

**Kapillarelektrophoretische Bestimmung
von DNA-Addukten als
Biomarker der chemischen Kanzerogenese**

vom Fachbereich C (Mathematik und Naturwissenschaften)

der Bergischen Universität Wuppertal

genehmigte Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

- Doktor der Naturwissenschaften -

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von



Michaela Wirtz

(Dipl.-Chem.)

aus Langerwehe

Wuppertal, Oktober 2006

Diese Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20060598

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3Ahbz%3A468-20060598>]

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit
von September 2002 bis Oktober 2006
auf Anregung von
Herrn PD Dr. Oliver J. Schmitz
im Arbeitskreis Analytische Chemie
unter Leitung von
Herrn Prof. Dr. Siegmur Gäb.

RESEARCH DESCRIBED IN THIS WORK
WAS SUPPORTED BY
PHILIP MORRIS INCORPORATED

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn **PD Dr. Oliver J. Schmitz**. Ihm verdanke ich nicht nur die Bereitstellung des Themas, sondern auch die intensive Einarbeitung in dieses interdisziplinäre Forschungsgebiet sowie die sehr engagierte Betreuung der Arbeit. Mit seiner steten Diskussionsbereitschaft unterstützte er meine Kreativität und ermöglichte mir die Verwirklichung der eigenen Ideen.

Herrn **Prof. Dr. Siegmär Gäb** danke ich für die Aufnahme in den Arbeitskreis, für die fruchtbaren Gespräche und Anregungen und für die Gelegenheit zur aktiven Gestaltung von Lehrveranstaltungen.

Herrn **Dr. Walter Turner** danke ich für die vielen anregenden Fachgespräche und für seine unzähligen Korrekturen der englischen Korrespondenz.

Weiterhin möchte ich mich, in alphabetischer Objektivität, herzlich bedanken bei:

Jochen v. Brocke für die Bereitstellung von Standardverbindungen,

Dr. Marc Constapel für die Anfertigung massenspektrometrischer Messungen,

Jane Hübner für die Beschaffung nichtionischer Tenside und, stellvertretend für alle namentlich nicht erwähnten Kollegen des Arbeitskreises, für die vielen Gespräche und die humorvolle Zeit,

Dr. Michael Podeschwa für die anregende Diskussion und Mithilfe bei der Literaturrecherche zum Entwurf der Synthesestrategie für Standardverbindungen und für die Bereitstellung dieser,

Marc Schellenträger für die Anfertigung massenspektrometrischer Messungen, seine Anregungen und für das jahrelange, freundschaftliche Zusammensein im Büro,

Claus A. Schumann für seine Arbeiten mit mitochondrialer DNA,

Dr. Martin Schütte für die Konstruktion des Detektors und die geduldige Beantwortung so vieler physikalischer Fragen,

Dirk Stach für die Bereitstellung der methylierten λ -DNA,

der **Werkstatt der Bergischen Universität Wuppertal** mit Axel Brakelmann und seinen Mitarbeitern für die Anfertigung komplexer Teile und Umsetzung manch verrückter Idee.

Meinem Mann danke ich für seine aktive Unterstützung, die stetige Diskussionsbereitschaft sowie für seine Toleranz und seine Bereitschaft, unser Privatleben weitgehend dem Wohle der Forschung zu widmen.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Kooperationspartnern:

Frau Dr. **Ruth Goth-Goldstein** von den Lawrence Berkeley National Laboratories, Berkeley, USA,

Herrn **PD Dr. Stefan Hiendleder** vom Lehrstuhl für molekulare Tierzucht und Haustiergenetik, Ludwig-Maximilian-Universität, München,

Herrn **Dr. David Oscier** vom Royal Bournemouth Hospital, UK,

Herrn **Prof. Dr. Hans-J. Altenbach** aus der Organischen Chemie, Bergische Universität Wuppertal,

Herrn **Dr. Martin Schütte** der Fa. LaVision BioTec, Bielefeld,

Herrn **Dr. Norbert Kleinsasser** aus der Ökogenotoxikologie der HNO-Klinik der Universität Regensburg,

Herrn **Prof. Dr. Manfred Wiebler** aus der Molekularen Toxikologie, DKFZ, Heidelberg

ohne die ein Großteil der Ergebnisse dieser Arbeit nicht möglich geworden wäre, sowie

der **Konrad-Adenauer-Stiftung**, durch deren Stipendium ich meine Doktorandenzeit finanziell sorgenfrei gestalten konnte

und

der **Philip Morris Corp., External Research Program** USA, die als Drittmittelgeber das Projekt finanziert und die Anschaffung der teilweise sehr teuren Geräte und Ausstattungen durchführbar gemacht hat.

Meinen Eltern

und

Bernd

VORWORT

„omnis cellula e cellula“

R. Virchow, 1855 (Zellpathologe)

Mit diesem Satz beschreibt der als Vater der Zellpathologie bezeichnete Belgardener Mediziner die Entstehung von Tumoren aus einer Ursprungszelle, indem sich dort jede Zellgeneration aus einer vorausgehenden entwickelt. Mit der Beschreibung der Tumorentwicklung als dynamischer Prozeß leistete Virchow eine entscheidende Vorarbeit für das heutige Wissen über die genetische Instabilität von Tumorzellen, welche maßgeblich zu dieser Dynamik beiträgt.

Ebenso wichtig wie die Aufklärung der molekularbiologischen Abläufe in der Tumorentstehung ist die Entwicklung von geeigneten Methoden zur Krebsfrüherkennung.

Die vorliegende Schrift beschreibt die Weiterentwicklung einer von *Schmitz et al.* entwickelten Methode zur DNA-Adduktanalytik mittels Kapillarelektrophorese und Laser-induzierter Fluoreszenz. Die Basis dieser Arbeit bilden die von *O. Schmitz, C. T. Wörth* und *D. Stach* durchgeführten Untersuchungen im Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg. Diese Schrift enthält auch Ergebnisse aus der Arbeit zweier von mir eingearbeiteter Diplomanden (*C.A. Schumann* und *R. Schiewek*), die sich unter anderem mit dem Nachweis von endogenen Addukten in mitochondrialer DNA und der Abtrennung der fluoreszenzmarkierten Nukleotide von den Überschüssen an Fluoreszenzmarker und Kopplungsreagenz beschäftigt haben.

Ich versichere, daß ich die durchgeführte Doktorarbeit in der Analytischen Chemie im Arbeitskreis von Herrn *Prof. Dr. S. Gäb* unter Betreuung von Herrn *PD Dr. O. J. Schmitz* selbstständig durchgeführt und keine anderen als die angegebenen Quellen als Hilfsmittel verwendet habe.

Wuppertal, Oktober 2006

Abkürzungsverzeichnis

ϕ	Quanteneffizienz
3'-dAMP	2'-Desoxyadenosin-3'-monophosphat
5m-dC	5-Methylcytosin
5m-dCMP	5-Methyl-2'-desoxycytidin-3'-monophosphat
8-oxo-dGMP	8-Oxo-2'-desoxyguanosin-3'-monophosphat
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AD	Außendurchmesser
AD-Wandler	Analog/Digital-Wandler
AI	künstliche Besamung (artificial insemination)
AID	activation-induced cytidine deaminase
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
AMS	Accelerator mass spectrometry
AP site	apurinic site; 2'-Desoxyribose-3'-monophosphat
B ₁₂	Vitamin B ₁₂
B[a]P	Benzo[a]pyren
B[c]F	Benzo[c]fluoren
BER	Base-Excision Repair
bisulfite-PCR	Bisulfit Restriktionsanalyse
BODIPY	4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-propionylethylendiamin-hydrochlorid
BPDE	7 β ,8 α -Dihydroxy-9 α ,10 α -epoxy-7,8,9,10-tetrahydro-benzo[a]pyren
BPDE-dGMP	7 β ,8 α -Dihydroxy-9 α ,10 α -epoxy-7,8,9,10-tetrahydro-benzo[a]pyren-2'-desoxyguanosin-3'-monophosphat
BWS	Beckwith-Wiedemann-Syndrom
C	Cytosin
C-334	Cytosin, 334 Basen vor dem Transkriptionsstartpunkt des ZAP-70-Gens
Caco2-Zelle	humane Dickdarm-Tumorzelllinie
CAE	Kapillararray-Systeme

CCD	charge coupled device
CE	Kapillarelektrophorese
CEC	Kapillarelektrochromatographie
CE-LIF	Kapillarelektrophorese mit Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion
CE-LS-CCD	Kapillarelektrophorese mit Laser-Spektroskopie und CCD-Detektion
CE-MPE	Kapillarelektrophorese mit Multiphotonen-Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion
CGE	Kapillargelelektrophorese
CID	charge injection device
cIEF	Kapillare isoelektrische Fokussierung
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CMC	Kritische micellare Konzentration
CMOS	coupled metal oxide semiconductor
CpG-Island	kumulierende 5'-CG-3'-Dinukleotide
CT-DNA	Kalbsthymus-DNA
CZE	Kapillarzonenelektrophorese
DAB	Deutsches Arzneibuch
dAMP	2'-Desoxyadenosin-3'-monophosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
dCMP	2'-Desoxycytidin-3'-monophosphat
DDT	1,1-(p,p'-Dichlordiphenyl)-2-trichlorethan
dGMP	2'-Desoxyguanosin-3'-monophosphat
dIMP	2'-Desoxyinosin-3'-monophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNMP	2'-Desoxynukleosid-3'-monophosphat
DNMT	Methyltransferasen
dTgMP	5,6-Dihydro-5,6-dihydroxy-2'-desoxythymidin-3'-monophosphat
dTMP	2'-Desoxythymidin-3'-monophosphat
dUMP	2'-Desoxyuridin-3'-monophosphat
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid

EKC	Elektrokinetische Chromatographie
EMCCD	Electron Multiplying CCD
EOF	Elektroosmotischer Fluß
ESI-MS	Elektronensprayionisations-Massenspektrometrie
etheno-dAMP	1,N ⁶ -Etheno-2'-desoxyadenosin-3'-monophosphat
EtOH	Ethanol
Eu-HMTaseI	eukaryotische Histonmethyltransferase
FAD	Flavinadenindinukleotid
FLNS	Fluorescence-line-narrowing spectrometry
G	Guanin
GCxGC-ToF MS	zweidimensionale komprehensiv Gaschromatographie mit Time-of-Flight massenspektrometrischer Detektion
GC-MS	Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
HPLC-ECD	HPLC mit elektrochemischer Detektion
ID	Innendurchmesser
IgVH	variabler, schwerer Teil der Immunglobulinkette
IVF	<i>in vitro</i> -Fertilisation
KF	Korrekturfaktor
LPO	Lipidperoxidation
LS-CCD-System	Detektionssystem mit spektraler Auflösung der Laser-induzierten Fluoreszenz und CCD-Detektion
LSM	Laserscanning-Mikroskopie
MEEKC	Mikroemulsion elektrokinetische Chromatographie
MEKC	Micellare elektrokinetische Chromatographie
MeOH	Methanol
MMR	Mismatch Repair
MN	Mikrokokkennuklease
MOS	metal oxide semiconductor
MS	Massenspektrometrie
MSP	methylierungsspezifische PCR
Ms-SNuPE	methylation-sensitive single-nucleotide primer extension
MTHFR	Methylentetrahydrofolat-Reduktase

Mytj 45	Polyethylenglykol(8)stearat
NA	numerische Apertur
Na-Phosphat-Puffer	Natrium Phosphatpuffer
NAT	N-Acetyltransferase
NER	Nucleotide-Excision Repair
NMR	Nuclear magnetic resonance
NWG	Nachweisgrenze
PAK	Polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoff
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PMT	Photomultiplier
POE	Polyoxyethylen
QE	Quanteneffizienz
RAL	relative adduct labeling
RFU	relative fluorescence unit
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RSD	Relative Standardabweichung
S/N	Signal-zu-Rausch-Verhältnis
SAH	S-Adenosyl-Homocystein
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SCNT	somatic cell nuclear transfer
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOP	Standard-Operating-Procedure
SPD	Milz-Phosphodiesterase
SPE	Festphasenextraktion (solid phase extraction)
Sp-QuPE	solid-phase quantitative primer extension
SSCP	single-strand conformation polymorphism
SssI assay	Methylakzeptorassay
T	Thymin
TCDD	Tetrachlor-Diphenyl-Dioxin
THF	Tetrahydrofolat
TOC	total organic compound
ZAP	zetaassoziiertes Protein
Zp	Zersetzungsprodukt

$\tau_{1/2}$

[γ - ^{32}P]-ATP

Lebensdauer

[γ - ^{32}P]-2'-Desoxyadenosintriphosphat

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
2	Theoretische Grundlagen	6
2.1	Krebs und krebserzeugende Faktoren	6
2.2	Molekulare Grundlagen und Mechanismen der Krebsentstehung	7
2.3	DNA-Addukte	12
2.3.1	Exogene DNA-Addukte	13
2.3.2	Endogene DNA-Addukte	13
2.3.3	Oxidativer Streß	14
2.3.4	Nachweismethoden für DNA-Addukte	15
2.4	DNA-Methylierung	17
2.4.1	Bedeutung der DNA-Methylierung	17
2.4.2	Nachweismethoden für die DNA-Methylierung	19
2.5	Kapillarelektrophorese	21
2.5.1	Die LIF-Detektion in der Kapillarelektrophorese	22
2.5.2	Fluoreszenzdetektion in CAE-Systemen	25
2.5.3	LIF-Detektoren in der CE	28
3	Problemstellung und Zielsetzung	33
4	Ergebnisse und Diskussion	35
4.1	Standardisierung der CE-LIF-Methode zur Methylierungsbestimmung	35
4.1.1	Optimierung der Probenvorbereitung für 1 µg und 100 ng DNA	35
4.1.2	Ermittlung von Korrekturfaktoren zur Bestimmung des Methylierungsgrades für 10 µg, 1 µg und 100 ng DNA	39
4.1.3	Betrachtung diverser Bereiche in einem Elektropherogramm	43
4.1.4	Erhöhung des Probendurchsatzes und der Routinetauglichkeit	47
4.1.5	Überprüfung der Korrekturfaktoren mittels Lambda-DNA (unmethyliert) bei 10 µg	50
4.1.6	Reproduzierbarkeit	51
4.1.7	Dokumentation relevanter Probenvorbereitungsparameter	52
4.2	Bestimmung des genomischen Methylierungsgrades	53
4.2.1	Analyse von 10 µg DNA aus Caco2-Zellen	54
4.2.2	Analyse von 100 ng DNA aus Brustkrebs-Zellen	56

4.2.3	Analyse des genomischen Methylierungsgrades in DNA von Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie.....	57
4.2.4	Bestimmung des genomweiten Methylierungsgrades von DNA aus Rinderföten nach <i>in vitro</i> - und <i>in vivo</i> -Fertilisation.....	68
4.3	Nachweis endogener DNA-Addukte mittels CE-LIF	71
4.3.1	Standardverbindungen für die Analyse endogener DNA-Addukte.....	71
4.3.2	Co-chromatographische Analyse von endogenen Addukten in mitochondrialer und genomischer DNA aus Rinderleber und humanem Blut	73
4.3.3	Optimierung der kapillarelektrophoretischen Bedingungen für den Nachweis der endogenen Addukte.....	74
4.3.4	Bestimmung der Korrekturfaktoren für die synthetisierten endogenen Addukte	77
4.3.5	Quantifizierung von etheno-dAMP und dUMP in <i>in vivo</i> -Proben.....	79
4.3.6	Analyse von etheno-dAMP bei einer gesunden Person	84
4.4	Steigerung der Empfindlichkeit durch Konstruktion eines neuen LIF-Detektors....	86
4.4.1	Theoretische Vorüberlegungen	87
4.4.2	Der experimentelle Aufbau des LS-CCD-Detektionssystems	89
4.4.3	Ankopplung des LS-CCD-Systems an die CE.....	91
4.4.4	Laserjustierung nach Einbau einer Kapillare	93
4.4.5	Einfluß verschiedener Parametereinstellungen der CCD-Kamera.....	96
4.4.6	Wahl des Ausschnittes in der Bilddarstellung.....	100
4.4.7	Sensitivitätsvergleich zwischen CE-LIF und CE-LS-CCD	102
4.4.8	Linearität des LS-CCD-Systems	107
4.4.9	Sensitivitätssteigerung durch Einsatz einer kubischen Kapillare.....	109
4.5	Erhöhung des Probendurchsatzes durch Konstruktion einer Multikapillarenanordnung.....	112
4.5.1	Vorbereitung und Entwicklung einer Multikapillarenanordnung	112
4.5.2	Analyse von CT-DNA mit der Multikapillarenanordnung	115
4.6	Ausblick	119
5	Zusammenfassung.....	125
6	Experimenteller Teil.....	128
6.1	Herstellung des Enzymmixes (MN/SPD) für die DNA-Hydrolyse	128
6.2	DNA-Quantifizierung.....	130
6.3	Probenvorbereitungsvorschriften (PVV).....	131
6.4	Proteinabtrennung über eine Größenmembran	134

6.5	Lagerung der Proben	134
6.6	Durchführung der kapillarelektrophoretischen Messungen	135
6.6.1	Vorbereitungen der Kapillaren.....	135
6.6.2	Spülen der Kapillaren.....	136
6.6.3	Herstellen der Trennelektrolyten.....	137
6.6.4	Kapillarelektrophoretische Analysemethoden	139
6.7	Geräte und Materialien.....	140
6.8	Sonstige Software.....	144
6.9	Chemikalien	145
7	Anhang	147
7.1	Abbildungsverzeichnis	159
7.2	Tabellenverzeichnis.....	162
8	Literaturverzeichnis.....	164

Abstract

The work described here is essentially divided into two parts. The first section covers the optimisation and standardisation of a capillary-electrophoretic method for the analysis of DNA modifications and the employment of this procedure to investigate real samples. The second part is concerned with the construction of a detection system with spectral resolution of laser-induced fluorescence and detection by a charge-coupled device (CCD) as well as the use of a multi-capillary arrangement to increase sample throughput.

Tumour tissue from biopsies or surgery is often very small and inhomogeneous, so that DNA in amounts of 10 μg is only rarely available for analysis. After the amount of DNA necessary for analysis had successfully been reduced from 10 μg to 1 μg and 100 ng and correction factors had been determined by means of the defined standard DNA of Lambda bacteriophages, the methylation level in 100 ng DNA from human breast-cancer cells could be determined reproducibly.

In the context of a co-operative project with *Goth Goldstein* (Lawrence Berkeley National Laboratories, Berkeley, USA), DNA samples from Caco2 cellular lines which had been incubated with various polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) for 24 h and 48 h were analysed for their methylation level. The hypomethylation turned out to depend on the carcinogenic potential of the PAHs.

During this work, it was noticed that the sample throughput, despite the fully automated CE-LIF instrument, was limited by the instability of the fluorescence-labelled DNA sample diluted in water before the analysis. Detailed investigations showed that the cause for this lay in the formation of decomposition products from the great excess of fluorescence label. These decomposition products were present in the second or third analysis run and/or on longer storage of the diluted sample. In particular, they made it more difficult to integrate the 5m-dCMP signals reproducibly. It was shown that the extent of the formation of these products depended on the pH, the temperature and the influences of light and oxygen, as well as on the concentration of the fluorescence marker. As a result of these observations, the concentrations of the fluorescence marker and the coupling reagent were reduced for the 10 μg DNA analyses, and the diluted samples were covered with paraffin oil. The significantly higher sample stability achieved by these measures led to a doubling of the sample throughput from 12 to 24 analyses a day. An instability of the capillaries under routine use manifested itself after approximately 70 runs by a loosening of the polyimide coating at the outlet end; this could be repaired by a simple modification of a thermal-treatment

procedure described by *Baeuml* and *Welsch*. The lifetime of capillaries treated this way (heat-cured capillaries) could be extended by a factor of two to three (ca. 400 runs).

In the context of a co-operative project with *Oscier* (Royal Bournemouth Hospital, UK), 31 clinically very well characterised DNA samples from 29 B-CLL patients were examined, first for the genomic methylation. For comparison, the methylation level was determined in six lymphocytic DNA samples from healthy persons, which were made available by *Kleinsasser* (Department of Oekogenotoxikology of the HNO clinic of the University of Regensburg). Significant hypomethylation ($P < 0,0001$) was determined in all the persons suffering from leukaemia. In further investigations an additional trend to hypermethylation was noticed in patients with high VH-homology, high ZAP-70 expression and unmethylated C-334; this was, however, not statistically significant ($P = 0.064$). From these results and the results of *Oscier* it was concluded that patients with a methylation level $> 3.95\%$, a VH-homology of 98 % and a ZAP-70 expression of 10 % with unmethylated C-334 would have a worse disease prognosis than those with lower values and with methylated C-334. Since some patients with B-CLL exhibited a methylation level similar to that of healthy persons, 5m-dCMP is not a suitable biomarker for this type of illness. Interest was therefore focussed on the search for another biomarker. Further endogenous adducts (dUMP and etheno-dAMP) were quantified after optimisation of the capillary-electrophoretic separation in DNA samples from four B-CLL patients. RAL values found for etheno-dAMP lay within the range of 21 - 42 adducts in 10^5 unmodified nucleotides and for dUMP within the range of 35 - 77 adducts in 10^6 unmodified nucleotides. These results and further findings from the literature suggest that etheno-dAMP might represent a suitable biomarker for chronic lymphatic leukaemia (CLL).

To increase the sensitivity, a detection-system was constructed in co-operation with *Schütte* (LaVision BioTec), with which spectral resolution of the laser-induced fluorescence with following CCD detection could be accomplished (LS-CCD-system). Coupling of this detection system to capillary electrophoresis gave a detection limit of 5 pM for an aqueous solution of the fluorescence marker BODIPY with a S/N greater than 5. Exploitation of the advantages of the CCD camera's exposure time and modification of the null function of the camera by means of a capillary filled with water increased the sensitivity of the CE-LS-CCD system by a factor ~ 8.4 over that of the CE-LIF system. The employment of a cubic capillary instead of a round one led to a further increase in sensitivity by about a factor of 3. That means a sensitivity difference over commercial LIF detection of ~ 25 -fold, whereby the detection limit for DNA adducts, starting from an RAL of ~ 11 in 10^6 (CE-LIF), could be raised to ~ 5 in 10^7 .

In addition to this, the LS-CCD system could be used successfully for a multi-capillary arrangement with three capillaries. That had the advantage of accomplishing three analyses of a sample simultaneously in the time which had normally been needed for one analysis. Thus it was possible to increase the sample throughput from approximately 10 to 30 analyses a day. A sensitivity loss results from the necessary expansion of the laser beam, but that does not interfere with the determination of the methylation level.

1 Einleitung

The only real security a person can have in this world is a reserve of knowledge, experience and ability.

Henry Ford (1863-1947)

In den westlichen Industrieländern ist Krebs nach Herz- und Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache [1, 2]. Trotz umfangreicher staatlicher und industrieller Ausgaben zur Entwicklung neuer Arzneien erkranken jährlich weltweit mehr als zehn Millionen Menschen an Krebs, mehr als sechs Millionen sterben daran [3]. Allein in Deutschland wird jährlich bei etwa 400000 Frauen und Männern Krebs diagnostiziert, für mehr als 211000 Personen endet diese Erkrankung jedes Jahr tödlich [4, 5]. Zwar gibt es Krebsarten, die heute rückläufig sind wie der Magenkrebs oder der Gebärmutterhalskrebs, jedoch nehmen andere auf alarmierende Weise zu, etwa Lungen- und Dickdarmkrebs [1, 5]. Lungenkrebs steht bei Männern an der Spitze der Todesursachen, bei Frauen ist es Brustkrebs [5].

Die meisten Krebserkrankungen nehmen an Häufigkeit im Alter deutlich zu, so daß Krebs auch als eine degenerative Alterserkrankung des Zellwachstums angesehen werden kann. Hauptrisikofaktoren für die Krebsentstehung sind das Rauchen sowie falsche Ernährung. So werden 25 bis 30 % aller Krebserkrankungen auf das Rauchen zurückgeführt. Weitere 20 bis 40 % der Krebserkrankungen hängen laut Schätzungen mit der Ernährung zusammen. Als weitere Risikofaktoren gelten Virusinfektionen, die weltweit mit rund 15 % unter anderem bei der Entstehung von Leberkrebs, Gebärmutterkrebs und Lymphomen (Tumoren des Lymphgewebes) eine Rolle spielen. Beruflich bedingte Schadstoffbelastungen sind mit etwa 7 % an der Krebsentstehung beteiligt, während genetische Faktoren, die an der Entstehung von Darm-, Brust-, Schilddrüsen- und Eierstockkrebs beteiligt sind, nach heutigem Wissen zwischen 5 und 10 % ausmachen [6 - 8].

Außerdem zeigen sich auch geographische Häufigkeitsunterschiede in der Tumorlokalisation [7]. Beispielsweise kommt Leberkrebs in Ostasien, insbesondere in der Mongolei am häufigsten vor [3]. Als Hauptursachen für Hepatokarzinome werden Hepatitis-B- und -C-Viren und die ernährungsbedingte Aufnahme von Aflatoxin vermutet [9]. Dagegen treten in Australien Hautkrebserkrankungen besonders oft auf [3]. Die primäre Ursache hierfür ist in der dünnen Ozonschicht über Australien und die damit verbundene starke UV-Strahlung zu sehen.

Krebserkrankungen stellen ein sehr vielschichtiges Problem dar. Entsprechend ist die Krebsforschung eine sehr breit angelegte Disziplin, die fast jeden Aspekt der Biologie normaler Zellen berührt, von der molekularen über die zelluläre Ebene bis zur Gewebsdifferenzierung und schließlich zur Untersuchung überregionaler Kontrollsysteme wie etwa des Hormon- und des Immunsystems [1]. Ein wesentliches Aufgabengebiet zur Minimierung von Krebserkrankungen stellt die Fortsetzung und Optimierung der Prophylaxe und Früherkennung dar. Dazu zählen unter anderem die Identifikation von kanzerogenen Noxen und die Identifizierung und Validierung von Biomarkern, die mit dem Prozeß der Krebsentstehung assoziiert sind.

2 Theoretische Grundlagen

Mehr als einhundert verschiedene, deutlich unterschiedliche Krankheitsbilder werden im Allgemeinen unter dem Begriff „Krebs“ zusammengefaßt. Sie variieren im Zeitpunkt ihres ersten Auftretens, in der Geschwindigkeit ihres Fortschreitens, in der zellulären Differenzierung, in ihrer Tendenz zur Metastasenbildung, in ihrer Therapierbarkeit und in ihrer Prognose. Die einzelnen Krebsarten werden in erster Linie nach den Körperzellen unterschieden, von denen die Krankheit ausgeht. Die weit überwiegende Zahl humaner Krebse stellen Karzinome dar, bösartige Entartungen epithelialer Zellen, etwa der Lunge, des Brustgewebes oder des Verdauungstraktes. Der Rest verteilt sich auf Tumoren des Knochen-, Knorpel-, Muskel- oder Bindegewebes (Sarkome), Lymphome und Leukämien. Letztere entstehen aus blutbildenden Zellen des Knochenmarks bzw. der lymphoiden Organe [2, 10 - 12].

2.1 Krebs und krebserzeugende Faktoren

Die Entstehung von Krebs kann ohne äußeren Einfluß spontan erfolgen, aber auch durch biologische, chemische oder physikalische Umweltfaktoren initiiert werden. Die Folge sind neoplastische Zellen (maligne Tumorzellen) mit unvollkommener Differenzierung und ungehemmter Vermehrung. Ihr Wachstum ist weitgehend unabhängig von Kontrollmechanismen des Ursprungsgewebes [10]. Maligne Tumorzellen sind in der Lage, unabhängig von der Umgebung zu proliferieren, Apoptose-Signale zu ignorieren, sich der immunologischen Abwehr zu entziehen und gegebenenfalls sogar infiltrierend zu wachsen und zu metastasieren [11 - 13]. Alle Tumoren bestehen aus mindestens zwei Komponenten, nämlich den autonom wachsenden Tumorzellen im eigentlichen Sinne, und einem Stroma, das sich aus Bindegewebe, Blutgefäßen, entzündlichen Zellinfiltraten und anderen Komponenten zusammensetzt [10]. Lebensbedrohend an einer Tumorerkrankung ist zumeist weniger der Primärtumor, sondern vielmehr seine multiplen Metastasen (Sekundärtumoren). Ein Therapieerfolg ist deshalb besonders abhängig von einer möglichst frühen Erkennung maligner Zellen, solange diese noch zahlenmäßig begrenzt und lokalisiert sind. Mit bildgebenden Diagnostikverfahren können in der Regel maligne Neubildungen, deren Tumordurchmesser unter einem halben bis einem Zentimeter liegt, nicht nachgewiesen werden. In diesem Stadium enthält ein Tumor bereits zwischen 10^8 - 10^9 Zellen [10, 11].

2.2 Molekulare Grundlagen und Mechanismen der Krebsentstehung

Bereits 1914 formulierte der Würzburger Biologe *Theodor Boveri* seine Theorie der somatischen Mutation als Ursache für die Krebsbildung. Krebszellen entstehen danach infolge fälschlich kombinierter Chromosomenabschnitte, was zu einer anormalen Vermehrungsfähigkeit der Zellen führt [14].

Der genaue Mechanismus zur Krebsentstehung ist bis heute noch nicht exakt aufgeklärt. Es ist aber allgemein akzeptiert, daß die Krebsbildung das Ergebnis eines mehrstufigen Prozesses von genetischen Fehlern und Veränderungen (z.B. Mutationen, Deletionen, Chromosomentranslokationen) ist, deren Akkumulation in einer Zelle zu ihrer Entartung führen kann [12, 15 - 17]. Der Übergang von einer normalen Zelle zur Tumorzelle (maligne Transformation) ist durch einen zunehmenden Verlust der Zelldifferenzierung gekennzeichnet, die sich unter anderem in einer veränderten Zellform, einer gestörten Position der Zellen zueinander und einer Abnahme der normalen Gewebestruktur äußert [18].

Eine wichtige Rolle bei der malignen Transformation spielen zwei bestimmte Kategorien von Genen, die Proto-Onkogene und die Tumorsuppressorgene [10, 11, 19] (Abbildung 2-1). Diese, bereits von *Boveri* postulierten Gene [14, 20], stellen kritische Wirkungsorte in der zellulären DNA dar [11]. Sie enthalten genetische Informationen zur Regulation des Zellzyklus und des Zellwachstums.

In einer normalen Zelle wird das Wachstum so reguliert, daß der Anteil proliferierender Zellen in einem Organ zu- und abnimmt, wie es erforderlich ist, um den ständigen Verlust an Zellen durch Verschleiß und Alterung zu kompensieren [11]. Krebszellen scheinen diesen Regulationsmechanismen nicht mehr zu unterliegen [11].

Proto-Onkogene können beispielsweise durch Mutationen, Viren oder Chromosomentranslokationen zu Onkogenen aktiviert werden [7, 11]. Einige Onkogene (z.B. *myc*) kodieren Proteine, die direkt an der Stimulierung der Proteinsynthese im Zellkern beteiligt sind. Weitere Genprodukte von Onkogenen sind unter anderem Wachstumsfaktoren, membrangebundene Rezeptoren und Regulatoren des Phosphoinositol-Stoffwechsels [7, 11, 21]. In Zellen mit dem Wachstumsverhalten von Tumorzellen sind solche Gene entweder verstärkt exprimiert oder deren Produkte strukturell verändert, wodurch die Zellen zu einer verstärkten Vermehrung angeregt werden können [21, 22]. Diese Abweichungen vom physiologischen Genexpressionsmuster tragen zur malignen Transformation bei [10, 11, 22].

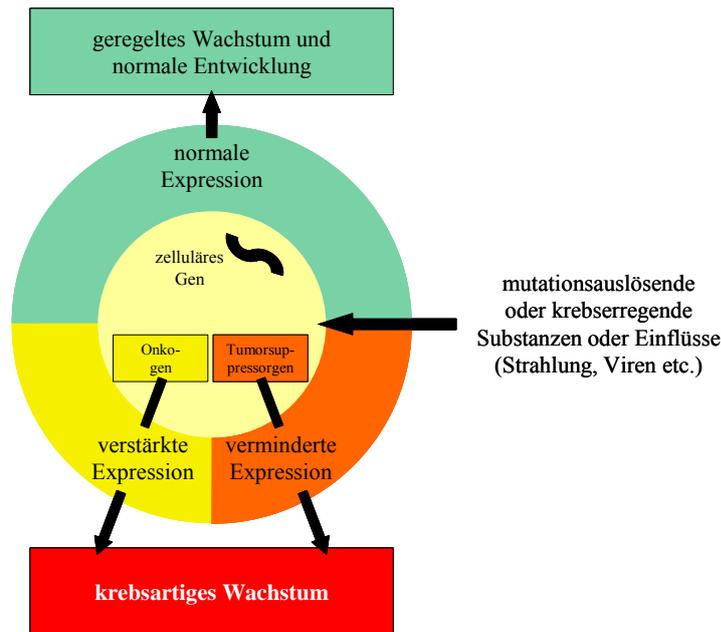


Abbildung 2-1: Modell einer einheitlichen Theorie zur Krebsentstehung. Modifiziert aus *Schirmacher* [11]. Zentraler Ausgangspunkt sind zelluläre Gene (Proto-Onkogene und Tumorsuppressorgene), die für ein geregeltes Wachstum und eine normale Entwicklung der Zelle verantwortlich sind. Mutationsauslösende Vorgänge können zur Aktivierung oder Überexpression von Onkogenen oder zum Ausfall von Tumorsuppressorgenen führen [11].

Im Gegensatz zu den Onkogenen ist der Einfluß von Tumorsuppressorgenen in der Krebsentstehung durch einen rezessiven Prozeß charakterisiert [11]. Tumorsuppressorgene sind negative Regulatoren der Zellproliferation [23]. Sie kodieren Proteine, die ihrerseits die Expression von Zellteilungsproteinen hemmen und damit die Zellteilung kontrollieren. Des weiteren sind sie an Differenzierungsprozessen beteiligt [19, 24].

Die Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens führt zur Inhibierung der Expression von Enzymen, die als Wachstumsbremsen fungieren [24]. Das *p53*-Gen ist das am häufigsten mutierte Tumorsuppressorgen bei humanen Tumoren [25, 26]. Die wichtigste Funktion des nicht mutierten *p53*-Proteins besteht darin, in Zellen mit DNA-Schäden je nach Ausmaß des Schadens und nach Zellzyklusstadium einen Wachstumsstop oder die Apoptose zu induzieren. Durch eine Mutation des *p53*-Gens können diese bedeutsamen Kontrollmechanismen nicht mehr optimal durchgeführt werden [16, 25].

Eine einzige Veränderung dieser Kontrollgene ist für die vollständige maligne Transformation nicht ausreichend. Krebs entwickelt sich erst, wenn einige dieser Gene z.B. durch Mutationen aktiviert bzw. inaktiviert werden, die mutierte Zelle teilungsfähig ist und der Schaden nicht repariert wird [7, 23, 27].

Für den mehrstufigen Prozeß, der für die Bildung eines malignen Tumors erforderlich ist, wird heute eine allgemeine Untergliederung in die Schritte Initiation, Promotion und Progression vorgeschlagen. Dieses Mehrstufen-Modell (Multi-Hit-Konzept) umfaßt mittlerweile bis zu sieben voneinander unabhängige genetische und epigenetische Ereignisse (Abbildung 2-2) [12, 28 - 30]. In der Initiationsphase, dem ersten Schritt der Kanzerogenese, entstehen aus normalen Zellen durch irreversible Schädigungen des genetischen Materials potentielle Tu-

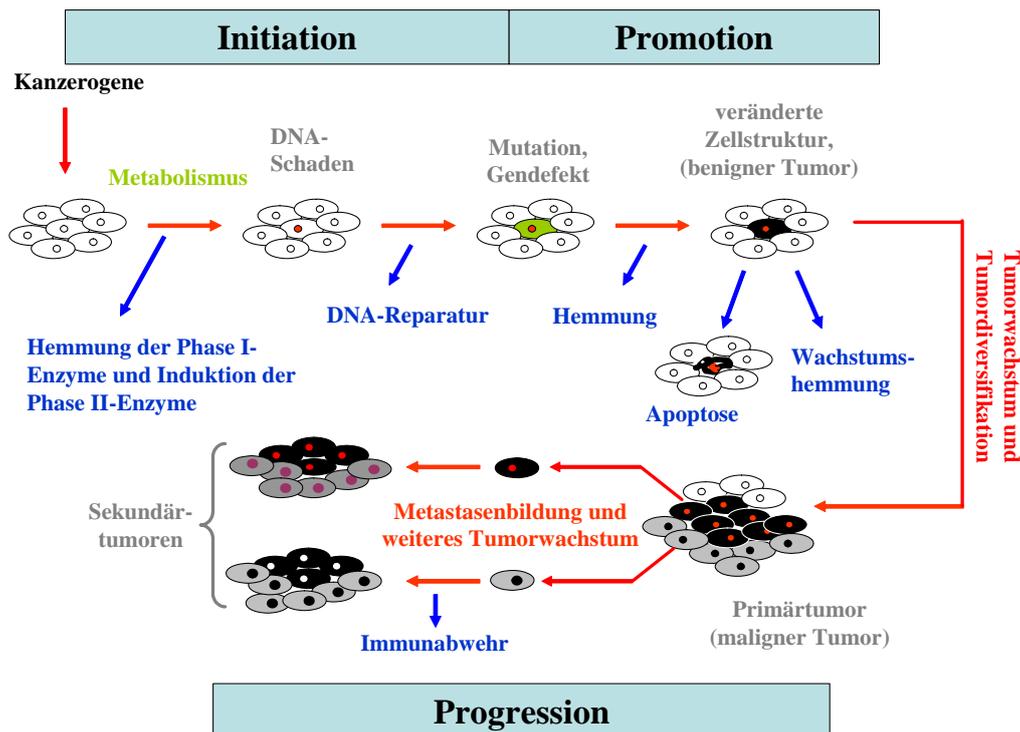


Abbildung 2-2: Multi-Hit-Konzept der chemischen Kanzerogenese. Modifiziert aus *Schirrmacher* [11]. Die blauen Pfeile kennzeichnen Prozesse, die einer Krebsentstehung entgegenwirken. Trotz ihres klonalen Ursprungs zeichnen sich maligne Tumoren vor allem dadurch aus, daß sie in der Lage sind, sich zu diversifizieren, d.h. sie bilden genotypisch unterschiedliche Subpopulationen bzw. phänotypisch veränderte Varianten (Tumorheterogenität). Analoges gilt für ihre Metastasen [11].

morzellen, die sich phänotypisch nicht von den umliegenden, normalen Zellen unterscheiden [31, 32]. In der Promotionsphase proliferiert die initiierte Zelle zu einem morphologisch erkennbaren, präneoplastischen Zellklon (benigner Tumor). Der letzte Schritt, die Progression, beschreibt die Umwandlung des benignen Tumors zur Neoplasie (maligner Tumor) und darüber hinaus die Metastasierung (Transformation vom Primär- zum Sekundärtumor) [11, 12, 28 - 30]. Auch die Metastasenbildung ist ein mehrstufiger Prozeß [11, 33]. Dieser umfaßt das Einwachsen des Primärtumors in das umliegende Gewebe, den Einbruch von Tumorzellen in

die Lymph- und/oder Blutgefäße, das Eindringen in neues Gewebe, die Veränderung der Umgebung zugunsten des Tumorwachstums und der Versorgung der Metastasen mit Blutgefäßen [11, 18, 33 - 35]. Ein noch nicht ganz geklärtes Phänomen der Metastasenbildung ist der Organotropismus, d.h., daß bestimmte Tumoren bei der Metastasierung bestimmte Organe bevorzugt kolonisieren. Leber und Lunge gehören dabei zu den am häufigsten betroffenen Organen. Metastasierende Tumorzellen werden im Verlauf ihrer Ausbreitung neben einem stetigen Wechsel der Mikroumgebung auch immunologischen Abwehrreaktionen ausgesetzt, und wahrscheinlich überlebt nur ein kleiner Prozentsatz von Tumorzellen diese Phase [11]. Es wird angenommen, daß der Übergang von der Promotionsphase zur Progressionsphase im Wesentlichen auf dem molekularen Prinzip der veränderten Genexpression beruht. In diesem Zusammenhang werden insbesondere Veränderungen im Methylierungsmuster diskutiert [23]. Die irreversiblen Schädigungen der DNA in der Initiationsphase basieren auf einer genetischen Mutation durch Einwirkung exogener oder endogener Faktoren [36]. Umwelteinflüsse wie Strahlen (UV-Licht, ionisierende Strahlung), bestimmte Viren und eine große Zahl von kanzerogenen Substanzen können nach heutigem Wissen DNA-Läsionen hervorrufen. Bei der Mehrzahl der chemischen Krebsrisikofaktoren handelt es sich um organische Substanzen. Kanzerogene Noxen können aufgrund ihrer chemischen und biologischen Wirkung in zwei Gruppen eingeteilt werden:

➤ Genotoxische Kanzerogene

Diese Kategorie umfaßt Chemikalien, deren mutagenes Potential auf die Interaktion mit der Erbsubstanz zurückzuführen ist [37, 38]. Aufgrund der chemischen Aktivität kann zusätzlich zwischen direkten Kanzerogenen, die keine metabolische Aktivierung benötigen, und indirekten Kanzerogenen, die erst metabolisch verändert werden müssen, um mit der DNA reagieren zu können, unterschieden werden. Zur erstgenannten Klasse zählen z.B. Nitrosamide, halogenierte Substanzen und Nitrosoharnstoff [22, 39]. Die überwiegende Anzahl genotoxischer Kanzerogene gehört zur letztgenannten Klasse [40] wie die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK) [22, 41, 42], aromatische Amine [22, 43 - 45], Nitrosamine [22, 46] und einige Pilzgifte [10, 47].

Bei der Metabolisierung kanzerogener Verbindungen spielen Phase I- und Phase II-Enzyme in den entsprechenden Organen eine entscheidende Rolle. Phase I-Enzyme aktivieren unpolare, lipophile Verbindungen durch Einführen von funktionellen Gruppen. Das kann oxidativ durch Epoxidierung, Hydroxylierung, N- oder S-Des-

alkylierung beziehungsweise reduktiv durch Nitroreduktion oder Carbonylreduktion geschehen. Wichtigster Vertreter dieses Metabolismus-Systems ist die Cytochrom P450-Familie. Es existieren mindestens 40 unterschiedliche P450-Cytochrome in jeweils einer einzigen Spezies [48]. Durch die Einführung von funktionellen Gruppen erhöht sich die Reaktivität der Verbindungen zum Teil erheblich. Die reaktiven Metabolite können dann z.B. kovalente Bindungen mit den Basen der DNA (DNA-Addukte) ausbilden, bevor Phase II-Enzyme die durch Phase I-Enzyme aktivierten Verbindungen an körpereigene Liganden wie Glutathion, Glukuronsäure, Essigsäure oder Schwefelsäure binden, wodurch die Ausscheidung über Niere und Galle ermöglicht wird. Allerdings können auch Konjugate des Phase-II-Metabolismus aktivierte Spezies darstellen und als Elektrophile kovalente Bindungen mit der DNA eingehen.

➤ Epigenetische Kanzerogene

Unter epigenetischen (nicht-genotoxischen) Kanzerogenen werden krebserzeugende Substanzen verstanden, für die eine direkte Interaktion mit der DNA nicht nachweisbar ist. Ihre biologische Wirkung beruht auf Zytotoxizität, hormonelle Einflüsse, immunologische Effekte oder Tumorpromotion [22]. In letzter Konsequenz ist die krebsauslösende Wirkung dieser epigenetischen Kanzerogene auf einer gesteigerten Mutationsrate, Veränderung der Genexpression oder Erhöhung der Proliferationsrate zurückzuführen [49 - 55]. Zu dieser Gruppe gehören beispielsweise Dioxine, Phthalate, Butylhydroxyanisol, Dichlormethan, Dichlordiphenyl- β -trichlorethan (DDT), Östrogen und Asbest [22].

Ob sich eine DNA-Läsion (z.B. Einzel- oder Doppelstrangbrüche, Basendimerisierungen, Depurinierungen, Ausbildung von DNA-Addukten) nach Einwirkung endogener und exogener Faktoren manifestiert und dieser Schaden dann letztlich zu einer malignen Transformation führt, hängt im Wesentlichen von den zahlreichen Abwehr- und Reparaturmöglichkeiten auf zellulärer Ebene ab. Dazu gehören unter anderem die Adsorptions- und Stoffwechselbarrieren gegen kanzerogene Noxen, die Immunabwehr und eine Reihe von DNA-Reparaturmechanismen. Zu den wichtigsten Reparaturmechanismen zählen das Base-Excision-Repair (BER)-, das Nucleotide-Excision-Repair (NER)- sowie das Mismatch Repair (MMR)-System [18, 25, 36, 56 - 68]. Schätzungen zufolge werden pro Zelle und Tag 20000 bis 100000 DNA-Modifikationen repariert [69]. Schädigung und Reparatur befinden sich im normalen Lebenszyklus einer Zelle im Gleichgewicht. Dieses kann aber durch einen Konzen-

trationsanstieg von Umwelttoxinen, durch eine Exposition über einen langen Zeitraum oder durch Schwächung der zellulären Abwehr gestört werden [70, 71]. Eine solche Störung ist mit einer gesteigerten Mutationsrate verbunden und kann ein erhöhtes Krebsrisiko zur Folge haben [18].

2.3 DNA-Addukte

DNA-Addukte sind Produkte einer kovalenten Verknüpfung elektrophiler Moleküle mit den Basen der DNA, bei der es zu einer Vielzahl unterschiedlicher Modifikationen kommen kann [72]. Unter Betrachtung der nukleophilen Zentren der vier Nucleobasen kommen allein für alkylierende Agentien 12 unterschiedliche Angriffspunkte in Frage. Abbildung 2-3 gibt einen Überblick über die vier wichtigsten Möglichkeiten der Adduktbildung und die jeweiligen Angriffspunkte an den nukleophilen Zentren der Basen [73].

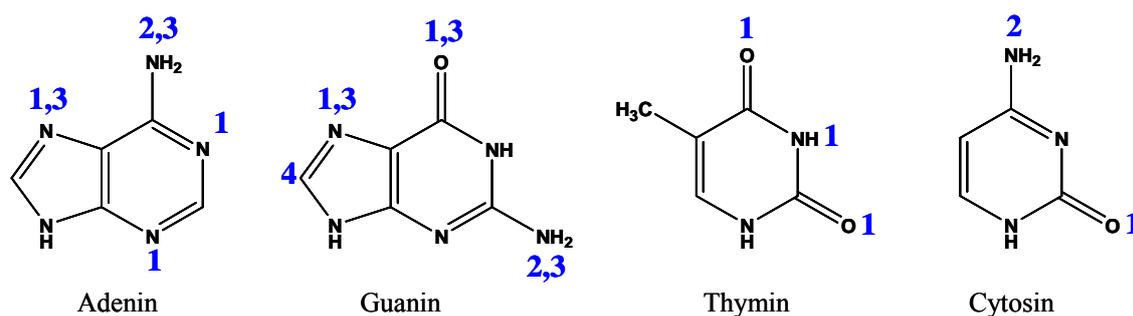


Abbildung 2-3: Modifizierbare nukleophile Zentren der vier DNA-Basen [73]. Die Zahlen stellen die verschiedenen Reaktionstypen an den jeweiligen potentiellen Angriffspunkten der Basen dar: 1: Alkylierung (z.B. Nitrosamine); 2: Arylalkylierung (z.B. PAK); 3: Arylaminierung (z.B. aromatische Amine); 4: Oxidation (z.B. Sauerstoffradikale).

Experimentelle Befunde belegen eindeutig, daß DNA-Addukte Mutationen verursachen können, da bei der Replikation an den modifizierten Stellen beispielsweise Basensubstitutionen oder Deletionen beobachtet werden [74 - 81]. Dadurch spielen die Addukte eine sehr wichtige Rolle in der Initiationsphase der Kanzerogenese. Die selektive Lokalisation und Akkumulation von DNA-Addukten in verschiedenen Organen ist abhängig von toxikokinetischen Effekten, vom Metabolismus, von der Effizienz der DNA-Reparatur und von der Zellproliferation [72]. Es werden zwei Gruppen von DNA-Addukten unterschieden, die exogenen und endogenen Addukte.

2.3.1 Exogene DNA-Addukte

Exogene DNA-Addukte entstehen durch Exposition gegenüber genotoxischen Kanzerogenen und Reaktion dieser mit der DNA. Dazu ist für die meisten dieser Substanzen erst eine Verstoffwechslung notwendig. Als reaktive Formen werden beispielsweise die vom Cytochrom P450-Enzymsystem metabolisierten Epoxide [80] angesehen [22, 82 - 86], die durch nukleophile Ringöffnung z.B. an die N-7- oder N-2-Position des Guanins adduktieren können.

Eine Substanzklasse der kanzerogenen, genotoxischen Noxen, die sehr häufig im Fokus des öffentlichen und wissenschaftlichen Interesses steht, sind die PAKs, die bei unvollständiger Verbrennung organischen Materials entstehen. Sie sind weit verbreitet und kommen z.B. im Teer, Ruß, Petroleum, Ölen, Abgasen von Verbrennungsmotoren und Tabakrauch sowie in gebratenen, gegrillten und geräucherten Lebensmitteln [22] vor. Die PAKs spielen vor allem bei der Entwicklung von Lungentumoren eine bedeutende Rolle [82, 87]. Die Leitstruktur dieser ubiquitären Umweltschadstoffe stellt Benzo[*a*]pyren (B[*a*]P) dar. Es gilt als eines der stärksten Mutagene und Kanzerogene, wobei die reaktiven Metaboliten die Stereoisomere des 7,8-Diol-9,10-epoxids (BPDE) darstellen [22, 41, 82, 87, 88]. Ihre krebsauslösende Wirkung durch Induktion von Mutationen im *ras*-Proto-Onkogen und im *p53*-Tumorsuppressorgen ist bekannt [78, 81, 82, 89, 90]. Eine Reihe von Untersuchungen, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, zeigt die Bedeutung dieser DNA-Addukte für die Kanzerogenese [82, 88, 89, 91 - 101].

2.3.2 Endogene DNA-Addukte

Diese Gruppe beinhaltet DNA-Modifikationen, die bei normalen physiologischen Prozessen gebildet werden [102]. Der überwiegende Anteil dieser Addukte besteht aus oxidierten Nucleobasen [103], die durch Oxidantien, Produkte der Lipidperoxidation, reaktive Stickstoffspezies und Intermediate unterschiedlicher Metabolisierungswege entstehen können [104]. Auch wenn viele endogene Substanzen kein akut toxisches Potential besitzen, wird ihr schädigender Beitrag aufgrund der lebenslangen Exposition diskutiert [105]. Erst durch die Weiterentwicklungen und Optimierungen auf dem Gebiet der DNA-Adduktanalytik rückten die endogenen Addukte vermehrt ins wissenschaftliche Interesse. Mittlerweile wurden auch für diese Addukte ein mutagenes und zytotoxisches Potential nachgewiesen [22, 103, 106 - 108]. Abbildung 2-4 zeigt eine Auswahl endogener DNA-Modifikationen.

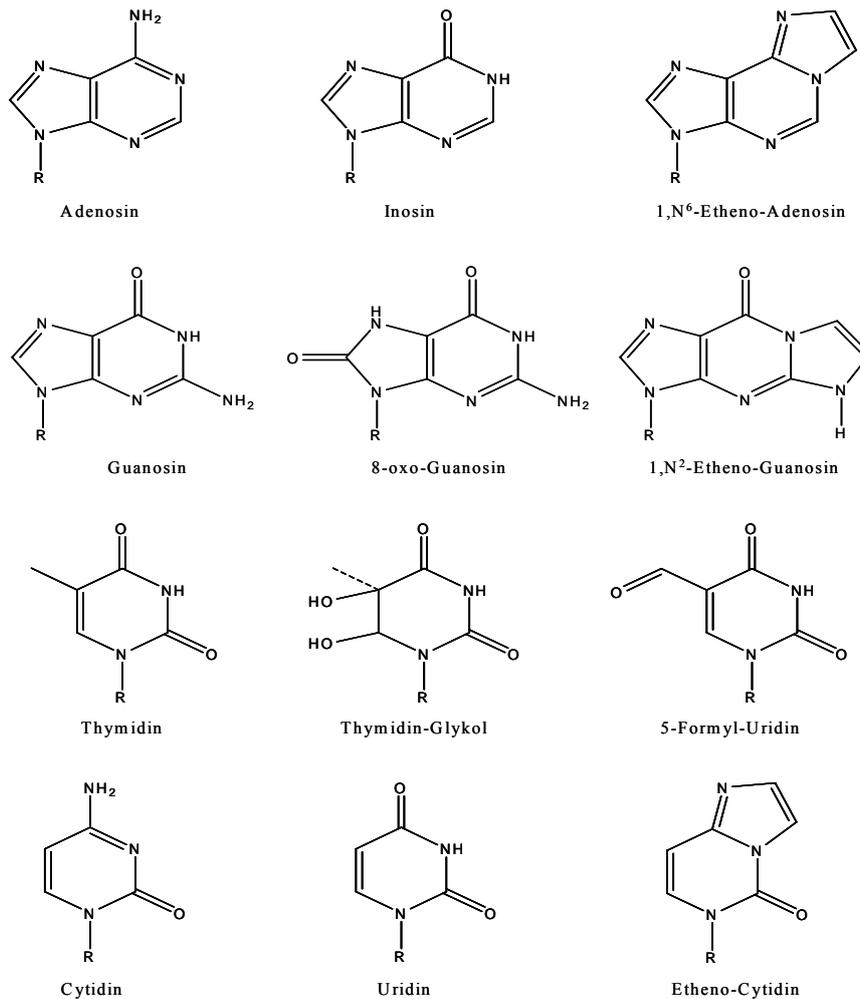


Abbildung 2-4: Auswahl einiger endogener DNA-Modifikationen [58, 103, 108, 109]; auf der linken Seite befinden sich die jeweils unmodifizierte Nukleoside, aus denen die Addukte gebildet werden; R = Desoxyribose.

2.3.3 Oxidativer Streß

Als eine der Hauptursachen für endogene DNA-Schädigungen wird der oxidative Streß angesehen [102, 103]. Während des zellulären Stoffwechsels produziert ein aerobischer Organismus einen gewissen Anteil reaktiver Sauerstoffspezies (ROS = reactive oxygen species), der durch Einwirken exogener Faktoren (z.B. Strahlen, Xenobiotika) noch verstärkt werden kann [58, 103, 109 - 112]. Dabei können die ROS mit den Basen der DNA oder der Desoxyribose reagieren und DNA-Läsionen in Form von oxidierten DNA-Basen oder Strangbrüchen verursachen [103]. Auch Lipide können oxidiert werden, was zur Bildung von reaktiven Intermediaten führen kann, die dann ihrerseits kovalent mit der DNA unter Ausbildung von DNA-Addukten reagieren können [113, 114]. Untersuchungen haben gezeigt, daß im zellulären

Metabolismus etwa 10^{10} ROS pro Tag entstehen, woraus ca. 20000 oxidierte DNA-Basen pro Zelle resultieren [115]. Allerdings besteht normalerweise ein Gleichgewicht zwischen dem Aufkommen der verschiedenen ROS, dem vorhandenen Antioxidationsystem und den diversen Reparaturmechanismen. Erst eine Störung dieses Gleichgewichts wird als oxidativer Streß bezeichnet [105, 116]. Zu den reaktiven Sauerstoffspezies gehören z.B. Hydroxyradikale (HO^\bullet), Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), das Superoxid-Anion (O_2^\bullet), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Ozon (O_3), Alkylperoxyradikale (RO_2^\bullet) und Alkoxyradikale (RO^\bullet) [103, 105, 108, 117]. Es wird angenommen, daß die Generierung dieser Spezies einen wesentlichen Beitrag zu degenerativen, vielfach altersabhängigen Krankheiten wie kardiovaskuläre Störungen, immuno- und neurologische Degenerationen, Katarakte und Krebs leistet [113].

2.3.4 Nachweismethoden für DNA-Addukte

Die DNA-Adduktbildung wird als Initiation der chemischen Kanzerogenese angesehen, weshalb derartige Addukte frühe Biomarker der Exposition darstellen und im Gegensatz zu äußeren Expositionsmessungen sowohl Aufnahme, Verteilung, Metabolismus und Entgiftung des Schadstoffes im Organismus berücksichtigen [72, 118]. Bei der Analyse von DNA-Addukten stellt deren unterschiedliche Persistenz (Stunden bis Monate) eine Einschränkung dar, die durch DNA-Reparatur, chemische Stabilität und zelluläre Lebensdauer limitiert ist. Dadurch wird eine Analysenauswertung erschwert [79]. Ein weiteres Problem ist die Beschaffung von Human-Proben. Der Nachweis von DNA-Addukten in den Zielorganen der Kanzerogenese wäre zwar wünschenswert, ist beim Menschen aber nur in Ausnahmefällen (Biopsien) möglich. Normalerweise kann nur auf DNA aus den Lymphozyten im Blut, aus Epithelzellen in der Mundhöhle oder Plazentazellen zurückgegriffen werden [119 - 121]. In diesem Zusammenhang wurde auch darüber berichtet, DNA aus Epithelzellen der Blase, welche regelmäßig abgestoßen und mit dem Urin ausgeschieden werden, zu gewinnen [121, 122].

Durch die Analyse von DNA-Addukten sollen grundlegende Erkenntnisse über die kanzerogene Wirkungsweise chemischer Substanzen erhalten werden. Die geringe Konzentration und die Vielfältigkeit der DNA-Addukte stellen dabei höchste Ansprüche an die Sensitivität und Selektivität der analytischen Methode (relative adduct labeling (RAL) von 1 Addukt auf 10^6 bis 10^9 unmodifizierte Nukleotide). Zudem erfordert die Bestimmung von Addukten als Biomarker im Rahmen z.B. epidemiologischer Studien mit beträchtlichem Probenaufkommen eine Analysenmethode mit hohem Probendurchsatz („high throughput screening“). Ein Bei-

spiel für eine solche Studie ist die „European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition“ (EPIC), eine der weltweit größten prospektiven Beobachtungsstudien, in der Zusammenhänge zwischen Ernährung, Lebensstil und Erkrankungsrisiko ermittelt werden sollen. Dabei wurden neben statistischen Erhebungen Blutproben von europaweit 500000 Personen im Alter von vorwiegend 35 - 70 Jahren archiviert [4].

In den letzten 25 Jahren wurden mehrere unterschiedliche Nachweismethoden zur Bestimmung von DNA-Addukten entwickelt. Dazu zählen neben physikalisch-chemischen Verfahren (z.B. GC-MS [44, 123 - 126], HPLC-Fluoreszenz [127 - 129], HPLC-ECD [130], Fluorescence-line-narrowing spectrometry (FLNS) [131 - 136], Accelerator mass spectrometry (AMS) [137 - 140]) auch Immunoassays [141 - 146] und ^{32}P -Postlabeling [147 - 155].

Die physikalisch-chemischen Methoden bieten den Vorteil der Automatisierbarkeit. Allerdings reichen die zur Verfügung stehenden kleinen Probenmengen nicht aus, um die DNA-Schäden qualitativ und quantitativ zu bestimmen. Bei Anbindung einer massenspektrometrischen Detektion stellt zudem die Verfügbarkeit stabiler isotope markierter Standardverbindungen zur Quantifizierung ein Problem und auch einen Kostenfaktor dar.

Dem gegenüber haben die immunologischen Verfahren aufgrund ihrer hohen Spezifität den Nachteil, daß sie nur spezielle DNA-Addukte analysieren können. Dazu benötigen sie spezifische monoklonale oder polyklonale Antikörper sowie zu deren Produktion hoch adduktivierte DNA im Bereich von 1 % der Gesamtmenge. Des weiteren müssen die DNA-Addukte zur Erzeugung der Antikörper bekannt sein [26, 144, 156].

Die zur Zeit empfindlichste und gebräuchlichste Methode, DNA-Addukte nachzuweisen, stellt das ^{32}P -Postlabeling-Verfahren dar. Diese Technik basiert auf einer enzymatisch katalysierten, radioaktiven Markierung angereicherter Addukte mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-Adenosintri-phosphat}$ und anschließender chromatographischer Auftrennung mittels multidimensionaler Dünnschichtchromatographie (DC). Die Nachteile dieser Methode liegen im Einsatz eines starken β -Strahlers und in der Tatsache, daß Simultanbestimmungen unterschiedlicher Kanzerogene aufgrund der geringen Trennleistung der DC nicht möglich sind. Darüber hinaus ist die Quantifizierung im Allgemeinen mit sehr hohen Standardabweichungen (bis zu 40 % [26]) verbunden, und das Verfahren läßt sich nicht automatisieren. Der Ablauf des ^{32}P -Postlabeling-Verfahrens ist unter anderem in den Arbeiten von *Schmitz* [26], *Schmeiser* [121], *Wörth* [157] und *Wirtz* [158] ausführlicher beschrieben.

Ein sehr guter Überblick über die verschiedenen Methoden zur DNA-Addukt-Bestimmung wurde von *Poirier* und *Weston* [159, 160], *Reddy* [118] und *Phillips et al.* [161] veröffentlicht.

2.4 DNA-Methylierung

Mittlerweile ist bekannt, daß nicht nur genetische, sondern auch epigenetische Veränderungen in der Krebsentstehung eine wichtige Rolle spielen [162, 163]. Eine bedeutende epigenetische Modifikation in Eukaryonten ist die Methylierung der Position 5 von Cytosin unter Bildung von 5-Methylcytosin in 5'-CG-3'-Dinukleotiden [164 - 167]. Dabei sind die Desoxycytidinreste dieses Dinukleotid-Paares in beiden Strängen symmetrisch methyliert [168 - 170]. Nicht alle Desoxycytidine liegen methyliert vor; vielmehr weist jeder DNA-Abschnitt ein spezifisches Muster von methylierten und unmethylierten Sequenzen auf. Im Säuger genom ergibt sich ein Gesamtgehalt an 5-Methylcytosin von 3 - 7 %, bei einem gesunden Menschen sind es etwa 3 - 4 % [164, 171 - 173]. Der Gehalt an 5-Methylcytosin wird vielfach als Methylierungsgrad bezeichnet. Dieser gibt den prozentualen Anteil des 5-Methylcytosins (5mC) von der Summe des methylierten und nicht methylierten Cytosins an.

Die Methylierung von Cytosin erfolgt enzymatisch unmittelbar nach der DNA-Synthese durch DNA-Methyltransferasen (DNMT) [166, 174, 175]. Mittlerweile sind mehrere Methyltransferase-Familien (DNMT1 und DNMT3) und deren Funktionen bekannt. Die DNMT1, auch „Maintenance“-Methyltransferase genannt, katalysiert an der Replikationsgabel die Methylierung des neu synthetisierten, unmethylierten DNA-Stranges. Dadurch ist die Weitergabe eines spezifischen Methylierungsmusters an die Tochterzellen gewährleistet [166, 172, 176]. Die DNMT3-Familie besitzt *de novo*-Methyltransferaseaktivität, d.h. sie methyliert eine bisher in beiden DNA-Strängen unmethylierte DNA [166, 172]. Beide Enzym-Familien spielen eine wichtige Rolle für die Genese und den Erhalt des art- und gewebsspezifischen Methylierungsmusters. Zudem kann die *de novo*-Methylierung auch als Schutz vor der Transkription fremder DNA, die in ein etabliertes Genom integriert worden ist, dienen [172]. Eine Inaktivierung der DNMT1 durch gezielte Mutationen in diesem Enzym führt zu einer globalen Demethylierung, welche letale Auswirkungen in Säugetieren zur Folge hat [174, 177].

2.4.1 Bedeutung der DNA-Methylierung

Der DNA-Methylierung wird eine bedeutende Funktion bei der Genexpression und Zelldifferenzierung zugesprochen. Da das Methylierungsmuster in verschiedenen Organen bei einer hohen interindividuellen Übereinstimmung unterschiedlich ist [178, 179], kann von einer Be-

deutung der Methylierung für die Aufrechterhaltung des jeweiligen Differenzierungsstatus ausgegangen werden [180].

Die 5'-CG-3'-Dinukleotide sind nicht gleichmäßig über das gesamte Genom verteilt, sondern kumulieren zu sogenannten CpG-Islands, die sich häufig in der Nähe von Promotorregionen befinden [181]. Etwa die Hälfte aller humanen Gen-Promotorregionen enthalten diese CpG-Islands [182]. In Genen, die in allen Zellen exprimiert werden, den sogenannten „house-keeping“-Genen, sind die CpG-Islands meist nicht methyliert. Daneben liegen die Promotoren gewebsspezifischer Gene normalerweise methyliert vor, genauso wie die CG-Dinukleotide außerhalb der CpG-Islands [162, 164, 183 - 185]. Unmethylierte CG-Dinukleotide innerhalb der Promotorregion eines Gens ermöglichen Transkriptionsfaktoren, an diese Stelle zu binden und die Transkription zu starten. Eine Methylierung innerhalb dieser Region verhindert ein Andocken der Transkriptionsfaktoren und führt folglich zu einer Inhibierung der Transkription [162, 183]. Ferner können an die methylierte DNA-Region verschiedene Enzymkomplexe binden, die eine Histon-Deacetylierung und eine Chromatinkondensation bewirken. Die Chromatinstruktur wird dadurch von einer transkriptionell aktiven in eine inaktive Form überführt [183, 186]. 5-Methylcytosin fungiert somit entweder direkt oder indirekt als molekularer Schalter für die Genexpression.

Tumoren zeichnen sich oft durch eine Störung des DNA-Methylierungsmusters aus. Dies äußert sich sowohl in der genspezifischen Hypermethylierung von CpG-Islands als auch in der genomischen Hypomethylierung. Beide Effekte erscheinen häufig simultan in einer Krebszelle, tragen aber separat zum Prozeß der Tumorgenese bei [187 - 190]. Es ist noch unklar, welche Ereignisse dafür verantwortlich sind. In vielen humanen Tumoren tritt beispielsweise eine transkriptionelle Inhibierung von Tumorsuppressorgenen aufgrund einer Hypermethylierung auf [191, 192]. Dabei gibt es für jeden Tumortyp ein spezifisches Profil der CpG-Island-Hypermethylierung [193], und die Veränderungen im CpG-Methylierungsmuster sind abhängig vom Stadium der Kanzerogenese [194].

Eine globale Hypomethylierung wird bei vielen Tumoren beobachtet und stellt einen frühen Schritt in der Entwicklung z.B. von Kolonkarzinomen und Magenkarzinomen dar, der noch vor den morphologischen, malignen Veränderungen nachgewiesen werden kann [195 - 198]. Auch bei der hepatozellulären Karzinogenese, der Genese des Prostatakarzinoms und der chronisch lymphatischen B-Zellen-Leukämie (B-CLL) wurde bereits über eine genomweite Hypomethylierung berichtet [199 - 201]. Maligne Zellen können gegenüber der normalen Zelle bis 60 % weniger 5-Methylcytosin enthalten [202, 203]. Es wird vermutet, daß die Hypomethylierung neben codierenden Regionen (z.B. bei Onkogenen) und Introns auch zentro-

merische DNA-Sequenzen betrifft, was mit chromosomaler Instabilität verbunden ist, ein typisches Merkmal von Tumorzellen [162, 164, 204, 205]. Eine verringerte Methylierung kann in einer malignen Zell-DNA auch zur Reaktivierung intragenomischer, fremder DNA und dann letztlich zu einer Störung normaler zellulärer Gene führen [162, 164]. *Gama-Sosa et al.* haben schon früh beschrieben, daß der Methylierungsgrad schrittweise während des Prozesses der malignen Transformation und nachfolgender Metastasierung in verschiedenen Tumortypen abnimmt [206]. Dieser tendenzielle Verlauf der progressiven Hypomethylierung mit steigendem Grad der Malignität konnte in späteren Untersuchungen z.B. für Ovarial-, Zervix- und Mammakarzinome (Eierstock-, Gebärmutterhals- und Brustkrebs) bestätigt werden [207 - 209]. Zusätzlich hat eine Studie von *Soares et al.* an 136 Brustkrebspatienten eine signifikante Korrelation zwischen dem Ausmaß der Hypomethylierung und dem Krankheitsstadium, der Tumorgroße sowie der Histopathologie ergeben [210]. Die Hypomethylierung könnte daher als biologischer Marker mit prognostischem Wert fungieren [211].

Eine stadiumspezifische Abnahme des Methylierungsgrades tritt allerdings nicht in jeder Krebserkrankung auf. So ergab eine Studie an Leukämie-Patienten mit B-CLL eine Korrelation zwischen dem Methylierungsgrad und der Schwere der Krebserkrankung. Dabei wurde beobachtet, daß Patienten mit einer B-CLL-Erkrankung mit steigendem Gehalt an 5-Methylcytosin eine schlechtere Prognose haben [212].

Für unterschiedliche Krebsarten, einschließlich verschiedener Formen von Leukämie, wurden neben Veränderungen im Methylierungsmuster auch Überexpressionen von Methyltransferasen und erhöhte Enzymaktivitäten festgestellt [213 - 218]. Trotz des erhöhten Gehaltes an Methyltransferasen trat z.B. in hepatozellulären Karzinomen eine genomische Hypomethylierung auf [199]. Diese auf den ersten Blick widersprüchlichen Beobachtungen erklären die Autoren damit, daß die Überexpression der Methyltransferasen im Krebs eine Konsequenz der schnellen Zellproliferation ist.

Die verschiedenen Einflüsse und Auswirkungen der DNA-Methylierung verdeutlichen die Komplexität dieser epigenetischen Modifikation. Die angesprochenen Variationen in der Methylierung stellen aber potentielle, sensitive molekulare Marker zur Risikoklassifizierung dar, die eine Krebsprognose unterstützen können [192].

2.4.2 Nachweismethoden für die DNA-Methylierung

Eine Vielzahl von Methoden wurde entwickelt, um die DNA-Methylierung genspezifisch oder genomweit zu bestimmen. Um den Methylierungsstatus positionsspezifisch zu erfassen,

werden häufig Techniken wie die spezifische Restriktionsanalyse mit Modifikations-sensitiven Restriktionsendonukleasen (MSRE) in Kombination mit Southern-Blotting [219], verschiedene Basenmodifizierungen entweder mit Bisulfit, Hydrazin oder Permanganat gefolgt von einer DNA Sequenzanalyse [220 - 224] sowie eine methylierungsspezifische PCR (MSP) [225] eingesetzt. Diese Methoden werden überwiegend für eine qualitative Methylierungsanalyse einer Gen-Promotorregion [226], selten aber für eine quantitative Bestimmung verwendet [227]. Quantitative Informationen über eine genspezifische Methylierung können durch Methoden wie z.B. die Bisulfit-Restriktionsanalyse (bisulfite-PCR) [228, 229], die „methylation-sensitive single-nucleotide primer extension“ (Ms-SNuPE) [230] oder eine „solid-phase quantitative primer extension“ [231] erhalten werden. Es werden auch Fluoreszenz basierende Echtzeit PCR (MethyLight) [232], „fluorescent PCR single-strand conformation polymorphism“ (SSCP) Analysen [233, 234] und der von *Yamamoto et al.* entwickelte Methylierungsassay durch Nukleotidintegration [235] verwendet. Daneben gibt es noch einige Methoden, die die MSP, die Bisulfit-PCR-Technik oder die Bisulfit-Modifikation mit anderen Techniken für eine qualitative und quantitative Analyse der genspezifischen Methylierung kombinieren [227, 236 - 240].

Zur Bestimmung des genomweiten Methylierungsgrades werden vielfach Methoden wie HPLC-UV [241 - 245], CE-UV [246] oder LC/ESI-MS [247] eingesetzt. Ebenso finden chemische oder enzymatische Verfahren wie die Chloracetaldehyd-Reaktion [248], der Methylakzeptor-Assay (SssI assay) [249] und die immunochemische Analyse [250] Verwendung. Die Methoden zur Quantifizierung des globalen 5-Methylcytosingehaltes benötigen DNA Mengen von etwa 1 - 10 µg. Jede Methode hat ihre Vor- und Nachteile, auf die in dieser Arbeit nicht näher eingegangen wird. Wesentlich dabei ist, daß eine einzelne Methode allein zumeist nicht in der Lage ist, allen individuellen Fragestellungen zu entsprechen. Hervorragende Übersichten über die verschiedenen Methoden zur Bestimmung der DNA Methylierung wurden von *Rein et al.* [171], *Oakeley* [251], *Fraga et al.* [252] und *Dahl et al.* [253] publiziert.

Aufgrund der Bedeutung der DNA-Methylierung und der DNA-Adduktbildung im Prozeß der Kanzerogenese ist die weitere Entwicklung von Analysemethoden, die eine simultane Detektion dieser DNA-Modifikationen in einem Analysenlauf ermöglichen, sehr sinnvoll. Die von *Schmitz et al.* [212, 254 - 257] entwickelte kapillarelektrophoretische Analysemethode mit Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion (CE-LIF) entspricht diesen Anforderungen.

2.5 Kapillarelektrophorese

Während der letzten zwei Jahrzehnte hat sich die Kapillarelektrophorese (CE) zu einer leistungsfähigen analytischen Methode entwickelt [258]. Aufgrund ihrer vielfältigen Ausführungstechniken (Kapillarzonenelektrophorese [259 - 262], micellare elektrokinetische Chromatographie [263, 264], Kapillarelektrochromatographie [265], Kapillargelelektrophorese [266 - 268], kapillar-isoelektrische Fokussierung [269 - 271], Mikroemulsion elektrokinetische Chromatographie [272 - 276] etc.) stellt sie in vielen Bereichen eine sehr gute Alternative zu chromatographischen Methoden dar. Sie hat sich in der Umweltanalytik (anorganische Ionen, organische Säuren), bei der Analyse biochemischer Makromoleküle (DNA-Sequenzierung, Oligonukleotide, PCR-Fragmente, Proteine) und in der pharmazeutischen Industrie (Trennung chiraler Moleküle) bewährt. Darüber hinaus wird sie auch in analytischen Labors der chemischen Großindustrie angewendet. Die CE ist kompatibel mit einer großen Anzahl an Detektionsmethoden, wie Absorption, Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion (LIF), Massenspektrometrie, Chemilumineszenz, Voltammetrie etc. [258, 277].

Ein sehr wichtiger Anwendungsbereich für die Kapillarelektrophorese ist die DNA- und Protein-Analytik, da die CE gegenüber der klassischen Flachbettgelelektrophorese deutliche Vorteile bietet. Aufgrund des kleinen Innendurchmessers (ID) der Kapillaren ist die Joule'sche Wärme geringer und die auftretenden Temperaturgradienten sind bei entsprechender Kühlung zu vernachlässigen [258]. Die effektive Ableitung der Joule'schen Wärme erlaubt die Verwendung wesentlich stärkerer elektrischer Feldstärken (typischerweise bis zu etwa 400 V/cm) und folglich kurzer Analysenzeiten. Die geringe Diffusion und Konvektion führt dabei zu sehr hohen Effizienzen [258, 278 - 281].

Nach der Methode von *Schmitz et al.* [212, 254 - 257] ist zur Analyse von DNA-Addukten mittels CE-LIF eine Hydrolyse der DNA in die einzelnen Mononukleotide sowie die anschließende Derivatisierung mit einem geeigneten Fluoreszenzmarker erforderlich (Abbildung 2-5). Die DNA wird dabei enzymatisch zu modifizierten und unmodifizierten 2'-Desoxynukleosid-3'-monophosphaten hydrolysiert und anschließend über eine 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid (EDC)-vermittelte Phosphoramidatkupplung mit 4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-propionyl-ethylendiamin-hydrochlorid (BODIPY) fluoreszenzmarkiert. Dabei wird durch intramolekulare Protonierung das EDC in eine aktive Form überführt, die den nukleophilen Angriff der primären Aminogruppe des Fluoreszenzmarkers an die Phosphatgruppe des Nukleotids ermöglicht [282, 283].

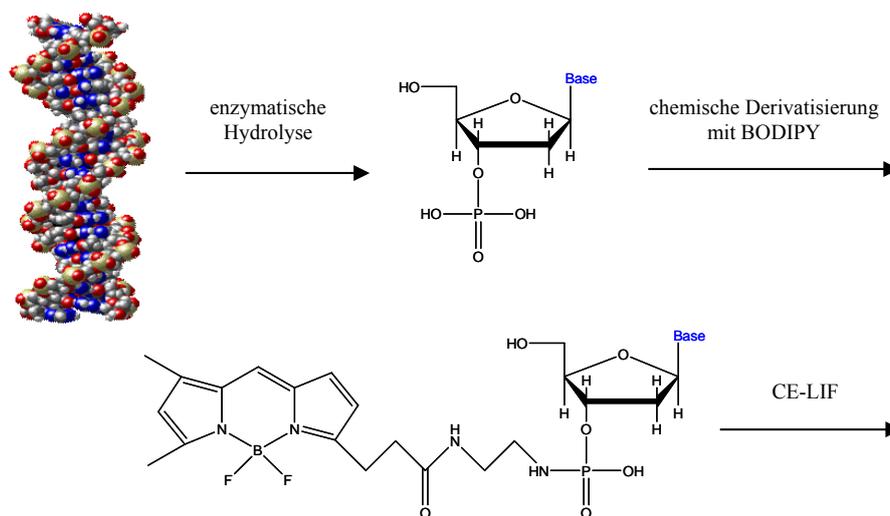


Abbildung 2-5: Schematische Darstellung des verwendeten Verfahrens zur DNA-Adduktanalytik mittels CE-LIF

Wörth hat gezeigt, daß für die Derivatisierung von Mononucleotiden mit diesem Fluoreszenzmarker der pH-Wert essentiell ist [157]. Daneben haben auch Konzentration, Reaktions-temperatur und Reaktionsdauer Einfluß auf die resultierenden Ausbeuten [26, 157, 158].

2.5.1 Die LIF-Detektion in der Kapillarelektrophorese

Die Laser-induzierte Fluoreszenz ist eine der empfindlichsten Detektionsmethoden in der CE [277, 284]. Im Gegensatz zur UV-Detektion, die bei gut absorbierenden Verbindungen Nachweisgrenzen (NWGs) im mikromolaren Bereich liefert [285, 286], ist die LIF-Detektion in der Kapillarelektrophorese mehr als 100000-mal empfindlicher [287]. Aufgrund der Vielzahl verfügbarer Fluoreszenzmarker, die im sichtbaren Bereich angeregt werden können, werden bei den meisten LIF-Detektionen Laser in diesem Spektralbereich verwendet. Zudem liefern sie die beste Nachweisgrenze in der CE [284]. Darüber hinaus ist der rote bis hin zum nahen infraroten Bereich für eine LIF-Detektion interessant, weil dort einerseits preiswerte und leistungsfähige Dioden-Laser eingesetzt werden können und andererseits in diesem Spektralbereich wenig Probleme mit Fluoreszenzinterferenzen bestehen [286]. Des weiteren sind dort die Intensitäten der Rayleigh- und Raman-Streuung, die über den Kehrwert zur vierten Potenz mit der Wellenlänge verknüpft sind [286, 288, 289], gering, und ein Ausbleicheffekt bei Analyten ist gewöhnlich vernachlässigbar [286]. Mank und Yeung nutzten eine Dioden-LIF-Detektion für die Analyse von fluoreszenzgelabelten Aminosäuren und erreichten eine

Nachweisgrenze für Glycin von 10^{-10} M [290]. Eine weitere interessante LIF-Detektionstechnik, die in Verbindung mit CE bereits angewendet wurde, ist die Multiphotonen-Anregungs-LIF (CE-MPE) [291]. Damit gelang der Arbeitsgruppe von *Shear* [291] die Analyse verschiedener nativer biologischer Fluorophore mit Nachweisgrenzen von z.B. 350 zmol (38 nM) für das Flavinadenindinukleotid (FAD) in einer Kapillare mit einem Innendurchmesser (ID) von 5 μm [286, 291]. Der hervorragenden Sensitivität der LIF-Detektion steht allerdings das begrenzte Identifikationspotential gegenüber. Fluoreszenzspektren flüssiger Proben sind in der Regel wenig aussagekräftig und enthalten kaum Strukturinformationen. Unter bestimmten Bedingungen ist es allerdings möglich, hochauflösende Fluoreszenzspektren aufzunehmen, die detaillierte Schwingungsstrukturen bei sehr niedrigen Analytkonzentrationen zeigen. Eine derartige Technik stellt z.B. die FLN (fluorescence line-narrowing) Spektroskopie dar, die prinzipiell die Sensitivität der Fluoreszenzdetektion mit der Selektivität der Schwingungsspektroskopie verknüpft [286]. Diese Technik wurde in Kombination mit der Kapillarelektrophorese bereits zur Identifikation von DNA-Addukten aus PAKs eingesetzt [292].

