The validated method was used to detect various base modifications in *in vitro* modified calf thymus DNA and to determine the amount of the naturally occurring rare base pseudouracil in RNA of different organisms.

In the second part of this thesis the separation conditions of an older version of the fluorescence postlabeling method, which is based on DNA digestion to 2'-deoxnucleoside-3'-monophosphates, fluorescence labeling with BODIPY-FL-EDA and CE-LIF analysis, was optimised. Using the modified procedure different deamination products and oxidative damage in *in vitro* modified calf thymus DNA were determined. Both versions of the fluorescence postlabeling method turned out to be equally efficient and sensitive. Furthermore an analytical method for the detection of N⁶-methyladenine was devised and validated. Using this method it was possible to quantify the methylation level of adenine in lambda DNA of wild-type *E. coli* (0.59%)

VERÖFFENTLICHUNGEN

Publikationen:

Bieler CA, **Cornelius MG**, Klein R, Arlt VM, Wiessler M, Phillips DH, Schmeiser HH DNA adduct formation by the environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone after intratracheal instillation in rats. *International Journal of Cancer*, *116* (2005) 833-38;

Cornelius MG, Wörth CCT, Kliem H-C, Wießler M, Schmeiser HH

Detection and separation of nucleoside-5'-monophosphates of DNA by conjugation with the fluorescent dye BODIPY and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis*, 26 (2005) 2591-98;

Poster-Präsentationen:

46. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Mainz, 15.-17. März 2005;

Cornelius MG, Bieler CA, Klein R, Arlt VM, Wiessler M, Phillips DH, Schmeiser HH DNA adduct formation by the environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone after intratracheal instillation in rats

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 371 (2005), R111 (Suppl. 1)

35th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (EEMS2005), Kos, Griechenland, 3.-7. Juli 2005;

Cornelius MG, Wörth CCT, Kliem H-C, Wießler M, Schmeiser HH

Detection and separation of nucleoside-5'-monophosphates of DNA by conjugation with the fluorescent dye BODIPY and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection

European Journal of Genetic Toxicology, Juli 2005

Vorträge:

5. ³²P-Postlabeling-Workshop, 29.-30. April 2003, Schering AG, Berlin;

Anwendungen der Kapillarelektrophorese mit Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion zur Analyse von DNA-Addukten

I Inhaltsverzeichnis

II	Abkürzungsverzeichnis	iii
1	Einleitung	1
2	Theoretischer Hintergrund	3
2.1	Chemische Kanzerogenese	3
2.2	Metabolische Aktivierung chemischer Kanzerogene	4
2.3	Endogene und exogene Kanzerogene	4
2.3.1	Exogene Kanzerogene	5
2.3.1.1	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe	5
2.3.1.2	Aromatische Stickstoffverbindungen	5
2.3.1.3	Alkylantien	7
2.3.1.4	α,β-ungesättigte Carbonylverbindungen	7
2.3.1.5	Naturstoffe	8
2.3.2	Endogene Kanzerogene	8
2.3.2.1	DNA-Schädigung durch endogene Oxidation	8
2.3.2.2	DNA-Schädigung durch Fettsäureoxidation	9
2.3.2.3	Reaktive Stickstoffspezies	9
2.3.2.4	Spontane hydrolytische Deaminierung und Apurinische Stellen	10
2.3.3	DNA-Methylierung	10
2.4	RNA-Modifikationen	12
2.4.1	Natürliche RNA-Modifikationen	12
2.4.2	RNA-Schäden (Addukte)	13
2.5	Nachweismethoden für DNA-Addukte	13
2.5.1	³² P-Postlabeling	14
2.5.2	Kapillarelektrophorese mit Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion	16
2.5.2.1	Grundlagen der Fluoreszenz	16
2.5.2.2	Fluoreszenzlöschung (Quenching)	17
2.5.2.3	Laser-induzierte Fluoreszenzdetektion (LIF)	17
2.5.2.4	Grundlagen der Kapillarelektrophorese	18
2.5.2.5	Kapillarelektrophoretische Methoden	20
2.6	Theoretischer Hintergrund – Fluoreszenzmarkierung	21
2.6.1	Fluoreszenzmarkierung von Mononukleotiden	21
3	Aufgabenstellung	25
4	Ergebnisse und Diskussion	26
4.1	Stand der Forschung	26
4.2	Fluoreszenzmarkierung von 2'-Desoxynukleosid-5'-Phosphaten	29
4.2.1	Vergleich der Kopplungsausbeuten von Nukleosid-3'- und -5'-Monophosphaten	30
4.2.2	Fluoreszenzmarkierung von pdNs und dNps mit BODIPY-FL-EDA	31
4.3	Entwicklung alternativer Hydrolyseverfahren für DNA	34
4.3.1	Überprüfung neuer Puffersysteme	34
4.3.2	Uberprüfung der Hydrolyse mit dem ³² P-Postlabeling-Verfahren	36
4.3.3	Hydrolyse von DNA mit DNasel/SVPD	38
4.3.4	Hydrolyse von DNA mit Nuklease Pl	39
4.3.5	Methodenentwicklung zur kapillarelektrophoretischen Trennung von	4.1
4 4	5-Methyl-2 -Desoxycytosin-5 -Phosphat-Bodipy (p5mdC-Bodipy)	41
4.4	Validiamus	40
4.4.1 1 1 1	vanuitiung Bestimmung der Nachweisgrenze	40
4.4.1.1 1 1 1 2	Desummung der Mathweisgrenze Renroduzierbarkeit und Präzision der 5° Eluoreszenz Destlebeling Mathada	50
4.4.1.2	Reproduzieroarken und Frazision der 5-Frudreszenz-Fostiadennig-ivieulode Restimmung der Linearität des Messheraighes	52
4.4.1.3 1 1 1	Bestimming der Korrekturfaktoren	55
447	Nachweis von natürlichen DNA-Schäden	58
ч. ч .2 ДДЭ1	Analyse von Deaminierungsprodukten	50 67
7.7.4.1	Thur, se von Deuminerungsprodukten	02

4.4.2.2	Nachweis von Uridin in Bisulfit-behandelter CT-DNA	64
4.4.2.3	Nachweis von Deaminierungsprodukten in Nitrit-behandelter CT-DNA	67
4.4.3	Nachweis von veränderten Basen in 2'-Desoxy-Oligonukleotiden	70
4.4.3.1	N ⁶ -Methyl-2'-Desoxyadenosin	71
4.4.3.2	1,N ⁶ -Etheno-2'-Desoxyadenosin	73
4.4.3.3	8-Oxo-2'-Desoxyguanosin	76
4.4.3.4	8-Oxo-2'-Desoxyadenosin	82
4.5	Analyse von RNA mittels CE-LIF	84
4.5.1	Methodenentwicklung	86
4.5.2 4.5.3	Kapillarelektrophoretische Trennung von 2'-Desoxy- und Ribonukleosid-5'-Phosphaten Nachweis von Pseudouracil und 2'-O-Methyladenosin in Oligoribonukleotiden	90
	durch Fluoreszenz-Postlabeling und CE-LIF	91
4.5.4	Validierung der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode für Ribonukleosid-5'-Phosphate	96
4.5.4.1	Bestimmung der Nachweisgrenze	96
4.5.4.2	Linearität des Messbereichs, Reproduzierbarkeit und Präzision der Analyse	98
4.5.5	RNA-Analysen (verschiedene Organismen und tRNA)	99
4.6	Weiterentwicklung der 3'-Variante der Fluoreszenz-Postlabeling Methode	106
4.6.1	Analyse von 2'-Desoxynukleosid-3'-Phosphat Addukt-Standards	106
4.6.1.1	Analyse von Aminobiphenyl-Addukten	106
4.6.1.2	Fluoreszenzspektroskopie von BODIPY-FL-EDA	112
4.6.2	Untersuchung des 1,N ² -Propano-2'-Desoxyguanosin Adduktes von Trans-2-Hexenal	
	mit der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode	116
4.6.3	Untersuchungen von 8-Oxo-2'-Desoxyguanosin-3'-Phosphat (8-oxo-dGp) in DNA	119
4.6.4	Nachweis von 2'-Desoxyinosin-3'-Phosphat in DNA	128
4.6.5	Entwicklung einer Analysenmethode zur Bestimmung von N ⁶ -Methyladenosin mit der	
	3'-Variante der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode	130
4.6.5.1	In vitro dam Methylierung von Lambda-DNA	134
4.7	Abschliessende Diskussion	139
4.7.1	Vergleich der Fluoreszenz-Postlabeling-Methoden	139
4.7.1.1	Nachweisgrenzen	140
4.7.1.2	Reproduzierbarkeit	140
4.7.1.3	Migrationsverhalten bei der kapillarelektrophoretischen Trennung	140
4.7.1.4	Analysendauer	142
4.7.2	Korrekturfaktoren und Ouenching-Effekte	143
4.7.2.1	Beziehung zwischen Struktur und Signalintensität	144
4.7.3	Ausblick	147
5	Experimenteller Teil	148
5.1	Geräte und Materialien	148
5.1	Methoden	152
521	³² P-Postlabeling Analysen	152
522	Fluoreszenzmarkierung enzymatischer DNA- und RNA-Hydrolysate	156
523	Kanillarelektronhorese	150
524	In vitro Systeme	163
5.3	Synthese von Addukt-Standardverbindungen	166
6	Literaturverzeichnis	169
7	Danksagungen	180

II Abkürzungsverzeichnis

λ-DNA	Lambda-Phagen-DNA
μg	Mikrogramm (10 ⁻⁶ g)
μl	Mikroliter (10 ⁻⁶ l)
μm	Mikrometer (10 ⁻⁶ m)
μM	Mikromolar (10 ⁻⁶ mol/l)
3-NBA	3-Nitro-7H-benz[d,e]anthracen-7-on (3-Nitrobenzanthron)
4-ABP	4-Aminobiphenyl
5mC	5-Methylcytosin
5mdCp	5-Methyl-2'-Desoxycytidin-3'-Phosphat
5mdCp-Bodipy	5-Methyl-2'-Desoxycytidin-3'-Phosphat Bodipy-Konjugat
8-oxo-dGp	8-Oxo-7,8-Dihydro-2'-Desoxyguanosin-3'-Monophosphat
8-oxo-dGp-Bodipy	8-Oxo-7,8-Dihydro-2'-Desoxyguanosin-3'-Monophosphat Bodipy Konjugat
8-oxo-pdG	8-Oxo-7,8-Dihydro-2'-Desoxyguanosin-5'-Monophosphat
8-oxo-pdG-Bodipy	8-Oxo-7,8-Dihydro-2'-Desoxyguanosin-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat
AAI	Aristolochiasäure I
AA II	Aristolochiasäure II
ATP	Adenosintriphosphat
amol	Attomol (10^{-18}mol)
B[a]P	Benzo[a]pyren
BODIPY-FL-EDA	4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-propionylethylendiamin-
	hydrochlorid
С	Čytosin
CE	Kapillarelektrophorese
CGE	Kapillargelelektrophorese
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-2-hydroxypropansulfonat
Cisplatin	cis-Diamindichlorplatin(II)
cm	Zentimeter $(10^{-2}m)$
CTAB	Hexadecyl-trimethylammoniumchlorid
CT-DNA	Kalbsthymus-DNA, calf thymus DNA
CZE	Kapillarzonenelektrophorese
dA-AA I,II	7-(2'-Desoxyadenosin-N ⁶ -yl)-Aristolactam I,II
dAp	2'-Desoxyadenosin-3'-Monophosphat
dAp-Bodipy	2'-Desoxyadenosin-3'-Monophosphat Bodipy-Konjugat
dCp	2'-Desoxycytidin-3'-Monophosphat
dCp-Bodipy	2'-Desoxycytidin-3'-Monophosphat Bodipy-Konjugat
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DDT	1,1-(p,p'-Dichlordiphenyl)-2-trichlorethan
dG-AA I,II	7-(2'-Desoxyguanosin-N ² -yl)-Aristolactam I,II
dGp	2'-Desoxyguanosin-3'-Monophosphat
dGp-Bodipy	2'-Desoxyguanosin-3'-Monophosphat Bodipy-Konjugat
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNaseI	DNaseI aus Rinderbauchspeicheldrüse
Dnmt	DNA-Methyltransferase
dNp	2'-Desoxynukleosid-3'-Monphosphat
dNp-Bodipy	2'-Desoxynukleosid-3'-Monophosphat Bodipy-Konjugat
EDC	N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EOF	elektroosmotischer Fluß
ESI	electrospray-ionization
ESI-DAU (X)	Tochterionenspektrum der Verbindung der Masse X
etheno-dAp	1,N°-Etheno-2'-Desoxyadenosin-3'-Monophosphat
etheno-dAp-Bodipy	1,N°-Etheno-2'-Desoxyadenosin-3'-Monophosphat Bodipy-Konjugat
etheno-pdA	1,N°-Etheno-2'-Desoxyadenosin-5'-Monophosphat
etheno-pdA-Bodipy	1,N°-Etheno-2'-Desoxyadenosin-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat
fM	Femtomolar (10^{-13} mol/l)
FLNS	fluorescence-line-narrowing spectroscopy

FOV	Elizanos - mantenaria harta (fluonascence manten riald)
FQ1	Fluoreszenzquantenausbeute (nuorescence quantum yield)
GC	Gaschromatographie
GLY	Glycinethylester
GSH	Glutathion
H_2O_2	Wasserstoffsuperoxid
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	high performance liquid chromatography
IARC	International Agency for Research on Cancer
няа	humanes Serumalhumin
I	affaltiva Länga dar Kanillara his zum Dataktionsfanstar
Leff	Casentianas der Kapillare
LIF	Laser-induzierte Fluoreszenz
LOD	limit of detection, Nachweisgrenze
М	Molar (1mol/l)
MALDI-TOF	matrix-assisted laser-desorption ionization – time-of-flight
MeIO	2-Amino-3.4-dimethylimidazol[4.5-flchinolin
MEKC	micellare elektrokinetische Chromatographie
MES	2 (N mornholing) ethansulfonsäure
WILS .	2-(N-morphonino)-cunansunonsaure
mg	$\operatorname{Milligramm}_{111} (10^{-3} \text{ g})$
mM	millimolar (10 ^{-m} ol/l)
MN	Mikrokokkennuklease
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
MSP	methylation specific PCR
N ⁶ mA	N ⁶ -Methyladenin
N ⁶ md An	N ⁶ -Methyl-2'-Desoyvadenosin-3'-Mononhosnhat
N ⁶ md An Dodiny	N ⁶ Methyl 2 ² Decovyadenosin 2 ² Monophosphat
N maxp-boarpy	N -Methyl-2 -Desoxyadenosin-5 -Monophosphat Bodipy-Konjugat
N°mpdA	N°-Methyl-2'-Desoxyadenosin-3'-Monophosphat
N ^o mpdA-Bodipy	N°-Methyl-2'-Desoxyadenosin-3'-Monophosphat Bodipy-Konjugat
nl	Nanoliter (10 ⁻⁹ 1)
nm	Nanometer (10 ⁻⁹ m)
nM	nanomolar (10 ⁻⁹ mol/l)
nmol	Nanomol (10 ⁻⁹ mol)
NMR	nuclear magnetic resonance
ND1	Nuklaasa D1
	Nukicase 1 1 nalyzyklischa aromatischa Kahlanwassarataffa
	Delaware Kattenneldier
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
p5mdC	5-Methyl-2'-Desoxycytidin-5'-Monophosphat
pdA	2'-Desoxyadenosin-5'-Monophosphat
pdA-Bodipy	2'-Desoxyadenosin-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat
pdC	2'-Desoxycytidin-5'-Monophosphat
ndC-Bodiny	2'-Desoxycytidin-5'-Monophosphat Bodipy-Koniugat
ndG	2'-Desoryguanosin-5'-Mononhosnhat
ndG Rodiny	2' Desoxyguanosin 5' Monophosphat 2' Desoxyguanosin 5' Monophosphat Bodiny Konjugat
ndl	2' Deservinging 5' Mononhoamhat
	2 -Desoxymosin-5 -Wonophosphat
pdl-Bodipy	2 -Desoxymosin-5 -Monophosphat Bodipy-Konjugat
pdN	
pdN-Bodipy	2'-Desoxynukleosid-5'-Monophosphat
ndR	2'-Desoxynukleosid-5'-Monophosphat 2'-Desoxynukleosid-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat
purc	2'-Desoxynukleosid-5'-Monophosphat 2'-Desoxynukleosid-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat 2'-Desoxyribose-5'-Monophosphat
pdU	2'-Desoxynukleosid-5'-Monophosphat 2'-Desoxynukleosid-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat 2'-Desoxyribose-5'-Monophosphat 2'-Desoxyuridin-5'-Monophosphat
pdU pdU-Bodipy	2'-Desoxynukleosid-5'-Monophosphat 2'-Desoxynukleosid-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat 2'-Desoxyribose-5'-Monophosphat 2'-Desoxyuridin-5'-Monophosphat 2'-Desoxyuridin-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat
pdU pdU-Bodipy pH	2'-Desoxynukleosid-5'-Monophosphat 2'-Desoxynukleosid-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat 2'-Desoxyribose-5'-Monophosphat 2'-Desoxyuridin-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat potentia hydrogenii
pdU pdU-Bodipy pH PhIP	2'-Desoxynukleosid-5'-Monophosphat 2'-Desoxynukleosid-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat 2'-Desoxyribose-5'-Monophosphat 2'-Desoxyuridin-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat potentia hydrogenii 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-blpyridin
pdU pdU-Bodipy pH PhIP	 2'-Desoxynukleosid-5'-Monophosphat 2'-Desoxynukleosid-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat 2'-Desoxyribose-5'-Monophosphat 2'-Desoxyuridin-5'-Monophosphat 2'-Desoxyuridin-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat potentia hydrogenii 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin Logarithmus dar Dissoriationskonstants dar protoniorten Form
pdU pdU-Bodipy pH PhIP pK _s	 2'-Desoxynukleosid-5'-Monophosphat 2'-Desoxynukleosid-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat 2'-Desoxyribose-5'-Monophosphat 2'-Desoxyuridin-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat potentia hydrogenii 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin Logarithmus der Dissoziationskonstante der protonierten Form
pdU pdU-Bodipy pH PhIP pK _s pM	 2'-Desoxynukleosid-5'-Monophosphat 2'-Desoxynukleosid-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat 2'-Desoxyribose-5'-Monophosphat 2'-Desoxyuridin-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat potentia hydrogenii 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin Logarithmus der Dissoziationskonstante der protonierten Form picomolar (10⁻¹²mol/l)
pdU pdU-Bodipy pH PhIP pK _s pM prA	 2'-Desoxynukleosid-5'-Monophosphat 2'-Desoxynukleosid-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat 2'-Desoxyuridin-5'-Monophosphat 2'-Desoxyuridin-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat potentia hydrogenii 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin Logarithmus der Dissoziationskonstante der protonierten Form picomolar (10⁻¹²mol/l) Adenosin-5'-Monophosphat
pdU pdU-Bodipy pH PhIP pK _s pM prA prA-Bodipy	 2'-Desoxynukleosid-5'-Monophosphat 2'-Desoxynukleosid-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat 2'-Desoxyuridin-5'-Monophosphat 2'-Desoxyuridin-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat potentia hydrogenii 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin Logarithmus der Dissoziationskonstante der protonierten Form picomolar (10⁻¹²mol/l) Adenosin-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat
pdU pdU-Bodipy pH PhIP pK _s pM prA prA-Bodipy prC	 2'-Desoxynukleosid-5'-Monophosphat 2'-Desoxynukleosid-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat 2'-Desoxyribose-5'-Monophosphat 2'-Desoxyuridin-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat potentia hydrogenii 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin Logarithmus der Dissoziationskonstante der protonierten Form picomolar (10⁻¹²mol/l) Adenosin-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat Cytidin-5'-Monophosphat
pdU pdU-Bodipy pH PhIP pK _s pM prA prA-Bodipy prC prC-Bodipy	 2'-Desoxynukleosid-5'-Monophosphat 2'-Desoxynukleosid-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat 2'-Desoxyribose-5'-Monophosphat 2'-Desoxyuridin-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat potentia hydrogenii 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin Logarithmus der Dissoziationskonstante der protonierten Form picomolar (10⁻¹²mol/l) Adenosin-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat Cytidin-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat Cytidin-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat
pdU pdU-Bodipy pH PhIP pK _s pM prA prA-Bodipy prC prC-Bodipy prG	 2'-Desoxynukleosid-5'-Monophosphat 2'-Desoxynukleosid-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat 2'-Desoxyuridin-5'-Monophosphat 2'-Desoxyuridin-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat potentia hydrogenii 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin Logarithmus der Dissoziationskonstante der protonierten Form picomolar (10⁻¹²mol/l) Adenosin-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat Cytidin-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat Cytidin-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat Gytidin-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat Guanosin-5'-Monophosphat

prG-Bodipy	Guanosin-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat
prI	Inosin-5'-Monophosphat
prI-Bodipy	Inosin-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat
prN	Nukleosid-5'-Monophosphat
prn-Bodipy	Nukleosid-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat
prU	Uridin-5'-Monophosphat
prU-Bodipy	Uridin-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat
prX	Xanthosin-5'-Monophosphat
prX-Bodipy	Xanthosin-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat
psi	pounds per square inch (1psi = 6894,75729 Pascal)
рТ	Thymidin-5'-Monophosphat
pT-Bodipy	Thymidin-5'-Monophosphat Bodipy-Konjugat
RAL	relatives Addukt-Labeling
Rel. Stabw.	relative Standardabweichugn
RFU	relative Fluoreszenzeinheiten, relative fluorescence units
RIA	Radioimmunoassay
RP-HPLC	reversed-phase high performance liquid chromatography
rRNA	ribosomale RNA
S9-Mix	Rattenleberhomogenat
s.d.	siehe dort
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	size exclusion chromatography, Größenausschlußchromatographie
SFS	synchronous fluorescence spectrophotometry
snRNA	small nuclear RNA
SPD	Milz-Phosphodiesterase, (spleen phosphodiesterase)
SVPDE	Schlangengift-Phosphodiesterase
Тр	Thymidin-3'-Monophosphat
Tp-Bodipy	Thymidin-3'-Monophosphat Bodipy Konjugat
tRNA	transfer RNA
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
USERIA	ultrasensitive enzymatic radioimmunoassay
UV-	ultraviolett-
zeptomol	Zeptomol (10 ⁻²¹ mol)

1 Einleitung

In Deutschland ist Krebs nach den Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems die zweithäufigste Todesursache. Als hauptverantwortlich für die Krebsentstehung gelten Umwelteinflüsse wie UV-Strahlung, bestimmte Bakterien oder Viren und die Exposition gegenüber chemischen Substanzen. Der größte Teil der Krebsfälle (80-90%) kann daher auf letztendlich vermeidbare Expositionsarten zurückgeführt werden, zu denen insbesondere die Ernährungsgewohnheiten, sowie Tabak- und Alkoholkonsum gehören, aber auch berufliche Expositionen und die generelle Belastung der Bevölkerung durch Luftschadstoffe [1]. War man anfangs noch der Meinung, dass zwei Mutationen zur Krebsentstehung ausreichen (Knudsons "two-hit model" 1971 [2]), so ist die derzeitige Lehrmeinung, dass die Krebsentstehung ein mehrstufiger Prozess ist, bei dem sich im Laufe der Zeit Schäden im Erbgut anhäufen ("multi hit model"[3]). Eine wichtige Rolle spielen bei diesem Prozess chemische Substanzen als genotoxische Agenzien. Derzeit sind über 500 Chemikalien, das entspricht 20% aller chronisch-toxikologisch getesteten Substanzen, im Tierexperiment als krebserzeugend eingestuft [3]. Von den beim Menschen als krebsauslösend bekannten Substanzen führen 90% spontan oder nach metabolischer Aktivierung zu kovalenten Veränderungen der DNA, d. h. sie bilden so genannte DNA-Addukte [4]. Diese strukturellen Modifikationen der DNA stellen als prämutagene Läsionen oftmals den ersten Schritt in der Kanzerogenese dar. Daher können sie einerseits als individuelle interne Dosimeter für die Exposition gegenüber genotoxischen Substanzen, aber andererseits auch als frühe Biomarker des Krebsrisikos für die molekulare Epidemiologie genutzt werden [5]. Gleichzeitig wird die Analyse von DNA-Addukten für die Erkennung von Präventionsmaßnahmen und zur Diagnostik in der Krebstherapie eingesetzt.

DNA-Addukte treten *in vivo* nur in extrem geringen Konzentrationen auf, da nur wenige DNA-Basen modifiziert werden und die Zelle über außerordentlich effiziente Reparatursysteme für Schäden am Erbgut verfügt. Im Allgemeinen findet man für die verschiedensten Substanzen, denen der Organismus ausgesetzt ist, einen DNA-Gesamtadduktlevel von 1 Addukt in 10⁶ bis 10⁸ unmodifizierten Nukleotiden. Bezogen auf ein bestimmtes DNA-Addukt finden sich jedoch oft nur 1 oder 2 in 10⁹ bis 10¹⁰ normalen Nukleotiden, z. B. im Blut von nicht beruflich exponierten Personen [6]. Verbunden mit dem Umstand, dass in der Regel nur sehr wenig DNA aus biologischen Proben für eine Analyse zur Verfügung steht, ergeben sich höchste Anforderungen an die Sensitivität einer analytischen Methode zur Bestimmung von DNA-Addukten *in vivo*. Gleichzeitig bedarf es für die Untersuchung von DNA-Adduktmustern aus komplexen Gemischen genotoxischer Schadstoffe, entsprechend den realen humanen Expositionsgegebenheiten, wie zum Beispiel Autoabgase oder Zigarettenrauch, einer sehr selektiven Analysenmethode. Diese ist nötig, um möglichst alle der gebildeten DNA-Addukte trennen und simultan detektieren zu können, auch wenn sie chemisch und strukturell stark unterschiedlich sind.

Im Laufe der letzten Jahre wurden viele Anstrengungen unternommen, Analysenmethoden zu entwickeln, die alle diese Ansprüche erfüllen [6-17]. Wirklich etablieren konnte sich in der Routineanalytik jedoch nur das ³²P-Postlabeling-Verfahren, welches die Detektion von 1 Addukt in 10⁹ bis 10¹⁰ unmodifizierten Nukleotiden ermöglicht und dabei mit einer DNA-Menge von nur 10µg auskommt [6-8]. Allerdings hat auch diese Methode noch gravierende Nachteile:

- schlechte Reproduzierbarkeit
- keine simultane Analytik verschiedener Adduktklassen
- Probleme bei der Analyse kleinvolumiger Addukte
- geringer Probendurchsatz
- keine Automatisierungsmöglichkeit
- Verwendung radioaktiver Materialien
- keine absolute Addukt-Quantifizierung

Eine neue Trennmethode, der zugetraut wird einige dieser Nachteile überwinden zu können, ist die in den achtziger Jahren entwickelte Kapillarelektrophorese. Dieses Verfahren kommt mit kleinsten Probenmengen aus und sollte in Verbindung mit der Laser-induzierten Fluoreszenzdetektion (LIF) in der Lage sein, die erforderliche hohe Sensitivität zu erreichen [16]. Darüber hinaus sind kapillarelektrophoretische Trennungen automatisierbar und ermöglichen durch kurze Analysenzeiten, verbunden mit einer potentiellen Miniaturisierung, z. B. auf Glas- oder Kunststoff-Chips, einen hohen Probendurchsatz bei vergleichsweise geringen Kosten. Damit kann die Bestimmung von DNA-Addukten in Zukunft in umfangreiche molekularepidemiologische Studien eingebunden werden, was zu einem besseren Verständnis der Krebsentstehung und lebensgewohnheitsbedingter und umweltbezogener Risikofaktoren führen sollte.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Chemische Kanzerogenese

Es ist mittlerweile für eine ganze Reihe von chemischen Substanzen gut belegt, dass sie an der Auslösung bestimmter Krebserkrankungen des Menschen beteiligt sind. Historisch betrachtet vermutete zum ersten Mal Paracelsus um 1500 einen Zusammenhang zwischen dem Lungenkrebs von Bergleuten und Rauschrot (Realgar, As₄S₄). Aktuelle Beispiele sind Farbstoffe, vor allem aromatische Amine, als Ursache für Blasenkrebs oder auch das Auftreten von Mesangiotheliomen bei Personen, die mit Asbest gearbeitet haben [3].

Beide Substanzen gehören jedoch in bezug auf ihren Wirkmechanismus zu ganz unterschiedlichen Klassen von chemischen Kanzerogenen: Aromatische Amine (z. B. β-Naphthylamin) auf der einen Seite gehören zu den genotoxischen Kanzerogenen, die direkt mit der DNA reagieren und DNA-Addukte bilden. Zu dieser Klasse gehören auch die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAH), Nitrosamine und einige Naturstoffe. In vielen Fällen ist zuvor jedoch noch eine "Giftung" der chemischen Kanzerogene durch metabolische Aktivierung nötig [18].

Die zweite Kategorie der chemischen Kanzerogene umfasst die "epigenetisch" wirksamen Substanzen wie z. B. DDT, Diethylstilböstrol und Asbest, die nicht direkt mit DNA reagieren, sondern beispielsweise über Rezeptoren für Wachstumsfaktoren tumorpromovierend, pseudohormonell oder cytotoxisch wirken [19, 20].

Zur Erklärung des molekularen Wirkmechanismus der Krebsentstehung hat sich ein Mehrstufenkonzept durchgesetzt. Demnach wandeln sich normale Körperzellen nicht unmittelbar in maligne Zellen um, vielmehr handelt es sich dabei um einen lang andauernden Prozess, der in vielen kleinen Schritten, die jeweils eine genetische Veränderung bewirken, verläuft. Dabei geht man von einer Mutation des Erbgutes als erstem Schritt aus (Initiation), gefolgt von einem epigenetischen Ereignis, das zu einer Stimulation des Zellwachstums führt (Promotion). DNA-Schäden (wie DNA-Addukte, Strangbrüche u. a.) gelten als Vorläufer für diese Mutationen, da es im Zuge der Replikation an den Positionen dieser DNA-Modifikationen oder in der unmittelbaren Nähe zu Basensubstitutionen oder Deletionen und Leserasterverschiebungen ("frame-shift") kommt. Dieses klassische Modell wurde erweitert durch die Progression. In diesem dritten Schritt wird aus der gutartigen Wucherung durch Anhäufung weiterer Gendefekte ein maligner Tumor [3]. Eine zentrale Rolle nehmen dabei Protoonkogene und Tumorsuppressorgene ein, die auch als "critical target genes" der Kanzerogenese bezeichnet werden [21]. Das bekannteste Gen aus dieser Familie ist sicherlich *p*53, das unter anderem verhindert, dass sich Zellen teilen, deren Erbgut Schäden aufweist. Fällt diese Kontrollinstanz aus, können sich entartete Zellen nahezu ungehindert vermehren und weiter Schäden ansammeln, die sich letztendlich fatal auswirken können [22].

2.2 Metabolische Aktivierung chemischer Kanzerogene

Der größte Teil der bekannten krebsauslösenden Stoffe muss im Körper metabolisch aktiviert werden, bevor er mit der DNA kovalent reagieren kann. Verantwortlich hierfür sind insbesondere Enzyme, die Biotransformationen von xenobiotischen Stoffen katalysieren. Dabei werden kanzerogene Chemikalien als "Prokanzerogene" durch metabolische Aktivierung in "proximale" und letztendlich in "ultimale" Kanzerogene umgewandelt. Die dabei gebildeten reaktiven elektrophilen Spezies reagieren dann mit den vorhandenen nukleophilen Zentren in Proteinen oder Nukleinsäuren. Dabei entstehen für die einzelnen Stoffe charakteristische und nachweisbare Addukte.

Allgemein kann man fremdstoffmetabolisierende Enzyme in zwei Kategorien einteilen: Der Phase-I-Metabolismus wandelt unpolare, lipophile Stoffe in polare, hydrophilere Stoffe um. Dies kann oxidativ durch Epoxidierung, Hydroxylierung, N- oder S-Desalkylierung oder reduktiv durch Nitroreduktion oder Carbonylreduktion geschehen. Wichtigster Vertreter dieses Metabolismus-Systems ist die Cytochrom P450-Familie, von der mindestens 40 verschiedene Vertreter in jeweils einer einzigen Spezies vorkommen [18].

Enzyme des Phase-II-Metabolismus konjugieren Fremdstoffe oder Phase-I-Metabolite an hoch hydrophile, endogene Moleküle durch Glutathionkonjugation, Glucuronidierung, Acetylierung oder Sulfatierung, wodurch die Ausscheidung über Niere und Galle ermöglicht wird. Allerdings können auch Konjugate des Phase-II-Metabolismus nach Hydrolyse wieder zu Elektrophilen zerfallen und DNA-Addukte bilden.

2.3 Exogene und endogene Kanzerogene

DNA-Addukt-bildende Substanzen können entsprechend ihres Ursprungs in endogene und exogene Kanzerogene unterteilt werden [23]. Zu Beginn der Adduktforschung standen vor allem Umweltgifte im Mittelpunkt der Untersuchungen. Stetig verbesserte Nachweismethoden ermöglichen heutzutage allerdings auch die Detektion genotoxischer Nebenprodukte des normalen Metabolismus. Eine eindeutige Trennung zwischen diesen beiden Klassen ist dabei nicht immer leicht möglich, da zum Beispiel manche Nitrosamine sowohl exogen vorkommen (Zigarettenrauch) als auch endogen gebildet werden können [3].

2.3.1 Exogene Kanzerogene

Die wichtigsten Vertreter dieser Kategorie sind polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, aromatische Stickstoffverbindungen, Alkylantien und manche Naturstoffe wie Mykotoxine oder Pflanzeninhaltstoffe.

2.3.1.1 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH) sind ubiquitäre Umweltschadstoffe, die durch unvollständige Verbrennung von organischem Material entstehen. Sie sind beispielsweise in Teer, Ruß, Petroleum, Ölen, Autoabgasen und Tabakrauch enthalten [24].

Die bekanntesten Vertreter der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe sind das Benzo[a]pyren (B[a]P) und das 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen. Kanzerogene Kohlenwasserstoffe waren die ersten reinen Chemikalien, für die eine kanzerogene Wirkung im Tierversuch ermittelt werden konnte, wobei auch große Speziesunterschiede zu Tage traten. Die krebsauslösende Wirkung dieser Substanzklasse durch die Induktion von Mutationen im *ras*-Protoonkogen im Tier und die Bedeutung der PAH-DNA-Addukte bei Tumoren der Lunge durch Zigarettenrauch im Menschen ist mittlerweile allgemein anerkannt [25, 26].

2.3.1.2 Aromatische Stickstoffverbindungen

Aromatische Stickstoffverbindungen lassen sich ihrerseits in Arylamine, heterozyklische aromatische Amine und aromatische Nitroverbindungen unterteilen:

Arylamine kommen in der Natur nicht vor, sondern werden als Farbstoffe, für die Arzneimittelherstellung und als Antioxidantien synthetisch hergestellt. Zu ihnen gehören zum Beispiel Anilin, Aminofluoren, 4-Aminobiphenyl oder 6-Aminochrysen.

Die metabolische Aktivierung der Arylamine erfolgt in der Regel oxidativ über Cytochrom P450-katalysierte N-Hydroxylierung [18]. Die gebildeten N-Hydroxylamine bilden im Sauren direkt oder nach Sulfatierung durch Sulfotransferasen bzw. nach Acetylierung durch N,O-Acetyltransferasen und anschließender Hydrolyse elektrophile Nitreniumionen, die als ultimale Kanzerogene DNA-Basen angreifen.

Das 4-Aminobiphenyl (4-ABP) wurde bereits von der International Agency for Research on Cancer (IARC) in die Kategorie 1, nachgewiesenermaßen krebserzeugend beim Menschen, eingestuft. Es hat sich herausgestellt, dass die Substanz eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Blasenkrebs spielt und möglicherweise auch Brustkrebs verursachen kann. Beruflich exponiert sind vor allem Arbeiter in der Farben-, Textil-, Leder- und Gummiindustrie. Die Normalbevölkerung ist 4-ABP vor allem durch Zigarettenrauch, Haarfärbemittel und durch Abgase bei der Verbrennung fossiler Energieträger ausgesetzt.

Eine besondere Stellung hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen Krebserkrankungen und Lebensgewohnheiten nehmen heterozyklische aromatische Amine ein [28]. Diese Substanzklasse, deren wichtigster Vertreter 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b)pyridin (PhIP) ist, entsteht durch Pyrolyse von Aminosäuren und somit bei der Zubereitung von Fisch und Fleisch. So wurde die mutagene Wirkung von gekochtem Fisch und Rindfleisch bereits vor 20 Jahren im Ames-Test nachgewiesen [29]. Auch hier erfolgt der Angriff an die DNA-Basen über ein Nitrenium-Ion. Die bis heute charakterisierten Addukte heterozyklischer aromatischer Amine entstehen ausschließlich durch Bindung des ultimalen Kanzerogens an die N²- und C8-Position des Guanins [28].

Unter den aromatischen Nitroverbindungen erregte in jüngster Vergangenheit 3-Nitrobenzanthron (3-NBA) als Umweltgift in Dieselabgasen besonderes Interesse [30].



Abb. 1: Strukturformel von 3-Nitro-7H-benz[d,e]anthracen-7-on (3-Nitrobenzanthron)

Diese Substanz zeigte im Ames-Test eine der höchsten je gemessenen Revertantenzahlen überhaupt. *In vitro* erfolgt die DNA-Adduktbildung durch reduktive Aktivierung mittels Zink, Xanthinoxidase oder mittels Rattenleberhomogenat [31]. *In vivo* sind CYP1A2 und CYP-Oxidoreduktase als Phase-I-Enzyme sowie als Phase-II-Enzyme Sulfotransferase und N-Acetyltransferase 2 an der metabolischen Aktivierung beteiligt [32]. 3-NBA bildet dabei

Addukte mit Guanin und Adenin, wobei die genaue Struktur noch nicht geklärt werden konnte.

2.3.1.3 Alkylantien

finden besonders DNA alkylierende Substanzen bei der Chemotherapie von Krebserkrankungen Anwendung. So beruht die therapeutische Wirkung von cis-Diamindichlorplatin(II) (Cisplatin) auf der kovalenten Modifikation von Nukleobasen, indem es an die N7-Position von Guanin und Adenin bindet. Aufgrund der Quervernetzung zweier DNA-Stränge durch dieses Agens kommt es zu Strangbrüchen und einer Inhibierung der DNA-Replikation [33]. Alkylantien sind aber auch als Umweltgifte von Bedeutung. So haben N-Nitrosoverbindungen aus Zigarettenrauch und Lebensmitteln nach metabolischer Aktivierung ebenfalls alkylierende Wirkung [4].

2.3.1.4 α,β-ungesättigte Carbonylverbindungen

Diese bisfunktionalen Verbindungen sind wichtige Industriechemikalien, kommen aber auch natürlich als Umweltkontaminanten oder als endogene Metabolismus-Produkte vor. Acrolein, Acrylamid und Crotonaldehyd werden in großem Maßstab als Monomere in der Kunststoffproduktion eingesetzt und entstehen bei Verbrennungsprozessen (Autoabgase, Tabakrauch und Waldbrände) [34].

Beim Braten, Backen und Frittieren von stärkehaltigen Lebensmitteln wie etwa Kartoffelprodukten, Kleingebäck oder Knäckebrot kann je nach Herstellungsbedingungen Acrylamid im zweistelligen ppm Bereich entstehen. Hierfür ist insbesondere der Asparagingehalt der Nahrungsmittel von Bedeutung [35, 36]. Obwohl kanzerogen im Tierversuch, konnte bislang noch kein Zusammenhang zwischen der Acrylamid-Exposition und einem humanen Krebsrisiko festgestellt werden [37]. Acrolein oder Crotonaldehyd entstehen hauptsächlich bei der Erhitzung von Fetten.

Zu der gleichen homologen Reihe von α,β -ungesättigten Aldehyden gehört auch das Trans-2-Hexenal. Diese Verbindung ist ein häufiger Inhaltsstoff im Pflanzenreich ("leaf aldehyde"). Aufgenommen wird die Substanz vor allem beim Verzehr von Obst und Gemüse. Hexenal ist aber auch als Aromastoff (sog. "green notes") in der EU und den USA zugelassen [38].

Ähnliche Verbindungen wie 4-Hydroxy-2-nonenal und Malondialdehyd können auch endogen beim Abbau von Fettsäuren aus Lipidmembranen entstehen.

Alle diese Verbindungen sind genotoxisch wirksam, entweder direkt oder nach metabolischer Epoxidierung. Es konnten cyclische DNA-Addukte, aber auch Quervernetzung der DNA nachgewiesen werden [34].

2.3.1.5 Naturstoffe

Einige der potentesten Kanzerogene werden durch Mikroorganismen oder in Pflanzen gebildet. So ist das Stoffwechselprodukt des Schimmelpilzes *Aspergillus flavus*, Aflatoxin B1, eines der wirksamsten bekannten Leberkanzerogene. Zu den pflanzlichen Kanzerogenen werden unter anderem auch Safrol und Aristolochiasäure, ein Inhaltsstoff der Aristolochiaceen, gezählt. Letztere wird reduktiv durch Nitroreduktasen metabolisch aktiviert und bildet N⁶-Adenosin- und N²-Guanosin-Addukte. Diese DNA-Addukte sind in der Lage, durch Mutationen im Protoonkogen *H-ras* Tumore im Vormagen und Gehörgang in der Ratte zu induzieren. Aktuelle Belege sprechen auch für eine tumorauslösende Wirkung im Harnleiter beim Menschen [39, 40].

2.3.2 Endogene Kanzerogene

Hierbei handelt es sich um chemische Modifikationen der DNA, ausgelöst durch normale physiologische Prozesse. Die Substanzen endogenen Ursprungs umfassen Oxidantien, Produkte der Fettsäureoxidation, reaktive Stickstoffspezies und Intermediate unterschiedlicher Metabolisierungswege [23]. So wurden bei der Untersuchung der Kanzerogenität von Vinylchlorid und Ethylcarbamat strukturell verwandte DNA-Addukte auch in Kontrolltieren gefunden [41]. Auch wenn viele endogene Substanzen kein akutes toxisches Potential besitzen, wird ihr schädigender Beitrag aufgrund der lebenslangen Exposition diskutiert [42].

2.3.2.1 DNA-Schädigung durch endogene Oxidantien

Die oxidative Schädigung der DNA liefert den Hauptanteil der endogenen DNA-Modifikationen [43]. So beträgt die Menge an ausgeschiedenen oxidierten Nukleobasen bei der Ratte 70 000 pro Zelle pro Tag [44]. Diese oxidativen Veränderungen werden vermutlich durch Superoxidanionradikale (O_2 ⁻) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) hervorgerufen [22]. H_2O_2 kann zum Beispiel durch Monoaminoxidasen des Neurotransmitterkatabolismus gebildet werden. In *Escherichia coli* konnte auch gezeigt werden, dass Mutanten, die defizient an Sauerstoffradikal-abfangenden Proteinen wie Superoxiddismutase oder Katalase sind, eine erhöhte Rate an Spontanmutationen aufweisen [45]. Das Hauptprodukt oxidativer DNA-Schädigungen ist 8-Oxo-2'-Desoxyguanosin (8-oxo-dG), aber auch 2-Hydroxy-2'- Desoxyadenosin (2-OH-dA), 5-Hydroxy-2'-Desoxycytidin und seine Desaminierungsprodukte 5-Hydroxyuridin und Uridinglykol wurden nachgewiesen [46].

2.3.2.2 DNA-Schädigung durch Fettsäureoxidation

Ungesättigte Fettsäuren stellen im Vergleich zur DNA bedeutend bessere Targets für Oxidantien dar. Allerdings löst die Oxidation dieser Substanzen eine autokatalysierte Reaktionskaskade aus, bei der zahlreiche genotoxische Substanzen gebildet werden [47]. Unter diesen Fettsäuremetaboliten nehmen Malondialdehyd und verschiedene 4-Hydroxy-2-alkenale (z.B. 4-Hydroxy-2-nonenal) oder 2-Trans-Alkenale (z.B. Acrolein und Crotonaldehyd s.o.) eine bedeutende Stellung ein. In Anwesenheit von Hydroperoxiden werden diese ungesättigten Aldehyde epoxidiert und bilden exozyklische Etheno-Addukte mit Guanin, Adenin und Cytosin [48, 49]. Das am Besten untersuchte Beispiel ist hier das $1, N^6$ -Etheno-2'-Desoxyadenosin (etheno-dA, ϵ dA).

2.3.2.3 Reaktive Stickstoffspezies

Verschiedene humane Tumorerkrankungen sind eng mit chronischen viralen, bakteriellen und parasitischen Infektionen verknüpft, so dass hier ein ursächlicher Zusammenhang zwischen dem erhöhten Krebsrisiko und einer gesteigerten Produktion von Stickstoffmonoxid vermutet wird [50]. Durch die pathophysiologischen Prozesse der chronischen Infektionen bzw. Entzündungen wird die Überproduktion von Stickstoffmonoxid (NO) durch die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) ausgelöst. Die erhöhte Produktion von NO und O_2^{--} bei entzündlichen Prozessen und die damit einhergehende Bildung von Peroxynitrit (ONOO⁻, entsteht aus der Reaktion von NO mit O_2^{--}) wird nicht nur als Ursache für Krebserkrankungen sondern auch für verschiedene andere Krankheiten wie Atherosklerose und neurodegenerative Erkrankungen diskutiert.

Schäden an der DNA, die durch NO ausgelöst werden, sind vor allem Deaminierungen (s. d.), Alkylierungen durch endogen gebildete Nitrosamine und Strangbrüche, verursacht durch den Zerfall von Peroxynitrit [51, 52]. Weiterhin scheint die Überproduktion von NO zu einer erhöhten Bildung von etheno-dA und etheno-dC Addukten aus dem Fettsäuremetabolismus zu führen [53]. Eine relativ neue Entdeckung ist die Bildung eines umgelagerten Guanosins nach Nitrosierung durch Peroxynitrit, dem Oxanosin [54]. Peroxynitrit ist unter physiologischen Bedingungen wesentlich stabiler als NO und leistet daher vermutlich einen wesentlichen Beitrag zum Toxizitätsmechanismus von NO [55].

2.3.2.4 Spontane hydrolytische Deaminierung und Apurinische Stellen (AP-Stellen)

Trotz der hohen Stabilität der DNA-Moleküle gibt es chemische Veränderungen, die ohne äußeres Zutun, einfach aufgrund der chemischen Natur der Nukleotide, stattfinden. Die häufigste dieser Veränderungen ist der Verlust einer Purinbase durch hydrolytische Spaltung der glycosidischen Bindung zwischen der Base und dem Zucker-Phosphat-Gerüst der DNA. Dieses Ereignis tritt ca. 10 000mal pro Zelle und Tag auf. Auch der Verlust von Pyrimidin-Basen ist möglich, ist aber deutlich seltener als die Abspaltung einer Purin-Base. Daneben gibt es noch die hydrolytische Deaminierung von Cytosin zu Uracil, die schätzungsweise 400mal pro Tag und Genom auftritt, noch seltener ist die Deaminierung von Adenin zu Hypoxanthin (ca. 10mal/Tag/Genom) [56]. Alle diese DNA-Modifikationen können zu Mutationen bei der Replikation führen, da an der gegenüberliegenden Stelle einer "fehlenden Base" praktisch jedes der vier möglichen Nukleotide eingebaut werden kann. Häufiger als erwartet wird jedoch ein Adenin eingesetzt, so dass eine AP-Stelle oft die Ursache für die Überführung eines GC-Basenpaares in ein AT-Paar ist. Die Umwandlung eines Cytosins in ein Uracil führt zur Fehlpaarung mit Adenin, was letztendlich ebenfalls zur Umwandlung in ein AT-Paar führt. Für diese auf die chemische Natur der Basen zurückzuführenden Instabilitäten haben sich im Laufe der Evolution sehr effiziente und spezifische Reparaturmechanismen entwickelt, die der Entstehung von Mutationen entgegenwirken.

2.3.3 DNA-Methylierung

In der DNA verschiedener Organismen wurden im Laufe der Jahre drei verschiedene Methyl-Modifikationen des Cytosins und Adenosins entdeckt. Es handelt sich dabei um N⁶-Methyladenin (N⁶mA), N⁴-Methylcytosin und 5-Methylcytosin (5mC). Diese DNA-Methylierungen wurden zunächst nur als Bestandteile von Restriktionsenzymsystemen zum Schutz vor viralem Erbgut in niederen Organismen erkannt [57]. Vor etwa 30 Jahren stellte man aber fest, dass es außer der bekannten Regulation der Proteinexpression auf RNA-Ebene noch eine übergeordnete, epigenetische Genregulation in Form von DNA- und Histon-Modifikationen gibt. Als hierfür entscheidende DNA-Veränderung stellte sich in Eukaryoten die Methylierung an der Position 5 des Cytosins durch DNA-Methyltransferasen (Dnmt) heraus [58], die in enger Korrelation mit den Modifikationen der Histone, Lysin-Methylierungen und Acetylierung steht, was als "epigenetic crosstalk" bezeichnet wird. Die überraschende Häufigkeit von 5-Methylcytosin, im menschlichen Erbgut sind ca. 4% aller Cytosine methyliert, hat ihm auch den Beinamen "5. Base" eingetragen (ca. 0.8% aller Basen des menschlichen Genoms) [59]. 5-Methylcytosin befindet sich vor allem in Regionen, in denen Cytosin (C) und Guanin (G) zusammen auftreten, seien es Dinukleotide der Struktur CpG (C-Phosphat-G), Trinukleotide der Struktur CpNpG, wobei N ein beliebiges Nukleotid darstellt, oder Pentanukleotide der Struktur CpCpWpGpG (W steht für wahlweise A oder T), vor allem als Cp5mCpWpGpG. Neben diesen sehr kurzen DNA-Abschnitten von CpG-Häufung gibt es auch sog. "CpG-islands". Das sind DNA-Abschnitte, in denen über große Regionen hinweg (einige hundert Basenpaare) gehäuft die Nukleotide C und G vorkommen, und die charakteristisch für die Promotorregionen von Genen sind. Die Promotorregionen von etwa 60 Prozent aller Gene sind in CpG-islands eingebettet [60]. In voll ausdifferenzierten Zellen sind etwa 80 Prozent der CpG-Dinukleotide methyliert, während die Cytosine in den CpG-islands größtenteils unmethyliert bleiben. Grob vereinfacht kann man sagen, dass die Methylierung von Promotorregionen zur Stilllegung der entsprechenden Gene führt. Allein daraus lässt sich bereits erahnen, wie wichtig die korrekte DNA-Methylierung für die Ausdifferenzierung von Geweben und die gesamte Embryonalentwicklung ist. Seit 1983 [61] weiß man außerdem, dass Krebsgewebe, genomweit betrachtet, weniger Cytosin-Methylierung aufweist als das zugehörige gesunde Organ. Mit immer ausgefeilteren Methoden wurde inzwischen nachgewiesen, dass sich außerdem das Methylierungsmuster (methylation pattern) des Genoms von Krebszellen von dem gesunder Zellen unterscheidet. Das führt beispielsweise zur Abschaltung wichtiger Tumorsuppressorgene, bzw. zur Aktivierung eigentlich nicht mehr benötigter embryonaler Wachstumsprotokolle [62]. Gegenwärtig wird die Frage, ob eher die genomweite Mindermethylierung (Hypomethylierung) mit der einhergehenden chromosomalen Instabilität, oder die erhöhte Promotormethylierung (Hypermethylierung) wichtiger für die Krebsentstehung ist, heftig diskutiert.

Daneben sollte noch darauf hingewiesen werden, dass die Anwesenheit von 5mC selbst die Mutationsfrequenz im methylierten Genabschnitt gegenüber dem unmethylierten erhöht. Durch spontane hydrolytische Deaminierung (s. d.) entsteht aus 5mC nämlich Thymin, das im Gegensatz zu Uracil, das aus Cytosin entsteht, nicht von der DNA-Uracil-Glycosylase erkannt und repariert wird. Die durch Deaminierung von 5mC entstehenden T-G Fehlpaarungen werden zwar von sog. "Mismatch Repair-Systemen" erkannt, die aber naturgemäß nur in 50% aller Fälle das Thymin in ein Cytosin korrigieren, da sie nicht erkennen können, welcher der korrekte Strang ist. Durch Veränderungen in der UV-Absorption durch die Methylierung kommt es weiterhin zur vermehrten Bildung von CC-Pyrimidin-Dimeren, die zu typischen CC nach TT Mutationen führen [63]. Außerdem gibt es Hinweise, dass große polyzyklische Kohlenwasserstoffe (B[a]P) bevorzugt an Guanin binden, wenn ein benachbartes Cytosin methyliert ist [64].

2.4 RNA Modifikationen

2.4.1 Natürliche RNA-Modifikationen

Während die DNA, abgesehen von unerwünschten Veränderungen, aus fünf Basen aufgebaut ist, gibt es in der RNA nahezu 100 verschiedene Basen, für deren Herstellung die Natur zum Teil erhebliche Anstrengungen unternimmt [65]. RNA kommt in der Zelle in verschiedenen Formen vor: die ribosomale-RNA (rRNA) ist am Aufbau der Ribosomen beteiligt und damit an der Proteinbiosynthese, die messenger-RNA (mRNA) übernimmt die genetische Information von der DNA und bringt sie zu den Ribosomen, wo sie in Proteine übersetzt wird. Die transfer-RNA (tRNA) dient der Aktivierung der Aminosäuren, die an sie binden und von ihr zu den Ribosomen transportiert werden. Die small nuclear RNA (snRNA) ist im Zellkern von Eukaryonten zuständig für das Spleißen der hnRNA (heterogene nucleäre RNA) einer Vorstufe der mRNA. Alle diese Formen der zellulären RNA (mRNA, rRNA, tRNA, snRNA) enthalten modifizierte Nukleoside, wobei die mit Abstand meisten Veränderungen in tRNA gefunden wurden (z. Zt. 79), danach folgen mRNA (12) und snRNA (11). Die Mehrheit dieser Veränderungen beschränkt sich auf einfache Methylierungen, Reduktionen (z.B. Dihydrouridin), Isomerisierungen (Pseudouracil) oder den Einbau von Schwefel anstelle von Sauerstoff (2- bzw. 4-Thiouracil). Es gibt aber auch sehr komplexe Hypermodifikationen, deren Synthese mehrere Enzymsysteme benötigt. Diese hypermodifizierten Nukleoside kommen hauptsächlich in tRNA vor, wohingegen die einfacheren Modifikationen in den anderen RNA-Typen dominieren [66].

