

Nachweis von DNA-Schäden mittels Analyse von oxidierten Nukleosiden und deren Anwendung als Biomarker

Andreas Wagner und Gerhard Jahreis, Institut für Ernährungswissenschaften der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Reaktive Sauerstoffradikale und andere freie Radikale, die kontinuierlich in vivo gebildet werden, sind Zwischenprodukte endogener Prozesse bzw. exogen bedingt. Auf Grund ihrer Reaktionsfreudigkeit können sie unmittelbar mit den Nukleosiden der DNA, zum Beispiel unter Adduktbildung, reagieren. Durch reaktive Sauerstoffradikale induzierte Oxidationsvorgänge verursachen Veränderungen an den Nukleotiden der DNA, so dass daraus Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie Transkriptionsfehler bei der RNA-Synthese resultieren (Abb. 1). Durch Transkriptionsfehler während der DNA-Replikation kommt es zu Punktmutationen im Einzelstrang.

Diese Prozesse können durch eine Vielzahl von Antioxidanzien gehemmt werden oder sind durch zelluläre Reparationsmechanismen reversibel. Ist das Reparaturpotenzial der Zelle jedoch durch erbliche oder erworbene Faktoren geschädigt oder durch Überschreitung des Schwellenwertes überfordert, wird der DNA-Einzelstrang in der nachfolgenden Replikation fehlerhaft kopiert und dieser Fehler in die DNA-Sequenz irreversibel integriert. Findet dieser Vorgang in einem sensiblen Teil der DNA, vor allem im Bereich von Schlüsselgenen statt, ist eine maligne Transformation der Zelle möglich.

Derzeit sind mehr als 20 Oxidationsprodukte bekannt, die auf direkte oxidative DNA-Schädigung kausal zurückzuführen sind. Eines dieser Reaktionsprodukte ist 8-Oxo-2'-deoxyguanosin (8-Oxo-dG, Tab. 1) [1].

Entstehung und Pathophysiologie des 8-Oxo-dG

Um den Energiebedarf zu decken, werden in aeroben Organismen Oxidationen auf Zellebene durchgeführt. Die oxidativen Stoffwechselprozesse führen dabei zwangsläufig zu unerwünschten Sauerstoffspezies, wie dem Superoxidanionradikal (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroxylradikal (OH^\bullet) und Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$). Das Hydroxylradikal ist wegen seines starken Oxidationspotenzials die reaktivste Sauerstoffspezies.

Eine Hauptquelle von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sind die Mitochondrien, in denen fast der gesamte Sauerstoffumsatz stattfindet. Durch Single-Elektron-

Transfer entsteht das Superoxidanionradikal (O_2^-), das eine geringe Aktivität zeigt, aber in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgewandelt wird. Bei Anwesenheit von Übergangsmetallen, wie Eisen und Kupfer, wird Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zum Hydroxylradikal (OH^\bullet) reduziert [4-7].

Das Superoxidanionradikal und das Wasserstoffperoxid können auch als Nebenprodukte der Phagozytose von Makrophagen über das NADPH-Oxidase-System freigesetzt werden. Dies ist besonders beim oxidativen Burst der Leukozyten der Fall.

Weiterhin können ROS durch die Aktivität von Sauerstoff übertragenden Enzymen, bei der Metabolisierung von toxischen Fremdstoffen durch das Cytochrom P450-System und bei der Oxidation von Fett- und Aminosäuren (z. B. Arachidonsäure) entstehen [8, 9].

Neben diesen endogenen Faktoren, die von der Stoffwechselaktivität abhängig sind, kann sich der oxidative Stress durch exogene Einflüsse, wie UV- und ionisierende Strahlung, Ozon und verschiedene Umweltgifte, erhöhen [10-13]. Der individuelle Lebensstil (Rauchen, Sport, Übergewicht) ist ein zusätzlicher Parameter, der den oxidativen Stress beeinflusst [14-22].

Ein weiterer Bildungsweg für Hydroxylradikale führt über die Spaltung des Peroxynitrit-Ions (ONOO^\bullet). Das Peroxynitrit-Ion ist ein reaktives Molekül, das bei der Reaktion von Stick-

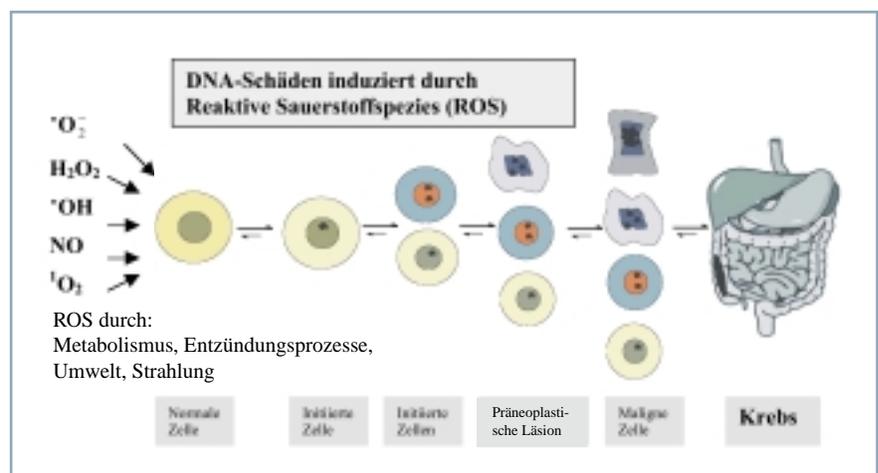


Abb. 1: Mögliche Rolle von ROS bei einem Mehrstufenprozess der Kanzerogenese [4]

oxid (NO) mit dem Superoxidradikal (O_2^-) entsteht und von Phagozyten zur Abwehr eingesetzt wird [23, 24]. Peroxynitrit-Ionen können aber auch direkt mit den Proteinen reagieren und diese nitrieren oder die DNA deaminieren. In diesen Fällen wird nicht mehr vom oxidativen, sondern vom nitrosativen Stress gesprochen [25].

Im Laufe der Evolution hat die Zelle einige sehr wirksame protektive Methoden entwickelt, um zellständige Makromoleküle vor ROS wirksam zu schützen. Trotzdem können Hydroxylradikale wie auch andere ROS wegen ihrer starken Elektronegativität Makromoleküle oxidieren. Das Ausmaß der Schädigung von zellulären Proteinen, Lipiden und der DNA kann damit die Reparaturkapazität des Organismus überschreiten. Dadurch wird die Genese zahlreicher Erkrankungen, z. B. Alzheimer, Parkinson, Krebs, Multiple Sklerose, Diabetes mellitus Typ 2, rheumatoide Arthritis und Herzinfarkt, begünstigt [26–32].

Entstehung von 8-OxidG im Organismus

Die ROS können prinzipiell jedes Molekül oder jede zelluläre Struktur angreifen, wobei die Schädigung der DNA hinsichtlich der Tumorgenese der entscheidende Aspekt ist [27–29]. Die oxidative Schädigung der DNA führt zu einer Vielzahl von modifizierten Purin- und Pyrimidin-Basen [1–3].

Von den DNA-Basen bzw. deren entsprechenden Nucleosiden ist die Purinbase Guanin auf Grund ihres niedrigen Ionisierungspotenzials die instabilste und damit der Hauptangriffspunkt für Sauerstoffradikale [30]. In Gegenwart von ROS wird bevorzugt das Kohlenstoffatom in der C8-Position des Guanins hydroxyliert. Das entstandene Endprodukt ist 8-Oxoguanin (8-OxoG) und das entsprechende Nucleosid ist 8-Oxo-2'-deoxyguanosin (8-OxidG) [2, 3] (Abb. 2).

8-OxidG kann in verschiedenen Keto-Enol-Tautomerieformen existieren. Die bevorzugte Form ist die 6,8-Diketoform. Deshalb wird oft die Bezeichnung 8-Oxo-2'-deoxyguanosin für das entstandene Oxidationsprodukt verwendet [2] (Abb. 2). Bei der Oxidierung des Guanins kann auch eine Ringöffnung erfolgen, wobei 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin entsteht. Weitere Oxidationsprodukte sind in Abbildung 3 dargestellt [3, 31].