Eine Reihe von Weiterentwicklungen in der CE-LIF-Detektion diente der Verbesserung der Empfindlichkeit. Dabei wurde versucht, durch Entwicklung und Einsatz verschiedener Techniken das Detektionslimit durch Unterdrückung von Streulichteffekten zu verbessern [277]. Streulichtprozesse laufen kontinuierlich ohne zeitliche Verzögerung ab, wohingegen die Fluoreszenz zeitlich verzögert, innerhalb von etwa 10^{-8} s nach der Photonenabsorption, stattfindet. Dieser Unterschied läßt sich in der zeitaufgelösten Fluoreszenzdetektion ausnutzen. Wird mit einem gepulsten Laser eine Fluoreszenz angeregt, so kann in der Zeit, in der der Laser ausgeschaltet ist, eine Abklingkurve der Fluoreszenz aufgezeichnet werden. In dieser Zeitspanne tritt dann kein Streulicht in Erscheinung. Dadurch kann das Fluoreszenzsignal auf sehr elegante Weise separiert werden. Der Einsatz dieser Technik in der Kapillarelektrophorese ist von verschiedenen Arbeitsgruppen für unterschiedliche Analyten bereits demonstriert worden [293 - 297]. Dabei wurden von *Song et al.* für verschiedene Fluoreszenzmarker bei 655 nm und mit einer durchschnittlichen Laserleistung von 21 μW Nachweisgrenzen (NWGs) von $2 \cdot 10^{-7}$ M bis $2,8 \cdot 10^{-6}$ M erreicht [295]. Bei der Analyse von 4-Methoxy- β -naphthylamin präsentierte *Miller et al.* eine NWG von 10^{-9} M bei 349 nm, allerdings unter dem Aspekt, daß der verwendete Fluoreszenzmarker einen geringen molaren Absorptionskoeffizienten aufwies (ca. Faktor 80 weniger als der von Fluorescein am entsprechenden Absorptionsmaximum) [294]. *Soper et al.* konnten mittels CZE und zeitaufgelöster Fluoreszenzdetektion Strahlungsdauern einiger Fluoreszenzmarker im nahen Infrarotbereich (790 nm) bei Konzen-

trationen von 0,4 pM bzw. 4,0 pM bestimmen. Die zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung kann auch verwendet werden, um verschiedene Fluoreszenzmarker aufgrund ihrer unterschiedlichen, charakteristischen Lebensdauern zu detektieren. So beschrieben *Müller et al.* bei zeitaufgelöster Fluoreszenzdetektion eine DNA-Sequenzierungsstrategie mit vier verschiedenen Fluoreszenzmarkern [298].

Eine Verbesserung der Sensitivität für eine on-column LIF-Detektion kann auch durch die Epifluoreszenzmikroskopie erreicht werden [299]. Dort liegen Anregungsstrahlung und Emissionsstrahlung in einer Ebene (epi = echo planar imaging) [300]. Das Laserlicht wird mit einem Objektiv auf die Kapillare fokussiert, und die inkohärent erzeugten Fluoreszenzphotonen werden durch dasselbe Objektiv gesammelt und auf den Detektor abgebildet [299, 301]. Dabei können Objektive mit hoher numerischer Apertur und hoher Vergrößerung eingesetzt werden, wodurch sich eine hohe Sammeleffizienz für die emittierten Fluoreszenzphotonen bei gleichzeitig reduziertem Streulichtanteil ergibt [302]. Mit Hilfe der Epifluoreszenzmikroskopie konnte nach Aussage von *Hernandez et al.* bereits die Sensitivität einer on-column LIF-Detektion von gelabelten Aminosäuren um drei Größenordnungen verbessert werden [299]. Die Autoren geben dabei in ihrer Arbeit ein Detektionslimit für Fluoresceinthiocarbamyl-Arginin von $3,75 \cdot 10^{-12}$ M an, demonstrierten jedoch lediglich den Nachweis von $21 \cdot 10^{-12}$ M.

Eine spezielle Art der Epifluoreszenzmikroskopie stellt die konfokale Fluoreszenzmikroskopie dar. Letztere unterscheidet sich von der erstgenannten Technik im Wesentlichen dadurch, daß im Emissionslichtpfad ein sogenanntes Pinhole (Lochblende) angebracht ist, welches verhindert, daß Licht außerhalb der Fokalebene (Brennebene des Objektivs) auf den Detektor fällt [301, 303]. Das bedeutet aber, daß von dem gesamten vom Laser durchstrahlten und zur Fluoreszenz angeregten Volumen, nur ein kleiner Bruchteil der Fluoreszenz genutzt wird [303]. Somit ist die Fluoreszenzlichtausbeute bei der konfokalen Mikroskopie geringer als bei der Epifluoreszenzmikroskopie. Gleichzeitig ist aber auch die Sensibilität gegenüber Streulicht reduziert. Zudem zeichnet sich die konfokale Mikroskopie aufgrund ihrer hohen Abbildungsschärfe durch eine hervorragende Auflösung aus. In Verbindung mit der Laserscanningmikroskopie (LSM), bei der das Objekt entweder durch rasterartige Bewegungen des Laserstrahls oder des Objektes selbst punktweise vermessen wird, bietet sich diese Technik z.B. für Kapillararray-Systeme (CAE) an.

2.5.2 Fluoreszenzdetektion in CAE-Systemen

Kapillararray-Systeme (CAE) bieten den Vorteil eines hohen Probendurchsatzes, da in einem einzigen Analysenlauf entsprechend der Anzahl an Kapillaren mehrere Proben analysiert werden können. Die simultane Erfassung der Analyten in mehreren Kapillaren stellt jedoch auch spezifische Anforderungen an die Detektionstechnik. Es gibt unterschiedliche Detektionsverfahren, die von verschiedenen Arbeitsgruppen in Verbindung mit CAE-Systemen eingesetzt wurden [258, 278, 304 - 322]. Alle bestehen prinzipiell aus den Einheiten Laser-einkopplung, Lichtkollektion, Wellenlängenseparation und Detektion, für die es unterschiedliche technische Optionen der Ausführung gibt [258]. Die verschiedenen Detektionsanordnungen unterscheiden sich dann letztlich in der Art, wie die einzelnen Möglichkeiten miteinander kombiniert werden [258]. Prinzipiell lassen sich die Detektionsanordnungen in zwei Kategorien einteilen:

- statische Anordnung, in der alle Kapillaren parallel detektiert werden [258, 312 - 322]
- bewegliche Anordnung, bei der die Kapillaren sequentiell detektiert werden [278, 304 - 311]

Für eine statische Anordnung wurden verschiedene Varianten der Einkopplung des Laserstrahls in die Kapillaren entwickelt (Abbildung 2-6), z.B. axiale Einkopplung [315, 321], seitliche Einkopplung [314, 316 - 320, 322], linienfokussierte Einkopplung mittels Linsenvorsatz [258, 313] und Einkopplung mit Hilfe von Faseroptik-Arrays [312]. Einfachheit, Robustheit, Zuverlässigkeit und der konstruktionsbedingte Verzicht auf bewegliche Komponenten zeichnen die statischen Systeme aus. Begrenzungen liegen allerdings z.B. bei linienfokussierten Systemen darin, daß die Laserleistung mit zunehmender Anzahl an Kapillaren erhöht werden muß, da der Laserstrahl linienförmig über den Kapillaren aufgeweitet wird [323]. Bei Verwendung einer Zylinderlinse besteht zusätzlich das Problem, daß die Linse ein gaußförmiges Intensitätsprofil des Laserstrahls erzeugt, wodurch die äußeren Kapillaren des Arrays in der auftreffenden Lichtmenge diskriminiert werden [258]. Eine Lösung dafür bietet der Einsatz eines speziellen Liniengenerators, der auf dem Prinzip einer Powell-Linse beruht [258]. Bei einer seitlichen Einkopplung wird die Fluoreszenz in allen Kapillaren durch einen schmal fokussierten Laserstrahl angeregt, so daß die Laserleistung unabhängig von der Anzahl der Kapillaren im Array ist [323]. Die Kapillaren selbst werden dabei praktisch als optische Lichtleiter verwendet. Steigt die Anzahl der Kapillaren, wird es jedoch bei der seitlichen Einkopplungsgeometrie aufgrund von Reflexion immer schwieriger, einen schmalen, stabilen

Fokus aufrecht zu erhalten. Dadurch ist die Anzahl der Kapillaren limitiert [258, 310, 323]. Zur Reduzierung von Refraktion und Reflexion können die Kapillaren in Wasser eingebettet werden, um starke Brechungsindexunterschiede auszugleichen [317, 320]. Eine weitere Reduzierung von Reflexion gelangen *Lu* und *Yeung* durch Verwendung kubischer Kapillaren und Immersionsöl [316]. Die Kollektion der emittierten Fluoreszenz kann mit einer Faseroptik [312] oder mit hoch aperturigen Optiken (Linsen oder Objektive) [313 - 317, 319 - 322] erfolgen. Als Detektoren für die Systeme mit statischer Anordnung werden zumeist Flächendetektoren, z.B. CCDs (charge coupled device) [258, 312, 313, 315 - 321], CIDs (charge injection device) [322] oder CMOS (coupled metal oxidated semiconductor) [314] eingesetzt. Diese ermöglichen einerseits aufgrund ihrer räumlichen Auflösung eine parallele Detektion mehrerer Kapillaren und andererseits aufgrund ihrer spektralen Auflösung in Verbindung mit einem lichtdispersiven Element (Gitter, Prisma, Filter) eine Wellenlängenseparation [258, 302]. Bei der beweglichen Anordnung, bei der die Kapillaren in bestimmten Zeitintervallen angestrahlt und separat detektiert werden, wird meist eine konfokale Laserscanning-Geometrie eingesetzt [278, 304 - 311]. Sie bietet den Vorteil der hohen Sensitivität aufgrund der hervorragenden räumlichen Trennung von Anregungs- und Emissionswellenlänge und somit einer einfachen Minimierung von Streulicht [258, 299, 310, 323]. Dabei erfolgt entweder eine Translation des Laserstrahls über die Kapillaren oder die Kapillaren werden z.B. mit Hilfe

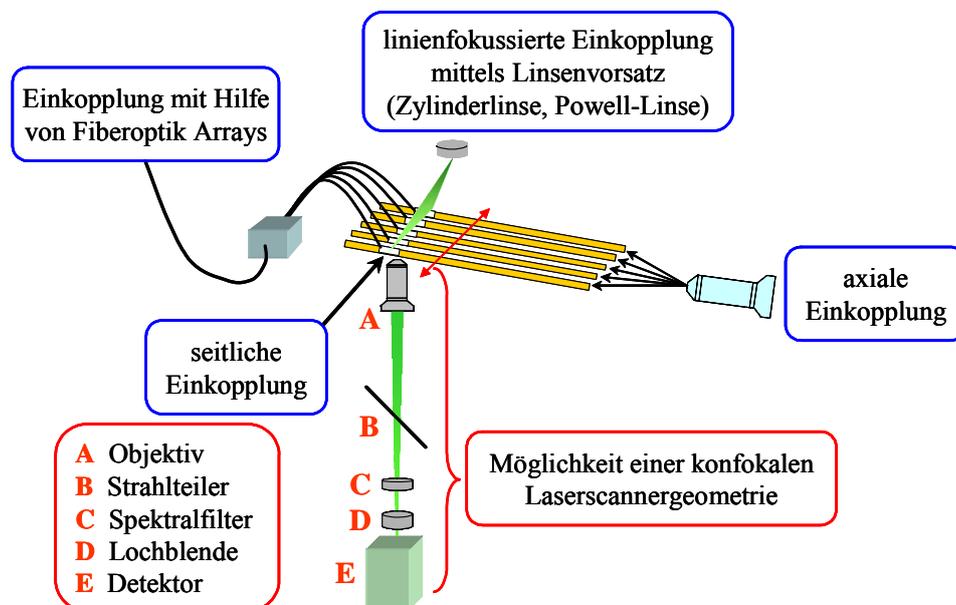


Abbildung 2-6: Schematische Darstellung der Einkopplungsmöglichkeiten bei statischer Anordnung (blau eingrahmt) und ein Beispiel für eine bewegliche Anordnung (rot eingrahmt)

von motorbetriebenen Scantischen bidirektional bewegt [278, 305 - 307]. Die Translation des Laserstrahls kann durch mechanische Bewegung des Objektivs [304], durch motorbetriebene, rotierende Laserscanner [308, 309] oder durch Einsatz von Galvanometer-Scannern [310, 311] erfolgen. Im Vergleich zu statischen Anordnungen haben Scanning-Systeme neben einer höheren mechanischen Beanspruchung noch eine wesentliche Einschränkung: die Fluoreszenzlichtausbeute, die pro Zeiteinheit bei einer Kapillare detektiert wird (sog. „duty cycle“) [310], sinkt im Allgemeinen proportional mit der Anzahl der Kapillaren im Array [258, 323]. Der duty cycle wird maßgeblich durch die Scangeschwindigkeit und die effektive Zeit der Lichtkollektion pro Kapillare bestimmt [310]. Neben der Geschwindigkeit spielt auch die räumliche Präzision der Anregung eine entscheidende Rolle für die Effektivität und Sensitivität eines Scanning-Systems. Bei den meisten Techniken, in denen eine bidirektionale Bewegung der Kapillaren oder des Objektivs erfolgt, wird der duty cycle durch die Geschwindigkeit der motorbetriebenen Einheit limitiert [307, 310]. Mit der Entwicklung eines kontinuierlichen Radial-Scanners zeigten *Kheterpal et al.* [306] eine Verbesserung der Geschwindigkeit und der Genauigkeit eines konfokalen Scanning-Systems. Zudem ermöglicht die Verwendung eines solchen rotierenden konfokalen Laserscanners eine parallele DNA-Sequenzierung in bis zu 1000 Kapillaren [308]. Eine höhere Scangeschwindigkeit kann auch durch Einsatz eines Galvanometer-Scanners [310, 311] erreicht werden. *Neumann et al.* [307] demonstrierten eine Verbesserung des duty cycle bei Kapillaren-Translationssystemen durch Anwendung eines diskontinuierlichen bidirektionalen Scanmodus, wodurch die Zeit der Lichtkollektion verlängert werden konnte. Mit gleichzeitiger Applikation einer zeitaufgelösten Fluoreszenzdetektion, bei der Streulichte effekte (ausgehend von den Kapillarwänden) weitgehend vermieden werden konnten, gelang den Autoren der Einzelmolekülnachweis. Sie untersuchten dazu verschiedene Fluoreszenzmarker im roten Spektralbereich (631 - 666 nm) mit Konzentrationen bis zu 10^{-9} M [307]. Die Detektionslimits für den Einzelmolekülnachweis wurden unter Berücksichtigung des Detektionsvolumens von ~ 500 fL berechnet [307]. Generell ist zu berücksichtigen, daß bei einigen Einzelmoleküldetektionen, über die in der Literatur berichtet werden, relativ hohe Probenkonzentrationen verwendet wurden, allerdings mit außerordentlich geringen Detektionsvolumina [324]. Die geringen Detektionsvolumina (z.B. 1 pL oder weniger) sind nützlich zur Minimierung des Hintergrundes, weil das Fluoreszenzsignal eines Moleküls unabhängig vom Nachweisvolumen und die Hintergrundemission proportional zu diesem Volumen ist [325].

Als Detektoren werden für die Laserscanning-Systeme meist Punktdetektoren, z.B. Photomultiplier [278, 304 - 306, 308 - 311] oder Avalanche-Photodioden [307] verwendet.

2.5.3 LIF-Detektoren in der CE

Die Detektoren in der Kapillarelektrophorese müssen prinzipiell auf die kleinen Säulendimensionen und die sehr geringen Peakbreiten angepaßt sein. Als Detektoren für den Fluoreszenznachweis bieten sich, wie in Kapitel 2.5.2 bereits erwähnt, sowohl Punktdetektoren (z.B. Photomultiplier) als auch flächige Detektoren (CCD-Kameras, CMOS-Sensoren, CID-Sensoren) an. Im Folgenden werden das Detektionsprinzip und die Charakteristika einer CCD-Kamera näher beschrieben.

2.5.3.1 CCD-Kamera

Das von *Boyle* und *Smith* [326] entwickelte CCD (charge coupled device) beruht auf dem Prinzip der Lichtdetektion mit Halbleitern. Der wichtigste Teil der Kamera ist der CCD-Chip, der auch als CCD-Sensor bezeichnet wird und aus einer großen Anzahl zweidimensional angeordneter Zellen (Pixel) besteht [327]. Die Anzahl dieser Pixel bestimmt das Auflösungsvermögen der Kamera. Grundsätzlich existieren auf einem CCD-Chip lichtempfindliche Bereiche, die sogenannten Bild- oder Belichtungsbereiche und lichtunempfindliche (abgedunkelte) Bereiche, die sogenannten Speicherbereiche. Bei der Belichtung des Chips werden auf der lichtempfindlichen Sensorfläche die Photonen in Elektronen umgewandelt und dann sehr schnell in einen abgedunkelten Speicherbereich verschoben. Zum Auslesen des Chips werden die gespeicherten Ladungspakete nach der Belichtung Pixel für Pixel (vertikal) über eine Ladungsverschiebung in ein sogenanntes Ausleseregister transportiert. Von dort aus werden sie seriell (horizontal) an einen AD-Wandler gesendet und digitalisiert (Abbildung 2-7) [300, 328, 329]. In der Art der Anordnung der Belichtungs- und Speicherbereiche werden verschiedene CCD-Sensoren unterschieden [300, 329]. Besonders erwähnt werden soll an dieser Stelle lediglich der Frame-Transfer-Sensor, bei dem der Belichtungs- und Speicherbereich in zwei großen Blöcken angeordnet ist.

Während das Bild aus dem Speicherbereich über das Ausleseregister ausgelesen wird, kann das nächste Bild aufgenommen werden. Somit kann ein Frame-Transfer-Chip kontinuierlich mit einer hohen Bildrate betrieben werden [328]. Vorteile dieser Anordnung sind die hohe Pixeldichte aufgrund der separierten Sensorfläche und daraus folgend ein sehr gutes Auflösungsvermögen und hohe Empfindlichkeit [300, 330]. Ein Nachteil dieser Anordnung ist, daß

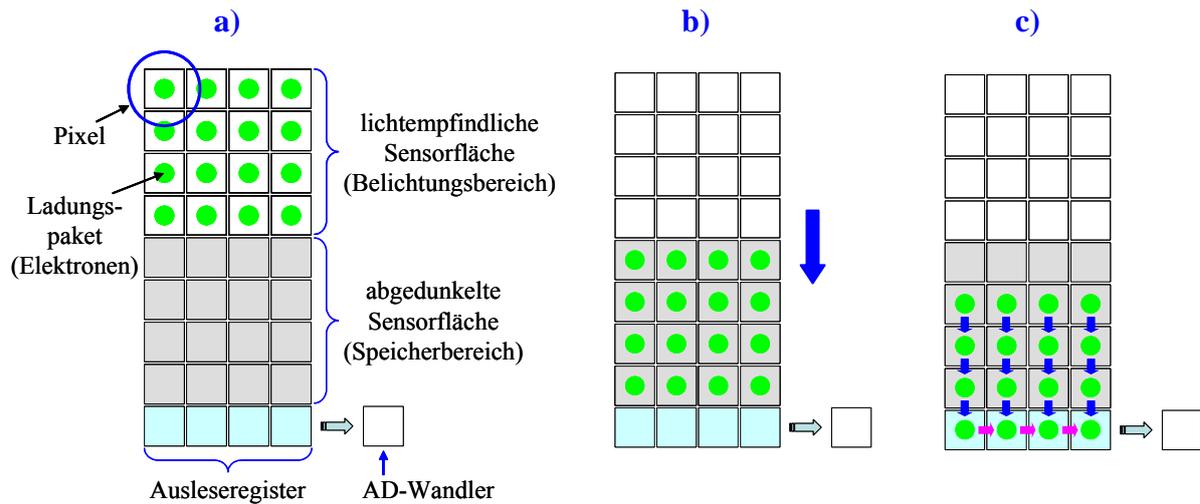


Abbildung 2-7: Schematische Darstellung des Prinzips eines CCD-Chips. Die Pfeile sollen den Ladungstransfer der Pixel darstellen. **a)** Belichtungsphase des Chips; **b)** Vertikaler Transfer in den Speicherbereich, der durch eine Maske vor Lichteinfall geschützt ist; **c)** Auslesen des Speicherbereiches durch vertikalen, parallelen Transfer der Ladungspakete in das Ausleseregister (blaue Pfeile) und serielles Auslesen des Registers durch horizontales Verschieben (rote Pfeile) in einen AD-Wandler.

die Ladungsverschiebung in den Speicherbereich wesentlich länger dauert als bei anderen Transfer-Chips, die keine blockweise Trennung zwischen Belichtungs- und Speicherbereich aufweisen (z.B. Interline-Transfer-Chips). Daraus folgt, daß die Sensorfläche bei kontinuierlicher Beleuchtung extern „geschuttert“ werden muß, wenn die Frametransferzeit einen merklichen Bruchteil der Belichtungszeit erreicht [300].

Die Sensorflächen bestehen aus Halbleiterelementen auf Silizium-Basis [301, 327]. Nur die Zellen der photoaktiven Fläche werden als Pixel bezeichnet, die Zellen des Speicherbereiches stellen lediglich Ladungstöpfe dar [300]. Grundbaustein eines Pixels ist ein sogenannter MOS-Kondensator (metal oxide semiconductor), der als Photodiode und als Ladungsspeicher fungiert (Abbildung 2-8) [327]. Dieser Kondensator besteht aus einem Substrat (z.B. p-dotiertes Silizium), auf welches in geringem Abstand eine hauchdünne, lichtdurchlässige Elektrode (ein Metall bzw. polykristallines Silizium) aufgebracht ist. Dazwischen befindet sich ein ebenfalls lichtdurchlässiger Isolator (z.B. Siliziumdioxid) [301, 327, 331]. Wird an die Elektrode ein positives Potential angelegt, so bildet sich im p-dotierten Substrat eine Potentialsenke, in der sich Elektronen sammeln, die bei Auftreffen von Photonen auf den Kondensator durch den inneren Photoeffekt freigesetzt werden [301, 331, 332].

Der Ladungstransport vom Belichtungsbereich in den Speicherbereich bzw. in das Auslesere-

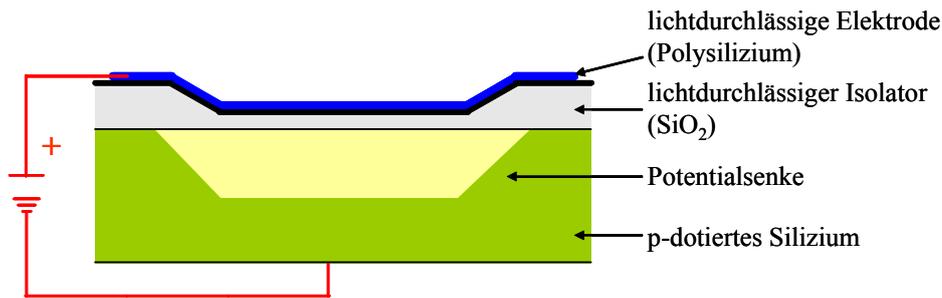


Abbildung 2-8: Schematische Darstellung eines MOS-Kondensators. Aufgrund der Vorspannung des Kondensators bildet sich im p-dotierten Siliziumsubstrat eine Potentialsenke aus. Modifiziert aus *Webers* [331].

gister verläuft prinzipiell durch Verwendung geeigneter Potentiale, durch die entweder eine Ladungsbarriere oder eine Ladungssenke entsteht [330] (Abbildung 2-9).

CCD-Kameras haben große Bedeutung in vielen Anwendungen des Life-science-Bereiches erlangt, in denen die Bilderfassungstechnologie als Detektionsmethode verwendet wird, z.B. im High-Throughput-Screening in der Arzneimittelentwicklung, in der Beobachtung biologischer Prozesse und Reaktionen und der ultrasensitiven Detektion von Biomolekülen bis hin zu

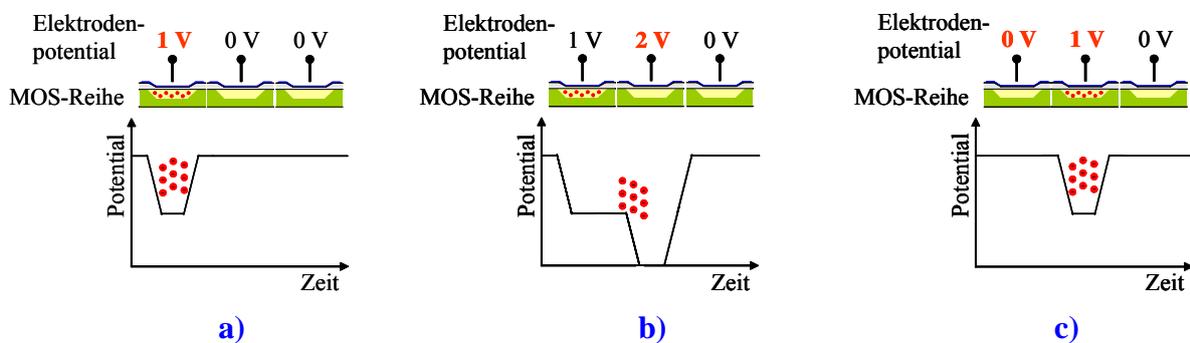


Abbildung 2-9: Schematischer Ablauf des Ladungstransportes. Durch die Veränderung der Spannungsniveaus kann die Ladung von einer Speicherzelle zur nächsten transportiert werden. **a)** Elektronenansammlung in der Potentialsenke eines MOS-Kondensators (innerer Photoeffekt und Vorspannung), **b)** Erniedrigung der Potentialsenke der Nachbarzelle durch Anlegen eines Elektrodenpotentials und Indizierung des Elektronenflusses; **c)** Reduzierung der Elektrodenpotentiale an beiden Zellen und Anhebung der Potentialsenke.

Einzelmolekülnachweisen [333, 334]. Gegenüber einem Photomultiplier (PMT) zeichnet sich eine CCD-Kamera durch verschiedene Eigenschaften aus. Sie besitzt eine wesentlich höhere Quanteneffizienz (QE) [333, 335]. Die QE gibt den prozentualen Anteil der aus den einfallenden Photonen primär gebildeten Elektronen wieder. Während ein PMT eine QE von etwa 15 - 20 % besitzt, beträgt die QE bei einer CCD-Kamera je nach Ausführung etwa 50 bis 90 %.

Anders als bei typischerweise hochverstärkten Photomultipliern ist bei einem hochwertigen, wissenschaftlichen CCD-Sensor das digitalisierte Meßsignal über einen größeren Bereich proportional zur Intensität des einfallenden Lichtes (höhere Linearität). Eine weitere Eigenschaft ist der Dunkelstrom, der aus der thermischen Erzeugung von Elektronen resultiert und die Sensitivität negativ beeinflusst. Er ist in der Regel bei einem Photomultiplier etwas höher, da die potentielle Fläche zur Bildung thermisch angeregter Elektronen größer ist (cm^2 -Bereich beim PMT und mm^2 -Bereich beim CCD-Chip) [300, 336]. Der Dunkelstrom ist von der Temperatur und der Belichtungszeit (Elektronen werden über diesen Zeitraum gesammelt) abhängig [337]. Durch Kühlung des CCD-Chips auf etwa $-60\text{ }^\circ\text{C}$ kann der Dunkelstrom sehr effektiv reduziert werden, so daß er fast vernachlässigt werden kann [300, 301, 327, 333].

Die erwähnten Parameter - Quanteneffizienz, Linearität, Dunkelstrom - zeigen die Vorteile einer CCD-Kamera im Vergleich zu einem Photomultiplier. Dem gegenüber steht die hervorragende Verstärkung eines PMT's mit etwa 10^{13} . Eine Möglichkeit, bei einem CCD-Chip die gebildeten Elektronen zusätzlich zu verstärken, wird z.B. bei einer Electron-Multiplying-CCD-Kamera (EMCCD) genutzt. Eine EMCCD-Kamera enthält im Anschluß an das Ausleseregister noch ein zusätzliches Verstärkungsregister, das die in den Pixeln erzeugten Elektronen vervielfacht, bevor sie durch den AD-Wandler digitalisiert und ausgelesen werden [328]. Der erreichte Verstärkungsfaktor ist im Vergleich zu einem PMT wesentlich geringer, er beträgt je nach Kameratyp maximal 10^6 [300]. Allerdings besitzt eine EMCCD-Kamera effektive Möglichkeiten der Rauschunterdrückung und erzielt mit der schon erwähnten extrem hohen Quanteneffizienz ein hervorragendes Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N).

Das S/N-Verhältnis läßt sich als das Verhältnis der Signalelektronen zu den Rauschelektronen darstellen. Die Anzahl der Signalelektronen ist abhängig von der einfallenden Lichtintensität, der Belichtungszeit, der Pixelfläche und der Quanteneffizienz [329]. Die Anzahl der Rauschelektronen ergibt sich bei einem CCD anhand von drei Rauschquellen [329]. Die erste Quelle ist das sogenannte Photonenrauschen, welches die Schwankung der auf einem Pixel erzeugten Elektronenzahl darstellt [303, 327, 329]. Die Zahl dieser Rauschelektronen folgt der Poisson-Statistik, d.h. werden n Primärelektronen erzeugt, ergibt sich eine Meßunsicherheit von \sqrt{n} Elektronen [300, 301, 303]. Typische Schwankungen auf einem Pixel liegen in der Größenordnung von etwa 1 % [300]. Die zweite Quelle resultiert aus dem Dunkelstrom, der aber bei effektiver Kühlung und kurzen Belichtungszeiten vernachlässigt werden kann. Die dritte Quelle ist das sogenannte Ausleserauschen, was aus Signalfluktuationsen besteht, die durch die Elektronik beim Auslesen entstehen [300, 327, 337]. Es ist ein konstantes, kameraspezifisches Rauschen, das unabhängig von der Belichtungszeit und der Signalintensität ist [303, 337].

Das Ausleserauschen wird mit steigender Auslesegeschwindigkeit größer. Bei einer langsamen Auslesegeschwindigkeit (im kHz Bereich) liegt das Rauschen zwischen 2 - 4 Elektronen pro Pixel, bei höheren Geschwindigkeiten, wie sie in der Praxis üblich sind (z.B. 1 MHz), steigt das Rauschen auf etwa 20 Elektronen pro Pixel an [328, 333, 335]. Bei großen Signalen ist das Ausleserauschen vernachlässigbar, und das S/N-Verhältnis wird dann maßgeblich aus dem Photonenrauschen bestimmt:

$$\frac{S}{N} \approx \frac{S}{\sqrt{S}} = \sqrt{S} \quad [327]$$

Bei kleinen Signalen hingegen ist das Ausleserauschen der dominierende und die Sensitivität begrenzende Faktor. EMCCD-Kameras können jedoch dieses Rauschen selbst bei kleinen Signalen durch ihre Verstärkungstechnik, deren Werte in der Praxis innerhalb eines bestimmten Bereiches einstellbar sind (EMCCD-gain), überwinden [328]. Dabei wird nur das Signal vor dem Auslesen verstärkt, das Ausleserauschen wird nicht mitverstärkt [328].

Die bereits erwähnten CMOS- bzw. CID-Detektoren basieren analog zum CCD-Chip auf dem Prinzip der Lichtdetektion mittels MOS-Dioden. Im Gegensatz zum CCD werden die bei der Belichtung erzeugten Elektronen nicht zu einem einzigen Ausleseverstärker verschoben, sondern jede Sensorzelle hat seinen eigenen Verstärker und wird einzeln adressiert. Die CMOS- und CID-Sensoren können kontinuierlich ausgelesen werden, d.h. sie arbeiten schneller als ein CCD-Sensor, sind aber auch unempfindlicher, da jedes Pixel einem eigenen Ausleserauschen unterliegt [300, 338].

3 Problemstellung und Zielsetzung

Die wachsende Erkenntnis, daß chemischen Kanzerogenen eine bedeutende Rolle für Krebserkrankungen beim Menschen zukommt, hat zur Entwicklung von sogenannten „Human-Biomonitoring“- Methoden geführt. Diese Methoden erlauben die Messung individueller Expositionen gegenüber einem spezifischen Kanzerogen durch die Bestimmung der Substanz selbst, ihrer Metabolite oder ihrer Reaktionsprodukte in Geweben oder in Körperflüssigkeiten.

Kovalente Modifikationen der DNA, DNA-Addukte, die durch reaktive Substanzen exogenen oder endogenen Ursprungs gebildet werden, zählen zu den frühesten Ereignissen in der Krebsentstehung. Fast 90 % der Substanzen, die als kanzerogen eingestuft werden, bilden im Tierversuch DNA-Addukte. Die Analyse endogener und exogener DNA-Addukte ist insofern interessant, als daß die DNA-Addukte molekulare Beziehungen zwischen der Exposition und den Krankheitsendstadien darstellen und daher als frühe Biomarker der Kanzerogenese genutzt werden können.

Eine weitere Modifikation, die DNA-Methylierung, spielt eine ebenso wichtige Rolle in der Tumorgenese. Da das Methylierungsmuster in verschiedenen Organen bei einer hohen interindividuellen Übereinstimmung unterschiedlich ist, wird von einer Bedeutung der Methylierung für die Aufrechterhaltung des jeweiligen Differenzierungsstatus ausgegangen. In Tumorzellen werden einerseits genomweite Hypomethylierung sowie andererseits genspezifische Hypermethylierung gefunden, die z.B. eine Reihe von Tumorsuppressorgenen betrifft. Beide Effekte können zur Ätiologie von Tumoren beitragen.

Um die pathologische Signifikanz der DNA-Methylierung und der DNA-Addukte bei humanen Krankheiten wie Krebs zu ermitteln, sind Analysenmethoden notwendig, die einen hohen Probendurchsatz bei simultaner Detektion verschiedener Adduktclassen gewährleisten. Das von *Schmitz et al.* [257] entwickelte CE-LIF-Verfahren auf der Basis einer enzymatischen DNA-Hydrolyse, einer Fluoreszenzderivatisierung und der micellaren elektrokinetischen Chromatographie stellt aufgrund der hervorragenden Trennleistung der MEKC eine derartige Analysenmethode dar.

Ziel dieser Arbeit war es, diese Methode hinsichtlich der Bestimmung des genomischen Methylierungsgrades zu standardisieren, um eine reproduzierbare Quantifizierung von 5-Methylcytosin in *in vivo*- und *in vitro*-Proben zu ermöglichen. Im Hinblick darauf, daß eine zu analysierende DNA-Menge von 10 µg, wie bei der ursprünglichen Methode beschrieben, aus hu-

manem Tumorgewebe nur selten zur Verfügung steht, sollte die zur Untersuchung des Methylierungsgrades eingesetzte DNA-Menge deutlich reduziert werden. Die weiterentwickelte Methode sollte im Rahmen dieser Arbeit dann zur Untersuchung verschiedener *in vitro*- und *in vivo*-Proben eingesetzt werden. Zudem sollte das Verfahren auf den Nachweis endogener Addukte in Realproben ausgedehnt werden. Die Konstruktion eines Fluoreszenzdetektors, der im Vergleich zu kommerziellen LIF-Detektoren eine größere Empfindlichkeit besitzt, sollte die Bestimmung von endogenen DNA-Addukten in *in vivo*-Proben erleichtern. Die Addukte sollten dabei durch synthetisierte Referenzsubstanzen co-chromatographisch identifiziert werden. Um den Probendurchsatz des neuen Analysensystems zu erhöhen, sollte zudem die parallele Detektion von 3 Analysenläufen realisiert werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Standardisierung der CE-LIF-Methode zur Methylierungsbestimmung

Die Standardisierung der CE-LIF-Methode zur genomweiten DNA-Methylierungsbestimmung sollte eine sichere Quantifizierung von 5-Methylcytosin (5m-dCMP) in jeder Art von Probe (*in vivo* und *in vitro*) bei hohem Probendurchsatz ermöglichen. Die Einführung einer umfangreichen Dokumentation der Probenvorbereitung sowie einer detaillierten Standard-Operating-Procedure (SOP) sollte eine einheitliche Durchführung der Analysenmethode gewährleisten und eine Fehler- und Abweichungsanalyse vereinfachen.

Es wurde ausschließlich mit 2'-Desoxynukleosid-3'-monophosphaten gearbeitet, weshalb sich im Folgenden die vereinfachte Bezeichnung Nukleotide und davon abgeleitete Begriffe automatisch auf diese Formen beziehen. Die aus der Fluoreszenzderivatisierung erhaltenen 2'-Desoxynukleosid-3'-monophosphat-BODIPY-Konjugate werden von nun an vereinfacht als Nukleotidkonjugate bezeichnet. Zur besseren Übersicht werden in den dargestellten Elektropherogrammen die Signale der Nukleotidkonjugate mit dNMP (dAMP, dGMP, dTMP, dCMP und 5m-dCMP) beschriftet.

4.1.1 Optimierung der Probenvorbereitung für 1 µg und 100 ng DNA

Zur Bestimmung des genomweiten Methylierungsgrades in DNA-Proben ist eine Probenvorbereitung bestehend aus einer enzymatischen DNA-Hydrolyse und einer Fluoreszenzderivatisierung erforderlich. Beide Reaktionen verlaufen in wässriger, N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES) - gepufferter Lösung in bestimmten Konzentrationen und bei definierten pH-Werten.

Die bei Biopsien oder nach chirurgischen Eingriffen erhaltenen tumorösen Gewebemengen sind oftmals sehr klein und inhomogen, so daß eine zu analysierende DNA-Menge von 10 µg, wie bei der ursprünglichen Methode beschrieben [158, 254, 257], nur selten zur Verfügung steht.

Aus meiner Diplomarbeit [158], in der verschiedene Optimierungen bezüglich der Probenvorbereitung durchgeführt wurden, ist ersichtlich, daß für die Analyse von Realproben ein 50 mM Derivatisierungspuffer für 10 µg DNA mit einem pH-Wert von etwa 6,4 sehr gut geeignet ist. Daher wurde dieser Puffer für die Bestimmung des Methylierungsgrades auch im Rahmen dieser Arbeit sowohl für *in vivo*- als auch *in vitro*-Untersuchungen eingesetzt.

Eine beträchtliche Reduzierung der DNA-Menge macht aber eine Anpassung der Probenvorbereitung erforderlich. So trat bei der Analyse einer 100 ng Kalbsthymus (CT)-DNA-Probe, die nach der für 10 µg DNA entwickelten Probenvorbereitung (Diplomarbeit [158] und Probenvorbereitungsvorschrift PVV 1, s. experimenteller Teil Kapitel 6.3) präpariert wurde, ein erheblicher Anteil an Nebensignalen auf. Diese Nebensignale zeigten eine den Hauptnukleotidkonjugaten analoge Fluoreszenzintensität und machten eine eindeutige Zuordnung und Quantifizierung der Hauptnukleotide unmöglich [158]. Es bestand der Verdacht, daß unter Beibehaltung der für 10 µg DNA ermittelten Reaktionsbedingungen bei einer deutlich geringeren Nukleotidkonzentration mögliche Konkurrenzreaktionen des im hohen Überschuß zugesetzten Fluoreszenzmarkers mit den in der Lösung vorhandenen Proteinen dominieren und daher ein effektives Labeln verhindern [158]. Das Ziel war es daher, die Hydrolyse- und Derivatisierungsbedingungen für 1 µg und 100 ng DNA hinsichtlich maximaler Reaktionsausbeute, maximaler Signalintensität der Nukleotidkonjugate, bestmöglichem S/N-Verhältnis und minimalen Nebensignalen zu optimieren. Dabei wurden das Reaktionsvolumen, die Konzentrationen des Fluoreszenzmarkers und des Carbodiimids sowie das zur hydrolysierten DNA zugegebene Volumen des HEPES-Puffers variiert (Tabelle 4-1). Die Hydrolysemethode für 10 µg DNA (PVV 1) wurde auf 1 µg DNA übertragen, während für 100 ng DNA die bereits in der Diplomarbeit beschriebene Hydrolysemethode mit einer 5-fach reduzierten Enzymmenge eingesetzt wurde [158]. Die dort beschriebenen Derivatisierungsbedingungen für 100 ng und 200 ng DNA wurden für die abschließende Optimierung als Basis herangezogen. Im Laufe der verschiedenen Arbeiten zur Entwicklung des CE-LIF-Verfahrens [26, 157, 158, 212, 255 - 257] hat sich CT-DNA als geeignete Standard-DNA erwiesen, weshalb sie auch hier bei der Anpassung der Reaktionsbedingungen für 1 µg und 100 ng eingesetzt wurde. Tabelle 4-1 gibt einen Überblick über die wesentlichen Variationen bei der Probenvorbereitung für 1 µg und 100 ng DNA. Zum Vergleich sind die entsprechenden Parameter für die Präparation von 10 µg DNA mit aufgeführt.

Unter den in der Tabelle aufgeführten, fett dargestellten Bedingungen zeigten sich die besten Reaktionsausbeuten und Signalintensitäten der Nukleotidkonjugate bei möglichst minimalen Nebensignalen.

Eine ausführliche Beschreibung der Hydrolyse und Derivatisierung für 10 µg, 1 µg und 100 ng DNA findet sich im Kapitel 6.3 unter PVV 1, PVV 4 bzw. PVV 5.

HEPES-Zusatz zum Hydrolysat [µL]	Reaktions- volumen [µL]	jeweiliges Volumen an BODIPY und EDC [µL]	BODIPY [mM]	EDC [M]
100 ng DNA				
30	60	10	4,5	0,30
16	40	7	4,8	0,32
20	40	5	3,4	0,23
1 µg DNA				
20	70	20	7,7	0,51
30	70	15	5,8	0,39
20	60	15	6,8	0,45
10	50	15	8,1	0,54
16	50	12	6,5	0,43
20	50	10	5,4	0,36
10 µg DNA				
20	90	30	9	0,60

Tabelle 4-1: Angaben zu den verschiedenen Variationen in der Probenvorbereitung (Derivatisierung) für 100 ng, 1 µg und 10 µg DNA. Das Volumen des Hydrolyсата betrug bei allen DNA-Mengen 10 µL. Die fett aufgeführten Werte stellen die optimierten Parameter aus den angegebenen Variationen dar.

Wird eine quantitative Hydrolyse und Derivatisierung vorausgesetzt, beträgt die Stoffmengenkonzentration der Nukleotidkonjugate im optimierten Reaktionsvolumen bei 10 µg DNA (90 µL) 339,9 µM, bei 1 µg DNA (50 µL) 61,2 µM und bei 100 ng DNA (40 µL) nur noch 7,7 µM. Dabei wurde von einer durchschnittlichen molaren Masse einer hydrolysierten DNA mit einem A:T:G:C-Verhältnis von 30:30:20:20 ausgegangen. Abbildung 4-1 zeigt die Elektropherogramme einer 100 ng und einer 1 µg CT-DNA-Probe nach optimierter Probenvorbereitung. In Abbildung 4-2 ist zum Vergleich die Analyse einer 10 µg DNA-Probe dargestellt. Die Variationen in den Migrationszeiten erklären sich durch die unterschiedlichen Zeitpunkte der Analysen dieser Proben. Die Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten in der MEKC ist über einen längeren Zeitraum nicht gegeben.

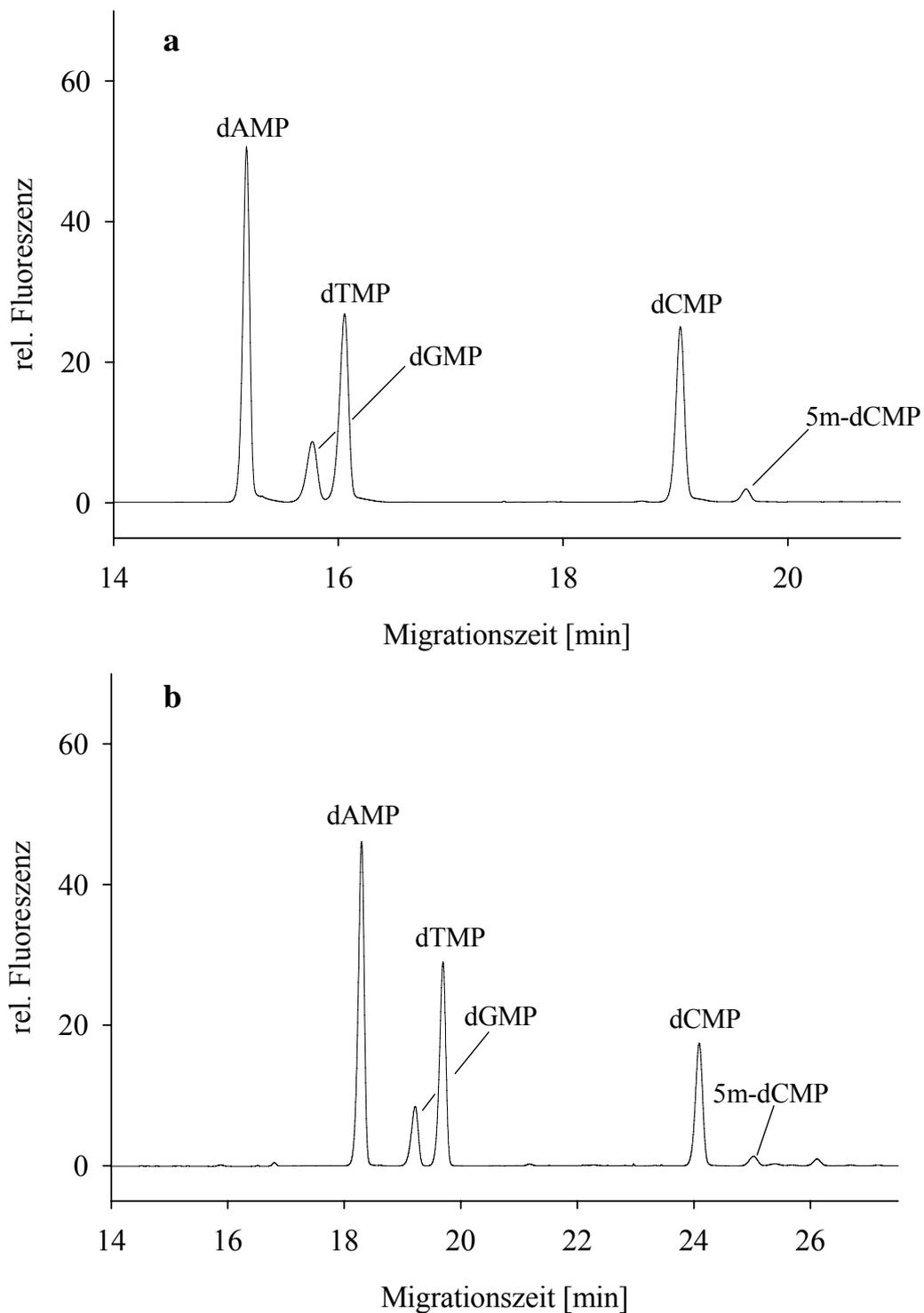


Abbildung 4-1: Elektropherogramme der Analysen (a) einer 1 µg und (b) einer 100 ng CT-DNA; hydrolysiert und derivatisiert nach PVV 4 bzw. PVV 5; die kapillarelektrophoretische Analyse wurde nach Methode I (s. experimenteller Teil Kapitel 6.6.4) durchgeführt. Die injizierte Stoffmenge betrug bei 1 µg DNA 1,62 fmol und bei 100 ng DNA 2,03 fmol unter Berücksichtigung eines Injektionsvolumens von 5,3 nL.

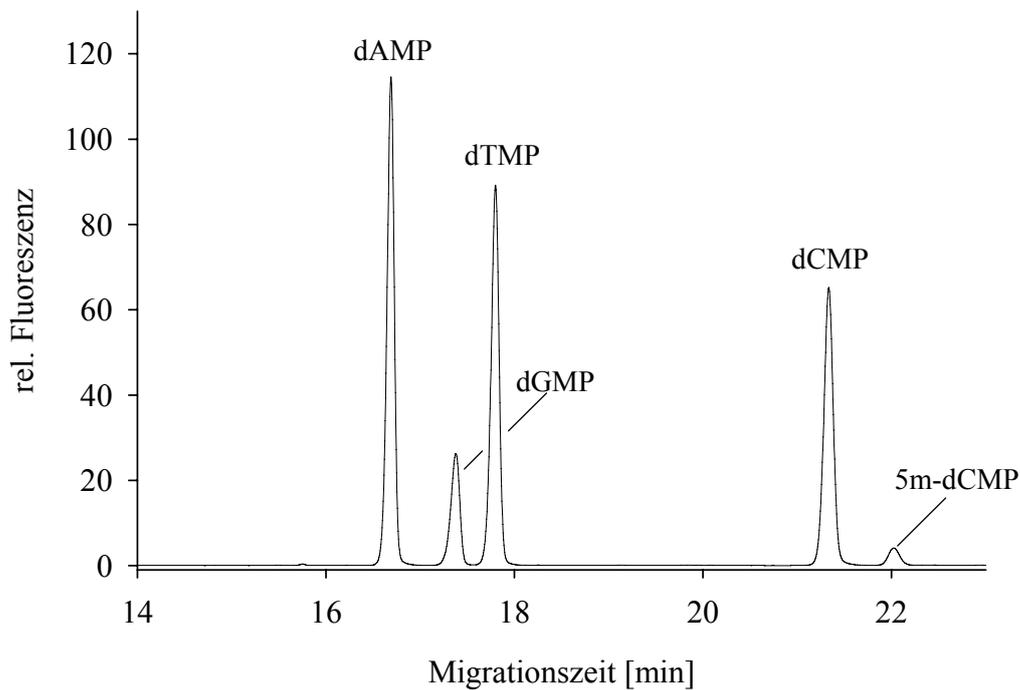


Abbildung 4-2: Elektropherogramm der Analysen einer 10 μg CT-DNA, hydrolysiert und derivatisiert nach PVV 1; die kapillarelektrophoretische Trennung wurde nach Methode I durchgeführt.

Mehrere Arbeiten [158, 254] haben belegt, daß verschiedene Parameter in der Probenvorbereitung (Temperatur, Reaktionszeit, pH-Wert, DNA-Menge und die Konzentration des Derivatisierungspuffers) einen Einfluß auf die Nukleotid-Konjugat-Ausbeuten ausüben. Zur Bestimmung des genomweiten Methylierungsgrades sind für eine entwickelte Probenvorbereitungsmethode, in die die genannten Parameter einfließen, Korrekturfaktoren zu bestimmen.

4.1.2 Ermittlung von Korrekturfaktoren zur Bestimmung des Methylierungsgrades für 10 μg , 1 μg und 100 ng DNA

Aufgrund der nicht quantitativ verlaufenden DNA-Hydrolyse und Fluoreszenzderivatisierung sowie durch Fluoreszenzlöschungen können die erhaltenen Signalflächen der derivatisierten Nukleotide nicht einfach relativ zueinander verglichen werden. Um exakte Quantifizierungen für 5m-dCMP trotzdem realisieren zu können, wurden durch die Analyse eines definierten Standards, dem Bakteriophagen Lambda (λ), Korrekturfaktoren eingeführt. Diese berücksich-

tigten die Hydrolyse- und Derivatisierungseffizienz der Probenvorbereitung sowie die Quantenausbeute des Fluoreszenzmarkers. Die Nukleotid-Sequenz der verwendeten Phagen-DNA ist bekannt. Das Plasmid enthält insgesamt 97004 Basen, davon 24182 Cytidinbasen und keinen natürlichen Anteil an 5m-dCMP. Auf jedem DNA-Strang befinden sich aber 328 mit Hpa II-Methylase methylierbare Zielsequenzen. Für diese Arbeit wurde von *Stach* (DKFZ Heidelberg) eine methylierte Lambda DNA mit 656 5-Methylcytidinen generiert und zur Verfügung gestellt.

Zur Bestimmung der Korrekturfaktoren wurden 10 µg, 1 µg und 100 ng λ-DNA (methyliert und unmethyliert) nach den jeweils entwickelten Probenvorbereitungsmethoden (PVV 1, PVV 4 und PVV 5) hydrolysiert, derivatisiert und kapillarelektrophoretisch nach Methode I analysiert. Alle Proben wurden jeweils siebenmal gemessen.

Für das methylierte Plasmid des Phagen λ ergibt sich eine theoretische Nukleotid-Zusammensetzung von 25,07 % dAMP, 24,93 % dGMP, 25,07 % dTMP, 24,25 % dCMP und 0,68 % 5m-dCMP. Das nicht methylierte Phagen-Genom enthält jeweils 25,07 % dAMP und dTMP sowie 24,93 % dGMP und dCMP. Die Division der theoretischen, prozentualen Anteile des Phagen durch die nach der Analyse ermittelten prozentualen, zeitkorrigierten Peakflächen ergab die jeweiligen Korrekturfaktoren (Tabelle 4-2).

Anhand der so erhaltenen Korrekturfaktoren ist ersichtlich, daß insbesondere für das dGMP-Nukleotid-BODIPY-Konjugat die theoretischen, prozentualen Konzentrationen doppelt so groß sind, wie die experimentell erhaltenen. Der Grund dafür ist ein intramolekularer, basenspezifischer Quenchprozeß zwischen der Nukleobase Guanin und dem Fluoreszenzmarker durch einen photoinduzierten Elektronentransfer-Mechanismus [339, 340]. Dabei agiert der Fluoreszenzmarker als Elektronen-Akzeptor in seinem angeregten Zustand und das Guanin als Elektronen-Donor im Grundzustand [339, 340]. Dieses Phänomen der basenspezifischen Fluoreszenzlöschung ist schon mehrfach zwischen Guanin und verschiedenen Fluoreszenzmarkern beobachtet worden [340 - 342].

Die Analyse von CT-DNA-Proben, die nach den entwickelten Probenvorbereitungen hydrolysiert, derivatisiert und mehrfach analysiert wurden (jeweils n = 7), zeigten unter Berücksichtigung der erhaltenen Korrekturfaktoren in ihren prozentualen Nukleotid-Konzentrationen eine gute Übereinstimmung und Vergleichbarkeit der Methode [255]. Die ermittelten Anteile der einzelnen Nukleotide entsprachen mit Ausnahme von dAMP sehr gut dem in eukaryotischer DNA vorliegenden Basenverhältnis von A:T:G:C mit 30:30:20:20. Bei dAMP konnte eine signifikante Diskriminierung von etwa 5 % gefunden werden. Diese spezifische Verminderung könnte auf einer unvollständigen Hydrolyse in genomischer DNA beruhen. Die Hydro-

lyse der relativ kurz-kettigen Plasmid-DNA des Phagen λ ist diesbezüglich vielleicht nicht 100 %-ig vergleichbar. Möglicherweise liegt in der eukaryotischen DNA ein merklicher Anteil dA außerhalb der Erkennungsstellen der verwendeten Enzyme. Die aus den Analysen der CT-DNA-Proben erhaltenen Methylierungsgrade betragen $6,50 \pm 0,17$ % (10 μg DNA), $6,45 \pm 0,20$ % (1 μg DNA) und $6,36 \pm 0,25$ % (100 ng DNA). Alle Proben wurden dabei unmittelbar nach der Probenvorbereitung kapillarelektrophoretisch analysiert.

a prozentuale Flächen des Phagen λ				
	<i>theoretisch [%]</i>	<i>experimentell [%]</i>		
n = 7		10 μg	1 μg	100 ng
dAMP	25,07	$35,55 \pm 0,44$	$35,92 \pm 0,08$	$43,54 \pm 0,23$
dGMP	24,93	$11,84 \pm 0,52$	$14,57 \pm 0,14$	$12,03 \pm 0,02$
dTMP	25,07	$26,21 \pm 0,22$	$26,47 \pm 0,00$	$23,06 \pm 0,02$
dCMP	24,25	$26,04 \pm 0,99$	$22,39 \pm 0,12$	$20,99 \pm 0,01$
5m-dCMP	0,68	$0,74 \pm 0,08$	$0,76 \pm 0,02$	$0,76 \pm 0,03$

b Korrekturfaktoren				
n = 7	10 μg [255]	1 μg	100 ng [255]	
dAMP	$0,71 \pm 0,02$	$0,70 \pm 0,001$	$0,58 \pm 0,01$	
dGMP	$2,12 \pm 0,18$	$1,71 \pm 0,02$	$2,08 \pm 0,01$	
dTMP	$0,96 \pm 0,02$	$0,95 \pm 0,00$	$1,09 \pm 0,003$	
dCMP	$0,95 \pm 0,08$	$1,10 \pm 0,01$	$1,17 \pm 0,02$	
5m-dCMP	$0,93 \pm 0,09$	$0,90 \pm 0,03$	$0,90 \pm 0,04$	

Tabelle 4-2: (a) prozentuale Flächen der Nukleotide in hydrolysiertes und derivatisiertes 10 μg -, 1 μg - und 100 ng λ -DNA sowie (b) die ermittelten Korrekturfaktoren. Mit Ausnahme der Werte für 5m-dCMP stellen die experimentell ermittelten prozentualen Flächen und die Korrekturfaktoren die zusammengefaßten Mittelwerte aus methylierter und unmethylierter λ -DNA, die angegebenen Fehler die Standardabweichungen der Mittelwerte dar.

Bei geringen DNA-Mengen wie z.B. 1 μg DNA ist zu beachten, daß die in Tabelle 4-2 aufgeführten Korrekturfaktoren nur auf DNA-Proben angewendet werden können, die relativ zeitnah nach der Probenvorbereitung kapillarelektrophoretisch analysiert werden (Lagerung maximal 1 bis 14 Tage). Eine Untersuchung hat ergeben, daß sich bereits nach dreiwöchiger Lagerung die Korrekturfaktoren einiger Nukleotide in einer 1 μg λ -DNA deutlich ändern. Tabelle 4-3 zeigt den Vergleich der ermittelten Korrekturfaktoren für 1 μg DNA nach unmittelbarer Analyse und nach dreiwöchiger Lagerung.

	Korrekturfaktoren	
	<i>ohne Lagerung</i>	<i>21 Tage Lagerung</i>
	1 µg (n = 7)	1 µg (n = 3)
dAMP	0,70 ± 0,001	0,65 ± 0,001
dGMP	1,71 ± 0,02	2,44 ± 0,01
dTMP	0,95 ± 0,00	1,05 ± 0,01
dCMP	1,10 ± 0,01	0,93 ± 0,01
5m-dCMP	0,90 ± 0,03	0,84 ± 0,04

Tabelle 4-3: Korrekturfaktoren aus der Analyse einer methylierten und einer unmethylierten 1 µg λ-DNA, die in verschiedenen Zeitabständen nach erfolgter Probenvorbereitung gemessen wurden.

Der Einfluß der Lagerung wurde bei einer DNA-Menge von 1 µg anhand der CT-DNA-Probe, die zunächst zeitnah nach der Fluoreszenzmarkierung siebenmal analysiert wurde, auch nach dreiwöchiger Lagerung untersucht. Unter Anwendung der Korrekturfaktoren, die aus der unmittelbaren Analyse stammten (Tabelle 4-3, ohne Lagerung), konnte für 1 µg CT-DNA ein Methylierungsgrad von $5,97 \pm 0,06$ % (n = 3) bestimmt werden. Unter Berücksichtigung des erhaltenen Korrekturfaktors nach dreiwöchiger Lagerung (Tabelle 4-3, 21 Tage Lagerung) erhöhte sich der Methylierungsgrad derselben Probe auf $6,54 \pm 0,06$ % (n = 3). Das zeigt, daß die Methode der Korrekturfaktorbestimmung mittels λ-DNA sehr gut geeignet ist, um auch solche Einflüsse zu berücksichtigen und reproduzierbar die genomische Methylierung zu bestimmen. Es verdeutlicht gleichzeitig auch, daß die Lagerung einen sichtbaren Einfluß auf den Gehalt der Nukleotidkonjugate hat, und daß dies bei der Bestimmung bzw. Anwendung der Korrekturfaktoren mit berücksichtigt werden muß. Im Gegensatz zu 1 µg CT-DNA zeigen 10 µg DNA-Proben eine höhere Lagerungsstabilität von mindestens 9 Wochen [158, 255]. Bei 100 ng ist das bislang noch nicht untersucht worden.

Abschließend ließ sich feststellen, daß aufgrund der guten Übereinstimmungen in den erhaltenen Methylierungsgraden bei unterschiedlichen DNA-Mengen die CE-LIF-Methode ein sicheres Verfahren zur Bestimmung des genomischen Methylierungsgrades darstellt.

Die Analysenmethode wurde anschließend zur Bestimmung der DNA-Methylierung sowohl in *in vivo*-Proben mit 100 ng und 1 µg DNA-Gehalt als auch in *in vitro*-Kanzergenitätsuntersuchungen mit 10 µg DNA-Gehalt eingesetzt.

4.1.3 Betrachtung diverser Bereiche in einem Elektropherogramm

Bei den durchgeführten Methylierungsuntersuchungen zeigte sich, daß im Bereich von etwa 10 - 12 Minuten eines Elektropherogramms immer wieder ein typisches Signalmuster mit Intensitäten von ca. 0,2 - 2 RFU auftrat (Abbildung 4-3). Diese Signalanhäufung hätte eine Analyse von DNA-Addukten erschweren können, da aus früheren Untersuchungen bekannt war, daß vor allem exogene Addukte ebenfalls in diesem Bereich migrieren [158, 257]. Es wurde vermutet, daß es sich dabei um Reaktionsprodukte von in der Probe vorhandenen bzw.

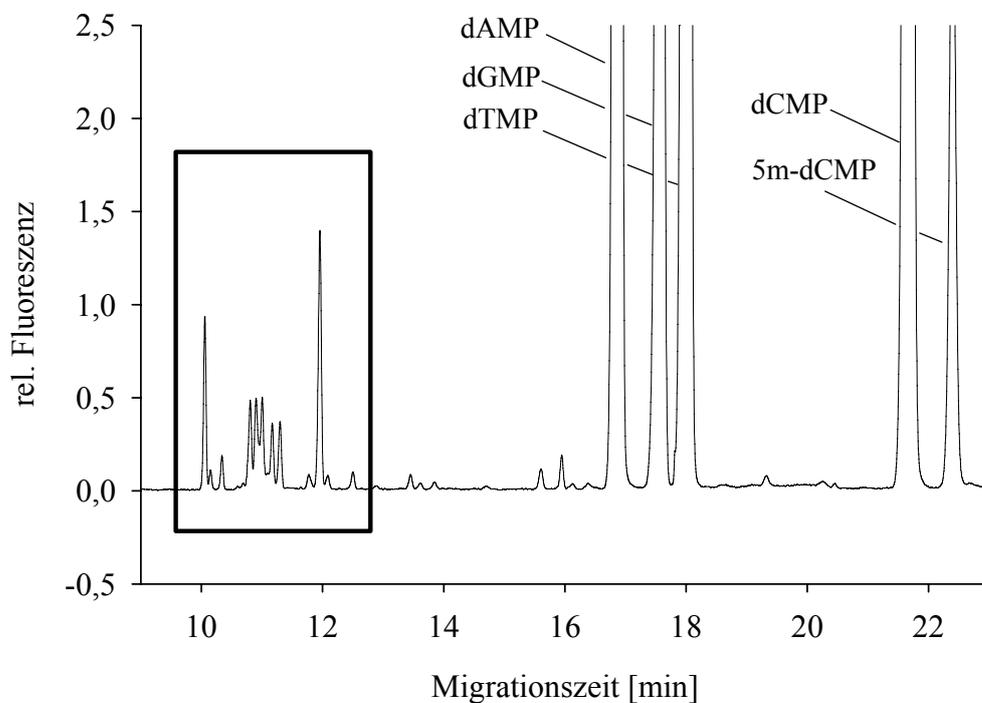


Abbildung 4-3: Vergrößerter Ausschnitt des Elektropherogramms einer Analyse einer hydrolysierten und derivatisierten 10 µg CT-DNA (PVV 1), die nach Methode I kapillarelektrophoretisch analysiert wurde. Der eingerahmte Bereich kennzeichnet die Region des interessierenden Signalmusters.

bei der Hydrolyse zugesetzten Proteinen mit dem Fluoreszenzmarker handelt. Um dies zu untersuchen, wurde nach der Hydrolyse einer 10 µg CT-DNA eine Proteinabtrennung mittels Größenausschlußmembran (Fugisep Mini, INTERSEP Deutschland, Kapitel 6.4) durchgeführt. Dafür wurde eine Membrangröße von 4 kD gewählt, welche ausreichen sollte, um die zugesetzte Phosphodiesterase Typ II (ca. 25 kD) und die Mikrokokkennuklease (ca. 15 kD) nahezu quantitativ abzutrennen. Nach erfolgreicher Abtrennung (Qualitätskontrolle der Rein-

heit des Hydrolysats mittels UV-VIS, Kapitel 6.2) wurde die Probe kapillarelektrophoretisch analysiert und mit einer 10 µg CT-DNA ohne Proteinabtrennung verglichen. Die Ergebnisse zeigten, daß es sich bei dem angesprochenen Signalmuster nicht um Reaktionsprodukte von Proteinen mit dem Fluoreszenzmarker handeln konnte.

Aufgrund der kurzen Migrationszeiten der Signale können die Substanzen kaum Wechselwirkungen mit dem micellaren System eingehen und werden deswegen relativ früh nach dem EOF detektiert. Die Vermutung, daß es sich um Produkte mit hohem Molekulargewicht handelte, schien daher sehr wahrscheinlich. Das trifft neben Proteinen aber auch auf Oligonukleotide zu. Deshalb wurde nun untersucht, ob das Signalmuster auf nicht vollständig hydrolysierte DNA-Fragmente zurückzuführen ist. Zu diesem Zweck wurden die Hydrolysebedingungen in mehreren 10 µg CT-DNA-Aliquoten variiert. Dabei wurden unterschiedliche Volumina der Enzymlösung (bestehend aus Hydrolysepuffer und der MN/SPD-Enzymmischung mit 150 mU/mL MN; 2,5 mU/mL SPD) den Aliquoten zugesetzt und mit gleichen Anteilen BODIPY und EDC (30 µL) derivatisiert. Das gesamte Derivatisierungsvolumen war bei allen Proben identisch. Die kapillarelektrophoretischen Analysen dieser CT-DNA-Proben ergaben eine Bestätigung der oben getroffenen Hypothese. Es zeigte sich, daß der betreffende Signalebereich in Abhängigkeit steigender Enzymkonzentration im Reaktionsvolumen immer geringer wurde. Daher wurden die Hydrolysebedingungen weiter optimiert. Eine 3,4-fache Menge der MN/SPD-Enzymmischung (14,1 µL statt 4,2 µL) erbrachte zufriedenstellende Hydrolysen mit nur noch sehr wenigen Signalen im untersuchten Bereich, was mit Abbildung 4-4 belegt wird.

Weitere Auswertungen verschiedener Elektropherogramme ergaben, daß ab einer bestimmten Anzahl an Mehrfachmessungen (ab $n = 3$) und bei längeren Standzeiten einer verdünnten Probe störende Nebensignale zwischen den Signalen der fluoreszenzmarkierten Hauptnukleotide auftraten, die teilweise eine Flächenintegration erschwerten. Es wurden dabei sechs diskrete Signale (das 1. vor dAMP, das 2. und 3. zwischen dTMP und dCMP, das 4. bis 6. direkt nach 5m-dCMP) detektiert (Abbildung 4-5). Deren Intensität nahm mit der Anzahl an Meßläufen bzw. bei zunehmender Standzeit der verdünnten Probe zu. Im Hinblick auf Methylierungsuntersuchungen erschwerten die Signale unmittelbar hinter 5m-dCMP die quantitative Auswertung. Die limitierte Stabilität der verdünnten Proben begrenzte deutlich den theoretisch möglichen Probendurchsatz. Messungen über Nacht waren bezogen auf eine sichere Quantifizierung des Methylierungsgrades nicht möglich. Die anderen drei Signale vor 5m-dCMP lagen in Bereichen eines Elektropherogramms, in denen auch endogene DNA-Addukte

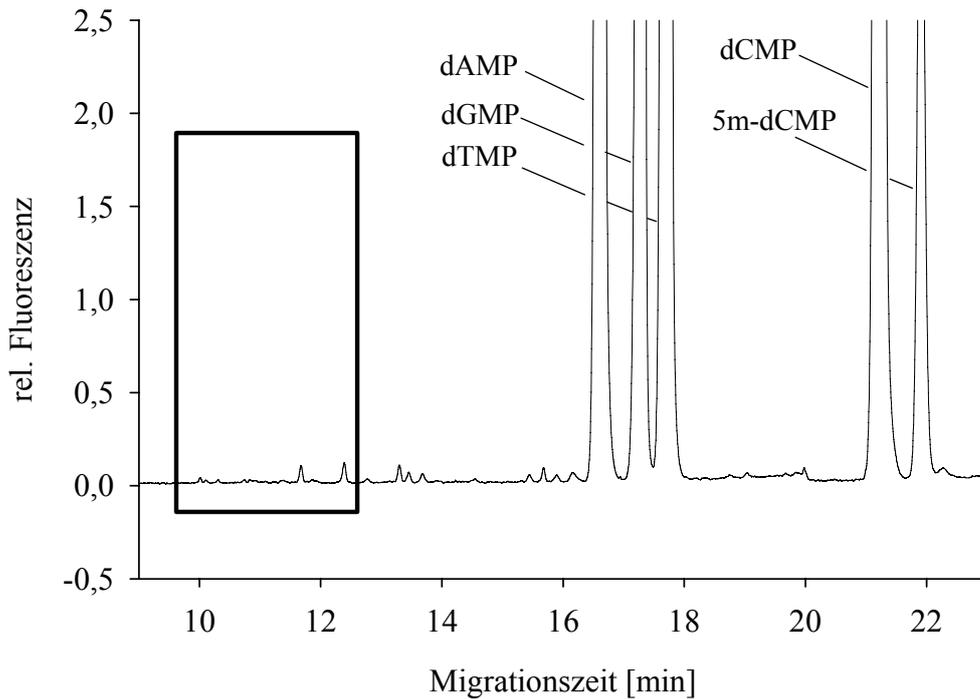


Abbildung 4-4: Vergrößerter Ausschnitt des Elektropherogramms einer Analyse einer mit 3,4-facher Enzymmenge hydrolysierten und derivatisierten 10 µg CT-DNA. Die Grafik dient als Vergleich zu der Analyse der 10 µg CT-DNA, die mit 1-facher Enzymmenge hydrolysiert wurde (Abbildung 4-3). Die kapillarelektrophoretische Analyse erfolgte nach Methode I. Der eingerahmte Bereich kennzeichnet die Region des interessierenden Signalmusters, bei dem es sich um nicht vollständig hydrolysierte Nukleotide (Oligos) handelt.

migrieren [257], und störten ebenfalls die Analyse. Detaillierte zeitliche Betrachtungen dieser „Störsignale“ ergaben ein bestimmtes Erscheinungsbild und einen definierten Reaktionsablauf. Zuerst bildete sich immer das Signal vor dAMP. In Abhängigkeit der Konzentration dieses Signals wurde das zweite Signal hinter dTMP erkennbar. Das dritte (vor dCMP) und die Signale 4 - 6 (hinter 5m-dCMP) standen in Bezug zur Konzentration der beiden ersten Signale. Parallel zum Intensitätsanstieg der Signale 3 - 6 verringerte sich die Konzentration des 1. Signals. Es wurde vermutet, daß es sich bei den unerwünschten Nebensignalen um Zeretzungsprodukte des Fluoreszenzmarkers handelte. Die Analyse diverser Blindproben (mit und ohne Protein-, EDC- oder Pufferzusatz) bestätigten diese Hypothese. Weitere Untersuchungen belegten, daß die Konzentrationen dieser BODIPY-Abbau- bzw. Spaltprodukte stark vom pH-Wert und der zugesetzten EDC-Menge abhängig waren. Je basischer eine BODIPY-Lösung wurde, desto schneller erschienen die Abbauprodukte. Im Gegensatz zu früheren Annahmen, daß der während der Derivatisierung erforderliche HEPES-Zusatz in erster Linie die

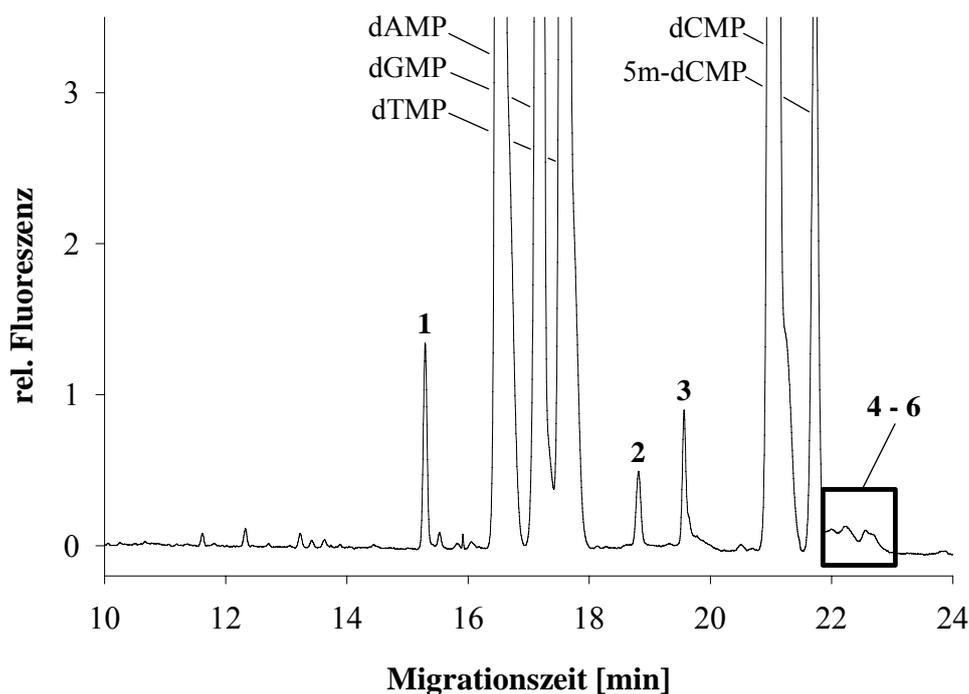


Abbildung 4-5: Vergrößerter Ausschnitt des Elektropherogramms einer Analyse von 10 µg CT-DNA, die mit in Relation zur ursprünglich verwendeten Vorschrift (Hydrolyse in PVV 1) 3,4-fach erhöhter Enzymmenge hydrolysiert, derivatisiert und nach Methode I analysiert wurde. Der Ausschnitt zeigt die dritte Mehrfachanalyse dieser Probe. Die numerierten Signale stellen die Zersetzungsprodukte des Fluoreszenzmarkers dar.

entstehende HCl abfangen und somit einen sinkenden pH-Wert verhindern soll, haben eigene Messungen ergeben, daß die Reaktionslösungen nach EDC-Zusatz nicht saurer, sondern basischer wurden. Dies führte bei einer Erhöhung der EDC-Konzentration zu einer Intensitätssteigerung der Störsignale. Gerade bei kleinen DNA-Mengen (z.B. 100 ng) machten sich die Signale ab dem 1. bzw. 2. Analysenlauf sehr störend bemerkbar. Das geht mit der Beobachtung von *Poguang* und *Giese* konform, die bei BODIPY-Konjugaten im basischen pH-Bereich eine sukzessive Austauschreaktion der beiden Fluoratome im BODIPY durch Hydroxygruppen beschrieben haben [343]. Ein weiterer Einfluß auf die Konzentration der Störsignale ergab sich durch die Anwesenheit von Sauerstoff. Daher lag die Vermutung nahe, daß es sich bei diesen Zersetzungsprodukten des Fluoreszenzmarkers sowohl um Hydrolyse- als auch um Oxidationsprodukte handelt.

4.1.4 Erhöhung des Probendurchsatzes und der Routinetauglichkeit

Die bisher verwendete CE-LIF-Methode, einschließlich der Probenvorbereitung, ist hervorragend zur Bestimmung des Methylierungsgrades geeignet. Durch die ermittelten Korrekturfaktoren kann die genomische Methylierung mit hoher Genauigkeit bestimmt werden. Jedoch ist bei einem hohen Probenaufkommen ein größerer Probendurchsatz wünschenswert. Bisher konnten ca. 12-14 Analysen am Tag durchgeführt werden, da die Haltbarkeit der Proben aufgrund der angesprochenen Zersetzungsprodukte des Fluoreszenzmarkers begrenzt war. Im Hinblick auf ein höheres Probenaufkommen war daher die Notwendigkeit zu einem ganztägigen Meßbetrieb (24 h) gegeben.