Generell ist die tRNA die am höchsten modifizierte RNA, bei höheren Eukaryonten bestehen einige tRNAs zu 25% aus Basen, die in irgendeiner Weise verändert sind. Ebenso bemerkenswert ist der hohe Grad an Modifikationen in der rRNA von Mensch, Maus und Xenopus, die bis zu 200 ungewöhnliche Basen (ca. 3% der 5.8S, 18S und 28S RNA) aufweisen. Die meisten davon finden sich im hochkonservierten "Core-Bereich" der rRNA. Gesichert ist mittlerweile die wichtige Rolle von modifizierten Nukleosiden bei der Reifung von snRNA und mRNA, dem Zusammenbau der Ribosomen, Übersetzung des genetischen Codes in RNA und Proteine (Translation), der Stabilisierung der 3D-Struktur, v. a. von tRNA und Erkennungsprozessen zwischen tRNA und Aminosäuren [67].

2.4.2 RNA-Schäden (Addukte)

Chemische Kanzerogene führen nach metabolischer Aktivierung nicht nur zur Bildung von DNA-Addukten sondern auch zu RNA-Addukten, indem sie die nukleophilen Zentren der RNA-Basen angreifen. Dabei wurde mehrfach beobachtet, dass die RNA sogar das bevorzugte Target für die elektrophilen ultimalen Kanzerogene ist. So zeigten *Sotomayor et al.*, dass bei der Behandlung von Ratten mit Aflatoxin B₁ drei bis neun Mal mehr Aflatoxin B₁ RNA-Addukte (AFB₁- Guanosin) als Aflatoxin B₁ DNA-Addukte (AFB₁-2'-Desoxyguanosin) gebildet werden [68]. Auch im Zusammenhang mit den Schäden, die durch oxidativen Stress entstehen wurde von *Hofer et al.* nachgewiesen, dass bei der *in vitro* Behandlung von Lungenepithel-Zellen mit H₂O₂ 14-25 Mal mehr 8-Oxo-Guanosin als 8-Oxo-2'-Desoxyguanosin gebildet wird [69]. Solche Befunde weisen darauf hin, dass RNA-Addukte auf Grund ihrer größeren Menge und damit einfacheren Nachweisbarkeit, besser als Expositions-Biomarker geeignet sind als DNA-Addukte. Über die Auswirkungen der RNA-Addukte auf die Lebensfähigkeit von Zellen oder sogar auf die Kanzerogenese ist wenig bekannt, es gibt aber Hinweise, dass auch oxidative Schäden und Schäden durch Alkylantien in der RNA repariert werden [70].

2.5 Nachweismethoden für DNA-Addukte

Zur Zeit stehen eine ganze Reihe von spezifischen und sensitiven Nachweismethoden für DNA-Addukte zur Verfügung, die alle ihre Vor- und Nachteile haben. Die empfindlichste ist die Accelerator Mass Spectrometry (AMS), für die jedoch ¹⁴C-markierte Kanzerogene synthetisiert werden müssen [71]. Außerdem ist die Messung des Isotopenverhältnisses derart aufwendig, dass weltweit nur ungefähr vier Laboratorien diese Analysen überhaupt durchführen können. Andere Nachweismethoden umfassen Immunoassays, für die spezifische Antikörper gegen das DNA-Addukt zur Verfügung stehen müssen und weitere radioaktive Methoden (³²P-Postlabeling, ³H-Markierung der Kanzerogene). Des weiteren können verschiedene chromatographische Trennmethoden (HPLC, CE, GC) mit diversen Detektionssystemen (UV, Fluoreszenz, MS) kombiniert werden, wobei vor allem mit den massenspektrometrischen Verfahren auch Informationen über die Struktur unbekannter Addukte gewonnen werden können. Eine kurze Übersicht der verschiedenen Methoden zum Nachweis von Addukten in genomischer DNA gibt die folgende Tabelle:

Methode	Nachweisgrenze	Addukte/	benötigte	Lit.
	$(\text{fmol}, 1 \times 10^{-13} \text{ mol})$	Nukleotide	DNA Menge	
Radioaktive Methoden		11		
Accelerator Mass Spectrometry (AMS)		$1 \text{ in } 10^{11}$	20µg -1mg	[71]
DNA-Bindung von ³ H markierten		7 0		
Substanzen	10	$1 \text{ in } 10^{7} - 10^{9}$	1mg	[72]
³² P-Postlabeling		_		
Standard Methode	10	1 in 10 ⁷	1-10µg	[77]
Butanol-/ Nuklease P1 Anreicherung	0.01	1 in 10 ¹⁰	1-10µg	[78]
Chromatographische Methoden				
HPLC-MS(/MS)	15	1 in 10 ⁷ -10 ⁸	10-100µg	[74]
HPLC-ECD	-	1 in 10 ⁸	10-100µg	[74]
HPLC-FD	50	1 in 10 ⁷	100µg	73
Eigenfluoreszenz	100	1 in 10 ⁵	-	[76]
Fluoreszenzmarkiert	-	1 in 10 ⁸	-	[76]
HPLC-UV	100 000	1 in 10 ⁵	1mg	[73]
GC-MS	0.5	1 in 10 ⁹	1mg	[72]
Elektrophoretische Methoden			U	
CE-UV	40nM	-	-	[76]
CE-LIF	0.01 (850pM)	$1.4 \text{ in } 10^7$	10µg	[16]
CE-MS	15	-	-	[76]
CE-RID	-	1 in 10 ⁹	-	[75]
Immunoassavs				
RIA	40	1 in 10 ⁸	bis zu 10mg	[73]
ELISA kompetitiv	1	1 in $6x \ 10^8$	50ug	[73]
ELISA nicht kompetitiv	3	$1 \text{ in } 10^7$	0.1µg	[73]
USERIA	1	$1 \text{ in } 10^7$	25ug	[73]
Slot Blot	1	$1 \text{ in } 3x \ 10^6$	1μg	[73]
Fluoreszenzmethoden				
SFS	20	1 in 5x10 ⁸	100µg	[73]
FLNS	1	1 in 10 ⁸	1mg	[73]

Tab. 1: Vergleich der gebräuchlichsten Methoden zum Nachweis von DNA-Addukten

RIA = Radioimmunoassay; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; USERIA = ultrasensitive enzymaticradioimmunoassay; SFS = synchronous fluorescence spectrophotometry; FLNS = fluorescence-line-narrowingspectroscopy; GC/MS = Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion; HPLC = highperformance liquid chromatography; UV = Ultraviolett-Detektion; FD = Fluoreszenz-Detektion; ECD =elektrochemische Detektion

2.5.1 ³²P-Postlabeling

Die zur Zeit gebräuchlichste Methode zum Nachweis von DNA-Addukten ist das Anfang der achtziger Jahre entwickelte ³²P-Postlabeling-Verfahren [6, 7, 77]. Adduktierte DNA wird nach ihrer Isolierung enzymatisch zu Mononukleotiden hydrolysiert. Im Allgemeinen wird Mikrokokkennuklease (MN) und Milz-Phosphodiesterase (SPD) zum Verdau der DNA eingesetzt, was zur Bildung sowohl der adduktierten wie unmodifizierten Nukleosid-3'-

Monophosphate führt. Im Anschluss an diese Hydrolyse wird auf die freie 5'-OH-Gruppe der Nukleosid-3'-Phosphate mit Hilfe von T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK) die ³²P-haltige Phosphatgruppe aus $[\gamma$ -³²P]-Adenosintriphosphat übertragen.

Die so entstandenen radioaktiv markierten Nukleosid-3',5'-Bisphosphate werden durch mehrdirektionale Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und autoradiographisch detektiert. Dadurch erhält man distinkte Addukt-Flecken mit definiertem Laufverhalten, die durch cochromatographischen Vergleich mit synthetisierten Standardverbindungen den einzelnen Kanzerogenen zugeordnet werden können. Alternativ können die markierten Nukleosid-3',5'-Bisphosphate auch mittels HPLC aufgetrennt und durch on-line-Radioaktivitäts-Detektion bestimmt werden. Die Empfindlichkeit des Standardverfahrens von 1 Addukt in ca. 10^7 unmodifizierten Nukleotiden ist durch Anreicherungsverfahren, die dem radioaktiven Markierungsschritt vorausgehen, um zwei Zehnerpotenzen verbessert worden. So können hydrophobe Addukte durch Extraktion mit n-Butanol aus der wäßrigen Phase extrahiert und somit angereichert werden [78]. Die Phosphataseaktivität der Nuklease P1 (NP1) aus Penicillium citrinum kann ebenfalls zur Anreicherung ausgenutzt werden [6]. Dieses Enzym dephosphoryliert unmodifizierte Nukleosid-3'-Phosphate, während es die Mehrzahl der adduktierten Nukleotide nicht als Substrat akzeptiert. Dephosphorylierte Nukleotide erkennt die zur Markierungsreaktion eingesetzte T4-PNK dann nicht mehr als Substrat, wodurch überwiegend die modifizierten Basen, die als Nukleosid-3'-Phosphate vorliegen, markiert und anschließend detektiert werden. Mit dieser universell anwendbaren Methode sind Addukte aller wichtigen genotoxischen Substanzklassen wie Arylamine, Nitroaromaten, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, heterozyklische aromatische Amine und Alkylantien nachgewiesen worden [8]. Ein Vorteil dieser Methode besteht darin, dass sie auch für noch unbekannte Addukte verwendet werden kann und somit zur Untersuchung des genotoxischen Potentials neuer chemischer Substanzen geeignet ist. Allerdings besitzt diese Methode auch entscheidende Nachteile, die für die Analyse von DNA-Addukten in quantitativer wie qualitativer Hinsicht ungünstig sind. So erhält man zwar durch das Laufverhalten der modifizierten Nukleotide bei der Dünnschichtchromatographie und der Sensitivität der Addukte gegenüber den unterschiedlichen Anreicherungsverfahren Rückschlüsse auf die Natur und die Position der Modifikationen, eine strukturelle Aufklärung ist jedoch nicht möglich. Zudem müssen die dünnschichtchromatographischen Trennbedingungen der chemischen Natur der zu untersuchenden Modifikation angepasst werden, womit eine simultane Untersuchung von Addukten unterschiedlicher genotoxischer Substanzklassen

ausgeschlossen ist. Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass mehrere enzymatische Schritte bei diesem Verfahren aufeinander folgen. Da die Enzymreaktionen für verschiedene Modifikationen unterschiedlich effektiv ablaufen, gestaltet sich die Quantifizierung problematisch [8]. Gegen eine universelle Anwendung spricht aber vor allem die Verwendung radioaktiver Phosphor-Isotope und die damit verbundenen Anforderungen an Arbeitssicherheit und Abfallentsorgung. Darüber hinaus ist die mehrdirektionale Dünnschichtchromatographie arbeitsintensiv und nicht automatisierbar.

2.5.2 Kapillarelektrophorese mit Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion

2.5.2.1 Grundlagen der Fluoreszenz

Fluoreszenz ist ein optisches Phänomen, bei dem ein Atom oder Molekül ein Photon absorbiert und später ein Photon mit niedrigerer Energie (d.h. größerer Wellenlänge) emittiert. Dieses Phänomen tritt bei bestimmten Molekülen, z.B. polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, sog. Fluorophoren, auf und ist ein dreistufiger Prozess, der sich besonders anschaulich mit Hilfe des Jablonski-Termschemas erklären lässt.



Abb. 2: Jablonski Termschema

Stufe 1: Anregung

Ein Photon bestimmter Energie (hv_{ex}) wird mit einer externen Quelle, z. B. einem Laser, zur Verfügung gestellt und von einem Fluorophor absorbiert, was zu einem angeregten elektronischen Singulett-Zustand S₁' führt.

Stufe 2: Lebensdauer des angeregten Zustandes

Der angeregte Zustand hat normalerweise eine Lebenszeit von 1-10ns. In dieser Zeit unterliegt der Fluorophor verschiedenen Einflüssen wie Konformationsänderungen und
Kollisionen mit anderen Molekülen. Daraus ergeben sich zwei bedeutsame Konsequenzen. Erstens verliert der angeregte Zustand geringfügig an Energie, was zu dem relaxierten Zustand S_1 führt, von welchem aus dann die Fluoreszenz stattfindet. Zweitens kehren nicht alle ursprünglich angeregten Moleküle über Fluoreszenzemission in den Grundzustand zurück, sondern werden durch andere Prozesse [Löschung, FRET (fluorescence resonance energy transfer), intersystem crossing] daran gehindert. Dies führt zu einer reduzierten Photonenausbeute. Das Verhältnis aus der Zahl der emittierten Fluoreszenzphotonen (Stufe 3) und der Zahl der ursprünglich absorbierten Photonen (Stufe1) bezeichnet man als Fluoreszenz-Quantenausbeute (fluorescence quantum yield, FQY).

Stufe 3: Fluoreszenzemission

Ein Photon der Energie hv_{em} wird emittiert und der Fluorophor kehrt in den Grundzustand zurück. Auf Grund des Energieverlustes im angeregten Zustand (Stufe 2) ist die Energie dieses Photons geringer und hat daher eine höhere Wellenlänge als das Anregungs-Photon (Stokesche Verschiebung). Diese Verschiebung ist essentiell für Fluoreszenzdetektionstechniken, da sie die Detektion der Fluoreszenzphotonen ohne Beeinträchtigung durch das eingestrahlte Licht erlaubt [79].

2.5.2.2 Fluoreszenzlöschung (Quenching)

Als Fluoreszenzlöschung bezeichnet man alle Prozesse, die die Quantenausbeute erniedrigen ohne das Fluoreszenzspektrum zu verändern. Man unterscheidet dabei zwei verschiedene Typen von Löschvorgängen:

- Die dynamische Löschung tritt bei Zusammenstößen von Fluorophor und Löscher während des angeregten Zustandes auf. Der Fluorophor überträgt seine Energie auf den Löscher und kehrt strahlungslos in den Grundzustand zurück.
- Beim statischen Löschen wird im angeregten Zustand ein nicht fluoreszierender Komplex zwischen Löscher und Fluorophor gebildet.

Bei beiden Vorgängen müssen also Löscher und Fluorophor in Kontakt miteinander treten. Die Löschprozesse verursachen keine chemischen Veränderungen an den beteiligten Molekülen [80].

2.5.2.3 Laser-induzierte Fluoreszenzdetektion (LIF)

Bei der Fluoreszenz-Detektion ist die Anregung des Fluorophors mittels einer inkohärenten (z. B. Glühlampe) oder einer kohärenten Lichtquelle (z. B. Laser, "light amplification by

stimulated emission of radiation") notwendig. Fluoreszenzdetektoren verwenden als Lichtquelle meist Hochdruck-Gasentladungslampen (Quecksilber- oder Xenonlampen). Ihre Strahlungsintensität muss möglichst konstant gehalten werden, da die Fluoreszenzintensität des Fluorophors von der Intensität des Anregungslichtes abhängt. Durch den Einsatz von Laserlicht erhöht sich die Intensität der Anregung und daher die Empfindlichkeit enorm. Diese als LIF bezeichnete Detektionstechnik ist geeignet um 1-0.01 amol Substanz nachzuweisen und ist 100-Mal empfindlicher als die normale Fluoreszenzdetektion und ca. 1000-Mal empfindlicher als die Detektion über UV-Absorption [81]. Bei der Erzeugung von Laserlicht steht im Gegensatz zu inkohärenten Lichtquellen die stimulierte Emission im Vordergrund. Dazu wird ein aktives Medium (z. B. ein Festkörper oder ein Gas) durch eine Blitzlampe oder Spannung in einen angeregten Zustand gebracht (Inversion). Durch die Positionierung des aktiven Mediums zwischen zwei Spiegeln kommt es zu einer Verstärkung des Laserstrahls. Der dabei entstehende Laserstrahl ist monochromatisch (einfarbig), kohärent (phasenkonstant) und nahezu parallel. Das bedeutet, dass man gezielt das Absorptionsmaximum des Fluorophors mit einem speziellen Laser anregen kann. Laserlicht ist weiterhin gut über Glasfasern zum Detektionsfenster der Kapillare zu transportieren, wo es sich sehr genau auf das Innere der nur 50-100µm dicken Kapillare fokussieren lässt und auch kleinste Substanzmengen mit hoher Effizienz zur Fluoreszenz anregen kann.

2.5.2.4 Grundlagen der Kapillarelektrophorese

Unter dem Begriff der Elektrophorese versteht man die unterschiedliche Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. Verantwortlich für dieses Verhalten sind die Differenzen in den Ladungsdichten der Moleküle und unterschiedliche Reibungswiderstände, die der Wanderung entgegenwirken. Bei der klassischen Elektrophorese, eingeführt von Tiselius 1937, wurden zunächst Proteine in einem Tubus zwischen Elektrolyten platziert und nach Anlegen eines elektrischen Feldes getrennt [80]. Später wurden dann mit Elektrolyten imprägnierte Gele oder Papierstreifen verwendet, was die Störungen durch Diffusion und Konvektion stark reduzierte und die Trennleistung entscheidend verbesserte. Erst Jorgensen und Lukacs erreichten Anfang der 80er Jahre unter Verwendung von fused-silica Kapillaren aus der Gaschromatographie hocheffiziente Trennungen [83-86]. Dies ist vor allem auf das günstige Oberflächen-Volumen-Verhältnis dieser Kapillaren mit nur 50-200µm Innendurchmesser zurückzuführen, was die störende thermisch induzierte Konvektion stark Die Kapillaren reduziert. Verwendung von erweiterte darüber hinaus das Anwendungsspektrum der Elektrophorese über das Feld der Trennung von Makromolekülen hinaus bis hin zur Analyse kleiner Kationen oder Anionen und sogar neutraler Moleküle. Der schematische Aufbau einer Kapillarelektrophorese ist in der folgenden Abbildung dargestellt.



Abb. 3: Schematischer Aufbau einer Kapillarelektrophorese [87]

Bei der Kapillarelektrophorese erfolgt die Trennung heute typischerweise in Polyimid beschichteten Kapillaren von 30-100cm Länge und 25-75µm Innendurchmesser bei Spannungen von bis zu 30 000 Volt. Die puffergefüllte Kapillare taucht dabei in Pufferreservoirs ein, die über Elektroden mit einer Hochspannungsquelle verbunden sind. Zur Injektion der Probe wird ein Reservoir durch ein Probengefäß ausgetauscht und durch Anlegen eines Druckes (hydrodynamisch) oder eines elektrischen Feldes (elektrokinetisch) eine definierte Menge der Probe injiziert (Inlet). Nach erneutem Austausch des Probengefäßes gegen das Pufferreservoir wird die Trennspannung angelegt, wodurch die Analyten im elektrischen Feld unterschiedlich schnell Richtung des anderen Kapillarendes (Outlet) migrieren und dort mit Hilfe eines on-line Detektors qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden können.

Um die hohen Effizienzen zu gewährleisten, muss eine Überladung der Kapillare vermieden werden, weshalb nur wenige Nanoliter Probe injiziert werden. Deshalb werden hohe Anforderungen an das Probenaufgabesystem einer kapillarelektrophoretischen Apparatur gestellt. Der kritische Faktor dabei ist die Größe des Probenpfropfens, der etwa 1% der Kapillarlänge betragen sollte. Dies bedeutet eine zur Verfügung stehende Injektionslänge von wenigen Millimetern. Unter Berücksichtigung des Kapillardurchmessers ergeben sich typischerweise Injektionsvolumina von 1 bis 50nl. Dies ist vorteilhaft, wenn nur geringe

Probenmengen zur Verfügung stehen, limitiert aber gleichzeitig die Sensitivität für verdünnte Lösungen. Es kann entweder die hydrodynamische oder elektrokinetische Injektion eingesetzt werden. In beiden Fällen ist das Injektionsvolumen mathematisch zugänglich.

2.5.2.5 Kapillarelektrophoretische Methoden

Das einfache Prinzip der kapillarelektrophoretischen Trennungen ermöglicht eine große Anzahl unterschiedlicher Applikationen. Die wichtigsten Ausführungstechniken sind:

- Kapillarzonenelektrophorese (CZE)
- mizellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC)
- Kapillargelelektrophorese (CGE)

Kapillarzonenelektrophorese

Bei der CZE findet die Trennung in einer lediglich mit Puffer gefüllten Kapillare statt. Nach der Probenaufgabe wird eine Spannung zwischen Inlet und Outlet angelegt und unter dem Einfluss des elektrischen Feldes migrieren die Probenkomponenten mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten zu den entsprechenden Elektroden. Da in fused-silica-Kapillaren der elektroosmotische Fluss zur Kathode gerichtet ist und in den meisten Fällen die Elektromigration der Anionen überkompensiert, können sowohl Kationen, Anionen und neutrale Teilchen am kathodischen Ende der Kapillare detektiert werden. Getrennt werden die Teilchen hierbei nach ihrer Ladungsdichte (Verhältnis von Ladung zu Masse), das bedeutet auch, dass neutrale Teilchen bei dieser Methode nicht getrennt werden können. Somit eignet sich diese Trennmethode nur für ionische Analyten.

Mizellare elektrokinetische Chromatographie

Die MEKC Kombination elektrophoretischen stellt eine aus mizellaren und flüssigkeitschromatographischen Trennprinzipien dar. Diese Technik wurde von Terabe et al. eingeführt, um im Gegensatz zur CZE auch ungeladenen Probenkomponenten trennen zu können. [88, 89]. Sie beruht auf dem Verteilungsgleichgewicht zwischen einer mobilen, durch Elektroosmose bewegten Phase und einer "pseudo-stationären" Phase, gebildet durch Mizellen. Als Mizellenbildner werden Tenside oberhalb ihrer kritischen mizellaren Konzentration eingesetzt, also der Konzentration, ab der sich die Moleküle des Detergens in Lösung zusammenlagern und Mizellen bilden. Die dabei verwendeten Detergentien können sowohl (Natriumdodecylsulfat, anionisch SDS), kationisch (Hexadecyltrimethylammoniumchlorid, CTAB) oder zwitterionisch (3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]- 2-hydroxypropansulfonat, CHAPS) sein. Daneben gibt es ungeladene Pufferadditive wie chirale Cyclodextrine zur Trennung von ionischen Enantiomerengemischen oder Kronenether, die als Wirtsmoleküle dienen.

Kapillargelelektrophorese

der CGE erfolgt die auf Grund der Größenunterschiede Bei Trennung der Probenkomponenten. Insbesondere biologische Makromoleküle, die als Polyanionen oder Polykationen vorliegen, unterscheiden sich nur gering in ihren Ladungsdichten und somit in ihrer elektrophoretischen Mobilität. Ist aber die Kapillare mit einer Polymerlösung gefüllt, die ein dreidimensionales Netzwerk darstellt, wird die Mobilität der Probenkomponenten größenabhängig beeinflusst. Somit beruht der Transport durch die Kapillare auf der Ladung der Makromoleküle, die Migrationszeit hängt jedoch von der Molekülgröße ab. Daher wird die Methode vor allem bei der Trennung von DNA-Bruchstücken, zum Beispiel bei der DNA-Sequenzierung eingesetzt. Die verwendeten Polymere in der CGE können kovalent miteinander verknüpft (bis-Polyacrylamid) oder durch Wasserstoffbrücken verbunden (Agarose) sein oder als Netzwerk linearer Polymerlösungen (Polyacrylamid oder Methylcellulose) vorliegen.

2.6 Theoretischer Hintergrund - Fluoreszenzmarkierung

Radioaktive Markierungen ermöglichen den Nachweis sehr geringer Substanzmengen, allerdings ist der Einsatz radioaktiver Isotope mit erheblichen Nachteilen behaftet. Die Vorkehrungen zur Vermeidung gesundheitlicher Folgen, die Entsorgungskosten sowie die erforderlichen behördlichen Umgangsgenehmigungen haben dazu geführt, dass in den letzten wurden. Jahrzehnten große Anstrengungen unternommen klassische radioaktive Analysenmethoden durch weniger gefährliche, aber ähnlich sensitive Fluoreszenzmethoden zu ersetzen [90]. In der Regel ist das zu analysierende Biomolekül nicht selbst fluoreszierend, so dass es selektiv mit entsprechenden Fluorophoren chemisch oder enzymatisch gekoppelt werden muss. Die dabei eingesetzten Fluoreszenzmarker bestehen aus zwei getrennt zu betrachtenden Molekülteilen, nämlich dem eigentlichen Fluorophor als signalgebendem Baustein und der Ankergruppe (Spacer, Linker), welche als reaktive Kopplungseinheit die selektive Anbindung an das zu markierende Molekül ermöglicht. Inzwischen gibt es eine kaum noch zu überschauende Bandbreite an einsetzbaren Fluorophoren für die verschiedensten Wellenlängenbereiche, die mit einer Vielzahl von unterschiedlichen

Ankergruppen kombiniert werden können, so dass sich immer mehr Anwendungsgebiete eröffnen [80].

Unter den Fluorophoren nimmt BODIPY (4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacen) eine Sonderstellung ein. So sind die Fluoreszenzeigenschaften unabhängig vom pH-Wert des Lösungsmittels und die schmalen Emissionsbanden bedingen eine höhere Signalintensität als bei den meisten anderen Fluorophoren [80].



Abb. 4: 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen, "BODIPY"

Dieser Fluorophor besitzt mit einem Extinktionsmaximum bei 503nm und einem Emissionsmaximum bei 510nm [80] geeignete spektroskopische Eigenschaften zur Anregung mit Argon-Ionen-Lasern mit einer Emmissionswellenlänge von 488nm. Darüber hinaus verfügt BODIPY trotz des Fehlens von Carbonsäuregruppen über eine ausreichende Wasserlöslichkeit.

2.6.1 Fluoreszenzmarkierung von Mononukleotiden

In der DNA-Addukt Analytik gibt es zum einen den Fall, dass bestimmte DNA-Addukte polyzyklischer Kohlenwasserstoffe im Bereich von 320nm eine Eigenfluoreszenz aufweisen; so konnten beispielsweise dG-Addukte des B[a]P mit HPLC-FD und CE-LIF detektiert werden [91, 92]. Zum anderen gibt es den Fall, dass die zu analysierenden DNA-Addukte vor der Analyse mit einem fluoreszierenden Molekül versehen werden müssen. Die meisten in der Literatur beschriebenen Methoden stammen aus den Bereichen der DNA-Sequenzierung und Hybridisierungstechniken und verwenden Fluoreszenzmarker, die entweder an das 3'- oder 5'-Ende eines Oligonukleotids [93, 94], an die Phosphatbrücke zwischen zwei Nukleotiden [95, 96], an die Ribose [97, 98] oder die Nukleobase [99, 100] über einen Spacer gekoppelt werden.

Im Jahre 1983 stellten Chu et al. eine einfache und effiziente Methode vor, Mono- und Oligonukleotide in wässrigen Medien unter Carbodiimid-Aktivierung mit Ethylendiamin zu

konjugieren [101]. Dabei wird das 5'-Phosphat-Ende der Nukleotide in ein reaktives Imidazolid überführt, welches in Anwesenheit von Aminen in 85%iger Ausbeute zu 5'-Phosphoramidaten umgesetzt werden kann.



Abb. 5: Darstellung von Nukleosid-5'-Ethylendiaminphosphoramidaten nach *Chu et al.*; Base = Uracil, Adenin, Cytosin oder Guanin; EDC = 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid; EDA = Ethylendiamin

Diese Synthesestrategie eröffnete nun die Möglichkeit, Amin-reaktive Fluoreszenzmarker über die generierte primäre Aminogruppe an 2'-Desoxy- und Ribonukleotide zu koppeln, was man in Analogie zu den radioaktiven Postlabeling-Methoden auch als Fluoreszenz-Postlabeling bezeichnet. Die Übertragung dieser Strategie auf 2'-Desoxynukleosid-5'-Phosphate wurde allerdings erst 1988 von *Kelman et al.* [102] beschrieben. Hierbei wurden 2'-Desoxynukleosid-5'-ethylendiamin-phosphoramidate mit Dansylchlorid zu fluoreszierenden Konjugaten verknüpft, mittels HPLC getrennt und detektiert.



Abb. 6: Darstellung dansylierter 2'-Desoxynukleosid-5'-Phosphate nach *Kelman et al.*; Base = Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin

Die Analyse verschiedener dansylierter, z. T. auch an der Base modifizierter, 2'-Desoxynukleosid-5'-ethylendiamin-phosphoramidate unter Verwendung der mizellaren elektrokinetischen Chromatographie mit Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion (MEKC-LIF) wurde erstmals 1991 von *Lee et al.* beschrieben [103]. Basierend auf dem gleichen Prinzip stellten *Al-Deen et al.* 1990 ebenfalls Fluorescein-konjugierte Nukleotide dar [104]. Auch hier wurden die 2'-Desoxynukleosid-5'-Phosphate nach *Chu et al.* [101] zuerst in Ethylendiamin-Phosphoramidate überführt. Die Darstellung fluoreszenzmarkierter Nukleotide erfolgte dann durch Umsetzung der primären Aminogruppe mit Fluoresceinisothiocyanat, wobei eine stabile Thioharnstoff-Bindung gebildet wird. Zur Detektion von DNA-Addukten mittels Fluoreszenz-Postlabeling durchgesetzt hat sich zunächst die Markierung der Nukleotide mit Ethylendiamin und Dansylchlorid, mit deren Hilfe verschiedene DNA-Addukte untersucht wurden, z. B. UV-induzierte Schäden [102], 8-oxo-dG [105], Platinaddukte [106] und O⁶-Methyl-Guanin [107]. Nachteilig an der Methode war aber vor allem, dass die DNA-Addukte vor der Fluoreszenzmarkierung durch HPLC von den normalen Nukleotiden getrennt werden mussten, um dann anschließend erneut mit HPLC/CE (LIF) getrennt und detektiert zu werden.

Wang und *Giese* stellten 1993 eine Derivatisierungstechnik vor, die ebenfalls auf das beschriebene Prinzip der Konjugation einer Aminogruppe an die 5'-Phosphatgruppe von Mononukleotiden unter Carbodiimid-Aktivierung beruht [108]. Sie machten sich die von *Chu et al.* [101] beschriebene Imidazolid-Bildung zunutze, in dem sie einen an N-Acetyl-L-Histidin gekoppelten Fluorophor (BODIPY-IMI) einsetzten. Dieses Konjugat koppelt über den Imidazol-Ring des Histidins an die 5'-Phosphatgruppe der Mononukleotide unter Ausbildung eines Nukleotid-Fluorophor-Imidazolids (Abb. 7). Da allerdings die N1- und N3–Positionen nicht äquivalent sind, kommt es bei jeder Reaktion zu regioisomeren Gemischen [14].



Abb. 7: Darstellung fluoreszenzmarkierter 2'-Desoxynukleosid-5'-Monophosphate nach Wang und Giese [14]

In den letzten Jahren wurde diese Markierungsstrategie weiter ausgebaut, indem spezielle Fluoreszenzfarbstoffe mit besonderen Eigenschaften eingesetzt wurden: 4-(N,N-Dimethylaminosulfonyl)-2,1,3-benzoxadiazol als Fluorophor war deutlich stabiler gegenüber Hydrolyse, die Nachweisgrenze mit einem Helium-Cadmium Laser (Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 442$ nm, Detektion bei $\lambda_{em} = 560$ nm) war jedoch 10fach schlechter als mit BODIPY-IMI [109]. Ein Cyanin-Farbstoff mit einer Fluoreszenz im nahen Infrarot Bereich besticht durch erhöhte Empfindlichkeit auf Grund der geringen natürlichen Störsignale der biologischen Matrix in diesem spektralen Bereich. Allerdings ist das nötige Zubehör für die CE bisher nicht kommerziell erhältlich, sondern wurde speziell angefertigt [110, 111].

3 Aufgabenstellung

Die derzeit am häufigsten zur Analyse von DNA-Addukten eingesetzte Methode, ist das ³²P-Postlabeling-Verfahren, welches die Detektion von einem Addukt in 10⁹ unmodifizierten Nukleotiden ermöglicht und dabei mit einer DNA-Menge von 10µg auskommt. Neben diesen vorteilhaften Eigenschaften hat diese Methode jedoch mehrere Nachteile. Hauptnachteile sind, dass es sich um ein radioaktives Nachweisverfahren handelt, die Analysen zeitaufwendig sind und unterschiedliche DNA-Addukte nicht simultan analysiert werden können. In den letzten Jahren wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen Methoden zum Nachweis von DNA-Addukten entwickelt, die auf Fluoreszenzdetektionstechniken beruhen. Besonders vielversprechend erscheint eine im Arbeitskreis von Prof. Wießler entwickelte Fluoreszenz-Postlabeling-Methode, die die ausgezeichnete Selektivität der kapillarelektrophoretischen Trennung mit der hohen Empfindlichkeit der Laser-induzierten Fluoreszenzdetektion kombiniert. Die Methode beruht auf dem enzymatischen Verdau von DNA zu 2'-Desoxynukleosid-3'-Phosphaten, deren chemischer Fluoreszenzmarkierung mit dem Farbstoff **BODIPY-FL-EDA** und der anschließenden Analyse mittels Kapillarelektrophorese und Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion.

In der vorliegenden Arbeit sollte diese Methode weiterentwickelt werden, um sie zur Detektion von DNA-Addukten in *in vivo* Proben einsetzen zu können. Der Schwerpunkt dieser Optimierungsversuche sollte auf der Verbesserung der Empfindlichkeit der Methode liegen. Des weiteren sollte, aufbauend auf der bereits etablierten Analysenmethode, eine Variante entwickelt und validiert werden, die auf der Hydrolyse von DNA zu 2'-Desoxynukleosid-5'-Phosphaten basiert. Hierzu sollten zunächst geeignete Bedingungen für Hydrolyse, Fluoreszenzmarkierung und die kapillarelektrophoretische Trennung ausgearbeitet werden. Im Anschluss an die Validierung der Methode sollten verschiedene DNA-Modifikationen, die durch endogene Prozesse wie oxidativen Stress, Lipidperoxidation und Deaminierungen entstehen, in Oligonukleotiden und DNA untersucht werden.

Eine auf der Basis von Nukleosid-5'-Phosphaten beruhende Fluoreszenz-Postlabeling-Methode bietet auch die Möglichkeit, normale und modifizierte Ribonukleotide zu untersuchen. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte diese Methode deshalb auch zur Analyse von RNA ausgearbeitet und validiert werden. Mit dieser Methode sollte dann zunächst versucht werden die häufigste veränderte RNA-Base (Pseudouracil) in verschiedenen RNA-Typen nachzuweisen, und die Zusammensetzung der RNAs unterschiedlicher Organismen miteinander zu vergleichen.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Stand der Forschung

In der Arbeitsgruppe von Prof. Wießler wurde mit Unterstützung durch die Deutsche Bundesstiftung Umwelt (DBU) in den letzten Jahren eine neue Methode zur Analyse von DNA-Addukten und DNA-Modifikationen entwickelt [16, 112]. Sie basiert zwar auf den anderen in der Literatur beschriebenen Methoden des Fluoreszenz-Postlabelings von Nukleotiden [14, 102], d. h. Konjugation eines Fluoreszenzmarkers über eine primäre Aminofunktion an die Phosphatgruppe, ist diesen aber in einigen Punkten überlegen. Diese neue Analysenmethode lässt sich in drei Stufen unterteilen, die nacheinander im selben Reaktionsgefäß durchgeführt werden:

- Die enzymatische Hydrolyse der DNA zu 2'-Desoxynukleosid-3'-Phosphaten (dNps) mit einem Enzymgemisch aus Mikrokokkennuklease (MN) und Milz-Phosphodiesterase (SPD).
- Die Derivatisierung der modifizierten und unmodifizierten Nukleotide mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3propionyl-ethylendiamin (BODIPY-FL-EDA, s. Abb. 8).
- Die auf mizellarer elektrokinetischer Chromatographie (MEKC) basierende Trennung der Bodipy-Konjugate mit anschließender Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion (CE-LIF).



Abb. 8: 4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacen-3-propionylethylendiaminhydrochlorid (BODIPY-FL-EDA) von Molecular Probes (Eugene, Oregon USA)

Von besonderer Bedeutung ist, dass die Ankergruppe des BODIPY-FL-EDA als Analogon zu Ethylendiamin aufgefasst werden kann, was die Übertragung der von *Chu et al.* [101] erarbeiteten Darstellung von 2'-Desoxynukleosid-3'-Ethylendiamin-Phosphoramidaten auf die Bedingungen nach der DNA-Hydrolyse ermöglichte. Auf diese Weise konnte der Fluoreszenzfarbstoff in einer "1-Schritt-Reaktion" ohne Aufreinigung von Zwischenprodukten, wie noch bei *Kelman* [102] und *Wang* [108] notwendig, an die Phosphatgruppe gekoppelt werden. Im Gegensatz zu den über den Imidazol-Ring des

Histidins gebundenen Fluoreszenzmarkern [14] wurde auf diese Weise auch die Bildung regioisomerer Kopplungsprodukte durch eine primäre Aminofunktion als Ankergruppe sicher vermieden.

Die selektive Konjugation der Phosphatgruppe der 2'-Desoxynukleosid-3'-Monophosphate an die Aminogruppe des BODIPY-FL-EDA wurde durch Aktivierung des Phosphats mit dem wasserlöslichen Carbodiimid N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) erreicht (siehe Abb. 9). Um die gewünschte Kopplung des Markers an das Nukleotid zu gewährleisten, muss sichergestellt sein, dass die Reaktionslösung und insbesondere die verwendeten Puffer frei von Amino-, Phosphat- und Carbonsäuregruppen sind. Natürlich dürfen auch die verwendeten Fluoreszenzmarker keine weiteren derartigen funktionellen Gruppen tragen, da dies zu Reaktionen der Farbstoffe untereinander führen würde.



Abb. 9: Darstellung N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) vermittelter nukleophiler Phosphorsäuremonoester-Modifikationen; Nu = Nukleophil

Folglich wurde bislang für die Derivatisierung der dNps mit BODIPY-FL-EDA als Puffer N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES) pH 6.5 verwendet, obwohl HEPES mit einem pKs Wert von 7.4 wenig geeignet erscheint. Um einen Reinigungsschritt zu vermeiden, wurde die vorgeschaltete enzymatische DNA-Hydrolyse ebenfalls in HEPES-Puffer, pH 6.0, durchgeführt. Dafür mussten allerdings in beiden Schritten relativ hohe Pufferkonzentrationen verwendet werden, um den pH-Wert stabil zu halten. Mit der ³²P-Postlabeling Methode konnten *Schmitz et al.* [16] zeigen, dass die enzymatische Hydrolyse von Kalbsthymus-DNA (CT-DNA) in HEPES-Puffer trotzdem mit gleichen Ausbeuten an dNps abläuft wie die routinemäßig eingesetzte Hydrolyse in Natrium-Succinat, pH 6.0. Die Bedingungen der Derivatisierungsreaktion wurden durch die Bildung des 2'-Desoxyadenosin-3'-Phosphat Bodipy-Konjugats (dAp-Bodipy) kontrolliert und auch hierauf optimiert. dAp-Bodipy ist auch das einzige vollständig durch ¹H-, ¹³C-, ¹⁹F- und ¹¹B-NMR spektroskopisch charakterisierte Bodipy-Konjugat [112]. Diese Fluoreszenz-Postlabeling Methode mit anschließender kapillarelektrophoretischer Trennung und Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion (CE-LIF-Methode) wurde dann zur Detektion von apurinischen Stellen (AP-Stelle), 5mC und zur Bestimmung verschiedener endogener und exogener DNA-Addukte in Oligonukleotiden, CT-DNA oder humaner DNA eingesetzt [16]. Sowohl die Bedingungen der Derivatisierungsreaktion als auch die Trennparameter der CE-LIF-Analyse waren für alle erwähnten Untersuchungen identisch. Die Reproduzierbarkeit der Methode wurde durch die mehrfache Analyse von Aliquots der selben Kalbsthymus-DNA bestimmt. Unter Zusatz von Fluorescein als internem Standard wurden Standardabweichungen für die korrigierten Peakflächen der Nukleotide zwischen 5.6% und 8.4% (n = 29) erhalten. Zur Signal-Identifizierung und exakten Quantifizierung wurden die 2'-Desoxynukleosid-3'-Phosphat Bodipy-Konjugate der vier normalen Nukleotide (dAp, Tp, synthetisiert, massenspektrometrisch charakterisiert, dCp, dGp) ihre Fluoreszenz-Quantenausbeuten (FQY) (s. Punkt 2.5.2.1) ermittelt und standen somit als Standardverbindungen zur Verfügung. Die einzelnen FQYs wurden auf die Fluoreszenz-Quantenausbeute des dAp-Bodipy-Konjugates normiert. Damit ergeben sich relative Quantenfaktoren von 1.00 für dAp-Bodipy, 0.55 für das 2'-Desoxyguanosin-3'-Phosphat Bodipy-Konjugat (dGp-Bodipy), 0.97 für Thymidin-3'-Phosphat Bodipy-Konjugat (Tp-Bodipy) und 0.98 für das 2'-Desoxycytidin-3'-Phosphat Bodipy-Konjugat (dCp-Bodipy).



Abb. 10: CE-LIF Analyse einer CT-DNA nach MN/SPD-Verdau zu 2'-Desoxynukleosid-3'-Phosphaten und Derivatisierung mit BODIPY-FL-EDA. Der Ansatz wurde vor der Analyse 1:10 000 mit Wasser verdünnt.

In Abbildung 10 ist ein typisches Elektropherogramm einer CE-LIF Analyse von CT-DNA nach Verdau mit MN/SPD zu dNps und anschließender Fluoreszenzmarkierung mit BODIPY-FL-EDA gezeigt. Die Nachweisgrenze für reines dAp-Bodipy wurde mit den in Tabelle 4 angegebenen Bedingungen bestimmt und beträgt 8.5pM. Das bedeutet, dass bei einer Probenaufgabe von 20x psi·s etwa 48nL einer 8.5pM dAp-Bodipy Lösung in die Kapillare injiziert wurden (Stoffmenge = 0.4amol).

Für eine Analyse von DNA-Addukten in einer DNA-Probe muss diese auf Grund der hohen Salzkonzentration und des großen Überschusses an unmodifizierten Nukleotiden vor der CE-LIF-Analyse allerdings mindestens einhundertfach mit Wasser verdünnt werden. Dies führt generell zu einer um den Faktor 100 schlechteren Nachweisgrenze von 850 pM, was einer Addukt-Häufigkeit von zwei DNA-Addukten in 10⁶ unmodifizierten Nukleotiden entspricht. Diese Sensitivität reicht für die Detektion vieler endogener DNA-Modifikationen und Addukte sowie zur exakten Quantifizierung der DNA-Methylierung aus [113], aber nicht für die Detektion exogener DNA-Addukte in vivo. Für die quantitative Analyse der Gesamt-Genom-Methylierung (Methylierungsgrad) in Tumorproben von Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) wurden mit Hilfe von DNA-Molekülen genau bekannter Sequenzen (lambda DNA, bluescript plasmid) Korrekturfaktoren bestimmt, die zusätzlich zu den unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften der dNp-Bodipy-Konjugate die unterschiedlichen Reaktivitäten der verschiedenen dNps bei der Derivatisierung mit BODIPY-FL-EDA widerspiegeln. Auf diese Weise konnte eine mittlere Standardabweichung für den Methylierungsgrad von weniger als 5% erreicht werden [113]. Außerdem wurde die Methode soweit optimiert, dass sie bereits mit 100ng DNA-Material (z. B. aus Tumor-Biopsien) zu zuverlässigen Ergebnissen für die Messung der genomweiten Methylierung führt [114].

4.2 Fluoreszenzmarkierung von 2'-Desoxynukleosid-5'-Monophosphaten

Aus den oben gemachten Angaben lässt sich leicht erkennen, dass die Fluoreszenzmarkierung mittels Kopplung von BODIPY-FL-EDA für den Nachweis vieler biologischer Moleküle geeignet ist, sofern sie eine Phosphatgruppe bzw. eine Carbonsäuregruppe tragen. Deshalb lag es nahe abzuklären, ob die auf dNps basierende Fluoreszenz-Postlabeling-Methode auf 2'-Desoxynukleosid-5'-Phosphate (**pdNs**) übertragbar ist. Des Weiteren wurden die meisten in der Einleitung beschriebenen Verfahren zur Fluoreszenzmarkierung von Nukleotiden mit 5'-Monophosphaten durchgeführt, da sie gegenüber den 3'-Monophosphaten eine Reihe von

Vorteilen aufweisen, darunter nicht zuletzt ihre leichtere Verfügbarkeit und der geringere Preis. Weiterhin ist aus vielen ³²P-Postlabeling-Studien bekannt, dass adduktierte DNA oftmals relativ resistent gegenüber dem Verdau mit MN/SPD ist, was sich in einer schlechten Nachweisbarkeit bestimmter Addukte äußert [115]. Daher könnte der Verdau von adduktierter DNA mit anderen Enzymen oder Bedingungen die Möglichkeit einer verbesserten Addukt-Freisetzung bieten.

4.2.1 Vergleich der Kopplungsausbeuten von Nukleosid-3'- und -5'-Phosphaten

Versuche zur Kopplung von primären Aminen an pdNs unter Carbodiimid-Aktivierung wurden bereits von *Wörth* durchgeführt [112]. Dabei wurden ausgehend von der von *Ivanovskaya et al.* [116] beschriebenen Methode pdNs und dNps mit Glycinethylester unter Zugabe von EDC zur Reaktion gebracht (Abb. 11).



Abb. 11: Darstellung von 2'-Desoxyadenosin-5'-Glycinethylester-Phosphoramidat (5'-dA-GLY-Phosphoramidat)

Nach Optimierung der Reaktionsbedingungen wurden jeweils gleiche Volumina 1mM Nukleotid-, 50mM EDC- und 300mM Glycinethylesterlösung in jeweils 100mM HEPES-Puffer pH 6.5 bei Raumtemperatur für 36h umgesetzt. Wie Tab. 2 zeigt erzielten die pdNs deutlich bessere Ausbeuten an Phosphoramidaten als die dNps, was mit der sterisch anspruchsvolleren 3'-Phosphatgruppe erklärt wurde (s. Tab. 2).

Tab. 2: Vergleich der Kopplungsausbeuten der Umsetzung von 2'-Desoxynukleosid-5'- und 3'-Phosphatenmit Glycinethylester unter EDC-Aktivierung [112]

2'-Desoxy-Nukleotid	5'-GLY-Phosphoramidat	3'-GLY-Phosphoramidat
Adenosin	91%	56%
Cytidin	76%	45%
Guanosin	91%	66%
Thymidin	66%	55%

Ersetzt man unter den oben beschriebenen Reaktionsbedingungen Glycinethylester durch den Fluoreszenzfarbstoff BODIPY-FL-EDA, sinken die Ausbeuten deutlich, vor allem für die pdNs. Tabelle 3 zeigt die Ausbeuten der Umsetzung von 2'-Desoxynukleosid-3'- bzw. 5'- Phosphat mit EDC und BODIPY-FL-EDA in 100mM HEPES, pH 6.5, Reaktionszeit 36h bei 35°C [112]. Diese Ergebnisse führten dazu, dass nur die Derivatisierung der dNps mit BODIPY-FL-EDA für die Fluoreszenz-Postlabeling-Methode zur DNA-Addukt Analytik mit CE-LIF eingesetzt wurde.

 Tab. 3: Vergleich der Kopplungsausbeuten der Umsetzung von 2'-Desoxynukleosid-5'- und 3'-Phosphaten

 mit BODIPY-FL-EDA unter EDC-Aktivierung [112]

2'-Desoxy-Nukleotid	5'-Bodipy-Phosphoramidat	3'-Bodipy-Phosphoramidat
Adenosin	10%	34%
Cytidin	24%	26%
Guanosin	17%	24%
Thymidin	24%	24%

4.2.2 Fluoreszenzmarkierung von pdNs und dNps mit BODIPY-FL-EDA

Die unter 4.2.1 vorgestellten Ergebnisse zeigen aber, dass neben der Markierung von dNps auch die Markierung von pdNs mit BODIPY-FL-EDA möglich ist, wenn auch mit niedrigeren Ausbeuten. Eine vollständige Analyse von DNA nach Verdau zu 2'-Desoxynukleosid-5'-Phosphaten, Fluoreszenzmarkierung mit BODIPY-FL-EDA und die kapillarelektrophoretische Trennung der entstandenen Konjugate wurde bisher nicht berichtet. Um zu überprüfen, wie sich das Reaktionsverhalten der dNps von den pdNs unter den neuen etablierten Standardbedingungen der Derivatisierung mit BODIPY-FL-EDA [16, 113] unterscheidet, wurden die reinen 3'- und 5'-Monophosphate dAp und pdA sowie dCp und pdC mit BODIPY-FL-EDA umgesetzt. Dafür wurden je 10µg dNp bzw. pdN in 30µl 0.8M HEPES pH 6.5 gelöst, mit 30µl einer 1.8M EDC-Lösung (in 0.8M HEPES, pH 6.5) und 30µl einer 25mM BODIPY-FL-EDA-Lösung (in 0.8M HEPES, pH 6.5) für 25h bei 25°C im Dunkeln inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden anschließend 1:10 000 mit einer wässrigen Fluorescein-Lösung (1ng/ml)als internem Standard verdünnt und mittels Laser-induzierter Kapillarelektrophorese und Fluoreszenzdetektion analysiert. Die Trennungen wurden in einer unbeschichteten fused-silica-Kapillare der Gesamtlänge 64cm (effektive Länge bis zum Detektionsfenster = 59.4cm) mit einem Durchmesser von 50µm durchgeführt, und die Analyten durch Laser-induzierte Fluoreszenz bei 488nm Anregungswellenlänge (Argon-Ionen-Laser) detektiert. Die Trennspannung betrug 25 000V (390 V/cm) mit kathodischem Outlet. Die Injektion der Analyten erfolgte hydrodynamisch mit 20x psi·s. Als Trennparameter wurden die etablierten Bedingungen für 3'-Phosphat-Bodipy-Konjugate verwendet: Trennpuffer 75mM SDS, 15% (v/v) Methanol in 17mM Natriumphosphat-Puffer, pH 9.0.

Zur quantitativen Auswertung wurden die Signalflächen zeitnormiert und auf die Fläche des internen Standards bezogen. Die Korrektur der Signalflächen in Abhängigkeit von der Migrationszeit ist bei kapillarelektrophoretischen Analysen immer notwendig, da die Analyten im Gegensatz zu den üblichen chromatographischen Verfahren unterschiedlich lange im Detektionsfenster der Kapillare verweilen. Eine langsamer wandernde Substanz verursacht durch ihre längere Verweildauer im Detektionsfenster deshalb eine höhere Signalintensität und damit eine größere Peakfläche als eine schneller migrierende mit identischen Fluoreszenzeigenschaften. Aus diesem Grund werden alle Peakflächen vor einer weiteren Auswertung durch die Migrationszeit dividiert, im Folgenden als korrigierte Peakfläche bezeichnet [117].

Nach den Vorversuchen von Wörth (s. Seite 30/31) war zu erwarten, dass die Derivatisierungsausbeute und damit die in der CE-LIF-Analyse erhaltenen Signalflächen für die dNps größer sein würden als für die pdNs. Diese Einschätzung wurde durch die erhaltenen Reaktionsausbeuten der Adenosin-Phosphate bestätigt, d. h. die normierte Peakfläche von pdA-Bodipy betrug nur ca. 60% der Peakfläche von dAp-Bodipy. Dagegen zeigten die Cytosin-Phosphate das umgekehrte Bild, die normierte Peakfläche des 3'-Phosphates war deutlich kleiner als die des 5'-Phosphates (ca. 65% der Peakfläche). Unter der Annahme, dass die Fluoreszenzeigenschaften der 5'- und 3'-Phosphat-Bodipy-Konjugate der jeweiligen schließen, Nukleotide gleich sind. kann man dass unter den verwendeten Derivatisierungsbedingungen die Kopplungsausbeuten von dNps und pdNs mit BODIPY-FL-EDA zwar unterschiedlich sind, aber nicht alle 5'-Phosphate schlechter markiert werden, wie nach den Versuchen von Wörth [112] zu erwarten gewesen wäre. Dies war auch hinsichtlich der Derivatisierungsbedingungen überraschend, da diese auf dNps optimiert waren.

Für weitere Untersuchungen wurden die pdNs der vier in der DNA vorkommenden Basen (je 10µg) unter den oben beschriebenen Bedingungen einzeln derivatisiert und standen danach als Standards zum Aufstocken und zur Identifizierung der Signale in Gemischen zur

Verfügung. In einem zweiten Schritt wurden je 2.5µg der einzelnen pdNs zuerst gemischt und dann gleichzeitig unter den selben Bedingungen derivatisiert.

In Abb. 12 ist das entsprechende Elektropherogramm der CE-LIF-Analyse für die vier gemeinsam derivatisierten Nukleotide nach 1:10 000 Verdünnung mit Fluorescein-Lösung gezeigt. Die Trennung der vier normalen pdN-Bodipy-Konjugate gelingt mit sehr guter Basislinientrennung unter den für dNp-Bodipy-Konjugate entwickelten Trennbedingungen.



