

# **Modifizierung und Anwendung einer kapillarelektrophoretischen Methode zur Bestimmung des genomweiten Methylierungsgrades**

vom Fachbereich C (Mathematik und Naturwissenschaften)

der Bergischen Universität Wuppertal

genehmigte Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

- Doktor der Naturwissenschaften -

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von



**Markus Thiemann**

(Dipl.-Biologe)

aus Monheim am Rhein

Wuppertal, August 2008

Diese Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20080624

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3A468-20080624>]

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit

von April 2005 bis August 2008

auf Anregung von

**Herrn PD Dr. Oliver J. Schmitz**

im Arbeitskreis Analytische Chemie

unter Leitung von

**Herrn Prof. Dr. Siegmur Gäb.**

DIESE ARBEIT WURDE FINANZIERT DURCH DIE  
DEUTSCHE FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT (DFG)

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit im Arbeitskreis Analytische Chemie unter der Leitung von Prof. Dr. S. Gäß eigenständig durchgeführt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Wuppertal, 29.08.2008

---

(Markus Thiemann)

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn PD Dr. Oliver J. Schmitz für die Bereitstellung des Themas, für die kontinuierliche Unterstützung und Diskussionsbereitschaft während meiner Arbeit, sowie die Korrekturen und hilfreichen Tipps zum Verfassen der selbigen.

Herrn Prof. Dr. Siegmund Gäßler danke ich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und seine Unterstützung bei meiner Arbeit.

Ich bedanke mich bei Frau Dr. Michaela Wirtz für die hervorragende Einarbeitung in das Gebiet der Bioanalytik, sowie die stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft während meiner Arbeit.

Herrn Dr. Walter V. Turner danke ich für die Korrekturen der englischen Korrespondenz.

Herrn Bernd Wallmichrath danke ich für die vielen Tipps beim Umgang mit Microsoft Office-Programmen zur Erstellung meiner Arbeit sowie die Korrekturen.

Herrn Ralf Schiewek, Herrn Kay Plitt und Herrn Stefan Stelljes sage ich Dank für die sehr gute und fruchtbare Zusammenarbeit in Theorie und Praxis.

Frau Waltraud Schiewek danke ich für die Unterstützung bei allen die Verwaltung betreffenden Fragen.

Ein ganz besonderer Dank gilt allen Kolleginnen und Kollegen für das hervorragende Arbeitsklima und gegenseitige Hilfeleistungen bei den unterschiedlichsten Projekten.

Herrn Dr. Scherer vom Analytisch-Biologischen Forschungslabor in München danke ich für die statistische Auswertung der Rattenproben-Ergebnisse.

Herrn PD Dr. Heinz H. Schmeiser und Frau Dr. Evi Frei vom Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg danke ich für die Bereitstellung verschiedenster *in vivo*- und *in vitro*-Proben und die Möglichkeit, für 6 Wochen in Heidelberg selber forschen zu können, sowie für die stetige Diskussionsbereitschaft und Hilfe bei der Erstellung meiner Arbeit.

Herrn Dr. Volker Arlt von Institute of Cancer Resarch, Section of Molecular Carcinogenesis in England danke ich für die Bereitstellung von *in vivo*-Proben, sowie für die rege Email- Korrespondenz und telefonischen Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Stephan Störkel und Dr. Derek-John Atkins von der HELIOS Klinik in Wuppertal danke ich für die Bereitstellung von verschiedenen in Formalin fixierten Gewebeproben.

Herrn Dr. PD Günter Vogt vom Zoologischen Institut der Universität in Greifswald sage ich Dank für die Bereitstellung der Marmorkrebs-Proben sowie seine Bereitschaft zur Diskussion.

Herrn Prof. Dr. Karl Skorecki vom Technion Israel Institute of Technology und Dr. Liran Shlush vom Israel Medical Institute (INMI) danke ich für die Bereitstellung der DNA Proben von israelischen Kampftauchern.

Für die Finanzierung der Arbeit und meiner Stelle bedanke ich mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die diese Arbeit erst möglich gemacht hat.

Besonders möchte ich meinen Eltern und meiner Frau danken für ihre Unterstützung während meines gesamten Studiums.

*Meinen Eltern*

*und*

*Deniz*





## Abkürzungsverzeichnis

3'-dAMP	2'-Desoxyadenosin-3'-monophosphat
3-NBA	3-Nitrobenzanthron
4-ABP	4-Aminobiphenyl
5m-dC	5'-Methylcytosin
5m-dCMP	5'-Methyl-2'-desoxycytidin-3'-monophosphat
8-Oxo-dGMP	8-Oxo-2'-desoxyguanosin-3'-monophosphat
A	Adenin
ABC-Translokator	ATP-binding cassetten Tanslokator
ACN	Acetonitril
AD	Außendurchmesser
AP site	apurinic site; 2'-Desoxyribose-3'-monophosphat
AS	Angelman-Syndrom
ATP	Adenosintriphosphat
B <sub>12</sub>	Vitamin B <sub>12</sub>
B[a]P	Benzo[a]pyren
B[c]F	Benzo[c]fluoren
B[e]P	Benzo[e]pyren
bisulfite-PCR	Bisulfit Restriktionsanalyse
BODIPY	4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-propionylethylendiamin-hydrochlorid
BSA	bovine serum albumin
BWS	Beckwith-Wiedemann-Syndrom
C	Cytosin
C-8-dG	C-8 Desoxyguanosin
CE	Kapillarelektrophorese
CE-LIF	Kapillarelektrophorese mit Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion
CE-UV	Kapillarelektrophorese mit ultravioletter Detektion
CCORDA	closed-circuit oxygen rebreathing diving apparatus
CpG-Island	kumulierende 5'-CG-3'-Dinukleotide
CT-DNA	Kalbsthymus-DNA

CYP	Cytochrom P450
CZE	Kapillarzonenelektrophorese
dAMP	2'-Desoxyadenosin-3'-monophosphat
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM bzw. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Dichlormethan
dCMP	2'-Desoxycytidin-3'-monophosphat
dGMP	2'-Desoxyguanosin-3'-monophosphat
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferasen
dTMP	2'-Desoxythymidin-3'-monophosphat
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid- hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FAD	Flavinadenindinukleotid
FCS	fetal calf serum (fetales oder fötales Kälberserum)
G	Guanin
HCl	Salzsäure (Hydrogenchlorid)
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HRN	hepatic cytochrom P450 reductase null
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
HPLC-UV	HPLC mit ultravioletter Detektion
HPLC-LIF	HPLC mit Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion
HSI	hepatopankreatisch-somatischer Index
IC	Imprinting-Centrum
ICF-Syndrom	Immunodeficiency, centromeric instability, facial anomalies
ICR	imprinting control region
ID	Innendurchmesser
Igf	Insulin-like-growth Faktor
K <sub>F</sub>	Korrekturfaktor

KV	Kilovolt
LC/ESI-MS	Liquid chromatography electrospray ionisation mass spectrometry
meC	Korrigierte Fläche von 5m-dCMP
MECP2	methyl CpG binding protein 2
MEKC	Micellare elektrokinetische Chromatographie
MeOH	Methanol
MN	Mikrokokkennuklease
m-RNA	Messenger-RNA
MS	Massenspektrometrie
MSP	methylierungsspezifische PCR
MS-SNuPE	methylation-sensitive single nucleotide primer extension
NADPH	reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
Na-Phosphat-Puffer	Natrium Phosphatpuffer
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
OSI	Ovarien-somatische Index
p-53 Protein	Tumorsuppressorprotein (Name p-53 kommt von der Molekularenmasse von 53 kDa)
PAK	Polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoff
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RAL	relative adduct labeling
RB-Protein	Retinoblastoma Protein
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
RT	Raumtemperatur
Psi	Pounds-force per square inch
PWS	Pradar-Willi-Syndrom
Rf	Responsfaktor
RFU	relative fluorescence unit
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RP	reversed phase
RAS-Protein	Rat sarcoma Protein (Proto-Onkogen)

SAM	S-Adenosyl-Methionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOP	Standard-Operating-Procedure
SPD	Milz-Phosphodiesterase
SRB-Assay	Sulforhodamin B-Assay
T	Thymin
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TL	totale Länge
TPB	Natriumtetraphenylborat
Tris-Puffer	Tris(hydroxymethyl)aminomethan Puffer
t-RNA	Transfer-RNA
U	Uracil
UPD	uniparentale Disomie
V79MZ	Lungenfibroblasten-Zelllinie des Mainzer Subklons
wt	Wild-Typ
Xist-RNA	X inactive specific transcript-RNA
ZNS	Zentrales-Nerven-System
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$	$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-2' -Desoxyadenosintriphosphat}$

---

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	3
1.1	DNA-Replikation.....	3
1.2	Gen-Expression .....	5
1.3	Krebsentstehung .....	7
1.3.1	Ursachen der Krebsentstehung .....	11
1.4	DNA-Addukte .....	13
1.5	Mutationen .....	16
1.6	Tumorzelle .....	19
1.7	Epigenetische Prägung.....	20
1.8	DNA-Methylierung.....	24
1.8.1	Auswirkungen des methylierten Cytosins auf die Zelle.....	26
1.8.2	Einfluss des Methylierungsgrades auf die Krebsentstehung .....	27
1.8.3	Beeinflussung des Methylierungsgrades.....	29
1.8.4	Methoden zur Bestimmung des genomweiten und promotorspezifischen Methylierungsgrades .....	31
2	Problemstellung und Zielsetzung .....	32
3	Ergebnisse und Diskussion .....	33
3.1	Bestimmung des genomweiten DNA-Methylierungsgrades mittels CE-LIF .....	33
3.2	Einfluss von Kanzerogenen auf den genomweiten Methylierungsgrad .....	36
3.2.1	Analyse von Rattengewebe nach der Behandlung mit 3-Nitrobenzanthron .....	36
3.2.2	Zellkultorexperimente mit V79-Zelllinien .....	43
3.2.3	Ablauf des Zellkulturversuches .....	45
3.2.4	Methylierungsgrades der mit Kanzerogenen inkubierter Zelllinien .....	46
3.3	Untersuchung der clearance von Benzo[ <i>a</i> ]pyren im Blut von Knockout-Mäusen.....	50
3.4	Weiterentwicklung der Probenaufbereitung für die CE-LIF-Methode.....	58
3.4.1	Entfernung des Überschusses an EDC und BODIPY nach erfolgter Derivatisierung.....	60
3.4.2	Reproduzierbarkeit der Probenvorbereitung .....	63
3.4.3	Überprüfung der Probenstabilität bei Raumtemperatur .....	63
3.4.4	Langzeitlagerung.....	65
3.4.5	Untersuchung von Realproben mit neuer Probenaufbereitung.....	66
3.5	Analyse des Methylierungsgrades von Marmorkrebsen.....	68

3.5.1 Methylierungsgrad der Muskulatur und des Hepatopankreas von Marmorkrebsen.....	70
3.6 Untersuchungen zur Korrelation des Methylierungsgrades mit dem oxidativen Stress .....	73
3.6.1 Versuchsaufbau und Methylierungsgrad der DNA israelischer Kampftaucher ....	74
3.7 Bestimmung des genomweiten Methylierungsgrades von mit Formalin fixierten Gewebeproben.....	77
3.7.1 Bestimmung des Methylierungsgrades von gefrorener und fixierter Nieren-DNA .....	78
3.7.2 Versuchsaufbau der 2. Studie zur Untersuchung von fixiertem Blasengewebe....	79
3.8 Probleme der Methode.....	82
3.8.1 Enzymabhängigkeit der Methode .....	82
3.8.2 Veränderung der Fluoreszenzmarkerqualität BODIPY® FL EDA.....	85
3.8.3 Einfluss der verwendeten Kapillare auf die Empfindlichkeit der Analysen .....	87
4 Zusammenfassung.....	90
5 Experimenteller Teil.....	92
5.1 Herstellung des Enzymmixes (MN/SPD) für die DNA-Hydrolyse.....	92
5.1.1 Aufkonzentrierung der SPD für die anschließende Dialyse.....	92
5.1.2 Dialyse der Enzyme .....	92
5.2 Isolierung von DNA aus Gewebeproben .....	94
5.3 DNA-Quantifizierung .....	94
5.4 Herstellung von Trenn-, Hydrolyse- und Derivatisierungs-puffer .....	94
5.5 Vorbereitung einer Kapillare.....	95
5.5.1 heat-curing einer Kapillare .....	95
5.5.2 Präparation eines Detektorfensters.....	96
5.5.3 Konditionierung einer Kapillare .....	96
5.6 Probenvorbereitung für 1 µg und 10 µg DNA .....	96
5.6.1 Hydrolyse von 1 µg bzw. 10 µg DNA .....	97
5.6.2 Derivatisierung der DNA .....	97
5.6.3 Derivatisierung einer 1 µg DNA-Probe .....	97
5.6.4 Derivatisierung einer 10 µg DNA-Probe .....	97
5.6.5 Lagerung der derivatisierten Proben .....	97
5.7 Entfernung des Überschusses an BODIPY und EDC nach der Derivatisierung.....	98
5.7.1 Fällung einer 1 µg DNA-Probe.....	98

---

5.7.2 Fällung einer 10 µg DNA-Probe.....	98
5.7.3 Lagerung der gefällten Proben.....	99
5.8 Bestimmung der Korrekturfaktoren.....	99
5.8.1 Präparation der Lambda-DNA.....	99
5.8.2 Restriktionsverdau der Lambda-DNA .....	99
5.9 Durchführung einer kapillarelektrophoretischen Messung.....	100
5.10 Methoden für die Zellkulturversuche im DKFZ.....	101
5.10.1 Verwendete Zelllinien .....	101
5.10.2 Kultivierung von V79-Zellen.....	101
5.10.3 Ablösen von V79-Zellen mittels Trypsin / EDTA.....	102
5.10.4 Passagieren von V79-Zellen .....	102
5.10.5 Bestimmung der Zellzahl .....	102
5.10.6 Einfrieren von V79-Zellen.....	102
5.10.7 Auftauen von V79-Zellen.....	103
5.10.8 Toxizitätstest.....	103
5.10.9 SRB-Assay.....	103
5.10.10 Inkubation der V79MZ-Zellen mit den PAK`s.....	104
5.10.11 Ernte der V79MZ-Zellen .....	104
5.10.12 Enzymaktivitätsbestimmung.....	105
5.11 Präparation der Mäuseblutproben.....	105
5.11.1 Detektion von Benzo[ <i>a</i> ]pyren im Blut mittel HPLC-LIF .....	105
5.12 Geräte und Materialien.....	106
5.13 Chemikalien.....	110
6 Anhang.....	114
6.1 Abbildungsverzeichnis.....	126
6.2 Tabellenverzeichnis .....	127
7 Literaturverzeichnis.....	128





**Abstract**

In this work the capillary electrophoresis method developed by Schmitz for the determination of the genome-wide DNA methylation level was used and further optimised.

The surplus of the fluorescence marker BODIPY FL EDA left after derivatisation leads with the method used to fluorophoric decomposition products that produce interfering signals in the electropherogram and after some hours' storage in the autosampler prevent the analysis of a sample. To increase the sample throughput of the method, after the derivatisation the surplus of the fluorescence marker was precipitated with sodium tetraphenyl borate, dissolved in dichloromethane and separated by centrifugation from the aqueous phase, which contains the phosphoramidate to be analyzed. The sample throughput was thereby increased from 75 to 250 analyses per week [1].

The method was to be used i. a. to examine whether the regulation of the methylation level is suitable as a genotoxicity test. With *in vivo* experiments, a significant change of the methylation level in the small intestine and the lung of rats could be ascertained as early as 48 h after a single application of 3-nitrobenzanthrone. *In vitro* experiments then carried out with V79 cells (which express cytochrome P450 enzyme) with four cancerogens showed, because of surprisingly low DNA-adduct formation, no significant change in the methylation level. In order to understand these unexpected results better, in collaboration with several European working groups, knock-out mice, in which the cytochrome P450 was inactivated, were treated with benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P) and their metabolism examined. To this end an HPLC method with fluorescence detection was developed, by means of which the clearance of B[*a*]P from mouse blood could be determined. In cooperation with the other working groups it was found that, as a result of the absence of the cytochrome P450 activity, increased DNA-adduct formation took place [2]. This is contrary to the popular opinion that the increased level of DNA adducts results from the formation of PAH metabolites by cytochrome P450.

With the new sample preparation, the DNA-methylation level in non-mammals, such as the marbled crayfish, could also be investigated for the first time. On account of the size of these animals, only 1- $\mu$ g DNA samples could be used. The methylation level was found to correlate with the size and weight of the animals [3].

Further, the first experiments were carried out which might indicate a connection between oxidative stress and the methylation level. For this, DNA samples of Israeli combat divers who dive with hyperbaric oxygen were compared with those of non-diving elite soldiers. However, no significant differences could be ascertained among the samples to be analysed. Perhaps there is no correlation between oxidative stress and the methylation level, but it is also possible that the duration of the oxidative stress (five months) was not long enough for a definitive statement to be made.

To determine whether the capillary electrophoresis method for determining the genome-wide methylation level could be used to analyse tissue from tumour banks, as well, this study examined whether the customary fixation of tissue with formalin has an influence on the determinable methylation level. It turned out that the methylation level of frozen kidney tissue was about 20% lower than in kidney tissue fixed with formalin. A follow-up study was therefore designed to look at whether the fixation time had a significant influence on the methylation level. For this, bladder tissue from five patients was fixed for 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 and 48 h in formalin, and in each case the DNA methylation level was analysed. The methylation level varied greatly in both directions. This was probably due to the inhomogeneous samples, because it was afterwards discovered that the bladder tissue in all cases was inflamed and in two samples a tumour was even present. Even if the results of the study indicate the problems with tissue fixation, the relevance of the methylation level in various illnesses nevertheless becomes clear.

# 1 Einleitung

Die Zellteilung ist eine der grundlegenden Ereignisse des Lebens. Ohne eine kontrollierte Zellteilung wäre ein Organismus nicht lebensfähig. Ein erwachsener Mensch besteht aus etwa  $10^{14}$  Zellen, wovon cirka  $5 \times 10^6$  Zellen jede Sekunde absterben. Jedoch im Zuge der Zellteilung werden fast ebenso viele Zellen auch wieder neu gebildet, was die absolute Zellanzahl annähernd konstant hält [4, 5]. Hierbei nehmen die DNA-Replikation sowie die Gen-Expression einen sehr hohen Stellenwert ein.

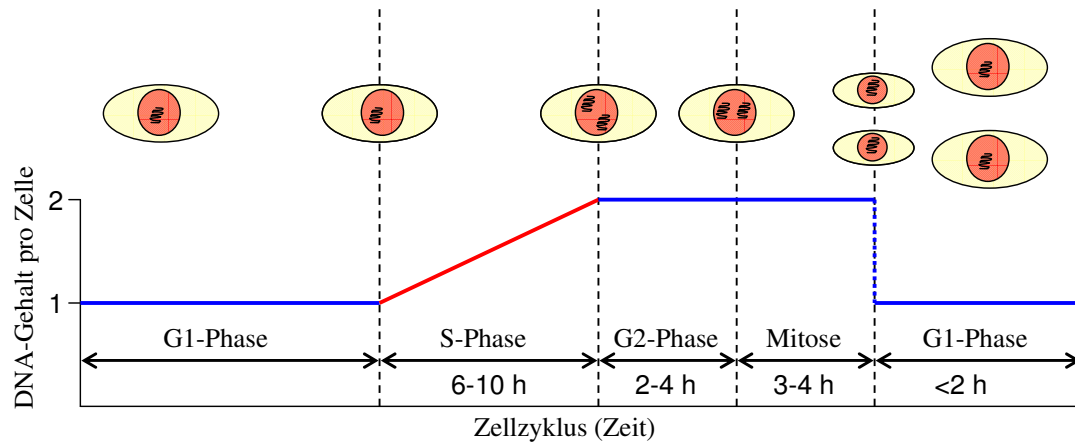
## 1.1 DNA-Replikation

Die DNA-Replikation muss folgenden Anforderungen genüge leisten:

Sie muss sehr schnell ablaufen, um den Verlust an Zellen durch Verletzungen, Entzündungen sowie das normale Zellsterben durch Alterung ausgleichen zu können [6 - 8]. Ebenso wichtig ist eine hohe Genauigkeit während der Replikation, um die Genomstabilität zu wahren und das Fixieren von Mutationen möglichst gering zu halten [8, 9]. So lässt sich die DNA-Replikation in die drei Stadien Initiation, Elongation und Termination unterteilen.

An diesen Vorgängen sind eine Vielzahl verschiedener Proteine und Enzyme beteiligt, die spezifische Aufgaben während des Synthese-Zyklus wahrnehmen. Schon das Verändern bzw. Fehlen von einzelnen Proteinen kann den Replikationsabbruch sowie den anschließenden Zelluntergang zufolge haben [6, 10].

Das menschliche Genom besteht aus  $3 \times 10^9$  Basenpaaren im haploiden Chromosomensatz mit 23 Chromosomen, welches sich semikonservativ repliziert [7, 11]. Für eine möglichst schnelle Replikation stehen  $10^4 - 10^5$  Startsequenzen pro Zelle zur Verfügung [6, 12 - 16], die in sogenannten Replikons von 2 - 9 Startregionen organisiert sind. Die Startpunkte der Replikation sind unterschiedlich weit, im Durchschnitt 111 Kbp [9] voneinander entfernt. Die Geschwindigkeit, mit der die DNA-Synthese vorschreitet, kann ebenfalls stark variieren und liegt durchschnittlich bei ca. 1,5 Kbp/min [6, 9, 12]. Die DNA-Replikation findet nur in einem kleinen Zellzyklusabschnitt statt, der sogenannten S-Phase (Synthese-Phase). Die folgende Abbildung zeigt den zeitlichen Ablauf eines normalen Zellzykluses in Bezug auf die DNA-Menge in den Zellen [6, 17].



**Abbildung 1:** Ablauf des Zellzyklus nach [7] modifiziert. Sie zeigt den schematischen Ablauf des Zellzyklus mit den verschiedenen Phasen und Zeiten, sowie die relative DNA-Menge während eines Zyklus in einer Zelle.

Im Folgenden soll ein stark vereinfachter Ablauf der Replikation von Anfang bis zum Ende skizziert werden:

### 1. Initiation

- Erkennung der Startsequenz (des Initiationsbereiches)
- Lokale Entwindung und Trennung der elterlichen DNA-Stränge
- Stabilisierung der Einzelstränge

Die Initiation der Replikation findet während der G1 - Phase statt. Alle an diesem Vorgang beteiligten Proteine binden nacheinander an der Initiationssequenz an und bilden so den Präinitiationskomplex aus.

### 2. Elongation

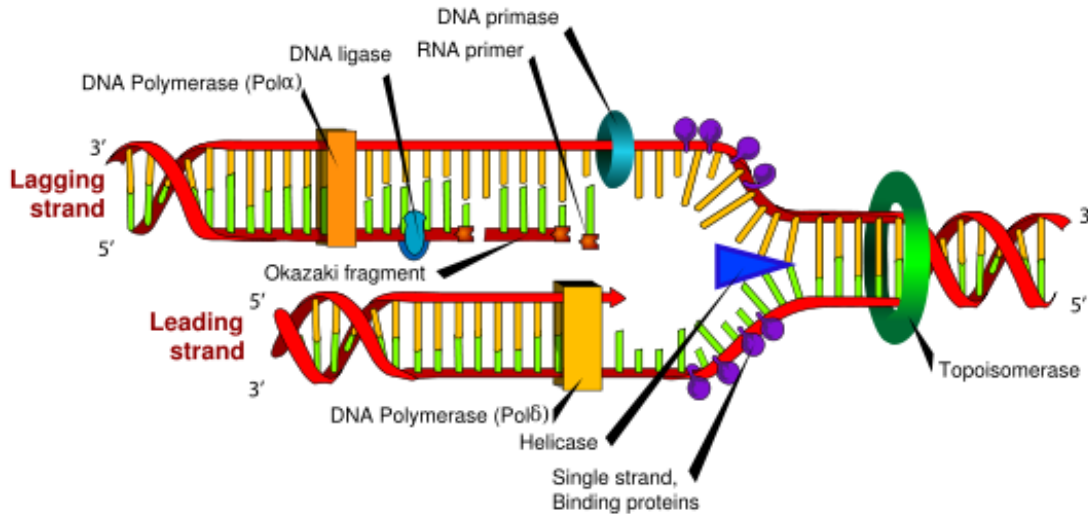
- Anlagerung von DNA-Polymerasen an den Präinitiationskomplex
- Entwindung der Elternstränge
- Bidirektionales Fortschreiten der DNA-Synthese

Die Elongation findet während der sogenannten S-Phase im Zellzyklus statt und beschreibt den Ablauf der semidiskontinuierlichen DNA-Synthese, die nur während der S-Phase stattfinden kann. An der DNA-Synthese sind mehrere DNA-Polymerasen beteiligt, die zum Teil auch Reparaturfunktionen besitzen (Abbildung 2).

### 3. Termination

- Trennung der verdoppelten Chromosomen

Der Vorgang der Termination ist noch relativ unerforscht. Es wird angenommen, dass die DNA-Synthese durch das Zusammentreffen zweier Replikationsgabeln bzw. durch Kernmembran assoziierte DNA-Abschnitte beendet wird [6, 7, 18].



**Abbildung 2:** Replikationsgabel von Mariana Ruiz [19] wurde in modifizierter Form übernommen. Sie zeigt eine stark vereinfachte Darstellung einer Replikationsgabel von Eukaryonten: Nach einer erfolgreichen Initiation bewegt sich nun die DNA durch den aktiven Replikationskomplex hindurch, da die Replikationsgabel selbst mit dem Zellkern verbunden ist (in der Abbildung nicht dargestellt) [8, 12, 13, 20]. Hierbei sorgen Topoisomerasen für die Entwindung, die folgende Helikase für die Trennung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen und die DNA-Einzelstrang bindenden Proteine (DBP) für die Stabilisierung. Der Führungsstrang in 5'-3' Richtung wird kontinuierlich durch DNA-Polymerasen  $\delta$  synthetisiert. Der Folgestrang in 3'-5' Richtung wird diskontinuierlich von Polymerase  $\alpha$  synthetisiert und benötigt regelmäßige RNA-Primer (etwa alle 200 bp), die von einer Primase bereitgestellt werden. Die RNA-Primer werden anschließend durch DNA-Fragmente ausgetauscht. Zum Schluss werden die sogenannten Okazaki-Fragmente (100-300 bp lang) durch eine Ligase zu einem durchgehenden DNA-Strang verbunden [6, 7, 10, 16, 17, 21].

## 1.2 Gen-Expression

Die in Abbildung 3 schematisch dargestellte Gen-Expression beschreibt die Umsetzung der Information eines Gens durch Transkription (Abschreiben) und Translation (Übersetzen). Anders formuliert: Gen-Expression ist die Biosynthese von RNA und Protein aus den genetischen Informationen und ein wesentliches Element jeder Entwicklung [6, 7, 17, 18, 22]. Bei der Gen-Expression wird die Erbinformation der DNA in RNA transkribiert.

Es werden insgesamt drei Arten von RNA unterschieden:

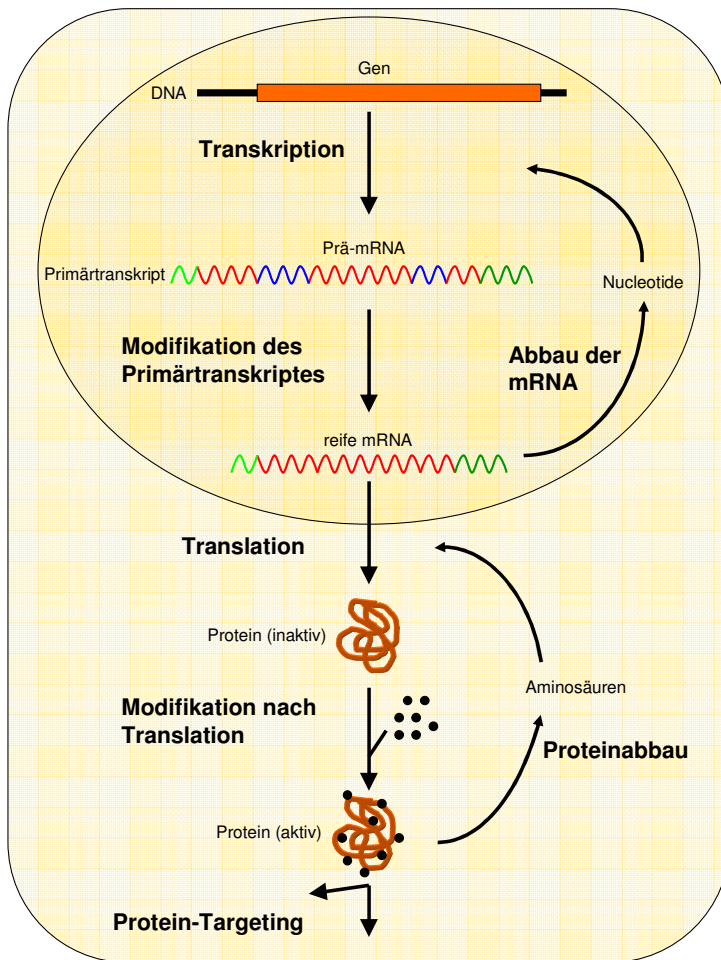
- die mRNA (Messenger-RNA) codiert die Aminosäuresequenz,
- die tRNA (Transfer-RNA) bringt die Aminosäuren im Cytoplasma zur mRNA

- die rRNA (Ribosomale RNA) ist ein Bestandteil der Ribosomen, die für die Synthese der Peptide verantwortlich ist [22].

Im Cytoplasma der Zelle wird der genetische Code (Nukleotidtriplett) durch Ribosomen und tRNA in entsprechende Aminosäuren translatiert und zu einer Polypeptidkette verknüpft. Anschließend erfolgt eine Faltung der Polypeptidkette zu einem Protein mit nachfolgender Aktivierung [6, 22].

Im Folgenden soll etwas näher auf die Regulation der Expression - speziell der Expression von mRNA – eingegangen werden. Die Expression von Genen ist ein gut regulierbarer Prozess und lässt sich in sieben wesentliche Regulationsebenen einteilen:

1. Strukturelle Aktivierung des Gens [23 - 25]
  - Überführung des Heterochromatins ins Euchromatin, um den Transkriptionsfaktoren den Zugang zu Enhancer [26], Promotor [27] und Gen zu ermöglichen.
2. Initiation der RNA-Synthese (Transkription)
  - Nach der Bindung der Transkriptionsfaktoren kann die RNA-Polymerase an den Präinitiationskomplex binden und mit der RNA-Synthese starten [28, 28, 29].
3. Posttranskriptionale Prozessierung
  - Der Reifeprozess der RNA umfasst eine Reihe von Modifikationen wie z.B. Endcapping, Polyadenylierung, Spleißen und RNA-Editing [6, 7, 17, 18, 22].
4. Abbau bzw. Transport der RNA aus dem Kern
  - Nur etwa 25 % der synthetisierten RNA verlässt den Zellkern, da die Halbwertszeit der RNA bei 3-60 min liegt [17].
5. Initiation der Proteinsynthese (Translation)
  - Erkennung der RNA durch Ribosomen und anschließende Synthese [30].
6. Posttranslationale Modifikation
  - Faltung und Modifikation der Aminosäuresequenz [6]
7. Abbau bzw. Aktivierung der Proteine [18]



**Abbildung 3:** Schematischer Verlauf der Genexpression. Unterteilt sich in Transkription, Prozessierung im Zellkern und Translation der mRNA in eine Aminosäuresequenz mit anschließender Modifikation (Aktivierung) im Cytoplasma der Zelle.

Zusammenfassend lässt sich über die Genexpression sagen, dass sie maßgeblich Einfluss auf die Veränderung eines Phänotyps hat und somit ein wesentliches Element der Entwicklung darstellt.

### 1.3 Krebsentstehung

Krebs ist eine Erkrankung des Erbguts vielzelliger Organismen, bei der die Zelle ihre normale Wachstumskontrolle verloren hat und unbegrenzt wachsen kann. Bei diesem unregulierten Wachstum wird gesundes Gewebe und letztendlich der Organismus zerstört. Krebszellen entstehen durch mehrstufige Mutationen der DNA, die eine kontrollierte Zellproliferation ausschalten und zur Ausbildung eines Tumors führen [6, 7, 17, 22, 31].

Unterschieden wird zwischen zwei Arten von Tumoren: die malignen (bösartigen) und die benignen (gutartigen). Die malignen Tumore zeichnen sich durch eine erhöhte Zellproliferati-

onsrate, ein undifferenziertes-, infiltrierendes und metastasierendes Wachstum aus. Die benignen Tumore wachsen langsamer, differenziert und infiltrieren nicht, da sie sich in einer Kapsel befinden und auch keine Metastasen ausbilden [6, 7, 22, 32]. Krebs hat in den letzten Jahren eine immer größere Bedeutung in den Industriestaaten erlangt, da dies die zweithäufigste Todesursache nach Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems darstellt [33, 34]. Es gibt mehr als zweihundert verschiedene Krebsarten, die alle denselben Auslöser – eine Veränderung des Erbguts - aufweisen [7, 35, 36].

Dabei werden 3 Gruppen von Krebserkrankungen unterschieden:

- Sarkome entstehen im Binde-, Stütz- und Nervengewebe (Knochen, Knorpel, Nerven, Blutgefäße, Muskeln und Fett)
- Karzinome entstehen im Epithelgewebe (90 % aller Tumore [35, 37]) (Haut, Auskleidung von Körperhöhlen, Organen und im Drüsengewebe)
- Leukämie und Lymphome (Milz und Knochenmark)

Auf Deutschland bezogen bedeutet das, dass mehr als 420.000 Neuerkrankungen jährlich (Zahlen von 2002) [38] auftreten, wovon mehr als die Hälfte tödlich verlaufen. Die Anzahl der Neuerkrankungen ist in den letzten Jahrzehnten aufgrund einer stetig steigenden Lebenserwartung der Bevölkerung angestiegen. Die Krebssterberate ist allerdings leicht rückläufig, was vor allem auf bessere Früherkennungs-Diagnostik (z.B. Computertomographie) sowie regelmäßige Vorsorgeuntersuchungen zurückzuführen ist. Die drei häufigsten Krebserkrankungen bei Männern sind Prostata-, Darm- und Lungenkrebs, bei Frauen Brustdrüsen-, Darm- und Lungenkrebs. Die meisten Todesfälle durch Krebserkrankungen bei Männern werden durch Lungenkrebs, bei Frauen durch Brustdrüsenkrebs hervorgerufen [38].

Die Hauptrisiken, an Krebs zu erkranken, stellen das Rauchen (25 bis 30 %) sowie eine nicht ausgewogene Ernährung (20 bis 40 %) dar. Weitere Risiken stellen Virusinfektionen mit 15 % sowie beruflich bedingte Schadstoffbelastungen, die noch etwa 7 % aller Krebserkrankungen verursacht, dar. Lediglich 5 bis 10 % aller Krebserkrankungen haben einen erblichen bzw. einen genetischen Hintergrund [39 - 42].

Der wichtigste Schritt im Kampf gegen Krebs ist dessen Prävention, wodurch mehr als die Hälfte aller Krebserkrankungen verhindert werden könnte (Rauchen und Ernährung) [39]. Ein ebenfalls wichtiger Punkt ist die Krebs-Früherkennung durch regelmäßige Vorsorgeuntersuchungen mit empfindlichen, bildgebenden Untersuchungsgeräten (Computertomographie), sowie die Identifizierung von Biomarkern, die die Suche nach Tumoren erleichtern. Die Iden-

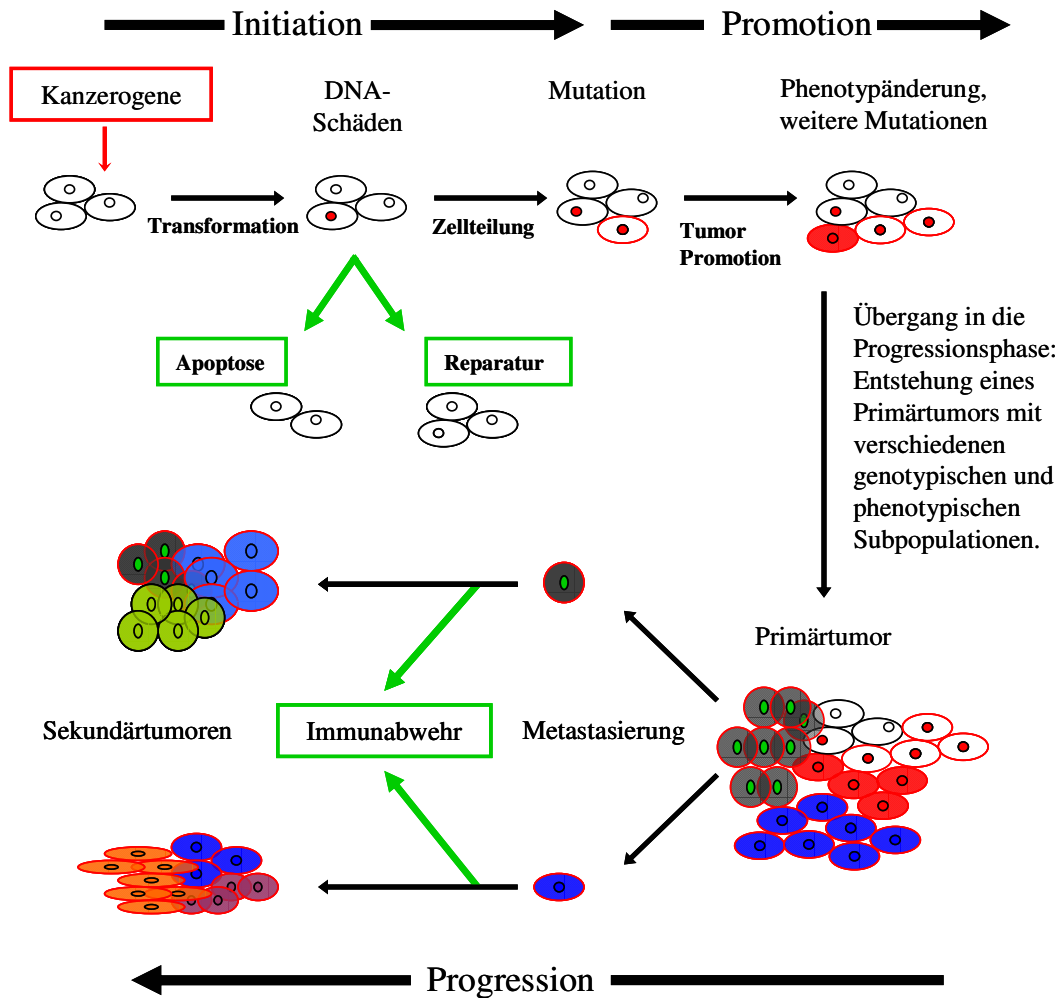


tifizierung von Kanzerogenen, die mit der Entstehung von Krebs in Verbindung gebracht werden, stellt ebenfalls einen wichtigen Schritt im Kampf gegen Krebs dar [39, 40, 43, 44]. Im Jahre 1914 stellte *Theodor Boveri* die Hypothese auf, dass die Ursache für die Krebsentstehung ein abnormer Chromatinbestand der Zelle sei, welcher durch erbliche Disposition, intrazelluläre Parasiten und/oder äußere Einwirkungen zustande kommt. Infolgedessen kommt es zu einem unreparablen Defekt im Zellkern der Zelle [45].

Nach heutigem Wissensstand kann man die Hypothese von *Boveri* weitgehend bestätigen. Der Krebsentstehung liegt eine somatische Mutation von Genen im Zellkern zugrunde, die unter anderem Proteine für die Genexpression und/oder Zellproliferation kodieren [7, 46]. Die Entstehung von Krebs läuft in mehreren Stufen ab, so dass eine Mutation alleine nicht ausreicht, um eine normale Zelle in eine Tumor- bzw. Krebszelle zu überführen [7, 22, 32, 37, 46 - 48]. Der Verlauf einer Tumorentstehung gleicht einer Evolution, wobei die Selektion auf eine immer schnellere und unabhängigere Zellproliferation liegt [7, 46]. Die Entstehung von Krebs lässt sich vereinfacht in folgende Schritte einteilen: *Initiation*, *Promotion* und *Progression* [37, 48] und ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

Die *Initiation* beschreibt die Veränderung der DNA durch Kanzerogene und das Auftreten der ersten Mutation, die der betroffenen Zelle einen Wachstumsvorteil gegenüber den nicht mutierten Zellen verschafft und sich infolge dessen häufiger teilen kann [22, 37]. Die Initiati-on einer Zelle erfolgt in Tierexperimenten mit hohen Dosen kanzerogener Stoffe nur sehr selten (1 von  $10^6$  Zellen), zumal die *Initiation* eine Stammzelle (undifferenzierte teilungsfähige Zelle) treffen muss. Besonders anfällig für die initiierende Wirkung von Kanzerogenen sind Gewebe in ihrer Entwicklungsphase [37].

Die *Promotion* bezeichnet den Prozess, der die Entstehung eines Tumors nach vorheriger *Initiation* beschleunigt und verstärkt [37]. In dieser Phase kommt es zu weiteren Mutationen der Kontroll-Gene (Tumorsuppressor-Gene und Protoonkogene) einer Zelle. Allgemein beschreibt die *Promotion* die Vermehrung initiiertter Zellen [37]. Hierdurch kommt es zu einer erneuten Erhöhung der Proliferationsrate, einer veränderten Genexpression und einer verminderten Entdifferenzierung der Zellen [22].



**Abbildung 4:** Mehrstufen-Modell der Tumorentstehung, modifiziert aus Schirmacher [49]. Die Abbildung zeigt die Entwicklung eines Primärtumors bis hin zur Metastasierung mit anschließender Bildung von Sekundärtumoren aus einer einzigen Vorläuferzelle. In grün hervorgehoben wurden die Prozesse, die einer Tumorentwicklung entgegen wirken, wobei die Apoptose auch in späteren Stadien der Tumorentwicklung stattfinden kann.

Die *Progression* beschreibt das Umwandeln eines benignen Tumors in ein malignes Geschwulst [37]. Die Progression lässt sich noch einmal unterteilen in die *Tumor-Angiogenese*, die *Invasion* und die *Metastasierung*.

Bei der *Tumor-Angiogenese* regt das Tumorgewebe eine eigene Blutversorgung über Kapillaren an. Ab einem Tumordurchmesser von 1 mm muss eine Versorgung der Zellen über eigene Gefäße erfolgen, da die alleinige Diffusion jetzt nicht mehr ausreicht. Erfolgt diese Versorgung nicht, hört der Tumor auf zu wachsen und tritt in eine so genannte Schlafphase ein [36].

Die *Invasion* beschreibt den Abschnitt, bei der sich die Tumorzellen in das umliegende Gewebe ausbreiten, so dass eine veränderte Zell-Zell-Wechselwirkung (Wegfall der Kontaktinhibition) stattfindet.

Der letzte Schritt der malignen Tumor-Progression ist die *Metastasierung*, bei der sich einzelne Tumorzellen vom Primär-Tumor lösen und in Blut und/oder Lymphgefäße eindringen (Intravasation). Ein Sekundär-Tumor entsteht durch das Verlassen von Blut- und Lymphgefäßen in das umliegende Gewebe (Extravasation) [22]. Eine weitere Form der Verbreitung von Sekundär-Tumoren wird durch das Eindringen von Tumorzellen in Körperhölräume (z.B. Bauch) erreicht. Die hierdurch entstehenden Tumore werden als *Abklatschmetastasen* bezeichnet [32]. Metastasen können in allen Organen, außer der Augenlinse auftreten, jedoch ist die Verteilung von Gewebe zu Gewebe verschieden, sodass Metastasen besonders häufig in Lymphknoten (Halsregion), Leber, Lunge und Knochen zu finden sind, selten in ebenfalls gut durchbluteten Organen wie Herz, Milz und Knochenmuskulatur [32].

Die unterschiedliche Verteilung von sekundären Tumoren findet man auch beim primären Tumor. Bereits *Boveri* konnte feststellen, dass maligne Tumore in den verschiedenen Organen und Geweben sehr verschieden häufig auftreten. Er führte dies auf die unterschiedliche Zellteilungsrate der Organe und des Gewebes zurück, welche parallel zu der Häufigkeit des Auftretens von Tumoren stattfand [45].

Allgemein lässt sich sagen, dass Tumore in Organen z.B. Magen, Darm, Lunge und Haut, die einer stärkeren mechanischen Belastung und im direkten Kontakt zur Umwelt stehen, gehäuft auftreten. Dies lässt sich damit erklären, dass die Zellproliferation in diesen Organen häufiger stattfindet, um verbrauchte oder geschädigte Zellen zu ersetzen. Dies wiederum erhöht die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von DNA-Schäden und ihrer Fixierung im Genom [7, 32].

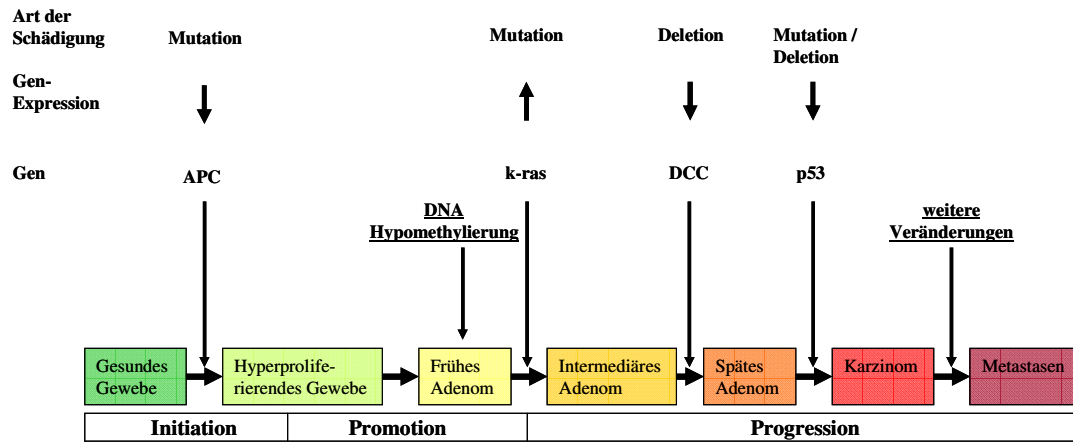
### 1.3.1 Ursachen der Krebsentstehung

Die Ursachen für eine Krebsentstehung sind vielfältig, wobei viele chemische Substanzen menschliche Tumore verursachen können [37]. Die Mutation gewisser Gene reicht aus, um den Phänotyp einer normalen Zelle in eine Krebszelle zu transformieren. Die Gene, die in einer Tumorzelle betroffen sind, heißen *Protoonkogene* und *Tumorsuppressor-Gene* [6, 7, 18, 22, 46, 50]. *Protoonkogene* werden durch Punktmutation, Chromosomen-Translokation oder Gen-Amplifikation in Onkogene transformiert, welche dadurch ihre regulative Wirkung auf den Zellzyklus verlieren [37]. Protoonkogene werden in einer normalen Zelle nur für kurze Zeit aktiviert und spielen eine Rolle in der Embryonalentwicklung, Regeneration und bei Wundheilungsprozessen [36]. Sie haben einen steuernden bzw. regulierenden Einfluss auf die Zellproliferation und umfassen folgende Genprodukte: *Wachstumsfaktoren*, die die Zelle veranlassen, in den Zellzyklus einzutreten, *Transmembranproteine*, die

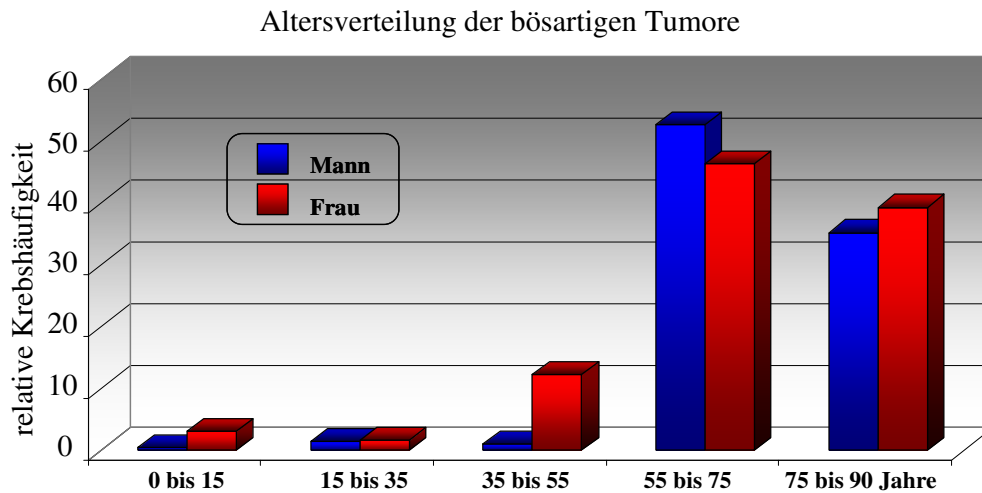
für die intrazelluläre Signalübertragung verantwortlich sind und *Transkriptionsfaktoren*, die für eine geregelte Genexpression benötigt werden. Wird durch Mutation ein Protoonkogen zu einem Onkogen aktiviert, werden dessen Genprodukte vermehrt exprimiert, wodurch das Bestreben einer Zelle, sich zu teilen, enorm verstärkt wird [22]. Für eine Aktivierung eines Onkogens reicht nur eine Mutation in einer der beiden Allele (dominanter Erbgang), um die Zellexpression und Replikation zu beeinflussen [18].

Tumorsuppressor-Gene codieren *zellwachstumshemmende* Genprodukte, die durch ihre Transformation zu einer indirekten Steigerung der Proliferationsrate führen. Genprodukte der Tumorsuppressor-Gene stellen einen Schutz der Zelle vor bösartigen Transformationen dar [51]. Durch das Ausschalten dieser Tumorsuppressor-Gene fällt die hemmende Wirkung für eine Zellproliferation weg [22]. Eine weitere Aufgabe von Tumorsuppressor-Genen (z.B. *p53*) ist das Einleiten der *Apoptose* (programmierter Zelltod). Bei irreparablen Schädigungen der DNA wird in normalen Zellen zum Schutz des Organismus vor möglichen Mutationen der Zelltod der betroffenen Zelle eingeleitet. Bei Zellen, in denen das Tumorsuppressor-Gen *p53* mutiert ist, fällt dieser Schutzmechanismus aus [6, 7, 22, 46]. Für die Inaktivierung eines Tumorsuppressor-Gens müssen beide Kopien eines Chromosoms mutieren, um eine vollständige Abschaltung des Gens zu erreichen (rezessiver Erbgang) [18, 36].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es gleichgültig ist, ob Mutationen ein Protoonkogen oder ein Tumorsuppressor-Gen treffen. Die Folge ist immer eine unkontrollierte Genexpression und/oder Zellproliferation. Jede Erstmutation in einer dieser beiden Gen-Familien zieht ein steigendes Risiko für Folgemutationen aufgrund einer erhöhten Zellteilungsrate nach sich. Anhand der in Abbildung 5 dargestellten Graphik für das Zustandekommen von Darmkrebs lässt sich der Weg von der ersten Transformation bis zur vollständigen Entwicklung eines malignen Tumors auf genetischer Basis sehr gut verdeutlichen [7]. Nicht zuletzt aufgrund der erforderlichen Mehrfachmutationen einer Zelle bis zur vollständigen Transformation in einen Krebszelle konnte bereits *Boveri* 1914 die Aussage machen: „*Krebs ist eine ausgesprochene Alterskrankheit*“ [45]. Auch diese Aussage lässt sich heute eindrucksvoll mit Zahlen und Statistiken belegen und ist in Abbildung 6 gezeigt [32, 37, 50].



**Abbildung 5:** Genetisches Modell der Entstehung von kolorektalen Tumoren. (Wurde modifiziert aus Vogelstein und Kinzler [52])



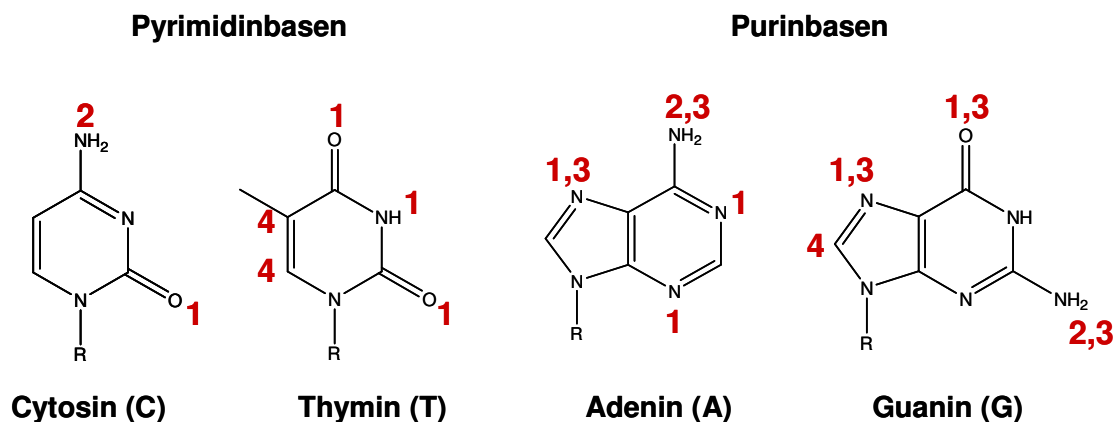
**Abbildung 6:** Altersverteilung bösartiger Tumore. (Wurde übernommen aus Schmitz-Moormann [32])

So weiß man heute, dass das Risiko an Krebs zu erkranken im Alter drastisch ansteigt. Über 90 % der neu entdeckten Kolonkarzinome werden bei Patienten über 55 Jahren gefunden. Die Inzidenz vervierfacht sich vom 60. bis zum 80. Lebensjahr eines Menschen [32].

### 1.4 DNA-Addukte

DNA-Addukte entstehen bei der Reaktion von elektrophilen Molekülen mit den Basen der DNA, wobei sich kovalente Verknüpfungen ausbilden. Diese Modifikationen können ohne Reparatur zu Mutationen führen und die Entwicklung von Krebs einleiten [12, 53 - 63].

Abbildung 7 zeigt die vier Basen der DNA und ihre möglichen Angriffspunkte für die Bildung von DNA-Addukten [64].



**Abbildung 7:** Modifizierbare Zentren der vier Nucleobasen. Die Abbildung zeigt die vier Basen der DNA mit ihren möglichen Angriffspunkten für die Bildung von Addukten. Die Zahlen von 1-4 an den Basen bezeichnen die verschiedenen Mechanismen der Adduktbildung: 1) Alkylierung; 2) Arylalkylierung; 3) Arylaminierung und 4) Oxidation (modifiziert nach [64])

Vermutlich verursacht die Aufnahme chemischer Substanzen die Mehrzahl der menschlichen Tumore [65]. Hierfür spricht, dass über 90 % aller Krebsarten bevorzugt an Epithelen auftreten, die mit exogenen Noxen (schädigende Faktoren, die auf den Organismus einwirken [32]) in direktem Kontakt zur Umwelt stehen (Haut, Magen-Darm-Trakt, Urogenital-System und Bronchialbaum) [37].