4.1.4.1 Änderung der Probenvorbereitung

Aus allen bisherigen Beobachtungen zusammengefaßt wurde eine neue Probenvorbereitungsmethode für 10 µg DNA entwickelt, die statt 30 µL nur 20 µL BODIPY- und EDC-Lösung gegenüber der bisher eingesetzten Derivatisierungsmethode (in PVV 1) enthielt. Diese Methode wurde mit der aus den Analysen des „Oligonukleotidbereiches“ (Kapitel 4.1.3) resultierenden effizienteren Hydrolyse mit 3,4-facher Enzymmenge kombiniert. Gleichzeitig wurde das Reaktionsvolumen von 90 µL auf 70 µL reduziert. Aus dieser ~ 22 %-igen Verminderung des Reaktionsvolumens resultierte dann letztlich eine effektive Verringerung der BODIPY- und EDC-Konzentration um ~ 15 % bei zugleich erhöhter Nukleotid-Konzentration im Reaktionsvolumen [212]. Der Überschuß an BODIPY im Verhältnis zur Nukleotidkonzentration wurde dadurch von 26,5-fach auf 17,6-fach und an EDC von 1765-fach auf 1167-fach gesenkt. Ferner wurde zur oxidativen Stabilisierung die verdünnte Probe mit Paraffinöl (~ 4 Tropfen) überschichtet. Die Paraffinüberschichtung empfindlicher Proben ist bereits von *Wätzig* und *Dette* [344] beschrieben worden. Die beiden Elektropherogramme in Abbildung 4-6 stellen jeweils eine hydrolysierte, derivatisierte und 1:200 verdünnte 10 µg CT-DNA-Probe dar, die über Nacht unter Lichtausschluß im Kapillarelektrophoresegerät stengelassen wurde. Abbildung 4-6 a zeigt vergrößerte Ausschnitte der Analyse einer nach der bisherigen Probenvorbereitung (PVV 1, ohne Paraffinstabilisierung) präparierten DNA und im Vergleich dazu (Abbildung 4-6 b) eine nach neuer Probenvorbereitung (PVV 2, mit Paraffinüberschichtung). Die Unterschiede sind deutlich zu erkennen. Diese Änderungen in der Probenvorbereitung ermöglichten einen 24-stündigen Routineeinsatz des CE-LIF-

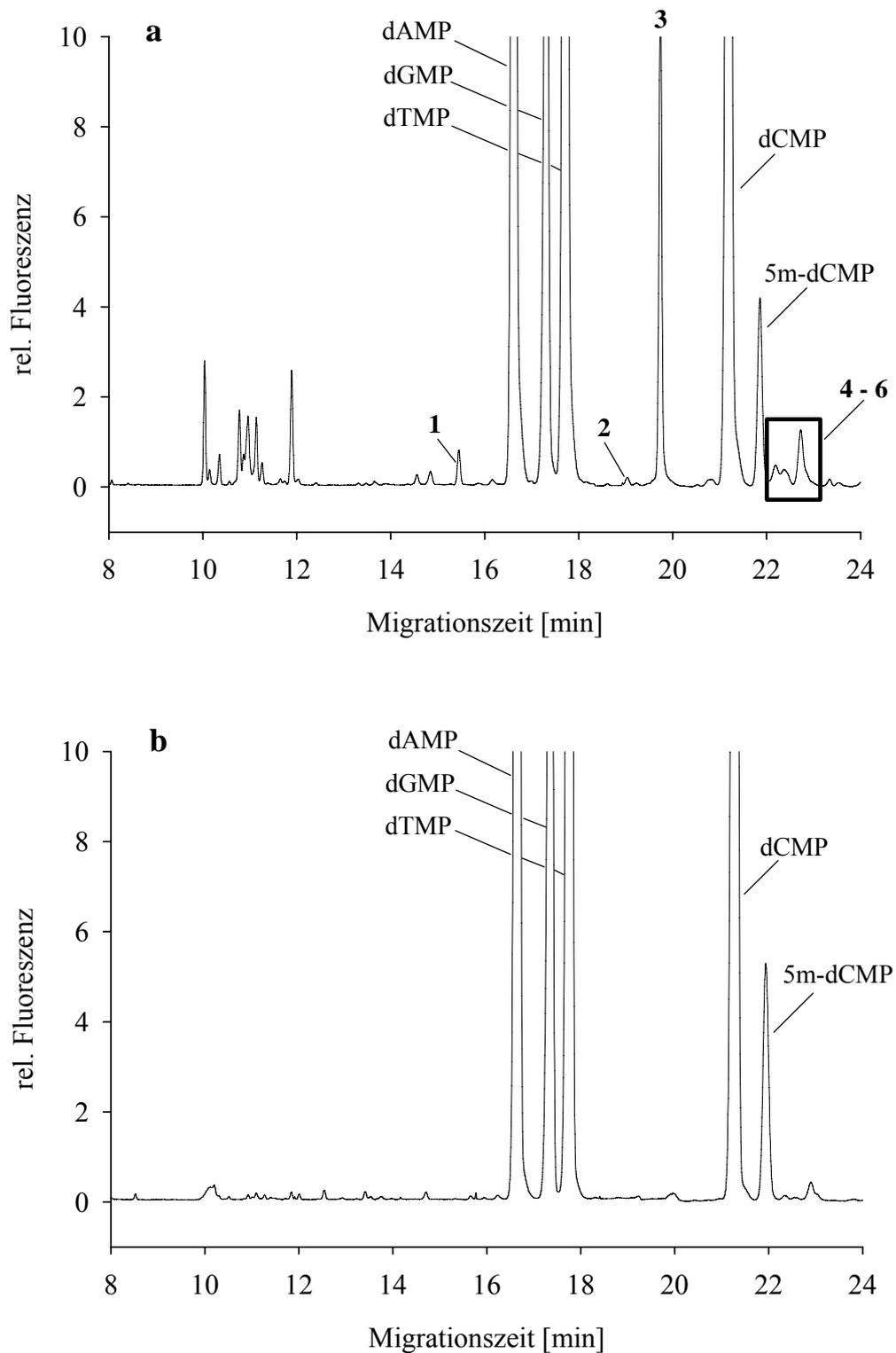


Abbildung 4-6: Vergleich der Analysen zweier CT-DNA-Proben (a) mit bisheriger und (b) mit neuer Proben-
vorbereitung mit Paraffinstabilisierung (1 - 6 = Zersetzungsprodukte); die Proben wurden über Nacht bei Raum-
temperatur unter Lichtausschluß gelagert [212]. Beide Proben wurden kapillarelektrophoretisch nach Methode I
analysiert.

Gerätes, was annähernd zu einer Verdopplung des Probendurchsatzes auf bis zu 24 Analysen pro Tag bei gleichzeitiger Minimierung der finanziellen Aufwendungen für den kostenintensiven Fluoreszenzmarker führte. Alle Proben wurden ab diesem Zeitpunkt nach erfolgter Verdünnung in Wasser mit Paraffin überschichtet. Auf eine explizite Erwähnung bei jeder nachfolgenden Analyse wird daher verzichtet.

Die Paraffinstabilisierung kann auch bei den Elektrolyten eingesetzt werden. Das Paraffin verhindert dabei die Verdunstung des organischen Modifiers und hält damit die Elektrolytzusammensetzung über einen langen Meßzyklus konstant. Dieser positive Effekt macht sich jedoch erst bei erhöhter Raumtemperatur ($> 25\text{ °C}$) und einer eventuell daraus resultierenden Erwärmung des Analysengerätes bemerkbar. Daher wurde in dieser Arbeit auf eine derartige Elektrolytstabilisierung überwiegend verzichtet. Die von *Shimura et al.* [345] beschriebene Möglichkeit, daß Paraffinöl in das Innere der Kapillaren dringen kann, konnte hier nicht beobachtet werden.

Eine weitere Änderung im Routinebetrieb betraf eventuell auftretende Injektionsschwankungen. *Baeuml* und *Welsch* [346] beschreiben die Möglichkeit, daß es zu Aufquell- und Ablösungsvorgängen der Polyimid (PI)-Schicht der Kapillaren kommt. Wenn dies am Inlett passiert, können feinste Fasern dieser gelösten PI-Schicht die Kapillaröffnung derartig verstopfen oder verengen, daß eine reproduzierbare Injektion der Proben nicht gewährleistet ist. Um die daraus resultierenden Injektionsschwankungen zu vermeiden, wurden am Inlet der Kapillare $\sim 2\text{ mm}$ der PI-Schicht entfernt.

Zusätzlich wurden die kapillarelektrophoretischen Bedingungen bei nachfolgenden Analysen leicht modifiziert. Dabei wurde die SDS-Konzentration im Elektrolyten um 5 mM erhöht, die Trenntemperatur auf 20 °C und die Trennungsspannung auf 18 kV reduziert (Methode II). Dadurch konnte eine reproduzierbarere und effektivere Trennung der noch in geringem Maße vorhandenen Zersetzungsprodukte vom 5m-dCMP-Signal erreicht werden. Die Analysenzeit wurde dadurch nur geringfügig verlängert.

4.1.4.2 Erhöhung der Lebensdauer einer Kapillare

Im nun durch die angesprochenen Maßnahmen möglichen Routinebetrieb mit entsprechendem Probendurchsatz fiel eine mangelnde Langzeitstabilität der verwendeten Kapillaren auf. Eine Kapillare konnte unter den hier gewählten elektrophoretischen Bedingungen durchschnittlich für 150 - 200 Analysen verwendet werden. Nach ~ 70 Analysenläufen begann sich

am Outlet die Polyimid-Schicht abzulösen. Nach $\sim 100 - 150$ Analysenläufen war die PI-Schicht auf einer Länge von ca. 2 cm vollständig entfernt. Dadurch kam es etwa 15 min nach Beginn der Analyse zu einer deutlichen Verschlechterung der Basislinie. Nach weiteren ~ 50 Analysen war die Kapillare für quantitative Messungen nicht mehr verwertbar. Zudem stieg mit großflächigem Ablösen der PI-Schicht die Gefahr eines Kapillarbruchs. Dies war gerade bei Messungen über Nacht unerfreulich, da Meßzeit und Probenmaterial verschwendet wurde. Das Problem wurde durch eine Modifizierung des von *Baeuml* und *Welsch* beschriebenen Verfahrens des „heat-curings“ gelöst [346], wodurch sich die Langzeitstabilität deutlich verbesserte. Die Kapillare wurde im Heizofen eines Gas-Chromatographen einem Temperaturgradientenprogramm unterzogen. Dabei wurde der Ofen mit einer Heizrate von $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ auf $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt. Diese Temperatur wurde 100 Stunden gehalten und anschließend der Ofen abgeschaltet. Bei geschlossener Ofentür konnte die Kapillare in der Folgezeit auf Raumtemperatur abkühlen. Mit einer derart vorbereiteten Kapillare wurde bei gleichen elektrophoretischen Bedingungen die Lebensdauer um den Faktor 2 - 3 gesteigert. Erst nach ca. 250 Analysenläufen kam es zum Aufquellen und nachfolgenden Ablösen der PI-Schicht. Nach ca. 150 weiteren Analysen konnte auch eine so behandelte Kapillare aufgrund der bereits angesprochenen Beeinträchtigungen nicht mehr verwendet werden.

4.1.5 Überprüfung der Korrekturfaktoren mittels Lambda-DNA (unmethyliert) bei $10\text{ }\mu\text{g}$

Gegenüber der früheren Probenvorbereitung für $10\text{ }\mu\text{g}$ DNA-Proben haben sich bei der hinsichtlich der Probenstabilität optimierten Methode die Enzymkonzentration, der BODIPY- und EDC-Zusatz und das Reaktionsvolumen in der Derivatisierung geändert. Es mußte deshalb kontrolliert werden, ob die erfolgten Änderungen in der Probenvorbereitung gravierende Auswirkungen auf die schon ermittelten Korrekturfaktoren haben.

Es wurden $10\text{ }\mu\text{g}$ unmethylierte λ -DNA (New England Biolabs) nach der neuen Probenvorbereitung hydrolysiert, derivatisiert und 7-mal kapillarelektrophoretisch nach Methode II analysiert. Analog dem in Kapitel 4.1.2 beschriebenen Verfahren wurden erneut Korrekturfaktoren für die vier Nukleotide dA, dG, dT und dC ermittelt (Tabelle 4-4).

	n	KF ¹ aus bisheriger Probenvorbereitung	KF ² aus optimierter Probenvorbereitung
dA	7	0,71 ± 0,02	0,72 ± 0,002
dG	7	2,12 ± 0,18	2,01 ± 0,08
dT	7	0,96 ± 0,02	0,96 ± 0,005
dC	7	0,95 ± 0,08	0,94 ± 0,01

Tabelle 4-4: Vergleich der Korrekturfaktoren für 10 µg DNA; ⁽¹⁾ gemittelte Korrekturfaktoren aus methylierter und unmethylierter λ-DNA; ⁽²⁾ Korrekturfaktoren aus unmethylierter λ-DNA.

Die Korrekturfaktoren zeigten innerhalb der Fehlertoleranz für die vier Hauptnukleotide eine sehr gute Übereinstimmung. Auch beim dAMP-Konjugat ergab sich keine merkliche Änderung des Korrekturfaktors, was die Vermutung unterstützt, daß die Hydrolyse der relativ kleinen Plasmid-DNA unproblematisch ist. Die Ergebnisse für die vier Hauptnukleotide ließen den Schluß zu, daß auch für 5m-dCMP kein gravierender Einfluß auf den Korrekturfaktor bestehen sollte.

4.1.6 Reproduzierbarkeit

Im Anschluß an die durchgeführte Optimierung der Probenvorbereitung und Überprüfung der Korrekturfaktoren mittels unmethylierter λ-DNA wurde auch die Reproduzierbarkeit der neuen Präparationsmethode durch eine Mehrfachbestimmung von CT-DNA überprüft. Dazu wurden 4 x 10 µg CT-DNA an unterschiedlichen Tagen nach optimierter Methode hydrolysiert, derivatisiert (PVV 2) und über einen Zeitraum von mehreren Tagen je dreimal kapillarelektrophoretisch analysiert. Die ermittelten Methylierungsgrade zeigt Tabelle 4-5.

	Methylierungsgrad [%]
Probe 1	6,53 ± 0,07
Probe 2	6,51 ± 0,14
Probe 3	6,58 ± 0,04
Probe 4	6,46 ± 0,09

Tabelle 4-5: Ermittelte Methylierungsgrade von 4 x 10 µg CT-DNA Proben, die kapillarelektrophoretisch nach Methode II analysiert wurden.

Damit konnte die Reproduzierbarkeit nach geänderter Probenvorbereitung verifiziert werden. Die in Tabelle 4-5 aufgeführten Werte für die genomische Methylierung stimmten sehr gut mit den in Kapitel 4.1.2 erhaltenen Werten überein, so daß damit indirekt auch der KF von 5m-dCMP für die neue Methode (PVV 2) überprüft wurde.

4.1.7 Dokumentation relevanter Probenvorbereitungsparameter

Nach Abschluß der Optimierungen wurde eine umfangreiche Dokumentation über die Präparation der DNA-Proben entwickelt und eingeführt. Dies sollte bei einer routinemäßigen Analytik eine einheitliche, personenunabhängige Durchführung der Probenpräparation und eine effektive Vereinfachung in der Auffindung von Fehlerquellen gewährleisten. Daher wurde neben der Einführung einer detaillierten SOP auch ein Vordruck zur Dokumentation aller Parameter einer Probenvorbereitung erstellt, der bei jeder weiteren Probenpräparation ausgefüllt wurde. Diese Dokumentation enthält in einem mehrseitigen Formular folgende Angaben:

- den Namen des Probenvorbereitenden, das entsprechende Namenskürzel, das Datum der Probenvorbereitung
- das Alter und die Bezugsquelle der DNA sowie den Namen desjenigen, der die Aliquotierung der DNA (z.B. à 10 µg) vorgenommen hat
- das Alter der verwendeten Enzymmischung, der Name des Präparators und das Datum des ersten Auftauens des verwendeten Enzym-Aliquots
- die Hydrolyse- und die Derivatisierungsmethode in Form eines Kürzels, der exakten Reaktionstemperatur und -dauer sowie einer an die Dokumentation angehängte, detaillierte Beschreibung der Hydrolyse- und die Derivatisierungsmethode
- die Zusammensetzung des Hydrolyse- und Derivatisierungspuffers, der Name des Präparators, das Datum des jeweiligen Ansatzes, die zur Herstellung verwendete Wassercharge und die Temperatur des Puffers vor Reaktionsbeginn
- die exakten Einwaagen von BODIPY und EDC, die Chargenbezeichnung des Herstellers und das Datum der ersten Öffnung der verwendeten Abfüllung
- die für die Hydrolyse und Derivatisierung eingesetzten Pipetten und das Datum der letzten Kalibrierung
- die Aliquotierung und Lagerung (Raum, Ort, Temperatur)

In ähnlicher Weise wurde eine Dokumentation für die Wasseraufbereitung mittels der Millipore-Anlage (z.B. Leitfähigkeit, total organic compound (TOC)-Wert) und zur Präparation der Enzymmischungen angefertigt. Üblicherweise betrug der Leitfähigkeitswert $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ und der TOC-Wert $\leq 5 - 10 \text{ ppb}$. An der Entnahmestelle des Gerätes befand sich zusätzlich ein Proteasefilter zur mikrobiellen Aufreinigung. Aus der Wasseraufbereitungsanlage wurden je nach Bedarf 10 L aufgereinigtes Wasser entnommen und im Labor gelagert. Für jede 10 L-Entnahme wurde eine interne Chargenbezeichnung vergeben. Auf dem Dokumentationsformblatt zur Wasserentnahme wurden neben dem Datum der Entnahme und dem Namen des Ausführenden die Chargenbezeichnung und die qualitativen Eigenschaften eingetragen. Zuzüglich zur Dokumentation wurde auf dem entsprechenden Lagerbehälter das Datum der Entnahme und die interne Chargenbezeichnung vermerkt. Das Entnahmedatum ließ Rückschlüsse auf eine mögliche, verstärkte bakterielle Kontamination aufgrund einer längeren Standzeit zu.

Die Präparation der Enzymmischung bestand aus der Aufkonzentrierung der kommerziell erworbenen Phosphodiesterase, der Dialyse der Phosphodiesterase und der Mikrokokken-nuklease, der Lyophilisation der entsalzten Enzyme und der Mischung der anschließend in Wasser gelösten Proteine (s. experimenteller Teil, Kapitel 6.1). Die zugehörige Dokumentation enthielt neben dem Datum der Präparation und dem Namen des Operators herstellerspezifische Angaben zu den Enzymen (z.B. Name des Herstellers, Artikel-Nummer, Proteinkonzentration, Enzymaktivität, Charge), Informationen zu eingesetzten Verbrauchsmaterialien (z.B. Konzentrator, Dialyserahmen, Einwegspritzen), der verwendeten Wassercharge, der Lyophilisationsdauer sowie der Lagerung und Etikettierung. An die Dokumentation wurden detaillierte Beschreibungen der einzelnen Präparationsschritte und der Aliquotierung angehängt.

Dadurch war neben der Vereinfachung einer Fehleranalyse auch eine Präparator-unabhängige Dokumentation gewährleistet. Dies ermöglicht einer anderen Person zu jeder Zeit, die Probenvorbereitung anhand detaillierter Daten in einfacher, übersichtlicher und standardisierter Form nachzuvollziehen.

4.2 Bestimmung des genomischen Methylierungsgrades

Die CE-LIF-Methode wurde zur Bestimmung des Methylierungsgrades sowohl in *in vitro*- als auch in *in vivo*-Proben eingesetzt.

4.2.1 Analyse von 10 µg DNA aus Caco2-Zellen

Es ist unbestritten, daß epigenetische Modifikationen (z.B. DNA-Methylierung) eine wichtige Rolle in der Tumorgenese spielen. Unklar ist jedoch noch, in welcher Phase des Kanzerogeneseprozesses die Umgestaltungen im Methylierungsmuster einsetzen. Im Modell der Entwicklung eines Kolonkarzinoms [23] werden Veränderungen in der genomweiten Methylierung in Form einer Hypomethylierung in der Promotionsphase diskutiert. *Wilson et al.* [347] konnten in einer *in vitro*-Studie zeigen, daß bereits in der frühen Phase der Zellentwicklung, bedingt durch exogene Faktoren, eine Veränderung in der genomischen Methylierung stattfindet. Die Autoren inkubierten NHBE-Zellen (normal human bronchial epithelial cells) 48 Stunden mit unterschiedlichen Kanzerogenen, darunter einige PAK, in verschiedenen Konzentrationen (B[a]P z.B. 0,4 bis 4 µM) und konnten eine genomweite Hypomethylierung (12 - 17 %-iger Verlust an 5-Methylcytosin) in Abhängigkeit der kanzerogenen Konzentration und des genotoxischen Potentials dieser Kanzerogene feststellen. Damit konnten sie die Ergebnisse einer bereits einige Jahre zuvor von *Wilson* und *Jones* durchgeführten *in vitro*-Studie an einer 16 Stunden mit B[a]P inkubierten Zelllinie von Mäusen (BALB/3T3-Zellen) bestätigen [348]. *In vivo*-Experimente in einer in unserem Arbeitskreis angefertigten Diplomarbeit [349], bei der verschiedene Gewebe von mit 3-Nitrobenzanthron inkubierten Ratten (2 mg/kg Körpergewicht) auf Änderungen im Methylierungsgrad untersucht wurden, zeigten bereits 48 Stunden nach Inkubation in zwei Geweben eine Hypomethylierung.

In PAK-Kanzerogenitätsstudien stellt das B[a]P das häufigste untersuchte Kanzerogen dar [350]. Eine von *Li et al.* [351] publizierte Studie lieferte allerdings Anhaltspunkte, daß auch Benzo[c]fluoren (B[c]F) in der chemischen Kanzerogenese beim Menschen von großer Bedeutung ist. Dabei konnte ein B[a]P-ähnliches Addukt, das als Derivat von Benzo[c]fluoren identifiziert wurde, in 41 % aller Gewebeproben von Brustkrebs-Patientinnen nachgewiesen werden. In Gewebeproben gesunder Frauen wurde dagegen nichts gefunden. Zur Untersuchung des kanzerogenen Potentials von B[c]F im Vergleich zu B[a]P und Teer wurden von *Goth-Goldstein* (Lawrence Berkeley National Laboratories, Berkeley, USA) Caco2-Zellen mit B[a]P, B[c]F und Teer 24 h und 48 h inkubiert und die DNA isoliert. Caco2-Zellen werden aus einem menschlichen Dickdarmkarzinom gewonnen und stellen eine häufig genutzte Zelllinie dar. Sie differenzieren analog dem Dünndarm und bilden verschiedene Cytochrom P450-Isoformen aus. Dabei exprimieren sie CYP1A1 und CYP1B1, mit einer 5-fach höheren Konzentration an CYP1A1. Dies ist interessant, da die Ergebnisse aus der Studie von *Li et al.*

vermuten lassen, daß Benzo[*c*]fluoren primär über CYP1A1 metabolisiert wird [351]. Die Anzucht der Caco2-Zellen erfolgte nach der sogenannten Transwells-Technik, bei der sie auf mikroporösen Filtern, die zwischen zwei mit Kulturmedien gefüllten Kammern angeordnet waren, gezüchtet wurden. Aufgrund der porösen Membran konnten sich die Zellen dreidimensional ausbreiten [352].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die zur Verfügung gestellten DNA-Proben hinsichtlich des Methylierungsgrades untersucht. Je 10 µg der isolierten DNA wurden nach PVV 1 hydrolysiert, derivatisiert und mehrfach kapillarelektrophoretisch nach Methode I analysiert. Tabelle 4-6 zeigt die Ergebnisse dieser Analysen.

Probe	Inkubationszeit [h]	Konzentration [µg/mL]	Methylierungsgrad [%]	n
Kontrolle			4,17 ± 0,26	19
B[<i>c</i>]F	24	5	4,04 ± 0,24	5
B[<i>c</i>]F	48	5	3,81 ± 0,20	17
B[<i>a</i>]P	24	2,5	4,09 ± 0,12	3
B[<i>a</i>]P	48	2,5	3,91 ± 0,16	6
Teer	24	5	3,78 ± 0,10	3
Teer	48	5	3,76 ± 0,13	11

Tabelle 4-6: Methylierungsgrade der DNA von Caco2-Zellen, die 24 h und 48 h mit unterschiedlichen PAKs inkubiert wurden.

Die Resultate zeigen eine Hypomethylierung der Zell-DNA nach Inkubation mit B[*c*]F und Teer, die beim Teer deutlicher ausfällt [351, 353, 354]. Bei den *in vitro*-Untersuchungen von Wilson *et al.*, die eine Hypomethylierung bei Einwirkungen exogener Kanzerogene ergaben, zeigten nicht alle zur Inkubation verwendeten PAKs eine starke Auswirkung auf den 5-Methylcytosin-Gehalt. So wies B[*a*]P in einer geringen Konzentration keine deutlich signifikanten Unterschiede zur Kontrolle auf [347]. Die in Tabelle 4-6 aufgeführten Ergebnisse bestätigen dieses Resultat. Das kanzerogene Potential von komplexen Noxen, in denen ein Gemisch von verschiedenen PAKs vorliegt (z.B. Teer), wird oft relativ auf der Basis von sogenannten B[*a*]P-Äquivalenzfaktoren berechnet [353]. Diese Faktoren beschreiben allerdings nicht genau das kanzerogene Potential dieser komplexen Zusammensetzungen und führen in vielen Fällen zu einer Unterbestimmung des eigentlichen kanzerogenen Potentials [353, 354]. In der Literatur werden unterschiedliche Wechselwirkungen zwischen den genetischen Schä-

den (Addukten) und der epigenetischen Modifikation (5m-dCMP) diskutiert. Es konnte z.B. in mehreren Arbeiten gezeigt werden, daß eine Adduktbildung durch verschiedene exogene Kanzerogene bevorzugt an methylierten CpG-Sequenzen in Tumorsuppressorgenen auftritt [355 - 358]. Weiterhin wurde darüber berichtet, daß die Anwesenheit beider Modifikationen (5m-dCMP und ein B[a]P-dG Addukt) innerhalb der Sequenz eine beträchtliche Konformationsänderung in der DNA-Struktur bewirkt [355]. Das könnte auch in ähnlicher Weise zu dem von *Smela et al.* für das N²-dG-Addukt von Aflatoxin B1 postulierten Mechanismus zur Bildung von Mutationen im Tumorsuppressorgen führen [80].

Darüber hinaus haben *Wojciechowski* und *Meehan* beschrieben, daß eine DNA, die B[a]P-Addukte enthält, ein schlechtes Substrat für beide Methyltransferasen (sowohl *de novo* als auch „Maintenance“-DNMT) darstellt [359].

Die in dieser Arbeit erzielten Analysenergebnisse der Caco2-Zellen deuten an, daß der Methylierungsgrad als Biomarker eingesetzt werden könnte. Die statistische Signifikanz dieser Ergebnisse muß durch zukünftige, systematische *in vitro*-Untersuchungen verifiziert werden.

4.2.2 Analyse von 100 ng DNA aus Brustkrebs-Zellen

Durch die Reduzierung der für die Analyse notwendigen DNA-Menge konnte der Methylierungsgrad in 100 ng DNA aus humanen Brustkrebszellen bestimmt werden. Dazu wurden 100 ng DNA, die von der Arbeitsgruppe von *Wießler* (Molekulare Toxikologie, DKFZ-Heidelberg) zur Verfügung gestellt wurde, nach PVV 5 hydrolysiert, derivatisiert und kapillarelektrophoretisch nach Methode I analysiert.

Der Mittelwert des genomweiten Methylierungsgrades ergab sich unter Berücksichtigung der zuvor ermittelten Korrekturfaktoren zu $4,18 \pm 0,26$ % ($n = 9$) [255]. Abbildung 4-7 zeigt ein Elektropherogramm der Analyse von 100 ng der Tumorzell-DNA.

Das Elektropherogramm veranschaulicht, daß durch die zuvor durchgeführten Optimierungen der Probenvorbereitung und unter Anwendung des bereits in der Diplomarbeit [158] ermittelten Elektrolytsystems auch in Realproben in dieser geringen DNA-Konzentration sowohl ein sehr gutes S/N-Verhältnis für die einzelnen Nukleotid-Konjugate als auch eine sehr gute Trennung zwischen dCMP und 5m-dCMP erzielt wird. Zur sicheren Quantifizierung des genomweiten Methylierungsgrades sind daher 100 ng DNA ausreichend, was gerade im Hinblick auf die Verfügbarkeit von humanem Tumorgewebe durch Biopsien ein wichtiger Fortschritt für die Anwendung der CE-LIF-Methode darstellt.

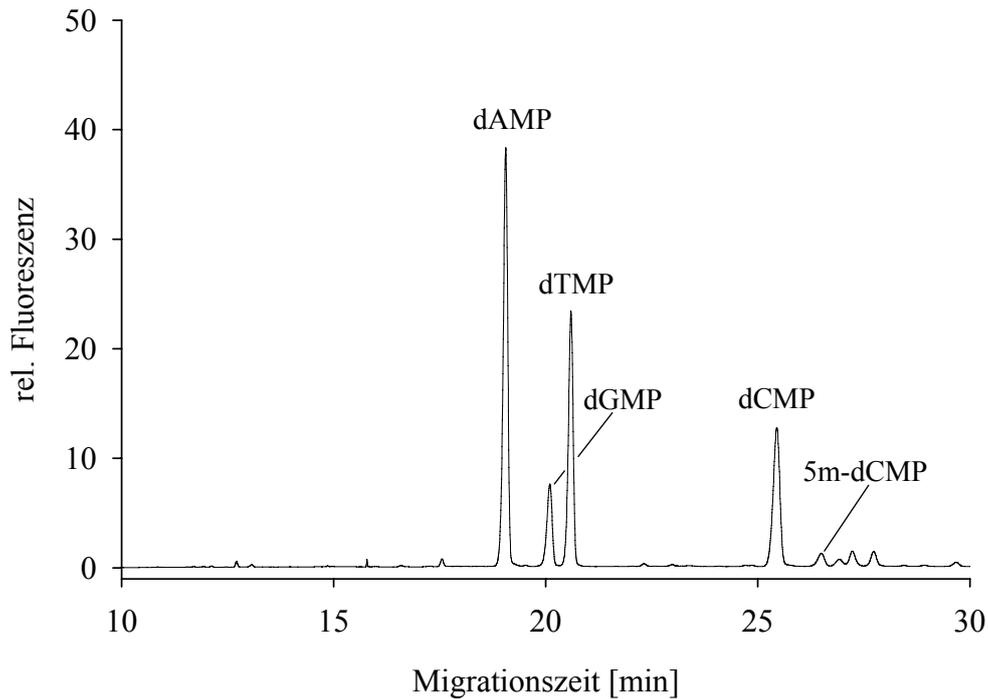


Abbildung 4-7: Elektropherogramm der Analyse einer 100 ng Brustkrebs-DNA; hydrolysiert und derivatisiert nach PVV 5; die Probe wurde nach Methode I analysiert.

4.2.3 Analyse des genomischen Methylierungsgrades in DNA von Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in einer Kooperation mit *Oscier* (Royal Bournemouth Hospital, UK) Proben von insgesamt 29 Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) hinsichtlich ihres genomischen Methylierungsgrades analysiert. Die zur Verfügung gestellten DNA-Proben der an B-CLL erkrankten Personen waren sehr gut hinsichtlich verschiedener, für diese Erkrankung wichtiger Prognosemarker charakterisiert. Die Fragestellung war dabei, ob einerseits die genomische Methylierung mit den klinischen Parametern korreliert und andererseits die Methylierung eventuell als möglicher weiterer Prognosefaktor geeignet ist.

4.2.3.1 Prognosefaktoren in der chronisch lymphatischen Leukämie

Die chronisch lymphatische Leukämie ist ein leukämisches, niedrig-malignes Non-Hodgkin-Lymphom der B-Zellreihe. Die morphologisch reifen, aber funktionell unreifen

neoplastischen B-Zellen sind charakterisiert durch eine sehr niedrige Proliferationsrate und deaktivierter Apoptose. Die B-CLL-Zellen akkumulieren in Blut, Knochenmark, Lymphknoten und Milz und führen zur Organvergrößerung sowie zur Knochenmarks- und Immunsuffizienz [360 - 362]. Mit einer jährlichen Inzidenz von 3 pro 100000 Einwohner ist die CLL in den westlichen Ländern die häufigste Leukämie bei Erwachsenen. Das mediane Erkrankungsalter liegt zwischen 65 und 70 Jahren. Die Ätiologie der CLL ist unklar. Ein Einfluß von Umweltfaktoren wird diskutiert, ist aber nicht gesichert [360]. Eine familiäre Prädisposition ist mittlerweile durch epidemiologische Studien belegt [363, 364]. Kinder von CLL-Patienten haben ein erhöhtes Risiko, ebenfalls daran oder an einer anderen lymphatischen Neoplasie zu erkranken [360, 365].

Der Früherkennung der schleichenden, meist zufällig diagnostizierten CLL-Erkrankung kommt eine besondere Bedeutung zu. Die mittlere Überlebenszeit ab dem Diagnosezeitpunkt variiert abhängig vom Stadium zwischen zwei und mehr als zehn Jahren. Basierend auf der Beobachtung, daß in frühen Krankheitsstadien die zunehmenden Tumormassen und in den fortgeschrittenen Stadien das Ausmaß der Knochenmarksinsuffizienz die Prognose bestimmen, entwickelten *Rai et al.* 1975 [366] und *Binet et al.* 1981 [367] Stadieneinteilungen, die prognostisch differente Gruppen definieren. Diese Stadieneinteilungen erlauben jedoch keine zuverlässige Beurteilung des individuellen Krankheitsverlaufes, insbesondere bei jüngeren Patienten in frühen Stadien (Binet-Stadium A, Rai-Stadium 0-II) [360, 368, 369]. Neuere Prognosefaktoren gewährleisten dagegen im Einzelfall eine bessere Abschätzung des Fortschreitens der Erkrankung [369].

Ein derzeit allgemein anerkannter prognostischer Faktor für die B-CLL ist der individuelle Mutationsstatus des Gens für den variablen, schweren Teil der Immunoglobulinkette (*IgVH*) bzw. die VH-Homologie [370, 371]. Während der B-Zell-Reifung unterliegt die VH-Region des Immunoglobulin-Gens einer somatischen Hypermutation [212, 361]. Dabei werden Punktmutationen in diese Genregion eingeführt und dadurch hochaffine Antikörper generiert [361]. Der Anteil dieser DNA-Veränderungen spiegelt sich im Grad der VH-Homologie wider [212, 372]. Die VH-Homologie gibt die Ähnlichkeit bzw. die prozentuale Übereinstimmung der VH-Nukleotidsequenz zwischen den B-Zell-Genen und den nächsten Keimbahn-Genen an [212, 372]. Als Referenz-DNA zur Bestimmung der VH-Homologie wird üblicherweise eine Keimbahn-DNA nichtlymphoider Zellen derselben Person (z.B. DNA aus Wangenschleimhaut-Zellen) herangezogen [372]. Der Mutationsstatus der Immunoglobulin-Gene in einem B-Zell-Tumor liefert wichtige Hinweise auf dessen Ursprung, und es läßt sich daran ablesen, in welchem Differenzierungsstadium sich die verantwortliche B-Zelle befindet, d.h.

ob diese ein Keimzentrum durchlaufen und somit bereits Kontakt zu einem Antigen hatte oder nicht [372, 373]. Eine hohe VH-Homologie in B-CLL-Zellen bedeutet, daß die *IgVH*-Genregion dieser zellulären DNA kaum Mutationen aufweist und daher diese Zellen einen geringen Reifegrad und eine höhere Malignität besitzen [372]. Bei der B-CLL können durch den *IgVH*-Status zwei Gruppen unterschieden werden: die B-CLL mit mutierten und die B-CLL mit unmutiertem *IgVH*. Dabei haben B-CLL-Patienten mit mutiertem *IgVH* eine bessere Überlebensprognose als die mit unmutiertem *IgVH* [370, 374 - 376]. Die Bestimmung des *IgVH*-Mutationsgrades erfolgt durch eine Sequenzierung des Gens, was allerdings ein sehr aufwendiges, teures Verfahren darstellt und daher für eine Routineuntersuchung nicht gut geeignet ist [371, 377]. Als praktikable Alternative zur Sequenzierung hat sich die durchflußzytometrische Bestimmung der Expression von CD38, ein Aktivierungsmarker der Zelloberfläche, erwiesen [378 - 381]. Es konnte eine Korrelation zwischen der Oberflächenexpression von CD38 auf B-Lymphozyten und dem *IgVH*-Mutationsgrad gezeigt werden, jedoch ist die prognostische Signifikanz von CD38 umstritten [377, 379, 382 - 388]. In jüngster Zeit sind mehrere Arbeiten veröffentlicht worden, die mit der Expression der Tyrosin-Kinase ZAP-70 (zeta-assoziiertes Protein mit 70 kD), ein normalerweise nur in T-Lymphozyten exprimiertes Antigen, einen neuen Prognosemarker für die B-CLL beschreiben. Aus diesen Arbeiten ergab sich, daß die gencodierte Bildung dieses Antigens mit einem aggressiven Krankheitsverlauf, einer ungünstigen Prognose und einem unmutierten *IgVH*-Status korreliert [371, 379, 389 - 396]. Einige Methoden für die ZAP-70-Bestimmung (z.B. quantitative Reverse Transcription-PCR, Western Blotting) sind aufgrund falsch positiver Ergebnisse durch Kontaminierung mit T- und NK (natürliche Killer)-Zellen problematisch [371]. Durch eine durchflußzytometrische Bestimmung kann dieses Problem zwar vermieden werden, jedoch ist die Methode aufgrund der nur schwachen intrazellulären Expression dieses Markers bislang noch nicht standardisiert [371].

Die für die unterschiedlichen Korrelationen verschiedener Prognosemarker verantwortlichen Mechanismen sowie die sich daraus ergebenden Assoziationen zum Krankheitsverlauf sind nur teilweise verstanden [397]. Daher ist es sinnvoll, nach weiteren prognostischen Markern zu suchen, die eine Hilfestellung sowohl bei der Einschätzung des Krankheitsverlaufes als auch der Therapieentscheidung leisten können. In jüngster Zeit ergeben sich zunehmend Hinweise, daß neben genetischen Veränderungen auch epigenetische Modifikationen zum malignen Wachstum und zur Therapieresistenz führen können.

4.2.3.2 Ergebnisse der Analyse des genomischen Methylierungsgrades von 29 Patienten mit B-CLL

Bei den zur Verfügung gestellten DNA-Proben von Patienten mit einer B-CLL-Erkrankung waren die DNA-Konzentrationen nicht bekannt. Daher wurde zunächst der DNA-Gehalt mittels UV-VIS-Spektrometrie untersucht (Kapitel 6.2). Diese Untersuchungen ergaben, daß nur wenig DNA-Material zur Verfügung stand. Insgesamt war von drei Proben nur 1 µg DNA vorhanden, von den restlichen konnte jeweils mindestens eine 10 µg-Probe angefertigt werden. Von einigen Proben standen mehr als 20 µg DNA zur Verfügung, weshalb bei diesen eine Mehrfachbestimmung (Doppel- bzw. Dreifachbestimmung) durchgeführt werden konnte. Die Analysen der 29 Proben wurden in mehreren Untersuchungsreihen durchgeführt, wobei durchschnittlich jeweils 9 Proben parallel hydrolysiert und derivatisiert (PVV 2) wurden. Eine Kontrollprobe (CT-DNA) wurde zu Beginn einer Untersuchungsreihe in den ersten beiden Sequenzmessungen standardmäßig zuzüglich zu den Realproben analysiert und ebenfalls hinsichtlich des Gehaltes an 5-Methylcytosin ausgewertet. Die Kontrollen dienten dabei als Systemcheck. Sie wurden innerhalb einer Untersuchungsreihe durchschnittlich einmal pro Woche bzw. bei Systemänderungen (z.B. nach einem erfolgten Kapillarenwechsel etc.) mit analysiert. Die kapillarelektrophoretischen Analysen der Proben erfolgten einheitlich unter Anwendung von Methode II.

Nach Durchführung aller Analysen der insgesamt 31 Proben von 29 Leukämie-Patienten ergaben sich die in Tabelle 4-7 aufgeführten Werte. Neben den hier ermittelten Methylierungsgraden sind einige wesentliche klinische Parameter, die von der Arbeitsgruppe von *Oscier* analysiert und im Anschluß an die Methylierungsuntersuchungen zur Verfügung gestellt wurden, aufgelistet. Dabei handelt es sich um Angaben bezüglich der VH-Homologie, des Expressionsstatus von ZAP-70 (ZAP-70-Status) und zum Methylierungsstatus eines bestimmten CG-Dinukleotids, welches 334 Basen vor dem Transkriptionsstartpunkt des ZAP-70-Gens liegt (C-334) [371].

Die Proben der Patienten, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten genommen wurden, zeigten innerhalb ihrer Standardabweichungen keine signifikanten Unterschiede, unabhängig davon, ob zwischenzeitlich eine chemotherapeutische Behandlung erfolgte. Daher konnten diese Werte zusammengefaßt werden. Für den Patienten mit den Probennummern 9 und 10 ergab sich ein Mittelwert des Methylierungsgrades von $3,82 \pm 0,00$ %, für den mit den Probennummern 18 und 19 ein Mittelwert von $3,88 \pm 0,01$ %. Die Fehler der aus Mehrfachbestimmungen ermittelten Methylierungsgrade stellen die Standardabweichungen der Mittelwerte dar.

Proben-Nr.	Methylierungsgrad [%]	n _{ges}	m = Zahl der Proben-vorbereitungen	VH-Homologie	ZAP-70-Status	C-334-Methylierung m = methyliert u = unmethyliert
1	3,72 ± 0,15	13	1	k. A.	k. A.	m
2	3,94 ± 0,04	9	1	92	1	m
3	3,83 ± 0,08	9	1	93	1	m
4	3,97 ± 0,08	9	1	92	1	m
5	3,79 ± 0,06	5	1	94	4	m
6	3,71 ± 0,01	4	1	95	1	m
7	4,12 ± 0,06	12	1	93	3	m
8	3,84 ± 0,07	6	1	96	1	m
9	3,82 ± 0,05	6	1	91	2	m
10	3,82 ± 0,03	11	2	91	2	m
11	4,10 ± 0,02	14	2	94	1	m
12	3,94 ± 0,04	6	1	97	3	m
13	4,22 ± 0,08	6	1	90	1	m
14	4,09 ± 0,05	6	1	94	6	m
15	3,94 ± 0,06	6	1	97	1	m
16	4,30 ± 0,14	6	1	92	1	m
17	4,19 ± 0,08	8	1	96	1	m
18	3,89 ± 0,06	9	2	92	2	m
19	3,86 ± 0,05	8	2	92	2	m
20	3,88 ± 0,05	12	2	95	4	m
21	4,14 ± 0,05	3	1	k. A.	k. A.	u
22	3,96 ± 0,18	7	1	100	37	u
23	4,27 ± 0,04	11	1	100	43	u
24	4,00 ± 0,12	5	1	100	80	u
25	4,10 ± 0,10	9	1	100	50	u
26	3,95 ± 0,06	9	1	100	22	u
27	3,97 ± 0,08	12	1	100	40	u
28	4,00 ± 0,04	3	1	100	34	u
29	4,13 ± 0,02	25	3	100	58	u
30	3,98 ± 0,05	20	2	100	64	u
31	4,38 ± 0,04	13	2	99	65	u
Kontrolle 1	4,43 ± 0,11	6	1	gesunde männliche Person (34 Jahre)		
Kontrolle 2	4,62 ± 0,07	6	1	gesunde männliche Person (46 Jahre)		
Kontrolle 3	4,60 ± 0,06	6	1	gesunde männliche Person (68 Jahre)		
Kontrolle 4	4,51 ± 0,09	5	1	gesunde weibliche Person (41 Jahre)		
Kontrolle 5	4,53 ± 0,12	7	1	gesunde weibliche Person (51 Jahre)		
Kontrolle 6	4,61 ± 0,10	11	1	gesunde weibliche Person (77 Jahre)		

Tabelle 4-7: Ergebnisse der Methylierungsuntersuchung bei 29 Patienten mit B-CLL (31 Proben); das Kürzel k.A. bedeutet, daß von diesen Patienten keine klinischen Daten vorlagen.

fett dargestellt: zwei Proben eines Patienten; Probe 9 und 10: Proben eines Patienten mit Probennahmen zu unterschiedlichen Zeitpunkten ohne zwischenzeitliche Chemobehandlung; Probe 18: Probenahme eines Patienten vor einer Chemobehandlung, Probe 19: Probenahme desselben Patienten nach einer Chemotherapie

Die Kontroll-Proben wurden von *Kleinsasser* und *Sassen* (Ökogenotoxikologie der HNO-Klinik der Universität Regensburg) zur Verfügung gestellt.

Die Interpretation der in Tabelle 4-7 ersichtlichen Werte ermöglicht einen Vergleich der genomischen Methylierung von an CLL erkrankten mit nicht daran erkrankten Personen. Zudem

können die Methylierungsdaten der CLL-Patienten mit weiteren, klinischen Parametern wie VH-Homologie, ZAP-70-Status, C-334-Methylierungsstatus in Bezug gesetzt werden.

Abbildung 4-8 zeigt die Verteilung der von 29 Patienten erhaltenen Methylierungsgrade. Diese Verteilung gleicht der von *Stach et al.* publizierten für ein anderes, größeres CLL-Probenkollektiv [254]. Allerdings liegt der hier bestimmte mediane Methylierungsgrad etwa um 0,3 % höher, was möglicherweise auf unterschiedliche Probenvorbereitungen und Analysenbedingungen zurückgeführt werden kann. Der Methylierungsgrad aller CLL-Patienten liegt im Bereich von 3,71 - 4,38 % (Mittelwert $4,01 \pm 0,17$ %), der der Kontroll-Personen im Bereich von 4,43 - 4,62 % (Mittelwert $4,55 \pm 0,03$ %). Der Unterschied dieser Mittelwerte ist statistisch hochsignifikant ($P < 0,0001$). Er zeigt eine allgemeine Hypomethylierung in allen Proben von CLL-Patienten und bestätigt damit die Ergebnisse der Untersuchungen von *Wahlfors et al.* und *de Capoa et al.* [201, 398]. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des (Student)t-Tests mit zweiseitiger Fragestellung berechnet und das Signifikanzniveau auf einen Wert von 0,01 festgelegt. Zu bedenken ist allerdings, daß die Anzahl der Kontroll-Personen mit $n = 6$ relativ gering ist. In der Literatur konnten neben einer genomweiten Hypomethylierung ebenfalls einige hypomethylierte, chromosomale Regionen mit der chronisch lymphatischen Leukämie assoziiert werden, darunter auch repetitive DNA-Sequenzen im Eu- und Heterochroma-

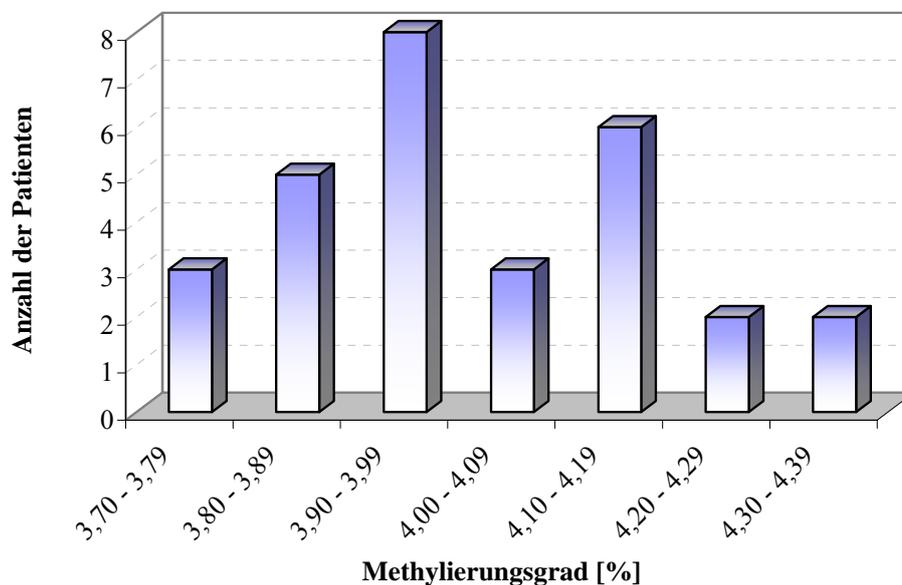


Abbildung 4-8: Verteilung der von 29 Patienten bestimmten, genomweiten Methylierungsgrade

tin [201, 399 - 405]. Eine eindeutige Erklärung für das Auftreten der genomweiten Hypomethylierung gibt es bislang nicht. Als mögliche Ursache dafür wäre aber eine Funktionsstörung der Methylierungsmaschinerie denkbar [201]. *Harikrishnan et al.* konnten in B-CLL-

Fällen im Vergleich zu normalen Lymphozyten zwar keine signifikante Änderung in der Expression der Maintenance-Methyltransferase DNMT1 nachweisen, jedoch eine signifikant abgeschwächte Expression der DNMT3b und der eukaryotischen Histonmethyltransferase (Eu-HMTaseI) [406]. Ein möglicher Einfluß auf den Methylierungsgrad wird auch für bestimmte genetische Faktoren, die im Folatmetabolismus eine Rolle spielen, diskutiert [211, 407]. Folat ist an der Produktion des Methyl donors S-adenosylmethionin (SAM) beteiligt und spielt daher eine wichtige Rolle für die Bildung von 5-Methylcytosin [211, 407, 408]. In verschiedenen Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, daß ein Folsäure (Vitamin B_C)-Mangel mit einer genomweiten Hypomethylierung und einem erhöhten Krebsrisiko korreliert [407, 409 - 416]. Nach *Jacob et al.* bewirkt ein erniedrigter Folsäureanteil eine Hypomethylierung in Lymphozyten von postmenopausalen Frauen [413]. Patienten mit intraepithelialen Zervixneoplasien in verschiedenen Stadien weisen sowohl im Blut als auch im neoplastischen Gewebe einen reduzierten Folsäureanteil auf [411]. Es gibt Hinweise, daß spezifische Mutationen im Methylentetrahydrofolat-Reduktase (*MTHFR*)-Gen (C677T Polymorphismus) mit der kolorektalen Karzinogenese und der akuten Leukämogenese in Verbindung gebracht werden können [407, 417 - 420]. Das *MTHFR*-Gen kodiert ein Enzym, welches an der SAM-Synthese beteiligt ist [211, 407]. Die spezifische Mutation im *MTHFR*-Gen verursacht eine reduzierte Aktivität des exprimierten Enzyms und führt zu einer Erniedrigung des zirkulären Folats (5-Methyltetrahydrofolsäure) [211, 407]. 5-Methyltetrahydrofolsäure ist die vorwiegende Form des Vitamins B_C im Plasma und stellt die Methylgruppe für die *de novo*-Methioninsynthese und die DNA-Methylierung zur Verfügung [407, 412]. Die spezifische Mutation im *MTHFR*-Gen und die nachfolgend reduzierte Aktivität des *MTHFR*-Enzyms führt zu einer genomischen Hypomethylierung peripherer Leukozyten [412, 416]. Verschiedene Studien erbrachten jedoch keine statistisch signifikanten Anhaltspunkte, daß die *MTHFR*-Variation in der Entwicklung der chronisch lymphatischen Leukämie eine Rolle spielt [421 - 423]. Über den Folatstatus der hier in der Arbeit untersuchten B-CLL-Patienten lagen leider keine Angaben vor.

Der Grad der Methylierung des Cytosins allein ist für sichere Prognosen z.B. medianer Überlebensraten nicht ausreichend genug. Allerdings können ermittelte Methylierungsgrade in Beziehung zu anderen klinischen Parametern gesetzt werden. Sich ergebende Korrelationen können zur Unterstützung der Aussagekraft und der Bedeutung sowohl des einen als auch des anderen Parameters beitragen und mögliche Hilfestellungen bei Entscheidungen über Therapiestrategien geben. Die Arbeitsgruppe von *Oscier* konnte in ihren Untersuchungen der klinischen Daten statistisch signifikante Korrelationen einzelner Parameter nachweisen. So korre-

liert der Methylierungsstatus von C-334 mit der ZAP-70-Expression und dem Mutationsstatus der schweren Kette des Immunglobulin-Gens (*IgVH*) [371]. Bei einem Cut-off von 10 % für die ZAP-70-Expression wiesen von 53 ZAP-70 negativen Patienten 96 % eine Methylierung an der C-334-Position auf, von 32 Patienten mit positivem ZAP-70 zeigten 94 % keine Methylierung an C-334 [371]. Aus den zusammengefaßten Ergebnissen der Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe kann folgende Beziehung zwischen dem C-334-Methylierungsstatus, dem ZAP-70-Expressionsstatus, dem *IgVH*-Mutationsstatus und der Überlebensprognose von CLL-Patienten abgeleitet werden:

C-334 methyliert \Rightarrow *ZAP-70 negativ* \Rightarrow *IgVH mutiert* \Rightarrow *gute Prognose/Überlebensrate*

C-334 unmethyliert \Rightarrow *ZAP-70 positiv* \Rightarrow *IgVH unmutiert* \Rightarrow *schlechte Prognose/Überlebensrate*

Dabei ergab sich aus Kaplan-Meier-Kurven eine mediane Überlebensrate von Patienten mit methyliertem C-334, geringer ZAP-70-Expression und mutiertem *IgVH* von 211 Monaten (17,5 Jahre). Eine wesentlich schlechtere durchschnittliche Überlebensprognose zeigte sich für Patienten mit unmethyliertem C-334, hoher ZAP-70-Expression und unmutiertem *IgVH* mit 85 - 110 Monaten (7 - 9 Jahre). Dabei wurde ein Cut-off von ≥ 98 % der VH-Homologie für die Definition der B-CLL-Fälle mit unmutiertem *IgVH* herangezogen [371].

In Abbildung 4-9 ist die VH-Homologie gegen den ZAP-70-Expressionsstatus von 27 B-CLL-Proben dargestellt, die in dieser Arbeit hinsichtlich einer genomweiten DNA-Methylierung untersucht wurden.

Anhand dieser Grafik lassen sich die Patienten in zwei Gruppen aufteilen:

- eine Patientengruppe mit einer VH-Homologie ≥ 98 %, einer ZAP-70-Expression > 10 % und unmethyliertem C-334 (10 Patienten)
- eine Patientengruppe mit einer VH-Homologie < 98 %, einer ZAP-70-Expression < 10 % und methyliertem C-334 (17 Patienten)

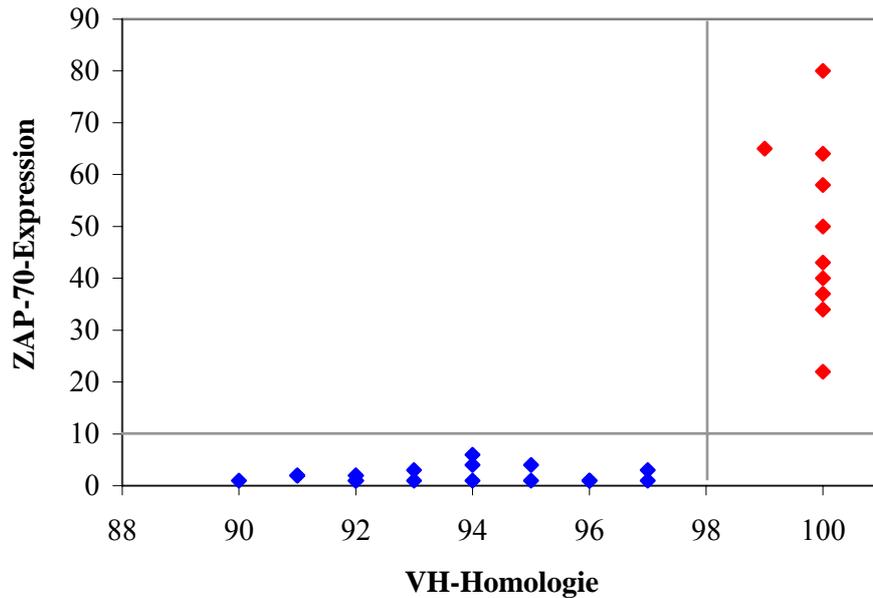


Abbildung 4-9: Zusammenhang zwischen der VH-Homologie und der ZAP-70-Expression bei 27 Patienten mit B-CLL; die blauen Punkte stellen Patienten mit methyliertem C-334, die roten Punkte stellen Patienten mit unmethyliertem C-334 dar. Die grauen Linien veranschaulichen den gewählten Cut-off für die VH-Homologie und den ZAP-70-Status.

Abbildung 4-10 zeigt den Zusammenhang zwischen der ZAP-70- Expression und dem genomweiten Methylierungsgrad.

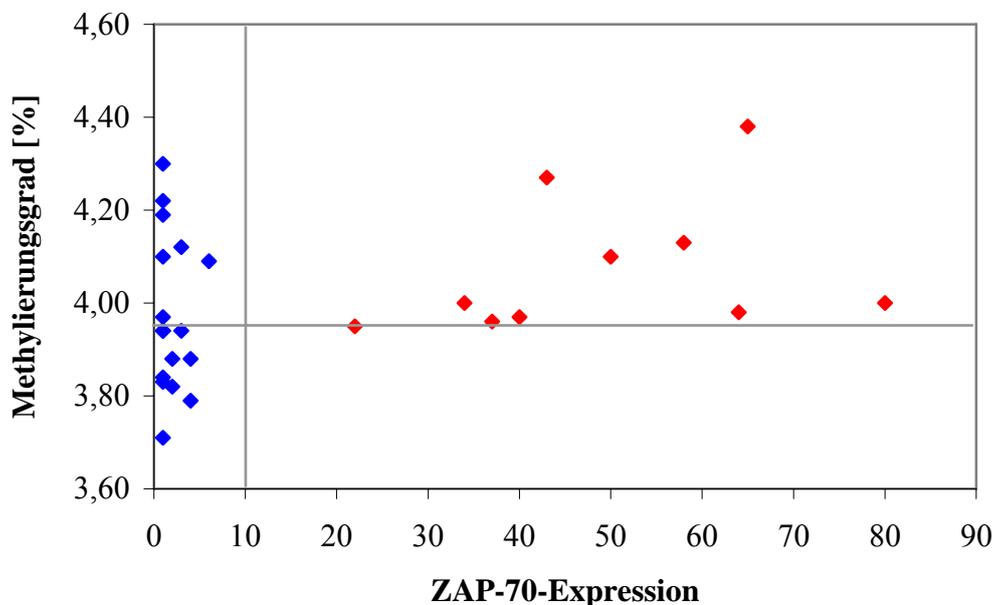


Abbildung 4-10: Zusammenhang zwischen der ZAP-70-Expression und dem Methylierungsgrad bei 27 Patienten mit B-CLL; die blauen Punkte stellen Patienten mit methyliertem C-334 und niedriger VH-Homologie (< 98 %), die roten Punkte Patienten mit unmethyliertem C-334 und hoher VH-Homologie (≥ 98 %) dar. Die grauen Linien verdeutlichen den gewählten Cut-off für den ZAP-70-Status und den sich daraus ergebenden Cut-off für den Methylierungsgrad.

Bei dem gewählten Cut-off für den ZAP-70-Status von $> 10\%$ ergab sich ein resultierender Cut-off für den Methylierungsgrad von $3,95\%$. Unter Berücksichtigung der Untersuchungen von *Oscier* kann abgeleitet werden, daß Patienten mit einem Methylierungsgrad $\geq 3,95\%$, einer ZAP-70-Expression $> 10\%$, einer VH-Homologie $\geq 98\%$ bei gleichzeitig unmethyliertem C-334 eine schlechtere Prognose des Krankheitsverlaufes als Patienten mit niedrigerem Methylierungsgrad, einer ZAP-70-Expression $< 10\%$, einer VH-Homologie $< 98\%$ und methyliertem C-334 haben. Der genomweite Methylierungsgrad lag bei den 10 Patienten mit einer VH-Homologie von $\geq 98\%$ im Bereich von $3,95\% - 4,38\%$ (Mittelwert $4,07\% \pm 0,15\%$) (Gruppe 1). Bei den 17 Patienten mit einer VH-Homologie $< 98\%$ wurden Methylierungsgrade im Bereich von $3,71\% - 4,30\%$ (Mittelwert $3,97\% \pm 0,17\%$) (Gruppe 2) erhalten. Der Unterschied in den Mittelwerten der genomweiten Methylierung bei den beiden Patientengruppen ist anhand des (Student)t-Test's statistisch nicht signifikant. Eine umfassende, biostatistische Auswertung der Daten konnte von *Oscier* bislang noch nicht zur Verfügung gestellt werden.

Abbildung 4-11 stellt den Zusammenhang zwischen dem C-334-Methylierungsstatus und der genomweiten Methylierung aller 29 Patienten dar. Der mittlere Methylierungsgrad von allen

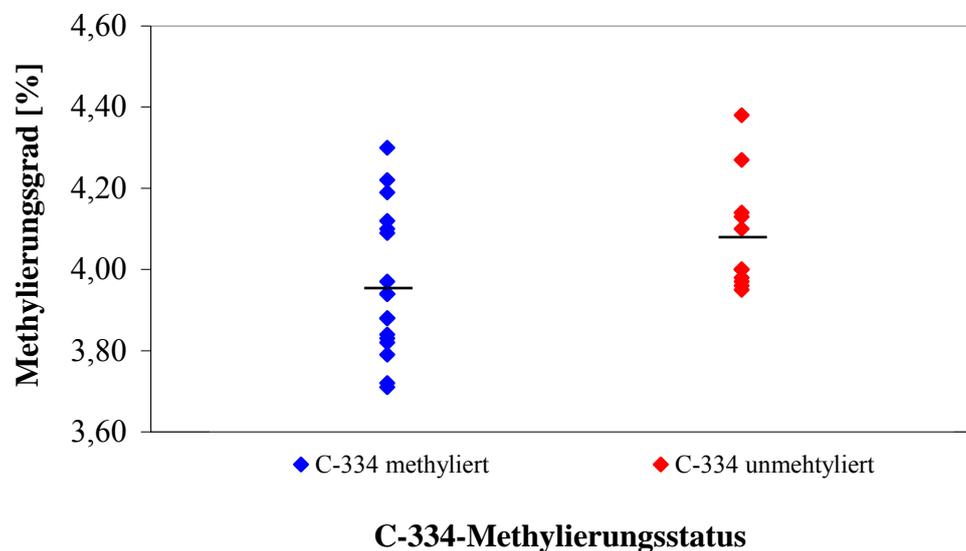


Abbildung 4-11: Zusammenhang zwischen dem C-334-Methylierungsstatus und der genomweiten Methylierung aller 29 Patienten mit B-CLL (ergänzt gegenüber [371]); die blauen Punkte stellen Patienten mit methyliertem C-334, die roten Punkte Patienten mit unmethyliertem C-334 dar. Die schwarzen Linien verdeutlichen den jeweiligen Mittelwert der Methylierungsgrade.

Patienten mit methyliertem C-334 (Anzahl = 18) betrug $3,96 \% \pm 0,17 \%$, der der Patienten mit unmethyliertem C-334 (Anzahl = 11) $4,08 \% \pm 0,14 \%$. Anhand des (Student)t-Test's mit zweiseitiger Fragestellung ergab sich auch bei diesen Mittelwerten kein statistisch signifikanter Unterschied ($P = 0,064$).

Im Gegensatz zu den Untersuchungsergebnissen von *Lyko et al.*, die bei 81 B-CLL-Patienten einen signifikanten Zusammenhng zwischen hohen Methylierungsgraden (Cut-off $\geq 3,53 \%$) und unmutiertem *IgVH* (Cut-off $> 98 \%$) feststellten [212], deutete sich in dieser Arbeit eine tendenzielle Hypermethylierung bei Patienten mit hoher VH-Homologie, hoher ZAP-70-Expression und unmethyliertem C-334 nur an. Statistisch konnte dies nicht belegt werden. Mögliche Ursachen könnten einerseits die geringe Anzahl der Patienten und andererseits die unausgewogene Verteilung zwischen den beiden Patientengruppen (17:10 bzw. 18:11) sein.

Das Potential von funktionsfähigen B-Lymphozyten, Antikörper gegen eine nahezu unbegrenzte Anzahl von Antigenen bilden zu können, basiert auf dem Ablauf bestimmter molekularer Prozesse: der sogenannten somatischen Hypermutation (SHM), der Immunoglobulin-Genkonversion (IGC) und der Class-Switch-Rekombination (CSR) [373, 424]. Für deren Initiation wird die „activation-induced cytidine deaminase“ (AID) benötigt [425 - 429]. Verschiedene Untersuchungen haben ergeben, daß die mRNA des *AID*-Gens in B-CLL-Fällen mit unmutiertem *IgVH* bevorzugt exprimiert wird [425 - 428]. Die AID desaminiert Cytidine und konvertiert in einzelsträngiger DNA innerhalb der variablen und der switch Region des Immunoglobulin-Antikörpergens Cytidin zu Uridin [429, 430]. *Larijani et al.* konnten feststellen, daß eine Methylierung innerhalb von CpG Islands die Cytidine vor einer AID-vermittelten Desaminierung schützt, während unmethylierte CpGs nicht vor der Desaminierung geschützt sind [429]. Eine Methylierung von Cytidinen neben den CpG Islands hat keine schützende Funktion. Daher stellt sich die Frage, ob eine Hypermethylierungstendenz bei Patienten mit unmutiertem *IgVH* im Gegensatz zu denen mit mutiertem *IgVH* ein Anzeichen für eine übermäßige Methylierung der CpG Islands innerhalb der VH-Region des *IgG*-Gens sein kann und durch die für eine Antikörperdiversität notwendigen Prozesse trotz einer hohen Expression von AID [425 - 428] nicht mehr induziert werden können.

Zusammenfassend aus den Ergebnissen der in dieser Arbeit durchgeführten Methylierungsuntersuchungen in DNA von B-CLL-Patienten und den Untersuchungen gesunder Personen (Kontrollen) sowie aus den Arbeiten der Arbeitsgruppe von *Oscier*, die die gleichen Patienten hinsichtlich der klinischen Parameter analysierten [371], und den Ergebnissen von *Lyko et al.* [212] zeigen sich zwei gegenläufige Effekte in der genomischen Methylierung: eine nachgewiesene Hypomethylierung im Vergleich zu den Kontrollen auf der einen Seite und eine ten-

denzielle Hypermethylierung innerhalb der B-CLL-Fälle mit schlechter Prognose auf der anderen Seite. Die empirischen Befunde belegen, daß die genomweite Methylierung andere, anerkannte Prognosefaktoren zwar nicht ersetzen kann, sich aber für zukünftige Untersuchungen als zusätzlicher, unterstützender Marker zur Einschätzung des Krankheitsverlaufes etablieren könnte. Dies wird zudem durch die relativ einfach durchzuführende Analysenmethode in Kombination mit einem möglichen hohen Probendurchsatz unterstützt. Anhand der in Tabelle 4-7 aufgeführten Methylierungsgrade ist aber auch ersichtlich, daß einige Patienten mit B-CLL einen Wert ähnlich dem von gesunden Personen aufwiesen. Daher ist die genomweite Methylierung als Biomarker für diesen Erkrankungstyp nicht geeignet, vor allem dann nicht, wenn sich die angedeutete Tendenz einer Hypermethylierung in Fällen mit einem schlechten prognostischen Verlauf durch weitere Untersuchungen bestätigen läßt.

Als Biomarker für eine chronisch lymphatische Leukämie müssen daher andere genetische oder epigenetische Faktoren gefunden werden.

4.2.4 Bestimmung des genomweiten Methylierungsgrades von DNA aus Rinderröten nach *in vitro*- und *in vivo*-Fertilisation

Seit Einführung reproduktionsmedizinischer Behandlungsmöglichkeiten und insbesondere der ersten erfolgreich durchgeführten *in vitro*-Fertilisation (IVF) beim Menschen [431] stellt sich die Frage, ob methodisch bedingt mit einer erhöhten Rate von angeborenen Erkrankungen bzw. Fehlbildungen bei so gezeugten Kindern zu rechnen ist [432]. Mehrere in letzter Zeit publizierte Beobachtungen lassen es möglich erscheinen, daß spezifische, durch Imprinting-Störungen verursachte, angeborene Syndrome nach einer künstlichen Befruchtung vermehrt auftreten [432 - 434]. Voraussetzung für eine normale, postnatale Entwicklung ist beim Säugerembryo die epigenetische Reprogrammierung der elterlichen Genome [432]. Genomweite Veränderungen der DNA-Methylierung im frühen Embryo sind hierbei von entscheidender Bedeutung. Störungen bei diesem biologisch hochsensiblen Vorgang des genomischen Imprintings sind verantwortlich für eine Vielzahl seltener und teilweise spät manifestierender Erkrankungen beim Menschen [432]. Ein bekanntes Beispiel für Erkrankungen beim Menschen aufgrund fehlerhafter genomischer Prägung ist das Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS), eine somatische Entwicklungsstörung mit Riesenwuchs, das zu vergrößerten Organen und erhöhter Tumoranfälligkeit führt [432, 435 - 439]. Ergebnisse aus Tierexperimenten lassen sich zwar nur bedingt auf den Menschen übertragen [432], aber auch bei Tieren kommen

sehr häufig nach Klonen (z.B. durch Zellkern-Transfer, SCNT) und vermehrt nach *in vitro*-Fertilisation Nachkommen unnatürlicher Größe, begleitet von diversen anderen Anomalien, zur Welt [440 - 449]. Tierexperimentelle Studien haben weiterhin ergeben, daß die Kulturbedingungen und Manipulationen von *in vitro* kultivierten Embryonen die Expression von geprägten Genen und das fetale Wachstum beeinflussen können [435, 450 - 454]. Im Vergleich zu *in vivo*-Embryonen zeigten *in vitro*-Kulturen von Rinderembryonen im präembryonalen Stadium unter anderem auch signifikante Unterschiede in der Expression der DNA-Methyltransferasen (DNMTs) [455]. Dabei verursacht beispielsweise eine Überexpression der DNMT1 bei der Maus eine genomweite Hypermethylierung und einen Verlust des Imprintings [456]. *Hiendleder et al.* konnten dagegen eine Verbindung zwischen hypermethylierter DNA und phänotypischen Eigenschaften bei Rinderföten nach SCNT und in geringerem Ausmaß auch bei Tieren nach *in vitro*-Fertilisation zeigen [457]. Die Autoren konnten eine signifikante genomische Hypermethylierung in Leber-DNA aus SCNT-Föten im Vergleich zu Föten aus künstlicher Besamung feststellen. Auch in der Leber-DNA von IVF-Föten ergab sich eine tendenzielle Hypermethylierung, die allerdings nicht statistisch signifikant war. Die SCNT- und die IVF-Föten zeigten dabei gegenüber den Kontrollen u.a. ein erhöhtes Fötengewicht, einen höheren Thoraxumfang und ein erhöhtes Lebergewicht [457].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde DNA von Rinderföten nach *in vitro*- und *in vivo*-Fertilisation hinsichtlich des genomweiten Methylierungsgrades analysiert, um Auswirkungen verschiedener IVF-Kulturbedingungen auf diesen zu untersuchen. Die DNA wurde von der Arbeitsgruppe *Hiendleder* (Lehrstuhl für molekulare Tierzucht und Haustiergenetik, Ludwig-Maximilian-Universität, München) zur Verfügung gestellt. Bei den Proben aus der *in vitro*-Fertilisation handelte es sich um DNA aus Hirn- und Muskelgewebe lebensfähiger, 80 Tage alter Rinderföten, die nach zwei IVF-Protokollen (IVF 1 und IVF 2) generiert wurden. Die Kulturmedien der beiden IVF-Protokolle unterschieden sich in der Konzentration eines während der Reifung der Eizellen zugefügten Gonadotropins und in der Serumkonzentration während der Embryonalkultur. Durch die Applizierung von Gonadotropinen in bestimmten Dosen kann die Zahl der befruchtungsfähigen Eizellen erhöht und damit ein multifollikuläres Wachstum induziert werden [458, 459]. Die *in vivo* fertilisierten Kontrollföten wurden durch künstliche Besamung (AI = artificial insemination) erhalten. 57 erhaltene DNA-Proben wurden nach einer leicht modifizierten Probenvorbereitung (PVV 3) präpariert, da zu diesem Zeitpunkt eine erneute Herstellung der MN/SPD-Enzymmischung erforderlich wurde und Testanalysen an CT-DNA-Proben eine Verschlechterung der Enzymqualität ergaben. Daher wurde bei der Hydrolyse dieser Proben eine Enzymmischung mit 150 mU/mL MN und

12,5 mU/mL SPD eingesetzt und das Hydrolysevolumen entsprechend angepaßt. Die anschließende Derivatisierung wurde wieder gemäß den in PVV 2 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Die kapillarelektrophoretische Analyse der Proben erfolgte nach Methode II. Die Anzahl der Analysen pro Probe betrug mindestens sechs. Abbildung 4-12 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchung.

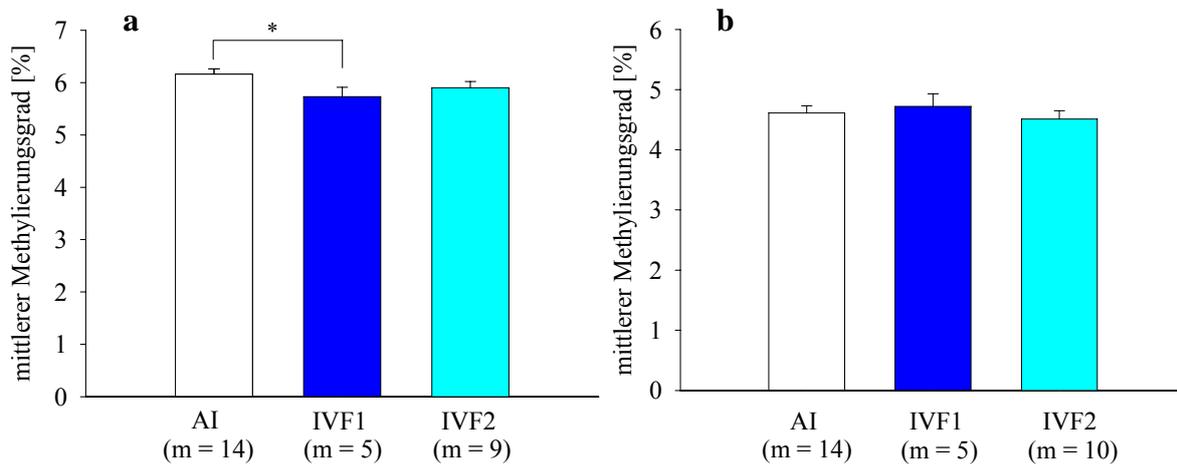


Abbildung 4-12: Mittelwerte mit Standardabweichung für den genomweiten Methylierungsgrad in (a) Muskel- und (b) Hirngewebe von 80 Tage alten Rinderföten; AI = *in vivo* fertilisierte Kontrollföten, IVF1 = *in vitro* fertilisierte Föten nach IVF-Protokoll 1, IVF2 = *in vitro* fertilisierte Föten nach IVF-Protokoll 2; m = jeweilige Anzahl der Proben; die eckige Klammer mit dem Sternsymbol impliziert einen statistisch signifikanten Unterschied (t-Test) [460].

Die genomweiten Methylierungsgrade in dieser Studie lagen im Bereich von 4,88 - 6,56 % (Mittelwert: $5,97 \pm 0,09$ %) in DNA aus Muskelgewebe und im Bereich von 3,13 - 5,50 % (Mittelwert: $4,78 \pm 0,14$ %) in zerebraler DNA und zeigten damit eine sehr gute Übereinstimmung mit anderen publizierten Daten aus verschiedenen Säugetiergeweben [461, 462]. Die gewebspezifischen Unterschiede in der Methylierung waren statistisch hochsignifikant ($P < 0,0001$) [460]. Die hier ermittelten Daten ergaben weiterhin eine schwach signifikante genomweite Hypomethylierung im Muskelgewebe zwischen Föten aus dem IVF-Protokoll 1 (IVF1) und den Kontrollföten aus der künstlichen Besamung (AI) (- 9,3 %; $P = 0,042$) [460]. Die zerebralen Methylierungsgrade zeigten dagegen keine signifikanten Unterschiede innerhalb der verschiedenen fötalen Gruppen. Phänotypisch wiesen die Föten aus der IVF1-Gruppe im Vergleich zu den *in vivo* fertilisierten keine Abnormalitäten auf, während die aus der IVF2-Gruppe ein übermäßiges fötales Wachstum erkennen ließen [460]. Die genomweite

Hypomethylierung im Muskelgewebe der IVF1-Föten ist aus reproduktionsbiologischer Sicht eine neue und unerwartete Erkenntnis [463].

4.3 Nachweis endogener DNA-Addukte mittels CE-LIF

Wie bereits in Kapitel 2.3.4 erwähnt, haben DNA-Addukte als Biomarker eine wichtige Bedeutung in der chemischen Kanzerogenese, da sie eine effektivere Risikoabschätzung für eine sich entwickelnde Mutations-basierende Erkrankung ermöglichen als eine externe Expositionsbestimmung [72]. Im Forschungsbereich der Krebsprävention füllt die DNA-Addukt-Analytik eine wichtige Nische aus [72], da für eine erfolgreiche Krebsvorbeugung die Aufklärung der Ursachen und Mechanismen der Kanzerogenese unverzichtbar sind. Dabei rücken endogene Addukte, die aus zellulären Stoffwechselprozessen resultieren, immer mehr in den wissenschaftlichen Fokus [103, 464]. Von diesen Addukten stellen die durch ROS gebildeten, oxidierten Formen der natürlichen Nukleobasen den überwiegenden Anteil dar [103]. Die wissenschaftliche Aufmerksamkeit richtete sich seit den 1990er Jahren aber auch auf exozyklische DNA-Addukte, deren endogene Bildung auf die Reaktion von Produkten der Lipidperoxidation (LPO) mit der DNA zurückgeführt wird [103, 465, 466]. Das mutagene Potential exozyklischer Addukte ist in verschiedenen Untersuchungen belegt worden [467 - 471], und somit könnten solche Addukte für ein erhöhtes Krebsrisiko verantwortlich sein.

Für die co-chromatographische Zuordnung der Signale von endogenen DNA-Addukten mittels CE-LIF sind Standardverbindungen erforderlich, die kommerziell nicht zu Verfügung stehen.

4.3.1 Standardverbindungen für die Analyse endogener DNA-Addukte

Für das in dieser Arbeit verwendete CE-LIF-Verfahren sind DNA-Addukte in Form von 3'-Mononukleotiden notwendig. Diese sind im Gegensatz zu den 5'-Mononukleotiden oder den Nukleosiden kaum erhältlich, weshalb eine Synthese von solchen DNA-Addukten erforderlich wurde. Ziel war es, ein grundlegendes Syntheschema zu entwickeln, das auf sehr viele Verbindungen mit modifizierten Basen übertragen werden kann. Im Arbeitskreis von *Prof. Altenbach* (Organische Chemie, Bergische Universität Wuppertal) wurde im Zuge einer Kooperation die in Abbildung 4-13 gezeigte Synthesestrategie entwickelt und von *vom Brocke* in seiner Diplomarbeit umgesetzt [472].

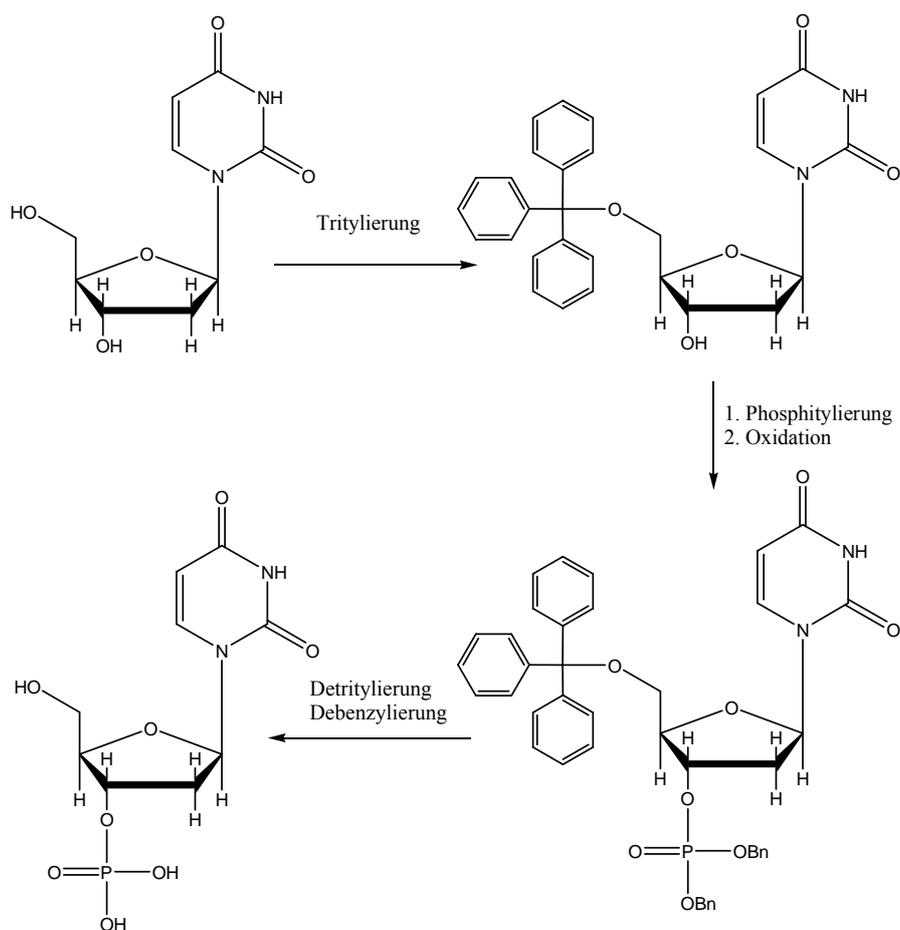


Abbildung 4-13: Grundlegende Syntheseroute zur Herstellung endogener Addukte am Beispiel von 2'-Desoxyuridin-3'-monophosphat (dUMP); Bn = Benzyl

Dadurch konnten vier verschiedene endogene Addukte als Standardverbindungen für den co-chromatographischen Nachweis zur Verfügung gestellt werden (Abbildung 4-14) [256]. Die ausführliche Synthese und Charakterisierung ist in den Arbeiten von *vom Brocke* [472], *Wirtz et al.* [256] und *Schumann* [473] beschrieben.