Abb. 12: Trennung der vier normalen 2'-Desoxynukleosid-5'-Monophosphat-Bodipy-Konjugate mit Fluorescein als internem Standard nach Derivatisierung einer Mischung von je 2.5µg der einzelnen pdNs. Trennbedingungen wie in Tab. 4 angegeben

Zum Vergleich wurden die separat derivatisierten Standards zu gleichen Teilen gemischt (jeweils 5µl der einzelnen Ansätze), danach 1:10 000 verdünnt und unter identischen Bedingungen kapillarelektrophoretisch analysiert. Die Signalflächen der jeweiligen Bodipy-Konjugate waren nahezu identisch, so dass man davon ausgehen kann, dass die dNps in beiden Versuchen mit gleicher Ausbeute fluoreszenzmarkiert wurden. Im Gegensatz zu den dNp-Konjugaten (s. Abb. 10) hat sich die Migrationsreihenfolge bei gleichen Trennbedingungen leicht verändert. Das pdG-Bodipy migriert nun am langsamsten, was für die höchste Lipophilie spricht (längste Verweildauer in der Mizelle). Bei den dNp-Bodipy-Konjugaten nimmt diese Stellung das dCp-Bodipy bzw. das 5mdCp-Bodipy ein. Ansonsten sind keine gravierenden Unterschiede zu beobachten, vielmehr erhält man gleich große

Peakflächen für die jeweiligen 5'- bzw. 3'-Phosphat-Bodipy-Konjugate und der für dGp-Bodipy beschriebene Fluoreszenz-Quenching-Effekt ist auch für pdG-Bodipy zu beobachten. Allerdings wandern pdN-Bodipy-Konjugate prinzipiell schneller als ihre korrespondierenden 3'-Phosphat-Bodipy-Konjugate.

In Tabelle 4 sind noch einmal die verwendeten Bedingungen für die Fluoreszenzmarkierung der 2'-Desoxynukleosid-5'- und 3'-Monophosphate und der CE-LIF-Analyse als Übersicht dargestellt.

Analysenschritt	Bedingungen				
Fluoreszenzmarkierung	10µl Nukleotidlosung (10µg pdN oder dNp, 30nmol)				
(Derivatisierung)	+ 20µl 800mM HEPES, pH 6.5 (1mM Nukleotid)				
	+ 30µl 25mM BODIPY-FL-EDA in 800mM HEPES, pH 6.5				
	+ 30µl 1.8M EDC in 800mM HEPES, pH 6.5				
	Inkubation bei 25°C für 25h				
Kapillarelektrophorese	unbeschichtete fused-silica-Kapillare, $L_{ges} = 64$ cm, $L_{eff} = 59.4$ cm				
(MEKC), BioRad	Durchmesser = $50 \mu m$				
BioFocus 3000 LIF ²	25 kV Trennspannung ≈ 400 V/cm				
	hydrodynamische Injektion 20x psi·s				
	Trennpuffer bestehend aus 17mM Natriumphosphat-Puffer, pH 9.0;				
	75mM SDS, 15% Methanol				

Tab. 4: Bedingungen für die CE-LIF Analyse von 2'-Desoxynukleosid-Monophosphaten

4.3 Entwicklung alternativer Hydrolyseverfahren für DNA

4.3.1 Überprüfung neuer Puffersysteme

Wie bereits dargelegt, ist die Auswahl des Puffersystems von entscheidender Bedeutung für die selektive Kopplung der Phosphatgruppe mit der primären Aminofunktion des Fluoreszenzmarkers. Dabei darf die Puffersubstanz keine primäre Aminogruppe oder Carbonsäure enthalten. Gleichzeitig sollte der Puffer sowohl für den DNA-Verdau, als auch für die anschließende Derivatisierung verwendbar sein, um eine Mischung verschiedener Puffersalze zu vermeiden, da sich diese in der Regel negativ bei der kapillarelektrophoretischen Trennung bemerkbar macht. Für die enzymatische Hydrolyse der DNA werden gleichzeitig ganz verschiedene Anforderungen an den Pufferbereich gestellt, da die verwendeten Enzyme nur in einem bestimmten pH-Bereich optimal arbeiten. Die folgende Abb. 13 gibt einen Überblick über die gebräuchlichsten Methoden Nukleinsäuren (DNA und RNA) zu 3'- oder 5'-Nukleosid-Monophosphaten zu verdauen.



Abb. 13: Strukturen der Mononukleotide aus enzymatischer DNA/RNA-Hydrolyse; MN = Mikrokokkennuklease; SPD = Milz-Phosphodiesterase; NP1 = Nuklease P1; DNaseI = DNaseI aus Rinderbauchspeicheldrüse; SVPD = Schlangengift-Phosphodiesterase aus *Crotalus atrox*; dNp = 2'-Desoxynukleosid-3'-Phosphat; pdN = 2'-Desoxynukleosid-5'-Phosphat; prN = Ribonukleosid-5'-Phosphat

Hieraus ist ersichtlich, dass für die optimale enzymatische Hydrolyse von DNA und RNA der bisher verwendete HEPES-Puffer, pH 6.5, nur für den Verdau mit MN/SPD zu dNps geeignet ist. Bei den anderen Vorschriften wird jedoch eine Puffersubstanz mit einem niedrigeren oder höheren pK_s-Wert benötigt.

Für die Derivatisierungsreaktion der Phosphatgruppen von Nukleotiden mit primären Aminen sind in der Literatur bereits eine Reihe geeigneter Puffer beschrieben: Lutidin (2,6-Dimethylpyridin) [101], Methylimidazol, HEPES und 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES). Für die DNA-Hydrolyse wurde bisher allerdings nur HEPES, pH 6.0, analog zum etablierten MN/SPD-Verdau bei der ³²P-Postlabeling-Methode eingesetzt [112].

In Vorversuchen wurde für die Derivatisierung von 10µg dAp und pdA mit BODIPY-FL-EDA unter den etablierten Bedingungen (s. Tab. 4) zunächst der 0.8M HEPES-Puffer, pH 6.5, gegen 100mM Methylimidazol, pH 6.0, wie von *Kelman et al.* [102] verwendet, bzw. 250mM MES, pH 6.5, ausgetauscht. Die Reaktionsansätze wurden anschließend gemäß der in Tabelle 4 beschriebenen Bedingungen mittels CE-LIF analysiert. Bei allen Versuchen konnte das erwartete dAp- bzw. pdA-Bodipy-Konjugat zwar detektiert und durch Vergleich mit Standards identifiziert werden, Methylimidazol gepufferte Reaktionen erzielten aber die schlechtesten Ausbeuten für beide Konjugate. Wahrscheinlich läuft die Konjugation mit BODIPY-FL-EDA bei pH 6.5 besser ab, als die von *Kelman* beschriebene Reaktion mit Ethylendiamin (pH 6.0).

Die Kopplungsreaktionen in MES Puffer, pH 6.5, liefen ohne Probleme und mit etwa gleichen Ausbeuten ab wie die in HEPES, pH 6.5. Diese Ergebnisse eröffnen die Möglichkeit der Hydrolyse von DNA mit NP1 zu pdNs, da MES-Puffer bei pH 5.5 einsetzbar ist. Durch das Fehlen reaktiver funktioneller Gruppen ist MES ebenfalls für den Einsatz zur Derivatisierung mit BODIPY-FL-EDA geeignet, so dass in diesem Schritt der Puffer nicht gewechselt werden muss.



Abb. 14: Strukturformeln von 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) und N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)

4.3.2 Überprüfung der DNA-Hydrolyse mit dem ³²P-Postlabeling Verfahren

Um zu klären, ob die beiden Puffersubstanzen HEPES und MES bei der DNA-Hydrolyse mit MN/SPD gleichwertig sind, wurden vergleichende Versuche durchgeführt und mit der ³²P-Postlabeling Methode ausgewertet. Hierzu wurde CT-DNA, die *in vitro* mit 3-Nitrobenzanthron behandelt war, verwendet (Proben NBA2 und NBA9). Die zuvor mit der ³²P-Postlabeling Methode bestimmten Gesamt-DNA-Addukt Mengen betrugen für NBA2 2 Addukte pro 10⁸ normale Nukleotide und 4 Addukte pro 10⁷ normale Nukleotide für NBA9. Je vier Aliquots (12.5µg DNA) der beiden Proben wurden mit MN/SPD zu dNps verdaut. Dabei wurden anstelle des standardmäßig verwendeten Natriumacetat-Puffers (100mM, pH 6.0) unterschiedliche Konzentrationen von HEPES und MES-Puffer des selben pH Wertes eingesetzt (100mM und 250mM) und die DNA 3h bei 37°C hydrolysiert. Danach wurden Aliquots, die 2.5µg DNA entsprachen, entnommen und mit [γ -³²P]ATP mittels T4-Polynukleotidkinase radioaktiv markiert [118]. Die radioaktiv markierten Proben wurden

nach Verdünnung auf Polyethylenimin-Cellulose-Fertigfolien aufgetragen, dünnschichtchromatographisch getrennt (Laufmittel 0.28M Ammoniumsulfat, 50mM Natriumphosphat, pH 6.5) und autoradiographisch entwickelt (Abb. 15). Die quantitative Auswertung der Radioaktivmarkierung erfolgte durch Messung der Zählraten (radioaktive Zerfälle pro Minute) der markierten Nukleotide korrigiert durch die in Bahn 9 gemessenen Hintergrundaktivität (Negativkontrolle, Wasser) mit einem Instant-Imager. Die Auswertung ergab in allen Fällen keine Unterschiede in der gemessenen Radioaktivität, so dass man davon ausgehen kann, dass die DNA mit den verwendeten Puffern und Konzentrationen gleich gut verdaut wurde. Von *Schmitz et al.* war bereits nachgewiesen worden, dass die Verwendung von HEPES-Puffer die gleichen Hydrolyse-Ausbeuten für CT-DNA liefert, wie der beim ³²P-Postlabeling verwendete Natriumsuccinat-Puffer [16].



Abb. 15: ³²P-Postlabeling-Analyse unterschiedlicher DNA-Hydrolysate; **Bahn 1-4**: NBA2 verdaut in 100mM HEPES (1), 250mM HEPES (2), 100mM MES (3) und 250mM MES (4); **Bahn 5-8**: NBA9 verdaut in 100mM HEPES (5), 250mM HEPES (6), 100mM MES (7) und 250mM MES (8); **Bahn 9**: Negativkontrolle mit Wasser; Origin = Auftragspunkt; G,A,C,T = radioaktiv markierte Nukleosid-3',5'-Bisphosphate; V: Verunreinigung im $[^{32}P]$ -ATP; ³²Pi = freies, radioaktives Phosphat

Die DNA-Addukte in den restlichen 10µg des DNA-Verdaus wurden wie von *Bieler et al.* beschrieben mit Butanol-Extraktion angereichert, radioaktiv markiert und getrennt [31]. Die quantitative Auswertung der Addukt-Flecken ergab für NBA2 ein Gesamt-Addukt-Level von 3.2 Addukten pro 10⁸ normalen Nukleotiden (100mM MES) bis 8.7 Addukten pro 10⁸ normalen Nukleotiden (100mM HEPES). Bei NBA9 lagen die Werte zwischen 1.9 Addukten pro 10⁷ normalen Nukleotiden (250mM MES) und 3.8 Addukten pro 10⁷ normalen Nukleotiden (100mM HEPES). Die beobachteten Abweichungen liegen im üblichen Bereich der ³²P-Postlabeling-Methode, so dass man davon ausgehen kann, dass die verwendeten Puffer nicht nur gleich effektiv bei der DNA-Hydrolyse einsetzbar sind, sondern auch den Addukt-Nachweis nicht beeinflussen.

4.3.3 Hydrolyse von DNA mit DNaseI/SVPD

Die Hydrolyse der DNA mit DNaseI und Snake Venom Phosphodiesterase (SVPD) zu pdNs wird in der Literatur häufig beschrieben und ist auch für kleine DNA Mengen gut standardisiert [119]. Sie baut ähnlich wie die Hydrolyse mit MN/SPD auf ein System aus einer Endonuklease (DNaseI) und einer Exonuklease (SVPD). DNaseI verdaut die DNA in kleine Einheiten von ca. vier Nukleotiden, die am 5'-Ende eine Phosphatgruppe und am 3'-Ende eine OH-Gruppe besitzen. Die Exonuklease (SVPD) zerschneidet dann diese kleinen Stücke vom 3'-OH Ende her in pdNs.

Die ersten Versuche zur Übertragung dieser Version des DNA-Verdaus orientierten sich an den Angaben von *Liuzzi et al.* [120] und *Dipple et al.* [121]. Beide Methoden unterscheiden sich grundsätzlich darin, dass einmal DNaseI und SVPD gleichzeitig zur DNA-Hydrolyse eingesetzt werden [120], wogegen im anderen Fall der DNA-Verdau in zwei Schritten durchgeführt wird; zuerst die Inkubation mit DNaseI, danach mit SVPD. Die beschriebenen DNA- und Enzymkonzentrationen wurden übernommen und die Tris-Puffer durch HEPES gleicher Molarität und gleichen pH-Wertes ersetzt (s. Tab. 39 und 40 im Experimentellen Teil).

Die so erhaltenen CT-DNA Hydrolysate wurden danach wie gewohnt (s. Tab. 4) mit EDC und BODIPY-FL-EDA umgesetzt. Dabei traten allerdings Probleme in Form von Farbveränderungen auf, bzw. es bildeten sich rötliche Niederschläge im Reaktionsansatz. Der Niederschlag wurde nach 16h kurz abzentrifugiert, die Probe 1:100 mit Wasser oder Fluorescein-Lösung (1ng/ml) verdünnt und mit CE-LIF analysiert. In den Elektropherogrammen wurden jedoch keine Peaks identifiziert, die mit den synthetisierten

Standards der pdN-Bodipy-Konjugate [112] übereinstimmten (nicht gezeigt). Die wahrscheinlichste Ursache hierfür ist wohl die SVPD. Sie ist nur in Form von grob aufgereinigtem Schlangengift erhältlich und zeigt nach dem Auflösen eine gelbliche Farbe. Dies läßt auf Verunreinigungen schließen, die wiederum zu störenden Nebenreaktionen führen können. Generell hatten die Elektropherogramme große Ähnlichkeit mit solchen, die man nach Verwendung von Succinat-Puffern (störende Carbonsäure) für die DNA-Hydrolyse erhält. Ein DNA-Verdau mit DNaseI/SVPD zu pdNs ist offenbar nicht mit den Bedingungen zur Fluoreszenzmarkierung mit BODIPY-FL-EDA kompatibel. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht abschließend geklärt werden, ob das entscheidende Problem bei der Markierungsreaktion mit dem Fluoreszenzfarbstoff, oder bereits bei der Hydrolyse der DNA auftritt. Daher wurde diese Variante des DNA-Verdaus nicht weiter verfolgt.

4.3.4 Hydrolyse von DNA mit Nuklease P1

Eine weitere häufig gebrauchte Methode zum Verdau von DNA zu 2'-Desoxynukleosid-5'-Phosphaten nutzt das Enzym NP1 aus *Penicillium citrinum*. Diese hat den Vorteil, dass sie sowohl Endo- als auch Exonuklease-Aktivität aufweist und somit kein Enzymgemisch für die vollständige Hydrolyse der DNA zu pdNs nötig ist. Das bedeutet auch, dass man den pH-Wert exakt auf das Optimum für NP1 einstellen kann (pH 5.5), ohne Kompromisse im Hinblick auf ein zweites Enzym einzugehen oder den Verdau in zwei Schritte aufteilen zu müssen. Für die Versuche zum Verdau von CT-DNA wurden die von *Li et al.* [122] optimierten Hydrolyse-Bedingungen übernommen (s. Tab. 5), außer dass MES (50mM, pH 5.5), anstelle von Natriumacetat (50mM, pH 5.5) eingesetzt wurde. Die Hydrolyse wurde bei 37°C in 2h unter leichtem Schütteln (500rpm) in einem Eppendorf Thermomixer durchgeführt.

Tab	o. 5: Modifizierte l	Bedingungen fi	ür die DNA-Hyd	rolyse zu 2'-De	soxynukleosid-5'-	Phosphaten nach	ı <i>Li</i>
et a	<i>ıl.</i> [122]						

Substanz	Menge	Endkonzentration	
CT-DNA	10µg (30.8nmol)	3.08nmol/µl	
Nuklease P1 gelöst in H ₂ O	2µl (0.066µg/µl)	0.0132µg/µl	
Zinkchlorid (ZnCl ₂)	2µl (2mM)	0.4mM	
MES 50mM, pH 5.5	6µl	30mM	
Gesamtvolumen	10µ1		

Im Anschluss an den Verdau wurde die Probe, wie in Tabelle 6 angegeben, fluoreszenzmarkiert und mit CE-LIF analysiert. Da für diese Versuche nun ein neues Kapillarelektrophorese-Gerät (Beckman P/ACETM MDQ Glycoprotein-System) zur Verfügung stand, ergaben sich neben der Umstellung der Puffersubstanz von 800mM HEPES auf 350mM MES für die Fluoreszenzmarkierung auch einige gerätespezifische Änderungen für die elektrophoretische Trennung.

 Tab. 6: Bedingungen f
 ür die CE-LIF-Analyse fluoreszenzmarkierter 2'-Desoxynukleosid-5'-Phosphat-Bodipy-Konjugate

Analysenschritt	Bedingungen
Fluoreszenzmarkierung	10ul Hydrolyselösung (10ug pdN, 30nmol)
(Derivatisierung)	+ 20μ l 350mM MES, pH 6.5 (1mM Nukleotid)
	+ 30µl 25mM BODIPY-FL-EDA in 350mM MES, pH 6.5
	+ 30µl 1.8M EDC in 350mM MES, pH 6.5
	Inkubation bei 25°C für 25h
Kapillarelektrophorese	unbeschichtete fused-silica-Kapillare, $L_{ges} = 59$ cm, $L_{eff} = 49$ cm
(MEKC),	Durchmesser = $50 \mu m$
Beckman Coulter,	25kV Trennspannung (420V/cm)
P/ACE MDQ	hydrodynamische Injektion 7.5x psi ·s (ca. 15nl)
Glycoprotein System	Trennpuffer bestehend aus 17mM Natriumphosphat-Puffer, pH 9.0, 75mM
	SDS, 15% Methanol

 L_{ges} = Gesamtlänge der Kapillare; L_{eff} = effektive Länge der Kapillare bis zum Detektionsfenster; psi = pounds per square inch

Im Gegensatz zu den CT-DNA-Hydrolysaten nach DNasel/SVPD-Verdau traten während der Fluoreszenzmarkierungs-Reaktion zu keiner Zeit Probleme auf, die Lösung blieb klar orange und konnte nach 1:1000 Verdünnung mit Wasser ohne Schwierigkeiten analysiert werden. Die vier Signale im Elektropherogramm (Abb. 16) wurden durch Aufstocken mit den Standards der einzelnen pdN-Bodipy-Konjugate eindeutig identifiziert. Es fehlt jedoch der Peak für das 5-Methyl-2'-Desoxycytosin-5'-Phosphat Bodipy-Konjugat (p5mdC-Bodipy). Da bei einem Methylierungsgrad der CT-DNA von ca. 6% auch die Signalhöhe des 5mdCp-Bodipy etwa 6% der Höhe des dCp-Bodipys beträgt, war ein erkennbares Signal von ca. 0.5 relativen Fluoreszenzeinheiten (relative fluorescence units, RFU) zu erwarten. Da eine unvollständige Freisetzung von p5mdC aus CT-DNA unwahrscheinlich erschien, wurde systematisch versucht, die Trennbedingungen zu optimieren. Auch im Hinblick auf eine spätere Anwendung für die Messung der genomweiten Cytosinmethylierung war dies von Interesse. Die unsymmetrische Peakform des pdC-Bodipy ließ vermuten, dass p5mdC-Bodipy mit pdC-Bodipy comigrierte. Aus den Ergebnissen konnte jedoch abgeleitet werden, dass MES, 50mM, pH 5.5, für den Verdau, und MES, 350mM, pH 6.5, für die Fluoreszenzmarkierung geeignet sind. Daher wurden diese Bedingungen für die weiteren Versuche beibehalten.



Abb. 16: CE-LIF-Analyse von CT-DNA nach Nuklease P1 Verdau und Fluoreszenzmarkierung, Trennbedingungen s. Tab. 6.

4.3.5 Methodenentwicklung zur kapillarelektrophoretischen Trennung von 5-Methyl-2'-Desoxycytosin-5'-Phosphat-Bodipy (p5mdC-Bodipy)

Zur Optimierung der Trennbedingungen wurde auf das mittlerweile bewährte System aus Natriumphosphatpuffer, pH 9.0, mit SDS als Mizellbildner und Methanol als "organischem Modifier" zurückgegriffen. Wie in Tab. 41 (s. S. 161) aufgeführt, wurden zehn Trennpuffer mit unterschiedlichen Verhältnissen von SDS zu Methanol bei zwei verschiedenen Stromstärken (20kV und 25kV) getestet.

Für die Peakidentifizierung und die Entwicklung der Trennbedingungen standen zwei Oligodesoxynukleotide unterschiedlicher Länge, die jeweils ein 5mdC (C*) als Modifikation enthielten, zur Verfügung:

Oligo Mod1:5'-TCC*-ATC-TGG-AAC-3'(12mer)Oligo Mod2:5'-TGC-C*AC-GTC-AGC-CTG-GAT-ACC-3'(21mer)

Da nach dem Verdau der Oligonukleotide mit NP1 das 5'-endständige Nukleotid keine Phosphatgruppe aufweist und deshalb nicht mit BODIPY-FL-EDA markiert werden kann, fehlt es in der Analyse. Unter Berücksichtigung dieses Sachverhaltes berechnen sich die prozentualen Anteile der einzelnen Nukleotide am gesamten Oligonukleotid wie in Tabelle 7 angegeben.

	Nukleotid	Anzahl	Anteil (%)
Oligo Mod1 (12mer)	dA	3	27.3
	dT	2	18.2
	dG	2	18.2
	dC	3	27.3
	5mdC	1	9.1
Oligo Mod2 (21mer)	dA	4	20
	dT	3	15
	dG	5	25
	dC	7	35
	5mdC	1	5

Tab. 7: Zusammensetzung der für die Methodenentwicklung verwendeten Oligodesoxynukleotide

Durch die unterschiedlichen Anteile an 5-Methylcytosin in den Oligonukleotiden von 9.1% bzw. 5% kann das 5mdC-Signal über die Proportionalität zur Gesamt-Peakfläche eindeutig identifiziert werden.

Beide modifizierte Oligonukleotide ($10\mu g$) wurden nach den Bedingungen aus Tabelle 5 mit Nuklease P1 verdaut und anschließend, wie in Tabelle 6 beschrieben, fluoreszenzmarkiert. Verdünnungen dieser Derivatisierungsansätze wurden mit CE-LIF analysiert, wobei sich in zwei der getesteten Trennpuffer-Systemen eine vollständige Basislinientrennung aller pdN-Bodipy-Konjugate zeigte. Dies waren 16mM Natriumphosphat-Puffer, pH 9.0, 20% Methanol (v/v), 75mM SDS (Abb. 17) und 18.5mM Natriumphosphat-Puffer pH 9.0, 7.5% Methanol (v/v), 90mM SDS, die sich vor allem im Verhältnis Methanol/SDS unterscheiden. Dabei erwies sich eine Trennspannung von 20kV durchweg als besser geeignet als 25kV, auch wenn dafür eine etwa fünf Minuten längere Analysendauer in Kauf genommen werden musste. Des weiteren war es für die Analysen völlig ausreichend nur 2.5x psi·s (ca. 5nl) in die Kapillare zu injizieren. Dies führte zu einer weiteren Verbesserung der Auftrennung zwischen p5mdC-Bodipy und pdC-Bodipy.



Abb. 17: Analyse von Oligo Mod1 nach Verdau mit Nuklease P1 und Fluoreszenzmarkierung; Trennung auf P/ACE MDQ mit 16mM Natriumphosphat, pH 9.0, 20% Methanol (v/v) 75mM SDS, 20kV

Eine Erhöhung Konzentration des Mizellbildners SDS der bei gleicher Methanolkonzentration führte zu einer Verschiebung des p5mdC-Bodipy-Peaks hin zu längeren Migrationszeiten (nicht gezeigt). Leider führt dieser Weg letztendlich zu einer schlechteren Trennung von pdA-Bodipy und pT-Bodipy. Die zweite Variante mit 16mM Natriumphosphat pH 9.0, 20% Methanol und 75mM SDS beschreibt dagegen das andere Extrem einer hohen Methanolkonzentration bei niedrigerer SDS-Konzentration, wie Abb. 17 zeigt. Bei diesen Trennbedingungen konnten besser reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden, weshalb diese Elektrolytzusammensetzung für die weiteren Analysen verwendet wurde.

Die in Tab. 7 berechneten Verhältnisse der einzelnen Nukleotide zueinander sowie ihr prozentualer Anteil am gesamten Oligonukleotid spiegeln sich näherungsweise auch in den Peakflächen des Elektropherogramms der Analyse von Oligo Mod2 wider (Abb. 18). Oligo Mod2 besteht aus dA, T, 5mdC, dC, und dG im Verhältnis 4:3:1:7:5.



Abb. 18: Analyse von Oligo Mod2 nach Verdau mit Nuklease P1 und Fluoreszenzmarkierung; Trennung auf P/ACE MDQ mit 16mM Natriumphosphat, pH 9.0, 20% Methanol (v/v), 75mM SDS, 20kV

Die quantitative Auswertung der CE-LIF-Analyse von Oligo Mod2 wird im Folgenden kurz erläutert und ist in Tabelle 8 aufgelistet.

Dargestellt sind die Mittelwerte der Signalflächen aus acht aufeinander folgenden Analysenläufen einer Probe, welche nach Division durch die Migrationszeit die korrigierte Peakfläche ergeben. Für die Ermittlung des Nukleotidverhältnisses wurden alle korrigierten Flächen durch die Fläche des p5mdC-Signals dividiert. Der aus der Analyse ermittelte prozentuale Anteil der Nukleotide am Oligonukleotid (gemessener Nukleotidanteil in Tab. 8) errechnet sich aus dem Verhältnis der einzelnen korrigierten Peakflächen zur Gesamtfläche aller Nukleotide. Der Korrekturfaktor errechnet sich aus dem Verhältnis des praktisch bestimmten Nukleotidanteils zum tatsächlichen Anteil des Nukleotids im Oligonukleotid.

	pdA-Bodipy	pT-Bodipy	pdC-Bodipy	p5mdC-	pdG-Bodipy
				Bodipy	
Fläche [Einheiten]	$1958601 \pm$	$1376566 \pm$	$4113251\pm$	$525887 \pm$	$818198 \pm$
	90924	60185	163781	22593	24046
Migrationszeit [min]	22.247	23.463	24.944	24.451	26.227
Korrigierte Peakfläche	$88211 \pm$	$58787 \pm$	$165234 \pm$	$24545 \pm$	$31218 \pm$
	6342	4101	10939	1376	685
Nukleotidverhältnis	4.1	2.73	7.67	1.0	1.45
Gem. NuklAnteil (%)	24.16 ± 0.24	16.16 ± 0.12	45.26 ± 0.18	5.90 ± 0.09	8.58 ± 0.43
Tats. NuklAnteil (%)	20	15	35	5	25
Korrekturfaktor	0.83 ± 0.008	0.93 ± 0.007	0.77 ± 0.003	0.85 ± 0.013	2.92 ± 0.015
Normierte					
Migrationszeit	1.00	1.06	1.12	1.10	1.18

Tab. 8: Auswertung der CE-LIF Analyse von Oligo Mod2 (n = 8)

Gem. Nukl.-Anteil = Gemessener Nukleotid-Anteil, Tats. Nukl.-Anteil = Tatsächlicher Nukleotid-Anteil

Die so bestimmte Zusammensetzung des Oligonukleotids stimmt bis auf den Gehalt an dG näherungsweise mit der Realität überein. Wie erwartet erhält man aber Abweichungen zur tatsächlichen Zusammensetzung, da die Signalflächen von den chemischen Reaktivitäten der einzelnen Nukleotide und den Fluoreszenz-Quantenausbeuten ihrer Bodipy-Konjugate abhängen.

Anhand der experimentell bestimmten Zusammensetzung des Oligonukleotids und der tatsächlichen Zusammensetzung wurden für die einzelnen pdNs Korrekturfaktoren berechnet (s. Tab. 8). Aus den Versuchen mit den dNp-Bodipy-Konjugaten ist allerdings bekannt, dass Korrekturfaktoren, die mit Oligonukleotiden bestimmt werden, die Situation für reale DNA Proben nicht korrekt wiedergeben, da die Vollständigkeit der Hydrolyse bei Oligonukleotiden anders ist als bei großen DNA-Abschnitten. Korrekturfaktoren sollten daher mit komplexeren, in ihrer Zusammensetzung bekannten DNA-Molekülen ermittelt werden (4.4.1 Validierung).

Die in Tabelle 8 aufgeführte normierte Migrationszeit ist ein Hilfsmittel zur Identifikation von Signalen bei der Kapillarelektrophorese. Treten im Verlauf von Analysenreihen Verschiebungen beim elektroosmotischen Fluss (EOF) und damit in der Migrationszeit der Analyten auf, z. B. durch Belegung der Kapillarwände mit Proteinen aus der Hydrolyse der DNA, so lassen sich Peaks dennoch sicher mit Hilfe von normierten Migrationszeiten zuordnen. Dabei wird die Migrationszeit des fraglichen Signals durch die Migrationszeit eines bekannten Signals des gleichen Laufes dividiert. Diese kann mit den früher ermittelten normierten Migrationszeiten verglichen werden. Alle Signale wurden auf pdA-Bodipy normiert, da es das erste und in der Regel höchste Signal eines Analysenlaufes darstellt und somit eindeutig zu identifizieren ist.

Nun stand ein komplettes Methodenspektrum für die Hydrolyse von DNA zu pdNs, die Derivatisierung mit BODIPY-FL-EDA unter EDC Aktivierung und die anschließende CE-LIF-Analyse zur Verfügung. Dieses, im Folgenden als 5'-Variante der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode bezeichnete Verfahren, wurde in weiteren Untersuchungen validiert und mit der bekannten Methode zur Fluoreszenzderivatisierung von dNps (3'-Variante der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode) verglichen.

4.4 Die 5'-Variante der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode

4.4.1 Validierung

Für einen Einsatz der 5'-Variante der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode zur Analyse von DNA und DNA-Schäden ist eine Validierung der Methode unverzichtbar. Dazu zählt die Bestimmung der wichtigsten Parameter einer analytischen Methode wie die Nachweisgrenze, die Überprüfung der Linearität des Messbereiches, die Präzision und Reproduzierbarkeit der Methode [123], sowie die Ermittlung der Korrekturfaktoren. Da solche Untersuchungen für die 3'-Variante von *Stach et al.* und *Wirtz et al.* bereits durchgeführt wurden, orientierte ich mich an der beschriebenen Vorgehensweise [113, 114]. Damit war es gleichzeitig möglich, beide Verfahren miteinander zu vergleichen und ihre jeweiligen Stärken bzw. Schwächen aufzudecken.

Die unter Punkt 4.3.5 beschriebene Methodenentwicklung führte zu den in Tab. 9 dargestellten Bedingungen für die folgenden Validierungsexperimente.

Analysenschritt	Bedingungen					
DNA-Hydrolyse	10µg CT-DNA (30nmol) zur Trockene einengen, in 6µl MES 50mM, pH 5.5, lösen Zugabe von 2µl ZnCl ₂ (2mM) und 2µl NP1 (0.02U) in Wasser Inkubation bei 37°C für 2h					
Fluoreszenzmarkierung	10µl Hydrolyselösung (10µg pdN, 30nmol)					
(Derivatisierung)	+ 20µl 350mM MES, pH 6.5 (Endkonzentration 340µM Nukleotid)					
	+ $30\mu l$ 25mM BODIPY-FL-EDA in 350mM MES, pH 6.5					
	(Endkonzentration 8.33mM BODIPY-FL-EDA)					
	+ 30µl 1.8M EDC in 350mM MES, pH 6.5 (Endkonzentration 0.6M EDC)					
	Endvolumen 90µl					
	Inkubation bei 25°C für 25h					
Kapillarelektrophorese	unbeschichtete fused-silica-Kapillare, $L_{ges} = 59$ cm, $L_{eff} = 49$ cm					
(MEKC),	Durchmesser = $50\mu m$					
Beckman Coulter,	20kV Trennspannung (340V/cm)					
P/ACE MDQ	hydrodynamische Injektion 2.5x psi·s (5nl)					
Glycoprotein System	Trennpuffer: 16mM Natriumphosphat-Puffer, pH 9.0, 75mM SDS,					
	20% Methanol (v/v)					

Tab. 9: Versuchsbedingungen für die 5'-Variante der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode

Die bereits validierte 3'-Variante des Fluoreszenz-Postlabeling-Assays wurde nach den Bedingungen von *Stach* [113] und *Wirtz* [114] mit kleinen Änderungen durchgeführt. Diese Änderungen betreffen insbesondere die Verwendung einer höheren Konzentration an Milz-Phosphodiesterase (SPD) beim Verdau der DNA, bzw. die Durchführung der CE-LIF-Analysen mit der Beckman P/ACE MDQ anstelle der BioRad Biofocus 3000 [113]. Die so modifizierte Methode ist in Tabelle 10 dargestellt.

Analysenschritt	Bedingungen
DNA-Hydrolyse	10µg CT-DNA (30nmol) zur Trockene einengen in 5µl H ₂ O (Millipore) lösen Herstellung eines Enzym-Mix aus 5µl MN/SPD Mischung in Wasser (12.5mU/µl SPD und 150µU/µl MN) und 1µl HEPES 250mM, 100mM CaCl ₂ , pH 6.0 Zugabe von 5µl des Enzym Mix zur gelösten DNA Inkubation bei 37°C für 3h
Fluoreszenzmarkierung (Derivatisierung)	 10μl Hydrolyselösung (10μg dNp, 30nmol) + 20μl 0.8M HEPES, pH 6.5 (Endkonzentration 340μM Nukleotid) + 30μl 25mM BODIPY-FL-EDA in 0.8M HEPES, pH 6.5 (Endkonzentration 8.33mM BODIPY-FL-EDA) + 30μl 1.8M EDC in 0.8M HEPES, pH = 6.5 (Endkonzentration 0.6M EDC) Endvolumen 90μl Inkubation bei 25°C für 25h
Kapillarelektrophorese (MEKC), Beckman Coulter, P/ACE MDQ Glycoprotein System	unbeschichtete fused-silica-Kapillare, L _{ges} = 59cm, L _{eff} = 48.5cm Durchmesser = 50μm 20kV Trennspannung (340V/cm) hydrodynamische Injektion 2.5x psi·s (ca. 5nl) Trennpuffer: 18mM Natriumphosphat-Puffer, pH 9.0; 90mM SDS, 10% Methanol (v/v)

Tab. 10: Versuchsbedingungen für die 3'-Variante der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode

Für erste vergleichende Untersuchungen wurden je 10µg CT-DNA nach den jeweiligen Standardbedingungen mit MN/SPD zu dNps (Tab. 10) bzw. mit NP1 zu den pdNs (Tab. 9) verdaut und mit BODIPY-FL-EDA fluoreszenzmarkiert. Die erhaltenen Reaktionslösungen wurden dann zu gleichen Teilen gemischt (jeweils 5µl) und 1:500 mit Wasser verdünnt (Gesamtverdünnung der einzelnen Probe 1:1000). Die erhaltene Mischung aus fünf pdN-Bodipy- und fünf dpN-Bodipy-Konjugaten wurde unter verschiedenen Trennbedingungen mittels CE-LIF analysiert. Die beste Trennung wurde mit den Analysenbedingungen für die dNp-Bodipy-Konjugate (siehe Tab. 10) erreicht. Neun Signale wurden basisliniengetrennt detektiert, nur p5mdC-Bodipy und pdC-Bodipy migrierten gemeinsam (s. Abb. 19).



Abb. 19: CE-LIF-Analyse einer Mischung von pdN-Bodipy- und dNp-Bodipy-Konjugaten aus je 10µg CT-DNA

Aus dem abgebildeten Elektropherogramm lässt sich unschwer erkennen, dass die pdN-Bodipy-Konjugate, mit Ausnahme des pdG-Bodipy, unter den gegebenen Bedingungen schneller migrieren als die korrespondierenden dNp-Bodipy-Konjugate. Wie Tabelle 11 zeigt, sind die korrigierten Peakflächen der einzelnen dNp-Bodipy-Konjugate mit denen der entsprechenden pdN-Bodipy-Konjugate vergleichbar groß, was darauf hinweist, dass die beiden Varianten der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode ähnlich effizient sind. Daher kann man annehmen, dass beide Hydrolysemethoden sowie die anschließende Fluoreszenzmarkierung mit **BODIPY-FL-EDA** für die korrespondierenden 2'-Desoxynukleotide mit vergleichbaren Ausbeuten ablaufen, und die Fluoreszenz-Quantenausbeuten der einzelnen 5'-Phosphat-Bodipy-Konjugate in etwa denen der 3'-Phosphat-Bodipy-Konjugate entsprechen.

	Gesamtfläche	dA	dG	Т	dC+5mdC
5'-Phosphate	332134 ± 17021	116029 ± 5727	30639 ± 1860	98090 ± 6696	87376 ± 2112
3'-Phosphate	337057 ± 24977	128939 ± 7093	32991 ± 4222	97692 ± 8221	77436 ± 6450

Tab. 11: Vergleich der korrigierten Peakflächen von pdN-Bodipy- und dNp-Bodipy-Konjugaten einer Mischung aus CT-DNA (s. Abb. 19); Mittelwerte aus 3 Analysenläufen

4.4.1.1 Bestimmung der Nachweisgrenze

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze der 5'-Variante der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode wurde CT-DNA, wie in Tab. 9 beschrieben, mit NP1 verdaut und fluoreszenzmarkiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz so lange mit Wasser verdünnt bis die pdN-Bodipy-Signale gerade noch detektierbar waren (Signal-Rausch Verhältnis, S/N 3:1). Die Nachweisgrenze definiert sich somit als die Probenkonzentration, die einen Peak des Bodipy-Konjugates mit einer Signalintensität ergibt, die dreimal so groß ist wie die Standardabweichung des Grundrauschens der Basislinie. Das Rauschen (Noise) sind statistische Fluktuationen des "Detektor-Outputs", die z. B. durch Schwankungen der Laserintensität oder elektrische Phänomene im Photomultiplier verursacht werden.

Wie Abb. 20 zeigt, konnten nach Verdünnung der Probe mit Wasser von 1:10⁶ gerade noch die Signale von pdA-Bodipy, pdC-Bodipy und pT-Bodipy detektiert werden. pdG-Bodipy war auf Grund des basenspezifischen Quenching-Effektes nicht mehr mit dem geforderten S/N von 3:1 zu erkennen.

Nach Tab. 9/10 beträgt die Konzentration der Nukleotide in der Reaktionslösung nach Verdau und Derivatisierung 342µM. Da CT-DNA zu 42% aus G/C Basenpaaren und 58% A/T Basenpaaren aufgebaut ist, bedeutet das für die einzelnen Nukleotide, bei vollständiger Hydrolyse, eine Konzentration von 99.2µM für pdA und pdT sowie 71.9µM für pdG und pdC. Nach der Verdünnung dieses Reaktionsansatzes (1:10⁶) ergeben sich daher als Konzentrationen für die Nachweisgrenze 99.2pM für pdA und pT und 71.9pM für pdC. Da mit der hydrodynamischen Injektion ca. 5nl (2.5x psi·s) der Lösung auf die Kapillare aufgegeben wurden, entspricht das einer Stoffmenge von ca. 0.36 amol für pdC bzw. 0.5 amol für pT und pdA. Das pdG-Bodipy-Konjugat konnte nur bis zu einer Verdünnung des Reaktionsansatzes von 1:350 000 mit dem geforderten S/N-Verhältnis von 3:1 detektiert werden. Die Nachweisgrenze für pdG liegt somit bei etwa 200pM, was einer injizierten Stoffmenge von 1amol entspricht.



Abb. 20: Bestimmung der Nachweisgrenze von 2'-Desoxyribonukleosid-5'-Phosphat-Bodipy-Konjugaten. CE-LIF-Analyse von CT-DNA nach NP1-Verdau und Fluoreszenzmarkierung, Verdünnung 1:10⁶ mit Wasser; Trennbedingungen s. Tab. 9

Im Vergleich zu der von *Schmitz et al.* [16] publizierten Nachweisgrenze für das 3'-Phosphat dAp von 8.5pM, ergibt sich auf den ersten Blick eine Diskrepanz von fast einer Zehnerpotenz. Der Unterschied ist aber durch das deutlich höhere Injektionsvolumen zu erklären. So haben *Schmitz et al.* etwa 48nl (20x psi·s) einer 8.5pM dAp-Bodipy Lösung aufgegeben, was einer Stoffmenge von 0.41 amol entspricht. Man darf daher davon ausgehen, dass dAp mit gleicher Sensitivität wie pdA detektierbar ist. Eigene Versuche mit einem Injektionsvolumen von 50nl (18psi) ergaben eine Nachweisgrenze von 10pM für die Bodipy-Konjugate von pdA, pT und pdC und belegen die gleiche Empfindlichkeit zusätzlich. Beide Varianten der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode erzielen daher die gleiche Sensitivität mit einer Nachweisgrenze im Bereich von 90pM (bei 1:1000 Verdünnung 90nM) für A, C und T, wenn die Methode zur DNA-Analyse im Routinebetrieb durchgeführt wird.

4.4.1.2 Reproduzierbarkeit und Präzision der 5'-Variante der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode

Zur Untersuchung der Präzision der Messung und der Reproduzierbarkeit der Methode wurden vier Aliquots einer CT-DNA-Stammlösung in Wasser (1mg/ml) parallel unter Standardbedingungen, wie in Tab. 9 angegeben, mit NP1 verdaut und mit dem Fluoreszenzmarker umgesetzt. Für die Bestimmung der Präzision wurde eine der Proben 1:1000 verdünnt und sechsmal in aufeinander folgenden Analysenläufen mit CE-LIF untersucht. Die Peakflächen wurden auf die Migrationszeit normiert und der Anteil der jeweiligen pdN-Bodipy Konjugate an der Gesamtfläche bestimmt. Die Mittelwerte betrugen: pdA-Bodipy 36.58% \pm 0.25; pdC-Bodipy 24.42% \pm 0.08; pT-Bodipy 28.79% \pm 0.11; pdG-Bodipy 8.43% \pm 0.09; p5mdC 1.56% \pm 0.03. Diese Ergebnisse spiegeln, wie bei der Analyse von Oligo-Mod2 beschrieben (Punkt 4.3.5), die individuellen Ausbeuten der Derivatisierung mit dem Fluoreszenzmarker und die spezifischen Fluoreszenz-Quantenausbeuten der einzelnen Bodipy-Konjugate wider und nicht die Zusammensetzung von CT-DNA, die etwa 29% A, 29% T und 21% C (inklusive 5mC), 21% G beträgt.

Wenn angenommen wird, dass Hydrolyse und Derivatisierung für pdC und p5mdC mit etwa gleichen Ausbeuten ablaufen, und sich die Fluoreszenz-Quantenausbeuten beider Bodipy-Konjugate auf Grund des nur geringen strukturellen Unterschiedes nicht unterscheiden, so kann der Methylierungsgrad der CT-DNA nach folgender Formel errechnet werden:

 $\frac{korr. Fläche (p5mdC-Bodipy)}{korr. Fläche (p5mdC-Bodipy) + korr. Fläche (pdC-Bodipy)} \times 100 = Methylierungsgrad (\%)$

Auf diese Weise erhält man mit der 5'-Variante der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode für CT-DNA einen Methylierungsgrad von $6.02\% \pm 0.09$, der sehr gut mit dem von *Wirtz et al.* [114] publizierten Methylierungsgrad von 6.47%, der mit der 3'-Variante bestimmt wurde, übereinstimmt.

Um die Reproduzierbarkeit der Analyse zu kontrollieren, wurden die vier CT-DNA-Aliquote 1:1000 verdünnt, je sechsmal vermessen und wie beschrieben ausgewertet. Die Daten sind in Tab. 12 dargestellt und belegen die gute Reproduzierbarkeit (geringe Standardabweichung) der 5'-Variante der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode und eine hohe Präzision bei der wiederholten Analyse ein und der selben Probe.
	pdA	рТ	pdC	p5mdC	pdG
Mittelwert (%) $(n = 4)$	37.11	28.42	24.35	1.55	8.28
Standardabweichung	0.62	0.56	0.47	0.05	0.35
rel. Standardabw. (%)	1.67	1.98	1.93	3.34	4.18

Tab. 12: Ergebnisse der Reproduzierbarkeitsanalysen

Die relativen Standardabweichungen (Mittelwert/Standardabweichung x 100; Variationskoeffizient) sind naturgemäß für die kleineren Peakflächen etwas höher, liegen aber immer noch weit unter der angestrebten Grenze von 5%. Aus den Mittelwerten der vier parallel analysierten Proben ergibt sich ein Methylierungsgrad der CT-DNA von $6.03\% \pm$ 0.18. Verglichen mit den Resultaten aus den Validierungen der 3'-Variante der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode liegen die erhaltenen Mittelwerte und Standardabweichungen im gleichen Bereich [114].

4.4.1.3 Bestimmung der Linearität des Messbereichs

Für die Untersuchungen zur Linearität des Messbereiches wurde ein Derivatisierungsansatz der CT-DNA aus der Reproduzierbarkeitsstudie ausgewählt und in verschiedenen Verdünnungen (1:500, 1:1000, 1:5000, 1:10000) je siebenmal analysiert. Die Messergebnisse sind wiederum als prozentualer Anteil der einzelnen korrigierten Peakflächen der pdN-Bodipy-Konjugate an der Gesamtfläche ausgedrückt (Tab. 13) und zeigen nur geringe Abweichungen.

Tab. 13: Ergebnisse der Linearitätsversuche

Verdünnung	pdA	рТ	pdC	p5mdC	pdG
1:500	34.39 ± 0.40	29.96 ± 0.23	26.03 ± 0.33	1.75 ± 0.03	7.56 ± 0.21
1:1000	34.19 ± 0.11	29.82 ± 0.05	26.16 ± 0.12	1.78 ± 0.05	7.75 ± 0.04
1:5000	34.54 ± 0.41	29.93 ± 0.52	26.02 ± 0.23	1.71 ± 0.12	7.48 ± 0.26
1:10000	34.85 ± 0.27	29.73 ± 0.27	26.33 ± 0.23	1.66 ± 0.08	7.29 ± 0.33
Mittelwert	34.49	29.86	26.14	1.72	7.52
Stabw.	0.28	0.10	0.15	0.05	0.19
rel. Stabw.	0.80	0.34	0.56	3.15	2.52

Alle Angaben in Prozent, für jede Verdünnung n = 7

Die erhaltenen fast identischen Peakflächen zeigen eindeutig, dass die Methode im getesteten Messbereich linear arbeitet und 20fache Konzentrationsunterschiede korrekt wiedergibt.

4.4.1.4 Bestimmung der Korrekturfaktoren

Wie unter Punkt 4.4.1.2 beschrieben, geben die durch LIF-Detektion gemessenen korrigierten Peakflächen der pdN-Bodipy-Konjugate das Verhältnis der Nukleotide in der DNA-Probe nicht korrekt wieder. Die Hauptursache liegt in den schon mehrfach erwähnten unterschiedlichen Ausbeuten der Kopplungsreaktion der 2'-Desoxynukleotide mit BODIPY-FL-EDA und den unterschiedlichen Fluoreszenz-Quantenausbeuten der Nukleotid-Bodipy-Konjugate. Insbesondere die basenabhängige Fluoreszenzlöschung des Guanosins erschwert die unmittelbare Quantifizierung anhand der Signalstärke der LIF-Detektion. Dieser methodische Nachteil kann durch die Bestimmung von Korrekturfaktoren ausgeglichen werden [113, 114]. Ansatzweise wurde die Vorgehensweise zur Bestimmung von Korrekturfaktoren bereits bei der Untersuchung des Oligonukleotids Mod2 beschrieben. Es hat sich aber herausgestellt, dass Oligonukleotide zur Ermittlung der Korrekturfaktoren für die Analyse genomischer DNA wenig geeignet sind. Besser geeignet sind hierfür komplexere, in ihrer Sequenz genau bekannte, doppelsträngige DNA-Moleküle. Verwendet wurde daher das Genom des Bakteriophagen Lambda (λ -DNA), das komplett sequenziert, also in seiner Zusammensetzung genau bekannt ist und keine methylierten Basen enthält (kein 5mC und kein N⁶mA). Es besteht aus 48502 Basenpaaren mit je 24320 A/T-Paaren und 24182 G/C-Paaren. Die kommerziell erhältliche λ -DNA wurde, um Salze zu entfernen, zunächst gefällt, mit Ethanol gewaschen und wieder in Wasser gelöst. Nach Gehaltsbestimmung durch UV-Spektroskopie bei 260nm wurden zwei Aliquots von je 10µg nach den Bedingungen aus Tabelle 9 prozessiert. Jede der beiden Proben wurde anschließend zehn Mal mittels Kapillarelektrophorese und Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion analysiert und wie beschrieben ausgewertet (s. S. 45).

In Abbildung 21 ist einer der Analysenläufe beispielhaft dargestellt. Verglichen mit den bisher gezeigten Analysen von CT-DNA wird auf den ersten Blick deutlich, dass das Signal für p5mdC-Bodipy fehlt, das λ -Genom also keine Cytosin-Methylierung aufweist. Weiterhin ist nun pdC-Bodipy das zweithöchste Signal nach pdA-Bodipy und größer als pT-Bodipy.



Abb. 21: CE-LIF-Analyse der DNA des Bakteriophagen Lambda nach Nuklease P1 Verdau. Trennung mit P/ACE MDQ; Trennbedingungen: Natriumphosphat-Puffer 16mM pH 9.0, 20% Methanol (v/v), 75mM SDS, 20kV

Tabelle 14 fasst die Ergebnisse der beiden Versuche zusammen. Die tatsächliche Zusammensetzung des λ -Genoms wurde mit den gemessenen Werten verglichen und daraus der Korrekturfaktor berechnet. Die letzte Spalte gibt den Mittelwert (MW) des so bestimmten Korrekturfaktors an.

Tab. 14: Bestimmung der Korrekturfakto	ren für die 5'-Variante der Fluor	eszenz-Postlabeling-Methode
--	-----------------------------------	-----------------------------

unmethyliert	Anzahl der Basen	Aliquot 1 (n=10)	Aliquot 2 (n=10)	Korrekturfaktor
		korr. Peakfläche (%)	korr. Peakfläche (%)	(MW)
Lambda Genom				
dA	24320 (25.07%)	33.78 ± 0.93	34.40 ± 0.54	0.735 ± 0.011
Т	24320 (25.07%)	25.92 ± 0.74	25.76 ± 0.23	0.970 ± 0.009
dC	24182 (24.93%)	30.69 ± 0.94	29.98 ± 0.48	0.822 ± 0.013
dG	24182 (24.93%)	9.61 ± 0.40	9.86 ± 0.29	2.561 ± 0.076

Da λ -DNA nicht methyliert ist, kann auf diese Weise nicht der Korrekturfaktor für p5mdC bestimmt werden. Allerdings wurde der Korrekturfaktor für das 3'-Phosphat des 5-

Methylcytosins (5mdCp), nach vollständiger enzymatischer Methylierung von λ -DNA und anschließender Hydrolyse mit MN/SPD schon von *Wirtz et al.* [114] und *Stach et al.* [113] ermittelt. Er beträgt 0.93 ± 0.09 und unterscheidet sich nur unwesentlich von dCp-Bodipy 0.95 ± 0.08 [114]. Unter der Annahme, dass sich pdNs ähnlich verhalten wie die dNps, wurde für die im folgenden beschriebenen quantitativen Auswertungen der CT-DNA für pdC und p5mdC der selbe Korrekturfaktor verwendet. Benutzt man die oben errechneten Korrekturfaktoren zur Berechnung der Zusammensetzung von CT-DNA mit den Daten aus den Reproduzierbarkeits-Versuchen, so erhält man eine sehr gute Übereinstimmung mit den wirklichen Verhältnissen (s. Tab. 15).

 Tab.
 15: Anwendung der Korrekturfaktoren auf CT-DNA (Mittelwert aus vier unabhängig hydrolysierten und derivatisierten CT-DNA Proben, die jeweils fünfmal analysiert wurden)

Reale Probe	Anteil der	Messung (%)	Korrekturfaktor	Berechnet
	Base (%)			(%)
CT-DNA	ca.			
dA	29	37.11 ± 0.62	0.735	28.23 ± 0.52
Т	29	28.42 ± 0.56	0.970	27.36 ± 0.54
dC	20	24.35 ± 0.47	0.822	20.30 ± 0.50
dG	21	8.28 ± 0.35	2.561	21.97 ± 0.88
5mdC	1	1.55 ± 0.05	0.822	1.29 ± 0.04

In der letzten Spalte ist die mit dem Korrekturfaktur errechnete Zusammensetzung der CT-DNA angegeben.

Im Gegensatz dazu ergibt sich bei Anwendung der Korrekturfaktoren, die mit dem 2'-Desoxyoligonukleotid (Mod2) bestimmt wurden, eine Zusammensetzung der CT-DNA von 30.80% dA, 26.43% T, 18.75% dC, 1.31% 5mdC und 24.18% dG. Damit wird noch einmal deutlich, dass für die Ermittlung von Korrekturfaktoren zur Analyse genomischer DNA möglichst langkettige, doppelsträngige DNA-Moleküle verwendet werden müssen.