Tab. 1: Die wichtigsten DNA-Oxidationsprodukte und ihre Bezeichnungen [3]

Abkürzung	Bezeichnung
8-OxidG/ 8-OHdG	8-Oxo-2'-deoxyguanosin/8-Hydroxy-2'-deoxyguanosin
8-OxoG	8-Oxo-guanin
8-OxidA/8-OHdA	8-Oxo-2'-deoxyadenosin/8-Hydroxy-2'-deoxyadenosin
5-HMUra/ 5-OHMU	5-(Hydroxymethyl)uracil
5-OHCyt	5-Hydroxycytosin

Tab. 2: Übersicht der Methoden zur Bestimmung von DNA-Oxidationsaddukten

Marker	Methode	Vorteile	Nachteile
8-OxidG	HPLC-ECD	Sehr empfindlich und genau; niedrige Gerätekosten; weit verbreitet	Kann nur elektrochemisch aktive Substanzen detektieren (8-OxidG, 5-OHdCyt, 5-OHdUrd, 8-OxidA)
8-OxidG	GC/MS	Mehrzahl der oxidierten Modifikationen nachweisbar	Durch Derivatisierung künstlich erhöhte Level an 8-OxidG; relativ teuer
8-OxidG	LC-MS/MS	Theoretisch leistungsstärkste Methode	In Entwicklung; relativ teuer
8-OxidG	Immunologische Methoden	Kommerziell verfügbar	Nicht validiert; Spezifitätsprobleme
Oxidierter Pyrimidine, 8-OxidG	Enzymatische Methoden	Sehr empfindlich; schnelle und günstige Methode	Benutzt spezifische Reparaturenzyme zur Detektion

Auf Grund der chemischen Reaktionsfreudigkeit der DNA, insbesondere des Guanins, und durch die permanente Generierung von ROS durch den natürlichen Zellstoffwechsel ist 8-OxidG in der DNA ständig präsent und fällt daher nach DNA-Reparatur im Zellmetabolismus laufend als endogenes Ausscheidungsprodukt an. Eine Guaninhydroxylierung tritt unter physiologischen Bedingungen im

Organismus des Menschen 10 000 Mal pro Zelle und Tag auf. Physiologische Werte liegen bei einer hydroxylierten Guanin-Base je 10^5 Guanin-Basen [2, 32–34]. Dieses *steady state* wird jedoch bei Überschreiten einer bestimmten Exposition gegenüber Schadstoffen übersteuert. Es entsteht überproportional viel 8-OxidG, und der Reparaturmechanismus der Zelle wird dadurch überfordert. Als mögliche Folge

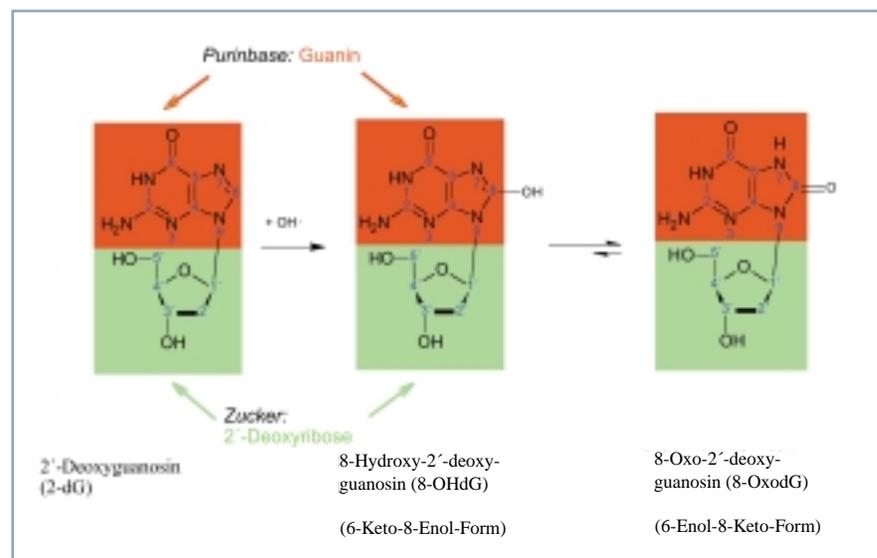


Abb. 2: Entstehung von 8-Oxo-2'-deoxyguanosin und des entsprechenden Tautomers durch Angriff eines reaktiven Sauerstoffradikales (ROS) am C8-Atom des Purinringes. Das vorherrschende Tautomer ist die 6-Enol-8-Keto-Form.

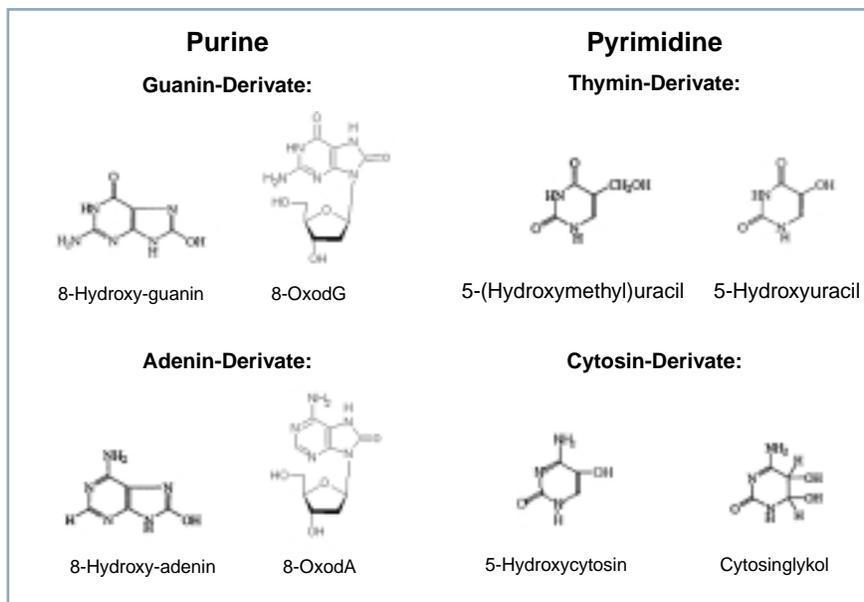


Abb. 3: Strukturen der am häufigsten untersuchten DNA-Oxidationsprodukte [3, 31]

dieser Überlastung kann es zu einer malignen Transformation kommen. Nicht reparierte, spontane endogene DNA-Schäden sind nicht nur Ursache maligner Erkrankungen, sondern auch verantwortlich für den Alterungsprozess höherer Organismen. Da es altersabhängig zu einer Akkumulation von DNA-Schäden kommt, steigt mit zunehmendem Alter auch das Risiko, an Krebs zu erkranken [1, 35–39].

8-OxodG wird im Organismus kaum metabolisiert und fast ausschließlich renal ausgeschieden, daher bietet es sich als Biomarker für Personen mit Exposition gegenüber oxidativem Stress an.

Bedeutung von 8-OxodG

Wird 8-OxodG nicht entfernt, entstehen im Rahmen der DNA-Replikation Fehler. Guanin paart sich regulär mit Cytosin, Thyminidin mit Adenosin.

Da sich 8-OxodG jedoch fälschlicherweise mit Adenosin paart, wird die Basensequenz der Nukleinsäurenkette in der Folge irreversibel verändert. Durch diesen Vorgang der Guanin-Thymin-Transversion (G→T-Transversion) kann es zum Funktionsverlust des Gens und infolge dessen zur malignen Entartung der Zelle kommen (Abb. 4) [40–42].

G→T-Transversionen im Tumorsuppressorgen p53 sind die häufigsten *hot-spot*-Mutationen in menschlichen Tumoren. Dies ist kritisch, da sich die Mutationen auf wenige *hot-spot*-Codons konzentrieren und besonders häufig im Codon 248 auftreten. Mutationen dieses Codons erhöhen die Kanzerogenese insbesondere im Darmgewebe [43–45].