Das Auftreten von DNA-Addukten führt zu einer Vielzahl von Prozessen, wie die Hemmung der DNA-Synthese, die Hemmung von Makromolekülen in der Zelle, den Zelltod, DNA-Reparaturprozesse, die Clastogenese (Chromosomenbrüchen), der Chromosomenaustausch, die Teratogenese (Fehlbildungen) und maligne Tumorformation [37].

Es werden zwei Arten von Addukten unterschieden:

Auf der einen Seite die exogenen Addukte, die durch die kovalente Bindung exogener chemischer Kanzerogene mit der DNA gebildet werden, auf der anderen Seite die endogenen Addukte, die durch aktive Substanzen, die bei normalen physiologischen Prozessen entstehen [37].

### ***Exogene Addukte***

Genotoxische Substanzen, die zu exogenen Addukten führen, sind chemische Kanzerogene, die in direkte Kanzerogene, die Krebs induzieren können, und indirekte Kanzerogene, bei

denen zunächst eine metabolische Aktivierung erfolgen muss, um mit der DNA reagieren zu können, unterschieden werden [60, 61, 66],[37].

Letzteres ist bei den meisten chemischen Kanzerogenen der Fall [37, 61]. Zu den genotoxischen Substanzen zählen beispielsweise halogenierte Verbindungen, Nitrosamine, Nitroharnstoff, aromatische Amine und polycyclische Kohlenwasserstoffe (PAK's) [37].

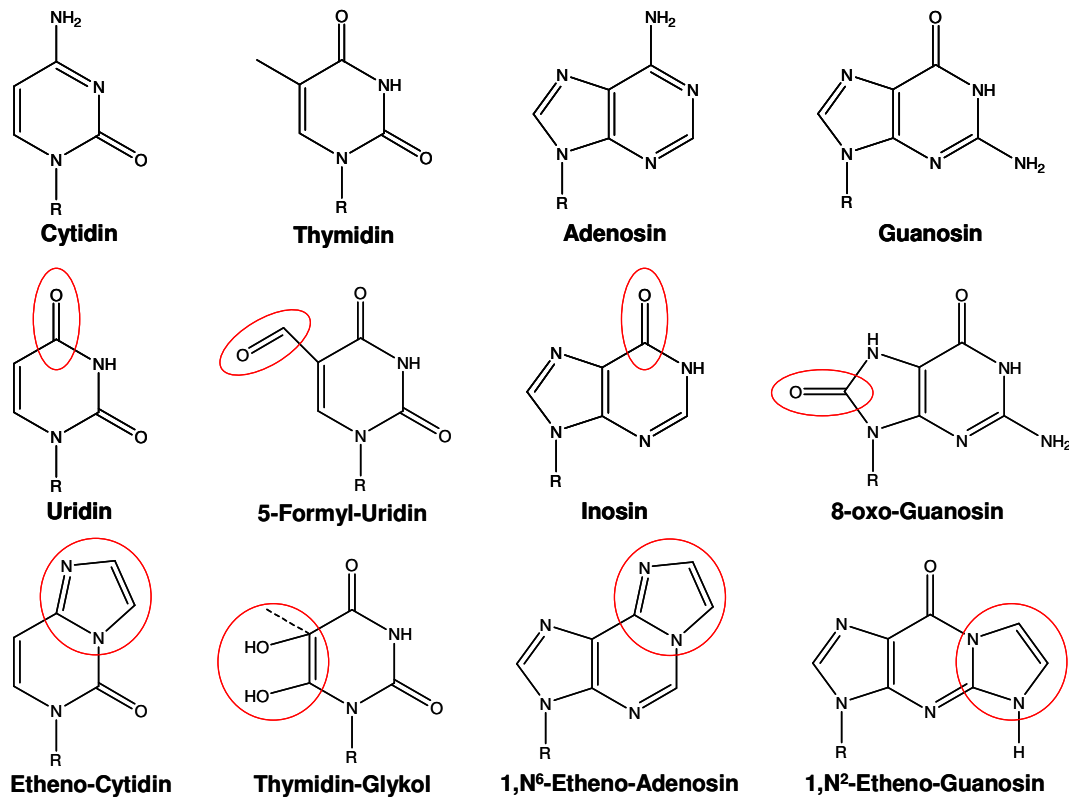
Die PAK's stehen häufig im Mittelpunkt des öffentlichen und wissenschaftlichen Interesses. Die Leitsubstanz dieser Stoffgruppe ist das Benzo[*a*]pyren. Es handelt sich bei den PAK's um Produkte, die durch die unvollständige Verbrennung von organischem Material entstehen, wie z.B. Ruß, Teer, Kohle, Petroleum, Ölen, Autoabgasen und Tabakrauch. Aber auch in Lebensmitteln wie gegrillten, gebratenen oder geräucherten Speisen sind PAK's vorhanden. Sie müssen nach ihrer Aufnahme in den Organismus zunächst metabolisch aktiviert werden, um dann als elektrophile Substanz die DNA angreifen zu können. Die Aktivierung dieser Substanzen erfolgt über körpereigene Enzymsysteme (Cytochrom P450 1A1), bei denen im Zuge des enzymatischen Abbaus Zwischenprodukte gebildet werden, die dann mit den Basen der DNA reagieren können [37, 61].

Epigenetische Kanzerogene, die ebenfalls eine krebserzeugende Wirkung besitzen, werden von den genotoxischen Substanzen unterschieden, da sie nicht direkt mit den Basen der DNA in Kontakt treten. Ihre biologische Wirkung besteht beispielsweise in einer gesteigerten regenerativen Zellproliferation, einer chronischen Entzündungsreaktion, hormonellen Einflüssen, immunologischen Wirkungen sowie einer Tumorpromotion [37].

### ***Endogene Addukte***

Endogene Addukte sind ebenfalls Modifikationen der Nukleobasen, jedoch sind diese nicht durch äußere Kanzerogene bedingt, sondern treten bei normalen physiologischen Prozessen, wie oxidativem Stress und Entzündungsreaktionen, im Körper auf [67].

Der Großteil dieser endogenen Addukte sind oxidierte Nukleobasen der DNA, die durch Intermediate verschiedener Metabolisierungswege, reaktive Stickstoffspezies, Produkte der Lipidsäureoxidation und Oxidantien verursacht werden [68 - 70]. Man geht davon aus, dass in einer einzelnen Rattenleberzelle ca. 1 Million derartige DNA-Schäden bestehen und täglich 100.000 neue DNA-Schäden entstehen. Diese werden jedoch durch DNA-Reparaturvorgänge sowie enzymatische Reduktion minimiert [37]. Das am Häufigsten zu beobachtende, durch oxidativen Stress hervorgerufene DNA-Addukt ist 8-Oxo-2'-desoxy-guanosin-3'-monophosphat (8-oxo-dGmP) [61, 67]. Beispiele für endogene Addukte sind in Abbildung 8 dargestellt.



**Abbildung 8:** Auswahl von verschiedenen endogenen DNA-Addukten, wobei oben die vier unmodifizierten Basen abgebildet sind und darunter die jeweils modifizierten [68, 71 - 73].

## 1.5 Mutationen

Mutationen sind zufällige und ungerichtete Veränderungen des Erbgutes bzw. der Nukleotidabfolge, welche eine Änderung des Phänotyps einer Zelle bzw. eines Organismus zur Folge haben kann und die von Zelle zu Zelle bzw. von Generation zu Generation weitergegeben wird [6, 7, 65]. Mutationen unterliegen dem normalen Evolutionsdruck, welcher eine Selektion ausübt in Richtung der Mutationen, die einen Vorteil gegenüber Nichtmutanten besitzt. Mutationen stellen somit eine der notwendigen Grundlagen der Evolution dar [7, 65]. Ursachen für Mutationen sind normale zelluläre Vorgänge und zufällige Wechselwirkungen mit der Umwelt. Mutationen sind unvermeidlich, jedoch verfügen die Zellen über wirkungsvolle Reparatursysteme, sodass die Zahl der Mutationen auf ein tolerierbares Maß reduziert werden kann [65, 74]. Zwei Arten von Mutationen können unterschieden werden. Auf der einen Seite die *Keimbahnmutationen*, welche sich erst von einer Generation auf die andere auswirken, auf der anderen Seite die *somatischen Mutationen* (alle Körperzellen außer Keim-



zellen), wobei der Organismus selbst betroffen ist und die Mutationen Auswirkung auf Folgegenerationen haben [7]. Im Folgenden soll nunmehr auf die somatischen Mutationen eingegangen werden.

Hierbei wird unterschieden zwischen *Genom-Mutationen* und *Genmutationen*. Die Genom-Mutationen haben in der Regel drastische Auswirkungen auf den Organismus, da sie eine Vervielfältigung eines Chromosoms (Polyploidie) bzw. den Verlust eines Chromosoms (Aneuploidie) bedeuten. Hierunter fallen ebenfalls noch Strukturänderungen der Chromosomen, wie Translokationen (Verlängerung), Deletionen (Verlust), Insertionen (Einbau) sowie Inversionen (Verdrehung) [7].

Als Genmutationen werden Punktmutationen (z.B. macht der Nukleotidaustausch 70 % der Mutationen aus) und Leseraster-Mutationen (sogenannte „frame shift“ Mutationen machen 4,3 % aus) bezeichnet, welche durch Insertionen und Deletionen hervorgerufen werden [7].

Die Folgen für den Organismus nach dem Auftreten von Mutationen können sein:

- der Zelltod („conditional-letale“-Mutation)
- der Funktionsverlust eines Gens („Loss-of-function“-Mutationen)
- die Funktionssteigerung eines Gens („Gain-of-function“-Mutation)
- die Entstehung von Krebs bei Mutationen in Wachstums-Kontrollgenen
- das Auftreten neutraler Mutationen (Veränderung der DNA-Sequenz ohne Auswirkungen auf die Funktion des Genproduktes)
- das Auftreten von stummen/stillen Mutationen (Veränderungen der DNA-Sequenz von nicht codierenden Abschnitten)

Mutationen werden darüber hinaus nach ihren Ursachen in *spontane Mutationen* (ohne äußere Ursachen) und *induzierte Mutationen* (durch Mutagene hervorgerufen) unterschieden.

Als spontane Mutationen werden folgende Änderungen der Nukleotid-Sequenz angesehen [65]:

- Replikationsfehler durch Basenfehlpaarungen während der DNA-Synthese.
- Reparaturfehler durch unzureichendes Proofreading (Korrekturlesen).
- Oxidative Schäden durch Hydroxyl-Radikale [75].
- Hydrolytische Depurinierung (der Verlust einer Base durch die Spaltung der glykosidischen Bindung).

- Hydrolytische Deaminierung (der Verlust der Aminogruppe führt zu einer direkten Verwandlung in eine andere Base).
- Inadäquates Crossing-over während der Meiose durch den Austausch von Abschnitten homologer Chromosomen.
- Integration von Transposons (DNA-Sequenzen, die sich an beliebigen Stellen im Genom einfügen).

Für das Zustandekommen von induzierten Mutationen werden beispielsweise folgende Prozesse verantwortlich gemacht [6, 66]:

- Nitrosamine bewirken DNA-Alkylierung und führen zu Basenfehlpaarungen.
- Polycyclische Kohlenwasserstoffe (PAK's) bilden sogenannte „bulky-adducts“, die bei der DNA-Replikation zu Fehlpaarungen führen.
- Ultraviolettes Licht (UV-Licht) führt zu Thymidin-Dimeren, die Replikationsfehler nach sich ziehen können.
- Ionisierende Strahlung (Röntgen/ $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -Strahlung) kann zu Einzel-/Doppelstrangbrüchen in der DNA, oxidative Schäden sowie zu Nukleotid-Dimeren führen.

Um zu testen, ob eine Substanz bzw. ein Umweltfaktor eine mutagene Wirkung besitzt, kann unter anderem ein *Ames-Test* durchgeführt werden, der ein Maß für die Stärke der mutagenen Wirkung liefert [65, 76, 77]. Der Ames-Test wird mit Bakterien durchgeführt, die durch eine Punktmutation nicht mehr in der Lage sind, auf einem Nährmedium ohne Histidin wachsen zu können. Durch das Aufbringen von mutagenen Substanzen kommt es zu Mutationen, die eine Reversion (Rückmutation) bzw. eine Suppression (Zweitmutation mit ausgleichender Wirkung auf die Erstmutation) zur Folge haben können, wodurch eine Vermehrung der Bakterien wieder möglich wird. Diese Reversionen bzw. Suppressionen können auch spontan passieren, jedoch in einem wesentlich geringeren Maß als bei dem Einsatz von mutagenen Substanzen. So liefert die Anzahl der Bakterienkulturen ein Maß für die mutagene Wirkung von Umwelteinflüssen bzw. chemischen Substanzen [65, 76, 77].

Das Auftreten von Mutationen ist, wie bereits am Anfang erwähnt, ein zufälliger und ungerichteter Prozess, jedoch ist das Auftreten von Mutationen im Genom nicht gleichmäßig verteilt. Dennoch entspricht die Anfälligkeit eines Gens für Mutationen in etwa seiner Größe. Wird die Mutationsverteilung innerhalb eines Gens betrachtet, so kann festgestellt werden, dass diese nicht rein zufällig verteilt sind. Im Gen gibt es sogenannte „hot spots“. Dies sind

Stellen in der DNA, die häufiger als andere von Mutationen betroffen sind. Einen solchen „hot spot“ für Mutationen stellen methylierte CpG-Dinukleotide dar, an denen ein Drittel aller spontanen Nukleotid-Austausch-Ereignisse stattfindet [6, 7, 78, 79].

Die hydrolytische Deaminierung von 5'-Methylcytosin (Bestandteil der methylierten CpG-Dinukleotide) stellt den wichtigsten Mechanismus für die spontane Entstehung von Gen-Mutationen beim Menschen dar [6].

## 1.6 Tumorzelle

Tumorzellen unterscheiden sich von normalen Zellen in vielen Eigenschaften, die jedoch nicht in jeder Tumorzelle gleichermaßen auftreten müssen. Tumorzellen lassen sich gut von normalen Zellen unterscheiden und zeichnen sich durch eine hohe Kern-/Plasmarelation und prominente Nucleoli aus. Die Morphologie von Tumorzellen verändert sich aufgrund des Verlustes ihrer spezifischen Differenzierungsmöglichkeit, da sie nicht mehr in der Lage sind, die gewebespezifischen Stoffe eines Gewebes zu bilden. Das Cytoskelett von Tumorzellen ist oftmals instabil, was ebenfalls die Änderung der Morphologie bewirkt [17]. Tumorzellen besitzen auch keine Kontaktinhibition mehr, was ihnen ermöglicht, sich überwachsend zu vermehren (Fokusbildung). Außerdem besitzen sie keine Kontrolle über ihre Zellproliferation, wodurch eine nicht immer schnelle, aber stetige Vermehrung möglich wird. Um sich jedoch stetig weiter teilen zu können, müssen die Tumorzellen über eine aktive Telomerase verfügen, die dafür sorgt, dass die Teleomeren der Chromosomen nicht wie in normalen Zellen von Replikation zu Replikation immer kürzer werden und so für ein endliches Leben der Zellen sorgen. Ohne die Expression der Telomerase wäre die Zahl der möglichen Zellteilungen begrenzt. Auch stehen normale Zellen über sogenannte Cap-Junctions mit ihren Nachbarzellen in Verbindung. Bei Tumorzellen fehlen die elektrischen Kopplungen.

Tumorzellen werden auch als „Multi-Drug-Resistenz“ bezeichnet, da ihnen Cytostatika/Chemotherapeutika häufig nichts mehr anhaben können. Sie bilden gehäuft das Genprodukt p-Glykoprotein, welches durch das Gen *mdr1* kodiert wird und zur Familie der ABC-Translokatoren gehört. Dieses Genprodukt ist in der Lage, lipophile Stoffe (die meisten Cytostatika sind lipophil) unter Verbrauch von Energie (ATP) aus der Zelle zu transportieren [17]. Ein besonderer Unterschied von Tumorzellen zu normalen Zellen stellt die gesteigerte Aufnahme von Glukose dar, die bereits 1926 festgestellt werden konnte [80]. Tumorzellen haben einen hohen Bedarf an Glukose, da sie diesen aerob vergären und so weniger Energie

gewinnen als normale Zellen, die den Zucker in der Atmungskette über die Mitochondrien verstoffwechseln. Normale Zellen vergären Glukose zu Milchzucker nur dann, wenn sie nicht genügend Sauerstoff zur Verfügung haben. Das bedeutet, die Tumorzellen verfügen über eine insuffiziente Atmung, was die Ursache für die Vergärung des Zuckers darstellt [17, 17, 80 - 84]. Patienten mit einem Tumor besitzen deshalb einen chronisch erhöhten Blutzuckerspiegel [83].

### 1.7 Epigenetische Prägung

Die epigenetische Prägung beschreibt die unterschiedliche Expression von väterlichen und mütterlichen Genen. Das Phänomen, dass entweder das paternale (väterliche) bzw. das maternale (mütterliche) Chromosom abgelesen wird, bezeichnet man auch als Imprinting bzw. genetische Prägung [6, 7, 17, 85, 86].

Geprägte Gene findet man nur im Säugergenom. Bislang wurden über 80 Gene identifiziert, was bei einer Gesamtzahl von ca. 30.000 - 40.000 Genen pro Genom einen geringen Teil ausmacht [87]. Die genomische Prägung findet während der frühen embryonalen Entwicklung eines Individuums statt und ist ein dynamischer Prozess, der während der verschiedenen Entwicklungsstadien und später in unterschiedlichen Geweben Änderungen unterworfen ist [7, 88 - 91]. Das Vorhandensein eines väterlichen und mütterlichen Chromosomensatzes ist für die Entwicklung eines Embryos entscheidend [87, 88, 92, 93].

Sollte es während des Vorgangs des Prägens zu Verlusten, Duplikationen von Chromosomen oder zu Deletionen eines Teilstückes eines Chromosoms kommen, kann dies zum Tod des Embryos führen [85, 86, 88, 94].

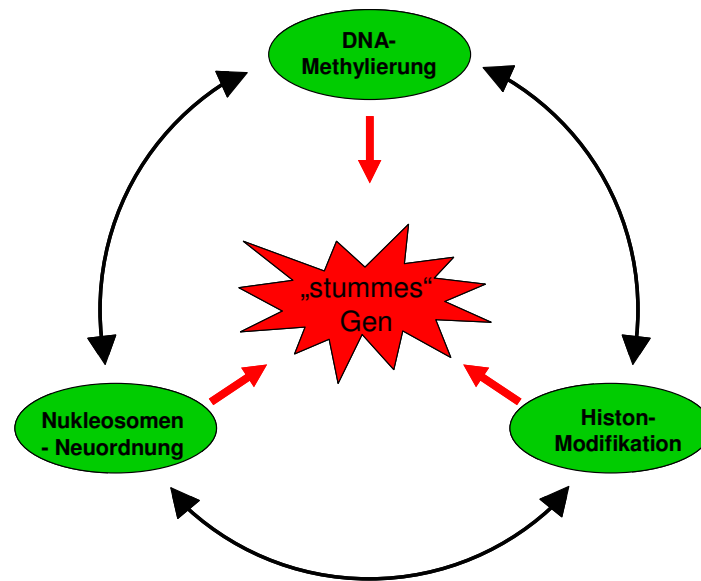
Genetisch geprägte Gene unterliegen nicht den klassischen Vererbungsregeln von *Gregor Mendel*, die um 1865 aufgestellt wurden [95 - 97]. Säuger besitzen einen diploiden Chromosomensatz, welcher jeweils eine Kopie eines Gens vorhält. Sollte eines durch Mutationen ausfallen, kann das andere die Funktion übernehmen. Bei geprägten Genen ist dies nicht mehr möglich, da nur ein Gen, entweder das vom Vater oder das der Mutter, aktiv ist. Sollte dieses Gen mutieren, wird der Einfluss der Mutation sofort sichtbar [87]. Zusätzliche Risiken für Mutationen bringen geprägte Gene mit sich, da sie häufig in Clustern organisiert sind, die zum Teil einer komplizierten Steuerung unterliegen und so durch eine Mutation mehrere Gene gleichzeitig betroffen sein können [87, 98]. Zu den zehn häufigsten Erbkrankheiten zählt das Prader-Willi-Syndrom (PWS) sowie das Angelman-Syndrom (AS), die beide auf

Fehler in der Prägung während der frühen embryonalen Entwicklung zurückzuführen sind [7, 86, 90]. Bei beiden Erkrankungen ist das Chromosom 15 und speziell das Imprinting-Centrum (IC) des Chromosoms betroffen. Beim AS ist das maternale Chromosom zumeist durch Deletionen oder Punktmutationen geschädigt, beim PWS ist es das paternale Chromosom, welches ebenfalls durch Deletionen aber auch uniparenteralen Disomien geschädigt wurde [7, 86, 99, 100]. Die Symptome der beiden Erkrankungen sind bei Patienten mit PWS: Fett-leibigkeit, Heißhunger, Kleinwuchs mit kleinen Händen und Füßen, Lernstörungen sowie Zwangsneurosen. Patienten mit AS hingegen leiden unter Bewegungsstörungen, Nervosität, Krämpfe, Schlafstörungen, Hyperaktivität, geistige Verlangsamung und unangebrachtes Lachen [7, 86, 90, 100].

Die genetische Prägung stellt zudem die Balance zwischen der Versorgung des Embryos im Mutterleib und der Aufrechterhaltung mütterlicher Ressourcen dar. Man kann Prägung auch als „Kampf“ um mütterliche Ressourcen bezeichnen, wobei die väterlichen Gene das Bestreben haben, einen möglichst großen und starken Nachkommen zu schaffen, da ihr Erbgut auf diese Weise bewahrt und weiter verbreitet werden kann. Anders als die Mutter kann der Vater nicht sicher sein, dass in einem weiteren Nachkommen derselben Mutter seine DNA noch zu 50 % vertreten sein wird. Die maternalen Gene sind mehr darauf bedacht, die Reserven der Mutter für weitere Nachkommen zu sichern, da ihr Erbgut immer zu 50 % an ihren Nachwuchs weitergegeben wird, unabhängig von welchem Vater die anderen 50 % stammen [7, 90, 101, 102]. Das Phänomen Prägung wurde das erste Mal in den frühen achtziger Jahren entdeckt. Bereits da wurde realisiert, dass es einen maßgeblichen Einfluss auf die Entstehung genetischer Erkrankungen beim Menschen hat [85]. Ebenfalls zu dieser Zeit wurde festgestellt, dass die genetische Prägung, durch Modifikationen des Genoms, unter anderem auf die Methylierung von sequenzspezifischen DNA-Abschnitten beruht [6, 103 - 106]. Hierbei wird die DNA-Base Cytosin an der 5` Position mit einer Methylgruppe versehen, welche die Expression eines Gens entweder direkt oder indirekt kontrolliert. Die Methylierung von Cytosin erfolgt häufig an so genannten CpG-Inseln. Diese sind Abfolgen der Basen Guanin und Cytosin, welche gehäuft nahe des Promotorbereichs eines Gens zu finden sind. Ist dieser Bereich methyliert, erfolgt keine Genexpression. Das Gen ist „stumm“ [6, 7, 17, 102, 104 - 109].

Die DNA-Methylierung ist nur eine von drei möglichen Arten der Genregulation. Beim Aktivieren und „Stummschalten“ von Genen bzw. Genclustern spielt die Chromatinstruktur eine entscheidende Rolle. Die DNA-Doppelhelix wird zur Stabilisierung an basische Proteine (Histone) gebunden und bildet sogenannte Nucleosomen. Je nach Modifikation - z.B. Methylierung

– nimmt die DNA eine stark kondensierte Form ein oder aber auch eine, nach Acetylierung der Histone, geöffnete Form, sodass die DNA weiter zugänglich für die Proteine und Enzyme der Replikation und Expression [6, 7, 106] bleibt. Als weiterer Faktor für die „Stummschaltung“ eines Gens spielt die Anordnung bzw. Neuordnung der Nucleosomen selber eine entscheidende Rolle [6, 7, 106]. Die Abbildung 9 verdeutlicht noch einmal den Zusammenhang der drei Faktoren.



**Abbildung 9:** „Stummschalten“ von Genen. (Das „stumme“ Gen nach [106] zeigt den Einfluss der drei Faktoren - DNA-Methylierung, Histon-Modifikation und Nucleosomen-Neuordnung - auf das „ausschalten“ von Genen.)

Die ersten geprägten Gene, die identifiziert wurden, waren auf dem Chromosom 7 der Maus lokalisiert. Es handelt sich hierbei um die Gene Insulin-like growth Faktor II (*Igf II*) und Gen *H19*. Das Gen *Igf II* codiert das Genprodukt für einen gewebe-spezifischen Wachstumsfaktor [110]. Das Gen *H19* codiert für eine RNA mit einem geschlossenen Leseraster (die Sequenz der Basen-Triplets ist durch häufige Terminationscodons unterbrochen und lässt sich nicht mehr in eine Aminosäuresequenz übersetzen [6].), welche direkte Wechselwirkungen mit der DNA eingehen kann und so eine steuernde Funktion hat. Dieses Gen ist nur während der Embryonalphase der Entwicklung aktiv. Danach ist es, mit Ausnahme der Skelettmuskulatur, in allen Geweben inaktiv [7, 111].

Die beiden geprägten Gene *Igf II* und *H19* liegen gemeinsam auf dem menschlichen Chromosom 11 zusammen mit einem Enhancer (Verstärker) für beide Gene. Des Weiteren liegt zwischen den beiden Genen eine so genannte „imprinting control region“ (ICR) sowie vor jedem Gen im Promotorbereich ein Sequenzabschnitt, der methyliert werden kann.

Ein weiteres Beispiel für genomische Prägung ist die Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen weiblicher Säuger, das etwa 160 Mb groß ist und ca. 1500 Gene trägt, welche wichtig für die Entwicklung und das Funktionieren von Zellen sind. Männliche Säuger verfügen nur über ein X-Chromosom und ein kleines Y-Chromosom mit wenigen Genen. Darunter befinden sich viele mit geschlechtsspezifischen Funktionen. Um den Unterschied am lebensnotwendigen Gen (das Doppelte im Vergleich zu männlichen) zu kompensieren, wird eines der beiden X-Chromosomen weiblicher Säuger, wie folgt beschrieben, inaktiviert [7, 112, 112 - 115].

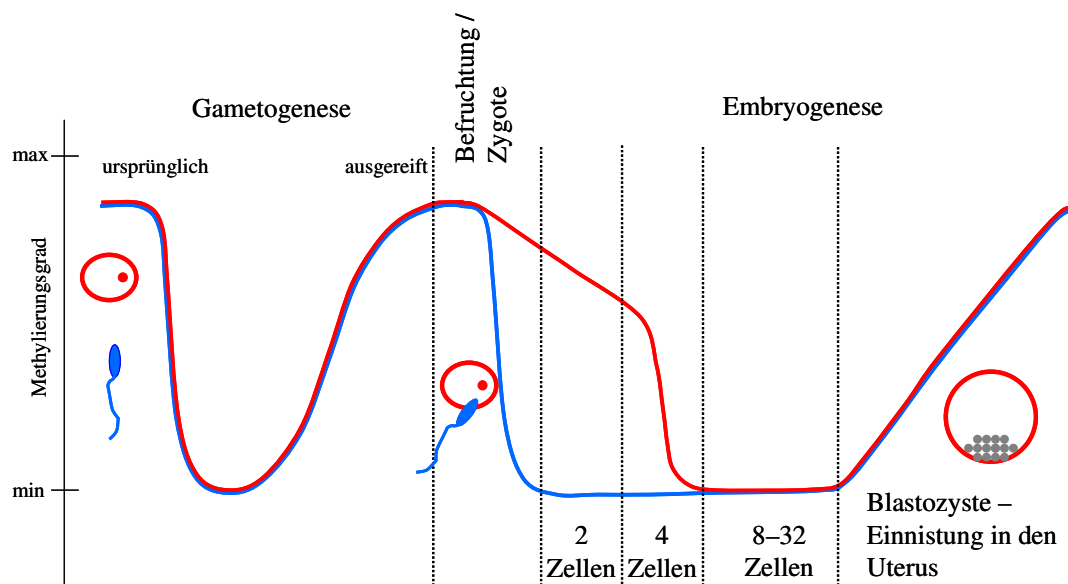
In der Oocyte (Eizelle) ist das X-Chromosom aktiv, was bedeutet, dass das Gen bzw. der Promotorbereich vom *Xist*-Gen, welches für eine RNA codiert, die unter anderem zur Inaktivierung des X-Chromosoms führt, methyliert vorliegt [113, 116 - 118]. Im Spermium (Samenzelle) ist dieses Gen bzw. der Promotorbereich unmethyliert, so dass die aus der Expression resultierende RNA die weiteren Gene auf dem X-Chromosom unzugänglich macht. Nach der Befruchtung der Oocyte und den ersten Zellteilungen in der frühen Embryogenese verschwindet die Inaktivierung des männlichen X-Chromosoms, so dass in dieser Phase zwei aktive X-Chromosomen vorliegen, da das Genprodukt *eeb* für eine Stabilisierung des inaktivierten X-Chromosoms noch nicht vorhanden ist. Jedoch unmittelbar vor bzw. während der Einnistung in die Gebärmutter findet eine genomische Prägung statt, die nach dem Zufallsprinzip entweder das väterliche oder mütterliche X-Chromosom inaktiviert [119]. Das einmal inaktivierte X-Chromosom bleibt in der betreffenden Zelle auch nach Zellteilungen immer ausgeschaltet. Ein Gen, welches ständig auf dem stummen X-Chromosom exprimiert wird, ist das *Xist*-Gen, welches die *Xist*-RNA codiert, die für die Aufrechterhaltung der Inaktivierung notwendig ist. Neuere Forschungen haben jedoch ergeben, dass auch andere Gene auf dem „stummen“ X-Chromosom abgelesen werden [113, 118].

Es gibt zwei Phasen (Abbildung 10) der epigenetischen Prägung, die eine während der Gametenbildung (Keimbahnzellenbildung Oozyte/Spermium), die andere unmittelbar nach der Befruchtung [94].

Für die Bildung der Gameten wird die DNA vollständig demethyliert, sodass weder die maternale noch die paternale Prägung vorhanden ist. Anschließend erfolgt eine entweder maternale oder paternale spezifische Neuprägung. Das bedeutet, dass Oozyten über eine rein mütterliche Prägung verfügen, während Spermien eine rein väterliche Prägung aufweisen [6, 7, 120, 121].

Im Spermium ist die DNA hypermethyliert, so dass die meisten Gene „stumm“ sind. Die DNA der Oozyte ist im Gegensatz zur DNA im Spermium weitgehend unmethyliert, so dass die meisten Gene für die Transkription zugänglich sind [94, 122].

Unmittelbar nach dem Verschmelzen von Ei und Samenzelle wird die Spermium-DNA noch im Stadium der Zygote innerhalb von wenigen Stunden (6-8 Std.) aktiv enzymatisch demethyliert (bis auf wenige Gene) [123]. Der Methylierungsgrad der Oozyten-DNA bleibt bis zum Zweizellstadium unverändert. Anschließend erfolgt eine passive Demethylierung. Mit jeder Zellteilung sinkt der Methylierungsgrad um die Hälfte [88, 124]. Nach dem fünften Tag bzw. dem 32-Zellstadium des Embryos ist die Oozyten-DNA ebenfalls nahezu vollständig demethyliert. Im Stadium der Blastozyste erfolgt eine spezifische Neuprägung der DNA über weitere fünf Tage, bis die Individuen-Spezifische Neuprägung abgeschlossen ist [85, 88, 89].



**Abbildung 10:** Methylierungsreprogrammierung während der Gametogenese und frühen Embryogenese. Die Abbildung wurde modifiziert aus dem Paper „*Genomic imprinting: Parental influence on the genome*“ von Reik und Walter übernommen. Sie zeigt den relativen Methylierungsgrad von Gameten und Embryonen, wobei hier zwischen der maternalen (rot) und paternalen (blau) DNA unterschieden wird.

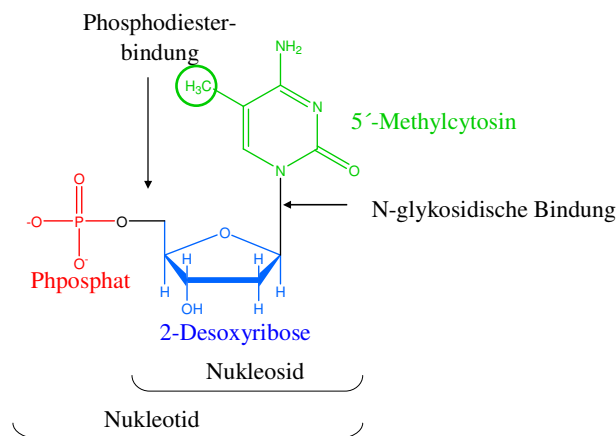
## 1.8 DNA-Methylierung

Cytosin ist das einzige der vier Nukleotide der DNA, das in größeren Konzentrationen in Eukaryoten noch in einer modifizierten Form als 5'-Methylcytosin vorkommt (Abbildung 11)



und wurde das erste Mal im Jahre 1925 von Johnson & Coghill in Prokaryoten entdeckt [125 - 127].

5'-Methylcytosin wird als molekularer Schalter bezeichnet, da es viele steuernde Funktionen im Bereich der Zelle ausübt [6, 7]. Der Methylierungsgrad (Anteil von 5'-Methylcytosin am gesamten Cytosin im Genom) eines Vertebraten liegt zwischen 3-7 % [6, 128, 129] und beim gesunden Menschen zwischen 3-4 % [130 - 133]. Die Cytosin Methylierung erfolgt in der frühen Phase der embryonalen Entwicklung nach einem individuellen Muster. Sie ist von Spezies zu Spezies und von Organ zu Organ unterschiedlich [126, 134 - 136]. Kommt es beim Prozess der Methylierung von Cytosin zu Fehlern, sind diese in der Regel mit dem Leben des Organismus nicht vereinbar [7, 137 - 139].



**Abbildung 11:** 5'-Methylcytosin

Die Methylierung erfolgt ausschließlich an so genannten 5'-CpG-3'-Dinukleotiden [7, 126, 132, 133, 140]. CpG-Dinukleotide sind, aufgrund von Deaminierungsreaktion, im Säuger-Genom unterrepräsentiert (10-20 % von dem statistisch zu erwartenden [6, 7, 78, 130, 140 - 142]). Man unterscheidet zwischen CpG-Dupletts, eine Folge von Cytosin und Guanin pro 100 bp und CpG-Inseln mit 10 CpG-Folgen in einem DNA-Abschnitt von 100 bp [6]. CpG-Dupletts sind vorwiegend im codierenden Bereich (Exons) der Gene, in repetitiven Sequenzen und im Centromer-Bereich der Chromosomen lokalisiert und meistens methyliert [6, 7]. Die so genannten CpG-Inseln erstrecken sich über 1 - 2 kb und machen 1 - 2 % des gesamten Genoms aus [6, 143 - 148]. Im menschlichen Genom gibt es etwa 45.000 CpG-Inseln, wovon etwa 50 - 60 % im Promotorbereich bzw. im ersten Exon der so genannten „housekeeping“-Gene lokalisiert sind und etwa 40 - 50 % im Promotorbereich bzw. im ersten Exon gewebe-spezifischer Gene [6, 7, 78, 149 - 152].

Der Methylierungsgrad einer Zelle bleibt über viele Zellteilungen hinweg nahezu konstant, wobei er in beide Richtungen reversibel ist [150]. Dies wird durch DNA-Methyltransferasen (DNMTs) gewährleistet, welche Methylgruppe von S-Adenosyl-methionin (SAM) spezifisch auf die Base Cytosin in CpG-Folgen der DNA überträgt bzw. durch das Enzym MBD2, welches an methylierter DNA bindet und die Methylgruppe entfernt [138, 153 - 156]. Man unterscheidet inzwischen fünf verschiedene DNA-Methyltransferasen DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b und DNMT3L, wobei hier nur auf drei näher eingegangen werden soll [138, 153, 154]. Die Methyltransferase DNMT1 und DNMT3a/b sind für eine normale Entwicklung entscheidend. Sollten diese durch Mutationen geschädigt sein, kommt es zum Abfall des Methylierungsgrades um den Faktor drei, welcher dann Fehlbildungen und den Tod während der frühen Embryogenese zur Folge hat [139, 154, 157]. Die DNA-Methyltransferasen DNMT3a und DNMT3b sind *de novo* Methyltransferasen, die in der Lage sind, eine auf beiden Strängen unmethylierte DNA zu methylieren und ein gewebe- und zell-spezifisches Methylierungsmuster zu erstellen [154, 154, 158]. Sollten z.B. Mutationen im Gen der DNMT3b auftreten, kommt es zur Chromosomeninstabilität, dem so genannten ICF-Syndrom (**I**mmunodeficiency, **g**entromeric instability, **f**acial anomalies), da die Methylierung im Centromer-Bereich der Chromosomen nicht mehr gegeben ist [149, 159]. Dagegen besitzt die DNA-Methyltransferase DNMT1 eine 10 - 40fach höhere Bindungsaffinität zu hemimethylierten DNA-Doppelsträngen und sorgt dafür, dass nach einer erfolgten DNA-Replikation der ursprüngliche Methylierungszustand der DNA wiederhergestellt wird. Sie wird auch als „Maintenance“-Methyltransferase bezeichnet und hat eine Fehlerrate von ~1 % pro Zellteilung [160 - 164]. Fällt das Gen der DNMT1 durch Mutation aus, kommt es zu einer schrittweisen Hypomethylierung (einer Reduzierung des Methylierungsgrades von 20 - 60 % im Vergleich zu gesunden Zellen), da bei jeder weiteren Zellteilung der genomweite Methylierungsgrad sinkt [149].

### **1.8.1 Auswirkungen des methylierten Cytosins auf die Zelle**

5'-Methylcytosin hat großen Einfluss auf eine Vielzahl von Vorgängen in Säugerzellen, unter anderem auf die Expressionsrate von Genen, die Chromatin-Struktur, den Vorgang der DNA-Replikation, X-Chromosomeninaktivierung, genomische Prägung, Erkennung von Fremd-DNA und beim Vorgang der Gewebedifferenzierung [6, 7, 78, 130, 138, 143, 144, 161, 165 - 173]. Im weiteren Verlauf wird auf die oben aufgeführten Punkte näher eingegangen, jedoch ist es schwierig, die Punkte einzeln zu betrachten.

Die DNA-Methylierung ist ein zellspezifischer Prozess, der die Expression von Genen in verschiedenen Zellen bzw. Geweben steuert [173]. Aufgrund der Methylierung von CpG-Inseln wird das dahinter befindliche Gen inaktiviert bzw. „stumm“ geschaltet. Dies kann entweder direkt durch die Methylierung in Verbindung mit Strukturänderung des Chromatins erfolgen oder aber indirekt durch die Bindung von Proteinen (z.B. MeCP2), die spezifisch Methylcytosin binden können, da die Methylgruppe in der großen Furche der DNA-Doppelhelix liegt und somit für Proteine gut zugänglich ist [6, 7, 143, 153, 170, 174, 175, 175, 176]. Die Kontrolle der Expression durch spezifische Methylierung beeinflusst auch die Differenzierung von Gewebe, sodass nur bestimmte Genprodukte in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden können [126, 177, 178], weil die Methylierung nach einem spezifischen Muster erfolgt, kann die Zelle darüberhinaus die eigene DNA von Fremd-DNA (z.B. parasitäre) unterscheiden und diese, sofern sie ins Genom integriert wird, durch entsprechende Methylierung „stumm“ schalten [6, 172, 179]. Der Einfluss der DNA-Methylierung auf die Inaktivierung von einem der beiden weiblichen X-Chromosome sowie die epigenetische Prägung wurde bereits im vorangegangenen Kapitel erläutert [137, 143, 144, 149, 161, 179, 180].

### **1.8.2 Einfluss des Methylierungsgrades auf die Krebsentstehung**

Intensive Forschungen der letzten Jahrzehnte haben ergeben, dass die Änderung des Methylierungsgrades direkt im Zusammenhang mit der frühen Entwicklung von Krebs bzw. von Tumoren steht [141, 161, 169, 181, 182].

So kann in Tumoren eine genomweite Hypomethylierung und eine abschnittsspezifische Hypermethylierung festgestellt werden [137, 138, 141, 166, 172, 181 - 187]. Die Änderung des Methylierungsgrades der DNA hat zahlreichen Folgen für die Zelle:

- Chromosomeninstabilität
- „unerlaubte“ Genexpression
- Reaktivierung von „Transposons“
- Reaktivierung intragenomischer Fremd-DNA
- Verlust der genetischen Prägung
- steigendes Mutationsrisiko
- „Stumm“-schalten von Tumor-Suppressor-Genen

### *Hypomethylierte DNA*

Durch Hypomethylierung der DNA im Bereich der Centromere sowie repetitiver Sequenzabschnitte wird eine Chromosomeninstabilität hervorgerufen. Diese Bereiche sind in gesunden Zellen normalerweise hypermethyliert. Dadurch ist die DNA im Centromer stark kondensiert und die Rekombination von repetitiven Abschnitten der DNA kontrollierbar [130, 131, 171]. Durch eine Verringerung des Methylierungsgrades geht die Kontrolle über die „Transposons“ sowie ins Genom integrierte Fremd-DNA verloren, was zu einer weiteren Instabilität des Genoms führt [131, 149, 161]. Ebenso können Gene zur Expression kommen, die in normalen Zellen durch Methylierung reprimiert sind [6, 130, 137, 153]. Eine weitere Folge der Hypomethylierung ist ein möglicher Verlust der epigenetischen Prägung, die ebenfalls zum großen Teil auf spezifischen DNA-Methylierungen beruht [78, 130, 131, 149].

### *Hypermethylierte DNA*

Durch eine spezifische Hypermethylierung von CpG-Folgen der DNA entstehen „hot spots“ der Mutationen. Die Wahrscheinlichkeit für eine Mutation steigt im Vergleich zu anderen Sequenzabschnitten im Genom um den Faktor 42 an. In CpG-Folgen finden 30 - 35 % aller Mutationen statt, obwohl die CpG-Folgen im Genom unterrepräsentiert sind [6, 7, 78, 137, 140, 141, 188]. Ein Beispiel für die erhöhte Mutationsrate ist das Tumor-Suppressor-Gen *p53*, bei dem alleine 47 % der Punktmutationen in CpG-Inseln stattfinden [78, 137, 141, 165, 188, 189]. Auch erhöht sich durch methylierte DNA die Absorption des Sonnenlichtes im Vergleich zu unmethylierter DNA, sodass die Bildung von Thymindimeren um das 5 - 15fache ansteigt [188, 190]. Des Weiteren steigt die Wahrscheinlichkeit für verschiedene Tumor-Suppressor-Gene durch die Hypermethylierung „stumm“ bzw. mutiert zu werden. Diese Gene spielen bei der DNA-Reparatur (hHLM1, MGMT, BRCA1), beim Zellzyklus (Rb, p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p14<sup>ARF</sup>), bei der Apoptose (RARB2, TMS1), bei der Entgiftung (GSTP1) und bei der hormonellen Ansprechbarkeit der Zelle (RARB2, ER) eine wichtige Rolle [131, 140].

Abbildung 12 zeigt die DNA-Methylierung als zentralen Punkt für die Entwicklung von normalen Zellen sowie den Einfluss auf die Entstehung von Tumorzellen [130].

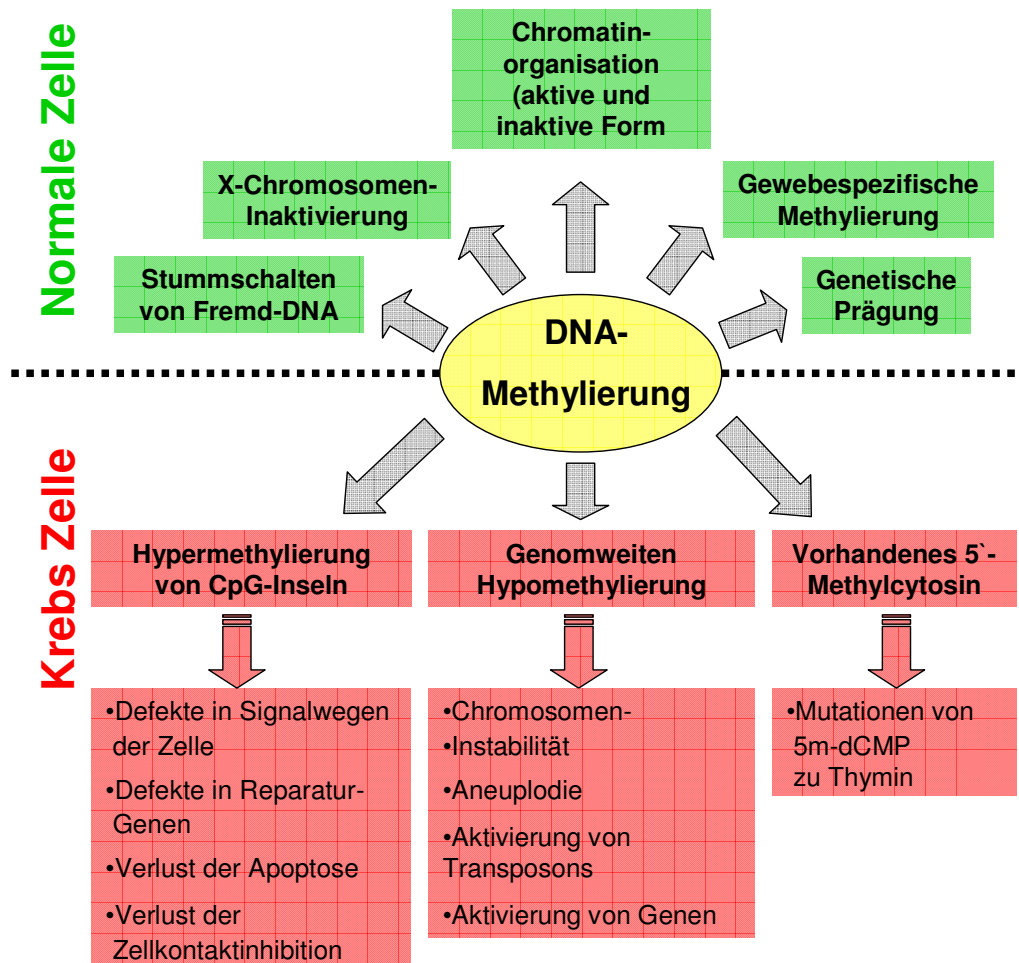
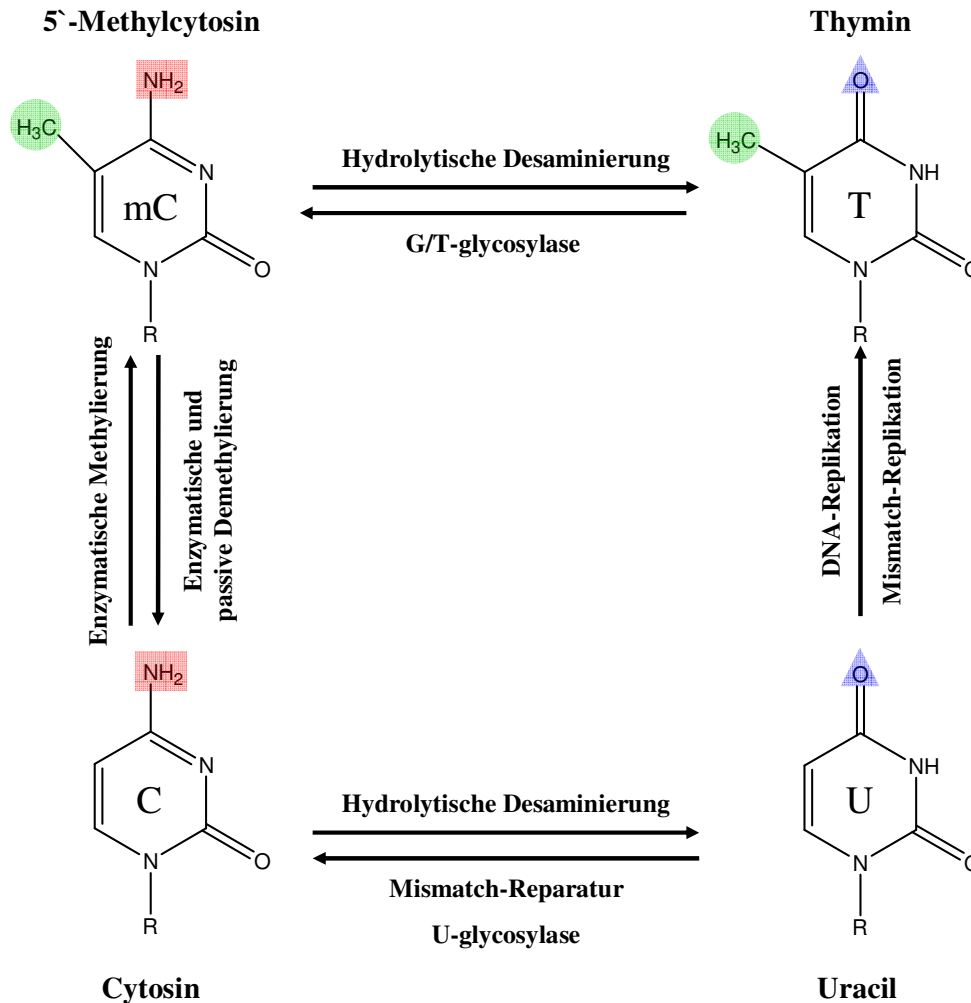


Abbildung 12: Einfluss der DNA-Methylierung.

### 1.8.3 Beeinflussung des Methylierungsgrades

Die Ernährung als solche hat Einfluss auf den Methylierungszustand der DNA [78, 138]. Eine Hypomethylierung der DNA kann aber auch durch Kanzerogene, wie beispielsweise aromatische Kohlenwasserstoffe hervorgerufen werden [191]. Ebenso führt der Prozess des Alterns zu einer schrittweisen Verringerung des genomweiten Methylierungsgrades sowie zu einer Hypermethylierung von CpG-Inseln [138, 140]. Mutationen in der DNA können direkt oder indirekt zu einer Verschiebung des Methylierungsgrades führen. Eine sehr häufig auftretende Mutation ist die Desaminierung von 5'-Methylcytosin zu Thymin (Abbildung 13), die um den Faktor 6000 schlechter repariert werden kann als die Desaminierung von Cytosin zu Uracil,

da es sich bei Uracil um eine nicht reguläre Base der DNA handelt, was bei Thymin nicht der Fall ist [189, 192].



**Abbildung 13:** Genetische Veränderung durch DNA-Methylierung. Zeigt die spontane Desaminierung von Cytosin und 5'-Methylcytosin sowie die daraus resultierenden Änderungen in der DNA-Sequenz, nach Zingg [129].

In den letzten Jahren wurde viel über den Methylierungsgrad der DNA und die Verbindungen zur Krebsentstehung herausgefunden. So weiß man heute, dass die genomweite Hypomethylierung ein frühes Ereignis der Kanzerogenese ist, gefolgt von einer Hyperproliferation der Zelle, die eine gesteigerte Methyltransferaseaktivität aufweist. Der nächste Schritt wäre eine promotorspezifische Hypermethylierung von CpG-Inseln, die dann eine erhöhte Mutationsrate mit sich bringt [141, 188, 189, 193, 194]. Darüber hinaus korreliert der Methylierungsgrad der DNA mit der Malignität und dem Grad der Tumorentwicklung, so dass man

maligne und benigne Tumore über den Methylierungsgrad auseinander halten kann [141, 171, 181, 195]. Jedoch konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sich nicht alle Tumore nach demselben Schema entwickeln. Beispielsweise erfolgt bei Brustdrüsenkrebs keine Hypomethylierung und bei Gebärmutterhalskrebs tritt dies erst im späteren Verlauf der Tumorgenese [141] auf.

#### **1.8.4 Methoden zur Bestimmung des genomweiten und promotorspezifischen Methylierungsgrades**

Es sind eine Vielzahl von Methoden zur qualitativen und quantitativen Bestimmung des genspezifischen und des genomweiten Methylierungsgrades der DNA entwickelt worden. Für die genspezifische Analyse sind folgende Methoden verfügbar:

- methylation-specific PCR (MSP) [196]
- Bisulfit-Restriktions-Analyse kombiniert mit PCR [128, 150]
- modification-sensitive restriction endonucleases (MSRE) in Kombination mit Southern-Blotting [128]
- methylation-sensitive single nucleotide primer extension (MS-SNuPE) [197]

Für die Bestimmung der globalen DNA-Methylierung stehen folgende Methoden zur Verfügung:

- CE-UV [198]
- LC/ESI-MS [199]
- HPLC-UV [126, 189, 199 - 201]
- CE-LIF [55, 202 - 205].

Auf die zuletzt genannte Methode wird im Ergebnissteil noch näher eingegangen.

## 2 Problemstellung und Zielsetzung

Das Interesse an 5'-Methylcytosin als „fünfte-Base“ der DNA hat in den letzten Jahren stark zugenommen und dadurch wurde die große Bedeutung dieser Base entdeckt. So ist mittlerweile bekannt, dass in Tumoren häufig eine genomweite Hypomethylierung sowie eine genspezifische Hypermethylierung auftreten. Des Weiteren hat die Methylierung einen wesentlichen Einfluss sowohl auf die Aufrechterhaltung der Zelldifferenzierung als auch auf die genetische Prägung und die Entwicklung eines neuen Individuums.

Um die Bedeutung der DNA-Methylierung weiter untersuchen zu können, muss eine Methode zur Bestimmung des genomweiten Methylierungsgrades mit ausreichender Empfindlichkeit, guter Reproduzierbarkeit und einem hohen Probendurchsatz eingesetzt werden. Die von Schmitz et al. entwickelte Methode besitzt all diese Voraussetzungen und kann somit für die Untersuchung der genomweiten DNA-Methylierung genutzt werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Probendurchsatz der Methode zur Bestimmung des genomweiten Methylierungsgrades durch eine geeignete Probenvorbereitung weiter zu steigern, um das hohe Probenaufkommen schneller bearbeiten zu können. Neben Säugetier-DNA soll mit dieser modifizierten Methode dann auch erstmals die DNA von wirbellosen Tieren untersucht werden, um auch auf andere biologische Anwendungsfelder hinzuweisen. Des Weiteren soll die Methode dann für die Bestimmung des Methylierungsgrades von Ratten und Zelllinien, die mit verschiedenen Kanzerogenen behandelt wurden, eingesetzt werden. Auch soll untersucht werden, ob die DNA-Methylierung mit dem oxidativen Stress korreliert. Zu diesem Zweck soll die DNA von israelischen Kampftauchern, die mit reinem Sauerstoff tauchen und eine erhöhte Krebsrate aufweisen, untersucht werden. Ferner sollen Gewebeproben, die mit Formalin fixiert wurden, auf ihre Tauglichkeit hinsichtlich einer Methylierungsgradbestimmung getestet werden, um für spätere Studien einen größeren Probenpool zu erhalten.