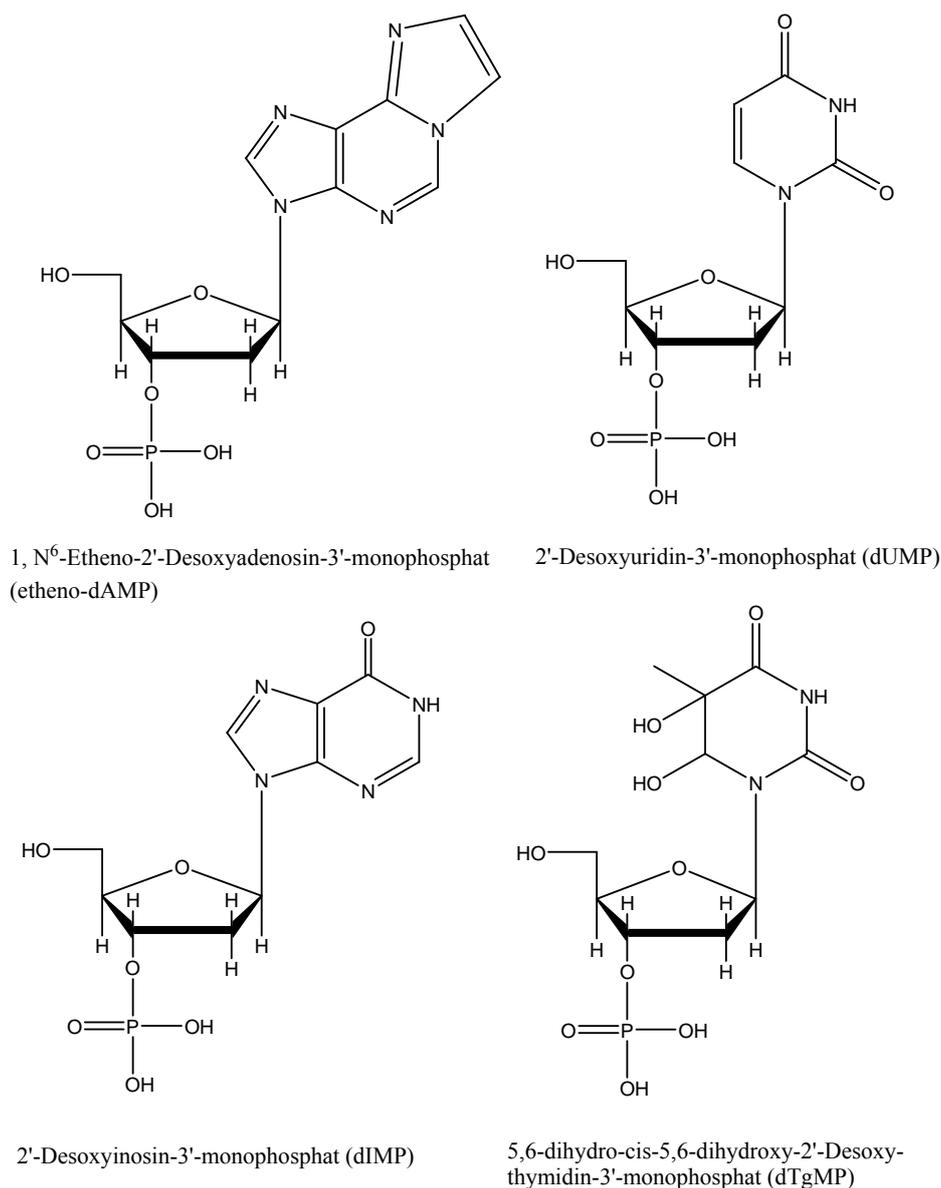


Abbildung 4-14: Synthetisierte Standardverbindungen für den co-chromatographischen Nachweis von endogenen DNA-Addukten [256, 472]

4.3.2 Co-chromatographische Analyse von endogenen Addukten in mitochondrialer und genomischer DNA aus Rinderleber und humanem Blut

Nach Bereitstellung der Standardverbindungen dUMP und dTgMP gelang der co-chromatographische Nachweis dieser Verbindungen in mitochondrialer (mtDNA) und genomischer DNA (nDNA) aus Rinderleber und humanem Blut nach vorheriger Isolierung der DNA [256, 473]. Dabei wurde eine 2,4-fach höhere Konzentration an dTgMP und eine 1,7-fache geringere Konzentration an dUMP in mitochondrialer DNA aus Rinderleber gegenüber der genomi-

schen DNA gefunden. Darüber hinaus konnte eine 22-fach höhere Konzentration von dTgMP und eine 6-fach geringere Konzentration an dUMP in thrombozytärer, humaner mtDNA im Vergleich zu genomischer DNA (Gesamt-DNA) festgestellt werden [473]. Mitochondriale DNA stellt im Gegensatz zu nuklearer DNA aufgrund der Nähe zur Elektronentransportkette ein bevorzugtes Ziel für die entstehenden ROS dar. Zudem verfügt mtDNA über weniger effiziente Reparaturmechanismen, und ihr fehlen schützende Histone [56, 111, 474, 475]. Diese Faktoren gelten als verantwortlich für eine erhöhte Anfälligkeit von mtDNA gegenüber oxidativen Schäden und somit endogenen Addukten [475]. So konnten *Richter et al.* z.B. einen 16,3-fach höheren Anteil an 8-oxo-dG in mitochondrialer DNA aus Rattenleber gegenüber nuklearer DNA nachweisen [475]. Die Anwesenheit von dUMP in einer DNA erscheint sicherlich zunächst überraschend, es kann sich dort aber aufgrund zweier unterschiedlicher Mechanismen bilden. Der erste Mechanismus ist ein direkter Einbaufehler von Desoxyuridin-triphosphat (dUTP) statt des regulären Desoxythymidin-triphosphats (dTTP) durch die DNA-Polymerase während der Replikation und der Reparatur, woraus eine U:A Basenpaarung resultiert. Die zweite Möglichkeit ist eine oxidative Desaminierung von Cytidin, die zu einer U:G Mismatch-Paarung führt.

4.3.3 Optimierung der kapillarelektrophoretischen Bedingungen für den Nachweis der endogenen Addukte

Weder mit dem bislang zur Quantifizierung von 5m-dCMP eingesetzten Elektrolyten noch durch einfache Variation des SDS-Gehaltes oder des Gehaltes an organischem Modifier war es möglich, alle vier bereitgestellten endogenen Addukte reproduzierbar zu trennen. Dies machte eine umfangreichere Anpassung des Elektrolyten und der elektrophoretischen Parameter erforderlich. Dies gelang durch Zusatz eines weiteren Micellenbildners zum Elektrolyten und Änderung der Trennungsspannung.

Der bislang bei der Bestimmung des Methylierungsgrades verwendete Elektrolyt B, bestehend aus 95 mM SDS in 20 mM Natriumphosphatpuffer pH = 9,0 mit 10 % (v/v) Methanol, zeigte eine hervorragende Trennung der Hauptnukleotidkonjugate. Daher wurde dieser als Basiselektrolyt zur Optimierung der Trennung von dIMP, dUMP, dTgMP und etheno-dAMP verwendet. Dem Basiselektrolyten wurden dann verschiedene nichtionische Tenside (Polyoxyethylenester und Polyoxyethylenether) als weitere Micellenbildner zugesetzt. Tabelle 4-8 gibt einen Überblick über die ausgewählten Micellenbildner. Sie sind kommerziell erhältlich

und unterscheiden sich im Wesentlichen in ihrer Alkylkettenlänge und im Ethoxylierungsgrad, wodurch unterschiedliche Lipophilien resultieren. Der Zusatz eines weiteren ionischen Tensids würde den Strom unnötig erhöhen, weshalb auf zusätzliche ionische Tenside verzichtet wurde. Die Konzentration der zugesetzten nichtionischen Tenside betrug zunächst 2,5 mg/mL Basiselektrolyt und lag oberhalb der CMC dieser Tenside [476, 477].

Handelsname des Tensids (Abkürzung)	Bezeichnung der Substanz	Summenformel
Brij 56	POE(10)cetylother	C ₁₆ E ₁₀
Brij 78	POE(20)stearylother	C ₁₈ E ₂₀
Brij 98	POE(20)oleylether	C ₁₈₋₁ E ₂₀
Brij 58	POE(20)cetylother	C ₁₆ E ₂₀
Brij 35	POE(23)laurylother	C ₁₂ E ₂₃
Talgalkohol EO 40	POE(40)fettalkohol(12-14)ether	C ₁₂₋₁₄ E ₄₀
Dehydol LS 50	POE(50)fettalkohol(12-14)ether	C ₁₂₋₁₄ E ₅₀
Myrj 45	PEG(8)stearat	C ₁₈ E ₈
Myrj 52	PEG(40)stearat	C ₁₈ E ₄₀
Myrj 59	PEG(100)stearat	C ₁₈ E ₁₀₀

Tabelle 4-8: Übersicht über die ausgewählten, zum Basiselektrolyten zugesetzten nichtionischen Tenside, diese sind innerhalb ihrer jeweiligen Substanzklasse (Polyethylenoxidfettalkoholether bzw. Polyethylenoxidfettsäureester) nach steigender, relativer Polarität [478 - 480] aufgelistet; C_n = Alkylkettenlänge; E_n = Ethylenoxid; POE = Polyoxyethylen; PEG = Polyethylenglykol.

Die Ergebnisse dieser Testreihe zeigten, daß je nach relativer Polarität des verwendeten nichtionischen Tensids die Signale der dIMP-, dUMP-, dTgMP- und etheno-dAMP-Konjugate unterschiedlich gut von den Hauptnukleotidsignalen (dAMP, dGMP, dTMP, dCMP und 5m-dCMP) getrennt wurden. Je polarer der Tensidzusatz wurde, desto schlechter konnte dUMP von dTgMP und von den Nachbarsignalen dAMP und dGMP getrennt werden. Im Gegensatz dazu stieg die Auflösung von dTMP und etheno-dAMP mit steigender Polarität des nichtionischen Tensids an. Auch zeigte das Signal von dIMP eine ansteigende Auflösung zu dAMP. Bei sehr polaren Zusätzen ergab sich aber eine Co-Migration von dIMP mit einem der Hauptabbauprodukte des Fluoreszenzmarkers. Der Elektrolyt mit dem nichtionischen Zusatz Myrj 45 stellte einen akzeptablen Kompromiß für die Trennung der endogenen Addukte un-

tereinander und zu den Hauptnukleotidkonjugaten dar. Allerdings war die Lage der Signale von dUMP und dTgMP zwischen den Hauptnukleotiden dAMP und dGMP im Hinblick auf eine reproduzierbare Analyse der Addukte in geringen Konzentrationen ungünstig. Durch eine Senkung des Methanol-Gehaltes sowie eine Verringerung des Myrj 45-Gehaltes im Puffer gelang es, die Migrationsreihenfolge so zu verändern, daß dUMP und dTgMP vor dem Hauptnukleotid dAMP bei gleichzeitiger Basislinientrennung migrierten (Abbildung 4-15). Durch die Reduzierung der MeOH-Konzentration im Elektrolyten verringerte sich auch gleichzeitig die Analysenzeit. Das optimierte Elektrolytsystem enthielt schließlich 1,5 mg/mL Myrj 45, 95 mM SDS, 5 % (v/v) Methanol und 19 mM Natriumphosphatpuffer pH = 9,0 (Elektrolyt C). Vor der Verwendung wurde der Elektrolyt im Wasserbad auf die verwendete Analysentemperatur temperiert.

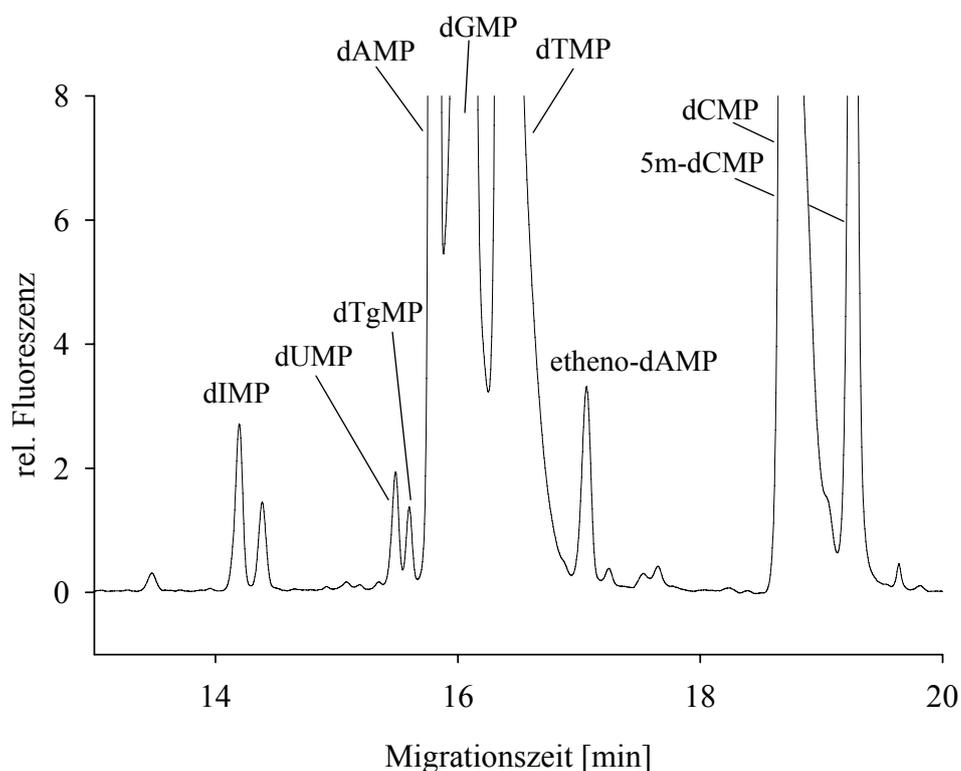


Abbildung 4-15: Ausschnitt eines Elektropherogramms der Analyse einer 10 µg CT-DNA-Probe (PVV 2), die vor der Analyse mit unterschiedlichen Konzentrationen fluoreszenzmarkiertem dIMP (13,4 nmol/L), dUMP (7,2 nmol/L), dTgMP (6,2 nmol/L) und etheno-dAMP (12,6 nmol/L) aufgestockt wurde. Die Probe wurde nach Methode III analysiert.

Die unterschiedlichen Migrationszeiten der Nukleotide und insbesondere der endogenen Addukte sind bei einem derartig komplexen Elektrolytsystem mit zwei unterschiedlichen Micellenbildnern nicht vorhersagbar. In der Literatur wird bei einem binären Gemisch zweier

Amphiphile, besonders bei Mischungen aus ionischen und nichtionischen Tensiden, über die Ausbildung von gemischten Micellen diskutiert [476, 481 - 485]. Als Gründe für die Bildung derartiger Mischmicellen werden z.B. die Entstehung dichter, energetisch günstigerer Packungen im Micelleninnern durch unterschiedlich lange hydrophobe Molekülschwänze oder die Aufhebung elektrostatischer Abstoßungseffekte im geladenen, hydrophilen Kopf des ionischen Tensids bei Einschleiben nichtionischer Gruppen genannt [484]. In dem komplexen Elektrolytssystem ist das Vorliegen eines Gleichgewichtes zwischen Mischmicellen, SDS-Micellen, Monomeren und der wäßrigen Pufferphase denkbar. Im Gegensatz zu den ionischen SDS-Micellen besitzen die Mischmicellen eine geringere Ladungsdichte, aufgrund derer sie eine kürzere Migrationszeit zum Detektor haben. Das bedeutet, daß sich das micellare Fenster in binären Gemischen stark ändert. Wechselwirkungen einzelner Analyten mit Bestandteilen solcher Systeme sind aufgrund der komplexen Zusammensetzung nicht ableitbar. Zudem muß berücksichtigt werden, daß es sich bei den zugesetzten nichtionischen Tensiden nicht um Reinsubstanzen handelt, sondern, daß diese selbst Gemische mit unterschiedlicher Alkylkettenverteilung und Ethoxylierung darstellen. Die vom Hersteller genannte Substanzbezeichnung gibt meist lediglich die Hauptkomponente des Produktes an.

4.3.4 Bestimmung der Korrekturfaktoren für die synthetisierten endogenen Addukte

Aufgrund der Erfahrungen mit den unmodifizierten Nukleotiden wurde vermutet, daß auch bei den synthetisierten endogenen DNA-Addukten unterschiedliche Derivatisierungsausbeuten und Fluoreszenzquenching-Effekte auftreten würden. Letzteres wurde vor allem bei dem strukturell zu dGMP verwandtem dIMP erwartet. Die bereits eingesetzte Methode der Korrekturfaktorermittlung mittels λ -DNA, bei der die Hydrolyse- und Derivatisierungseffizienz sowie die Quantenausbeute des Fluoreszenzmarkers berücksichtigt werden, konnte leider nicht auf die endogenen Addukte übertragen werden, da λ -DNA keine endogenen Addukte in nachweisbarer Konzentration enthält. Deshalb konnten für die Standards lediglich Korrekturfaktoren ermittelt werden, die die Derivatisierungseffizienz und die Quantenausbeute der gelabelten Verbindung berücksichtigten. Dazu wurden jeweils 10 μ g von dIMP, dUMP, dTgMP, etheno-dAMP sowie 10 μ g des kommerziell erworbenen dCMP derivatisiert (PVV 6). Anschließend wurde jeder derivatisierte Standard zunächst einzeln 1:40 in Wasser verdünnt. Danach wurden jeweils 10 μ L der verdünnten Lösungen zusammengefügt und mit

Wasser auf 1000 μL aufgefüllt, woraus sich eine Gesamtverdünnung jedes einzelnen Standards von 1:4000 ergab. Die Mischung wurde sechsmal nach Methode III kapillarelektrophoretisch analysiert. Die erhaltenen korrigierten Peakflächen wurden anschließend auf die korrigierte Peakfläche von dCMP normiert und daraus die Korrekturfaktoren ermittelt (Tabelle 4-9) [256].

n = 6	fluoreszenzgelabelte Nukleotide				
	dIMP	dUMP	dTgMP	etheno-dAMP	dCMP
korrigierte Peakfläche der Nukleotide	14568 \pm 364	12769 \pm 319	18564 \pm 464	11772 \pm 294	19658 \pm 491
Korrekturfaktoren	1,35 \pm 0,06	1,54 \pm 0,03	1,06 \pm 0,03	1,67 \pm 0,05	1,00

Tabelle 4-9: Ermittelte Peakflächen und Korrekturfaktoren für die modifizierten Nukleotide [256], normiert auf dCMP; die Peakflächen und die ermittelten Faktoren stellen jeweils die Mittelwerte aus 6 Messungen dar.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß in Relation zu dCMP lediglich der dTgMP-Standard eine ähnliche Signalfäche aufweist, alle anderen zeigen kleinere Signale. Bei dIMP und etheno-dAMP könnte ein Quenchprozeß analog dem von dGMP dafür verantwortlich sein. Dies ist bei dUMP aufgrund der strukturellen Analogie zum dCMP und dTMP allerdings nicht wahrscheinlich.

Mit diesen Faktoren können nur die bereits angesprochenen Derivatisierungs- und Quenching-Einflüsse korrigiert werden, potentielle Unterschiede in der Hydrolyseeffizienz der einzelnen endogenen Addukte fließen dort nicht mit ein. Daher können diese Faktoren lediglich eine Näherung darstellen. Abbildung 4-16 zeigt ein Elektropherogramm der Analyse dieser Standardverbindungen. Zum Vergleich wurden der verdünnten Probe in gleicher Konzentration noch das fluoreszenzmarkierte, käuflich erworbene dTMP und der von *Kliem* (DKFZ Heidelberg) synthetisierte und charakterisierte Standard von 5m-dCMP [255], ebenfalls fluoreszenzmarkiert, zugesetzt.

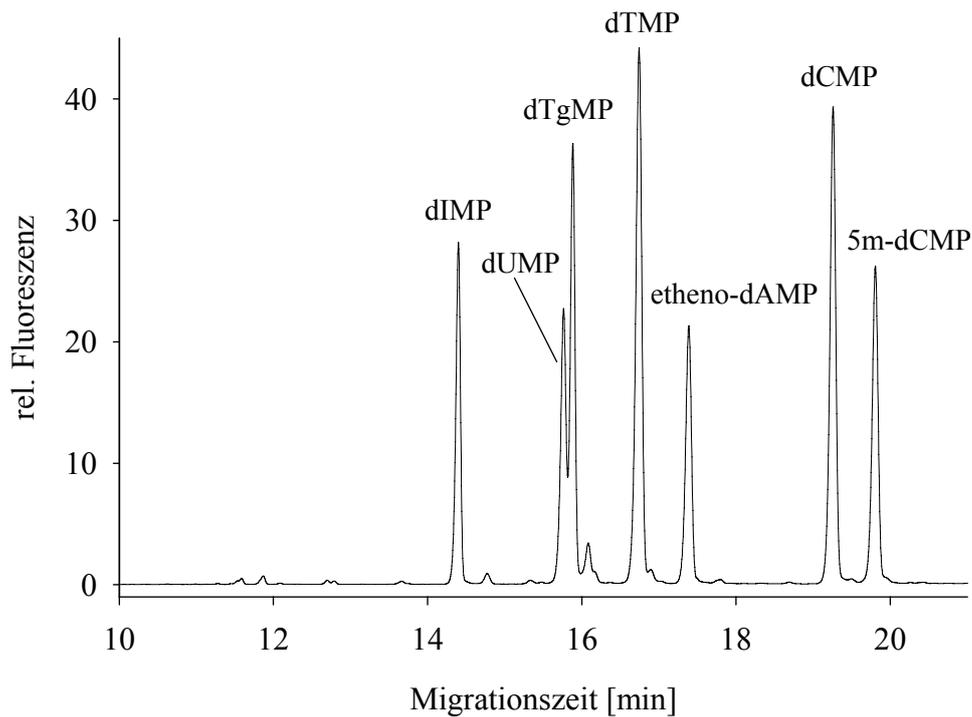


Abbildung 4-16: Elektropherogramm der Analyse einer 1:4000 in Wasser verdünnten Probe aus Derivaten von dIMP, dUMP, dTgMP, dTMP, etheno-dAMP, dCMP und 5m-dCMP (je 10 µg). Die Trennung erfolgte nach Methode III.

4.3.5 Quantifizierung von etheno-dAMP und dUMP in *in vivo*-Proben

Nach erfolgreicher Trennung der zur Verfügung gestellten Standardverbindungen und nach Bestimmung der Korrekturfaktoren konnte eine Identifizierung und Quantifizierung von dUMP und etheno-dAMP in vier DNA-Proben von B-CLL-Patienten durchgeführt werden. Die co-chromatographische Bestimmung der endogenen Addukte erfolgte mittels Standardadditionsverfahren. Tabelle 4-10 zeigt die nach diesem Verfahren erhaltenen Konzentrationen der Addukte, die zuvor bestimmten Methylierungsgrade sowie die klinischen Parameter (VH-Homologie und ZAP-70-Status) der Patienten.

Zur Durchführung der Quantifizierung wurden die hydrolysierten und derivatisierten DNA-Proben (je 10 µg, präpariert nach PVV 2) mit 2 - 4 unterschiedlichen Konzentrationen der fluoreszenzmarkierten Standards aufgestockt (von etwa 1,0 bis max. 7,2 nM) und mehrfach mit und ohne Standardzusatz kapillarelektrophoretisch nach Methode III analysiert. Abbildung 4-17 zeigt beispielhaft die Elektropherogramme der Analyse eines Patienten (Patient D)

Patient	A	B	C	D
ermittelte Konzentration dUMP [nM]	0,115 ± 0,022	0,169 ± 0,015	0,157 ± 0,022	0,077 ± 0,020
Korrelationskoeffizient	1,0000	1,0000	0,9842	0,9795
ermittelte Konzentration etheno-dAMP [nM]	0,923 ± 0,170	0,589 ± 0,108	0,564 ± 0,099	0,467 ± 0,101
Korrelationskoeffizient	0,9999	1,0000	0,9928	0,9751
Anzahl der Analysen	n = 3; n ₀ = 15; n _A = 8	n = 3; n ₀ = 5; n _A = 4	n = 3; n ₀ = 4; n _A = 4	n = 2; n ₀ = 2; n _A = 2
RAL (dUMP)	(53 ± 10) · 10 ⁶	(77 ± 7) · 10 ⁶	(72 ± 10) · 10 ⁶	(35 ± 10) · 10 ⁶
RAL (etheno-dAMP)	(42 ± 7) · 10 ⁵	(27 ± 6) · 10 ⁵	(26 ± 5) · 10 ⁵	(21 ± 4) · 10 ⁵
Methylierungsgrad [%]	4,14 ± 0,05	3,97 ± 0,08	3,97 ± 0,08	3,71 ± 0,01
VH-Homologie [%]	kA	100	92	95
ZAP-70 Expression	kA	40	1	1

Tabelle 4-10: Ergebnis der quantitativen Bestimmung endogener DNA-Addukte in DNA-Proben von Patienten mit B-CLL mittels Standardadditionsverfahren; kA = keine Angabe; n = Anzahl der Teilproben (= in Wasser verdünnte Aliquote einer präparierten DNA-Probe); n₀ = Anzahl der Mehrfachanalysen pro Teilprobe ohne Aufstockung; n_A = durchschnittliche Anzahl an Mehrfachanalysen pro aufgestockter Teilprobe.

Proben (je 10 µg, präpariert nach PVV 2) mit 2 - 4 unterschiedlichen Konzentrationen der fluoreszenzmarkierten Standards aufgestockt (von etwa 1,0 bis max. 7,2 nM) und mehrfach mit und ohne Standardzusatz kapillarelektrophoretisch nach Methode III analysiert. Abbildung 4-17 zeigt beispielhaft die Elektropherogramme der Analyse eines Patienten (Patient D) ohne Standardzusatz (schwarz) und mit Zusatz von dIMP, dUMP und etheno-dAMP (blau).

Die in Tabelle 4-10 angeführten Fehler der jeweiligen Konzentrationen wurden aus den Standardabweichungen der Flächenwerte der unaufgestockten Proben und durch anschließendes Einsetzen in die Geradengleichung der aus der Standardaddition erhaltenen Regression berechnet. Eine Fehleranalyse nach DIN ISO 32633 für das Standardadditionsverfahren wurde ebenfalls durchgeführt, lieferte aber aufgrund der geringen Anzahl an Mehrfachbestimmungen und Aufstockkonzentrationen unrealistische Werte. Die erhaltenen korrigierten Peakflä-

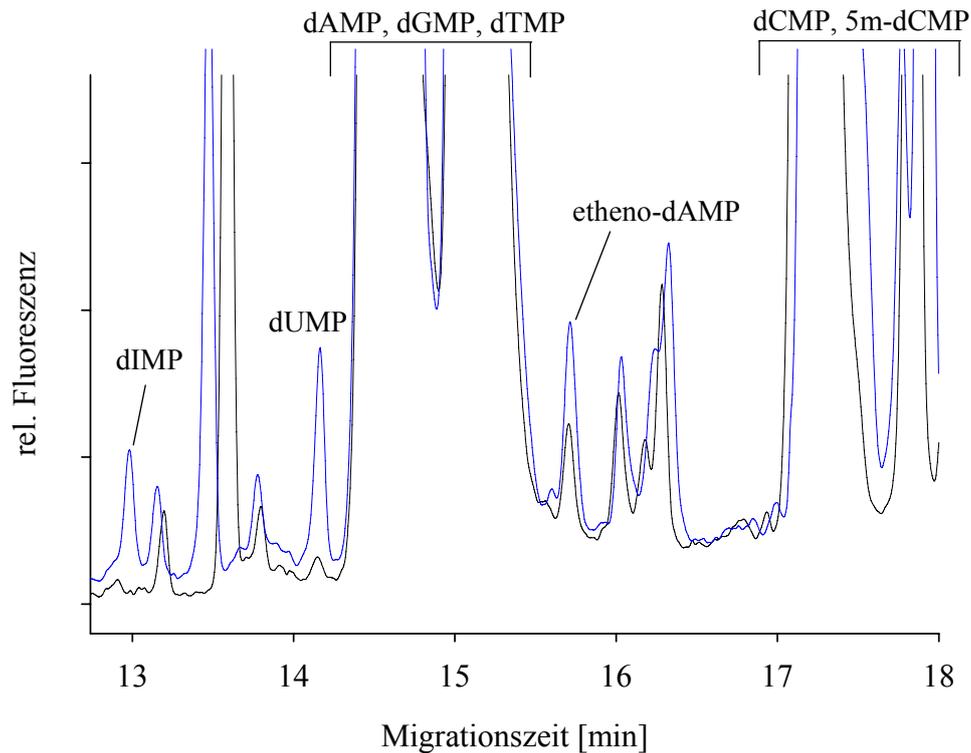


Abbildung 4-17: Vergrößerter Ausschnitt der Elektropherogramme der DNA-Analyse eines B-CLL-Patienten (Patient D); (schwarz) Probe ohne Standardzusatz; (blau) die Probe wurde mit 1,68 nM dIMP-, 1,81 nM dUMP- und 1,57 nM etheno-dAMP-Standardzusatz aufgestockt und nach Methode III analysiert.

chen der Addukte wurden auf die korrigierten Peakflächen von dCMP normiert. Die in Kapitel 4.3.4 ermittelten Korrekturfaktoren wurden entsprechend berücksichtigt, wobei dCMP zur Flächennormierung ausgewählt wurde. Die Verwendung von dTMP oder dAMP als interner Standard zur Flächennormierung war aufgrund einer nicht vollständigen Basislinientrennung zum dGMP-Konjugat-Signal nicht sinnvoll. Abbildung 4-18 zeigt exemplarisch das Ergebnis des Standardadditionsverfahrens bei der Bestimmung von etheno-dAMP in der DNA-Probe eines B-CLL-Patienten (Patient A).

Zur Untersuchung, ob der Peak, der co-chromatographisch als etheno-dAMP identifiziert wurde, nicht aus einer Co-Elution mit einer anderen Substanz resultierte, wurde das micellare System so verändert, daß die Migrationsreihenfolge von dTMP und etheno-dAMP umgekehrt wurde. Aus den umfangreichen Untersuchungen zur Trennungsoptimierung (Kapitel 4.3.3) war bekannt, mit welchen Einflüssen (Konzentration des nichtionischen Tensids, Methanolgehalt, Trenntemperatur, Trennungsspannung) die Migrationstendenzen der endogenen Addukte beeinflusst werden konnten. Durch eine drastische Erhöhung der Konzentration der

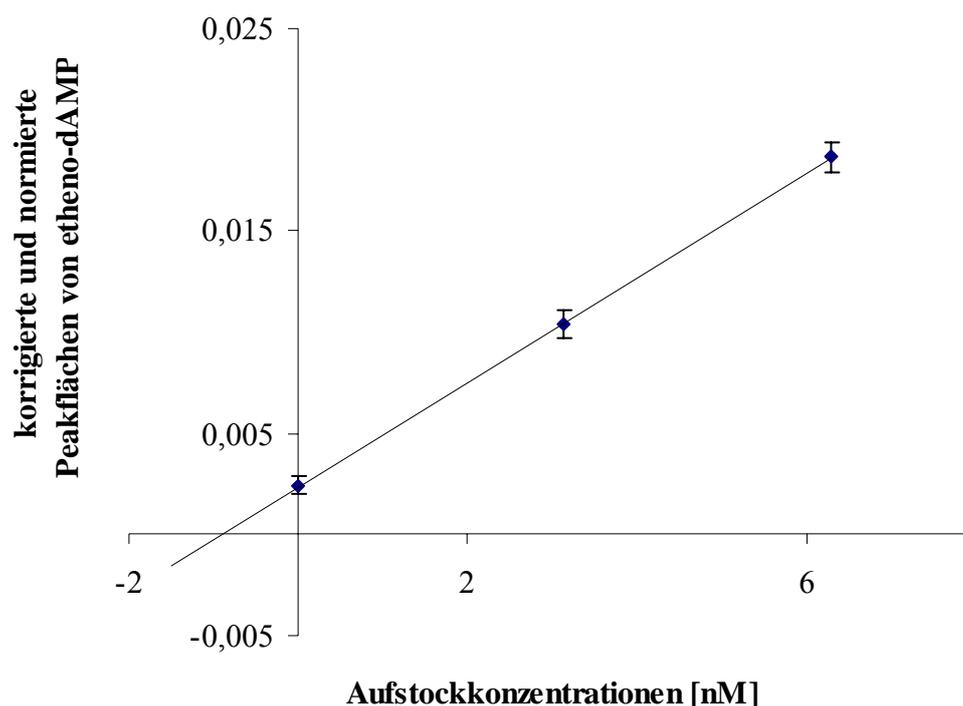


Abbildung 4-18: Ergebnis der Standardaddition bei der Bestimmung von etheno-dAMP in der DNA-Probe eines B-CLL-Patienten (Patient A) mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,9999. Der erhaltene etheno-dAMP-Gehalt in der Probe betrug 923 ± 170 pM.

nichtionischen, oberflächenaktiven Substanz (Myrj 45) und einer Erhöhung des Anteils an organischem Modifier (MeOH) gelang die angesprochene Elutionsumkehr. Eine DNA-Probe eines B-CLL-Patienten (Patient C) mit bekanntem etheno-dAMP-Gehalt (564 pM) wurde nach Methode V analysiert und hinsichtlich der korrigierten Peakfläche des verschobenen etheno-dAMP-Konjugat-Signals ausgewertet. Parallel dazu wurde die gleiche Probe nochmals mit der zur Quantifizierung verwendeten Methode III analysiert. Die erhaltenen korrigierten Flächen stimmten innerhalb der bei der Quantifizierung ermittelten Fehlergrenzen überein. Auch mit dem geänderten Elektrolytsystem wurde also ein hoher etheno-dAMP-Gehalt festgestellt, so daß eine zufällige Co-Elution des etheno-dAMP-Signals mit einer anderen Matrixkomponente nahezu ausgeschlossen werden konnte.

Oltra et al. [486] haben gezeigt, daß die B-CLL eine neoplastische Erkrankung darstellt, bei der eine hohe Empfänglichkeit für Veränderungen im Antioxidationssystem und für die Ausprägung von oxidativem Streß besteht. Die Autoren beschrieben eine Zunahme der Malondialdehyd-Konzentration um den Faktor 4 im Verlauf der Erkrankung verglichen mit nicht erkrankten Personen [486]. Malondialdehyd ist ein Hauptprodukt der LPO [114], und ungesättigte Fettsäuren stellen im Vergleich zur DNA bedeutend bessere Angriffsziele für Oxidantien

dar [157]. Die Oxidation dieser Substanzen löst allerdings eine autokatalysierte Reaktionskaskade aus, bei der zahlreiche genotoxische Verbindungen gebildet werden können [487]. Bei diesen Fettsäuremetaboliten spielen neben Malondialdehyd auch verschiedene Hydroxyalkenale (z.B. 4-Hydroxy-2-nonenal) eine bedeutende Rolle. Die Anwesenheit von Hydroperoxiden ermöglicht eine Epoxidierung dieser Enale und daraus folgernd eine mögliche Bildung exozyklischer Etheno-Addukte mit Guanin, Adenin und Cytosin [103, 488 - 490]. Das bedeutet, daß etheno-dAMP einer der oxidativen Schäden ist, die aus einer erhöhten LPO resultieren können [113, 491]. Deshalb war es nicht überraschend, ein erhöhtes Maß an etheno-dAMP in an B-CLL erkrankten Patienten zu finden. Die *in vivo* bereits detektierten Backgroundlevel in verschiedenen Geweben von Ratten und Mensch liegen bei 0,02 bis 10 etheno-dA auf 10^8 dA [468]. Für Lymphozyten nicht exponierter Ratten wurde ein Wert von 4,3 auf 10^8 , für humane Leber ein Bereich von $< 0,05$ bis 3,0 auf 10^8 angegeben [468]. In Leber-DNA bei Patienten mit erhöhter LPO aufgrund einer Metallspeicherkrankheit (Wilson's Syndrom) wurde ein auf 6,1 auf 10^8 gesteigertes Level an etheno-dA gefunden [468, 492]. Diese Patienten haben ein stark erhöhtes Risiko zur Bildung von Leberkarzinomen [492]. Des weiteren wurde darüber berichtet, daß eine hohe Aufnahme von ω -6-mehrfachungesättigten-Fettsäuren (ω -6-PUFAs) bei Frauen eine Erhöhung von etheno-DNA-Addukten in Leukozyten aufgrund gesteigerter LPO zur Folge hatte [493]. Für diese Frauen mit der sogenannten PUFA-Diät werden Werte von etheno-dA/dA von bis zu 901 auf 10^8 angegeben [468].

Im Gegensatz zu dUMP und etheno-dAMP konnte bei allen in dieser Arbeit untersuchten Proben kein dTgMP nachgewiesen werden. Eine sichere Quantifizierung von dIMP konnte nicht erfolgen, da die Konzentration entweder unterhalb der Nachweisgrenze lag (Abbildung 4-17) beziehungsweise in einer Probe das dIMP-Signal mit einer anderen nicht identifizierten Substanz coeluierte, so daß nur eine schwache Antrennung des dIMP-Signals mit dieser Substanz erreicht wurde [256]. Anhand der erhaltenen Ergebnisse (Tabelle 4-10) deutet sich ein tendenzieller Zusammenhang zwischen dem etheno-dAMP und dem Methylierungsstatus, dem VH-Status und der ZAP-70-Expression an. Diese Aussage müßte aber erst durch weitere Analysen mit einer deutlich höheren Probenzahl verifiziert werden.

Untersuchungen zeigen, daß ein Zusammenhang zwischen einem erhöhten Anteil an dUMP und einem Folat- bzw. 5-Methylcytosinmangel besteht [106]. *Progribny et al.* haben nach wenigen Wochen eine signifikante Zunahme an Uracil in Leber-DNA von Ratten festgestellt, bei denen sie einen ernährungsbedingten Folat- und 5-Methylcytosinmangel initiierten [106]. Aufgrund der Verwendung quantitativer PCR-Analysen haben die Autoren keine absoluten Konzentrationen an dUMP angegeben. Weitere Studien haben eine übermäßige Anwesenheit

von Uracil in humaner DNA aus Lymphozyten bei Personen mit Folatmangel ergeben [494, 495]. Desoxyuridin und die S-adenosylmethionin (SAM)-abhängige Bildung von 5-Methylcytosin stehen durch die Folat-abhängige Synthese (Folatmetabolismus) von Desoxythymidin-5'-monophosphat (Thymidylat) miteinander in Verbindung [407]. Über den Folatstatus der CLL-Patienten kann, wie bereits erwähnt, keine Aussage getroffen werden. Aber es stellt sich aufgrund der hier in dieser Arbeit erhaltenen Befunde und der verschiedenen Belege aus der Literatur die Frage, ob möglicherweise resultierend aus der erhöhten LPO und oxidativem Streß eine oxidative Desaminierung von Cytosin zu Uracil gefördert werden kann.

Als Fazit dieser Untersuchung läßt sich festhalten, daß etheno-dAMP eventuell als Biomarker für die chronisch lymphatische Leukämie geeignet sein könnte. Dabei stellt sich natürlich die Frage, ob die Bildung von etheno-dAMP eine Ursache oder eine Wirkung der Erkrankung ist und welche Schlußfolgerungen dann daraus in Bezug auf die Entwicklung einer CLL gezogen werden können. Die Analyse von etheno-dAMP als Biomarker für oxidativen Streß bietet zudem den Vorteil, daß die Substanz im Gegensatz zu dem für die Störung des Oxidations-Antioxidations-Gleichgewichtes am meisten untersuchten Biomarker, dem 8-oxo-Guanosin [496 - 499], gegenüber artifizieller Generierung nicht in gleichem Maße empfindlich ist. Es ist hinreichend bekannt, daß eine Untersuchung von 8-oxo-dG in Abhängigkeit der gewählten Analyse-methode sehr problematisch ist, da es bei der Probenvorbereitung oder während der Analyse durch z.B. ionisierende Strahlen, Anwesenheit von Sauerstoff, Silylierung etc. gebildet werden kann [102, 500 - 503]. Daher kann es sehr schwierig sein, zuverlässige Korrelationen zwischen einer Erkrankung und oxidativem Streß festzustellen, wenn lediglich 8-oxo-dG als Maßstab herangezogen wird. Da sich etheno-dAMP nicht allein durch Anwesenheit von Luftsauerstoff oder durch die anderen genannten Faktoren bilden kann, stellt es somit einen wesentlich sicheren und besseren Biomarker für eine endogene DNA-Schädigung durch oxidativen Streß dar.

4.3.6 Analyse von etheno-dAMP bei einer gesunden Person

Um eine Aussage über die Änderung der etheno-dAMP-Konzentration in B-CLL-Proben machen zu können, sollte als nächstes der Backgroundlevel von etheno-dAMP in lymphozytärer DNA bestimmt werden. Bedauerlicherweise konnte keine Kontrollprobe in Form einer DNA aus B-Lymphozyten einer nicht an B-CLL erkrankten Person von *Oscier* (Royal Bournemouth and Christchurch Hospital, UK) zur Verfügung gestellt werden. Daher wurde eine im Rahmen einer weiteren Kooperation mit der Arbeitsgruppe von *Kleinsasser* (Ökogenotoxiko-

logie der HNO-Klinik der Universität Regensburg) erhaltene DNA-Probe aus B-Lymphozyten einer gesunden Person (Vgl. Kontrollproben im Kapitel 4.2.3.2) hinsichtlich des etheno-dAMP-Gehaltes untersucht. Die DNA-Probe (10 µg) wurde nach PVV 2 hydrolysiert, derivatisiert und mehrfach sowohl mit als auch ohne anschließenden Standardzusatz kapillarelektrophoretisch nach Methode III analysiert. In Abbildung 4-19 sind Elektropherogramme einer Analyse ohne Standardzusatz (schwarz) und mit Zusatz von gelabeltem etheno-dAMP (blau, $c = 100 \text{ pM}$, PVV 6) dargestellt.

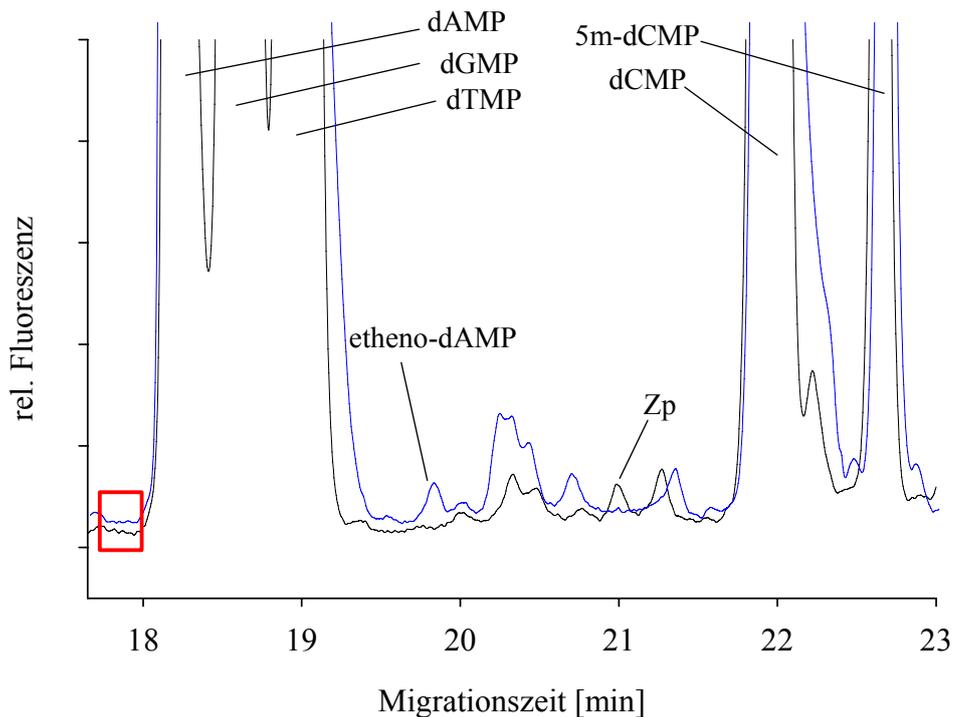


Abbildung 4-19: Vergrößerter Ausschnitt der Elektropherogramme einer Analyse von 10 µg DNA aus B-Lymphozyten einer gesunden Person ohne Standardzusatz (schwarz) und mit Zusatz von 100 pM gelabeltem etheno-dAMP (blau). Bei dem als Zp gekennzeichneten Signal handelt es sich um ein Zersetzungsprodukt des Fluoreszenzmarkers. In dem rot gekennzeichneten Bereich des Elektropherogramms migriert das dUMP-Signal. Die DNA-Probe wies einen Methylierungsgrad von $4,43 \pm 0,11$ auf.

Aus den Elektropherogrammen ist erkennenbar, daß der etheno-dAMP-Gehalt in der Kontrollprobe unterhalb der Nachweisgrenze (NWG) lag. Anhand der in Abbildung 4-17 dargestellten Analyse von etheno-dAMP eines Patienten mit B-CLL (Patient D) konnte in grober Näherung das Detektionslimit für dieses Addukt abgeschätzt werden. Das in dieser Probe detektierte Signal von etheno-dAMP wies ein S/N-Verhältnis von 24,6 auf. Das Basislinienrauschen wurde im Bereich vom Startpunkt der Elektrophorese bis zum EOF bei etwa 5,5 min graphisch ermittelt. Extrapoliert auf ein S/N-Verhältnis von 3, was der nach *Kaiser* und *Spek-*

ker definierten 3s-Schranke für die NWG [504] entspricht, und unter Berücksichtigung der in dieser Probe erhaltenen Konzentration an etheno-dAMP von 467 pM würde das theoretische Detektionslimit bei 57 pM liegen. Die Kontrollprobe wies demnach einen etheno-dAMP-Gehalt unterhalb dieser Konzentration auf. Des weiteren ist anhand der Abbildung 4-19 zu erkennen, daß in dem Bereich, in dem das dUMP-Signal erwartet wird, kein Peak erkennbar ist. Daher wurde auf eine zusätzliche Aufstockung der Probe mit fluoreszenzmarkiertem dUMP verzichtet. Unter Anwendung der beschriebenen groben Näherung würde sich für dUMP ein theoretisches Detektionslimit von 48 pM ergeben. Demnach wies die Kontrollprobe ebenfalls einen dUMP-Gehalt unterhalb von 48 pM auf.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß eine lymphozytäre DNA einer gesunden Person keine mit der CE-LIF detektierbare Konzentration an etheno-dAMP und dUMP enthielt. Ebenso konnte ein nachweisbarer Anteil an dTgMP anhand der relativen Migrationszeit ausgeschlossen werden. Dabei muß allerdings berücksichtigt werden, daß die DNA-Proben der B-CLL-Patienten und die Kontrollproben von verschiedenen Quellen bezogen und unterschiedlich isoliert wurden. Daher kann eine artifizielle Generierung dieser Addukte bei der DNA-Isolierung nicht komplett ausgeschlossen werden. Sie gilt allerdings aufgrund der bereits in Kapitel 4.3.5 angeführten Überlegungen hinsichtlich der oxidativen Stabilität für etheno-dAMP als sehr unwahrscheinlich. Da dUMP ein Produkt der oxidativen Desaminierung von dCMP darstellt [106] und diese bei der DNA-Isolierung nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, wäre eine Kontrollprobe aus gleicher Quelle wie die B-CLL-Proben wünschenswert.

4.4 Steigerung der Empfindlichkeit durch Konstruktion eines neuen LIF-Detektors

Mit dem bislang verwendeten Analysenverfahren konnten neben der reproduzierbaren Bestimmung des Methylierungsgrades bei einem sehr guten Probendurchsatz auch endogene Addukte im zweistelligen pM-Konzentrationsbereich nachgewiesen werden; d.h. bei einer notwendigen Probenverdünnung von 1:200 und einem RAL von beispielsweise 35 modifizierten auf 10^6 unmodifizierten Nukleotiden. Für Addukte in deutlich niedrigeren Konzentrationsbereichen war das Verfahren nicht sensitiv genug. Zur Erhöhung der Sensitivität wurde deshalb versucht, den vorhandenen LIF-Detektor durch ein externes Detektionssystem zu ersetzen.

4.4.1 Theoretische Vorüberlegungen

Um eine Entscheidung für ein entsprechend aussichtsreiches Detektionssystem zu treffen, wurden in Zusammenarbeit mit *Schütte* (LaVision BioTec) einige wichtige Aspekte diskutiert. Die Vorüberlegungen bezogen sich auf die Ausführungstechnik der LIF-Detektion und auf die einzelnen Komponenten, die bei einer LIF-Detektion notwendig und sinnvoll sind.

Laser

Das in kommerziell erhältlichen CE-Geräten integrierte LIF-Detektionssystem (Beckman Coulter) verwendet einen Ar-Ionen Laser mit einer Ausgangsleistung von 3 mW. Da die Intensität eines Fluoreszenzsignals proportional zur eingestrahnten Intensität ist, können durch eine höhere Laserleistung auch höhere Signalintensitäten erhalten werden. Das kann zu einer Steigerung der Empfindlichkeit führen, wenn nicht in demselben Maße wie die Laserleistung ansteigt, auch das Laserrauschen zunimmt. Die Laserleistung kann allerdings auch nicht unendlich erhöht werden, da ab einer bestimmten Photonendichte ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes auftritt (Photobleicheffekt). Deshalb wurde von *Schütte* ein Laser mit einer Ausgangsleistung von 40 mW vorgeschlagen, der bei der ersten Einrichtung des neuen Detektionssystems durch Fokussierung bzw. Defokussierung so eingestellt werden sollte, daß er im laufenden Elektrophoreseprozeß gerade unterhalb der Ausbleichgrenze betrieben wird.

Einstrahlung des Laserlichts

Die Fluoreszenzdetektion bei dem kommerziellen LIF-Detektionssystem basiert auf einer Durchlichtbeleuchtung, bei der das Anregungslicht senkrecht auf die Kapillare trifft, welche sich zwischen Lichtquelle und der Detektionseinheit befindet. Daher ist ein optischer Filter für die Anregungswellenlänge (488 nm Notch-Filter) in den Lichtgang des Fluoreszenzstrahles notwendig, um das durch Streulicht bedingte Hintergrundsignal zu verringern. Wie bei jedem Filter gibt es auch bei einem Notch-Filter Grenzen in der Unterdrückung von Streulicht. Diese hängen im Gesamtsystem von der Winkelverteilung des auftreffenden Streulichtes sowie dessen diffuser weiterer Ausbreitung im System ab [300]. Eine geringere Hintergrundstrahlung durch Streulicht kann z.B. durch eine Dunkelfeldbeleuchtung erzielt werden, bei der das Anregungslicht in einem Winkel von etwa 45 ° auf die Kapillare trifft. Dadurch fällt ein großer Teil des durchtretenden Anregungslichtes nicht direkt auf den Detektor. Eine Dunkelfeldbeleuchtung kann daher etwa um den Faktor 10 - 100 empfindlicher als eine Durchlichtbeleuchtung sein [300].

Fokussierung des Anregungsstrahls in die Kapillare

Ein weiterer Empfindlichkeitsgewinn kann durch gezielte Fokussierung in das Innere der Kapillare erreicht werden. Dadurch erhöht sich die Photonendichte (Laserintensität) im gewünschten Detektionsvolumen gegenüber einem einfach als Parallelstrahl auf die Kapillare gerichteten Laserstrahl. Diese Fokussierung kann z.B. mit einer entsprechenden Linse (Achromatlinse) erreicht werden [300].

Sammeleffizienz der Fluoreszenzemission

Die nach der Fluoreszenzanregung des Analyten emittierten Photonen sollten möglichst effektiv und verlustfrei gesammelt und zum Detektor geleitet werden. Zur Lichtkollektion bieten sich Objektive mit hoher numerischer Apertur (NA) und hoher Vergrößerung bei gleichzeitig geringem Arbeitsabstand an. Durch die hohe NA (z.B. 0.75 - 0.90) besitzen sie eine große Sammeleffizienz für die emittierten Fluoreszenzphotonen. Dieser Effekt kann ebenfalls positiv das S/N-Verhältnis beeinflussen.

Hintergrundstrahlung durch die Probenmatrix

Ein weiterer Nachteil des kommerziell erhältlichen LIF-Systems ist, daß das gesamte Fluoreszenzlicht ohne spektrale Auflösung mit einem Detektor aufgenommen wird. Das bedeutet, daß einerseits spektrale Verschiebungen der Fluoreszenz, welche aus Änderungen in der chemischen Umgebung resultieren können, nicht registriert werden. Andererseits können spektrale Eigenschaften von der Probenmatrix oder von Elektrolytkomponenten, die gegebenenfalls in den Bereich des Emissionsfilters fallen, nicht ausgeblendet werden. Damit können sie zu einer erhöhten Hintergrundstrahlung beitragen und folglich die Sensitivität einschränken. Eine Lösung dafür bietet z.B. der Einsatz von Fluoreszenzspektrometern, die eine spektrale Auflösung in einem bestimmten Wellenlängenbereich gestatten. Durch Integration eines Spektrometers ergibt sich der Vorteil, daß selektiv der kleine Wellenlängenbereich betrachtet werden kann, in dem die Fluoreszenzemission das Maximum aufweist. Die etwas längerwellige Ramanstrahlung (z.B. Ramanbanden für Wasser zwischen 570 und 585 nm [299]) kann mit einem Spektrometer aufgelöst und mittels geeigneter Software aus dem interessierenden Bereich ausgeblendet werden.

Detektor

In Verbindung mit einem Spektrometer bietet sich ein Flächendetektor an. Aufgrund der bereits in Kapitel 2.5.4.1 erwähnten Vorteile gegenüber einem Photomultiplier könnte aus der Verwendung einer CCD-Kamera ein weiterer Empfindlichkeitsgewinn resultieren. Für die Applikation der DNA-Adduktanalytik würde sich eine back-illuminated EMCCD-Kamera mit einem Frame-Transfer-Sensor eignen. Diese zeichnet sich durch eine sehr hohe Quanteneffizienz ($> 90\%$) bei gleichzeitiger Möglichkeit einer effektiven Rauschunterdrückung aus [300, 328]. Ein Frame-Transfer-Sensor ist zwar langsamer als z.B. ein Interline-Transfer-Sensor, er hat dafür aber eine größere aktive Pixelfläche. Das bedeutet, daß der erstgenannte Sensor einen höheren Füllfaktor besitzt, also einen größeren für die Konversion der einfallenden Photonen wirksamen Flächenanteil im Pixel, und somit mehr Photonen sammeln kann [300].

Nach diesen Vorüberlegungen entwickelte die Firma LaVision BioTec ein variables Detektionssystem, das verschiedene optionale Detektionstechniken (z.B. Fluoreszenzspektroskopie mit Dunkelfeldbeleuchtung oder Epifluoreszenzmikroskopie) bietet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die erste Technik angewendet. Mit diesem System wurde die Laser-induzierte Fluoreszenz während der gesamten Analysendauer spektral aufgelöst und mit einer Kombination aus hochauflösendem Spektrometer und Elektronen-verstärkter CCD-Kamera aufgenommen. Das System wird im Folgenden als LS-CCD-System (für Laserspektroskopie mit CCD-Detektion) bezeichnet.

4.4.2 Der experimentelle Aufbau des LS-CCD-Detektionssystems

Der gesamte Aufbau ist in Abbildung 4-20 schematisch dargestellt. Zur Anregung wurde ein 488 nm Argon-Ionen Laser (Melles Griot IMA Series) mit einer Ausgangsleistung von 40 mW verwendet. Das Laserlicht wurde mit einem „single wavelength“-Einkoppellichtleiter (Point Source kineFlex, 69 % Throughput bei 488 nm) in das Detektorgehäuse geleitet und mit einer antireflexbeschichteten Achromatlinse ($f = 10\text{ mm}$) in die Kapillare fokussiert. Der Durchmesser des Laserstrahls betrug etwa 30 - 50 μm . Es wurde eine Dunkelfeldbeleuchtung in einem Beleuchtungswinkel von etwa 45° durchgeführt, der bei diesem System allerdings variabel einstellbar ist. Um die emittierten Photonen mit möglichst hoher Effizienz zu sammeln, wurde ein hoch aperturiges Objektiv (Nikon S-Fluor 40x/0.90) unmit-

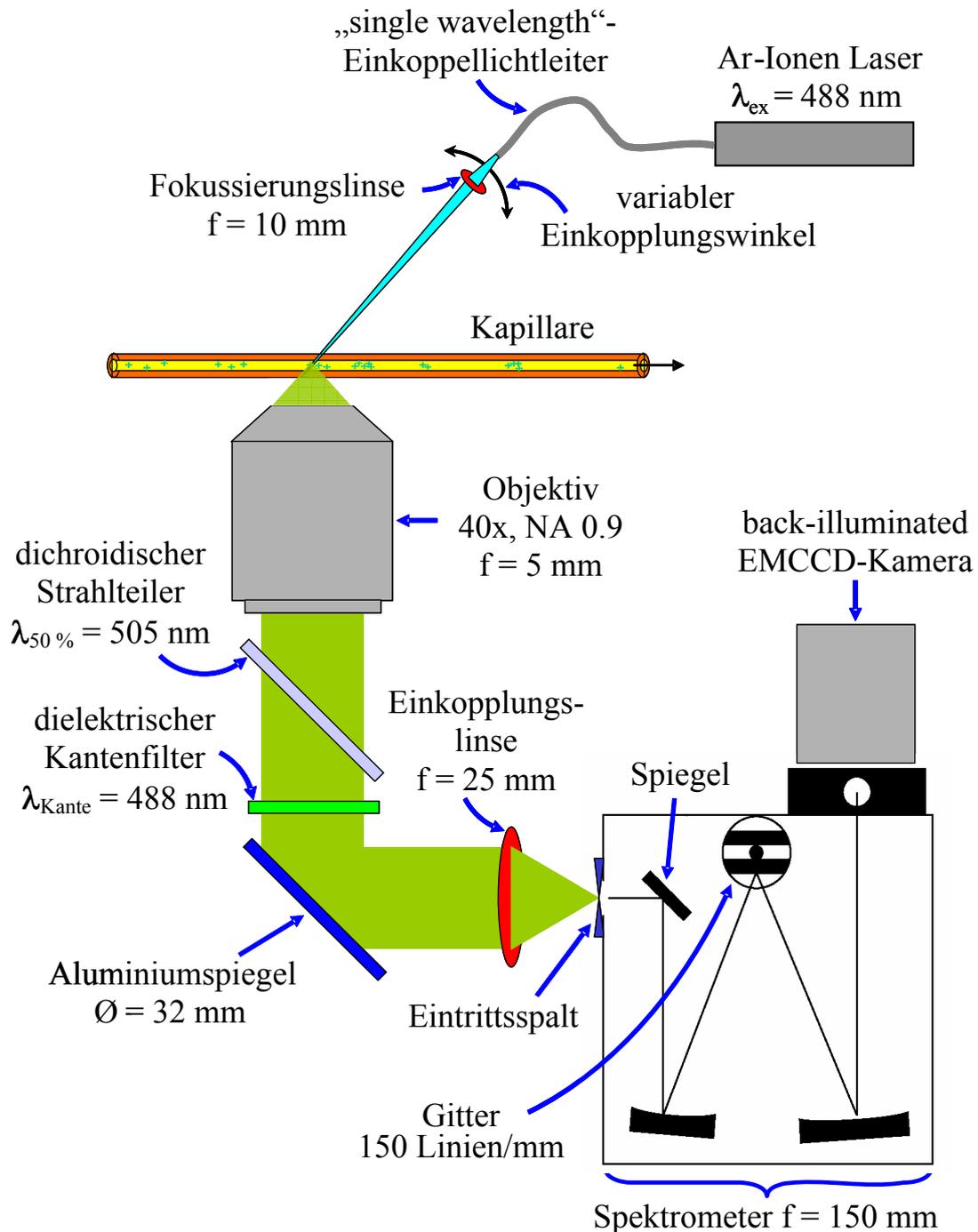


Abbildung 4-20: Schematischer Aufbau des LS-CCD-Detektionssystems, modifiziert aus einer von Schütte (LaVision BioTec) bereitgestellten Vorlage; in die aus der CE austretende Kapillare wird der Strahl eines Argon-Ionen-Lasers ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$) mit einer Achromatlinse in einem Winkel von etwa 45° hineinfokussiert. Ein kleiner Teil der auf die Kapillarwand auftreffenden Strahlung wird durch Reflexion an der Glasoberfläche abgelenkt. Die in alle Raumrichtungen ausgesendete Fluoreszenzstrahlung wird durch ein Objektiv gesammelt. Die Emissionsstrahlung wird anschließend im Spektrometer spektral zerlegt, über eine EMCCD-Kamera detektiert und bildlich dargestellt.

telbar in den Lichtgang des Fluoreszenzstrahles eingesetzt. Die Fluoreszenz wurde mit einem Aluminiumspiegel (Linus Photonics, Ø 32 mm, mit MgF₂ Beschichtung) auf den Eintrittsspalt eines Spektrometers (Roper Scientific Spectra Pro Series, 150 Linien/mm, geblazed für 500 nm) abgebildet. Vor dem Spektrometer befand sich ein dielektrischer Kantenfilter (Semrock SEM-LP-RS, $\lambda_{\text{Kante}} = 488 \text{ nm}$, Transmission > 93 %) zur Unterdrückung von Laserstreulicht sowie ein dichroidischer Strahlteiler (AHF Analysentechnik, $\lambda_{50\%} = 505 \text{ nm}$). Zum Einkoppeln der Fluoreszenzstrahlung in das Spektrometer wurde eine beidseitig im sichtbaren Bereich antireflexbeschichtete Achromatlinse ($f = 25 \text{ mm}$) verwendet. Als Detektor wurde eine back-illuminated EMCCD-Kamera mit Frame-Transfer-Sensor (Andor Technology, Ixon DV860) eingesetzt.

Das Detektionssystem ist sehr variabel. So bietet es neben dem hier beschriebenen Aufbau auch die Möglichkeit einer Epiilluminationsanordnung (Abbildung 7-1, Anhang). In dieser Anordnung wird der dichroidische Strahlteiler verwendet, der in dem oben beschriebenen Detektionssystem keine Aufgabe übernimmt. Ein Ausbau für die in Abbildung 4-20 dargestellte Anordnung wäre zu aufwendig gewesen - zumal der Strahlteiler die Funktionsweise nicht beeinträchtigte.

4.4.3 Ankopplung des LS-CCD-Systems an die CE

Alle aufgeführten Komponenten des Detektionssystems befinden sich in einem innen schwarz lackierten Metallschrank und sind dadurch weitgehend gegen Lichteinfall von außen abgeschirmt (Abbildung 4-21).

Zur Ankopplung des LS-CCD-Systems an die CE wurde zunächst die bisher im Routinebetrieb mit dem CE-LIF-System verwendete Kartusche eingesetzt. Der Kühlkreislauf wurde mit Hilfe eines Y-förmigen Adapters, der an der rechten Seite des CE-Gerätes fixiert wurde, geschlossen. Gleichzeitig fungierte der Adapter als Kapillaraustritt aus der CE.

Um den für eine Kapillarelektrophorese notwendigen Stromkreislauf zu ermöglichen, wurde eine Elektrode für die Outletseite im LS-CCD-Gehäuse konstruiert (Abbildung 4-22 a). Als Basis diente dafür eine Hohlelektrode der Firma Agilent, durch die die Kapillare hindurchgeführt und somit sicher und reproduzierbar am Outlet positioniert werden konnte. Die Elektrode wurde in ein Kunststoffgehäuse eingebaut und in den Detektorschrank montiert. Die Kapillarführung und -fixierung innerhalb der Elektrode wurde durch eine Gummidichtung,

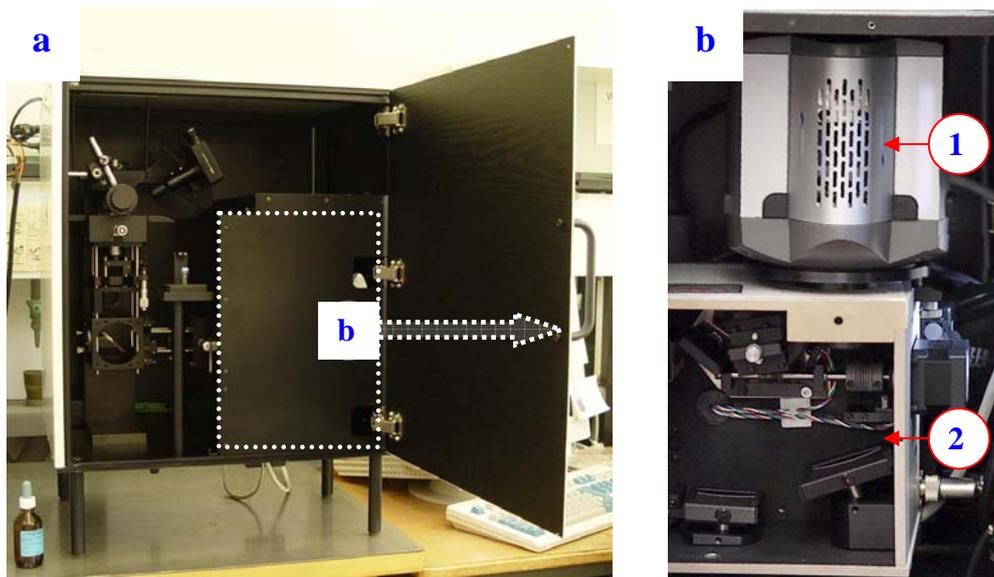


Abbildung 4-21: Photo des LS-CCD-Systems; (a) Metallschrank; (b) internes Gehäuse mit 1: EMCCD-Kamera und 2: Spektrometer.

die am Elektrodeneingang angebracht wurde, ermöglicht (Abbildung 7-2, Anhang). Die Einbettung der Kapillare in die Outletelektrode hat sich sehr positiv auf die Langlebigkeit der Kapillare ausgewirkt. Das typische Ablösen der Polyimidschicht an der Outletseite, das bei direktem Kontakt der Kapillare mit der Elektrolytlösung über einen Meßzeitraum von etwa 4 - 5 Wochen (bei einer heat-cure Kapillare) auftrat, wurde bei dieser Outletkonstruktion nicht mehr beobachtet.

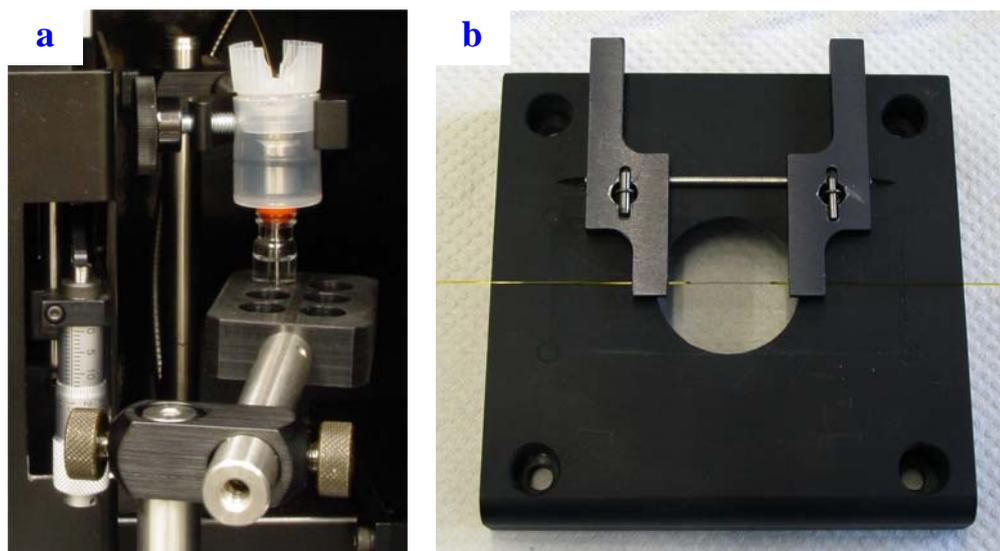


Abbildung 4-22: (a) Outletelektrode im Detektorgehäuse; (b) Auflage mit Aluminiumklammern für die Fixierung der Kapillare im Bereich des Detektionsfensters.

Im Bereich des Detektionsfensters wurde die Kapillare mit Hilfe zweier Aluminiumklammern, die an der Unterseite über eine ca. 100 μm tiefe, kapillarführende Aussparung verfügten, auf einer Auflage aus Polycarbonat fixiert (Abbildung 4-22 b). Die Klammern ließen sich über einen Federmechanismus anheben. Die Auflage enthielt eine 24 mm Bohrung für die Ausrichtung des Objektivs und war mit dem Objektivgehäuse verschraubt (Abbildung 4-22). Bei der ersten Version der Ankopplung des LS-CCD-Detektionssystems ergab sich bautechnisch eine Gesamtlänge der Kapillare von etwa 76 cm; die effektive Trennstrecke betrug 59 cm. Das bedeutete bei gleichbleibenden elektrophoretischen Bedingungen eine Verlängerung der Analysenzeit um 22 min im Vergleich zum CE-LIF-System. Eine Verringerung der Analysenzeit konnte durch Verkürzung der Trennstrecke erreicht werden. Dazu wurde die vorhandene Kartusche durch eine EDA-Kartusche (Beckman Coulter) ersetzt und die in der CE bisher genutzte Outletseite nun als Inlet betrieben. Voraussetzung dafür war eine Umpolung der Elektroden an der Spannungsquelle der CE und eine Umprogrammierung des CE-Motherboards. Durch den Einsatz der EDA-Kartusche konnte mit einer Kapillarlänge von insgesamt 64 cm (effektive Trennstrecke 46,4 cm) gearbeitet und die Analysenzeit um ca. 20 min reduziert werden. Abbildung 4-23 zeigt den optimierten Aufbau.

Zwischen den Gehäusen der CE und dem externen Detektor wurde eine Manschette aus schwarzem Schaumstoff angebracht, um den Lichteinfall in den Detektor an der Eintrittsstelle der Kapillare zu minimieren. Zur Vermeidung eines Wärmestaus in der Kapillare an dieser Überbrückungsstelle, welcher zu einer möglichen Peakverbreiterung hätte beitragen können, wurde das effektive Flüssigkühlsystem der CE bis fast unmittelbar vor das Detektionsfenster geführt. Innerhalb des LS-CCD-Systems sorgte ein seitlich am Detektorgehäuse angebrachter Ventilator für eine ausgewogene Luftzirkulation und Kühlung der Kapillare. Zur Vermeidung von Spannungsüberschlägen zwischen der Kapillare und metallischen Bauteilen im Detektionssystem wurden zusätzlich alle relevanten Bauteile (z.B. Metallteile in der Nähe des Detektionsfensters, Detektor-, Kamera- und Spektrometer-Gehäuse) geerdet.

4.4.4 Laserjustierung nach Einbau einer Kapillare

Nach dem Einbau einer Kapillare wurde vor der ersten Messung eine Laserjustierung vorgenommen. Diese Justage erfolgte anhand der intensiven Ramanbande von Wasser bei 596 nm

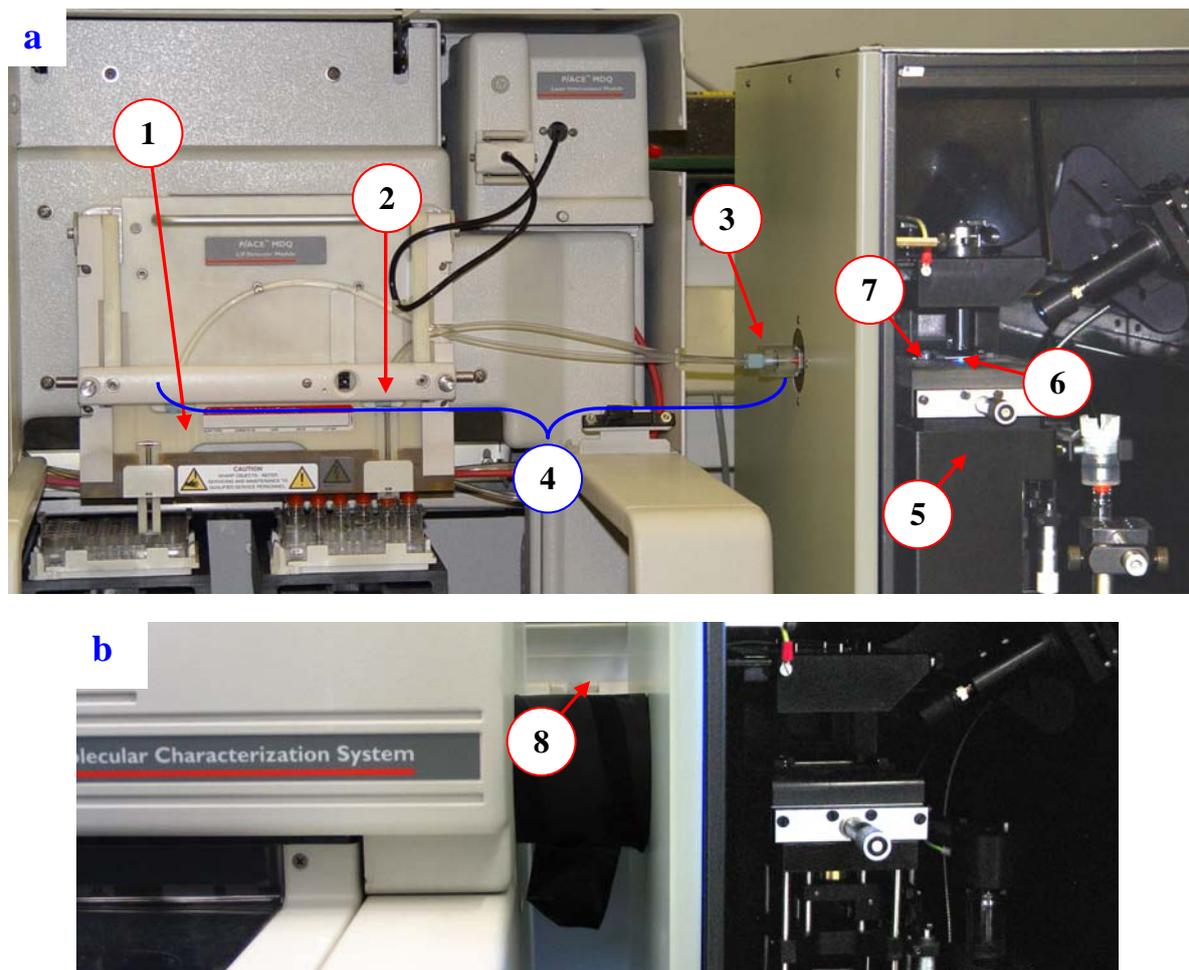


Abbildung 4-23: Optimierter Aufbau des CE-LS-CCD-Systems (a) ohne Manschette, 1: EDA-Kartusche, 2: Inlet, 3: Y-Adapter, 4: Kühlkreislauf, 5: Objektivgehäuse, 6: Detektionsfenster, 7: Auflage zur Fixierung der Kapillare; (b) 8: Manschette zur Minimierung des Lichteinfalls an der Eintrittsstelle der Kapillare in den Detektor.

(Mittelpunkt der beiden intensiven Schwingungsbanden von Wasser bei 594 nm und 598 nm) [300]. Die Verwendung dieser Ramanbande hatte den Vorteil, die Optimierung der optischen Ausrichtung des Laserstrahls durchführen zu können, ohne die Kapillare mit einem Fluorophor zu kontaminieren. Dazu wurde die Kapillare nach erfolgter Konditionierung mit Wasser gefüllt (~ 30 s, 100 psi), und für die gesamte Dauer der Justage wurde der Wasserdurchfluß mit 5 psi aufrechterhalten. Im Wellenlängenbereich von ca. 480 - 600 nm wurde ein Intensitätsprofil betrachtet und der Laserstrahl sowohl in Längs- als auch in Querrichtung (Abbildung 7-3, Anhang) solange über die Kapillare bewegt, bis die Ramanbande von Wasser eine maximale Intensität bei gleichzeitig minimalem Streulichtanteil aufwies (Abbildung 4-24). Diese Justierung war aufgrund der Kombination der beiden Ausrichtungen des Laserstrahls relativ zeitaufwendig (teilweise 1-2 Stunden) und mußte bei jedem Kapillarwechsel

erneut erfolgen, da eine μm -exakte und reproduzierbare Platzierung der Kapillare am Detektionsfenster nach einem Wechsel nicht immer gewährleistet war. Teilweise mußte auch während der Nutzung einer Kapillare eine Nachjustierung erfolgen. Der Grund dafür lag in einem minimalen Bewegungsspielraum der Kapillare an der ersten Befestigungsklammer nach dem Eintritt ins Detektorgehäuse. Durch den automatischen Vialwechsel in der CE wurden leichte Schwingungen auf das Inlet der Kapillare übertragen, die sich trotz der mehrfach vorhandenen Gummidichtungen innerhalb der Kartusche bis zum Detektionsfenster fortpflanzten.

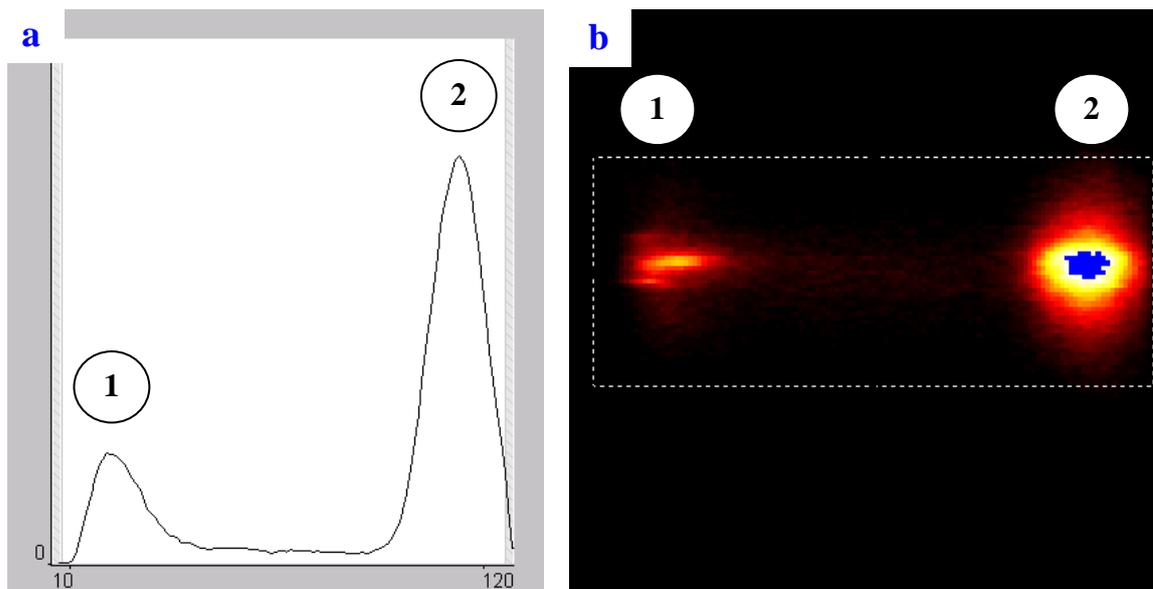


Abbildung 4-24: Intensitäts-Wellenlängenprofil von Wasser mit maximalem Intensitätsverhältnis der Ramanbande zum Laserstreulicht, 1: Laserstreulicht bei $\lambda = 488 \text{ nm}$, 2: Ramanbande von Wasser bei $\lambda_{\text{mitte}} = 596 \text{ nm}$; **(a)** Koordinatendarstellung (xy-Darstellung); auf der y-Achse ist die Intensität angegeben, die Zahlen auf der x-Achse sind Pixelwerte; **(b)** Bilddarstellung; der der xy-Darstellung zugehörige Bildausschnitt ist durch das weiße Rechteck gekennzeichnet. Das Intensitätsverhältnis von der Ramanbande zu Streulicht beträgt hier 3,7.