Reparatur und renale Elimination der oxidierten Basen

DNA-Reparatur-Prozesse sorgen dafür, dass 8-OxodG und andere oxidierte DNA-Addukte kontinuierlich wieder aus der DNA entfernt werden. Für die Reparatur der DNA-Schäden existieren verschiedene Mechanismen. Die Reparatur erfolgt meistens durch den Ausschluss der modifizierten Base als solche oder als Nukleotid [46, 47]. Bei der Nukleotidexzisionsreparatur wird die geschädigte Base als Teil eines Oligonukleotids aus der DNA entfernt. Die entstehende Lücke wird durch anschließende Neusynthese aufgefüllt. Dieser Mechanismus trägt insbesondere zur Reparatur von Einzelstrangbrüchen bei und nur zu einem geringen Teil zur Reparatur oxidativ geschädigter DNA. Durch spezifische DNA-Glykosylasen werden bei der Basenexzisionsreparatur die geschädigten, falsch gepaarten oder DNA unüblichen Basen erkannt und als freie Basen aus der DNA entfernt. Die entstehenden Fehlstellen werden durch Insertion einer Base gefüllt oder in einen Strangbruch überführt. Dieser kann durch Neusynthese geschlossen werden. Für oxidative DNA-Schäden und besonders für die Reparatur des 8-OxoG ist die Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG-Protein) von Bedeutung. Das FPG-Protein entfernt spezifisch 8-Oxo-guanin, Fapy-guanin und Fapy-adenin sowie geringe Mengen 8-Oxo-adenin aus der DNA [48–50]. Oxidative Basenschäden werden außerdem von der Endonuklease III erkannt und repariert [51].

Unter physiologischen Bedingungen werden pro Tag im Mittel 130–600

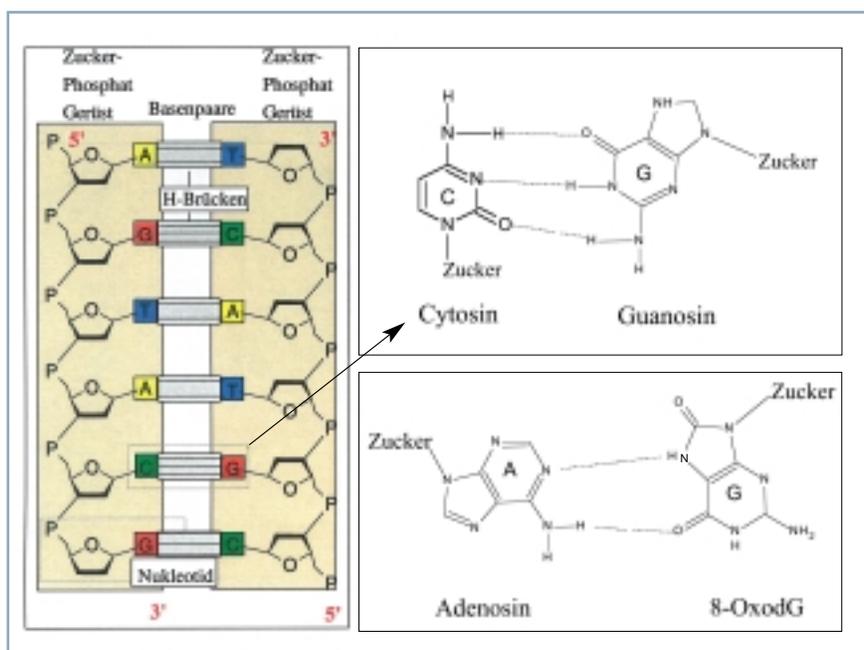


Abb. 4: Bei der DNA-Replikation ist Cytosin das mit Guanin korrespondierende Nukleotid. Bei einer oxidativen Schädigung des Guanosins kommt es zu einer fehlerhaften Paarung mit Adenosin (siehe rechts unten). Da Adenosin bei der DNA-Replikation mit Thyminidin korrespondiert, entsteht eine mutagene Guanin-Thymin-Transversion.

pmol 8-OxodG/kg Körpergewicht mit dem Urin ausgeschieden. Die Gesamtmenge beträgt beim Menschen ungefähr $5,1 \times 10^{15}$ Moleküle pro Tag [33, 52, 53]. Die Generierung und Ausscheidung von 8-OxodG ist eine spezifische Kenngröße für verschiedene Spezies. Es findet sich eine enge negative Korrelation zur Lebenserwartung, d. h. kurzlebige Säugetiere, wie Maus oder Ratte, scheiden höhere Mengen von 8-OxodG aus (Abb. 5) [32].

8-OxodG ist eine chemisch stabile Substanz, eine Konzentrationsveränderung konnte auch nach längerer Lagerung von Urin nicht nachgewiesen werden [53]. Deshalb bietet sich 8-OxodG als sensitiver und einfach zu erhebender Parameter für das biologische Monitoring im Bereich der Ernährungsforschung an.

Quantitative 8-OxodG-Analyse

8-OxodG wurde erstmals 1984 von KASAI und NISHIMURA mittels HPLC und elektrochemischer Detektion (HPLC-ECD) nachgewiesen [54]. Nachfolgend wurde eine Reihe unterschiedlicher Methoden zur Quantifizierung von 8-OxodG entwickelt (Tab. 2).

Am stärksten verbreitet ist die Analyse mittels HPLC-ECD. Die elektrochemische Detektion zeichnet sich durch eine niedrige Nachweisgrenze von 2–10 fmol und durch eine hohe Richtigkeit aus. Zur Verwendung kommen amperometrische und coulometrische Techniken. Durch Auswahl des Elektrodenpotenzials kann eine selektive Detektion erfolgen [55, 56]. Um Koelutionen auszuschließen, ist eine Aufreinigung der Urinproben notwendig.

Für die GC/MS ist ein Derivatisierungsschritt notwendig, da in der GC nur flüchtige Substanzen untersucht werden können. Die Nukleoside sind auf Grund des Zuckerrestes schwer flüchtig. Durch eine Hydrolyse werden die Nukleoside in Zucker und Base gespalten und dann derivatisiert. Detektiert werden nach chromatografischer Trennung nur die oxidierten Basen [57]. Mit der GC/MS werden oft höhere Gehalte an 8-OxodG gemessen (10- bis 100fach) [58]. Verantwortlich für die Artefaktbildung von 8-OxodG sind wahrscheinlich die hohen Temperaturen während der Hydrolyse [60, 61]. Die Nachweisgrenze der GC/MS für 8-OxodG beträgt 18 fmol [61].

Die LC-MS/MS ist eine relativ neue Methode, die die Vorteile der HPLC-

ECD und der GC/MS verbindet. So können mehrere Parameter mit einer hohen Empfindlichkeit bestimmt werden. Eine Derivatisierung wie bei der GC ist nicht notwendig. Für 8-OxodG konnten Nachweisgrenzen von 7,5 und 10 fmol erreicht werden [62, 63].

Immunologische Methoden geben Information über den Ort und das Vorkommen von Schäden im Gewebe. Die Detektion von 8-OxodG erfolgt *in situ* mittels Antikörpern. Nach der Aufarbeitung wird die Probe mit Antikörpern versetzt, die 8-OxodG in der DNA identifizieren. Durch Zugabe eines zweiten Antikörpers können die Schäden mikroskopisch lokalisiert werden [64–66]. Der Nachteil dieser Methoden ist, dass nicht alle geschädigten Stellen der DNA gefunden werden und die Antikörper an modifizierte Basen binden, die dem 8-OxodG ähnlich sind.

Im Comet-Assay, auch bezeichnet als Einzelzell-Gel-Elektrophorese, werden oxidierte DNA-Basen mit Hilfe verschiedener Enzyme nachgewiesen. Die Reparaturenzyme entfernen die Schäden aus der DNA, und gleichzeitig kommt es zu Strangbrüchen [67, 68]. Nach Anfärben können die Strangbrüche durch Wanderung im

angelegten elektrischen Feld als Schweif mikroskopisch nachgewiesen werden. Das am häufigsten verwendete Enzym ist das FPG-Protein von *E. coli*, welches auch als Fapy Glykosylase bekannt ist [69, 70]. Der Comet-Assay zeichnet sich durch eine hohe Empfindlichkeit und kurze Analysenzeiten aus. Er ist jedoch weniger spezifisch als HPLC-ECD, GC/MS und LC-MS/MS, da auch die nicht-oxidativen DNA-Schäden nachgewiesen werden. Ein weiterer Nachteil ist die mangelnde Reproduzierbarkeit der Ergebnisse [71].

Untersucht werden leicht zugängliche Zellen bzw. Gewebeteile oder Urin (Tab. 3 u. 4). Die in Zellen gemessenen 8-OxodG-Gehalte repräsentieren das Gleichgewicht (*steady state*) zwischen oxidativer Schädigung und Reparatur. Die ermittelten Gehalte sind nur für die betrachteten Zellen spezifisch [72, 73]. Um 8-OxodG in Zellen zu bestimmen, ist eine Isolation aus der Zelle nötig. Durch die Aufarbeitung kommt es zur Artefaktbildung und damit zu überhöhten Werten. Weiterhin existieren zwischen den Methoden Diskrepanzen, die einen Vergleich erschweren.