### 3 Ergebnisse und Diskussion

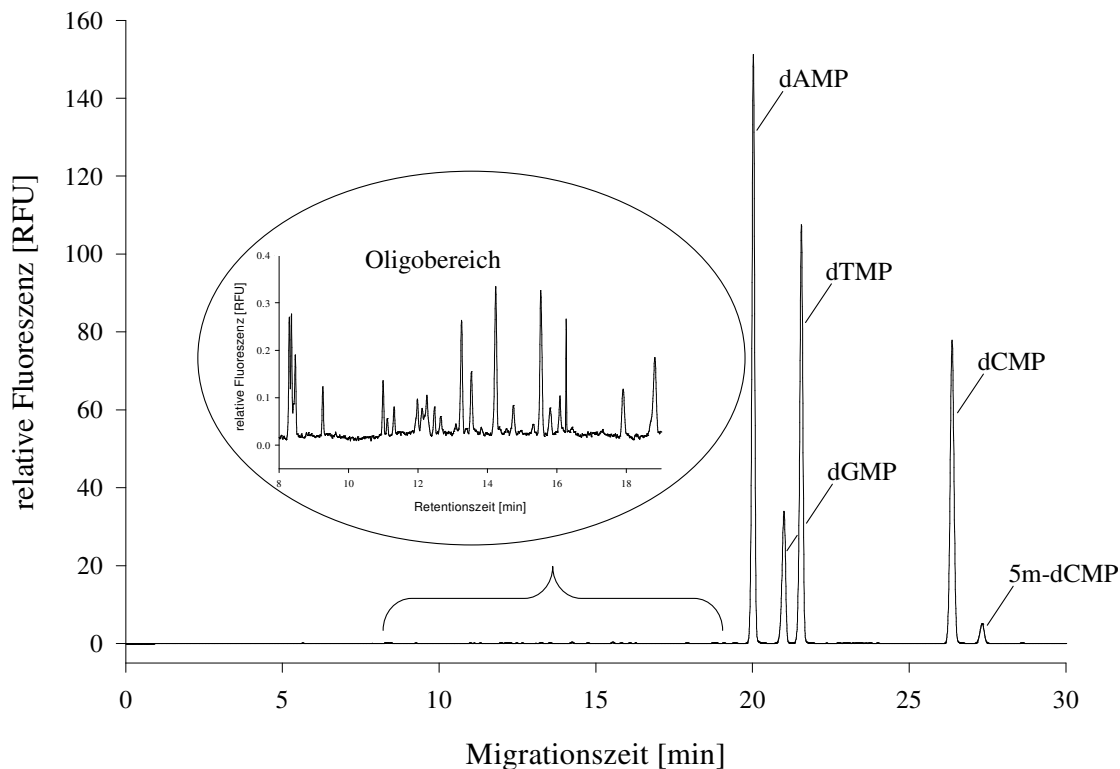
#### 3.1 Bestimmung des genomweiten DNA-Methylierungsgrades mittels CE-LIF

Diese Arbeit beinhaltet in erster Linie die Bestimmung des genomweiten Methylierungsgrades von *in vivo* und *in vitro* Proben sowie die Weiterentwicklung der hierfür verwendeten Probenaufbereitung im Hinblick auf eine längere Probenstabilität und einen höheren Proben-durchsatz

Für die Bestimmung des genomweiten Methylierungsgrades wurde eine von Schmitz et al. entwickelte Methode verwendet, die eine Kapillarelektrophoretische Analyse mit Laser-induzierter Fluoreszenz (CE-LIF) vorsieht [55, 206, 207]. Bei dieser Methode wird die genomische DNA durch die Enzyme Mikrokokkennuklease (MN) und Milz-Phosphodiesterase (SPD) an der Phosphatesterbindung hydrolytisch gespalten. Die hierdurch entstehenden 2'-Desoxynukleosid-3'-monophosphate werden in einem zweiten Schritt, der Derivatisierung, durch Carbodiimid (EDC) in einer Phosphoramidatkupplungsreaktion an den Fluoreszenzmarker BODIPY-EDA kovalent gebunden. Die aus dieser Reaktion hervorgehenden 2'-Desoxynukleosid-3'-BODIPY-phosphoramidate werden nach einer geeigneten Verdünnung mit Reinst-Wasser mittels CE-LIF analysiert. Abbildung 14 zeigt die Analyse einer 10 µg Kalbsthymus-DNA-Probe (CT-DNA). Diese DNA fungiert in der vorliegenden Arbeit als Kontrolle für die Hydrolyse- und Derivatisierungsausbeute, da der Methylierungsgrad von CT-DNA ( $\approx 6,5\%$ ) sehr häufig bestimmt wurde und diese in reiner Form kommerziell erhältlich ist.

Anhand des Elektropherogramms lassen sich fünf Hauptsignale identifizieren, die in der Reihenfolge Adenin (dAMP), Guanin (dGMP), Thymin (dTMP), Cytosin (dCMP) und 5'-Methylcytosin (5m-dCMP) erscheinen. Dabei handelt es sich jeweils um die mit BODIPY derivatisierten Nukleotiden. Im vorderen Bereich des Elektropherogramms befindet sich der so genannte Oligobereich. Hierbei handelt es sich um DNA, die nicht vollständig durch den Enzymmix verdaut wurde. Der Oligobereich kann abhängig von der eingesetzten Enzymmenge an SPD größer oder kleiner ausfallen, hat bei jeder eingesetzten Enzym-Charge jedoch eine konstante Größe, sodass dieser bei der Quantifizierung vernachlässigt werden kann. Ein großer Vorteil der von Schmitz et al. entwickelten Methode ist, dass mit geringer Probenauf-

bereitung und nur einer Analyse der Methylierungsgrad bestimmt werden kann und zudem auch eventuell vorhandene DNA-Addukte identifiziert werden können.



**Abbildung 14:** Analyseergebnis einer 10 µg CT-DNA-Probe, 1:200 verdünnt mit Reinst-Wasser und mit der CE-LIF analysiert wurde.

Die Bestimmung des Methylierungsgrades erfolgt über das Verhältnis der korrigierten Peakflächen von 5`-Methylcytosin zu allen Cytosinen. Die Integration der Peakflächen wurde bei allen Messungen manuell mit der Software <sup>32</sup>Karat vorgenommen. Für die Quantifizierung des Methylierungsgrades sind Korrekturfaktoren notwendig, um nukleotid-spezifische Derivatisierungsausbeuten und Fluoreszenzlöschungen auszugleichen [55, 61]. Dies wird in Abbildung 14 deutlich, in der, auch ohne eine Integration der Peaks, ein Flächenunterschied der Signale von Thymin und Adenin bzw. von Guanin und Cytosin + 5`-Methylcytosin auszumachen ist. Für die Bestimmung der Korrekturfaktoren wird die DNA des Bakteriophagen Lambda ( $\lambda$ ) sowohl unmethyliert als auch enzymatisch methyliert verwendet. Die Basenzusammensetzung der  $\lambda$ -DNA ist durch vollständige Sequenzierung bekannt. Sie liefert somit einen theoretischen Wert für die Basenzusammensetzung, der mit dem experimentell ermittelten in Bezug gesetzt wird. Daraus ergeben sich Korrekturfaktoren (siehe experimenteller Teil: Erstellung von Korrekturfaktoren). In der folgenden Abbildung ist die Formel für die Berechnung des Methylierungsgrades dargestellt:

$$\text{Methylierungsgrad in [\%]} = \left( \frac{meC \cdot f1}{(meC \cdot f1) + (C \cdot f2)} \right) \cdot 100$$

*meC* = korrigierte Fläche von 5-me-dCMP

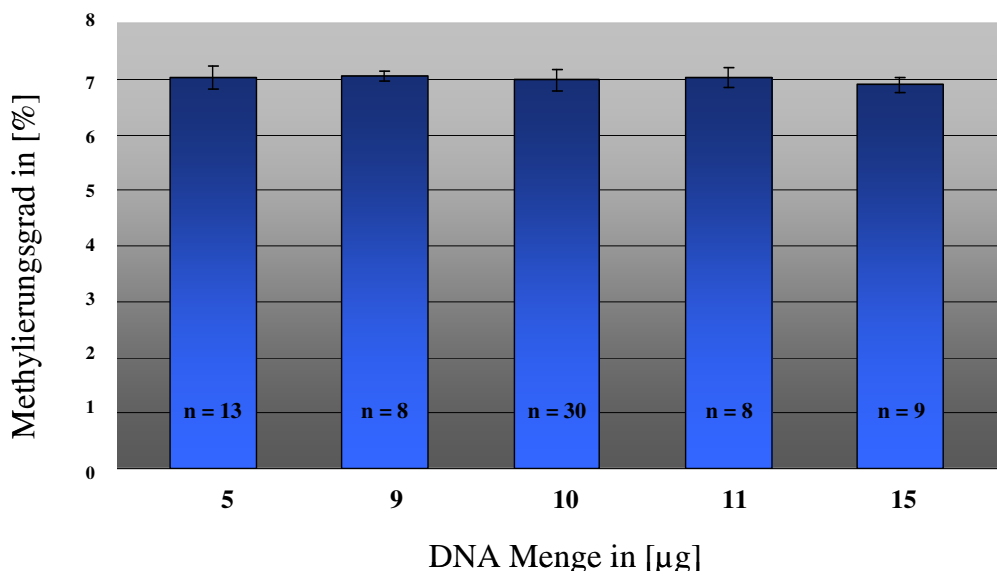
*C* = korrigierte Fläche von dCMP

*f1* = Korrekturfaktor für 5-me-dCMP

*f2* = Korrekturfaktor für dCMP

**Abbildung 15:** Formel zur Quantifizierung von 5'-Methylcytosin

Korrekturfaktoren wurden sowohl für 1 µg als auch 10 µg DNA bestimmt. Da aber die DNA-Quantifizierung mittels UV/VIS-Spektrometer (siehe Experimenteller Teil DNA-Quantifizierung) relativ ungenau ist, erschien es notwendig, den Anwendungsbereich der Korrekturfaktoren genauer zu bestimmen. Deshalb wurden unterschiedliche CT-DNA-Mengen (5, 9, 10, 11 und 15 µg) aliquotiert und nach einer 10 µg-Probenvorbereitung hydrolysiert und derivatisiert. Die Ergebnisse aus diesem Experiment können der Abbildung 16 entnommen werden.



**Abbildung 16:** Methylierungsgrad von CT-DNA bei unterschiedlichen DNA-Konzentrationen.

Abbildung 16 zeigt, dass es bei keiner der eingesetzten DNA-Mengen zu signifikanten Abweichungen des Methylierungsgrades im Vergleich zur 10 µg-Probe kommt. Dies bedeutet, dass die Korrekturfaktoren selbst bei einer unwahrscheinlichen Abweichung von 50 % des angestrebten DNA-Gehaltes ohne Bedenken angewandt werden können.

## **3.2 Einfluss von Kanzerogenen auf den genomweiten Methylierungsgrad**

Es ist seit längerem bekannt, dass es durch den Einfluss von Kanzerogenen zu einer genomweiten Hypomethylierung in der Zelle kommen kann. Eine solche Hypomethylierung kann, wie bereits in Kapitel 1.8 beschrieben, auch z.B. bei Tumoren festgestellt werden. Durch den metabolischen Abbau von PAK's in der Zelle können reaktive Zwischenstufen entstehen, die mit den Basen der DNA einer kovalente Bindung eingehen können und DNA-Addukte (siehe auch Kapitel 1.4) bilden. Die Anlagerung dieser reaktiven Zwischenprodukte erfolgt nicht völlig zufällig, sondern findet verstärkt an den methylierten CpG-Inseln bzw. an den CpG-Dupletts der DNA statt, wo es zur Adduktierung von Guanin mit einer 3-8 fachen höheren Wahrscheinlichkeit kommt [78, 79, 140, 188]. Diese DNA-Addukte können zu Störungen bei der DNA-Replikation und Gen-Expression führen, die unter anderem eine genomweite Hypomethylierung zur Folge haben kann.

Um den Vorgang der genomweiten Hypomethylierung nach Kontakt mit PAK's näher untersuchen zu können, wurden zum einen DNA-Proben von Ratten aus einem *in vivo* Versuch des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) in Heidelberg analysiert, zum anderen wurde ein *in vitro* Versuch mit Zellkulturen im DKFZ in Zusammenarbeit mit der Bergischen Universität Wuppertal durchgeführt. Die anschließend isolierte DNA wurde dann auf eine Änderung des Methylierungsgrades hin untersucht.

### **3.2.1 Analyse von Rattengewebe nach der Behandlung mit 3-Nitrobenzanthron**

In dem vom DKFZ durchgeführten Versuch wurden insgesamt drei Ratten einer intratrachealen Applikation mit dem stark mutagenen 3-Nitrobenzanthron (3-NBA) (2,0 mg/kg Körpergewicht) während einer Narkose mit Äther unterzogen [208 - 210]. Ebenso wurde einem Kontrolltier ausschließlich die Trägerlösung appliziert, in der das 3-NBA aufgenommen wurde. Bei dem Versuch gab es noch zwei weitere Ratten, die nach dem gleichen Verfahren mit einer geringeren Konzentration von 3-NBA (0,2 mg/kg Körpergewicht) inkubiert wurden. Auch zu diesen beiden Tieren gab es ein Kontrolltier, welchem nur die Trägerlösung appliziert wurde.

Alle Ratten wurden nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden getötet und unmittelbar danach wurde den Tieren mit der hohen Konzentration an 3-NBA und dem Kontrolltier die

folgenden Organe entnommen: Herz, Lunge, Leber, Niere, Pankreas, Dünndarm und Blase. Bei den Tieren mit geringer 3-NBA-Konzentration sowie dem anderen Kontrolltier wurden der Dünndarm sowie der rechte und linke Lungenflügel entfernt. Nach der Präparation wurden alle Organe bis zur Isolierung der genomischen DNA bei -80 °C gelagert [211]. Die DNA wurde mit dem Qiagen Genomic Tip 100G Kit aus dem isolierten Gewebe gewonnen. Bei den so erhaltenen 36 DNA-Proben wurde zunächst eine DNA-Quantifizierung mit einem UV/VIS-Spektrometer durchgeführt, damit für die anschließende Probenaufbereitung Aliquote mit jeweils 10 µg DNA verwendet werden konnten.

Bei den DNA-Proben handelt es sich, durch die Inkubation mit 3-NBA, um vermutlich adduktivierte DNA. Deshalb ist es wichtig sicherzustellen, dass der eingesetzte Enzymmix bzw. die Konzentration der SPD die betreffende DNA auch in der Hydrolysedauer von 3 Stunden in ihre Mononukleotide zerlegen kann [211]. Die Anlagerung von nukleophilen Substanzen an die DNA kann den freien Zugang für das Enzym zur Phosphordiesterbindung erschweren, weshalb die Hydrolyse der DNA verlangsamt wird [212, 213]. Folglich sollte die DNA vor der Derivatisierung nicht vollständig hydrolysiert vorliegen. Der Wert des Methylierungsgrades würde dabei in Richtung einer vermeintlichen Hypomethylierung verschoben, da in erster Linie methylierte DNA von der Adduktivierung betroffen und diese DNA-Abschnitte bevorzugt im Oligobereich des Elektropherogramms wieder zu finden sein sollten [214 - 218]. Um diesem Effekt vorzubeugen, wurde die Ratten-DNA mit „15-fach“ Enzym (37,5 mU/µl SPD und 150 mU/µl MN) hydrolysiert. Diese Enzymmixkonzentration kommt auch beim <sup>32</sup>P-Postlabeling für hoch adduktivierte DNA zum Einsatz. Nach der Hydrolyse und Derivatisierung der DNA-Proben wurden diese 1:200 mit entgastem Tridest-Wasser verdünnt und im Anschluss mittels CE-LIF analysiert.

Um den Methylierungsgrad bei diesen Proben bestimmen zu können, mussten mindestens 9 Wiederholungsmessungen einer Probe (3 Probenaliquote wurden jeweils analysiert) durchgeführt werden, um einen verlässlichen Mittelwert für die Methylierung zu erhalten (Vorversuch mit einer Lungengewebsprobe).

Für die große Zahl an Messungen (ca. 400) war es erforderlich, nicht nur tagsüber, sondern auch über Nacht messen zu können. Die Software <sup>32</sup>Karat der CE Pace MDQ<sup>TM</sup> von Beckman Coulter ermöglicht es, mehrere Einzelläufe in einer Sequenz hintereinander abzurufen, ohne dass ein Operator anwesend sein muss. Hierdurch waren etwa 32 Analysen pro 24 Stunden möglich, wobei die Auswertung der Elektropherogramme im Anschluss an die Sequenz erfolgen konnte. Im Vorfeld musste dabei allerdings berücksichtigt werden, dass der eingesetzte Fluoreszenzmarker BODIPY<sup>®</sup>-FL-EDA oxidationsempfindlich ist und die Proben für

eine Sequenz bis zu 12 Stunden im Probenrack der CE bei 25 °C verbringen mussten. Durch die Oxidation von BODIPY entstehen Abbauprodukte, die eine Auswertung bzw. die Integration des Signals von 5'-Methylcytosin nach ca. 3 Stunden nicht mehr möglich machen [203]. Durch eine Überschichtung der verdünnten Proben mit Paraffinöl wird diese von der Umgebungsluft abgeschlossen [203, 219], sodass die Probe für etwa 15 Stunden stabil ist. Um jedoch bei der Analyse der Rattenproben sicher zu sein, dass alle Läufe im Anschluss auswertbar waren, wurden die Sequenzen auf eine Anzahl von 15 Einzelläufen (Gesamtdauer ca. 12 Stunden) begrenzt [203] und nach folgendem Analyseschema vermessen:

Ein Aliquot einer Probe wurde immer 3-mal hintereinander analysiert. Im Anschluss erfolgte die Analyse der Kontrolle ebenfalls in 3 aufeinander folgenden Analysen, um eine Änderung im Methylierungsgrad nicht aufgrund von veränderten elektrophoretischen Bedingungen zu bestimmen. So konnte gewährleistet werden, dass für jede Messung die Bedingungen nahezu identisch waren und der direkte Vergleich von Probe und Kontrolle gezogen werden konnte.

Um sicherzustellen, dass die Probenvorbereitung bei allen Proben mit der gleichen Effizienz stattgefunden hat, wurde bei jeder Vorbereitung eine CT-DNA mit hydrolysiert, derivatisiert und anschließend ebenfalls mit der CE-LIF analysiert und ausgewertet. Durch den Vergleich des Methylierungsgrades der CT-DNA mit CT-DNA's aus anderen Probenvorbereitungen ist es möglich, direkt Probleme bzw. aufgetretene Fehler während einer Probenaufbereitung zu erkennen.

Bei der großen Anzahl von durchzuführenden Messungen ist es von großer Wichtigkeit gewesen, eine einheitliche und eindeutige Proben- und „Datenfile“-Codierung anzulegen, damit zu jedem Zeitpunkt der Messungen ein Elektropherogramm der entsprechenden Probe zu-geordnet werden konnte. Dies war möglich, da jeder Datenfile das Datum sowie eine dreistellig fortlaufende Nummer trug, die mit jedem neuen Datum bei 001 begann (z.B. 130505011 bedeutet, die Messung wurde am 13.05.2005 durchgeführt. Es handelt sich um den 11. Lauf an diesem Tag). Des Weiteren wurde bei jedem Datenfile die „Sample ID“ ausgefüllt, die sowohl eine dreistellige Sequenznummer als auch das Datum und die Laufnummer beinhaltete (z.B. 036/130505011, Sequenz 36 Lauf 11 am 13.05.2005 gemessen). Jede Sequenznummer steht für ein Begleitblatt, welches weitere Probeninformationen enthält sowie die genauen Positionen von Spüllösungen, Pufferlösung und Proben auf den jeweiligen Racks in der CE (siehe Anhang Begleitblätter für Sequenzen). Um mehr Informationen in einen Datenfile einbringen zu können, wurde die „Description“ der <sup>32</sup>Karat-Software verwendet. Hier kann ein Text erstellt werden, der den Namen der Probe, das Datum der Probenaufbereitung, die Sample ID, den verwendeten Trennpuffer, die Probenverdünnung, die Tempe-

ratur der Kapillare, die Höhe der Trennungsspannung, die eingestellte Detektorempfindlichkeit sowie die Anzahl der jeweiligen Messungen aus einem Aliquot enthält. Anhand dieser Informationen ist es möglich, eine Probe zusammen mit den Bedingungen, unter denen das Elektropherogramm entstand, eindeutig zuzuordnen.

Die Auswertung der Elektropherogramme erfolgte durch eine manuelle Integration der Signale von Cytosin und 5'-Methylcytosin mit der <sup>32</sup>Karat-Software. Die manuelle Auswertung macht es erforderlich, dass immer dieselbe Person sowohl die Daten einer Versuchsreihe als auch die verwendeten Korrekturfaktoren bestimmt, da jede Person ihren ganz individuellen „Integrationsstil“ entwickelt. Dieser sollte für alle Integrationen gleich sein. Durch Reproduzierbarkeitstests konnte gezeigt werden, dass, wenn ein und dieselbe Person einen Datenfile mehrfach an verschiedenen Tagen auswertet, der ermittelte Methylierungsgrad um +/- 0,02 % schwankt. Das zeigt, dass die manuelle Integration geeignet ist, um zuverlässige Messwerte zu erhalten.

Die Auswertung der Elektropherogramme der Rattenproben erfolgte in einer „Doppel-Blindstudie“. Hierbei wurde der Operator für die Auswertung nicht informiert, ob es sich um Proben oder Kontrollen handelte, sodass eine unbewusste Beeinflussung des Operators bei seiner Integration ausgeschlossen werden konnte.

### **3.2.1.1 Vergleich der Analyseergebnisse von Versuchs- und Kontrolltieren**

Die gesamten Analysen wurden nach dem oben beschriebenen Schema durchgeführt und haben zu den Ergebnissen in den folgenden Tabellen geführt.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte freundlicherweise durch Herrn PD Dr. Scherer vom Analytisch-Biologischen Forschungslabor in München. Vergleicht man den Methylierungsgrad der drei Ratten (Tabelle 2), die mit einer hohen Konzentration von 3-NBA behandelt wurden, mit dem des entsprechenden Kontrolltieres, so kann bei Dünndarm und Lunge eine signifikante Änderung mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % festgestellt werden. Die Organe Pankreas, Herz, Niere, Leber und Blase zeigen hingegen im Vergleich zur Kontrolle keinen signifikanten Unterschied im Methylierungsgrad. Bei den Versuchstieren, die mit der geringeren Konzentration von 3-NBA instilliert wurden, lässt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied erkennen.

Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis ist, dass die Adduktierung der DNA gewebespezifisch abläuft, sodass die DNA in allen Organen nicht im gleichen Maße durch Adduktbildung verändert wird. Ebenso ist die Reparatur solcher DNA-Schäden in ihrer Effizienz von

Gewebe zu Gewebe und von Individuum zu Individuum unterschiedlich. Lunge und Dünndarm, bei denen eine Änderung im Methylierungsgrad zu beobachten war, haben gemeinsam, dass sie über ein Gewebe verfügen, welches nach auftretenden Schäden schnell repliziert wird, um mögliche DNA-Schäden sowie den Zellverlust ausgleichen zu können.

Methylierungsgrade der Rattenorgane			
Organ	Versuchstier	genomweiter Methylierungsgrad [%]	Standardabweichung [%]
rechte Lunge	4	4.06	0.20
	5	4.06	0.20
linke Lunge	4	3.97	0.15
	5	4.19	0.24
Lunge	Kontrolle	<b>4.01</b>	<b>0.22</b>
Dünndarm	4	-*	-*
	5	4.03	0.32
	Kontrolle	<b>4.08</b>	<b>0.30</b>

**Tabelle 1:** Organe der Ratten nach Applikation einer 3-NBA-Konzentration von 0,2 mg/kg Körpergewicht (\* für diese Organe gab es keine DNA-Probe)

Eine mögliche Erklärung, warum man gerade in der Lunge einen Unterschied im Methylierungsgrad feststellen konnte, ist der sehr nahe Ort der Applikation, der eine hohe Konzentration von 3-NBA in diesem Bereich vermuten lässt.



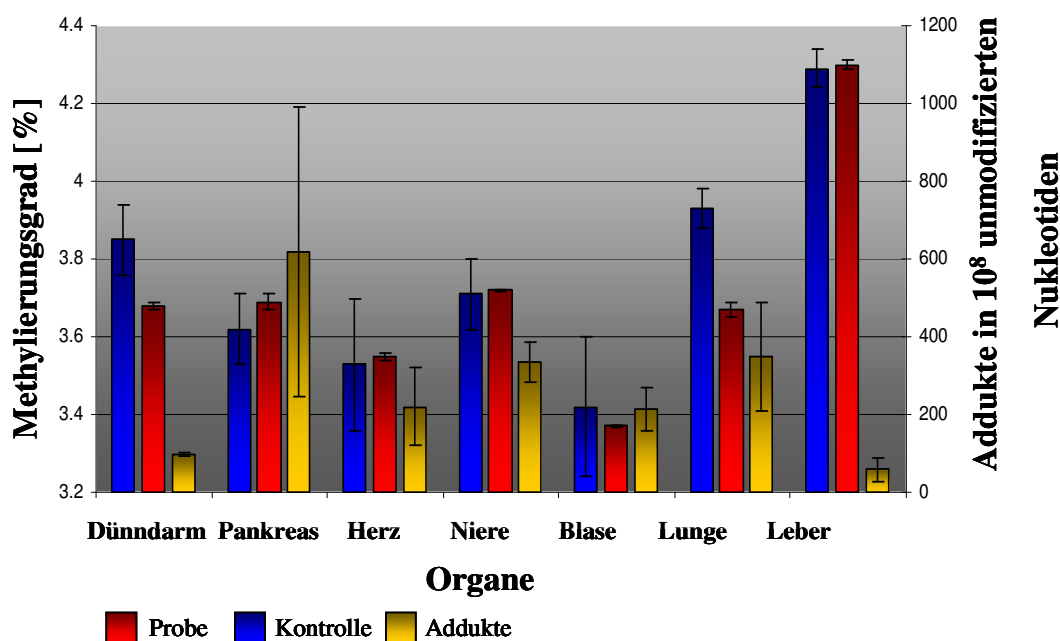
Methylierungsgrade der Rattenorgane			
Organ	Versuchstier	genomweiter Methylierungsgrad [%]	Standardabweichung [%]
Herz	1	3,56	0,04
	2	3,53	0,09
	3	_*	_*
	Kontrolle	<b>3,53</b>	<b>0,17</b>
Lunge	1	3,59	0,10
	2	3,72	0,06
	3	3,72	0,06
	Kontrolle	<b>3,83</b>	<b>0,05</b>
Leber	1	4,29	0,09
	2	4,32	0,05
	3	4,30	0,10
	Kontrolle	<b>4,29</b>	<b>0,05</b>
Niere	1	3,71	0,05
	2	3,72	0,04
	3	_*	_*
	Kontrolle	<b>3,71</b>	<b>0,09</b>
Pankreas	1	3,67	0,04
	2	3,65	0,15
	3	3,75	0,12
	Kontrolle	<b>3,62</b>	<b>0,09</b>
Dünndarm	1	3,68	0,14
	2	3,65	0,14
	3	3,72	0,08
	Kontrolle	<b>3,85</b>	<b>0,09</b>
Blase	1	3,38	0,13
	2	3,36	0,08
	3	3,38	0,08
	Kontrolle	<b>3,42</b>	<b>0,18</b>

**Tabelle 2:** Organe der Ratten nach Applikation einer 3-NBA-Konzentration von 2,0 mg/kg Körpergewicht (\* für diese Organe gab es keine DNA-Probe)

### 3.2.1.2 Vergleich des Methylierungsgrades mit den jeweilig gemessenen Addukt-Konzentrationen der verschiedenen Organe

Aus den gleichen Gewebeproben wurde im DKFZ der Adduktlevel für jedes Organ mittels  $^{32}\text{P}$ -Postlabeling bestimmt [203]. Hierbei wurde festgestellt, dass jedes Organ eine spezifische Addukt-Konzentration aufweist und diese keine Korrelation zu den in Wuppertal bestimmten genomweiten Methylierungsgraden zeigt [220].

Abbildung 17 gibt einen Überblick über die verschiedenen Organe mit ihren spezifischen Addukt-Konzentrationen und den ermittelten Methylierungsgraden. In der Abbildung ist der durchschnittliche Methylierungsgrad der drei Ratten mit hoher Konzentration und den dazugehörigen Kontrollen dargestellt.



**Abbildung 17:** Methylierungsgrad und Adduktlevel der Rattenproben. Die Grafik zeigt sowohl die ermittelten Werte der Methylierung in % als auch die Addukt-Konzentration per  $10^8$  unmodifizierte Nucleotide nach Applikation von 2,0 mg/kg Körpergewicht 3-NBA.

Es fällt auf, dass sich die Adduktlevel der verschiedenen Organe bei gleicher Konzentration von 3-NBA um bis zu einem Faktor von 10 unterscheiden. Der fehlende Bezug einer Änderung des Methylierungsgrades mit dem entsprechenden Adduktlevel kann bei den Organen Dünndarm und Pankreas beobachtet werden. Der Dünndarm der drei Tiere, die mit 2,0 mg/kg Körpergewicht 3-NBA inkubiert wurden, zeigt eine signifikante Änderung des Methylierungsgrades, obwohl in diesem Organ der relative Adduktlevel mit 98,1 pro  $10^8$  Nucleotiden den zweitniedrigsten Wert von allen untersuchten Organen aufweist. Dem

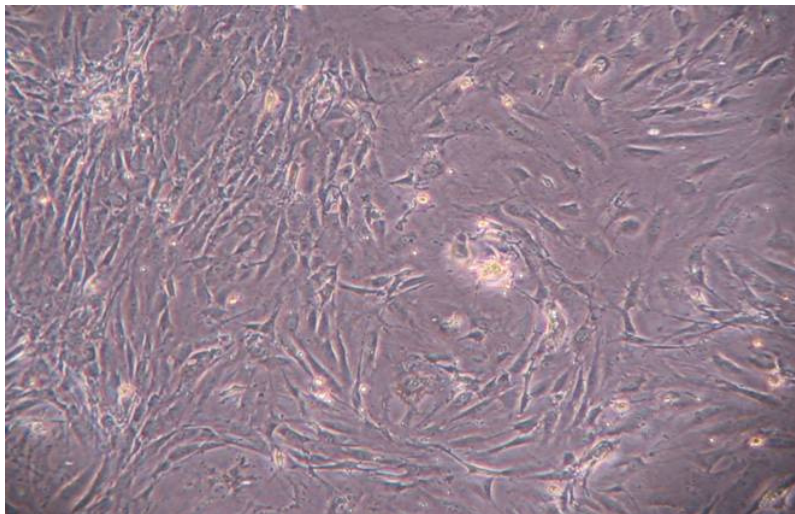
gegenüber wird beim Pankreas, die mit Abstand höchste Addukt-Konzentration mit 619,9 pro  $10^8$  Nukleotiden, jedoch kein signifikanter Unterschied im Methylierungsgrad im Vergleich zur Kontrolle festgestellt.

An den Ergebnissen der Adduktlevel-Bestimmung der verschiedenen Organe lässt sich ableiten, dass die Höhe der Adduktrate in der DNA der Ratte in keiner erkennbaren Beziehung zu einer Änderung des Methylierungsgrades steht.

### 3.2.2 Zellkulturexperimente mit V79-Zelllinien

In dem von mir im DKFZ Heidelberg durchgeführten *in vitro* Versuch mit transfizierten Zelllinien ging es um die Untersuchung des Methylierungsgrades der Zelllinien-DNA nach erfolgter Behandlung mit verschiedenen Kanzerogenen (Benzo[*a*]pyren, (B[*a*]P); 3-Nitrobenzanthron, (3-NBA); 4-Aminobiphenyl, (4-ABP) und Benzo[*c*]fluoren, (B[*c*]F).

Bei der ausgewählten Zelllinie handelt es sich um Lungenfibroblasten eines männlichen chinesischen Hamsters (V79-Zelle), die in den 50iger Jahren etabliert wurde [221].



**Abbildung 18:** Aufnahme der V79-Zellen und ihr adhärentes Wachstum in einer Kulturflasche

Der Vorteil dieser Zelllinie liegt unter anderem in ihrer sehr kurzen Generationszeit von etwa 12 Stunden, ihrer außergewöhnlichen Chromosomenstabilität, sowie ihrer Eigenschaft, sich mit hoher Klonierungseffizienz stabil transfizieren zu lassen [222 - 224]. Diese Zelllinie findet seitdem in vielen Toxizitäts- und Mutagenitätsstudien ihre Anwendung [225 - 227]. Von dieser ursprünglichen Lungenfibroblasten-Zelllinie gibt es seitdem viele genetisch

verschiedene Varianten, von denen vier für den Versuch eingesetzt wurden. Dabei handelt es sich um eine nicht transfizierte V79-Zelllinie und 3 mit Cytochrom P450 transfizierten Zelllinien.

Die nicht transfizierten V79-Zellen des so genannten Mainzer Subklons (V79MZ) wurden als Kontrolle für das gesamte Zellkultorexperiment verwendet und mit allen Kanzerogenen inkubiert, da diese weder endogenes Cytochrom P450 [228, 229] noch signifikante N-Acetyltransferase-Aktivität aufweisen [230].

Es gibt inzwischen mehr als 300 bekannte Gene der Enzymfamilie Cytochrom P450 [231], die sich in ihrer Substrataffinität und -spezifität unterscheiden. Darüber hinaus sind verschiedene Isoformen des Cytochroms P450 spezie-, organ- und gewebespezifisch verteilt [232, 233]. Cytochrom P450 Enzyme aktivieren Kanzerogene zu reaktiven Intermediaten, die DNA-Addukte bilden können [234 - 238]. So ist das CYP1A1 das aktivste Enzym für die Hydroxylierung von B[a]P und B[c]F.

Die transfizierte Zelllinie V79MZ1A1 exprimiert das menschliche Gen *P450 IA1*, welches in den Lungen von Rauchern und in Bronchialkarzinomen nachgewiesen werden kann [239]. Bei der Zelllinie V79MZ1A2 handelt es sich hingegen um eine mit dem menschlichen Gen *CYP1A2* transfizierte Zelllinie. Dieses Cytochrom P450 wird vor allem in der Leber exprimiert und sorgt für die Metabolisierung verschiedener Arzneistoffe [240], aromatischer Amine und heterozyklischer Arylamine, die eine ausgeprägte mutagene Wirkung besitzen [241]. Die eingesetzten Zellen verfügen somit über eine gesteigerte N-Hydroxylierungs-Aktivität, die bei einer Inkubation mit 4-ABP zu reaktiven Metaboliten führt. In einem intakten Organismus werden diese über die Blutbahn in die Nieren und von da in die Harnblase transportiert, wo sie im Blasenepithel Arylamin-DNA-Addukte bilden [242, 243].

Die vierte verwendete Zelllinie V79MZNH wurde auf eine gesteigerte N-Acetyltransferaseaktivität hin selektiert. Im Versuch wurden diese Zellen nur mit 3-NBA inkubiert. N-Acetyltransferasen sind ausschließlich cytosolisch verteilte fremdstoffmetabolisierende Phase-II-Enzyme, welche die Übertragung von Acetylresten katalysieren [244].

In dem Zellkulturversuch sollte gezeigt werden, ob die transfizierten bzw. nicht transfizierten V79-Zellen durch die Exposition gegenüber Kanzerogenen eine Änderung des Methylierungsgrades der DNA erfahren.

### 3.2.3 Ablauf des Zellkulturversuches

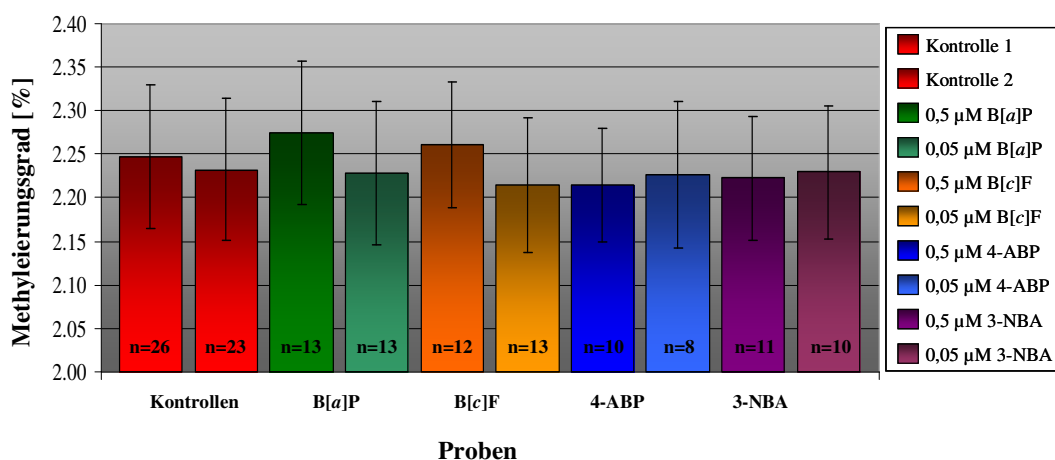
Beim Ablauf des Versuches wurde zunächst mit den V79MZ-Zellen Toxizitätstests (siehe experimenteller Teil: Toxizitäts-Test 5.9.8) durchgeführt, um die maximal einzusetzende Kanzerogen-Konzentration zu ermitteln. Dieser Toxizitätstest wurde insgesamt viermal mit verschiedenen Konzentrationen von Kanzerogenen wiederholt und auch im Verlauf mit allen vier verwendeten Zelllinien durchgeführt, um beim Expositionsversuch die optimale Konzentration einzusetzen. Ein großes Problem stellte die sehr schlechte Löslichkeit der eingesetzten Kanzerogenen im Nährmedium der Zellen dar, sodass die Stoffe zunächst in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst werden mussten, um später schrittweise in das Nährmedium verdünnt werden zu können. Aufgrund der schlechten Löslichkeit der Kanzerogene konnten die verdünnten Lösungen erst unmittelbar vor ihrer Verwendung angesetzt werden, da nach ca. 48 Stunden ein Ausfallen beobachtet wurde. Die Konzentration an DMSO musste, da es sich um ein Zellgift handelt, welches sehr gut über die Zellmembran ins Zellinnere gelangen kann [245, 246], soweit wie möglich reduziert werden.

Die Toxizitätstests ergaben eine von den Zellen tolerierte maximale Kanzerogen-Endkonzentration von 0,5  $\mu\text{M}$ . Nur 3-NBA wirkt auch bei Konzentrationen grösser 0,05  $\mu\text{M}$  auf V79MZNH-Zellen toxisch. Bei allen Zellen und Kanzerogenen wurde zusätzlich noch eine 10-fach geringere Konzentration eingesetzt.

Im Anschluss an die Bestimmung der Kanzerogen Maximalkonzentrationen wurden von den V79MZ-Zellen insgesamt 2 Kontrollflaschen (ohne Kanzerogenen, jedoch mit gleicher Konzentration an DMSO wie die Probenflaschen mit Kanzerogenen) und für jede Substanz und Konzentration eine weitere Kulturflasche (8 Probekulturen) angesetzt. Bei der Zelllinie V79MZ1A1 wurden ebenfalls zwei Kontrollen sowie 4 Kulturflaschen für eine Inkubation mit B[a]P und B[c]F vorbereitet. Für die V79MZ1A2-Zelllinien wurden eine Kontrolle und zwei Flaschen für die Inkubation mit 4-ABP angesetzt. Bei der Zelllinie V79MZNH mussten zwei Kontrollen sowie jeweils zwei Flaschen für jede Konzentration an 3-NBA angelegt werden, um im Anschluss genügend Zellen für eine DNA-Isolierung zu erhalten, da diese Zelllinie ein wesentlich schlechteres Wachstumsverhalten als die anderen Kulturen zeigte. Der genaue Ablauf vom Ansetzen einer Kulturflasche, Umsetzen, Bestimmung der Zellzahl bis hin zur Isolierung der DNA mit anschließender Quantifizierung befindet sich im experimentellen Teil zur Zellkultur. Die extrahierte genomische DNA wurde zu 10  $\mu\text{g}$  aliquotiert und nach erfolgter Probenaufbereitung mit der CE-LIF analysiert.

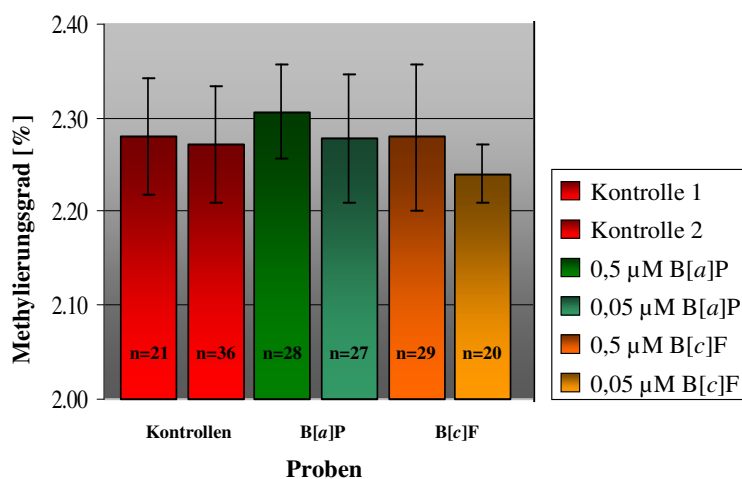
### 3.2.4 Methylierungsgrades der mit Kanzerogenen inkubierter Zelllinien

Von den insgesamt 23 DNA-Proben wurden über 480 Analysen mit der CE durchgeführt. Hierbei wurde nach demselben Analysenschema vorgegangen, welches bereits bei den Rattenproben erfolgreich eingesetzt wurde. In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse der V79MZ-Zellen zusammengefasst.

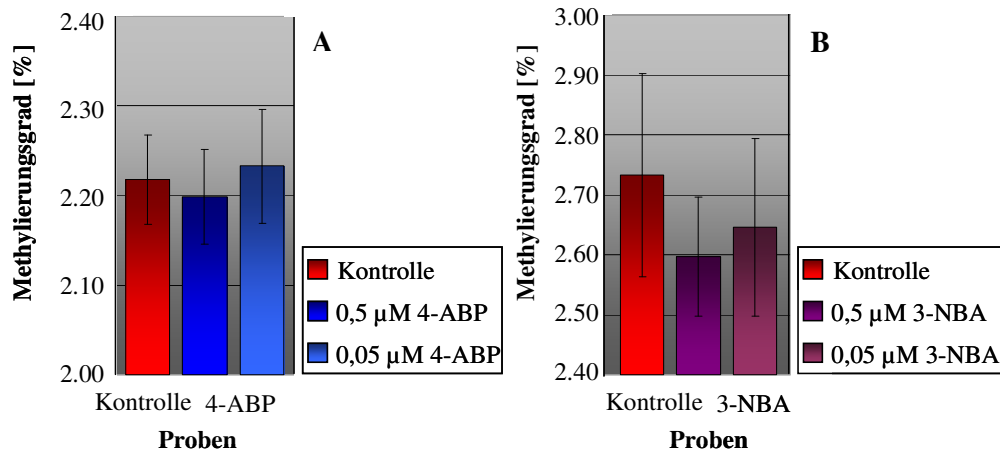


**Abbildung 19:** Methylierungsgrade der „Kontroll-Zellen“ (V79MZ) nach Inkubation mit den verschiedenen Kanzerogenen für jeweils 48 Stunden.

Aus der Abbildung 19 ist ersichtlich, dass der Methylierungsgrad der Proben zwischen 2,21 und 2,27 % liegt und keinerlei signifikante Änderungen im Vergleich zur Kontrolle aufweist. Dieses Ergebnis wurde erwartet, da die V79MZ Zellen keine oder nur geringe CYP-, bzw. N-Acetyltransferase- und Reduktase-Aktivität haben. Die Ergebnisse der V79MZ1A1, V79MZ1A2 und V79MZNH sind in den folgenden Diagrammen dargestellt.



**Abbildung 20:** Methylierungsgrade der Zelllinien V79MZ1A1. Nach 48 Stunden-Inkubation mit B[a]P bzw. B[c]F.



**Abbildung 21:** Methylierungsgrade der Zelllinien V79MZ1A2 nach 48 Stunden-Inkubation mit 4-ABP (A) und Methylierungsgrade der Zelllinien V79MZNH nach 48 Stunden-Inkubation mit 3-NBA (B).

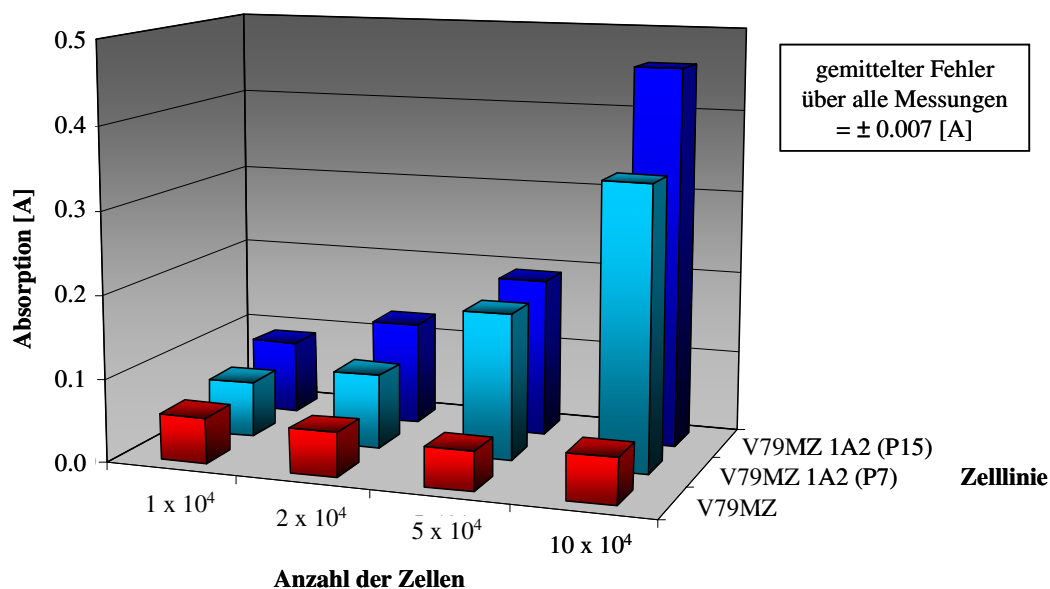
Bei keiner der drei verwendeten Zelllinien lässt sich ein signifikanter Unterschied im Methylierungsgrad erkennen. Hierfür gibt es drei mögliche Erklärungen:

1. Die transfizierten Zellen besitzen kein aktives Enzym bzw. das entsprechende Gen ist im Laufe der Zellzyklen verloren gegangen.
2. Die Kanzerogene fallen beim Lösen nicht wie beobachtet erst nach 48 Stunden, sondern schon unmittelbar nach einer Verdünnung im Nährmedium aus. Dadurch wäre die effektive Konzentration geringer.
3. Die gewählte Kanzerogen-Konzentration reicht nicht aus, um genügend DNA-Addukte zu bilden, die zu einer Änderung des Methylierungsgrades führen könnten.

Aufgrund dieser drei möglichen Erklärungen für das Zustandekommen der Untersuchungsergebnisse wurden drei weitere Versuche durchgeführt.

1. Um überprüfen zu können, ob die transfizierten Zellen noch über aktive Enzyme verfügen, wurde die Aktivität des Enzyms der Zelllinie V79MZ1A2 in einem weiteren Versuch bestimmt. Als Substrat wurde 3-Cyano-7-Ethoxycoumarin eingesetzt, welches durch CYP 1A Enzyme zu 3-Cyano-7-Hydroxycoumarin deethyliert wird. Hierdurch erhöht sich die Fluoreszenzintensität um mehr als das Doppelte. Zudem verschieben sich die Anregungs- und Emissionswellenlängen von 355 nm auf 408 nm bzw. von 410 nm auf 450 nm. Somit stellt die Fluoreszenz von 3-Cyano-7-Hydroxycoumarin ein Maß für die Aktivität des Cytochroms-P450 1A in der Zelle dar [247 - 250].

Die Ergebnisse der Enzymaktivitätsbestimmung sind in Abbildung 22 gezeigt und widerlegen die zuvor geäußerte Vermutung, dass die Zellen über kein aktives Enzym mehr verfügen.



**Abbildung 22:** Enzym-Aktivitäts-Bestimmung (Bestimmung der Deethylierung); der 7. Passage und 15. Passage

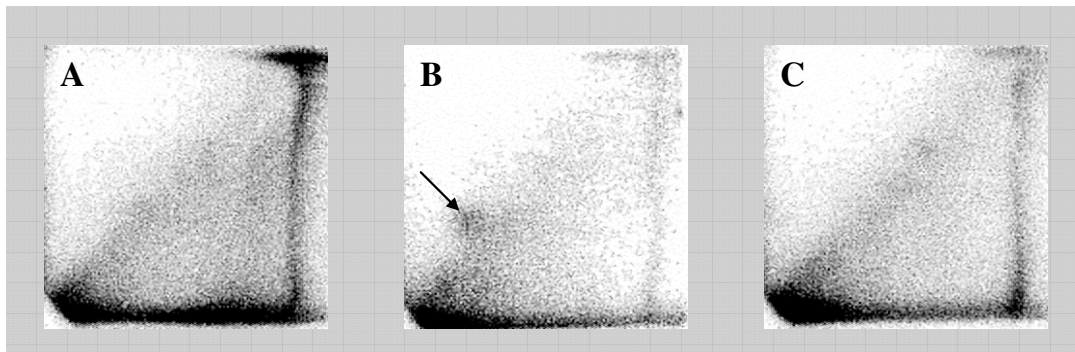
Im Gegensatz zur Kontrolle (V79MZ) verfügt die eingesetzte Zelllinie V79MZ1A2 über aktives Cytochrom P450. Überraschend ist jedoch, dass die Enzymaktivität der V79MZ1A2-Zellen in der 7. Passage geringer ist als in der 15. Passage. Dies wurde in einem zweiten Versuch bestätigt. Erwartet wurde, dass nach Passage 10 die Enzymaktivität des CYP geringer werden würde [222, 225]. Dennoch zeigen sowohl die Zellen aus Passage 7 als auch aus Passage 15 eine ausreichend hohe metabolische Enzymaktivität, um 4-ABP zu aktivieren [251].

2. Die Überprüfung der Löslichkeit der Kanzerogene ergab zum Teil starke Unterschiede. So konnte 3-NBA nur in einer Konzentration von maximal  $2 \mu\text{M}$  dauerhaft in Lösung (Komplettmedium) gehalten werden [252]. Im Gegensatz hierzu löste sich 4-ABP in einer Konzentration von  $50 \mu\text{M}$  ohne Probleme im Komplettmedium und fiel auch nicht mehr aus [252]. Die zuvor angestellte Vermutung lässt sich somit zumindest für 3-NBA bestätigen, da von 3-NBA wie auch von allen anderen Stammlösungen mit einer Konzentration von  $15,5 \mu\text{M}$  in Medium angesetzt wurden. 3-NBA ist wahrscheinlich schon vor der Zugabe zu den Zellen ausgefallen, wodurch die Endkonzentration geringer als die gewünschten  $0,05 \mu\text{M}$  war.

3. Die dritte Vermutung, dass die eingesetzte Konzentration der Kanzerogene zu gering war, konnte durch die Ergebnisse des  $^{32}\text{P}$ -Postlabelings, welches ebenfalls im DKFZ durchgeführt



wurde, bestätigt werden. Jedoch wurde auch hier nur die DNA der Zelllinien V79MZ und V79MZ1A2, die mit 4-ABP inkubiert wurden, exemplarisch untersucht. 4-ABP sollte durch CYP1A2 aktiviert werden und C-8 Desoxyguanosin-Addukte bilden. Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass bei einer eingesetzten Endkonzentration von 50  $\mu\text{M}$  nur ca. 2 Addukte pro  $10^8$  unmodifizierte Nukleotide nachzuweisen sind. Dies liegt nahe der Nachweisgrenze der Methode. In den Abbildungen 23 (A-C) sind die Dünnschicht-Chromatogramme des  $^{32}\text{P}$ -Postlabelings der V79MZ und V79MZ1A1 dargestellt.



**Abbildung 23 A-C:** Chromatogramme aus dem  $^{32}\text{P}$ -Postlabeling-Versuch. In Abbildung A ist das Chromatogramm der Zelllinie V79MZ gezeigt, die mit 50  $\mu\text{M}$  4-ABP behandelt wurde. Abbildung B zeigt das Chromatogramm der transfizierten V79MZ1A1-Zellen mit einem Pfeil, der auf das Addukt weist. Als zusätzliche Kontrolle ist in Abbildung C das Chromatogramm derselben Zelllinie dargestellt, die nur mit DMSO behandelt wurde.

Dem Dünnschicht-Chromatogramm A kann man eindeutig entnehmen, dass die V79MZ-Zellen nicht über die benötigte enzymatische Ausstattung verfügen, um 4-ABP effektiv zu aktivieren. Chromatogramm B zeigt im Gegensatz dazu V79MZ1A1-Zellen, die einen schwachen, aber sichtbaren Spott von C-8-dG Addukt aufweisen. Mit Chromatogramm C wird nur gezeigt, dass die Zelllinie V79MZ1A1 ohne die Behandlung mit 4-ABP entsprechend der Kontrolle V79MZ keinen Adduktspott ausweist. Die eingesetzten Konzentrationen als auch die Löslichkeit der Kanzerogene hat einen großen Einfluss auf die Adduktbildungsrate und wahrscheinlich auch auf den Methylierungsgrad. Somit ist es nicht verwunderlich, dass zumindest bei den Zellen, die mit 4-ABP behandelt wurden, keine Änderung im Methylierungsgrad festzustellen war. Eine weitere Überprüfung der Löslichkeit von B[a]P und B[c]F sowie die Bestimmung des Adduktlevels steht noch aus, wobei auch hier mit einem ähnlichen Ergebnis wie bei 4-ABP zu rechnen ist.