Vor Beginn der Justierung sowie vor der ersten Messung eines jeden Arbeitstages wurde ein Nullabgleich der Kamera durchgeführt, d.h. es wurde ein sogenannter Background von der Kamera aufgenommen, der dann bei jeder nachfolgenden Messung automatisch berücksichtigt wurde. Die Aufnahme des Backgrounds erfolgte mit betriebsbereitem System. Dieser Systemzustand wurde durch Einschalten des Ventilators, Gewährleisten einer äquilibrierten Kamerakühlung, Aktivierung des Spektrometers sowie Einstellung der Kameraverstärkung (EMCCD-gain) und -belichtung erreicht. Der Background wurde bei ausgeschaltetem Laser aufgezeichnet (ca. 5 s) und korrigierte somit nachfolgende Messungen um den Anteil des

Umgebungslichtes, das trotz der Abschirmung durch das Detektorgehäuse noch auf den photosensitiven CCD-Chip traf. Ein vergleichendes Experiment ergab, daß eine Justierung ohne vorherige Aufnahme eines solchen Backgrounds ein schlechteres Intensitätsverhältnis der Ramanbande von Wasser zum Laserstreulicht lieferte. Anscheinend wies das Umgebungslicht im Labor einen höheren spektralen Anteil bei 488 nm als bei 596 nm auf.

4.4.5 Einfluß verschiedener Parametereinstellungen der CCD-Kamera

Zu Beginn der Analysen mit dem LS-CCD-System stellte die Restfluoreszenz, die nach jedem, einem Analysenlauf nachgeschalteten Spülvorgang der Kapillare noch vorhanden war, ein Problem dar. Diese Restfluoreszenz beruht wahrscheinlich auf der Belegung der Kapillarwand mit fluoreszierenden Bestandteilen des Puffers oder der Probe, die sich nicht durch einen kurzen Spüllauf vollständig entfernen ließen. Das CE-LIF-System verfügt über einen sogenannten Autozero-Modus, der 1 min nach Beginn eines jeden Analysenlaufes einen Nullwert einstellt. Dieses System wird daher nicht wesentlich durch eine noch vorhandene Restfluoreszenz beeinträchtigt. Das LS-CCD-System verfügt allerdings nicht über eine solche Funktion, und deshalb führte die sukzessive Belegung der Kapillarwand zu einem stetigen Anstieg des Backgrounds von Analyse zu Analyse. Aus diesem Grund wurde eine effektivere Spülmethode für das LS-CCD-System entwickelt (Kapitel 6.6.2), die allerdings etwa 10 Minuten mehr Zeit in Anspruch nahm. Die störenden Belegungen der Kapillare wurden dadurch aber vollständig entfernt.

Nachdem die Optimierung des Spülprozesses abgeschlossen war, wurden die optimalen Einstellungen der CCD-Kamera ermittelt, indem die Auswirkungen der Belichtungszeit und der Verstärkung untersucht wurden. Dazu wurde eine fluoreszenzmarkierte 10 µg CT-DNA-Probe (PVV 2) bei verschiedenen Verstärkungseinstellungen und Belichtungszeiten gemessen. Zur Untersuchung dieser Einflüsse wurde das 5m-dCMP-BODIPY-Signal betrachtet. Es wurde gerade dieses Signal ausgewählt, weil es bei allen untersuchten Verstärkungs- und Belichtungseinstellungen unterhalb der Sättigungsgrenze der Kamera lag, was bei den anderen unmodifizierten Nukleotidkonjugaten nicht der Fall war.

Die kapillarelektrophoretischen Analysen wurden nach Methode II durchgeführt. Zur Auswertung der Daten und Aufnahme der Elektropherogramme wurde in der entsprechenden Bilddarstellung der Software ImSpector[®] (LaVision BioTec, MPI f. biophysical Chemistry) ein Ausschnitt gewählt, bei dem die Ramanbande von Wasser und die Streulichtbande ausge-

blendet wurden (vgl. Abbildung 4-27 c, Kapitel 4.4.6). Anschließend wurde in der Software eine Funktion angewählt, durch deren Aktivierung automatisch aus der aufgenommenen Serie von Einzelbildern eines Analysenlaufes ein Intensitäts-Zeitprofil für den gewählten Bildausschnitt erstellt wurde. Dieses Profil zeigte während der Messung die fortlaufende Anzahl der Einzelbilder auf der x-Achse und den zugehörigen Meßwert (der gemittelte Wert der Fluoreszenzintensitäten im betrachteten Bildausschnitt) auf der y-Achse. Nach Abschluß der Messung wurde automatisch auf der x-Achse die Meßzeit in Sekunden angegeben, die sich aus der Zahl der Einzelbilder und der Belichtungszeit ergab. Das so erstellte Intensitäts-Zeitprofil entsprach damit einem Elektropherogramm. Die weitere Auswertung der Daten (z.B. Integration der Peakflächen) erfolgte mit Hilfe der ³²Karat Software (Beckman Coulter), da ImSpector[®] ursprünglich nicht für eine analytische Auswertung konzipiert wurde und daher nicht über eine Integrationsfunktion mit Angabe analytisch relevanter Parameter verfügte. Die xy-Rohdaten der Intensitäts-Zeitprofile wurden in zuvor aus der ³²Karat-Software exportierte ASCII-Dateien importiert und anschließend von der Software eingelesen.

Die Untersuchung der Peakhöhe (Abbildung 7-4, Anhang) und -flächen ergab, daß die Verstärkung einen exponentiellen Einfluß auf diese Signalcharakteristika ausübte, während bei Variation der Belichtungszeit (Abbildung 7-5, Anhang) ein linearer Verlauf zu beobachten war. Abbildung 4-25 zeigt den Verlauf der Peakflächen des 5m-dCMP-BODIPY-Signals in Abhängigkeit von der Kameraverstärkung (EMCCD-gain).

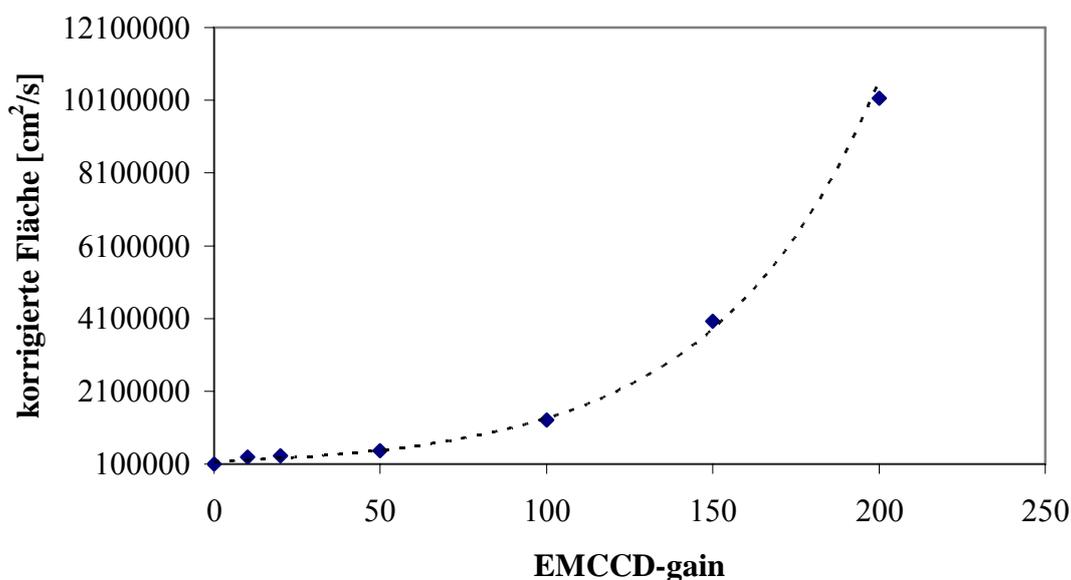


Abbildung 4-25: Abhängigkeit der korrigierten Fläche des 5m-dCMP-BODIPY-Signals von den Verstärkungseinstellungen der CCD-Kamera; die CT-DNA wurde vor der kapillarelektrophoretischen Analyse 1:200 in Wasser verdünnt. Die Belichtungszeit betrug bei allen Messungen 500 ms. Die Peakhöhen zeigten einen analogen Verlauf (Abbildung 7-4, Anhang).

Eine höhere Verstärkung bei einem EMCCD-Chip bedeutet letztlich eine höhere Potentialabsenkung im Verstärkungsregister. Dadurch wird die Austrittsarbeit der Elektronen erniedrigt. Dieser exponentielle Verlauf ist üblich bei Detektoren, bei denen der Verstärkungsprozeß auf Elektronenkaskaden beruht [505]. Der Verlauf ergibt sich aus der thermodynamischen Betrachtung der Energieverteilung von Fermionen [300]. Bei einer Verstärkung von 100 war bereits für die Signale von dAMP, dTMP und dCMP die Sättigungsgrenze erreicht, bei dGMP war dies ab einer Verstärkung von 150 der Fall. Eine deutliche Übersättigung trat bei allen Signalen mit Ausnahme von 5m-dCMP bei einer Verstärkung von 200 auf. Jedes Kamerapixel besitzt eine maximale Elektronen-Sammelkapazität, die sogenannte „full-well capacity“. Diese ist abhängig von der Größe des Pixels und von der angelegten Spannung an den Elektroden. Bei hoher Belichtung und Verstärkung wird diese Kapazität überschritten, die überschüssigen Elektronen fließen in die Potentialtöpfe der benachbarten Pixel, die Kamera „läuft über“. Die qualitativen und quantitativen Bildeigenschaften gehen dabei verloren und die Signale sind nicht mehr auswertbar.

Bei der Betrachtung der S/N-Verhältnisse des 5m-dCMP-BODIPY-Signals zeigte sich eine Erhöhung der Empfindlichkeit mit steigender Verstärkung (Abbildungen 7-6, Anhang). Für diese Berechnungen wurde das Basislinienrauschen im Bereich vom Beginn der Elektrophorese bis zum EOF (bei etwa 5,5 min.) berücksichtigt. Das Ergebnis widersprach zunächst den Erwartungen. Bei einer höheren Verstärkung besteht zwar die Möglichkeit, den Einfluß des Ausleserausens der Kamera zu minimieren, das Gesamtrauschen (Hintergrund) sollte jedoch im gleichen Maße wie die Signalphotonen mitverstärkt werden. Daher sollte eine höhere EMCCD-gain nicht unbedingt zu einer Verbesserung des S/N-Verhältnisses beitragen. Im durchgeführten Experiment stieg ab einer Verstärkung von 50 das Rauschen an, aber nicht in dem Maße wie die Signalintensität. Allerdings wurde im Bereich von 150 bis 200 nur noch ein relativ geringer Empfindlichkeitsgewinn erzielt, so daß eine höhere Verstärkung als 200 (maximal möglich 255) keinen wesentlichen Nutzen hatte. Daher wurde in dieser Arbeit ein Verstärkungswert von 200 nie überschritten. *Bagh et al.* stellten fest, daß bei sehr hohen Verstärkungswerten ihrer verwendeten on-chip multiplication CCD-Kamera (electron multiplying CCD) der Dunkelstrom eine signifikante Rolle zu spielen begann [505]. Möglicherweise könnte das auch bei der hier verwendeten Kamera trotz der effektiven Kühlung der Fall sein und würde insofern erklären, warum im Bereich hoher Verstärkungswerte der Empfindlichkeitsgewinn minimal war.

Das Ergebnis zeigt, daß es sich insbesondere für Analyten in niedrigen Konzentrationsbereichen im Hinblick auf die qualitative und quantitative Auswertung anbietet, eine

hohe Verstärkereinstellung zu wählen. Bei der Analyse des Methylierungsgrades in einer 10 µg DNA-Probe mit der üblicherweise gewählten Verdünnung sollte jedoch ein Verstärkungswert von 50 nicht überschritten werden.

Bei Variation der Belichtungszeit und konstanter Verstärkungseinstellung konnte ein linearer Bezug mit dem S/N-Verhältnis (Abbildung 4-26) festgestellt werden.

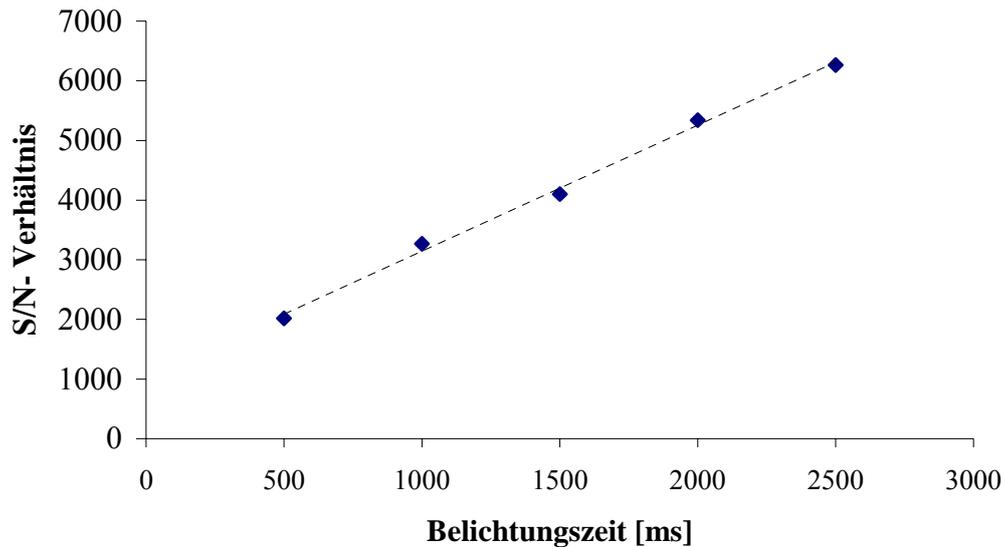


Abbildung 4-26: Abhängigkeit des S/N-Verhältnisses des 5m-dCMP-BODIPY-Signals von der Belichtungszeit der CCD-Kamera bei den kapillarelektrophoretischen Analysen einer 10 µg CT-DNA (Methode II); die Verstärkung wurde dabei auf 50 eingestellt. Der Korrelationskoeffizient betrug 0,9964.

Mit Erhöhen der Belichtungszeit um 500 ms nahm das S/N-Verhältnis durchschnittlich um einen Faktor von 1,3 zu. Wie in Kapitel 2.5.3.1 bereits erwähnt, steigt die Signalintensität proportional zur Belichtungszeit, während das Photonenrauschen der Kamera sich nur proportional zur Quadratwurzel des Signals verhält. Das Photonenrauschen begründet sich darin, daß Photonen mit ihrer Energie $h \cdot \nu$ in unregelmäßigen Zeitabständen auf den Detektor treffen. Die wirksame Zufallsverteilung für diesen Prozeß ist die Poissonstatistik [506]. Der Dunkelstrom ist durch die Kamerakühlung fast vernachlässigbar. Das Ausleserauschen bleibt konstant und leistet keinen höheren Beitrag zum Gesamtrauschen. Daher wird vor allem bei schwachen Signalen durch eine höhere Belichtung eine Verbesserung des S/N-Verhältnisses und somit eine bessere Empfindlichkeit erzielt. Der limitierende Faktor bei der Wahl der Belichtungszeit ist die Breite des Peaks. Um statistisch einen gaußförmigen Peak sicher zu integrieren, werden mindestens 8 Bildpunkte benötigt. Bei zu langer Belichtung eines migrieren-

den Signals werden zu wenige Bilder pro Zeiteinheit aufgenommen. Das bedeutet auch, daß ein schlankes Signal (geringe Konzentration) eines schnell in der CE migrierenden Analyten nicht genauso hoch belichtet werden kann wie ein breites Signal (hohe Konzentration) eines erst spät das Detektionsfenster erreichenden Analyten. Bei der Analyse von 5m-dCMP ist eine Belichtungszeit von bis zu 2500 ms möglich, da die Signalbreite etwa 21 s beträgt. Für die Signale von dAMP, dTMP und dCMP ist bei einer Belichtungszeit von 1000 ms bereits die Sättigungsgrenze erreicht.

Diese Untersuchungen zeigten die Bedeutung der Auswahl von Verstärkung und Belichtung in Bezug auf die analytische Fragestellung und ermöglichten, die Einstellung dieser Parameter dem Analysenziel optimal anzupassen.

4.4.6 Wahl des Ausschnittes in der Bilddarstellung

Zur Erstellung eines zweidimensionalen Intensitäts-Zeitprofils mit nachfolgender Integration, ist der betrachtete Ausschnitt in der Bilddarstellung von Bedeutung. Es konnte festgestellt werden, daß in Abhängigkeit des gewählten Bildausschnittes unterschiedliche Peakflächen, -höhen und S/N-Verhältnisse eines Signals erhalten werden. Tabelle 4-11 zeigt die Auswertung eines Analysenlaufes einer 20 pM wäßrigen BODIPY-Lösung, bei der verschiedene Bildausschnitte (Abbildung 4-27) herangezogen wurden.

Ausschnitt der Bilddarstellung	korrigierte Peakfläche des BODIPY-Signals [cm^2/s]	S/N-Verhältnis des BODIPY-Signals
Ausschnitt a	20720	28,1
Ausschnitt b	10439	18,2
Ausschnitt c	42614	39,6
Ausschnitt d	33776	34,1

Tabelle 4-11: Korrigierte Flächen und S/N-Verhältnisse des Signals eines Analysenlaufes (Methode VI) einer 20 pM BODIPY-Lösung in Abhängigkeit vom gewählten Bildausschnitt. Zur Ermittlung der Rauschwerte wurde der Bereich vom Beginn der Elektrophorese bis zum jeweiligen BODIPY-Signal (bei etwa 4 min) herangezogen.

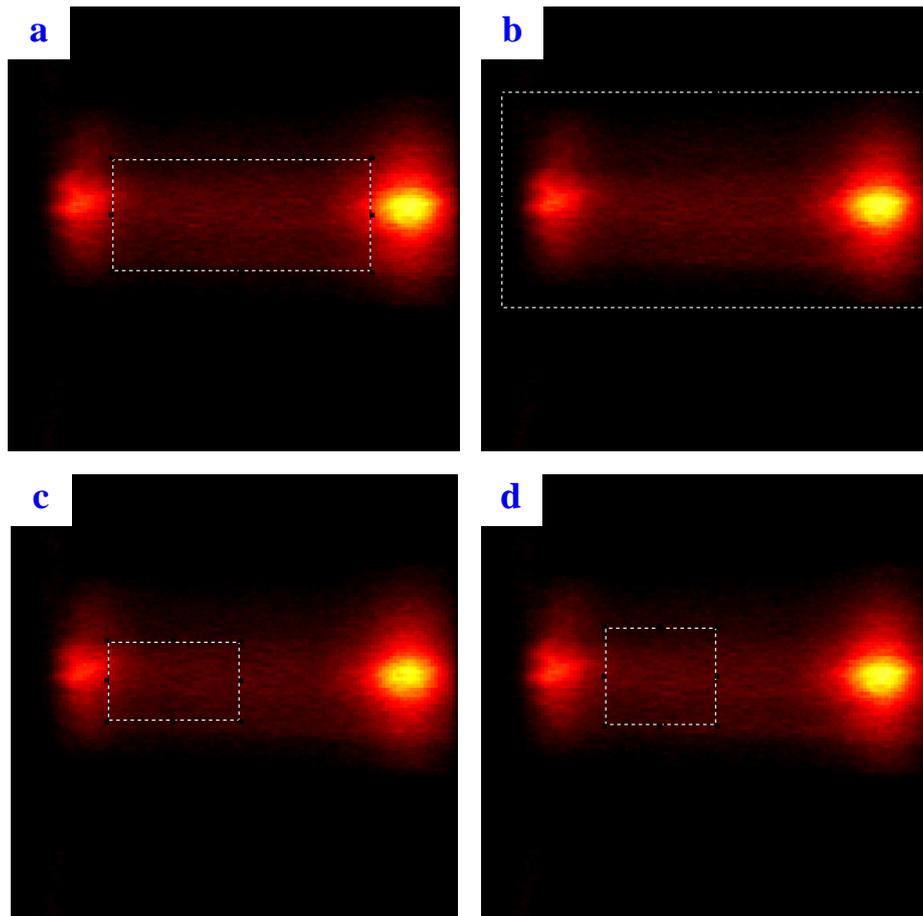


Abbildung 4-27: Verschiedene Ausschnitte in der Bilddarstellung (gestrichelte Rechtecke), anhand derer die jeweilige Auswertung des Analysenlaufes erfolgte; die Bildaufnahme erfolgte bei einer Belichtungszeit von 500 ms und einem Verstärkungswert von 200.

Aus Tabelle 4-11 ist ersichtlich, daß die Wahl des Bildausschnittes einen bedeutenden Einfluß auf die Empfindlichkeit und die Peakfläche ausübt. Bei einem größeren Bildausschnitt geht durch einen höheren Anteil an intensitätsarmen Pixeln bzw. Nullwerten (schwarze Bereiche in der Bilddarstellung) mehr Signalinformation verloren. Bei einem größeren Bildausschnitt nimmt zwar auch der Rauschwert ab, die Intensität des Signals wird aber in größerem Maße geschwächt. Es hat sich gezeigt, daß der Bildausschnitt c am sinnvollsten für die Auswertung ist, wobei zwischen diesem und dem Bildausschnitt d kein gravierender Unterschied besteht. Eine wesentliche Bedeutung kommt der Wahl des Bildausschnittes vor allem innerhalb einer Meßreihe zu. Bei der Datenauswertung muß darauf geachtet werden, daß immer der gleiche Bildausschnitt verwendet wird. Die Bilddarstellung in Abbildung 4-27 stellt den gesamten Pixelbereich der Kamera dar (128x128 Pixel), der von der Software als ROI (region of interest) bezeichnet wird. Bei der kapillarelektrophoretischen Analyse der 20 pM BODIPY-

Lösung nahm die Kamera alle 500 ms (Belichtungszeit) ein Bild mit dem gesamten Pixelbereich auf. Bei einer Analysendauer von 30 min bestand somit ein Datenfile aus 3600 Einzelbildern. Bei einem Speicherplatzbedarf eines Bildes von etwa 32 kB ergab dies eine ungefähre Dateigröße von 115 MB auf einem Datenträger. Aus Abbildung 4-27 ist ersichtlich, daß bei einer ROI von 128 x 128 ein großer Teil des Bildes aus Nullwerten (schwarze Bildbereiche) besteht, die für eine Datenauswertung nicht benötigt werden. Daher wurde bei anschließenden Analysen von DNA-Proben die ROI um etwa 50 % verkleinert. Dadurch reduzierte sich die Dateigröße auf etwa 68 MB.

4.4.7 Sensitivitätsvergleich zwischen CE-LIF und CE-LS-CCD

Zur Überprüfung, ob sich die theoretischen Vorüberlegungen bezüglich der Sensitivitätsvorteile des LS-CCD-Systems gegenüber dem CE-LIF-System in der Praxis bestätigen ließen, wurden wäßrige Lösungen des Fluoreszenzmarkers BODIPY in unterschiedlichen Konzentrationen bis zum jeweiligen Detektionslimit auf beiden Systemen analysiert. Da die Migrationszeit von BODIPY unter MEKC-Bedingungen zu groß war (ca. 80 min), wurde für die Erfassung des Detektionslimits beider Systeme die CZE eingesetzt. Von den Lösungen des Fluoreszenzmarkers wurden auf beiden Systemen jeweils die gleichen Mengen hydrodynamisch in die Kapillaren injiziert (5,9 nL). Die Analysen erfolgten nach Methode VI. Abbildung 4-28 zeigt ein Elektropherogramm der Analyse einer 25 pM BODIPY-Lösung am Detektionslimit des CE-LIF-Systems. Zum Vergleich ist in Abbildung 4-29 ein Elektropherogramm einer Analyse am Detektionslimit (5 pM) des CE-LS-CCD-Systems dargestellt. Auf beiden Systemen wurden die Lösungen jeweils dreimal hinsichtlich ihrer Peakflächen analysiert, um Injektionsschwankungen auszugleichen. Die Standardabweichungen der Peakflächen am Detektionslimit betragen 21,3 % (CE-LIF) bzw. 15,4 % (CE-LS-CCD). Für Auswertungen der Analysen auf dem LS-CCD-System wurde der im vorherigen Kapitel angesprochene Bildausschnitt 3 verwendet.

Bei den vorangegangenen Experimenten zeigte sich, daß auch der Elektrolyt eine Eigenfluoreszenz aufwies (Untergrundfluoreszenz). Diese begründete sich wahrscheinlich in einer Kontamination der zur Elektrolytherstellung verwendeten Chemikalien mit aromatischen Nebenprodukten. Eine Minimierung der Untergrundfluoreszenz gelang durch mehrstündige UV-Photolyse des Elektrolyten. Die Photolyse fand in einer einfach konstruierten Vorrichtung

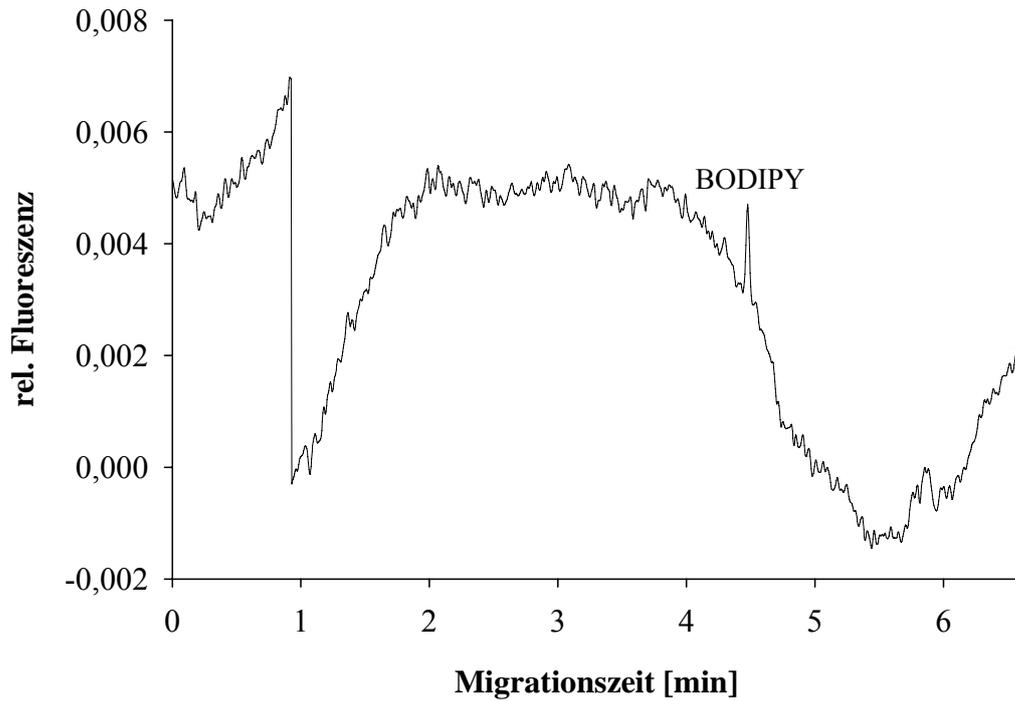


Abbildung 4-28: Elektropherogramm einer 25 pM BODIPY-Lösung, die auf dem CE-LIF-System nach Methode VI analysiert wurde. Die injizierte Stoffmenge betrug 147,5 zmol.

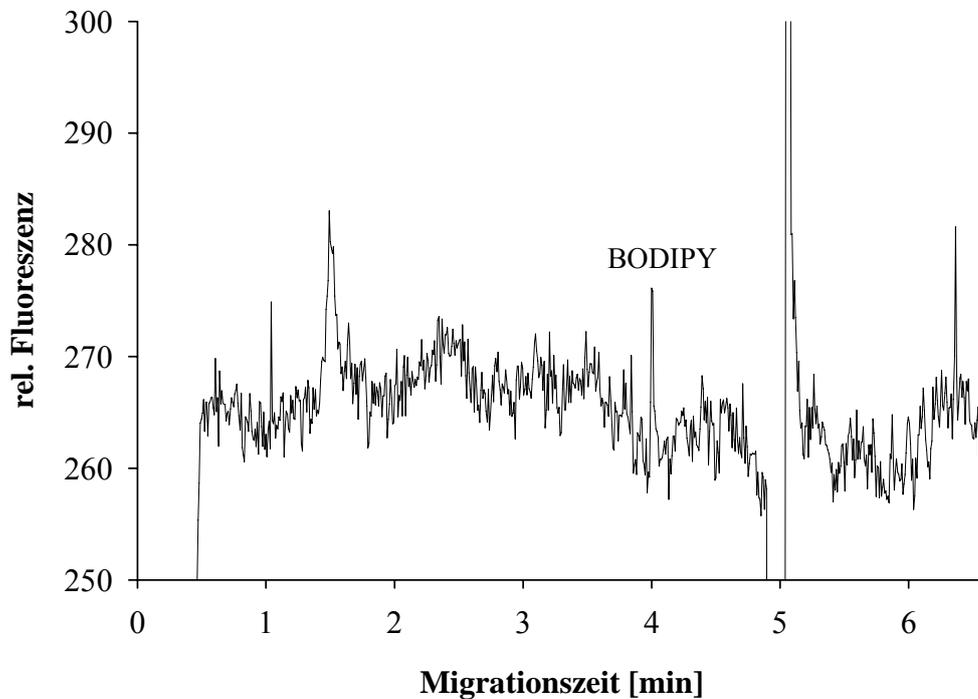


Abbildung 4-29: Elektropherogramm einer 5 pM BODIPY-Lösung, die auf dem CE-LS-CCD-System nach Methode VI analysiert wurde. Die Belichtungszeit der Kamera betrug 500 ms und die Verstärkung 200. Die injizierte Stoffmenge betrug 29,5 zmol.

statt, bestehend aus einem UV-Quecksilber-Strahler (45 W, $\lambda = 280\text{-}370$ nm), einem Quarzglaskühlfinger, einer Standflasche aus Quarzglas für den Elektrolyten und einem Kühlsystem (Wasserbad mit Thermostat) zur Kühlung der Elektrolytlösung und des Quarzglasfingers (Abbildung 7-7, Anhang). Der Elektrolyt wurde in dieser Apparatur mehrere Stunden bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ photolysiert (s. experimenteller Teil Kapitel 6.6.3). Dadurch wurde bei einer 5 pM BODIPY-Lösung eine Verbesserung des S/N-Verhältnisses um etwa das 1,4-fache erzielt (S/N von $5,3 \pm 0,6$ ($n = 3$) statt $3,8 \pm 0,1$ ($n = 3$) mit unphotolysiertem Puffer). Abbildung 4-30 zeigt das Elektropherogramm einer Analyse von 5 pM BODIPY, bei der der Elektrolyt nach $3,5\text{ h}$ UV-Photolyse eingesetzt wurde. Deutlich ist die Verbesserung des S/N-Verhältnisses gegenüber der Analyse der gleichen Lösung mit einem nicht photolysierten Elektrolyten (Abbildung 4-29) erkennbar. Eine längere Photolysedauer (z.B. 6 h) lieferte keine wesentliche Verbesserung mehr. Durch diese Erhöhung des S/N-Verhältnisses konnte allerdings das Detektionslimit des LS-CCD-Systems nicht weiter herabgesetzt werden. Es gelang auch mit einem photolysierten Puffer nicht, reproduzierbar eine Konzentration von $2,5\text{ pM}$ mit einem $\text{S/N} \geq 3$

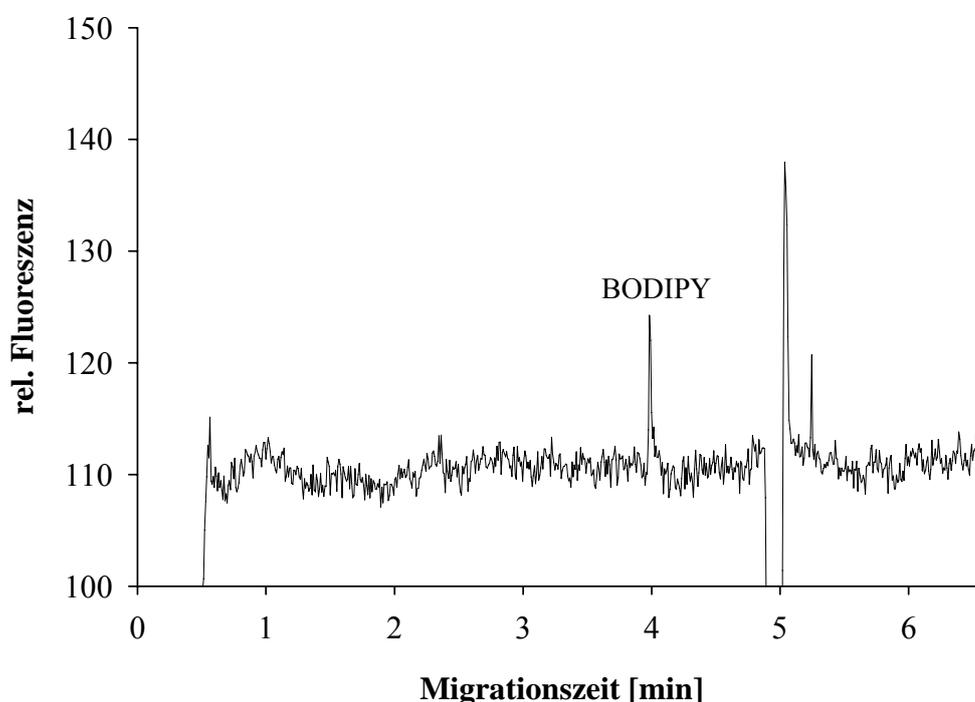


Abbildung 4-30: Elektropherogramm einer 5 pM BODIPY-Lösung (CE-LS-CCD-System) unter Verwendung des Elektrolyten E nach dreieinhalb-stündiger UV-Photolyse; die Belichtungszeit der Kamera betrug 500 ms und die Verstärkung 200 .

nachzuweisen. Gerade in solchen Konzentrationsbereichen ist eine reproduzierbare Analyse aufgrund von Fluktuationen durch stochastische Schwankungen in der Anzahl der Analytmoleküle innerhalb des Probenvolumens [507] äußerst schwierig. Als Ergebnis dieses Vergleichs wurde eine um den Faktor 5 höhere Sensitivität beim CE-LS-CCD-System gegenüber dem CE-LIF-System erhalten.

Wird das Detektionslimit von 25 pM BODIPY bei der LIF-Detektion auf die Analyse von DNA-Addukten übertragen, dann bedeutet dies, daß bei einer notwendigen Probenverdünnung (1:200 bei 10 µg DNA) DNA-Addukte mit einem RAL von 11 Addukten in 10^6 unmodifizierten Nukleotiden nachgewiesen werden können. Bei einem übertragenen Detektionslimit von 5 pM mit der LS-CCD-Detektion liegt die theoretische Nachweisgrenze für DNA-Addukte dann bei etwa 2 Addukten in 10^6 unmodifizierten Nukleotiden.

Das hier ermittelte Detektionslimit von 5 pM BODIPY für das CE-LS-CCD-System ist sehr gut vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Arbeiten auf dem Gebiet der Wellenlängen aufgelösten Fluoreszenzdetektion. *Timperman et al.* demonstrierten mit einem ähnlich aufgebauten System den Nachweis einer $5 \cdot 10^{-13}$ M Fluorescein-Lösung ($S/N = 6$) bei einer Injektionsmenge von 2,4 nL und einer Anregungswellenlänge von ebenfalls 488 nm [508]. Zum Vergleich der beiden Ergebnisse muß allerdings berücksichtigt werden, daß die Anregungswellenlänge von 488 nm hervorragend mit dem Absorptionsmaximum von Fluorescein übereinstimmt, jedoch nicht mit dem von BODIPY. Die molaren Absorptionskoeffizienten der beiden Fluoreszenzmarker sind zwar in ihren jeweiligen Absorptionsmaxima vergleichbar (Fluorescein $\epsilon_{490 \text{ nm}} \sim 90000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, BODIPY $\epsilon_{503 \text{ nm}} \sim 88700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [505, 509, 510]), bei 488 nm absorbieren allerdings nur etwa 55 % der BODIPY-Moleküle [511]. Ein weiterer, wesentlicher Unterschied zwischen dem hier verwendeten System und dem von *Timperman et al.* ist das Detektionsvolumen. Unter Berücksichtigung der Angaben der Autoren (ID Kapillare = 50 µm und Illuminationsbreite des Laserstrahls von ~ 2 mm) [508] ist das Nachweisvolumen etwa 40 mal größer im Vergleich zu dem hier verwendeten System. Unter Beachtung der Detektionsvolumina und des Absorptionsverhaltens beider Fluorophore besitzt das hier verwendete LS-CCD-System eine hervorragende Empfindlichkeit für eine on-column LIF-Detektion.

Bei der Analyse der wäßrigen BODIPY-Lösungen mit dem LS-CCD-System konnten die Vorteile der Kamera nicht vollständig genutzt werden. Das lag an der fehlenden Möglichkeit, im unteren Konzentrationsbereich eine höhere Belichtungszeit als 500 ms aufgrund der geringen Signalbreite bei der CZE zu verwenden. Die Breite des BODIPY-Peaks bei einer Konzen-

tration von 5 pM betrug durchschnittlich 4 s ($n = 6$). Nur bei einer Belichtungszeit von 500 ms war gewährleistet, daß der Peak aus acht Datenpunkten bestand. Eine Sensitivitätssteigerung durch Erhöhung der Belichtungszeit auf 1000 ms, wie sie bei der Analyse der CT-DNA (Kapitel 4.4.5) festgestellt werden konnte, konnte deshalb leider nicht ausgenutzt werden. Es wurde allerdings vermutet, daß bei der MEKC-Analyse einer DNA-Probe aufgrund der deutlich längeren Migrationszeiten und größeren Peakbreiten der Analyten bei entsprechender Adaption der Belichtungszeit ein etwas größerer Sensitivitätsunterschied gegenüber der CE-LIF beobachtet werden sollte. Dies bestätigte sich bei der Analyse einer hydrolysierten und derivatisierten DNA eines Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie (10 µg, präpariert nach PVV 2), die auf beiden Systemen gemessen wurde. Um trotz der unterschiedlich langen Trennstrecken auf beiden Systemen vergleichbare Migrationszeiten und Signalhöhen zu erhalten, wurde auf dem CE-LIF-System eine geringere Trennungsspannung (16 kV, Methode IV) als auf dem CE-LS-CCD-System (18 kV, Methode VII) angelegt. Zum Vergleich der Sensitivität wurden die Signale von 5m-dCMP und etheno-dAMP betrachtet und die jeweiligen S/N-Verhältnisse ermittelt. Bei einer Belichtungszeit von 1000 ms zeigte das CE-LS-CCD-System im Mittel eine um den Faktor 8,4 höhere Empfindlichkeit.

Die bei der Bestimmung des Detektionslimits mit Hilfe wäßriger BODIPY-Lösungen angesprochene Elektrolytphotolyse, die sich dort positiv auf die Empfindlichkeit ausgewirkt hat, zeigte bei SDS-haltigen Elektrolytsystemen keinen wesentlichen Erfolg. Daher wurde bei diesen Elektrolyten versucht, die Untergrundfluoreszenz durch fluoreszenzarme, wenig kontaminierte Elektrolytbestandteile möglichst gering zu halten. Dazu wurden Elektrolytkomponenten in verschiedenen Qualitätsstufen und von verschiedenen Herstellern auf ihre Eigenfluoreszenz getestet. Die Chemikalien (MeOH, SDS) wurden dazu hydrodynamisch mit 1 psi durch die Kapillare gedrückt und mit 1000 ms bei einer Verstärkung von 200 belichtet. Die Bestandteile mit der geringsten Eigenfluoreszenz wurden dann zur Herstellung der Elektrolyten für die MEKC verwendet. Da die SDS-haltigen Elektrolytsysteme im interessierenden Wellenlängenbereich eine diffuse, stetige Basisfluoreszenz aufwiesen, ließ sich ein Grundrauschen je nach verwendetem Elektrolyten nicht komplett vermeiden. Vergleichende Untersuchungen ergaben, daß sich ein modifizierter Nullabgleich der Kamera positiv auf die Minimierung der Untergrundfluoreszenz und auf die Sensitivität auswirkte. So konnte eine Aufnahme der mit Wasser gefüllten Kapillare mit eingeschaltetem Laser, anstelle des in Kapitel 4.4.4 beschriebenen Dunkelbildes der Kamera bei ausgeschaltetem Laser, das S/N-Verhältnis betrachteter Signale deutlich verbessern (~ Faktor 1,4). Dagegen zeigte der Nullabgleich der

Kamera mit einer statischen Elektrolytlösung in der Kapillare bei eingeschaltetem Laser keine deutlich erkennbare Verbesserung des S/N-Verhältnisses.

4.4.8 Linearität des LS-CCD-Systems

Die Linearität des LS-CCD-Systems wurde sowohl mit der Kapillarzonen-
elektrophorese anhand wäßriger Lösungen des Fluoreszenzmarkers BODIPY im Konzentrationsbereich von 5 pM - 1000 pM als auch mit der MEKC anhand einer derivatisierten Probe des Nukleotids dAMP im Konzentrationsbereich von 3,4 nM - 108,2 nM überprüft.

Die CZE-Analyse wäßriger BODIPY-Lösungen ergab eine Linearität des Systems über den gesamten Konzentrationsbereich bis zum Detektionslimit. Abbildung 4-31 zeigt die Kalibriergerade mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,9939. Bei allen Messungen war die Belichtungszeit der Kamera auf 500 ms und die Verstärkung auf 200 eingestellt.

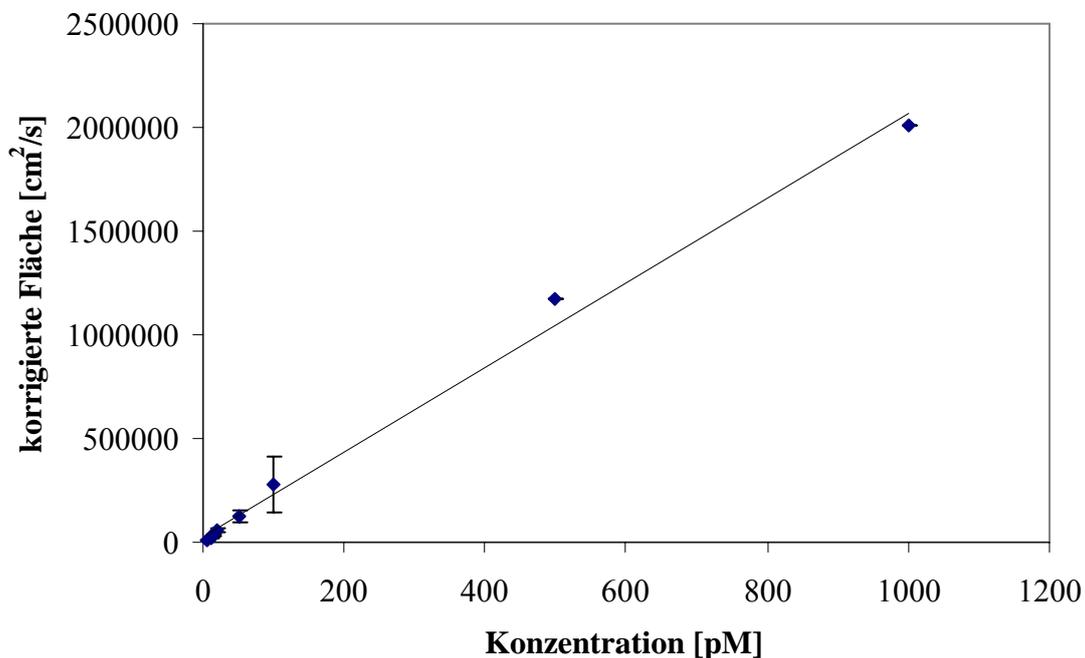


Abbildung 4-31: Untersuchungen zur Linearität mit wäßrigen BODIPY-Lösungen, die mit der Kapillarzonen-
elektrophorese und dem LS-CCD-Detektor analysiert wurden. Die Datenpunkte stellen die Mittelwerte aus je
3 Messungen dar (mit Ausnahme von 500 und 1000 pM, n = 1)

Zur Überprüfung der Linearität des Systems unter Bedingungen, die den Analysen von Realproben entsprachen, wurden 10 µg des Nukleotids dAMP analog einer 10 µg DNA-Probe derivatisiert (PVV 6) und anschließend in verschiedenen Verdünnungen kapillarelektrophoretisch nach Methode VII analysiert. Die Detektion erfolgte mit einer Belichtungszeit von 1000 ms und einer Verstärkung von 200. Untersucht wurde ein Konzentrationsbereich von 3,4 nM bis 108,2 nM des Nukleotids (eine quantitative Derivatisierung vorausgesetzt). In diesem Konzentrationsbereich liegt z.B. das 5m-dCMP-Signal (bei 10 µg DNA-Ansätzen ca. 20 – 30 nmol/L bei Säugetieren). Die Untersuchung ergab, daß bei den verwendeten Detektoreinstellungen eine Linearität des Systems im Bereich von 3,4 nM -54,1 nM gewährleistet werden konnte. Abbildung 4-32 zeigt ein Konzentrations-Flächen-Profil der derivatisierten 10 µg dAMP-Probe, die vor den Messungen verdünnt wurde (Korrelationskoeffizient 0,9982). Bei einer Konzentration von 108,2 nM war die Sättigungsgrenze der Kamera bei diesen Einstellungen erreicht, weshalb dort auch keine Linearität mehr gegeben war.

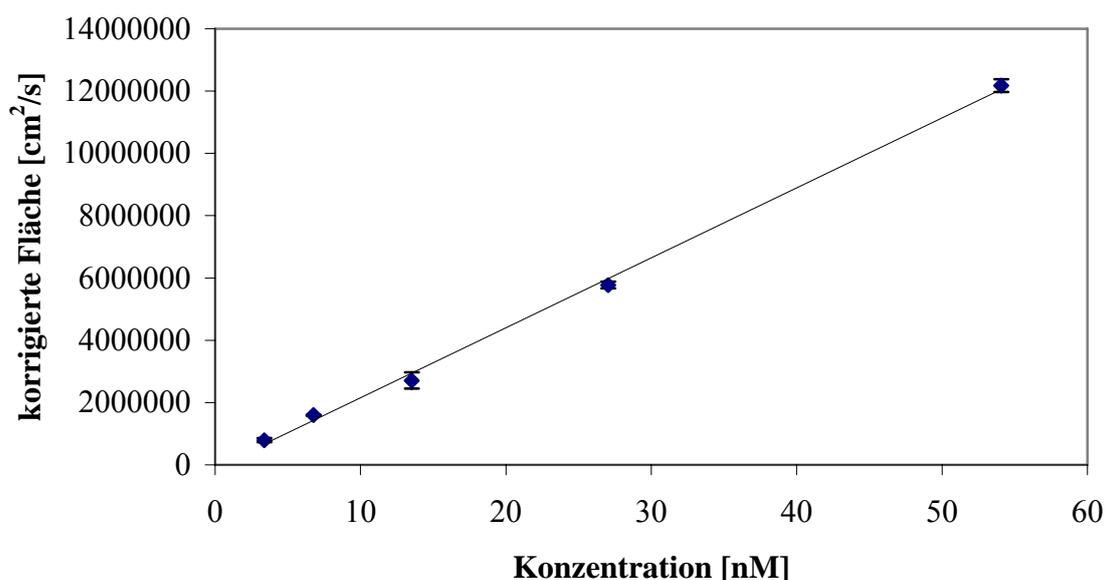


Abbildung 4-32: Konzentrations-Flächen-Profil von derivatisiertem dAMP (10 µg), das in unterschiedlichen Verdünnungen kapillarelektrophoretisch (MEKC) mit LS-CCD-Detektion analysiert wurde. Die jeweiligen Datenpunkte stellen die Mittelwerte aus zwei Einzelmessungen ($n = 2$), die Fehlerbalken die entsprechenden Standardabweichungen dar.

Parallel zu dieser Untersuchung wurde auch die Linearität des CE-LIF-Systems unter analogen kapillarelektrophoretischen Bedingungen mit derivatisiertem dAMP in einem Konzentra-

tionsbereich von 1,1 nM bis 216,3 nM überprüft. Das System zeigte über den gesamten Bereich einen linearen Verlauf (Korrelationskoeffizient = 0,9953) (Abbildung 7-8, Anhang).

4.4.9 Sensitivitätssteigerung durch Einsatz einer kubischen Kapillare

In der in dieser Arbeit genutzten Anordnung des LS-CCD-Systems, bei dem ein Beleuchtungswinkel von etwa 45° zur Illumination des Detektionsvolumens verwendet wurde, ging ein Teil der Intensität des Laserlichtes durch Reflexion an der Glasoberfläche der runden Kapillare verloren. Theoretisch sollte es möglich sein, diesen Intensitätsverlust entweder durch den Einsatz eines Prismas direkt über der dann zusätzlich in einer Immersionsflüssigkeit einzubettenden Kapillare oder durch Substitution der runden Kapillare durch eine kubische zu minimieren. Eine Minderung der Reflexion sollte zu einer Sensitivitätssteigerung führen. Um dies zu untersuchen, wurde eine kubische Kapillare von Polymicro Technologies (schematische Darstellung Abbildung 4-33) eingesetzt. Die Reflexion an der Glasoberfläche dieser Kapillare fiel im Vergleich zu einer runden Kapillare deutlich geringer aus (Abbildungen 7-9 und 7-10, Anhang).

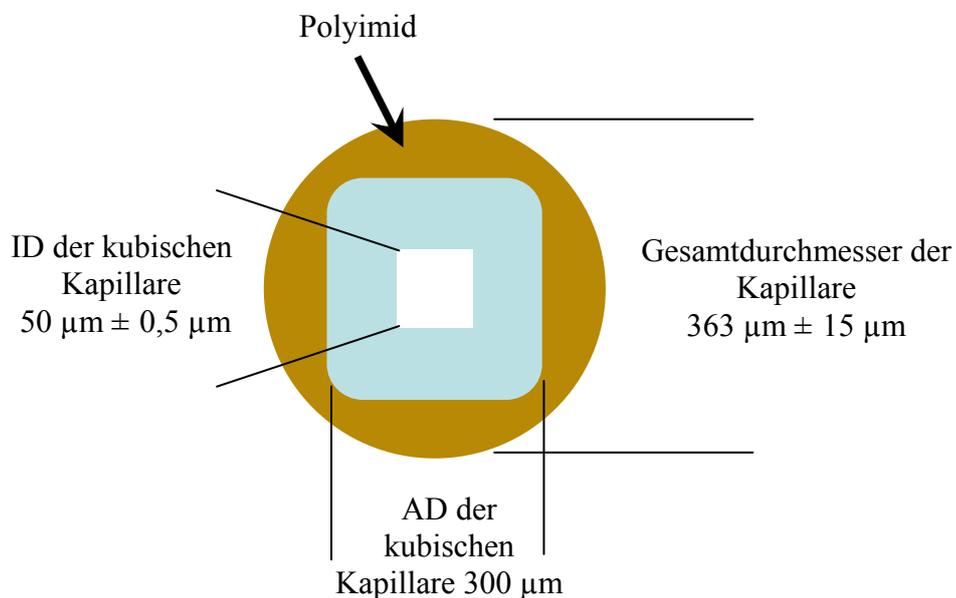


Abbildung 4-33: Schematische Darstellung der verwendeten kubischen Kapillare laut Produktinformation des Herstellers

Zum Nachweis einer möglichen Sensitivitätssteigerung wurde eine nach PVV 2 vorbereitete 10 µg CT-DNA-Probe, die unmittelbar vor dem Kapillarwechsel auf dem CE-LS-CCD-System mit runder Kapillare analysiert worden war, auf dem gleichen System mit kubischer Kapillare gemessen. In beiden Fällen wurde die Probe unter gleichen kapillarelektrophoretischen Bedingungen nach Methode VII zweimal analysiert. Die Detektion erfolgte mit einer Belichtungszeit von 1000 ms und einer Verstärkung von 200. Zum Vergleich der Sensitivität wurden die Signale von 5m-dCMP und dGMP betrachtet und die jeweiligen Peakflächen sowie die S/N-Verhältnisse ermittelt. Dabei ergab sich eine Erhöhung in der Peakfläche bei 5m-dCMP um den Faktor 2,7 (bei dGMP 2,5) und eine Verbesserung im S/N-Verhältnis bei 5m-dCMP von 3,7 (bei dGMP von 2,7) zugunsten der kubischen Kapillare. Die Faktoren wurden aus den Mittelwerten von je zwei Analysen bestimmt. Abbildung 4-34 zeigt das Elektropherogramm der Analyse auf dem CE-LS-CCD-System unter Verwendung einer runden Kapillare inklusive der Bilddarstellung, während in Abbildung 4-35 die Analyse der Probe auf der kubischen Kapillare dargestellt ist.

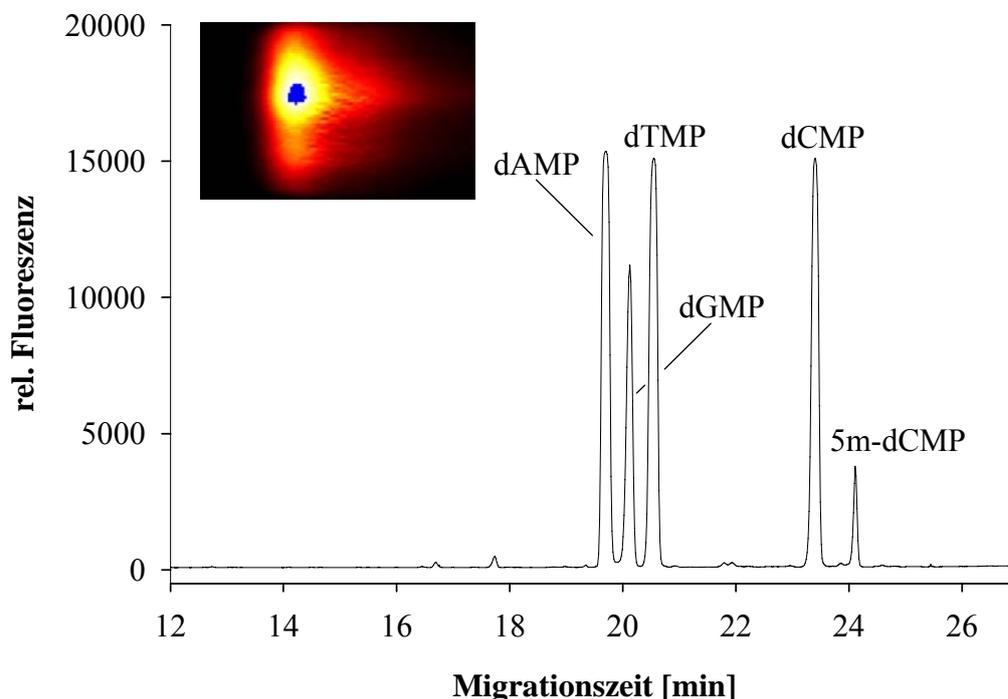


Abbildung 4-34: Elektropherogramm der Analyse einer präparierten 10 µg CT-DNA auf dem CE-LS-CCD-System unter Verwendung einer runden Kapillare; die Bilddarstellung zeigt das Kamerabild des 5m-dCMP-BODIPY-Signals. Die Signale von dAMP, dTMP und dCMP liegen oberhalb der Sättigungsgrenze der Kamera und sind daher nicht vollständig in ihrer Signalhöhe aufgelöst.

Zusammenfassend ließ sich eine Sensitivitätssteigerung um das ~ 3 -fache durch Verwendung einer kubischen Kapillare gegenüber einer runden feststellen. Das würde bedeuten, daß zur Analyse von DNA-Proben mit Hilfe einer kubischen Kapillare eine Sensitivitätssteigerung um das 25-fache ($8,4 \cdot 3$) gegenüber der kommerziellen LIF-Detektion möglich ist. Unter Berücksichtigung dieses Faktors könnten mittels LS-CCD-Detektion und Einsatz einer kubischen Kapillare DNA-Addukte mit einem RAL von ~ 5 Addukten in 10^7 unmodifizierten Nukleotiden nachgewiesen werden.

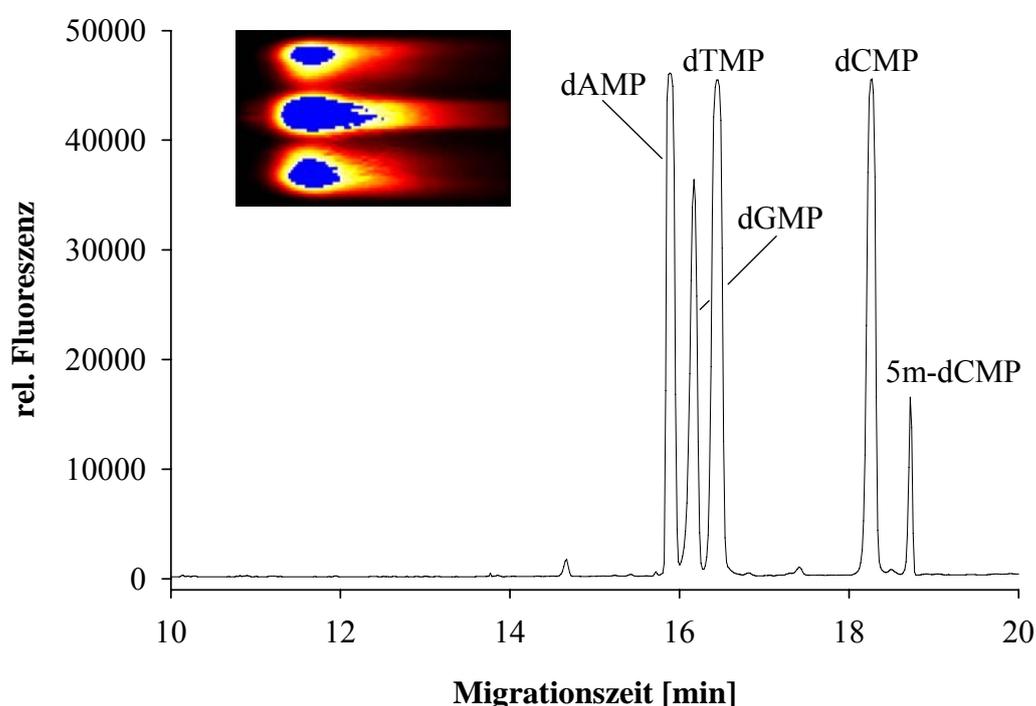


Abbildung 4-35: Elektropherogramm der Analyse einer präparierten $10 \mu\text{g}$ CT-DNA auf dem CE-LS-CCD-System unter Verwendung einer kubischen Kapillare; die Bilddarstellung zeigt das Kamerabild des 5m-dCMP-BODIPY-Signals. Die Lücken zwischen den einzelnen Spots resultieren aus Abschattungen an den Kanten der kubischen Kapillare. Die Signale von dAMP, dTMP und dCMP liegen oberhalb der Sättigungsgrenze der Kamera und sind daher nicht vollständig in ihrer Signalhöhe aufgelöst.

Der Einsatz kubischer Kapillaren ist bereits von *Lu* und *Yeung* in CAE-Systemen mit Erfolg demonstriert worden [316]. *Zugel* und *Lytle* konnten bei einer Zweiphotonenanregung von β -Naphthylamin zeigen, daß mit einer kubischen Kapillare eine etwa 1,4 mal höhere Sensitivität im Vergleich zu einer runden erreicht wird [512]. Ähnlich empfindlich wie die kubische Kapillare erwies sich bei den Untersuchungen der Autoren eine dünnwandigere, runde Kapil-

lare (ID = 75 μm , AD = 150 μm) [512], was in dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht getestet wurde.

4.5 Erhöhung des Probendurchsatzes durch Konstruktion einer Multikapillarenanordnung

Der zeitliche Aufwand betrug bei dem bestehenden Einzelkapillaren-CE-LS-CCD-System wegen der fehlenden Automatisierbarkeit im Outletbereich etwa 1 Stunde für einen Analysenlauf und den anschließenden Spülschritten. Dies limitierte den täglichen Probendurchsatz auf 10 Analysen. Sequenzmessungen über Nacht waren im Gegensatz zum CE-LIF-System nicht möglich. Um den Probendurchsatz auf dem CE-LS-CCD-System zu erhöhen, wurde deshalb eine Multikapillarenanordnung konzipiert.

4.5.1 Vorbereitung und Entwicklung einer Multikapillarenanordnung

Um eine solche Anordnung mit drei Kapillaren zu gewährleisten, waren mehrere Aspekte zu berücksichtigen:

- die Kapillarenführung innerhalb der CE
- die Kapillarenführung innerhalb der externen Detektionseinheit
- die Einstellung des Laserstrahls (Anpassung) und des Objektivs

Die Kapillaren mußten zunächst innerhalb der CE durch die vorhandene Beckman Coulter Kartusche geführt werden. Sowohl die Kartuschenabdichtung als auch das Interface für den Kartuschenhalterung sind werksmäßig lediglich für die Aufnahme einer Kapillare mit einem Durchmesser von max. etwa 380 μm vorgesehen. Zur Aufnahme von drei Kapillaren in das vorhandene Kartuschensystem wurden das Interface an entsprechender Stelle und die Austrittsöffnung der Kapillaren am Y-Stück der Kühlwasserrückführung auf 0,8 mm aufgebohrt. Um die Dichtigkeit der flüssiggekühlten Kartusche nach Einsetzen von drei Kapillaren zu gewährleisten, wurde eine werksmäßige Gummidichtung verwendet und die Schnittstelle zwischen Dichtung und Kapillare zusätzlich mit Polyimid-Kleber (CS-Chromatographie, Langerwehe) versiegelt. Im Gegensatz zu Epoxidharz oder Silikon hat der Polyimid-Kleber den Vorteil, daß er eine gute Kriechfähigkeit besitzt und so die Zwischenräume zwischen Kapillare und Gummidichtung und den Kapillaren untereinander sehr gut verschließt. Zwei Tropfen

des Klebers wurden an der Schnittstelle mit einer Pipettenspitze aufgetragen. Zur Aushärtung des Klebers wurde die gesamte Einheit (Kartusche mit drei durchgeführten Kapillaren) bei 40 °C im Trockenschrank über Nacht gelagert.

Zur Führung der Kapillaren im externen Detektorgehäuse wurde eine Auflage (Abbildung 4-36 a) mit verschiedenen Kapillarträgern (Abbildung 4-36 b) hergestellt, die oberhalb des Objektivgehäuses platziert wurde. Der Kapillarträger bestand aus getempertem Polymethylmethacrylat (PMMA) und enthielt drei mit einem 90° Stichel gefräste Rillen, in denen die Kapillaren geführt und fixiert wurden sowie eine 24 mm-Bohrung für die Ausrichtung des Objektivs. Die Fixierung der Kapillaren auf diesem Träger erfolgte über zwei Metallklammern, die auf der Auflage angebracht waren.

Da die effektivste Positionierung der Kapillaren zu Beginn der Planungen noch nicht bekannt war, wurden mehrere Kapillarträger mit unterschiedlichen Rillenabständen und -größen gefertigt. Die Rillenabstände variierten dabei von 360 µm bis 720 µm und die Rillengrößen (Tiefe und Breite) von 320 µm bis 380 µm. Grund für die unterschiedlich gewählten Rillenabstände war einerseits die Frage, wie weit die Kapillaren mindestens voneinander entfernt sein müssen, um noch eine effektive Wärmeableitung durch Luftzirkulation am Kapillarenfenster zu gewährleisten. Andererseits ergab sich die Frage, wie nah die Kapillaren aneinander positioniert sein müssen, um sie optisch parallel erfassen zu können. Zudem sollte der durch Aufweitung des Laserstrahls zu erwartende Sensitivitätsverlust so gering wie möglich sein. Es zeigte sich, daß ein Kapillarträger mit den Rillenmaßen 360 µm x 360 µm (Abstand x Rillentiefe und -breite) sehr gut den gestellten Anforderungen entsprach. Die gesamte Führungs-

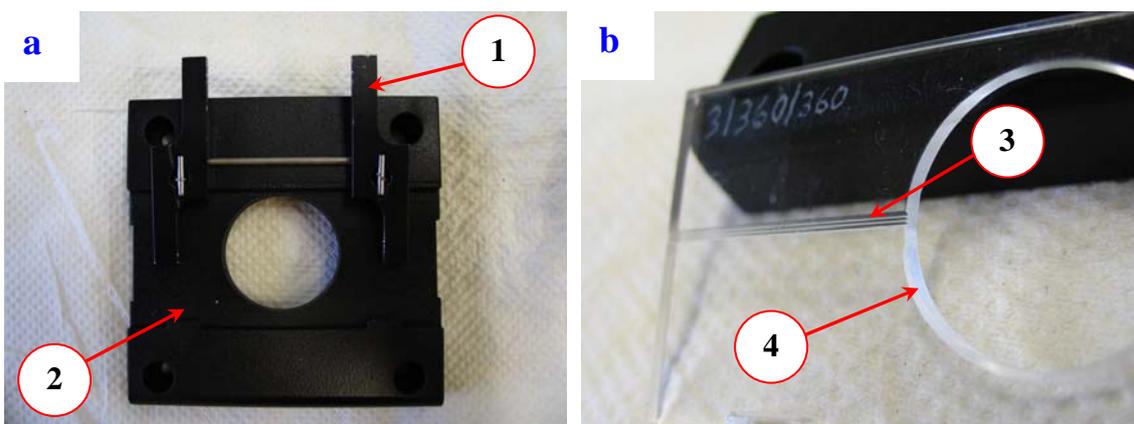


Abbildung 4-36: (a) Auflage für die Fixierung des Kapillarträgers, 1: Klammer zur Fixierung der Kapillaren, 2: Ausfräsung für den Kapillarträger; (b) Kapillarträger aus getempertem PMMA, 3: Führungsrillen für die Kapillaren (360 µm x 360 µm = Abstand x Rillentiefe und -breite), 4: 24 mm-Bohrung für die Ausrichtung des Objektivs

konstruktion (Auflage mit Klammern und Kapillarträgersystem) wurde so variabel gestaltet, daß der Umbau auf eine Einzelkapillar- oder eine Multikapillarenanordnung mit eventuell vier oder fünf Kapillaren mit relativ wenig Aufwand möglich wurde. Durch das gewählte Nutsystem in der Auflage und im Kapillarträger wurde zudem eine exaktere und schnellere Positionierung der Kapillaren nach einem Wechsel erreicht, als dies bei der bisherigen Vorrichtung für eine einzelne Kapillare möglich war.

Abbildung 4-37 gibt einen Überblick über die Führung der Kapillaren im Bereich der Eintrittsstelle in das Detektorgehäuse und des Detektionsfensters.

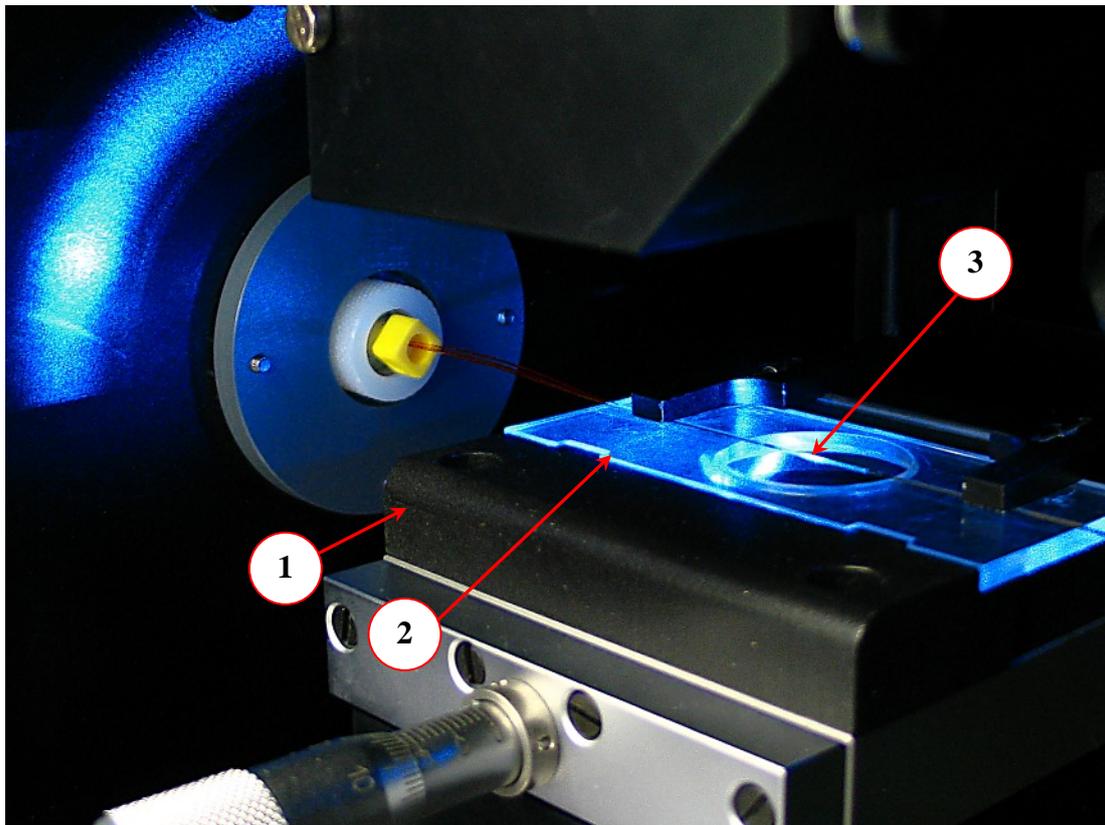


Abbildung 4-37: Überblick über die Führung der Kapillaren im Bereich der Eintrittsstelle in das Detektorgehäuse und des Detektionsfensters bei der Multikapillarenanordnung mit drei Kapillaren, 1: Auflage zur Fixierung des Kapillarträgers, 2: Kapillarträger, 3: Detektionsfenster

Um den elektropheretischen Stromkreis für alle drei Kapillaren zu schließen, war die Konstruktion eines neuen Outlets erforderlich. Dazu wurde ein von der Fa. Picometrics (Ramonville, Frankreich) hergestellter Polycarbonatzylinder verwendet, der eine Platinelektrode, die notwendige Erdung und eine mittige Bohrung (\varnothing 4 mm) enthielt, durch die die Kapillaren geführt werden konnten. Ein 10 mL Probenglas (CS Chromatographie, Langerwehe) diente

als Puffergefäß am Outlet (Abbildung 7-11, Anhang).

Zur gleichzeitigen Fluoreszenzanregung der Analyten in allen drei Kapillaren war es darüber hinaus notwendig, den Laserstrahl zu defokussieren. Die Defokussierung wurde zunächst nach optischen Gesichtspunkten und anschließend nach der softwaretechnischen Bilddarstellung vorgenommen. Dabei fiel auf, daß das bisher im System integrierte Objektiv (Nikon S Fluor 40x /0.90) eine zu starke Vergrößerung aufwies, so daß die gleichzeitige Darstellung aller drei Kapillaren nicht möglich war. Daher wurde es gegen ein Objektiv mit geringerer Vergrößerung, aber auch geringerem Auflösungsvermögen (Leitz PL 8x / 0.18) ersetzt.

Zur Unterstützung der Luftzirkulation wurde auf der Rückseite des Detektorgehäuses an einer bestehenden Öffnung (etwa 10 cm Durchmesser) ein zusätzlicher Ventilator angebracht.

4.5.2 Analyse von CT-DNA mit der Multikapillarenanordnung

Nach erfolgreicher Einrichtung der Multikapillarenanordnung ergaben sich für die Analyse von DNA-Proben Fragestellungen bezüglich

- der Funktionsfähigkeit in Bezug auf die Ableitung der Joule'schen Wärme
- der Gleichmäßigkeit der Injektion in allen drei Kapillaren
- des Sensitivitätsverlustes bedingt durch die Aufweitung des Laserstrahls
- der Reproduzierbarkeit der Analyse im Vergleich der Kapillaren untereinander
- der Einsatzfähigkeit und Routinetauglichkeit des Systems

Zur Beantwortung dieser Fragestellungen wurde eine hydrolysierte und derivatisierte 10 µg CT-DNA Probe 1:200 in Wasser verdünnt und hydrodynamisch mit 3,2 psi · s in alle drei Kapillaren gleichzeitig injiziert. Vor der Analyse wurden die Kapillaren mit 1 M NaOH (15 min), 1 M HCl (15 min), 1 M NaOH (15 min), Wasser (5 min) und Elektrolyt (10 min) jeweils mit einem Druck von 25 psi konditioniert. Die Trennung wurde auf fused-silica Kapillaren ($L = 64$ cm, $L_{\text{eff}} = 46,4$ cm, $ID = 50$ µm) unter Einsatz von Methode II durchgeführt. Es wurde mit 500 ms belichtet, und die Verstärkung betrug 200. Nach der Analyse wurden die Kapillaren mit einer 50 %-igen (v/v) Lösung aus 200 mM SDS und MeOH (2 min), 1 M NaOH (2 min), Wasser (1,5 min) und Elektrolyt (10 min) mit jeweils 30 psi gespült. Abbildung 4-38 zeigt das Elektropherogramm dieser Analyse ohne softwaretechnische Untergrundkorrektur.

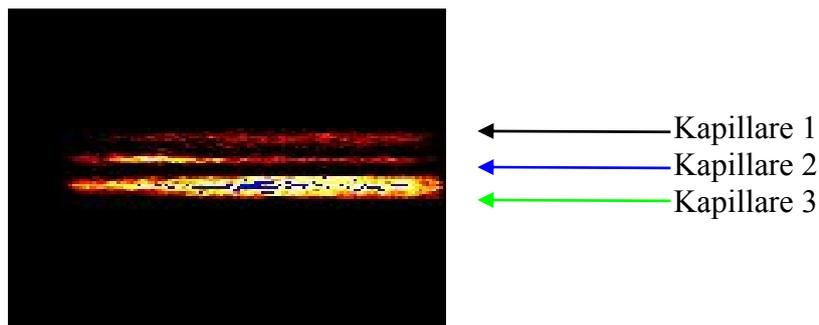
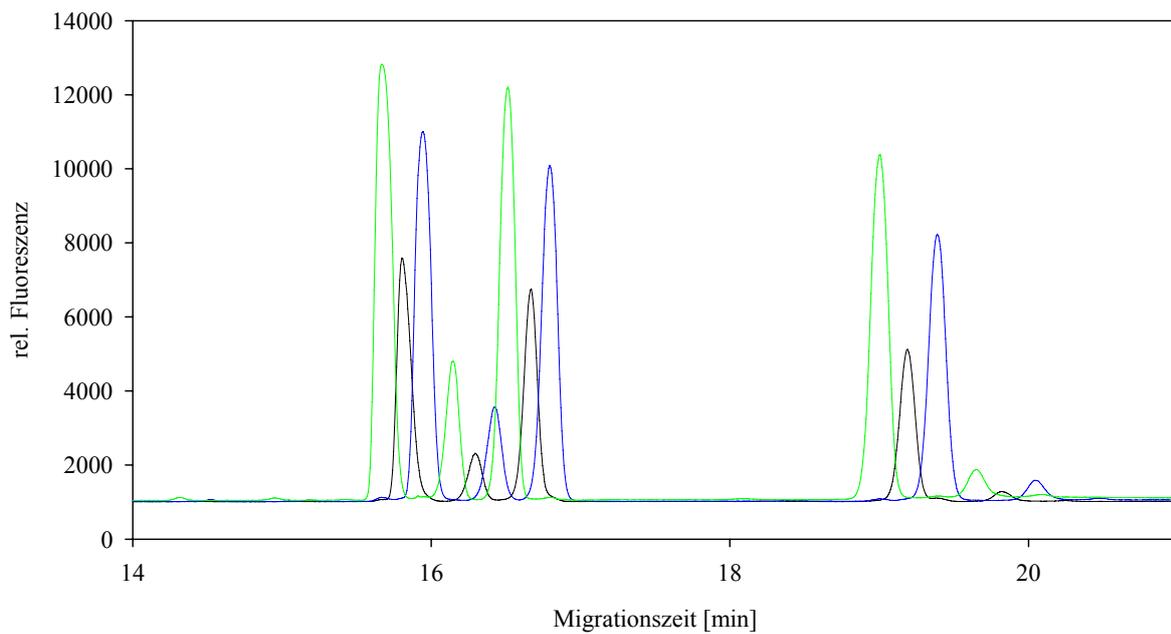


Abbildung 4-38: Elektropherogramm der Multikapillaren-Analyse einer 1:200 in H₂O verdünnten, präparierten CT-DNA (10 µg nach PVV 2) mit einer entsprechenden Legende zur Kapillarenzuordnung der jeweiligen Spur.

Während der gesamten Elektrophorese zeigte sich ein stabiles Stromprofil. Das bedeutete, daß die Effektivität der Luftzirkulation im Detektorgehäuse ausreichte, um die entstehende Wärme abzuleiten, und daß die dicht aneinander liegenden Kapillaren sich vermutlich nicht gegenseitig gravierend beeinflussten. Gerade am Detektionsfenster, an dem die isolierende Polyimidschicht nicht mehr vorhanden war, war dies nicht unbedingt zu erwarten. Über die Gleichmäßigkeit der Injektion in allen drei Kapillaren fällt es schwer, eine eindeutige Aussage zu treffen. Es waren deutliche Signalintensitätsunterschiede in den Kapillaren zu beobachten, die auf mehreren Faktoren beruhen konnten. Bei der kegelförmigen Aufweitung des Laserstrahls ergaben sich am Kegelrand geringere Intensitäten als in der Mitte. Dies ist schematisch in Abbildung 4-39 a dargestellt. Demnach sollte beim Durchgang einer fluoreszierenden Lösung ein Intensitätsprofil mit abnehmender Intensität bei den beiden äußeren Kapillaren

erhalten werden. Auf Kapillare 1 und 2 traf diese Aussage zu, jedoch zeigte Kapillare 3 die größte Intensität. Zwar wies diese Kapillare auch eine höhere Untergrundfluoreszenz auf (Abbildung 4-39 b), welche möglicherweise auf innere oder äußere Kontaminationen (z.B. mit Polyimidresten im Spurenbereich) basieren konnte. Die sehr hohe Signalintensität der Nukleotidkonjugate konnte damit alleine aber nicht erklärt werden. Daher war es wahrscheinlich, daß der große Unterschied in den Signalintensitäten der einzelnen Kapillaren maßgeblich auf Injektionsschwankungen beruhte. Auch sind herstellerbedingte Variabilitäten im Kapillardurchmesser bzw. der Glasqualität nicht auszuschließen.