Die im Urin ermittelten Werte spiegeln die Ganzkörperbelastung wider.

Tab. 3: Übersicht zu einigen Untersuchungen in Zellen und Geweben unter Verwendung von Biomarkern des oxidativen Stresses

Jahr	Gewebe/Zellen	Marker	Methode	Studie	Referenz
1990	Leukozyten	8-OxodG	HPLC-ECD	Einfluss von Rauchen	84
1991	Leukozyten	5-OHmU	GC/MS-SIM	normale Diät vs. fettreduzierte Diät	88
1994	Leukozyten	8-OxodG	HPLC-ECD	Raucher vs. Nichtraucher	86
1994	Gesundes Gewebe vs. Krebsgewebe	8-OxoG 5-OHmU FapyGua ¹	GC/MS-SIM	Patienten mit Lungenkrebs vs. gesunde Probanden	105
1994	Gesundes Gewebe vs. Krebsgewebe	8-OxodG	HPLC-ECD	Patienten mit Nierenkrebs vs. gesunde Probanden	117
1994	Lebergewebe	8-OxodG	HPLC-ECD	Chronische Hepatitis, Leberkrebs	110
1995	Gesundes Gewebe vs. Krebsgewebe	8-OxodG	HPLC-ECD	Patienten mit Brustkrebs vs. gesunde Probanden	106
1995	Plazenta	8-OxodG	HPLC-ECD vs. ELISA	Einfluss von Rauchen während Schwangerschaft, Methodenvergleich	87
1998	Serum Plasma Urin	8-OxodG	HPLC-ECD vs. ELISA	Wirkung von Vitamin C als Antioxidans	116
1999	Urin Lymphozyten	8-OxodG 8-EPG ² MDA ³	HPLC-ECD ELISA Fluoreszenz	Einfluss verschiedener Gemüse- und Obstsorten auf die oxidative Schädigung	96
2001	Brustdrüsengewebe Epithelzellen	5-OHmdU	GC/MS	Einfluss der Fettzufuhr auf oxidative Schäden bei Ratten	89

¹ FapyGua: 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin, ² 8-EPG: 8-Isoprostan-F_{2α}, ³ MDA: Malondialdehyd

Tab. 4: Übersicht zu einigen Untersuchungen im Urin hinsichtlich Biomarker der oxidativen Schädigung

Jahr	Marker	Methode	Studie	Referenz
1990	dTg ¹ 8-OxoG	GC/MS	Krebspatienten vor und nach Strahlenbehandlung	108
1994	8-OxodG	HPLC-ECD	Einfluss von Rauchen	74
1995	8-OxodG	HPLC-ECD	Wirkung von β -Karotin bei Rauchern	97
1995	8-OxodG	HPLC-ECD	Wirkung von Rosenkohl auf oxidative Schädigung	92
1998	8-OxodG	HPLC-ECD	Einfluss unterschiedlicher Fette auf die DNA-Schädigung	90
1998	8-OxodG	HPLC-ECD	Einfluss von Rauchen und Entzug	83
1999	8-OxodG 8-EPG MDA	HPLC-ECD ELISA Fluoreszenz	Einfluss verschiedener Gemüse- und Obstsorten auf die oxidative Schädigung	96
2000	8-OxodG	HPLC-ECD	Einfluss von Vitamin C und E auf oxidative Schädigung	98
2001	8-OxodG	HPLC-ECD ELISA GC/MS LC-MS/MS	Einfluss von Rauchen, BMI, Fleischaufnahme, Arbeitsbedingungen	85
2003	8-OxodG	HPLC-ECD	Einfluss von Rauchen und Entzug, Vitamin-C- Supplementation	82
2003	8-OxodG	HPLC-ECD	Einfluss von Kaffee auf die oxidative Schädigung bei Ratten	101
2003	8-OxodG	HPLC-ECD	Protektive Wirkung von Muttermilch	115

¹dTg: Thymidin-glykol

Das mit dem Urin ausgeschiedene 8-OxodG wird nicht weiter metabolisiert. Da 8-OxodG eine stabile Verbindung ist, kommt es während der Probenaufarbeitung nicht zur Artefaktbildung [72, 73]. Es erscheint sinnvoll, die Ausscheidungsrate von 8-OxodG mit der Messung des *steady state* zu kombinieren, um die Reparaturrate in Abhängigkeit von der Schädigungsrate zu untersuchen.

Beispiele für Anwendungen

Alter

In Studien mit unterschiedlichen Altersgruppen konnte festgestellt werden, dass mit zunehmendem Alter die Urinkonzentration an Reparaturprodukten abnimmt. Für die 8-OxodG-Konzentration in Leukozyten ergab sich jedoch eine lineare Zunahme mit dem Alter von jährlich $0,09 \pm 0,01$ Modifikationen pro 10^5 Deoxyguanosin-Molekülen [74]. Ähnliche Akkumulationen wurden in mitochondrialer DNA aus Muskeln sowie in der nukleären und mitochondrialen DNA des Hirngewebes gefunden [75, 76]. Die Akkumulation von 8-OxodG in der nukleären DNA von Hirngewebe be-

trägt etwa 0,04 Modifikationen pro 10^5 Deoxyguanosin-Molekülen im Jahr oder 2 Schädigungen pro Zelle und Tag [76].

Anhand der erhobenen Daten ergibt sich die Aussage, dass die Schädigungsrate mit dem Alter zunimmt, bei gleichzeitiger Erniedrigung der Metabolisierungsrate. Das *steady state* wird auf Grund einer fehlenden Reparatur erhöht.

Rauchen

In mehreren Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass Rau-

chen zu einer Erhöhung der Urinkonzentration von 8-OxodG um 30–50 % führt [33, 77–79]. Kreatinin-korrigierte Werte sowie auf der Analyse von 8-OxoG (korrespondierende Base) beruhende Messungen bestätigen die Aussage [80, 81]. Eine signifikante Reduzierung der Aus-

scheidung von 8-OxodG mit dem Urin und ein Abfall der Serumkonzentration konnten mit Beendigung des Zigarettenkonsums erreicht werden [82, 83]. Die Betrachtung des *steady state* lässt keine eindeutige Aussage über die Beziehung zwischen der 8-OxodG-Konzentration und dem Rauchen zu. In den zellulären Matrices konnten ähnliche Analysenergebnisse ermittelt werden [84, 85], während in einer weiteren Studie keine Veränderung der 8-OxodG-Konzentration gemessen wurde [88]. Eine Untersuchung zur oxidativen Schädigung der DNA aus der Plazenta von Raucherinnen und Nichtraucherinnen mittels ELISA ergab eine signifikant höhere 8-OxodG-Konzentration bei den Raucherinnen [87].

Ernährung und Antioxidanzien

Seit längerem wird vermutet, dass eine fettreiche Ernährung mit einem erhöhten Krebsrisiko korreliert. So wurde in einer Studie mit 21 Frauen, die ein erhöhtes Brustkrebsrisiko aufwiesen, der Energieanteil aus Fett von 30 % auf 15 % reduziert. Untersucht wurde die Konzentration von 5-Hydroxyuracil in der DNA von Lymphozyten. In der Gruppe mit der fettreduzierten Diät konnten um 68 % niedrigere 5-Hydroxyuracil-Konzentrationen gegenüber der Kontrollgruppe gemessen werden [88]. Eine vergleichbare Studie wurde mit Ratten durchgeführt, wobei die Nahrung im Fettanteil zwischen 3–20 % variierte. Die Ergebnisse des Rattenversuchs stimmten mit denen der Humanstudie überein [89]. Weitere Untersuchungen konnten einen ähnlichen Effekt für 8-OxodG nachweisen [90]. Die oxidative Schädigung scheint dabei vom Sättigungsgrad der Fettsäuren unabhängig zu sein. So war die Ausscheidung von 8-OxodG im Urin der Versuchstiere,

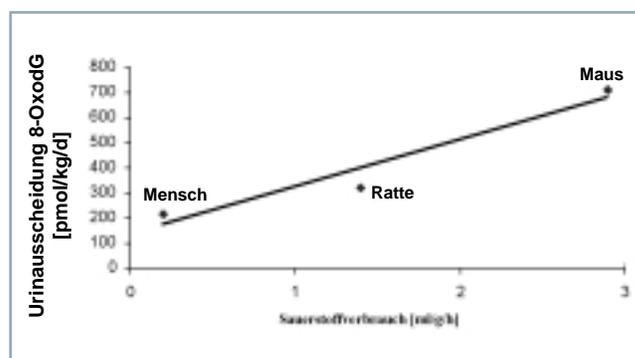


Abb. 5: Vergleich der Urinausscheidung von 8-OxodG gegenüber der spezifischen metabolischen Größe für drei Spezies [32]

die eine Diät mit gesättigten Fettsäuren erhielten, nicht signifikant höher als die von Versuchstieren, die hoch ungesättigte Fettsäuren erhielten [90].