Die Ergebnisse der Zellkulturversuche waren insgesamt anders als im Vorfeld erwartet wurde. Die geringe Adduktbildungsrate trotz hoher CYP-Aktivität der Zellen war unerwartet. In einem *in vivo*-Versuch an Ratten, die mit 3-NBA behandelt wurden, konnten erheblich höhere

Adduktlevel in den verschiedenen Organen festgestellt werden [252]. Eine mögliche Erklärung für die Ergebnisse der Zellkulturversuche ist, dass die verwendeten V79-Zelllinien für die Versuchsanordnung nicht geeignet sind. Aufgrund dessen wurde das Experiment mit Caco-2-Zellen, mit denen bereits in einer früheren Studie gute Ergebnisse erzielt werden konnten, wiederholt. In Kooperation mit Dr. Geoff Matthews vom Lung Research Laboratory, Royal Adelaide Hospital in Australien wurde der Versuch mit den Caco-2-Zellen (humane Dünndarmenterozyten) durchgeführt, jedoch liegen zu diesem Zeitpunkt die Ergebnisse der Versuche noch nicht vor.

In einem weiteren *in vivo*-Experiment mit Mäusen sollte deshalb die Bedeutung der CYP-Aktivität für die metabolische Aktivierung von B[a]P untersucht werden. Hierbei sollte unter anderem geklärt werden, ob CYP maßgeblich für die Aktivierung von B[a]P verantwortlich ist, was zurzeit die allgemeine Lehrmeinung darstellt. Die Ergebnisse dieser *in vivo*-Studie werden im folgenden Kapitel 3.3 dargestellt.

### **3.3 Untersuchung der clearance von Benzo[a]pyren im Blut von Knockout-Mäusen**

In einer Studie von Uno et. al [253] wurden Knockout-Mäuse mit Gendefekten im *Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1)*, *1A2* und *1B1* im Einzel-Knockout, sowie *CYP1A1/1B1* und *CYP1A2/1A1* in Doppel-Knockout durch eine orale Applikation mit B[a]P inkubiert. Die eben erwähnten Gene waren in allen Organen und Körperzellen der Mäuse spezifisch ausgeschaltet. Bei diesen Mäusen wurden ebenfalls Blutproben nach erfolgter Applikation entnommen und auf eine Restkonzentration an B[a]P untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass die Knockout-Mäuse eine geringere B[a]P-Konzentration im Blut aufwiesen als die Wild-Typ (wt)-Mäuse. Dies bedeutet, dass, obwohl einige CYP-Gene spezifisch ausgeschaltet sind, die metabolische Aktivierung in diesen Tieren besser abläuft als in denen mit vollständig aktivem CYP [253]. Um den Einfluss von CYP bei der Metabolisierung von PAK's und somit auch auf den Methylierungsgrad besser zu verstehen, wurde aufbauend auf diese Studie in einer Kooperation mit den Instituten: Section of Molecular Carcinogenesis, Institute of Cancer Research, Sutton, UK; Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic; Cancer Research UK Molecular Pharmacology, Biomedical Research Centre, Dundee, UK; Division of Molecular Toxicology, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany and Cancer Biomarkers and Prevention Group, Biocentre, University of Leicester, UK, Knockout-Mäusen nach Applikation von B[a]P jeweils

mehrere Blutproben zu verschiedenen Zeiten entnommen. Diese Blutproben wurden anschließend bei -80 °C bis zur Probenaufbereitung gelagert und im Anschluss mit der HPLC - aufgrund der nativen Fluoreszenz von B[a]P - mit einem Fluoreszenzdetektor auf ihre Restkonzentration an B[a]P hin untersucht.

**Versuchsablauf:**

Bei den Mäusen handelte es sich um insgesamt 24 Versuchstiere, die in zwei Gruppen aufgeteilt waren. Gruppe 1 setzte sich zusammen aus 6 Knockout-Mäusen (hepatic cytochrom P450 reductase null = HRN), wovon die Hälfte als Kontrolle diente, und 6 wt-Mäusen, wovon ebenfalls drei Tiere als Kontrolle fungierten. In dieser ersten Gruppe wurden die Versuchstiere mit einer einmaligen intraperitonealen (Bauchhöhle) Injektion von 125 mg/kg Körpergewicht B[a]P inkubiert, welches in Weizenöl gelöst wurde. Den Kontrolltieren wurde nur das Weizenöl in einer intraperitonealen Applikation verabreicht. Im Anschluss an die Applikation wurde allen Mäusen nach jeweils 30 min, 1 h, 1,5 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h und 12 h 10 µL Blut aus dem Schwanz entnommen.

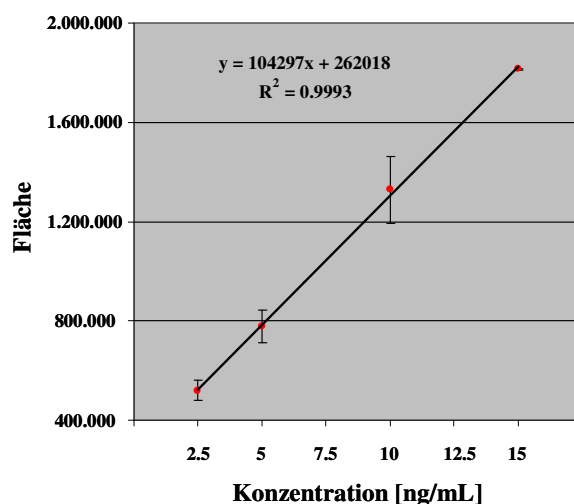
Die zweite Gruppe setzte sich ebenfalls nach dem gleichen Muster wie Gruppe 1 aus Knockout- und Wild-Typ-Mäusen zusammen. Jedoch wurden diese Versuchstiere in fünf aufeinander folgenden Tagen mit einer täglichen Dosis von 125 mg/kg Körpergewicht B[a]P inkubiert bzw. nur mit der Trägerlösung (Weizenöl). Nach der letzten von fünf erfolgten Applikationen wurde analog zu dem Zeitplan von Gruppe 1 den Tieren ebenfalls 10 µL Blut entnommen.

Bei den Knockout-Mäusen (HRN) handelt es sich um Tiere mit einem Gen-Defekt für NADPH:Cytochrom-P450-Oxidoreduktase in der Leber. Hiermit fehlt ihnen das gleichnamige Enzym, welches spezifisch in der Leber bzw. in den Hepatocyten der Leber exprimiert wird. NADPH:Cytochrom-P450-Oxidoreduktase dient allgemein als Elektronendonator für das Cytochrom-P450-Enzym, welches in den HRN-Mäusen zwar exprimiert wird, aber durch den ausgeschalteten Elektronentransfer in der Leber nicht aktiv ist [254]. Das Enzym Cytochrom P450 ist in der Leber jedoch nicht vollständig inaktiv. Die Leber besteht zwar zum überwiegenden Teil aus Hepatocyten, jedoch gibt es dort noch so genannte Kupferzellen, bei denen der Elektronentransfer nicht ausgeschaltet ist. Hierdurch kann, eine äußerst geringe Cytochrom-P450-Aktivität in der Leber nachzuweisen. Dieser fällt jedoch im Vergleich zu den wt-Mäusen verschwindend gering aus [254].

Die intraperitoneale Applikation wurde deshalb gewählt, da es die einzige Art der Verabreichung ist, die eine direkte Aufnahme von Substanzen über die Pfortader gewährleistet. Die

Pfortader gehört zum venösen Blutsystem der unpaaren Bauchorgane (Magen, Darm, Milz und Pankreas), die das sauerstoffarme und nährstoffreiche Blut direkt von den Organen zur Leber transportiert. Würde B[a]P über den oralen Weg aufgenommen, so könnte bereits im Darmgewebe eine Umsetzung erfolgen und bei einer intravenösen Applikation würde die Substanz zunächst im gesamten Körper verteilt und hierbei z.B. in der Lunge metabolisiert. Das gesamte Probenvolumen umfasste 191 Blutproben mit je 10 µL, die jeweils 3-mal in insgesamt 573 Analysen mit der HPLC vermessen wurden.

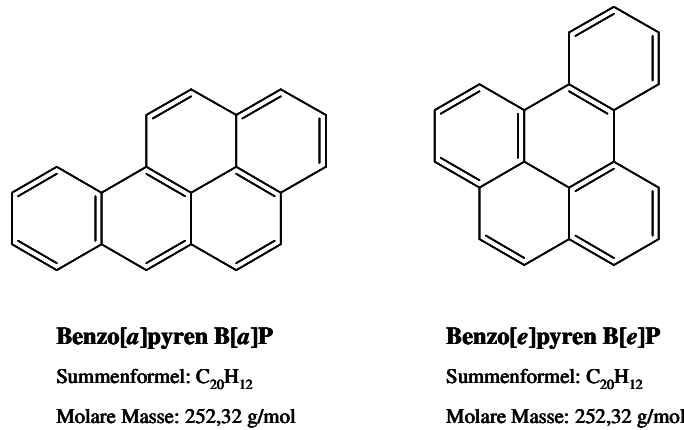
Vor Beginn der Messungen musste zunächst eine Kalibriergerade mit unterschiedlichen Konzentrationen an B[a]P erstellt werden. Hierfür wurde normales Mäuseblut mit einer definierten Menge an B[a]P versetzt und Abbildung 24 zeigt die Linearität zwischen 2,5 und 15 ng/mL.



**Abbildung 24:** Kalibriergerade der mit B[a]P versetzten Mäuseblutproben

Um eine Quantifizierung zu ermöglichen, wurde Benzo[e]pyren (B[e]P) als interner Standard eingesetzt. B[e]P eignet sich als interner Standard, da es unter den gegebenen Analysebedingungen von B[a]P getrennt, bei den verwendeten Anregungs- und Emissionswellenlängen (294 nm bzw. 404 nm) detektiert und B[a]P aus dem Blut extrahiert werden kann. In Abbildung 25 sind die Strukturformeln von B[a]P und B[e]P dargestellt.

Für die Quantifizierung von B[a]P musste mit B[e]P zunächst der Responsefaktor bestimmt werden. Dieser liegt bei 10,1, was bedeutet, dass sich B[a]P, bei den gegebenen Bedingungen, um den Faktor 10,1 empfindlicher nachweisen lässt als der interne Standard. Für die Ermittlung des Responsefaktors wurden jeweils zwei Verdünnungsreihen von B[e]P (25, 50, 100)



**Abbildung 25:** Struktur von B[a]P und dem internen Standard B[e]P.

und 150 ng/mL) und für B[a]P (2,5, 5, 10 und 15 ng/mL) angesetzt und anschließend jeweils dreimal hintereinander analysiert. Über die Formeln in Abbildung 26 wurde der Responsefaktor aus den Messwerten ermittelt. Mit der zweiten Formel lässt sich die Konzentration von B[a]P bestimmen.

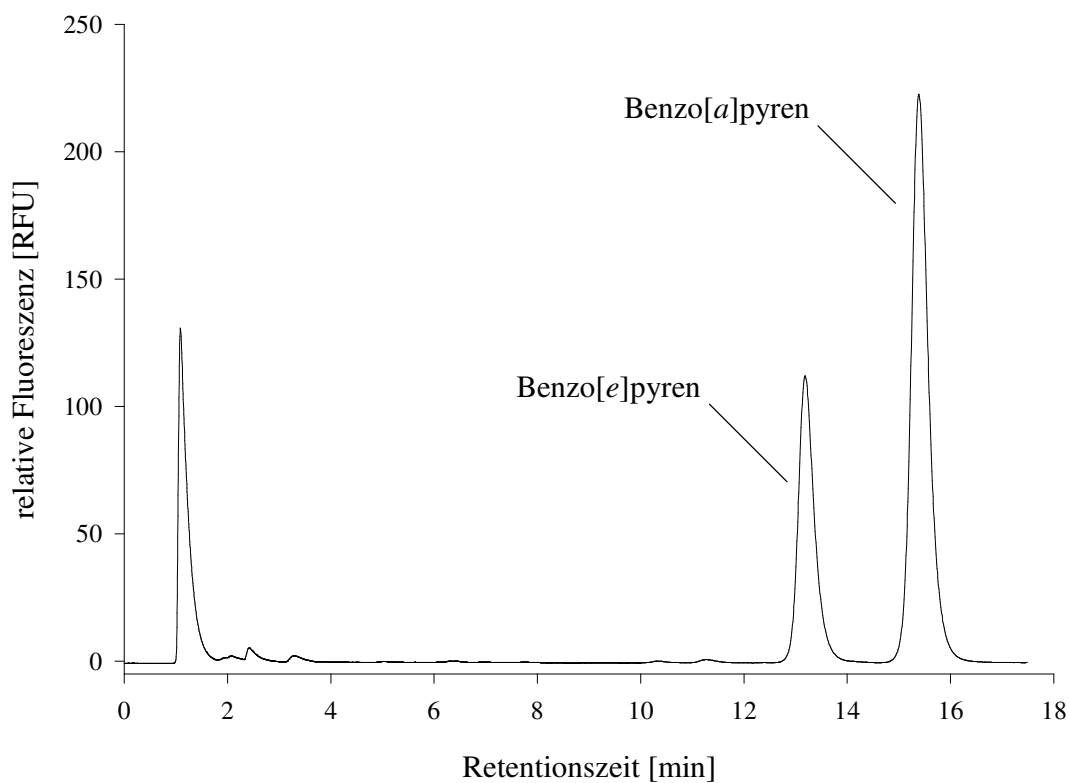
In einem weiteren Vorversuch wurde untersucht, ob sich B[a]P sowie B[e]P quantitativ aus dem Mäuseblut extrahieren lassen. Hierfür wurden jeweils 10 µL unbehandeltes Mäuseblut eingesetzt und mit 5 ng bzw. 10 ng B[e]P sowie 50 ng bzw. 100 ng B[a]P versetzt. Nach der vollständigen Probenaufbereitung wurde jede Probe viermal analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Extraktion von B[a]P und B[e]P aus dem Blut nahezu quantitativ (99,9%) erfolgt.

$$Rf = \frac{A(B[a]P) \cdot c(B[e]P)}{c(B[a]P) \cdot A(B[e]P)} \quad A(B[a]P) = \frac{A(B[a]P) \cdot c(B[e]P)}{Rf \cdot A(B[e]P)}$$

**Abbildung 26:** Formeln zur Bestimmung des Responsefaktors und zur Quantifizierung von B[a]P. (*Rf* = Responsefaktor; *A* = Peakfläche und *c* = Konzentration in ng/mL)

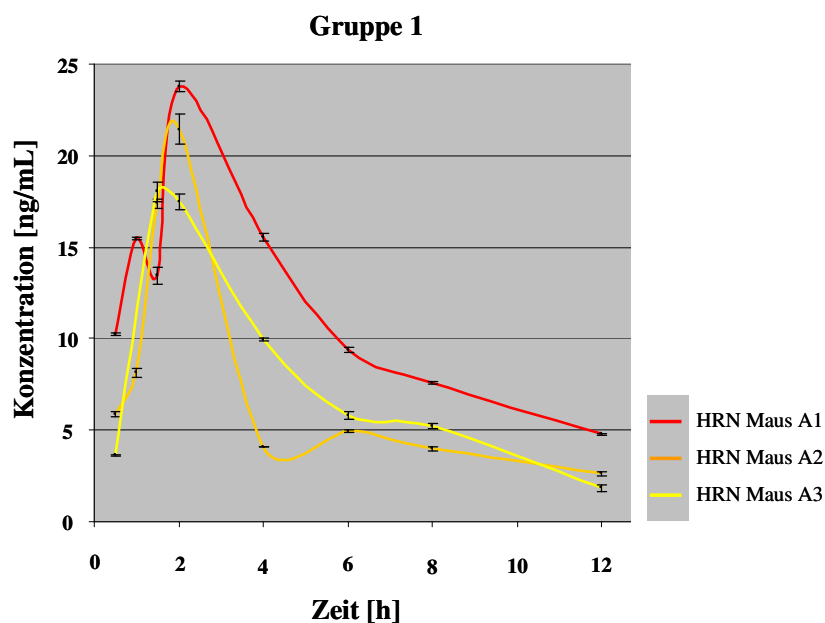
Nach erfolgter Probenaufbereitung (Kapitel 5.11), wurden die in 150 µL Acetonitril gelösten Proben dreimal analysiert, immer im Wechsel mit der Kontrollproben.

In der folgenden Abbildung ist exemplarisch das Chromatogramm einer nach einer Stunde entnommenen Blutprobe einer Knockout-Maus nach 5-tägiger Inkubation mit B[a]P dargestellt. In dem Chromatogramm sieht man eine gute Basislinientrennung der Signale von B[e]P nach 13,2 min und von B[a]P nach 15,4 min.



**Abbildung 27:** Chromatogramm einer Mäuseblutprobe. In der Abbildung ist das Chromatogramm einer Knockout-Maus dargestellt, die über eine Zeit von fünf Tagen mit B[a]P inkubiert wurde.

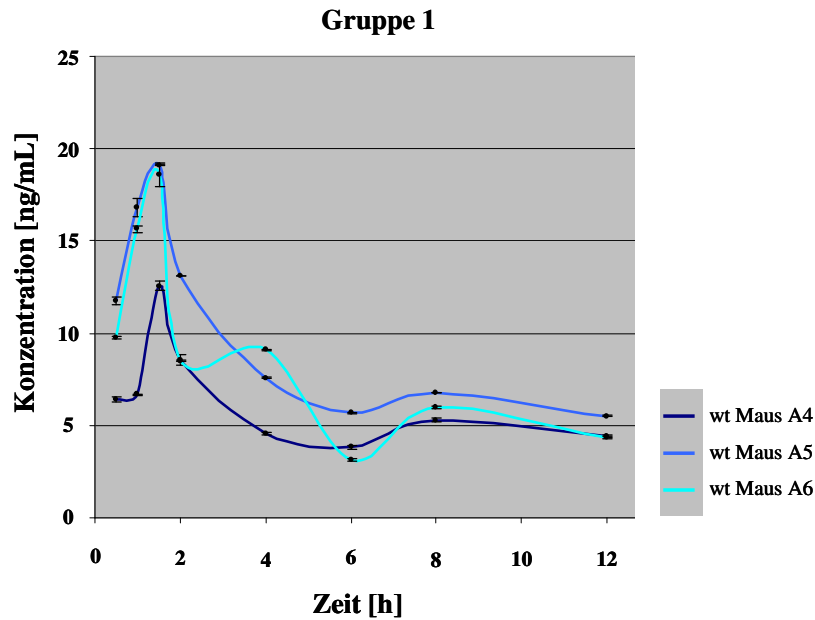
Die folgenden Abbildungen zeigen die Analyseergebnisse der Mäuseblutproben.



**Abbildung 28:** Clearance von B[a]P bei den HRN-Mäusen nach Applikation einer Einmaldosis.

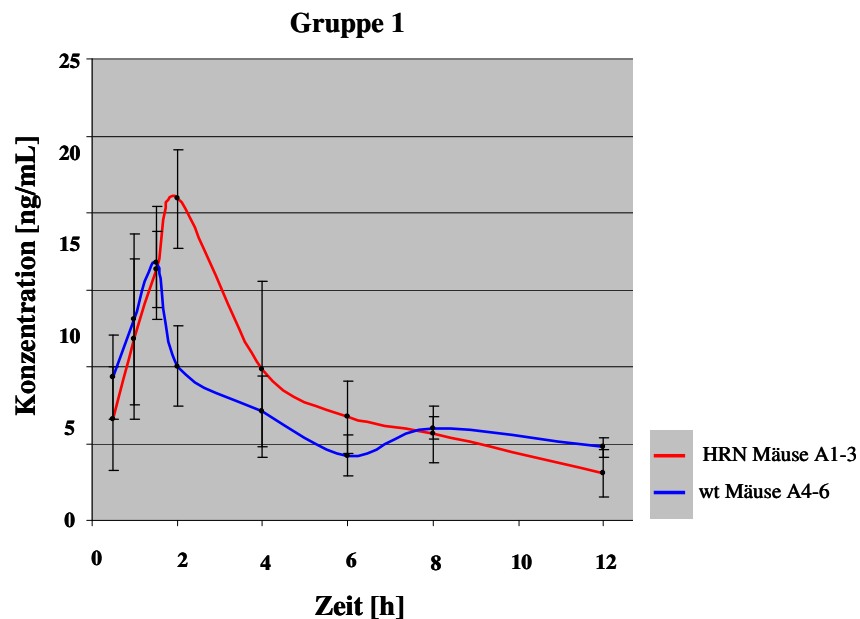
Die Konzentration von B[a]P steigt bei den HRN-Mäusen innerhalb von zwei Stunden auf ein Maximum und fällt von diesem Zeitpunkt an kontinuierlich auf Werte von unter 5 ng/mL ab.

Die drei HRN-Mäuse zeigen eine gute Übereinstimmung beim Verlauf der Clearance von B[a]P.



**Abbildung 29:** Clearance von B[a]P bei den wt-Mäusen nach Applikation einer Einmaldosis.

Die Konzentration von B[a]P steigt bei den wt-Mäusen innerhalb von 1,5 Stunden auf ein Maximum und fällt von diesem Zeitpunkt an relativ kontinuierlich auf Werte von etwa 5 ng/mL ab. Die drei wt-Mäuse zeigen eine gute Übereinstimmung beim Erreichen ihrer maximalen Konzentration von B[a]P nach 1,5 Stunden.



**Abbildung 30:** Gemittelte clearance von B[a]P bei den drei HRN-Mäusen sowie den drei wt-Mäusen.

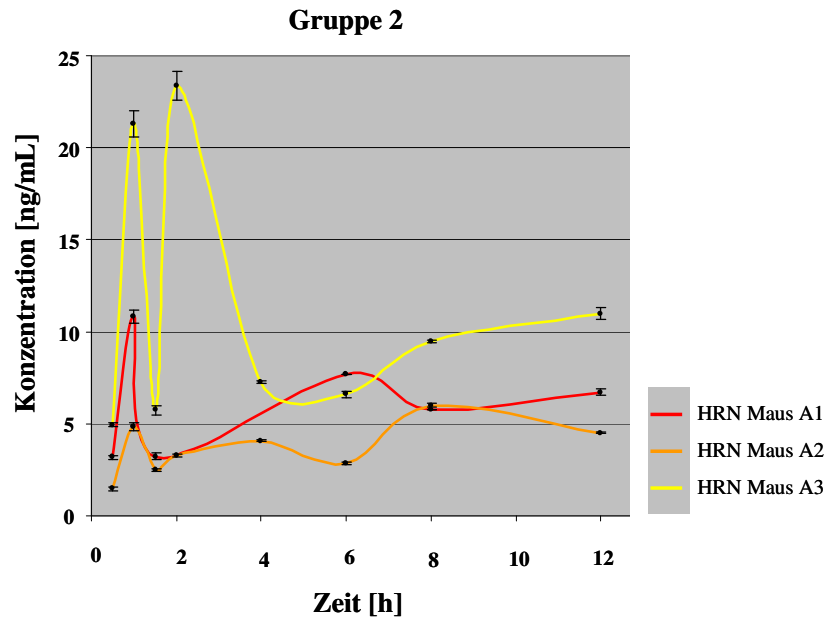
Im direkten Vergleich von HRN- und wt-Mäusen lässt sich erkennen, dass im Blut die Konzentration innerhalb von 1,5 Stunden (wt) bzw. 2 Stunden (HRN) schnell auf ein Maximum ansteigt und von diesem Zeitpunkt an kontinuierlich fällt.

Die B[a]P-Konzentration der HRN-Mäuse aus Gruppe 1 steigt innerhalb von 2 Stunden nach erfolgter Applikation auf eine maximale Konzentration von 17 bis 23 ng/mL Blut an und fällt von diesem Zeitpunkt an kontinuierlich auf eine Konzentration von unter 5 ng/mL Blut ab. Die B[a]P-Konzentration der wt-Mäuse aus der gleichen Gruppe steigt ebenfalls nach erfolgter Applikation an. Jedoch wird bei diesen Tieren die maximale Konzentration von 12 bis 19 ng/mL Blut nach 1,5 Stunden erreicht und fällt von diesem Zeitpunkt an kontinuierlich auf Werte unter 5.5 ng/mL ab. Abbildung 31, in der alle Messwerte der HRN-Mäuse und wt-Mäuse in zwei Graphen zusammengefasst sind, lassen keine statistisch signifikanten Unterschiede in dem Konzentrationsverlauf von B[a]P im Mäuseblut erkennen.

Die HRN-Mäuse aus Gruppe 2 Abbildung 31 zeigen anders als die Tiere aus Gruppe 1 keinen einheitlichen Verlauf der B[a]P Konzentration über die Zeit von 12 Stunden. Alle drei Mäuse erreichen nach unterschiedlichen Zeiten ein Konzentrationsmaximum und weisen zudem erhebliche Unterschiede in der maximalen Konzentration (6 bis 23 ng/mL B[a]P) auf. Auch die Blutproben der wt-Mäuse Abbildung 32 zeigen keinen einheitlichen Verlauf der B[a]P-Konzentration über dieselbe Zeit. Auch bei diesen Tieren erreicht die Konzentration nach unterschiedlichen Zeiten ein Maximum und fällt im Laufe der Probennahmezeit auch nicht kontinuierlich ab. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde bei Gruppe 2 auf einen direkten Vergleich der beiden Konzentrationsverläufe von HRN- und wt-Mäusen verzichtet.

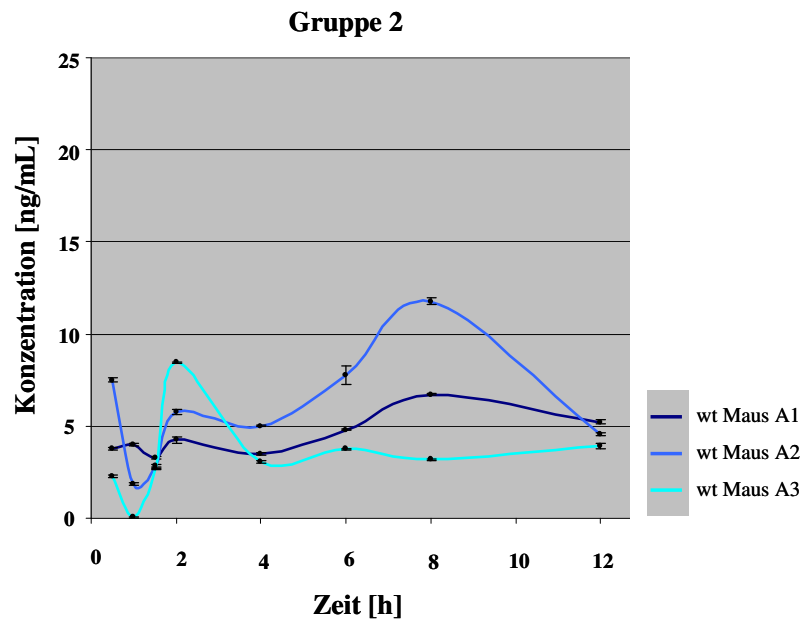
Die Ergebnisse der *in vivo*-Studie mit Knockout-Mäusen zeigt, dass die metabolische Aktivierung von B[a]P durch CYP noch nicht wirklich verstanden ist. So wurde bislang davon ausgegangen, dass CYP für die Aktivierung von PAK's notwendig ist, was auch in verschiedenen *in vitro*-Experimenten mit Säugertierzellen gezeigt werden konnte [255, 256]. Hierfür wurden unter anderem Mäuseleberzellen verwendet, die entsprechend der HRN-Mäuse über kein aktives CYP verfügen und nach Inkubation mit B[a]P einen um den Faktor 7 geringeren Adduktlevel im Vergleich zu den wt-Zellen aufwiesen [2]. Jedoch sind diese Ergebnisse scheinbar nicht auf *in vivo*-Studien übertragbar, da die Adduktlevel-Bestimmung bei den Mäuseorganen zu paradoxen Ergebnissen führte. Die Adduktlevel der Organe der Mäuse aus dem *in vivo*-Experiment, die mit der <sup>32</sup>P-Postabeling-Methode bestimmt wurden, zeigten, dass die HRN-Mäuse im Vergleich zu den wt-Mäusen eine um den Faktor 6- bzw. 13-fach höhere Adduktkonzentration in der Leber aufwiesen [2].





**Abbildung 31:** Clearance der B[a]P Konzentration bei den HRN-Mäusen nach 5-tägiger Applikation.

Die drei HRN-Mäuse weisen einen uneinheitlichen Verlauf der Clearance von B[a]P auf. Vernachlässigt man den Messwert von Maus A3 bei 2 Stunden, so wird die maximale Konzentration bereits nach einer Stunde erreicht, fällt von diesem Zeitpunkt jedoch nicht kontinuierlich auf ein Minimum ab.



**Abbildung 32:** Clearance der B[a]P Konzentration bei den wt-Mäusen nach 5-tägiger Applikation.

Bei den wt-Mäusen lässt sich kein kontinuierlicher Verlauf erkennen, ebenso wenig wie ein einheitliches Maximum. Überraschend ist, dass die Tiere ein Minimum bei 1 Stunde bzw. 1.5 Stunden aufweisen, bei allen anderen Tieren wurde zu diesem Zeitpunkt ein starker Anstieg bzw. ein Maximum festgestellt.

Auch in den Organen Lunge und Darm war dieser Gegensatz von HRN- und wt-Maus im Vergleich zur Zellkultur zu beobachten, jedoch lag bei diesen Organen der Unterschied nur bei einem Faktor von 1,7 bis 2,6 [2]. Die Daten der *in vivo*-Studie zeigen, dass CYP im Organismus eine eher entgiftende Wirkung besitzt, während CYP bei *in vitro*-Versuchen in erster Linie zu einer metabolischen Aktivierung von B[a]P führt.

Aufgrund dieser Ergebnisse scheinen weitere *in vitro*-Versuche mit Zelllinien zurzeit nicht sinnvoll zu sein, auch wenn die Kosten und der zeitliche Aufwand im Vergleich zu *in vivo*-Studien wesentlich geringer sind. Bis zu einem besseren Verständnis der Rolle von CYP in der Zelle bzw. dem Organismus scheinen deshalb *in vivo*-Untersuchungen das geeignete Mittel der Wahl zu sein.

Alle Ergebnisse dieser umfangreichen Studie wurden von uns publiziert [2].

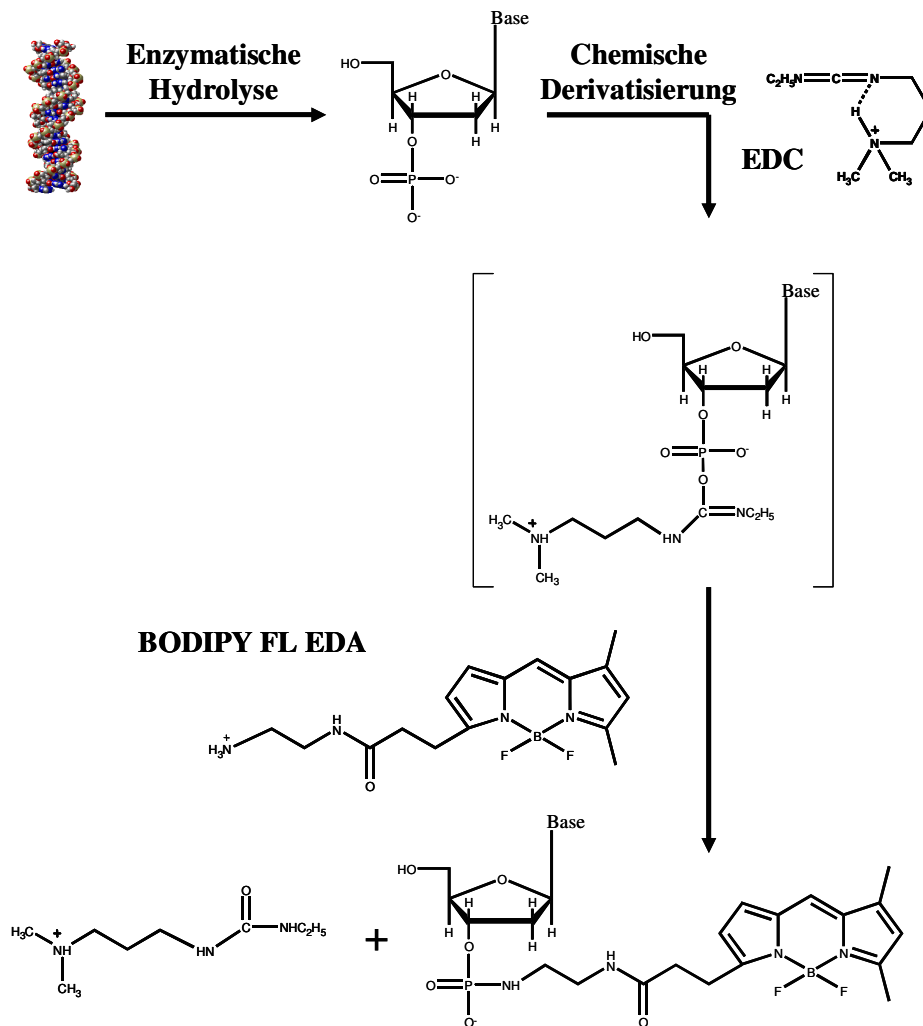
### **3.4 Weiterentwicklung der Probenaufbereitung für die CE-LIF-Methode**

Für die Bestimmungen des Methylierungsgrades der Proben aus Kapiteln 3.2 wurde die von Schmitz et al. [206, 207] entwickelte Methode zur Bestimmung des genomweiten Methylierungsgrades mit der CE-LIF verwendet. Abbildung 33 zeigt schematisch die Probenvorbereitung (Hydrolyse und Derivatisierung).

Bereits in Kapitel 3.1 wurde erwähnt, dass der Methylierungsgrad trotz einer Überschichtung der Probe mit Paraffin spätestens nach 15 Stunden im Probenrack der CE bei 25°C nicht mehr auswertbar war. Dies liegt unter anderem daran, dass der Fluoreszenzmarker für die Derivatisierung im 20fachen Überschuss eingesetzt wird, um eine höchst mögliche Derivatisierungsausbeute zu gewährleisten. Das Kopplungsreagenz EDC wird hierfür im 1000-fachen Überschuss eingesetzt. Dies wäre nicht weiter problematisch, wenn BODIPY sich nicht innerhalb weniger Stunden aufgrund seiner Oxidationslabilität zersetzen würde [203, 204, 206, 207, 257, 258]. Die hierdurch entstehenden Abbauprodukte in der Probe machen eine Auswertung des Elektropherogramms nach mehr als 15 Stunden bei einer 10 µg DNA-Probe unmöglich. Die sich bildenden Abbauprodukte erscheinen im Elektropherogramm bevorzugt im Bereich

von dCMP und 5m-dCMP und verhindern eine Auswertung [207, 257, 259]. Somit hängt die Auswertbarkeit einer Messung maßgeblich von der Probenstabilität im verdünnten Zustand ab und wird durch das Auftauchen störender Signale im Bereich von dCMP und 5m-dCMP limitiert [257, 259].

Das Interesse an einer Bestimmung des globalen Methylierungsgrades steigt seit den letzten Jahren stetig an, da das Verständnis über die Bedeutung der DNA-Methylierung im Bezug auf die Krebsentstehung zugenommen hat. Zudem nimmt neben dem Probenaufkommen der Wunsch zu, immer geringere DNA-Mengen analysieren zu können [204, 260].

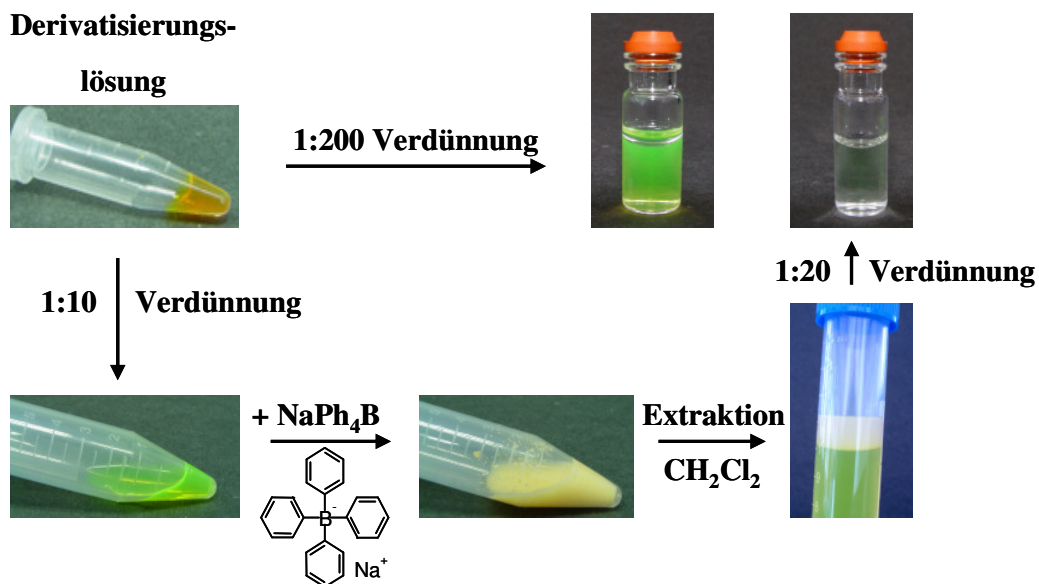


**Abbildung 33:** Schematische Darstellung des Ablaufes der Hydrolyse und Derivatisierung.

### **3.4.1 Entfernung des Überschusses an EDC und BODIPY nach erfolgter Derivatisierung**

Aufgrund der oben beschriebenen Situation wurde überprüft, ob eine Entfernung von - in erster Linie - BODIPY nach erfolgter Derivatisierung möglich war. Bereits in einem Experiment mit einer präparativen HPLC konnte gezeigt werden, dass eine Reinigung der derivatisierten Nukleotide zu einer längeren Stabilität führt [61]. Um BODIPY und EDC nach erfolgter Derivatisierung zu entfernen, sollten entweder die gelabelten Mononukleotide oder der Überschuss an EDC und BODIPY in eine organische Phase überführt werden [257]. Dabei sollte der Vorgang reproduzierbar und quantitativ ablaufen und nur ein geringes Maß an Mehraufwand bedeuten, sowie die Kosten für eine Probenaufbereitung nicht wesentlich erhöhen. Alle diese Punkte konnten mit der im Anschluss beschriebenen Methode zur Entfernung von EDC und BODIPY erreicht werden:

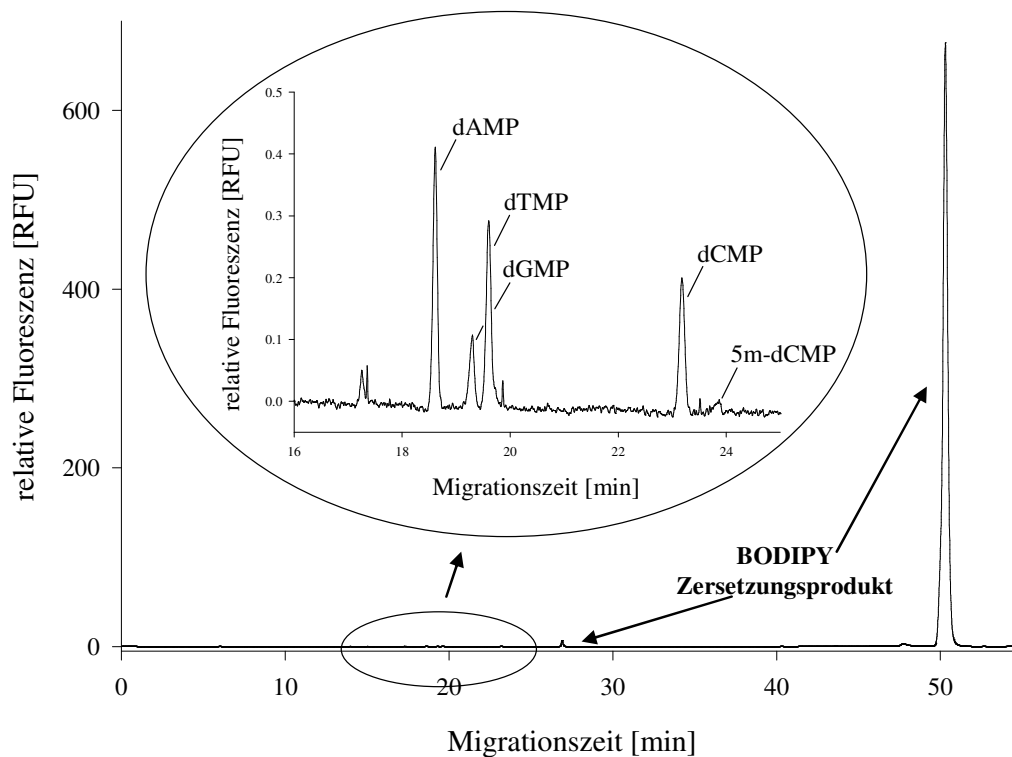
Nach der Derivatisierung wird die gesamte Probe in ein Zentrifugengefäß überführt und dort 1:10 mit Reinst-Wasser verdünnt. Zu dieser Verdünnung wird eine 52,5 mM Natrium-tetraphenylboratlösung (TPB) gegeben, die zur sofortigen Ausfällung von EDC und BODIPY führt, jedoch werden bei diesem Vorgang teilweise die gelabelten Mononukleotide durch Inklusion bzw. Okklusion aus der Lösung mit ausgefällt. Da solch ein Vorgang nicht reproduzierbar ist, erfolgt nach der Fällung ein Extraktionsschritt, bei dem der gesamte Niederschlag in Dichlormethan (DCM) gelöst wird, während die Phosphoamidate in der wässrigen Phase. Um die hierbei entstehenden Phasen besser trennen zu können, wird die Probe zentrifugiert und anschließend die wässrige Phase von der DCM-Phase getrennt. Nach weiteren Zentrifugationsschritten und einer Probenverdünnung mit Reinst-Wasser kann die Probe mittels CE-LIF vermessen werden (die ausführliche Probenaufbereitung für 1 µg und 10 µg DNA befindet sich im experimentellen Teil). Die Zwischenstufen dieses neu entwickelten Verfahrens zur Entfernung von BODIPY und EDC sind in Abbildung 34 in anschaulicher Form dargestellt.



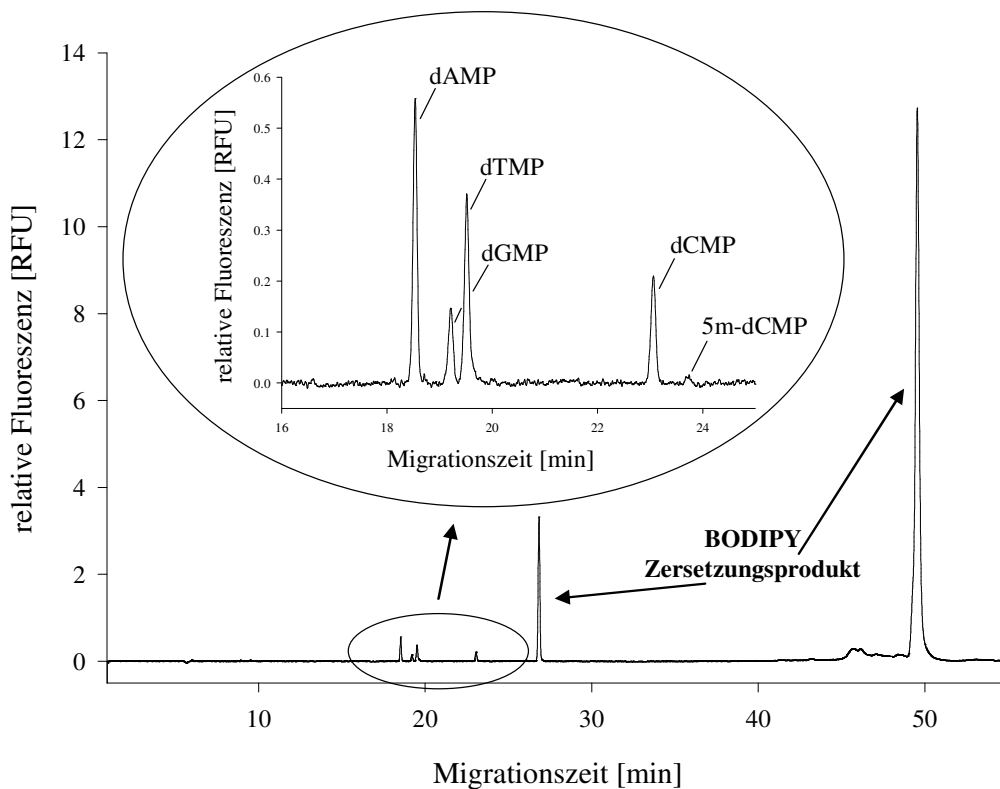
**Abbildung 34:** Verlauf der Probenaufbereitung nach erfolgter Derivatisierung. Mit dargestellt sind der direkte Vergleich zwischen gefällter und nicht gefällter Probe, die in der CE analysiert werden können.

Der zeitliche Aufwand beschränkt sich bei dieser erweiterten Probenaufbereitung auf ein Minimum, sodass vom Ende der Derivatisierung bis zur Probenanalyse nicht mehr als 20 Minuten vergehen. Auch der finanzielle Aufwand für die zusätzlich eingesetzten Chemikalien ist vernachlässigbar.

In den beiden folgenden beiden Abbildungen ist der direkte Vergleich einer gefällten und einer nicht gefällten CT-DNA dargestellt. Die durch die Fällung der Probe erzielte Reduzierung des Überschusses an BODIPY beträgt etwa 98 %. Für die Analyse mussten die Proben 1:10000 mit Reinst-Wasser verdünnt werden, um auch bei der nicht gefällten Probe den Überschuss an BODIPY innerhalb des Detektorlimits von 1000 RFU integrierbar darzustellen.



**Abbildung 35:** Analyseergebnis einer 1 µg CT-DNA-Probe, 1:10000 verdünnt mit Reinst-Wasser (nach Hydrolyse und Derivatisierung).

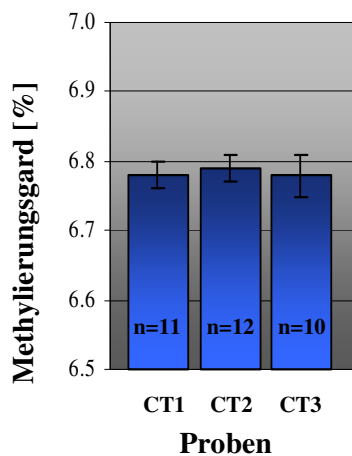


**Abbildung 36:** Analyseergebnis einer 1 µg CT-DNA-Probe, 1:10000 verdünnt mit Reinst-Wasser (nach Hydrolyse, Derivatisierung und Fällung mit Tetraphenylborat (TPB)).

### 3.4.2 Reproduzierbarkeit der Probenvorbereitung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der Überschuss von EDC und BODIPY quantitativ entfernt werden kann, mußte die Reproduzierbarkeit überprüft werden. Hierfür wurden drei Aliquote von je 10 µg CT-DNA separat hydrolysiert, derivatisiert, mit TPB gefällt, in DCM extrahiert und nach einer 1:200 Verdünnung mit der CE fünfmal analysiert.

Die Ergebnisse der folgenden Abbildung zeigen das hohe Maß an Reproduzierbarkeit der „Fällungsmethode“. Hiermit wird belegt, dass die Methode durch die zusätzliche Probenvorbereitung nichts an ihrer Reproduzierbarkeit verloren hat



**Abbildung 37:** Methylierungsgrade dreier unabhängig aufbereiteter CT-DNA-Proben

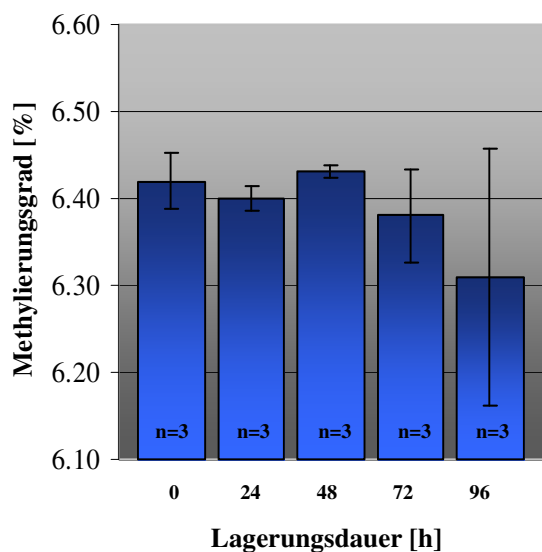
Jedoch fällt auf, dass der Methylierungsgrad der CT-DNA um etwa 0,3 % von dem ohne Fällung bestimmten Wert abweicht, der im Durchschnitt bei ca. 6,5 %  $\pm$  0,1 % liegt. Wahrscheinlich unterscheidet sich das Extraktionsverhalten des derivatisierten Cytosins von dem des 5`-Methylcytosin. Deshalb müssen, für die Fällungsmethode neue Korrekturfaktoren bestimmt werden, um das veränderte Verhältnis der Mononukleotide zu-einander berücksichtigen zu können. Die neu bestimmten Korrekturfaktoren für 1 µg und 10 µg einer gefällten DNA-Probe befinden sich im Anhang.

### 3.4.3 Überprüfung der Probenstabilität bei Raumtemperatur

Zu Beginn dieses Kapitels wurde bereits erwähnt, dass eine Sequenzlänge mit mehr als 15 Einzelläufen (ca. 12 Stunden) selbst bei einer Überschichtung der Probe mit Paraffin problematisch war.

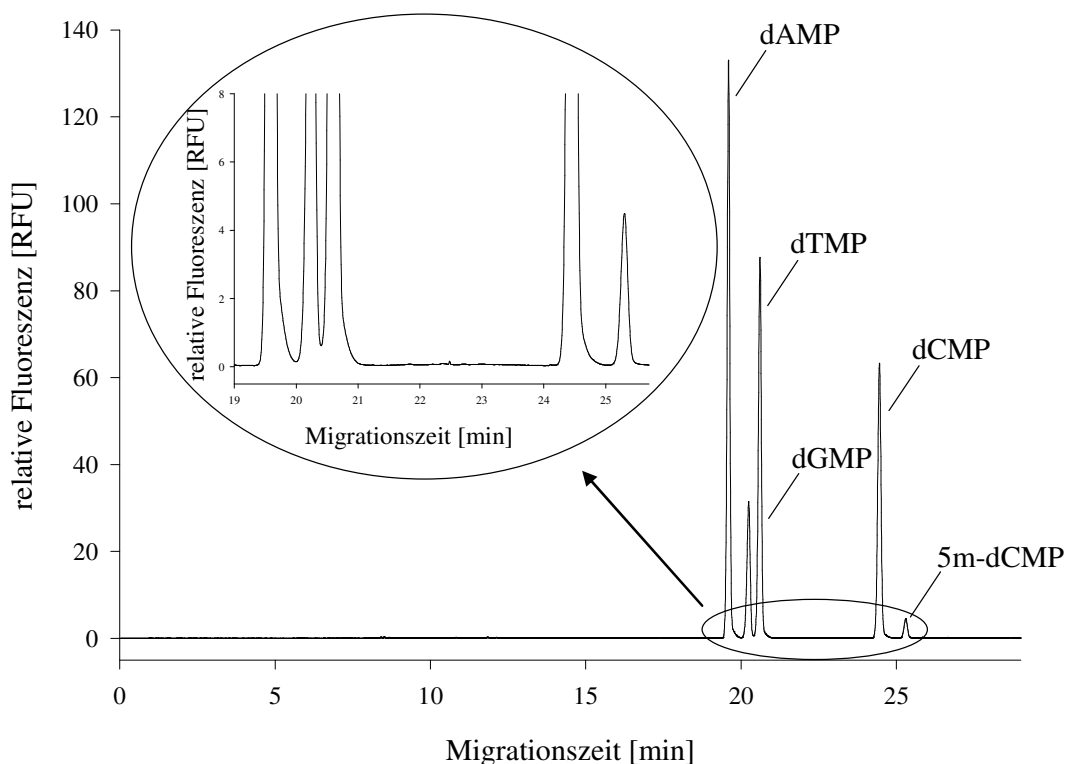
Durch die Entfernung des Überschusses an BODIPY und EDC ist es nun möglich, die Proben bis zu 96 Stunden in der verdünnten Form bei Raumtemperatur zu lagern. Selbst nach dieser langen Zeit lassen sich die Elektropherogramme der Proben ohne Schwierigkeiten auswerten, wie in Abbildung 39 dargestellt ist. Nicht nur die Auswertbarkeit der Proben ist von Bedeutung, sondern vielmehr, ob nach dieser Zeit der Methylierungsgrad der Probe unverändert bleibt. Dies konnte ebenfalls, für eine Zeitspanne von 0 bis 96 Stunden nachgewiesen werden (Abbildung 38). Alle Messungen zeigen keine signifikanten Abweichungen vom Methylierungsgrad, jedoch wird ersichtlich, dass nach einer Lagerungszeit von mehr als 72 Stunden die Zahl von drei Wiederholungsmessungen nicht mehr ausreicht, um eine akzeptable Standardabweichung zu erhalten.

Bei einer so langen Lagerung in der CE bei +25 °C muss die Probe unbedingt mit Paraffin überschichtet werden. Dies geschieht nicht aus Gründen der Probenstabilität, sondern weil die Probe in dieser Zeit ihr Volumen erheblich durch Verdunstung verringert und hierdurch eine ungewollte Aufkonzentrierung stattfindet. Durch eine Überschichtung mit Paraffin ist die Konzentration der Probe konstant, sodass ohne Bedenken Sequenzen in dieser Länge durchgeführt werden können. Allerdings wird die Anzahl der Einzelläufe in einer Sequenz durch die zur Verfügung stehenden Stellplätze (33) für Puffervails limitiert. Der eingesetzte Puffer eignet sich nicht für mehrere Analysen aus ein und demselben Vail, da die Basislinie bei jeder weiteren Analyse unruhiger wird und so die Auswertbarkeit nicht mehr gegeben ist [258].