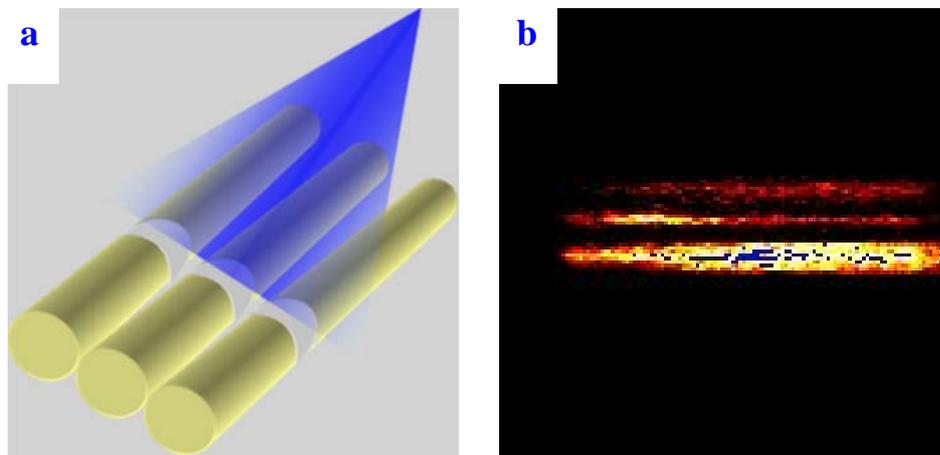


Abbildung 4-39: (a) Schematische Darstellung der gaußförmigen Aufweitung des Laserstrahls zur gleichzeitigen Illumination von drei Kapillaren; (b) Bilddarstellung des bei der Multikapillaren-Analyse der CT-DNA-Probe verwendeten ROI unmittelbar vor dem dCMP-Signal bei ca. 18,5 min.

Der Intensitätsverlust an den beiden äußeren Kapillaren durch die kegelförmige Aufweitung des Laserstrahls könnte durch Einsatz eines Liniengenerators (Powell-Linse) verhindert werden. Die Positionierung einer Zylinderlinse vor der fokussierenden Achromatlinse würde allerdings der Funktionsweise eines Liniengenerators entsprechen. Dadurch könnte eine gleichmäßige, spaltförmige Aufweitung des Laserstrahls erfolgen, und alle Kapillaren würden mit gleicher Lichtintensität angestrahlt.

Um den Sensitivitätsverlust durch Aufweitung des Laserstrahls abschätzen zu können, wurde die gleiche, 1:200 verdünnte CT-DNA-Probe auf einem Beckman Coulter CE-LIF-System analysiert und das S/N-Verhältnis der jeweiligen Nukleotidkonjugat-Signale ermittelt. Der Vergleich beider Ergebnisse wies einen Sensitivitätsverlust des Multikapillarensystems um den Faktor 2,4 (Mittelwert, $n = 3$) zum CE-LIF-System auf. Kapillare 2 ergab bei allen Nukleotidkonjugat-Signalen die höchsten S/N-Werte, was auch dafür sprach, daß der Laserstrahl

dort fokussierter als bei den beiden äußeren Kapillaren war. Gegenüber dem CE-LS-CCD mit einer Einzelkapillaranordnung bedeutete das eine etwa 20-fach geringere Empfindlichkeit bei der Analyse von DNA-Proben, wodurch der Nachweis von DNA-Addukten mit einem RAL von 1 auf 10^6 oder weniger sicherlich nicht mehr möglich sein wird. Für die Analyse der genomischen Methylierung war jedoch noch eine hinreichende Empfindlichkeit gegeben, für die zudem lediglich ein Drittel der bisherigen Analysenzeit benötigt wurde. Eine Steigerung der Empfindlichkeit könnte allerdings durch einige Optimierungen wie z.B. der bereits angesprochenen Positionierung einer Zylinderlinse vor der fokussierenden Achromatlinse, der Verwendung eines Objektivs mit höherer numerischer Apertur zur Erhöhung der Sammeleffizienz der Fluoreszenzphotonen und dem Einsatz kubischer Kapillaren erfolgen.

Die Reproduzierbarkeit der Multikapillaren-Analyse wurde überprüft, indem die Elektrophogramme aller drei Kapillaren hinsichtlich des Methylierungsgrades (vgl. Kapitel 2.4 und 4.1.2) in der Probe ausgewertet wurden. Die Auswertung wurde mit Hilfe der ³²Karat-Software (Beckman Coulter) durchgeführt und ergab die in Tabelle 4-12 aufgeführten Werte:

Kapillare	Methylierungsgrad [%]
1	6,68
2	6,52
3	6,71
Mittelwert:	$6,64 \pm 0,10$

Tabelle 4-12: Erhaltene Methylierungsgrade aus der Multikapillaren-Analyse einer 10 µg CT-DNA-Probe, die nach PVV 2 vorbereitet und nach Methode II kapillarelektrophoretisch analysiert wurde.

Diese Ergebnisse belegen, daß das Multikapillarensystem in der jetzigen Konstruktion für den täglichen Einsatz sehr gut geeignet ist.

Ein von der Anzahl der betriebenen Kapillaren unabhängiger Nachteil des Systems ist sicherlich, daß es im Gegensatz zum kommerziellen CE-LIF-System nicht vollständig automatisiert ist. Durch den notwendigen manuellen Glaswechsel zwischen dem Spülvorgang und der Elektrophorese, der fehlenden elektronischen Verknüpfung beider Software-Programme (³²Karat und ImSpector[®]) und der nicht möglichen Sequenzprogrammierung der ImSpector-Software sind zur Zeit keine Übernachtmessungen möglich. Das schränkt natürlich den theoretisch durchführbaren Probendurchsatz des Multikapillarensystems stark ein.

4.6 Ausblick

Aufbauend auf den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen bieten sich zukünftig folgende Untersuchungen an:

- Analyse des genomischen Methylierungsgrades in DNA von Patienten mit hämatologischen Neoplasien
- Standardisierung der Analyse von endogenen DNA-Addukten
- Empfindlichkeitserhöhung bei der Multikapillarenanalyse auf dem LS-CCD-System
- Sensitivitätssteigerung durch Ausnutzen der Variabilität des LS-CCD-Systems in einer Einzelkapillaranordnung
- Sensitivitätssteigerung durch Entfernen des Überschusses an BODIPY und Reduzierung der Probenverdünnung
- Verkürzung der Derivatisierungszeit
- Substitution des Fluoreszenzmarkers

Methylierungsuntersuchungen

In Kapitel 4.2.3.2 konnte bei der Analyse der genomischen Methylierung in DNA von Patienten mit B-CLL eine Hypomethylierung gegenüber nicht daran erkrankten Personen festgestellt werden. Um das Auftreten dieser Hypomethylierung in der chronischen lymphatischen Leukämie zu erforschen, wäre interessant, B-CLL-Proben zu analysieren, die neben den prognostischen, klinischen Parametern auch Angaben bezüglich der Methyltransferaseaktivität sowie den Folatstatus der Patienten enthalten.

Daneben wären Methylierungsuntersuchungen hoch maligner hämatologischer Neoplasien wie z.B. die akute myeloische Leukämie (AML) oder die akute lymphatische Leukämie (ALL) zum einen wegen ihres aggressiven Krankheitsverlaufes und zum anderen wegen ihrer Inzidenz bei jungen Erwachsenen (AML) beziehungsweise Kindern (ALL) sehr interessant. Studien von *Melki et al.* [213] haben in diesen Leukämie-Formen eine erhöhte Methyltransferase-Expression gezeigt. Zudem ist bekannt, daß bei diesen Leukämien 5-Azacytidin und das entsprechende Desoxy-Analogon 5-Aza-2'-Desoxycytidin eine klinische antileukämische Aktivität besitzen [513].

DNA-Adduktanalyse

Das in Kapitel 4.3.5 beschriebene Verfahren der Standardaddition zum Nachweis von endogenen DNA-Addukten ist ein sehr aufwendiges und zeitintensives Verfahren und im Gegen-

satz zur Methylierungsbestimmung noch nicht routinetauglich. Es hat sich gezeigt, daß der Probendurchsatz sehr gering ist. So konnte die sichere Quantifizierung von etheno-dAMP in einer B-CLL-Probe bis zu zwei Wochen Zeit in Anspruch nehmen. Dieses Verfahren sollte in Anbetracht der Untersuchungsergebnisse und der möglichen Bedeutung bestimmter endogener Addukte als Biomarker vereinfacht und standardisiert werden. Eine Vereinfachung könnte beispielsweise dadurch erfolgen, daß die Konzentration eines Adduktes, in Analogie zum Methylierungsgrad, relativ zur Konzentration eines unmodifizierten Nukleotids, z.B. von etheno-dAMP zu dAMP, bestimmt wird.

Empfindlichkeitssteigerung in der Multikapillarenanordnung

Wie in Kapitel 4.5.2 gezeigt werden konnte, trat bei der Multikapillarenanordnung auf dem LS-CCD-Detektionssystem ein deutlicher Empfindlichkeitsverlust aufgrund der für eine parallele Illumination aller Kapillaren notwendigen Aufweitung des Laserstrahls auf. Eine Steigerung der Empfindlichkeit um den Faktor 2 - 4 wäre allerdings mit folgenden Optimierungen möglich:

- der Positionierung einer Zylinderlinse vor der fokussierenden Achromatlinse
- der Verwendung eines Objektivs mit höherer numerischer Apertur
- dem Einsatz kubischer Kapillaren

Damit würde die Empfindlichkeit mindestens der des CE-LIF-Systems entsprechen.

Aufgrund der bereits erzielten Empfindlichkeit in einer Einzelkapillaranordnung würde es sich allerdings eher anbieten, das LS-CCD-System in einer solchen Anordnung zu nutzen und hinsichtlich der Sensitivität und der Automatisierbarkeit weiter zu optimieren.

Erhöhung der Sensitivität in der Einzelkapillaranordnung

Durch diverse Einstellungen und Verwendung einer kubischen Kapillare auf dem CE-LS-CCD-System konnte das theoretische Detektionslimit für DNA-Addukte ausgehend von einem RAL von ~ 11 auf 10^6 (CE-LIF) auf ~ 5 auf 10^7 verbessert werden (Kapitel 4.4.9). Dieser Faktor könnte durch Ausnutzen der Variabilität des LS-CCD-Systems noch weiter erhöht werden. Zu diesem Zweck würde sich anbieten, die Möglichkeit der Epiillumination (Abbildung 7-1, Anhang) in Kombination mit der Verwendung kubischer Kapillaren zu nutzen, wodurch der Einfluß von Streulicht und Ramanstreuung von Elektrolytbestandteilen zusätzlich minimiert werden könnte. Die Vorteile einer Epifluoreszenzmikroskopie sind

unter anderem für den Nachweis von Aminosäuren von *Hernandez et al.* [299, 302] bereits demonstriert worden.

Auch durch eine seitliche Einkopplung des Laserstrahls in Verbindung mit einer kubischen Kapillare ließe sich der Streulichtanteil eventuell noch minimieren. Um die bei einer kubischen Kapillare noch in geringem Maße vorhandene Reflexion an der Kapillaroberfläche zu vermeiden, würde sich der Einsatz eines Prismas und einer Immersionsflüssigkeit oberhalb der Kapillare anbieten. Das LS-CCD-System ist bereits für den Einsatz eines solchen Prismas bautechnisch vorbereitet, weil in der Konzeption dieses Detektors diese Möglichkeit für eine runde Kapillare bereits vorgesehen war. Es wurden auch schon erste Versuche mit einer runden Kapillare durchgeführt, die allerdings aufgrund einer sehr hohen Eigenfluoreszenz des vermutlich verschmutzten Immersionsöls nicht erfolgreich waren.

Die mit dem LS-CCD-System durchgeführten Analysen lassen den Schluß zu, daß die Leistungsschwankungen des Lasers den Hauptbeitrag zum Grundrauschen liefern. Deshalb könnte der rauschstarke Ar-Ionen Laser durch einen geeigneten rauscharmen Festkörperlaser ersetzt werden. Festkörperlaser und Diodenlaser zeigen eine um Faktor 100 höhere Stabilität bei der Generierung der Laserphotonen und weisen im Vergleich zu einem Ar-Ionen Laser ein um diesen Faktor geringeres Laserrauschen auf [286]. Durch den Einsatz eines geeigneten Festkörperlasers wäre daher gegebenenfalls eine weitere Sensitivitätssteigerung erreichbar.

Die Möglichkeit einer zeitaufgelösten Fluoreszenzdetektion zur effektiven Trennung des Streulichtes und der Ramanstreuung könnte auch in Betracht gezogen werden. Bautechnisch ließe das LS-CCD-System prinzipiell die Ausführung dieser Detektion zu. Es sollte allerdings folgendes berücksichtigt werden: es müßte eine gepulste Anregungsquelle gefunden werden, die auf das Absorptionsverhalten (geeignete Wellenlänge) und die Lebensdauer des Fluoreszenzmarkers ($\tau_{\text{BODIPY}} \sim 5,9 \text{ ns}$ [509]) abgestimmt ist. Des weiteren wäre die Frage zu klären, ob die Übertragungszeit der vorhandenen EMCCD-Kamera mit Frame-Transfer-Sensor gering genug ist. Generell ist bei einer zeitaufgelösten Detektion zu beachten, daß zur effektiven Trennung des Hintergrundsignals Fluoreszenzmarker mit einer hohen Lebensdauer (z.B. $> 16 \text{ ns}$) am besten geeignet sind [294, 295].

Neben den bisher genannten Möglichkeiten, die Sensitivität des Systems zu erhöhen, könnte die CCD-spezifische Möglichkeit des Binnings getestet werden. Als Binning wird das Zusammenfassen von Intensitäten benachbarter Pixel verstanden [300, 303]. Dabei reduziert sich zwar die örtliche Auflösung entsprechend der Anzahl der zusammengefaßten Pixel, diese aber kann für die Applikation der DNA-Adduktanalytik toleriert werden. Neben dem Einfluß auf die Auslesegeschwindigkeit beeinflusst das Binning positiv das S/N-Verhältnis, da die zu-

sammengefaßten Ladungen nur einmal ausgelesen werden [300, 303]. Das bedeutet, daß für die Gesamtintensität mehrerer Pixel nur einmal das Ausleserauschen entsteht, womit ein entsprechend der „gebintten“ Pixelzahl höheres S/N-Verhältnis erzielt werden kann.

Im Rahmen einer Kooperation mit den Fachbereichen Elektrotechnik und Informatik wäre eventuell die Konstruktion eines automatisierten Probengebers am Outlet sowie die Erstellung eines Verknüpfungsprogramms zwischen der ³²Karat-Software (Beckman Coulter) und der ImSpector[®]-Software (LaVision BioTec) möglich.

Sensitivitätssteigerung durch Entfernen des Überschusses an BODIPY und Reduzierung der Probenverdünnung

Eine Limitierung der Sensitivität in Bezug auf die Analyse von DNA-Addukten ergab sich durch die notwendige Verdünnung einer hydrolysierten und derivatisierten DNA-Probe (z.B. bei einer 10 µg Probe 1:200). Bei einer derartigen Verdünnung und einem Injektionsvolumen von 5,3 nL werden 11,6 fmol in die Kapillare injiziert, das entspricht etwa $7 \cdot 10^9$ Moleküle. Eine Analyse eines DNA-Adduktes würde bei einem RAL von 1 auf 10^8 die Detektion von 70 Molekülen bzw. 116 ymol bedeuten. Eine geringere Verdünnung (evtl. um den Faktor 20) würde daher den Nachweis von DNA-Addukten in solchen Konzentrationsbereichen wesentlich erleichtern. Dies war aber aufgrund der Abbauprodukte des Fluoreszenzmarkers sowie wegen des hohen Überschusses der unmodifizierten Nukleotide nicht möglich. Der für die kapillarelektrophoretische Analyse von DNA-Addukten bislang eingesetzte Fluoreszenzmarker BODIPY besitzt zwar sehr gute spektroskopische Eigenschaften (hoher molarer Absorptionskoeffizient und hohe Quanteneffizienz $\phi > 0,8$ [505, 509, 514]), neigt aber durch basische Hydrolyse, Temperatur- und Sauerstoffeinflüsse zur Bildung von Zersetzungsprodukten. Diese Nebenprodukte erschweren ab einer bestimmten Konzentration die Zuordnung relevanter Signale (Kapitel 4.1.3) und stellten zudem den limitierenden Faktor bei der Reduzierung der DNA-Menge dar. Eine reproduzierbare Mehrfachanalyse von DNA-Mengen < 100 ng war aufgrund des hohen Überschusses an BODIPY und EDC nicht ohne Komplikationen möglich. Die Bildung der Nebenprodukte setzte bei der geringen DNA-Menge bereits nach einem Analysenlauf der verdünnten Probe ein. Eine Trennung der derivatisierten Nukleotide vom Überschuss des Fluoreszenzmarkers sowie des Kopplungsreagenzes sollte eine Reduzierung der DNA-Menge auf ≤ 50 ng ermöglichen. Eine erste Überlegung diesbezüglich tendierte zu einer Anreicherung der gelabelten Nukleotide in einer organischen Phase (wie z.B. Toluol, Tetrahydrofuran, Diethylether oder Essigsäureethylester), während idealerweise die zur Hydrolyse verwendeten Proteine, die jeweiligen Puffer (HEPES) und die Derivatisierungsreagenzien in

der wäßrigen Phase verbleiben sollten. Neben der erwünschten Abtrennung der Derivatisierungsreagenzien sollte die gleichzeitige Entsalzung der Nukleotidkonjugate eine Steigerung der Signaleffizienz durch ein verbessertes Elektrostacking bewirken. Experimentell zeigte sich jedoch, daß die quantitative Anreicherung der Nukleotidkonjugate in den gewählten organischen Phasen aufgrund des auch nach der Derivatisierung noch vorhandenen polaren Charakters nicht möglich war.

Beim Versuch, den Fluoreszenzmarker in eine geeignete organische Phase zu überführen, gelang die nahezu quantitative Abtrennung der Derivatisierungsreagenzien von den gelabelten Nukleotidkonjugaten [349]. Zu einer derivatisierten Probe wurde zur Komplexierung von BODIPY und EDC ein anionisches Ionenpaarreagenz (Natriumtetraphenylborat in Natriumphosphatpuffer pH = 6,0) zugesetzt, womit zunächst die nahezu quantitative Fällung der Überschüsse an BODIPY und EDC erreicht wurde. Bei dieser Fällung wurde allerdings auch ein nicht reproduzierbarer Anteil derivatisierter Nukleotide mitgerissen und somit ebenfalls aus der wäßrigen Reaktionslösung entfernt. Um diese Diskriminierungseffekte zu vermeiden, wurde der gesamte Niederschlag in Dichlormethan gelöst, was dazu führte, daß die komplexierten Derivatisierungsreagenzien in der organischen Phase verblieben, während die mitgefällten Nukleotidkonjugate erneut in die wäßrige Phase übertraten. Mit Hilfe dieser Technik gelang dann die kapillarelektrophoretische Analyse von 50 und 10 ng DNA (Abbildungen 7-12 und 7-13, Anhang) auf dem CE-LIF-System. Es besteht bei diesen geringen Mengen allerdings noch weiterer Optimierungsbedarf, da die Abtrennung der Derivatisierungsreagenzien noch nicht quantitativ erfolgte und daher noch Zersetzungsprodukte des Fluoreszenzmarkers ab dem zweiten Analysenlauf auftraten, die dann die Integration des 5m-dCMP-BODIPY-Signals erschwerten.

Es wäre auch interessant, die Probenaufbereitung für 10 µg DNA so zu optimieren, daß die bislang notwendige Probenverdünnung weiter reduziert wird (evtl. 1:5-fach) oder gegebenenfalls nicht mehr erforderlich ist. Ohne Verdünnung könnte bei einer Nachweisgrenze von 25 pM für die LIF Detektion ein theoretisches Detektionslimit für DNA-Addukte mit einem RAL von 6 Addukten in 10^8 unmodifizierten Nukleotiden erzielt werden. Bei Einsatz der LS-CCD-Detektion im Einzelkapillarbetrieb und Verwendung einer kubischen Kapillare sollte ohne Verdünnung der Probe theoretisch der Nachweis von DNA-Addukten mit einem RAL von 2 Addukten in 10^9 unmodifizierten Nukleotiden möglich sein. Diese Nachweisgrenze wäre dann vergleichbar mit der Sensitivität des ^{32}P -Postlabeling-Verfahrens. Das „relative adduct labeling“ dieser Methode liegt z.B. für exogene bulky adducts, die mit der Butanolex-

traktion oder mit Nuklease P1 angereichert werden können, bei ca. 1 Addukt auf 10^9 unmodifizierten Nukleotiden (bei einer 10 μg DNA-Probe) [157].

Verkürzung der Derivatisierungszeit

Die in dieser Arbeit entwickelten Probenvorbereitungsvorschriften beinhalten eine Derivatisierungszeit von 21 Stunden zuzüglich einer 3-stündigen vorher durchzuführenden Hydrolyse. In Zusammenarbeit mit *Schellenträger* (Analytische Chemie, Bergische Universität Wuppertal) wurde versucht, die Derivatisierungszeit durch Einsatz eines Mikrowellensystems (MLS Ethos Plus Mikrowellen-Laborsystem, MLS GmbH) zu verkürzen. Die Idee war dabei, die Bildung des Phosphoramidats durch Mikrowellenstrahlung-induzierte Molekülrotationen zu beschleunigen. Im Rahmen dieser „Mikrowellen“-Derivatisierung wurde die hydrolysierte Probe nach Zugabe des Fluoreszenzmarkers (BODIPY) und des Kopplungsreagenzes (EDC) innerhalb von 3 Minuten von Raumtemperatur auf 45 °C erhitzt und 3 Stunden mit einer durchschnittlichen Leistung von 20 W/s (72 kJ) bei dieser Temperatur unter Rühren bestrahlt. Nach 3-stündiger Reaktion ergaben sich im Vergleich zur „klassischen“ Derivatisierung bereits sehr gute Reaktionsausbeuten und Signalhöhen (Abbildungen 7-14 und 7-15, Anhang). Es wurden allerdings andere prozentuale Flächenverhältnisse der Nukleotid-Konjugate ermittelt. Für die Zukunft wären weitere Arbeiten in diesem Bereich interessant.

5 Zusammenfassung

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit umfaßt die Optimierung und Standardisierung einer kapillarelektrophoretischen Methode zur Analyse von DNA-Modifikationen und deren Anwendung zur Untersuchung von Realproben. Im zweiten Teil werden die Konstruktion eines CCD-Detektionssystems mit spektraler Auflösung der Laser-induzierten Fluoreszenz zur Sensitivitätssteigerung und der Einsatz einer Multikapillarenanordnung zur Erhöhung des Probendurchsatzes beschrieben.

Da die tumorösen Gewebemengen bei Biopsien oder nach chirurgischen Eingriffen oftmals sehr klein und inhomogen sind, wurde die zur Analyse notwendige DNA-Menge von 10 µg auf 1 µg bzw. 100 ng reduziert. Nach Ermittlung von Korrekturfaktoren mittels Standard-DNA des Bakteriophagen Lambda konnte der Methylierungsgrad in 100 ng DNA aus humanen Brustkrebszellen reproduzierbar bestimmt werden.

Im Rahmen einer Kooperation mit *Goth-Goldstein* (Lawrence Berkeley National Laboratories, Berkeley, USA) wurden DNA-Proben einer Caco2-Zelllinie, die mit unterschiedlichen polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAKs) 24 h und 48 h inkubiert worden war, hinsichtlich des Methylierungsgrades analysiert. Dabei zeigte sich mit Zunahme des kanzerogenen Potentials der PAKs eine Hypomethylierung.

Als Folge der unzureichenden Stabilität der fluoreszenzmarkierten und vor der Analyse mit Wasser verdünnten DNA-Proben war der Probendurchsatz des vollautomatisierten CE-LIF-Gerätes begrenzt. Verantwortlich dafür waren Zersetzungsprodukte des in großem Überschuß vorhandenen Fluoreszenzmarkers, die beim zweiten oder dritten Analysenlauf bzw. bei längerer Standzeit der verdünnten Probe auftraten und insbesondere die reproduzierbare Integration des 5m-dCMP-Signals erschwerten. Das Ausmaß der Bildung dieser Produkte konnte auf pH-Wert-, Temperatur-, Licht- und Sauerstoff-Einflüsse sowie auf die Konzentration des Fluoreszenzmarkers zurückgeführt werden. Daher wurden im weiteren Verlauf der Arbeit für DNA-Analysen die Konzentrationen des Fluoreszenzmarkers und des Kopplungsreagenzes reduziert und die verdünnten Proben mit Paraffin überschichtet. Durch diese Maßnahmen konnte eine deutlich höhere Probenstabilität erreicht werden, was zu einer Verdopplung des Probendurchsatzes von 12 auf 24 Analysen pro Tag führte. Die im Routinebetrieb auftretende mangelnde Stabilität der verwendeten Kapillaren, die sich nach ca. 70 Läufen durch ein beginnendes Ablösen der Polyimidschicht an der Outletseite bemerkbar machte, konnte mit einem von *Baeuml* und *Welsch* [346] beschriebenen Verfahren zur Thermobehandlung von Kapillaren,

das leicht modifiziert wurde, behoben werden. Die Lebensdauer derartig behandelte Kapillaren (heat-cure Kapillaren) erhöhte sich auf ca. 400 Läufe.

Im Rahmen einer Kooperation mit *Oscier* (Royal Bournemouth Hospital, UK) wurden 31 klinisch sehr gut charakterisierte DNA-Proben von 29 B-CLL-Patienten zunächst hinsichtlich der genomischen Methylierung untersucht. Zum Vergleich wurde von 6 Lymphozyten-DNA-Proben gesunder Personen, die von *Kleinsasser* (Ökogenotoxikologie der HNO-Klinik der Universität Regensburg) zur Verfügung gestellt wurden, der Methylierungsgrad bestimmt. Dabei konnte eine signifikante Hypomethylierung ($P < 0,0001$) aller an Leukämie erkrankten Personen festgestellt werden. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen deutete sich zudem ein Trend zur Hypermethylierung bei Patienten mit hoher VH-Homologie, hoher ZAP-70-Expression und unmethyliertem C-334 an, der statistisch allerdings nicht signifikant war ($P = 0,064$). Aufgrund der Analyseergebnisse sowie der Resultate von *Oscier* konnte festgestellt werden, daß Patienten mit einem Methylierungsgrad $> 3,95$ %, einer VH-Homologie von 98 % und einer ZAP-70 Expression von 10 % bei unmethyliertem C-334 eine schlechtere Prognose des Krankheitsverlaufes haben als jene mit entsprechend geringeren Werten und methyliertem C-334. Aufgrund der Tatsache, daß einige Patienten mit B-CLL einen Methylierungsgrad ähnlich dem gesunder Personen aufwiesen, ist 5m-dCMP kein geeigneter Biomarker für diesen Erkrankungstyp. Die Suche nach einem anderen Biomarker stand daher im Fokus des Interesses. Weitere endogene Addukte (dUMP und etheno-dAMP) wurden nach Optimierung der kapillarelektrophoretischen Trennung in DNA-Proben von 4 B-CLL-Patienten quantifiziert. Dabei konnten RAL-Werte für etheno-dAMP im Bereich von 21 - 42 Addukten pro 10^5 unmodifizierten Nukleotiden und für dUMP im Bereich von 35 - 77 Addukten pro 10^6 unmodifizierten Nukleotiden gefunden werden. Aufgrund dieser Ergebnisse und weiterer Befunde aus der Literatur könnte etheno-dAMP ein geeigneter Biomarker für die chronisch lymphatische Leukämie sein.

Zur Sensitivitätssteigerung wurde in Kooperation mit *Schütte* (LaVision BioTec) ein Detektionssystem konstruiert, mit dem eine spektrale Auflösung der Laser-induzierten Fluoreszenz mit nachfolgender CCD-Detektion möglich ist (LS-CCD-System). Mit der Ankopplung dieses Detektionssystems an die Kapillarelektrophorese wurde ein Detektionslimit von 5 pM einer wäßrigen Lösung des Fluoreszenzmarkers BODIPY mit einem S/N von größer 5 erreicht. Unter Ausnutzung der Vorteile der CCD-Kamera hinsichtlich der Belichtungszeit und einer Modifizierung des Nullabgleiches der Kamera (Verwendung einer mit Wasser gefüllten Kapillare) konnte eine um den Faktor $\sim 8,4$ höhere Empfindlichkeit des CE-LS-CCD-Systems gegenüber einem kommerziellen CE-LIF-System erzielt werden. Der Einsatz einer kubischen

Kapillare ergab im Vergleich zu einer runden Kapillare eine weitere Sensitivitätssteigerung um den Faktor 3. Damit wurde insgesamt ein Empfindlichkeitsgewinn um das ~ 25 -fache erreicht, wodurch das Detektionslimit für DNA-Addukte, ausgehend von einem RAL von $\sim 11 \text{ pro } 10^6$ (CE-LIF) auf $\sim 5 \text{ pro } 10^7$ gesteigert werden konnte.

Darüber hinaus konnte das LS-CCD-System erfolgreich für eine Meßanordnung mit drei Kapillaren genutzt werden. Das hat den Vorteil, drei Analysen einer Probe in der gleichen Zeit durchführen zu können, die normalerweise für eine Analyse benötigt wird. Damit war eine Erhöhung des Probendurchsatzes von etwa 10 auf 30 Analysen pro Tag möglich. Allerdings mußte dabei ein Empfindlichkeitsverlust aufgrund der notwendigen Aufweitung des Laserstrahls hingenommen werden, der aber bei der Bestimmung des Methylierungsgrades akzeptabel ist.

6 Experimenteller Teil

Durch Verwendung von Mikrokokken-Nuklease (MN) und Kalbsmilz-Phosphodiesterase (SPD) wurde DNA zu unmodifizierten und modifizierten (adduktierten) 2'-Desoxynukleosid-3'-monophosphaten hydrolysiert. Die nach der enzymatischen Hydrolyse erhaltenen Nukleotide wurden mit einem Fluoreszenzmarker (BODIPY), der eine freie aliphatische Aminofunktion enthielt, derivatisiert. Dabei entstanden 2'-Desoxynukleosid-3'-phosphoramidate, die durch LIF detektiert werden konnten. Die Phosphoramidatbildung der freien Aminogruppe des Fluoreszenzmarkers und des Nukleotids verlief über eine Carbodiimid-Aktivierung. Aufgrund der Photolabilität des BODIPY fand die Derivatisierung unter Lichtausschluß statt. Unmittelbar vor einer Analyse wurden in Abhängigkeit der erwarteten Nukleotidkonzentration Verdünnungen dieser Lösung mit Wasser hergestellt. Die verwendeten Probenvorbereitungen werden im Folgenden beschrieben:

6.1 Herstellung des Enzymmixes (MN/SPD) für die DNA-Hydrolyse

Die Präparation des MN/SPD-Enzymmixes besteht aus zwei Schritten: der Dialyse der einzelnen Proteine und der Herstellung des Enzymmixes. Vor der Dialyse wurde die Kalbsmilz-Phosphodiesterase (SPD) aufkonzentriert.

- Aufkonzentrierung der Phosphodiesterase für die anschließende Proteinentsalzung (Dialyse)

Vor der Dialyse wurde das Volumen der gelieferten Phosphodiesterase, Typ II, Calf Spleen (SPD) von 2,5 mL auf 1,0 mL reduziert. Dazu wurde der in einem Glasvial befindliche Inhalt, 10 U SPD in 2,5 mL Pufferlösung, auf die Membranoberfläche eines Proteinkonzentrators (mit einer 9 kD Membran) überführt, zur Einstellung eines Dead-Stops von 1 mL nach Herstellerangaben verfahren und in einer Zentrifuge für 30 Minuten bei einer Temperatur von 4 °C und 3000 x g zentrifugiert.

➤ Dialyse der Enzyme

○ *Dialyse der Phosphodiesterase, Typ II, Calf Spleen*

Die aufkonzentrierte Lösung (1 mL) enthielt 10 U SPD. Die Lösung wurde mit einer 2 mL Einwegspritze und einer 0,9x40-er Nadel (gelb) aufgenommen und vorsichtig zwischen die Membranen eines Slide-A-Lyzers (0,5 - 3 mL Volumen) injiziert. Dabei wurde zur Vermeidung von Beschädigungen der Dialysemembranen darauf geachtet, daß die Dichtung an der Injektionsstelle behutsam durchstoßen und die Spritzennadel nicht zu tief eingeführt wurde. Nach der Injektion wurde durch vorsichtiges Aufziehen der Spritze der Dialysekammer so weit wie möglich Luft entzogen und dann die Spritze langsam entfernt. Die Injektionsstelle wurde anschließend auf dem Dialyserahmen mit einem wasserfesten Stift markiert. Die Dialysekammer wurde dann an einem Schaumstoffschwimmer so befestigt, daß die gekennzeichnete Ecke nach oben wies, um einen Enzymverlust während der Dialyse durch eine evtl. nicht exakt verschlossene Dichtung an der Einstichstelle zu vermeiden. Die Kammer wurde darauf in ein Becherglas mit 10 L Millipore-Wasser gelegt und die Dialyse bei 4 °C (Kühlraum) durchgeführt. Das Wasser wurde nach einigen Stunden (~ 7 h) gewechselt und die Proteinlösung über Nacht weiter dialysiert. Nach der Dialyse wurde die gesamte Flüssigkeit (etwa das 2,5-fache des Ausgangsvolumens) mit einer 5 mL Spritze aus der Dialysekammer entfernt. Dazu wurde die Spritzennadel an einer der nicht markierten Ecken des Dialyserahmens eingestochen und nach Entnahme der Lösung die Kammer vorsichtig einmal mit ~ 0,4 mL Tridest. ausgespült. Die erhaltene Proteinlösung (etwa 2,7 - 2,9 mL) wurde dann gleichmäßig auf 2 x 2 mL Eppendorf-Cups verteilt, eingefroren (durch kurzes Eintauchen der Cups in flüssigen Stickstoff) und in der Speed Vac lyophilisiert. Dabei war zu beachten, daß die Kühlkette so wenig wie möglich unterbrochen wurde. Der Inhalt der beiden 2 mL Eppendorf-Cups wurde bei einem Restvolumen von etwa 500 µL je Cup vor der endgültigen Trocknung in ein 2 mL Cup überführt.

○ *Dialyse der Mikrokokken-Nuklease (MN), Staphylococcus aureus*

Die Dialyse der Mikrokokken-Nuklease (MN) erfolgte analog. Ausnahme war, daß die 500 U MN in 250 µL Wasser gelöst und das Befüllen und Entleeren des Dialyserahmens mit einer 1 mL Spritze vorgenommen wurde. Nach erster Entleerung der Dialysekammer (Volumen etwa 0,4 mL) und Ausspülen der Kammer (mit 0,4 mL Tridest.) wurde das erhaltene Endvo-

lumen an Proteinlösung (~ 0,8 mL) in ein 1,5 mL Eppendorf-Cup überführt und in der Speed Vac lyophilisiert.

➤ Herstellung der MN-Lösung

Das lyophilisierte Protein (500 U) wurde in 1667 μL H_2O gelöst. Das ergab eine Konzentration von 300 $\text{mU}/\mu\text{L}$.

➤ Herstellung der MN/SPD-Lösung

○ *1-fach Endkonzentration*

Um einen MN/SPD-Mix mit einer Endkonzentration der SPD = 2,5 $\text{mU}/\mu\text{L}$ herzustellen, wurde das SPD-Lyophilisat in 2 mL H_2O gelöst. Das ergab eine Konzentration von 5 $\text{mU}/\mu\text{L}$. Ein Teil dieser Enzymlösung wurde dann mit dem gleichen Volumen an MN (mit 300 $\text{mU}/\mu\text{L}$) gemischt, aliquotiert (à 50 μL) und bei $-25\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

○ *5-fach Endkonzentration*

Um einen MN/SPD-Mix mit einer Endkonzentration der SPD = 12,5 $\text{mU}/\mu\text{L}$ herzustellen, wurde das SPD-Lyophilisat in 400 μL H_2O gelöst. Das ergab eine Konzentration von 25 $\text{mU}/\mu\text{L}$. Ein Teil dieser Enzymlösung wurde dann mit dem gleichen Volumen an MN (mit 300 $\text{mU}/\mu\text{L}$) gemischt, aliquotiert (à 50 μL) und bei $-25\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

6.2 DNA-Quantifizierung

Die DNA-Probe wurde zunächst in 500 μL H_2O gelöst. Diese Lösung wurde in eine 500 μL Küvette (Transmission ausgemessen) überführt und dann mit einem UV/VIS-Photometer ein Transmissionsspektrum gegen Wasser im Wellenlängenbereich von 200 nm bis 800 nm aufgenommen. Die Erfassung des 0-Wertes bzw. des 100 %-igen Transmissionswertes erfolgte zuvor mittels eines Autozeros. Dabei diente das gleiche Wasser, das auch zum Lösen der DNA verwendet wurde, als Blindlösung. Die DNA-Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$] ergab sich nach *Lambert-Beer* aus dem Extinktionswert bei 260 nm. Die Reinheit wurde anhand des Verhältnisses aus der Differenz des Extinktionswertes bei 260 nm und 320 nm zu dem Extinktions-

wert bei 280 nm ermittelt. Der Präzisionsbereich dieser Methode liegt bei 2,5 - 25 µg DNA [473]. DNA-Proben, die nach der ersten Messung außerhalb dieses Bereiches lagen, wurden erneut verdünnt. 500 µL dieser Verdünnung wurden nochmals einer Transmissionsmessung unterzogen. Der Verdünnungsfaktor wurde bei der Auswertung berücksichtigt.

6.3 Probenvorbereitungsvorschriften (PVV)

PVV 1 (für 10 µg DNA; Vol_{ges} = 90 µL)

➤ Hydrolyse

10 µg getrocknete DNA wurden nach Aufnahme in 5 µL destilliertem und entionisiertem H₂O (Tridest) mit 5 µL einer Enzymlösung versetzt. Die Enzymlösung bestand aus 1 µL Hydrolysepuffer (250 mM HEPES, 100 mM CaCl₂, pH = 6,0) und 5 µL einer MN/SPD-Enzymmischung (150 mU/mL MN und 2,5 mU/mL SPD). Nach Zugabe der Enzymlösung zur DNA wurde kurz gevortext und zentrifugiert. Die Hydrolyse der DNA erfolgte dann 3 h bei 37 °C im Thermomixer.

➤ Derivatisierung

Das DNA-Hydrolysat (10 µL) wurde mit 20 µL 50 mM HEPES-Puffer (pH = 6,4) versetzt. Zu dieser Nukleotid-Lösung wurden 30 µL 27 mM Fluoreszenzmarker BODIPY-EDA-Lösung (in 50 mM HEPES, pH = 6,4) und 30 µL 1800 mM EDC-Lösung (in 50 mM HEPES, pH = 6,4) zugegeben und 21 h bei 25 °C im Thermomixer inkubiert. In dem Reaktionsvolumen von 90 µL betrug die Konzentration an BODIPY 9,0 mM und an EDC 600 mM.

PVV 2 (für 10 µg DNA; Vol_{ges} = 70 µL; 3-fach Enzym)

➤ Hydrolyse

10 µg getrocknete DNA wurden nach Aufnahme in 5 µL destilliertem und entionisiertem H₂O (Tridest) mit 15 µL einer Enzymlösung versetzt. Die Enzymlösung bestand aus 1 µL Hydrolysepuffer (250 mM HEPES, 100 mM CaCl₂, pH = 6,0) und 15 µL einer MN/SPD-Enzym-

mischung (150 mU/mL MN und 2,5 mU/mL SPD). Nach Zugabe der Enzymlösung zur DNA wurde kurz gevortext und zentrifugiert. Die Hydrolyse der DNA erfolgte dann 3 h bei 37 °C im Thermomixer.

➤ Derivatisierung

Das DNA-Hydrolysat (20 µL) wurde mit 10 µL 50 mM HEPES-Puffer (pH = 6,4) versetzt. Zu dieser Nukleotid-Lösung wurden 20 µL 27 mM Fluoreszenzmarker BODIPY-EDA-Lösung (in 50 mM HEPES, pH = 6,4) und 20 µL 1800 mM EDC-Lösung (in 50 mM HEPES, pH = 6,4) zugegeben und 21 h bei 25 °C im Thermomixer inkubiert. In dem Reaktionsvolumen von 70 µL betrug die Konzentration an BODIPY 7,7 mM und an EDC 510 mM.

PVV 3 (für 10 µg DNA; Vol_{ges} = 70 µL; 5-fach Enzym)

➤ Hydrolyse

10 µg getrocknete DNA wurden nach Aufnahme in 5 µL destilliertem und entionisiertem H₂O (Tridest) mit 5 µL einer Enzymlösung versetzt. Die Enzymlösung bestand aus 1 µL Hydrolysepuffer (250 mM HEPES, 100 mM CaCl₂, pH = 6,0) und 5 µL einer MN/SPD-Enzymmischung (150 mU/mL MN und 12,5 mU/mL SPD). Nach Zugabe der Enzymlösung zur DNA wurde kurz gevortext und zentrifugiert. Die Hydrolyse der DNA erfolgte dann 3 h bei 37 °C im Thermomixer.

➤ Derivatisierung

Das DNA-Hydrolysat (10 µL) wurde mit 20 µL 50 mM HEPES-Puffer (pH = 6,4) versetzt. Zu dieser Nukleotid-Lösung wurden 20 µL 27 mM Fluoreszenzmarker BODIPY-EDA-Lösung (in 50 mM HEPES, pH = 6,4) und 20 µL 1800 mM EDC-Lösung (in 50 mM HEPES, pH = 6,4) zugegeben und 21 h bei 25 °C im Thermomixer inkubiert. In dem Reaktionsvolumen von 70 µL betrug die Konzentration an BODIPY 7,7 mM und an EDC 510 mM.

PVV 4 (für 1 µg DNA; Vol_{ges} = 50 µL)

➤ Hydrolyse

1 µg getrocknete DNA wurde nach Aufnahme in 5 µL destilliertem und entionisiertem H₂O (Tridest) mit 5 µL einer Enzymlösung versetzt. Die Enzymlösung bestand aus 1 µL Hydrolysepuffer (250 mM HEPES, 100 mM CaCl₂, pH = 6,0) und 5 µL einer MN/SPD-Enzymmischung (150 mU/mL MN und 2,5 mU/mL SPD). Nach Zugabe der Enzymlösung zur DNA wurde kurz gevortext und zentrifugiert. Die Hydrolyse der DNA erfolgte dann 3 h bei 37 °C im Thermomixer.

➤ Derivatisierung

Das DNA-Hydrolysat (10 µL) wurde mit 10 µL 50 mM HEPES-Puffer (pH = 6,4) versetzt. Zu dieser Nukleotid-Lösung wurden 15 µL 27 mM Fluoreszenzmarker BODIPY-EDA-Lösung (in 50 mM HEPES, pH = 6,4) und 15 µL 1800 mM EDC-Lösung (in 50 mM HEPES, pH = 6,4) zugegeben und 21 h bei 25 °C im Thermomixer inkubiert. In dem Reaktionsvolumen von 50 µL betrug die Konzentration an BODIPY 8,1 mM und an EDC 540 mM.

PVV 5 (für 100 ng DNA; Vol_{ges} = 40 µL)

➤ Hydrolyse

100 ng getrocknete DNA wurden nach Aufnahme in 5 µL destilliertem und entionisiertem H₂O (Tridest) mit 5 µL einer Enzymlösung versetzt. Die Enzymlösung bestand aus 5 µL Hydrolysepuffer (250 mM HEPES, 100 mM CaCl₂, pH = 6,0) und 1 µL einer MN/SPD-Enzymmischung (150 mU/mL MN und 2,5 mU/mL SPD). Nach Zugabe der Enzymlösung zur DNA wurde kurz gevortext und zentrifugiert. Die Hydrolyse der DNA erfolgte dann 3 h bei 37 °C im Thermomixer.

➤ Derivatisierung

Das DNA-Hydrolysat (10 µL) wurde mit 16 µL 50 mM HEPES-Puffer (pH = 6,4) versetzt. Zu dieser Nukleotid-Lösung wurden 7 µL 27 mM Fluoreszenzmarker BODIPY-EDA-Lösung

(in 50 mM HEPES, pH = 6,4) und 7 μL 1800 mM EDC-Lösung (in 50 mM HEPES, pH = 6,4) zugegeben und 25 h bei 37 °C im Thermomixer inkubiert. In dem Reaktionsvolumen von 40 μL betrug die Konzentration an BODIPY 4,8 mM und an EDC 320 mM.

PVV 6 (für 10 μg DNA; $\text{Vol}_{\text{ges}} = 70 \mu\text{L}$)

➤ Derivatisierung

10 μg eines Mononukleotids wurden in 10 μL H_2O gelöst und mit 20 μL 50 mM HEPES-Puffer (pH = 6,4) versetzt. Zu dieser Nukleotid-Lösung wurden 20 μL 27 mM Fluoreszenzmarker BODIPY-EDA-Lösung (in 50 mM HEPES, pH = 6,4) und 20 μL 1800 mM EDC-Lösung (in 50 mM HEPES, pH = 6,4) zugegeben und 21 h bei 25 °C im Thermomixer inkubiert. Im Reaktionsvolumen von 70 μL betrug die Konzentration an BODIPY 7,7 mM und an EDC 510 mM.

6.4 Proteinabtrennung über eine Größenmembran

10 μg DNA wurden nach PVV 1 hydrolysiert und anschließend das Hydrolysat (10 μL) durch Zugabe von 55 μL destilliertem und entionisiertem H_2O (Tridest) auf 65 μL Gesamtvolumen aufgefüllt. Diese Lösung wurde auf eine in einem 2 mL Eppendorf-Cup platzierte Fugisep Mini-Säule (4 kD Membran) gegeben und 36 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (13400 U/min). Nach behutsamer Entnahme der Mini-Säule wurde der untere Rand vorsichtig mit 20 μL H_2O abgespült. Filtrat und Waschflüssigkeit wurden vereint, 1,5 h in der Speed Vac getrocknet und für die nachfolgende Derivatisierung in 10 μL H_2O aufgenommen.

6.5 Lagerung der Proben

Die derivatisierten Proben wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert. Das Aliquotieren fand unter dem Aspekt der Vermeidung unnötiger Temperaturschwankungen und Lichteinwirkung statt.

6.6 Durchführung der kapillarelektrophoretischen Messungen

6.6.1 Vorbereitungen der Kapillaren

Die runden Kapillaren wurden als Meterware von CS-Chromatographie-Service (Langerwehe) und die kubischen Kapillaren von Polymicro Technologies (Phoenix, USA) bezogen.

6.6.1.1 heat-curing (runde Kapillare)

Die Kapillare wurde in einem Heizofen eines Gas-Chromatographen mit 5 °C/min auf eine Endtemperatur von 300 °C erwärmt. Nach 100 Stunden wurde der Ofen abgeschaltet. Bis zur Abkühlung auf Raumtemperatur verblieb die Kapillare im Ofen.

6.6.1.2 Präparation des Detektorfensters

Zur Herstellung des Detektorfensters wurde die Kapillare in eine selbst konstruierte Vorrichtung (Abbildung 7-16, Anhang) zum mm-genauen Brennen des Detektorfensters (Fensterbreite variierbar), eingespannt. Mit den Abstandhaltern wurde eine Fensterbreite von 3 mm (CE-LIF) bzw. 14 mm (CE-LS-CCD) eingestellt. Anschließend wurde die Kapillare mit einem Gasbrenner zwischen den beiden Abstandhaltern kurzzeitig erhitzt (ca. 4 s). Die Kapillare wurde aus der Vorrichtung entnommen und mit Methanol an der Brennstelle gereinigt. Nach Einsetzen der Kapillare in die CE-Kartusche wurde ~ 1 mm der Polyimidschicht am Inlet entfernt.

6.6.1.3 Konditionierung

➤ *CE-LIF-System*

Die Kapillare wurde mit 1 M NaOH (15 min, 20 psi), 1 M HCl (15 min, 20 psi), 1 M NaOH (15 min, 20 psi), H₂O (5 min, 20 psi) und Elektrolyt (10 min, 20 psi) konditioniert. Anschließend erfolgte eine Elektrolytinjektion (2,5 psi · s) und eine 30-minütige Aufzeichnung einer Basislinie (20 kV, 20 °C).

➤ *CE-LS-CCD-System*

Die Kapillare wurde mit 1 M NaOH (15 min, 25 psi), 1 M HCl (15 min, 25 psi), 1 M NaOH (15 min, 25 psi), H₂O (5 min, 25 psi) und Elektrolyt (10 min, 25 psi) konditioniert. Anschließend erfolgte eine Elektrolytinjektion (3,2 psi · s) und eine 30-minütige Aufzeichnung einer Basislinie (20 kV, 20 °C).

6.6.2 Spülen der Kapillaren

6.6.2.1 Spülen der Kapillare bei den Analysen unter MEKC-Bedingungen

➤ *CE-LIF-System*

Zu Beginn eines jeden Arbeitstages wurde die Kapillare mit 200 mM SDS-Lösung (1 min, 20 psi), 1 M NaOH (1,5 min, 20 psi), Wasser (1 min, 20 psi) und mit Elektrolyt (2 min, 20 psi) gespült und eine Basislinie durch Injektion von Elektrolyt (0,5 psi, 5 sec) und 50-minütiges Anlegen einer Spannung von 20 kV aufgezeichnet. Zwischen den einzelnen Analysen wurde die Kapillare mit 200 mM SDS-Lösung (1 min, 20 psi), 1 M NaOH (1,5 min, 20 psi), Wasser (1 min, 20 psi) und mit Elektrolyt (2 min, 20 psi) gespült. Am Ende eines jeden Arbeitstages wurde die Kapillare mit Wasser (3 min, 50 psi) gespült und über Nacht Inlet und Outlet der Kapillare in Wasser gelagert. Dabei war das Outlet-Glasvial (2 mL) randvoll mit Wasser gefüllt.

➤ *CE-LS-CCD-System*

Zu Beginn eines jeden Arbeitstages wurde die Kapillare mit 200 mM SDS-Lösung (1 min, 25 psi), 1 M NaOH (1,5 min, 25 psi), Wasser (1 min, 25 psi) und mit Elektrolyt (2 min, 25 psi) gespült und eine Basislinie durch Injektion von Elektrolyt (0,5 psi, 5 sec) und 50-minütiges Anlegen einer Spannung von 20 kV aufgezeichnet. Zwischen den einzelnen Analysen wurde die Kapillare mit Hexan (2 min, 30 psi), 200 mM SDS/MeOH-Lösung (50:50 v/v, 2,5 min, 30 psi), 1 M NaOH (2 min, 30 psi), Wasser (1 min, 30 psi) und mit Elektrolyt (2 min, 30 psi) gespült. Am Ende eines jeden Arbeitstages wurde die Kapillare mit

Wasser (3 min, 100 psi) gespült und über Nacht Inlet und Outlet der Kapillare in Wasser gelagert. Dabei war das Outlet-Glasvial (2 mL) randvoll mit Wasser gefüllt.

6.6.2.2 Spülen der Kapillare bei den Analysen unter CZE-Bedingungen

➤ *CE-LIF-System*

Zu Beginn eines jeden Arbeitstages wurde die Kapillare mit 1 M NaOH (1,5 min, 20 psi), Wasser (1 min, 20 psi) und mit Elektrolyt (2 min, 20 psi) gespült und eine Basislinie durch Injektion von Elektrolyt (0,5 psi, 5 sec) und 20-minütiges Anlegen einer Spannung von 20 kV aufgezeichnet. Zwischen den einzelnen Analysen wurde die Kapillare mit 1 M NaOH (1,5 min, 20 psi), Wasser (1 min, 20 psi) und mit Elektrolyt (2 min, 20 psi) gespült. Am Ende eines jeden Arbeitstages wurde die Kapillare mit Wasser (3 min, 50 psi) gespült und über Nacht Inlet und Outlet der Kapillare in Wasser gelagert. Dabei war das Outlet-Glasvial (2 mL) randvoll mit Wasser gefüllt.

➤ *CE-LS-CCD-System*

Zu Beginn eines jeden Arbeitstages wurde die Kapillare mit 1 M NaOH (1,5 min, 25 psi), Wasser (1 min, 25 psi) und mit Elektrolyt (2 min, 25 psi) gespült und eine Basislinie durch Injektion von Elektrolyt (0,5 psi, 6,4 sec) und 20-minütiges Anlegen einer Spannung von 20 kV aufgezeichnet. Zwischen den einzelnen Analysen wurde die Kapillare mit Methanol (2 min, 30 psi), 1 M NaOH (2 min, 30 psi), Wasser (1 min, 30 psi) und mit Elektrolyt (2 min, 30 psi) gespült. Am Ende eines jeden Arbeitstages wurde die Kapillare mit Wasser (3 min, 100 psi) gespült und über Nacht Inlet und Outlet der Kapillare in Wasser gelagert. Dabei war das Outlet-Glasvial (2 mL) randvoll mit Wasser gefüllt.

6.6.3 Herstellen der Trennelektrolyten

Zur Trennung der fluoreszenzmarkierten Nukleotide in unbeschichteten fused-silica-Kapillaren kamen unterschiedliche Elektrolyten zum Einsatz (Tabelle 6-1).

Die Elektrolyten, die nur den Zusatz des ionischen Tensids SDS beinhalteten, wurden wie folgt präpariert (am Beispiel des Elektrolyten B, Gesamtvolumen = 200 mL):

In einer 500 mL Gewindeflasche wurden 5,48 g SDS vorgelegt und unter schwachem Rühren (Magnetrührer und Rührfisch) in 180 mL Natriumphosphatpuffer (pH = 9,0) vollständig gelöst. Anschließend wurden 20 mL Methanol zugesetzt, ca. 15 Stunden schwach nachgerührt und dann bei Raumtemperatur gelagert. Nach ca. 3-7 Tagen war der Elektrolyt einsatzbereit.

Bei den Elektrolyten, die neben dem SDS ein nichtionisches Tensid enthielten, wurde zunächst eine Stammlösung aus SDS/Natriumphosphatpuffer (95 mM SDS in 20 mM Na-P, pH = 9,0) vorbereitet und diese ca. 2 Wochen bei Raumtemperatur gelagert. Die Präparation der Elektrolytlösung erfolgte wie nachstehend beschrieben (am Beispiel des Elektrolyten C, Gesamtvolumen = 60 mL):

In einer 100 mL Gewindeflasche wurden 90 mg Myrj 45 vorgelegt. Anschließend wurden 57 mL der SDS/Natriumphosphatpuffer-Stammlösung und 3 mL Methanol zugesetzt und die Gewindeflasche dicht verschlossen. Zum vollständigen Lösen des nichtionischen Tensids wurde die Elektrolytlösung ca. 30 - 45 min ins Ultraschallbad gestellt. Die Beschallung wurde ~ 3 - 4 mal für je 1 - 2 min Vortexen unterbrochen. Der Elektrolyt war danach sofort einsatzbereit.

Bezeichnung Elektrolyt	SDS Gehalt [mM]	Organischer Modifier	Vol. % org. Modifier	Myrj 45 [mg/mL]	Gesamtkonzentration Na-Phosphat-Puffer pH = 9,0 [mM] *
Elektrolyt A	90	MeOH	10	-	18
Elektrolyt B	95	MeOH	10	-	18
Elektrolyt C	95	MeOH	5	1,5	19
Elektrolyt D	95	MeOH	10	13	18

Tabelle 6-1: Verwendete Elektrolyten für die MEKC; * = die Gesamtkonzentration wurde ohne Berücksichtigung einer Volumenkontraktion berechnet

Der verwendete Na-Phosphat-Puffer (pH = 9,0) setzte sich aus einer 20 mM Dinatriumhydrogenphosphat- und einer 20 mM Natriumdihydrogenphosphat-Lösung zusammen.

Zur kapillarelektrophoretischen Analyse wässriger BODIPY-Lösungen wurde ein Elektrolyt ohne Tensidzusatz verwendet (Tabelle 6-2). Zur Herstellung des Puffers wurde eine 20 mM Dinatriumhydrogenphosphatlösung vorgelegt, mit einer 20 mM Natriumdihydrogenphosphatlösung auf pH = 7,5 titriert und abschließend die Menge Methanol zugegeben, die 10 % des Gesamtvolumens entsprach.

Bezeichnung Elektrolyt	Organischer Modifier	Vol. % org. Modifier	Gesamtkonzentration Na-Phosphat-Puffer pH = 7,5 [mM] *
Elektrolyt E	MeOH	10	18

Tabelle 6-2: Verwendeter Elektrolyt für die CZE; * = die Gesamtkonzentration wurde ohne Berücksichtigung einer Volumenkontraktion berechnet

➤ Photolyse des Elektrolyten E

Mit einem UV-Quecksilber-Strahler (45 W, I = 65 cd, E = 340 cd/cm², λ = 280 - 370 nm) wurden bei 4 °C 150 mL des Puffers 3,5 Stunden photolysiert. Die Photolyse fand in der in Abbildung 7-5 im Anhang dargestellten Apparatur statt.

6.6.4 Kapillarelektrophoretische Analysemethoden

Zur Durchführung kapillarelektrophoretischer Messungen wurden verschiedene Methoden verwendet, die den jeweiligen Analysenbedingungen angepaßt waren. Nachfolgende Tabelle listet die im Analysengerät eingestellten Parameter sowie die jeweiligen Probenverdünnungen und die eingesetzten Trennpuffer auf (Tabelle 6-3). Die Messungen der 1:200 verdünnten Proben erfolgten in 2 mL Glasvials, während die Analysen der 1:20 verdünnten Proben in selbst hergestellten 0,2 mL Glasvials durchgeführt wurden. Bei Mehrfach- bzw. Sequenzmessungen wurden die 1:200 verdünnten Proben zur Stabilisierung mit 4 Tropfen Paraffinöl überschichtet. Die Injektion der entsprechend verdünnten Probelösungen erfolgte hydrodynamisch bei 20 °C mit Ausnahme der Analysen, die zum Vergleich des CE-LIF-Systems mit dem CE-LS-CCD-System durchgeführt wurden. Dort erfolgte die Injektion bei 25 °C. Unter Berücksichtigung der Kapillarlängen (CE-LIF 50 cm; CE-LS-CCD 64 cm), der in Tabelle 6-3 aufge-

	Methode I	Methode II	Methode III	Methode IV	Methode V	Methode VI	Methode VII
Verdünnung der DNA-Proben							
10 µg und 1 µg	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	*	1 :200
100 ng	1:20	-	-	-	-		-
Trennungsspannung [kV]	20	18	16	16	16	20	18
Injektion [psi · s]							
CE-LIF	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	-
CE-LS-CCD	-	3,2	-	-	-	3,2	3,2
Trenntemperatur [°C]	25	20	20	18	16	20	18
Elektrolyt	A	B	C	C	D	E	C

Tabelle 6-3: Verwendete Analysemethoden; * = mit dieser Methode wurde ausschließlich eine Verdünnungsreihe einer wässrigen Lösung des Fluoreszenzmarkers BODIPY analysiert.

fürten Injektionsparameter und der Pufferviskosität ergab sich nach dem Hagen-Poiseuilleschen Gesetz bei einer Proben­temperatur von 20 °C näherungsweise ein Injektionsvolumen von 5,3 nL, bei einer Proben­temperatur von 25 °C von 5,9 nL. Die 50 cm-Kapillare war zu 0,54 % (bei 5,3 nL) bzw. 0,60 % (bei 5,9 nL) mit Probe gefüllt, während die 64 cm-Kapillare zu 0,41 % (bei 5,3 nL) bzw. 0,47 % (bei 5,9 nL) mit Probe gefüllt war. Bei der Pufferviskosität wurde näherungsweise das Viskositätsverhalten von H₂O zugrunde gelegt. Die Injektionsparameter wurden mit Hilfe des online calculators (CE Expert lite) der Fa. Beckman Coulter berechnet. Die Trennstrecke betrug beim CE-LIF-System 40 cm, beim CE-LS-CCD-System 46,4 cm.

6.7 Geräte und Materialien

➤ CE-LIF-System

○ Kapillarelektrophorese

P/ACE™ MDQ mit LIF-Detektor, Beckman Coulter (Krefeld)

○ Laser

Argon-Ionen-Laser mit $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ [Leistung = 3 mW output], 488 nm notch filter, Beckman Coulter (Krefeld)

○ *Auswertungs-Software*

32 Karat™ Version 7.0 (2003), Beckman Coulter (Krefeld)

➤ CE-LS-CCD-System

○ *Kapillarelektrophorese*

P/ACE™ MDQ, Beckman Coulter (Krefeld)

▪ *Kartusche*

EDA-Kartusche [Art.-Nr. 149852], Beckman Coulter (Krefeld)

○ *Detektion*

LS-CCD-Detektor, LaVision BioTec (Bielefeld)

▪ *Bestandteile des LS-CCD-Detektors*

Argon-Ionen-Laser: IMA101030BOS ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, 40 mW), Melles Griot (USA)

Einkoppellichtleiter: kineFLEX-P-2-S-488-0,65-FCP-P2 (Throughput 69 % bei 488 nm), PointSource (UK)

Antireflexbeschichtete Achromatlinse: Standard-AR-Beschichtung für sichtbares Licht, ARB2 (f = 10 mm), Linos (Göttingen)

Objektiv (Einzelkapillare): Nikon CFI S-Fluor 40x/0.90 C (Transmission 400 - 700 nm 80 - 85 %, Arbeitsabstand = 0,3 mm, f = 5 mm), Nikon, Abt. Mikroskopie/Optische Meßtechnik (Düsseldorf)

Objektiv (Array-System): Leitz PL 8x/0.18, Leitz (Wetzlar)

Dichroideischer Strahlteiler: Strahlteiler für FITC Q505LP, 25x36x1 mm ($\lambda_{50\%} = 505 \text{ nm}$), AHF Analysentechnik (Tübingen)

Dielektrischer Kantenfilter: Langpass-Ramanfilter SEM-LP01-488-RS-25 ($\lambda_{\text{Kante}} = 0,5 \%$ bei 488 nm, Transmission > 93 %), SEMROCK (Wessling/München)

Aluminiumspiegel (Ø 32 mm, ARC, MgF₂ Beschichtung), Linos Photonics (Göttingen)

Beidseitig visible antireflexbeschichtete Achromatlinse: Standard-AR-Beschichtung für sichtbares Licht, ARB2 (f = 25 mm), Linos (Göttingen)

Spektrometer: SpectraPro SP2156, Roper Scientific (USA)

Gitter (150 Linien/mm, geblazed für 500 nm), Roper Scientific (USA)

EMCCD-Kamera: iXon Model DV860AC-BV (back-illuminated mit Frame-Transfer-Sensor), ANDOR TECHNOLOGY (USA)

○ *Auswertungs-Software*

ImSpector® Version 2.4.0.0 (2005), LaVision BioTec GmbH (Bielefeld)

MPI f. biophysical Chemistry (Göttingen)

➤ *Probenaufbereitung für kapillarelektrophoretische Trennungen*

○ *Meßgefäße*

2 mL Glasvials, Beckman Coulter (Krefeld)

0,2 mL Glasvials, eigene Herstellung (Universität Wuppertal)

Gummistopfen REV AA u. REV AB, Beckman Coulter (Krefeld)

○ *Zentrifuge*

Mini-Spin-Tischzentrifuge [max. 13400 U/min], Eppendorf (Hamburg)

➤ *Hydrolysen und Derivatisierungen*

○ *Thermomixer und Zubehör*

Thermomixer comfort incl. 0,5 mL und 2 mL Aufsatz, Eppendorf (Hamburg)

Alufolie, Lidl (Wuppertal)

➤ *DNA-Trocknung*

○ *Speed Vac*

Jouan RC 1022, Jouan (Saint Herblain, Frankreich)

Kryostat RCT 90, Jouan (Saint Herblain, Frankreich)

Drehschieberpumpe Pascal 2005 SD [Saugvermögen = 5 m³/h, 2-stufig],
Alcatel Vacuum Technology (Annecy Cedex, Frankreich)
Ölabscheider OME 25 S, Alcatel Vac. Technology (Annecy Cedex, Frankreich)

➤ *DNA-Quantifizierung*

○ *Photometer*

Lambda 40 UV/VIS-Photometer, Perkin Elmer Instruments (Rodgau - Jügesheim)
Hellma 104-QS 5 mm Suprasil - 0,5 cm Küvetten, Ausmessung: 284, Hellma
(Mühlheim)

○ *Auswertungs-Software*

UVWinLAB Version 2.70.71, Perkin Elmer Instruments (Rodgau - Jügesheim)

➤ *H₂O-Aufbereitung*

○ *Wasseraufbereitungsanlage*

Das in dieser Arbeit verwendete Wasser wurde mit Hilfe der Reinstwasseranlage Milli-Q synthesis A10, Millipore (Schwalbach) aufgereinigt. Das Wasser wies eine Reinheit von 18.2 MΩ x cm mit einem TOC von 5 - 10 ppb auf. Vor der Verwendung wurde eine ~ 20-minütige Entgasung im Ultraschallbad durchgeführt.

➤ *Sonstige Geräte und Materialien*

Vortexer REAX 2000, Heidolph (Schwabach)

Feinwaage BP 221S [220 g/max d = 0,1 mg], Sartorius (Göttingen)

Analysenwaage M2P [2 g/max], Sartorius (Göttingen)

Allegra™ 25R Centrifuge, Beckman Coulter (Krefeld)

Transferpetten® [100 - 1000 µL, 10 - 100 µL, 1 - 10 µL, 0,1 - 1 µL], Brand
(Wertheim)

Glasspritze Luer Lock [5 mL, 20 mL], Fortuna®, Poulten & Graf (Wertheim)

pH-Meter: Beckman φ 350, Beckman Coulter (Krefeld)

pH-Standardelektrode: 511275-AB [incl. BNC u. ATC Anschluß], Beckman Coulter (Krefeld)

pH-Mikroelektrode: Inlab 423 [incl. BNC Anschluß], Mettler-Toledo (Schweiz)

Fugisep Mini MWCO 4.000 [4 kD], INTERSEP DEUTSCHLAND (Witten)
Dialyserahmen: Slide-A-Lyzer [0,5 - 3 mL], Perbio Science (Deutschland)
Proteinkonzentrator: iCON™ Concentrator [7 mL/9 kD], Perbio Science (Deutschland)
Gefrierschrank: Liebherr Comfort G 2711, Liebherr (Ochsenhausen)
Kühlschrank: Liebherr Premium K 2650, Liebherr (Ochsenhausen)
Ultraschallbad: Merck eurolab USR 30 H, Merck eurolab N.V. (Belgien)
Trockenschrank: memmert Modell 100, Memmert (Schwabach)
Trockenschrank: T 6 [1,22 kW], Heraeus (Hanau)
IKA Heizrührer RTCbasic, Janke & Kunke (Staufen)
Gas-Brenner: MICROFLAM-Brenner MFB/E, PROXXON (Niersbach)
Kosmetik-Tücher Cien, Lidl (Wuppertal)
UV-Quecksilber-Strahler ST 60 [45 W, $\lambda = 280 - 370 \text{ nm}$], Heraeus Noblelight (Hanau)

DNA-Proben wurden von folgenden Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt:

- Caco2-Zellen *R. Goth-Goldstein* (Lawrence Berkeley National Laboratories, Berkeley, USA)
- Rinderföten-DNA *S. Hiendleder* (Lehrstuhl für molekulare Tierzucht und Haustiergenetik, Ludwig-Maximilian-Universität, München)
- CLL-Zellen *D. Oscier* (Royal Bournemouth Hospital, UK)
- Brustkrebszellen *M. Wießler* (Molekulare Toxikologie, DKFZ, Heidelberg)
- methylierte λ -DNA *D. Stach* (DKFZ, Heidelberg)
- Kontrollproben *N. Kleinsasser* (Ökogenotoxikologie der HNO-Klinik der Universität Regensburg)

6.8 Sonstige Software

- *Textverarbeitung*: MS-Word XP
- *Tabellenkalkulation*: MS-Excel XP
- *Präsentation*: MS-PowerPoint XP
- *Grafikgestaltung und -bearbeitung*: CorelDRAW, Corel Photo-Paint 8.0, ChemDraw Ultra 7.0 und SigmaPlot 8.0

6.9 Chemikalien

1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)- carbodiimid-hydrochlorid, <i>EDC</i> > 99 %	Fa. Fluka, Steinheim
2'-Desoxyguanosin-3'-monophosphat, <i>Natriumsalz</i>	Fa. Sigma, Steinheim
2'-Desoxyguanosin-5'-monophosphat, <i>Natriumsalz</i>	Fa. Sigma, Steinheim
4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza- <i>s</i> -indacen-3- propionylethylendiamin-hydrochlorid, <i>BODIPY-EDA</i>	Fa. MoBiTec, Göttingen
Aceton, <i>p. A.</i>	Fa. Merck, Darmstadt
Calciumchlorid-Dihydrat, <i>Ph Eur</i>	Fa. Merck, Darmstadt
Desoxyribose 5'-monophosphat	Fa. Sigma, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat, <i>Ph Eur</i>	Fa. Merck, Darmstadt
Ethanol 96 %	Fa. Merck, Darmstadt
Guanin-HCl	Fa. Fluka, Steinheim
Hexan, <i>HPLC-Qualität 95 %</i>	Fa. sds, Frankreich
Kalbsthymus-DNA	Fa. Sigma, Steinheim
Lambda-DNA	Fa. New England Biolabs, Frankfurt am Main
Methanol, <i>G Chromasolv</i> [®]	Fa. Sigma-Aldrich, Seelze
Methanol, <i>LiChrosolv</i> [®]	Fa. Merck, Darmstadt
Methanol-D ₄ , <i>Uvasol</i> [®] 99,95 %	Fa. Merck, Darmstadt
Mikrokokkennuklease (<i>Staphylococcus aureus</i>)	Fa. Sigma, Steinheim
Milz-Phosphodiesterase (<i>Kalb</i>)	Fa. Sigma, Steinheim
N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure	Fa. Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat, <i>Ph Eur</i>	Fa. Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat, <i>Ph Eur</i>	Fa. Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Natriumdodecylsulfat, 99 %	Fa. Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid, <i>p. A.</i>	Fa. Merck, Darmstadt
Polyethylenglykol(8)stearat, <i>Myrj 45</i>	Fa. Sigma-Aldrich, Seelze
Polyethylenglykol(40)stearat, <i>Myrj 52</i>	Fa. Sigma-Aldrich, Seelze

Experimenteller Teil

Polyethylenglykol(100)stearat, <i>Myrj 59</i>	Fa. Sigma-Aldrich, Seelze
Polyoxyethylen(10)cetylether, <i>Brij 56</i>	Fa. Sigma-Aldrich, Seelze
Polyoxyethylen(20)cetylether, <i>Brij 58</i>	Fa. Sigma-Aldrich, Seelze
Polyoxyethylen(20)oleylether, <i>Brij 98</i>	Fa. Sigma-Aldrich, Seelze
Polyoxyethylen(20)stearylether, <i>Brij 78</i>	Fa. Sigma-Aldrich, Seelze
Polyoxyethylen(23)laurylether, <i>Brij 35</i>	Fa. Sigma-Aldrich, Seelze
Polyoxyethylen(40)fettalkohol(12-14)ether, <i>Talgalkohol EO 40</i>	Fa. Cognis, Düsseldorf
Polyoxyethylen(40)fettalkohol(12-14)ether, <i>Dehydol LS 50</i>	Fa. Cognis, Düsseldorf
Salzsäure, 37 %	Fa. Merck, Darmstadt
tridest. Wasser	Analytische Chemie der BU Wuppertal

7 Anhang

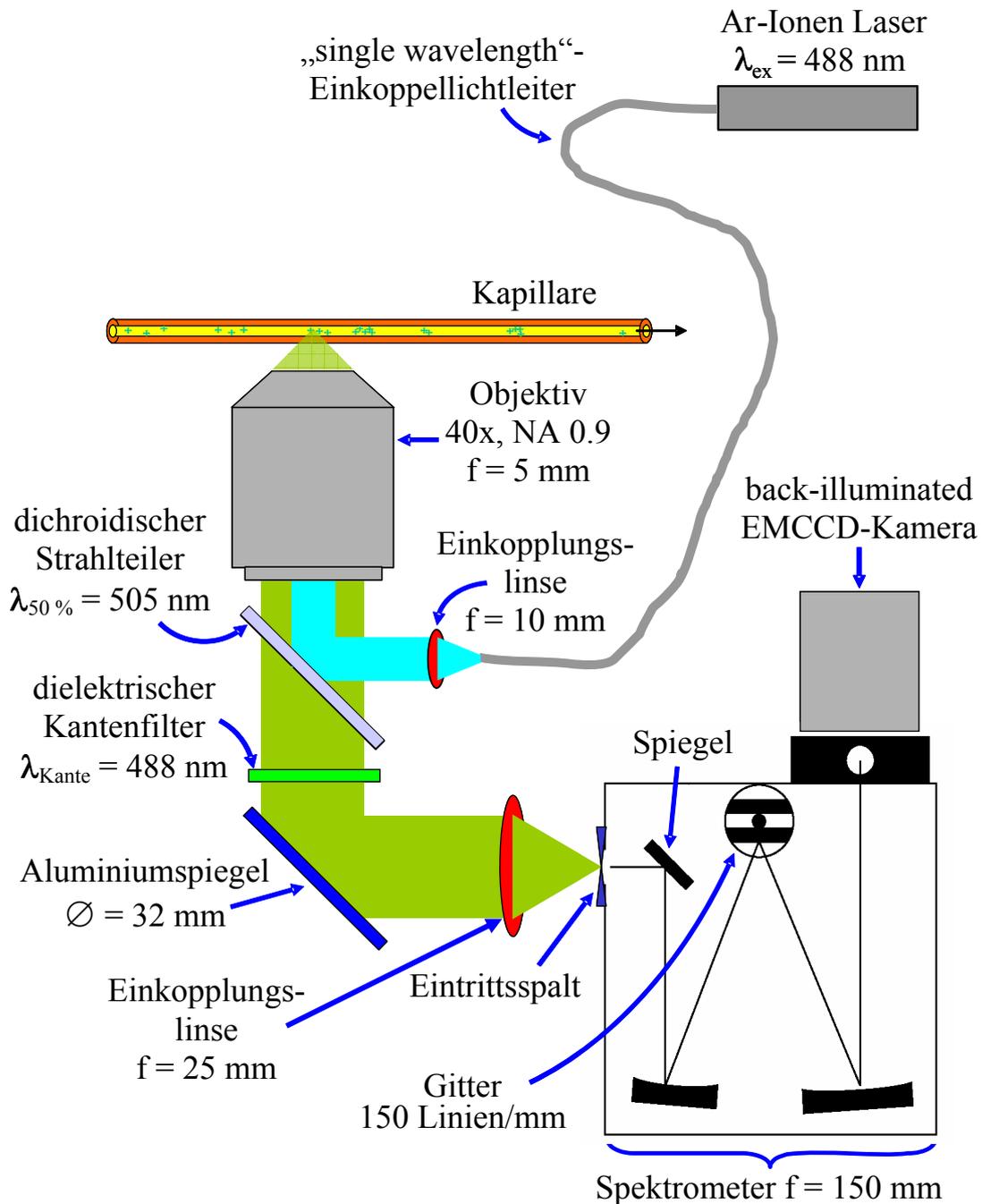


Abbildung 7-1: Schematischer Aufbau des LS-CCD-Detektionssystems in einer Epiilluminationsanordnung, modifiziert aus einer von *Schütte* (LaVision BioTec) bereitgestellten Vorlage; der Strahl eines Argon-Ionen Lasers ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$) wird nach Fokussierung durch eine Achromatlinse über einen dichroidischen Strahlteiler in das Mikroskopobjektiv gelenkt. Dieses Objektiv bündelt den Strahl in das Anregungsvolumen der Kapillare und sammelt die emittierten Fluoreszenzphotonen. Die Emissionsstrahlung wird anschließend im Spektrometer spektral zerlegt, über eine EMCCD-Kamera detektiert und bildlich dargestellt. Der Eintrittsspalt des Spektrometers dient bei dieser Anordnung als eindimensional ortsauflösende Lochblende.

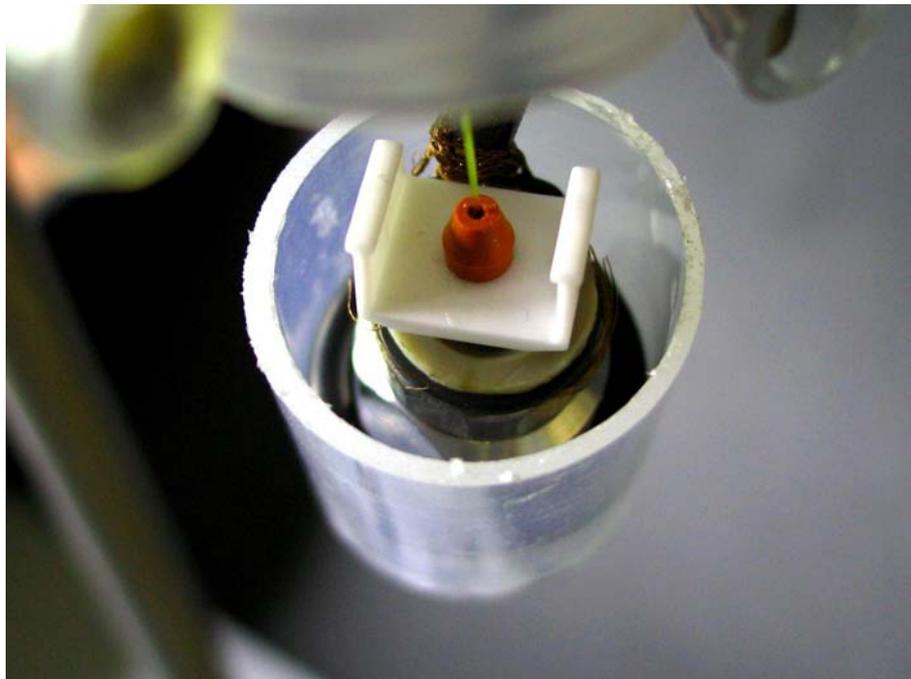


Abbildung 7-2: Ansicht von oben auf die Outletelektrode des LS-CCD-Systems (Einzelkapillare). Die Abbildung zeigt das Plastikgehäuse, einen Dichtring, der die Halterung der Agilent-Elektrode durch Druck gegen das Plastikgehäuse stabilisiert, und einen Gummi-Abdichtungsclip (Beckman Coulter), der als Kapillarführung und -fixierung innerhalb der Elektrode fungiert.