Ein protektiver Effekt auf die DNA konnte durch den Verzehr von Rosenkohl in Human- und Rattenstudien sowie durch Tomaten in Humanstudien nachgewiesen werden [91–93]. Verursacht werden die verminderten 8-OxodG-Konzentrationen nach Verzehr von Kreuzblütlern wie Rosenkohl oder Brokkoli durch sekundäre Pflanzenstoffe [94, 95]. Durch die Erhöhung des Konsums verschiedener Obst- und Gemüsearten wurde die Urin- sowie die Serumkonzentration an 8-OxodG signifikant reduziert [96].

Die gegenwärtige Datenlage ermöglicht keine eindeutige Aussage, ob die Supplementation mit Antioxidantien zu einer Verminderung der oxidativen Schädigung der DNA beiträgt. So hatte die tägliche Zufuhr von 20 mg β -Karotin über einen Zeitraum von 20 Wochen keinen Einfluss auf die Konzentration von 8-OxodG im Urin von Rauchern [97]. Zu ähnlichen Ergebnissen führte die Supplementation mit Vitamin C und Tocopherol [98–100].

Kaffee ist eines der am häufigsten konsumierten psychoaktiven Getränke. In einer Untersuchung erhielten Ratten mit der Nahrung Kaffeepulver in unterschiedlichen Mengen. Nach 130 Tagen war die Urinkonzentration an 8-OxodG bei Ratten mit der koffeinhaltigen Diät signifikant erhöht gegenüber der Kontrollgruppe. Dieser Effekt könnte durch Chlorogensäure, einem Kaffeebestandteil, entstehen. Es wird diskutiert, dass Chlorogensäure eine prooxidative Wirkung in Anwesenheit von CuCl_2 besitzt [101], während ihr in Abwesenheit von Übergangsmetall-Ionen eine antioxidative Kapazität zugeschrieben wird [118].

Krankheiten

Oxidative DNA-Schäden wurden im Zusammenhang mit einer Vielzahl von immunologischen und kanzerogenen Erkrankungen untersucht. So wurden Lungen-, Darm- und Brustkrebs unter Verwendung verschiedener DNA-Modifikationen mittels GC/MS untersucht. Dabei lagen die Konzentrationen im kanzerogenen Gewebe für die meisten Marker höher als in gesundem Gewebe [102–105]. Dagegen konnten mit HPLC-ECD keine signifikanten Unterschiede der 8-OxodG-Konzentration in Geweben

von Patienten mit Brustkrebs im Vergleich zu gesunden Probanden gefunden werden [106]. Im Urin von Krebspatienten wurden jedoch signifikant erhöhte Werte von 8-OxodG gemessen. Unterschiede ergaben sich auch zwischen den verschiedenen Krebsarten. Weiterhin erhöhte sich der oxidative Stress und damit die 8-OxodG-Konzentration durch Chemotherapie [107, 108]. In einer anderen Untersuchung zur Wirkung von Zytostatika konnte eine Erhöhung der Urinkonzentration von 8-OxoG um 50 % im Vergleich zur Kontrollgruppe durch Messung mit GC/MS nachgewiesen werden [109].

Erhöhte Konzentrationen von 8-OxodG wurden mittels GC/MS im Lebergewebe von Patienten mit chronischer Hepatitis gefunden. Die chronische Hepatitis wird als ein wichtiger Risikofaktor für die Entwicklung von Hepato-Karzinomen diskutiert [110].

Im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen werden Biomarker der oxidativen DNA-Schädigung gehäuft untersucht. So wurden erhöhte Gehalte an 8-OxodG in den Lymphozyten und im Urin von Patienten mit rheumatoider Arthritis festgestellt [111]. In klinischen Studien konnten bei Patienten mit Nierenerkrankungen durch Diabetes mellitus signifikant höhere Werte von 8-OxodG gemessen werden als in der Kontrollgruppe [112–114].

Schlussbemerkungen

Der Zusammenhang zwischen Exposition mit reaktiven Sauerstoffspezies und oxidativer Schädigung der DNA gilt als gesichert. Reaktive Sauerstoffspezies werden durch endogene und exogene Prozesse gebildet. Trotz verschiedener Schutzmechanismen, wie Reparaturprozesse oder Antioxidanzien, kommt es zu einer Schädigung der DNA. Die Oxidation der DNA führt zu Zellschädigungen, die für degenerative Erkrankungen und Krebs verantwortlich sind.

Oxidative DNA-Addukte können als Marker für die Schädigung des Organismus durch mutagene und kanzerogene Substanzen verwendet werden. Das am besten untersuchte oxidative DNA-Addukt ist 8-OxodG. 8-OxodG führt zu einer G→T-Transversion und ist dadurch die stärkste mutagene Base, die besonders in tumorrelevanten Genen gefunden wird. Es existieren noch weitere DNA-Modifikationen, die aber bisher kaum untersucht

wurden. Zur Untersuchung der modifizierten DNA wurden verschiedene Methoden entwickelt. Sehr viel versprechend ist die HPLC-MS/MS. Eine Validierung der Methoden ist notwendig. Mit den untersuchten Biomarkern ist eine Aussage über Schädigungsrate und Reparatur möglich.

Es existiert eine Vielzahl von Studien mit zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen. Wegen der inter- und intraindividuellen Unterschiede sowie der Komplexität der DNA-Schädigung sind weitere standardisierte Untersuchungen notwendig. Relevante Resultate für die Ernährung lassen sich anhand der gegenwärtigen Daten nur für die gut etablierten protektiven Effekte von Obst und Gemüse erkennen. Diese Lebensmittel führen zu einer Absenkung der für die Kanzerogenese verantwortlichen oxidativen DNA-Schäden. Allerdings sind dafür weder Vitamin C noch β -Karotin und möglicherweise auch nicht die Flavonoide oder Vitamin E verantwortlich. Diskutiert wird, ob die protektiven Effekte auf einen Vitaminkomplex und/oder auf andere sekundäre Pflanzenstoffe zurückzuführen sind.

Literatur:

1. Marnett, L.J.: Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21: 361-370 (2000).
2. Halliwell, B.: Can oxidative DNA damage be used as a biomarker of cancer risk in humans? Problems, resolution and preliminary results from nutritional supplementation studies. *Free Radical Res* 29: 469-486 (1998).
3. Dizdaroglu, M.: Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Bio Med* 10: 225-242 (1992).
4. Loft, S.; Poulsen, H.E.: Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J Mol Med* 74: 297-312 (1996).
5. Boveris, A.; Chance, B.: The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 134: 707-716 (1973).
6. Sohal, R.S.: Aging, cytochrome oxidase activity, and hydrogen peroxide release by mitochondria. *Free Radical Bio Med* 14: 583-588 (1993).
7. Wallace, D.C.: Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283: 1482-1488 (1999).
8. Wei, Y.H.; Lu, C.Y.; Lee, H.C.; Pang, C.Y.; Ma, Y.S.: Oxidative damage and mutation to mitochondrial DNA and age-dependent decline of mitochondrial respiratory function. *Ann NY Acad Sci* 854: 155-170 (1998).
9. Ames, B.N.; Shigenaga, M.K.; Hagen, T.M.: Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *P Natl Acad Sci USA* 90: 7915-7922 (1993).
10. Davies, K.J.A.: Oxidative stress: the paradox of aerobic life. In: *Rice-Evans C., Halliwell B., Lunt G.G. (eds.): Free Radicals and Oxidative Stress: Environment, Drugs and Food Additives*, Portland Press, London 1-31 (1995).
11. Ji, L.L.; Leeuwenburgh, C.; Leichtweis, S.; Gore, M.; Fiebig, R.; Hollander, J.; Bejma, J.: Oxidative stress and aging. Role of exercise

Zusammenfassung

Nachweis von DNA-Schäden mittels Analyse von oxidierten Nucleosiden und deren Anwendung als Biomarker