Zum Vergleich wurde ein weiteres Aliquot λ -DNA (10µg) mit MN/SPD zu dNps verdaut und fluoreszenzderivatisiert (Bedingungen s. Tabelle 10). Nach 1:1000 Verdünnung und CE-LIF Analyse wurde das erwartete Elektropherogramm (Abb. 22) aus den vier normalen dNp-Bodipy-Konjugaten ohne 5mdCp-Bodipy erhalten. Auch aus diesem Experiment wurden die Korrekturfaktoren wie oben beschrieben berechnet:

unmethyliert	Anzahl der Basen	korr. Peakfläche (%)	Korrekturfaktor	F [114]
Lambda Genom				
dA	24320 (25.07%)	35.88 ± 0.30	0.699 ± 0.006	0.706
Т	24320 (25.70%)	25.80 ± 0.58	0.972 ± 0.021	0.957
dC	24182 (24.93%)	26.41 ± 0.66	0.944 ± 0.024	0.950
dG	24182 (24.93%)	11.91 ± 0.23	2.093 ± 0.041	2.122

Tab. 16: Bestimmung der Korrekturfaktoren für die 3'-Variante der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode (n = 7)

In der letzten Spalte sind zum Vergleich die von Wirtz et al. [114] mit der selben Methode ermittelten Korrekturfaktoren angegeben



Abb. 22: CE-LIF-Analyse von λ-DNA nach MN/SPD Verdau und Derivatisierung. Trennung mit P/ACE-MDQ; Trennbedingungen: 18mM Natriumphosphat-Puffer, pH 9.0, 90mM SDS, 10% Methanol (v/v), 20kV

Hier zeigt sich eine hervorragende Übereinstimmung, obwohl die Analysen völlig unabhängig voneinander in verschiedenen Laboratorien durchgeführt wurden. Beim Vergleich der Korrekturfaktoren von pdNs und dNps erhält man die größten Unterschiede für Cytosin und Guanin.

4.4.2 Nachweis von natürlichen DNA-Schäden

Neben den Veränderungen durch oxidativen Stress (s. Kap. 2.3.2.1) oder durch genotoxische Substanzen unterliegt DNA auch ständig Veränderungen, die in der chemischen Stabilität der DNA-Basen begründet sind. Zum einen sind dies spontane Deaminierungen von Cytosin zu Uracil und Adenin zu Hypoxanthin (als Nukleosid Inosin), zum anderen der Verlust der gesamten Base durch Spaltung der N-glykosidischen Bindung zur 2'-Desoxyribose (apurinic site bzw. AP-Stelle) (s. Theorie 3.3.2.4). Letzteres geschieht auch häufig nach Reaktion von alkylierenden Substanzen am N7 des Guanins. Ein Vorteil der neu entwickelten und validierten Fluoreszenz-Postlabeling-Methode mit pdNs ist, dass die DNA-Schäden 2'-Desoxyuridin und 2'-Desoxyinosin sowie 2'-Desoxyribose als 5'-Phosphate kommerziell erhältlich sind und daher nicht erst aufwendig synthetisiert werden müssen, wie das für die 3'-Phosphate der Fall ist. Die folgenden Abbildungen zeigen die Bildung sowie die Häufigkeit dieser DNA-Schäden (Abb. 23, 24).



Abb. 23: Spontane Deaminierung von Cytosin zu Uracil



Abb. 24: Spontane Deaminierung von Adenin zu Hypoxanthin

Eine Sonderstellung unter diesen Veränderungen nimmt die AP-Stelle ein, da das entstehende 2'-Desoxyribose-5'-Phosphat (pdR) nach der Hydrolyse nicht als eine stabile Verbindung vorliegt, sondern verschiedene, offenkettige oder ringförmige, isomere Strukturen einnehmen kann (Abb. 25).



Abb. 25: Isomere Strukturen der AP-Stelle nach [124], dargestellt am Beispiel des 2'-Desoxyribose-3'-Phosphates

Zur Darstellung eines Standards für die AP-Stelle wurde 2'-Desoxyribose-5'-Phosphat (10µg) nach den üblichen Bedingungen (s. Tab. 9) mit BODIPY-FL-EDA derivatisiert. Die anschließende CE-LIF Analyse ergab vier Signale, von denen das größte (4) eine um den Faktor zehn geringere Intensität zeigte als das der normalen Nukleotide, wenn diese unter diesen Bedingungen derivatisiert und analysiert werden. Daher wurde die Reaktionslösung nicht wie sonst üblich 1:1000 sondern nur 1:100 vor Aufgabe auf die Kapillare verdünnt (Abb. 26).



Abb. 26: CE-LIF-Analyse von 10µg fluoreszenzmarkiertem 2'-Desoxyribose-5'-Phosphat, Verdünnung 1:100; Trennung auf P/ACE MDQ, 16mM Natruimphosphat pH 9.0; 20% Methanol (v/v), 75mM SDS, 20kV

Aus diesem Ergebnis ist jedoch nicht abzuleiten, dass hier die vier Signale den vier Isomeren aus Abb. 25 entsprechen. Zum einen ist selbst das Hauptsignal (Nr. 4) bei 21.5min viel kleiner als erwartet, so dass ein Zerfall des Ribose-Phosphates während der Derivatisierung zu unbekannten Produkten angenommen werden muss. Zum anderen sind auch Reaktionen zwischen dem Fluoreszenzmarker und der Aldehydfunktion der offenkettigen Ribose denkbar, was zu mehrfach markierten Molekülen führen kann. Diese sind eventuell nicht zu detektieren, da sich die Bodipy-Moleküle gegenseitig auslöschen können. Bisher gibt es keinen 2'-Desoxyribose-3'-Phosphat-Standard (dRp) für vergleichende Untersuchungen. Auch *Wirtz* [124] erhielt mehrere Signale bei der CE-LIF Analyse nachdem sie dGp durch saure Hydrolyse in die Base und den Zucker-Phosphat Rest gespalten und die Reaktionsprodukte mit BODIPY-FL-EDA derivatisiert hatte. Sollte sich die Ribose nach der DNA-Hydrolyse tatsächlich derart schnell zersetzen, müsste die Analysenzeit von AP-Stellen deutlich verkürzt werden, um höhere Ausbeuten an fluoreszenzmarkiertem Produkt zu erhalten. Ansonsten ist die Nachweisgrenze (geschätzt 1µM) für *in vivo* Anwendungen deutlich zu gering. Voraussetzung dafür ist natürlich, dass diese Produkte lange genug stabil sind, um mit CE-LIF analysiert zu werden. Zusätzlich müssten zuvor die bei der Reaktion von dR-5'-Phosphat mit BODIPY-FL-EDA entstehenden Produkte charakterisiert und ihre Fluoreszenz-Quantenausbeuten bestimmt werden.

Um den Einfluss der Reaktionsprodukte von pdR mit BODIPY-FL-EDA auf das Signalmuster einer DNA-Analyse zu untersuchen, wurde der Derivatisierungsansatz 1:100 verdünnt und zu einem fluoreszenzmarkierten NP1-Verdau von CT-DNA (Verdünnung 1:1000) zugegeben. Abbildung 27 macht deutlich, dass unter den verwendeten Trennbedingungen nur das erste, kleinere Signal (Nr. 1) von den normalen pdN-Bodipy-Konjugaten getrennt wird, das Hauptsignal (Nr. 4) migriert ähnlich wie das pdG-Bodipy und wurde daher bisher möglicherweise übersehen. Für die Anwendung der Methode zur Bestimmung von apurinischen Stellen in DNA muss also auch eine verbesserte CE-Trennung entwickelt werden.



Abb. 27: CE-LIF-Analyse einer NP1 verdauten und fluoreszenzmarkierten CT-DNA nach Aufstocken mit dem Reaktionsansatz von 2'-Desoxyribose-5'-Phosphat mit BODIPY-FL-EDA, Trennbedingungen s. Abb. 26

4.4.2.1 Analyse von DNA-Deaminierungsprodukten

Je 10µg (30nmol) 2'-Desoxyuridin-5'-Phosphat (pdU) und 2'-Desoxyinosin-5'-Phosphat (pdI) wurden unter Verwendung der Standardbedingungen aus Tabelle 9 mit BODIPY-FL-EDA derivatisiert und kapillarelektrophoretisch analysiert. In beiden Fällen wurde ein Signal erhalten, welches in Analogie zu den vorangegangenen Untersuchungen mit den normalen Nukleotiden als pdI-Bodipy (21.2 min; auf pdA-Bodipy normierte Migrationszeit 1.081) und pdU-Bodipy (21.7min; auf pdA-Bodipy normierte Migrationszeit 1.062) identifiziert wurde. Spektroskopische Untersuchungen zur eindeutigen Charakterisierung der Reaktionsprodukte konnten auf Grund der geringen Mengen nicht durchgeführt werden.

Mischt man die erhaltenen Reaktionsansätze mit den Standards der normalen pdN-Bodipy-Konjugate oder mit NP1-verdauter und mit BODIPY-FL-EDA fluoreszenzmarkierter CT-DNA, so zeigt sich bei der CE-LIF-Analyse, dass mit dem auf die Trennung von p5mdC-Bodipy optimierten Puffersystem (16mM Natriumphosphat-Puffer, pH 9.0, 75mM SDS, 20% Methanol (v/v), 20kV) weder die Trennung von pdI-Bodipy noch von pdU-Bodipy gelingt: pdU-Bodipy eluiert mit pT-Bodipy und pdI-Bodipy überlagert das p5mdC-Bodipy (nicht gezeigt).

Auch der Einsatz der in Tab. 41 (s. S. 161) aufgeführten Puffersysteme führte nicht zur Trennung aller sieben pdN-Bodipy Konjugate. Zur Verbesserung der kapillarelektrophoretischen Trennung wurde daher ein von Kaneta et al. [125] beschriebener Weg eingeschlagen. Durch Beimischung verschiedener Kohlenhydrate, v. a. Glukose, zum Trennpuffer wurde die kapillarelektrophoretische Trennung verschiedener Nukleosid-Phosphate verbessert. Bisher ist das genaue Wirkprinzip dieser Strategie noch weitgehend unverstanden, Erklärungsversuche machen vor allem die Erhöhung der Viskosität des Trennmediums für die Verbesserung der Trennleistung verantwortlich. Demnach wird das mizellare Fenster durch eine Reduktion der Wanderungsgeschwindigkeit der Mizellen (Abnahme der elektrophoretischen Mobilität) vergrößert und die Wechselwirkung der Analyten mit der Mizelle intensiviert. Daneben scheinen auch Wechselwirkungen zwischen der hydrophilen Zuckerstruktur der Glukose und den Zuckerstrukturen der Ribose stattzufinden. Alles zusammen führt zu einer besseren Auflösung, wenn auch auf Kosten einer längeren Analysendauer. Durch Zusatz von Glukose wurde ein Trennsystem erhalten mit dem die Trennung aller sieben pdN-Bodipy-Konjugate ermöglicht wurde (18mM Natriumphosphat, pH 9.0, 75mM SDS, 8% Methanol (v/v), 0.5M Glukose, 20kV (Abb. 28)).



Abb. 28: Trennung von sieben pdN-Bodipy Konjugaten unter den optimierten Trennbedingungen nach Glukose-Zugabe. Für die Analyse wurde ein NP1-Verdau von 10µg CT-DNA nach den Standardbedingungen fluoreszenzmarkiert und 1:1000 mit Wasser verdünnt. Die pdU und pdI-Bodipy-Konjugate sind zum besseren Nachweis jeweils nur 1:500 verdünnt in der Mischung enthalten.

Um zu überprüfen, ob die durch Deaminierung entstehende Modifikation pdI auch nach Hydrolyse von DNA mit NP1 analysiert werden kann, wurde poly(dI·dC)·(dI·dC) analysiert. Poly(dI·dC)·(dI·dC) ist ein doppelsträngiges DNA-Analogon, das abwechselnd aus 2'-Desoxycytidin und 2'-Desoxyinosin besteht, wobei immer dI mit dC paart:

5'-dI-dC-dI-dC-usw.-3'

3'-dC-dI-dC-dI-usw.-5'

Die CE-LIF Analyse des fluoreszenzmarkierten Verdaus von poly(dI·dC)·(dI·dC) sollte also zwei Signale etwa gleicher Stärke ergeben. Es zeigte sich jedoch, dass die korrigierten Flächen der beiden erhaltenen Signale unterschiedlich groß waren (Abb. 29).



Abb. 29: CE-LIF-Analyse von 10µg Nuklease P1 verdautem poly(dI·dC)·(dI·dC) nach Fluoreszenzmarkierung mit BODIPY-FL-EDA. Trennbedingungen: 16mM Natriumphosphat, 75mM SDS, 20% Methanol (v/v), 20kV

Das Verhältnis der korrigierten Flächen von pdI-Bodipy zu pdC-Bodipy beträgt ca. 3:7. Ursachen hierfür könnten sein, dass pdI schlechter mit dem Fluoreszenzmarker reagiert, oder dass pdI-Bodipy eine schlechtere Fluoreszenz-Quantenausbeute besitzt als pdC-Bodipy oder eine Kombination aus beidem. Wurden je 10µg pdI und pdC getrennt mit BODIPY-FL-EDA markiert, zu gleichen Teilen gemischt und mit CE-LIF analysiert, ergaben sich identische Peakverhältnisse wie nach dem Verdau von poly(dI·dC)·(dI·dC). Auch damit lässt sich aber nicht endgültig klären, ob eine schlechtere Reaktivität von pdI die Ursache für die niedrigere Signalintensität ist, oder doch ein Quenching-Effekt ähnlich dem von pdG vorliegt.

4.4.2.2 Nachweis von Uracil in Bisulfit-behandelter CT-DNA

Nachdem die Bedingungen zur Analyse von 2'-Desoxyuridin erarbeitet waren (4.4.2.1), wurden diese auf die Bestimmung des Uracilgehaltes in DNA angewendet. Da der Uracilgehalt zellulärer DNA nur 7.5 in 1 Million normaler Nukleotide beträgt und damit bisher mit unserer Fluoreszenz-Postlabeling-Methode nicht nachweisbar ist, wurde eine DNA mit deutlich höherem Uracilgehalt zur Erprobung der Methode eingesetzt. Hier bietet es sich an von der lange bekannten chemischen Umwandlung von Cytosin in Uracil in DNA Gebrauch zu machen. Durch ihren Einsatz in der Epigenetik ist diese Methode vielfach standardisiert und validiert: die Bisulfit-Reaktion.



Abb. 30: Reaktion von Cytidin mit Bisulfit zu Uridin

Wie in Abb. 30 dargestellt, wird bei der Reaktion von DNA mit Natriumbisulfit im Alkalischen Cytosin zu Uracil umgewandelt. Alle anderen Basen der DNA reagieren unter diesen Bedingungen nicht und bleiben unverändert. Bei epigenetischen Fragestellungen macht man sich zunutze, dass 5mdC ebenfalls nicht verändert wird und kann so nach Behandlung von DNA mit Bisulfit die genaue Position der methylierten Cytosine in der DNA bestimmen, z. B. durch die Bisulfit–Sequenzierung [126] oder methylation specific PCR (MSP) [127, 128]. Aliquote von je 2µg CT-DNA wurden wie von *Frommer* und *Herman* beschrieben [127, 128] mit Natriumbisulfit umgesetzt, isoliert, gereinigt, mit NP1 hydrolysiert und mit BODIPY-FL-EDA derivatisiert (Bedingungen wie in Tab. 9).

In Abb. 31 ist das Elektropherogramm einer solchen Analyse dargestellt. Wie erwartet ist zwischen pdA-Bodipy und pT-Bodipy ein Signal zu erkennen, welches durch Aufstockung mit der Standardverbindung eindeutig als pdU-Bodipy identifiziert wurde. Daneben treten weitere drei Signale auf (? in Abb. 31), die bisher nicht identifiziert werden konnten. Möglicherweise handelt es sich um DNA-Abbauprodukte, die bei der Behandlung mit Bisulfit entstehen.



Abb. 31: CE-LIF-Analyse von Bisulfit-behandelter CT-DNA (2µg) nach Verdau mit NP1 und Fluoreszenzmarkierung mit BODIPY-FL-EDA. Trennbedingungen: 18mM Natriumphosphat, 75mM SDS, 8% Methanol (v/v), 0.5 M Glukose, 20kV

Die quantitative Auswertung ist zusammen mit den Daten für unbehandelte CT-DNA in Tabelle 17 dargestellt.

Tab.17:VergleichderPeakflächenverhältnissezwischenBisulfit-behandelterCT-DNAundunbehandelterCT-DNA (Mittelwerte aus zwei unabhängigenDerivatisierungen, je drei Analysenläufe)

	Bisulfit-behandelte CT-DNA	Unbehandelte CT- DNA	Korrekturfaktor	Bisulfit-behandelte CT-DNA korrigierte
	Peakfläche (%)	Peakfläche (%)		Peakfläche (%)
pdA	34.91 ± 0.18	37.11	0.735 ± 0.011	25.65%
pdU	17.88 ± 0.15	0.00	n. b.	n. b.
pT	32.49 ± 0.15	28.42	0.970 ± 0.009	31.51%
pdC	2.29 ± 0.09	24.35	0.822 ± 0.013	1.88%
pdG	10.85 ± 0.31	8.28	2.561 ± 0.076	27.78%
p5mdC	1.59 ± 0.08	1.55	0.822 ± 0.013	1.31%

n. b. = nicht bestimmt

Da 10µg DNA im Mittel 550 000 Flächeneinheiten für die Gesamtfläche aller Nukleotid-Bodipy-Konjugate ergeben, wurden für die verwendeten 2µg CT-DNA etwa 110 000 Einheiten erwartet. Detektiert wurden nur ca. 30 000 Einheiten, was etwa einem Viertel der erwarteten Fluoreszenzeinheiten und damit ca. 0.5µg DNA entspricht. Mögliche Erklärungen hierfür sind Verluste bei der Aufreinigung oder Zerfall in nicht markierbare Bestandteile. Derartige Abbauvorgänge während der Bisulfit-Behandlung von DNA wurden bereits beobachtet und quantifiziert. Diese Zerstörung der DNA durch die Behandlung könnte eine Erklärung für die beobachtete veränderte DNA-Zusammensetzung (Tab. 17) sein, wenn nicht alle Basen in gleichem Maße davon betroffen sind. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Korrekturfaktoren von der eingesetzten DNA Menge abhängig sind und sich daher für 2µg DNA (bzw. 0.5µg) und 10µg unterscheiden, wie es von *Wirtz et al.* [114] für die 3'-Variante der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode bereits beschrieben wurde (Unterschiede zwischen 10µg und 100ng DNA).

Wie in Tab. 17 angegeben und im Elektropherogramm klar ersichtlich ist das Signal des pdC-Bodipys (2.28%) noch vorhanden, was eine unvollständige chemische Konversion zu Uridin von 90% bedeutet. Dies steht im Gegensatz zum Bericht von *Grunau et al.* [129], der unter ähnlichen Bedingungen eine vollständige Deaminierung von Cytosin fand.

Der Nachweis von Uracil in DNA gelingt also mit den entwickelten Bedingungen der 5'-Variante der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode ohne Probleme. Nach den bisherigen Erfahrungen ist ein Uracilgehalt von 0.2% und ein Cytosingehalt von 0.1% mit der Methode nachweisbar und eignet sich somit zur Überprüfung der Vollständigkeit der Bisulfit-Reaktion vor einer Sequenzierung.

4.4.2.3 Nachweis von Deaminierungsprodukten in Nitrit-behandelter CT-DNA

Eine weitere Möglichkeit DNA-Basen *in vitro* in ihre Deaminierungsprodukte zu überführen, ist die Behandlung von DNA mit salpetriger Säure (HNO₂). Die mutagene Wirkung von HNO₂ wurde schon 1960 gezeigt und wenig später konnten die Haupt-Reaktionsprodukte identifiziert werden [130]. Dies sind 2'-Desoxyuridin, 2'-Desoxyinosin (Abb. 23 u. 24) und 2'-Desoxyxanthosin (Abb. 32), die Deaminierungsprodukte von 2'-Desoxycytosin, 2'-Desoxyadenosin bzw. 2'-Desoxyguanosin.



Abb. 32: Deaminierung von Guanosin zu Xanthosin unter dem Einfluss von HNO2

Daneben wurden auch verschiedene Nitrierungsprodukte (v. a. 2-Nitroinosin [131]) und in jüngster Zeit ein weiteres Deaminierungsprodukt, Oxanosin [132] s. Abb. 33, nachgewiesen. Oxanosin entsteht wie Xanthosin unter dem Einfluss von HNO₂ (bzw. N₂O₃) aus Guanosin. Im ersten Schritt erfolgt der Angriff einer reaktiven Spezies (vermutlich N_2O_3) an der N²eines N²-Nitroso-Intermediates. Position des Guanosins unter Bildung Dieses Zwischenprodukt wandelt sich in ein Diazotat-Ion um, welches die stabilste Zwischenstufe der Reaktion darstellt. Im zweiten Schritt wandelt sich das Diazotat-Ion in ein Diazonium-Ion um, welches unter gleichzeitiger Stickstoffabspaltung und Ringöffnung zwischen C6 und N1 ein offenes Kation mit Carbodiimid-Struktur bildet. Durch Anlagerung von Wasser an der C6-Position entsteht nach Ringschluss Oxanosin. Lagert sich Wasser hingegen an der C2-Position (am Carbodiimid) an, so entsteht nach Ringschluss Xanthosin [133].



Abb. 33: Reaktion von 2'-Desoxyguanosin-5'-Phosphat zu 2'-Desoxyoxanosin-5'-Phosphat

DNA, die mit salpetriger Säure behandelt wurde, sollte also eine ganze Reihe modifizierter Nukleotide enthalten, die mit der 5'-Variante der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode analysiert und identifiziert werden können. Daher wurden 100µg CT-DNA nach *Suzuki et al.* [132] in 3M Natriumacetat-Puffer (pH 3.7) gelöst und mit Natriumnitrit (100mM) für 2h bei

37°C inkubiert. Die DNA wurde anschließend über eine Sephadex-Säule von den Salzen befreit und ein Aliquot (10μg) nach den Standardbedingungen (Tab. 9) zu pdNs verdaut, mit BODIPY-FL-EDA derivatisiert und analysiert. Uridin und Inosin konnten durch Aufstocken mit Standardverbindungen in der HNO₂-behandelten DNA identifiziert werden (Abb. 34).



Abb. 34: CE-LIF-Analyse von HNO₂-behandelter CT-DNA nach Verdau mit NP1 und Derivatisierung mit BODIPY-FL-EDA. Trennbedingungen wie in Tab. 9 angegeben.

Ebenfalls zu erkennen ist, dass pdG-Bodipy im Vergleich zu unbehandelter CT-DNA ein deutlich kleineres Signal liefert. Die Signalstärke entspricht nur noch 1.7% der gesamten Peakflächen, in unbehandelter CT-DNA ist es dagegen 8.3% (Tab. 13). Auch für pdA-Bodipy und pdC-Bodipy ist eine leichte Abnahme der Signalintensität gegenüber unbehandelter CT-DNA zu beobachten. Darüber hinaus enthält das Elektropherogramm einen neuen Peak bei ca. 15.5min, der dem 2'-Desoxyxanthosin-5'-Phosphat-Bodipy (pdX-Bodipy) entsprechen könnte. Die Zuordnung der aus 2'-Desoxyguanosin entstehenden Produkte ist jedoch schwierig, da entsprechende Standardverbindungen fehlen. Vergleicht man jedoch das Migrationsverhalten der pdN-Bodipy-Konjugate mit dem der korrespondierenden Ribonukleosid-5'-Phosphat-Konjugate (siehe Kapitel 4.5.1), so ist es möglich, dass es sich bei

dem ersten Signal (ca. 15.5min) um pdX-Bodipy handelt, da Xanthosin-5'-Phosphat (prX) als Standardverbindung zur Verfügung steht, und das entsprechende Bodipy-Konjugat das schnellste bisher beobachtete Wanderungsverhalten zeigte. 2'-Desoxyoxanosin, das in etwa gleicher Menge wie 2'-Desoxyxanthosin bei der Umsetzung mit HNO₂ aus 2'-Desoxyguanosin gebildet wird [132], kann unter den verwendeten CE-Trennbedingungen (bei pH 9.0) nicht detektiert werden. Offenbar steht es in einem pH-abhängigen Gleichgewicht und migriert daher über einen sehr breiten Bereich hinweg [134].

Aus den Ergebnissen lässt sich ableiten, dass mit der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode unter Verwendung der optimierten Trennbedingungen (18mM Natriumphosphat-Puffer, pH 9.0, 75mM SDS, 8% Methanol (v/v), 0.5M Glukose, 20kV) eine Analyse von entsprechend geschädigter DNA möglich ist. Da diese DNA-Modifikationen vor allem bei chronisch entzündlichen Erkrankungen entstehen, bietet sich der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode hier ein interessantes und klinisch relevantes Einsatzfeld zur Untersuchung des Zusammenspiels zwischen weit verbreiteten (Zivilisations-) Krankheiten wie z. B. Atherosklerose und der Entstehung von Krebserkrankungen.

Da die Bodipy-Konjugate der untersuchten Deaminierungsprodukte (pdX, pdU, pdI) offenbar einen ähnliche Fluoreszenz-Quenching-Effekt aufweisen wie pdG-Bodipy, liegt ihre Nachweisgrenze vermutlich ebenfalls im Bereich von 200pM. Das bedeutet bei einer hydrolysierten DNA-Probe von $10\mu g$ (30nmol, $c_{Nukleotide} = 340\mu M$) und einer 100fachen Verdünnung eine theoretische Nachweisgrenze von 20 000pM (= 20nM). Das entspricht etwa sechs modifizierten Nukleotiden pro 100 000 normalen Nukleotiden.

4.4.3 Nachweis von veränderten DNA-Basen in 2'-Desoxy-Oligonukleotiden

Für weitere Untersuchungen zum Nachweis von modifizierten 2'-Desoxynukleotiden in DNA wurden verschiedene 2'-Desoxy-Oligonukleotide mit jeweils einer der folgenden Veränderungen eingesetzt. Abbildung 35 zeigt die vier modifizierten 2'-Desoxynukleosid-5'-Phosphate, die in den 2'-Desoxy-Oligonukleotiden enthalten waren:



Abb. 35: Strukturformeln der modifizierten 2'-Desoxynukleosid-5'-Phosphate

4.4.3.1. N⁶-Methyl-2'-Desoxyadenosin

Wie im theoretischen Teil bereits beschrieben, handelt es sich bei N⁶mdA um eine der drei natürlichen Methyl-Modifikationen, die man bisher in der DNA von einigen niederen Organismen nachgewiesen hat. Im Gegensatz zum 5mdC ist über die biologische Bedeutung noch sehr wenig bekannt, fest steht nur, dass die Präsenz von N⁶mdA in der Erkennungssequenz einen Schutz vor bestimmten Restriktionsenzymen bietet [135]. Für die Analysen von N⁶mdA wurde ein Oligonukleotid folgender Sequenz verwendet (A* = N⁶mdA): 5' - GAG TCT TCC A*GT GTG ACA CAT – 3' (Oligo IBA 3).

Oligo IBA 3 wurde nach den Standardbedingungen (Tab. 9) mit NP1 zu pdNs verdaut, mit BODIPY-FL-EDA fluoreszenzmarkiert und für die CE-LIF-Analyse 1:1000 mit Wasser verdünnt. Mit den etablierten CE-LIF Trennbedingungen (16mM Natriumphosphat-Puffer, pH 9.0, 75mM SDS, 20% Methanol (v/v), 20kV) wurden nur vier Signale mit Migrationszeiten, die den normalen pdN-Bodipy-Konjugaten entsprachen, detektiert. Allerdings war die korrigierte Peakfläche des pT-Bodipy-Signals entschieden zu groß.

Abbildung 36 zeigt, dass Änderungen der Elektrolyt-Pufferzusammensetzung (Salzkonzentration, Methanol- und SDS-Anteil) zur Auftrennung des pT-Bodipy-Signals führten, wobei ein fünftes Signal zwischen pT-Bodipy und pdC-Bodipy erschien. Dieses Signal, mit einer Migrationszeit von ca. 17.2min, läßt sich pN⁶mdA-Bodipy zuordnen (Trennbedingungen 17mM Natriumphosphat, pH 9.0, 75mM SDS, 15% Methanol (v/v) 20kV). Die Lage des Peaks entspricht den Erwartungen, da pN⁶mdA-Bodipy durch die Methylgruppe etwas lipophiler als pdA-Bodipy ist, sich daher länger in der SDS-Mizelle aufhalten sollte und deshalb langsamer migriert als pdA-Bodipy.



Abb. 36: CE-LIF-Analyse von Oligo IBA 3, Trennbedingungen s. Text

Die Position des Signals ist aber in der Hinsicht ungünstig, da unter diesen Bedingungen an der gleichen Stelle sowohl 8-oxo-pdG-Bodipy (s. Punkt 4.4.3.3), als auch p5mdC-Bodipy erscheint. Das bedeutet, dass mit diesen Trennbedingungen nicht alle bisher nachweisbaren DNA-Modifikationen, die in einer realen DNA Probe vorhanden sein können, gleichzeitig detektiert und quantifiziert werden können.

Die quantitative Auswertung (Mittelwerte aus drei Analysenläufen) ist in Tabelle 18 dargestellt. Zur Ermittlung des Nukleotidverhältnisses wurden die errechneten korrigierten Peakflächen durch die korrigierte Fläche des pN⁶-mdA-Bodipys dividiert.

	pdA	рТ	pdC	pN ⁶ mdA	pdG
Fläche [Einheiten]	4053119 ± 68316	4140363 ± 78341	4766818 ± 113697	$\begin{array}{r} 848032 \pm \\ 6428 \end{array}$	1125814 ± 42453
Migrationszeit [min]	16.27	16.84	17.74	17.24	18.37
Korrigierte Peakfläche	$\begin{array}{r} 249162 \pm \\ 2818 \end{array}$	$\begin{array}{r} 245836 \pm \\ 4342 \end{array}$	$\begin{array}{r} 268674 \pm \\ 5068 \end{array}$	49184 ± 436	31218 ± 1957
Nukleotidverhältnis	5.07 ± 0.03	5.00 ± 0.07	5.46 ± 0.08	1.0 ± 0.00	1.25 ± 0.03
Gem. NuklAnteil (%)	28.50 ± 0.24	28.12 ± 0.12	30.74 ± 0.18	5.63 ± 0.09	7.01 ± 0.43
Tats. NuklAnteil (%)	20	30	25	5	20
Korrekturfaktor	0.70 ± 0.008	1.07 ± 0.007	0.81 ± 0.003	0.89 ± 0.013	2.85 ± 0.015
Norm. Migrationszeit	1.00	1.04	1.09	1.06	1.13

Tab. 18: Quantitative Auswertung der CE-LIF-Analysen von IBA 3 (n = 3)

Gem. Nukl.-Anteil = Gemessener Nukleotid-Anteil, Tats. Nukl.-Anteil = Tatsächlicher Nukleotid-Anteil

Wie Tabelle 18 zeigt, ist das Verhältnis von pdA zu pN⁶mdA nicht wie auf Grund der Oligonukleotidzusammensetzung erwartet 4:1 sondern etwa 5:1. Die Ursachen dafür sind, dass N⁶mdA etwas schlechter mit BODIPY-FL-EDA reagiert oder die markierte Substanz schlechter fluoresziert. Der Korrekturfaktor für pN⁶mdA ist dementsprechend etwas größer, als der für pdA bestimmte Korrekturfaktor von 0.7, liegt aber mit 0.89 im Bereich der anderen Nukleotide (Ausnahme pdG-Bodipy). Die mit diesem Oligonukleotid ermittelten Korrekturfaktoren stimmen generell eher mit denen von Oligo-Mod2 überein als mit denen, die mit λ -DNA bestimmt wurden (s. Seite 56).

Auf Grund der Schwierigkeiten mit der elektrophoretischen Trennung des pN⁶mdA-Bodipy-Konjugates von den normalen pdN-Bodipy-Konjugaten wurden alle weiteren Versuche zur Validierung der Messung von N⁶mdA mit der 3'-Variante der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode durchgeführt (s. Punkt 4.6.5).

4.4.3.2 1,N⁶-Etheno-2'-Desoxyadenosin

1,N⁶-Ethenoadenosin (εA, etheno-dA) wird den exocyclischen DNA-Addukten zugerechnet, welche im Zusammenspiel von freien Sauerstoffradikalen und ungesättigten Fettsäuren

gebildet werden (s. Punkt 2.3.2.2) Die Menge der so entstehenden Addukte liegt beim Menschen im Bereich von 1 Addukt pro 100 Millionen Basen [136] und hängt stark von den individuellen Ernährungsgewohnheiten ab [137]. Die Untersuchungen zum Nachweis von edA in DNA mittels Verdau mit NP1 zu pdNs, Fluoreszenzmarkierung mit BODIPY-FL-EDA und anschließender CE-LIF-Analyse wurden mit zwei 2'-Desoxy-Oligonukleotiden durchgeführt, die je zwei bzw. vier veränderte Adenosine enthielten (Verdau und Fluoreszenzmarkierung s. Tab. 9):

Oligonukleotid Nr. 614357: 5' - AGεA-GCG-εAGεA-TTC-CεAA-TCA - 3' Oligonukleotid Nr. 614358: 5' - GAG-TCT-TCC-εAGT-GTG-εATG-AT - 3'



Abb. 36: CE-LIF-Analyse von Oligonukleotid 614357 (4x etheno-dA), Trennbedingungen: 16mM Natriumphosphat, pH 9.0, 75mM SDS, 20% Methanol (v/v), 25kV

Die Elektropherogramme beider Oligonukleotide enthielten neben bekannten Signalen für die normalen fluoreszenzmarkierten pdNs einen weiteren fünften Peak bei ca. 21min. Dieses Signal war für Oligo 614357 (Abb. 36) doppelt so groß wie für Oligo 614358. Damit konnte dieses Signal eindeutig über die Intensitäten, entsprechend der Verhältnisse von εdA in den beiden Oligonukleotiden, als etheno-pdA-Bodipy identifiziert werden.

Die Lage des Signals stimmt wiederum gut mit den theoretischen Überlegungen überein, wonach etheno-pdA-Bodipy durch den Ethylen-Baustein deutlich lipophiler und schwerer ist und damit längere Migrationszeiten aufweist als das pdA-Bodipy. Durch die Erhöhung der Trennspannung auf 25 000V wurde die Analysenzeit ohne Effizienz-Einbußen bei der Trennleistung unter 30 Minuten gehalten. Die quantitative Auswertung der Analysen ergab einige Unterschiede zwischen den Oligonukleotiden, so dass hier beide getrennt aufgeführt sind. Dabei ist wiederum zu beachten, dass das 5'-endständige Nukleotid auf Grund der fehlenden Phosphatgruppe nach der Hydrolyse nicht fluoreszenzmarkiert wird, und deshalb nicht nachgewiesen werden kann.

Wie aus den beiden Tabellen (19 und 20) ersichtlich, werden unterschiedliche Korrekturfaktoren für die einzelnen Nukleotid-Bodipy-Konjugate erhalten. Die niedrigsten Korrekturfaktoren ergaben sich wiederum für pdA-Bodipy und pdC-Bodipy. Interessanterweise ähnelt der Korrekturfaktor des etheno-pdAs von 1.6 bzw. 1.8 eher dem des pdG von etwa 2.0 als dem des pdA mit einem Korrekturfaktor von 0.73 bzw. 0.61. Daher dürfte die Nachweisgrenze für etheno-dA auch eher der von pdG entsprechen und etwa 200pM betragen. Bezogen auf eine Probenverdünnung von 1:100 vor der Analyse ergibt sich somit eine Nachweisgrenze von 20 000pM, was etwa sechs Addukten in 10⁵ normalen Nukleotiden entspricht.

614357					
4x etheno-dA					
	PdA	рТ	pdC	etheno-pdA	pdG
Nukleotide	2	3	4	4	4
Gem. NuklAnteil (%)	16.12 ± 0.70	19.81 ± 0.84	38.45 ± 0.60	14.39 ± 0.75	11.22 ± 0.76
Tats. NuklAnteil (%)	11.76	17.65	23.53	23.53	23.53
Korrekturfaktor	0.731 ± 0.032	0.892 ± 0.039	0.612 ± 0.01	1.639 ± 0.083	2.105 ± 0.136
Nukleotidverhältnis	4.50 ± 0.39	5.53 ± 0.47	10.71 ± 0.62	4.00 ± 0.00	3.12 ± 0.12
Normierte MT (dA)	1.00	1.04	1.11	1.39	1.21

Tab. 19: Auswertung der CE-LIF-Analyse von Oligonukleotid Nr. 614357 nach Nuklease F	P1 \	Verdau und
Fluoreszenzmarkierung mit BODIPY-FL-EDA (n = 6)		

Gem. Nukl.-Anteil = Gemessener Nukleotid-Anteil, Tats. Nukl.-Anteil = Tatsächlicher Nukleotid-Anteil, Normierte MT (dA) = auf dA normierte Migrationszeit

614358					
2x etheno-dA					
	pdA	рТ	pdC	etheno-pdA	pdG
Nukleotide	2	7	3	2	5
Gem. NuklAnteil (%)	17.22 ± 0.91	40.43 ± 0.85	23.88 ± 0.62	5.72 ± 0.04	12.74 ± 0.62
Tats. NuklAnteil (%)	10.53	36.84	15.79	10.52	26.32
Korrekturfaktor	0.612 ± 0.032	0.911 ± 0.019	0.662 ± 0.017	1.839 ± 0.013	2.069 ± 0.10
Nukleotidverhältnis	6.01 ± 0.32	14.15 ± 0.32	8.34 ± 0.25	2.00 ± 0.00	4.46 ± 0.22
Normierte MT (dA)	1.00	1.03	1.09	1.35	1.19

Tab. 20: Auswertung der CE-LIF Analyse von Oligonukleotid Nr. 614358 nach Nuklease P1 Verdau und Fluoreszenzmarkierung mit BODIPY-FL-EDA (n = 3)

Gem. Nukl.-Anteil = Gemessener Nukleotid-Anteil, Tats. Nukl.-Anteil = Tatsächlicher Nukleotid-Anteil, Normierte MT (dA) = auf dA normierte Migrationszeit

4.4.3.3 8-Oxo-2'-Desoxyguanosin

Der wichtigste und am besten untersuchte Biomarker für oxidative DNA-Schäden ist 8-Oxo-Guanin. Seine Häufigkeit in der DNA des Menschen wird je nach verwendeter Analysenmethode und untersuchtem Gewebe mit etwa 30 in 10⁶ (GC-MS) bis 1 in 10⁷ (Postlabeling, ELISA, HPLC-ECD) normalen Nukleotiden angegeben [136] und liegt damit in einem Bereich, der mit der CE-LIF Methode erreichbar sein sollte. Zur Identifizierung und Charakterisierung von 8-oxo-pdG in DNA standen zunächst drei Oligonukleotide unterschiedlicher Sequenz mit jeweils einem bzw. zwei 8-oxo-dG Bausteinen (G*) zur Verfügung:

IBA 5: 5' - GAG TCT TCC AG*T GTG ACA CAT - 3'

995297: 5' - AGA-GCG-AG*A-TTC-CAA-TCA - 3'

995298: 5' - GAG-TCT-TCC-AGT-**G***T**G***-ATG-AT - 3'

Die Oligonukleotide wurden wie in Tab. 9 beschrieben zu pdNs verdaut und analysiert. Die Elektropherogramme enthielten alle ein neues Signal zwischen pT-Bodipy und pdC-Bodipy, das aber deutlich kleiner war als erwartet (s. Abb. 37). Dieses Signal mit einer Migrationszeit von 21min erscheint damit an der gleichen Stelle wie das p5mdC-Bodipy Konjugat, wodurch die gleichzeitige Analyse beider DNA-Modifikationen unter diesen Trennbedingungen nicht möglich ist (s. auch Abb. 39). Die korrigierte Peakfläche des neuen Signals war für das Oligonukleotid 995298 mit 23201 \pm 291 Flächeneinheiten etwa doppelt so groß wie für



Oligonukleotid 995297 (11984 \pm 270), entsprechend dem Verhältnis von 8-oxo-dG in den Oligonukleotiden, wodurch der Peak als 8-oxo-pdG-Bodipy identifiziert wurde.

Abb. 37: CE-LIF-Analyse von Oligo 995298 (2x 8-oxo-dG). Trennbedingungen s. Text

Es wurde vermutet, dass das Bodipy-Konjugat des 8-oxo-pdGs, ähnlich wie das pdG-Bodipy, einen Fluoreszenz-Quenching-Effekt aufweisen würde. Die Auswertung der Peakflächen für 8-oxo-pdG der drei Oligonukleotide zeigte aber eine erstaunlich schlechte Detektierbarkeit (Tab. 21). Der Korrekturfaktor für 8-oxo-pdG von etwa 6 ist noch 2.5 Mal größer als der für das pdG (ca. 2.3), was aber gut mit den bei den Ribonukleotiden gemachten Beobachtungen (siehe Kapitel 4.7.2.1) übereinstimmt, wonach die Oxidation der Base (Einführung einer Ketogruppe in das Molekül) zu einer schlechteren Fluoreszenz des Bodipy-Konjugates führt. Die vollständige quantitative Auswertung der Analysen der drei Oligonukleotide ist in den Tabellen 42-44 im Experimentellen Teil der Arbeit zu finden (Kap. 5.2.3).

	pdA	рТ	pdC	8-oxo-pdG	pdG
Oligo-995297	0.737 ± 0.003	1.088 ± 0.003	0.865 ± 0.002	5.873 ± 0.091	2.277 ± 0.018
1x 8-oxo-dG					
IBA 5 (72875)	0.678 ± 0.001	0.952 ± 0.003	0.740 ± 0.002	5.528 ± 0.204	2.250 ± 0.007
1x 8-oxo-dG					
Oligo-995298	0.746 ± 0.013	0.994 ± 0.021	0.843 ± 0.009	6.314 ± 0.238	2.559 ± 0.132
2x 8-oxo-dG					

Tab. 21: Korrekturfaktoren für die drei 8-oxo-dG enthaltenden Oligonukleotide (Mittelwerte, n = 3)

Man beachte, dass das 5'-endständige Nukleotid wiederum in der Analyse fehlt (s. o.)

Für weitere Untersuchungen wurde synthetisiertes 8-Oxo-2'-Desoxyguanosin-5'-Phosphat eingesetzt. Die Substanz wurde am Institute of Cancer Research in London von M. Osborne durch Umsetzung von pdG mit Wasserstoffperoxid, Natriumascorbat und Kupfersulfat nach der Methode von *Schuler et al.* [138] synthetisiert und am DKFZ spektroskopisch charakterisiert (MS, ¹H-und ¹³C-NMR). Die erhaltenen spektroskopischen Daten stimmten mit den Literaturangaben überein.

Nach der Reaktion von 10µg 8-oxo-pdG mit BODIPY-FL-EDA und EDC (Bedingungen s. Tab. 9) wurde mit CE-LIF ein deutliches Signal bei ca. 26min detektiert.

Zur besseren Vergleichbarkeit wurde pdG unter identischen Reaktionsbedingungen fluoreszenzmarkiert und die beiden Ansätze 1:1 gemischt.

Die CE-LIF Analyse dieser Mischung nach 1:100 Verdünnung mit Wasser ist in Abbildung 38 gezeigt.

Bedingt durch die geringere Verdünnung ist nun auch ein kleines Signal kurz vor dem pdG-Bodipy zu erkennen, möglicherweise ein Nebenprodukt aus der Synthese des 8-oxo-pdGs. Das Verhältnis der Peakflächen von 8-oxo-pdG-Bodipy und pdG-Bodipy zueinander beträgt ca. 40:60 (Faktor 1.5) und ist damit kleiner als das zuvor mit den modifizierten Oligonukleotiden ermittelte (Faktor 2.5). Das lässt darauf schließen, dass nicht nur eine reduzierte Reaktionsausbeute gegenüber pdG bei der Fluoreszenzmarkierung und eine niedrigere Fluoreszenzquantenausbeute vorhanden ist, sondern auch die Hydrolyse der 8-oxodG modifizierten Oligonukleotide gehemmt ist.



Abb. 38: Analyse einer 1:1 Mischung von Reaktionsansätzen mit 8-oxo-pdG und pdG, Verdünnung 1:100 mit Wasser, Trennbedingungen s. Tab. 9

Dabei handelt es sich um ein bekanntes Phänomen, dem man im Allgemeinen mit einer Erhöhung der Enzymkonzentration begegnet oder ein Gemisch aus mehreren Enzymen (DNaseI, SVPD, MN, SPD, Alkalische Phosphatase) verwendet [139]. Die Verwendung dieses Enzymgemisches ist aber nur dann praktikabel, wenn die nachfolgende Analysenmethode auf Nukleosiden beruht, da dabei die Phosphatgruppe der Nukleotide verloren geht.

Um die erarbeiteten Analysenbedingungen zur Detektion von 8-oxo-pdG auf DNA anzuwenden, wurde CT-DNA *in vitro* mit H_2O_2 oxidiert und diese DNA mit HPLC und elektrochemischer Detektion (ECD) untersucht (M. Osborne, London). Sie enthielt laut dieser Analyse etwa 1.3% 8-oxo-dG, d. h. 13 von 1000 Nukleotiden sind 8-oxo-dG. Bei etwa 21% pdG-Gehalt in der verwendeten CT-DNA entspricht das 6.2% aller pdGs.

Ein Aliquot der *in vitro* oxidierten CT-DNA (10µg) wurde nach den Bedingungen aus Tab. 9 analysiert. Nach Aufstocken mit dem Reaktionsansatz des 8-oxo-pdGs wurde das in Abb. 39 gezeigte Elektropherogramm erhalten. Wie vermutet konnten mit den bisher verwendeten Trennbedingungen die Signale des 8-oxo-pdG-Bodipys und des p5mdC-Bodipys nicht voneinander getrennt werden.



Abb. 39: CE-LIF-Analyse von *in vitro* oxidierter CT-DNA nach Aufstocken mit dem Reaktionsansatz von 8oxo-pdG. Trennbedingungen: 16mM Natriumphosphat, pH 9.0, 75mM SDS, 20% Methanol (v/v), 20kV

Die unruhigere Basislinie des Elektropherogramms gegenüber der Analyse unbehandelter CT-DNA weißt darauf hin, dass auch andere oxidative Schäden (z.B. Thymidinglykol, Hydroxyuracil, 8-oxo-Adenosin etc.) durch die H₂O₂-Behandlung entstanden sein könnten. Eine Änderung des Elektrolyten zu 17mM Natriumphosphat, pH 9.0, 15% Methanol (v/v), 75mM SDS, 20kV, ermöglicht die Trennung von 8-oxo-pdG-Bodipy von den normalen Nukleotid-Bodipy-Konjugaten. Allerdings kann p5mdC-Bodipy nicht vollständig von pdC-Bodipy getrennt werden (s. Abb. 40).



Abb. 40: CE-LIF-Analyse von *in vitro* oxidierter CT-DNA nach NP1 Verdau und Reaktion mit BODIPY-FL-EDA. Trennbedingungen s. Text; Verdünnung 1:1000 mit Wasser

Zur quantitativen Auswertung wurden zwei Korrekturfaktoren für 8-oxo-pdG verwendet. Zum einen 2.56, also der selbe Faktor wie für pdG-Bodipy, für den Fall, dass sich die beiden Bodipy-Konjugate sehr ähnlich verhalten und die großen Korrekturfaktoren bei der Analyse der modifizierten Oligonukleotide durch Probleme beim Verdau verursacht wurden, da der 8oxo-pdG Gehalt hoch ist (bis 10%). Zum anderen wurden die Berechnungen mit dem Mittelwert der Korrekturfaktoren aus den drei Bestimmungen mit den modifizierten Oligonukleotiden von 5.98 durchgeführt, für den Fall, dass die Unterschiede in der Reaktivität bzw. der Fluoreszenz-Quantenausbeute tatsächlich so groß sind. Mit dem Korrekturfaktor von 2.56 ergab sich ein Anteil von 1.72% 8-oxo-pdG an der Gesamtfläche (also der DNA) aller Bodipy-Konjugate. Nimmt man für die Berechnungen den Korrekturfaktor von 5.98, so erhält man einen Anteil von 4.03% 8-oxo-dG bezogen auf alle Basen der DNA. Die bessere Übereinstimmung mit der HPLC-ECD Analyse (1.3% 8-oxo-pdG) wird also für den Korrekturfaktor von 2.56 (1.72% 8-oxo-pdG) erhalten. Analog der Berechnung des Methylierungsgrades (s. S. 52) wurde der Anteil an 8-oxo-pdG nach folgender Formel bestimmt:

 $\frac{korr. Fläche (\$-oxo-pdG-Bodipy)}{korr. Fläche (\$-oxo-pdG-Bodipy) + korr. Fläche (pdG-Bodipy)} \times 100 = \$-oxo-pdG-Bodipy (\%)$

Dabei ergab sich je nach verwendetem Korrekturfaktor mit 9.0% (Faktor 2.56) bzw. 18.7% (Faktor 5.98) oxidierten dGs wiederum die bessere Übereinstimmung mit der HPLC-Methode für den niedrigeren Korrekturfaktor. Überraschenderweise erhält man etwa die gleichen Ergebnisse für die Menge an 8-oxo-pdG in der H₂O₂ behandelten DNA, wenn man für 8-oxo-pdG und pdG den gleichen Korrekturfaktor verwendet und nicht den deutlich höheren Faktor, der durch die Analyse von Oligonukleotiden bestimmt wurde.

Die Methode ist also in der Lage bei 1:100 Verdünnung der Probe eine Adduktmenge von 1 8-oxo-dG pro 1000 Nukleotide zu detektieren, was aber für die *in vivo* Anwendung nicht ausreicht. Problematisch ist ebenfalls, dass noch keine Trennbedingungen gefunden werden konnten, die die Basislinien-getrennte Analyse von allen sechs relevanten Nukleotid-Bodipy-Konjugaten (pdA, pdC, pdG, pT, p5mdC, 8-oxo-pdG) gewährleistet.

4.4.3.4 8-Oxo-2'-Desoxyadenosin

Neben 8-Oxo-Guanin gibt es weitere DNA-Schäden, die ebenfalls durch freie Sauerstoffradikale verursacht werden. Eine dieser Basenveränderungen ist das 8-Oxo-Adenin (8-oxo-dA), das auf Grund der geringeren Oxidationsempfindlichkeit des Adenins im Verhältnis zum Guanin aber wesentlich seltener entsteht, und daher deutlich schwieriger zu detektieren ist. In der Literatur gibt es nur wenige Angaben über die Häufigkeit dieser DNA-Modifikation; sie wird in der Regel mit etwa 1 Addukt pro 10⁸ normalen Nukleotiden angegeben [136].

Für Untersuchungen stand ein 2'-Desoxy-Oligonukleotid (IBA 4) mit folgender Sequenz zur Verfügung (A* = 8-oxo-dA): 5' - GAG TCT TCC A*GT GTG ACA CAT - 3' (Oligo IBA 4). 10 μ g des Oligonukleotids wurden nach den Standardbedingungen aus Tab. 9 mit NP1 zu pdNs verdaut und mit BODIPY-FL-EDA derivatisiert. Die CE-LIF Analyse mit den normalen Bedingungen (16mM Natriumphosphat, pH 9.0, 75mM SDS, 20% Methanol (v/v), 20kV) zeigte zunächst nur die vier Signale der normalen pdN-Bodipy-Konjugate. Durch Änderungen

der Pufferzusammensetzung gelang die Detektion eines fünften Signals, das hinter dem pdG-Bodipy erscheint (s. Abb. 41).



Abb. 41: CE-LIF-Analyse von Oligonukleotid IBA 4 nach NP1 Verdau und Fluoreszenzmarkierung. Trennbedingungen: 17mM Natriumphosphat, pH 9.0, 75mM SDS, 15% Methanol (v/v), 20kV

Eigentlich war das Signal des 8-oxo-dA-Bodipy auf Grund seiner höheren Hydrophilie durch die Ketogruppe am C8-Atom bei kleineren Migrationszeiten als pdA-Bodipy erwartet worden.

Die Auswertung der korrigierten Signalflächen (s. Tab. 22) ergab für die vier normalen Nukleotide ähnliche Korrekturfaktoren wie mit den anderen untersuchten Oligonukleotiden. Für das 8-oxo-pdA-Bodipy Konjugat wurde ebenso wie für 8-oxo-pdG-Bodipy ein deutlich höherer Korrekturfaktor ermittelt, als für das nicht oxidierte Nukleotid.

IBA 4 (72874)					
1 x 8-oxo-dA					
	pdA	рТ	pdC	8oxo-pdA	pdG
Nukleotide	4	6	5	1	4
Gem. NuklAnteil (%)	28.37 ± 0.12	30.53 ± 0.98	31.59 ± 0.09	1.59 ± 0.01	7.91 ± 0.05
Tats. NuklAnteil (%)	20	30	25	5	20
Korrekturfaktor	0.705 ± 0.003	0.983 ± 0.002	0.791 ± 0.002	3.135 ± 0.015	2.529 ± 0.02
Nukleotidverhältnis	17.79 ± 0.16	19.14 ± 0.10	19.81 ± 0.04	1.00 ± 0.00	4.96 ± 0.02
Normierte MT (dA)	1.00	1.04	1.09	1.19	1.15

Tab. 22: Auswertung der Oligonukleotid-Untersuchung von IBA 4 (Mittelwerte, n = 3)

Gem. Nukl.-Anteil = Gemessener Nukleotid-Anteil, Tats. Nukl.-Anteil = Tatsächlicher Nukleotid-Anteil Man beachte, dass das 5'-endständige Nukleotid wiederum in der Analyse fehlt (s.o.)

Das Elektropherogramm in Abb. 40 zeigt, dass im Bereich des 8-oxo-pdA-Bodipy-Signales (ca. 22min) mehrere kleine Signale zu erkennen sind, die aber bisher nicht zugeordnet werden konnten. Da der Korrekturfaktor für 8-oxo-pdA-Bodipy mit 3.135 um den Faktor 1.24 höher ist als der Korrekturfaktor für pdG-Bodipy, sollte auch die Nachweisgrenze um den gleichen Faktor höher sein. Das bedeutet, dass für 8-oxo-pdA eine Nachweisgrenze von ca. 250pM zu erwarten ist. Bei einer Probenverdünnung von 1:100 vor der Analyse bedeutet dies die Detektierbarkeit 25000pM und damit etwa sieben Addukte in 100 000 normalen Nukleotiden.