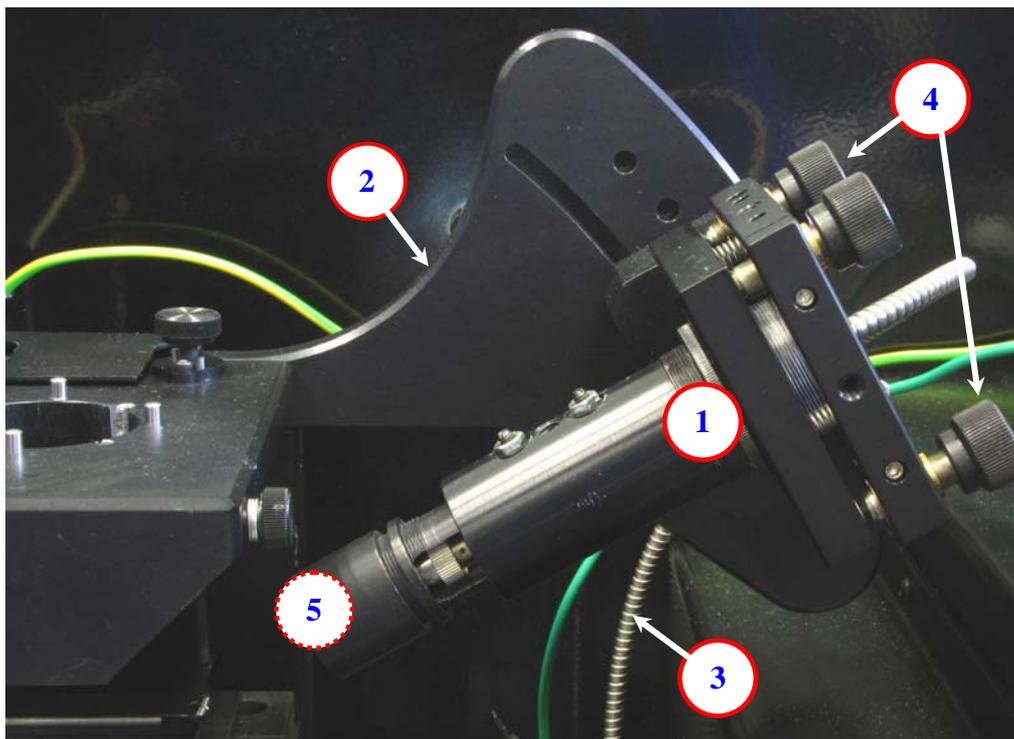


Abbildung 7-3: Vorrichtung zur Justierung des Laserstrahls:

Der „single wavelength“-Lichtleiter (3) wird in die Einkopplungshalterung (1) geführt und der Laserstrahl mit einer Achromatlinse (5) ($f = 10 \text{ mm}$, innerhalb der Einkopplungshalterung; im Bild nicht sichtbar) fokussiert. Durch die variable Verbindung mit dem Einkoppelwinkel (2) lassen sich unterschiedliche Einstrahlwinkel des Lasers einstellen. Mit den Feinjustierschrauben (4) kann der Laserstrahl in Querrichtung (kurzer Pfeil) und Längsrichtung (langer Pfeil) bewegt werden.

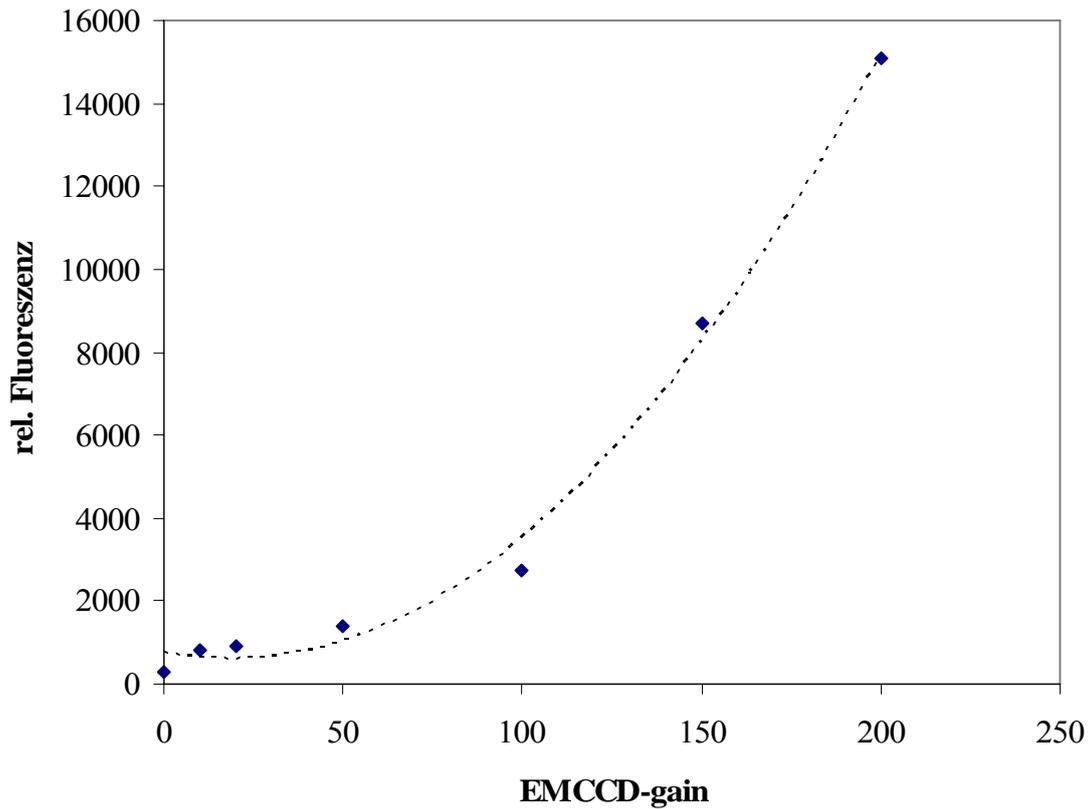


Abbildung 7-4: Abhängigkeit der Signalhöhe des 5m-dCMP-BODIPY-Signals einer in H₂O 1:200 verdünnten 10 µg CT-DNA-Probe von der Verstärkungseinstellung der EMCCD-Kamera. Die Belichtungszeit betrug bei allen Analysen 500 ms. Der Korrelationskoeffizient der exponentiellen Regression betrug 0,9938.

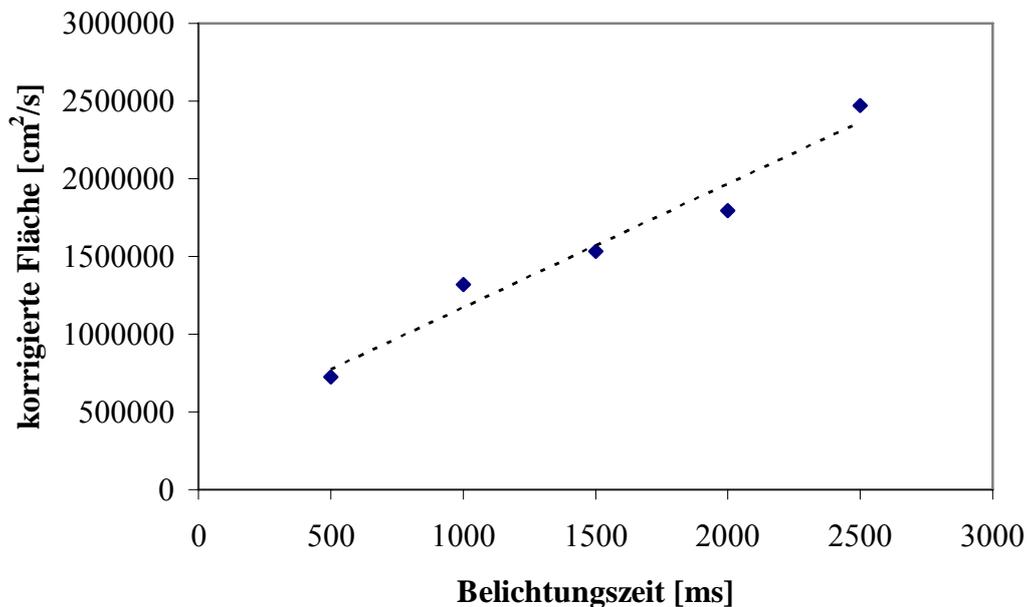


Abbildung 7-5: Auswirkung der Belichtungszeit auf die korrigierten Flächen von 5m-dCMP. Der Korrelationskoeffizient betrug 0.9602. Bei allen Analysen wurde ein EMCCD-Verstärkungswert von 50 eingestellt.

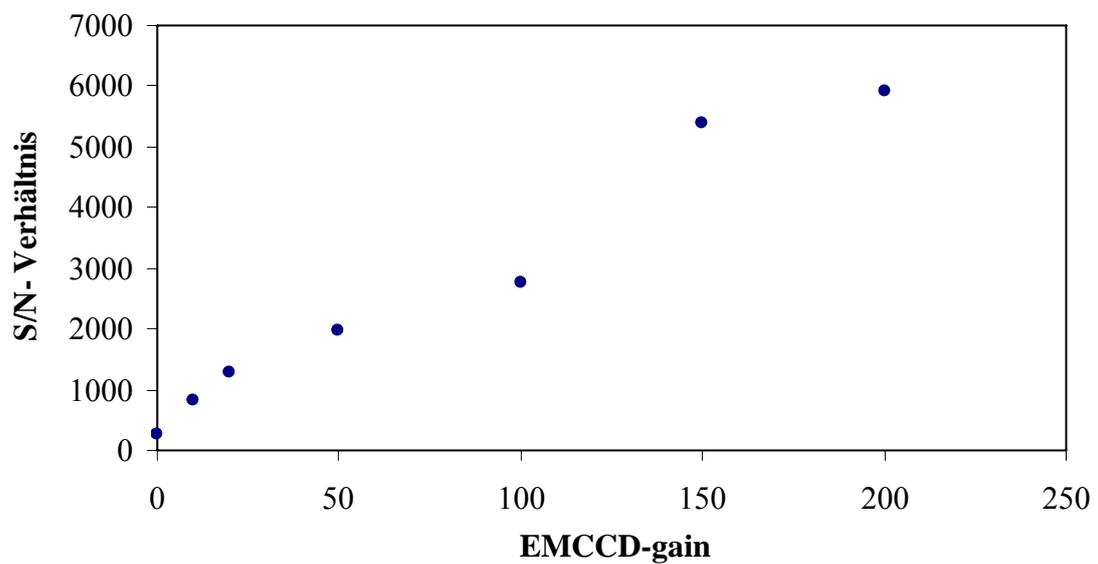


Abbildung 7-6: Abhängigkeit des S/N-Verhältnisses von der EMCCD-gain anhand des Signals von 5m-dCMP-BODIPY aus der Analyse einer hydrolysierten und derivatisierten 10 μg CT-DNA, die auf dem CE-LS-CCD-System analysiert wurde. Vor der Analyse wurde die Probe 1:200 in Wasser verdünnt und mit Paraffin überschichtet.



Abbildung 7-7: UV-Apparatur für die Photolyse des CZE-Puffers: (1) Kühlfinger, (2) UV-Strahler, (3) Quarzglasstandflasche mit Elektrolyt; im Gegensatz zu der in der Abbildung erkennbaren Temperatur von 19,8 °C wurden bei der Photolyse eines CZE-Puffers 4 °C eingehalten. Zusätzlich wurde der gesamte gläserne Aufbau mit Aluminiumfolie umhüllt.

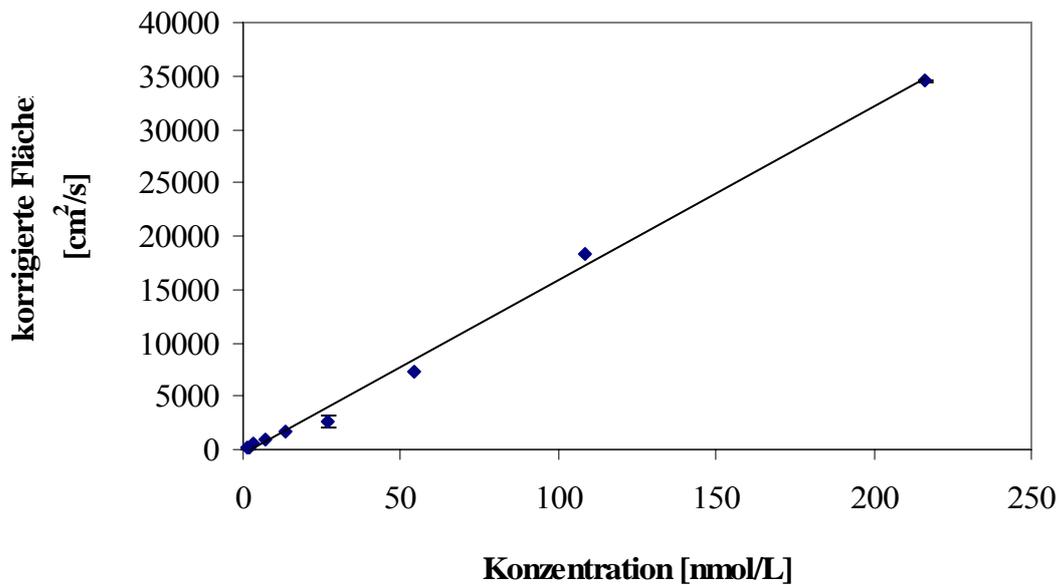


Abbildung 7-8: Intensitätsuntersuchung mittels derivatisiertem dAMP (10 μg), das in unterschiedlichen Verdünnungen kapillarelektrophoretisch (MEKC) mit CE-LIF-Detektion analysiert wurde. Die jeweiligen Datenpunkte stellen die Mittelwerte aus je $n = 2$ Messungen dar (Korrelationskoeffizient 0,9953). Die relativen Standardabweichungen lagen zwischen 0,03 und 7,08 %, daher sind die im Diagramm dargestellten Fehlerbalken kaum erkennbar.

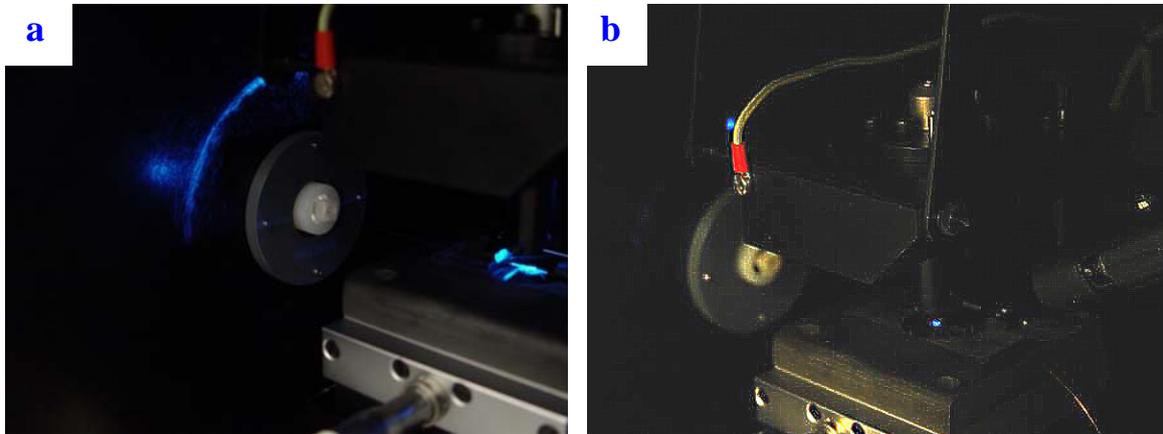


Abbildung 7-9: Vergleich der Reflexion des Laserlichts an der Glasoberfläche einer (a) runden und einer (b) kubischen Kapillare. Die Aufnahmen entstanden ohne zusätzliche Belichtung. Laserstrahldurchmesser, Laserleistung und der Einstrahlwinkel des Lasers auf das Detektionsfenster waren bei beiden Photos identisch. Jeweils links im Bild ist die Eintrittsöffnung der Kapillare ins Detektorgehäuse zu erkennen. Hier endet die Flüssigkühlung.

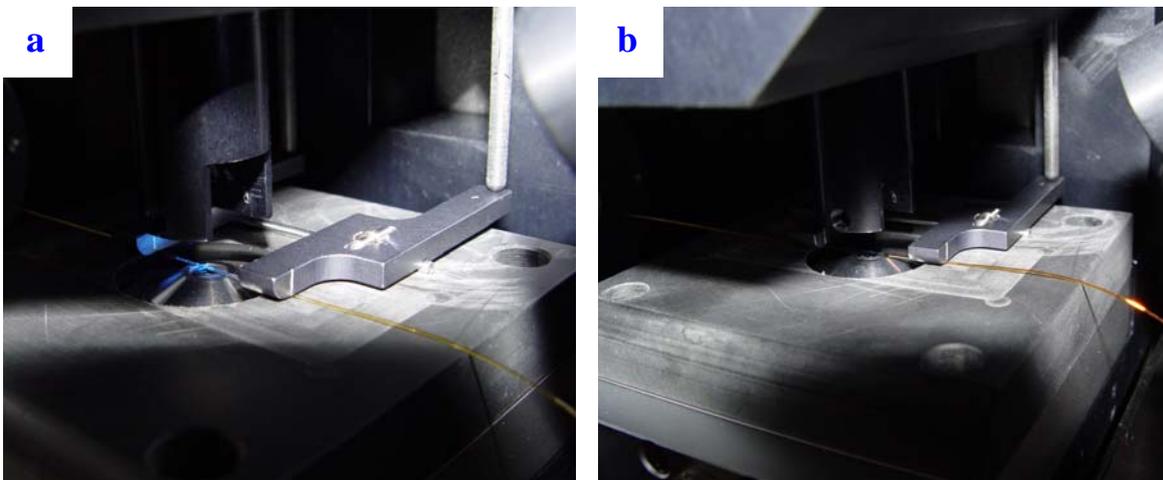


Abbildung 7-10: Vergleich der Reflexion des Laserlichts an der Glasoberfläche einer (a) runden und einer (b) kubischen Kapillare. Die Aufnahmen wurden mit indirektem Blitzlicht belichtet. Laserstrahldurchmesser, Laserleistung und der Einstrahlwinkel des Lasers auf das Detektionsfenster waren bei beiden Photos identisch.

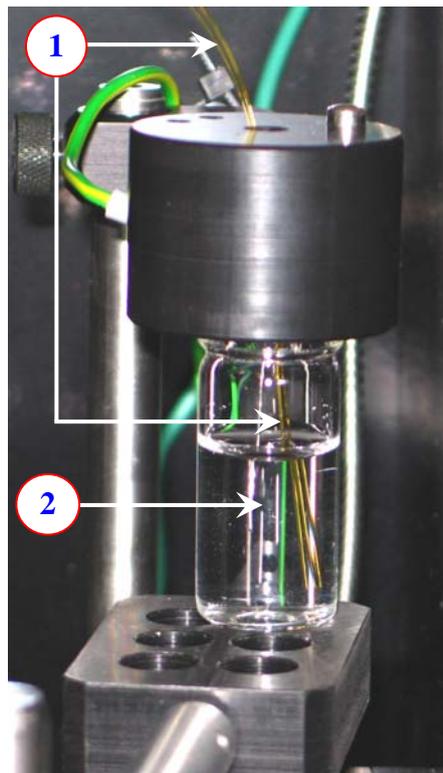


Abbildung 7-11: Neukonstruktion der Outletelektrode für die Multikapillarenanordnung: (1) Kapillaren, (2) Elektrode; der im unteren Bereich des Bildes zu erkennende Outlet-Vialhalter wurde zu einem späteren Zeitpunkt gegen einen anderen ersetzt, der Ausfräsungen enthält, die dem Durchmesser des 10 mL Probenglases entsprechen.

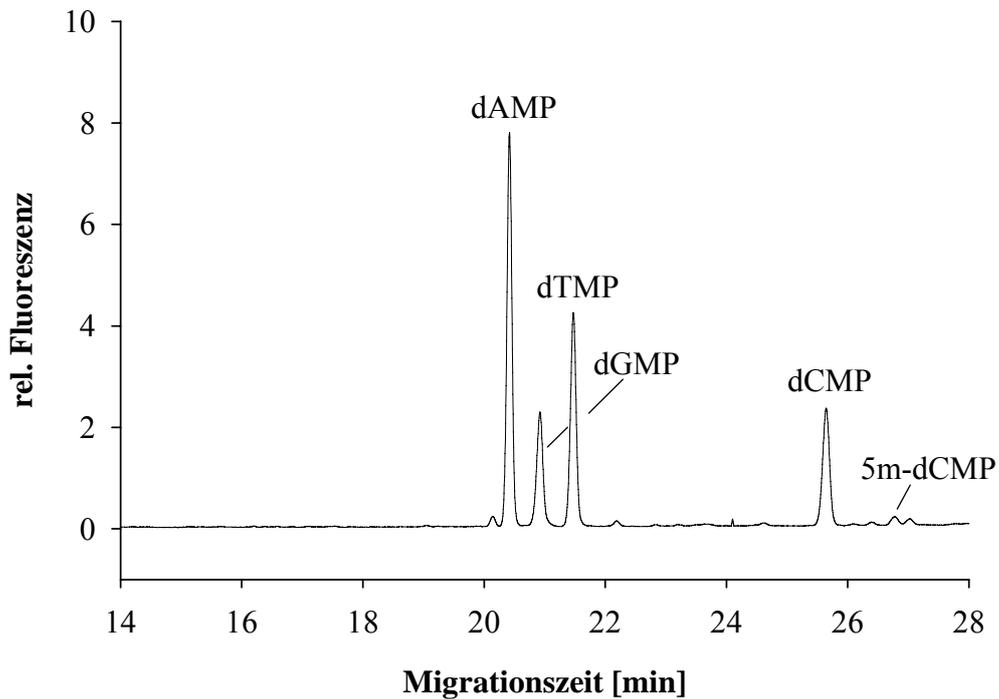


Abbildung 7-12: Elektropherogramm einer Analyse von 50 ng CT-DNA nach Komplexierung und Eliminierung der Derivatisierungsreagenzien; die kapillarelektrophoretische Analyse erfolgte nach Methode II, allerdings mit 2,9-facher Verdünnung; die injizierte Stoffmenge betrug 7,79 fmol (bei 5,9 nL Injektionsvolumen).

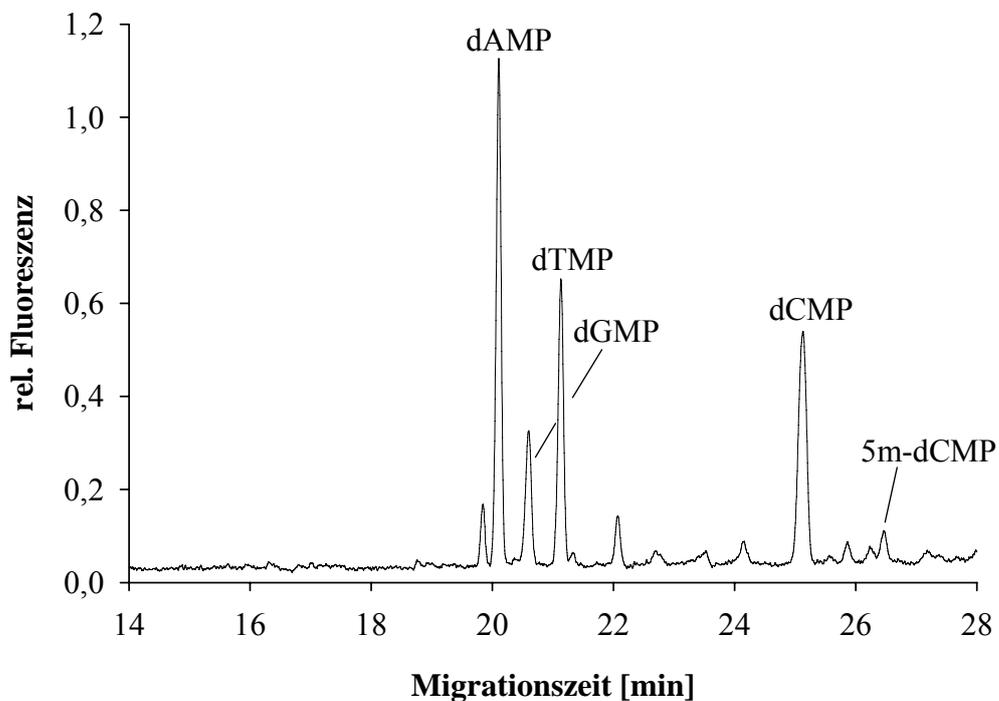


Abbildung 7-13: Elektropherogramm einer Analyse von 10 ng CT-DNA nach Komplexierung und Eliminierung der Derivatisierungsreagenzien; die kapillarelektrophoretische Analyse erfolgte nach Methode II, allerdings mit 2,6-facher Verdünnung; die injizierte Stoffmenge betrug 1,77 fmol (bei 5,9 nL Injektionsvolumen).

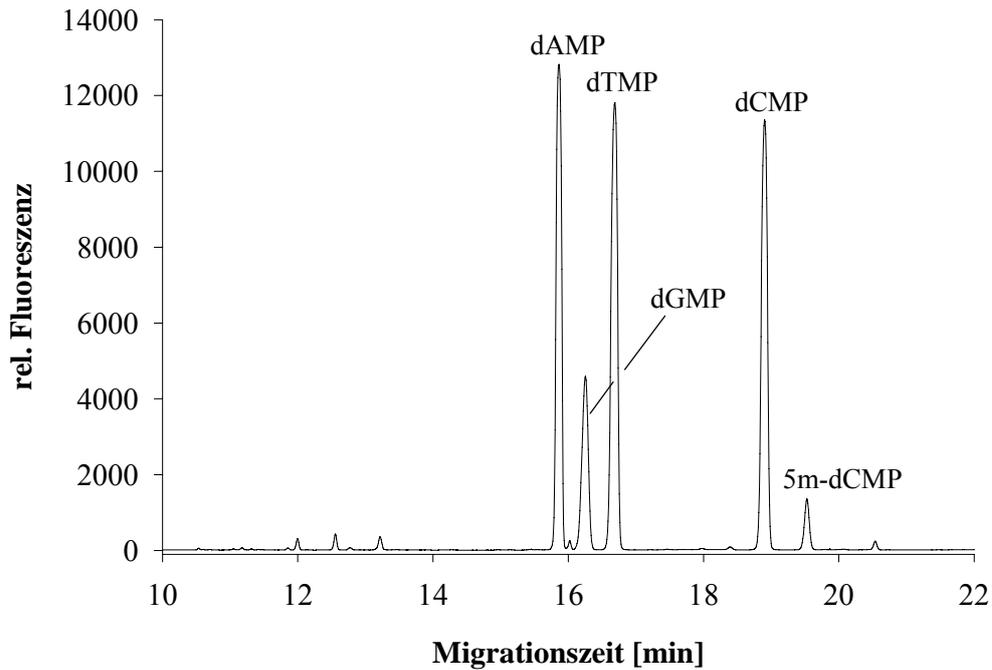


Abbildung 7-14: LS-CCD-Analyse einer 10 µg CT-DNA nach Hydrolyse und „klassischer“ Derivatisierung (21 h, 25 °C) 1:200-fach verdünnt; die Belichtungszeit der Kamera betrug 500 ms, die Verstärkung 200.

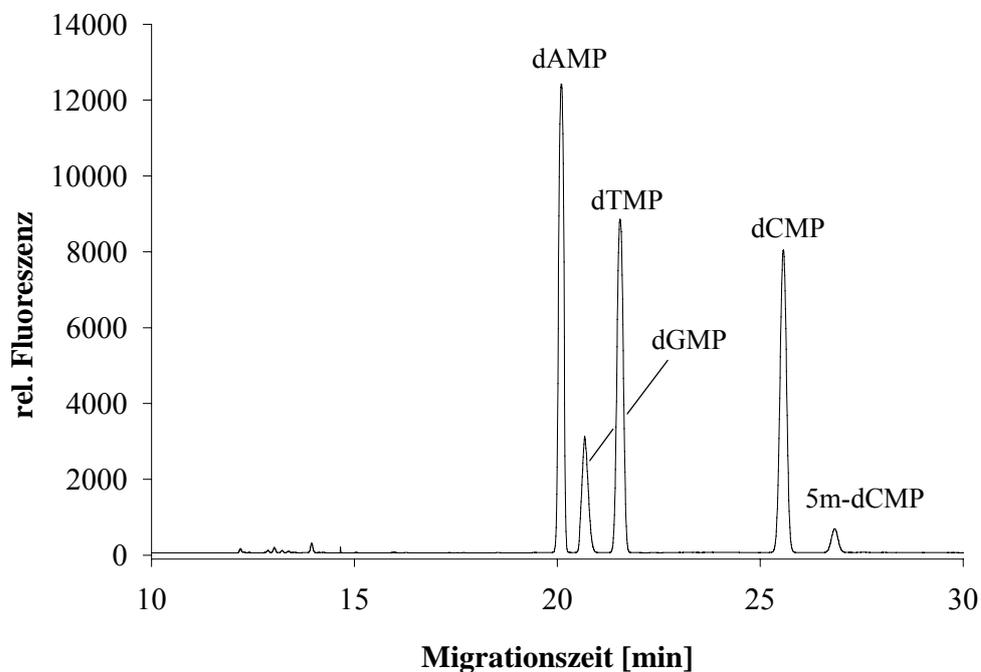


Abbildung 7-15: LS-CCD-Analyse einer 10 µg CT-DNA nach Hydrolyse und „Mikrowellen“-Derivatisierung (3 h, 45 °C, 72 kJ) 1:200-fach verdünnt; die Belichtungszeit der Kamera betrug 500 ms, die Verstärkung 200.

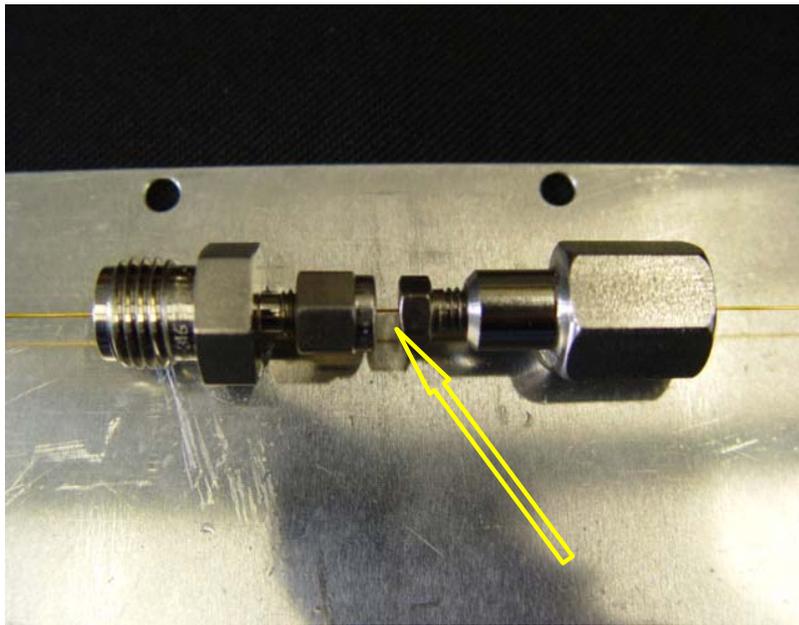


Abbildung 7-16: Brennvorrichtung mit eingesetzter Kapillare; der gelbe Pfeil markiert die Stelle, an der mit einem Gasbrenner die Polyimidschicht entfernt wird.

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Modell einer einheitlichen Theorie zur Krebsentstehung.....	8
Abbildung 2-2: Multi-Hit-Konzept der chemischen Kanzerogenese.....	9
Abbildung 2-3: Modifizierbare nukleophile Zentren der vier DNA-Basen.....	12
Abbildung 2-4: Auswahl einiger endogener DNA-Modifikationen	14
Abbildung 2-5: Schematische Darstellung des verwendeten Verfahrens zur DNA-Addukt-analytik mittels CE-LIF.....	22
Abbildung 2-6: Schematische Darstellung der Einkopplungsmöglichkeiten bei statischer Anordnung (blau eingerahmt) und ein Beispiel für eine bewegliche Anordnung (rot eingerahmt).....	26
Abbildung 2-7: Schematische Darstellung des Prinzips eines CCD-Chips.....	29
Abbildung 2-8: Schematische Darstellung eines MOS-Kondensators	30
Abbildung 2-9: Schematischer Ablauf des Ladungstransportes	30
Abbildung 4-1: Elektropherogramme der Analysen (a) einer 1 µg und (b) einer 100 ng CT-DNA	38
Abbildung 4-2: Elektropherogramm der Analysen einer 10 µg CT-DNA	39
Abbildung 4-3: Vergrößerter Ausschnitt des Elektropherogramms einer Analyse einer hydrolysierten und derivatisierten 10 µg CT-DNA (PVV 1).....	43
Abbildung 4-4: Vergrößerter Ausschnitt des Elektropherogramms einer Analyse einer mit 3,4-facher Enzymmenge hydrolysierten und derivatisierten 10 µg CT-DNA.....	45
Abbildung 4-5: Vergrößerter Ausschnitt des Elektropherogramms einer Analyse von 10 µg CT-DNA.....	46
Abbildung 4-6: Vergleich der Analysen zweier CT-DNA-Proben.....	48
Abbildung 4-7: Elektropherogramm der Analyse einer 100 ng Brustkrebs-DNA.....	57
Abbildung 4-8: Verteilung der von 29 Patienten bestimmten, genomweiten Methylierungsgrade	62
Abbildung 4-9: Zusammenhang zwischen der VH-Homologie und der ZAP-70-Expression bei 27 Patienten mit B-CLL	65
Abbildung 4-10: Zusammenhang zwischen der ZAP-70-Expression und dem Methylierungsgrad bei 27 Patienten mit B-CLL	65
Abbildung 4-11: Zusammenhang zwischen dem C-334-Methylierungsstatus und der genomweiten Methylierung aller 29 Patienten mit B-CLL	66

Abbildung 4-12: Mittelwerte mit Standardabweichung für den genomweiten Methylierungsgrad in (a) Muskel- und (b) Hirngewebe von 80 Tage alten Rinderföten.....	70
Abbildung 4-13: Grundlegende Syntheseroute zur Herstellung endogener Addukte.....	72
Abbildung 4-14: Synthetisierte Standardverbindungen für den co-chromatographischen Nachweis von endogenen DNA-Addukten.....	73
Abbildung 4-15: Ausschnitt eines Elektropherogramms der Analyse einer 10 µg CT-DNA-Probe (PVV 2).....	76
Abbildung 4-16: Elektropherogramm der Analyse einer 1:4000 in Wasser verdünnten Probe aus Derivaten von dIMP, dUMP, dTgMP, dTMP, etheno-dAMP, dCMP und 5m-dCMP (je 10 µg).....	79
Abbildung 4-17: Vergrößerter Ausschnitt der Elektropherogramme der DNA-Analyse eines B-CLL-Patienten (Patient D).....	81
Abbildung 4-18: Ergebnis der Standardaddition bei der Bestimmung von etheno-dAMP in der DNA-Probe eines B-CLL-Patienten (Patient A).....	82
Abbildung 4-19: Vergrößerter Ausschnitt der Elektropherogramme einer Analyse von 10 µg DNA aus B-Lymphozyten einer gesunden Person.....	85
Abbildung 4-20: Schematischer Aufbau des LS-CCD-Detektionssystems.....	90
Abbildung 4-21: Photo des LS-CCD-Systems.....	92
Abbildung 4-22: (a) Outletelektrode im Detektorgehäuse; (b) Auflage mit Aluminiumklammern für die Fixierung der Kapillare im Bereich des Detektionsfensters.....	92
Abbildung 4-23: Optimierter Aufbau des CE-LS-CCD-Systems.....	94
Abbildung 4-24: Intensitäts-Wellenlängenprofil einer wäßrigen Lösung mit maximalem Intensitätsverhältnis der Ramanbande von Wasser zum Laserstreulicht.....	95
Abbildung 4-25: Abhängigkeit der korrigierten Fläche des 5m-dCMP-BODIPY-Signals von den Verstärkungseinstellungen der CCD-Kamera.....	97
Abbildung 4-26: Abhängigkeit des S/N-Verhältnisses des 5m-dCMP-BODIPY-Signals von der Belichtungszeit der CCD-Kamera.....	99
Abbildung 4-27: Verschiedene Ausschnitte in der Bilddarstellung.....	101
Abbildung 4-28: Elektropherogramm einer 25 pM BODIPY-Lösung, die auf dem CE-LIF-System nach Methode VI analysiert wurde.....	103
Abbildung 4-29: Elektropherogramm einer 5 pM BODIPY-Lösung, die auf dem CE-LS-CCD-System nach Methode VI analysiert wurde.....	103
Abbildung 4-30: Elektropherogramm einer 5 pM BODIPY-Lösung (CE-LS-CCD-System) unter Verwendung des Elektrolyten E nach dreieinhalb-stündiger UV-Photolyse.....	104

Abbildung 4-31: Untersuchungen zur Linearität mit wäßrigen BODIPY-Lösungen	107
Abbildung 4-32: Konzentrations-Flächen-Profil von derivatisiertem dAMP (10 µg).....	108
Abbildung 4-33: Schematische Darstellung der verwendeten kubischen Kapillare laut Pro- duktinformation des Herstellers	109
Abbildung 4-34: Elektropherogramm der Analyse einer präparierten 10 µg CT-DNA auf dem CE-LS-CCD-System unter Verwendung einer runden Kapillare	110
Abbildung 4-35: Elektropherogramm der Analyse einer präparierten 10 µg CT-DNA auf dem CE-LS-CCD-System unter Verwendung einer kubischen Kapillare	111
Abbildung 4-36: (a) Auflage für die Fixierung des Kapillarträgers; (b) Kapillarträger aus getempertem PMMA.....	113
Abbildung 4-37: Überblick über die Führung der Kapillaren im Bereich der Eintrittsstelle in das Detektorgehäuse und des Detektionsfensters bei der Multikapillarenanordnung mit drei Kapillaren	114
Abbildung 4-38: Elektropherogramm der Multikapillaren-Analyse einer 1:200 in H ₂ O verdünnten, präparierten CT-DNA (10 µg nach PVV 2).....	116
Abbildung 4-39: Schematische Darstellung der gaußförmigen Aufweitung des Laserstrahls	117
Abbildung 7-1: Schematischer Aufbau des LS-CCD-Detektionssystems in einer Epi- illuminationsanordnung.....	147
Abbildung 7-2: Ansicht von oben auf die Outletelektrode des LS-CCD-Systems (Einzel- kapillare).....	148
Abbildung 7-3: Vorrichtung zur Justierung des Laserstrahls:	149
Abbildung 7-4: Abhängigkeit der Signalhöhe des 5m-dCMP-BODIPY-Signals einer in H ₂ O 1:200 verdünnten 10 µg CT-DNA-Probe von der Verstärkungseinstellung der EMCCD-Kamera.....	150
Abbildung 7-5: Auswirkung der Belichtungszeit auf die korrigierten Flächen von 5m-dCMP	150
Abbildung 7-6: Abhängigkeit des S/N-Verhältnisses von der EMCCD-gain.....	151
Abbildung 7-7: UV-Apparatur für die Photolyse des CZE-Puffers.....	152
Abbildung 7-8: Intensitätsuntersuchung mittels derivatisiertem dAMP (10 µg).....	153
Abbildung 7-9: Vergleich der Reflexion des Laserlichts an der Glasoberfläche einer (a) runden und einer (b) kubischen Kapillare	154
Abbildung 7-10: Vergleich der Reflexion des Laserlichts an der Glasoberfläche einer (a) runden und einer (b) kubischen Kapillare	154
Abbildung 7-11: Neukonstruktion der Outletelektrode für die Multikapillarenanordnung	155

Abbildung 7-12: Elektropherogramm einer Analyse von 50 ng CT-DNA nach Komplexierung und Eliminierung der Derivatisierungsreagenzien.....	156
Abbildung 7-13: Elektropherogramm einer Analyse von 10 ng CT-DNA nach Komplexierung und Eliminierung der Derivatisierungsreagenzien.....	156
Abbildung 7-14: LS-CCD-Analyse einer 10 µg CT-DNA nach Hydrolyse und „klassischer“ Derivatisierung	157
Abbildung 7-15: LS-CCD-Analyse einer 10 µg CT-DNA nach Hydrolyse und „Mikrowellen“-Derivatisierung	157
Abbildung 7-16: Brennvorrichtung mit eingesetzter Kapillare.....	158

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 4-1: Angaben zu den verschiedenen Variationen in der Probenvorbereitung (Derivatisierung) für 100 ng, 1 µg und 10 µg DNA	37
Tabelle 4-2: (a) prozentuale Flächen der Nukleotide in hydrolysierten und derivatisierten 10 µg-, 1 µg- und 100 ng λ-DNA sowie (b) die ermittelten Korrekturfaktoren	41
Tabelle 4-3: Korrekturfaktoren aus der Analyse einer methylierten und einer unmethylierten 1 µg λ-DNA, die in verschiedenen Zeitabständen nach erfolgter Probenvorbereitung gemessen wurden.	42
Tabelle 4-4: Vergleich der Korrekturfaktoren für 10 µg DNA; ⁽¹⁾ gemittelte Korrekturfaktoren aus methylierter und unmethylierter λ-DNA; ⁽²⁾ Korrekturfaktoren aus unmethylierter λ-DNA.	51
Tabelle 4-5: Ermittelte Methylierungsgrade von 4 x 10 µg CT-DNA Proben	51
Tabelle 4-6: Methylierungsgrade der DNA von Caco2-Zellen, die 24 h und 48 h mit unterschiedlichen PAKs inkubiert wurden.	55
Tabelle 4-7: Ergebnisse der Methylierungsuntersuchung bei 29 Patienten mit B-CLL (31 Proben).....	61
Tabelle 4-8: Übersicht über die ausgewählten, zum Basiselektrolyten zugesetzten nicht-ionischen Tenside.....	75
Tabelle 4-9: Ermittelte Peakflächen und Korrekturfaktoren für die modifizierten Nukleotide.	78
Tabelle 4-10: Ergebnis der quantitativen Bestimmung endogener DNA-Addukte in DNA-Proben von Patienten mit B-CLL mittels Standardadditionsverfahren.....	80

Tabelle 4-11: Korrigierte Flächen und S/N-Verhältnisse des Signals eines Analysenlaufes (Methode VI) einer 20 pM BODIPY-Lösung in Abhängigkeit vom gewählten Bildausschnitt.....	100
Tabelle 4-12: Erhaltene Methylierungsgrade aus der Multikapillaren-Analyse einer 10 µg CT-DNA-Probe	118
Tabelle 6-1: Verwendete Elektrolyten für die MEKC	138
Tabelle 6-2: Verwendeter Elektrolyt für die CZE.....	139
Tabelle 6-3: Verwendete Analysenmethoden	140

8 Literaturverzeichnis

- [1] Schirmmacher, V.; „*Krebs-Tumoren Zellen, Gene*“; in: Krebs-Tumoren Zellen, Gene; Spektrum der Wissenschaft, Reihe verständliche Forschung; **2. Auflage** (1987) 7 - 9
- [2] Anders, A., Anders, F., Zechel, Ch., Gröger, H., Schmidt, D., Smith, A. und Schlatterer, B.; „*Genetische Mechanismen der Tumorgenese - Prüfung erb- und umweltabhängiger Krebsrisiken in Xiphophorus-Testsystemen*“; in: Chemische Krebsrisikofaktoren der Umwelt; (Ed) Schlatterer, B.; Erich Schmidt, Berlin (1991) 81 - 115
- [3] Ferlay, J., Bray, F., Pisani, P. und Parkin, D. M.; „*GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide*“; IARC CancerBase No.5, version 2.0, IARC Press, Lyon (2004)
- [4] Linseisen, J.; „*Ernährung und Krebsprävention*“; BIOforum; **10** (2005) 12 - 13
- [5] *Krebs in Deutschland; 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe*, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V und das RKI Saarbrücken (2006)
- [6] Deutscher Krebsatlas, DKFZ-Heidelberg, Ausgabe (1990-1998)
- [7] Schmitz-Moormann, P., Gebert, G. und Thomas, C.; „*Allgemeine Pathologie*“; Schattauer-Verlag, Stuttgart, New York (1995)
- [8] Doll, R. und Peto, R.; „*The causes of cancer - quantitative estimates of avoidance risks of cancer in the United States today*“; J.Natl.Cancer Inst.; **66** (1981) 1197 - 1312
- [9] Tang, Z.-Y.; „*Hepatocellular Carcinoma-Cause, Treatment and Metastasis*“; World J.Gastroenterol.; **7** (2001) 445 - 454
- [10] Rajewsky, M. F.; „*Die Entstehung von Krebserkrankungen nach Einwirkung exogener und endogener Kanzerogene*“; Essener Unikate, Thema: Krebs; **1** (1992) 7
- [11] Schirmmacher, V.; „*Tumoren: Entstehung, Metastasierung und immunologische Abwehrmechanismen*“; in: Immunologie; (Eds) Gemsa, D., Kalden, J. R. und Resch, K.; Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York; **3. Auflage** (1991) 184 - 202
- [12] Hanahan, D. und Weinberg, R. A.; „*The hallmarks of cancer*“; Cell; **100** (2000) 57 - 70
- [13] Cairns, P. H.; „*Das Krebsproblem*“; in: Krebs-Tumoren Zellen, Gene; Spektrum der Wissenschaft, Reihe verständliche Forschung; **2. Auflage** (1987) 11 - 21
- [14] Boveri, T.; „*Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren*“; Verlag von Gustav Fischer; Jena; **1** (1914)
- [15] Cohen, S. M. und Ellwein, L. B.; „*Genetic Errors, Cell-Proliferation, and Carcinogenesis*“; Cancer Research; **51** (1991) 6493 - 6505
- [16] Hahn, W. C.; „*Cancer: Surviving on the edge*“; Cancer Cell; **6** (2004) 215 - 222
- [17] Lengauer, C., Kinzler, K. W. und Vogelstein, B.; „*Genetic instabilities in human cancers*“; Nature; **396** (1998) 643 - 649

- [18] Wagener, C.; „*Molekulare Onkologie: Entstehung und Progression maligner Tumoren*“; Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York; **2. Auflage** (1999)
- [19] Weinberg, R. A.; „*Wie Krebs entsteht*“; in: Spektrum der Wissenschaft Spezial 5: Krebsmedizin; Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg (1999) 7 - 17
- [20] Neumann, H. A.; „*Vom Ascaris zum Tumor*“; Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin, Wien (1998) 197 - 211
- [21] Neumann, H. G.; „*Entstehung und Behandlung von Tumoren, Immunsuppressiva*“; in: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie; (Eds) Forth, W, Henschler, D., Rummel, W. und Starke, K.; Spektrum akademischer Verlag (1996) 789 - 814
- [22] Marquardt, H. und Schäfer, S. G.; „*Lehrbuch der Toxikologie*“; BI Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich (1994)
- [23] Vogelstein, B. und Kinzler, K. W.; „*The multistep nature of cancer*“; TIG; **9** (1993) 138 - 141
- [24] Horsthemke, B.; „*Die Rolle des RB1-Anti-Onkogens bei der Entstehung von Retinoblastomen*“; Essener Unikate; Thema: Krebs; **1** (1992) 46 - 53
- [25] Neumann, H. G.; „*Entstehung und Behandlung von Tumoren, Immunsuppressiva*“; in: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie; (Eds) Forth, W, Henschler, D., Rummel, W. und Starke, K.; Spektrum akademischer Verlag (1987) 1002 - 1018
- [26] Schmitz, O. J.; „*Entwicklung einer Methode zur Analyse von DNA-Addukten mittels Kapillarelektrophorese*“; Habilitationsschrift, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg (2003)
- [27] Fearon, E. R. und Vogelstein, B.; „*A genetic model for colorectal tumorigenesis*“; Cell; **61** (1990) 763
- [28] Harris, C. C.; „*Chemical and physical carcinogenesis: Advances and perspectives for the 1990s*“; Cancer Res.(suppl.); **18** (1991) 5023s - 5044s
- [29] Perera, F. P.; „*Molecular epidemiology: insights into cancer susceptibility, risk assessment and prevention*“; J.Natl.Cancer Inst.; **88** (1996) 496 - 509
- [30] Renan, M. J.; „*How many mutations are required for tumorigenesis?*“; Mol.Carcinogenesis; **7** (1993) 139 - 146
- [31] Stephan, D. U.; „*In-vitro-Untersuchungen von Speichelproben auf zyto- und genotoxische Wirkung*“; Dissertation, Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (2000)
- [32] Coussens, L. M. und Werb, Z.; „*Inflammation and cancer*“; Nature; **420** (2002) 860 - 867
- [33] Nicolson, G. L.; „*Krebsmetastasen*“; in: Krebs-Tumoren Zellen, Gene; Spektrum der Wissenschaft, Reihe verständliche Forschung; **2. Auflage** (1987) 148 - 159
- [34] Birchmeier, W.; „*Molekularbiologische Ansätze zum Problem der Metastasenbildung*“; Essener Unikate; Thema: Krebs; **1** (1992) 35 - 45
- [35] Ruoslahti, E.; „*Wie Krebs sich ausbreitet*“; in: Spektrum der Wissenschaft Spezial 5: Krebsmedizin; Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg (1999) 18 - 23

- [36] Coates, P. J., Lorimore, S. A. und Wright, E. G.; „*Cell and tissue responses to genotoxic stress*“; *Journal of Pathology*; **205** (2005) 221 - 235
- [37] Auerbach, C., Robson, J. M. und Carr, J. G.; „*The chemical production of mutations*“; *Science*; **105** (1947) 243 - 247
- [38] Miller, J. A.; „*Carcinogenesis by chemicals: an overview*“; *Cancer Res.*; **30** (1970) 559 - 576
- [39] Guengerich, F. P.; „*Metabolism of chemical carcinogens*“; *Carcinogenesis*; **21** (2000) 345 - 351
- [40] Dipple, A., Michejda, C. J. und Weisburger, E. K.; „*Metabolism of chemical carcinogens*“; *Pharmacol. Ther.*; **27** (1985) 265 - 296
- [41] Kriek, E., Rojas, M., Alexandrov, K. und Bartsch, H.; „*Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in humans: relevance as biomarkers for exposure and cancer risk*“; *Mut. Res.*; **400** (1998) 215 - 231
- [42] Philips, D. H.; „*Fifty years of benzo[a]pyrene*“; *Nature*; **303** (1983) 486 - 472
- [43] Kaderlik, K. R., Talaska, G., De Bord, D. G., Osorio, A. M. und Kadlubar, F. F.; „*4,4'-Methylene-bis(2-Chloroaniline)-DNA adduct analysis in human exfoliated urothelial cells by P-32 postlabeling*“; *Cancer Epidemiol. Biom. Prev.*; **2** (1993) 63 - 69
- [44] Lin, D., Lay, J. O., Bryant, M. S., Malaveille, C., Fiesen, M., Bartsch, H., Lang, N. P. und Kadlubar, F. F.; „*Analysis of 4-Aminobiphenyl-DNA adducts in human urinary-bladder and lung by alkaline-hydrolysis and negative-ion gas-chromatography mass-spectrometry*“; *Environ. Health Perspect.*; **102** (1994) 11 - 16
- [45] Talaska, G., Al-uburi, A. Z. S. S. und Kadlubar, F. F.; „*Smoking related carcinogen DNA-adducts in biopsy samples of human urinary bladder: Identification of N-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminobiphenyl as a major adduct*“; *PNAS*; **88** (1983) 5350 - 5354
- [46] Magee, P. N. und Barnes, J. M.; „*The production of malignant primary hepatic tumors in the rat by feeding dimethylnitrosamine*“; *Br. J. Cancer*; **10** (1956) 114 - 122
- [47] Groopman, J. D., Donahue, P. R., Zhu, J., Chen, J. und Wogan, G. N.; „*Aflatoxin metabolism in humans: detection of aflatoxin metabolites and nucleic acid adducts in urine by affinity chromatography*“; *PNAS*; **82** (1985) 6492 - 6497
- [48] Guengerich, F. G.; „*Metabolic activation of carcinogens*“; *Pharmacol. Ther.*; **54** (1992) 17 - 61
- [49] Bartsch, H., in: Higginson, J., Muir, C. S. und Munoz, N. E.; „*Human cancer: Epidemiology and environmental causes*“; *Cambridge Univ. Press*; New York; (1992) 189 - 208
- [50] Bishop, J. M.; „*Molecular themes in oncogenesis*“; *Cell*; **64** (1991) 235 - 248
- [51] Davis, D. L., Bradlaw, H. L., Wolff, M., Woodruff, T., Hoel, D. G. und Anton-Culver, H.; „*Medical hypothesis: xenoestrogens as preventable causes of breast cancer*“; *Environ. Health Perspect.*; **101** (1993) 373 - 377
- [52] Frenkel, K.; „*Carcinogen mediated oxidant formation and oxidative DNA damage*“; *Pharmacol. Ther.*; **53** (1992) 127 - 166
- [53] Perera, F. P.; „*Perspectives on the risk assessment for nongenotoxic carcinogens and tumor promoters*“; *Environ. Health Perspect.*; **94** (1991) 231 - 235

- [54] Shaw, I. C. und Jones, H. B.; „*Mechanism of non-genotoxic carcinogenesis*“; TIPS; **15** (1994) 89 - 93
- [55] Wu, L. und Whitlock Jr., J. P.; „*Mechanism of dioxin action: Ah receptor mediated increase in promoter accessibility in-vivo*“; PNAS; **89** (1992) 4811 - 4815
- [56] Bohr, V. A.; „*Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells*“; Free Radic.Biol.Med.; **32** (2002) 804 - 812
- [57] Csordas, A.; „*DNS-Reparatur*“; in: Funktionelle Pathologie: molekulare-zelluläre-systematische Grundlagen; (Eds) Wick, G., Schwarz, S., Förster, O. und Perlik, M.; Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1989) 51 - 71
- [58] Croteau, D. L. und Bohr, V. A.; „*Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells*“; J.Biol.Chem.; **272** (1997) 25409 - 25412
- [59] Flanders, P. H.; „*Notreparatur der DNA*“; in: Krebs-Tumoren Zellen, Gene; Spektrum der Wissenschaft, Reihe verständliche Forschung; **2. Auflage** (1987) 40 - 49
- [60] Gunz, D., Hess, M. T. und Naegeli, H.; „*Recognition of DNA adducts by human nucleotide excision repair. Evidence for a thermodynamic probing mechanism*“; J.Biol.Chem.; **271** (1996) 25089 - 25098
- [61] Hanawalt, P. C.; „*Transcription-coupled repair and human disease*“; Science; **266** (1994) 1957 - 1958
- [62] Wilson III, D. M. und Thompson, L. H.; „*Life without DNA repair*“; PNAS; **94** (1997) 12754 - 12757
- [63] Wood, R. D. et al.; „*DNA damage recognition and nucleotide excision repair in mammalian cells*“; Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.; **65** (2000) 173 - 182
- [64] Lindahl, T., Karan, P. und Wood, R. D.; „*DNA excision repair pathways*“; Curr.Opin.Genet.Dev.; **7** (1997) 158 - 169
- [65] Modrich, P.; „*Strand-specific mismatch repair in mammalian cells*“; J.Biol.Chem.; **272** (1997) 24727 - 24730
- [66] Sancar, A.; „*DNA excision repair*“; Annu.Rev.Biochem.; **65** (1996) 43 - 81
- [67] Vermeulen, W. et al.; „*Mammalian nucleotide excision repair and syndroms*“; Biochem. Soc.Trans.; **25** (1997) 309 - 315
- [68] Wood, R. D.; „*Nucleotide excision repair in mammalian cells*“; J.Biol.Chem.; **272** (1997) 23465 - 23468
- [69] Sauls, R. L. und Ames, B. N.; „*Backgroundlevels of DNA damage in the population*“; in: Mechanisms of DNA damage and repair; (Eds) Simic, M., Grossmann, L. und Upton, A.; Plenum Press, New York (1986) 529 - 535
- [70] Lindahl, T., Sedgwick, B., Sekiguchi, M. und Nakabeppu, Y.; „*Regulation and Expression of the Adaptive Response to Alkylating-Agents*“; Annual Review of Biochemistry; **57** (1988) 133 - 157
- [71] Rüdiger, H. W.; „*Endogene und exogene Determinanten in der Bewertung kanzerogener Risiken*“; Öff.Gesundh.Wes.; **52** (1990) 1 - 4

- [72] De Flora, S. et al.; „DNA adducts and chronic degenerative disease. Pathogenetic relevance and implications in preventive medicine"; Mutat.Res.; **366** (1996) 197 - 238
- [73] Roboz, J.; „Mass Spectrometry in Cancer Research"; CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington D.C. (2002)
- [74] Hemminki, K.; „DNA adducts, mutations and cancer"; Carcinogenesis; **14** (1993) 2007 - 2012
- [75] Loechler, E. L.; „The role of adduct site-specific mutagenesis in understanding how carcinogen-DNA adducts cause mutations: perspective, prospects and problems"; Carcinogenesis; **17** (1996) 895 - 902
- [76] Greenblatt, M. S., Bennett, W. P., Hollstein, M. und Harris, C. C.; „Mutations in the p53 tumor-suppressor gene - clues to cancer etiology and molecular pathogenesis"; Mut.Res.; **54** (1994) 4855 - 4878
- [77] Ruggeri, B., DiRado, M., Zhang, S. Y., Bauer, B., Goodrow, T. und Klein-Szanto, A. J. P.; „Benzo[a]pyrene-induced murine skin tumors exhibit frequent and characteristic G-to-T mutations in the p53 gene"; PNAS; **90** (1991) 1013 - 1017
- [78] Ross, J. A. und Nesnow, S.; „Polycyclic aromatic hydrocarbons - correlations between DNA-adducts and ras oncogene mutations"; Mut.Res.; **424** (1999) 155 - 166
- [79] Otteneeder, M. und Lutz, W. K.; „Correlation of DNA adduct levels with tumor incidence: carcinogenic potency of DNA adducts"; Mutat.Res.; **424** (1999) 237 - 247
- [80] Smela, M. E., Currier, S. S., Bailey, E. A. und Essigmann, J. M.; „The chemistry and biology of Aflatoxin B1: from mutational spectrometry to carcinogenesis"; Carcinogenesis; **22** (2001) 535 - 545
- [81] Vousden, K. H., Bos, J. L., Marshall, C. J. und Phillips, D. H.; „Mutations activating human c-Ha-ras 1 protooncogene (HRAS1) induced by chemical carcinogens and depurination"; PNAS; **83** (1986) 1222 - 1226
- [82] Denissenko, M. F., Pao, A., Tang, M. und Pfeifer, G. P.; „Preferential Formation of Benzo[a]pyrene Adducts at Lung Cancer Mutational Hotspots in P53"; Science; **274** (1996) 430 - 432
- [83] Baird, W. M. und Ralston, S. L.; „Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons"; in: Comprehensive Toxicology; (Eds) Sipes, I. G., McQueen, C. A. und Gandolfi, A. J.; Cambridge University Press, Cambridge, UK; **12** (1997) 171 - 200
- [84] Dipple, A.; „Reactions of polycyclic aromatic hydrocarbons with DNA"; in: DNA adducts: Identification and biological significance; (Eds) Hemminki, K., Dipple, A., Shuker, D. E. G., Kadlubar, F. F., Segerback, D. und Bartsch, H.; IARC Publications 125, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France (1994) 107 - 129
- [85] King, H. W. S., Osborne, M. R. und Brookes, P.; „The in vitro and in vivo reaction at the N-7 position of guanine of the ultimate carcinogen derived from benzo[a]pyrene"; Chem.Biol.Interact.; **24** (1979) 345 - 353
- [86] Melendez-Colon, V. J., Luch, A., Seidel, A. und Baird, W. M.; „Formation of stable DNA adducts and apurinic sites upon metabolic activation of bay and fjord region polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell cultures"; Chem.Res.Toxicol.; **13** (2000) 10 - 17

- [87] Hecht, S. S.; „*Tobacco Smoke Carcinogens and Lung Cancer*“; Journal of the National Cancer Institute; **91** (1999) 1194 - 1210
- [88] Hecht, S. S.; „*Carcinogen biomarkers for lung or oral cancer chemoprevention trials*“; in: Biomarkers in Cancer Chemoprevention; (Eds) Miller, A. B., Bartsch, H., Bofetta, P., Dragsted, L. und Vainio, H.; IARC Sci.Publ., **no. 154**, IARC, Lyon (2001) 245 - 255
- [89] Godschalk, R. W., Van Schooten, F. J. und Bartsch, H.; „*A critical evaluation of DNA adducts as biological markers for human exposure to polycyclic aromatic compounds*“; J.Biochem.Mol.Biol.; **36** (2003) 1 - 11
- [90] Vineis, P. und Caporaso, N.; „*Tobacco and cancer: Epidemiology and the laboratory*“; Environ.Health Perspect.; **103** (1995) 156 - 160
- [91] Alexandrov, K., Rojas, M., Geneste, O., Castegnaro, M., Camus, A.-M., Petruzzelli, S., Giuntini, C. und Bartsch, H.; „*An improved fluorometric assay for dosimetry of benzo[a]pyrene diol-epoxide-DNA adducts in smokers' lung: comparisons with total bulky adducts and aryl hydrocarbon hydroxylase activity*“; Cancer Res.; **52** (1992) 6248 - 6253
- [92] Rojas, M. et al.; „*High benzo[a]pyrene diol-epoxide DNA adduct levels in lung and blood cells from individuals with combined CYP1A1 MspI/MspI-GSTM1*0/*0 genotypes*“; Pharmacogenetics; **8** (1998) 109 - 118
- [93] Rojas, M., Cascorbi, I., Alexandrov, K., Kriek, E., Auburtin, G., Mayer, L., Koop-Schneider, A., Roots, I. und Bartsch, H.; „*Modulation of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adduct levels human white blood cells by CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 polymorphism*“; Cancerogenesis; **21** (2000) 35 - 41
- [94] Rojas, M., Alexandrov, K., Auburtin, G., Wastiaux-Denamur, A., Mayer, L., Mahieu, B., Sebastien, P. und Bartsch, H.; „*Anti-benzo[a]pyrene diolepoxide-DNA adduct levels in peripheral mononuclear cells from coke oven workers and the enhancing effect of smoking*“; Cancerogenesis; **16** (1995) 1373 - 1376
- [95] Alexandrov, K., Cascorbi, I., Rojas, M., Bouvier, G., Kriek, E. und Bartsch, H.; „*CYP1A1 and GSTM1 genotypes affect benzo[a]pyrene DNA adducts in smokers lung: comparison with aromatic/hydrophobic adduct formation*“; Carcinogenesis; **23** (2002) 1969 - 1977
- [96] Izzotti, A., Rossi, G. A., Bagnasco, M. und De Flora, S.; „*Benzo[a]pyrene diolepoxide-DNA adducts in alveolar macrophages of smokers*“; Carcinogenesis; **12** (1991) 1281 - 1285
- [97] Nowak, D., Schmidt-Preuss, U., Jorres, R., Liebke, F. und Rüdiger, H. W.; „*Formation of adducts and water-soluble metabolites of B(a)P in human monocytes is genetically controlled*“; Int.J.Cancer; **41** (1988) 169 - 173
- [98] Nowak, D., Meyer, A., Schmidt-Preuss, U., Gatzemeier, U., Magnussen, H. und Rüdiger, H. W.; „*Formation of benzo[a]pyrene-DNA adducts in blood monocytes from lung cancer patients with a familial history of lung cancer*“; J.Cancer Res.Clin.Oncol.; **118** (1992) 67 - 71
- [99] Paleologo, M., Van Schooten, F. J., Pavanello, S., Kriek, E., Zordan, M., Clonfero, E., Bezze, C. und Levis, A. G.; „*Detection of benzo(a)pyrene-diol-epoxide-DNA adducts in white blood cells of psoriatic patients treated with coal tar*“; Mutat.Res.; **281** (1992) 11 - 16
- [100] Ross, J. A., Nelson, G., Kliegerman, A., Erexson, G., Bryant, M., Earley, K., Gupta, R. und Nesnow, S.; „*Formation and persistence of novel B(a)P adducts in rat lung, liver, and peripheral blood lymphocyte DNA*“; Caner Res.; **50** (1990) 5088 - 5094

- [101] Chen, L., Devanesan, P. D., Higginbotham, S., Ariese, F., Jankowiak, R., Small, G. J., Rogan, E. G. und Cavalieri, E. L.; „*Expanded analysis of benzo[a]pyrene-DNA adducts formed in vitro and in mouse skin: their significance in tumor initiation*“; Chem.Res.Toxicol.; **9** (1996) 897 - 903
- [102] Helbock, H. J., Beckman, K. B., Shigenaga M.K., Walter, P. B., Woodall, A. A., Yeo, H. C. und Ames, B. N.; „*DNA oxidation matters - The HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine*“; PNAS; **95** (1998) 288 - 293
- [103] Marnett, L. J.; „*Oxyradicals and DNA damage*“; Carcinogenesis; **21** (2000) 361 - 370
- [104] Burcham, P. C.; „*Internal hazards - base-line DNA-damage by endogenous products of normal metabolism*“; Mut.Res.; **443** (1999) 11 - 36
- [105] Beckman, K. B. und Ames, B. N.; „*The free-radical theory of aging matures*“; Physiol.Rev.; **78** (1998) 547 - 581
- [106] Pogribny, I. P., Muskhelishvili, L., Miller, B. J. und James, S. J.; „*Presence and consequence of uracil in preneoplastic DNA from folate/methyl-deficient rats*“; Carcinogenesis; **18** (1997) 2071 - 2076
- [107] Purmal, A. A., Lampman, G. W., Bond, J. P., Hatahet, Z. und Wallace, S. S.; „*Enzymatic processing of uracil glycol, a major oxidative product of DNA cytosine*“; J.Biol.Chem.; **273** (1998) 10026 - 10035
- [108] Wiseman, H. und Halliwell, B.; „*Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer*“; Biochem.J.; **313 (Pt 1)** (1996) 17 - 29
- [109] Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M. und Lunec, J.; „*Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease*“; Faseb Journal; **17** (2003) 1195 - 1214
- [110] Ames, B. N. und Shigenaga, M. K.; „*DNA and Free Radicals*“; Ellis Horwood, New York; (1994) 1 - 15
- [111] Bohr, V. A., Stevnsner, T. und Souza-Pinto, N. C.; „*Mitochondrial DNA repair of oxidative damage in mammalian cells*“; Gene; **286** (2002) 127 - 134
- [112] Halliwell, B. und Cuttidge, J. M. C.; „*Free Radicals in Biology and Medicine*“; Oxford Univ.Press, Oxford (1999)
- [113] Blair, I. A.; „*Lipid hydroperoxide-mediated DNA damage*“; Experimental Gerontology; **36** (2001) 1473 - 1481
- [114] Marnett, L. J.; „*Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage*“; Toxicology; **181-182** (2002) 219 - 222
- [115] Beckman, K. B. und Ames, B. N.; „*Oxidative decay of DNA*“; Journal of Biological Chemistry; **272** (1997) 19633 - 19636
- [116] Poulsen, H. E., Prieme, H. und Loft, S.; „*Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion*“; European Journal of Cancer Prevention; **7** (1998) 9 - 16
- [117] Stadtman, E. R. und Berlett, B. S.; „*Reactive Oxygen-Mediated Protein Oxidation in Aging and Disease*“; Chem.Res.Toxicol.; **10** (1997) 485 - 494

- [118] Reddy, M. V.; „*Methods for Testing Compounds for DNA Adduct Formation*“; Regulatory Toxicology and Pharmacology; **32** (2000) 256 - 263
- [119] Montesano, R.; „*Approaches to detecting individual exposure to carcinogens*“; in: Complex mixtures and cancer risk; IARC Sci.Publ., IARC, Lyon; **104** (1990) 11 - 19
- [120] Perera, F. P.; „*The significance of DNA and protein adducts in human biomonitoring studies*“; Mut.Res.; **250** (1988) 255 - 269
- [121] Schmeiser, H. H.; „*Molekularer Mechanismus der Krebsentstehung durch den Pflanzeninhaltsstoff Aristolochiasäure*“; Habilitationsschrift, Fakultät für Pharmazie der Ruperto-Carola-Universität zu Heidelberg (1995)
- [122] Talaska, G., Dooley, K. L. und Kadlubar, F.; „*Detection and characterization of carcinogen-DNA adducts in exfoliated urothelial cells from 4-aminobiphenyl-treated dogs by ³²P-postlabelling and subsequent thin-layer and high-pressure liquid chromatography*“; Carcinogenesis; **11** (1990) 639 - 646
- [123] Foiles, P. G., Akerkar, S. A., Carmella, S. G., Kagan, M., Stoner, G. D., Resau, J. H. und Hecht, S. S.; „*Mass spectrometric analysis of tobacco-specific nitrosamine-DNA adducts in smokers and nonsmokers*“; Chem.Res.Toxicol.; **4** (1991) 364 - 368
- [124] Friesen, M. D., Kaderlik, K., Lin, D., Garren, L., Bartsch, H., Lang, N. P. und Kadlubar, F. F.; „*Analysis of DNA adducts of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol[4,5-b]pyridine in rat and human tissues by alkaline hydrolysis and gas chromatography/electron capture mass spectrometry: validation by comparison with ³²P-postlabeling*“; Chem.Res.Toxicol.; **7** (1994) 733 - 739
- [125] Schutze, D., Sagelsdorff, P., Sepai, O. und Sabbioni, G.; „*Synthesis and quantification of DNA adducts of 4,4'-methylenedianiline*“; Chem.Res.Toxicol.; **9** (1996) 1103 - 1112
- [126] Shuker, D. E. G. und Farmer, P. B.; „*Relevance of urinary DNA adducts as markers of carcinogen exposure*“; Chem.Res.Toxicol.; **5** (1992) 450 - 460
- [127] Autrup, H., Wakhisi, J., Vahakangas, K., Wasunna, A. und Harris, C. C.; „*Detection of 8,9-dihydro-(7'-guanyl)-9-hydroxyafatoxin B1 in human urine*“; Environ.Health Perspect.; **62** (1985) 105 - 108
- [128] Weston, A. et al.; „*The application of immunoassays and fluorometry to the detection of polycyclic hydrocarbon-macromolecular adducts and anti-adduct antibodies in humans*“; Int.Arch.Occup.Environ.Health; **60** (1988) 157 - 162
- [129] Weston, A., Rowe, M. L., Manchester, D. K., Farmer, P. B., Mann, D. L. und Harris, C. C.; „*Fluorescence and mass spectralevidence for the formation of benzo[a]pyrene anti-diol-epoxide-DNA and -hemoglobin adducts in humans*“; Carcinogenesis; **10** (1989) 251 - 257
- [130] Halliwell, B. und Dizdaroglu, M.; „*The measurement of oxidative damage to DNA by HPLC and GC/MS techniques*“; Free Radic.Res.Comm.; **16** (1992) 75 - 87
- [131] Jankowiak, R. und Small, G. J.; „*Fluorescence line narrowing: A high resolution window on DNA and protein damage from chemical carcinogens*“; Chem.Res.Toxicol.; **4** (1991) 256 - 269
- [132] Jankowiak, R., Zamzow, D., Ding, W. und Small, G. J.; „*Capillary electrophoresis-fluorescence line-narrowing system for on-line structural characterization of molecular analytes*“; Anal.Chem.; **68** (1996) 2549 - 2553

- [133] Jankowiak, R., Zamzow, D., Stack, D. E., Todorovic, R., Cavalieri, E. L. und Small, G. J.; „Spectral Characterization of Florescently Labeld Catechol Estrogen 3,4-Quinone-Derives N7 Guanine Adducts and Their Identification in Rat Mammary Gland Tissue“; Chem.Res.Toxicol.; **11** (1998) 1139 - 1145
- [134] Roberts, K. P., Lin, C.-H., Jankowiak, R. und Small, G. J.; „On-line identification of diastereomeric dibenzo[a,l]pyrene diol epoxide-derived deoxyadenosine adducts by capillary electrophoresis-fluorescence line-narrowing and non-line narrowing spectroscopy“; J.Chromatogr.; A; **853** (1999) 159 - 170
- [135] Sanders, M. J., Cooper, R. S., Jankowiak, R. und Small, G. J.; „Identification of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites and DNA adducts in mixtures using fluorescence line narrowing spectrometry“; Anal.Chem.; **58** (1986) 816 - 820
- [136] Zamzow, D., Lin, C.-H., Small, G. J. und Jankowiak, R.; „Application of capillary electrophoresis-fluorescence line-narrowing spectroscopy for on-line spectral characterization of closely related analytes“; J.Chromatogr.; A; **781** (1997) 73 - 80
- [137] Creek, M. R., Frantz, C. E., Fultz, E., Haack, K., Redwine, K., Shen, N., Turteltaub, K. W. und Vogel, J. S.; „C-14 AMS quantification of biomolecular interactions using microbore and plate separations“; Nucl.Instrum.Meth.Phys.Res.; B; **92** (1994) 454 - 458
- [138] Turteltaub, K. W., Vogel, J. S., Frantz, C., Felton, J. S. und McManus, M.; „Assessment of the DNA adduction and pharmacokinetics of PhIP and MeIQx in rodents at doses approximating human exposure using the technique of accelerator mass spectrometry (AMS) and 32P-postlabeling“; Princess Takamatsu Symp.; **23** (1995) 93 - 102
- [139] Vogel, J. S., Turteltaub, K. W., Felton, J. S., Gledhill, B. L., Nelson, D. E., Southon, J. R., Proctor, I. D. und Davis, J. C.; „Application of AMS to the biomedical sciences“; Nucl.Instrum.Meth.Phys.Res.; B; **52** (1990) 524 - 530
- [140] Vogel, J. S. und Turteltaub, K. W.; „Biomolecular tracing through accelerator mass spectrometry“; Trends Anal.Chem.; **11** (1992) 142 - 149
- [141] Divi, R. L., Osborne, M. R., Hewer, A., Phillips, D. H. und Poirier, M. C.; „Tamoxifen-DNA adduct formation in rat liver determined by immunoassay and 32P-postlabeling“; Cancer Res.; **59** (1999) 4829 - 4833
- [142] Poirier, M. C.; „Development of immunoassays for the detection of carcinogen-DNA adducts“; Molecular dosimetry and human cancer, CRC Press, Boca Raton; (1991) 211 - 229
- [143] Poirier, M. C. und Weston, A.; „DNA adduct determination in humans“; New horizons in biological dosimetry, Wiley-Liss Inc.New York; (1991) 205 - 218
- [144] Poirier, M. C.; „Antisera specific for carcinogen-DNA adducts and carcinogen-modified DNA: applications for detection of xenobiotics in biological samples“; Mutat.Res.; **288** (1993) 31 - 38
- [145] Santella, R. M.; „Immunological messets of detection of carcinogene-DNA damage in humans“; Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.; **8** (1999) 733 - 739
- [146] Weston, A. und Poirier, M. C.; „Development of methods for chemical carcinogen-DNA adduct determination in human tissue“; in: Handbook of carcinogen testing; (Eds) Milman, H. A. und Weisburger, E. K.; Noyes Publications Park Ridge, NJ; **2. Auflage** (1994) 672 - 700

- [147] Gupta, R. C., Reddy, M. V. und Randerath, K.; „*32P*-postlabelling analysis of non-radioactive aromatic carcinogen-DNA adducts“; *Carcinogenesis*; **3** (1982) 1081 - 1092
- [148] Gupta, R. C.; „*Enhanced sensitivity of 32P*-postlabeling analysis of aromatic carcinogen-DNA adducts“; *Cancer Res.*; **35** (1985) 5656 - 5662
- [149] Phillips, D. H.; „*Detection of DNA modifications by the 32P*-postlabelling assay“; *Mut.Res.*; **378** (1997) 1 - 12
- [150] Phillips, D. H. und Castegnaro, M.; „*Standardization and validation of DNA adduct postlabeling methods - report of interlaboratory trials and production of recommended protocols*“; *Mutagenesis*; **14** (1999) 301 - 315
- [151] Randerath, K., Reddy, M. V. und Gupta, R. C.; „*32P*-labelling test for DNA damage“; *PNAS*; **78** (1981) 6126 - 6129
- [152] Randerath, K. und Randerath, E.; „*P-32 postlabeling methods for DNA adduct detection - overview and critical-evaluation*“; *Drug Metab.Rev.*; **26** (1994) 67 - 85
- [153] Reddy, M. V., Gupta, R. C., Randerath, E. und Randerath, K.; „*32P*-postlabeling test for covalent DNA binding of chemicals in vivo“; *Carcinogenesis*; **5** (1984) 231 - 243
- [154] Reddy, M. V. und Randerath, K.; „*Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of 32P*-postlabeling test for structurally diverse DNA adducts“; *Carcinogenesis*; **14** (1986) 1543 - 1551
- [155] Schmitz, O. und Richter, E.; „*Capillary zone electrophoresis with on-line blotting for separation and detection of 32P*-postlabeled DNA-Adducts“; *Biomarkers*; **5** (4) (2000) 314 - 321
- [156] Divi, R. L. et al.; „*Highly sensitive chemiluminescence immunoassay for benzo[a]pyrene-DNA adducts: validation by comparison with other methods, and use in human biomonitoring*“; *Carcinogenesis*; **23** (2002) 2043 - 2049
- [157] Wörth, C. C. T.; „*Entwicklung eines Nachweis-Verfahrens für DNA-Addukte basierend auf Fluoreszenzderivatisierung und kapillarelektrophoretischer Trennung*“; Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg (2000)
- [158] Wirtz, M.; „*Optimierung einer Analysenmethode zur Bestimmung von DNA-Addukten*“; Diplomarbeit, Bergische Universität Wuppertal, Analytische Chemie (2002)
- [159] Poirier, M. C. und Weston, A.; „*Human DNA adduct measurements: state of the art*“; *Environ.Heath Perspect.*; **104** Suppl. 5 (1996) 883 - 893
- [160] Poirier, M. C.; „*DNA adducts as exposure biomarkers and indicators of cancer risk*“; *Environ.Health Perspect.*; **105** Suppl. 4 (1997) 907 - 912
- [161] Phillips, D. H., Farmer, P. B., Beland, F. A., Nath, R. G., Poirier, M. C., Reddy, M. V. und Turteltaub, K. W.; „*Methods of DNA adduct determination and their application to testing compounds for genotoxicity*“; *Environ.Mol.Mut.*; **35** (2000) 222 - 233
- [162] Esteller, M. und Herman, J. G.; „*Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours*“; *J.Pathol.*; **196** (2002) 1 - 7
- [163] Jones, P. A. und Laird, P. W.; „*Cancer epigenetics comes of age*“; *Nature Genet.*; **21** (1999) 163 - 167

- [164] Esteller, M.; „*Profiling aberrant DNA methylation in hematologic neoplasms: a view from the tip of the iceberg*“; *Clinical Immunology*; **109** (2003) 80 - 88
- [165] Robertson, K. D. und Jones, P. A.; „*DNA methylation: past, present and future directions*“; *Carcinogenesis*; **21** (2000) 461 - 467
- [166] Rush, L. J. und Plass, C.; „*Alterations of DNA methylation in hematologic malignancies*“; *Cancer Letters*; **185** (2002) 1 - 12
- [167] Teitell, M. und Richardson, B.; „*DNA methylation in the immune system*“; *Clinical Immunology*; **109** (2003) 2 - 5
- [168] Doerfler, W.; „*DNA methylation - a regulatory signal in eucaryotic gene expression*“; *J.gen.Virol*; **57** (1981) 1 - 20
- [169] Doerfler, W.; „*DNA Methylation and Gene Activity*“; *Ann.Rev.Biochem.*; **52** (1983) 93 - 124
- [170] Riggs, A. D. und Jones, P. A.; „*5-Methylcytosine, Gene Regulation, and Cancer*“; *Advances in Cancer Research*; **40** (1983) 1 - 30
- [171] Rein, T., DePamphilis, M. L. und Zorbas, H.; „*Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes*“; *Nucl.Acids Res.*; **26** (1998) 2255 - 2264
- [172] Remus, R.; „*Verteilung der fünften DNA-Base 5-Methyl-Desoxycytidin im Säuger genom: DNA-Methylierungsmuster endogener retroviraler Sequenzen des Syrischen Hamsters (*Mescocricetus auratus*) und in den Promotoren menschlicher Erythrozytenmembranskelettproteine (*Homo sapiens*)*“; Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität zu Köln (2000)
- [173] Zingg, J. M. und Jones, P. A.; „*Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis*“; *Carcinogenesis*; **18** (1997) 869 - 882
- [174] Bestor, T. H.; „*The DNA methyltransferases of mammals*“; *Hum.Mol.Genet.*; **9** (2000) 2395 - 2402
- [175] Okano, M., Xie, S. und Li, E.; „*Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases*“; *Nat.Genet.*; **19** (1998) 219 - 220
- [176] Rhee, I. et al.; „*DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells*“; *Nature*; **416** (2002) 552 - 556
- [177] Li, E., Bestor, T. H. und Jaenisch, R.; „*Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality*“; *Cell*; **69** (1992) 915 - 926
- [178] Gama Sosa, M. A., Midgett, R. M., Slagel, V. A., Githens, S., Kuo, K. C., Gehrke, C. W. und Ehrlich, M.; „*Tissue-specific differences in DNA methylation in various mammals*“; *Biochim.Biophys.Acta*; **740** (1990) 212 - 219
- [179] Kochanek, S., Toth, M., Dehmel, A., Renz, D. und Doerfler, W.; „*Interindividual concordance of methylation profiles in human genes for tumor-necrosis-factor-alpha and factor-beta*“; *PNAS*; **87** (1990) 8830 - 8834
- [180] Zingg, J. M., Pedraza Alva, G. und Jost, J. P.; „*Myod1 promoter autoregulation is mediated by 2 proximal E-boxes*“; *Nucl.Acids Res.*; **22** (1994) 2234 - 2241