A. Wagner, G. Jahreis, Jena

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden kontinuierlich in den Zellen durch endogene und exogene Prozesse gebildet. Die reaktivste Sauerstoffspezies ist das Hydroxyl-Radikal. Infolge einer unzureichenden antioxidativen Abwehr der ROS kommt es zur Schädigung der DNA. Im Tierexperiment wurde die oxidative Schädigung der DNA als ein wichtiger Faktor in der Kanzerogenese nachgewiesen. Da nicht alle oxidativen Schäden beseitigt werden, kommt es altersabhängig zur Akkumulation der geschädigten Nucleoside. Die Reparaturprodukte der oxidativen Schädigung werden renal ausgeschieden. Die in diesem Zusammenhang häufigste DNA-Modifikation betrifft die Bildung von 8-Oxo-2'-deoxyguanosin (8-OxodG). Sie ist auch die am stärksten mutagene DNA-Schädigung. Die oxidierten DNA-Basen und Nucleoside dienen als Biomarker für das Ausmaß der DNA-Schädigung. Die Biomarker reflektieren die Schädigungsrate in bestimmten Zielorganen oder die Reparaturrate der mit dem Urin ausgeschiedenen DNA-Modifikationen. Es besteht eine direkte Korrelation der Ausscheidungsrate von 8-OxodG mit der Stoffwechselaktivität, einer Hauptquelle des endogenen oxidativen Stresses. In verschiedenen Studien wurden widersprüchliche Ergebnisse in Bezug auf eine Energiereduzierung bzw. eine Nahrungs-Supplementation mit Antioxidantien erzielt. Anhand der Datenlage gilt als gesichert, dass eine Ernährung mit Obst und Gemüse zu einer Konzentrationsminderung von 8-OxodG im Urin führt. Eine fettarme Ernährung reduziert in den Leukozyten die Konzentration von 5-Hydroxymethyl-Uracil, einem weiteren Biomarker des oxidativen Stresses. Die oxidativen DNA-Modifikationen werden außerdem als Biomarker im Zusammenhang mit verschiedenen Krankheiten und Krebsarten untersucht.

Ernährungs-Umschau 51 (2004), S. 178–184

- and its influences on antioxidant systems. *Ann NY Acad Sci* 854: 102-117 (1998).
12. Kelly, F.J.; Mudway, I.; Krishna, M.T.; Holgate, S.T.: The free radical basis of air pollution: focus on ozone. *Resp Med* 89: 647-656 (1995).
 13. Sies, H.: Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 215: 213-219 (1993).
 14. Cutler, R.G.: Human longevity and aging: possible role of reactive oxygen species. *Ann NY Acad Sci* 621: 1-28 (1991).
 15. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C.: Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219: 1-14 (1984).
 16. Halliwell, B.: Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimisation of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radical Res* 25: 57-74 (1996).
 17. Pryor, W.A.: Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. *Free Radical Bio Med* 28: 141-164 (2000).
 18. Sohal, R.S.; Weindruch, R.: Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273: 59-63 (1996).
 19. Khan, A.U.; Wilson, T.: Reactive oxygen species as cellular messengers. *Chem Biol* 2: 437-445 (1995).
 20. Ischiropoulos, H.; Zhu, L.; Beckman, J.S.: Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 298: 446-451 (1992).
 21. DeRojas-Walker, T.; Tamir, S.; Ji, H.; Wishnok, J.S.; Tannenbaum, S.R.: Nitric oxide induces oxidative damage in addition to deamination in macrophage DNA. *Chem Res Toxicol* 8: 473-477 (1995).
 22. Cottrell, D.A.; Blakely, E.L.; Borthwick, G.M.; Johnson, M.A.; Taylor, G.A.; Brierley, E.J.; Ince, P.G.; Turnbull, D.M.: Role of mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Ann NY Acad Sci* 908: 199-207 (2000).
 23. Knight, J.A.: Diseases related to oxygen-derived free radicals. *Ann Clin Lab Sci* 25: 111-121 (1995).
 24. Knight, J.A.: Free radicals: their history and current status in aging and disease. *Ann Clin Lab* 28: 331-346 (1998).
 25. Knight, J.A.: The biochemistry of aging. *Adv Clin Chem* 35: 1-62 (2000).
 26. Williams, L.R.: Oxidative stress, age-related neurodegeneration, and the potential for neurotrophic treatment. *Cerebrovasc Brain Met Rev* 7: 55-73 (1995).
 27. Ames, B.N.; Gold, L.S.; Willett, W.C.: The causes and prevention of cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5258-5265 (1995).
 28. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C.: Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press, 1999.
 29. Feig, D.I.; Reid, T.M.; Loeb, L.A.: Reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Res* 54: 1890-1894 (1994).
 30. Seidel, C.A.M.; Schulz, A.; Sauer M.H.M.: Nucleobase-specific quenching of fluorescent dyes. 1. Nucleobase one redox potentials and their correlation with static and dynamic quenching efficiencies. *J Phys Chem* 100: 5541-5553 (1996).
 31. Dizdaroglu, M.: Chemical determination of oxidative DNA damage by gas chromatography-mass spectrometry. *Method Enzymol* 234: 3-16 (1994).
 32. Shigenaga, M.K.; Gimeno, C.J.; Ames, B.N.: Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. *P Natl Acad Sci USA* 86: 9697-9701 (1989).
 33. Loft, S.; Vistisen, K.; Ewertz, M.; Tjønneland, A.; Overvad, K.; Poulsen, H.E.: Oxidative DNA-damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in man: influence of smoking, gender and body mass index. *Carcinogenesis* 13: 2241-2247 (1992).
 34. Loft, S.; Poulsen, H.E.: Markers of oxidative damage to DNA: antioxidants and molecular damage. *Method Enzymol* 300: 166-184 (1999).
 35. Croteau, D.L.; Bohr, V.A.: Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells. *J Biol Chem* 272: 25409-25412 (1997).
 36. Floyd, R.A.: Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc Soc Exp Biol Med* 222: 236-245 (1999).
 37. Kasai, H.: Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res* 387: 146-163 (1997).
 38. Ottender, M.; Lutz, W.K.: Correlation of DNA adduct levels with tumor incidence: carcinogenic potency of DNA adducts. *Mutat Res* 424: 237-247 (1999).
 39. Wang, D.; Kreutzer, D.A.; Essigmann, J.M.: Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions. *Mutat Res* 400: 99-115 (1998).
 40. Shibutani, S.; Takeshita, M.; Grollman, A.P.: Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation damaged base 8-oxodG. *Nature* 349: 431-434 (1991).
 41. Kuchino, Y.; Mori, F.; Kasai, H.; Inoue, H.; Iwai, S.; Miura, K.; Ohtsuka, E.; Nishimura, S.: Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues. *Nature* 327: 77-79 (1987).
 42. Kamiya, H.; Murata-Kamiya, N.; Fujimuro, M.; Kido, K.; Inoue, H.; Nishimura, S.; Masutani, C.; Hanaoka, F.; Ohtsuka, E.: Comparison of incorporation and extension of nucleotides in vitro opposite 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine) in hot spots of the c-Ha-ras gene. *Jpn J Cancer Res* 86: 270-276 (1995).
 43. Hollstein, M.; Sidransky, D.; Vogelstein, B.; Harris, C.C.: p53 mutations in human cancers. *Science* 253: 49-52 (1991).
 44. Harris, C.C.; Hollstein, M.: Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 329: 1318-1327 (1993).
 45. Green, M.S.; Bennett, W.P.; Hollstein, M.; Harris, C.C.: Mutation in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 54: 4855-4878 (1994).
 46. Ramotar, D.; Demple, B.: Enzymes that repair oxidative damage to DNA. In: Halliwell B., Aruoma O.I. (eds): DNA and free radicals. Horwood, Chichester (1993).
 47. Bemple, B.; Harrison, L.: Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu Rev Biochem* 63: 915-948 (1994).
 48. Boiteux, S.; Gajewski, E.; Laval, J.; Dizdaroglu, M.: Substrate specificity of the Escherichia coli Fpg protein (formamidopyrimidine-DNA glycosylase): excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. *Biochemistry* 31: 106-110 (1992).
 49. Bohr, V.A.; Taffe, B.G.; Larminat, F.: DNA repair, oxidative stress and aging. In: Cutler RG, Packer L, Bertram J, Mori A (eds): Oxidative stress and aging. Birkhauser Basel (1995).
 50. Karakaya, A.; Jaruga, P.; Bohr, V.A.; Grollman, A.P.; Dizdaroglu, M.: Kinetics of excision of purine lesions from DNA by Escherichia coli FPG protein. *Nucleic Acids Res* 25: 474-479 (1997).
 51. Collins, A.R.; Ai-Guo, Ma; Duthie, S.J.: The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat Res* 336: 69-77 (1995).