**Abbildung 38:** Methylierungsgrad einer CT-DNA-Probe über einen Zeitraum von 0-96 Stunden bei 25 °C.



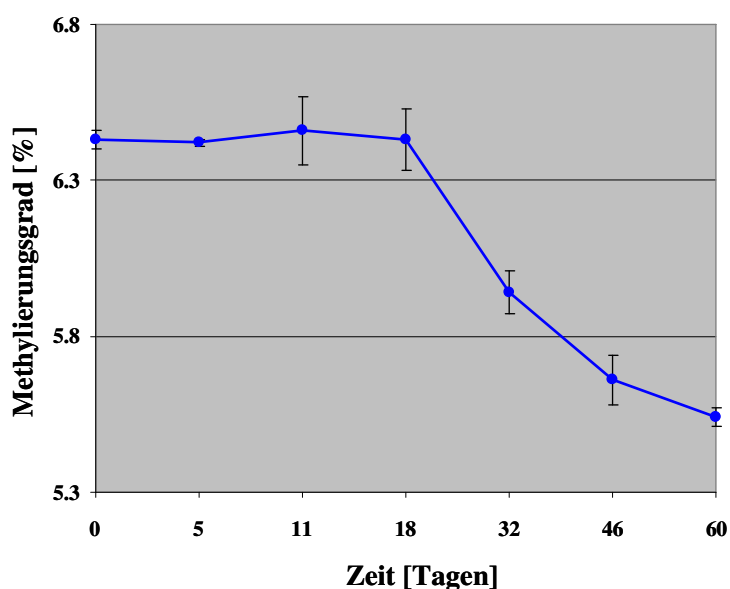


**Abbildung 39:** Analyseergebnis einer 10 µg CT-DNA-Probe, 1:200 verdünnt nach 96 Stunden in der CE

### 3.4.4 Langzeitlagerung

Bislang konnte gezeigt werden, dass die Stabilität der verdünnten Proben durch die Entfernung des Überschusses an BODIPY und EDC während einer Sequenz über einen langen Zeitraum wesentlich größer ist als bei den Proben mit Überschuss an Derivatisierungsreagenzien. Jedoch ist nicht nur die Stabilität der Proben während einer Sequenz von Bedeutung, sondern auch die Langzeitlagerungsfähigkeit. Bei einem hohen Probendurchsatz müssen, um keine Leerlaufzeiten bei der Analyse hinnehmen zu müssen, ständig bereits aufbereitete Proben gelagert werden, da die Hydrolyse und Derivatisierung insgesamt 24 Stunden dauert. Ebenfalls ist es wünschenswert, wenn eine Messung nach einigen Wochen noch mal wiederholt werden kann. Die nach der Methode von Schmitz et al. [206] aufbereiteten Proben erfüllen diese Voraussetzungen vollständig, da die derivatisierten Proben bis zu 3 Monaten bei -25 °C gelagert werden können, ohne dass sich der Methylierungsgrad der Proben ändert [206, 207, 258, 259]. Eine lange Lagerungszeit hat zusätzlich den Vorteil, dass bei eventuell abgebrochenen Sequenzläufen, Kapillarbrüchen oder technischen Problemen mit der CE die Proben im Eisfach stabil bleiben, bis mit der Analyse fortgefahren werden kann.

Abbildung 40 zeigt, dass Proben, bei denen der Überschuss an BODIPY und EDC durch die Fällung entfernt wurde, nur für ca. 3 Wochen bei  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert werden können. Nach dieser Zeit fällt der Methylierungsgrad der DNA signifikant ab, sodass die Proben nicht länger verwendet werden können. Deshalb sollten, nur so viele Proben vorbereitet werden, wie auch in den folgenden drei Wochen analysiert werden können. Diese Einschränkung bei der Langzeitlagerungsstabilität stellt kein Problem dar, jedoch bedeutet dies einen größeren logistischen Aufwand, damit nicht zu viele Proben gleichzeitig vorbereitet werden bzw. ein Leerlauf wegen Mangels an Proben für die Analyse entsteht.



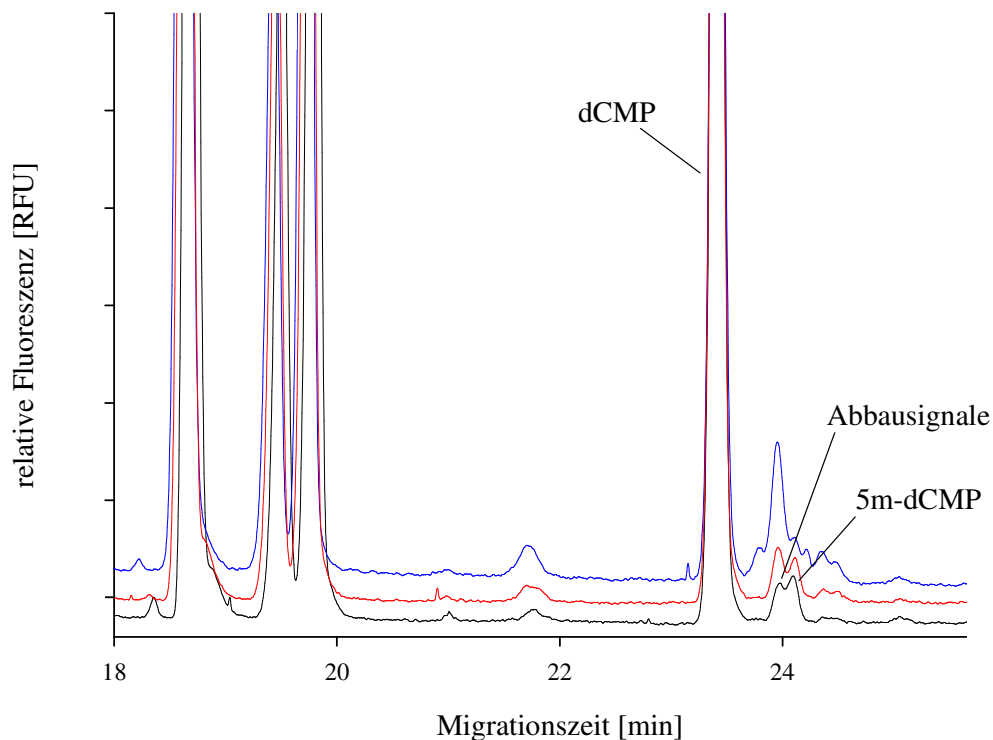
**Abbildung 40:** Methylierungsgrad-Änderung gefällter Proben nach unterschiedlich Lagerungszeit bei  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$

### 3.4.5 Untersuchung von Realproben mit neuer Probenaufbereitung

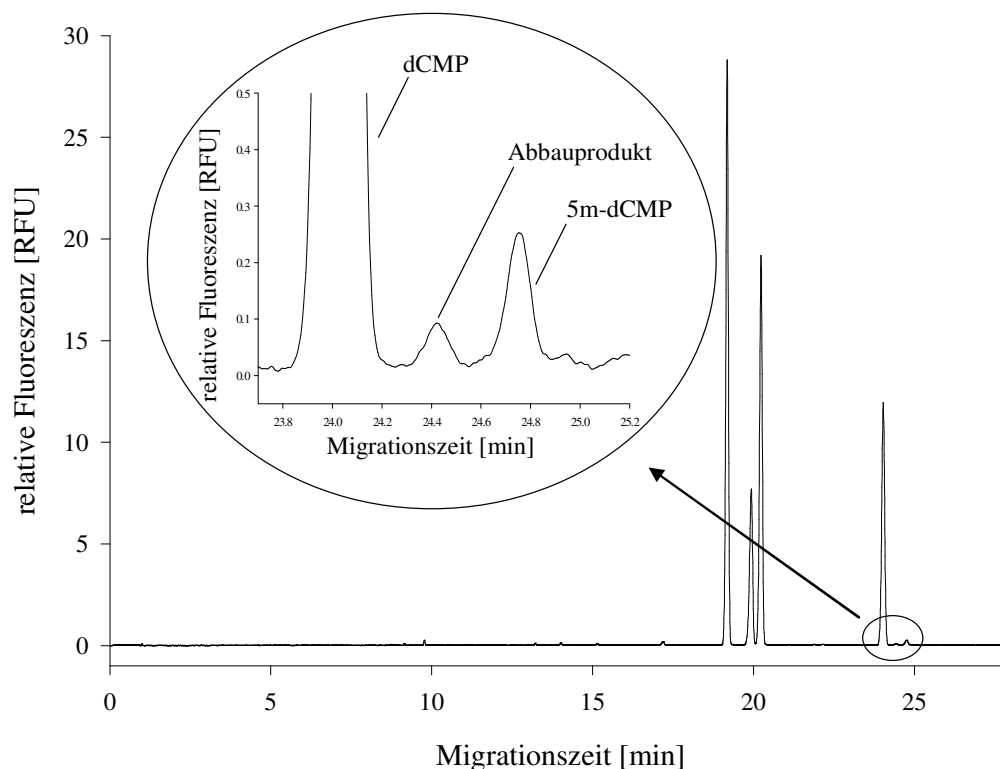
Um die veränderte Methode zur Entfernung von Derivatisierungsreagenzien auf ihre Routinefähigkeit mit Realproben hin zu testen, wurden DNA-Proben von Marmorkrebsen analysiert. Bedingt durch ihrer geringe Größe konnten nur wenige  $\mu\text{g}$  DNA aus den verschiedenen Geweben bzw. Organen isoliert werden. Deshalb mussten  $1\text{ }\mu\text{g}$  DNA-Aliquote für die Probenaufbereitung verwendet werden, welche ohne die Entfernung des Überschusses an Derivatisierungsreagenzien bereits während der Dauer der ersten Messung so große Abbauprodukte im Bereich von 5m-dCMP zeigten, dass eine Auswertung nicht mehr möglich

war. Abbildung 41 zeigt das Elektropherogramm einer 1  $\mu\text{g}$  DNA-Probe von drei aufeinander folgenden Analysen.

Aufgrund dieser problematischen Analyse wurde die neue Methode zur Entfernung von BODIPY und EDC das erste Mal in der Routineanalyse von Realproben eingesetzt. Zudem kam erstmalig ein Pufferreservoir bei der Analyse mit der CE zum Einsatz (Abbildung 60 im Anhang). Mit diesen Pufferreservoir, welches 2 Kammern mit jeweils 20 mL Puffer enthält, können bis zu 120 Analysen durchgeführt werden. Bei einer Sequenz mit 120 Läufen steht die zuletzt zu analysierende Probe bis zu 90 Stunden im Probenrack der CE und kann, wie Abbildung 42 zeigt, trotz dem ausgewertet werden.



**Abbildung 41:** Elektropherogramme einer 1  $\mu\text{g}$  Marmorkrebs-DNA-Probe, die unmittelbar nach der Derivatisierung dreimal analysiert wurde. Analyse 1 (schwarz), Analyse 2 (rot) und Analyse 3 (blau)



**Abbildung 42:** Analyseergebnis einer 1  $\mu\text{g}$  Marmorkrebs-DNA-Probe, 1:100 verdünnt nach fast 90 Stunden in der CE.

### 3.5 Analyse des Methylierungsgrades von Marmorkrebsen

In einer Kooperation mit PD Dr. Günter Vogt vom Zoologischen Institut der Universität in Greifswald wurde der genomweite Methylierungsgrad von Marmorkrebs-DNA untersucht. Die Krebse sind seit Mitte der 90iger Jahre in vielen deutschen Aquarien zu finden und stammen ursprünglich von einer in Amerika beheimateten Krebsfamilie ab [261]. Bei den Marmorkrebsen (Abbildung 43) handelt es sich um Tiere, die sich durch Parthenogenese fortpflanzen. Dies ist eine Form der eingeschlechtlichen Fortpflanzung, die auch als „Jungfernzeugung“ bezeichnet wird. Hierbei entstehen genetisch identische Nachkommen, die sich hervorragend für die Untersuchung von Genotyp-Phänotyp-Korrelationen eignen, da sie sich, obwohl sie dieselben Erbinformationen tragen, wesentlich in Größe, Gewicht, Farbmuster und Verhalten unterscheiden [261 - 264], und dies alles, obwohl die Tiere zusammen in einem Aquarium mit Überschuss an Futter aufgezogen wurden.



**Abbildung 43:** Marmorkrebs

Die Kultivierung der Marmorkrebse ist zudem denkbar einfach. Hierfür bedarf es lediglich eines Aquariums ohne Pflanzen, nur mit Steinen als Unterschlupf. Das Wasser sollte zwischen 18 und 25 °C warm sein und nur für 6 Stunden am Tag beleuchtet werden [263, 264]. Die Krebse selbst werden maximal 12 cm groß und wiegen ca. 10 g. Ein Krebs kann zwischen 50 bis 270 Eier tragen, wovon ca. 80 % überleben [261, 263, 264]. Die Generationszeit mit 4-6 Monaten ist zudem äußerst kurz. In dieser Zeit durchlaufen die Marmorkrebse insgesamt 5 Stadien der Entwicklung und erreichen ein maximales Alter von 3-4 Jahren [261, 265]. Dies alles macht den Marmorkrebs zu einem interessanten Modellorganismus, an dem ohne großen Aufwand und Kosten eine Vielzahl von genetischen und phänotypischen Veränderungen erforscht werden kann.

Unser Interesse galt hierbei jedoch lediglich der Bestimmung des Methylierungsgrades von genetisch identischen Tieren, die bei exakt gleichen Bedingungen kultiviert wurden. Die Vermutung zu Beginn der Analysen war, dass sich das Epigenom der Tiere im Laufe ihrer Entwicklung durch unterschiedliche DNA-Methylierung immer weiter voneinander unterscheidet. Dies könnte ein möglicher Grund für die Phänotyp- und Verhaltensunterschiede sein.

Für die Untersuchung standen uns zwei Gruppen von genetisch identischen Geschwisterkrebsen zur Verfügung:

Gruppe 1 umfasste drei Geschwistertiere im Alter von 626 Tagen. Die Tiere 1 und 3 sind während der ganzen Zeit im selben Aquarium gehalten worden. Das Tier 2 war für 297 Tage mit den Geschwistern im selben Aquarium, wurde jedoch danach in ein anders Aquarium zusammen mit Fischen und Pflanzen übersiedelt.

Gruppe 2 umfasste insgesamt 4 Geschwistertiere im Alter von 222 Tagen, die ihr ganzes Leben über zusammen in einem kleinen Aquarium mit wenig Platz (Stress) gehalten wurden.

Jedoch hatten auch diese Tiere während der gesamten Zeit Futter im Überschuss wie auch die Tiere aus Gruppe 1.

In beiden Gruppen unterschieden sich die Tiere in Größe und Gewicht zum Teil erheblich voneinander. So war das größte Tier aus Gruppe 1 mit 7,0 cm totale Länge (TL) und 10,32 g Gewicht um 0,8 cm größer und mehr als 4 g schwerer als das kleinste aus derselben Gruppe. Auch die Krebse aus Gruppe 2 unterschieden sich um bis zu 1 cm TL sowie um über 1 g in ihrem Körpergewicht.

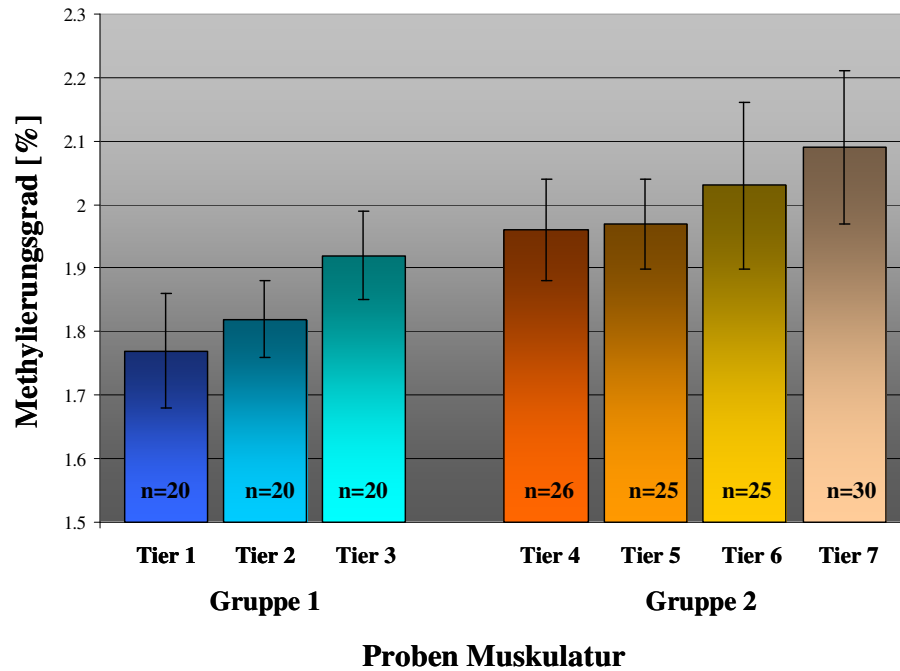
Für die Untersuchung wurden den Tieren bis zu 11 unterschiedliche Organe entnommen und bei -80 °C bis zur DNA-Isolierung gelagert. Jedoch wurden zunächst nur die Muskulatur sowie der Hepatopankreas aller Tiere analysiert. Beim Hepatopankreas handelt es sich um ein Organ des Verdauungstrakts von Gliederfüßern, Weichtieren und Fischen. Es entspricht funktionell den Organen von Hepar (Leber) und Pankreas (Bauchspeicheldrüse) von Reptilien, Vögeln und Säugern [264]. Das Verhältnis des Gewichtes des Hepatopankreas zum Gesamtgewicht des Marmorkrebses (in Prozent ausgedrückt) wird als hepatopankreatisch-somatischer Index (HSI) bezeichnet und stellt ein Maß für die Fitness der Tiere da. Diese Werte wurden nach der Entnahme der Organe ermittelt und korrelierten sehr gut mit dem unterschiedlichen Körpergewicht und der Körperlänge der Tiere [264]. Bei den Krebsen, die kurz vor der Eiablage stehen, muss zusätzlich der so genannte Ovarien-Somatische-Index (OSI) bestimmt werden, da für den Vorgang der Eireifung viel Dotter vom Hepatopankreas in die Ovarien transportiert wird und hierdurch der HSI-Wert der Krebse sinkt. Anschließend wird der OSI mit dem HSI summiert und gibt Auskunft über die relative Fitness der Tiere [264].

### **3.5.1 Methylierungsgrad der Muskulatur und des Hepatopankreas von Marmorkrebsen**

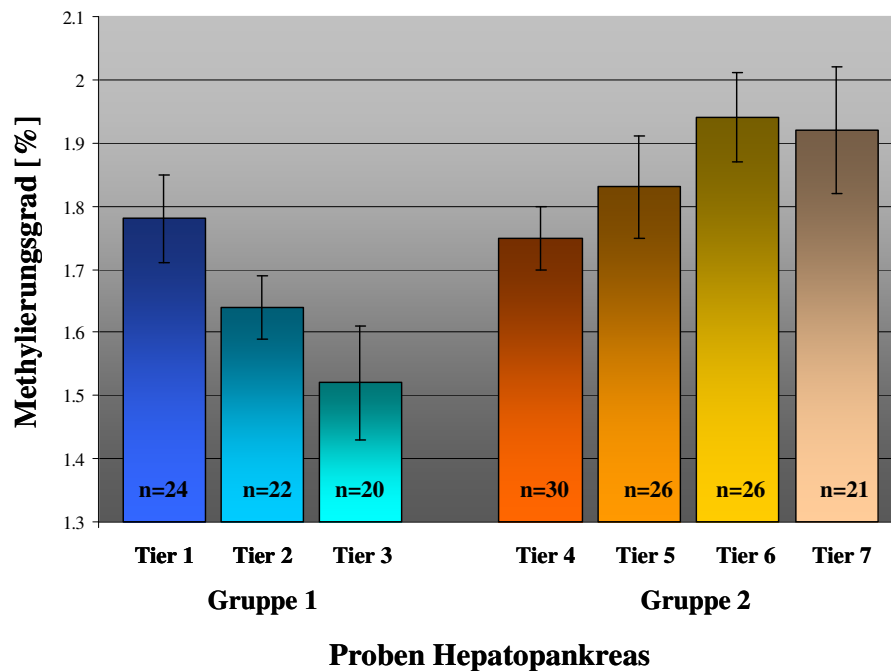
Die Isolierung der DNA durch das von Qiagen verwendete Qiagen Genomic-tip 20/G Kit (siehe DNA-Isolierung) erfolgte nach der mechanischen Zerkleinerung des Gewebes mit einem Ultraturax. Anschließend wurde die isolierte DNA mit einem UV-VIS-Spektrometer quantifiziert und in 1 µg DNA-Aliquote separiert.

Die Probenaufbereitung erfolgte nach dem Protokoll für 1 µg DNA-Proben (siehe Anhang). Alle derivatisierten Proben wurden nach dem optimierten Fällungsverfahren für 1 µg DNA mit TPB gefällt und mit DCM extrahiert. Die Analyse der insgesamt 14 Proben von Muskulatur und Hepatopankreas wurde in Sequenzen unter Einsatz der Pufferreservoirs durchgeführt.

Aufgrund des sehr geringen Methylierungsgrades der Marmorkrebs-DNA von unter 2 % sowie der schwierigen Auswertbarkeit wurden insgesamt 335 Analysen durchgeführt. In den folgenden Abbildungen sind die Analyseergebnisse der beiden Gruppen nach Geweben, Muskulatur und Hepatopankreas getrennt dargestellt.



**Abbildung 44:** Analyseergebnisse der Muskulaturproben der Tiere aus Gruppe 1 und 2



**Abbildung 45:** Analyseergebnisse der Hepatopankreasproben der Tiere aus Gruppe 1 und 2

Beim Vergleich der beiden Gruppen miteinander fällt auf, dass die Gruppe 2 (jüngere Tiere) im Durchschnitt einen höheren Methylierungsgrad sowohl bei der Muskulatur als auch beim Hepatopankreas aufweist. Beim Betrachten der Ergebnisse von Gruppe 1 untereinander fällt eine signifikante Änderung des Methylierungsgrades auf, die mit der Größe und dem Gewicht in Korrelation stehen (siehe Tabelle 3).

<b>Tier</b>	<b>Totale Länge</b>	<b>Gewicht</b>
1	7,0 cm	10,32 g
2	6,9 cm	7,69 g
3	6,2 cm	6,04 g
4	4,2 cm	1,71 g
5	3,5cm	0,82 g
6	3,4 cm	0,84 g
7	3,2 cm	0,68 g

**Tabelle 3:** Gesamtlänge und Gewicht der jeweiligen Tiere.

So ist der Methylierungsgrad der Muskulatur von Tier 1, dem größten und schwersten, mit ( $1.77 \pm 0.09$  %) geringer als bei den Tieren 2 ( $1.82 \pm 0.06$  %) und 3 ( $1.92 \pm 0.07$  %). Bei der Untersuchung des Hepatopankreas stellt man genau den gegenteiligen Effekt fest. Hierbei weist das Tier 1 den höchsten Methylierungsgrad auf ( $1.78 \pm 0.07$  %) und die beiden Tiere 2 ( $1.64 \pm 0.05$  %) und 3 ( $1.52 \pm 0.09$  %) jeweilig niedrigere Werte.

Bei den Marmorkrebsen aus Gruppe 2 ist, sowohl in der Muskulatur als auch im Hepatopankreas, ein Ansteigen des Methylierungsgrades entgegengesetzt der Größe und dem Gewicht der Krebse zu beobachten. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es in beiden Gruppen signifikante Unterschiede im Methylierungsgrad der Geschwistertiere mit gleichem genetischem Hintergrund gibt, die in Korrelation mit der Größe und dem Gewicht der Tiere stehen. Hiermit lässt sich die Anfangsvermutung bestätigen, dass sich das Epigenom der genetisch gleichen Tiere im Laufe ihres Lebens ändert und dies in Zusammenhang mit ihrem Phänotyp zu bringen ist.



### 3.6 Untersuchungen zur Korrelation des Methylierungsgrades mit dem oxidativen Stress

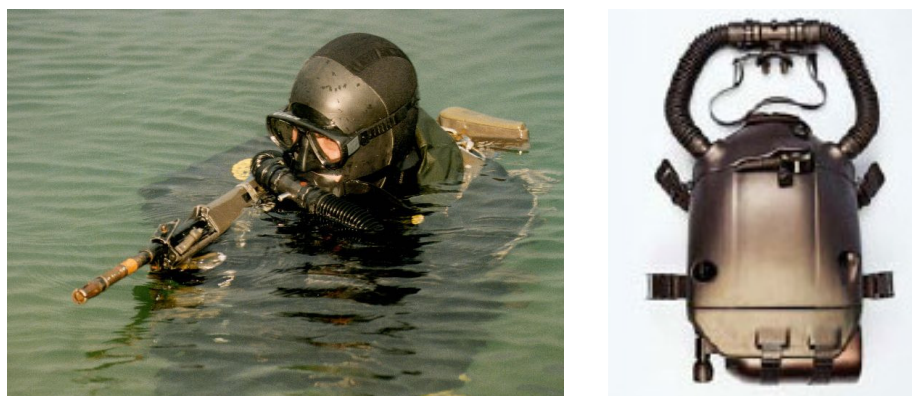
Als eine der Hauptursachen für endogene DNA-Schädigung wird der oxidative Stress angesehen [67, 68, 266 - 268]. Während des zellulären Stoffwechsels produziert ein aerober Organismus einen gewissen Anteil reaktiver Sauerstoffspezies (ROS = reactive oxygen species), der durch Einwirken exogener Faktoren (z.B. Strahlen, Xenobiotika) noch verstärkt werden kann [68, 73, 269 - 271]. 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 [73]. 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 (z.B. etheno-Adenosin) reagieren können [272, 273]. Allerdings besteht normalerweise ein Gleichgewicht zwischen dem Aufkommen der verschiedenen ROS, dem vorhandenen Antioxidationssystem und den diversen Reparaturmechanismen. Erst eine Störung dieses Gleichgewichts wird als oxidativer Stress bezeichnet [69, 71, 274 - 276]. Es wird angenommen, dass die Generierung von ROS einen wesentlichen Beitrag zu degenerativen, vielfach altersabhängigen Krankheiten wie kardiovaskuläre Störungen, immuno- und neurologische Degenerationen, Katarakte und Krebs leistet [273]. Auch wird ein Zusammenhang zwischen oxidativen Stress und 5`-Methylcytosin vermutet. Jedoch wurde bisher aufgrund des Fehlens einer geeigneten Analyseverfahren (geringe Probenmenge, exakte Quantifizierung, hoher Probendurchsatz) dieser Zusammenhang noch nicht ausreichend anhand von *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten belegt. Arbeiten von Pfeifer et al. zeigen beispielsweise, dass die Oxidation von methylierten CpG-Dinukleotiden sowohl zu einer TT-Tandem-Mutation (Thymindimere) als auch zu einer Deaminierung [277] und somit zu einer Hypomethylierung führen kann. Diese gilt ebenfalls für die Beobachtung von Boorstein et al., bei der Oxidation von 5`-Methylcytosin zu 5`-Hydroxymethylcytosin und durch anschließende Deaminierung zu 5`-Hydroxymethyluracil führt [278]. Weizman et al. beschrieben, dass oxidierte CpG-Dinukleotide die Methylierung durch *HPA II* Methylase verhindern bzw. reduzieren [279], was ebenfalls in eine Hypomethylierung resultieren könnte. Diese Untersuchungen zeigen die Relevanz von reaktiven Sauerstoffspezies bei der Kanzerogenese. In jüngster Zeit werden aber immer häufiger Anwendungen von Sauerstoff im Überdruck (hyperbaric oxygen, HBO) bei Patienten mit unterschiedlichsten Krankheiten durchgeführt [280 - 283], und dies trotz Untersuchungen, die bei solchen Anwendungen in *in vivo*-Experimenten einen genotoxischen Effekt belegen [284 - 286]. Eine Klärung hinsichtlich des Gefahrenpotentials von HBO

scheint deshalb dringend erforderlich und der mögliche Zusammenhang zwischen oxidativen Stress und Methylierung könnte darüber hinaus zu einem Besseren Verständnis der Kanzerogenese beitragen.

In einer Kooperation mit Prof. Karl Skorecki vom Technion Israel Institute of Technology und Dr. Liran Shlush vom Israel Medical Institute (INMI) sollten Blutproben israelischer Kampftaucher, bei denen generell eine erhöhte Krebskrankungsrate festgestellt werden kann, untersucht werden.

In vielen Navy-Spezialeinheiten in der Welt (Abbildung 46) werden so genannte „closed-circuit oxygen rebreathing diving apparatus“ (CCORDA) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein geschlossenes System, bei dem die Taucher reinen Sauerstoff mit hohem Druck atmen, um ihnen hierdurch die Möglichkeit zu geben, sehr lange Tauchgänge auch in sehr großer Tiefe zu absolvieren [287 - 289]. Weitere militärische Vorteile, im Vergleich zu einer herkömmlichen Taucherausrüstung, sind der niedrige Geräuschpegel sowie eine geringe Menge freiwerdenden Gases. [289].

Die israelischen Kampftaucher werden während ihrer militärischen Ausbildung einem hohen Maß an Hochdruck-Sauerstoff ausgesetzt und dies über einen längeren Zeitraum [288]. So verbringen die Taucher während ihres ersten Ausbildungsjahres 25 Stunden pro Woche unter Wasser, in den folgenden drei Jahren immerhin noch 15 Stunden pro Woche [288].



**Abbildung 46:** Kampftaucher mit CCORDA, sowie das CCORDA zur Einzelansicht.

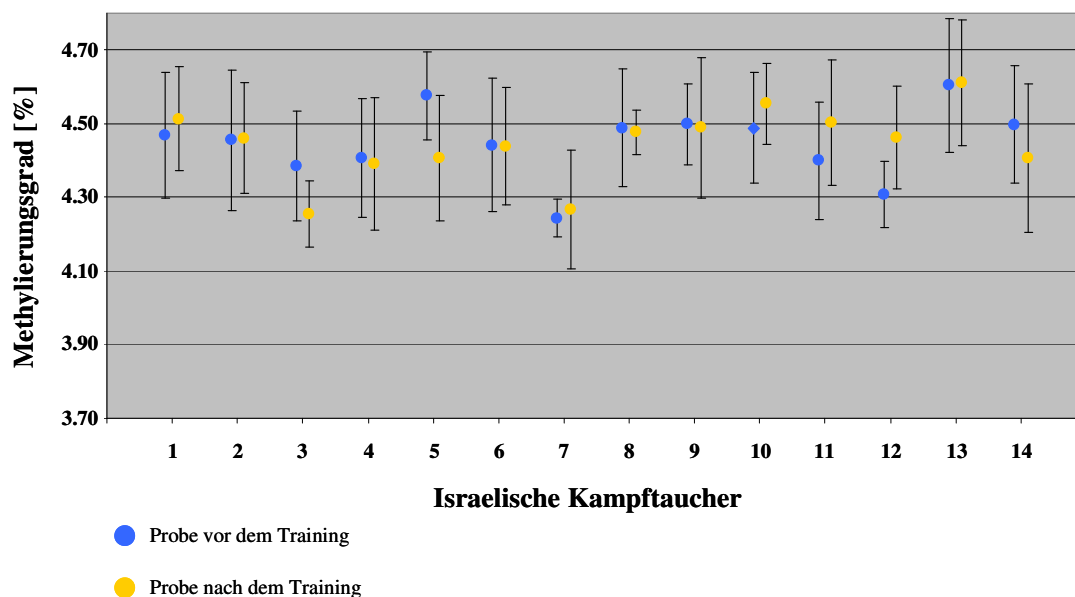
### **3.6.1 Versuchsaufbau und Methylierungsgrad der DNA israelischer Kampftaucher**

Für die Bestimmung des globalen Methylierungsgrades wurden DNA-Proben von israelischen Kampftauchern und Proben von nicht tauchenden Elitesoldaten als Kontrolle analysiert. Hier-

für wurden den Kampftauchern und den Elitesoldaten jeweils zwei Blutproben entnommen. Die erste Blutabnahme erfolgte unmittelbar vor einem einheitsspezifischen Training, welches 5 Monate lang dauerte, die zweite nach Beendigung des Trainings. Aus den Blutproben wurde anschließend die DNA der T-Lymphozyten isoliert, welche für unsere Analysen verwendet wurde. Insgesamt umfasste das Probenvolumen 58 DNA-Proben, wobei 28 Proben von 14 Kampftauchern stammen und 30 Proben von 15 Elitesoldaten.

Damit keine ungewollte Beeinflussung der Auswertungsergebnisse stattfinden konnte, wurden die 58 DNA-Proben in einer „Doppelblindstudie“ analysiert. Für die Analyse mussten zunächst die DNA-Proben mittels UV-VIS-Spektrometer quantifiziert und dann aliquotiert werden. Zur Analyse wurden 1 µg DNA-Proben verwendet. Alle Proben wurden nach ihrer Hydrolyse und Derivatisierung mit TPB gefällt. Nach einer 1:100 Verdünnung der Proben mit Reinst-Wasser erfolgte die Analyse mit der CE-LIF. Hierfür wurde jedes Aliquot 5-mal hintereinander in Sequenzen vermessen. Für die Bestimmung des globalen Methylierungsgrades der DNA wurden über 870 Einzelmessungen durchgeführt. Dabei wurden auch 10 CT-DNA-Proben zur Kontrolle analysiert. Jeweils eine CT-DNA wurde dabei in jeder neuen Probenaufbereitung zusammen mit den Kampftaucherproben vorbereitet und anschließend in derselben Sequenz analysiert.

Abbildung 47 und 48 zeigen den Methylierungsgrad der Taucher und der Elitesoldaten vor und nach ihrem Training. Das Diagramm in Abbildung 49 vergleicht die Mittelwerte der Methylierungsgrade aller Taucher vor und nach dem Tauchtraining mit dem Mittelwerte aller Elitesoldaten vor und nach dem Training.



**Abbildung 47:** Methylierungsgrad der DNA der Taucher vor und nach dem 5-monatigem Training.

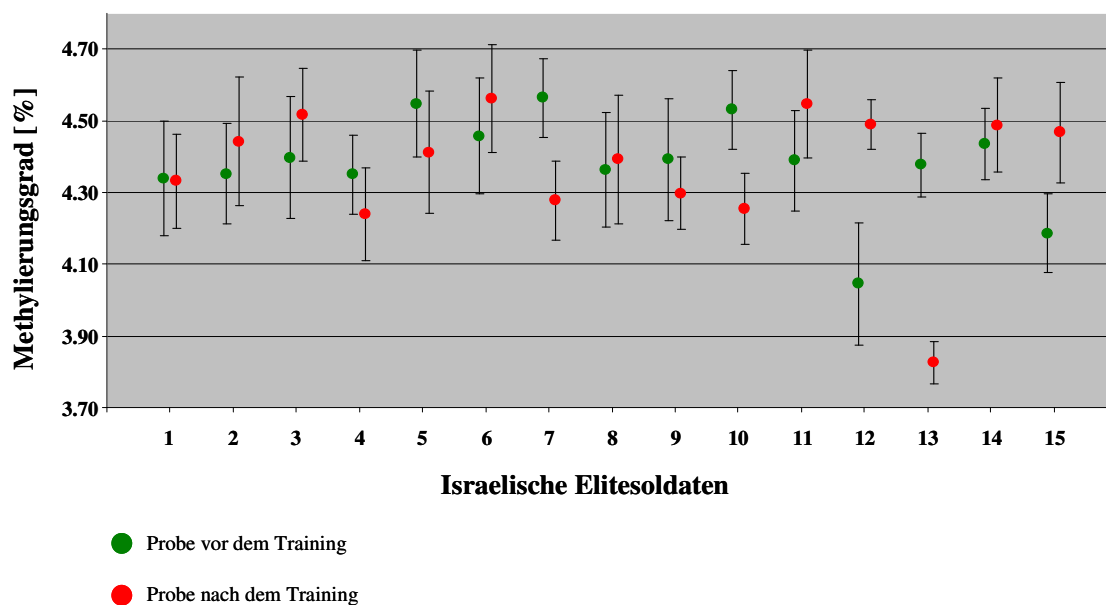


Abbildung 48: Methylierungsgrad der DNA der Elitesoldaten vor und nach dem 5-monatigem Training.

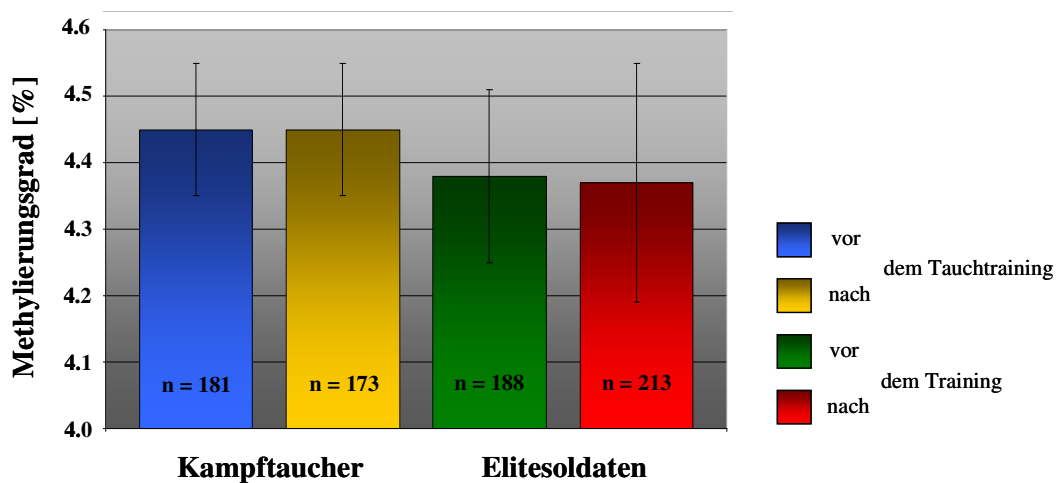


Abbildung 49: Mittelwerte der Methylierungsgrade der DNA aller Kampftaucher. (Vor und nach dem Tauchtraining im direkten Vergleich mit den Mittelwerten der DNA-Methylierung aller Elitesoldaten vor und nach ihrem spezifischen Training.)

Die in Abbildung 47 bis 49 dargestellten Ergebnisse zeigen keine signifikanten Änderungen zwischen den Methylierungsgraden vor bzw. nach dem Training lediglich bei den Soldaten 12 und 13 kann eine signifikante Änderung festgestellt werden. Jedoch ist diese bei Soldat 12 mit einer Hypermethylierung und bei Soldat 13 mit einer Hypomethylierung nach dem Training verbunden.

Auffällig ist, dass der Fehler der Mittelwerte aller Proben trotz häufiger Wiederholungsmessungen relativ groß im Vergleich zu den Analyseergebnissen bei den Marmorkrebsen ist, weshalb kleine Änderungen im Methylierungsgrad schwierig zu identifizieren sind.

Der Zeitraum von fünf Monaten, die zum Vergleich zweier DNA-Proben zu Verfügung standen, scheint für eine solche Studie bei Menschen relativ knapp bemessen zu sein, da der Körper für oxidative DNA-Schäden effektive Reparaturmechanismen vorhält, die einer kurzfristige Änderung des Methylierungsgrades entgegenwirken. In einer möglichen Studie, bei der Soldaten vor Beginn ihrer Ausbildung zum Kampftaucher und nach Beendigung dieser 4-jährigen Ausbildung jeweils eine Blutprobe abgenommen würde, wäre die Wahrscheinlichkeit, eine Änderung zu beobachten, vermutlich wesentlich größer.

### **3.7 Bestimmung des genomweiten Methylierungsgrades von mit Formalin fixierten Gewebeproben**

In diesem Versuch sollte gezeigt werden, ob mit der CE-LIF-Methode die Analyse von zuvor in Formalin fixierten Proben zu reproduzierbaren Ergebnissen führt. Hierzu wurden in eine Kooperation mit Prof. Dr. Stephan Störkel vom Institut der Pathologie der Universität in Witten/Herdecke insgesamt drei gesunde menschliche Nieren verwendet, die von der Helios-Klinik in Wuppertal zu Verfügung gestellt wurden.

DNA-Proben, die aus mit Formalin fixiertem Gewebe stammen, können durch die Fixierung des Gewebes DNA-Brüche aufweisen, die dann eventuell zu einer fehlerhaften Bestimmung des Methylierungsgrades führen [260]. Deshalb sollte geklärt werden, ob die Proben mit der CE-LIF-Methode analysiert werden können und es dabei zu reproduzierbaren Ergebnissen bei der Bestimmung der genomweiten DNA-Methylierung kommt.

Das Interesse an der Bestimmung des genomweiten Methylierungsgrades von in Formalin fixierten Proben rührt daher, dass es sich bei den Gewebeproben, die bei einer Biopsie entnommen werden, in der Regel um Tumore handelt. Diese werden im Anschluss an eine Biopsie von Pathologen mikroskopisch untersucht und charakterisiert. Da ein Großteil der Tumore zur weiteren Untersuchung bzw. als Archivmaterial gelagert wird, werden diese aus Kosten- und Stabilitätsgründen nicht eingefroren, sondern in 4 % Formalin fixiert. Diese Langzeitlagerungsart ermöglicht es, auch noch nach mehreren Jahren an einem Gewebe weitere Charakterisierungen vorzunehmen.

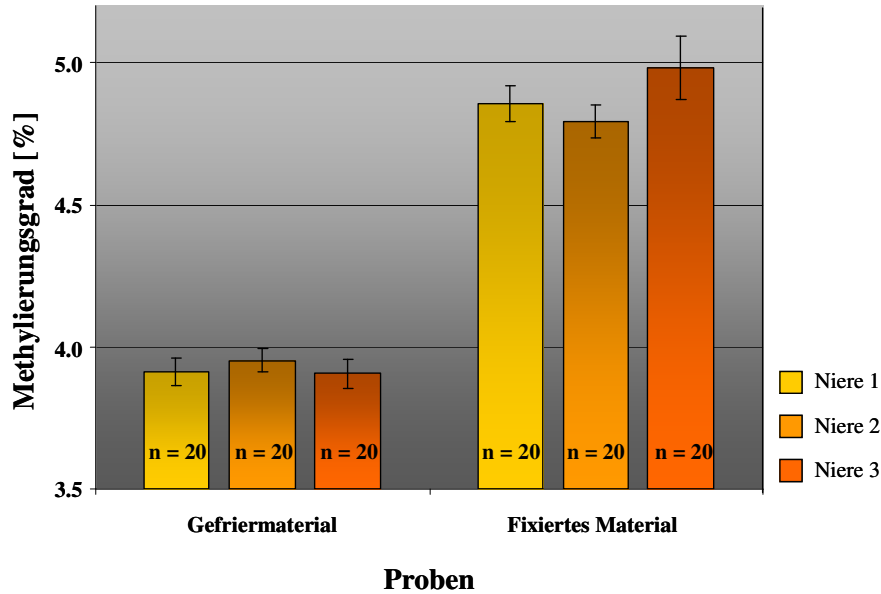
Ein wichtiger Vorteil, der Analyse von fixierten Proben wäre das Vorhandensein so genannter Tumorbanks, die verschiedenste Tumore in fixierter und charakterisierter Form in großer Anzahl enthalten. Somit würde eine Bestimmung des genomweiten Methylierungsgrades auch im Hinblick auf die unterschiedlichen Stadien der Entwicklung von Tumoren ermöglicht werden.

### **3.7.1 Bestimmung des Methylierungsgrades von gefrorener und fixierter Nieren-DNA**

In dieser ersten Analyse von in Formalin fixierten Proben wurden drei Nieren von unterschiedlichen Patienten verwendet. Bei diesen Organen wurden keine makroskopischen Veränderungen im Vorfeld festgestellt. Um einen Vergleich zwischen gefrorenen und fixierten Gewebeproben zu erhalten, wurde vor der Fixierung ein Teil des frischen Organs eingefroren, während der andere in 4 % Formalin für 48 bis 72 Stunden fixiert wurde. Anschließend wurde die DNA aus beiden Geweben mit dem *E.Z.N.A. Tissue DNA Kit II* der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH isoliert. Die anschließende Quantifizierung der DNA wurde an der Universität Wuppertal durchgeführt, ebenso die Aliquotierung der Proben. Aufgrund der ausreichenden DNA-Menge wurde für die Analyse jeweils 10 µg DNA verwendet, die nach Hydrolyse, Derivatisierung und Fällung 1:100 mit Reinst-Wasser verdünnt und anschließend 20 mal analysiert wurde. Jede Probe wurde für eine genaue Bestimmung des Methylierungsgrades bis zu 20-mal analysiert.

Die Ergebnisse aus Abbildung 50 zeigen, dass der Methylierungsgrad der drei Nieren untereinander - sowohl gefrorene als auch fixierte Proben - sehr gut übereinstimmen. Vergleicht man jedoch die gefrorenen Gewebeproben mit den fixierten, stellt man einen hoch signifikanten Unterschied im Methylierungsgrad fest, der im Vorfeld auch erwartet wurde. So unterscheidet sich der Methylierungsgrad in fixiertem Gewebe der Niere von demselben gefrorenen Organ um bis zu 20 %. Aufgrund der guten Reproduzierbarkeit der Analysen ist es möglich, aus den Werten des Methylierungsgrades einen konstanten Faktor von 1,24 für den Unterschied von gefrorenem zu fixiertem Gewebe zu bestimmen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich DNA-Proben aus fixiertem Gewebe ebenso gut wie gefrorene Proben analysieren lassen und ebenfalls zu reproduzierbaren Ergebnissen führen, mit dem Unterschied, dass sich der Methylierungsgrad um den Faktor 1,24 unterscheidet.



**Abbildung 50:** Ergebnisse der 1. Studie fixierter Gewebeproben: Die Abbildung zeigt den Methylierungsgrad von drei gesunden Nieren aus Gefriermaterial (links) und den Methylierungsgrad derselben drei Nieren nach Fixierung in Formalin (rechts).

### 3.7.2 Versuchsaufbau der 2. Studie zur Untersuchung von fixiertem Blasengewebe

Aufgrund der guten Resultate der ersten Studie wurde ein weiteres Experiment durchgeführt, bei dem die Auswirkung der Fixierungsdauer auf den Methylierungsgrad der DNA bestimmt werden sollte. Als Organ wurde hierfür die menschliche Blase gewählt. Es wurden von den fünf eingesetzten Blasen jeweils 9 Gewebeproben abgetrennt, wobei die erste Probe vor der Fixierung entnommen wurde. Die Organe wurden für die Fixierung aufgespannt und in die Fixierlösung getaucht. Nach einer Inkubationszeit von jeweils 6 Stunden wurde das Organ für das Abtrennen eines Gewebestückes aus dem Fixierbad genommen und anschließend weitere 6 Stunden inkubiert. Dieser Vorgang wurde bis zu einer maximalen Fixierdauer von 48 Stunden fortgesetzt. Von allen abgetrennten Gewebeproben wurde im Anschluss die DNA isoliert. Die hierdurch erhaltenen DNA-Proben wurden mit einer patientenzugehörigen Nummer versehen und an die Universität Wuppertal zur Quantifizierung und anschließender Analyse versendet.

Die verwendeten Organe stammen von Patienten mit unterschiedlichem Alter, Geschlecht sowie verschiedenen Vorerkrankungen. Die einzige Gemeinsamkeit der zu analysierenden Organe war, dass alle bei ihrer Präparation eine Entzündung des gesamten Organs aufwiesen.

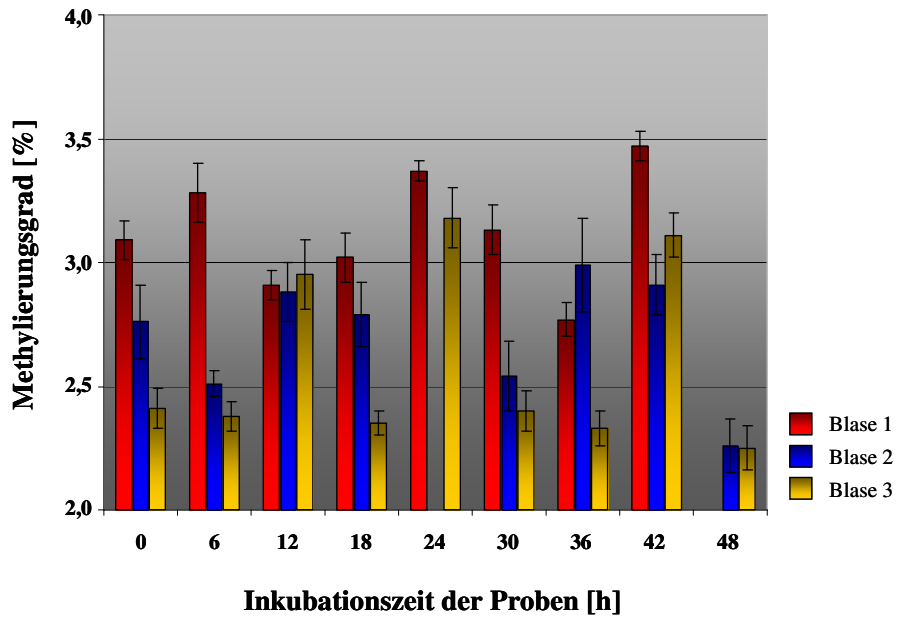
Bei einigen Patienten konnte zudem ein Tumor nachgewiesen bzw. nicht völlig ausgeschlossen werden. Von dem Patient 18182/06 fehlten die Proben für die Fixierdauer von 30 und 42 Stunden. Auch in dieser zweiten Studie wurden 10 µg-Aliquote für die Analyse verwendet, jedoch auf eine Fällung nach der Derivatisierung verzichtet. Jede Probe wurde viermal analysiert. Auch bei dieser Studie fungierte CT-DNA als Kontrolle der Hydrolyse und Derivatisierung. Für die Bestimmung des Methylierungsgrades wurden, im Durchschnitt 9 Wiederholungsmessungen durchgeführt.

Um die Ergebnisse besser vergleichen zu können, sind in Abbildung 51 die Ergebnisse der Blase 1 (♀, 89 Jahre, Entzündung der Blase), Blase 2 (♂, 61 Jahre, Entzündung der Blase, sowie mögliche Restformationen eines Tumors) sowie Blase 3 (♀, 69 Jahre, Entzündung der Blase, sowie mögliche Restformationen eines Tumors) in einem Diagramm zusammengestellt. Der gemessene Methylierungsgrad der drei Organe beim Zeitpunkt 0 Stunden zeigt deutlich, dass sich die 3 Proben signifikant in ihrem Methylierungsgrad voneinander unterscheiden. Dieses Ergebnis ist nicht weiter überraschend, da die analysierten Organe alle bei ihrer Präparation eine Entzündung aufwiesen, das Alter der Patienten sich zum Teil stark unterschied, sowie die Blase 2 und 3 zusätzlich noch nicht auszuschließende Restformationen eines Tumors aufwiesen. Es ist bekannt, dass sich der Methylierungsgrad im Lauf eines Lebens leicht ändert und dass in tumorösem Gewebe eine Hypomethylierung im Vergleich zu normalem Gewebe besteht [137, 141, 181, 183, 186]. Dies erklärt, warum ein Unterschied zwischen den verschiedenen Blasen durchaus zu erwarten war. Wird nun der Methylierungsgrad eines Organs über die unterschiedliche Zeit der Fixierdauer bis zum Wert von 48 Stunden betrachtet, so fällt auf, dass sich der Methylierungsgrad mit der Dauer der Fixierung zwar ändert, jedoch kein Trend bei einer der drei Blasen zu einem Anstieg oder Abfall der Methylierung ersichtlich ist. Selbst bei dem Versuch, nur einen Bezug zwischen Fixierdauer und einer Änderung des Methylierungsgrades beschreiben zu wollen, ohne hierbei die absoluten Werte zu betrachten, lassen sich keine Korrelationen erkennen.

In Abbildung 52 ist für alle fünf Blasen die prozentuale Veränderung der nicht fixierten Proben zu dem Methylierungsgrad nach 6 Stunden Fixierung aufgetragen.

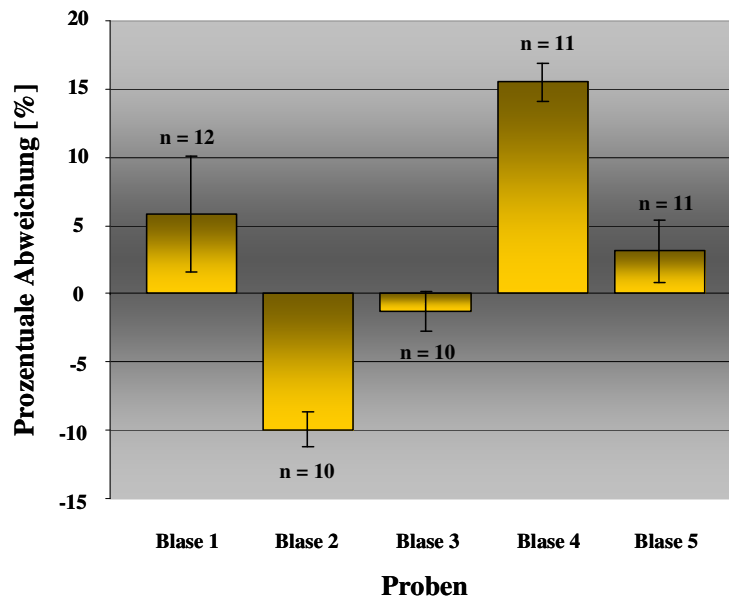
Während der Methylierungsgrad der Blase 1 und 4 ansteigt, fällt er bei den drei anderen Blasen. Eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse stellt alleine die Probenabtrennung nach verschiedenen Zeiten der Inkubation dar. Da es sich bei den Organen um vorgeschädigte Blasen handelt und somit um nicht homogenes Probenmaterial, kann nicht davon ausgegangen werden, dass jedes abgeschnittene Blasengewebe denselben Methylierungsgrad besitzt.





**Abbildung 51:** Ergebnisse der 2. Studie fixierter Blasen: Die Abbildung zeigt die Methylierungsgrade der drei Blasen nach unterschiedlich langer Fixierung in Formalin.

Um die Probennahme als mögliche Ursache ausschließen zu können, wäre es sinnvoll, mehrerer Proben zum selben Zeitpunkt einer Fixierdauer von einem Organ zu entnehmen. Die Analyse dieser Proben könnte eindeutig belegen oder widerlegen, dass die Probennahme für die Änderungen des Methylierungsgrades maßgeblich verantwortlich ist. Da eine veränderte



**Abbildung 52:** Veränderung des Methylierungsgrades aller Blasen [%]. (Nach einer Inkubation von 6 Stunden in 4 % Formalin.)

Versuchswiederholung aus Zeitgründen bisher nicht durchgeführt werden konnte, wurde zumindest durch eine wiederholte Probenaufbereitung der nichtfixierten Probe von Blase 1 gezeigt, dass die Bestimmung des Methylierungsgrades absolut reproduzierbar ist (Blase 1 erstes Aliquot  $3,09 \pm 0,08 \%$  und Blase 1 zweites Aliquot  $3,15 \pm 0,10 \%$ ) und die zum Teil großen Änderungen im Methylierungsgrad nicht auf die Methode zurückzuführen sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die zweite Studie nicht die Ergebnisse aus der ersten Studie mit den Nieren als Testorgan bestätigen konnte. Jedoch ist hierfür wahrscheinlich die Inhomogenität der Proben verantwortlich und nicht das analytische Verfahren.

Aus dieser zweiten Studie wird deutlich, dass bis zur Bestimmung von Realproben noch einiges an Grundlagenforschung betrieben werden muss, bevor mit repräsentativen Analyseergebnissen gerechnet werden kann. Zukünftig sollte zunächst wieder mit der Niere als Organ gearbeitet werden. Dabei sollten Organe mit keinerlei Vorerkrankung verwendet werden. Des Weiteren müssten mindestens drei Gewebeproben für einen bestimmten Zeitpunkt der Fixierung des Organs entnommen werden. Hiermit könnte sichergestellt werden, dass die Probenahme nicht als Ursache für eine Änderung des Methylierungsgrades verantwortlich ist. Erst nach diesen Voruntersuchungen ist eine weitere Analyse von anderen Organen nach demselben Schema sinnvoll.