- [181] Craig, J. M. und Bickmore, W. A.; „*The distribution of CpG islands in mammalian chromosomes*“; *Nat.Genet.*; **7** (1994) 376 - 382
- [182] Antequera, F. und Bird, A.; „*CpG islands as genomic footprints of promoters that are associated with replication origins*“; *Current Biology*; **9** (1999) R661 - R667
- [183] Attwood, J. T., Yung, R. L. und Richardson, B. C.; „*DNA methylation and the regulation of gene transcription*“; *Cell Mol.Life Sci.*; **59** (2002) 241 - 257
- [184] Brandeis, M., Frank, D., Keshet, I., Siegfried, Z., Mendelsohn, M., Nemes, A., Temper, V., Razin, A. und Cedar, H.; „*Sp1 Elements Protect A CpG Island from De-Novo Methylation*“; *Nature*; **371** (1994) 435 - 438
- [185] Melki, J. R., Vincent, P. C. und Clark, S. J.; „*Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia*“; *Cancer Research*; **59** (1999) 3730 - 3740
- [186] Keshet, I., Lieman-Hurwitz, J. und Cedar, H.; „*DNA Methylation Affects the Formation of Active Chromatin*“; *Cell*; **44** (1986) 535 - 543
- [187] Bariol, C., Suter, C., Cheong, K., Ku, S. L., Meagher, A., Hawkins, N. und Ward, R.; „*The relationship between hypomethylation and CpG island methylation in colorectal neoplasia*“; *Am.J.Pathol.*; **162** (2003) 1361 - 1371
- [188] Paz, M. F., Avila, S., Fraga, M. F., Pollan, M., Capella, G., Peinado, M. A., Sanchez-Cespedes, M., Herman, J. G. und Esteller, M.; „*Germ-Line Variants in Methyl-Group Metabolism Genes and Susceptibility to DNA Methylation in Normal Tissues and Human Primary Tumors*“; *Cancer Research*; **62** (2002) 4519 - 4524
- [189] Counts, J. L. und Goodman, J. I.; „*Hypomethylation of DNA - a nongenotoxic mechanism involved in tumor promotion*“; *Toxicol.Lett.*; **82/83** (1995) 663 - 672
- [190] Robertson, K. D.; „*DNA methylation, methyltransferases, and cancer*“; *Oncogene*; **20** (2001) 3139 - 3155
- [191] Karpf, A. R., Moore, B. C., Ririe, T. O. und Jones, D. A.; „*Activation of the p53 DNA damage response pathway after inhibition of DNA methyltransferase by 5-aza-2'-deoxycytidine*“; *Mol.Pharmacol.*; **59** (2001) 751 - 757
- [192] Baylin, S. B. und Herman, J. G.; „*DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics*“; *Trends Genet.*; **16** (2000) 168 - 174
- [193] Paz, M. F., Fraga, M. F., Avila, S., Guo, M. Z., Pollan, M., Herman, J. G. und Esteller, M.; „*A Systematic Profile of DNA Methylation in Human Cancer Cell Lines*“; *Cancer Research*; **63** (2003) 1114 - 1121
- [194] Pogribny, I. P., Pogribna, M., Christman, J. K. und James, S. J.; „*Single-Site Methylation within the p53 Promoter Region Reduces Gene Expression in a Reporter Gene Construct: Possible in Vivo Relevance during Tumorigenesis*“; *Cancer Research*; **60** (2000) 588 - 594
- [195] Cravo, M., Pinto, R., Fidalgo, P., Chaves, P., Gloria, L., NobreLeitao, C. und Mira, F. C.; „*Global DNA hypomethylation occurs in the early stages of intestinal type gastric carcinoma*“; *Gut*; **39** (1996) 434 - 438
- [196] Vogelstein, B. et al.; „*Genetic alterations during colorectal-tumor development*“; *New Engl.J.Med.*; **319** (1988) 525 - 532

- [197] Feinberg, A. P., Gehrke, C. W., Kuo, K. C. und Ehrlich, M.; „*Reduced Genomic 5-Methylcytosine Content in Human Colonic Neoplasia*“; *Cancer Research*; **48** (1988) 1159 - 1161
- [198] Cravo, M., Fidalgo, P., Pereira, A. D., Gouveia-Oliveira, A., Chaves, P. und Selhub, J.; „*DNA methylation as an intermediate biomarker in colorectal cancer: modulation by folic acid supplementation*“; *Eur J Cancer Prev*; **3** (1994) 473 - 479
- [199] Lin, C.-H., Hsieh, S.-Y., Sheen, I.-S., Lee, W.-C., Chen, T.-C. und Shyu, W.-C. u. L. Y.-F.; „*Genome-wide hypomethylation in hepatocellular carcinogenesis*“; *Cancer Research*; **61** (2001) 4238 - 4243
- [200] Santourlidis, S., Flori, A., Ackermann, R., Wirtz, H. C. und Schulz, W. A.; „*High frequency of alterations in DNA methylation in adenocarcinoma of the prostate*“; *Prostate*; **39** (1999) 166 - 174
- [201] Wahlfors, J., Hiltunen, H., Heinonen, K., Hamalainen, E., Alhonen, L. und Janne, J.; „*Genomic Hypomethylation in Human Chronic Lymphocytic-Leukemia*“; *Blood*; **80** (1992) 2074 - 2080
- [202] Ehrlich, M.; „*DNA hypomethylation and cancer*“; in: *DNA Alterations in Cancer: Genetic and Epigenetic Changes*; (Ed) Ehrlich, M.; Eaton Natick (2000) 273 - 291
- [203] Esteller, M. et al.; „*DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis*“; *Hum.Mol.Genet.*; **10** (2001) 3001 - 3007
- [204] Chen, R. Z., Pettersson, U., Beard, C., Jackson-Grusby, L. und Jaenisch, R.; „*DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates*“; *Nature*; **395** (1998) 89 - 93
- [205] Gaudet, F., Hodgson, J. G., Eden, A., Jackson-Grusby, L., Dausman, J., Gray, J. W., Leonhardt, H. und Jaenisch, R.; „*Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation*“; *Science*; **300** (2003) 489 - 492
- [206] Gama-Sosa, M. A., Slagel, V. A., Trewyn, R. W., Oxenhandler, R., Kuo, K. C., Gehrke, W. und Ehrlich, M.; „*The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors*“; *Nucleic Acids Research*; **11** (1983) 6883 - 6894
- [207] Kim, Y. I., Giuliano, A., Hatch, K. D., Schneider, A., Nour, M. A., Dallal, G. E., Selhub, J. und Mason, J. B.; „*Global Dna Hypomethylation Increases Progressively in Cervical Dysplasia and Carcinoma*“; *Cancer*; **74** (1994) 893 - 899
- [208] Narayan, A., Ji, W. Z., Zhang, X. Y., Marrogi, A., Graff, J. R., Baylin, S. B. und Ehrlich, M.; „*Hypomethylation of pericentromeric DNA in breast adenocarcinomas*“; *International Journal of Cancer*; **77** (1998) 833 - 838
- [209] Qu, G. Z., Dubeau, L., Narayan, A., Yu, M. C. und Ehrlich, M.; „*Satellite DNA hypomethylation vs. overall genomic hypomethylation in ovarian epithelial tumors of different malignant potential*“; *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*; **423** (1999) 91 - 101
- [210] Soares, J., Pinto, A. E., Cunha, C. V., Andre, S., Barao, I., Sousa, J. M. und Cravo, M.; „*Global DNA hypomethylation in breast carcinoma - Correlation with prognostic factors and tumor progression*“; *Cancer*; **85** (1999) 112 - 118
- [211] Costello, J. F. und Plass, C.; „*Methylation matters*“; *Journal of Medical Genetics*; **38** (2001) 285 - 303

- [212] Lyko, F., Stach, D., Brenner, A., Stilgenbauer, S., Dohner, H., Wirtz, M., Wiessler, M. und Schmitz, O. J.; „*Quantitative analysis of DNA methylation in chronic lymphocytic leukemia patients*“; *Electrophoresis*; **25** (2004) 1530 - 1535
- [213] Melki, J. R., Warnecke, P., Vincent, P. C. und Clark, S. J.; „*Increased DNA methyltransferase expression in leukaemia*“; *Leukemia*; **12** (1998) 311 - 316
- [214] El-Deiry, W. S., Nelkin, B. D., Celano, P., Yen, R. W., Falco, J. P., Hamilton, S. R. und Baylin, S. B.; „*High expression of methyltransferase gene characterizes human neoplastic cells and progression stages of colon cancer*“; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*; **88** (1991) 3470 - 3474
- [215] Belinsky, S. A., Nikula, K. J., Baylin, S. B. und Issa, J. P.; „*Increased cytosine DNA-methyltransferase activity is targeted-cell-specific and an early event in lung cancer*“; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*; **93** (1996) 4045 - 4050
- [216] Issa, J. P., Vertino, P. M., Wu, J., Sazawal, S., Celano, P., Nelkin, B. D., Hamilton, S. R. und Baylin, S. B.; „*Increased cytosine DNA-methyltransferase activity during colon cancer progression*“; *J.Natl.Cancer Inst.*; **85** (1993) 1235 - 1240
- [217] Issa, J. P., Baylin, S. B. und Herman, J. G.; „*DNA methylation changes in hematologic malignancies: Biologic and clinical implications*“; *Leukemia*; **11** (1997) S7 - S11
- [218] Mizuno, S., Chijiwa, T., Okamura, T., Akashi, K., Fukumaki, Y., Niho, Y. und Sasaki, H.; „*Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia*“; *Blood*; **97** (2001) 1172 - 1179
- [219] Feinberg, A. P. und Vogelstein, B.; „*Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts*“; *Nature*; **301** (1983) 89 - 92
- [220] Clark, S. J., Harrison, J., Paul, C. L. und Frommer, M.; „*High-Sensitivity Mapping of Methylated Cytosines*“; *Nucleic Acids Research*; **22** (1994) 2990 - 2997
- [221] Fritzsche, E., Hayatsu, H., Igloi, G. L., Iida, S. und Kossel, H.; „*The use of permanganate as a sequencing reagent for identification of 5-methylcytosine residues in DNA*“; *Nucl.Acids Res.*; **15** (1987) 5517 - 5528
- [222] Frommer, M., McDonald, L. E., Millar, D. S., Collis, C. M., Watt, F., Grigg, G. W., Molloy, P. L. und Paul, C. L.; „*A Genomic Sequencing Protocol That Yields A Positive Display of 5-Methylcytosine Residues in Individual Dna Strands*“; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; **89** (1992) 1827 - 1831
- [223] Maxam, A. M. und Gilbert, W.; „*Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages*“; *Methods Enzymol.*; **65** (1980) 499 - 560
- [224] Pfeifer, G. P., Steigerwald, S. D., Mueller, P. R., Wold, B. und Riggs, A. D.; „*Genomic sequencing and methylation analysis by ligation mediated PCR*“; *Science*; **246** (1989) 810 - 813
- [225] Herman, J. G., Graff, J. R., Myohanen, S., Nelkin, B. D. und Baylin, S. B.; „*Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands*“; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; **93** (1996) 9821 - 9826
- [226] Esteller, M., Corn, P. G., Baylin, S. B. und Herman, J. G.; „*A gene hypermethylation profile of human cancer*“; *Cancer Research*; **61** (2001) 3225 - 3229

- [227] Galm, O., Rountree, M. R., Bachman, K. E., Jair, K. W., Baylin, S. B. und Herman, J. G.; „*Enzymatic regional methylation assay: a novel method to quantify regional CpG methylation density*“; *Genome Res.*; **12** (2002) 153 - 157
- [228] Xiong, Z. und Laird, P. W.; „*COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay*“; *Nucl.Acids Res.*; **25** (1997) 2532 - 2534
- [229] Sadri, R. und Hornsby, P. J.; „*Rapid analysis of DNA methylation using new restriction enzyme sites created by bisulfite modification*“; *Nucleic Acids Res.*; **24** (1996) 5058 - 5059
- [230] Gonzalzo, M. L. und Jones, P. A.; „*Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE)*“; *Nucl.Acids Res.*; **25** (1997) 2529 - 2531
- [231] Heiskanen, M., Syvanen, A. C., Siitari, H., Laine, S. und Palotie, A.; „*A novel method to quantitate methylation of specific genomic regions*“; *PCR Methods Appl.*; **4** (1994) 26 - 30
- [232] Eads, C. A., Danenberg, K. D., Kawakami, K., Saltz, L. B., Blake, C., Shibata, D., Danenberg, P. V. und Laird, P. W.; „*MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation*“; *Nucl.Acids Res.*; **28** (2000) E32
- [233] Suzuki, H., Itoh, F., Toyota, M., Kikuchi, T., Kakiuchi, H., Hinoda, Y. und Imai, K.; „*Quantitative DNA methylation analysis by fluorescent polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism using an automated DNA sequencer*“; *Electrophoresis*; **21** (2000) 904
- [234] Walz, T., Geisel, J., Bodis, M., Knapp, J. P. und Herrmann, W.; „*Fluorescence-based single-strand conformation polymorphism analysis of mutations by capillary electrophoresis*“; *Electrophoresis*; **21** (2000) 375 - 379
- [235] Yamamoto, T., Nagasaka, T., Notohara, K., Sasamoto, H., Murakami, J., Tanaka, N. und Matsubara, N.; „*Methylation assay by nucleotide incorporation: a quantitative assay for regional CpG methylation density*“; *BioTechniques*; **36** (2004) 846 - 854
- [236] Baumer, A., Wiedemann, U., Hergersberg, M. und Schinzel, A.; „*A novel MSP/DHPLC method for the investigation of the methylation status of imprinted genes enables the molecular detection of low cell mosaicisms*“; *Hum.Mutat.*; **17** (2001) 423 - 430
- [237] Burri, N. und Chaubert, P.; „*Complex methylation patterns analyzed by single-strand conformation polymorphism*“; *BioTechniques*; **26** (1999) 232 - 234
- [238] Couvert, P., Poirier, K., Carrie, A., Chalas, C., Jouannet, P., Beldjord, C., Bienvenu, T., Chelly, J. und Kerjean, A.; „*DHPLC-based method for DNA methylation analysis of differential methylated regions from imprinted genes*“; *BioTechniques*; **34** (2003) 356 - 362
- [239] El Maarri, O.; „*SIRPH analysis: SNuPE with IP-RP-HPLC for quantitative measurements of DNA methylation at specific CpG sites*“; *Methods Mol.Biol.*; **287** (2004) 195 - 205
- [240] Lo, Y. M., Wong, I. H., Zhang, J., Tein, M. S., Ng, M. H. und Hjelm, N. M.; „*Quantitative analysis of aberrant p16 methylation using real-time quantitative methylation-specific polymerase chain reaction*“; *Cancer Res.*; **59** (1999) 3899 - 3903
- [241] Eick, D., Fritz, H. J. und Doerfler, W.; „*Quantitative Determination of 5-Methylcytosine in DNA by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography*“; *Analytical Biochemistry*; **135** (1983) 165 - 171

- [242] Ramsahoye, B. H.; „*Measurement of genome wide DNA methylation by reversed-phase high-performance liquid chromatography*“; *Methods*; **27** (2002) 156 - 161
- [243] Christman, J. K.; „*Separation of major and minor deoxyribonucleoside monophosphates by reverse-phase high-performance liquid chromatography: a simple method applicable to quantitation of methylated nucleotides in DNA*“; *Anal.Biochem.*; **119** (1982) 38 - 48
- [244] Gomes, J. D. und Chang, C. J.; „*Reverse-phase high-performance liquid chromatography of chemically modified DNA*“; *Anal.Biochem.*; **129** (1983) 387 - 391
- [245] Kuo, K. C., McCune, R. A., Gehrke, C. W., Midgett, R. und Ehrlich, M.; „*Quantitative reversed-phase high performance liquid chromatographic determination of major and modified deoxyribonucleosides in DNA*“; *Nucleic Acids Res.*; **8** (1980) 4763 - 4776
- [246] Fraga, M. F., Rodriguez, R. und Canal, M. J.; „*Rapid quantification of DNA methylation by high performance capillary electrophoresis*“; *Electrophoresis*; **21** (2000) 2990 - 2994
- [247] Friso, S., Choi, S. W., Dolnikowski, G. G. und Selhub, J.; „*A method to assess genomic DNA methylation using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry*“; *Analytical Chemistry*; **74** (2002) 4526 - 4531
- [248] Oakeley, E. J., Schmitt, F. und Jost, J. P.; „*Quantification of 5-methylcytosine in DNA by the chloroacetaldehyde reaction*“; *BioTechniques*; **27** (1999) 744 - +
- [249] Wu, J. J., Issa, J. P., Herman, J., Bassett, D. E., Nelkin, B. D. und Baylin, S. B.; „*Expression of An Exogenous Eukaryotic Dna Methyltransferase Gene Induces Transformation of Nih-3T3 Cells*“; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; **90** (1993) 8891 - 8895
- [250] Oakeley, E. J., Podesta, A. und Jost, J. P.; „*Developmental changes in DNA methylation of the two tobacco pollen nuclei during maturation*“; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; **94** (1997) 11721 - 11725
- [251] Oakeley, E. J.; „*DNA methylation analysis: a review of current methodologies*“; *Pharmacol.Ther.*; **84** (1999) 389 - 400
- [252] Fraga, M. F. und Esteller M.; „*DNA Methylation: A Profile of Methods and Applications*“; *BioTechniques*; **33** (2002) 632 - 649
- [253] Dahl, C. und Guldberg, P.; „*DNA methylation analysis techniques*“; *Biogerontology*; **4** (2003) 233 - 250
- [254] Stach, D., Schmitz, O. J., Stilgenbauer, S., Benner, A., Dohner, H., Wiessler, M. und Lyko, F.; „*Capillary electrophoretic analysis of genomic DNA methylation levels*“; *Nucleic Acids Research*; **31** (2003) E2
- [255] Wirtz, M., Stach, D., Kliem, H. C., Wiessler, M. und Schmitz, O. J.; „*Determination of the DNA methylation level in tumor cells by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection*“; *Electrophoresis*; **25** (2004) 839 - 845
- [256] Wirtz, M., Schumann, C. A., Schellentrager, M., Gab, S., vom Brocke, J., Podeschwa, M. A. L., Altenbach, H. J., Oscier, D. und Schmitz, O. J.; „*Capillary electrophoresis-laser induced fluorescence analysis of endogenous damage in mitochondrial and genomic DNA*“; *Electrophoresis*; **26** (2005) 2599 - 2607

- [257] Schmitz, O. J., Wörth, C. C., Stach, D. und Wiessler, M.; „*Capillary electrophoresis analysis of DNA adducts as biomarkers for carcinogenesis*“; *Angew.Chem.Int.Ed Engl.*; **41** (2002) 445 - 448
- [258] Behr, S., Matzig, M., Levin, A., Eickhoff, H. und Heller, C.; „*A fully automated multi-capillary electrophoresis device for DNA analysis*“; *Electrophoresis*; **20** (1999) 1492 - 1507
- [259] Jorgenson, J. W. und Lukacs, K. D.; „*High-Resolution Separations Based on Electrophoresis and Electroosmosis*“; *Journal of Chromatography*; **218** (1981) 209 - 216
- [260] Jorgenson, J. W. und Lukacs, K. D.; „*Zone Electrophoresis in Open-Tubular Glass-Capillaries: preliminary data on performance*“; *HRC % CC*; **4** (1981) 230 - 231
- [261] Jorgenson, J. W. und Lukacs, K. D.; „*Free-Zone Electrophoresis in Glass-Capillaries*“; *Clinical Chemistry*; **27** (1981) 1551 - 1553
- [262] Jorgenson, J. W. und Lukacs, K. D.; „*Capillary Zone Electrophoresis*“; *Science*; **222** (1983) 266 - 272
- [263] Terabe, S., Otsuka, K., Ichikawa, K., Tsuchiya, A. und Ando, T.; „*Electrokinetic Separations with Micellar Solutions and Open-Tubular Capillaries*“; *Analytical Chemistry*; **56** (1984) 111 - 113
- [264] Terabe, S., Otsuka, K. und Ando, T.; „*Electrokinetic Chromatography with Micellar Solution and Open-Tubular Capillary*“; *Analytical Chemistry*; **57** (1985) 834 - 841
- [265] Robson, M. M., Cikalo, M. G., Myers, P., Euerby, M. R. und Bartle, K. D.; „*Capillary electrochromatography: A review*“; *Journal of Microcolumn Separations*; **9** (1997) 357 - 372
- [266] Baba, Y. und Tshuhako, M.; „*Gel-Filled Capillaries for Nucleic-Acid Separations in Capillary Electrophoresis*“; *Trac-Trends in Analytical Chemistry*; **11** (1992) 280 - 287
- [267] Dolnik, V.; „*Capillary Gel-Electrophoresis*“; *Journal of Microcolumn Separations*; **6** (1994) 315 - 330
- [268] Tsuji, K.; „*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel- and replaceable polymer-filled capillary electrophoresis for molecular mass determination of proteins of pharmaceutical interest*“; *J.Chromatogr.B Biomed.Appl.*; **662** (1994) 291 - 299
- [269] Rodriguez-Diaz, R., Wehr, T. und Zhu, M.; „*Capillary isoelectric focusing*“; *Electrophoresis*; **18** (1997) 2134 - 2144
- [270] Hjerten, S. und Zhu, M. D.; „*Adaptation of the Equipment for High-Performance Electrophoresis to Isoelectric-Focusing*“; *Journal of Chromatography*; **346** (1985) 265 - 270
- [271] Hjerten, S., Elenbring, K., Kilar, F., Liao, J. L., Chen, A. J. C., Siebert, C. J. und Zhu, M. D.; „*Carrier-Free Zone Electrophoresis, Displacement Electrophoresis and Isoelectric-Focusing in A High-Performance Electrophoresis Apparatus*“; *Journal of Chromatography*; **403** (1987) 47 - 61
- [272] Altria, K. D.; „*Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography*“; *J.of Chromatogr.A*; **856** (1999) 443 - 463
- [273] Altria, K. D.; „*Highly Efficient and Selective Separations of a Wide Range of Analytes Obtained by an Optimised Microemulsion Elektrokinetic - Chromatography Method*“; *Chromatographia*; **49** (1999) 457 - 464

- [274] Altria, K. D.; „*Background theory and applications of microemulsion electrokinetic chromatography*“; J.of Chromatogr.A; **892** (2000) 171 - 186
- [275] Gabel-Jensen, C., Hansen, S. H. und Pedersen-Bjerggaard, S.; „*Separation of neutral compounds by microemulsion electrokinetic chromatography: Fundamental studies on selectivity*“; Elektrophoresis; **22** (2001) 1330 - 1336
- [276] Watarai, H.; „*Microemulsions in separation sciences*“; J.of Chromat.A; **780** (1997) 93 - 102
- [277] MacTaylor, C. E. und Ewing, A. G.; „*Critical review of recent developments in fluorescence detection for capillary electrophoresis*“; Electrophoresis; **18** (1997) 2279 - 2290
- [278] Huang, X. H. C., Quesada, M. A. und Mathies, R. A.; „*Dna Sequencing Using Capillary Array Electrophoresis*“; Analytical Chemistry; **64** (1992) 2149 - 2154
- [279] Karger, A. E., Harris, J. M. und Gesteland, R. F.; „*Multiwavelength Fluorescence Detection for Dna Sequencing Using Capillary Electrophoresis*“; Nucleic Acids Research; **19** (1991) 4955 - 4962
- [280] Luckey, J. A., Drossman, H., Kostichka, A. J., Mead, D. A., Dcunha, J., Norris, T. B. und Smith, L. M.; „*High-Speed Dna Sequencing by Capillary Electrophoresis*“; Nucleic Acids Research; **18** (1990) 4417 - 4421
- [281] Swerdlow, H., Zhang, J. Z., Chen, D. Y., Harke, H. R., Grey, R., Wu, S. L., Dovichi, N. J. und Fuller, C.; „*3 Dna Sequencing Methods Using Capillary Gel-Electrophoresis and Laser-Induced Fluorescence*“; Analytical Chemistry; **63** (1991) 2835 - 2841
- [282] Ibrahim, J. T. und Williams, A.; „*Reaction of the water-soluble reagent N-ethyl-N'(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide with nucleophiles: participation of the tautomeric cyclic ammonioamidine as a kinetically important intermediate*“; J.Am.Chem.Soc.; **100** (1978) 7420 - 7421
- [283] Ivanovskaya, M. G., Gottikh.M.B. und Shabarova, Z. A.; „*Modification of oligo(poly)nucleotide phosphormonoester groups in aqueous solutions*“; Nucleosides & Nucleotides; **6** (1987) 913 - 934
- [284] Chan, K. C., Muschik, G. M. und Issaq, H. J.; „*Solid-state UV laser-induced fluorescence detection in capillary electrophoresis*“; Electrophoresis; **21** (2000) 2062 - 2066
- [285] Kasicka, V.; „*Capillary electrophoresis of peptides*“; Electrophoresis; **20** (1999) 3084 - 3105
- [286] Gooijer, G. und Mank, A. J. G.; „*Laser spectroscopy in analytical chemistry: light on the next millennium*“; Analytica Chimica Acta; **400** (1999) 281 - 295
- [287] Schmitz, O. J.; *Persönliche Mitteilung*; Universität Wuppertal (2006)
- [288] Skoog, D. A. und Leary, J. J.; „*Instrumentelle Analytik*“; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg (1996)
- [289] McWhorter, S. und Soper, S. A.; „*Near-infrared laser-induced fluorescence detection in capillary electrophoresis*“; Electrophoresis; **21** (2000) 1267 - 1280
- [290] Mank, A. J. G. und Yeung, E. S.; „*Diode Laser-Induced Fluorescence Detection in Capillary Electrophoresis After Precolumn Derivatization of Amino-Acids and Small Peptides*“; Journal of Chromatography A; **708** (1995) 309 - 321

- [291] Gostkowski, M. L., McDoniel, J. B., Wei, J., Curey, T. E. und Shear, J. B.; „*Characterizing spectrally diverse biological chromophores using capillary electrophoresis with multiphoton-excited fluorescence*“; Journal of the American Chemical Society; **120** (1998) 18 - 22
- [292] Zamzow, D., Lin, C. H., Small, G. J. und Jankowiak, R.; „*Application of capillary electrophoresis-fluorescence line-narrowing spectroscopy for on-line spectral characterization of closely related analytes*“; Journal of Chromatography A; **781** (1997) 73 - 80
- [293] Miller, K. J., Leesong, I. K., Bao, J. M., Regnier, F. E. und Lytle, F. E.; „*Electrophoretically Mediated Microanalysis of Leucine Aminopeptidase in Complex Matrices Using Time-Resolved Laser-Induced Fluorescence Detection*“; Analytical Chemistry; **65** (1993) 3267 - 3270
- [294] Miller, K. J. und Lytle, F. E.; „*Capillary Zone Electrophoresis with Time-Resolved Fluorescence Detection Using A Diode-Pumped Solid-State Laser*“; Journal of Chromatography; **648** (1993) 245 - 250
- [295] Song, J. M., Kawazumi, H., Inoue, T. und Ogawa, T.; „*Time-resolved photon-counting fluorimetry with a semiconductor laser for capillary electrophoresis*“; Journal of Chromatography A; **727** (1996) 330 - 333
- [296] Sauer, M. et al.; „*On-line diode laser based time-resolved fluorescence detection of labelled oligonucleotides in capillary gel electrophoresis*“; Biomedical Chromatography; **11** (1997) 81 - 82
- [297] Soper, S. A., Legendre, B. L. und Williams, D. C.; „*Online Fluorescence Lifetime Determinations in Capillary Electrophoresis*“; Analytical Chemistry; **67** (1995) 4358 - 4365
- [298] Muller, R., Herten, D. P., Lieberwirth, U., Neumann, M., Sauer, M., Schulz, A., Siebert, S., Drexhage, K. H. und Wolfrum, J.; „*Efficient DNA sequencing with a pulsed semiconductor laser and a new fluorescent dye set*“; Chemical Physics Letters; **279** (1997) 282 - 288
- [299] Hernandez, L., Escalona, J., Joshi, N. und Guzman, N.; „*Laser-Induced Fluorescence and Fluorescence Microscopy for Capillary Electrophoresis Zone Detection*“; Journal of Chromatography; **559** (1991) 183 - 196
- [300] Schütte, M.; *Persönliche Mitteilung*; LaVision BioTec (2006)
- [301] Vogel, M.; „*Entwicklung und Aufbau einer modularen Konfokal-Multiphotonen-Laserscanning-Messapparatur (CMLTT) für Second Harmonic Generation-, Total Internal Reflectance und Laser Tweezers-Anwendungen an myofibrillären Präparaten*“; Dissertation, Naturwissenschaftlich-Mathematische Gesamtfakultät der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg (2004)
- [302] Hernandez, L., Joshi, N., Murzi, E., Verdeguer, P., Mifsud, J. C. und Guzman, N.; „*Colinear laser-induced fluorescence detector for capillary electrophoresis. Analysis of glutamic acid in brain dialysates*“; J.Chromatogr.A; **652** (1993) 399 - 405
- [303] Nielsen, T.; „*Zeitaufgelöste Laserspektroskopie*“; Dissertation, Fakultät für Physik der Universität Bielefeld (1999)
- [304] Bashkin, J. S., Bartosiewicz, M., Roach, D., Leong, J., Barker, D. und Johnston, R.; „*Implementation of a capillary array electrophoresis instrument*“; Journal of Capillary Electrophoresis; **3** (1996) 61 - 68

- [305] Huang, X. H. C., Quesada, M. A. und Mathies, R. A.; „*Capillary Array Electrophoresis Using Laser-Excited Confocal Fluorescence Detection*“; *Analytical Chemistry*; **64** (1992) 967 - 972
- [306] Kheterpal, I., Scherer, J. R., Clark, S. M., Radhakrishnan, A., Ju, J. Y., Ginther, C. L., Sensabaugh, G. F. und Mathies, R. A.; „*DNA sequencing using a four-color confocal fluorescence capillary array scanner*“; *Electrophoresis*; **17** (1996) 1852 - 1859
- [307] Neumann, M., Herten, D. P., Dietrich, A., Wolfrum, J. und Sauer, M.; „*Capillary array scanner for time-resolved detection and identification of fluorescently labelled DNA fragments*“; *Journal of Chromatography A*; **871** (2000) 299 - 310
- [308] Scherer, J. R., Kheterpal, I., Radhakrishnan, A., Ja, W. W. und Mathies, R. A.; „*Ultra-high throughput rotary capillary array electrophoresis scanner for fluorescent DNA sequencing and analysis*“; *Electrophoresis*; **20** (1999) 1508 - 1517
- [309] Wang, J., Sun, G. M., Bai, J. L. und Wang, L.; „*Capillary array electrophoresis with confocal fluorescence rotary scanner*“; *Analyst*; **128** (2003) 1434 - 1438
- [310] Xue, G. und Yeung, E. S.; „*Fluorescence detection in capillary arrays based on galvanometer step scanning*“; *Electrophoresis*; **22** (2001) 3490 - 3496
- [311] Xue, G. und Yeung, E. S.; „*Two-color excitation system for fluorescence detection in DNA sequencing by capillary array electrophoresis*“; *Electrophoresis*; **23** (2002) 1490 - 1498
- [312] Quesada, M. A. und Zhang, S.; „*Multiple capillary DNA sequencer that uses fiber-optic illumination and detection*“; *Electrophoresis*; **17** (1996) 1841 - 1851
- [313] Ueno, K. und Yeung, E. S.; „*Simultaneous Monitoring of DNA Fragments Separated by Electrophoresis in a Multiplexed Array of 100 Capillaries*“; *Analytical Chemistry*; **66** (1994) 1424 - 1431
- [314] Song, J. M. und Vo-Dinh, T.; „*Integrated CMOS microchip system with capillary array electrophoresis*“; *Analytical and Bioanalytical Chemistry*; **373** (2002) 399 - 403
- [315] Hanning, A., Westberg, J. und Roeraade, J.; „*A liquid core waveguide fluorescence detector for multicapillary electrophoresis applied to DNA sequencing in a 91-capillary array*“; *Electrophoresis*; **21** (2000) 3290 - 3304
- [316] Lu, S. X. und Yeung, E. S.; „*Side-entry excitation and detection of square capillary array electrophoresis for DNA sequencing*“; *Journal of Chromatography A*; **853** (1999) 359 - 369
- [317] Anazawa, T., Takahashi, S. und Kambara, H.; „*A capillary-array electrophoresis system using side-entry on-column laser irradiation combined with glass rod lenses*“; *Electrophoresis*; **20** (1999) 539 - 546
- [318] Quesada, M. A., Dhadwal, H. S., Fisk, D. und Studier, F. W.; „*Multi-capillary optical waveguides for DNA sequencing*“; *Electrophoresis*; **19** (1998) 1415 - 1427
- [319] Anazawa, T., Takahashi, S. und Kambara, H.; „*A capillary array gel electrophoresis system using multiple laser focusing for DNA sequencing*“; *Analytical Chemistry*; **68** (1996) 2699 - 2704
- [320] Lu, X. D. und Yeung, E. S.; „*Optimization of Excitation and Detection Geometry for Multiplexed Capillary Array Electrophoresis of Dna Fragments*“; *Applied Spectroscopy*; **49** (1995) 605 - 609

- [321] Taylor, J. A. und Yeung, E. A.; „*Multiplexed Fluorescence Detector for Capillary Electrophoresis Using Axial Optical Fiber Illumination*“; *Analytical Chemistry*; **65** (1993) 956 - 960
- [322] Li, Q. B. und Yeung, E. S.; „*Simple 2-Color Base-Calling Schemes for Dna-Sequencing Based on Standard 4-Label Sanger Chemistry*“; *Applied Spectroscopy*; **49** (1995) 1528 - 1533
- [323] Zhang, J. Z., Yang, M. J., Puyang, X. L., Fang, Y., Cook, L. M. und Dovichi, N. J.; „*Two-dimensional direct-reading fluorescence spectrograph for DNA sequencing by capillary array electrophoresis*“; *Analytical Chemistry*; **73** (2001) 1234 - 1239
- [324] Cousino, M. A., Jarbawi, T. B., Halsall, H. B. und Heineman, W. R.; „*Pushing Down the Limits of Detection: Molecular Needles in a Haystack*“; *Analytical Chemistry News & Features*; **97** (1997) 544 A - 549 A
- [325] Keller, R. A., Ambrose, W. P., Arias, A. A., Cai, H., Emory, S. R., Goodwin, P. M. und Jett, J. H.; „*Analytical Applications of Single-Molecule Detection*“; *Anal.Chem.*; **74** (2002) 316A - 324A
- [326] Boyle, W. S. und Smith, G. E.; „*Charge Coupled Semiconductor Devices*“; *Bell System Technical Journal*; **49** (1970) 587
- [327] Spring, K., Fellers, T. J. und Davidson, M. W.; „*Fundamentals of Digital Imaging*“; Nikon MicroscopyU Site Map; www.microscopyu.com (2006)
- [328] ANDOR TECHNOLOGY; „*Ixon CCD-Kamera mit Electron Multiplying Technologie*“; Herstellerinformation; (2005)
- [329] Ott, E.; „*Wissenswertes über CCD-Kameras*“; Herstellerinformation der Firma PCO AG; (1998)
- [330] Schmidt, U.; „*Professionelle Videotechnik: analoge und digitale Grundlagen, Signalformen, Videoaufnahme, Signalverarbeitung und Studiotchnik*“; **2. Auflage**, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Paris, Singapur, Tokio (2000) 214 - 219
- [331] Webers, J.; „*Handbuch der Film- und Videotechnik: Die Aufnahme, Speicherung, Bearbeitung und Wiedergabe audiovisueller Programme*“; **6. Auflage**, Franzis Verlag GmbH (2000) 146 - 150
- [332] Goßner, S.; „*Grundlagen der Elektronik - Halbleiter, Bauelemente und Schaltungen*“; **4. Auflage**, Shaker Verlag GmbH, Aachen (2005)
- [333] Denvir, D. J. und Coates, C. G.; „*Electron Multiplying CCD Technology: Application to Ultrasensitive Detection of Biomolecules*“; Technischer Artikel des Herstellers Andor Technology Ltd.; (2004)
- [334] Coates, C. G., Denvir, D. J., Mchale, N. G., Thornbury, K. D. und Hollywood, M. A.; „*Optimizing low-light microscopy with back-illuminated electron multiplying charge-coupled device: enhanced sensitivity, speed, and resolution*“; *Journal of Biomedical Optics*; **9** (2004) 1244 - 1252
- [335] Denvir, D. J. und Conroy, E.; „*Electron Multiplying CCDs*“; Technischer Artikel des Herstellers Andor Technology Ltd.; (2004)

- [336] Janesick, J. R.; „*Scientific Charge-Coupled Devices*“; SPIE Press, Bellingham, Washington USA (2001)
- [337] Knuth, H. und Hippler, S.; „*Messung der Charakteristika einer CCD-Kamera*“; Max Planck Institut für Astronomie, Heidelberg; (2002)
- [338] Li, Q. B. und Yeung, E. S.; „*Evaluation of the Potential of A Charge-Injection Device for Dna-Sequencing by Multiplexed Capillary Electrophoresis*“; Applied Spectroscopy; **49** (1995) 825 - 833
- [339] Lewis, F. D., Wu, T., Zhang, Y., Letsinger, R. L., Greenfield, S. R. und Wasielewski, M. R.; „*Distance-dependent electron-transfer in DNA hairpins*“; Science; **277** (1997) 673 - 676
- [340] Torimura, M., Kurata, S., Yamada, K., Yokomaku, T., Kamagata, Y., Kanagawa, T. und Kurane, R.; „*Fluorescence-Quenching Phenomenon by Photoinduced Electron Transfer between a Fluorescent Dye and a Nucleotide Base*“; Analytical Sciences; **17** (2001) 155 - 160
- [341] Lieberwirth, U. et al.; „*Multiplex dye DNA-sequencing in capillary gel-electrophoresis by diode Laser-based time-resolved fluorescence detection*“; Anal.Chem.; **70** (1998) 4771 - 4779
- [342] Seidel, C. A. M., Schulz, A. und Sauer, M.; „*Nucleobase-specific quenching of fluorescent dye: I. Nucleobase one-electron redox potentials and their correlation with static and dynamic quenching efficiencies*“; J.Phys.Chem.; **100** (1996) 5541 - 5553
- [343] Poguang, W. und Giese, R. W.; „*Phosphate-specific fluorescence labeling with BO-IMI: reaction details*“; Journal of Chromatography A; **809** (1998) 211 - 218
- [344] Wätzig, H. und Dette, C.; „*Analysis of Acetylcysteine by Capillary Electrophoresis (Ce) 3. Quantifikation*“; Pharmazie; **49** (1994) 656 - 659
- [345] Shimura, K., Uchiyama, N. und Kasai, K.; „*Prevention of evaporation of small-volume sample solutions for capillary electrophoresis using a mineral-oil overlay*“; Electrophoresis; **22** (2001) 3471 - 3477
- [346] Baeuml, F. und Welsch, T.; „*Improvement of the long-term stability of polyimide-coated fused-silica capillaries used in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography*“; Journal of Chromatography A; **961** (2002) 35 - 44
- [347] Wilson, V. L., Smith, R. A., Longoria, J., Liotta, M. A., Harper, C. M. und Harris, C. C.; „*Chemical carcinogen-induced decreases in genomic 5-methyldeoxycytidine content of normal human bronchial epithelial cells*“; Proc.Natl.Acad.Sci.USA; **84** (1987) 3298 - 3301
- [348] Wilson, V. L. und Jones, P. A.; „*Inhibition of DNA Methylation by Chemical Carcinogens in vitro*“; Cell; **32** (1983) 239 - 246
- [349] Schiewek, R.; „*Bestimmung des DNA-Methylierungsgrades in Ratten nach Behandlung mit 3-Nitrobenzanthron und Weiterentwicklung der kapillarelektrophoretischen Methode*“; Diplomarbeit, Bergische Universität, Wuppertal (2005)
- [350] Pradhan, P., Graslund, A., Seidel, A. und Jernstrom, B.; „*Implications of cytosine methylation on (+)-anti-Benz[a]pyrene 7, 8-dihydrodiol 9,10-epoxide N(2)-dG adduct formation in 5'-d(CGT), 5'-d(CGA), and 5'-d(CGC) sequence contexts of single- and double-stranded oligonucleotides*“; Chem.Res.Toxicol.; **12** (1999) 816 - 821
- [351] Li, D. et al.; „*Characterization of a major aromatic DNA adduct detected in human breast tissues*“; Environ.Mol.Mutagen.; **39** (2002) 193 - 200

- [352] Goth-Goldstein, R.; *Persönliche Mitteilung*; Lawrence Berkeley National Laboratories, Berkeley, USA (2005)
- [353] Schneider, K. und Roller, M.; „*Cancer Risk Assessment for Oral Exposure to PAH Mixtures*“; Journal of Applied Toxicology; **22** (2002) 73 - 83
- [354] Goldstein, L. S., Weyand, E. H., Safe, S., Culp, S. J., Gaylor, D. W. und Beland, F. A.; „*Tumors and DNA Adducts in Mice Exposed to Benzo Tars: Implications for Risk Assessment*“; Environ Health Perspect; **106** Suppl. 6 (1998) 1325 - 1330
- [355] Weisenberger, D. J. und Romano, L. J.; „*Cytosine Methylation in a CpG Sequence Leads to Enhanced Reactivity with Benzo[a]pyrene Diol Epoxide That Correlates with a Conformational Change*“; Journal of Biological Chemistry; **274** (1999) 23948 - 23955
- [356] Parker, B. S., Cutts, S. M. und Phillips, D. R.; „*Cytosine Methylation Enhances Mitoxantrone-DNA Adduct Formation at CpG Dinucleotides*“; Journal of Biological Chemistry; **276** (2001) 15953 - 15960
- [357] Denissenko, M. F., Chen, J. X., Tang, M.-S. und Pfeifer, G. P.; „*Cytosine methylation determines hot spots of DNA damage in the human P53 gene*“; Proc.Natl.Acad.Sci.USA; **94** (1997) 3893 - 3898
- [358] Tang, M.-S., Zheng, J. B., Denissenko, M. F., Pfeifer, G. P. und Zheng, Y.; „*Use of UvrABC nuclease to quantify benz[a]pyrene diol epoxide-DNA adduct formation at methylated versus unmethylated CpG sites in the p53 gene*“; Carcinogenesis; **20** (1999) 1085 - 1086
- [359] Wojciechowski, M. F. und Meehan, T.; „*Inhibition of DNA methyltransferases in vitro by benzo[a]pyrene diol epoxide-modified substrates*“; J.Biol.Chem.; **259** (1984) 9711 - 9716
- [360] Hallek, M., Bergmann, M. und Emmerich, B.; „*Chronische lymphatische Leukämie*“; Deutsches Ärzteblatt; **19** (2002) A1294 - A1301
- [361] Oduncu, F. S., Eichhorst, B., Nerl, C., Röhnisch, T., Schneller, F., Hallek, M. und Emmerich, B.; „*Lymphozytische Lymphome*“; Tumorzentrum München und Zuckschwerdt Verlag, München; (2004) 64 - 86
- [362] Rush, L. J. et al.; „*Epigenetic profiling in chronic lymphocytic leukemia reveals novel methylation targets*“; Cancer Research; **64** (2004) 2424 - 2433
- [363] Houlston, R. S., Sellick, G., Yuille, M., Matutes, E. und Catovsky, D.; „*Causation of chronic lymphocytic leukemia - insights from familial disease*“; Leukemia Research; **27** (2003) 871 - 876
- [364] Goldin, L. R. und Hemminki, K.; „*Familial risk of lymphoproliferative tumors in families of patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the Swedish family-cancer database*“; Leuk.Lymphoma; **44** (2003) 5
- [365] Yuille, M. R., Matutes, E., Marossy, A., Hilditch, B., Catovsky, D. und Houlston, R. S.; „*Familial chronic lymphocytic leukaemia: a survey and review of published studies*“; Br.J.Haematol.; **109** (2000) 794 - 799
- [366] Rai, K. R., Sawitsky, A., Cronkite, E. P., Chanana, A. D., Levy, R. N. und Pasternack, B. S.; „*Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia*“; Blood; **46** (1975) 219 - 234
- [367] Binet, J. L. et al.; „*A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis*“; Cancer; **48** (1981) 198 - 206

- [368] Montillo, M., Hamblin, T., Hallek, M., Montserrat, E. und Morra, E.; „*Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies*“; *Haematologica*; **90** (2005) 391 - 399
- [369] Ritgen, M.; „*Prognostische Marker der chronischen lymphatischen Leukämie*“; *Onkologisch*; **2** (2005) 9
- [370] Stilgenbauer, S.; „*VH-Status bei der chronischen lymphatischen Leukämie*“; Pressemitteilung: Informationsdienst Wissenschaft; (2005)
- [371] Corcoran, M., Parker, A., Orchard, J., Davis, Z., Wirtz, M., Schmitz, O. J. und Oscier, D.; „*ZAP-70 methylation status is associated with ZAP-70 expression status in chronic lymphocytic leukemia*“; *Haematologica-the Hematology Journal*; **90** (2005) 1078 - 1088
- [372] Koriath, F.; *Persönliche Mitteilung*; Labor Arndt & Partner, Hamburg (2006)
- [373] Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. und Shlomchik, M.; „*Immunologie*“; **5. Auflage**, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin (2002)
- [374] Damle, R. N. et al.; „*Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia*“; *Blood*; **94** (1999) 1840 - 1847
- [375] Hamblin, T. J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D. G. und Stevenson, F. K.; „*Unmutated Ig V-H genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia*“; *Blood*; **94** (1999) 1848 - 1854
- [376] Zenhäusern, R., Solenthaler, M. und Tobler, A.; „*Chronische Leukämien beim Erwachsenen: chronische lymphatische Leukämie und Haarzell-Leukämie*“; *Schweiz Med Forum*; **31** (2003) 712 - 719
- [377] Hamblin, T. J., Orchard, J. A., Ibbotson, R. E., Davis, Z., Thomas, P. W., Stevenson, F. K. und Oscier, D. G.; „*CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease*“; *Blood*; **99** (2002) 1023 - 1029
- [378] Boonstra, J. G., von't Veer, M. B. und Gratama, J. W.; „*The use of CD38 expression by monoclonal B lymphocytes as a prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia*“; *J.Biol.Regul.Homeost.Agents*; **18** (2004) 340 - 346
- [379] Del Giudice, I. et al.; „*Zeta-chain associated protein 70 and CD38 combined predict the time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia*“; *Cancer*; **104** (2005) 2124 - 2132
- [380] Dignum, H. M., Summerfield, G. P., Proctor, S. J. und Mainou-Fowler, T.; „*Quantification of CD38 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL): a comparison between antibody binding capacity (ABC) and relative median fluorescence (RMF)*“; *Leuk.Lymphoma*; **45** (2004) 1167 - 1173
- [381] Matrai, Z., Lin, K., Dennis, M., Sherrington, P., Zuzel, M., Pettitt, A. R. und Cawley, J. C.; „*CD38 expression and Ig V-H gene mutation in B-cell chronic lymphocytic leukemia*“; *Blood*; **97** (2001) 1902 - 1903
- [382] Hamblin, B. J., Orchard, J. A., Gardiner, A., Oscier, D. G., Davis, Z. und Stevenson, F. K.; „*Immunoglobulin V genes and CD38 expression in CLL*“; *Blood*; **95** (2000) 2455 - 2456

- [383] Ibrahim, S., Keating, M., Do, K. A., O'Brien, S., Huh, Y. O., Jilani, I., Lerner, S., Kantarjian, H. M. und Albitar, M.; „*CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia*“; *Blood*; **98** (2001) 181 - 186
- [384] Jelinek, D. F. et al.; „*Analysis of clonal B-cell CD38 and immunoglobulin variable region sequence status in relation to clinical outcome for B-chronic lymphocytic leukaemia*“; *Br.J.Haematol.*; **115** (2001) 854 - 861
- [385] Krober, A., Seiler, T., Benner, A., Bullinger, L., Bruckle, E., Lichter, P., Dohner, H. und Stilgenbauer, S.; „*V-H mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia*“; *Blood*; **100** (2002) 1410 - 1416
- [386] Matrai, Z.; „*CD38 as a prognostic marker in CLL*“; *Hematology*; **10** (2005) 39 - 46
- [387] Oscier, D. G. et al.; „*Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGHV gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors*“; *Blood*; **100** (2002) 1177 - 1184
- [388] Thunberg, U., Johnson, A., Roos, G., Thom, I., Tobin, G., Sallstrom, J., Sundstrom, C. und Rosenquist, R.; „*CD38 expression is a poor predictor for V-H gene mutational status and prognosis in chronic lymphocytic leukemia*“; *Blood*; **97** (2001) 1892 - 1893
- [389] Carreras, J. et al.; „*Immunohistochemical analysis of ZAP-70 expression in B-cell lymphoid neoplasms*“; *J.Pathol.*; **205** (2005) 507 - 513
- [390] Chen, L. G., Apgar, J., Huynh, L., Dicker, F., Giago-McGahan, T., Rassenti, L., Weiss, A. und Kipps, T. J.; „*ZAP-70 directly enhances TgM signaling in chronic lymphocytic leukemia*“; *Blood*; **105** (2005) 2036 - 2041
- [391] Crespo, M. et al.; „*ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia*“; *New England Journal of Medicine*; **348** (2003) 1764 - 1775
- [392] Durig, J., Nuckel, H., Cremer, M., Fuhrer, A., Halfmeyer, K., Fandrey, J., Moroy, T., Klein-Hitpass, L. und Duhrsen, U.; „*ZAP-70 expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia*“; *Leukemia*; **17** (2003) 2426 - 2434
- [393] Orchard, J. A., Ibbotson, R. E., Davis, Z., Wiestner, A., Rosenwald, A., Thomas, P. W., Hamblin, T. J., Staudt, L. M. und Oscier, D. G.; „*ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia*“; *Lancet*; **363** (2004) 105 - 111
- [394] Rassenti, L. Z. et al.; „*ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia*“; *New England Journal of Medicine*; **351** (2004) 893 - 901
- [395] Schroers, R., Griesinger, F., Trumper, L., Haase, D., Kulle, B., Klein-Hitpass, L., Sellmann, L., Duhrsen, U. und Durig, J.; „*Combined analysis of ZAP-70 and CD38 expression as a predictor of disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia*“; *Leukemia*; **19** (2005) 750 - 758
- [396] Wiestner, A. et al.; „*ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile*“; *Blood*; **101** (2003) 4944 - 4951
- [397] Stilgenbauer, S.; „*ZAP-70 methylation and expression status in chronic lymphocytic leukemia*“; *Haematologica*; **90** (2005) 1012

- [398] de Capoa, A., Grappelli, C., Febbo, F. R., Spano, A., Niveleau, A., Cafolla, A., Cordone, I. und Foa, R.; „*Methylation levels of normal and chronic lymphocytic leukemia B lymphocytes: Computer-assisted quantitative analysis of anti-5-methylcytosine antibody binding to individual nuclei*“; *Cytometry*; **36** (1999) 157 - 159
- [399] Browett, P. J. und Norton, J. D.; „*Analysis of Ras Gene-Mutations and Methylation State in Human Leukemias*“; *Oncogene*; **4** (1989) 1029 - 1036
- [400] Dante, R., Dantepaire, J., Rigal, D. und Roizes, G.; „*Methylation Patterns of Long Interspersed Repeated Dna and Aliphoid Repetitive Dna from Human Cell-Lines and Tumors*“; *Anticancer Research*; **12** (1992) 559 - 563
- [401] Felgner, J., Kreipe, H., Heidorn, K., Jaquet, K., Zschunke, F., Radzun, H. J. und Parwaresch, M. R.; „*Increased Methylation of the C-Fms Protooncogene in Acute Myelomonocytic Leukemias*“; *Pathobiology*; **59** (1991) 293 - 298
- [402] Hanada, M., Delia, D., Aiello, A., Stadtmauer, E. und Reed, J. C.; „*Bcl-2 Gene Hypomethylation and High-Level Expression in B-Cell Chronic Lymphocytic-Leukemia*“; *Blood*; **82** (1993) 1820 - 1828
- [403] Kochanek, S., Radbruch, A., Tesch, H., Renz, D. und Doerfler, W.; „*Dna Methylation Profiles in the Human Genes for Tumor Necrosis Factors-Alpha and Factor-Beta in Subpopulations of Leukocytes and in Leukemias*“; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; **88** (1991) 5759 - 5763
- [404] Lipsanen, V., Leinonen, P., Alhonen, L. und Janne, J.; „*Hypomethylation of Ornithine Decarboxylase Gene and Erb-A1 Oncogene in Human Chronic Lymphatic-Leukemia*“; *Blood*; **72** (1988) 2042 - 2044
- [405] Yuille, M. R., Condie, A., Stone, E. M., Wilsher, J., Bradshaw, P. S., Brooks, L. und Catovsky, D.; „*TCL1 is activated by chromosomal rearrangement or by hypomethylation*“; *Genes Chromosomes & Cancer*; **30** (2001) 336 - 341
- [406] Harikrishnan, K. N., Bassal, S., Tikellis, C. und El Osta, A.; „*Expression analysis of the epigenetic methyltransferases and methyl-CpG binding protein families in the normal B-cell and B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL)*“; *Cancer Biology & Therapy*; **3** (2004) 989 - 994
- [407] Kim, Y. I.; „*Folate and carcinogenesis: Evidence, mechanisms, and implications*“; *Journal of Nutritional Biochemistry*; **10** (1999) 66 - 88
- [408] Fox, M. A. und Whitesell, J. K.; „*Organische Chemie*“; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford (1995)
- [409] Christman, J. K., Sheikhnejad, G., Dizik, M., Abileah, S. und Wainfan, E.; „*Reversibility of Changes in Nucleic-Acid Methylation and Gene-Expression Induced in Rat-Liver by Severe Dietary Methyl Deficiency*“; *Carcinogenesis*; **14** (1993) 551 - 557
- [410] Christman, J. K., Chen, M. L., Sheikhnejad, G., Dizik, M., Abileah, S. und Wainfan, E.; „*Methyl Deficiency, Dna Methylation, and Cancer - Studies on the Reversibility of the Effects of A Lipotrope-Deficient Diet*“; *Journal of Nutritional Biochemistry*; **4** (1993) 672 - 680
- [411] Fowler, B. M., Giuliano, A. R., Piyathilake, C., Nour, M. und Hatch, K.; „*Hypomethylation in cervical tissue: Is there a correlation with folate status?*“; *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*; **7** (1998) 901 - 906

- [412] Friso, S. et al.; „*A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status*“; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; **99** (2002) 5606 - 5611
- [413] Jacob, R. A., Gretz, D. M., Taylor, P. C., James, S. J., Pogribny, I. P., Miller, B. J., Henning, S. M. und Swendseid, M. E.; „*Moderate folate depletion increases plasma homocysteine and decreases lymphocyte DNA methylation in postmenopausal women*“; Journal of Nutrition; **128** (1998) 1204 - 1212
- [414] Kim, Y. I., Pogribny, I. P., Basnakian, A. G., Miller, J. W., Selhub, J., James, S. J. und Mason, J. B.; „*Folate deficiency in rats induces DNA strand breaks and hypomethylation within the p53 tumor suppressor gene*“; American Journal of Clinical Nutrition; **65** (1997) 46 - 52
- [415] Kim, Y. I.; „*Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms, folate, and cancer risk: A paradigm of gene-nutrient interactions in carcinogenesis*“; Nutrition Reviews; **58** (2000) 205 - 209
- [416] Stern, L. L., Mason, J. B., Selhub, J. und Choi, S. W.; „*Genomic DNA hypomethylation, a characteristic of most cancers, is present in peripheral leukocytes of individuals who are homozygous for the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene*“; Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention; **9** (2000) 849 - 853
- [417] Chen, J., Giovannucci, E., Kelsey, K., Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Spiegelman, D., Willett, W. C. und Hunter, D. J.; „*A methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer*“; Cancer Res.; **56** (1996) 4862 - 4864
- [418] Ma, J. et al.; „*Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms, dietary interactions, and risk of colorectal cancer*“; Cancer Res.; **57** (1997) 1098 - 1102
- [419] Skibola, C. F., Smith, M. T. und Kane, E.; „*Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults*“; Proc.Natl.Acad.Sci.U S A; **96** (1999) 12810 - 12815
- [420] Wiemels, J. L., Smith, R. N. und Taylor, G. M.; „*Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia*“; Proc.Natl.Acad.Sci.U S A; **98** (2001) 4004 - 4009
- [421] Nuckel, H., Frey, U. H., Durig, J., Duhrsen, U. und Siffert, W.; „*Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene 677C > T and 1298A > C polymorphisms are associated with differential apoptosis of leukemic B cells in vitro and disease progression in chronic lymphocytic leukemia*“; Leukemia; **18** (2004) 1816 - 1823
- [422] Ordonez, A. J. G., Carreira, J. M. F., Alvarez, C. R. F., Martin, L., Garcia, J. S., Rodriguez, J. M. M., Alvarez, M. V. und Coto, E.; „*Normal frequencies of the C677T genotypes on the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene among lymphoproliferative disorders but not in multiple myeloma*“; Leukemia & Lymphoma; **39** (2000) 607 - 612
- [423] Rudd, M. F., Sellick, G. S., Allinson, R., Matutes, E., Catovsky, D. und Houlston, R. S.; „*MTHFR polymorphisms and risk of chronic lymphocytic leukemia*“; Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention; **13** (2004) 2268 - 2270
- [424] Greeve, J.; „*B cell specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) in transgenic mice as a model for the molecular pathogenesis of non-Hodgkin's lymphomas*“; Klinik und Poliklinik für Allgemeine Innere Medizin, Inselspital Bern; (2005)

- [425] Albesiano, E., Messmer, B. T. und Damle, R. N.; „*Activation-induced cytidine deaminase (AID) expression in B-CLL*“; Blood; **100** (2002) 99a
- [426] Heintel, D. et al.; „*High expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) mRNA is associated with unmutated IGV(H) gene status and unfavourable cytogenetic aberrations in patients with chronic lymphocytic leukaemia*“; Leukemia; **18** (2004) 756 - 762
- [427] McCarthy, H. et al.; „*High expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) and splice variants is a distinctive feature of poor-prognosis chronic lymphocytic leukemia*“; Blood; **101** (2003) 4903 - 4908
- [428] Oppezzo, P., Vuillier, F. und Vasconcelos, Y.; „*Chronic lymphocytic leukemia B cells expressing AID display dissociation between class switch recombination and somatic hypermethylation*“; Blood; **101** (2003) 4029 - 4032
- [429] Larijani, M., Frieder, D., Sonbuchner, T. M., Bransteitter, R., Goodman, M. F., Bouhassira, E. E., Scharff, M. D. und Martin, A.; „*Methylation protects cytidines from AID-mediated deamination*“; Molecular Immunology; **42** (2005) 599 - 604
- [430] Luo, Z. H., Ronai, D. und Scharff, M. D.; „*The role of activation-induced cytidine deaminase in antibody diversification, immunodeficiency, and B-cell malignancies*“; Journal of Allergy and Clinical Immunology; **114** (2004) 726 - 735
- [431] Steptoe, P. C. und Edwards, R. G.; „*Birth after the reimplantation of a human embryo*“; Lancet; **2** (1978) 366
- [432] Dufke, A. und Rieß, O.; „*Genomisches Imprinting - Einfluß durch IVF und ICSI*“; Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology; **1** (2004) 28 - 32
- [433] Hansen, M., Kurinczuk, J. J., Bower, C. und Webb, S.; „*The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization*“; N.Engl.J.Med.; **346** (2002) 725 - 730
- [434] Ludwig, M. und Katalinic, A.; „*Malformation rate in fetuses and children conceived after ICSI: results of a prospective cohort study*“; Reprod.Biomed.Online; **5** (2002) 171 - 178
- [435] Haaf, T.; „*Geschlechterkonflikt im frühen Embryo*“; Deutsches Ärzteblatt; **36** (2003) A2300 - A2308
- [436] Cox, G. F., Burger, J., Lip, V., Mau, U. A., Sperling, K., Wu, B. L. und Horsthemke, B.; „*Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects*“; Am.J.Hum.Genet.; **71** (2002) 162 - 164
- [437] DeBaun, M. R., Niemitz, E. L. und Feinberg, A. P.; „*Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19*“; Am.J.Hum.Genet.; **72** (2003) 156 - 160
- [438] Gicquel, C., Gaston, V., Mandelbaum, J., Siffroi, J. P., Flahault, A. und Le Bouc, Y.; „*In vitro fertilization may increase the risk of Beckwith-Wiedemann syndrome related to the abnormal imprinting of the KCN1OT gene*“; Am.J.Hum.Genet.; **72** (2003) 1338 - 1341
- [439] Maher, E. R. et al.; „*Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART)*“; J.Med.Genet.; **40** (2003) 62 - 64
- [440] Farin, C. E., Farin, P. W. und Piedrahita, J. A.; „*Development of fetuses from in vitro-produced and cloned bovine embryos*“; J.Anim.Sci.; **82** E-Suppl (2004) E53 - E62

- [441] Sinclair, K. D., Young, L. E., Wilmut, I. und McEvoy, T. G.; „*In-utero overgrowth in ruminants following embryo culture: lessons from mice and a warning to men*“; Hum.Reprod.; **15** Suppl 5 (2000) 68 - 86
- [442] Walker, S. K., Hartwich, K. M. und Robinson, J. S.; „*Long-term effects on offspring of exposure of oocytes and embryos to chemical and physical agents*“; Hum.Reprod.Update; **6** (2000) 564 - 577
- [443] Eggan, K., Akutsu, H., Loring, J., Jackson-Grusby, L., Klemm, M., Rideout III, W. M., Yanagimachi, R. und Jaenisch, R.; „*Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation*“; Proc.Natl.Acad.Sci.USA; **98** (2001) 6209 - 6214
- [444] Shi, W., Zakhartchenko, V. und Wolf, E.; „*Epigenetic reprogramming in mammalian nuclear transfer*“; Differentiation; **71** (2003) 91 - 113
- [445] Farin, P. W. und Farin, C. E.; „*Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: survival and fetal development*“; Biol.Reprod.; **52** (1995) 676 - 682
- [446] Behboodi, E., Anderson, G. B., Bondurant, R. H., Cargill, S. L., Kreuzscher, B. R., Medrano, J. F. und Murray, J. D.; „*Birth of Large Calves That Developed from in Vitro-Derived Bovine Embryos*“; Theriogenology; **44** (1995) 227 - 232
- [447] Sinclair, K. D., Broadbent, P. J. und Dolman, D. F.; „*In-Vitro Produced Embryos As A Means of Achieving Pregnancy and Improving Productivity in Beef-Cows*“; Animal Science; **60** (1995) 55 - 64
- [448] Walker, S. K., Hartwich, K. M. und Seamark, R. F.; „*The production of unusually large offspring following embryo manipulation: Concepts and challenges*“; Theriogenology; **45** (1996) 111 - 120
- [449] Sinclair, K. D., McEvoy, T. G., Maxfield, E. K., Maltin, C. A., Young, L. E., Wilmut, I., Broadbent, P. J. und Robinson, J. J.; „*Aberrant fetal growth and development after in vitro culture of sheep zygotes*“; Journal of Reproduction and Fertility; **116** (1999) 177 - 186
- [450] Feil, R.; „*Early-embryonic culture and manipulation could affect genomic imprinting*“; Trends in Molecular Medicine; **7** (2001) 245 - 246
- [451] Khosla, S., Dean, W., Brown, D., Reik, W. und Feil, R.; „*Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes*“; Biology of Reproduction; **64** (2001) 918 - 926
- [452] Wrenzycki, C., Herrmann, D., Lucas-Hahn, A., Korsawe, K., Lemme, E. und Niemann, H.; „*Addition to methods used already, such as Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from in vitro procedures and their implications for development*“; Reproduction Fertility and Development; **17** (2005) 23 - 35
- [453] Wrenzycki, C., Herrmann, D., Lucas-Hahn, A., Lemme, E., Korsawe, K. und Niemann, H.; „*Gene expression patterns in in vitro-produced and somatic nuclear transfer-derived preimplantation bovine embryos: relationship to the large offspring syndrome?*“; Animal Reproduction Science; **82-83** (2004) 593 - 603
- [454] Lonergan, P., Rizos, D., Gutiérrez-Adán, A., Fair, T. und Boland, M. P.; „*Effect of culture environment on embryo quality and gene expression - experience from animal studies*“; Reproductive BioMedicine Online; **7** (2003) 657 - 663

- [455] Wrenzycki, C. und Niemann, H.; „*Epigenetic reprogramming in early embryonic development: effects of in-vitro production and somatic nuclear transfer*“; *Reprod.Biomed.Online*; **7** (2003) 649 - 656
- [456] Biniszkiwicz, D. et al.; „*Dnmt1 overexpression causes genomic hypermethylation, loss of imprinting, and embryonic lethality*“; *Molecular and Cellular Biology*; **22** (2002) 2124 - 2135
- [457] Hiendleder, S., Mund, C., Reichenbach, H. D., Wenigerkind, H., Brem, G., Zakhartchenko, V., Lyko, F. und Wolf, E.; „*Tissue-specific elevated genomic cytosine methylation levels are associated with an overgrowth phenotype of bovine fetuses derived by in vitro techniques*“; *Biology of Reproduction*; **71** (2004) 217 - 223
- [458] Diedrich, K., Griesinger, G., Behre, H. M., Felberbaum, R., Montag, M., van der Ven, H. H., Strowitzki, T. und von Otte, S.; „*Neue Entwicklungen in der Reproduktionsmedizin*“; *Deutsches Ärzteblatt*; **102** (2005) A 587 - A 591
- [459] Chahoud, I. und Grote, K.; „*Male and Female Fertility: Background Physiology and In-Vivo Testing*“; DGPT - Weiterbildungskurs "Reproduktionstoxikologie" am Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Charité Berlin; (2005)
- [460] Hiendleder, S. et al.; „*Tissue-specific effects of in vitro fertilization procedures on genomic cytosine methylation levels in overgrown and normal sized bovine fetuses*“; *Biology of Reproduction*; **75** (2006) 17 - 23
- [461] Romanov, G. A. und Vanyushin, B. F.; „*Methylation of reiterated sequences in mammalian DNAs. Effects of the tissue type, age, malignancy and hormonal induction.*“; *Biochim.Biophys.Acta*; **653** (1981) 204 - 218
- [462] Gama Sosa, M. A., Midgett, R. M., Slagel, V. A., Githens, S., Kuo, K. C., Gehrke, C. W. und Ehrlich, M.; „*Tissue-specific differences in DNA methylation in various mammals*“; *Biochim.Biophys.Acta*; **740** (1983) 212 - 219
- [463] Hiendleder, S.; *Persönliche Mitteilung*; Ludwig-Maximilian-Universität, München (2006)
- [464] Olinski, R., Gackowski, D., Foksinski, M., Rozalski, R., Roszkowski, K. und Jaruga, P.; „*Oxidative DNA damage: Assessment of the role in carcinogenesis, atherosclerosis, and acquired immunodeficiency syndrome*“; *Free Radical Biology and Medicine*; **33** (2002) 192 - 200
- [465] Nair, J., Barbin, A., Guichard, Y. und Bartsch, H.; „*1,N-6-Ethenodeoxyadenosine and 3,N-4-Ethenodeoxycytidine in Liver Dna from Humans and Untreated Rodents Detected by Immunoaffinity P-32 Postlabeling*“; *Carcinogenesis*; **16** (1995) 613 - 617
- [466] Nath, R. G. und Chung, F. L.; „*Detection of Exocyclic 1,N-2-Propanodeoxyguanosine Adducts As Common Dna Lesions in Rodents and Humans*“; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; **91** (1994) 7491 - 7495
- [467] Barbin, A., Bartsch, H., Leconte, P. und Radman, M.; „*Studies on the Miscoding Properties of 1,N6-Ethenoadenine and 3,N4-Ethenocytosine, Dna Reaction-Products of Vinyl-Chloride Metabolites, During Invitro Dna-Synthesis*“; *Nucleic Acids Research*; **9** (1981) 375 - 387
- [468] Barbin, A.; „*Etheno-adduct-forming chemicals: from mutagenicity testing to tumor mutation spectra*“; *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*; **462** (2000) 55 - 69

- [469] Hall, J. A., Saffhill, R., Green, T. und Hathway, D. E.; „*The Induction of Errors During Invitro Dna-Synthesis Following Chloroacetaldehyde-Treatment of Poly(Da-Dt) and Poly(Dc-Dg) Templates*“; *Carcinogenesis*; **2** (1981) 141 - 146
- [470] Spengler, S. und Singer, B.; „*Transcriptional Errors and Ambiguity Resulting from the Presence of 1,N6-Ethenoadenosine Or 3,N4-Ethenocytidine in Polyribonucleotides*“; *Nucleic Acids Research*; **9** (1981) 365 - 373
- [471] Yang, I. Y., Chan, G., Miller, H., Huang, Y., Torres, M. C., Johnson, F. und Moriya, M.; „*Mutagenesis by acrolein-derived propanodeoxyguanosine adducts in human cells*“; *Biochemistry*; **41** (2002) 13826 - 13832
- [472] Brocke vom, J.; „*Synthese von phosphorylierten Cyclitolen und Desoxynukleotidaddukten*“; Diplomarbeit, Bergische Universität Wuppertal, Organische Chemie (2004)
- [473] Schumann, C. A.; „*Analyse von endogenen Addukten in mitochondrieller DNA*“; Diplomarbeit, Bergische Universität Wuppertal, Analytische Chemie (2004)
- [474] Bohr, V. A. und Anson, R. M.; „*Mitochondrial DNA repair pathways*“; *J.Bioenerg.Biomembr.*; **31** (1999) 391 - 398
- [475] Richter, C., Park, J. W. und Ames, B. N.; „*Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive*“; *Proc.Natl.Acad.Sci.U S.A.*; **85** (1988) 6465 - 6467
- [476] AKBAS, H., ISCAN, M. und SIDIM, T.; „*Composition of Mixed Anionic/Nonionic Surfactant Micelles*“; *Journal of Surfactants and Detergents*; **3** (2000) 77 - 80
- [477] Zhang, Z. Q., Xu, G. Y., Wang, F. und Du, G. Q.; „*Aggregation behaviors and interfacial properties of oxyethylated nonionic surfactants*“; *Journal of Dispersion Science and Technology*; **26** (2005) 297 - 302
- [478] Jellinek, J. S.; „*Tenside in der Kosmetik*“; Alfred Hüthig Verlag GmbH; **3** (1976)
- [479] Schrader, K., Frosch, P. J., Wagner, H. R., Wallhäußer, K. H. und Zahn, H.; „*Beschreibung kosmetischer Grund-, Hilfs- und Wirkstoffe*“; **2**, Hüthig Buch Verlag GmbH (1989)
- [480] Griffin, W. C.; „*Calculation of HLB Values of Non-Ionic Surfactants*“; *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*; **5** (1954) 249
- [481] AKBAS, H., SIDIM, T. und ISCAN, M.; „*Effect of Polyoxyethylene Chain Length and Electrolyte on the Viscosity of Mixed Micelles*“; *Turk J Chem*; **27** (2003) 357 - 363
- [482] Feitosa, E. und Brown, W.; „*Mixed micelles of the anionic surfactant sodium dodecyl sulfate and the nonionic pentaethylene glycol mono-n-dodecyl ether in solution*“; *Langmuir*; **14** (1998) 4460 - 4465
- [483] Ghosh, S. und Moulik, S. P.; „*Interfacial and micellization behaviors of binary and ternary mixtures of amphiphiles (Tween-20, Brij-35, and sodium dodecyl sulfate) in aqueous medium*“; *Journal of Colloid and Interface Science*; **208** (1998) 357 - 366
- [484] Shiloach, A. und Blankshtein, D.; „*Measurement and prediction of ionic/nonionic mixed micelle formation and growth*“; *Langmuir*; **14** (1998) 7166 - 7182
- [485] Zhu, L. Z. und Feng, S. L.; „*Synergistic solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons by mixed anionic-nomonic surfactants*“; *Chemosphere*; **53** (2003) 459 - 467

- [486] Oltra, A. M., Carbonell, F., Tormos, C., Iradi, A. und Saez, G. T.; „*Antioxidant enzyme activities and the production of mda and 8-oxo-dG in chronic lymphocytic leukemia*“; Free Radical Biology and Medicine; **30** (2001) 1286 - 1292
- [487] Esterbauer, H.; in: Free Radicals, Lipid Peroxidation and Cancer; (Eds) McBrien, D. C. H. und Slater T. F.; Academic Press, London (1982)
- [488] Burcham P.C.; „*Genotoxic lipid peroxidation products: their DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts*“; Mutagenesis; **13** (1998) 287 - 305
- [489] Chung, F. L., Chen, H. J. C. und Nath, R. G.; „*Lipid peroxidation as a potential endogenous source for the formation of exocyclic DNA adducts*“; Carcinogenesis; **17** (1996) 2105 - 2111
- [490] Barbin, A., Ohgaki, F., Nakamura, J., Kurrer, M., Kleihues, P. und Swenberg, J. A.; „*Endogenous deoxyribonucleic acid (DNA) damage in human tissues: A comparison of etheno-bases with aldehydic DNA lesions*“; Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention; **12** (2003) 1241 - 1247
- [491] Bartsch, H., Nair, J. und Velic, I.; „*Etheno-DNA base adducts as tools in human cancer aetiology and chemoprevention*“; Eur.J Cancer Prev.; **6** (1997) 529 - 534
- [492] Nair, J., Carmichael, P. L., Fernando, R. C., Phillips, D. H. und Bartsch, H.; „*Lipid peroxidation-induced etheno-DNA adducts in liver of patients with the genetic metal storage disorder Wilson's disease and primary hemochromatosis*“; Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.; **7** (1998) 435 - 440
- [493] Nair, J., Vaca, C. E., Velic, I., Mutanen, M., Valsta, L. M. und Bartsch, H.; „*High dietary ω -6 polyunsaturated fatty acids drastically increase the formation of etheno-DNA base adducts in white blood cells of female subjects*“; Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.; **6** (1997) 597 - 601
- [494] Blount, B. C. und Ames, B. N.; „*DNA damage in folate deficiency*“; Clin.Haematol.; **8** (1995) 461 - 478
- [495] Wickramasinghe, S. N. und Fida, S.; „*Misincorporation of uracil into the DNA of folate and B12 deficient HL-60 cells*“; Eur.J.Haematol.; **50** (1993) 127 - 131
- [496] Collins, A. R.; „*Assays for oxidative stress and antioxidant status: applications to research into the biological effectiveness of polyphenols*“; American Journal of Clinical Nutrition; **81** (2005) 261S - 267S
- [497] Lengger, C., Schoch, G. und Topp, H.; „*A high-performance liquid chromatographic method for the determination of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in urine from man and rat*“; Analytical Biochemistry; **287** (2000) 65 - 72
- [498] Orimo, H., Mei, N., Boiteux, S., Tokura, Y. und Kasai, H.; „*Analysis of 8-hydroxyguanine (8-OH-Gua) released from DNA by the formamidopyrimidine DNA glycosylase (Fpg) protein: A reliable method to estimate cellular oxidative stress*“; Journal of Radiation Research; **45** (2004) 455 - 460
- [499] Ravanat, J. L., Remaud, G. und Cadet, J.; „*Measurement of the main photooxidation products of 2'-deoxyguanosine using chromatographic methods coupled to mass spectrometry*“; Archives of Biochemistry and Biophysics; **374** (2000) 118 - 127
- [500] Beckman, K. B. und Ames, B. N.; „*Endogenous oxidative damage of mtDNA*“; Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis; **424** (1999) 51 - 58

- [501] Cadet, J., Douki, T. und Ravanat, J. L.; „*Artifacts associated with the measurement of oxidized DNA bases*“; Environmental Health Perspectives; **105** (1997) 1034 - 1039
- [502] Collins, A. R., Cadet, J., Moller, L., Poulsen, H. E. und Vina, J.; „*Are we sure we know how to measure 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA from human cells?*“; Archives of Biochemistry and Biophysics; **423** (2004) 57 - 65
- [503] Zeisig, M., Hofer, T., Cadet, J. und Moller, L.; „*³²P-postlabeling high-performance liquid chromatography (³²P-HPLC) adapted for analysis of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine*“; Carcinogenesis; **20** (1999) 1241 - 1245
- [504] Gäb, S.; „*Instrumentelle Analytik*“; Vorlesung an der Bergischen Universität Wuppertal, (2005)
- [505] Bagh, S. und Paige, M. F.; „*Construction and application of a single-molecule fluorescence microscope*“; Can.J.Chem.; **83** (2005) 435 - 442
- [506] Mikroskopie von Carl Zeiss; „*Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie*“; Herstellerinformation; (2006)
- [507] Chen, D. Y. und Dovichi, N. J.; „*Single-Molecule Detection in Capillary Electrophoresis: Molecular Shot Noise as a Fundamental Limit to Chemical Analysis*“; Anal.Chem.; **68** (1996) 690 - 696
- [508] Timperman, A. T., Khatib, K. und Sweedler, J. V.; „*Wavelength-Resolved Fluorescence Detection in Capillary Electrophoresis*“; Anal.Chem.; **67** (1995) 139 - 144
- [509] Karolin, J., Johansson, L. B. A., Strandberg, L. und Ny, T.; „*Fluorescence and Absorption Spectroscopic Properties of Dipyrrometheneboron Difluoride (BODIPY) Derivatives in Liquids, Lipid Membranes, and Proteins*“; J.Am.Chem.Soc.; **116** (1994) 7801 - 7806
- [510] Klonis, N. und Sawyer, W. H.; „*Spectral Properties of the Prototropic Forms of Fluorescein in Aqueous Solution*“; Journal of Fluorescence; **6** (1996) 147 - 157
- [511] Haugland, R. P.; „*Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*“; Molecular Probes, Eugene, OR; (1992) Online Resource
- [512] Zugel, S. A. und Lytle, F. E.; „*Two-Photon Excitation in Square and Cylindrical Capillaries*“; Applied Spectroscopy; **54** (2000) 1203 - 1207
- [513] Lübbert, M.; „*DNA Methylation Inhibitors in the Treatment of Leukemias, Myelodysplastic Syndromes and Hemoglobinopathies: Clinical Results and Possible Mechanisms of Action*“; Current Topics in Microbiology and Immunology; **249** (2000) 135 - 164
- [514] Johnson, I. D., Kang, H. C. und Haugland, R. P.; „*Fluorescent Membrane Probes Incorporating Dipyrrometheneboron Difluoride Fluorophores*“; Anal.Biochem.; **198** (1991) 228 - 237