4.5 Analyse von RNA mittels CE-LIF

Das Prinzip der Fluoreszenzmarkierung von Oligo- oder Mononukleotiden durch chemische Konjugation von Fluorophoren über primäre Aminofunktionen an ihre Phosphatgruppen hat seit der Arbeit von Chu et al. 1983 [101] relativ weite Verbreitung gefunden. Diese Technik bietet nicht nur die Möglichkeit 2'-Desoxyribonukleotide sondern auch Ribonukleotide und andere Moleküle, die eine Phosphatgruppe tragen, zu markieren. Über die Fluoreszenzmarkierung von Ribonukleosid-Monophosphaten liegt jedoch nur ein Bericht von Jain et al. vor [140]. In dieser Arbeit wurden die vier normalen Ribonukleosid-5'-Phosphate (prNs) sowie 7-Methylguanosin-5'-Phosphat nach der Methode von Kelman et al. [102] zunächst mit Ethylendiamin und EDC zu den entsprechenden Phosphoramidaten umgesetzt und dann in einem zweiten Schritt mit Dansylchlorid fluoreszenzmarkiert (s. Abb. 5 und 6). Zur Analyse via HPLC mit Fluoreszenzdetektion der Konjugate war zuvor jedoch eine chromatographische Anreicherung der Addukte notwendig.

Während der Entwicklung unserer Fluoreszenz-Postlabeling-Methode mit BODIPY-FL-EDA zur Analyse von DNA wurde die Frage aufgeworfen, ob isolierte DNA mit RNA-Verunreinigungen zu Störungen bei der CE-LIF-Analyse führen könnten. Erste Versuche zeigten jedoch, dass die Zugabe von Ribonukleosid-3'-Phosphaten (**rNps**) zu MN/SPD verdauter DNA vor der Fluoreszenzmarkierung keine anderen Signale in der CE-LIF Analyse erzeugten als mit reiner CT-DNA allein. Der Grund hierfür liegt in der Bildung eines stabilen cyclischen Phosphates, das, wie von *Dekker* und *Khorana* beschrieben [141], bei der Umsetzung von Ribonukleosid-3'-Phosphaten mit Carbodiimiden gebildet wird (Abb. 42, oben). Durch die direkte Nachbarschaft der 2'-OH-Gruppe der Ribose zu der durch EDC aktivierten Phosphatgruppe kommt es zu einem nukleophilen Angriff der freien Elektronenpaare des Sauerstoffes, der sofort zur Bildung des cyclischen Phosphates führt. Andere Nukleophile (wie z.B. BODIPY-FL-EDA) haben keine Möglichkeit mit der aktivierten Phosphatgruppe zu reagieren. Da 2'-Desoxyribose an der fraglichen Position keine OH-Gruppe besitzt, läuft in diesem Fall die Reaktion mit BODIPY-FL-EDA mit EDC-Aktivierung ohne Probleme ab (Abb. 42, unten).



Abb. 42: Möglichkeiten der Hydrolyse von RNA mit anschließender Fluoreszenzmarkierung. Reaktionsschema für Ribonukleosid-3'- und -5'-Monophosphate mit EDC und BODIPY-FL-EDA

Inzwischen wurde auch am Beispiel des Adenosin-3'-Monophosphates (rAp) gezeigt, dass bei der Reaktion mit EDC und BODIPY-FL-EDA das cyclische 2',3'-Adenosin-Monophosphat gebildet wird, und die Phosphatgruppe nicht mehr für die Reaktion mit dem Fluoreszenzmarker zur Verfügung steht. Nach Isolierung dieses Reaktionsproduktes aus dem Derivatisierungsansatz mittels HPLC wurde es spektroskopisch (MS, ¹H-NMR) als 2',3'-Adenosin-Monophosphat identifiziert [143].

Daraus ergibt sich einerseits, dass RNA-Verunreinigungen die Untersuchung von DNA mit der 3'-Variante der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode nicht oder nur unwesentlich beeinflussen; andererseits bietet diese Variante der Methode aber auch keine Möglichkeit zur Analyse von RNA und RNA-Addukten [68, 69] oder seltenen RNA-Basen, wie sie zum Beispiel gehäuft in tRNA vorkommen (s. Theorie 2.4).

Der Nachweis von RNA-Basen gelingt jedoch, wenn man RNA mit Nuklease P1 zu Ribonukleosid-5'-Phosphaten verdaut. In diesem Fall ist die Phosphatgruppe zu weit von der Hydroxyl-Funktion in der 2'-Position der Ribose entfernt, um nach Aktivierung mit EDC ein cyclisches Phosphat zu bilden. Somit findet die Markierung mit BODIPY-FL-EDA statt (Abb. 42).

4.5.1 Methodenentwicklung

Für erste Untersuchungen zur Fluoreszenzmarkierung von prNs mit BODIPY-FL-EDA wurden 10µg Adenosin-5'-Monophosphat (prA) unter den für pdNs entwickelten Bedingungen (s. Tab. 10) mit EDC und BODIPY-FL-EDA in 350mM MES Puffer pH 6.5 umgesetzt und anschließend mit CE-LIF analysiert. Die Derivatisierungsreaktion verlief ohne Probleme und im Elektropherogramm konnte ein Signal der erwarteten Intensität detektiert werden, welches in Analogie zu den Umsetzungen der pdNs nur das prA-Bodipy sein konnte. Daher wurde auf eine spektroskopische Identifizierung dieses Bodipy-Konjugates verzichtet. Ein Aliquot dieser Reaktionslösung wurde mit einem Aliquot des Derivatisierungsansatzes von pdA so gemischt, dass gleiche molare Mengen vorlagen. Das Gemisch wurde 1:1000 mit Wasser verdünnt und mit CE-LIF analysiert (Abb. 43).

Das Elektropherogramm zeigt annähernd gleich große Peakflächen und prA-Bodipy (13.8min) wandert etwas schneller als pdA-Bodipy (15min). Durch die zusätzliche 2'-OH Gruppe ist prA-Bodipy hydrophiler als pdA-Bodipy und hat daher wahrscheinlich eine reduzierte Aufenthaltswahrscheinlichkeit in der Mizelle, was die kürzere Migrationszeit erklären könnte. Die beiden kleinen, nicht bestimmten Signale (? in Abb. 43) entstammen dem Reaktionsansatz des prAs und sind vermutlich Verunreinigungen des käuflich erworbenen prAs (Reinheit It. Hersteller, SIGMA, 98%).



Abb. 43: CE-LIF-Analyse der Mischung aus den Derivatisierungsansätzen von prA und pdA mit BODIPY-FL-EDA; Trennbedingungen: 17mM Natriumphosphat, pH 9.0, 75mM SDS, 15% Methanol (v/v), 20kV; Verdünnung 1:1000 mit Wasser

Um die oben angestellten Überlegungen zu untermauern, wurde ein Hybrid-Oligomer aus poly-rA und poly-dT (poly rA·dT) mit einer Länge von 8-12 Basenpaaren mit MN/SPD zu 2'-Desoxy- und Ribonukleosid-3'-Monophosphaten verdaut und derivatisiert (Tabelle 10). Es sollte nur das Tp-Bodipy entstehen, da rAp unter den gegebenen Bedingungen nicht mit BODIPY-FL-EDA reagieren kann (s. o.). Bei der anschließenden CE-LIF-Analyse wurde im Elektropherogramm tatsächlich nur das Signal des Tp-Bodipys nachgewiesen (nicht gezeigt). Nach Verdau mit NP1 zu den entsprechenden 5'-Monophosphaten mit anschließender Derivatisierung und CE-LIF Analyse wurden demzufolge zwei Peaks für pT-Bodipy und prA-Bodipy erwartet. Das folgende Elektropherogramm (Abb. 44) bestätigt diese Vermutung:



Abb. 44: CE-LIF-Analyse von 10μg poly-rA·dT nach NP1 Verdau zu Nukleosid-5'-Phosphaten. Trennbedingungen für 3'-Phosphate: 18mM Natriumphosphat, pH 9.0, 90mM SDS, 10% Methanol (v/v), 20kV.; Verdünnung 1:1000 mit Wasser.

Wie bei den pdNs wurden von den prNs neben den normalen in der RNA vorkommenden Nukleotiden (Adenosin-5'-Phosphat, Uridin-5'-Phosphat, Cytidin-5'-Phosphat und Guanosin-5'-Phosphat) auch leicht modifizierte Nukleotide (Inosin-5'-Phosphat, Xanthosin-5'-Phosphat) sowie Ribose-5'-Phosphat als Standardverbindungen für die Fluoreszenz-Postlabeling-Methode hergestellt. Dazu wurden je 10µg dieser Substanzen einzeln, unter den Standardbedingungen für pdNs (s. Tab. 9) mit EDC und BODIPY-FL-EDA umgesetzt. In allen Reaktionsansätzen wurde durch CE-LIF-Analyse nur ein Signal des entsprechenden prN-Bodipy-Konjugates detektiert. Im Gegensatz zu pdR konnte bei Ribose-5'-Phosphat (pR) auch nur ein Signal detektiert werden. Die sieben Reaktionsansätze wurden mit Wasser verdünnt (1:100), je 50µl dieser Lösungen wurden gemischt und mit Wasser auf 0.5ml aufgefüllt (Verdünnung 1:1000). Mit den Trennbedingungen für die dNps (18mM Natriumphosphat, pH 9.0, 90mM SDS, 10% Methanol (v/v) bei 20kV) konnte das Gemisch kapillarelektrophoretisch vollständig getrennt werden (s. Abb. 45).


Abb. 45: CE-LIF-Analyse eines Gemisches aus sieben Ribonukleosid-5'-Phosphat-Bodipy-Konjugaten. Trennbedingungen s. Text.

Aus dem Elektropherogramm (Abb. 45) ist ersichtlich, dass die prN-Bodipy-Konjugate ein ähnliches Migrationsverhalten zeigen wie die pdN-Bodipy-Konjugate, lediglich die Migrationsreihenfolge für prI und prU ist vertauscht (vgl. Abb. 28). Obwohl von allen Ribonukleosid-5'-Phosphaten die gleiche Menge (10µg) für die Derivatisierungsreaktion eingesetzt wurde, sind die korrigierten Flächen der einzelnen Signale sehr unterschiedlich. Tabelle 23 vergleicht die auf molare Massen korrigierten Peakflächen der einzelnen Nukleotide miteinander:

Base	rA	rC	rU	rG	rI	rX	Ribose
Nmol	22.66	20.86	20.75	19.89	25.50	23.00	24.82
Mittelwert (n=3) Fläche/nmol	$\begin{array}{c} 16183 \\ \pm 743 \end{array}$	$\begin{array}{r} 15168 \pm \\ 625 \end{array}$	$9191 \pm \\ 463$	5111 ± 122	$5289 \pm \\ 220$	$\begin{array}{c} 3570 \pm \\ 104 \end{array}$	5409 ± 140
% prA	100.00	93.73	56.79	31.58	32.68	22.06	33.43

Tab. 23: Peakflächenauswertung der CE-LIF-Analyse von Abb. 45 bezogen auf die eingesetzten Molmengen (n = 3)

Die korrigierten Peakflächen (Mittelwert aus drei Analysenläufen) wurden durch die eingesetzte Stoffmenge dividiert, wodurch eine "Signalfläche pro mol" erhalten wurde. Diese Werte wurden zur besseren Vergleichbarkeit noch auf den höchsten Wert (prA-Bodipy) normiert (% prA). Nur wenig kleiner als für prA-Bodipy ist die Signalfläche für prC-Bodipy. Alle übrigen Bodipy-Konjugate zeigen deutlich niedrigere Intensitäten, am geringsten ist sie für prX-Bodipy. Also müssen für eine quantitative RNA-Analyse ebenfalls Korrekturfaktoren bestimmt werden.

4.5.2 Kapillarelektrophoretische Trennung von 2'-Desoxy- und Ribonukleosid-5'-Phosphaten

Ein Vorteil der 3'-Variante der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode ist, dass RNA-Verunreinigungen in der DNA-Präparation nicht markiert werden, und damit keine störenden Signale bei der CE-LIF-Analyse verursachen. Beim Verdau von DNA mit NP1 zu pdNs wird anwesende RNA jedoch ebenfalls zu fluoreszenzmarkierbaren prNs verdaut, was zu zusätzlichen Signalen im Elektropherogramm führt. Wie Abbildung 46 zeigt, gelang die vollständige Trennung einer Mischung von NP1 verdauter und fluoreszenzmarkierter DNA und den vier normalen Ribonukleosid-Bodipy Konjugaten (prA-Bodipy, prU-Bodipy, prG-Bodipy, prC-Bodipy), die jeweils getrennt derivatisiert worden waren, nur durch Zusatz von 1M Glukose zum Elektrolyten. Dies bedingt jedoch eine wesentlich längere Migrationszeit, so dass es im Sinne einer Hochdurchsatz-Methode sinnvoller ist, schon bei der DNA-Isolation auf die Reinheit der DNA zu achten. Aus dem Elektropherogramm ist jedoch ersichtlich, dass die Peakflächen für die entsprechenden prN und pdN-Bodipy-Konjugate in etwa gleich groß sind.



Abb. 46: CE-LIF-Analyse einer Mischung von DNA verdaut mit NP1 (2'-Desoxyribonukleosid-5'-Phosphat Bodipy-Konjugate) und Ribonukleosid-5'-Phosphat Bodipy-Konjugaten; Trennbedingungen: 18mM Natrium-phosphat, pH 9.0, 10% Methanol (v/v), 90mM SDS, 1M Glukose, 20kV

4.5.3 Nachweis von Pseudouracil (Ψ) und 2'-O-Methyladenosin in Oligoribonukleotiden durch Fluoreszenz-Postlabeling und CE-LIF

RNA enthält neben den vier normalen Basen, Adenin, Cytosin, Uracil und Guanin, noch eine Vielzahl von veränderten Basen. Die häufigste ist das Pseudouracil (Abb. 47), ein Isomer des Uracils, bei dem die Verknüpfung der Ribose mit dem Pyrimidin-Ring nicht über den Stickstoff sondern über einen Kohlenstoff erfolgt. Auf Grund seiner Häufigkeit hat Pseudouracil ein eigenes Symbol (Ψ) für die Notation von RNA-Sequenzen erhalten und wird in Analogie zum 5-Methylcytosin in der DNA als "Fünfte RNA-Base" bezeichnet.



Abb. 47: Strukturformeln von Pseudouridin (5-Ribosyluracil)-5'-Phosphat und 2'-O-Methyladenosin-5'-Phosphat

Die Bildung erfolgt erst nach der Synthese des RNA-Stranges durch ein spezielles Enzymsystem, das sequenzspezifisch bestimmte Uridine in Pseudouridine umwandelt. In tRNA, snRNA und rRNA von höheren Organismen (vielzellige Pflanzen und Tiere) erreicht der Gehalt an Pseudouridin 2-3%.

Eine weitere häufige Modifikation der RNA ist die Methylierung der 2'-OH Position der Ribose. Diese Veränderung ist für alle vier (bzw. fünf) normalen Ribonukleoside bekannt und tritt häufig an bestimmten Positionen der tRNA auf (T-loop). Sie ist auch in stark konservierten Bereichen von Untereinheiten der ribosomalen RNA (rRNA) verschiedener Organismen nachgewiesen worden und scheint sehr wichtig für den korrekten Zusammenbau von Ribosomen zu sein [67]. Generell herrscht heute die Meinung vor, dass Schlüsselprozesse wie der Peptidyl-Transfer bei der Proteinbiosynthese und der Aufbau der Ribosomen aus den RNA Untereinheiten stark von der korrekten Modifikation der RNA abhängen.

Um abzuklären, ob solche RNA-Modifikationen mit der 5'-Variante der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode untersucht werden können, wurden zunächst RNA-Oligonukleotide (21mere), die jeweils ein Pseudouridin oder ein 2'-O-Methyladenosin (mA, s. Abb. 47) enthalten, analysiert.

```
Ribo-Oligo U1: 5' - p-GAG UCU UCC AGΨ GUG ACA CAU - 3'
Ribo-Oligo mA: 5' - p-GAG UCU UCC AGmA GUG ACA CAU - 3'
Beide Oligoribonukleotide tragen am 5'-Ende eine Phosphatgruppe, so dass nach Verdau mit
NP1 alle 21 Basen als Ribonukleosid-5'-Phosphate mit BODIPY-FL-EDA markiert werden.
Für den Verdau mit NP1 wurden die Bedingungen des DNA-Verdaus übernommen (s. Tab.
```

9). 10µg der Oligoribonukleotide wurden mit NP1 in MES-Puffer bei pH 5.5 zu prNs verdaut und anschließend mit EDC und BODIPY-FL-EDA unter identischen Bedingungen wie die pdNs fluoreszenzmarkiert. Die erhaltene Reaktionslösung wurde 1:1000 mit Wasser verdünnt und mit den in Tabelle 24 angegebenen Trennbedingungen kapillarelektrophoretisch analysiert (Abb. 48 und 49).

Tab. 24: Versuchsbedingungen für die Analyse von RNA mit der 5'-Variante der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode

Bedingungen
10μg RNA (oder Oligonukleotid, 31nmol) zur Trockene einengen in 6μl MES 50mM, pH 5.5, lösen
Zugabe von 2μ I ZnCl ₂ (2mM) und 2μ I NP1 (0.02U) in Wasser Inkubation bei 37°C für 2h
10µl Hydrolyselösung (10µg pdN, 31nmol)
+ 20µl 350mM MES, pH 6.5 (Endkonzentration 340µM Nukleotid)
+ 30µl 25mM BODIPY-FL-EDA in 350mM MES, pH 6.5
(Endkonzentration 8.33mM BODIPY-FL-EDA)
+ 30µl 1.8M EDC in 350mM MES, pH 6.5
(Endkonzentration 0.6M EDC)
Endvolumen 90µl
Inkubation bei 25°C für 25h
unbeschichtete fused-silica-Kapillare, $L_{ges} = 59$ cm, $L_{eff} = 49$ cm
Durchmesser = $50 \mu m$
20kV Trennspannung (340V/cm)
hydrodynamische Injektion 2.5x psi·s (ca. 5nl)
Trennpuffer: 18mM Natriumphosphat-Puffer, pH 9.0, 90mM SDS, 10%
Methanol (v/v)

Für beide Oligoribonukleotide liefen Verdau und Derivatisierungsreaktion ohne Auffälligkeiten ab, so dass die Lösungen ohne Probleme mit CE-LIF analysiert werden konnten (s. Abb. 48 und 49).



Abb. 48: CE-LIF-Analyse von Ribo-Oligo U1 nach Verdau mit Nuklease P1 und Fluoreszenzmarkierung mit BODIPY-FL-EDA. Trennbedingungen s. Tab. 24, Verdünnung 1:1000 mit Wasser

Das Elektropherogramm in Abb. 48 zeigt die CE-LIF-Analyse von Ribo-Oligo U1 mit einem neuen Signal zwischen prA-Bodipy und prU-Bodipy, das dem Pseudouridin-Bodipy (pΨ-Bodipy) zugeordnet wurde. Die korrigierte Peakfläche des Signals entspricht der erwarteten Fläche für ein normales prN-Bodipy, d. h. pΨ-Bodipy weist ähnliche Fluoreszenz-Quenching-Effekte auf wie die vier normalen RNA-Nukleotide. Die korrigierten Peakflächen wurden mit der Zusammensetzung des Oligoribonukleotides verglichen und Korrekturfaktoren für die einzelnen prN-Bodipy-Konjugate ermittelt. Tabelle 25 bestätigt die bei den einzeln derivatisierten prNs gemachten Beobachtungen. Wiederum ist prA-Bodipy das Konjugat mit dem niedrigsten und prG-Bodipy das mit dem höchsten Korrekturfaktor (Quenching-Effekt wie das pdG-Bodipy).

Ribo-Oligo U1	Anzahl der Basen	Messung (%)	Korrekturfaktor
rA	5 (23.81%)	33.10 ± 0.19	0.719 ± 0.004
rU	5 (23.81%)	20.71 ± 0.14	1.150 ± 0.008
rC	5 (23.81%)	31.79 ± 0.26	0.784 ± 0.006
rG	5 (23.81%)	9.56 ± 0.24	2.491 ± 0.064
Ψ	1 (4.76%)	4.83 ± 0.07	0.986 ± 0.014

Tab. 25: Auswertung der CE-LIF-Analyse von Ribo-Oligo U1 (n = 5)

Auch die CE-LIF-Analyse von Ribo-Oligo mA ergab ein zusätzliches Signal für 2'-O-Methyladenosin-Bodipy (p2'OmrA-Bodipy), das aber unter den verwendeten Trennbedingungen nicht vollständig vom prC-Bodipy getrennt wurde.

Die beste Trennung erzielte der in Tab. 24 angegebene Puffer mit einem pH-Wert von 8.5 (Abb. 49). Dies führte zwar zu längeren Migrationszeiten aller Ribonukleosid-5'-Bodipy-Konjugate, war aber ausreichend für eine Auswertung der korrigierten Peakflächen mit einer relativen Standardabweichung von ca. 5%. Die Auswertung der Analysendaten von Ribo-Oligo mA ergab ähnliche Korrekturfaktoren wie bei Ribo-Oligo U1 (s. Tab. 26).



Abb. 49: CE-LIF-Analyse von Ribo-Oligo mA nach Verdau mit NP1 und Fluoreszenzmarkierung; Trennbedingungen: 18mM Natriumphosphat, pH 8.5, 10% Methanol (v/v), 90mM SDS, 20kV.

Ribo-Oligo mA	Anzahl der Basen	Messung (%)	Korrekturfaktor
rA	4 (19.05%)	27.38 ± 1.33	0.689 ± 0.033
rU	6 (28.57%)	18.06 ± 1.31	1.201 ± 0.068
rC	5 (23.81%)	29.20 ± 1.32	0.772 ± 0.033
rG	5 (23.81%)	10.25 ± 0.78	2.308 ± 0.169
2'-O-mrA	1 (4.76%)	7.15 ± 0.37	0.667 ± 0.034

Tab. 26: Auswertung der CE-LIF Analyse von Ribo-Oligo mA (n = 7)

Interessant ist, dass der Korrekturfaktor für 2'-O-Methyladenosin dem für prA entspricht, also keine Unterschiede beim Verdau mit NP1, bei der Markierungsreaktion mit BODIPY-FL-EDA und in den Fluoreszenzeigenschaften bestehen. Das ist insofern bemerkenswert, als dass die Methylierung der 2'-Position der Ribose im Allgemeinen zu einer erhöhten Resistenz der RNA gegenüber dem Verdau mit Nukleasen und RNasen führt [143]. Die korrigierten Peakflächen für die in beiden Oligoribonukleotiden gleich häufig vertretenen Nukleotide (prG und prC, je 5x) sind ebenfalls vergleichbar (Tab. 27)

Tab. 27: Auswertung der Peakflächen der RNA-Oligonukleotide (n = 5)

	rC	rG
Ribo-Oligo U1	41043 ± 3808	15000 ± 1539
Ribo-Oligo mA	44061 ± 5369	14550 ± 1300

4.5.4 Validierung der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode für Ribonukleosid-5'-Phosphate

Für einen Einsatz der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode zur Analyse von RNA ist es ebenso wie für die bisher vorgestellten Fluoreszenz-Postlabeling-Assays unerlässlich, die Methode zu validieren. Dazu wurden die Nachweisgrenze, die Reproduzierbarkeit und Präzision der Methode bestimmt, sowie die Linearität des Messbereiches überprüft. Dafür wurde mangels einer geeigneten Modell-RNA das Oligoribonukleotid U1 verwendet.

4.5.4.1 Bestimmung der Nachweisgrenze

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze der Ribonukleotide aus dem RNA-Verdau wurden 10µg des Oligonukleotides U1 mit NP1 zu prNs verdaut und mit BODIPY-FL-EDA fluoreszenzmarkiert (Bedingungen s. Tab. 24). Der Reaktionsansatz wurde anschließend so lange mit Wasser verdünnt, bis die Signale der Bodipy-Konjugate bei der CE-LIF-Analyse gerade noch mit einem Signal/Rausch-Verhältnis (S/N) von 3:1 detektiert werden konnten. Die prA-, prC- und prU-Bodipy-Konjugate konnten bei einer Verdünnung des Reaktionsansatzes von 1:10⁶ noch detektiert werden. Für prG-Bodipy war die Nachweisgrenze um den Faktor zwei schlechter (s. Abb. 50).



Abb. 50: CE-LIF-Analyse von Ribo-Oligo U1 nach Verdau mit Nuklease P1 und Fluoreszenzmarkierung. Trennbedingungen s. Tab. 24, Verdünnung 1:10⁶ mit Wasser

Da die durchschnittliche Molmasse eines prN im Oligonukleotid U1 321.57 g/mol beträgt, ergibt sich nach dem NP1 Verdau von 10 μ g eine Konzentration von 345.55 μ M Ribonukleotide im Reaktionsansatz (90 μ l), vollständigen Verdau vorausgesetzt. Da das Oligoribonukleotid zu je 23.86% aus rA, rC, rU, rG und zu 4.76% aus Ψ besteht, beträgt die Konzentration der Ribonukleotide im Reaktionsansatz 82.45 μ M für die vier normalen prNs und 16.45 μ M für p Ψ . Damit liegt die Nachweisgrenze für prA, prC und prU bei 82.45pM und entsprechend bei 165pM für prG. Eine Konzentration von 16.45pM reicht für die Detektion von Ψ nicht aus, das Signal ist gerade noch vor dem prU-Bodipy zu erahnen (bei ca. 20min). Ab einer Verdünnung von 1:200 000, was einer Konzentration von 82pM entspricht, ist das Signal jedoch eindeutig mit einem S/N von 3:1 zu erkennen. Eine Nachweisgrenze von 80pM

entspricht bei der Injektion von 2.5x psi·s (\approx 5nl) in die Kapillare etwa einer Stoffmenge von 41amol (4.1x 10⁻¹⁷ mol). Hieraus folgt, dass die Nachweisgrenzen von prNs sehr gut mit den unter Punkt 4.4.1.1 erhaltenen Werten für die pdNs und den von *Schmitz et al.* [16] publizierten Daten für das 2'-Desoxyadenosin-3'-Phosphat übereinstimmen. Damit kann man davon ausgehen, dass nicht nur die pdNs und dNps (wie in Kap. 4.4 gezeigt), sondern auch die prNs mit gleicher Sensitivität mit der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode detektierbar sind.

4.5.4.2 Linearität des Messbereiches, Reproduzierbarkeit und Präzision der Analyse

Diese Untersuchungen wurden analog denen mit den pdN-Bodipy-Konjugaten durchgeführt. Dafür wurden 10µg des Oligonukleotides U1 mit NP1 zu den prNs verdaut und mit BODIPY-FL-EDA fluoreszenzmarkiert (s. Tab. 28). Der Reaktionsansatz wurde mit Wasser entsprechend verdünnt (Verdünnungen 1:500, 1:1000, 1:5000, 1:10 000) und die Lösung fünfmal hintereinander mit CE-LIF analysiert. Die Ergebnisse wurden wiederum als Anteil der einzelnen korrigierten Peakflächen der pdN-Bodipy-Konjugate an der Gesamtfläche ausgedrückt (Tab. 28).

Verdünnung	prA	prU	prC	pΨ	prG
1.500	31.92 ± 0.21	20.53 ± 0.06	33.06 ± 0.11	5.08 ± 0.07	940 ± 0.27
1:1000	33.10 ± 0.19	20.71 ± 0.14	31.79 ± 0.26	4.83 ± 0.07	9.56 ± 0.24
1:5000	32.50 ± 0.27	20.62 ± 0.26	32.51 ± 0.24	4.94 ± 0.12	9.42 ± 0.28
1:10000	32.70 ± 0.13	20.87 ± 0.06	31.88 ± 0.21	4.84 ± 0.15	9.68 ± 0.20
Mittelwert	32.55	20.69	32.31	4.92	9.52
Stabw.	0.49	0.15	0.59	0.12	0.13
rel. Stabw.	1.50	0.71	1.84	2.41	1.39

Tab. 28: Ergebnisse der Linearitätsversuche (Anteil der Signalfläche an der Gesamtfläche in %, n = 5)

Die Peakflächen der prN-Bodipy-Konjugate waren proportional zur Verdünnung mit relativen Standardabweichungen unter 3% und damit über einen Bereich von drei Größenordnungen linear. Aus den insgesamt 20 Messungen konnten ebenfalls Aussagen über die Präzision der Analyse abgeleitet werden. Für alle vier Verdünnungen lagen die Schwankungen der korrigierten Peakflächenanteile bei den Wiederholungen der CE-LIF-Analyse unter 3%.

Aus allen 20 Messungen wurden wieder die Korrekturfaktoren und die normierte Migrationszeit der prN-Bodipy Konjugate berechnet. Dazu wurden die Migrationszeiten von prC-, prU-, prG- und pΨ-Bodipy durch die Migrationszeit von prA-Bodipy dividiert. Die normierte Migrationszeit zeigte eine relative Standardabweichung von 0.45% für pΨ-Bodipy

bis 1.27% für prG-Bodipy und lag damit genauso deutlich unter 3% wie die von *Schmitz et al.* für dNp-Bodipy beschriebenen normierten Migrationszeiten [16].

	rA	rG	rU	rC	Ψ
Korrekturfaktor (n=20)	0.732 ± 0.011	2.504 ± 0.069	1.151 ± 0.011	0.772 ± 0.013	0.968 ± 0.029
rel. Stabw. (%)	1.5	2.7	0.9	1.7	3.0
norm. Migrationszeit	1.00	1.20 ± 0.02	1.08 ± 0.01	1.16 ± 0.01	1.06 ± 0.01
rel. Stabw. (%)	0.0	1.27	0.57	0.70	0.45

Tab. 29: Korrekturfaktoren für Ribo-Oligo U1 (n = 20)

Die so erhaltenen Korrekturfaktoren unterscheiden sich kaum von den oben beschriebenen (s. Tab. 25), beruhen aber auf einer größeren Datenbasis und wurden daher für die Auswertung der RNA-Analysen im folgenden Kapitel verwendet.

4.5.5 RNA-Analysen (verschiedene Organismen und tRNA)

Mit der nunmehr validierten Analysen-Methode wurden folgende vier RNAs untersucht:

- Gesamt-RNA aus Drosophila melanogaster (AK Lyko, DKFZ)
- Gesamt-RNA aus humaner Leber (BD Bioscience, Heidelberg)
- Gesamt-RNA aus humaner Niere (BD Bioscience, Heidelberg)
- tRNA aus Saccharomyces cerevisiae (Böhringer, Mannheim)

Gesamt-RNA enthält alle RNA-Typen (mRNA, tRNA, rRNA etc.), wobei die ribosomale RNA mit > 70% den größten Anteil ausmacht [144]. Im Gegensatz dazu macht tRNA nur 10-20% der gesamten RNA einer Zelle aus. Sie besteht aus den verschiedenen tRNAs für die 20 proteinbildenden Aminosäuren, aus denen die Proteine bei Eukaryonten zusammengesetzt sind und besitzt wesentlich mehr modifizierte Nukleotide als die anderen RNA-Typen. Die Phenylalanin-tRNA von *Saccharomyces cerevisiae* ist z. B. aus 76 Nukleotiden aufgebaut, von denen elf modifiziert sind (14.5%), darunter je 2x Pseudouridin, 2x 5-Methylcytidin und 2x Dihydrouridin [145].

Mit den in Tabelle 24 angegebenen Bedingungen wurden 10µg der Gesamt-RNA aus Drosophila zu prNs verdaut und fluoreszenzmarkiert. Der erhaltene Reaktionsansatz wurde wie gewohnt 1:1000 mit Wasser verdünnt und kapillarelektrophoretisch analysiert. In dem resultierenden Elektropherogramm (Abb. 51) wurden die vier normalen prN-Bodipy-Konjugate durch Aufstocken mit Standardverbindungen identifiziert.



Abb. 51: CE-LIF-Analyse von Gesamt-RNA aus *Drosophila melanogaster* nach Verdau mit Nuklease P1 und Fluoreszenzmarkierung mit BODIPY-FL-EDA. Trennbedingungen s. Tab. 24

Zusätzlich wurde ein fünfter Peak detektiert, dessen korrigierte Migrationszeit von 1.05 gut mit p Ψ -Bodipy (1.06) übereinstimmt. Die Analyse einer Mischung aus dem Reaktionsansatz der Drosophila-RNA und des Oligoribonukleotids U1, das Ψ enthält, ergab an der fraglichen Stelle im Elektropherogramm ein Signal, was ebenfalls für p Ψ -Bodipy spricht. Daneben sind vor allem im Bereich des prC-Bodipys noch einige kleinere Signale im Elektropherogramm zu erkennen, die vermutlich von weiteren, bisher nicht identifizierten, modifizierten Ribonukleosiden stammen. Die Auswertung der korrigierten Flächen der einzelnen Signale unter Verwendung der in Tabelle 29 berechneten Korrekturfaktoren ergab die folgende RNA-Zusammensetzung (s. Tab 30).

Gesamt RNA	Messung (%)	Korrekturfaktor	Berechnet (%)
Drosophila	(n = 5)		
rA	44.32 ± 0.37	0.732 ± 0.004	31.89 ± 0.30
rU	21.45 ± 0.29	1.151 ± 0.011	24.27 ± 0.35
rC	22.05 ± 0.21	0.772 ± 0.013	16.73 ± 0.15
rG	10.45 ± 0.24	2.504 ± 0.069	25.72 ± 0.56
Ψ	1.45 ± 0.01	0.968 ± 0.029	1.38 ± 0.01

Tab. 30: Auswertung der CE-LIF-Analyse von Drosophila melanogaster Gesamt-RNA

Folglich besteht Drosophila-RNA zum größten Teil aus rA (ca. 32%), rU und rG sind mit ungefähr 25% etwa gleich häufig, rC ist mit 17% am wenigsten vertreten. Das Signal des Ψ -Bodipy ist mit 1.4% der Gesamtfläche klar die häufigste modifizierte Base.

In einer weiteren Untersuchung wurde mit den selben Analysenbedingungen humane Gesamt-RNA aus Leber und Niere von zwei verschiedenen Personen untersucht (BD Bioscience, Heidelberg). Die CE-LIF-Analyse enthielt ebenfalls die Signale der vier normalen Ribonukleoside und des Ψ (Abb. 52).



Abb. 52: CE-LIF-Analyse von Gesamt-RNA aus humaner Leber. Trennbedingungen wie in Tab. 24 angegeben. Verdünnung 1:1000 mit Wasser

Gesamt RNA	Messung (%)	Korrekturfaktor	Berechnet (%)
Leber (human)	(n = 7)		(, .)
rA	28.51 ± 1.64	0.732 ± 0.004	19.52 ± 1.23
rU	14.12 ± 0.76	1.151 ± 0.011	15.20 ± 0.89
rC	39.53 ± 1.37	0.772 ± 0.013	28.54 ± 0.93
rG	15.07 ± 0.85	2.504 ± 0.069	35.27 ± 1.19
Ψ	1.62 ± 0.08	0.968 ± 0.029	1.46 ± 0.20

Tab. 31: Auswertung der CE-LIF Analyse von Gesamt-RNA aus humaner Leber

Gesamt-RNA aus humaner Niere wurde auf die gleiche Weise untersucht. Für die CE-LIF-Analyse wurde jedoch ein 18mM Natriumphosphat-Puffer mit einem pH von 8.5 eingesetzt, was die Analysenzeit etwas verlängerte, die Trennung der einzelnen Peaks hingegen verbesserte (Abb. 53).



Abb. 53: CE-LIF-Analyse von humaner Gesamt-RNA aus Niere. Trennbedingungen: 18mM Natriumphosphat pH 8.5, 90mM SDS, 10% Methanol (v/v), 20kV; Verdünnung 1:1000 mit Wasser

Die Auswertung der Peakflächen ergab im Rahmen der Fehlergenauigkeit identische Werte wie für die Gesamt-RNA aus Leber (s. Tab. 32).

Gesamt RNA	Messung (%)	Korrekturfaktor	Berechnet (%)
Niere (human)	(n = 7)		
rA	28.61 ± 1.73	0.732 ± 0.004	19.58 ± 1.28
rU	14.11 ± 0.79	1.151 ± 0.011	15.18 ± 0.92
rC	38.82 ± 1.28	0.772 ± 0.013	28.01 ± 1.01
rG	15.25 ± 0.85	2.504 ± 0.069	35.68 ± 1.56
Ψ	1.70 ± 0.08	0.968 ± 0.029	1.54 ± 0.08

Tab. 32: Auswertung der CE-LIF-Analyse von Gesamt-RNA aus humaner Niere

Im Elektropherogramm ist deutlich die bessere Auflösung der einzelnen Signale zu sehen. Alleine neben dem prC-Bodipy sind nun mindestens drei kleinere Signale zu beobachten. Leider konnte das Signal bei etwa 26.5min, mit einem Anteil an der Gesamtfläche von ca. 1%, bisher noch nicht identifiziert werden.

Der Vergleich der Flächenanteile für die einzelnen Bodipy-Konjugate der prNs zwischen Drosophila-RNA (Tab. 30) und den beiden humanen Gesamt-RNAs (Leber und Niere) (Tab. 31 u. 32) zeigte jedoch erhebliche Unterschiede. Im Falle der humanen Gesamt-RNAs ist das Signal des prC-Bodipys deutlich am größten, gefolgt von prA-Bodipy. Die quantitative Auswertung ergibt jedoch, dass prG das am häufigsten vorkommende Nukleotid ist, dann folgen prC, prA und prU. Im Gegensatz dazu ist bei der Drosophila Gesamt-RNA das prA-Bodipy sowohl das höchste Signal als auch das am häufigsten vorkommende Nukleotid, gefolgt von prU und prG. Ψ ist in Drosophila Gesamt-RNA und in den humanen Gesamt-RNAs etwa in gleicher Menge enthalten. Daneben sind in den humanen Gesamt-RNAs noch mehrere kleinere Signale im Bereich des prC-Bodipys (ab 19min) zu erkennen, die in den Analysen der Drosophila-RNA nicht zu erkennen sind.

tRNA ist der mit Abstand am höchsten modifizierte RNA-Typ, weshalb ein natives Gemisch aller 20 tRNAs von *Saccharomyces cerevisiae* mit der Fluoreszenz-Postlabeling-Technik untersucht wurde. Dazu wurden 10µg tRNA hydrolysiert, markiert und kapillarelektrophoretisch analysiert. Bereits unter den normalen Trennbedingungen (18mM Natriumphosphat, pH 9.0, 90mM SDS, 10% Methanol, 20kV) waren deutlich mehr Nebenpeaks zu beobachten (nicht gezeigt).

Das Signalmuster entsprach in etwa dem humaner Gesamt-RNA, obwohl diese hauptsächlich aus rRNA besteht. Das prC-Bodipy war das höchste Signal im Elektropherogramm, und auch die bei den CE-LIF-Analysen der humanen Gesamt-RNAs beobachteten Nebenpeaks waren deutlich stärker ausgeprägt. Zusätzlich konnten um die Signale von p Ψ -Bodipy und prU-Bodipy weitere kleinere Signale nachgewiesen werden.

Um die Selektivität der kapillarelektrophoretischen Trennung zu verbessern, wurde wieder Glukose als zusätzlicher Bestandteil des Trennpuffers verwendet. Dies führte zwar nicht zu einer vollständigen Basislinientrennung aller Signale, es konnten aber vier neue Signale, die vermutlich von modifizierten RNA-Basen stammen, detektiert werden (s. Abb. 54). Die drei größten dieser Signale (P1-P3) wurden bei der Auswertung der CE-LIF-Analyse berücksichtigt (s. Tab. 33), obwohl die unvollständige Trennung zu merklich höheren Standardabweichungen führte.



Abb. 54: CE-LIF-Analyse von tRNA aus *Saccharomyces cerevisiae*. Trennbedingungen: 18mM Natriumphosphat, pH 9.0, 90mM SDS, 10% Methanol (v/v), 1M Glukose, 20kV

tRNA Saccharomyces	rA	rU	rC	rG	Ψ	P1	P2	P3
Fläche (%) (n = 3)	25.88	15.65	32.83	12.34	4.35	1.54	1.88	5.52
Stabw.	0.69	0.56	0.57	0.22	0.19	0.21	0.16	0.38
rel. Stabw.	2.67	3.60	1.72	1.79	4.39	13.73	8.30	6.92

Tab. 33: Auswertung der CE-LIF-Analyse von tRNA aus *Saccharomyces cerevisiae* (Angaben in % der Gesamtfläche, n = 3)

Wendet man die Korrekturfaktoren aus Tabelle 29 auf die fünf bereits untersuchten prN-Bodipy Konjugate an, so ergibt sich mit ca. 31% der höchste Anteil für prG, gefolgt von prC mit etwa 25%, prA und prU sind mit 18 bzw. 19% etwa gleich häufig vertreten. Der für p Ψ -Bodipy ermittelte Wert (4.35%) ist deutlich höher als in den zuvor untersuchten Gesamt-RNAs (1.74%). Dies war auch so zu erwarten, da Gesamt-RNA zu 70% aus der deutlich geringer modifizierten rRNA besteht. So lässt sich auch die hohe Anzahl an neuen Signalen erklären. Die drei neuen Signale haben einen Anteil an der Gesamtfläche (ohne Korrekturfaktoren) von ca. 1.5 bis 5.5%. Peak 3 (P3) ist sogar größer als das Ψ -Bodipy, es könnte sich beispielsweise um das 5-Methylcytosin handeln. In der Regel sind etwa 10% aller Basen in den verschiedenen tRNAs verändert, in der Phenylalanin tRNA der Hefe (*Saccharomyces*) sind es sogar 14.5%. Neben 2x Ψ sind auch 5-Methylcytosin und Dihydrouracil je zweimal vertreten [145]. Addiert man die Peakflächenanteile (ohne Verwendung von Korrekturfaktoren) von Ψ und der neuen Peaks 1-3 der untersuchten tRNA aus *Saccharomyces*, so ergibt sich ein Anteil der Gesamtfläche von 13.3%, was mit den Literaturdaten gut übereinstimmt.

4.6 Weiterentwicklung der 3'-Variante der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode

Die 3'-Variante der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode ist seit der ersten Beschreibung von *Schmitz et al.* [16] nun schon mehrere Jahre in Gebrauch, und daher weiter entwickelt als die von mir neu beschriebene 5'-Variante zur Fluoreszenzmarkierung von pdNs und prNs mit BODIPY-FL-EDA. So wird die 3'-Methode bereits routinemäßig zur Bestimmung des Cytosin-Methylierungsgrades in Tumorproben eingesetzt [146] und kommt mit DNA Mengen von 100ng aus [114], was zur Untersuchung von Biopsien des Menschen ausreicht.

Außerdem wurden einige DNA-Addukt-Standards als Nukleosid-3'-Phosphate für ³²P-Postlabeling-Analysen synthetisiert, die auch für die Markierung mit BODIPY-FL-EDA zur Verfügung stehen. Aus diesem Grund lag es nahe, Untersuchungen zur Detektion von großvolumigen ("bulky") DNA-Addukten mit der 3'-Variante der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode durchzuführen. *Schmitz et al.* [16] gelang es verschiedene DNA-Addukte der Aristolochiasäure (AA) aus *in vitro* behandelter CT-DNA nach Verdau zu dNps, Fluoreszenzmarkierung mit BODIPY-FL-EDA und anschließender CE-LIF-Analyse nachzuweisen. Mit der selben Methode waren auch DNA-Addukte des B[a]P nach Umsetzung des ultimalen Metaboliten mit dGp detektierbar. Problematisch bei diesen Analysen war, dass immer mehrere zusätzliche fluoreszierende Signale erhalten wurden, die nicht vollständig spektroskopisch charakterisiert und somit nicht eindeutig den AA- bzw. B[a]P-Addukten zugeordnet werden konnten.

4.6.1 Analyse von 2'-Desoxynukleosid-3'-Phosphat-Addukt-Standards

4.6.1.1 Analyse von Aminobiphenyl-Addukten

4-Aminobiphenyl (4-ABP, s. Abb. 55) ist eine humantoxikologisch relevante Substanz, die vor allem im Tabakrauch und in Produkten der Farbstoff- und Gummiindustrie vorkommt. Die IARC hat 4-ABP in die Kategorie 1, nachgewiesenermaßen krebserzeugend beim Menschen, eingestuft (s. Theorie 2.3.1.2).



Abb. 55: Strukturformel des 4-Aminobiphenyls

Von 4-Aminobiphenyl sind mehrere Reaktionsprodukte mit DNA-Basen bekannt. Nach metabolischer Aktivierung werden in vivo hauptsächlich Addukte an der C8-Position des Adenins und Guanins gebildet, wobei das N-(Desoxyguanosin-8-yl)-4-aminobiphenyl (dG-C8-4-ABP) das Hauptaddukt darstellt (1 in Abb. 56) [147]. Ein weiteres inzwischen identifiziertes 2'-Desoxyguanosin-Addukt entsteht durch den Angriff des durch metabolische der N²-Position gebildeten Nitrenium-Ions an [148]. Für Aktivierung die Markierungsversuche mit BODIPY-FL-EDA standen diese beiden von Haack et al. [149] synthetisierten und vollständig charakterisierten Addukte (MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, ³¹P-NMR) des dGps zur Verfügung (s. Abb. 56).



Abb. 56: Strukturformeln von N-(Desoxyguanosin-8-yl)-4-aminobiphenyl-3'-Phosphat (dGp-C8-4-ABP (1) und N-(Desoxyguanosin-N²-yl)-4-aminobiphenyl-3'-Phosphat (dGp-N²-4-ABP) (2)

Von beiden Standardverbindungen, die nach der chromatographischen Aufreinigung als Tetrabutylammonium-Salze vorlagen, wurden Stammlösungen (3.08nmol/µl) in Wasser erstellt. Die Löslichkeit des N²-4-ABP-Adduktes in Wasser war deutlich besser als die des C8-4-ABP-Adduktes. Untersuchungen der Stammlösungen mit der ³²P-Postlabeling-Methode nach Verdünnung mit CT-DNA zeigten die von *Haack et al.* beschriebenen Addukt-Flecken in der gewünschten Stärke, womit die Identität der Addukte und die Konzentration der Stammlösungen bestätigt werden konnte.

Aliquots von 30.8nmol ($\approx 23.3\mu g$) wurden dann entsprechend der etablierten Standardmethode (s. Tab. 10) mit BODIPY-FL-EDA derivatisiert und mit Kapillarelektrophorese und Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion analysiert. Zum Vergleich wurden auch 30.8nmol dGp fluoreszenzmarkiert und nach 1:1000 Verdünnung mit Wasser mit CE-LIF analysiert. Dabei wurde ein Signal von ca. 5-6 relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) mit einer Migrationszeit von ca. 24min erhalten, das dem dGp-Bodipy entsprach (ca. 50 RFU bei 1:100 Verdünnung mit Wasser). Die Höhe der entsprechenden Peaks der beiden Addukt-Standards wurde in der gleichen Größenordnung erwartet, und zwar im Zeitfenster von ca. 15-20min, da die bisher auf diese Weise analysierten, großvolumigen Addukte (B[a]P, Aristolochiasäure [16]) alle vor dem Signal des dAp-Bodipy detektiert wurden.

Bereits während der Markierungsreaktion beider 4-ABP-Standardverbindungen traten jedoch Probleme in Form tiefroter Ausfällungen auf. Der Ansatz wurde daher nach Beendigung der Reaktion (25h) kurz zentrifugiert und 1:100 mit Wasser verdünnt. Die anschließende CE-LIF-Analyse des Reaktionsansatzes zeigte für beide 4-ABP-Addukte keine Signale im erwarteten Bereich. Abbildung 57 zeigt ein typisches Elektropherogramm für die CE-LIF-Analyse eines Reaktionsansatzes von dGp-C8-4-ABP.



Abb. 57: CE-LIF-Analyse des Reaktionsansatzes von dGp-C8-4-ABP mit BODIPY-FL-EDA nach 1:100 Verdünnung mit Wasser. Trennbedingungen: 18mM Natriumphosphat, 10% Methanol (v/v), 90mM SDS, 20kV

Lediglich die Peaks im Bereich um 30min konnten den bekannten Abbauprodukten des Bodipys zugeordnet werden. Natürlich bestand die Möglichkeit, dass die durch den Aminobiphenyl-Rest lipophilen Addukte durch die Konjugation mit BODIPY-FL-EDA im Wässrigen nicht mehr ausreichend löslich und ausgefallen waren. Daher wurden die Präzipitate der Markierungsreaktionen in Methanol bzw. DMSO gelöst und danach mit CE- LIF analysiert. Auch diese Untersuchungen förderten keine Signale zu Tage, die größer als 2 RFU waren. In weiteren Versuchen wurden 30.8nmol der Standards in 10µl DMSO gelöst (anstelle von H₂O) und dann mit BODIPY-FL-EDA und EDC in HEPES-Puffer umgesetzt (Tab. 10). Auf diese Weise konnten die Ausfällungen während der Derivatisierung reduziert werden, die anschließende CE-LIF-Analyse erbrachte jedoch keine neuen Signale. Da die dGp-4-Aminobiphenyl-Addukte direkt nach den NMR-Untersuchungen verwendet wurden, ist es unwahrscheinlich, dass sich die Verbindungen in der kurzen Zeit zersetzt haben. In der Literatur sind keine Berichte über Instabilitäten zu finden, und auch wiederholte ³²P-Postlabeling-Analysen bestätigten, dass die verwendeten Standards intakt waren.

Mögliche Erklärungen für das Fehlen der Fluoreszenzsignale der dGp-4-ABP Addukt-Standards in der CE-LIF Analyse sind:

- 1. Die Standards liegen als Tetrabutylammonium-Salze vor.
- 2. Sterische Probleme verhindern die Derivatisierung mit BODIPY-FL-EDA.
- 3. Fluoreszenzquenching-Effekte des Bodipys durch den Aminobiphenyl-Rest.

Zu 1.: Aus Vorversuchen war bekannt, dass Tetrabutylammoniumchlorid (TBA) störende Einflüsse auf die Derivatisierungsreaktion mit BODIPY-FL-EDA hat. Da die Addukt-Standards durch die Aufreinigung (HPLC-Ionenpaar-Chromatographie) als TBA-Salze vorliegen (lt. NMR etwa im Verhältnis 1:1), lag es nahe, dass hier eine Ursache für die Derivatisierungsprobleme liegt. Daher wurden sowohl TBA alleine (30.8nmol in 10µl Wasser), TBA gemischt mit dGp (je 30.8nmol in Wasser) und die Negativkontrolle, die nur Wasser enthielt nach den Standardbedingungen (Tab. 10) fluoreszenzmarkiert, die Ansätze 1:100 mit Wasser verdünnt und analysiert. Nur die CE-LIF-Analyse des Reaktionsansatzes der 1:1 Mischung von dGp und TBA ergab einen Unterschied zur Negativkontrolle (Wasser), nämlich das Signal des dGp-Bodipy in der erwarteten Höhe von etwa 60RFU (nicht gezeigt). In keinem der beiden Reaktionsansätze traten die bei den 4-ABP-Addukten beobachteten Ausfällungen auf, so dass TBA als Einflussfaktor auf die Analyse ausgeschlossen wurde. Um auszuschließen, dass sich noch andere Substanzen in den Stammlösungen der ABP-Addukt Standards befinden, die die Markierungsreaktion mit BODIPY-FL-EDA behindern, wurden je 15.4nmol der beiden Standards mit je 15.4nmol dGp gemischt (gesamt 30.8nmol) und mit BODIPY-FL-EDA derivatisiert. Der Reaktionsansatz wurde anschließend 1:100 mit Wasser verdünnt und kapillarelektrophoretisch analysiert.

Abbildung 58 zeigt exemplarisch das Ergebnis der beiden Versuche. Neben dem Signal des dGp-Bodipy bei ca. 24min mit 63RFU-Einheiten ist noch ein kleines Signal bei etwa 14.5min zu erkennen, das aber nachweislich aus der Reaktion des dGps mit BODIPY-FL-EDA stammt. Somit verhindern weder TBA noch andere Bestandteile der Aminobiphenyl-dGp-Addukt Standard-Lösungen die Konjugation mit dem Fluoreszenzmarker.

Das Signal bei 26min stimmt mit dem Hauptsignal aus Abb. 57 überein und bleibt damit der einzige Kandidat für ein mögliches dGp-C8-4-ABP-Bodipy Konjugat, auch wenn es 100mal kleiner ist als erwartet.



Abb. 58: CE-LIF-Analyse des Reaktionsansatzes von 15.4nmol dGp-C8-4-ABP und 15.4nmol dGp mit BODIPY-FL-EDA nach 1:100 Verdünnung mit Wasser. Trennbedingungen: 18mM Natriumphosphat, pH 9.0, 10% Methanol (v/v), 90mM SDS, 20kV

Zu 2.: Sterische Einflüsse des voluminösen 4-Aminobiphenyl-Restes am dGp auf die Kopplungsreaktion mit BODIPY-FL-EDA sind nicht auszuschließen. Der Hypothese steht aber entgegen, dass bereits voluminöse Addukte des B[a]P mit der 3'-Variante der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode nachgewiesen wurden, ebenso wie Addukte der Aristolochiasäure [16]. Ferner haben *Giese et al.* bereits mit der von ihnen entwickelten

Fluoreszenz-Postlabeling-Methode C8-[N-Acetyl-N-(2-fluorenyl)]amino-2'-Desoxyguanosin-5'-Phosphat (AAF-pdG) mit Bodipy-IMI markiert und mit CE-LIF nachgewiesen [14].

<u>Zu 3.</u>: Ein weiteres Problem für die Detektion der 4-Aminobiphenyl-dGp-Addukt-Bodipy-Konjugate kann die bekannte Empfindlichkeit der Bodipy-Farbstoffe gegenüber Fluoreszenzlöschungseffekten (Quenching) sein. Wie bereits gezeigt, haben vor allem die Bodipy-markierten Guanine (prG-, pdG- und dGp-Bodipy) deutlich schlechtere Fluoreszenz-Quantenausbeuten als die anderen normalen Nukleotide. Für die dNp-Bodipy-Konjugate wurden die Quantenausbeuten bereits an massenspektrometrisch charakterisierten Standardverbindungen bestimmt (s. Tab. 34).