### **3.8 Probleme der Methode**

Während der Arbeit sind verschiedene Probleme aufgetreten, die einen großen Effekt auf die Methode zur Bestimmung des genomweiten Methylierungsgrades ausüben. Hierbei sind im Wesentlichen drei Faktoren zu nennen, die eine gute Auswertung von Elektropherogrammen sowie das Zustandekommen reproduzierbarer Ergebnisse stark beeinflussen können:

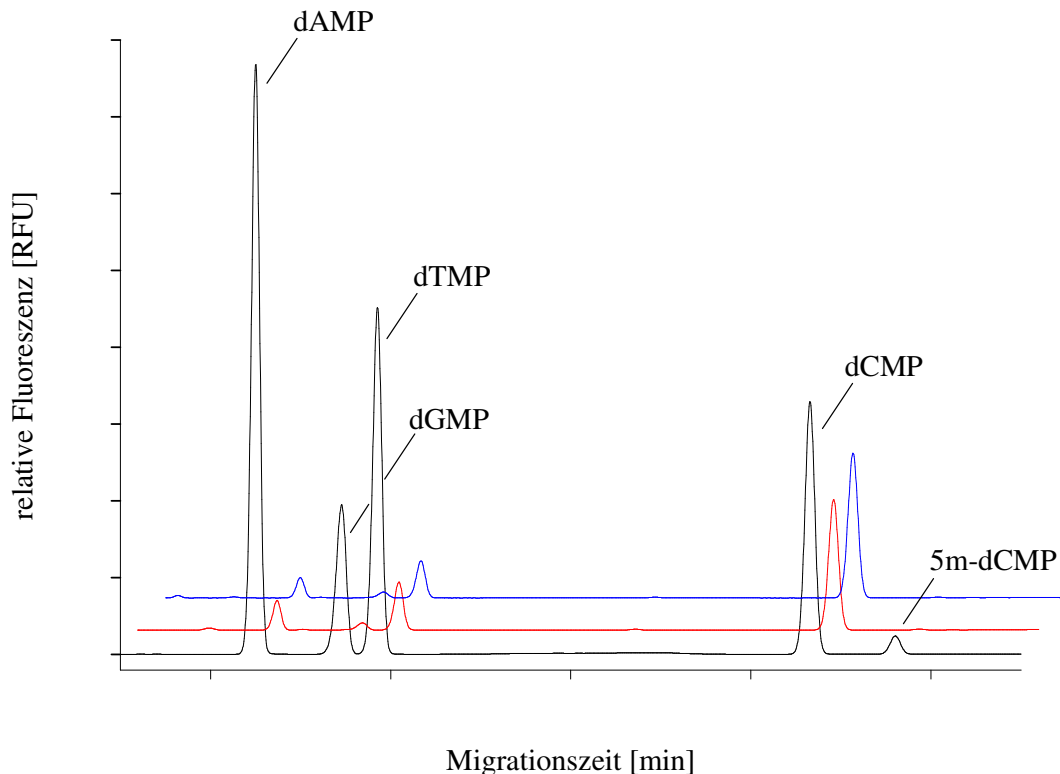
- Enzym SPD
- Fluoreszenzmarker BODIPY
- Kapillaren

#### **3.8.1 Enzymabhängigkeit der Methode**

Für die Hydrolyse wird seit Jahren ein Enzymmix aus Mikrokokken Nuklease (MN), *Staphylococcus aureus* von der Firma Sigma-Aldrich (No. N3755, 500U) sowie Phosphodiesterase (SPD) Typ II, Calf Spleen von der Firma Calbiochem (No. 524711, 10U) verwendet.

Aufgrund eines Lieferengpasses bei der Firma Calbiochem war das Enzym SPD fast acht Monaten während dieser Arbeit nicht verfügbar, weshalb SPD bei einer anderen Firma bestellt wurde. Es gibt zwei weitere Firmen die SPD anbieten, jedoch stammt dieses Enzym nicht von der Milz eines Kalbes sondern von der Milz eines erwachsenen Rindes, was sich im Verlauf als entscheidender Unterschied herausstellen sollte.

Es wurde jeweils eine SPD-Charge von den Firmen Sigma-Aldrich (No.P9041, 10U) und Worthington Biochemical Coporation (No. LS003603, 10U) bestellt. Beide Enzyme wurden entsprechend der bestehenden SOP für die Enzymdialyse und weiteren Behandlungen vorbereitet. Anschließend wurde mit den beiden Chargen jeweils ein Enzymmix mit der MN hergestellt. Die beiden Enzymmixe wurden zusammen mit einem alten Enzymmix in drei getrennten Hydrolysen unter jeweils gleichen Bedingungen eingesetzt. Für die Hydrolyse wurden 10 µg CT-DNA-Proben verwendet, die nach anschließender Derivatisierung in der CE-LIF analysiert und miteinander verglichen wurden. In der folgenden Abbildung sind die Elektropherogramme der drei unterschiedlichen Enzymkombinationen dargestellt.

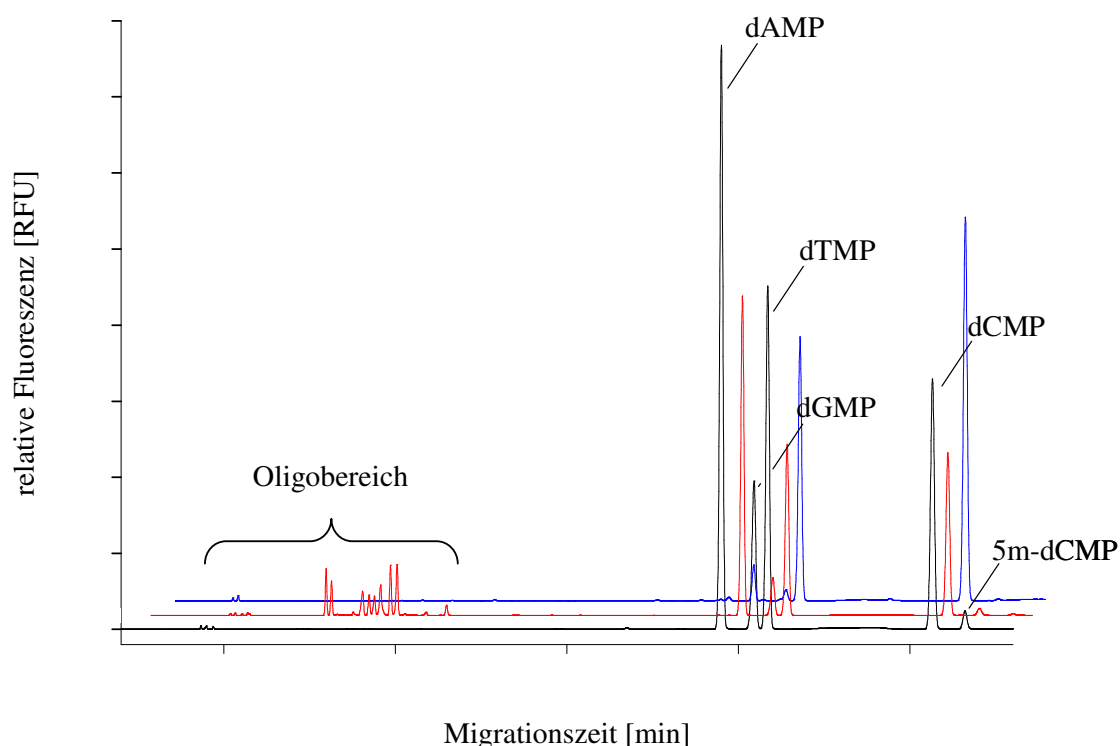


**Abbildung 53:** Enzymvergleich: Die Elektropherogramme der SPD von Calbiochem (schwarz), von Sigma (rot) und von Worthington (blau) sind alle bei einer Verdünnung von 1:100 mit Reinst-Wasser mit derselben Kapillare aufgenommen worden.

Der Abbildung 53 kann entnommen werden, dass nur der Enzymmix mit der SPD von Calbiochem ein normales Elektropherogramm mit den fünf Hauptsignalen liefert.

Um dieses Ergebnis näher zu untersuchen, wurden in einem weiteren Versuch 10 µg CT-DNA ausschließlich mit MN bzw. SPD für 3 Stunden verdaut. In Abbildung 54 sind die Elektropherogramme dargestellt, wobei das Elektropherogramm der SPD von Worthington (blau) stellvertretend für die SPD von Sigma und Calbiochem gezeigt wird, da diese Elektropherogramme nahezu identisch aussahen. Zusätzlich wurde noch das Elektropherogramm einer 10 µg CT-DNA-Probe aufgeführt, die mit MN und SPD (Calbiochem) verdaut wurde (schwarz).

Das Elektropherogramm, welches nur durch den Einsatz von MN (rot) entstanden ist, zeigt ein vergleichbar normales Analyseergebnis, welches jedoch einen großen Oligobereich aufweist. Aufgrund dieses sehr großen Oligobereiches sind die Bestimmungen des Methylierungsgrades nicht reproduzierbar, was den alleinigen Einsatz von MN für die Hydrolyse nicht möglich macht. Betrachtet man das beispielhafte Elektropherogramm der SPD von Worthington (blau), so fällt auf, dass es Ähnlichkeit zu den Elektropherogrammen hat, die in Kombination von MN mit der SPD von Sigma bzw. Worthington entstanden sind.



**Abbildung 54:** Einzelverdau mit MN bzw. SPD: Die Abbildung zeigt jeweils die Elektropherogramme von 10 µg CT-DNA, die 1:100 mit Reinst-Wasser verdünnt und analysiert wurden. Das Elektropherogramm eines normalen Verdau mit MN und SPD (schwarz), Verdau nur mit MN (rot) und Verdau nur mit SPD für 3 Stunden (blau).

Eine mögliche Erklärung für das Zustandekommen der nicht normalen Signalverhältnisse ist, dass sich die Enzyme MN und SPD gegenseitig bei der Hydrolyse stören bzw. bei der anschließenden Derivatisierung eine Substanz in der SPD enthalten sein könnte, die die Derivatisierung negativ beeinflusst. Alle Bemühungen, die Hydrolyse mit den SPD-Chargen von Sigma bzw. Worthington durchzuführen zu können, blieben ohne Erfolg.

### 3.8.2 Veränderung der Fluoreszenzmarkerqualität BODIPY® FL EDA

Der für die Derivatisierung verwendete Fluoreszenzmarker 4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-propionylethylenediamin-hydrochlorid (BODIPY® FL EDA) wird, wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, im Überschuss für die Derivatisierung der Mononukleotide nach erfolgter Hydrolyse eingesetzt.

Das hierfür benötigte BODIPY ist aus patentrechtlichen Gründen nur von einer Firma erhältlich. Diese Tatsache macht die Methode abhängig von dieser Firma und der gelieferten Qualität. Aufgrund einer Änderung im Herstellungsprozess ist die Qualität des Fluoreszenzmarkers deutlich schlechter geworden, was folgende Bilder verdeutlichen.



**BODIPY® FL EDA**  
**5 mg**  
**Lot: 4402-1**

**Molecular Probes**



**BODIPY® FL EDA**  
**5 mg**  
**Lot: 30374W**

**Invitrogen**

**Abbildung 55:** BODIPY Vergleich: Die Abbildung zeigt links das bislang über Jahre verwendete BODIPY der Firma Molecular Probes, rechts ist das Produkt der Firma Invitrogen nach der Übernahme der Herstellung von BODIPY.

Die Fotos zeigen jeweils 5 mg des Fluoreszenzmarkers. Hierbei lassen sich unschwer die Unterschiede im Volumen und Farbe ausmachen. Laut Auskunft des Herstellers wurde auf

das Aussalzen mit Salzsäure verzichtet. Allerdings führten sämtliche Versuche dies hier vorzunehmen nicht zum gewünschten Erfolg.

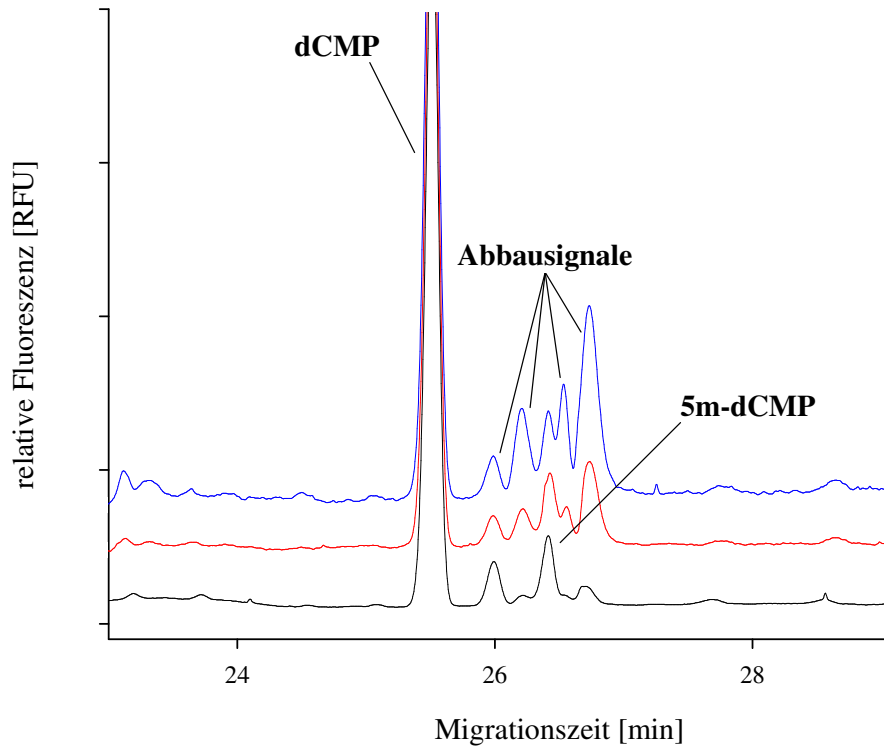
Durch geliefertes BODIPY der Firma Invitrogen haben sich zwei wesentliche Punkte verschlechtert.

Zunächst einmal ist das Einwiegen des Fluoreszenzmarkers wesentlich schwieriger geworden. Für die Derivatisierung einer 10 µg DNA-Probe müssen 0,2 mg BODIPY abgewogen werden. Aufgrund der kristallinen Beschaffenheit führt dies zu großen Verlusten, da es schwierig ist, das gesamte BODIPY aus der gelieferten Verpackung herauszubekommen. Aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit kann auch nicht die gesamte Menge von 5 mg BODIPY in Wasser oder Puffer gelöst werden, um anschließend eine Aliquotierung vorzunehmen.

Die zweite wesentliche Verschlechterung ist seine geringere Stabilität in der verdünnten Probe. In der Dissertation von Wirtz [64] konnte gezeigt werden, dass 1 µg DNA-Proben, die nach Verdünnung mit Paraffinöl überschichtet wurden, für mehrere Analysen hintereinander verwendet werden konnten. Ebenso war es möglich, 10 µg-Proben, auch ohne nachgeschaltete Fällung, 12 Stunden lang zu analysieren. Mit dem BODIPY von Invitrogen ist dies nur noch eingeschränkt möglich. Bei 1 µg-Proben treten bereits im ersten Lauf Abbausignale des Fluoreszenzmarkers im Bereich von 5m-dCMP auf, die spätestens nach der dritten Analyse dazu führen, dass eine Auswertung nicht mehr möglich ist. Selbst die Analyse von 10 µg-Proben ist ohne Fällung nur noch bis maximal 4 Läufen möglich. In Abbildung 56 sind beispielhaft Elektropherogramme einer 1 µg CT-DNA unmittelbar nach erfolgter Derivatisierung als auch 1,5 bzw. 3 Stunden nach Lagerung in der CE dargestellt.

In Abbildung 56 ist deutlich zu erkennen, dass innerhalb von drei Stunden die Intensität der Abbausignale stark zunimmt. Hierdurch ist eine Auswertung nach bereits 90 Minuten nicht mehr möglich. Zu berücksichtigen ist, dass es sich bei der analysierten Probe um keine Realprobe aus Gewebe oder Zellkultur handelt, was eine Analyse noch zusätzlich erschweren würde. Dies konnte am Beispiel der Marmorkrebs-DNA (1µg) gezeigt werden.

Aufgrund der in Kapitel 3.4 vorgestellten Methode zur Entfernung des Überschusses an BODIPY und EDC ist es möglich, die Geschwindigkeit, mit der die Abbauprodukte auftauchen, bis zu einer maximalen Sequenzlänge von etwa 80 Läufen herauszuzögern. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ohne eine Entfernung des Überschusses an Fluoreszenzmarker eine Analyse der Proben mit dem BODIPY der Firma Invitrogen nur sehr stark zeitlich begrenzt durchgeführt werden kann.



**Abbildung 56:** Elektropherogramme einer 1 µg CT-DNA: Die Probe wurde direkt nach Derivatisierung (schwarz) sowie nach 1,5 (rot) bzw. 3 Stunden (blau) Lagerung in der CE analysiert. Für eine bessere Übersicht wurde nur der Bereich von dCMP und 5m-dCMP abgebildet.

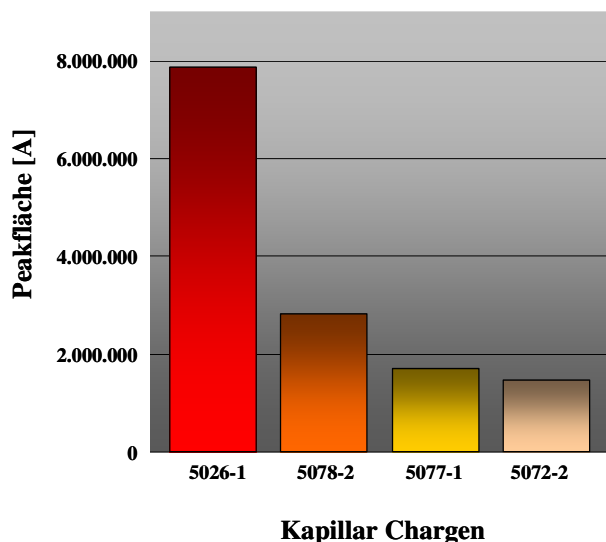
### 3.8.3 Einfluss der verwendeten Kapillare auf die Empfindlichkeit der Analysen

Für die Analyse von DNA-Proben mittels CE-LIF werden unbeschichtete Fused-Silica Kapillaren mit einem Innendurchmesser (ID) von 50 µm und einem Außendurchmesser (AD) von 360 µm verwendet.

Während der Arbeit wurde die Empfindlichkeit von vier verschiedenen Kapillarchargen der Firma CS Chromatographie Service GmbH miteinander verglichen. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Kapillaren einen großen Effekt auf die Empfindlichkeit der Analysenergebnisse haben.

Um einen repräsentativen Vergleich der vier Kapillaren zu bekommen, wurde von jeder Charge eine Kapillare konditioniert und für die Testmessungen zur Empfindlichkeitsbestimmung verwendet. Für die Bestimmung der Empfindlichkeit wurde das von der Firma Beckman bezogene *P/ACE™ System LIF Performance Test Mixture* eingesetzt. Diese Testlösung enthält Fluorescein, welches ein Signal bei einer Trennungsspannung von 20 KV nach ca. 5 Minuten erzeugt. Um für jede Analyse identische Bedingungen zu schaffen wurde als Elektrolyt ein von Beckman käuflich erhältlicher Puffer verwendet. Zudem fanden alle Analysen

auf demselben CE-Gerät mit dem originalen Beckman-Laser statt. In der folgenden Abbildung ist die zeitnormierte Peakfläche des Signals als Wert für die Empfindlichkeit dargestellt, da die Fläche eines Signals unter anderem von der Retentionszeit abhängt und somit für eine Bestimmung der absoluten Empfindlichkeit nicht in Frage kommt.



**Abbildung 57:** Empfindlichkeitsvergleich der Kapillarchargen. Die Abbildung zeigt die korrigierte Fläche des Signals der Beckmann LIF-Test-Solution, die auf vier unterschiedlichen Kapillarchargen bestimmt wurde. Alle eingesetzten Kapillaren stammen von der Firma CS Chromatographie Service (Langerwehe, Deutschland).

Die unterschiedlichen Kapillarchargen zeigen zum Teil signifikante Unterschiede in der Peakfläche und somit in der absoluten Empfindlichkeit. Diese großen Unterschiede in der Empfindlichkeit (Faktor 5.3 zwischen Charge 5026-1 und 5077-2) von einer Charge zur anderen können zu Problemen bei der Integration des kleinen Signals von 5m-dCMP führen.

Des Weiteren sind die Kapillaren der verschiedenen Chargen unterschiedlich lange stabil. Eine Kapillare kann bis zu 500 Einzelläufe einsetzbar sein, bevor Sie am Inlet oder Outlet der CE, aufgrund der abgelösten Polyimidschicht, bricht. Obwohl alle Kapillaren eine Ausheizungsphase von 24 Stunden im Muffelofen durchlaufen haben [290], wodurch die Haltbarkeit der Polyimidschicht um ein Vielfaches verlängert wird (siehe experimenteller Teil 5.5.1), kann diese auch bereits nach weniger als 100 Läufen abbrechen, was längere Sequenzen z.B. übers Wochenende nicht gesichert ermöglicht.

Interessanter weise konnte bei den verschiedenen Kapillaren ein Zusammenhang zwischen der Peakfläche und dem Strom während der jeweiligen Messung beobachtet werden. Der Strom scheint unter gleich bleibenden Bedingungen (Spannung und Puffer) ein Maß für die Empfindlichkeit der Kapillare darzustellen (je größer der Strom desto empfindlicher die Kapillare). Der resultierende Strom ist abhängig von der Spannung, Leitfähigkeit, Kapillar-



länge und der Schichtdicke (Abbildung 58, [291]). Der Unterschied im resultierendem Strom und in der Empfindlichkeit sind deshalb vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Kapillaren kleinste Innendurchmesser aufweisen. Ebenso sind Schwankungen des Stroms innerhalb einer Charge zu beobachten, was darauf deutet, dass selbst der Innendurchmesser innerhalb einer Charge Schwankungen unterworfen ist.

$$I = U \cdot k \cdot \left( \frac{d^2 \cdot \pi}{4 \cdot L_{ges}} \right)$$

$I$	= Strom
$U$	= Spannung
$k$	= Elektrolyten Leitfähigkeit
$d$	= Durchmesser der Kapillare
$L_{ges}$	= Länge der gesamten Kapillare

**Abbildung 58:** Gleichung zur Berechnung des Stroms

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Enzym Phosphodiesterase Typ II aus Kälbermilz der Firma Calbiochem zwingend für Probenaufbereitungen erforderlich ist und nicht durch Phosphodiesterase vom erwachsenen Rind ersetzt werden kann. Dies macht die Methode abhängig von der Firma und der Qualität sowie der Verfügbarkeit des Enzyms.

Ebenfalls eine Firmenabhängigkeit besteht bei dem Bezug von BODIPY<sup>®</sup> FL EDA, welches einen großen Effekt auf die Auswertbarkeit der Proben hat. Ohne eine Entfernung des Überschusses an Fluoreszenzmarker ist mit dem BODIPY der Firma Invitrogen der Proben-durchsatz stark eingeschränkt.

Zuletzt ist die Methode auch noch von der Kapillarqualität der verschiedenen Firmen abhängig, jedoch nicht in dem Maß wie bei dem Enzym oder BODIPY. Eine geringe Probenverdünnung führt auch mit einer weniger empfindlichen Kapillare zu guten Resultaten. Jedoch wird der Probendurchsatz durch die schlechte Kapillarstabilität aufgrund häufig anfallender Wechsel verringert.

## 4 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die von Schmitz entwickelte kapillarelektrophoretische Methode zur Bestimmung des genomweiten DNA-Methylierungsgrades eingesetzt und weiter optimiert.

Der nach Derivatisierung vorliegende Überschuss an Fluoreszenzmarker BODIPY FL EDA führt bei der eingesetzten Methode, durch fluorophore Zersetzungsprodukte, zu störenden Signalen im Elektropherogramm und verhindert die Analyse einer Probe nach mehrstündiger Lagerung im Autosampler. Um den Probendurchsatz der Methode zu erhöhen, wurde der nach Derivatisierung vorliegende Überschuss an Fluoreszenzmarker mit Natriumtetraphenylborat gefällt, in Dichlormethan gelöst und von der wässrigen Phase, die die zu analysierenden Phosphoramidate beinhaltet, mittels Zentrifugation getrennt. Dadurch konnte der Probendurchsatz von 75 auf 250 Analysen pro Woche gesteigert werden [1].

Mit der Methode sollte unter anderem untersucht werden, ob die Bestimmung des Methylierungsgrades als Genotoxizitätsstest geeignet ist. Bei *in vivo*-Experimenten konnte bereits 48 h nach der einmaligen Applikation von 3-Nitrobenzanthron bei Ratten eine signifikante Änderung des Methylierungsgrades im Dünndarm und in der Lunge festgestellt werden. Die daraufhin mit V79-Zellen (exprimieren Cytochrom-P450-Enzyme) durchgeführten *in vitro*-Versuche mit vier verschiedenen Kanzerogenen zeigten aufgrund einer überraschenderweise gering ausfallenden DNA-Adduktbildung allerdings keine signifikante Änderung im Methylierungsgrad. Um diese unerwarteten Resultate besser verstehen zu können, wurden in Zusammenarbeit mit mehreren europäischen Arbeitsgruppen knock-out-Mäuse, bei denen das Cytochrom P450 inaktiviert wurde, mit Benzo[*a*]pyren (B[*a*]P) behandelt und die Metabolisierung untersucht. Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit eine Methode entwickelt, mit der die Clearance von B[*a*]P in Mäuseblut mit HPLC und Fluoreszenzdetektion bestimmt werden konnte. In Kooperation mit den anderen Arbeitsgruppen wurde festgestellt, dass durch die fehlende Aktivität von Cytochrom P450 eine erhöhte DNA-Adduktrate auftrat [2]. Dies widerspricht der gängigen Lehrmeinung, wonach die DNA-Adduktbildung auf PAK-Metabolite, die durch Cytochrom P450 gebildet werden, beruht.

Mit der neuen Probenvorbereitung konnten auch erstmals DNA-Methylierungsgrade von Nicht-Säugetieren, wie dem Marmorkrebs, untersucht werden. Aufgrund der Größe dieser

Tiere konnten nur 1 µg DNA-Proben eingesetzt werden. Dabei wurde eine Korrelation zwischen der Größe und Gewicht im Bezug zum Methylierungsgrad festgestellt [3].

Ferner wurden erste Versuche durchgeführt, die einen Zusammenhang zwischen dem oxidativen Stress und dem Methylierungsgrad aufzeigen sollten. Dazu wurden DNA-Proben von israelischen Kampftauchern, die mit „hyperbaric oxygen“ tauchen, mit denen von nicht-tauchenden Elitesoldaten verglichen. Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede bei den zu analysierenden Proben festgestellt werden. Eventuell gibt es keine Korrelation zwischen dem oxidativen Stress und dem Methylierungsgrad oder aber die Dauer des oxidativen Stress (5 Monate) war für eine Aussage nicht ausreichend lang.

Um die kapillarelektrophoretische Methode zur Bestimmung des genomweiten Methylierungsgrades auch für die Analyse von Gewebe aus Tumorbanks einsetzen zu können, wurde untersucht, ob die üblicherweise stattfindende Gewebefixierung mit Formalin einen Einfluss auf den bestimmbaren Methylierungsgrad hat. Hierbei zeigte sich, dass der Methylierungsgrad bei eingefrorenem Nierengewebe im Vergleich zu mit Formalin fixiertem Nierengewebe um ca. 20 % niedriger lag. In einer Folgestudie sollte deshalb untersucht werden, ob auch die Fixierdauer einen signifikanten Einfluss auf den Methylierungsgrad aufweist. Dazu wurde Blasengewebe von 5 Patienten 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 und 48 h lang in Formalin fixiert und jeweils der DNA-Methylierungsgrad analysiert. Dabei variierte der Methylierungsgrad stark in beide Richtungen. Dies lag wahrscheinlich an den inhomogenen Proben, da im Nachhinein festgestellt wurde, dass bei den Blasengeweben in allen Fällen eine Entzündung und in zwei Proben sogar Tumore vorlagen. Auch wenn die Ergebnisse der Studie die Probleme bei der Gewebefixierung aufzeigen, so wird doch die Relevanz der Methylierungsgradbestimmung bei diversen Erkrankungen deutlich.

## **5 Experimenteller Teil**

### **5.1 Herstellung des Enzymmixes (MN/SPD) für die DNA-Hydrolyse**

Die Präparation der beiden Enzyme SPD und MN lief in zwei Schritten ab: Zunächst erfolgte eine Dialyse der beiden Enzyme, um die Proteine zu entsalzen. In einem zweiten Schritt wurde der Enzymmix hergestellt. Jedoch musste vor der Dialyse der SPD chargenabhängig zunächst eine Aufkonzentrierung erfolgen.

#### **5.1.1 Aufkonzentrierung der SPD für die anschließende Dialyse**

Abhängig von der gelieferten Enzymcharge der SPD musste diese von einem Volumen von 2,5 mL auf 1,0 mL reduziert werden. Hierfür wurde das gesamte Volumen der SPD (2,5 mL) auf eine Membranoberfläche eines Proteinkonzentrators (9 kD Membran) gegeben, zuvor wurde der Dead-Stop für 1 mL nach Herstellerangaben eingestellt. Anschließend konnte das Enzym in dem Proteinkonzentrator für 30 min bei 4 °C und 3000 x g zentrifugiert werden. Das so aufkonzentrierte Enzym wurde anschließend für die Dialyse weiter verwendet.

#### **5.1.2 Dialyse der Enzyme**

- Dialyse der Phosphodiesterase, Typ II, Calf Spleen

Die aufkonzentrierte Lösung der 10 U SPD erfolgte nach einer erstellten SOP von Frau Wirtz. Hierfür wurde die SPD mit einer 2 mL-Spritze in eine Dialysekammer (Slide-A-Lyzers) injiziert. Der Dialyserahmen wurde anschließend an einem Schwimmer befestigt und in ein 10 L Becherglas mit 4 °C kaltem Reinstwasser (Kühlraum) gehängt und für ca. 7 Stunden dialysiert. Im Anschluss wurde das Reinst-Wasser getauscht und über Nacht weiter dialysiert. Am nächsten Tag wurde die SPD mit einer 5 mL-Spritze aus dem Dialyserahmen herausgenommen, der anschließend noch mal mit 400 µL Reinst-Wasser gespült wurde. Das gesamte Volumen der SPD (ca. 3,0 bis 4,5 mL) wurde auf 2 mL-Eppendorf-Cups verteilt, kurz in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend in der Speed-Vac lyophilisiert. Wichtig war hierbei, darauf zu achten, dass die Kühlkette des Enzyms so wenig wie möglich unter-

brochen und in regelmäßigen Abständen ein erneutes Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff erfolgte. Vor der endgültigen Trocknung des Enzyms wurde dieses in einem Reaktionsgefäß vereinigt.

- Dialyse der Micrococccen-Nuklease (MN) *Staphylococcus aureus*

Die Dialyse der 500 U MN erfolgte analog der Dialyse der SPD, mit Ausnahme, dass die MN als Feststoff geliefert vorlag und vor der Injektion in den Dialyserahmen in 250  $\mu\text{L}$  Reinst-Wasser gelöst wurde. Sowohl für die Injektion als auch für das Herausnehmen der MN aus dem Dialyserahmen wurde eine 1 mL-Spritze verwendet.

- Herstellen der MN-Lösung

Die 500 U der lyophilisierte MN wurden in einem Volumen von 1667  $\mu\text{L}$  Reinst-Wasser zu einer Konzentration von 300  $\text{mU}/\mu\text{L}$  gelöst.

- Herstellen der SPD-Lösung

- ❖ Für die Herstellung von „1-fach“-Enzym wurde die 10 U SPD in 2000  $\mu\text{L}$  Reinst-Wasser resuspendiert zu einer Konzentration von 5  $\text{mU}/\mu\text{L}$ .
- ❖ Für die Herstellung von „5-fach“-Enzym wurde die 10 U SPD in 400  $\mu\text{L}$  Reinst-Wasser resuspendiert zu einer Konzentration von 25  $\text{mU}/\mu\text{L}$ .
- ❖ Für die Herstellung von „15-fach“-Enzym wurde die 10 U SPD in 133  $\mu\text{L}$  Reinst-Wasser resuspendiert zu einer Konzentration von 75  $\text{mU}/\mu\text{L}$ .

- Herstellung des Enzymmixes

Für die Herstellung des Enzymmixes wurden jeweils 25  $\mu\text{L}$  MN und 25  $\mu\text{L}$  SPD miteinander vermischt. Je nachdem, welche Konzentration von SPD eingesetzt wurde, bekamen die jeweiligen Aliquoten die Bezeichnung „1-fach“; „5-fach“ oder „15-fach“ und wurden bis zu ihrer Verwendung bei  $-25\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

## 5.2 Isolierung von DNA aus Gewebeproben

Die Isolierung der DNA aus dem Gewebe des Marmorkrebses wurde mit dem Qiagen Genomic-tip 20/G und dem Präparations- und Lyse-Protokoll für Gewebeproben der Firma Qiagen durchgeführt. Für die DNA-Isolierung wurden 20 mg Gewebe eingesetzt, die zunächst im Ultraturax homogenisiert wurden und der weitere Isolationsprozess entsprechend dem Protokoll durchgeführt, mit der Ausnahme, dass die isolierte DNA nicht in Puffer sondern in Reinst-Wasser gelöst und bis zur Quantifizierung im Kühlschrank gelagert wurde.

## 5.3 DNA-Quantifizierung

Für die Quantifizierung der DNA in einer 500  $\mu\text{L}$  Quarzküvette wurde diese zunächst über Nacht in 500  $\mu\text{L}$  Reinst-Wasser bei 4  $^{\circ}\text{C}$  im Kühlschrank gelöst und anschließend mit dem UV/VIS-Photometer vermessen. Hierfür wurde ein Transmissionsspektrum von 200 bis 800 nm gegen Wasser als Referenz aufgenommen und aus den Werten bei 260 nm anschließend nach *Lambert-Beer* die DNA-Konzentration [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] berechnet.

Um die Reinheit der DNA bestimmen zu können, wurde das Verhältnis aus der Differenz des Extinktionswertes bei 260 nm und 320 nm zu dem Extinktionwert bei 280 nm ermittelt.

Bei einer DNA-Konzentration von mehr als 25  $\mu\text{g}$  musste eine stärkere Verdünnung vorgenommen werden, da der Präzisionsbereich der Methode zwischen 2,5 $\mu\text{g}$  und 25  $\mu\text{g}$  DNA liegt [292].

## 5.4 Herstellung von Trenn-, Hydrolyse- und Derivatisierungspuffer

- Für die Herstellung des Trennpuffers wurden 13,7 g SDS in 450 mL 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH = 9.0) unter langsamen Rühren gelöst, anschließend 10 % Methanol (50 mL) zugegeben. Nach einer Ruhezeit von etwa 14 Tagen konnte der Trennpuffer für die Analyse in der CE verwendet werden. Für die Herstellung des 20 mM Natriumphosphat-Puffers wurde jeweils ein Puffer aus 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH = 9.3) und 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (pH = 4.0) zu einem pH-Wert von 9.0 vermischt. Dieser als Elektrolytpuffer XI bezeichnete Trennpuffer wurde für alle in dieser Arbeit durchgeführten Messungen verwendet.

- Für die Herstellung des Hydrolysepuffers wurde 1,49 g HEPES mit einer Endkonzentration von 250 mM und 0,34 g  $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$  in 25 mL Reinst-Wasser gelöst, der pH-Wert anschließend auf  $\text{pH} = 6.0$  mit einer 1 M NaOH Lösung eingestellt und bis zur Verwendung im Kühlschrank bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.
- Für die Herstellung des Derivatisierungspuffers wurde zunächst ein HEPES-Puffer mit einer Konzentration von 800 mM hergestellt, anschließend der pH-Wert zwischen 6,45-6,50 mit 1 M NaOH-Lösung eingestellt. Nach einer Verdünnung des HEPES-Puffers mit Reinst-Wasser auf eine Endkonzentration von 50 mM wurde erneut der pH-Wert bestimmt. Dieser sollte zwischen 6,33 und 6,45 liegen. Lag der pH-Wert nach der Verdünnung auf 50 mM nicht im gewünschten Bereich, wurde der pH-Wert der 800 mM HEPES-Lösung so variiert, dass bei einer erneuten Verdünnung der gewünschte pH-Bereich erzielt wurde. Auch dieser Puffer lagerte bis zu seiner Verwendung im Kühlschrank bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$ .

## 5.5 Vorbereitung einer Kapillare

Die verwendeten Kapillaren wurden als Meterware von der Firma CS Chromatographie-Service sowie von der Firma BGB<sup>®</sup> bezogen. Hierbei handelte es sich um unbelegte Fused-Silica-Kapillaren, die von außen mit einer Polyimidschicht überzogen sind und einen ID von  $50\text{ }\mu\text{m}$  sowie einem AD von  $360\text{ }\mu\text{m}$  aufweisen.

### 5.5.1 heat-curing einer Kapillare

Aufgrund dessen, dass die Polyimidschicht der Kapillare innerhalb von ca. 100 Einzelläufen vollständig vom Outlet abgelöst wird, kam es häufig bei weiteren Läufen zu Brüchen der Kapillare in diesem Bereich. Um das Ablösen der Polyimidschicht herauszuzögern, kam eine Methode von Welsch und Baeuml in modifizierter Form zur Anwendung, bei der die Kapillare durch eine Wärmebehandlung stabiler wurde [290].

Hierzu wurde die Kapillare im aufgerollten Zustand in einen Muffelofen gelegt, der ein Temperaturprogramm durchlief. Die Starttemperatur betrug  $30\text{ }^\circ\text{C}$ . Innerhalb von zwei Stunden wurde die Temperatur auf  $300\text{ }^\circ\text{C}$  erhöht und für 24 Stunden gehalten, bevor sie in-

nerhalb von 5 Stunden wieder auf 30 °C zurückging. Nach dieser Prozedur konnte die Kapillare sofort für den Einbau in die CE verwendet werden.

### **5.5.2 Präparation eines Detektorfensters**

Vor der Präparation des Detektorfensters wurde die Kapillare zunächst auf die benötigte Länge von ca. 55 cm zugeschnitten, bevor die Stelle für das Detektionsfenster mit einem Stift markiert und die Polyimidschicht an dieser Stelle mit einem Gasbrenner in einer von Wirtz [64] konstruierten Vorrichtung freigebrannt wurde. Diese Vorrichtung erlaubt es, das Fenster millimetergenau zu platzieren. Vor dem Einbau in die CE-Kartusche wurde die Stelle des Fensters mit Methanol gereinigt, die Kapillare nach erfolgtem Einbau in die Kartusche auf die richtige Länge gekürzt und die Polyimidschicht sowohl am Inlet als auch am Outlet für 1-2 mm ebenfalls mit einem Gasbrenner entfernt.

### **5.5.3 Konditionierung einer Kapillare**

Nach dem Einbau in die CE wurde die Kapillare konditioniert. Alle Spülschritte wurden mit einem Druck von 20 psi durchgeführt: Es wurde 15 min mit 1 M NaOH, 15 min mit 1 M HCl, 15 min mit 1 M NaOH, 5 min mit H<sub>2</sub>O und zum Abschluss noch einmal 10 min mit Elektrolytpuffer gespült. Nach erfolgter Elektrolyt-Injektion (2,5 psi x s) wurde für 30 Minuten eine Spannung von 20 KV bei 20 °C Kartuschen-Temperatur angelegt. Unmittelbar nach dem Anlegen der Spannung wurden von der <sup>32</sup>Karat-Software ein Stromprofil sowie die Basislinie im LIF-Channel aufgezeichnet. Die Basislinie sollte keine Signale enthalten und das Stromprofil über den gesamten Zeitraum stabil sein.

## **5.6 Probenvorbereitung für 1 µg und 10 µg DNA**

Die Probenvorbereitung bestand aus zwei Schritten:

Die Hydrolyse, wodurch mit dem Enzymmix aus MN und SPD die DNA in 2'-Deoxynukleosid-3'-monophosphate zerlegt wurde. Die Derivatisierung der Mononukleotide erfolgte anschließend mit dem Fluoreszenzmarker BODIPY.



### **5.6.1 Hydrolyse von 1 µg bzw. 10 µg DNA**

Die trocken vorliegende DNA wurde in 5 µL Reinst-Wasser gelöst und im Anschluss mit 5 µL Enzymlösung versetzt. Die Enzymlösung bestand aus 1 µL Hydrolysepuffer sowie 5 µL des Enzymmixes aus MN und SPD. Die Konzentration der SPD wurde für die zu hydrolysierende DNA spezifisch ausgewählt (1-fach, 5-fach oder 15-fach). Nach Zugabe des Enzymmixes wurde die Probe gemischt und anschließend kurz zentrifugiert. Die eigentliche Hydrolyse erfolgte bei 37 °C für 3 Stunden im Thermomixer.

### **5.6.2 Derivatisierung der DNA**

Hierbei wurden 1 µg bzw. 10 µg DNA-Proben nach verschiedenen Methoden derivatisiert.

### **5.6.3 Derivatisierung einer 1 µg DNA-Probe**

Unmittelbar nach der Hydrolyse wurden 15 µL Derivatisierungspuffer zu den 10 µL des Hydrolysats gegeben. Anschließend wurden 15 µL einer 27 mM BODIPY-Lösung und 15 µL einer 1800 mM EDC-Lösung (beide in Derivatisierungspuffer gelöst) hinzugefügt. Nach kurzem Vortexen und Zentrifugieren erfolgte die Derivatisierung bei 25 °C für 21 Stunden im Thermomixer.

### **5.6.4 Derivatisierung einer 10 µg DNA-Probe**

Die Derivatisierung erfolgte entsprechend der 1 µg-Probe, jedoch wurde hierbei jeweils 25 % der identischen Lösungen mehr zugesetzt.

### **5.6.5 Lagerung der derivatisierten Proben**

Aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit der Proben wurden diese unmittelbar nach der Derivatisierung aliquotiert (5,5 µL) und bei -25 °C eingefroren. Dies ermöglichte es für die Analyse, nur ein Aliquot aufzutauen, während die anderen weiter bei -25 °C gelagert wurden.

## **5.7 Entfernung des Überschusses an BODIPY und EDC nach der Derivatisierung**

Um eine größere Probenstabilität nach erfolgter Derivatisierung zu erhalten, konnte der Überschuss an Fluoreszenzmarker und Kopplungsreagenz entfernt werden, wodurch die Bildung von störenden Abbauprodukten stark verzögert wurde.

### **5.7.1 Fällung einer 1 µg DNA-Probe**

Die komplette Probe wurde nach der Derivatisierung (55 µL) in ein 15 mL-Zentrifugen-Cup überführt und mit 425 µL Reinst-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 480 µL aufgefüllt. Zu dieser verdünnten Probe wurden im Anschluss 550 µL des Fällungsreagenzes (52,5 mM Natriumtetraphenylborat in 1 mM Natriumphosphat-Puffer, pH = 6.0) pipettiert. Nach kurzem Vortexen wurden die Proben mit 11 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> versetzt und gut geschüttelt, um den Niederschlag zu lösen. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt für eine bessere Phasentrennung für 4 min bei 3000 rpm und 20 °C. Die wässrige Phase wurde im Anschluss von der CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Phase getrennt, in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand der Probe wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und konnte im Anschluss bis zur Analyse bei -25 °C gelagert werden. (Die Probenaufbreitung einer 1 µg und 10 µg Probe mit anschließender Fällung befindet sich im Anhang als Gesamtübersicht)

### **5.7.2 Fällung einer 10 µg DNA-Probe**

Der Ablauf der Fällung einer 10 µg DNA Probe entspricht der einer 1 µg Probe, jedoch sind die eingesetzten Volumina größer.

Die komplette Probe wird nach der Derivatisierung (70 µL) in ein 50 mL-Zentrifugen-Cup überführt und mit 630 µL Reinst-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 770 µL aufgefüllt. Zu dieser verdünnten Probe wurden im Anschluss 770 µL des Fällungsreagenzes (52,5 mM Natriumtetraphenylborat in 1 mM Natriumphosphat-Puffer, pH = 6.0) pipettiert. Nach kurzem Vortexen wurden die Proben mit 15 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> versetzt und gut geschüttelt, um den Niederschlag zu lösen. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt für eine bessere Phasentrennung für 4 min bei 3000 rpm und 20 °C. Die wässrige Phase wurde im Anschluss von der

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Phase getrennt, in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand der Probe wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und konnte im Anschluss bis zur Analyse bei -25 °C gelagert werden.

### 5.7.3 Lagerung der gefällten Proben

Aufgrund der wesentlich höheren Stabilität der Proben ohne den Überschuss an BODIPY und EDC ist ein Aliquotieren der Proben für die Lagerung bei -25 °C nicht mehr erforderlich.

## 5.8 Bestimmung der Korrekturfaktoren

Für die Auswertung der Elektropherogramme mussten im Vorfeld die Korrekturfaktoren für 1 µg und 10 µg DNA-Proben, die ohne Überschuss an EDC und BODIPY bestimmt werden. Ebenfalls mussten die Korrekturfaktoren für 10 µg DNA einer nicht gefällten Probe bestimmt werden.

### 5.8.1 Präparation der Lambda-DNA

Für die Analyse der Lambda-DNA ( $\lambda$ ) musste die vollständig unmethylierte DNA durch das Enzym *Hpa II* Methylase zunächst vollständig methyliert werden. Hierfür wurde jeweils ein 10 µg-Aliquot der  $\lambda$ -DNA für 2 Stunden bei 37 °C im Thermomixer inkubiert. Der Reaktionsansatz bestand aus 10 µg  $\lambda$ -DNA, 50 Units des Enzyms *Hpa II* Methylase, SAM als Methylgruppendonor, NE-Puffer 1 (10 mM Bis-Tris-Propane-HCL, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Dithiothreitol, pH7) sowie Reinst-Wasser. Nach 2 Stunden wurde die enzymatische Reaktion innerhalb von 15 min bei 65 °C gestoppt und anschließend die DNA mit dem Qiagen-QIAamp DNA Mini Kit aufgereinigt und in 200 µL Reinst-Wasser eluiert. Die Trocknung erfolgte in die Speed-Vac. Die DNA-Proben konnten bis zur Probenaufbereitung bei -25 °C gelagert werden.

### 5.8.2 Restriktionsverdau der Lambda-DNA

Um die oben beschriebene enzymatische Methylierung der  $\lambda$ -DNA auf ihre Vollständigkeit hin zu überprüfen, wurde ein Restriktionsverdau mit dem Enzym *Hpa II* durchgeführt. 1,5 µg

methylierte  $\lambda$ -DNA bzw. nicht methylierte  $\lambda$ -DNA als Kontrolle wurden in einem Restriktionsverdau durch 20 Units des Restriktionsenzym *Hpa II*, NE-Puffer 1 sowie Reinst-Wasser für 1 Stunde bei 37 °C im Thermomixer verdaut.

Anschließend wurden der Verdau der methylierten und nicht methylierten  $\lambda$ -DNA auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Hierfür wurde der gesamte Verdau auf ein Agarosegel mit 1:20000 Ethidiumbromid (EtBr) aufgetragen, welches in Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) lag. Dem TAE-Puffer wurde vor der Trennung noch 5  $\mu$ L EtBr zugemischt. EtBr setzte sich während der Analyse zwischen die DNA-Doppelhelix und ermöglicht so eine UV-Detektion der DNA [293 - 295].

Bei einer vollständigen Methylierung der  $\lambda$ -DNA war nur eine Bande auf dem Gel zu erkennen. Bei der nicht methylierten  $\lambda$ -DNA sind es viele Banden bzw. DNA-Fragmente. Dies liegt daran, dass das Restriktionsenzym *Hpa II* nur an spezifischen, nicht methylierten Sequenzabschnitten schneiden kann und somit ein sicherer Nachweis für eine vollständige Methylierung der  $\lambda$ -DNA darstellt.

## 5.9 Durchführung einer kapillarelektrophoretischen Messung

Vor Beginn der Probenanalyse wurde ein Anfangslauf durchgeführt, bei dem 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 statt einer Probe nur Elektrolyt (0,5 psi, 5 sec) injiziert wurde. Anschließend wurde für 50 min eine Spannung von 20 KV angelegt, während das Stromprofil und die Basislinie aufgezeichnet wurden.

Die eigentlichen Analysen liefen nach dem gleichen Muster ab, jedoch wurde nach den Spülschritten nicht der Elektrolyt, sondern die eigentliche Probe injiziert und mit einer Spannung von 18 bzw. 20 KV für 40 min getrennt.

Alle Proben für die Analyse wurden zuvor mit Wasser verdünnt und anschließend mit Paraffinöl überschichtet. Die nicht gefällten Proben wurde in 2 mL-Glasvails 1:200 mit Wasser verdünnt und analysiert. Die gefällten Proben wurde 1:50 bis 1:200 mit Wasser verdünnt. Die verdünnte Probe wurde in PCR-Vails (250  $\mu$ L Volumen) ebenfalls mit Paraffinöl überschichtet und mit der CE-LIF analysiert. In der Tabelle 4 sind die Parameter für die Analyse von 1  $\mu$ g bzw. 10  $\mu$ g DNA-Proben dargestellt.

Am Ende eines jeden Arbeitstages wurde die Kapillare mit Wasser (3 min, 50 psi) gespült und über Nacht mit beiden Kapillarenden in Wasser gelagert.

	<b>gefällt</b>	<b>gefällt</b>	<b>ungefällt</b>
<b>Probe</b>	<b>1 µg</b>	<b>10 µg</b>	<b>10 µg</b>
<b>Verdünnung</b>	<b>1:100</b>	<b>1:200</b>	<b>1:200</b>
	<b>1:50</b>	<b>1:100</b>	
<b>Injektion</b>	<b>0,5 psi, 5 s</b>	<b>0,5 psi, 5 s</b>	<b>0,5 psi, 5 s</b>
<b>Injektionsvolumen</b>	<b>5,6 nL</b>	<b>5,6 nL</b>	<b>5,6 nL</b>
<b>Kartuschentemperatur</b>	<b>20 °C</b>	<b>20 °C</b>	<b>20 °C</b>
<b>Probenkammertemperatur</b>	<b>25 °C</b>	<b>25 °C</b>	<b>25 °C</b>
<b>Spannung</b>	<b>18 bzw. 20 KV</b>	<b>18 bzw. 20 KV</b>	<b>18 bzw. 20 KV</b>
<b>Analysezeit</b>	<b>30 bis 40 min</b>	<b>30 bis 40 min</b>	<b>30 bis 40 min</b>

**Tabelle 4:** Trennparameter der verwendeten Methoden zur Analyse von 1 µg bzw. 10 µg DNA-Proben.

## 5.10 Methoden für die Zellkulturversuche im DKFZ

Vier verschiedene Kanzerogene wurden mit V79-Zellen inkubiert, die verschiedene humane fremdstoffmetabolisierende Enzyme exprimieren.

### 5.10.1 Verwendete Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden eingesetzt:

V79MZ, V791A1, V791A2 sowie V79NH

### 5.10.2 Kultivierung von V79-Zellen

Die V79-Zellen wurden bei 37 °C und bei 5 % CO<sub>2</sub> in sterilen Zellkulturgefäßen oder 96Well- Mikrotiterplatten in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-Kulturmedium) mit erhöhtem Glukosegehalt (4,5 g/L) und Natriumhydrogencarbonat (3,7 g/L) kultiviert. Zusätzlich wurde das DMEM-Kulturmedium mit 1 mM Natriumpyruvat, 4 mM L-Glutamin, 5 % fetal calf serum (FCS), 25 mM HEPES sowie 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin vervollständigt (Komplettmedium).

### **5.10.3 Ablösen von V79-Zellen mittels Trypsin / EDTA**

Für das Ablösen der V79-Zellen vom Boden der Kulturflasche wurde zunächst das Nährmedium komplett abpipettiert, die Zellen mit 10 mL PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 2 mL 0,05 % Trypsin und 0,02 % EDTA in Phosphate buffered saline (PBS) vollständig benetzt, und die Trypsin-EDTA-Lösung sofort wieder abgezogen. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten im Brutschrank bei 37 °C konnten die Zellen durch leichtes Schlagen gegen die Flasche vom Boden gelöst werden. Anschließend wurden die Zellen in 10 mL frischem Kompletmedium aufgenommen.

### **5.10.4 Passagieren von V79-Zellen**

Um die Konfluenz der Zellen stets unter 100 % zu halten, mussten diese regelmäßig passagiert werden. Dazu wurden die Zellen nach ihrer Trypsinierung ausgezählt und auf neue Kulturflaschen verteilt. Überzählige Zellen wurden verworfen.

### **5.10.5 Bestimmung der Zellzahl**

Für das Auszählen der Zellen wurde ein Lichtmikroskop sowie eine so genannte Neubauer-Zählkammer, die 4 Kästchen mit einer Größe von 1 mm<sup>2</sup> und einer Tiefe von 0,1 mm besitzt, verwendet. Hierdurch beträgt das Volumen in diesen Kästchen 0,1 mm<sup>3</sup> welches genau einem µL entspricht. Zellen wurden mit Trypanblau angefärbt, einem Farbstoff, der Zellkerne von Zellen mit nicht mehr intakter Zellmembran blau färbt. Somit können die Anzahl lebender (weißer) Zellen und die der toten (blauen) bestimmt werden und über das Volumen und die Verdünnung die Zellzahl pro mL berechnet werden.

### **5.10.6 Einfrieren von V79-Zellen**

Nachdem die Anzahl der trypsinierten Zellen bestimmt wurde, wurden diese 10 min bei 120 g bei RT pelletiert. Das Zellpellet wurde anschließend mit eiskaltem Kompletmedium mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in einer Dichte von 10<sup>7</sup> Zellen/mL suspendiert. Anschließend wurden die Zellen zu je 1 mL in Kryoröhrchen aliquotiert und sofort in ein Isopropanol-Gefrierfaß bei

-80 °C gestellt. Nach 24 Stunden konnten die eingefrorenen Zellen bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

### **5.10.7 Auftauen von V79-Zellen**

Die gefrorenen Zell-Aliquots wurden schnell bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, in ein Zentrifugenröhrchen mit 9 mL Komplettmedium überführt und 8 min mit 120 g bei RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 mL Komplettmedium resuspendiert, die Zellzahl und deren Vitalität wie oben beschrieben bestimmt (mind 80 % lebende Zellen) und anschließend in eine Kulturflasche mit weiteren 15 mL Komplettmedium überführt. Nach ca. 4 Stunden wurde überprüft ob sich die Zellen angeheftet hatten und die Morphologie der Zellen kontrolliert.