52. Shigenaga, M.K.; Ames, B.N.: Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: A biomarker of in vivo oxidative DNA damage. *Free Radical Bio Med* 10: 211-216 (1991).
53. Loft, S.; Wierik, E.J.M.V.; Van der Berg H.; Poulsen, H.E.: Energy restriction and oxidative DNA damage. *Cancer Epidem Biomar Prev* 4: 515-519 (1995).
54. Kasai, H.; Nishimura, S.: Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acid Res.* 12: 2137-2145 (1984).
55. Hofer, T.; Möller, L.: Optimization of the workup procedure for the analysis of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine with electrochemical detection. *Chem Res Toxicol* 15: 426-432 (2002).
56. Berger, M.; Anselmino, C.; Mouret, J.-E.; Cadet, J.: High performance liquid chromatography-electrochemical assay for monitoring the formation of 8-oxo-7,8-dihydroadenine and its related 2'-deoxyribonucleoside. *J. Liq Chrom* 13: 929-940 (1990).
57. Jaruga, P.; Dizdaroglu, M.: Repair of products of oxidative DNA base damage in human cells. *Nucleic Acids Res* 24: 1389-1394 (1996).
58. Halliwell, B.; Dizdaroglu, M.: The measurement of oxidative damage to DNA by HPLC and GC/MS techniques. *Free Radical Res Commun* 16: 75-87 (1992).
59. Hofer, T.; Möller, L.: Reduction of oxidation during the preparation of DNA and analysis of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Chem Res Toxicol* 11: 882-887 (1998).
60. Hofer, T.: Oxidation of 2'-deoxyguanosine by H₂O₂-ascorbate: evidence against free OHo and thermodynamic support for two-electron reduction of H₂O₂. *J Chem Soc Perk T* 2: 210-213 (2001).
61. Teixeira, A.J.R.; Gommers-Ampt, J.H.; Van de Werken, G.; Westra, G.J.; Stavenuiter, J.F.C.; De Jong A.P.J.M.: Method for the analysis of oxidized nucleosides by gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Biochem* 214: 474-483 (1993).
62. Frelon, S.; Douki, T.; Ravanat, J.-L.; Pouget, J.-P.; Tornabene, C.; Cadet, J.: High-performance liquid-chromatography-tandem mass spectrometry measurement of radiation-induced base damage to isolated and cellular DNA. *Chem Res Toxicol* 13: 1002-1010 (2000).
63. Weimann, A.; Belling, D.; Poulsen, H.E.: Measurement of 8-oxo-2'-deoxyguanosine and 8-oxo-2'-deoxyadenosine in DNA and human urine by high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Free Radical Bio Med* 30: 757-764 (2001).
64. Park, E.-M.; Shigenaga, M.K.; Degan, P.; Korn, T.S.; Kitzler, J.W.; Wehr, C.M.; Kolachana, P.; Ames, B.N.: Assay of excised oxidative DNA lesions: Isolation of 8-oxoguanine and its nucleoside derivatives from biological fluids with a monoclonal antibody column. *P Natl Acad Sci. USA* 89 (1992).
65. Hattori, Y.; Nishigori, C.; Tanaka, T.; Uchida, K.; Nakaido, O.; Osawa, T.; Hiai, H.; Imamura, S.; Toyokuni, S.: 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine is increased in epidermal cells of hairless mice after chronic ultraviolet B exposure. *J Invest Dermatol* 107: 733-737 (1997).
66. Soulanakis, R.P.; Melamed, R.J.; Bepalov, I.A.; Wallace, S.S.; Beckman, K.B.; Ames, B.N.; Taatjes, D.J.; Janssen-Heininger, Y.M.W.: Fluorescence detection of 8-oxoguanine in nuclear and mitochondrial DNA of cultured cells using a recombinant fab and confocal scanning laser microscopy. *Free Radical Bio Med* 28: 987-998 (2000).
67. Collins, A.; Dobson, V.; Dusinka, M.; Kennedy, G.; Stetina, R.: The comet assay: what can it really tell us? *Mutat. Res* 375: 183-193 (1997).
68. Collins, A.: The comet assay: a novel approach to measuring DNA oxidation. In: *Aruoma, O.I.; Halliwell, B. (eds.): DNA and Free Radicals: Techniques, Mechanisms & Applications.* OICA International, Saint Lucia (1998).
69. Bhagwat, M. and Gerlt, J.A.: 3'- and 5'-strand cleavage reactions catalyzed by the Fpg protein from *Escherichia coli* occur via successive β - and α -elimination mechanisms, respectively. *Biochemistry* 35: 659-665 (1996).
70. Tchou, J.; Grollman, A.P.: The catalytic mechanism of Fpg protein. *J Biol Chem* 270: 11671-11677 (1995).
71. Gedik, M.; Wood, S.G.; Collins, A.R.: Measuring oxidative damage to DNA; HPLC and the comet assay compared. *Free Radical Res* 29: 609-615 (1998).
72. Loft, S.; Deng, X.S.; Tuo, J.: Experimental study of oxidative DNA damage. *Free Radical Res* 29: 525-539 (1998).
73. Cooke, M.S.; Evans, M.D.; Herbert, K.E.; Lunec, J.: Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine-source, significance and supplements. *Free Radical Res* 32: 381-397 (2000).
74. Lagorio, S.; Tagesson, C.; Forastiere, F.; Axelsson, O.; Carere, A.: Exposure to benzene and urinary concentrations of 8-hydroxydeoxyguanosine, a biological marker of oxidative damage to DNA. *Occup Environ Med.* 51: 739-743 (1994).
75. Hayakawa, M.; Hattori, K.; Sugiyama, S.; Ozawa, T.: Age associated oxygen damage and mutations in mitochondrial DNA in human hearts. *Biochem Biophys Res C* 189: 979-985 (1992).
76. Mecocci, P.; MacGarvey, U.; Kaufman, A.E.; Koontz, D.; Shoffner, J.M.; Wallace, D.C.; Beal, M.F.: Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. *Ann Neurol* 34: 609-616 (1993).
77. Tagesson, C.; Källberg, M.; Leanderson, P.: Determination of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine by coupled-column high-performance liquid chromatography with electrochemical detection: a noninvasive assay for in vivo oxidative DNA damage in humans. *Toxicol Method J.* 242-251 (1992).
78. Loft, S.; Astrup, A.; Buemann, B.; Poulsen, H.E.: Oxidative DNA damage correlates with oxygen consumption in humans. *FASEB J* 8: 534-537 (1994).
79. Inoue, T.; Mu, Z.; Sumikawa, K.; Adachi, K.; Okochi, T.: Effect of physical exercise on the content of 8-hydroxydeoxyguanosine in nuclear DNA prepared from human lymphocytes. *Jpn J Cancer Res* 84: 720-725 (1993).
80. Suzuki, J.; Inoue, Y.; Suzuki, S.: Changes in urinary level of 8-hydroxyguanine by exposure to reactive oxygen-generating substances. *Free Radical Bio Med* 18: 431-436 (1995).
81. Kasai, H.; Iwamoto-Tanaka, N.; Miyamoto, T.; Kawanami, K.; Kawanami, S.; Kido, R.; Ikeda, M.: Life style and urinary 8-hydroxydeoxyguanosine, a marker of oxidative DNA damage: Effects of exercise, working conditions, meat intake body mass index, and smoking. *Jpn J Cancer Res* 92: 9-15 (2001).
82. Inoue, T.; Hayashi, M.; Takayanagi, K.; Morooka, S.: Oxidative DNA damage is induced by chronic cigarette smoking, but repaired by abstinence. *J Health Sci* 49: 217-220 (2003).
83. Prieme, H.; Loft, S.; Klarlund, M.; Grønbaek, K.; Tonnesen, P.; Poulsen H.E.: Effect of smoking cessation on oxidative DNA modification estimated by 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine excretion. *Carcinogenesis* 19: 347-351 (1998).
84. Kiyosawa, H.; Suko, M.; Okudaira, H.; Murata, K.; Miyamoto, T.; Chung, M.H.; Kasai, H.; Nishimura, S.: Cigarette smoking induces formation of 8-hydroxydeoxyguanosine, one of the oxidative DNA damages in human peripheral leucocytes. *Free Radical Res C* 11: 23-27 (1990).
85. Asami, S.; Manabe, H.; Miyake, J.: Cigarette smoking induces an increase in oxidative DNA damage, 8-hydroxyguanosine, in a central site of the human lung. *Carcinogenesis* 18: 1763-1766 (1997).
86. Takeuchi, T.; Nakajima, M.; Ohta, Y.; Mure, K.; Takeshita, T.; Morimoto, K.: Evaluation of 8-hydroxydeoxyguanosine, a typical oxidative DNA damage, in human leukocytes. *Carcinogenesis* 15: 1519-1523 (1994).
87. Yin, B.; Whyatt, R.M.; Perera, F.P.; Randall, M.C.; Cooper T.B.; Santella R.M.: Determination of 8-hydroxydeoxyguanosine by an immunoaffinity chromatography-monoclonal antibodybased ELISA. *Free Radical Bio Med* 18: 1023-1032 (1995).
88. Djuric, Z.; Heilbrun, L.K.; Reading, B.A.; Boomer, A.; Valeriote, F.A.; Martino, S.: Effects of low-fat diet on levels of oxidative damage to DNA in human peripheral nucleated blood cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 83: 766-769 (1991).
89. Djuric, Z.; Lewis, S.M.; Lu, M.H.; Mayhugh, M.; Tang, N.; Hart, R.W.: Effect of varying dietary fat levels on rat growth and oxidative DNA damage. *Nutr Canc* 39: 214-219 (2001).
90. Loft, S.; Thorling, E.B.; Poulsen, H.E.: High fat diet induced oxidative DNA damage estimated by 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine excretion in rats. *Free Radical Res* 29: 595-600 (1998).
91. Verhagen, V.; Poulsen, H.E.; Loft, S.: Reduction of oxidative DNA damage in humans by Brussels sprouts. *Carcinogenesis* 16: 969-970 (1995).
92. Deng, X.S.; Tuo, J.; Poulsen, H.E.; Loft, S.: Prevention of oxidative DNA damage in rats by Brussels sprouts. *Free Radical Res* 28: 323-333 (1998).
93. Rehman, A.; Bourne, L.C.; Halliwell, B.; Rice-Evans, C.: Tomato consumption modulates oxidative DNA damage in humans. *Biochem Biophys Res C* 262: 828-831 (1999).
94. Prester, T.; Holtclaw, W.D.; Zhang, Y.; Talalay, P.: Chemical and molecular regulation of enzymes that detoxify carcinogens. *P Natl Acad. Sci USA* 90: 2965-2969 (1993).
95. Zhang, Y.; Kensler, T.W.; Cho, C.G.; Posner, G.H.; Talalay, P.: Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates. *P Natl. Acad Sci USA* 91: 3147-3150 (1994).
96. Thompson, H.J.; Heimendinger, J.; Haegle, A.; Sedlack, S.M.: Effect of increased vegetable and fruit consumption on markers of oxidative cellular damage. *Carcinogenesis* 20: 2261-2266 (1999).
97. Van Poppel, G.; Poulsen, H.E.; Loft, S.; Verhagen, H.: No influence of beta-carotene on oxidative DNA damage in male smokers. *J Natl Cancer Inst* 87: 310-311 (1995).
98. Huang, H.-Y.; Helzouer, K.J.; Appel, L.J.: The effects of vitamin C and vitamin E on oxidative DNA damage: Results from a randomized controlled trial. *Cancer Epidem Biomar* 9: 647-652 (2000).
99. Porkkala-Sarataho, E.; Salonen, J.T.; Nyyssönen, K.; Kaikkonen J; Salonen R.; Ristonmaa U.; Diczfalusy U.; Brigelius-Flohe R.; Loft S.; Poulsen H. E.: Long-term effects of vitamin E, vitamin C, and combined supplementation on urinary 7-hydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine, serum cholesterol oxidation products, and oxidation resistance of lipids in nonde-