 Tab. 34:
 Spektroskopische Eigenschaften der BODIPY-FL-EDA-markierten 2'-Desoxynukleosid-3'

 Phosphate

Verbindung	$\lambda_{ex} \left[nm \right]$	$\lambda_{em} \left[nm \right]$	$OD(\lambda_{ex})$	$\int_{500-720} (FS)$	rel. QA	normiert
dAp-Bodipy	495	516	0.0506	14338	283359.68	100%
dCp-Bodipy	495	516	0.0456	12632	277626.37	98%
dGp-Bodipy	495	516	0.0390	6106	156564.10	55%
Tp-Bodipy	495	516	0.0503	13783	274015.90	97%

 λ_{ex} = Extinktionsmaximum; λ_{em} = Emissionsmaximum; OD(λ_{ex}) = optische Dichte der 1µM-Lösungen am Extinktionsmaximum; $\int_{500-720}$ (FS) = Integral des Fluoreszenzsignals von 500-720nm; rel. QA = relative Quantenausbeute; modifiziert nach [112]

Neben den Nukleobasen, und hier insbesondere Guanin und seine Analoga (7-Deazaguanin, 7-Deazaxanthosin), ist auch bekannt, dass die Aminosäure Tryptophan die Fluoreszenz von BODIPY zu löschen vermag [150]. Verantwortlich hierfür ist die Ausbildung eines nur schwach fluoreszierenden Grundzustand-Komplexes ("koplanares stacking") des Fluoreszenzfarbstoffes mit Tryptophan [150]. Die Ausbildung solcher Komplexe bestehend aus BODIPY-Farbstoffen und polyzyklischen Kohlenwasserstoffen ist bekannt und auch für andere, ähnlich aufgebaute Moleküle wie z. B. 4-ABP zu erwarten [Sauer, pers. Mitteilung]. Solch eine Wechselwirkung ist vor allem dann denkbar, wenn BODIPY-Farbstoff und Löscher in einem Molekül vereint sind, d. h. sich räumlich sehr nahe stehen, so dass diese intramolekulare Interaktion während des kurzen angeregten Zustandes mit hoher Wahrscheinlichkeit eintritt. Außerdem ist zu bedenken, dass die Umgebung der Moleküle während der CE-Trennung eher wässrig ist, demnach eine Aggregation der lipophilen Molekülteile begünstigt wird. Voraussetzung hierfür ist allerdings, dass es die Beweglichkeit der chemischen Bindungen der dGp-4-ABP-Bodipy Konjugate erlaubt, dass sich der Fluorophor (BODIPY) und das Aminobiphenyl entsprechend zusammenlagern.

Zur Ermittlung der Fluoreszenzquantenausbeuten der Bodipy-Konjugate von DNA-Addukten wie dGp-4-ABP müssen diese in ausreichender Menge hergestellt werden, was schon aus finanziellen Gründen problematisch ist. Allerdings kann die Beeinflussung der Fluoreszenz von BODIPY-FL-EDA innerhalb der DNA-Addukt-Konjugate in erster Näherung auch dadurch abgeschätzt werden, dass man anstelle der intramolekularen die intermolekulare Beeinflussung untersucht.

4.6.1.2 Fluoreszenzspektroskopie von BODIPY-FL-EDA

Um den Einfluss verschiedener Substanzen auf die Fluoreszenzeigenschaften von freiem BODIPY-FL-EDA zu ermitteln, wurde der Fluoreszenzmarker in einer, gut mit einem Fluoreszenzspektrometer messbaren, Konzentration (1µM) in Wasser vorgelegt, und dann die zu untersuchende Substanz in steigender Konzentration zugegeben. Um zu gewährleisten, dass mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit ein Zusammenstoß zwischen fluoreszierendem Molekül im angeregten Zustand und Substanzmolekül erfolgt, wird mit einem 1000fachen Überschuss an Substanz (also 1mM) begonnen. Mit diesen einfachen Experimenten sind Trend-Aussagen über eventuelle Löscheffekte möglich. Da dabei Stammlösungen der vermuteten Quencher von 100mM nötig sind, die meisten interessanten Karzinogene (DNA-Addukt-Bildner) aber lipophile aromatische Kohlenwasserstoffe sind, die in Wasser nahezu unlöslich sind, sind solche Konzentrationen unmöglich. Messungen in organischen Lösungsmitteln sind ungeeignet, da hier die Zusammenlagerung von BODIPY-FL-EDA mit dem Kohlenwasserstoff durch das lipophile Milieu verhindert wird, und so den Gegebenheiten der wässrigen CE-LIF-Trennung nicht entspricht.

Um die Übertragbarkeit der Ergebnisse des intermolekularen Quenchings auf die intramolekular bei der CE-LIF-Analyse beobachteten Effekte zu prüfen, wurden Vorversuche mit zwei 2'-Desoxynukleosid-5'-Phosphaten (pdG und pdC) durchgeführt. Es sollte dabei ein Unterschied in der Beeinflussung der Fluoreszenz des BODIPYs zwischen dem bekannten Quencher pdG und dem nicht quenchenden pdC zu beobachten sein. Die Versuche wurden mit einem Cary Eclipse Fluoreszenzspektrometer (Varian, Darmstadt) am Physikalisch Chemischen Institut der Universität Heidelberg durchgeführt. Es wurde 1ml der 1µM

BODIPY-FL-Lösung in Wasser vorgelegt und zunehmende Mengen einer 100mM Stammlösung des jeweiligen pdNs zugegeben, so dass ein Konzentrationsbereich von 1mM pdN bis 37.5mM pdN abgedeckt wurde. Die Anregungswellenlänge betrug 465nm, das Fluoreszenzspektrum wurde von 470 bis 650nm aufgezeichnet und das Emissionsmaximum in Fluoreszenzeinheiten als Maß der Fluoreszenz gemessen. Die von der normalerweise bei den CE-LIF Analysen abweichende Anregungswellenglänge von 465nm (sonst 488nm) wurde gewählt, da bei der verwendeten BODIPY-FL-EDA Konzentration genau bei dieser Wellenlänge die Detektorsensitivität des Fluoreszenzspektrometers voll ausgeschöpft wurde. Die Ergebnisse wurden dann noch auf Grund der Volumenzunahme durch die Zugabe der untersuchten (quenchenden) Substanz korrigiert. Im einfachsten Fall wird die gemessene Fluoreszenz gegen die Konzentration des Quenchers aufgetragen und im Falle einer Nichtbeeinflussung eine Gerade parallel zur x-Achse erhalten. Dies ist beim pdC auch tatsächlich so zu beobachten (Abb. 59, links). Im Gegensatz dazu kann mit steigender Konzentration an pdG eine Abnahme der Fluoreszenz von BODIPY-FL-EDA beobachtet werden (Abb. 59, rechts).



Abb. 59: Ergebnisse der Fluoreszenuntersuchungen von BODIPY-FL-EDA in Gegenwart von pdC und pdG. (Der Knick am Anfang der Kurve für pdC ist gerätebedingt, häufig ergeben sich nach der ersten Zugabe der Testsubstanz noch Verschiebungen der Messküvette, die zu Ausreißern führen.)

Eine andere, in der Literatur häufiger gewählte Auswertungsart, ist der sog. Stern-Volmer Plot. Dabei wird die Ausgangsintensität der Lösung ohne Quencher (I₀) durch die gemessene Intensität bei Anwesenheit einer bestimmten Konzentration des Quenchers (I) geteilt und gegen die Konzentration des Quenchers (mM) aufgetragen. Je größer die Steigung der erhaltenen Kurve, desto stärker ist der löschende Einfluss der Substanz. Verwendet man diese Art der Auswertung (s. Abb. 60), ergeben sich prinzipiell keine neuen Erkenntnisse, es wird lediglich deutlich, dass die Abhängigkeit des pdG-Quenchings nahezu linear ist ($r^2 = 0.999$).



Abb. 60.: Stern-Volmer Diagramm der Fluoreszenzquenching Untersuchungen von BODIPY-FL-EDA in Gegenwart von pdC und pdG.

Da analoge Untersuchungen mit 4-ABP und B[a]P, zwei Verbindungen deren DNA-Addukte bereits mit der 3'-Variante der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode untersucht wurden, wegen Unlöslichkeit in diesem wässrigen System nicht möglich waren, wurden die Quenching-Effekte von Aristolochiasäure und Hexenal bestimmt. Durch die Carbonsäuregruppe ist Aristolochiasäure als Natrium-Salz in Wasser besser löslich (bis ca. 50mM) als die polycyclischen Kohlenwasserstoffe, ist ihnen aber strukturell (Phenanthren) ähnlich (Abb. 61, (3)). Trans-2-Hexenal, ein α - β -ungesättigter Aldehyd (s. Einleitung), bildet mit Guanin stereoisomere exocyclische 1-N²-Propano-Addukte folgender Struktur (Abb. 61, (6) und (7)). Auch die DNA-Addukte dieser beiden Substanzen wurden bereits mit BODIPY-FL-EDA fluoreszenzmarkiert und mit CE-LIF nachgewiesen [16].



Abb. 61: Strukturformeln von Aristolochiasäure I Na-Salz (3) und dem Haupt-DNA-Addukt mit 2'-Desoxyadenosin-3'-Phosphat (dAp-Aristolactam I (4)); Strukturformeln von Trans-2-Hexenal (5) und dessen Guanin-Addukten 1-N²-Propano-2'-Desoxyguanosin-3'-Phosphat (Hex-dGp-1 und 2) (6 und 7)

Die chemische Struktur von Trans-2-Hexenal ließ nicht erwarten, dass durch die Zugabe zu BODIPY-FL-EDA ein Einfluß auf die Fluoreszenz zu beobachten sein würde. Diese Vorhersage wurde auch bestätigt (Abb. 62), für Aristolochiasäure hingegen wurden sehr überraschende Ergebnisse erhalten.



Abb. 62: Ergebnisse der Fluoreszenzuntersuchungen von Trans-2-Hexenal und Aristolochiasäure. (Der Knick am Anfang der Kurve für Hexenal ist gerätebedingt, häufig ergeben sich nach der ersten Zugabe der Testsubstanz noch Verschiebungen der Messküvette, die zu Ausreißern führen.)

Bereits ab einer Konzentration von 3mM Aristolochiasäure war praktisch kein Fluoreszenzmaximum mehr zu erkennen und ab etwa 6mM war die Fluoreszenz des BODIPY-FL-EDA vollständig gelöscht (s. Abb. 62). Damit ist Aristolochiasäure eine der am stärksten quenchenden Substanzen in Bezug auf BODIPY-Farbstoffe, die je entdeckt wurden.

Die Ergebnisse der Fluoreszenzuntersuchungen stimmen gut mit den bei den CE-LIF-Analysen gemachten Beobachtungen überein. Besonders die beiden Nukleotide pdC und pdG zeigen das erwartete Fluoreszenzverhalten. Während pdC keinen löschenden Einfluss auf BODIPY-FL-EDA ausübt, ist dieser Effekt bei pdG deutlich ausgeprägt. Ebenso bestätigte sich in weiteren Versuchen die Erwartung, dass die DNA-Addukte des Trans-2-Hexenals mit dGp mit der CE-LIF Methode nachzuweisen sind (s. 4.6.2). Im Gegensatz dazu ist zu erwarten, dass es beim Nachweis der DNA-Addukte der Aristolochiasäure mit beiden Fluoreszenz-Postlabeling-Methoden zu Problemen durch Fluoreszenz-Quenching-Effekte kommt.

4.6.2 Untersuchung des 1,N²-Propano-2'-Desoxyguanosin Adduktes von Trans-2-Hexenal mit der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode

Dieses DNA-Addukt wird durch eine Michael-Addition von Trans-2-Hexenal mit Guanin gebildet und war auch in verschiedenen Organen der Ratte nach oraler Verabreichung von Trans-2-Hexenal nachweisbar [151]. Für meine Untersuchungen mit der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode standen einige Mikrogramm des 1,N²-Propano-2'-Desoxyguanosin-3'-Phosphat-Adduktes (Hex-dGp-2 siehe Abb. 61) als vollständig spektroskopisch

charakterisierter Standard [152] zur Verfügung (Prof. Eder, Würzburg). 10µg des Hex-dGp-2 Standards wurden wie in Tabelle 10 beschrieben mit BODIPY-FL-EDA fluoreszenzmarkiert, 1:1000 mit Wasser verdünnt und mit CE-LIF analysiert. Das resultierende Elektropherogramm (Abb. 63) zeigte ein Hauptsignal bei 26min, welches dem Hex-dGp-2 zugeordnet wurde und ein deutlich kleineres Signal bei 25min, welches wahrscheinlich das bei der HPLC-Reinigung nicht vollständig abgetrennte Diastereomer Hex-dGp-1 ist [152].



Abb. 63: CE-LIF-Analyse von fluoreszenzmarkiertem Hex-dGp-2. Trennbedingungen: 18mM Natriumphosphat, pH 9.0, 10% Methanol (v/v), 90mM SDS, 20kV

Da die erhaltene Signalhöhe von Hex-dGp-2-Bodipy (12RFU) sogar höher als die für die gleiche Menge dGp (7-8RFU) ist, kann man davon ausgehen, dass sich das Hexenal-dGp Addukt in Bezug auf die Effizienz der Fluoreszenzmarkierung und die Fluoreszenz-Quantenausbeute des Bodipy-Konjugates ähnlich verhält wie das unmodifizierte dGp, und eventuell sogar weniger quencht. Nebenreaktionen und Ausfällungen während der Derivatisierung mit BODIPY-FL-EDA wurden ebenfalls nicht beobachtet, auch die 1:1 Mischung des Standards mit dGp und anschließende Fluoreszenzmarkierung mit BODIPY-FL-EDA führte zu den erwarteten Intensitäten der beiden Hauptsignale. Abschließend wurde eine mit MN/SPD zu dNps verdaute und mit BODIPY-FL-EDA markierte CT-DNA mit dem

markierten Hex-dGp-2 Standard aufgestockt, und eine CE-Trennung unter Standardbedingungen (18mM Natriumphosphat, pH 9.0, 10% Methanol (v/v), 90mM SDS, 20kV) durchgeführt. Das Addukt-Konjugat hatte die längste Migrationszeit, da es deutlich lipophiler ist als die anderen dNp-Bodipy-Konjugate und daher stärker mit den Mizellen interagieren kann (Abb. 64). Es läßt sich somit gut abtrennen und quantifizieren.



Abb. 64: CE-LIF-Analyse einer Mischung von fluoreszenzmarkierter CT-DNA nach Verdau mit MN/SPD zu 2'-Desoxynukleosid-3'-Phosphaten und Hex-dGp-2-Bodipy (1:1). Trennbedingungen s. Text

Die Ergebnisse der CE-LIF-Analysen bestätigen in diesem Fall die Ergebnisse der Fluoreszenzlöschungs-Versuche durch Trans-2-Hexenal. Die 1,N²-Propano-Modifikation am Guanin hat keinen zusätzlichen Einfluss auf die Fluoreszenz des Bodipy-Konjugates. Damit kann das DNA-Addukt Hex-dGp-2 mit der gleichen Empfindlichkeit wie dGp detektiert werden. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass es möglich ist, beide Hexenal-Addukte mit der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode in DNA mit der selben Nachweisgrenze wie für dGp (200pM, sechs Addukte in 100 000 normalen Nukleotiden) zu bestimmen. Da Hexenal in vielen Früchten in hoher Konzentration auftritt (Bananen 76ppm) und in Europa und den USA als Aromastoff zugelassen ist, eignen sich die Hexenal-dG-Addukte möglicherweise als ernährungsspezifischer Biomarker. Da Trans-2-Hexenal aber auch in

geringen Konzentrationen durch Autooxidationsprozesse beim Fettsäureabbau gebildet wird, sollte jeder Mensch einen gewissen Hintergrundlevel an diesem Addukt aufweisen [153].

4.6.3 Bestimmung von 8-Oxo-2'-Desoxyguanosin-3'-Phosphat (8-oxo-dGp) in DNA

Nachdem für großvolumige DNA-Addukte einige Probleme hinsichtlich der Detektion durch mögliche Fluoreszenzquenchingeffekte auftraten, sollte geklärt werden, ob solche Effekte auch mit einer kleineren Basenmodifikation wie 8-oxo-dG auftreten. Diese DNA-Modifikation wurde bereits von *Schmitz et al.* [16] mit der 3'-Variante der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode untersucht. Die von mir mit der 5'-Variante der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode durchgeführten Untersuchungen sind in Kapitel 4.4.3.3 beschrieben.

Das von *Schmitz et al.* veröffentlichte Elektropherogramm (Abbildung 65) der Analyse des 20-mer Oligodesoxynukleotides 995298, das zwei 8-oxo-dGs trägt, enthielt neben den normalen dNps zwei zusätzliche Signale, von denen das bei 18min als 8-oxo-dGp-Bodipy identifiziert wurde. Für die Identität des anderen Signales (15min) wurde ein BODIPY-FL-EDA markiertes 2'-Desoxyribose-3'-Phosphat (AP-Stelle), welches durch Depurinierung des 8-oxo-dGp-Bodipys entsteht, vorgeschlagen. Allerdings migriert der als 8-oxo-dGp identifizierte Peak überraschenderweise langsamer als das unmodifizierte dGp-Bodipy. Durch die Keto-Gruppe an der C8-Position ist das 8-oxo-dGp-Bodipy hydrophiler als das dGp-Bodipy und sollte daher schneller wandern, so wie es für das 8-oxo-dG-5'-Phosphat (8-oxo-pdG) von mir beobachtet wurde (s. S. 77).



Abb. 65: aus [16] Verdau des Oligodesoxynukleotides 995298 mit MN/SPD und anschließender Fluoreszenzmarkierung mit BODIPY-FL-EDA, Trennung mit BioFocus3000, 17mM Natriumphosphat, pH 9.0, 75mM SDS, 15% Methanol (v/v), 25kV, Injektion 20x psi·s, Verdünnung 1:10 000 mit Wasser

8-oxo-dGp wurde nach der selben Methode wie das 8-oxo-pdG [138] synthetisiert, eindeutig spektroskopisch charakterisiert (MS, ¹H-NMR) und stand damit für weitergehende Untersuchungen als Standard für die Fluoreszenz-Postlabeling-Methode zur Verfügung. 10μg 8-Oxo-2'-Desoxyguanosin-3'-Phosphat Standard wurden unter Verwendung der in Tab. 10 angegebenen Bedingungen mit BODIPY-FL-EDA derivatisiert, 1:100 mit Wasser verdünnt und mit CE-LIF analysiert.

Das resultierende Elektropherogramm (Abb. 66) zeigt ein Hauptsignal bei etwa 22min und ein Nebensignal bei 23.8 min. Durch Aufstocken mit dem dGp-Bodipy Standard, wurde das kleine Signal als dGp-Bodipy identifiziert und der Peak bei 22min dem 8-oxo-dGp zugeordnet. Um abzuklären, wie stabil der Standard in wässriger Lösung ist, wurde er mehrere Wochen bei Raumtemperatur gelagert. Die anschließende NMR-Analyse brachte kaum Abbauprodukte zum Vorschein.



Abb. 66: CE-LIF-Analyse des 8-Oxo-2'-Desoxyguanosin-3'-Phosphat Standards nach Fluoreszenzmarkierung mit BODIYP-FL-EDA. Trennbedingungen s. Tab. 10

In einem zweiten Schritt wurden je 15.4nmol dGp und 8-oxo-dGp gemischt, gemeinsam mit BODIPY-FL-EDA fluoreszenzmarkiert (Bedingungen s. Tab. 10) und mit CE-LIF untersucht.

Das Elektropherogramm (Abb. 67) bestätigt die Zuordnungen aus Abb. 66. Das kleine Signal bei 15min stammt von einer Verunreinigung des verwendeten dGp. Wie auch schon bei den 5'-Phosphaten beobachtet, ist das Signal des 8-oxo-dGp-Bodipys trotz äquimolarer Mengen kleiner als das des dGp-Bodipys. Das Verhältnis der korrigierten Peakflächen zueinander beträgt ca. 30:70 (8-oxo-dGp:dGp, Faktor 2.3). Damit ist der Unterschied zwischen den beiden Peakflächen etwas größer als für die entsprechenden 5'-Phosphate 8-oxo-pdG und pdG, so dass die Vermutung nahe liegt, dass 8-oxo-dGp noch schlechter fluoreszenzmarkiert wird als 8-oxo-pdG bzw. eine schlechtere Fluoreszenzquantenausbeute besitzt als 8-oxo-pdG-Bodipy.



Abb. 67: CE-LIF-Analyse einer gemeinsamen Derivatisierung von 8-oxo-dGp und dGp nach 1:100Verdünnung mit Wasser, Trennbedingungen s. Tab 10

Um den Einfluß von 8-oxo-dGp-Bodipy auf das Signalmuster der normalen dNp-Bodipy Konjugaten in der CE-LIF Analyse zu bestimmen, wurde Lachssperma-DNA (Salmon Testes DNA, ST-DNA) mit MN/SPD unter den Standardbedingungen aus Tabelle 10 zu dNps verdaut und fluoreszenzmarkiert. Der Derivatisierungsansatz wurde mit dem Ansatz des 8oxo-dGps im Verhältnis 10:1 gemischt, 1:100 mit Wasser verdünnt und analysiert (Trennbedingungen: 18mM Natriumphosphat-Puffer, pH 9.0, 10% Methanol (v/v), 90mM SDS, 20kV). Wie das Elektropherogramm (Abb. 68) zeigt, wurde das Signal vor dem dAp-Bodipy auf Grund seiner normierten Migrationszeit (0.964) und Signalintensität als 8-oxodGp-Bodipy identifiziert. Im Unterschied zur kapillarelektrophoretischen Trennung nach *Schmitz et al.* (Abb. 65) war zwischen Tp-Bodipy und dCp-Bodipy kein Signal zu detektieren.



Abb. 68: CE-LIF-Analyse einer 10:1 Mischung von MN/SPD verdauter und fluoreszenzmarkierter ST-DNA mit 8-oxo-dGp-Bodipy. Trennbedingungen s. Text.

Nachdem diese Analysenprobe aber 24h im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert wurde, enthielt die erneute Analyse neben einer deutlichen Zunahme der Bodipy-Abbauprodukte bei 26-27min auch ein neues Signal zwischen Tp-Bodipy und dCp-Bodipy (Abb. 69).

Möglicherweise ist dies identisch mit dem fälschlicherweise von *Schmitz et al.* [16] dem 8oxo-dGp-Bodipy zugeordneten Signal, welches erst durch längeres Lagern der Probe bei Raumtemperatur, z. B. im Probenraum der CE, entsteht.



Abb. 69: CE-LIF-Analyse der Probe aus Abb. 68 nach Lagerung für 24h bei Raumtemperatur, identische Trennbedingungen

Um den Einfluss der Hydrolyse auf die Analysierbarkeit des 8-oxo-dGps mit der 3'-Variante des Fluoreszenz-Postlabeling-Assays zu untersuchen, wurden die drei 2'-Desoxy-Oligonukleotide mit 8-oxo-dG Modifikation (G*) eingesetzt, die schon mit der 5'-Variante analysiert wurden. Je 10µg der folgenden 2'-Desoxy-Oligonukleotide wurden mit MN/SPD zu dNps verdaut, fluoreszenzmarkiert und nach 1:1000 Verdünnung mit CE-LIF analysiert (Bedingungen s. Tab. 10).

IBA 5:	5' - GAG TCT TCC AG*T GTG ACA CAT - 3'
995297:	5' - AGA-GCG-A G *A-TTC-CAA-TCA - 3'
995298:	5' - GAG-TCT-TCC-AGT- G *T G *-ATG-AT - 3'

In allen Oligonukleotid-Analysen wurde neben den Bodipy-Konjugaten der normalen dNps ein weiteres Signal detektiert, das mit der normierten Migrationszeit des 8-oxo-dGp-Bodipy Standards (0.968) eluierte. Das Elektropherogramm in Abb. 70 zeigt beispielhaft die CE-LIF-Analyse des Oligos Nr. 995298.


Abb. 70: CE-LIF-Analyse von Oligo 995298 nach MN/SPD Verdau und Fluoreszenzmarkierung. Trennbedingungen s. Tab. 10

Die Fläche des 8-oxo-dGp-Bodipy Signals war proportional zum 8-oxo-dG-Gehalt in den Oligonukleotiden. Allerdings war das 8-oxo-dGp-Bodipy-Signal für Oligo 995298 mit ca. 14000 ± 1500 Flächeneinheiten etwa dreimal so groß wie für IBA 5 (4600 ± 700) und Oligo 995297 (4700 ± 900) und nicht, wie eigentlich zu erwarten, doppelt so groß. Die quantitative Auswertung der Oligonukleotid-Analysen erbrachte deutliche Unterschiede zwischen den Oligonukleotiden mit nur einer und mit zwei 8-oxo-dGp Modifikationen. Besonders für die Oligonukleotide IBA 5 und 995297 erhält man hohe Korrekturfaktoren für 8-oxo-dGp von 10.5 und 13.2, während mit Oligo 995298 ein Korrekturfaktor von 6.7 bestimmt wurde, was in etwa dem Korrekturfaktor des 8-oxo-pdG entspricht.

	dAp-Bodipy	Tp-Bodipy	dCp-Bodipy	8-oxo-dGp-	dGp-Bodipy
				Bodipy	
995297	0.696 ± 0.002	1.067 ± 0.009	1.053 ± 0.010	13.221 ± 0.203	1.761 ± 0.013
1 x 8-oxo-dG					
IBA 5 (72875)	0.707 ± 0.007	0.922 ± 0.004	0.960 ± 0.003	10.545 ± 0.410	1.814 ± 0.020
1 x 8-oxo-dG					
995298	0.592 ± 0.02	0.954 ± 0.012	0.877 ± 0.015	6.736 ± 0.773	1.801 ± 0.088
2 x 8-oxo-dG					

Tab. 35: Korrekturfaktoren ermittelt aus den drei 8-oxo-dG enthaltenden Oligonukleotiden (jeweils n = 3)

Ebenfalls auffällig ist der niedrige Korrekturfaktor für dGp in allen untersuchten Oligonukleotiden von ca. 1.8, der sich deutlich von dem mit λ -DNA bestimmten Korrekturfaktor von 2.09 unterscheidet. Auch die anderen Korrekturfaktoren stimmen, wie schon bei den Nukleosid-5'-Phosphaten, nicht genau mit den für λ -DNA ermittelten überein, die Abweichungen sind jedoch deutlich geringer. Vergleicht man die Signalfläche für 8-oxodGp-Bodipy in den Oligonukleotiden (ca. 4700RFU) mit der für dGp-Bodipy (ca. 29000RFU), so ist die Fläche für dGp-Bodipy etwa sechsmal so groß. Für die reinen Standards erhielt man nach Fluoreszenzmarkierung mit BODIPY-FL-EDA ein um den Faktor 2.3 höheres dGp-Bodipy Signal. Diese großen Unterschiede lassen darauf schließen, dass bei der Analyse der Oligonukleotide aller Wahrscheinlichkeit nach v. a. die Effizienz der Hydrolyse, neben der Fluoreszenzquantenausbeute der Bodipy-Konjugate und der Effizienz der chemischen Derivatisierung, eine Rolle spielt.

Für die nächsten Versuche wurde die selbe H_2O_2 behandelte CT-DNA wie für die Analysen mit der 5'-Variante verwendet. Der mit HPLC und elektrochemischer Detektion bestimmte Gehalt an 8-oxo-dG für diese DNA lag bei 13 pro 1000 Nukleotiden. Mit der 5'-Variante des Fluoreszenz-Postlabelings wurde ein Adduktlevel von 17 bzw. 40 8-oxo-dG pro 1000 Nukleotiden gemessen, abhängig vom verwendeten Korrekturfaktor (vgl. S. 81). 10µg der DNA wurden nach den Standardbedingungen aus Tabelle 10 zu dNps verdaut und derivatisiert. Nach 1:100 Verdünnung mit Wasser ergab die CE-LIF Analyse das folgende Elektropherogramm (Abb. 71).



Abb. 71: CE-LIF-Analyse von *in vitro* mit H₂O₂ oxidierter CT-DNA nach MN/SPD Verdau und Reaktion mit BODIPY-FL-EDA. Trennbedingungen: 18mM Natriumphosphat, pH 9.0, 10% Methanol (v/v), 90mM SDS, 20kV

Neben den normalen dNp-Bodipy-Konjugaten waren, wie schon bei Anwendung der 5'-Variante, mehrere kleine Signale zu erkennen. Zwei davon migrierten im Bereich kurz vor dem dAp-Bodipy. Das kleinere der beiden Signale konnte durch Aufstocken mit dem Reaktionsansatz des 8-oxo-dGps sicher als dieses identifiziert werden (nicht gezeigt). Die Quantifizierung ohne den Korrekturfaktor ergab für 8-oxo-dGp einen Anteil von $0.1 \pm 0.02\%$ (n = 5) in H₂O₂ behandelter DNA (1 Addukt pro 1000 Nukleotide). Unter Verwendung der mit den beiden Oligonukleotiden IBA 5 und 995297 bestimmten Korrekturfaktoren von 10.5 bzw. 13.2 ergibt sich daher ein Adduktlevel von 10 bzw. 13 8-oxo-dG pro 1000 Nukleotide, was sehr gut mit den Ergebnissen übereinstimmt, die mit HPLC und elektrochemischer Detektion ermittelt wurden (13 Addukte pro 1000 Nukleotide). Die Nachweisgrenze für 8oxo-dGp-Bodipy in DNA liegt bedingt durch den hohen Korrekturfaktor jedoch im Bereich von 1 Addukt pro 1000 Nukleotide, so dass die Methode für *in vivo* Anwendungen noch nicht sensitiv genug ist. Dafür sind die erarbeiteten Trennbedingungen bei den dNp-BodipyKonjugaten jedoch ausreichend, um 8-oxo-dGp-Bodipy Basislinien-getrennt neben den normalen Nukleotiden zu detektieren.

4.6.4 Nachweis von 2'-Desoxyinosin in DNA

Die Erarbeitung einer Analysenmethode für modifizierte Nukleotide auf der Grundlage von dNps wird dadurch erschwert, dass modifizierte dNps als Standardverbindungen kommerziell nicht erhältlich sind. Im Gegensatz dazu sind von den pdNs bzw. prNs die Deaminierungsprodukte 2'-Desoxyinosin-5'-Phosphat, 2'-Desoxyuridin-5'-Phosphat, Inosin-5'-Phosphat und Xanthosin-5'-Phosphat erhältlich. Auch Oligonukleotide mit definierten Modifikationen bieten sich als Standardverbindungen zur Etablierung von Analysenmethoden an. Allerdings sind auch hier nur wenige Oligonukleotid-Modifikationen erhältlich (8-oxo-dG, etheno-dA) und Probleme bei der Hydrolyse des Oligonukleotides können die Identifikation des Signals erschweren (s. 8-oxo-dGp).

Im Falle des 2'-Desoxyinosin-3'-Phosphats (pdI) konnte auf das mit der 5'-Variante der Methode bereits untersuchte poly(dI·dC)·(dI·dC) zurückgegriffen werden. Nach Verdau von 10µg poly(dI·dC)·(dI·dC) mit MN/SPD zu dNps und anschließender Fluoreszenzmarkierung mit BODIPY-FL-EDA wurden zwei annähernd gleich große Signale in der CE-LIF Analyse erwartet. Das Elektropherogramm (Abb. 72) zeigt zwar zwei Signale, von denen jedoch das erste bei 18.2min deutlich kleiner war als das zweite bei 26min. Durch Aufstocken mit dem dCp-Bodipy Standard wurde das zweite Signal sicher identifiziert, während das Signal bei 18.2min dem dIp-Bodipy zugeordnet wurde. Das Verhältnis der korrigierten Peakflächen betrug etwa 40:60 (dIp-Bodipy:dCp-Bodipy, Faktor 1.5) und bestätigte damit die Ergebnisse mit der 5'-Variante der Methode aus Kapitel 4.4.2.1, die zeigen, dass 2'-Desoxyinosin mit unserer Fluoreszenz-Postlabeling-Methode etwas schlechter zu detektieren ist als dC. Allerdings war der Unterschied für die 3'-Phosphat Bodipy-Konjugate kleiner als für die 5'-Phosphat Bodipy-Konjugate (Faktor: 2.3). Ebenfalls interessant ist der größere Unterschied zwischen den Migrationszeiten der Bodipy-Konjugate. Während der Abstand zwischen pdI-Bodipy und pdC-Bodipy nur etwa 0.5min beträgt, sind es zwischen dIp-Bodipy und dCp-Bodipy 6min. Kürzlich wurde von Wirtz et al. die Synthese von dIp durch Phosphorylierung von 2'-Desoxyinosin sowie seine Detektion via Fluoreszenzmarkierung mit BODIPY-FL-EDA beschrieben [154]. Die CE-LIF-Analyse bestätigte, dass trotz anderer Trennbedingungen dIp-Bodipy schneller wandert als dCp-Bodipy, und auch die Signalfläche des dIp-Bodipys fiel kleiner aus als für dCp-Bodipy. Ferner wurde nach Normierung auf dCpBodipy für dIp ein Korrekturfaktor von 1.35 ermittelt, der gut mit dem von mir bestimmten Faktor von 1.5 übereinstimmt. Dabei ist zu berücksichtigen, dass bei dem von mir über poly(dI·dC)·(dI·dC) bestimmten Faktor noch der Einfluss der Hydrolyse mit einbezogen ist.



Abb. 72: CE-LIF-Analyse von 10µg MN/SPD verdautem poly(dI·dC)·(dI·dC) nach Fluoreszenzmarkierung mit BODIPY-FL-EDA. Trennbedingungen: 18mM Natriumphosphat, pH 9.0, 90mM SDS, 10% Methanol (v/v), 20kV

Um 2'-Desoxyinosin als 3'-Phosphat in DNA nachzuweisen, wurde die selbe HNO₂behandelte CT-DNA wie für die Analysen mit der 5'-Variante verwendet (s. Punkt 4.4.2.3). Ein Aliquot von 10µg wurde mit MN/SPD zu dNps verdaut, fluoreszenzmarkiert und mit CE-LIF analysiert. Im Elektropherogramm (Abb. 73) fanden sich eine ganze Reihe neuer Signale, von denen das Signal bei 18min durch Aufstocken mit dem Reaktionsansatz des poly(dI·dC)·(dI·dC) dem dIp-Bodipy zugeordnet wurde. Wie in Abb. 34 (5'-Variante), ist auch hier eine deutliche Abnahme des dGp-Bodipy-Signals durch die HNO₂-Behandlung zu beobachten. Eines der beiden Signale kurz vor dAp-Bodipy könnte nach den Untersuchungen von *Wirtz* das dUp-Bodipy, welches nach Deaminierung von Cytosin entsteht, sein. Die Signale im Bereich von 15-16 min sind ähnlich wie in Abb. 34, eines davon ist vermutlich das Bodipy-Konjugat des 2'-Desoxyxanthosin-3'-Phosphats, da dieses die kürzeste Migrationszeit der gebildeten Deaminierungsprodukte aufweist (vergl. Ribonukleotide).



Abb. 73: CE-LIF-Analyse von HNO₂-behandelter CT-DNA nach Verdau mit MN/SPD und Derivatisierung mit BODIPY-FL-EDA. Trennbedingungen wie in Abb. 72 angegeben.

4.6.5 Entwicklung einer Analysenmethode zur Bestimmung des Gehaltes von N⁶-Methyladenosin mit der 3'-Variante der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode

Da sich die kapillarelektrophoretische Trennung des markierten N⁶-Methyl-2'-Desoxyadenosin-5'-Phosphates von den normalen pdNs als schwierig erwies, wurden entsprechende Trennversuche zur Analyse von N⁶mdA mit der 3'-Variante der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode durchgeführt. Dazu wurden 10µg des Oligonukleotides IBA3 (Oligo 72853) mit der Sequenz:

5' - GAG TCT TCC **A***GT GTG ACA CAT - 3' (A* = N^6 -Methyladenosin)

mit MN/SPD zu dNps verdaut, fluoreszenzmarkiert und analysiert. Die CE-LIF-Analyse mit den etablierten Trennbedingungen erbrachte eine hervorragende Trennung des N⁶mdA von den vier normalen dNps (s. Abb. 74). Da 5mdCp-Bodipy unter den gleichen Trennbedingungen wesentlich später (nach dem dCp-Bodipy) im Elektropherogramm erscheint, bietet sich die Möglichkeit in einem Lauf die beiden epigenetisch interessanten DNA-Methyl-Modifikationen, 5-Methylcytosin und N⁶-Methyladenin, nachzuweisen und zu quantifizieren.



Abb. 74: CE-LIF-Analyse von Oligo IBA 3 nach Verdau mit MN/SPD und Fluoreszenzmarkierung mit BODIPY-FL-EDA, Trennbedingungen s. Tab. 10, Verdünnung 1:1000 mit Wasser.

Da nach Verdau mit MN/SPD das Nukleosid am 3'-Ende des 21mer-Oligonukleotides nicht fluoreszenzmarkiert werden kann (OH-Funktion am 3'-Ende), werden durch die CE-LIF-Detektion nur zwanzig 2'-Desoxynukleosid-3'-Phosphate nachgewiesen: 4x dAp (20%), 5x dGp (25%), 5x dCp (25%), 5x Tp (25%) und 1x N⁶mdAp (5%). Die Auswertung von fünf aufeinanderfolgenden Analysenläufen ergab die in Tab. 36 angegebenen Flächenanteile für die einzelnen dNp-Bodipy-Konjugate, aus denen die entsprechenden Korrekturfaktoren in gleicher Weise wie für die pdN-Bodipy-Konjugate berechnet wurden (s. S. 44). Die auf dAp-Bodipy normierte Migrationszeit für das N⁶mdAp-Bodipy betrug 1.13.

Oligo–IBA3	Anzahl der Basen	Messung (%)	Faktor
dA	4 (20%)	29.59 ± 1.08	0.677 ± 0.025
Т	5 (25%)	25.81 ± 0.66	0.969 ± 0.025
dC	5 (25%)	26.53 ± 0.86	0.943 ± 0.031
dG	5 (25%)	11.29 ± 0.84	2.225 ± 0.166
N ⁶ mdA	1 (5%)	6.46 ± 0.28	0.775 ± 0.033

TI 36 A I	CELIE A I		
1 ab. 36: Auswertung d	er CE-LIF-Analys	e von Oligo IBA3 n	ach Verdau mit MIN/SPD

Die aus dem Oligonukleotid ermittelten Korrekturfaktoren stimmen gut mit den in Kapitel 4.4.1.4 durch Analyse von λ -DNA erhaltenen Korrekturfaktoren überein (Tabelle 16). Beide Adenosin-Bodipy-Konjugate haben die niedrigsten Korrekturfaktoren, die von Tp-Bodipy und dCp-Bodipy sind sich sehr ähnlich und pdG-Bodipy hat auf Grund des Fluoreszenz-Quenching-Effektes einen deutlich höheren Korrekturfaktor.

Trotzdem ist es notwendig ein komplexeres, doppelsträngiges DNA-Molekül mit definierter Zusammensetzung für die Bestimmung der Korrekturfaktoren aller Nukleotide zur Verfügung zu haben, bevor die Methode in realen Proben zum Einsatz kommen kann. Stach und Wirtz [113, 114] lösten dieses Problem für 5-Methylcytosin, indem sie λ -DNA in vitro an definierten Stellen methylierten. Hierfür nutzten sie das Enzym M.HpaII Methylase, das in der Sequenz 5'-CCGG-3' das innere Cytosin zu 5'-CC*GG-3' methyliert. Diese Basenabfolge findet sich genau 328 Mal im λ -Genom, so dass bei vollständiger Methylierung auf beiden Strängen genau 656 5-Methylcytosine in der λ-DNA vorhanden sind. Zur Bestätigung wurde dann mit einem Restriktionsenzym, das die DNA an der Konsensussequenz im unmethylierten Zustand zerschneidet (im methylierten Zustand hingegen nicht, restriction/protection assay), verdaut. Da nach Restriktionsverdau keine DNA-Bruchstücke auftraten, wurde die vollständige Methylierung aller Konsensussequenzen bestätigt. Auf diese Weise ist es also möglich, ein komplexes, doppelsträngiges DNA-Molekül mit definiertem 5mdC-Gehalt zu generieren, mit dem dann der Korrekturfaktor für 5-Methylcytosin für den Fluoreszenz-Postlabeling-Assay deutlich realitätsnäher ermittelt werden kann, als mit modifizierten Oligonukleotiden.

Da auch die Methylierung der N⁶-Position des Adenins in der Sequenz 5'-GATC-3' von einem Restriktionsenzym erkannt wird, besteht auch hier die Möglichkeit das Lambda-Genom *in vitro* an bestimmten Sequenzen gezielt und vollständig zu methylieren. Wird hierfür das Enzym *dam* Methylase verwendet, das in der Sequenz 5'-GATC-3' Adenin methyliert, so finden sich im λ -Genom genau 112 derartige Konsensussequenzen, die wiederum auf beiden Strängen methyliert werden (insgesamt 224 N⁶mdA). Das entspricht einer Methylierung von 0.23% aller Basen (97004), bzw. 0.92% aller Adenine (24320).

Um zu überprüfen, ob ein N⁶mdA-Methylierungsgrad von 0.92% mit der etablierten Standardmethode der 3'-Variante der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode nachzuweisen ist, wurde ein weiteres Oligonukleotid (Oligo X) mit der Sequenz 5' - GAG TCT TCC AGT GTG ACA CAT - 3' mit MN/SPD verdaut und fluoreszenzmarkiert (Bedingungen s. Tab. 10). Da die Zusammensetzung von Oligo X derjenigen von Oligo IBA 3 entspricht, es jedoch kein N⁶mdA enthält, war es möglich, die Modifikation gezielt zu verdünnen. Das bedeutet, dass bei einer Mischung von 39 Teilen Oligo X mit 1 Teil Oligo IBA 3 genau eine Base von insgesamt 800 Basen ein N⁶mdA ist, was einer Häufigkeit von 0.125% entspricht. Bezogen auf Adenosin ist eines von 200 ein N⁶mdA (0.5%). Abbildung 75 zeigt die CE-LIF Analyse einer entsprechenden Mischung der beiden getrennt mit MN/SPD verdauten und mit BODIPY-FL-EDA fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide. Das Signal des N⁶mdAp-Bodipy ist klar bei 24.5min zu erkennen, wie auch der vergrösserte Bildausschnitt verdeutlicht.



Abb. 75: CE-LIF-Analyse einer 39+1 Mischung von Oligo X und Oligo IBA 3 nach Hydrolyse mit MN/SPD und Fluoreszenzmarkierung. Trennbedingungen s. Tab. 10

4.6.5.1 In vitro dam Methylierung von Lambda-DNA

Die Methylierung der Lambda-DNA wurde in Anlehnung an die Vorgaben des Herstellers (New England Biolabs), jedoch mit einem Überschuss an S-Adenosyl-Methionin (Methylgruppen-Donor) durchgeführt. Je $2\mu g N^6$ -Methyladenin freie λ -DNA wurden in fünf parallelen Ansätzen mit 16 Units *dam* Methylase und S-Adenosyl-Methionin (SAM, 200 μ M) für 2h 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden vereinigt und die DNA mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt. Um die Vollständigkeit der Methylierung zu überprüfen, wurde ein restriction/protection assay durchgeführt. Hierfür wurde das Restriktionsenzym *Dpn*II verwendet, welches die Sequenz 5'-GATC-3' zerschneidet. Ist das Adenin in der Konsensussequenz methyliert, kann das Enzym an dieser Stelle jedoch nicht mehr schneiden, wodurch die DNA vor Verdau geschützt ist.

2µg der methylierten und aufgereinigten λ-DNA wurden mit 10 Units *Dpn*II für 2h bei 37°C inkubiert. Als Kontrollen dienten 2µg N⁶-Methyladenin freie λ-DNA und DNA des λ-Phagen aus einem Wildtyp *E.coli* Stamm, die in gleicher Weise mit *Dpn*II behandelt wurden wie die methylierte DNA. Die Bezeichnung "Wildtyp" bezieht sich in diesem Zusammenhang auf den *E. coli* Stamm in dem der Phage gezüchtet wurde, d. h. der Wildtyp Stamm von *E. coli* besitzt das Enzym *dam* Methylase, weswegen das Phagen-Genom an einigen Stellen methylierte Adenine besitzt. Die N⁶-Methyladenin freie DNA des λ-Phagen wird indes in einer *E. coli* Mutante gezüchtet, die die *dam* Methylase nicht besitzt (*dam*⁻).

Alle Ansätze wurden per Gelelektrophorese (1% Agarose/1xTBE-Gel mit 0.03% Ethidiumbromid) analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 76 dargestellt.



Abb. 76: Gelelektrophoretische Untersuchung verschiedener Lambda DNAs nach Restriktionsverdau Bedingungen: 60V bei 60mA und 4 Watt, 45min

Bahn 1: DNA wide range marker

Bahn 2: λ-DNA N⁶mdA-frei, Negativkontrolle (nicht mit DpnII behandelt) (mock incubated)

Bahn 3: "Wildtyp" Lambda-Genom mit DpnII behandelt

Bahn 4: λ DNA N⁶mdA-frei, *Dpn*II behandelt

Bahn 5+6: in vitro methylierte λ DNA, DpnII behandelt

Auf den Bahnen 2, 5 und 6 ist jeweils nur eine Bande zu erkennen, was zum einen bedeutet, dass die nicht mit *dam* Methylase behandelte DNA von Beginn an unfragmentiert war (Bahn 2), und dass die mit *dam* Methylase inkubierte DNA vollständig vor dem Verdau mit *Dpn*II geschützt, also vollständig methyliert war. Wäre dies nicht der Fall gewesen hätte das Enzym die DNA in viele kleine Bruchstücke zerschnitten, die bei der Gelelektrophorese als wandernde Banden nachgewiesen werden können. Genau das ist auch auf den Bahnen 3 und 4 für die N⁶-Methyladenin-freie λ -DNA und die Wildtyp-DNA zu sehen. Die komplett N⁶-Methyladenin-freie λ -DNA ist dabei deutlich stärker verdaut als die DNA des "Wildtyp" Lambda-Phagen, was an der größeren Anzahl von Banden deutlich zu erkennen ist.

6μg *dam* Methylase behandelte DNA wurden mit den in Tabelle 10 angegebenen Standardbedingungen mit MN/SPD zu dNps verdaut und derivatisiert. Der Reaktionsansatz wurde 1:1000 mit Wasser verdünnt und kapillarelektrophoretisch analysiert. Wie in Abbildung 77 zu sehen ist, wurde das Signal des N⁶mdA an der erwarteten Stelle im Elektropherogramm (24.3min) detektiert. In unbehandelter, N⁶-Methyladenin-freier Lambda-DNA ist dieser Peak nicht vorhanden (Abb. 22). Die auf das dAp-Bodipy normierte Migrationszeit von N⁶mdAp-Bodipy betrug im Durchschnitt 1.13 und bestätigte damit die Identifizierung des Signals.



Abb. 77: CE-LIF-Analyse von *in vitro dam* methylierter Lambda-DNA nach Hydrolyse mit MN/SPD und Fluoreszenzmarkierung. Trennbedingungen s. Tab. 10

Die Auswertung der korrigierten Peakflächen ergab eine Gesamtfläche von ca. 115 000 Flächeneinheiten, was für 6µg DNA zu gering ist. Normalerweise werden mit 10µg CT-DNA oder λ -DNA etwa 300 000 Flächeneinheiten erhalten, d. h. nach Aufreinigung wurden nur etwa 3.5µg der methylierten λ -DNA wiedergewonnen. Daher sind die hier berechneten Korrekturfaktoren mit etwas weniger DNA bestimmt als bei den vorhergehenden Versuchen, was die Abweichungen zu diesen Versuchen erklären kann. Die oben beschriebene *in vitro dam*-Methylierung wurde zweimal an verschiedenen Tagen als voneinander unabhängige Experimente durchgeführt (Versuch 1 + 2), die DNA entsprechend den Standardbedingungen (Tab. 10) mit MN/SPD zu dNps verdaut und derivatisiert. Vor der CE-LIF-Analyse wurden die Ansätze wie gewohnt 1:1000 mit Wasser verdünnt. In Tabelle 37 sind die Mittelwerte der Messergebnisse (n = 7) dargestellt.

dam methyliert	Anzahl der Basen	Versuch 1	Versuch 2	Korrekturfaktor
		Messung (%)	Messung (%)	
Lambda Genom				
dA	24096 (24.84%)	37.33 ± 1.33	37.74 ± 0.36	0.658 ± 0.006
Т	24320 (25.07%)	25.34 ± 1.40	25.19 ± 0.37	0.997 ± 0.015
dC	24182 (24.93%)	24.54 ± 1.02	24.37 ± 0.86	1.002 ± 0.035
dG	24182 (24.93%)	12.30 ± 0.35	12.22 ± 0.21	2.041 ± 0.035
N ⁶ mdA	224 (0.23%)	0.29 ± 0.04	0.30 ± 0.04	0.783 ± 0.10

Tab. 37: Auswertung der CE-LIF-Analysen von in vitro methylierter Lambda-DNA

Aus den Daten geht hervor, dass beide Versuche sehr gut übereinstimmende Ergebnisse erbrachten, im Versuch 1 jedoch höhere Abweichungen zu beobachten waren. Die berechneten Korrekturfaktoren zeigen kleinere Abweichungen zu denen mit unmethylierter λ -DNA bestimmten in Tabelle 16. Möglicherweise hängt dies mit der geringeren DNA Menge zusammen (3.5µg gegenüber 10µg).

Im nächsten Schritt wurde versucht die Menge an N⁶mdA in der λ -Phagen-DNA aus dem Wildtyp *E. coli* zu bestimmen. Wie der Restriktionsverdau mit *Dpn*II zeigte (Abb. 76), war diese DNA im Vergleich zu der komplett unmethylierten DNA partiell geschützt, was auf einen gewissen Anteil an Adenin-Methylierung zurückzuführen ist.

10µg dieser λ -DNA wurden nach den Standardbedingungen fluoreszenzmarkiert und kapillarelektrophoretisch analysiert. In Abbildung 78 ist ein Ausschnitt aus dem resultierenden Elektropherogramm zu sehen. Deutlich ist das Signal des N⁶mdAp-Bodipy an der erwarteten Stelle nach dem Tp-Bodipy zu erkennen. Trotz der etwas längeren Migrationszeiten aller Nukleotid-Bodipy-Konjugate stimmte die auf dAp-Bodipy normierte Migrationszeit des N⁶mdAp-Bodipy mit 1.14 mit der zuvor beobachteten überein. Die größeren Signale bei 31-32min sind Abbauprodukte des Fluoreszenzmarkers (Bodipy).



Abb. 78: CE-LIF-Analyse von λ -DNA aus Wildtyp *E. coli* nach Verdau mit MN/SPD und Fluoreszenzmarkierung mit BODIPY-FL-EDA. Trennbedingungen s. Tab. 10

Verglichen mit den bereits durchgeführten Analysen von λ -DNA zeigte die Auswertung der korrigierten Peakflächen wiederum sehr gute Übereinstimmungen in Bezug auf die Korrekturfaktoren und die damit berechnete Zusammensetzung von λ -DNA (s. Tab 38). Da die genaue Anzahl der methylierten Adenine der Wildtyp λ -DNA nicht bekannt ist, können die Basenanteile für Adenin und N⁶-Methyladenin nur ungefähr angegeben werden.

Tab. 38: Auswertung der CE-LIF-Analyse von Lambda-Phagen DNA aus E. coli (Wildtyp)

Reale Probe	Anteil der Base (%)	Messung (%)	Korrekturfaktor	Berechnet (%)
Lambda-wt				
dA	ca. 24.75	36.62 ± 0.61	0.699 ± 0.006	25.52 ± 0.41
Т	25.07	24.51 ± 0.67	0.972 ± 0.021	23.75 ± 0.64
dC	24.93	26.30 ± 0.86	0.944 ± 0.024	24.75 ± 0.85
dG	24.93	12.39 ± 0.24	2.093 ± 0.041	25.85 ± 0.46
N ⁶ mdA	??	0.18 ± 0.01	0.783 ± 0.10	0.13 ± 0.01

Für N⁶mdA wurde ein Anteil an der Gesamtfläche von 0.18% ermittelt, was nach Berücksichtigung des Korrekturfaktors (0.783) 0.13% entspricht, oder anders ausgedrückt einen Adenin-Methylierungsgrad (s. Formel S. 52) von 0.59% ergibt. Im Durchschnitt enthält also das λ -Phagen Genom aus *E. coli* (Wildtyp) 126 N⁶mdA. Dieser Wert stimmt mit dem in der Literatur beschriebenen N⁶-Methyladenosin Gehalt im λ -Phagen Genom überein. So ermittelte *Hattman* für verschiedene *E. coli* Wirtsstämme und anwesende Plasmide eine Menge von 105 bis 220 N⁶mA-Moleküle je Genom [155]. Die Nachweisgrenze für N⁶mdA liegt etwa im gleichen Bereich wie für dA. Daher können theoretisch bei einer Verdünnung von 1:100 vor der Analyse 10 000pM, d. h. etwa 3 Addukte in 100 000 normalen Nukleotiden detektiert werden.

Die beschriebene Methode ist somit in der Lage, den N⁶mdA-Gehalt des Genoms verschiedener Organismen nachzuweisen und akkurat zu quantifizieren. Dies kann zur Bestimmung von epigenetischen Effekten, besonders in Organismen, die nicht über Enzymsysteme zur Methylierung des Cytosins verfügen, beitragen.