### **5.10.8 Toxizitätstest**

Bevor die Zelllinien mit den Kanzerogenen inkubiert werden konnten, musste in einem Vorversuch die maximal verträgliche Dosis an Kanzerogenen ermittelt werden, da für die spätere Analyse nur lebende Zellen verwendet werden sollten. Für die Bestimmung der Cytotoxizität in der vorliegenden Arbeit wurden jeweils 3000 V79-Zellen pro Well einer 96-Loch-Mikrotiterplatte in 100 µL DMEM-Komplettmedium ausgesät und für 24 Stunden in den Brutschrank gestellt. Anschließend wurden jeweils 100 µL Komplettmedium mit den in DMSO gelösten Kanzerogenen nach einem Bestückungsplan (siehe Anhang Abbildung 60) zugegeben. Die Zellen der Negativkontrolle wurden ausschließlich mit der maximal eingesetzten Konzentration von DMSO (0,04 %) inkubiert.

Für den gesamten Toxizitäts-Versuch wurden insgesamt 8 Mikrotiterplatten nach demselben Schema angesetzt, wobei die Inkubationszeit der jeweiligen Platten unterschiedlich war. Die ersten beiden Platten wurden unmittelbar nach Zugabe der Kanzerogenen zum Zeitpunkt Null als Kontrolle verwendet. Die übrigen wurden nach 24, 48 und 72 Stunden Inkubation bei 37 °C im Brutschrank entnommen und im Anschluss ein Sulforhodamin-B-Assay (SRB-Assay) durchgeführt.

### **5.10.9 SRB-Assay**

Sulforhodamin-B (SRB) bindet unter sauren Bedingungen an Proteine und lässt sich basisch abspalten, sodass eine photometrische Bestimmung möglich ist. Da nur adhärente Zellen fixiert werden, liefert der Test ein direktes Mass für lebende, adhärente Zellen.

Hierfür wurde das Medium aus den Mikrotiterplatten vollständig entfernt und die Zellen mit 100  $\mu\text{L}$  Fixierlösung für 5 min bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Im Anschluss wurde die Fixierlösung verworfen und die Mikrotiterplatte fünfmal mit Leitungswasser gespült und danach für 30 min im Abzug getrocknet. Nach dem vollständigen Trocknen wurden die fixierten Zellen mit

100  $\mu\text{L}$  SRB-Lösung für 30 min unter Lichtausschluss bei RT gefärbt. Die SRB-Lösung wurde abpipettiert und die Zellen ca. fünfmal mit 100  $\mu\text{L}$  0,1 % Essigsäure gespült, bis die Lösung klar blieb. Dann wurden die Zellen erneut für 30 min unter dem Abzug getrocknet. Das SRB wurden nun mit 100  $\mu\text{L}$  Tris für 5 min auf einem Schüttler bei  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  von den Zellen gelöst und im Anschluss zweimal photometrisch (546 nm und 561 nm) vermessen. Die Absorptionswerte gaben Aufschluss darüber, wie viele Zellen die jeweilig eingesetzten Kanzerogen-Konzentrationen überleben konnten.

### **5.10.10 Inkubation der V79MZ-Zellen mit den PAK`s**

Für jede Konzentration wurden  $4,5 \times 10^6$  Zellen pro Kulturflasche ausgesät und für 24 Stunden in den Brutschrank gestellt. Am nächsten Tag wurde zu jeder Kulturflasche 1 mL Kompletmedium mit den verschiedenen PAK`s in zwei unterschiedlichen Konzentrationen gegeben. Den Kontrollen wurde nur Medium mit entsprechender Konzentration an DMSO zugesetzt. Nach einer Inkubation von 48 Stunden wurden die Zellen geerntet.

### **5.10.11 Ernte der V79MZ-Zellen**

Für die Ernte der Zellen wurden diese wie unter 5.10.4 und 5.10.5 beschrieben gelöst und die Zellzahl bestimmt. Die in 10 mL Medium gelösten Zellen wurden in ein 50 mL Falcon-Zentrifugenröhrchen überführt und die Kulturflasche nochmals mit 2 mL nachgespült und ins selbe Röhrchen überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt, bei dem die Zellen in 10 min bei 800 rpm bzw. 120 g bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  pelletiert wurden. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 5 mL PBS resuspendiert und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert und der Vorgang anschließend nochmals wiederholt. Zum Schluss wurde das Zellpellet in einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen/mL PBS aufgenommen und die DNA nach dem Lyse-Protokoll für Zellkultur von Qiagen isoliert.



### 5.10.12 Enzymaktivitätsbestimmung

Der Enzymaktivitätstest mit 3-Cyano-7-Ethoxycoumarin (3-C-7-EC) wurde mit 4 verschiedenen Zelldichten in 96-Well Platten durchgeführt ( $1 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$  und  $10 \times 10^4$  Zellen/Well) und für jede Zelllinie und Zellzahl 4 Wells angesetzt. Die gewünschte Zellzahl wurde ins Well pipettiert.  $10 \mu\text{M}$  des Substrat 3C-7-EC wurde kurz vor Zugabe aus einer  $10 \text{ mM}$  ethanolischen Lösung in PBS verdünnt und  $100 \mu\text{l}$  zu jedem Well pipettiert. Die Endkonzentration von 3-C-7-EC betrug  $5 \mu\text{M}$ . Die Bildung von 3-Cyano-7-hydroxycoumarin wurde direkt nach Zugabe von 3-C-7-EC über eine Dauer von 45 Minuten im Fluorimeter vermessen. Die Anregungswellenlänge betrug  $408 \text{ nm}$  und die Emissionswellenlänge  $450 \text{ nm}$ . Der lineare Anstieg der Fluoreszenz ist ein Mass für die Enzymaktivität ( $\Delta\text{Fluoreszenz}/\Delta t$ ) [247 - 250].

## 5.11 Präparation der Mäuseblutproben

Für die Präparation der Mäuseblutproben wurden diese von  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  auf Raumtemperatur erwärmt,  $15 \text{ mL}$  des internen Standards (B[e]P  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) hinzugefügt und für  $15 \text{ s}$  gevortext. Anschließend wurden die Blutproben mit  $100 \mu\text{L}$  Ethylacetat /Aceton (2:1, v:v) versetzt, für  $30 \text{ s}$  gevortext und im Anschluss eine Minute lang bei  $13,5 \text{ rpm}$  zentrifugiert. Der klare Überstand wurde mit einer Pipette in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Extraktionsschritt wurde insgesamt dreimal wiederholt. Der ca.  $300 \mu\text{L}$  Überstand wurde mit der Speed-Vac in zwei Stunden getrocknet. Vor der Analyse der Probe wurde diese in  $150 \mu\text{L}$  ACN für  $5 \text{ min}$  im Ultraschallbad resuspendiert.

### 5.11.1 Detektion von Benzo[a]pyren im Blut mittel HPLC-LIF

Jede Probe wurde dreimal mit der HPLC analysiert im direkten Wechsel (mit der entsprechenden Kontrolle). Die Analysezeit der Proben lag bei  $20 \text{ min}$ , das Injektions-Volumen betrug  $20 \mu\text{L}$ . Als mobile Phase wurde eine Mischung aus ACN und Wasser (85:15, v:v) bei einer Flussrate von  $1 \text{ mL}/\text{min}$  eingesetzt. Die Detektion erfolgte bei einer Extinktions- und Emissionswellenlänge von  $294$  bzw.  $404 \text{ nm}$ .

## 5.12 Geräte und Materialien

### *Kapillarelektrophoretische Trennungen mit dem CE-LIF-System*

Alle elektrophoretischen Bestimmungen wurden mittels MEKC-LIF Methode durchgeführt.

- *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)
  - Argon-Ionen-Laser mit  $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$  [Leistung = 50 mW output], Spectra-Physics, (USA)
  - Sapphire Festkörper-Laser  $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$  [Leistung = 10 mW output], Coherent (Dieburg)
  
- *Kapillaren*
  - Unbelegte Fused-Silica-Kapillaren Innendurchmesser 50  $\mu\text{m}$ , CS-Chromatographie-Service, (Langerwehe)
  - Unbelegte Fused-silica Kapillaren Innendurchmesser 50  $\mu\text{m}$ , BGB-Analytik (Schloßböckelheim)
  
- *Auswertungssoftware*
  - <sup>32</sup>Karat™ Version 7.0 (2003), Beckmann Coulter (Krefeld)

### *Probenaufbereitung für kapillarelektrophoretische Trennungen*

- *Messgefäße für die Analyse*
  - 2 mL Glasvails, Beckmann Coulter (Krefeld)
  - 0,2 mL PCR-Vails, Neolab (Heidelberg)
  - Gummistopfen REV AA und REV AB, Beckman Coulter (Krefeld)

➤ *Zentrifugen*

- Mini-Spin-Tischzentrifuge (max. 13400 U/min), Eppendorf (Hamburg)
- Allegra™ 25R Zentrifuge, Beckman Coulter (Krefeld)

➤ *Hydrolyse und Derivatisierung*

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

➤ *DNA Isolations-Kits*

- Qiagen® Genomic-tip 20/G und 100/G, Qiagen GmbH (Hilden)
- QIAamp® DNA Mini Kit, Qiagen GmbH (Hilden)
- Blood & Cell Culture DNA Midi Kit, Qiagen GmbH (Hilden)
- DNeasy® Tissue Kit, Qiagen GmbH (Hilden)

➤ *DNA Trocknung*

Speed-Vac

- Jouan RC 1022, Jouan (Saint Herblain, Frankreich)
- Kryostat RCT 90, Jouan (Saint Herblain, Frankreich)
- Drehschieberpumpe Pascal 2005 SD (Saugvermögen = 5 m<sup>3</sup>/h, 2-stufig), Alcatel Vacuum Technology, (Annecy Cedex, Frankreich)
- Ölabscheider OME 25 S, Alcatel Vacuum Technology (Annecy Cedex, Frankreich)

➤ *DNA-Quantifizierung*

- Lambda 40 UV/VIS-Photometer, Perkin Elmer Instruments (Rodgau-Jügesheim)
- Specord® 205 UV/VIS, Analytik Jena (Jena)
- 0,5 cm Quarz Küvetten, Hellma (Mühlheim)

➤ *Reinstwassergewinnung*

- Milli-Q Synthesis A 10, Millipore (Eschborn)
- GenPure, TKA (Niederrelbert)

### ***Hochleistungsflüssigchromatographische Trennungen mit dem HPLC-System***

➤ *Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)*

- Detector F1080 Fluorescence, Merck Hitachi (Darmstadt)
- Autosampler AS 2000 A, Merck Hitachi (Darmstadt)
- Interface D-6000 A, Merck Hitachi (Darmstadt)
- Intelligent Pump L 6200 A, Merck Hitachi (Darmstadt)

➤ *HPLC Säule*

- Column LiChroCART 250-4 RP-18 (5 µm), Merck (Darmstadt)

➤ *Auswertungssoftware*

Merck-Hitachi Model D-7000 Chromatography Data Station Software HPLC System Manager, in Cooperation with Merck KGaA, (Darmstadt) and Hitachi Instruments, INC, (San Jose), Copyright© Hitachi, Ltd. 1994-2000 Version 4.0.

### ***Zellkulturexperiment im DKFZ Heidelberg***

➤ *Brutschränke*

- Inkubator Jouan, Jouan (Saint Herblain, Frankreich)
- Inkubator HERA cell, Forma Scientific

➤ *Sterilbänke*

- Zellkultur-Sterilbank, Heraeus Instrument (Hanau)
- Zellkultur-Sterilbank HS 12/2, Heraeus Instrument (Hanau)

➤ *Pipetten / Pipettierhilfen*

- 8-Kanal-Pipette, 30-300 µL, Eppendorf (Hamburg)
- Pipetten Eppendorf Research: Modelle: 0,5-10 µL; 10-100 µL; 20-200µL; 100-1000 µL, Eppendorf (Hamburg)

- Pipettus-Akku, pipetboy accu, elektrische Pipettierhilfe für serologische Messpipetten, Eppendorf (Hamburg)
- *Bestimmung der Zellzahl*
  - Lichtmikroskop Olympus BH-2, Olympus (Japan)
  - Zählkammer nach Neubauer, Brand (Wertheim)
- *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)
  - Tranferpetten<sup>®</sup> [100-1000 µL, 10-100 µL, 1-10 µL, 0,1-1 µL], Brand (Wertheim)
  - Glasspritze Luer Lock [5 mL, 20 mL], Fortuna<sup>®</sup>, 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<sup>™</sup> Concentrator [7 mL/9 kD], Perbio Science (Deutschland)
  - Gefrierschrank: Liebherr Comfort G 2711, Liebherr (Ochsenhausen)
  - Kühlschranks: Liebherr Premium K 2650, Liebherr (Ochsenhausen)
  - Ultraschallbad: Merck eurolab USR 30 H, Merck eurolab N.V. (Belgien)
  - Ultraschallbad: Heidolph (Schwabach)
  - Trockenschrank: Memmert Modell 100, Memmert (Schwabach)
  - Trockenschrank: T 6 [1,22 kW], Heraeus (Hanau)
  - IKA Heizrührer RTCbasic, Janke & Kunke (Staufen)
  - mini MR Standard, IKA-Labortechnik (Staufen)
  - Gasbrenner: MICROFLAM-Brenner MFB/E, PROXXON (Niersbach)
  - ULTRA TURRAX T18 basic, IKA<sup>®</sup> works (New York, USA)
  - Überkopfschüttler REAX 2, Heidolph (Schwabach)
  - Minifuge RF, Heraeus Instruments (Hanau)

- Zentrifuge Sorvall Super T21, Kendro (Langenselbold)
- Einfrierbehälter, Cryo 1C Freezing Container, -1 °C/min, Nalgene (Wiesbaden)
- Gelelektrophorese-Apparatur; BioRad MINI-SUB<sup>®</sup> Cell GT (München)
- Imaging-System; E.A.S.Y 429K Kamera, E.A.S.Y RH-3 Dunkelhaube; Software E.A.S.Y Win32, Herolab Wiesloch,

***DNA bzw. Gewebeproben wurden von folgenden Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt:***

- *Dr. Eva Frei und PD Dr. Heinz H. Schmeiser*; Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ); Abteilung Molekulare Toxikologie; in Heidelberg. (DNA-Proben von V79MZ-Zelllinien)
- *Dr. Volker M. Arlt*; Institute of Cancer Research, Section of Molecular Carcinogenesis; London; United Kingdom. (DNA-Proben von Ratten und Blut-Proben von Mäusen)
- *PD Dr. Günter Vogt*; Ernst Moritz Arndt Universität Greifswald, Institut Zoologie, Greifswald. (Gewebe Proben von Marmorkrebsen)
- *Prof. Karl Skorecki* vom Technion Israel institute of Technology und *Dr. Liran Shlush* vom Israel Medical Institute (INMI), Medical Corps, Haifa, Israel Defense Forces (IDF) (DNA-Proben von Kampftauchern und Elitesoldaten)
- *Prof. Stephan Störkel*; Institut für Pathologie, Universität Witten/Herdecke, Wuppertal. (DNA fixierter Gewebeproben von Nieren und Blasen)

### **5.13 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
3-Nitrobenzanthron	DKFZ Heidelberg
4-Aminobiphenyl 98,7 %	Fa. Sigma, Steinheim

---

4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza- <i>s</i> -indacen-3-propionylethylendiamin-hydrochlorid, <i>BODIPY</i> <sup>®</sup> <i>FL EDA</i>	Fa. Molekular Probes / Fa. Invitrogen, USA
7H-Benzo[ <i>c</i> ]fluorene 98,2 %	Fa. Dr. Ehrendorfer GmbH, Augsburg
Aceton, <i>p. A.</i>	Fa. Merck, Darmstadt/ Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Acetonitril, <i>Far UV</i> , HPLC Qualität	Fa. Fisher Scientific, UK
Agarose, <i>p.A.</i>	Fa. Sigma, Steinheim
Benzo[ <i>a</i> ]pyrene 98 %	Fa. Sigma, Steinheim
Benzo[ <i>e</i> ]pyren 99,5 %	Fa. Dr. Ehrendorfer GmbH, Augsburg
BSA, <i>bovine serum albumin</i>	Fa. New England Biolabs, Frankfurt am Main
Calciumchlorid-Dihydrat, <i>Ph Eur</i>	Fa. Merck, Darmstadt
Desoxyribose 5'-monophosphat	Fa. Sigma, Steinheim
Dichlormethan, HPLC Qualität	Fa. Acros Organics, Geel (Belgien)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fa. Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat, <i>Ph Eur</i>	Fa. Merck, Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Fa. Biochrom
Essigsäure, HPLC Qualität	Fa. Fluka, Neu-Ulm
Ethanol 96 %	Fa. Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Fa. Merck, Darmstadt
Ethylacetat, HPLC Qualität	Fa. Fisher Scientific, UK
FCS, <i>fœtal calf serum</i>	Fa. Gibco Invitrogen, USA
Fluorescein, Testmix	Fa. Beckman Coulter <sup>™</sup> , Krefeld
Glucose-6-Phosphat	Fa. Applichem, Darmstadt
Hexan, <i>HPLC-Qualität 95 %</i>	Fa. sds, Frankreich
<i>HpaII</i> -Methylase	Fa. New England Biolabs, Frankfurt am Main

<i>HpaII</i>	Fa. New England Biolabs, Frankfurt am Main
Isopropanol, 1-Propanol	Fa. Merck, Darmstadt
Kalbsthymus-DNA	Fa. Sigma, Steinheim
L-Glutamin, 200 MM (100x)	Fa. Gibco Invitrogen, USA
Lambda-DNA	Fa. New England Biolabs, Frankfurt am Main
MES	Fa. Sigma, Steinheim
Methanol, HPLC Qualität	Fa. Acros Organics, Geel (Belgien)
Mikrokokkennuklease ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	Fa. Sigma, Steinheim
Milz-Phosphodiesterase ( <i>Kalb</i> )	Fa. Calbiochem, USA
Milz-Phosphodiesterase ( <i>Rind</i> )	Fa. Sigma, Steinheim
Milz-Phosphodiesterase ( <i>Rind</i> )	Fa. Worthington, England
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
Natriumdodecylsulfat, <i>p.A</i>	Fa. Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid, <i>p. A.</i>	Fa. Merck, Darmstadt
Natrium-Pyruvat	Fa. Applichem, Darmstadt
Natriumtetraphenylborat, zur Analyse	Fa. Merck, Darmstadt
NE-Buffer 1	Fa. New England Biolabs, Frankfurt am Main
NE-Buffer für die Methylase	Fa. New England Biolabs, Frankfurt am Main
Paraffinöl, für IR-Spektroskopie	Fa. Fluka, Neu-Ulm
PBS, <i>phosphate buffered saline, steril</i>	Fa. Gibco Invitrogen, USA
Penicillin/Streptomycin, 10.000 units/mL	Fa. Gibco Invitrogen, USA
Proteinase K	Fa. Qiagen GmbH, Hilden
RNase A 100mg/ml	Fa. Qiagen GmbH, Hilden
S-Adenosylmethionin	Fa. New England Biolabs, Frankfurt am Main



Salzsäure, 37 %	Fa. Merck, Darmstadt
SRB-Lösung	Fa. Sigma, Steinheim
TAE-Puffer, <i>Tris-Acetat-EDTA-Puffer</i>	Fa. Merck, Darmstadt
Reinst-Wasser	Analytische Chemie der BU Wuppertal
Trypanblau; 0,4 % in 85 % NaCl	Fa. Gibco Invitrogen, USA
Trypsin/EDTA Lösung	Fa. PAA Laboratories GmbH, Pasching

## 6 Anhang

### Dokumentation

#### Hydrolyse und Derivatisierung von DNA-Proben

Datum: 27.06.07

Operator(en) (Name/Kürzel): Thiemann / M.T.

Probe(n)-Kürzel: 7, 20, 29, 34, 38, 43, 52, 58, CT-3

Beschreibung:

Proben: 7, 20, 29, 34, 38, 43, 52, und 58

1 µg Kampftaucher DNA => Hydrolyse mit 5fachem Enzym

Probe: CT-3

1µg CT-DNA => Hydrolyse mit 5fachem Enzym

#### 1. Hydrolyse

Hydrolysemethode: I

Verwendete DNA vom:05.03.07 / 07.12.06

Menge: 1µg

Bemerkungen:

keine

Präparation der DNA durch (Operator): Israel / M.T.

Enzymmischung MN/SPD (150mU/ml MN, 2,5U/ml SPD):

Datum der Präparation: 21.11.06 / 23.05.07

Operator: M.T.

Datum der ersten Verwendung (erstes Auftauen des jeweiligen Aliquots): 27.06.07  
Hydrolysepuffer (250mM HEPES, 100mM CaCl<sub>2</sub>, pH6.0):

Bezeichnung: H250II H MT1 vom (Datum): 19.03.07

Operator: M.T.

zurHerstellung verwendetes Wasser vom: 14.03.07 Charge: C-07.01

Wurde der Hydrolysepuffer vor der Hydrolyse auf R.T. erwärmt? ja

Verwendetes Wasser zur DNA-Aufnahme (Tridest.):

Hergestellt durch Aufarbeitung von VE-Wasser mittels einer Wasseraufbereitungsanlage der Fa. Millipore

Gerätebezeichnung und technische Daten:

Milli-Q SYNTHESIS A-10 <input checked="" type="checkbox"/>	Milli-Q-Anlage LM <input type="checkbox"/>
Charge: E-07-03	

**Information zur Wasserqualität siehe Wasser-Entnahme-Dokumentation**

Hydrolysebedingungen:

Temperatur: 37 °C

Exakte Hydrolysedauer: 3 Std.

h x v: ja  nein

**2.Derivatisierung:**

Derivatisierungsmethode: DVI MT

Derivatisierungspuffer:

Bezeichnung: DMT2 Zusammensetzung: 50 mM HEPES pH 6,38

Vom (Datum): 19.03.07 Operator: M.T.

Zur Herstellung verwendetes Wasser vom: 14.03.07 Charge: C07-01

Wurde der Derivatisierungspuffer vor der Derivatisierung auf R.T. erwärmt? ja

**BODIPY und EDC:**

e(BODIPY)= 1,51 mg + 151 µL Derivatisierungspuffer

Lot & Filling code (Hersteller): Lot. 21724W

1.Öffnung der verwendeten Abfüllung am: 21.06.07

Bemerkung:

e (EDC)= 54 mg + 154 µL Derivatisierungspuffer

Lot & Filling code (Hersteller): 1139198 / 1250106

Interne Chargen/ Abfüllungsbezeichnung: 291105 / 008 M.T.

1.Öffnung der verwendeten Abfüllung am: 04.06.07

Erfolgte nach Abwiegen eine Bestückung?      Ja       nein

**Derivatisierungsbedingungen:**

Temperatur: 25 °C

Derivatisierungsdauer: 21 Std.

Reaktionsvolumen [µL]: 55 µL

h x v:      ja       nein

**Sonstiges:**

**Verwendete Pipetten (Transferpetten®, Fa. Brand):**

Welche Pipette(n) wurden zur Hydrolyse verwendet?

- Herstellung der Enzymlösung:      10-100µL (gelb)       0,5-10µL (grau)

-DNA-Aufnahme und Enzymzusatz:      10-100µL (gelb)       0,5-10µL (grau)

Welche Pipette(n) wurden zur Derivatisierung verwendet?

- Hepes-Zugabe zum Hydrolysat: 10-100 $\mu$ L (gelb)  0,5-10 $\mu$ L (grau)

-Herstellung BODIPY-Lsg.: 10-100 $\mu$ L (gelb)  0,5-10 $\mu$ L (grau)

-Herstellung EDC-Lsg.: 10-100 $\mu$ L (gelb)  0,5-10 $\mu$ L (grau)

Letzte Kalibrierung der Pipetten ist erfolgt am: Juni `06

Weiterverarbeitung der derivatisierten Probe(n):

1. Aliquotierung:

nein

2. Lagerung ( Temp./Fach/Standort): -25 °C / 4 / H.11.16

Abschließende Bemerkung:

Nach dem fällen mit TPB sind alle Proben leicht milchig trüb gewesen => Zentrifugation für 10min => alle Proben klar

Datum: 28.06.07

Unterschrift des Operators:

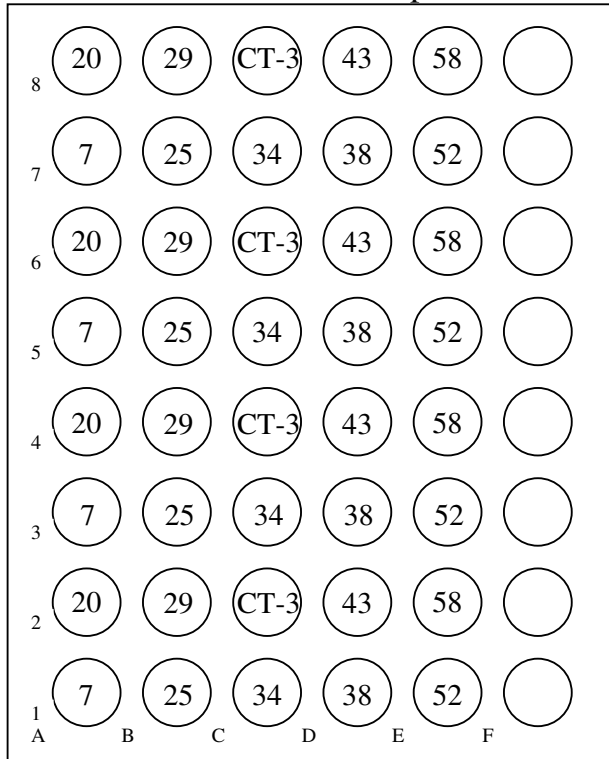
Dokumentationsbogen zur Probenaufbereitung der Kampftaucher-DNA, der für jede Hydrolyse und Derivatisierung einer Probe ausgefüllt wurde, um bei auftretenden Problemen in der Dokumentation eventuelle Fehler zu entdecken.

## Bestückungsübersicht

Name Sequenz: 120er 20 KV 20 °C 40 min 02.07.07      Datum: 02.07.07

laufende Nummer der Sequenz: 076

laufende Nummer der Kapillare: heat cure 5026-1 No.2



Proben

Proben:

7, 20, 25, 29, 34, 38, 43, 52 und 58

1 µg Kampftaucher-DNA => 5fach

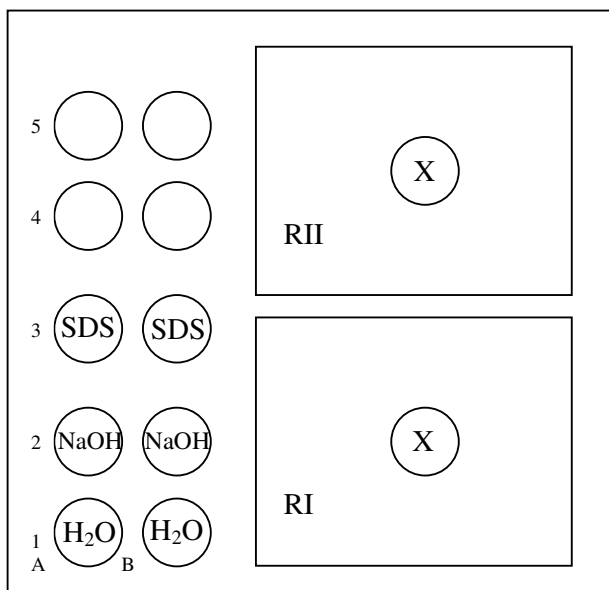
Enzym [Doku. 27.06.07]

CT-3

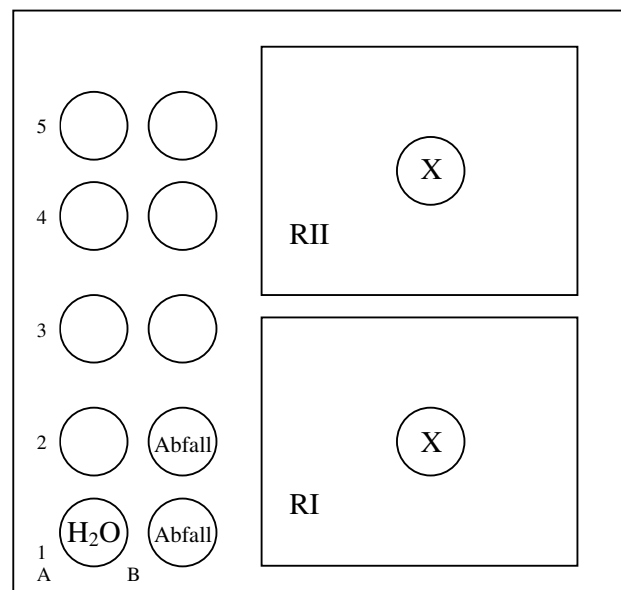
1 µg CT-DNA => 5fach Enzym [Doku. 27.06.07]

Laser / Sonstiges:

Beckmann



Inlet



Outlet

## Belegungsplan

Lauf NR.:	Probe (Doku)	Methode	Kapillare	Laser	Verd.	Puffer	Datenfile
001-003	7	20KV 20°C 40min	5026-1	Beck.	1:100	EXI 20	020707MT001-003
004-006	20	20KV 20°C 40min	5026-1	Beck.	1:100	EXI 20	020707MT004-006
007-009	25	20KV 20°C 40min	5026-1	Beck.	1:100	EXI 20	020707MT007-009
010-012	29	20KV 20°C 40min	5026-1	Beck.	1:100	EXI 20	020707MT010-012
013-015	34	20KV 20°C 40min	5026-1	Beck.	1:100	EXI 20	020707MT013-015
016-018	CT-3	20KV 20°C 40min	5026-1	Beck.	1:100	EXI 20	020707MT016-018
019-021	38	20KV 20°C 40min	5026-1	Beck.	1:100	EXI 20	020707MT019-021
022-024	43	20KV 20°C 40min	5026-1	Beck.	1:100	EXI 20	020707MT022-024
025-027	52	20KV 20°C 40min	5026-1	Beck.	1:100	EXI 20	020707MT025-027
028-030	58	20KV 20°C 40min	5026-1	Beck.	1:100	EXI 20	020707MT028-030
031-033	7	20KV 20°C 40min	5026-1	Beck.	1:100	EXI 20	020707MT031-033
034-036	20	20KV 20°C 40min	5026-1	Beck.	1:100	EXI 20	020707MT034-036
037-039	25	20KV 20°C 40min	5026-1	Beck.	1:100	EXI 20	020707MT037-039
040-042	29	20KV 20°C 40min	5026-1	Beck.	1:100	EXI 20	020707MT040-042
043-045	34	20KV 20°C 40min	5026-1	Beck.	1:100	EXI 20	020707MT043-045
046-048	CT-3	20KV 20°C 40min	5026-1	Beck.	1:100	EXI 20	020707MT046-048
049-051	38	20KV 20°C 40min	5026-1	Beck.	1:100	EXI 20	020707MT049-051
052-054	43	20KV 20°C 40min	5026-1	Beck.	1:100	EXI 20	020707MT052-054
055-057	52	20KV 20°C 40min	5026-1	Beck.	1:100	EXI 20	020707MT055-057
058-060	58	20KV 20°C 40min	5026-1	Beck.	1:100	EXI 20	020707MT058-060
.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
usw.	usw.	usw.	usw.	usw.	usw.	usw.	usw.

Belegungsplan der CE bei Sequenzläufen bei denen ein Puffer Reservoir eingesetzt wird. Als Beispiel wurde hier eine Sequenz der Kampftaucher-Proben aufgeführt

## Ermittelte Korrekturfaktoren 1 µg DNA (Aufbereitung mit Fällung)

Hydrolysemethode: I

Derivatisierungsmethode :MT VI

Basen	Methylierte λ-DNA Korrigierte Flächenanteile [%]		$K_F$ methyliert	Unmethylierte λ-DNA Korrigierte Flächenanteile [%]		$K_F$ unmethyliert
	Theoretische Werte	Messwerte		Theoretische Werte	Messwerte	
dA	25,07	37,60 ± 0,18	0,667 ± 0,003	25,07	37,57 ± 0,13	0,667 ± 0,003
dG	24,93	15,62 ± 0,07	1,597 ± 0,008	24,93	15,26 ± 0,16	1,634 ± 0,022
dT	25,07	27,43 ± 0,11	0,914 ± 0,004	25,07	27,23 ± 0,08	0,921 ± 0,005
dC	24,25	19,08 ± 0,16	1,271 ± 0,011	24,93	19,94 ± 0,09	1,250 ± 0,011
5-Me- dC	0,68	0,68 ± 0,03	1,005 ± 0,045	---	-----	

 $K_F$  = Korrekturfaktoren

Die prozentualen Flächenanteile stellen das arithmetische Mittel aus 18 Messungen mit den jeweiligen Standardabweichungen dar. Daraus ergeben sich als Korrekturfaktoren für diese Methode (Mittelwerte aus  $K_F$  methyliert und  $K_F$  unmethyliert ± Standardabweichungen):

Basen	$K_F$
dA	0,667 ± 0,00
dG	1,616 ± 0,006
dT	0,918 ± 0,001
dC	1,261 ± 0,003
5me-dC	1,005 ± 0,045

Korrekturfaktoren für 1 µg gefällte DNA-Proben. Die hier aufgeführten Korrekturfaktoren wurden für alle während der Arbeit analysierten Proben von 1 µg DNA nach Fällung mit TPB verwendet.



## Ermittelte Korrekturfaktoren 10 µg DNA (Aufbereitung mit Fällung)

Hydrolysemethode: I

Derivatisierungsmethode : VI

Basen	Methylierte λ-DNA Korrigierte Flächenanteile [%]		$K_F$ methyliert	Unmethylierte λ-DNA Korrigierte Flächenanteile [%]		$K_F$ unmethyliert
	Theoretische Werte	Messwerte		Theoretische Werte	Messwerte	
dA	25,07	37,29 ± 0,20	0,672 ± 0,009	25,07	36,71 ± 0,20	0,683 ± 0,010
dG	24,93	14,18 ± 0,12	1,759 ± 0,019	24,93	14,14 ± 0,05	1,763 ± 0,011
dT	25,07	25,68 ± 0,08	0,976 ± 0,005	25,07	25,52 ± 0,07	0,983 ± 0,005
dC	24,25	22,11 ± 0,36	1,098 ± 0,028	24,93	23,63 ± 0,23	1,051 ± 0,032
5-Me- dC	0,68	0,74 ± 0,03	0,910 ± 0,040	---	-----	

 $K_F$  = Korrekturfaktoren

Die prozentualen Flächenanteile stellen das arithmetische Mittel aus 30 Messungen mit den jeweiligen Standardabweichungen dar. Daraus ergeben sich als Korrekturfaktoren für diese Methode (Mittelwerte aus  $K_F$  methyliert und  $K_F$  unmethyliert ± Standardabweichungen):

Basen	$K_F$
dA	0,678 ± 0,001
dG	1,761 ± 0,001
dT	0,980 ± 0,001
dC	1,075 ± 0,006
5me-dC	0,910 ± 0,04

Korrekturfaktoren für 10 µg gefällte DNA-Proben. Die hier aufgeführten Korrekturfaktoren wurden für alle während der Arbeit analysierten Proben von 10 µg DNA nach Fällung mit TPB verwendet.

## Vorschrift zur Probenaufarbeitung einer 1 µg DNA-Probe:

### 1. Hydrolyse

### 2. Derivatisierung

### 3. Fällung

#### 1. Hydrolyse I:

1. 1 µg getrocknete DNA + 5 µL destilliertes und entionisiertes Wasser + 5 µL Enzymlösung
2. Enzymlösung: 1 µL Hydrolysepuffer (250 mM HEPES, pH = 6.0, 100 mM CaCl<sub>2</sub>) + 5 µL einer MN/SPD (5-fach) Enzymmischung (150 U/µL MN und 12,5 mU/µL SPD)
3. Nach Zugabe der Enzymlösung zur DNA wird kurz gevortext und zentrifugiert.
4. Hydrolyse bei 37 °C im Thermomixer → 3 Stunden

#### 2. Derivatisierung VI:

1. 10 µL DNA-Hydrolysat +
2. 15 µL Derivatisierungspuffer (50 mM HEPES (pH = 6.38)) +
3. 15 µL 27 mM BODIPY FL EDA Lösung (0,15 mg in 15 µL Deri. Puffer)
4. 15 µL 1800mM EDC Lösung ( 5,25 mg in 15 µL Deri. Puffer)
5. Nach Zugabe der Lösungen zum DNA-Hydrolysat wird kurz gevortext und zentrifugiert.
6. Inkubation bei 25 °C im Thermomixer → 21 Stunden

#### 3. Fällung:

1. 55 µL DNA-Derivat in ein 50 mL Cap überführen +
2. 425 µL tridest. Wasser +
3. 550 µL 52,5 mM Natriumtetraphenylborat (in 1 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH = 6.0)
4. mit 11 mL Dichlormethan (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) versetzen, vortexen
5. Zur Trennung der Phasen zentrifugieren (4 min bei 3000 rpm)
6. wässrige Phase abpipettieren
7. zentrifugieren (10 min bei 13.000 rpm)
8. wässrige Phase abpipettieren

**Anschließend ist die Probe fertig für die Analyse mittels CE-LIF**

Probenaufbereitungsvorschrift für 1 µg DNA, wobei der Schritt 3 optional ist.

---

**Vorschrift zur Probenaufarbeitung einer 10 µg DNA-Probe:****1. Hydrolyse****2. Derivatisierung****3. Fällung****1. Hydrolyse I:**

1. 10 µg getrocknete DNA + 5 µL destilliertes und entionisiertes Wasser + 5 µL Enzymlösung
2. Enzymlösung: 1 µL Hydrolysepuffer (250 mM HEPES, pH = 6.0, 100 mM CaCl<sub>2</sub>) + 5 µL einer MN/SPD (5-fach) Enzymmischung (150 U/µL MN und 12,5 mU/µL SPD)
3. Nach Zugabe der Enzymlösung zur DNA wird kurz gevortext und zentrifugiert.
4. Hydrolyse bei 37 °C im Thermomixer → 3 Stunden

**2. Derivatisierung VI:**

1. 10 µL DNA-Hydrolysat +
2. 20 µL Derivatisierungspuffer (50 mM HEPES (pH = 6.38)) +
3. 20 µL 27 mM BODIPY FL EDA Lösung (0,2 mg in 20 µL Deri. Puffer)
4. 20 µL 1800 mM EDC Lösung (7 mg in 20 µL Deri. Puffer)
5. Nach Zugabe der Lösungen zum DNA-Hydrolysat wird kurz gevortext und zentrifugiert.
6. Inkubation bei 25 °C im Thermomixer → 21 Stunden

**3. Fällung:**

1. 70 µL DNA-Derivat in ein 50 mL Cap überführen +
2. 630 µL tridest. Wasser +
3. 2 x 385 µL 52,5 mM Natriumtetraphenylborat (in 1 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH = 6.0)
4. mit 15 mL Dichlormethan (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) versetzen, vortexen
5. Zur Trennung der Phasen zentrifugieren (4 min bei 3000 rpm)
6. wässrige Phase abpipettieren
7. zentrifugieren (10 min bei 13.000 rpm)
8. wässrige Phase abpipettieren

**Anschließend ist die Probe fertig für die Analyse mittels CE-LIF**

Probenaufbereitungsvorschrift für 10 µg DNA, wobei der Schritt 3 mit optional ist.

# Anhang

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	200µl M	100µl Z +100µl M mit 0,01%D	100µl Z 100µl M mit0,1µM BcF	100µl Z 100µl M mit0,25µM BcF	100µl Z 100µl M mit0,5µM BcF	100µl Z 100µl M mit0,8µM BcF	100µl Z +100µl M mit 0,02%D	100µl Z 100µl M mit0,1µM BaP	100µl Z 100µl M mit0,25µM BaP	100µl Z 100µl M mit0,5µM BaP	100µl Z 100µl M mit1µM BaP	200µl M
<b>B</b>	200µl M	100µl Z +100µl M mit 0,01%D	100µl Z 100µl M mit0,1µM BcF	100µl Z 100µl M mit0,25µM BcF	100µl Z 100µl M mit0,5µM BcF	100µl Z 100µl M mit0,8µM BcF	100µl Z +100µl M mit 0,02%D	100µl Z 100µl M mit0,1µM BaP	100µl Z 100µl M mit0,25µM BaP	100µl Z 100µl M mit0,5µM BaP	100µl Z 100µl M mit1µM BaP	200µl M
<b>C</b>	200µl M	100µl Z +100µl M mit 0,01%D	100µl Z 100µl M mit0,1µM BcF	100µl Z 100µl M mit0,25µM BcF	100µl Z 100µl M mit0,5µM BcF	100µl Z 100µl M mit0,8µM BcF	100µl Z +100µl M mit 0,02%D	100µl Z 100µl M mit0,1µM BaP	100µl Z 100µl M mit0,25µM BaP	100µl Z 100µl M mit0,5µM BaP	100µl Z 100µl M mit1µM BaP	200µl M
<b>D</b>	200µl M	100µl Z +100µl M mit 0,01%D	100µl Z 100µl M mit0,1µM BcF	100µl Z 100µl M mit0,25µM BcF	100µl Z 100µl M mit0,5µM BcF	100µl Z 100µl M mit0,8µM BcF	100µl Z +100µl M mit 0,02%D	100µl Z 100µl M mit0,1µM BaP	100µl Z 100µl M mit0,25µM BaP	100µl Z 100µl M mit0,5µM BaP	100µl Z 100µl M mit1µM BaP	200µl M
<b>E</b>	200µl M	100µl Z +100µl M mit 0,01%D	100µl Z 100µl M mit0,1µM 4-ABP	100µl Z 100µl M mit0,5µM 4-ABP	100µl Z 100µl M mit1µM 4-ABP	100µl Z 100µl M mit4µM 4-ABP	100µl Z +100µl M mit 0,04%D	100µl Z 100µl M mit2µM 3-NBA	100µl Z 100µl M mit4µM 3-NBA	100µl Z 100µl M mit8µM 3-NBA	100µl Z 100µl M mit10µM 3-NBA	200µl M
<b>F</b>	200µl M	100µl Z +100µl M mit 0,01%D	100µl Z 100µl M mit0,1µM 4-ABP	100µl Z 100µl M mit0,5µM 4-ABP	100µl Z 100µl M mit1µM 4-ABP	100µl Z 100µl M mit4µM 4-ABP	100µl Z +100µl M mit 0,04%D	100µl Z 100µl M mit2µM 3-NBA	100µl Z 100µl M mit4µM 3-NBA	100µl Z 100µl M mit8µM 3-NBA	100µl Z 100µl M mit10µM 3-NBA	200µl M
<b>G</b>	200µl M	100µl Z +100µl M mit 0,01%D	100µl Z 100µl M mit0,1µM 4-ABP	100µl Z 100µl M mit0,5µM 4-ABP	100µl Z 100µl M mit1µM 4-ABP	100µl Z 100µl M mit4µM 4-ABP	100µl Z +100µl M mit 0,04%D	100µl Z 100µl M mit2µM 3-NBA	100µl Z 100µl M mit4µM 3-NBA	100µl Z 100µl M mit8µM 3-NBA	100µl Z 100µl M mit10µM 3-NBA	200µl M
<b>H</b>	200µl M	100µl Z +100µl M mit 0,01%D	100µl Z 100µl M mit0,1µM 4-ABP	100µl Z 100µl M mit0,5µM 4-ABP	100µl Z 100µl M mit1µM 4-ABP	100µl Z 100µl M mit4µM 4-ABP	100µl Z +100µl M mit 0,04%D	100µl Z 100µl M mit2µM 3-NBA	100µl Z 100µl M mit4µM 3-NBA	100µl Z 100µl M mit8µM 3-NBA	100µl Z 100µl M mit10µM 3-NBA	200µl M

A1 - H1 200µl Medium (M)

A12 - H12 200µl Medium (M)

A2 - H11 100µl Zellen (Z)

A2 - H2 100µl Medium mit 0,01% DMSO (D)

A7 - D7 100µl Medium mit 0,02% DMSO (D)

E7 - H7 100µl Medium mit 0,04% DMSO (D)

A3 - D3 100µl Medium mit 0,1µM BcF

A4 - D4 100µl Medium mit 0,25µM BcF

E3 - H3 100µl Medium mit 0,1µM 4-ABP

E4 - H4 100µl Medium mit 0,5µM 4-ABP

A8 - D8 100µl Medium mit 0,1µM BaP

A9 - D9 100µl Medium mit 0,25µM BaP

E8 - H8 100µl Medium mit 2µM 3-NBA

E9 - H9 100µl Medium mit 4µM 3-NBA

A5 - D5 100µl Medium mit 0,5µM BcF

A6 - D6 100µl Medium mit 0,8µM BcF

E5 - H5 100µl Medium mit 1µM 4-ABP

E6 - H6 100µl Medium mit 4µM 4-ABP

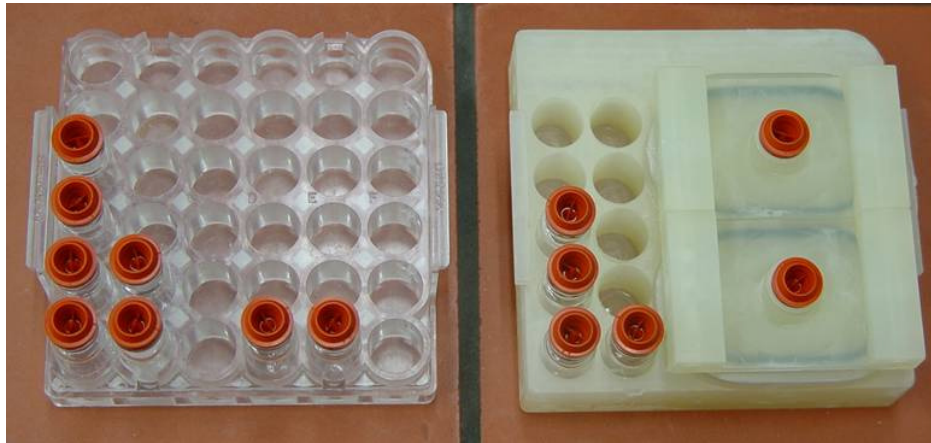
A10 - D10 100µl Medium mit 0,5µM BaP

A11 - D11 100µl Medium mit 1µM BaP

E10 - H10 100µl Medium mit 8µM 3-NBA

E11 - H11 100µl Medium mit 10µM 3-NBA

**Abbildung 59:** Bestückungsplan für einen Toxizitäts-Test. Ein solcher Plan wurde vor jedem Toxtest erstellt, um bei den Pipettierschritten keinen Fehler zu machen und nach erfolgter photometrischer Vermessung alle Signale richtig zuzuordnen zu können.



**Abbildung 60:** Pufferrack: links ein Rack für maximal 33 Analysen pro Sequenz und rechts das Pufferreservoir für insgesamt 120 Analysen pro Sequenz

## 6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ablauf des Zellzyklus .....	4
Abbildung 2: Replikationsgabel.....	5
Abbildung 3: Schematischer Verlauf der Genexpression.....	7
Abbildung 4: Mehrstufen-Modell der Tumorentstehung .....	10
Abbildung 5: Genetisches Modell der Entstehung von kolorektalen Tumoren.....	13
Abbildung 6: Altersverteilung bösartiger Tumore .....	13
Abbildung 7: Modifizierbare Zentren der vier Nukleobasen.....	14
Abbildung 8: Auswahl von verschiedenen endogenen DNA-Addukten.....	16
Abbildung 9: „Stummschalten“ von Genen.....	22
Abbildung 10: Methylierungsreprogrammierung .....	24
Abbildung 11: 5´-Methylcytosin.....	25
Abbildung 12: Einfluss der DNA-Methylierung.....	29
Abbildung 13: Genetische Veränderung durch DNA-Methylierung .....	30
Abbildung 14: Analyseergebnis einer 10 µg CT-DNA-Probe.....	34
Abbildung 15: Formel zur Quantifizierung von 5´-Methylcytosin.....	35
Abbildung 16: Methylierungsgrad von CT-DNA .....	35
Abbildung 17: Methylierungsgrad und Adduktlevel der Rattenproben .....	42
Abbildung 18: Aufnahme der V79-Zellen.....	43
Abbildung 19: Methylierungsgrade der „Kontroll-Zellen“ (V79MZ) .....	46
Abbildung 20: Methylierungsgrade der Zelllinien V79MZ1A1 .....	46
Abbildung 21: Methylierungsgrade der Zelllinien V79MZ1A2.....	47
Abbildung 22: Enzym-Aktivitäts-Bestimmung .....	48
Abbildung 23 A-C: Chromatogramme aus dem <sup>32</sup> P-Postlabeling-Versuch .....	49
Abbildung 24: Kalibriergerade der mit B[a]P versetzten Mäuseblutproben.....	52
Abbildung 25: Struktur von B[a]P und dem internen Standard B[e]P.....	53
Abbildung 26: Formeln zur Bestimmung des Responsefaktors .....	53
Abbildung 27: Chromatogramm einer Mäuseblutprobe.....	54
Abbildung 28: Clearance von B[a]P bei den HRN-Mäusen.....	54
Abbildung 29: Clearance von B[a]P bei den wt-Mäusen.....	55
Abbildung 30: Gemittelte clearance von B[a]P.....	55
Abbildung 31: Clearance der B[a]P Konzentration bei den HRN-Mäusen .....	57
Abbildung 32: Clearance der B[a]P Konzentration bei den wt-Mäuse.....	57

Abbildung 33: Schematische Darstellung des Ablaufes der Hydrolyse und Derivatisierung. ....	59
Abbildung 34: Verlauf der Probenaufbereitung nach erfolgter Derivatisierung .....	61
Abbildung 35: Analyseergebnis einer 1 µg CT-DNA-Probe .....	62
Abbildung 36: Analyseergebnis einer 1 µg CT-DNA-Probe .....	62
Abbildung 37: Methylierungsgrade dreier unabhängig aufbereiteter CT-DNA-Proben.....	63
Abbildung 38: Methylierungsgrad einer CT-DNA-Probe.....	64
Abbildung 39: Analyseergebnis einer 10 µg CT-DNA-Probe.....	65
Abbildung 40: Methylierungsgrad Änderung gefällter Proben .....	66
Abbildung 41: Elektropherogramme einer 1 µg Marmorkrebs-DNA-Probe .....	67
Abbildung 42: Analyseergebnis einer 1 µg Marmorkrebs-DNA-Probe .....	68
Abbildung 43: Marmorkrebs.....	69
Abbildung 44: Analyseergebnisse der Muskulaturproben der Tiere aus Gruppe 1 und 2 .....	71
Abbildung 45: Analyseergebnisse der Hepatopankreasproben der Tiere aus Gruppe 1 und 2 ..	71
Abbildung 46: Kampftaucher mit CCORDA, sowie das CCORDA zur Einzelansicht. ....	74
Abbildung 47: Methylierungsgrad der DNA der Taucher.....	75
Abbildung 48: Methylierungsgrad der DNA der Elitesoldaten .....	76
Abbildung 49: Mittelwerte der Methylierungsgrade der DNA aller Kampftaucher.....	76
Abbildung 50: Ergebnisse der 1. Studie fixierter Gewebeproben.....	79
Abbildung 51: Ergebnisse der 2. Studie fixierter Blasen .....	81
Abbildung 52: Veränderung des Methylierungsgrades aller Blasen [%] .....	81
Abbildung 53: Enzymvergleich .....	83
Abbildung 54: Einzelverdau mit MN bzw. SPD.....	84
Abbildung 55: BODIPY Vergleich .....	85
Abbildung 56: Elektropherogramme einer 1 µg CT-DNA.....	87
Abbildung 57: Empfindlichkeitsvergleich der Kapillarchargen .....	88
Abbildung 58: Gleichung zur Berechnung des Stroms .....	89
Abbildung 59: Bestückungsplan für einen Toxizitäts-Test .....	124
Abbildung 60: Pufferrack .....	125

## 6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Organe der Ratten nach Applikation einer 3-NBA-Konzentration von 0,2 mg/kg ...	40
Tabelle 2: Organe der Ratten nach Applikation einer 3-NBA-Konzentration von 2,0 mg/kg ...	41
Tabelle 3: Gesamtlänge und Gewicht der jeweiligen Tiere.....	72
Tabelle 4: Trennparameter der verwendeten Methoden zur Analyse .....	101

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] Schiewek, R., Wirtz, M., Thiemann, M., Plitt, K., Vogt, G. und Schmitz, O. J.; „*Determination of the DNA methylation level of the marbled crayfish: an increase in sample throughput by an optimised sample preparation*“; J.Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.; **850** (2007) 548 - 552
- [2] Arlt, V. M. et al.; „*Metabolic activation of benzo[a]pyrene in vitro by hepatic cytochrome P450 contrasts with detoxification in vivo: experiments with hepatic cytochrome P450 reductase null mice*“; Carcinogenesis; **29** (2008) 656 - 665
- [3] Vogt, G., Huber, M., Thiemann, M., van den Boogaart, G., Schmitz, O. J. und Schubart, C. D.; „*Production of different phenotypes from the same genotype in the same environment by developmental variation*“; Journal of Experimental Biology; **211** (2008) 510 - 523
- [4] Sumara, I., Quadroni, M., Frei, C., Olma, M. H., Sumara, G., Ricci, R. und Peter, M.; „*A Cul3-based E3 ligase removes aurora B from mitotic chromosomes, regulating mitotic progression and completion of cytokinesis in human cells*“; Developmental Cell; **12** (2007) 887 - 900
- [5] Honegger B.; „*Neue Funktion des humanen Cul3 Proteins in der Zellteilung*“ (2007)
- [6] Lewin B.; „*Molekularebiologie der Gene*“; Spektrum Akademischer Verlag (1997) 1 - 1020
- [7] Rolf Kippers; „*Molekulare Genetik*“; Georg Thieme Verlag (2001) 1 - 586
- [8] Branzei, D. und Foiani, M.; „*Interplay of replication checkpoints and repair proteins at stalled replication forks*“; Dna Repair; **6** (2007) 994 - 1003
- [9] Conti, C., Sacca, B., Herrick, J., Lalou, C., Pommier, Y. und Bensimon, A.; „*Replication fork velocities at adjacent replication origins are coordinately modified during DNA replication in human cells*“; Molecular Biology of the Cell; **18** (2007) 3059 - 3067
- [10] Stillman, B.; „*Initiation of Eukaryotic Dna-Replication In vitro*“; Annual Review of Cell Biology; **5** (1989) 197 - 245
- [11] Meselson, M. und Stahl, F. W.; „*The Replication of Dna in Escherichia-Coli*“; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; **44** (1958) 671 - 682
- [12] Anachkova, B., Djeliova, V. und Russev, G.; „*Nuclear matrix support of DNA replication*“; Journal of Cellular Biochemistry; **96** (2005) 951 - 961
- [13] Bogan, J. A., Natale, D. A. und DePamphilis, M. L.; „*Initiation of eukaryotic DNA replication: Conservative or liberal?*“; Journal of Cellular Physiology; **184** (2000) 139 - 150
- [14] Csikasz-Nagy, A., Battogtokh, D., Chen, K. C., Novak, B. und Tyson, J. J.; „*Analysis of a generic model of eukaryotic cell-cycle regulation*“; Biophysical Journal; **90** (2006) 4361 - 4379
- [15] Diffley, J. F. X.; „*Regulation of early events in chromosome replication*“; Current Biology; **14** (2004) R778 - R786



- [16] Zannis-Hadjopoulos, M. und Price, G. B.; „*Eukaryotic DNA replication*“; Journal of Cellular Biochemistry; (1999) 1 - 14
- [17] Kleinig H. und Maier U.; „*Zellbiologie*“; Gustav Fischer Verlag (1999) 1 - 543
- [18] Nelson D.L. und Cox M.M.; „*Lehninger Biochemie*“; Springer-Verlag (2001) 1 - 1342
- [19] Mariana Ruiz; „*DNA replikation*“  
;http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:DNA\_replication.svg; (2007)
- [20] Wu, J. R.; „*Regulation of eukaryotic DNA replication and nuclear structure*“; Cell Research; **9** (1999) 163 - 170
- [21] Campbell, J. L.; „*Eukaryotic Dna-Replication*“; Annual Review of Biochemistry; **55** (1986) 733 - 771
- [22] Doenecke D., Koolman J., Fuchs G. und Gerok W.; „*Biochemie und Pathobiochemie*“; Georg Thieme Verlag (2005) 1 - 803
- [23] Kwon, H., Imbalzano, A. N., Khavari, P. A., Kingston, R. E. und Green, M. R.; „*Nucleosome Disruption and Enhancement of Activator Binding by A Human Sw1/Snf Complex*“; Nature; **370** (1994) 477 - 481
- [24] Peterson, C. L. und Herskowitz, I.; „*Characterization of the Yeast Swi1, Swi2, and Swi3 Genes, Which Encode A Global Activator of Transcription*“; Cell; **68** (1992) 573 - 583
- [25] Edmondson, D. G. und Roth, S. Y.; „*Chromatin and transcription*“; Faseb Journal; **10** (1996) 1173 - 1182
- [26] Muller, H. P., Sogo, J. M. und Schaffner, W.; „*An Enhancer Stimulates Transcription in Trans When Attached to the Promoter Via A Protein Bridge*“; Cell; **58** (1989) 767 - 777
- [27] Imbalzano, A. N., Kwon, H., Green, M. R. und Kingston, R. E.; „*Facilitated Binding of Tata-Binding Protein to Nucleosomal Dna*“; Nature; **370** (1994) 481 - 485
- [28] Ptashne, M.; „*How Eukaryotic Transcriptional Activators Work*“; Nature; **335** (1988) 683 - 689
- [29] Kornberg, R. D.; „*RNA polymerase II transcription control*“; Trends in Biochemical Sciences; **21** (1996) 325 - 326
- [30] Green, R. und Noller, H. F.; „*Ribosomes and translation*“; Annual Review of Biochemistry; **66** (1997) 679 - 716
- [31] Ilyas, M., Straub, J., Tomlinson, I. P. M. und Bodmer, W. F.; „*Genetic pathways in colorectal and other cancers*“; European Journal of Cancer; **35** (1999) 335 - 351
- [32] Schmitz-Moormann, P., Gebert, G. und Thomas, C.; „*Allgemeine Pathologie*“; Schattauer-Verlag (1995)
- [33] 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*“ (1991) 81 - 115
- [34] Schirmacher, V.; „*Krebs-Tumoren Zellen, Gene*“; Krebs-Tumoren zellen, Gene; Spektrum der Wissenschaft, Reihe verständliche Vorschung; **2. Auflage** (1987) 7 - 9

- [35] Rajewsky M.F.; „*Ein Prozess in vielen Schritten*“**1** (1992) 7 - 21
- [36] Gemsa, D., Kalden, J. R. und Resch, K.; „*Immunologie: Grundlagen-Klinik-Praxis*“; Georg Thieme Verlag (1991)
- [37] Marquardt, H. und Schäfer, S. G.; „*Lehrbuch der Toxikologie*“; Spektrum Akademischer Verlag (1997) 124 - 177
- [38] *Krebs in Deutschland Häufigkeiten und Trends*; (2006)
- [39] Yogeshwer Shuklal and Sanjoy Kumar Pal<sup>2</sup>; „*Dietary Cancer Chemoprevention: An Overview*“; International Journal of Human Genetics; (2004) 265 - 267
- [40] Tomatis, L.; „*Environmental Cancer Risk-Factors - A Review*“; Acta Oncologica; **27** (1988) 465 - 472
- [41] *Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland 1981-1990*; (1990)
- [42] Loeb, L. A., Ernster, V. L., Warner, K. E., Abbotts, J. und Laszlo, J.; „*Smoking and Lung-Cancer - An Overview*“; Cancer Research; **44** (1984) 5940 - 5958
- [43] Hawk, E. T., Umar, A. und Viner, J. L.; „*Colorectal cancer chemoprevention - An overview of the science*“; Gastroenterology; **126** (2004) 1423 - 1447
- [44] Akopyan, G. und Bonavida, B.; „*Understanding tobacco smoke carcinogen NNK and lung tumorigenesis (Review)*“; International Journal of Oncology; **29** (2006) 745 - 752
- [45] Boveri, T.; „*Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren*“; Verlag von Gustav Fischer (1914)
- [46] Bodmer, W.; „*The somatic evolution of cancer*“; Journal of the Royal College of Physicians of London; **31** (1997) 82 - 89
- [47] Vogelstein, B. und Kinzler, K. W.; „*The Multistep Nature of Cancer*“; Trends in Genetics; **9** (1993) 138 - 141
- [48] Farber, E.; „*Cancer Development and Its Natural-History - A Cancer Prevention Perspective*“; Cancer; **62** (1988) 1676 - 1679
- [49] Schirmacher, V.; „*Krebs-Tumoren Zellen, Gene*“; Spektrum der Wissenschaft, Reihe verständliche Vorschung; **2. Auflage** (1987) 7 - 9
- [50] Schirmacher, V.; „*Krebs-Tumoren Zellen, Gene*“; Spektrum der wissenschaft (1994)
- [51] Pali, S. S. und Robertson, K. D.; „*Epigenetic control of tumor suppression*“; Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression; **17** (2007) 295 - 316
- [52] Vogelstein, B. et al.; „*Genetic Alterations During Colorectal-Tumor Development*“; New England Journal of Medicine; **319** (1988) 525 - 532
- [53] Perera, F. P.; „*The Significance of Dna and Protein Adducts in Human Biomonitoring Studies*“; Mutation Research; **205** (1988) 255 - 269
- [54] Poirier, M. C.; „*DNA adducts as exposure biomarkers and indicators of cancer risk*“; Environmental Health Perspectives; **105** (1997) 907 - 912

- [55] Schmitz, O. J., Worth, C. C. T., Stach, D. und Wiessler, M.; „*Capillary electrophoresis analysis of DNA adducts as biomarkers for carcinogenesis*“; *Angewandte Chemie-International Edition*; **41** (2002) 445 - 448
- [56] Hemminki, K., Koskinen, M., Rajaniemi, H. und Zhao, C. Y.; „*DNA adducts, mutations, and cancer 2000*“; *Regulatory Toxicology and Pharmacology*; **32** (2000) 264 - 275
- [57] Farmer, P. B., Neumann, H. G. und Henschler, D.; „*Estimation of Exposure of Man to Substances Reacting Covalently with Macromolecules*“; *Archives of Toxicology*; **60** (1987) 251 - 260
- [58] Otteneeder, M. und Lutz, W. K.; „*Correlation of DNA adduct levels with tumor incidence: carcinogenic potency of DNA adducts*“; *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*; **424** (1999) 237 - 247
- [59] Timbrell, J. A.; „*Biomarkers in toxicology*“; *Toxicology*; **129** (1998) 1 - 12
- [60] DeFlora, S. et al.; „*DNA adducts and chronic degenerative diseases. Pathogenetic relevance and implications in preventive medicine*“; *Mutation Research-Reviews in Genetic Toxicology*; **366** (1996) 197 - 238
- [61] Wörth, C. C. T.; „*Entwicklung eines Nachweis-Verfahrens für DNA-Addukte basierend auf Fluoreszenzderivatisierung und kapillarelektrophoretischer Trennung*“; Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg (2000)
- [62] Hemminki, K.; „*Dna-Adducts, Mutations and Cancer*“; *Carcinogenesis*; **14** (1993) 2007 - 2012
- [63] Koganti, A., Singh, R., Rozett, K., Modi, N., Goldstein, L. S., Roy, T. A., Zhang, F. J., Harvey, R. G. und Weyand, E. H.; „*7H-benzo[c]fluorene: a major DNA adduct-forming component of coal tar*“; *Carcinogenesis*; **21** (2000) 1601 - 1609
- [64] Wirtz, M.; „*Kapillarelektrophoretische Bestimmung von DNA-Addukten als Biomarker der chemischen Kanzerogenese*“; Dissertation, Bergische Universität Wuppertal (2006)
- [65] Devoret, R.; „*Mutation*“; *Encyclopedia of Life sciences*; (2004) 1 - 8
- [66] Sander, M. et al.; „*Proceedings of a workshop on DNA adducts: Biological significance and applications to risk assessment Washington, DC, April 13-14, 2004*“; *Toxicology and Applied Pharmacology*; **208** (2005) 1 - 20
- [67] 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*“; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; **95** (1998) 288 - 293
- [68] Marnett, L. J.; „*Oxyradicals and DNA damage*“; *Carcinogenesis*; **21** (2000) 361 - 370
- [69] Beckman, K. B. und Ames, B. N.; „*The free radical theory of aging matures*“; *Physiological Reviews*; **78** (1998) 547 - 581
- [70] Burcham, P. C.; „*Internal hazards: baseline DNA damage by endogenous products of normal metabolism*“; *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*; **443** (1999) 11 - 36

- [71] Wiseman, H. und Halliwell, B.; „*Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: Role in inflammatory disease and progression to cancer*“; *Biochemical Journal*; **313** (1996) 17 - 29
- [72] Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M. und Lunec, J.; „*Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease*“; *Faseb Journal*; **17** (2003) 1195 - 1214
- [73] Croteau, D. L. und Bohr, V. A.; „*Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells*“; *Journal of Biological Chemistry*; **272** (1997) 25409 - 25412
- [74] Friedberg, E. C.; „*DNA damage and repair*“; *Nature*; **421** (2003) 436 - 440
- [75] Ames, B. N., Shigenaga, M. K. und Hagen, T. M.; „*Oxidants, Antioxidants, and the Degenerative Diseases of Aging*“; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; **90** (1993) 7915 - 7922
- [76] Devoret, R.; „*Bacterial Tests for Potential Carcinogens*“; *Scientific American*; **241** (1979) 40 - &
- [77] Ames, B. N.; „*Identifying Environmental Chemicals Causing Mutations and Cancer*“; *Science*; **204** (1979) 587 - 593
- [78] Laird, P. W. und Jaenisch, R.; „*The role of DNA methylation in cancer genetics and epigenetics*“; *Annual Review of Genetics*; **30** (1996) 441 - 464
- [79] Kakar, S., Deng, G., Cun, L., Sahai, V. und Kim, Y. S.; „*CpG island methylation is frequently present in tubulovillous and villous adenomas and correlates with size, site, and villous component*“; *Human Pathology*; **39** (2008) 30 - 36
- [80] Warburg, O.; „*Über den Stoffwechsel von Tumoren*“; *Klinische Wochenschrift*; **5** (1926) 829 - 832
- [81] Schneider, F.; „*Die aerobe Glykolyse der Tumorzelle*“; *Naturwissenschaften*; **68** (1981) 20 - 27
- [82] Warburg, O., Gawehn, K., Geissler, A. W., Kayser, D. und Lorenz, S.; „*Experimente Zur Anaerobiose der Krebszellen*“; *Klinische Wochenschrift*; **43** (1965) 289 - &
- [83] Ristow, M.; „*Glukosestoffwechsel und Tumorwachstum*“; *Onkologie*; (2008) 22 - 30
- [84] Warburg, O.; „*Krebsforschung*“; *Naturwissenschaften*; **41** (1954) 485 - 486
- [85] Reik, W. und Walter, J.; „*Genomic imprinting: Parental influence on the genome*“; *Nature Reviews Genetics*; **2** (2001) 21 - 32
- [86] Nicholls, R. D., Saitoh, S. und Horsthemke, B.; „*Imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes*“; *Trends in Genetics*; **14** (1998) 194 - 200
- [87] Jirtle, R. L. und Weidman, J. R.; „*Imprinted and more equal*“; *American Scientist*; **95** (2007) 143 - 149
- [88] Haaf, T.; „*Geschlechterkonflikt im frühen Embryo: Elternspezifische Reprogrammierung des väterlichen und mütterlichen Erbguts nach der Befruchtung*“; *Deutsches Ärzteblatt*; **36** (2003)
- [89] Obata, Y., Kaneko-Ishino, T., Koide, T., Takai, Y., Ueda, T., Domeki, I., Shiroishi, T., Ishino, F. und Kono, T.; „*Disruption of primary imprinting during oocyte growth leads to*

- the modified expression of imprinted genes during embryogenesis*"; Development; **125** (1998) 1553 - 1560
- [90] Rafaela von Bredow; „*Kalter Krieg der Gene*“; Spiegel; **17** (1998) 174 - 177
- [91] Wutz, A. und Barlow, D. P.; „*Imprinting of the mouse Igf2r gene depends on an intronic CpG island*“; Molecular and Cellular Endocrinology; **140** (1998) 9 - 14
- [92] Surani, M. A. H., Barton, S. C. und Norris, M. L.; „*Development of Reconstituted Mouse Eggs Suggests Imprinting of the Genome During Gametogenesis*“; Nature; **308** (1984) 548 - 550
- [93] Mcgrath, J. und Solter, D.; „*Completion of Mouse Embryogenesis Requires Both the Maternal and Paternal Genomes*“; Cell; **37** (1984) 179 - 183
- [94] Oswald, J., Engemann, S., Lane, N., Mayer, W., Olek, A., Fundele, R., Dean, W., Reik, W. und Walter, J.; „*Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote*“; Current Biology; **10** (2000) 475 - 478
- [95] Mendel, G.; „*Versuche Uber Pflanzen-Hybriden*“; Journal of Heredity; **42** (1951) 3 - 47
- [96] Mendel, G.; „*Experiments in Plant Hybridization*“; British Medical Journal; **1** (1965) 370 - &
- [97] Sorsby, A.; „*Gregor Mendel*“; British Medical Journal; **1** (1965) 333 - &
- [98] Murphy, S. K. und Jirtle, R. L.; „*Imprinting evolution and the price of silence*“; Bioessays; **25** (2003) 577 - 588
- [99] Badcock, C. und Crespi, B.; „*Imbalanced genomic imprinting in brain development: an evolutionary basis for the aetiology of autism*“; Journal of Evolutionary Biology; **19** (2006) 1007 - 1032
- [100] Buiting, K., Saitoh, S., Gross, S., Bittrich, B., Schwartz, S., Nicholls, R. D. und Horsthemke, B.; „*Inherited Microdeletions in the Angelman and Prader-Willi Syndromes Define An Imprinting Center on Human-Chromosome-15 (Vol 9, Pg 395, 1995)*“; Nature Genetics; **10** (1995) 249 - 249
- [101] Mutter, G. L.; „*Role of imprinting in abnormal human development*“; Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis; **396** (1997) 141 - 147
- [102] Wutz, A., Smrzka, O. W., Schweifer, N., Schellander, K., Wagner, E. F. und Barlow, D. P.; „*Imprinted expression of the Igf2r gene depends on an intronic CpG island*“; Nature; **389** (1997) 745 - 749
- [103] Vanyushin, B. F.; „*DNA methylation and epigenetics*“; Russian Journal of Genetics; **42** (2006) 985 - 997
- [104] Paulsen, M. und Ferguson-Smith, A. C.; „*DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease*“; Journal of Pathology; **195** (2001) 97 - 110
- [105] Li, E., Beard, C. und Jaenisch, R.; „*Role for Dna Methylation in Genomic Imprinting*“; Nature; **366** (1993) 362 - 365
- [106] Jones, P. A. und Baylin, S. B.; „*The epigenomics of cancer*“; Cell; **128** (2007) 683 - 692

- [107] Sasaki, H., Jones, P. A., Chaillet, J. R., Fergusonsmith, A. C., Barton, S. C., Reik, W. und Surani, M. A.; „*Parental Imprinting - Potentially Active Chromatin of the Repressed Maternal Allele of the Mouse Insulin-Like Growth Factor-Ii (Igf2) Gene*“; *Genes & Development*; **6** (1992) 1843 - 1856
- [108] Szabo, P. E., Tang, S. H. E., Rentsendorj, A., Pfeifer, G. P. und Mann, J. R.; „*Maternal-specific footprints at putative CTCF sites in the H19 imprinting control region give evidence for insulator function*“; *Current Biology*; **10** (2000) 607 - 610
- [109] Constancia, M., Dean, W., Lopes, S., Moore, T., Kelsey, G. und Reik, W.; „*Deletion of a silencer element in Igf2 results in loss of imprinting independent of H19*“; *Nature Genetics*; **26** (2000) 203 - 206
- [110] DeChiara, T. M., Robertson, E. J. und Efstratiadis, A.; „*Parental Imprinting of the Mouse Insulin-Like Growth Factor-II Gene*“; *Cell*; **64** (1991) 849 - 859
- [111] Bartolomei, M. S., Zemel, S. und Tilghman, S. M.; „*Parental Imprinting of the Mouse H19 Gene*“; *Nature*; **351** (1991) 153 - 155
- [112] Lyon, M. F.; „*Gene Action in X-Chromosome of Mouse (Mus Musculus L)*“; *Nature*; **190** (1961) 372 - &
- [113] Chow, J. C., Yen, Z., Ziesche, S. M. und Brown, C. J.; „*Silencing of the mammalian X chromosome*“; *Annual Review of Genomics and Human Genetics*; **6** (2005) 69 - 92
- [114] Migeon, B. R.; „*X-Chromosome Inactivation - Molecular Mechanisms and Genetic Consequences*“; *Trends in Genetics*; **10** (1994) 230 - 235
- [115] Barr, M. L. und Bertram, E. G.; „*A Morphological Distinction Between Neurones of the Male and Female, and the Behaviour of the Nucleolar Satellite During Accelerated Nucleo-protein Synthesis*“; *Nature*; **163** (1949) 676 - 677
- [116] Brown, C. J., Ballabio, A., Rupert, J. L., Lafreniere, R. G., Grompe, M., Tonlorenzi, R. und Willard, H. F.; „*A Gene from the Region of the Human X-Inactivation Center Is Expressed Exclusively from the Inactive X-Chromosome*“; *Nature*; **349** (1991) 38 - 44
- [117] Borsani, G. et al.; „*Characterization of A Murine Gene Expressed from the Inactive X-Chromosome*“; *Nature*; **351** (1991) 325 - 329
- [118] Latham, K. E.; „*X chromosome imprinting and inactivation in the early mammalian embryo*“; *Trends in Genetics*; **12** (1996) 134 - 138
- [119] West, J. D., Frels, W. I., Chapman, V. M. und Papaioannou, V. E.; „*Preferential Expression of Maternally Derived X-Chromosome in Mouse Yolk-Sac*“; *Cell*; **12** (1977) 873 - 882
- [120] Kato, Y., Rideout, W. M., Hilton, K., Barton, S. C., Tsunoda, Y. und Surani, M. A.; „*Developmental potential of mouse primordial germ cells*“; *Development*; **126** (1999) 1823 - 1832
- [121] Howlett, S. K. und Reik, W.; „*Methylation Levels of Maternal and Paternal Genomes During Preimplantation Development*“; *Development*; **113** (1991) 119 - 127
- [122] Monk, M., Boubelik, M. und Lehnert, S.; „*Temporal and Regional Changes in Dna Methylation in the Embryonic, Extraembryonic and Germ-Cell Lineages During Mouse Embryo Development*“; *Development*; **99** (1987) 371 - 382

- [123] Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R. und Haaf, T.; „*Embryogenesis - Demethylation of the zygotic paternal genome*“; Nature; **403** (2000) 501 - 502
- [124] Rougier, N., Bourc'his, D., Gomes, D. M., Niveleau, A., Plachot, M., Paldi, A. und Viegas-Pequignot, E.; „*Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development*“; Genes & Development; **12** (1998) 2108 - 2113
- [125] Doerfler, W.; „*Dna Methylation - A Regulatory Signal in Eukaryotic Gene-Expression*“; Journal of General Virology; **57** (1981) 1 - 20
- [126] Gamasosa, 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*“; Biochimica et Biophysica Acta; **740** (1983) 212 - 219
- [127] Shiraishi, M., Oates, A. J. und Sekiya, T.; „*An overview of the analysis of DNA methylation in mammalian genomes*“; Biological Chemistry; **383** (2002) 893 - 906
- [128] Rein, T., DePamphilis, M. L. und Zorbas, H.; „*Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes*“; Nucleic Acids Research; **26** (1998) 2255 - 2264
- [129] 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
- [130] Esteller, M. und Herman, J. G.; „*Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours*“; Journal of Pathology; **196** (2002) 1 - 7
- [131] Esteller, M.; „*Profiling aberrant DNA methylation in hematologic neoplasms: a view from the tip of the iceberg*“; Clinical Immunology; **109** (2003) 80 - 88
- [132] Ehrlich, M.; „*DNA hypomethylation and cancer. In DNA Alterations in cancer: Genetic and Epigenetic changes*“; Westborough; (2000) 273 - 291
- [133] Esteller, M. et al.; „*DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis*“; Human Molecular Genetics; **10** (2001) 3001 - 3007
- [134] VANYUSHI.BF, Mazin, A. L., Vasilyev, V. K. und BELOZERS.AN; „*Content of 5-Methylcytosine in Animal Dna - Species and Tissue Specificity*“; Biochimica et Biophysica Acta; **299** (1973) 397 - 403
- [135] Ehrlich, M. und Wang, R. Y. H.; „*5-Methylcytosine in Eukaryotic Dna*“; Science; **212** (1981) 1350 - 1357
- [136] Kappler, J. W.; „*5-Methylcytosine Content of Dna - Tissue Specificity*“; Journal of Cellular Physiology; **78** (1971) 33 - &
- [137] Laird, P. W., Jacksongrusby, L., Fazeli, A., Dickinson, S. L., Jung, W. E., Li, E., Weinberg, R. A. und Jaenisch, R.; „*Suppression of Intestinal Neoplasia by Dna Hypomethylation*“; Cell; **81** (1995) 197 - 205
- [138] Agrawal, A., Murphy, R. F. und Agrawal, D. K.; „*DNA methylation in breast and colorectal cancers*“; Modern Pathology; **20** (2007) 711 - 721
- [139] Li, E., Bestor, T. H. und Jaenisch, R.; „*Targeted Mutation of the Dna Methyltransferase Gene Results in Embryonic Lethality*“; Cell; **69** (1992) 915 - 926
- [140] Jones, P. A.; „*Overview of cancer epigenetics*“; Seminars in Hematology; **42** (2005) S3 - S8

- [141] 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
- [142] Rideout, W. M., Coetzee, G. A., Olumi, A. F. und Jones, P. A.; „*5-Methylcytosine As An Endogenous Mutagen in the Human Ldl Receptor and P53 Genes*“; *Science*; **249** (1990) 1288 - 1290
- [143] Lewis, J. und Bird, A.; „*Dna Methylation and Chromatin Structure*“; *Febs Letters*; **285** (1991) 155 - 159
- [144] Attwood, J. T., Yung, R. L. und Richardson, B. C.; „*DNA methylation and the regulation of gene transcription*“; *Cellular and Molecular Life Sciences*; **59** (2002) 241 - 257
- [145] Antequera, F. und Bird, A.; „*Number of Cpg Islands and Genes in Human and Mouse*“; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; **90** (1993) 11995 - 11999
- [146] Bird, A. P.; „*Cpg-Rich Islands and the Function of Dna Methylation*“; *Nature*; **321** (1986) 209 - 213
- [147] Gardinergarden, M. und Frommer, M.; „*Cpg Islands in Vertebrate Genomes*“; *Journal of Molecular Biology*; **196** (1987) 261 - 282
- [148] Antequera, F. und Bird, A. P.; „*Unmethylated Cpg Islands Associated with Genes in Higher-Plant Dna*“; *Embo Journal*; **7** (1988) 2295 - 2299
- [149] Bestor, T. H.; „*The DNA methyltransferases of mammals*“; *Human Molecular Genetics*; **9** (2000) 2395 - 2402
- [150] DeAngelis, J. T., Farrington, W. J. und Tollefsbol, T. O.; „*An overview of epigenetic assays*“; *Molecular Biotechnology*; **38** (2008) 179 - 183
- [151] Antequera, F. und Bird, A.; „*CpG islands as genomic footprints of promoters that are associated with replication origins*“; *Current Biology*; **9** (1999) R661 - R667
- [152] Laird, P. W. und Jaenisch, R.; „*Dna Methylation and Cancer*“; *Human Molecular Genetics*; **3** (1994) 1487 - 1495
- [153] Rountree, M. R., Bachman, K. E., Herman, J. G. und Baylin, S. B.; „*DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer*“; *Oncogene*; **20** (2001) 3156 - 3165
- [154] Reik, W., Kelsey, G. und Walter, J.; „*Dissecting de novo methylation*“; *Nature Genetics*; **23** (1999) 380 - 382
- [155] Hamm, S., Just, G., Lacoste, N., Moitessier, N., Szyf, M. und Mamer, O.; „*On the mechanism of demethylation of 5-methylcytosine in DNA*“; *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; **18** (2008) 1046 - 1049
- [156] Bhattacharya, S. K., Ramchandani, S., Cervoni, N. und Szyf, M.; „*A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA*“; *Nature*; **397** (1999) 579 - 583
- [157] Rhee, I. et al.; „*DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells*“; *Nature*; **416** (2002) 552 - 556
- [158] Jaenisch, R.; „*DNA methylation and imprinting: Why bother?*“; *Trends in Genetics*; **13** (1997) 323 - 329



- [159] 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
- [160] Pradhan, S., Talbot, D., Sha, M., Benner, J., Hornstra, L., Li, E., Jaenisch, R. und Roberts, R. J.; „*Baculovirus-mediated expression and characterization of the full-length murine DNA methyltransferase*“; Nucleic Acids Research; **25** (1997) 4666 - 4673
- [161] Robertson, K. D.; „*DNA methylation, methyltransferases, and cancer*“; Oncogene; **20** (2001) 3139 - 3155
- [162] Nagase, H. und Ghosh, S.; „*Epigenetics: differential DNA methylation in mammalian somatic tissues*“; Febs Journal; **275** (2008) 1617 - 1623
- [163] Pradhan, S., Bacolla, A., Wells, R. D. und Roberts, R. J.; „*Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation*“; Journal of Biological Chemistry; **274** (1999) 33002 - 33010
- [164] Reik, W.; „*Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development*“; Nature; **447** (2007) 425 - 432
- [165] Counts, J. L. und Goodman, J. I.; „*Alterations in Dna Methylation May Play A Variety of Roles in Carcinogenesis*“; Cell; **83** (1995) 13 - 15
- [166] Kuroki, T., Tajima, Y. und Kanematsu, T.; „*Role of hypermethylation on carcinogenesis in the pancreas*“; Surgery Today; **34** (2004) 981 - 986
- [167] He, X. M. et al.; „*MethyCancer: the database of human DNA methylation and cancer*“; Nucleic Acids Research; **36** (2008) D836 - D841
- [168] Toyota, M., Ahuja, N., Suzuki, H., Itoh, F., Ohe-Toyota, M., Imai, K., Baylin, S. B. und Issa, J. P. J.; „*Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG island methylator phenotype*“; Cancer Research; **59** (1999) 5438 - 5442
- [169] Baylin, S. B., Esteller, M., Rountree, M. R., Bachman, K. E., Schuebel, K. und Herman, J. G.; „*Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer*“; Human Molecular Genetics; **10** (2001) 687 - 692
- [170] Ting, A. H., McGarvey, K. M. und Baylin, S. B.; „*The cancer epigenome - components and functional correlates*“; Genes & Development; **20** (2006) 3215 - 3231
- [171] Keshet, I., Liemanhurwitz, J. und Cedar, H.; „*Dna Methylation Affects the Formation of Active Chromatin*“; Cell; **44** (1986) 535 - 543
- [172] Baylin, S. B. und Herman, J. G.; „*DNA hypermethylation in tumorigenesis - epigenetics joins genetics*“; Trends in Genetics; **16** (2000) 168 - 174
- [173] 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*“; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; **87** (1990) 8830 - 8834
- [174] Wade, P. A.; „*Methyl CpG binding proteins: coupling chromatin architecture to gene regulation*“; Oncogene; **20** (2001) 3166 - 3173
- [175] Voet, D. V. J. G.; „*Biochemie*“; VCH Verlagsgesellschaft (1994)

- [176] Quina, A. S., Buschbeck, M. und Di Croce, L.; „*Chromatin structure and epigenetics*“; *Biochemical Pharmacology*; **72** (2006) 1563 - 1569
- [177] Zhang, Y. H., Shields, T., Crenshaw, T., Hao, Y., Moulton, T. und Tycko, B.; „*Imprinting of Human H19 - Allele-Specific CpG Methylation, Loss of the Active Allele in Wilms-Tumor, and Potential for Somatic Allele Switching*“; *American Journal of Human Genetics*; **53** (1993) 113 - 124
- [178] Razin, A. und Kafri, T.; „*Dna Methylation from Embryo to Adult*“; *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*; **48** (1994) 53 - 81
- [179] Jones, P. A. und Laird, P. W.; „*Cancer epigenetics comes of age*“; *Nature Genetics*; **21** (1999) 163 - 167
- [180] Migeon, B. R.; „*X inactivation and cellular mosaicism - In reply*“; *Jama-Journal of the American Medical Association*; **296** (2006) 931 - 931
- [181] 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
- [182] Baylin, S. B., Herman, J. G., Graff, J. R., Vertino, P. M. und Issa, J. P.; „*Alterations in DNA methylation: A fundamental aspect of neoplasia*“; *Advances in Cancer Research*; **72** (1998) 141 - 196
- [183] Gamasosa, M. A., Slagel, V. A., Trewyn, R. W., Oxenhandler, R., Kuo, K. C., Gehrke, C. W. und Ehrlich, M.; „*The 5-Methylcytosine Content of Dna from Human-Tumors*“; *Nucleic Acids Research*; **11** (1983) 6883 - 6894
- [184] Baylin, S. B., Belinsky, S. A. und Herman, J. G.; „*Aberrant methylation of gene promoters in cancer - Concepts, misconcepts, and promise*“; *Journal of the National Cancer Institute*; **92** (2000) 1460 - 1461
- [185] 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
- [186] Counts, J. L. und Goodman, J. I.; „*Hypomethylation of Dna - An Epigenetic Mechanism Involved in Tumor Promotion*“; *Molecular Carcinogenesis*; **11** (1994) 185 - 188
- [187] Herman, J. G. et al.; „*Silencing of the Vhl Tumor-Suppressor Gene by Dna Methylation in Renal-Carcinoma*“; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; **91** (1994) 9700 - 9704
- [188] Robertson, K. D. und Jones, P. A.; „*DNA methylation: past, present and future directions*“; *Carcinogenesis*; **21** (2000) 461 - 467
- [189] Belinsky, S. A., Nikula, K. J., Baylin, S. B. und Issa, J. P. J.; „*Increased cytosine DNA-methyltransferase activity is target-cell-specific and an early event in lung cancer*“; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; **93** (1996) 4045 - 4050
- [190] Tommasi, S., Denissenko, M. F. und Pfeifer, G. P.; „*Sunlight induces pyrimidine dimers preferentially at 5-methylcytosine bases*“; *Cancer Research*; **57** (1997) 4727 - 4730
- [191] Wilson, V. L. und Jones, P. A.; „*Chemical Carcinogen-Mediated Decreases in Dna 5-Methylcytosine Content of Balb 3T3 Cells*“; *Carcinogenesis*; **5** (1984) 1027 - 1031

- [192] Schmutte, C., Yang, A. S., Beart, R. W. und Jones, P. A.; „*Base Excision-Repair of U-G Mismatches at A Mutational Hotspot in the P53 Gene Is More Efficient Than Base Excision-Repair of T-G Mismatches in Extracts of Human Colon Tumors*“; *Cancer Research*; **55** (1995) 3742 - 3746
- [193] Eldeiry, W. S., Nelkin, B. D., Celano, P., Yen, R. W. C., Falco, J. P., Hamilton, S. R. und Baylin, S. B.; „*High Expression of the Dna Methyltransferase Gene Characterizes Human Neoplastic-Cells and Progression Stages of Colon Cancer*“; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; **88** (1991) 3470 - 3474
- [194] Issa, J. P. J., Vertino, P. M., Wu, J. J., Sazawal, S., Celano, P., Nelkin, B. D., Hamilton, S. R. und Baylin, S. B.; „*Increased Cytosine Dna-Methyltransferase Activity During Colon-Cancer Progression*“; *Journal of the National Cancer Institute*; **85** (1993) 1235 - 1240
- [195] Barciszewska, A. M., Murawa, D., Gawronska, I., Murawa, P., Nowak, S. und Barciszewska, M. Z.; „*Analysis of 5-methylcytosine in DNA of breast and colon cancer tissues*“; *lubmb Life*; **59** (2007) 765 - 770
- [196] 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
- [197] Gonzalgo, M. L. und Jones, P. A.; „*Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE)*“; *Nucleic Acids Research*; **25** (1997) 2529 - 2531
- [198] Fraga, M. F., Rodriguez, R. und Canal, M. J.; „*Rapid quantification of DNA methylation by high performance capillary electrophoresis*“; *Electrophoresis*; **21** (2000) 2990 - 2994
- [199] Ramsahoye, B. H.; „*Measurement of genome wide DNA methylation by reversed-phase high-performance liquid chromatography*“; *Methods*; **27** (2002) 156 - 161
- [200] 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
- [201] Rozhon, W., Baubec, T., Mayerhofer, J., Scheid, O. M. und Jonak, C.; „*Rapid quantification of global DNA methylation by isocratic cation exchange high-performance liquid chromatography*“; *Analytical Biochemistry*; **375** (2008) 354 - 360
- [202] Chaillet, J. R., Vogt, T. F., Beier, D. R. und Leder, P.; „*Parental-Specific Methylation of An Imprinted Transgene Is Established During Gametogenesis and Progressively Changes During Embryogenesis*“; *Cell*; **66** (1991) 77 - 83
- [203] 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
- [204] 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)
- [205] 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

- [206] Schmitz, O. J.; „*Entwicklung einer Methode zur Analyse von DNA-Addukten mittels Kapillarelektrophorese*“; Habilitationsschrift, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg (2001)
- [207] Wirtz, M.; „*Optimierung einer Methode zur Bestimmung von DNA-Addukten*“; Diplomarbeit, Bergischen Universität Wuppertal (2003)
- [208] Arlt, V. M., Glatt, H., Muckel, E., Pabel, U., Sorg, B. L., Schmeiser, H. H. und Phillips, D. H.; „*Metabolic activation of the environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone by human acetyltransferases and sulfotransferase*“; *Carcinogenesis*; **23** (2002) 1937 - 1945
- [209] Arlt, V. M., Suzuki, T., Zhan, L., Schmeiser, H. H., Honma, M., Hayashi, M. und Phillips, D. H.; „*DNA adducts and mutagenic specificity of the ubiquitous environmental pollutant 3-nitrobenzanthrone in Muta (TM) mouse*“; *Toxicology and Applied Pharmacology*; **197** (2004) 198 - 199
- [210] Enya, T., Suzuki, H., Watanabe, T., Hirayama, T. und Hisamatsu, Y.; „*3-nitrobenzanthrone, a powerful bacterial mutagen and suspected human carcinogen found in diesel exhaust and airborne particulates*“; *Environmental Science & Technology*; **31** (1997) 2772 - 2776
- [211] Cornelius, M. G., Bieler, C. A., Klein, R., Arlt, V. M., Wiessler, M., Phillips, D. H. und Schmeiser, H. H.; „*DNA adduct formation by the environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone after intratracheal instillation in rats*“; *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*; **371** (2005) R111 - R112
- [212] Ilankumaran, P., Pannell, L. K., Gebreselassie, P., Pilcher, A. S., Yagi, H., Sayer, J. M. und Jerina, D. M.; „*Patterns of resistance to exonuclease digestion of oligonucleotides containing polycyclic aromatic hydrocarbon diol epoxide adducts at N-6 of deoxyadenosine*“; *Chemical Research in Toxicology*; **14** (2001) 1330 - 1338
- [213] Mao, B., Li, B., Amin, S., Cosman, M. und Geacintov, N. E.; „*Opposite Stereoselective Resistance to Digestion by Phosphodiesterase-I and Phosphodiesterase-Ii of Benzo[A]Pyrene Diol Epoxide-Modified Oligonucleotide Adducts*“; *Biochemistry*; **32** (1993) 11785 - 11793
- [214] Chen, J. X., Zheng, Y., West, M. und Tang, M. S.; „*Carcinogens preferentially bind at methylated CpG in the p53 mutational hot spots*“; *Cancer Research*; **58** (1998) 2070 - 2075
- [215] Denissenko, M. F., Pao, A., Tang, M. S. und Pfeifer, G. P.; „*Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53*“; *Science*; **274** (1996) 430 - 432
- [216] 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*“; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; **94** (1997) 3893 - 3898
- [217] Denissenko, M. F., Pao, A., Pfeifer, G. P. und Tang, M. S.; „*Slow repair of bulky DNA adducts along the nontranscribed strand of the human p53 gene may explain the strand bias of transversion mutations in cancers*“; *Oncogene*; **16** (1998) 1241 - 1247
- [218] 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
- [219] Watzig, H. und Dette, C.; „*Capillary Electrophoresis (Ce) - A Review - Strategies for Method Development and Applications Related to Pharmaceutical and Biological Sciences*“; *Pharmazie*; **49** (1994) 83 - 96

- [220] Maniatis, T., Fritsch, E. F. und Sambrook, B.; „*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*“; Cold Spring Harbour Laboratory; (1982)
- [221] Ford, D. K. und Yerganian, G.; „*Observations on the Chromosomes of Chinese Hamster Cells in Tissue Culture*“; Journal of the National Cancer Institute; **21** (1958) 393 - &
- [222] Doehmer, J., Dogra, S., Friedberg, T., Monier, S., Adesnik, M., Glatt, H. und Oesch, F.; „*Stable Expression of Rat Cytochrome P-450Iib1 Cdna in Chinese-Hamster Cells (V79) and Metabolic-Activation of Aflatoxin-B1*“; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; **85** (1988) 5769 - 5773
- [223] Simi, S., Xiao, Y., Campagna, M., Doehmer, J. und Darroudi, F.; „*Dual-colour FISH analysis to characterize a marker chromosome in cytochrome P450 2B1 recombinant V79 Chinese hamster cells*“; Mutagenesis; **14** (1999) 57 - 61
- [224] Wolfel, C. et al.; „*Genetically Engineered V79 Chinese-Hamster Cells for Stable Expression of Human Cytochrome-P450Ia2*“; European Journal of Pharmacology-Environmental Toxicology and Pharmacology Section; **228** (1992) 95 - 102
- [225] Doehmer, J.; „*V79 Chinese-Hamster Cells Genetically-Engineered for Cytochrome-P450 and Their Use in Mutagenicity and Metabolism Studies*“; Toxicology; **82** (1993) 105 - 118
- [226] Bradley, M. O., Bhuyan, B., Francis, M. C., Langenbach, R., Peterson, A. und Huberman, E.; „*Mutagenesis by Chemical-Agents in V79 Chinese-Hamster Cells - A Review and Analysis of the Literature - A Report of the Gene-Tox Program*“; Mutation Research; **87** (1981) 81 - 142
- [227] Sawada, M. und Kamataki, T.; „*Genetically engineered cells stably expressing cytochrome P450 and their application to mutagen assays*“; Mutation Research-Reviews in Mutation Research; **411** (1998) 19 - 43
- [228] Krebsfaenger, N., Murdter, T. E., Zanger, U. M., Eichelbaum, M. F. und Doehmer, J.; „*V79 Chinese hamster cells genetically engineered for polymorphic cytochrome P450 2D6 and their predictive value for humans*“; Altex-Alternativen zu Tierexperimenten; **20** (2003) 143 - 154
- [229] Onderwater, R. C. A., Goeptar, A. R., Levering, P. R., Vos, R. M. E., Konings, P. N. M., Doehmer, J., Commandeur, J. N. M. und Vermeulen, N. P. E.; „*The use of macroporous microcarriers for the large-scale growth of V79 cells genetically designed to express single human cytochrome p450 isoenzymes and for the characterization of the expressed cytochrome p450*“; Protein Expression and Purification; **8** (1996) 439 - 446
- [230] Fenwick, R. G.; „*Reversion of A Mutation Affecting the Molecular-Weight of Hgpvt - Intragenic Suppression and Localization of X-Linked Genes*“; Somatic Cell Genetics; **6** (1980) 477 - 494
- [231] Nebert, D. W.; „*Suggestions for the nomenclature of human alleles: relevance to ecogenetics, pharmacogenetics and molecular epidemiology*“; Pharmacogenetics; **10** (2000) 279 - 290
- [232] Monier, S., Vanluc, P., Kreibich, G., Sabatini, D. D. und Adesnik, M.; „*Signals for the Incorporation and Orientation of Cytochrome-P450 in the Endoplasmic-Reticulum Membrane*“; Journal of Cell Biology; **107** (1988) 457 - 470
- [233] Stier, A.; „*Lipid Structure and Drug-Metabolizing Enzymes*“; Biochemical Pharmacology; **25** (1976) 109 - 113

- [234] Kappers, W. A., van Och, F. M. M., de Groene, E. M. und Horbach, G. J.; „*Comparison of three different in vitro mutation assays used for the investigation of cytochrome P450-mediated mutagenicity of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons*“; Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis; **466** (2000) 143 - 159
- [235] Frei, E., Bieler, C. A., Arlt, V. M., Wiessler, M. und Stiborova, M.; „*Covalent binding of the anticancer drug ellipticine to DNA in V79 cells transfected with human cytochrome P450 enzymes*“; Biochemical Pharmacology; **64** (2002) 289 - 295
- [236] Arlt, V. M., Glatt, H., Muckel, E., Pabel, U., Sorg, B. L., Seidel, A., Frank, H., Schmeiser, H. H. und Phillips, D. H.; „*Activation of 3-nitrobenzanthrone and its metabolites by human acetyltransferases, sulfotransferases and cytochrome P450 expressed in Chinese hamster V79 cells*“; International Journal of Cancer; **105** (2003) 583 - 592
- [237] Kiefer, F., Cumpelik, O., Reen, R., Doehmer, J. und Wiebel, F. J.; „*Arylamines Suppress Their Own Activation and That of Nitroarenes in V79 Chinese-Hamster Cells by Competing for Acetyltransferases*“; Environmental Health Perspectives; **102** (1994) 95 - 97
- [238] Bieler, C. A., Arlt, V. A., Wiessler, M. und Schmeiser, H. H.; „*DNA adduct formation by the environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone in V79 cells expressing human cytochrome P450 enzymes*“; Cancer Letters; **200** (2003) 9 - 18
- [239] Mclemore, T. L. et al.; „*Expression of Cyp1A1 Gene in Patients with Lung-Cancer - Evidence for Cigarette Smoke-Induced Gene-Expression in Normal Lung-Tissue and for Altered Gene-Regulation in Primary Pulmonary Carcinomas*“; Journal of the National Cancer Institute; **82** (1990) 1333 - 1339
- [240] Rendic, S. und DiCarlo, F. J.; „*Human cytochrome P450 enzymes: A status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors*“; Drug Metabolism Reviews; **29** (1997) 413 - 580
- [241] Lynch, A. M., Murray, S., Gooderham, N. J. und Boobis, A. R.; „*Exposure to and activation of dietary heterocyclic amines in humans*“; Critical Reviews in Oncology/Hematology; **21** (1995) 19 - 31
- [242] Kadlubar, F. F. et al.; „*Frequency of Urination and Its Effects on Metabolism, Pharmacokinetics, Blood Hemoglobin Adduct Formation, and Liver and Urinary-Bladder Dna Adduct Levels in Beagle Dogs Given the Carcinogen 4-Aminobiphenyl*“; Cancer Research; **51** (1991) 4371 - 4377
- [243] Badawi, A. F., Hirvonen, A., Bell, D. A., Lang, N. P. und Kadlubar, F. F.; „*Role of Aromatic Amine Acetyltransferases, Nat1 and Nat2, in Carcinogen-Dna Adduct Formation in the Human Urinary-Bladder*“; Cancer Research; **55** (1995) 5230 - 5237
- [244] Weber, W. W. und Hein, D. W.; „*N-Acetylation Pharmacogenetics*“; Pharmacological Reviews; **37** (1985) 25 - 79
- [245] Da Violante, G., Zerrouk, N., Richard, I., Provot, G., Chaumeil, J. C. und Arnaud, P.; „*Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco(2)/TC7 colon tumor cell cultures*“; Biological & Pharmaceutical Bulletin; **25** (2002) 1600 - 1603
- [246] Sexton, T. J.; „*Cytotoxicity of DmsO As Related to Components of A Turkey Semen Extender*“; Poultry Science; **58** (1979) 1024 - 1024
- [247] White, I. N. H.; „*A Continuous Fluorometric Assay for Cytochrome-P-450-Dependent Mixed-Function Oxidases Using 3-Cyano-7-Ethoxycoumarin*“; Analytical Biochemistry; **172** (1988) 304 - 310

- [248] Schmalix, W. A. et al.; „*Stable Expression of Human Cytochrome-P450 1A1 Cdna in V79 Chinese-Hamster Cells and Metabolic-Activation of Benzo[A]Pyrene*“; European Journal of Pharmacology-Environmental Toxicology and Pharmacology Section; **248** (1993) 251 - 261
- [249] Wolfel, C. et al.; „*Genetically Engineered V79 Chinese-Hamster Cells for Stable Expression of Human Cytochrome-P450Ia2*“; European Journal of Pharmacology-Environmental Toxicology and Pharmacology Section; **228** (1992) 95 - 102
- [250] Crespi, C. L., Miller, V. P. und Penman, B. W.; „*Microtiter plate assays for inhibition of human, drug-metabolizing cytochromes P450*“; Analytical Biochemistry; **248** (1997) 188 - 190
- [251] Frei, E.; *private Kommunikation* (2008)
- [252] Schmeiser, H. H.; *private Kommunikation* (2008)
- [253] Uno, S., Dalton, T. P., Dragin, N., Curran, C. P., Derkenne, S., Miller, M. L., Shertzer, H. G., Gonzalez, F. J. und Nebert, D. W.; „*Oral benzo[a]pyrene in Cyp1 knockout mouse lines: CYP1A1 important in detoxication, CYP1B1 metabolism required for immune damage independent of total-body burden and clearance rate*“; Molecular Pharmacology; **69** (2006) 1103 - 1114
- [254] Arlt, V. A.; *private Kommunikation* (2008)
- [255] Nebert, D. W.; „*Comparison of gene expression in cell culture to that in the intact animal: Relevance to drugs and environmental toxicants. Focus on "Development of a transactivator in hepatoma cells that allows expression of phase I, phase II, and chemical defense genes"*“; American Journal of Physiology-Cell Physiology; **290** (2006) C37 - C41
- [256] Nebert, D. W. und Dalton, T. P.; „*The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis*“; Nature Reviews Cancer; **6** (2006) 947 - 960
- [257] Schiewek, R.; „*Bestimmung des DNA-Methylierungsgrades in Ratten nach Behandlung mit 3-Nitrobenzanthon und Weiterentwicklung der kapillarelektrophoretischen Methode*“; Diplomarbeit, Bergische Universität Wuppertal (2005)
- [258] Wirtz, M.; *private Kommunikation* (2006)
- [259] Wirtz, M.; „*Kapillarelektrophoretische Bestimmung von DNA-Addukten als Biomarker der chemischen Kanzerogenese*“; Dissertation, Bergische Universität Wuppertal (2006)
- [260] Schmitz, O. J.; *private Kommunikation* (2008)
- [261] Scholtz, G., Braband, A., Tolley, L., Reimann, A., Mittmann, B., Lukhaup, C., Steuerwald, F. und Vogt, G.; „*Ecology - Parthenogenesis in an outsider crayfish*“; Nature; **421** (2003) 806 - 806
- [262] Martin, P., Kohlmann, K. und Scholtz, G.; „*The parthenogenetic Marmorkrebs (marbled crayfish) produces genetically uniform offspring*“; Naturwissenschaften; **94** (2007) 843 - 846
- [263] Vogt, G., Tolley, L. und Scholtz, G.; „*Life stages and reproductive marmorkrebs (Marbled crayfish) the first parthenogenetic decapod crustacean*“; Journal of Morphology; **261** (2004) 286 - 311
- [264] Vogt, G.; *private Kommunikation* (2006)

- [265] Alwes, F. und Scholtz, G.; „*Stages and other aspects of the embryology of the parthenogenetic Marmorkrebs (Decapoda, Reptantia, Astacida)*“; *Development Genes and Evolution*; **216** (2006) 169 - 184
- [266] Kot, J., Sicko, J. und Wozniak, M.; „*Oxidative stress during oxygen tolerance test*“; *International Marit.Health*; **54** (2003) 117
- [267] Brichta, M. e. al.; „*Lipid peroxide-related hemodilution during repetitive hyperbaric oxygenation*“; *Adv.Exp.Med.Biol.*; **345** (1994) 189
- [268] Bearden, S. E., Chevront, S. N., Ring, T. A. und Haymes, E. M.; „*Oxidative stress during a 3.5-hour exposure to 120 kPa(a) Po-2 in human divers*“; *Undersea & Hyperbaric Medicine*; **26** (1999) 159 - 164
- [269] Ames, B. N. und Shigenaga, M. K.; „*DNA and Free Radicls*“; Ellis Horwood, New York; (1994) 1
- [270] Bohr, V. A. und Stevnsner, T.; „*Mitochondrial DNA repair of oxidative damage in mammalian cells*“; *Gene*; **286** (2002) 127
- [271] Burton, G. und Wayner, D. D. M.; „*Free-Radicals in Biology and Medicine - Halliwell,B, Gutteridge,Jmc*“; *Nature*; **318** (1985) 322 - 322
- [272] Marnett, L. J.; „*Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage*“; *Toxicology*; **181** (2002) 219 - 222
- [273] Blair, I. A.; „*Lipid hydroperoxide-mediated DNA damage*“; *Experimental Gerontology*; **36** (2001) 1473 - 1481
- [274] Stadtman, E. R. und Berlett, B. S.; „*Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease*“; *Chemical Research in Toxicology*; **10** (1997) 485 - 494
- [275] 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
- [276] Beckman, K. B. und Ames, B. N.; „*Oxidative decay of DNA*“; *Journal of Biological Chemistry*; **272** (1997) 19633 - 19636
- [277] Lee, D. H., O'Connor, T. R. und Pfeifer, G. P.; „*Oxidative DNA damage induced by copper and hydrogen peroxide promotes CG -> TT tandem mutations at methylated CpG dinucleotides in nucleotide excision repair-deficient cells*“; *Nucleic Acids Research*; **30** (2002) 3566 - 3573
- [278] Boorstein, R. J., Chiu, L. N. und Teebor, G. W.; „*Phylogenetic Evidence of A Role for 5-Hydroxymethyluracil-Dna Glycosylase in the Maintenance of 5-Methylcytosine in Dna*“; *Nucleic Acids Research*; **17** (1989) 7653 - 7661
- [279] Weitzman, S. A., Turk, P. W., Milkowski, D. H. und Kozlowski, K.; „*Free-Radical Adducts Induce Alterations in Dna Cytosine Methylation*“; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; **91** (1994) 1261 - 1264
- [280] Butler, J.; „*Hyperbaric oxygen therapy in acute fracture management*“; *Emergency Medicine Journal*; **23** (2006) 571 - 572
- [281] Mills, C. und Bryson, P.; „*The role of hyperbaric oxygen therapy in the treatment of sternal wound infection*“; *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*; **30** (2006) 153 - 159



- [282] Cuthbertson, C. M. und Christophi, C.; „*Potential effects of hyperbaric oxygen therapy in acute pancreatitis*“; *Anz Journal of Surgery*; **76** (2006) 625 - 630
- [283] Kranke, P., Bennett, M., Schnabel, A., Wasiake, J., French, C., Kranke, E. und Roewer, N.; „*Hyperbaric oxygen therapy in acute cerebral ischemia*“; *Nervenheilkunde*; **25** (2006) 177 - &
- [284] Groger, M., Speit, G., Radermacher, P. und Muth, C. M.; „*Interaction of hyperbaric oxygen, nitric oxide, and heme oxygenase on DNA strand breaks in vivo*“; *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*; **572** (2005) 167 - 172
- [285] Panayiotidis, M. I., Rancourt, R. C., Allen, C. B., Riddle, S. R., Schneider, B. K., Ahmad, S. und White, C. W.; „*Hyperoxia-induced DNA damage causes decreased DNA methylation in human lung epithelial-like A549 cells*“; *Antioxidants & Redox Signaling*; **6** (2004) 129 - 136
- [286] Speit, G., Dennog, C., Radermacher, P. und Rothfuss, A.; „*Genotoxicity of hyperbaric oxygen*“; *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*; **512** (2002) 111 - 119
- [287] Shlush, L., Lansdorp, P. M., Abramovich, A., Berkovitch, R., Segev, Y., Shahar, H., Yehzekel, S., Skorecki, K. und Selig, S.; „*Chronic exposure to hyperbaric hyperoxia results in marked longitudinal telomere elongation in oxygen divers*“ (2006) Proposal
- [288] Skorecki, K., Selig, S. und Shlush, L.; „*Telomere Biology and DNA Damage in Divers and Cells Exposed to High Levels of Oxygen*“ (2006) Proposal
- [289] Neubauer, B., Zander, R. und Tetzlaff, K.; „*Mathematical model for the calculation of oxygen concentrations in a closed circuit oxygen rebreathing apparatus*“; *Aviation Space and Environmental Medicine*; **68** (1997) 722 - 725
- [290] 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
- [291] Engelhardt, H., Beck, W. und Schmitt, T.; „*Kapillarelektrophorese: Methoden und Möglichkeiten*“; Vieweg-Verlag (1994) 1 - 200
- [292] Schumann, C. A.; „*Analyse von endogenen Addukten in mitochondrieller DNA*“; Diplomarbeit bergische Universität Wuppertal, Analytische Chemie (2004)
- [293] Borst, P.; „*Ethidium DNA agarose gel electrophoresis: How it started*“; *Iubmb Life*; **57** (2005) 745 - 747
- [294] Lepecq, J. B. und Paoletti, C.; „*A New Fluorometric Method for Rna and Dna Determination*“; *Analytical Biochemistry*; **17** (1966) 100 - &
- [295] Waring, M. J.; „*Complex Formation Between Ethidium Bromide and Nucleic Acids*“; *Journal of Molecular Biology*; **13** (1965) 269 - &