4.7 Abschliessende Diskussion

4.7.1 Vergleich der Fluoreszenz-Postlabeling-Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden zur Analyse von DNA- bzw. RNA-Modifikationen verwendet. Diese Methoden beruhen beide auf dem Prinzip der Hydrolyse der Nukleinsäuren zu Nukleosid-3'- oder -5'-Monophosphaten, Fluoreszenzmarkierung mit BODIPY-FL-EDA und Analyse mit CE-LIF. Da Hydrolyse und Markierungsreaktion hintereinander im selben Reaktionsgefäß, ohne Aufreinigungsschritte durchgeführt werden sollten, war es nötig, für den Verdau von DNA zu pdNs zunächst neue, mit der chemischen Fluoreszenzmarkierung kompatible Puffersubstanzen zu testen. Im Prinzip erwiesen sich sowohl 1-Methylimidazol, MES und HEPES als geeignet, die besten Reaktionsausbeuten wurden jedoch mit MES, pH 5.5, erzielt, so dass alle weiteren Versuche mit MES als Puffer durchgeführt wurden. Diese ersten Versuche belegten auch die Eignung von MES als Alternative für den Verdau von DNA mit MN/SPD zu dNps (entgegen früheren Berichten von Wörth). Die Hydrolyse von DNA zu pdNs kann enzymatisch mit NP1 und DNaseI/SVPD durchgeführt werden. Vergleichende Untersuchungen lieferten nur für die NP1-verdaute CT-DNA reproduzierbare Analysendaten. Der Verdau mit DNaseI/SVPD scheiterte vermutlich an der Qualität der SVPD, die nicht die nötige Reinheit für die Derivatisierungsreaktion besaß, und so zu erheblichen Nebenreaktionen führte. Der Verdau mit NP1 zu Nukleosid-5'-Phosphaten bildete die Grundlage zur Entwicklung der 5'-Variante der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode sowohl für DNA als auch auch für RNA. Eine Analyse von RNA mit der schon länger bekannten 3'-Variante der Fluoreszenz-Postlabeling- Methode ist hingegen nicht möglich, da bei der Aktivierung der 3'-Phosphatgruppe mit EDC während der Fluoreszenzmarkierung ein stabiles cyclisches Phosphat mit der benachbarten 2'-OH Gruppe gebildet wird, und die Phosphatgruppe somit nicht mehr mit BODIPY-FL-EDA reagieren kann. Weitere Vorteile der 5'-Variante der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode sind die leichtere und preiswertere Verfügbarkeit von DNA-Addukt Standards und die für bestimmte Addukte bessere Freisetzung aus DNA im Vergleich zum MN/SPD-Verdau.

4.7.1.1 Nachweisgrenzen

Vergleicht man die analytischen Parameter der beiden Postlabeling-Assays miteinander, so ergeben sich generell große Übereinstimmungen. Beide Varianten erzielen für die Bodipy-Konjugate der normalen Nukleotide Nachweisgrenzen von etwa 100pM, mit Ausnahme des Guanosins, das eine Nachweisgrenze von etwa 200pM aufweist. Hierfür ist ein basenspezifischer Quenchingeffekt verantwortlich, der in dem besonders niedrigen Oxidationspotential des Guanosins begründet liegt [156].

4.7.1.2 Reproduzierbarkeit

Die Standardabweichungen der Signalflächen, ausgedrückt in Prozent der Gesamtfläche, für die Analyse von CT-DNA, bzw. eines mit Pseudouracil modifizierten Oligoribonukleotids lagen bei wiederholten Analysen der selben Proben unter 3%, und sind damit vergleichbar mit der für die 3'-Variante der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode publizierten Standardabweichung.

Des weiteren arbeiten beide Methoden im getesteten Verdünnungsbereich der Probe (von 1:500 bis 1:10 000) gleichermassen linear.

4.7.1.3 Migrationsverhalten bei der kapillarelektrophoretischen Trennung

Betrachtet man das Migrationsverhalten der einzelnen Bodipy-Konjugate während der kapillarelektrophoretischen Trennung genauer, so stellt man fest, dass unter identischen Trennbedingungen die prN-Bodipy Konjugate am schnellsten migrieren (schneller als die pdNs und dNps). Dieses Verhalten lässt sich mit der höheren Hydrophilie durch die zusätzliche 2'-OH Funktion dieser Verbindungen erklären, die dazu führt, dass sie weniger

mit den SDS-Mizellen interagieren. Die Migrationsreihenfolge der prN-Konjugate ist wie folgt: prX, prA, pΨ, prI, prU, p2'OmrA, prC, prG. Es ist daher anzunehmen, dass diese Reihenfolge auch in etwa die steigende Lipophilie der Verbindungen widerspiegelt. Für die korrespondierenden pdN-Bodipy Konjugate ist die Migrationsreihenfolge fast identisch: pdA, dT, pdU, pdI, p5mdC, pdC, pdG. Lediglich pdI wandert also langsamer als pdU. In diesem Fall ist jedoch darauf hinzuweisen, dass die Trennbedingungen nicht identisch sind, und dieser Unterschied auch auf die andere Pufferzusammensetzung, insbesondere den Zusatz von Glukose zurückzuführen sein kann (Abb. 34).

Vergleicht man hingegen die kapillarelektrophoretische Migrationsreihenfolge der Nukleosid-5'-Phosphat-Konjugate mit denen der Nukleosid-3'-Phosphat-Konjugate (dIp, dAp, dGp, Tp, dCp, 5mdCp), so ergeben sich zwei deutliche Unterschiede: dGp-Bodipy ist nun nicht mehr das am langsamsten wandernde Konjugat, sondern 5mdCp-Bodipy und dIp-Bodipy ist nun das am schnellsten migrierende Bodipy-Konjugat. Offenbar ändert sich die Lipophilie von pdG-Bodipy zu dGp-Bodipy und von pdI zu dIp erheblich, möglicherweise durch eine Konformationsänderung. Mischt man pdN und dNp Konjugate, so zeigt sich, dass die dNp-Konjugate insgesamt langsamer wandern als ihre korrespondierenden pdN-Konjugate, vermutlich also stärker mit den Mizellen wechselwirken. Dieser Effekt ist aus der RP-HPLC-Analytik bekannt, auch hier haben Nukleosid-3'-Phosphate längere Elutionszeiten als Nukleosid-5'-Phosphate [157].

Bezieht man die modifizierten Nukleoside mit in die Betrachtung ein, so kann man zumindest innerhalb der Reihe der Nukleosid-5'-Phosphat-Konjugate, pdN-Bodipys bzw. prN-Bodipys, Voraussagen über das Migrationsverhalten der Bodipy-Konjugate anstellen. So bewirkt die Methylierung der Base, bzw. der 2'-OH Gruppe eine langsamere Migrationsgeschwindigkeit im Vergleich zum ursprünglichen Nukleotid-Bodipy-Konjugat. Gleiches konnte auch in dieser Arbeit für das pdN-Konjugat des 1,N⁶-Etheno-Adenins und das dNp-Konjugat des 1,N⁶-Propano-Guanins (Hex-dG) gezeigt werden, welche durch die Einführung der Alkyl-Bausteine wesentlich lipophiler geworden sind als die entsprechende unmodifizierte Base, und dadurch langsamer wanderten. (*Schmitz et al.* haben das auch für etheno-dAp gezeigt [158]).

Ausnahme ist hierbei p5mdC-Bodipy, welches unter den entwickelten Trennbedingungen schneller wandert als pdC-Bodipy. Das könnte jedoch auch auf den sehr hohen Methanolanteil im Trennpuffer bei dieser Methode zurückzuführen sein.

Im Gegensatz dazu sollten die oxidativ veränderten Nukleoside (8-oxo-dA und 8-oxo-dG) nach Einführung einer weiteren Hydroxylfunktion schneller wandern, da sie sich seltener in den Mizellen aufhalten als das unmodifizierte Nukleotid-Bodipy-Konjugat. Diese Annahme trifft allerdings nur auf die beiden 8-oxo-dG-Bodipy-Konjugate zu, während 8-oxo-pdA-Bodipy langsamer als pdA-Bodipy und sogar noch langsamer als pdG-Bodipy migriert.

Auch für das elektrophoretische Wanderungsverhalten der Deaminierungsprodukte ist ein eindeutiger Zusammenhang mit dem Austausch der NH2-Gruppe gegen eine Ketogruppe nicht festzustellen. Die Deaminierung von Cytosin zu Uracil führt sowohl bei den 3'- als auch 5'-Phosphat-Bodipy Konjugaten zu einer schnelleren Migration des Deaminierungsproduktes (Uracil-Bodipy). Die Deaminierung von Adenosin zu Inosin führt zu einer Beschleunigung der Migration von dIp-Bodipy im Vergleich zu dAp-Bodipy (s. Abb. 73). Im Gegensatz dazu wandern pdI-Bodipy und prI-Bodipy deutlich langsamer als pdA-Bodipy und prA-Bodipy (s. Abb. 34 und 45). Xanthosin, das Deaminierungsprodukt des Guanosins, konnte nur als Ribonukleotid untersucht werden. Hier kommt es zu einer ganz erheblichen Beschleunigung der Migrationsgeschwindigkeit des prX-Bodipys im Vergleich zu prG-Bodipy. Da sich die 2'-Desoxyribonukleosid- und Ribonukleosid-5'-Phosphate im Bezug auf die kapillarelektrophoretische Trennung sehr ähnlich verhalten, kann man aus diesem Ergebnis ableiten, dass eines der ersten Signale im Elektropherogramm der mit NP1 verdauten, HNO2behandelten DNA (Abb. 34), das pdX-Bodipy Konjugat darstellt. Ebenso liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei einem der ersten Signale in Abbildung 73 (HNO₂ behandelte DNA, MN/SPD verdaut) um das dXp-Bodipy-Konjugat handelt. Die endgültige Klärung dieser Frage erfordert jedoch einen charakterisierten Bodipy-Konjugat Standard von dXp bzw. pdX.

4.7.1.4 Analysendauer

In den bisher durchgeführten kapillarelektrophoretischen Trennungen bei 20kV migrierten die Bodipy-Konjugate aller Nukleosid-3'- und -5'-Phosphate in einem Zeitfenster von etwa 15 bis 30min, so dass keine Probleme bestehen, die normalen Nukleotide innerhalb einer vertretbaren Analysendauer zu trennen. Auch ein oder zwei zusätzliche modifizierte Nukleotide lassen sich in der Regel mit nur leichten Änderungen der Trennbedingungen neben den normalen Nukleotiden analysieren. Je mehr verschiedene modifizierte Nukleotide man jedoch in einem Analysenlauf analysieren will, desto schwieriger wird eine Basisilinientrennung innerhalb dieses Zeitfensters (z. B. p5mdC gemeinsam mit 8-oxo-pdG, Abb. 39). Untersuchungen in dieser Arbeit haben gezeigt, dass die Zugabe von Glukose zum Trennpuffer als zusätzlichem "Modifier" dieses Fenster erweitern kann, wenn auch auf Kosten der Dauer eines Analysenlaufes.

4.7.2 Korrekturfaktoren und Quenching-Effekte

Neben den Migrationszeiten bei der kapillarelektrophoretischen Trennung unterscheiden sich die Nukleotid-Bodipy-Konjugate auch in ihrer Signalintensität bei der Laser-induzierten Fluoreszenzdetektion. Ein Teil dieser Unterschiede ist auf die unterschiedliche Fluoreszenz-Quantenausbeute (FQY) der Bodipy-Konjugate, ein Teil auf die unterschiedlichen chemischen Ausbeuten bei der Kopplungsreaktion und ein weiterer Teil auf die unvollständige Freisetzung der Nukleotide bei der Hydrolyse der Nukleinsäuren zurückzuführen. Daher ist für die quantitative Bestimmung von Nukleotiden mit der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode die Ermittlung von Korrekturfaktoren für die einzelnen Bodipy-Konjugate unverzichtbar. Die spektroskopischen Eigenschaften der aufgereinigten und charakterisierten dNp-Bodipy-Konjugate wurden bereits von Wörth ermittelt [112] und zeigen jeweils für die Konjugate von dAp, dCp und Tp nahezu identische FQYs, während die Quantenausbeute von dGp-Bodipy hingegen nur ca. die Hälfte der für die anderen Nukleotide gemessenen Werte (s. Tab. 34) betrug. In den mit λ -DNA ermittelten Korrekturfaktoren sind neben der FQY auch die Unterschiede in der Hydrolyse und der Derivatisierung für die einzelnen dNps enthalten. Vergleicht man nun diese Korrekturfaktoren miteinander (Tab. 16), so hat dAp mit 0.7 einen deutlich niedrigeren Korrekturfaktor als Tp und dCp (beide etwa 0.95). Dies lässt sich wahrscheinlich auf eine bessere Reaktionsausbeute von dAp mit BODIPY-FL-EDA zurückführen, was auch mit den von Wörth gemachten Beobachtungen übereinstimmt (vgl. Tab. 3). Wegen der kostenintensiven Synthese liegen von den pdN-Bodipy Konjugaten bisher weder fluoreszenzspektroskopische Daten noch Daten zur spektroskopischen Charakterisierung vor. Die mit λ -DNA ermittelten Korrekturfaktoren entsprechen aber in etwa denen der dNp-Konjugate (s. Tab. 14). Die größten Unterschiede erhält man für Cytosin und Guanin. pdC wird unter den verwendeten Bedingungen offenbar deutlich besser mit BODIPY-FL-EDA umgesetzt als dCp (niedrigerer Faktor), pdG dagegen reagiert offensichtlich schlechter als dGp, oder aber die FQYs der Bodipy-Konjugate unterscheiden sich erheblich. Die höchsten Signalintensitäten nach DNA-Hydrolyse erzielen aber die 3'- und 5'-Phosphate des 2'-Desoxyadenosins, möglicherweise weil die Bedingungen der 3'-Variante der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode auf dAp optimiert wurden [16].

Da für die Analyse der Ribonukleotide kein, der λ -DNA entsprechendes, definiertes RNA-Molekül zur Verfügung stand, wurden die Signalintensitäten einzeln derivatisierter prNs miteinander verglichen, und die Korrekturfaktoren mit Ribo-Oligonukleotiden bestimmt. Die dabei für prA, prC und prG erhaltenen Korrekturfaktoren stimmen besser mit den entsprechenden pdNs als mit den dNps überein. Der Korrekturfaktor von prU (1.15) liegt etwas höher als der von pT (0.97) und stimmt nicht mit dem Faktor für Ψ (0.97) überein, obwohl es sich dabei um ein Isomer des prUs handelt.

4.7.2.1 Beziehung zwischen Struktur und Signalintensität

Um weitere Erkenntnisse über den Einfluss der chemischen Struktur der Basen auf die Signalintensität ihrer Bodipy-Konjugate zu erhalten, wurden die Ergebnisse der CE-LIF-Analysen der Derivatisierungsreaktionen von einzelnen prNs miteinander verglichen (Tab. 23, Abb. 45). Dabei ergibt sich folgende Reihenfolge der Signalintensität der Bodipy-Konjugate: prA > prC > prU > prI > prG > prX. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die gemessenen Signalflächen auf den höchsten Wert von prA (100%) normiert. Auffällig ist hierbei vor allem, dass durch den Austausch einer Aminofunktion gegen eine Ketofunktion in der Base die Signalintensität stark abnimmt. Dies gilt sowohl für das Paar prC und prU (Abb. 79) als auch für prA und prI (Abb. 80).



Abb. 79: Vergleich der Signalintensität der Bodipy-Konjugate von prU und prC in Abhängigkeit von der Struktur



Abb. 80: Vergleich der Signalintensität der Bodipy-Konjugate von prA und prI in Abhängigkeit von der Struktur. R = BODIPY-FL-EDA, s. Abb. 79

Auch die Deaminierung von prG, das sowohl eine Aminofunktion als auch eine Ketofunktion besitzt zu prX, welches dann zwei Ketogruppen trägt, führt zu einer, wenn auch geringeren, Abnahme der Signalintensität (Abb. 81).



Abb. 81: Vergleich der Signalintensität der Bodipy-Konjugate von prG und prX in Abhängigkeit von der Struktur. R = BODIPY-FL-EDA, s. Abb. 79

Vergleicht man die Signalintensität von prA mit prG unter diesem Gesichtspunkt, so stellt man fest, dass die im Guanin zusätzlich zur Aminofunktion vorhandene Ketogruppe die Signalintensität stark reduziert. *Seidel et al.* haben bereits ähnliche Fluoreszenz-Quenching-Effekte für Dansyl-gekoppelte Nukleobasen, vor allem Guanin, beschrieben [156]. Sie fanden eine Abhängigkeit der FQY von der Höhe des Oxidationspotentials der Base, d. h. je geringer das Oxidationspotential der Base, desto ausgeprägter war der Quenching-Effekt. Da die

Einführung der Ketogruppe eine Oxidation darstellt, liegt es nahe, auch für die von mir beobachteten Fluoreszenz-Quenching-Effekte unterschiedliche Oxidationspotentiale als Erklärung heranzuziehen, auch wenn diese nicht direkt bestimmt wurden.

Diese für die Ribonukleotide eingehender beschriebenen strukturellen Effekte auf die Signalintensität der Bodipy-Konjugate finden sich auch bei den 2'-Desoxyribonukleotiden wieder. Die Signalintensitäten für pdI-Bodipy und pdU-Bodipy waren deutlich niedriger als die ihrer entsprechenden Aminoverbindungen pdA-Bodipy und pdC-Bodipy. Daher wurden die entsprechenden Standards für die CE-LIF-Analyse in Abb. 28 auch in doppelter Konzentration eingesetzt. Niedrige Signalausbeuten an pdI-Bodipy und dIp-Bodipy wurden auch nach Hydrolyse von poly(dI·dC)·(dI·dC) (Abb. 29) und an pdU-Bodipy nach Hydrolyse Bisulfit-behandelter DNA beobachtet (Abb. 31).

Auch die Signalintensitäten der modifizierten Nukleotide wiesen z.T. erhebliche Unterschiede zu den Signalintensitäten der unmodifizierten Nukleotide auf. In nahezu allen Fällen wurde eine Reduzierung der Signalintensitäten gemessen. Den geringsten Einfluss auf die Peakfläche der Bodipy-Konjugate haben offenbar einfache Methylierungen (vgl. 5mdC, N⁶mdA, 2'OmrA). Die ermittelten Korrekturfaktoren entsprechen hier in etwa denen für die normalen Nukleotide oder sie sind nur wenig größer. Die oxidierten Basen 8-oxo-dG und 8-oxo-dA haben hingegen deutlich höhere Korrekturfaktoren und damit niedrigere Signalintensitäten als dG bzw. dA. Auch diese beiden Verbindungen tragen eine zusätzliche Ketogruppe in der Base, d. h. ihr geringeres Oxidationspotential könnte hier eine Rolle spielen. Wie aber für das 8-oxo-dG gezeigt werden konnte, ist möglicherweise eine nicht vollständige DNA-Hydrolyse der stärkere Einflussfaktor. Mit dieser Theorie hingegen nicht erklärbar sind der kleinere Korrekturfaktor für Pseudouracil im Vergleich zu Uracil und der deutlich größere Korrekturfaktor von etheno-dA im Vergleich zu dA.

Einen extremen Fall für die Beeinflussung der Fluoreszenz-Quantenausbeute von Nukleotid-Bodipy-Konjugaten stellen die großen aromatischen Reste der DNA-Addukte polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe dar. Hier konnte am Beispiel der Aristolochiasäure ein ausgeprägter löschender Einfluss auf den Fluoreszenzmarker BODIPY-FL-EDA aufgezeigt werden. Dieses Phänomen dürfte zu Schwierigkeiten beim Nachweis dieser Adduktklasse mit der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode mit BODIPY-FL-EDA als Marker führen.

4.7.3 Ausblick

Mit der in dieser Arbeit entwickelten 5'-Variante der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode steht nun eine neue Analysenmethode zur Verfügung, die es ermöglicht modifizierte Nukleotide in DNA und RNA mit CE-LIF nachzuweisen. Die einzelnen Schritte, enzymatischer Verdau und chemische Fluoreszenzmarkierung, lassen sich nacheinander in einem Reaktionsgefäss ohne weitere Aufreinigungsschritte durchführen. Durch die Möglichkeit der Automatisierung der CE-LIF-Analyse lässt sich eine große Anzahl an Proben in vergleichsweise kurzer Zeit analysieren, wobei bei Mehrfachmessungen sehr gut reproduzierbare Ergebnisse erhalten wurden. Ein weiterer Vorteil der neuen Methode ist die Möglichkeit der simultanen Messung der unmodifizierten Nukleotide und verschiedenster modifizierter Nukleotide in einem Lauf. Da sämtliche Schritte der Methode (enzymatischer Verdau, chemische Markierung mit BODIPY-FL-EDA und Laser-induzierte Fluoreszenzdetektion) abhängig vom Nukleotid, bzw. vom modifizierten Nukleotid, mit unterschiedlichen Ausbeuten ablaufen, müssen allerdings für alle Nukleotide Korrekturfaktoren ermittelt werden. Ähnliche Probleme haben aber auch alle anderen zum Nachweis von DNA-Addukten verwendeten Methoden (Spezifität von Antikörpern, Effizienz der Anreicherung/Markierung beim ³²P-Postlabeling, Effizienz der Ionisierung bei HPLC-MS etc.). Eines der Hauptprobleme der Fluoreszenz-Postlabeling-Methode ist jedoch auch weiterhin die für humane Proben noch zu geringe Nachweisgrenze von ca. 1 Addukt in 10⁶ normalen Nukleotiden oder 100pM. Hier kann der Einsatz neuartiger Fluorophore und neuer Derivatisierungsstrategien zu einer Verbesserung der Nachweisgrenze führen. Weniger Quenching-empfindliche Fluoreszenzfarbstoffe, die auch noch eine höhere Quantenausbeute als BODIPY besitzen, wären besonders geeignet. Wie von anderen Arbeitsgruppen bereits gezeigt, können Markierungen mit Farbstoffen, die im längerwelligen Bereich des Spektrums fluoreszieren, die Nachweisbarkeit von Nukleotiden in einer biologischen Matrix verbessern [109, 110]. Zusätzlich wäre es zunächst möglich beim ³²P-Postlabeling-Verfahren erprobte Anreicherungsverfahren (z.B. Butanol-Extraktion) für bestimmte lipophile DNA-Addukte auf die Fluoreszenz-Postlabeling-Methode zu übertragen. Dies würde jedoch zu extrem niedrigen Mengen an zu markierenden Nukleotiden führen (ca. 4pmol [159]), was die Entwicklung völlig neuer Derivatisierungsbedingungen erforderlich machen dürfte, da es sonst zu erheblichen Störsignalen bei der Detektion durch Nebenreaktionen kommt.

5 Experimenteller Teil

5.1 Geräte und Materialien

Kernresonanzspektren:

¹ H-NMR:	250MHz Bruker AC-250
	500MHz Bruker AM-500
	int. Standard: Tetramethylsilan, $\delta = 0.00$ ppm;
¹³ C-NMR:	500MHz Bruker AM-500
	int. Standard: Tetramethylsilan, $\delta = 0.00$ ppm;

Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS):

Finnigan MAT TSQ 7000;

Chromatographie:

DC-Folien:	Kieselgel 60 F ₂₅₄ , Merck (Darmstadt)
	RP-18 F _{254s} Merck (Darmstadt)

UV-aktive Substanzen wurden bei 254nm detektiert;

Analytische und präparative HPLC:

Jasco PU-980 Intelligent HPLC-Pump; Jasco (Groß-Umstadt) Jasco LG-980-02 Ternary Gradient Unit; Jasco (Groß-Umstadt) Jasco DG-980-50 3-Line Degaser; Jasco (Groß-Umstadt) Analytische Säule: Nucleosil 100 C18, 5µm, 250x4mm, Latek (Eppelheim) Präparative Säule: Nucleosil 100 C18, 10µm, 250x10mm; Latek (Eppelheim)

UV-Detektion: Lambda Max Model 481 LC Spectrophotometer, Millipore Waters (Milford, Massachusetts)

Datenaufzeichnung und Auswertung: HP 3394A Integrator, Hewlett Packard (Cambridge, Massachusetts)

Laufmittel der Firmen Merck (Lichrosolv) und Roth (Rotisolv®, HPLC Gradient Grade); Entgasung durch 5min beschallen mit Ultraschall;

Ammoniumformiat 10mM, pH 4.7:

300µl 25% Ammoniaklösung (Merck, Darmstadt) werden in 11 HPLC Grade Wasser (Fluka, Neu-Ulm) gelöst und mit konzentrierter Ameisensäure auf pH 4.7 eingestellt.

³² P-Postlabeling-Analysen:

Filterpapier Whatman 3 MM CHR;

PEI-Cellulose DC-Fertigfolien, Macherey&Nagel (Düren);

 $[\gamma^{-32}P]$ -ATP, spezifische Aktivität >7000Ci/mmol, MP Biomedicals (Eschwege);

Dialyse-Kassette Slide-A-Lyzer[®] 10 K, (Molecular weight cutoff 10 000, Pierce (Rockford, Illinois);

Mikrokokken-Endonuklease (MN) aus Stapylococcus aureus, Sigma (Taufkirchen);

Phosphodiesterase aus Kalbsmilz (Phosphodiesterase II, Spleen Phosphodiesterase, SPD), Calbiochem/Merck (Darmstadt);

Nuklease P1 (NP1) aus Penicillium citrinum, Sigma (Taufkirchen);

T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK), USB (Cleveland, Ohio);

Butanol (Spectranal), Riedel-de Haën (Seelze);

Quantifizierung radioaktiver Spots mittels Instant-Imager-System von Canberra Packard (Meriden, Connecticut);

Kapillarelektrophorese:

BioFocus 3000TC Kapillarelektrophorese-System mit LIF² -Detektor (Ar-Ionen-Laser der Wellenlänge 488nm, Ausgangsleistung 3.8mW Emissionsfilter 520 DF 30), BioRad (München);

Auswertungssoftware: Biofocus 3000 Integrator;

unbeschichtete fused-silica-Kapillare, Innendurchmesser = $50\mu m$, CS-Chromatographie-Service (Langerwehe);

Gesamtlänge 64cm, effektive Länge zum Detektor 59.4cm;

Kapillare und Probenraum temperiert auf 25°C

Probenaufgabe 20x psi·s (48nl), hydrodynamisch;

P/ACE MDQ Glycoprotein System mit LIF Detektor (Ar-Ionen Laser, der Wellenlänge 488nm, Ausgangsleistung 3mW, Emissionsfilter 520nm); Beckman Coulter (Krefeld)

Auswertungs- und Steuersoftware: 32Karat;

unbeschichtete fused-silica-Kapillare, Innendurchmesser = $50\mu m$, CS-Chromatographie-Service (Langerwehe);

Kapillare und Probenraum temperiert auf 25°C

Gesamtlänge 59cm, effektive Länge zum Detektor 48.5cm (PACE/MDQ);

Probenaufgabe 2.5x psi·s, hydrodynamisch (ca. 5nl) soweit nicht anders angegeben;

Trennpuffer und Kapillarkonditionierung:

Dinatriumhydrogenphosphat, Natriumdihydrogenphosphat, Merck (Darmstadt Natriumlaurylsulfat (Natriumdodecylsulfat, SDS), Fluka (Seelze) Methanol (Lichrosolv) HPLC gradient grade, Merck (Darmstadt) Salzsäure 1M und Natronlauge 1M, Baker (Deventer, Niederlande)

Fluoreszenzmarker:

4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacen-3-propionyl-ethylendiaminhydrochlorid (BODIPY-FL-EDA), Molecular Probes (Eugene, USA); bezogen über MoBiTec (Göttingen) bzw. Invitrogen (Karlsruhe) Absorption: $\lambda_{max} = 503$ nm, Extinktion 74 700 cm⁻¹ M⁻¹ Fluoreszenzemission: $\lambda_{max} = 510$ nm

Fluoreszenzmarkierungen:

N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid (EDC), Fluka (Seelze) 2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES), Sigma (Taufkirchen) N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure, Gerbu (Gaiberg) 1-Methylimidazol, Fluka (Seelze)

UV-Absorptionsmessungen:

UV/Visible Spectrometer Cary 50 Scan, Varian (Darmstadt) UV/Vis Diode Array Spectrophotometer lightwave, WPA (Cambridge, Großbritannien)

Lyophilisation von DNA Proben:

Speed-Vac Concentrator, Savant, GMI (Ramsey, Minnesota) mit einer HV-5 Ölpumpe, Edwards High Vacuum International (Sussex Crawley, Grossbritannien)

Unmodifizierte DNA Oligonukleotide:

Applied Biosystems (Weiterstadt):

5' - GAG TCT TCC AGT GTG ACA CAT - 3' (Oligo X)

Modifizierte Oligonukleotide:

DNA-Oligonukleotide:

5-mdC:	5' - TGC C*AC GTC AGC CTG GAT ACC - 3' (Oligo-Mod1)
5-mdC:	5' -TCC*-ATC-TGG-AAC-3' (Oligo-Mod2)
5-mdC:	5' - GAG TCT TCA C*GT GTC ACA CAT - 3' (Oligo-Mod3)

IBA (Göttingen):

8-oxo-dG:	5' - GAG TCT TCC AG*T GTG ACA CAT - 3' (IBA 5, 72875N)
8-oxo-dA:	5' - GAG TCT TCC A*GT GTG ACA CAT - 3' (IBA 4, 72874N)
N ⁶ -mdA:	5' - GAG TCT TCC A*GT GTG ACA CAT - 3' (IBA 3, 72873N)

Eurogentec (Lüttich, Belgien):

4x etheno-dA: 5' - AGεA-GCG-εAGεA-TTC-CεAA-TCA - 3' (Oligo-614357) 2x etheno-dA: 5' - GAG TCT TCC εAGT GTG εATG AT-3' (Oligo-614358) 8-oxo-dG: 5' - ACA TCG* ACA TTC CAA TCA-3' (Oligo-614359)

DKFZ-Abteilung Oligonukleotidsynthese: G* = 8-oxo-dG

995297:	5' – AGA-GCG-AG*A-TTC-CAA-TCA – 3'
995298:	5' – GAG-TCT-TCC-AGT- G *T G *-ATG-AT – 3

RNA-Oligonukleotide:

Dharmacon (Lafayette, CO) über Perbio (Bonn):

Pseudouracil: 5'- GAG UCU UCC AGΨ GUG AUA CAU - 3' 2'O-methyl-rA: 5'- GAG UCU UCC **mA**GU GUG AUA CAU - 3'

Kalbsthymus-DNA und Lachssperma-DNA: Sigma (Taufkirchen)

In vitro Assays:

Adenin-Methylierung: Lamda-Phage Genom (Wildtyp und N⁶mdA frei), *dam* Methylase, *Dpn*II, S-Adenosyl-Methionin (SAM) und zugehörige Puffer: New England Biolabs (Beverly, Massachusetts) QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen (Hilden) QIAquick Gel Extraktion Kit, Qiagen (Hilden) 1% Agarose Gel (1xTAE) Gelelektrophorese Apparatur: MINI SUB[®] CELL GT, BioRad (München) Imaging System: E.A.S.Y 429K Kamera, E.A.S.Y RH-3 Dunkelhaube; Software E.A.S.Y Win32, Herolab (Wiesloch)

DNA-Inkubationen, Hydrolyse und Derivatisierungen:

Schüttelwaserbad Julabo SW-20C, Julabo (Seelbach); Tischzentrifuge, Mikro 12-24, Hettich (Tuttlingen); Thermomixer compact und Thermomixer comfort, Eppendorf (Hamburg); Aristolochiasäure I, Madaus

pH-Messungen: φ 340 pH TempMeter, Beckman Coulter (Krefeld);

DNA Isolierung aus Gewebe (Phenol-Extraktionen):

Minifuge RF, Heraeus (Hanau); Sorvall Super T21, Kendro (Langenselbold); Überkopfschüttler Reax 2 und Vortex-Schüttler Reax Control, Heidolph (Schwabach);

Reinstwasseranlage: Milli Q, Millipore (Schwalbach);

5.2 Methoden

5.2.1 ³²P-Postlabeling-Analysen:

Bestimmung der DNA-Konzentration

Aliquots der DNA-Lösungen werden 1:50 mit Wasser verdünnt und die UV-Extinktionen bei 260 und 280nm bestimmt. Für reine DNA liegt der Quotient OD₂₆₀:OD₂₈₀ bei ca. 1.8. Die DNA-Konzentration ergibt sich aus:

$$c(DNA) [\mu g/ml] = OD_{260} \cdot 50 \cdot Verdünnung$$

Herstellung des Enzym-Mixes zum DNA-Verdau

Da die Enzyme Mirokokken-Nuklease (MN) und Milz-Phosphodiesterase (SPD) in Form von gepufferten Lösungen, bzw. stabilisierten Lyophilisaten geliefert werden, müssen sie vor einer Verwendung von diesen Substanzen (Salzen) gereinigt werden. Von besonderer Bedeutung beim ³²P-Postlabeling-Verfahren ist das NH₄⁺ Ion, welches kompetitiv die T4-

PNK inhibiert und die Übertragung der radioaktiven Phosphatgruppe verhindert. Auch beim Fluoreszenz-Postlabeling störende Substanzen mit Carbonylfunktion (z. B. Acetat) werden in diesem Schritt abgetrennt.

330μl SPD Lösung werden mit bidestilliertem Wasser auf 1ml aufgefüllt, in eine Slide-A-Lyzer[®] Dialysekassette gespritzt und zweimal für 10h gegen 10l Wasser dialysiert. Die erhaltene Lösung wird an der Speed-Vac zur Trockene eingeengt und entsprechend der gewünschten SPD Konzentration wieder in bidest. Wasser gelöst: in 2ml für 1fach SPD (5mU/μl), in 400μl für 5fach SPD (25mU/μl), in 133μl für 15fach SPD (75mU/μl).

500U MN (Lyophilisat) werden in 250µl bidest. Wasser aufgenommen, in die Dialyse-Kassette überführt und zweimal 10h gegen 10l Wasser dialysiert. Die erhaltene Lösung wird an der Speed-Vac zur Trockene einrotiert und der Rückstand in 1667µl bidest. Wasser gelöst (300mU/µl). Zur Herstellung des Enzym-Mixes werden gleiche Volumina MN- und SPD-Lösung gemischt, was die gewünschten Endkonzentrationen ergibt.

Enzymatische DNA-Hydrolyse

Durch Verwendung von Mikrokokken-Nuklease (MN) und Phosphodiesterase aus Kalbsmilz (SPD) wird DNA zu 2'-Desoxynukleosid-3'-Phosphaten hydrolysiert. Je Probe werden Aliquots der DNA-Proben, die 12.5µg DNA enthalten, im Vakuum zur Trockene eingeengt und in 6.5µl destilliertem Wasser gelöst. Zu dieser Lösung werden 1µl des Standard-Verdau-Puffers (100mM CaCl₂, 250mM Natriumsuccinat, pH 6.0) oder des für die Fluoreszenzderivatisierung angepassten Verdau-Puffers (100mM CaCl₂, 250mM HEPES, pH 6.0) zugegeben. Diese Lösung wird mit 5µl MN/SPD-Mix bestehend aus 2.5mU/µl SPD und 150mU/µl MN versetzt. Die Lösung wird 3h bei 37°C inkubiert.

Vorbehandlung der Dünnschichtplatten

Die PEI-Cellulose Fertigplatten werden vor ihrer Verwendung einer Vorentwicklung mit demineralisiertem Wasser als Fließmittel (ca. 16h, über Nacht) unterzogen. Dadurch werden fertigungsbedingte Verunreinigungen am oberen Ende der Platte als gelbliche Zone konzentriert.

Radioaktiv-Markierung zur Bestimmung der "Normals"

2.5µl des enzymatischen DNA-Verdaus werden 1:1500 verdünnt. Dazu werden 2.5µl des Hydrolysats zu 247µl Wasser gegeben. Dann werden 10µl dieser Lösung zu 140µl Wasser pipettiert. 5µl dieser 1:1500-Verdünnung werden zu 2.5µl TRIS-Puffer (10mM, pH 9.0) gegeben. Zu dieser Nukleotid-Lösung (Volumen 7.5µl) werden 2.5µl eines frisch hergestellten "Label-Mix", bestehend aus 1µl Kinase-Puffer (200mM Bicin, 100mM DTT, 100mM Magnesiumchlorid, 10mM Spermidin, pH 9.5), 0.5µl ATP (90µM), 0.34µl T4-PNK (30U/µl), 100µCi [γ -³²P]-ATP (Volumen abhängig von Aktivität) und Wasser (Differenz zu 2.5µl) zugegeben. Zu beachten ist dabei, dass die Kinase als letztes dem "Label-Mix" beigefügt wird. Die Inkubationsdauer beträgt 30min bei Raumtemperatur. Die 2'-Desoxynukleosid-3'-Phosphate werden dabei in 3',5'-(³²P)-Nukleosid-Bisphosphate überführt und anschließend chromatographisch getrennt.

Chromatographische Trennung der "Normals"

4μl der Lösung der markierten Nukleotide werden entnommen und mit 750μl TRIS-Puffer (10mM, pH 9.0) verdünnt. Von dieser Verdünnung werden je Probe 5μl 2cm vom unteren Rand entfernt auf eine PEI-Cellulose-DC-Folie aufgetragen. Die Entwicklung erfolgt in 0.28M NH₂SO₄, 50mM NaH₂PO₄, pH 6.5. Nach Trocknung im Warmluftstrom wird die Radioaktivität mit einem Instant-Imager gemessen.

Butanol Anreicherung der DNA-Addukte

Diese Methode wurde speziell für die Anreicherung großer lipophiler DNA-Addukte entwickelt. Dabei werden die veränderten Nukleotide in die lipophile Phase (Butanol) ausgeschüttelt und so von den deutlich hydrophileren Normals abgetrennt, bzw. stark angereichert. Zu den erhaltenen 10µl DNA-Hydrolysat werden 215µl Ammoniumformiat-Puffer (11.6mM, pH 3.5) und 25µl Tetrabutylammoniumchlorid-Lösung (10mM) gegeben und gut gemischt. Die Lösung wird mit 1 Vol. (250µl) H₂O-gesättigtem n-Butanol überschichtet und 2min bei höchster Stufe gevortext, danach für 1min bei 9000rpm bis zur vollständigen Phasentrennung zentrifugiert. Die Butanolphase (oben) wird in ein neues Eppendorf-Tube überführt, und der Extraktionsvorgang wie beschrieben wiederholt, die Butanol-Phasen vereinigt. Zu den ca. 500µl organische Phase werden 400µl Butanol gesättigtes Wasser gegeben und wie beschrieben zweimal extrahiert. Dieses Mal wird nach jedem Extraktionsvorgang die untere, wässrige Phase mit einer Spritze (abgeschnittene Kanüle) entnommen und verworfen. Die letztendlich erhaltene Butanolphase wird mit 3µl Tris-Puffer (250mM) neutralisiert und an der Speed-Vac zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wird in 50 μ l Butanol aufgenommen, das Tube gevortext ("geschnippt") und erneut zur Trockene einrotiert. Der Rückstand wird in 16 μ l H₂O gelöst und für die Analyse der Addukte verwendet.

Nuklease P1 Anreicherung der DNA-Addukte

Bei diesem von Reddy und Randerath [6] erstmals beschriebenen Verfahren wird die Eigenschaft der Nuklease P1 ausgenutzt 2'-Desoxynukleosid-3'-Monophosphate zu dephosphorylieren. Große sperrige ("bulky") Addukte werden dabei von dem Enzym nicht als Substrat akzeptiert, was dazu führt, dass nur unmodifizierte 2'-Desoxynukleosid-3'-Phosphate zu 2'-Desoxynukleosiden verdaut werden. So erreicht man eine relative Anreicherung der Addukte. Die Methode ist nicht universell anwendbar, da kleinere Addukte (z. B. alkylierte) oder bestimmte großvolumige C8-Addukte zum Teil dephosphoryliert werden.

Zu den restlichen 10µg Hydrolysat werden 3µl NP-1 Mix, bestehend aus 1.25µl Nuklease P1 (4µg/µl), 0.65µl Natriumacetat pH 5.0 (0.8M), 0.65µl ZnCl₂ (2mM) und 0.45µl H₂O, gegeben und 30min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wird die Reaktion durch Zugabe von 3µl Tris-Puffer (0.427M) gestoppt.

³²P-Postlabeling der DNA-Addukte

Nach DNA-Verdau und Anreicherung folgt nun die eigentliche Markierungsreaktion. Die (verbliebenen) 2'-Desoxynukleosid-3'-Phosphate werden durch enzymatische Phosphorylierung mit der T4-PNK in die 3',5'(³²P)-Nukleosid-Bisphosphate überführt. Dazu werden die nach Anreicherung erhaltenen 16µl mit 4µl des unter "Normals" beschriebenen Labeling-Cocktails gemischt und 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird der gesamte Ansatz vorsichtig am Origin (s. Abb. 82) aufgetragen und in Richtung D1 (Laufmittel s. u.) entwickelt. Insgesamt sind vier DC Entwicklungen nötig, auf die Richtung D2 kann im Allgemeinen verzichtet werden. Hierbei sind D1 und D5 Waschschritte über Nacht, bei denen übrig gebliebene unmodifizierte Nukleotide und radioaktives ATP auf ein angeheftetes Filterpapier abgetrennt werden. Die eigentliche zweidimensionale Trennung der DNA-Addukte erfolgt mit den Laufmitteln D3 und D4.

Nach den entsprechenden Läufen wird die Platte an den gestrichelten Linien geschnitten. Die Aktivitätsbestimmung der erhaltenen Addukt-Spots erfolgt mittels eines Instant Imagers.



Abb. 82: Schema der mehrdirektionalen Dünnschichtchromatographie

- D1: 1M Natriumphosphat-Puffer, pH 6.8
- D3: 3.5M Lithiumformiat-Puffer, 8.5 M Harnstoff, pH 3.5
- D4: 0.8M Lithiumchlorid, 0.5 M Tris, 8.5 M Harnstoff, pH 8.0
- D5: 1.7M Natriumphosphat-Puffer, pH 6.0

5.2.2 Fluoreszenzmarkierung enzymatischer DNA-und RNA-Hydrolysate

Auf Grund der Hydrolysempfindlichkeit von RNA wurde darauf geachtet, dass alle verwendeten Lösungen mit RNase freiem Wasser bereitet wurden und die Arbeitsflächen und Geräte entsprechend mit RNase freeTM (Continental Laboratory Products, San Diego) behandelt waren.

Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration genomischer DNA wurde entsprechend der bei der ³²P-Postlabeling-Methode angegebenen Gleichung ermittelt. Im Fall von Oligonukleotiden erfolgt die Bestimmung der Konzentration nach:

$c(DNA) [\mu g/ml] = OD_{260} \cdot 30 \cdot Verdünnung$

oder es wurde die Konzentrationsangabe des Herstellers verwendet.

Enzymatische DNA-Hydrolyse zu 2'-Desoxyribonukleosid-3'-Monophosphaten

Durch Verwendung von Mikrokokken-Nuklease (MN) und Phosphodiesterase aus Kalbsmilz (SPD) wird DNA zu 2'-Desoxynukleosid-3'-Phosphaten hydrolysiert. Je Probe werden Aliquots der DNA-Proben/Oligonukleotide, die 10µg DNA enthalten, im Vakuum zur Trockene eingeengt und in 5µl destilliertem Wasser gelöst. Zu dieser Lösung werden 5µl eines Enzym-Mixes gegeben, der aus 1µl Verdaupuffer (100mM CaCl₂, 250mM HEPES, pH 6.0) und 5µl MN/SPD Mischung besteht. Je nach Adduktierung wurden verschiedene Konzentrationen an SPD eingesetzt:

1-fach SPD: 2.5mU/µl SPD, 150mU/µl MN

5-fach SPD: 12.5mU/µl SPD, 150mU/µl MN

15-fach SPD: 72.5mU/µl SPD, 150mU/µl MN

Die Lösung wird 3h bei 37°C inkubiert.

Enzymatische DNA-Hydrolyse zu 2'-Desoxyribonukleosid-5'-Monophosphaten mit NP1

Unter Verwendung von NP1 wird DNA zu 2'-Desoxynukleosid-5'-Monophosphaten verdaut. Dazu werden Aliquots der DNA-/Oligonukleotidproben an der Speed-Vac lyophilisiert und in 6μ l 50mM MES Puffer pH 5.5 gelöst. Nach Zugabe von 2μ l 2mM ZnCl₂ Lösung (in Wasser) und 2μ l NP1 (0.266 μ g = 0.2U) wurde der Ansatz 2h bei 37°C inkubiert

Enzymatische RNA-Hydrolyse zu Ribonukleosid-5'-Monophosphaten mit Nuklease P1

10µg RNA oder Oligoribonukleotid wurden unter den gleichen Bedingungen wie DNA zu den entsprechenden Ribonukleosid-5'-Monophosphaten verdaut.

Enzymatische DNA-Hydrolyse zu 2'-Desoxyribonukleosid-5'-Monophosphaten mit DNaseI/SVPD

a) Methode nach Liuzzi und Weinfeld [119, 120]

Die beschriebenen und in Tab. 39 wiedergegebenen Inkubationsbedingungen wurden übernommen, außer dass der 10mM Tris-EDTA-Puffer pH 7.5 durch HEPES 10mM pH 7.5

ersetzt wurde. 10µg zur Trockene eingeengte DNA wurden im Puffer gelöst, die Enzymlösung zugegeben und der Ansatz 16h bei 37°C inkubiert.

 Tab. 39: Modifizierte Bedingungen f
 ür die DNA-Hydrolyse zu 2'-Desoxynukleosid-5'-Phosphaten nach

 Liuzzi et al. und Weinfeld et al. [119, 120]

Substanz	Menge	Endkonzentration
CT-DNA	10µg (30.8nmol)	770µM
DNaseI gelöst in H ₂ O	2µl (2U/µl)	0.1U/µl
SVPD gelöst in H ₂ O	2µl (0.02U/µl)	1mU/µl
HEPES 10mM, 4mM MgCl ₂ pH 7.5	36µl	
Gesamtvolumen	40µl	

b) Methode nach Dipple und Piggot [121]

Die beschriebenen Bedingungen wurden an die Bedingungen der CE-LIF-Methode angepasst indem die verwendeten Tris-Puffer durch HEPES gleicher Molarität und gleichen pH-Wertes ersetzt wurden (s. Tab. 40). 10µg zur Trockene eingeengte CT-DNA Stammlösung wurden im Puffer gelöst und nach Zugabe der DNaseI 1h bei 37°C inkubiert. Danach wurde die SVPD zugegeben und eine weitere Inkubation von 48h bei 37°C angeschlossen.

Tab. 40: Modifizierte Bedingungen f ür die DNA-Hydrolyse zu 2'-Desoxynukleosid-5'-Phosphaten nach Dipple und Piggot [121]

Substanz	Menge	Endkonzentration
Schritt 1:		
CT-DNA	10µg (30.8nmol)	770µM
DNaseI gelöst in H ₂ O	$2\mu l (0.1 mg = 200 U)$	6.67U/µl
HEPES 10mM, 1mM MgCl ₂ pH 7.0	26µl	
Schritt 2:		
SVPD gelöst in H ₂ O	10µl (0,1U)	1.67mU/µl
HEPES 200mM pH 9.0	20µl	
Gesamtvolumen	60µl	

Chemische Derivatisierung von 2'-Desoxyribonukleosid-3'-Monophosphaten

Das DNA Hydrolysat (10µl) wird zunächst mit 20µl 0.8M HEPES-Puffer pH 6.5 versetzt. Danach werden 30µl einer 25mM BODIPY-FL-EDA Lösung (0.3mg in 33µl HEPES 0.8M, pH 6.5) und 30µl einer 1.8M EDC-Lösung (11.2mg in 32.5µl HEPES 0.8M pH 6.5) zugegeben, gut vermischt (Vortex) und der Ansatz unter Lichtausschluss 25h bei 25°C inkubiert.

Chemische Derivatisierung von 2'-Desoxyribonukleosid-5'-Monophosphaten und Ribonukleosid-5'-Monophosphaten

Die Lösung aus der DNA- bzw. RNA-Hydrolyse (10µl) wird zunächst mit 20µl 0.25M MES Puffer pH 6.5 vermischt. Danach werden 30µl einer 25mM BODIPY-FL-EDA Lösung (0.3mg in 33µl MES 0.25M, pH 6.5) und 30µl einer 1.8M EDC-Lösung (11.2mg in 32.5µl MES 0.25M, pH 6.5) zupipettiert und gut vermischt (Vortex). Der Ansatz wird unter Lichtausschluss 25h bei 25°C inkubiert.

5.2.3. Kapillarelektrophorese

Kapillarkonditionierung

Eine neu installierte Kapillare wurde unabhängig vom Gerätetyp (BioRad oder PACE/MDQ) vor der ersten Messung konditioniert, indem sie nacheinander 15min mit 1M NaOH, 15min mit 1M HCl, 15min mit 1M NaOH, 5min mit destilliertem Wasser (Millipore) und 15min mit dem entsprechenden Trennpuffer gespült wurde (High pressure Mode für BioRad, 50psi für PACE/MDQ). Anschließend wurde für 120min ein Strom von 20KV angelegt.

Kapillarspülung

Nach ungefähr 15-20 Analysen macht sich die Belegung der Innenwand der Glaskapillare mit Proteinen aus der Hydrolyse der DNA Proben durch eine schlechtere Trennung der Nukleotid-Bodipy Konjugate bemerkbar, v. a. durch verstärktes Tailing, bzw. deutlich längere Migratioszeiten. Daher wurde ein Spülschritt mit Methanol entwickelt, der die Proteine aus der Kapillare entfernen soll. Dabei wurde folgende, optimierte Spülsequenz benutzt: 3min dest. Wasser (Millipore), 10min Methanol, 5min dest. Wasser (Millipore), 5min SDS (200mM), 10min 1M NaOH, 5min dest. Wasser (Millipore), 10min Trennpuffer und anschließend für 120min 20KV angelegt. Die Beckman PACE/MDQ wurde mit 20psi, die BioRad im High Pressure Mode gespült.

Kapillarelektrophoretische Trennung (Analyse)

Zwischen den Analysenläufen wurde die Kapillare jedesmal für 1min mit 200mM SDS, 1.5min mit 1M NaOH, 1min mit dest. Wasser (Millipore) und 2min mit dem Trennpuffer gespült um die Kapillare für die nächste Analyse vorzubereiten, d. h. den Bodipy-Überschuss

des letzten Laufes auszuwaschen und möglichst auch alle weiteren an die Kapillaroberfläche adsorbierten Substanzen (z.B. Proteine) zu entfernen. Danach wurde die Probe hydrodynamisch injiziert (PACE 2.5x psi·s, BioRad 20x psi·s), 20 000V (25 000V bei der BioRad-Anlage) zwischen den beiden Kapillarenden angelegt und das Kapillaroutlet kathodisch geschaltet. Ein gewöhnlicher Analysenlauf dauert 40min, die Signale der Bodipy-Nukleotid-Konjugate erscheinen in der Regel zwischen 17 und 30 Minuten.

Herstellung der Elektrolyte (Standardvorschrift)

Für den Natriumphosphatpuffer werden zwei Stammlösungen von 20mM Natriumdihydrogenphosphat (NaH₂PO₄) und Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄) angesetzt. Dazu werden 1.3799g NaH₂PO₄ in genau 0.51 destilliertem Wasser (Millipore) gelöst, sowie 1.7799g NaH₂PO₄ · 2H₂O ebenfalls in genau 0.51 destilliertem Wasser (Millipore) gelöst. Von der 20mM NaH₂PO₄ Lösung (pH ca. 9.2-9.5 je nach Wasserqualität) wird die gewünschte Menge vorgelegt und mit der 20mM NaH₂PO₄ Lösung auf pH 9.0 bei 25°C eingestellt.

Die gewünschte Menge an Natriumlaurylsulfat (SDS) wird in einem 50ml Falcon Tube eingewogen (für 75mM SDS 1.0814g, für 90mM SDS 1.2968g) und in der entsprechenden Menge Natriumphosphat-Puffer pH 9.0 gelöst. Die Menge hängt vom Methanolgehalt (v/v) des Puffers ab:

75mM SDS, 15% Methanol: 1.0814g SDS in 42.5ml Natriumphosphat-Puffer lösen, 7.5ml Methanol zugeben, gut mischen und über Nacht stehen lassen. (Endkonzentrationen 17mM Na-Phosphat Puffer, 75mM SDS, 15% Methanol (v/v), pH 9.0

75mM SDS, 20% Methanol: 1.0814g SDS in 40ml Natriumphosphat-Puffer lösen, 10ml Methanol zugeben, gut mischen und über Nacht stehen lassen. (Endkonzentrationen 16mM Na-Phosphat Puffer, 75mM SDS, 20% Methanol (v/v), pH 9.0

90mM SDS, 10% Methanol: 1.2968g SDS in 45ml Natriumphosphat-Puffer lösen, 5ml Methanol zugeben, gut mischen und über nacht stehen lassen. (Endkonzentration 18mM Na-Phosphat Puffer, 90mM SDS, 10% Methanol (v/v), pH 9.0

Für Puffer die Glukose enthalten wird eine entsprechende Menge an D(+)-Glukose, in 0.51 (90.08g für 1M) des 20mM Natriumphosphat-Puffers pH 9.0 (s.o.) gelöst, sterilfiltriert und im Kühlschrank gelagert. Diese Stammlösung kann wie der normale Natriumphosphat-Puffer zum Lösen des SDS eingesetzt werden, bzw. die benötigte Verdünnung für Trennpuffer, die
weniger Glukose enthalten. Vor Gebrauch sollte der pH-Wert der Stammlösung überprüft und gegebenenfalls nachjustiert werden. Es ist dabei zu beachten, dass sich die Molarität der Glukose durch die Zugabe von Methanol verändert.

Im Falle des zur Trennung von pdU-Bodipy aus Bisulfit-behandelter DNA verwendeten 0.5M Glukose-Puffers wurden 25ml 1M Glukose-Stammlösung in 20mM Natrium-Phosphatpuffer, pH 9.0 mit 21ml Natrium-Phosphatpuffer, pH 9.0, gemischt, 1.08142g SDS darin gelöst und 4ml Methanol zugegeben.

	Verhältnis		
Konzentration	Konzentration	Konzentration	Methanol/SDS
SDS	Methanol [% v/v]	Natriumphosphat	
50mM	20%	16mM	0.4
75mM	5%	19mM	0.067
75mM	7.5%	18.5mM	0.1
75mM	10%	18mM	0.133
75mM	15%	17mM	0.2
75mM	20%	16mM	0.267
90mM	5%	19mM	0.055
90mM	7.5%	18.5mM	0.083
90mM	10%	18mM	0.111
100mM	5%	19mM	0.05

Tab. 41: Übersicht über die getesteten Trennpuffer zur Analyse von p5mdC-Bodipy

Natriumlaurylsulfat (SDS) 200mM:

2.5954g SDS werden in einem 50ml Falcon-Tube eingewogen und in 45ml destilliertem Wasser (Millipore) gelöst.

Ausführliche Auswertung der 8-oxo-dG enthaltenden Oligonukleotide

Oligo 995397	pdA	рТ	pdC	8-oxo-pdG	pdG
Fläche [Einheiten]	11312703 ± 200842	$4028325 \pm$	7157384 ±	257986 ±	2140755 ±
	509642	69234	1/190/	0525	30420
Migrationszeit [min]	19.75	20.77	22.00	21.52	23.09
Korrigierte Peakfläche	$572819 \pm$	$193938 \pm$	$325287 \pm$	11984 ± 270	$92709 \pm$
	11442	2690	4735		1145
Nukleotidverhältnis	47.80 ± 0.82	16.19 ± 0.27	27.15 ± 0.40	1.0 ± 0.00	7.74 ± 0.09
Gem. NuklAnteil (%)	47.86 ± 0.16	16.21 ± 0.05	27.18 ± 0.06	1.00 ± 0.02	7.75 ± 0.06
Tats. NuklAnteil (%)	35.29	17.64	23.52	5.88	17.64
Korrekturfaktor	0.74 ± 0.003	1.09 ± 0.007	0.87 ± 0.003	5.87 ± 0.091	2.28 ± 0.018
Norm. Migrationszeit	1.00	1.05	1.11	1.09	1.17

 Tab. 42: CE-LIF-Analyse von Oligonukleotid Nr. 995397 nach NP1-Verdau und Fluoreszenzmarkierung

 mit BODIPY-FL-EDA

Tab. 43: CE-LIF-Analyse von Oligonukleotid Nr. 995398 nach NP1-Verdau und Fluoreszenzmarkierungmit BODIPY-FL-EDA

Oligo 995398	pdA	рТ	pdC	8-oxo-pdG	pdG
Fläche [Einheiten]	$\begin{array}{r} 7270749 \pm \\ 301737 \end{array}$	9539603± 424587	5552866 ± 224781	$\begin{array}{r} 484725 \pm \\ 6760 \end{array}$	$ \begin{array}{r} 1910232 \pm \\ 92961 \end{array} $
Migrationszeit [min]	19.27	20.23	21.37	20.90	22.35
Korrigierte Peakfläche	$\begin{array}{r} 377821 \pm \\ 9591 \end{array}$	471441 ± 12981	$\begin{array}{c} 259372 \pm \\ 5596 \end{array}$	23201 ± 291	$\begin{array}{r} 85438 \pm \\ 2395 \end{array}$
Nukleotidverhältnis	32.58 ± 1.22	40.65 ± 1.61	22.40 ± 0.75	1.0 ± 0.00	7.37 ± 0.30
Gem. NuklAnteil (%)	31.03 ± 0.03	38.72 ± 0.11	21.33 ± 0.07	1.91 ± 0.07	7.02 ± 0.02
Tats. NuklAnteil (%)	21.05	36.84	15.79	10.53	15.73
Korrekturfaktor	0.75 ± 0.013	0.95 ± 0.021	0.84 ± 0.009	6.31 ± 0.238	2.56 ± 0.132
Norm. Migrationszeit	1.00	1.05	1.11	1.09	1.16

.

Oligo IBA5	pdA	рТ	pdC	8-oxo-pdG	pdG
Fläche [Einheiten]	5695723 ± 81178	5723605± 237427	5513460 ± 110645	$\begin{array}{r} 137689 \pm \\ 16988 \end{array}$	1130598 ± 103624
Migrationszeit [min]	17.62	18.37	19.34	18.91	20.32
Korrigierte Peakfläche	$\begin{array}{r} 323074 \pm \\ 5426 \end{array}$	290885 ± 13399	$\begin{array}{r} 285548 \pm \\ 6254 \end{array}$	7648 ± 67	$56653 \pm \\ 4476$
Nukleotidverhältnis	42.11 ± 0.87	38.39 ± 2.13	37.27 ± 1.06	1.0 ± 0.00	7.50 ± 0.70
Gem. NuklAnteil (%)	33.54 ± 0.59	30.18 ± 0.62	29.64 ± 0.33	0.76 ± 0.07	5.87 ± 0.30
Tats. NuklAnteil (%)	25.00	30.00	25.00	5.00	15.00
Korrekturfaktor	0.68 ± 0.001	0.95 ± 0.003	0.74 ± 0.002	5.53 ± 0.204	2.25 ± 0.007
Norm. Migrationszeit	1.00	1.046	1.105	1.081	1.162

Tab. 44: CE-LIF-Analyse von Oligonukleotid IBA5 nach NP1-Verdau und Fluoreszenzmarkierung mit BODIPY-FL-EDA

5.2.4 In vitro Systeme

In vitro Adenin-Methylierung

Die *in vitro* Methylierung des Lambda-Phagen Genoms wurde angelehnt an die Vorschrift des Herstellers (New England Biolabs) durchgeführt, alle Reagenzien wurden jedoch im Überschuss eingesetzt um eine wirklich vollständige Methylierung aller GATC Sequenzen des Genoms zu erreichen.

 $2\mu g$ (4 μ l) der N⁶-Methyladenin-freien Lambda-Phagen DNA wurden mit 27.5 μ l bidestilliertem Wasser gemischt und mit 4 μ l 10fach reaction buffer versetzt. Das mitgelieferte S-Adenosyl-Methionin wurde 1:10 mit bidestilliertem Wasser verdünnt und davon 2.5 μ l zum Reaktionsansatz zugegeben. Zum Schluss wurden noch 2 μ l (16U) der *dam* Methylase zupipettiert und der Ansatz für 2h 30min bei 37°C inkubiert.

Nach der Methylierung wurde die DNA mit dem QIAquick PCR Purification Kit unter Verwendung des Herstellerprotokolls aufgereinigt:

- Zugabe von fünf Teilen Puffer PB (200µl)
- Probe auf die Membran der "spin column" pipettieren und 60s bei 13 000rpm zentrifugieren (DNA bindet an die Membran)
- Eluat verwerfen
- Zum Waschen 750µl Puffer PE auf die Membran pipettieren und wiederum 60s bei 13000rpm zentrifugieren

- Eluat verwerfen und das leere Tube nochmals 1min bei 13 000 rpm zentrifugieren um übrig gebliebenes Ethanol zu entfernen
- "Spin column" mit der an die Membran gebundenen DNA aus dem Tube nehmen und in ein sauberes Eppendorf Gefäß (1.5ml) überführen.
- 30µl bidestilliertes Wasser auf die Membran geben, 5min bei Raumtemperatur einwirken lassen und dann 1min zentrifugieren (13 000rpm) um die DNA zu eluieren.

Restriktionsverdau (restriction/protection assay) zur Überprüfung der Vollständigkeit der Methylierung

DpnII ist ein Restriktionsenzym, das die Sequenz GATC nur dann schneidet, wenn das Adenin **nicht** methyliert ist. Dabei hinterlässt das Enzym überstehende GATC Enden ("sticky ends"). Im Gegensatz zu der N⁶ methyl-dA freien Lambda-Phagen DNA sollte die vollständig methylierte DNA nach der Behandlung mit *dam* Methylase nicht zerschnitten werden, Wildtyp DNA von Lambda-Phagen aus *dam*⁺ *E. Coli* sollte wegen der natürlichen, unvollständigen Methylierung, deutlich weniger Bruchstücke aufweisen.

Es wurde eine etwas abgewandelte Methode des Enzymherstellers (NEB) verwendet.

Die 30µl Eluat aus der Methylierungsreaktion wurden mit 4µl 10fach konzentriertem *Dpn*II Puffer gemischt, dann 4µl bidestilliertes Wasser und zum Schluss 1µl *Dpn*II Lösung (10U) zugegeben und 2h bei 37°C inkubiert. Das Ergebnis wurde über ein 1% Agarose/1xTBE-Gel mit 0.03% Ethidiumbromid bestimmt. Die 40µl wurden mit 5µl loading buffer vermischt und komplett aufgetragen, die Spannung betrug 60V bei 60mA und 4 Watt (ca. 45min). Zur anschließenden Betrachtung unter UV-Licht wurde das Imaging-System Herolab Wiesloch (E.A.S.Y 429K Kamera, E.A.S.Y RH-3 Dunkelhaube; Software E.A.S.Y Win32) verwendet.

Extraktion der unverdauten DNA aus dem Agarosegel:

Die Extraktion der DNA aus dem Gel hat den Vorteil, dass bei einer nicht vollständig verlaufenen Methylierung nur die unverdaute Bande (d.h. komplett methylierte DNA) ausgeschnitten und verwendet werden kann.

Die Extraktion wurde mit dem QIAquick Gel Extraktion Kit nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt:

• Ausschneiden der Bande aus dem Agarosegel

- Zu je 100mg Gel 300µl Puffer QC pipettieren und bei 50°C für 10min inkubieren. Zur besseren Auflösung des Gels alle 2-3min kurz vortexen.
- Wenn das Gel komplett gelöst ist sollte die Farbe der Mischung gelb sein (ähnlich wie die Pufferfarbe vor dem Auflösen des Gels)
- Pro 100mg Gel 100µl Isopropanol zugeben und Mischen
- Die Lösung auf die Membran einer "spin column" geben und wie oben beschrieben die DNA isolieren.

Bisulfit-Behandlung von Kalbsthymus DNA

EcoRI verdaute DNA wurde wie beschrieben [127, 128] denaturiert und mit Natriumbisulfit behandelt. Kalbsthymus DNA (2µg) wurde in einem Volumen von 50µl mit Natronlauge (Enkonzentration 0.2mM) 30min bei 37°C denaturiert. Frisch zubereitete Hydrochinonlösung (30µl, 10mM) und Natriumbisulfit-Lösung (3M, 520µl, pH 5.0) wurden zugegeben, gemischt und der Ansatz unter einer Ölschicht 14h bei 55°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA mit dem Gene Clean Kit (Qbiogene) nach Vorschrift des Herstellers aufgereinigt und in 100µl Wasser eluiert. Die Modifikation wurde durch eine 20minütige Behandlung mit NaOH bei 37°C abgeschlossen, die DNA mit Ethanol gefällt und bis zur Analyse in Wasser gelöst bei - 20°C aufbewahrt (max. 2 Wochen).

Behandlung von CT-DNA mit 3-NBA in vitro

Zur in vitro Adduktierung von DNA mit Nitroaromaten gibt es 3 Standard-Aktivierungssysteme: Reduktion mit Zink, Xanthinoxidase oder S9 Mix.

Inkubation mit Zink: 250µl Kaliumphosphat-Puffer (100mM, pH 5.8) wurden mit 158µl CT-DNA Lösung (3mg/ml) und 18µl 3-NBA Stammlösung in einem Pyrex[®]-Röhrchen gemischt und mit 74µl H₂O auf 500µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Nach Zugabe von 20mg Zink wurde der Ansatz 3h bei 37°C inkubiert. Die Farbe schlug dabei von leicht gelb nach rosa um (Reduktion zum Aminobenzanthron). Nach der Inkubation wurde das Zink abzentrifugiert, der Überstand entnommen und mit 1ml Ethylacetat extrahiert. Die DNA wurde nach Zugabe von 50µl NaCl-Lösung (5M) mit 1.25ml Ethanol (-20°C) gefällt.

Deaminierung von DNA mit Natriumnitrit nach Suzuki et al. [132]

100µg Kalbsthymus-DNA gelöst in 1ml 3 M Natriumacetat-Puffer pH 3.7 wurden mit 100µl NaNO₂-Lösung (1M in Wasser) versetzt und 6h bei 37°C inkubiert. Ausfällen der DNA mit 2.5 Vol. Ethanol (-20°C) war anschließend aufgrund der starken Schädigung der DNA nicht mehr möglich, daher wurde für die Isolierung der DNA eine Sephadex-NAP G-25M Säule verwendet (Herstellervorschrift).

5.3 Synthesen von Addukt-Standardverbindungen

Alle Verbindungen wurden von Martin Osborne, Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey synthetisiert.

1-N²-Propano-2'-Desoxyguanosin-3'-Monophosphat (Hex-dGp)

(6*S*,8*S*) und (6*R*,8R)-3-(2'-deoxy-β-D-*erythr*o-pentofuranosyl-3'-phosphat)5,6,7,8-tetrahydro-8-hydroxy-6-propylpyrimodo[1,2-*a*]purin-9(3*H*)-on Martin Osborne, Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey



Die Synthese wurde nach der Methode von Schuler et al. [152] durchgeführt.

14mg (0.04mmol) 2'-Desoxyguanosin-3'-Monophosphat (dGp) Natriumsalz wurden mit 50µl Hexenal (0.43mmol) in einem 0.1M Natriumphosphatpuffer, pH 10.7, bei 37°C für vier Tage zur Reaktion gebracht. Das Hexenal wurde danach dreimal mit je 0.7ml Diethylether extrahiert und der Ether mit Stickstoff abgeblasen.

Die Produkte wurden mittels präparativer HPLC aufgereinigt und bei 254nm detektiert: Jupiter ODS (Phenomenex, Macclesfield) 250 x 4.6mm, Laufmittel A: Ammoniumformiat 0.05M, pH 6.0, Laufmittel B Methanol, Flussgeschwindigkeit: 0.8ml/min. Es wurde ein diskontinuierlicher Gradient bei Raumtemperatur verwendet: 0-10% Methanol in 5min, auf 25% Methanol in 25min, dann auf 40% Methanol in 10min. Zwei Peaks wurden gesammelt, Hex-dGp1 bei ca. 40min und Hex-dGp2 bei ca. 42min. Die Produktfraktionen wurden eingeengt und mit einer Waters C-18 Sep Pak Säule entsalzt. Ausbeuten: 4mg Hex-dGp1 und 5.3mg Hex-dGp2 (9.3mg gesamt = 52%).

UV-Spektrum, MS und H¹-NMR entsprechen der Literatur [152].

1-N²-Propano-2'-Desoxyguanosin-5'-Monophosphat (Hex-pdG)

(6*S*,8*S*) und (6*R*,8R)-3-(2'-deoxy-β-D-*erythr*o-pentofuranosyl-5'-phosphat)5,6,7,8-tetrahydro-8-hydroxy-6-propylpyrimodo[1,2-*a*]purin-9(3*H*)-on



Die Synthese wurde analog zu den 3'-Phosphaten nach [152] durchgeführt.

30mg (0.86mmol) 2'-Deoxyguanosin-5'-Monophosphat (pdG) Natriumsalz wurden mir 50μl (0.43mmol) Hexenal in einem 100mM Natriumphosphat-Puffer, pH 10.7, versetzt und acht Tage bei Raumtemperatur, bzw. vier Tage bei 37°C inkubiert. Nicht abreagiertes Hexenal wurde dreimal mit je 0.7ml Diethylether extrahiert und der Ether mit Stickstoff abgeblasen.

Die Produkte wurden mittels präparativer HPLC aufgereinigt und bei 254nm detektiert: Jupiter ODS (Phenomenex, Macclesfield) 250 x 4.6mm, Laufmittel A: Ammoniumformiat 0.05M, pH 6.0, Laufmittel B Methanol, Flussgeschwindigkeit: 0.8ml/min. Die Trennung der Produkte erfolgte mit einem Gradienten von 0 auf 40% Methanol in 40min. Nicht umgesetztes pdG eluierte bei ca. 9min, die beiden Produkte Hex-pdG1 und Hex-pdG2 bei ca. 40 und 42min.

Ausbeuten: 1.7mg Hex-pdG1 und 1.9 Hex-pdG2 (3.6mg gesamt = 5%) UV, MS, H^1 -NMR entsprechen der Literatur

8-Hydroxy-2'-Desoxyguanosin-3'-Phosphat (8-oxo-dGp)



Die Synthese wurde analog der in der Literatur beschriebenen Methode [138] durchgeführt. Zu 4mg (0.01mmol) 2'-Desoxyguanosin-3'-Monophosphat (pdG) Natriumsalz, gelöst in 0.4ml Wasser, wurden 160µl Natriumascorbat-Lösung (34g/l Wasser), 160µl Kupfersulfat-Lösung (5g/l Wasser) und 100µl Wasserstoffperoxid-Lösung (28%) zugegeben und der Ansatz 15min bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Produkt wurde mittels präparativer HPLC isoliert und bei 254nm detektiert: Jupiter ODS (Phenomenex, Macclesfield) 250 x 4.6mm, Ammoniumformiat 25mM, pH 4.7, isokratisch; Flussgeschwindigkeit: 0.8ml/min. Der letzte Peak war 8-oxo-dGp (ca. 12min). Die gesammelten Fraktionen wurden lyophilisiert und über eine C18 Säule (Sep-Pak, Waters) entsalzt.

Ausbeute: ca. 0.2mg (5%). Aufgrund der geringen Ausbeute wurde auch das dGp wieder aufgereinigt und erneut umgesetzt bis letztendlich 0.8mg 8-oxo-dGp erhalten wurden.

UV-Spektrum, MS und H¹-NMR entsprechen den Literaturangaben.

8-Hydroxy-2'-Desoxyguanosin-5'-Phosphat (8-oxo-pdG)



Synthese und Aufreinigung wurden wie bei der Synthese des 3'-Phosphates durchgeführt. Ausbeute: ca. 1.7mg

UV-Spektrum, MS und H¹-NMR entsprechen den Literaturangaben.

6 Literaturverzeichnis

- [1] N. Becker und J. Wahrendorf; "Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland" Springer-Verlag, Heidelberg, (1998)
- [2] A. G. Knudson; Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma *PNAS*, *68* (1971), 820-823
- [3] H. Marquardt in H. Marquardt und S. G. Schäfer (Editors) in "Lehrbuch der Toxikologie" Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart (2003)
- [4] K. Hemminki; DNA adducts, mutations and cancer *Carcinogenesis*, *14* (1993), 2007-2012
- [5] F. P. Perera und I. B. Weinstein; Molecular epidemiology: recent advances and future directions *Carcinogenesis, 21* (2000), 517-524
- [6] M. V. Reddy und K. Randerath; Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of ³²P-postlabeling test for structurally diverse DNA adducts *Carcinogenesis* 7 (1986) 1543-1551
- [7] K. Randerath, M. V. Reddy und R. C. Gupta; ³²P-labelling test for DNA damage PNAS, 78 (1981) 6126-6129
- [8] D. H. Phillips und M. Castegnaro; Standardization and validation of DNA adduct postlabeling methods report of interlaboratory trials and production of recommended protocols *Mutagenesis*, 14 (1999) 301-315
- [9] J. P. Barry, C. Norwood und P. Vouros; Detection and Identification of Benzo[a]pyrene Diol Epoxide Adducts to DNA Utilizing Capillary Electrophoresis-Electrospray Mass Spectrometry *Analytical Chemistry 68* (1996) 1432-1438
- [10] D. L. D. Deforce, F. P. K. Ryniers, E. G. Van den Eeckhout, F. Lemiere und E. L. Esmans; Analysis of DNA Hydrolysates by Capillary Zone Electrophoresis and Capillary Zone Electrophoresis-Electrospray Mass-Spectrometry *Analytical Chemistry*, 68 (1996) 3575-3584
- [11] J. Ding und P. Vouros; Capillary Electrochromatography and Capillary Electrochromatography-Mass Spectrometry for the Analysis of DNA Adduct Mixtures *Analytical Chemistry*, 69 (1997) 379-384
- [12] E. A. Martin, R. T. Heydon, K. Brown, J. E. Brown, C. K. Lim, I. N. H. White und L. L. Smith; Evaluation of tamoxifen and alpha-hydroxytamoxifen ³²P-post-labelled DNA adducts by the development of a novel automated on-line solid-phase extraction HPLC method *Carcinogenesis, 19* (1998) 1061-1069
- [13] C. B. Norwood, E. Jackim und S. Cheer; DNA Adduct Research with Capillary Electrophoresis *Analytical Biochemistry*, *213* (1993) 194-199
- [14] P. Wang und R. W. Giese; Phosphate-specific fluorescence labeling with BO-IMI: reaction details *Journal of Chromatography A*, 809 (1998) 211-218
- [15] Z.-H. Lan, X. Qian und R. W. Giese; Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Deoxynucleotides Labeled with an IMI dye *Journal of Chromatography A*, 831 (1999) 325-330
- [16] O. J. Schmitz, C. C. T. Wörth, D. Stach, und M. Wießler; Kapillarelektrophoretische Analyse von DNA-Addukten als Biomarker der Kanzerogenese Angew. Chemie, 114 (2002) 461-464

- [17] T. M. C. M. de Kok, H. J. J. Moonen, J. van Delft und F. J. van Schooten; Methodologies for bulky DNA adduct analysis and biomonitoring of environmental and occupational exposures *Journal of Chromatography B*, 778 (2003) 345-355
- [18] F. P. Guengerich; Metabolism of chemical carcinogens *Carcinogenesis, 21* (2000) 345-351
- [19] H. Bartsch in J. Higginson, C. S. Muir, und N. Munoz (Editors): "Human cancer: epidemiology and environmental causes" *Cambridge Univ. Press, New York* (1992) 189-208
- [20] F. P. Perera; Perspectives on the risk assessment for nongenotoxic carcinogens and tumor promoters *Environ. Health Perspect.*, *94* (1991) 231-235
- [21] I. B. Weinstein; The Origins of Human Cancer Molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment - 27th Clowes, G.H.A. Memorial Award Lecture *Cancer Res.*, 48 (1988) 4135-4143
- [22] B. Vogelstein, D. Lane und A. J. Levine; Surfing the p53 network *Nature, 408* (2000) 307-310
- [23] P. C. Burcham; Internal hazards base-line DNA-damage by endogenous products of normal metabolism *Mut. Res.*, 443 (1999) 11-36
- [24] International Agency for Research on Cancer (IARC), "IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Suppl. 7: Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs Vols. 1-42" World Health Organization, Lyon, France (1987)
- [25] J. A. Ross und S. Nesnow; Polycyclic aromatic hydrocarbons correlations between DNA-adducts and ras oncogene mutations *Mut. Res.*, 424 (1999) 155-166
- [26] E. Kriek, M. Rojas, K. Alexandrov und H. Bartsch; Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in humans: relevance as biomarkers for exposure and cancer risk *Mut. Res.*, 400 (1998) 215-231
- [27] T. Haak, G. Boche, H.-C. Kliem, M. Wießler, D. Albert und H. H. Schmeiser; Synthesis, Characterization and ³²P-Postlabeling of N-(Deoxyguanosin)-4-aminobiphenyl-3'-Phosphate Adducts *Chem. Res. Toxicol.*, 17 (2004) 776-784
- [28] H. A. J. Schut und E. G. Snyderwine; DNA-adducts of heterocyclic amine food mutagens implications for mutagenesis and carcinogenesis *Carcinogenesis*, 20 (1999) 353-368
- [29] B. Commoner, A. J. Vithayathil, P. Dolara, S. Nair, P. Madyastha und G. C. Guca; Formation of mutagens in beef and beef extract during cooking *Science*, 201 (1978) 913-916
- [30] T. Enya, H. Suzuki, T. Watanabe, T. Hirayama und Y. Hisamatsu; 3-Nitrobenzanthrone, a powerful bacterial mutagen and suspected human carcinogen found in Diesel exhaust and airborne-particulates *Environ. Sci. Technol., 31* (1997) 2772-2776
- [31] C. A. Bieler, M. Wießler, L. Erdinger, H. Suzuki, T. Enya und H. H. Schmeiser; DNA adduct formation from the mutagenic air pollutant 3-Nitrobenzanthrone *Mut. Res.*, 439 (1999) 307-311

- [32] V. M. Arlt, H. Glatt, E. Muckel, U. Pabel, B. L. Sorg, H. H. Schmeiser und D. H. Phillips; Metabolic activation of the environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone by human acetyltransferases and sulfotransferase *Carcinogenesis*, 23 (2002)1937-1945
- [33] J. M. Malinge, M. J. Giraudpanis und M. Leng; Interstrand cross-links of Cisplatin induce striking distortions in DNA J. Inorg. Biochem., 77 (1999) 23-29
- [34] L. J. Marnett; DNA Adducts of α,β-unsaturated aldehydes and dicarbonyl compounds *IARC Sci. Publ.*, *124* (1994) 151-163
- [35] D. S. Mottram, B. L. Wedzicha und A. T. Dodson; Acrylamide is formed in the Maillard reaction *Nature*, *419* (2002), 448
- [36] R. H. Stadler, I. Blank, N. Varga, F. Robert, J. Hau, P. A. Guy, M.-C.Robert und S. Riediker; Acrylamide from Maillard reaction products *Nature*, 419 (2002), 449
- [37] M. Friedman, Chemistry, biochemistry and safety of acrylamide. A review *J. Agric. Food Chem.*, *51* (2003), 4504-4526
- [38] E. Eder, D. Schuler und Budiawan; Cancer risk assessment for crotonaldehyde and 2-hexenal: an approach *IARC Sci. Publ.*, 150 (1999), 219-232
- [39] J. L. Nortier, M.-C. Muniz, H. H. Schmeiser, V. M. Arlt, C. A. Bieler, M. Petein, M. F. Depierreux, L. dePauw, D. Abramovicz, P. Vereerstraeten und J.-L. Vanherweghem; Urothelial carcinoma associated with the use of a chinese herb (*Aristolochia fangchi*) *N. Engl. J. Med.*, 342 (2000) 1686-1692
- [40] V. M. Arlt, M. Stiborova, und H. H. Schmeiser; Aristolochic acid as a probable human cancer hazard in herbal remedies: a review *Mutagenesis*, 17 (2002) 265-277
- [41] H. Bartsch, A. Barbin, M. J. Marion, J. Nair und Y. Guichard; Formation, detection, and role in carcinogenesis of ethenobases in DNA *Drug Metab. Rev.*, 26 (1994) 349-371
- [42] K. B. Beckman und B. N. Ames; The free-radical theory of aging matures *Physiol. Rev.*, *78* (1998) 547-581
- [43] H. J. Helbock, K. B. Beckman, M. K. Shigenaga, P. B. Walter, A. A. Woodall, H. C. Yeo und B. N. Ames; DNA oxidation matters - The HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine *PNAS*, 95 (1998) 288-293
- [44] L. J. Marnett; Oxyradicals and DNA damage *Carcinogenesis, 21* (2000) 361-370
- [45] S. B. Farr, R. D'Ari und D. Touati; Oxygen-dependent mutagenesis in *Escherichia coli* lacking superoxide dismutase *PNAS*, 83 (1986) 8268-8272
- [46] J. R. Wagner, C. C. Hu und B. N. Ames; Endogenous oxidative damage of deoxycytidine in DNA PNAS, 89 (1992) 3380-3384
- [47] H. Esterbauer in D. C. H. McBrien und T. F. Slater (Editors) "Free Radicals, Lipid Peroxidation and Cancer"
 Academic Press, London (1982) 101-128

- [48] F. L. Chung, H. J. Chen und R. G. Nath; Lipid-peroxidation as a potential endogenous source for the formation of exocyclic DNA-adducts *Carcinogenesis*, 17 (1996) 2105-2111
- [49] P. C. Burcham; Genotoxic lipid-peroxidation products their DNA-damaging properties and role in formation of endogenous DNA-adducts *Mutagenesis*, 13 (1988) 287-305
- [50] H. Oshima und H. Bartsch; Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis *Mutaion Research*, 305 (1994) 253-264
- [51] J. L. Caulfield, J. S. Wishnok und S. R. Tannenbaum; Nitric Oxide-induced Deamination of Cytosine and Guanine in Deoxynucleosides and Oligonucleotides *J. Biol.* Chem., 21 (1998) 12698-12695
- [52] S. Tamir, S. Burney und S. R. Tannenbaum; DNA damage by nitric oxide *Chem. Res. Toxicol.*, *9* (1996) 821-827
- [53] J. Nair, A. Gal, S. Tamir, S. R. Tannenbaum, G. N. Wogan und H. Bartsch; Etheno adducts in spleen DNA of SJL mice stimulated to overproduce nitric oxide *Carcinogenesis*, 19 (1998) 2081-2084
- [54] T. Suzuki, R. Yamaoka, M. Nishi, H. Die und K. Makino; Isolation and Characterization of a Novel Product, 2'-Deoxyoxanosine, from 2'-Deoxyguanosine, Oligodeoxynucleotide, and Calf Thymus DNA Treated by Nitrous Acid and Nitric Oxide J. Am. Chem. Soc., 118 (1996) 2515-2516
- [55] H. Rubbo, V. Darley Usmar und B. A. Freeman; Nitric oxide regulation of tissue free radical injury *Chem. Res. Toxicol.; 9* (1996) 809-820
- [56] R. Knippers in R. Knippers "Molekulare Genetik" *Thieme Verlag, Stuttgart, 8. Auflage* (2001)
- [57] T. H. Boyer; DNA Restriction and Modification Mechanisms in Bacteria *Ann. Rev. Microbiol., 25* (1971) 153-176
- [58] J. M. Zingg und P. A. Jones; Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis *Carcinogenesis*, 18 (1997) 869-882
- [59] T. Rein, M. L. DePamphilis und H. Zorbas; Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes *Nucl. Acids Res.*, 26 (1998) 2255-2264
- [60] P. A. Jones und S. B. Baylin; The fundamental role of epigenetic events in cancer Nat. Rev. Genet., 3 (2002) 415-428
- [61] A. P. Feinberg und B. Vogelstein; Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts *Nature*, 301 (1983) 89-92
- [62] A. P. Feinberg, H. Chui und R. Ohlson; DNA methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms *Sem. Cancer Biol.*, 12 (2002) 389-398
- [63] G. P. Pfeifer, M. Tang und M. F. Denissenko; Mutation hotspots and DNA methylation *Curr. Top. Microbiol. Immunol., 249* (2000) 1-19

- [64] G. P. Pfeifer, D. Grunberger und D. Drahovsky; Impaired enzymatic methylation of BPDE-modified DNA *Carcinogenesis*, 5 (1984) 931-935
- [65] J. Rozenski, P. F. Crain und J. A. McCloskey; The RNA Modification Database: 1999 update Nucleic Acids Res., 27 (1999) 196-197
- [66] H. Grosjean, G. Björk und B. E. H Maden; Nucleotide modification and base conversion of RNA: Summary and outlook *Biochimie*, 77 (1995) 3-6
- [67] B. G. Lane, J. Ofengand und M. W. Gray; Pseudouridine and O2'-methylated nucleosides. Significance of their selective occurrence in rRNA domains that function in ribosome-catalyzed synthesis of the peptide bonds in proteins *Biochimie*, 77 (1995) 7-15
- [68] R. E. Sotomayor, M. Washington, L. Nguyen, R. Nyang'anyi, D. M. Hinton und M. Chou; Effects of Intermittent Exposure to Aflatoxin B1 on DNA and RNA Adduct Formation in Rat Liver: Dose-Response and Temporal Patterns *Toxicological Sciences*, 73 (2003) 329-338
- [69] T. Hofer, C. Badouard, E. Bajak, J.-L. Ravanant, A. Mattsson und I. A. Cotgreave; Hydrogen peroxide causes greater oxidation in cellular RNA than in DNA *Biol. Chem.*, 386 (2005) 333-337
- [70] P. A. Aas, M. Otterlei, P. Ø. Falnes, C. B. Vågbø, F. Skorpen, M. Akbari, O. Sundheim, M. Bjørås, G. Slupphaug, E. Seeberg und H. E. Krokan; Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA *Nature*, 421 (2003) 859-863
- [71] I. N. White und K. Brown; Techniques: the application of accelerator mass spectrometry to pharmacology and toxicology *Trends Pharmacol. Sci.*, 25 (2004) 442-447
- [72] Th. Wolff in H. Greim und E. Demel (Editors); "Toxikologie" VCH Verlag, Weinheim, 1. Auflage (1996)
- [73] Y. Yamamoto und B. N. Ames; Detection of lipid hydroperoxides and hydrogen peroxide at picomole levels by an HPLC and isoluminol chemiluminescence assay *Free Radic. Biol. Med.*, 3 (1987) 359-361
- [74] P. B. Farmer; DNA and protein adducts as marker of genotoxicity *Toxicology Letters, 146* (2004) 3-9
- [75] O. Schmitz und E. Richter; Capillary zone electrophoresis with on-line blotting for separation and detection of ³²P-postlabelled DNA adducts *Biomarkers*, 5 (2000) 314-321
- [76] Y. Esaka, S. Inagaki und M. Goto; Separation procedures capable of revealing DNA adducts *Journal of Chromatography B*, 797 (2003) 321-329
- [77] R. C. Gupta, M. V. Reddy und K. Randerath; ³²P-postlabelling analysis of non-radioactive aromatic carcinogen-DNA adducts *Carcinogenesis*, 3 (1982) 1081-1092
- [78] R. C. Gupta; Enhanced sensitivity of ³²P-postlabeling analysis of aromatic carcinogen-DNA adducts *Cancer Res.*, *35* (1985) 5656-5662
- [79] D. Meschede (Editor); Gerthsen Physik 22. Auflage, Springer Verlag, Berlin (2003)

- [80] R. P. Haugland; Handbook of fluorescent probes and research chemicals 9th edition, Molecular Probes Inc., Eugene (2002)
- [81] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler und S. R. Crouch (Editors); Fundamentals of Analytical Chemistry 8th edition, Brooks Col, London (2003)
- [82] F. E. P. Mikkers, F. M. Everaerts und T. P. E. M. Verheggen; High performance zone electrophoresis J. Chromatogr., 169 (1979) 11-20
- [83] J. W. Jorgenson und K. D. Lukacs; Capillary zone electrophoresis *Science*, *222* (1983) 266-272
- [84] J. W. Jorgenson und K. D. Lukacs; Zone-electrophoresis in open-tubular glass capillaries Anal. Chem., 53 (1981) 1298-1302
- [85] J. W. Jorgenson und K. D. Lukacs; High resolution separations based on electrophoresis and electroosmosis J. Chromatogr., 218 (1981) 209-216
- [86] J. W. Jorgenson und K. D. Lukacs; Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries: preliminary data on performance *HRC & CC*, 4 (1981) 230-231
- [87] http://www.pharmchem.tu-bs.de/waetzig-cep.html
- [88] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya und T. Ando; Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries *Anal. Chem.*, 56 (1984) 111-113
- [89] S. Terabe, K. Otsuka und T. Ando; Electrokinetic chromatography with micellar solution and opentubular capillary *Anal. Chem.*, 57 (1985) 834-841
- [90] E. Kohen, J. G. Hirschberg und Rene Santus; Fluorescence Probes in Oncology Imperial College Press, London (2002)
- [91] M. Rojas, K. Alexandrov, F. J. van Schooten, M. Hillebrand, E. Kriek, und H. Bartsch; Validation of a new fluorimetric assay for benzo[a]pyrene diolepoxide-DNA adducts in human white blood cells: comparisons with ³²P-postlabeling and ELISA *Carcinogenesis*, 15 (1994) 557-560
- [92] A. P. Formenton-Catai und E. Carrilho; Applications of capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence for analysis of dGMP-BPDE adduct *Anal. Bioanal. Chem.*, *376* (2003) 138-141
- [93] S. Agrawal, C. Christodoulou und M. J. Gait; Efficient methods for attaching non radioactive labels to the 5'ends of synthetic oligodeoxyribonucleotides *Nucl. Acids* Res., 14 (1986) 6227-6245
- [94] N. T. Thuong und M. Chassignol; Solid-phase synthesis of oligo-alpha-deoxynucleotides and oligobeta-deoxynucleotides covalently linked to an acridine *Tetrahedr. Lett.*, 29 (1988) 5905-5908
- [95] S. Agrawal und P. C. Zamecnik; Site specific functionalization of oligonucleotides for attaching 2 different reporter groups *Nucl. Acids Res.*, 18 (1990) 5419-5423
- [96] S. Tang und S. Agrawal; Incorporation of multiple reporter groups on synthetic oligonucleotides *Nucl. Acids Res.*, *18* (1990) 6461

- [97] L. M. Smith, S. Fung, M. W. Hunkapillar, T. J. Hunkapillar und L. E. Hood; The synthesis of oligonucleotides containing an aliphatic amino group at the 5'terminus: synthesis of fluorescent DNA primers for use in DNA sequence analysis *Nucl. Acids Res.*, 13 (1985) 2399-2412
- [98] K. Yamana, T. Gokota, H. Ozaki, H. Nakano, O. Sangen und T. Shimidzu; Enhanced fluorescence in the binding of oligonucleotides with a pyrene group in the sugar fragment to complementary polynucleotides *Nucleosides & Nucleotides, 11* (1992) 383-390
- [99] P. R. Langer, D. C. Waldrop und D. C. Ward; Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes *PNAS*, 78 (1981) 6633-6637
- [100] A. Roget, H. Bazin und R. Teoule; Synthesis and use of labeled nucleoside phosphoramidite buildingblocks bearing a reporter group - biotinyl, dinitrophenyl, pyrenyl and dansyl *Nucl. Acids Res.*, 17 (1987) 7643-7651
- [101] B. C. F. Chu, G. M. Wahl und L. E. Orgel; Derivatisation of unprotected polynucleotides Nucl. Acids Res., 11 (1983) 6513-6529
- [102] D. J. Kelman, K. T. Lilga und M. Sharma; Synthesis and application of fluorescent labeled nucleotides to assay DNA damage *Chem.-Biol. Interactions, 66* (1988) 85-100
- [103] T. Lee, E. S. Yeung und M. Sharma; Micellar electrokinetic capillary chromatographic separation and laser induced fluorescence detection of 2'-deoxynucleoside-5'-monophosphates of normal and modified bases *Journal of Chromatography*, 565 (1991) 197-206
- [104] A. N. Al-Deen, D. C. Cecchini, S. Abdel-Baky, N. M. Abdel Moneam und R. W. Giese; Preparation of ethylenediaminephosphoramidates of nucleotides and derivatization with fluoresceine isothiocyanate *J. Chrom.*, 512 (1990) 409-414
- [105] M. Sharma, H. C. Box und R. C. Paul; Detection and quantitation of 8-hydroxyguanosine-5'monophosphate in X-irradiated calf thymus DNA by fluorescence postlabeling *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 167 (1990) 419-424
- [106] M. Sharma, R. Jain, E. Ionescu und H. K. Slocum; Capillary Electrophoretic Separation and Fluorescence Detection of the Major Adducts of Cisplatin and Carboplatin *Anal. Biochem.*, 228 (1995) 307-311
- [107] R. Jain und M. Sharma; Fluorescence Postlabeling Assay of DNA Damage Induced by N-Methyl-Nnitrosourea *Cancer Research*, 53 (1993) 2771-2774
- [108] P. Wang und R. W. Giese; Phosphate-specific fluorescence labeling under aqueous conditions Anal. Chem., 65 (1993) 3518-3520
- [109] Z.-H. Lan, X. Qian und R. W. Giese; Preparation of an IMI dye (imidazole functional group) containing a 4-(N,N-dimethylaminosulfonyl)-2,1,3-benzoxadiazole fluorophore for labeling of phosphomonoesters *Journal of Chromatography A*, 831 (1999) 325-330
- [110] C. Yang, O. Shimelis, X. Zhou, G. Li, C. Bayle, M. Nertz, H. Lee, L. Strekowski, G. Patonay, F. Couderc und R. W. Giese; Handling and detection of 0.8 amol of near infrared cyanine dye by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection *Journal of Chromatograpy A*, 979 (2002) 307-314

- [111] G. Li, J. Gao, X. Zhou, O. Shimelis und R. W. Giese; Handling and detection of 25 amol of nearinfrared dye deoxynucleotide conjugates by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection *Journal of Chromatography A*, 1004 (2003) 401-412
- [112] Dissertation C. C. T. Wörth; *Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg* (2000)
- [113] D. Stach, O. J. Schmitz, S. Stilgenbauer, A. Benner, H. Döhner, M. Wießler, und F. Lyko; Capillary electrophoretic analysis of genomic DNA methylation levels *Nucleic Acids Research 31* (2003) E2
- [114] M. Wirtz, D. Stach, H.-C. Kliem, M. Wießler und O. J. Schmitz; Determination of the DNA methylation level in tumor cells by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence *Electrophoresis*, 25 (2004) 839-845
- [115] W. Pfau, U. Brockstedt, K. D. Sohren und H. Marquardt; ³²P-post-labeling analysis of DNA adducts formed by food-derived heterocyclic amines: evidence for incomplete hydrolysis and a procedure for adduct pattern simplification *Carcinogenesis 15* (1994) 877-882
- [116] M. G. Ivanovskaya, M. B. Gottikh und Z. A. Shabarova; Modification of oligo(poly)nucleotide phosphomonoester groups in aqueous solutions *Nucleosides & Nucleotides*, 6 (1987) 913-934
- [117] H. Engelhardt; W. Beck und T. Schmitt; Kapillarelektrophorese, Methoden und Möglichkeiten *Vieweg Buch, Springer, Berlin* (1994)
- [118] D. H. Phillips und M. Castegnaro; Standardization and validation of DNA adduct postlabelling methods: report of interlaboratory trials and production of recommended protocols. *Mutagenesis*, 14 (1999) 301-315
- [119] M. Weinfeld, M. Liuzzi und G. D. D. Jones; A postlabeling assay for oxidative DNA damage in G.P. Pfeiffer (Editor) Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations *Plenum Press, New York* 63-71
- [120] M. Liuzzi, M. Weinfeld und M. C. Patterson; Enzymatic Analysis of Isomeric Trithymidylates Containing ultraviolet Light-induced Cyclobutane Pyrimidine Dimers *The Journal of Biological Chemistry*, 264 (1989) 6355-6363
- [121] A. Dipple und M. A. Pigott; Resistance of 7,12dimethybenz[a]anthracen-deoxyadenosine adducts in DNA to hydrolysis by snake venom phosphodiesterase *Carcinogenesis*, 8 (1987) 491-493
- [122] G. Li; O. Shimelis, X. Zhou und R. W. Giese; Scaled Down Nuclease P1 for Scaled up DNA Digestion Biotechniques, 34 (2003) 908-909
- [123] K. D. Altria in M. G. Khaledi (Editor); High Performance Capillary Electrophoresis, Theory, Techniques and Applications *John Wiley & Sons, New York* (1998)
- [124] Diplomarbeit M. Wirtz Bergische Universität Wuppertal (2002)
- [125] T. Kaneta, S. Tanaka, M. Taga und H. Yoshida; Effect of addition of Glucose on micellar electrokinetic chromatography with sodium dodecyl sulphate *Journal of Chromatography*, 609 (1992), 369-374
- [126] M. F. Fraga und M. Esteller; DNA methylation: a profile of methods and applications *Biotechniques*, 33 (2002) 636-649

- [127] M. Frommer, L. E. McDonald, D. S. Millar, C. M. Collis, F. Watt, G. W. Grigg, P. L. Molloy und C. L. Paul; A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands *PNAS*, 89 (1992) 1827-1831
- [128] J. G. Herman, J. R. Graff, S. Myohanen, B. D. Nelkin und S. B. Baylin; Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands *PNAS*, 93 (1996) 9821-9826
- [129] C. Grunau, S. J. Clark und A. Rosenthal; Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters *Nucl. Acids Res.*, 29 (2001) E65
- [130] V. H. Schuster; The method of reaction of desoxyribonucleic acid with nitrous acid Z. Naturforsch. 15b (1960) 298-304
- [131] M. Yamada, T. Suzuki, K. Kanaori, K. Tajima, S. Sakamoto, T. Kodaki und K. Makino; Nitration of 2'-Deoxyguanosine by a NO/O₂ Gas Mixture: Identification and Characterization of N²-Nitro-2'-Deoxyguanosine Organic Letters, 5 (2003) 3173-3176
- [132] T. Suzuki, R. Yamaoka, M. Nishi, H. Ide und K. Makino; Isolatiom and Characterization of a Novel product, 2'-Deoxyoxanosine, from 2'-Deoxyguanosine, Oligodeoxynukleotide, and Calf Thymus DNA Treated by Nitrous Acid and Nitric Oxide J. Am. Chem. Soc., 118 (1996) 2515-2516
- [133] T. Suzuki, H. Ide, M. Yamada, N. Endo, K. Kanaori, K. Tajima, T. Morii und K. Makino; Formation of 2'-deoxyoxanosine from 2'-deoxyguanosine and nitrous acid: mechanism and intermediates *Nucleic. Acids Res.*, 28 (2000) 544-551
- [134] T. Suzuki, M. Yamada, K. Kanaori, K. Tajima, T. Morii und K. Makino; Influence of ring openingclosure equilibrium of oxanine, a novel damaged nucleobase, on migration behavior in capillary electrophoresis J. Chromatogr. A, 877 (2000) 225-232
- [135] B. F. Vanyushin; Enzymatic DNA methylation is an epigenetic control for genetic functions of the cell. Biochemistry (Moscow), 70 (2005) 488-499
- [136] R. de Bont und N. van Larebeke; Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data Mutagenesis, 19 (2004) 169-185
- [137] T. Hagenlocher, J. Nair, N. Becker, A. Korfmann und H. Bartsch; Influence of dietary fatty acid, vegetable, and vitamin intake on etheno-DNA adducts in white blood cells of healthy female volunteers: a pilot study *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 10 (2001) 1187-1191
- [138] D. Schuler, E. Otteneder, P. Sagelsdorff, E. Eder, R. C. Gupta und W. K. Lutz; Comparative analysis of 8-oxo-2' -deoxyguanosine in DNA by ³²P- and ³³P-postlabeling and electrochemical detection *Carcinogenesis*, 18 (1997) 2367-2371
- [139] X. Huang, J. Powell, L. A. Mooney, C. Li und K. Frenkel; Importance of complete DNA digestion in minimizing variability of 8-oxo-dG analyses *Free Radic. Biol. Med.*, 31 (2001) 1341-1351
- [140] R. Jain, T. V. Isac und M. Sharma; Fluorescence postlabeling assay of RNA modification Biochem. Biophys. Res. Commun., 200 (1994) 1239-1244
- [141] C. A. Dekker und H. G. Khorana; The Reaction of Dicyclohexylcarbodiimide with Yeast Adenylic Acid. A New Method for the Preparation of Monoesters of Ribonucleoside 2'- and 3'-Phosphates J.Am. Chem. Soc., 76 (1954) 3522-3527

- [142] Dissertation D. Stach Ruprecht-Karls Universität Heidelberg (2006)
- [143] X. Chen, N. Dudgeon, L. Shen und J. H. Wang; Chemical modification of gene silencing oligonucleotides for drug discovery and development *Drug Discov. Today*, 10 (2005) 587-593
- [144] B. Alberts (Editor); Molekularbiologie der Zelle *Wiley-VCH, Weinheim* (2003)
- [145] H. Shi und P. B. Moore; The crystal structure of yeast phenylalanine tRNA at 1.93 A resolution: a classic structure revisited *RNA*, 6 (2000) 1091-1105
- [146] F. Lyko, D. Stach, A. Benner, S. Stilgenbauer, H. Döhner, M. Wirtz, M. Wießler und O. J. Schmitz; Quantitative analysis of DNA methylation in chronic lymphocytic leukemia patients *Electrophoresis*, 25 (2004) 1530-1535
- [147] J. F. Hatcher und S. Swaminathan; ³²P-postlabeling analysis of adducts generated by peroxidasemediated binding of N-hydroxy-4-acetylaminobiphenyl to DNA *Carcinogenesis, 16 (1995)* 2149-2157
- [148] S. Swaminathan und J. F. Hatcher; Identification of new DNA adducts in human bladder epithelia exposed to the proximate metabolite of 4-aminobiphenyl using ³²P-postlabeling method *Chem. Biol. Interact*, 139 (2002) 199-213
- [149] T. Haack, G. Boche, C. Kliem, M. Wießler, D. Albert und H. H. Schmeiser; Synthesis, characterization, and ³²P-postlabeling of N-(deoxyguanosin)-4-aminobiphenyl 3'-phosphate adducts. *Chem. Res. Toxicol.*, 17 (2004) 776-784
- [150] N. Marme, J. P. Knemeyer, M. Sauer und J. Wolfrum; Inter- and intramolecular fluorescence quenching of organic dyes by tryptophan *Bioconjug. Chem.*, 14 (2003) 1133-1139
- [151] D. Schuler und E. Eder; Detection of 1,N²-propanodeoxyguanosine adducts of 2-hexenal in organs of Fischer 344 rats by a ³²P-post-labeling technique. *Carcinogenesis*, 20 (1999) 1345-1350
- [152] D. Schuler, B. Budiawan und E. Eder; Development of a ³²P-postlabeling method for the detection of 1, N²-propanodeoxyguanosine adducts of 2-hexenal in vivo *Chem. Res. Toxicol.*, *12* (1999) 335-340
- [153] P. Golzer, C. Janzowski, B. L: Pool-Zobel und G. Eisenbrandt; (E)-2-hexenal-induced DNA damage and formation of cyclic 1,N²-(1,3-propano)-2'-deoxyguanosine adducts in mammalian cells *Chem. Res. Toxicol.*, 9 (1996) 1207-1213
- [154] M. Wirtz, C.A. Schumann, M. Schellenträger, S. Gäb, J. vom Brocke, M. A. Podeschwa, H. J. Altenbach, D. Oscier und O. J. Schmitz; Capillary electrophoresis-laser induced fluorescence analysis of endogenous damage in mitochondrial and genomic DNA *Electrophoresis*, 13 (2005) 2599-2607
- [155] S. Hattman; Plasmid-controlled variation in the content of methylated bases in bacteriophage lambda deoxyribonucleic acid *Journal of Virology, 10* (1972) 404-412
- [156] C.A.M. Seidel, A.Schulz und M. Sauer; Nucleobase-Specific Quenching of Fluorescent dyes.
 1. Nucleobase One-Electron Redox Potentials and Their correlation with Static and Dynamic Quenching Efficiencies
 J. Phys. Chem., 100 (1996) 5541-5553

- [157] D. Perrett in C. K. Lim (Editor); HPLC of small molecules a practical approach IRL Press, Oxford (1986)
- [158] O. J. Schmitz, C. C. T. Wörth, D. Stach und M. Wießler; Capillary electrophoresis analysis of DNA adducts as biomarkers for carcinogenesis Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 41 (2002) 445-448; Erratum in: Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 43 (2004) 4389.
- [159] C. E. Vaca, M. Löfgren und K. Hemminki; Some quantitative considerations about DNA adduct enrichment procedures for ³²P-postlabeling *Carcinogenesis*, 13 (1992) 2463-2466

7 Danksagungen

Mein Dank gilt ganz besonders Herrn PD Dr. H. Schmeiser für die ausgezeichnete Betreuung, die interessante Themenstellung und die stete Gesprächs- und Hilfsbereitschaft. Die freundschaftliche Atmosphäre, die wohlwollende Förderung meiner Arbeit, sowie die gewährten Freiheiten waren Grundlage für den Erfolg dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. G. Fricker danke ich für die freundliche Übernahme des zweiten Referates. Für die freundliche Übernahme der Nebenfachprüfung gilt mein Dank auch auch Herrn Prof. Dr. Reichling.

Herrn Prof. Dr. M. Wießler danke ich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Unterstützung meines DBU-Antrages, die stete Diskussionsbereitschaft bei allen chemischen Problemen und die Übernahme der zweiten Nebefachprüfung.

Weiterhin gilt mein herzlichster Dank:

- meinem ersten Laborkollegen Dirk Stach, für seine geduldige Einführung in alle Fragen der Kapillarelektrophorese, die allzeit gute Zusammenarbeit und seine Gesellschaft in der Exklave unserer Abteilung.
- meinem zweiten Laborkollegen und Nachfolger Jochen vom Brocke für die gute Laboratmosphäre, die interessanten Diskussionen und seine Hilfe als mein verlängerter Arm in Heidelberg während der Fertigstellung der Dissertation.
- Herrn PD Dr. O. Schmitz (Universität Wuppertal) für seine Hilfsbereitschaft bei allen CE-Problemen und seine Korrekturen und Anmerkungen zum Manuskript dieser Arbeit.
- den anderen Korrekturlesern Dr. Christian Bieler, Dr. Regine Garcia-Boy und Dr. H.-C. Kliem für die kritische Durchsicht der Arbeit während des Enstehungsprozesses und ihre wertvollen Kommentare und Anmerkung.
- der Arbeitsgruppe von Dr. Frank Lyko, besonders Cora, Carlo, Joachim, Bodo und Natascha für ihre Hilfe in allen Fragen der Epigentik und ihre häufigen aufmunternden Besuche im Labor.
- Hans-Hermann Schrenk für seine Geduld und Hilfe bei der Arbeit mit der HPLC.
- Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. M. Sauer (Universität Bielefeld) für die Unterstützung bei den fluoreszenzspektrometrischen Untersuchungen.
- Prof. Dr. D. Philipps, Dr. Volker Arlt und Dr. Martin Osborne (Institute of Cancer Research, Sutton) für die Synthese der DNA-Addukt Standardverbindungen.
- Ed, Peter, Heinz, Hélène, Andrea und Ilse für ihre Beiträge zum Gelingen dieser Arbeit.
- der Badmintonfraktion um Regine, Katrin, Britta, Markus und Tobias für ihre Überredungskünste und Anleitungen zur Aufnahme einer Zweitsportart .
- Evi, Bernd, Evelyn, Thomas, Bettina, Claas, Sonja, Erwin, Christoph, Volker, Markus, Julio, Annette, Marlis, Maike, Tabea, Jutta, Melanie, Nicole, Anna, Marina und allen anderen ehemaligen und aktuellen Doktoranden, Praktikanten und Mitarbeitern der Abteilung für das gute Arbeitsklima und die schöne Zeit.

Der Deutschen Bundesstiftung Umwelt danke ich für die Gewährung eines Promotionsstipendiums (Aktenzeichen 264/20002), ohne das diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.