- pleted men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 2087-2093 (2000).
100. Beatty, E.R.; England, T.G.; Geissler, C.A.; Aruoma, O.I.; Halliwell, B.: Effect of antioxidant vitamin supplementation on markers of DNA damage and plasma antioxidants. *P Nutr Soc* 58: 44A (abstr) (1999).
 101. Sakamoto, W.; Isoura, H.; Fujie, K.: Coffee increases levels of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine in rats. *Toxicology* 183: 255-263 (2003).
 102. Olinski, R.; Zastawny, T.; Budzbon, J.; Skokowski, J.; Zegarski, W.; Dizdaroglu, M.: DNA base modification in chromatin of human cancerous tissues. *FEBS Lett* 309: 193-198 (1992).
 103. Malins, D.C.; Haimanot, R.: Major alterations in the nucleotide structure of DNA in cancer of the female breast. *Cancer Res* 51: 5430-5432 (1991).
 104. Malins, D.C.; Holmes, E.H.; Polissar N.L.; Gunselman, S.: The etiology of breast cancer. Characteristic alterations in hydroxyl radical-induced DNA base lesions during oncogenesis with potential for evaluating incidence risk. *Cancer Lett* 71: 3036-3042 (1993).
 105. Jaruga, P.; Zastawny, T.H.; Skokowski, J.; Dizdaroglu, M.; Olinski, R.: Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme activities in human lung cancer. *FEBS Lett* 341: 59-64 (1994).
 106. Nagashima, M.; Tsuda, H.; Takenoshita, S.; Nagamachi, Y.; Hirohashi, S.; Yokota, J.; Kasai, H.: 8-hydroxydeoxyguanosine levels in DNA of human breast cancer are not significantly different from those of non-cancerous breast tissues by the HPLC-ECD method. *Cancer Lett* 90: 157-62 (1995).
 107. Tagesson, C.; Kallberg, M.; Klintonberg, C.; Starkhammar, H.: Determination of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine by automated coupled-column high performance liquid chromatography: a powerful technique for assaying in vivo oxidative DNA damage in cancer patients. *Eur J Cancer* 31A: 934-940 (1995).
 108. Bergtold, D.S.; Berg, C.D.; Simic, M.G.: Urinary biomarkers in radiation therapy of cancer. *Adv Exp Med Biol* 264: 311-316 (1990).
 109. Rozalski, R.; Gackowski, D.; Roszkowski, K.; Foksinski, M.; Olinski, R.: The level of 8-hydroxyguanosine, a possible repair product of oxidative DNA damage, is higher in urine of cancer patients than in control subjects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11: 1072-1075 (2002).
 110. Shimoda, R.; Nagashima, M.; Sakamoto, M.; Yamaguchi, N.; Hirohashi, S.; Yokota, J.; Kasai, H.: Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-deoxyguanosine, in humans livers with chronic hepatitis. *Cancer Res* 54: 3171-3172 (1994).
 111. Bashir, S.; Harris, G.; Denman, M.A.; Blake D.R.; Winyard, P.G.: Oxidative DNA damage and cellular sensitivity to oxidative stress in human autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* 52: 659-666 (1993).
 112. Tsuboi, H.; Kouda, K.; Takeuchi, H.; Takigawa, M.; Masamoto, Y.; Takeuchi, M.; Ochi, H.: 8-Hydroxyguanosine in urine as an index of oxidative damage to DNA in the evaluation of atopic dermatitis. *Brit J Dermatology* 138: 1033-1035 (1998).
 113. Dandona, P.; Thusu, K.; Cook, S.; Snyder, B.; Makowski, J.; Armstrong, D.; Nicotera, T.: Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet* 347: 444-445 (1996).
 114. Hinokio, Y.; Suzuki, S.; Hirai, H.; Suzuki, C.; Suzuki, M.; Toyota, T.: Urinary excretion of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine as a predictor of the development of diabetic nephropathy. *Diabetologia* 45: 877-882 (2002).
 115. Shohji, H.; Oguchi, S.; Shimizu, T.; Yamashiro, Y.: Effect of human breast milk on urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine excretion in infants. *Pediatr Res* 53: 850-852 (2003).
 116. Cooke, M.S.; Evans, M.D.; Podmore, I.D.; Herbert, K.E.; Mistry, N.; Mistry, P.; Hickenbotham, P.T.; Hussien, A.; Griffiths, H.R.; Lunec, J.: Novel repair action of vitamin C upon in vivo oxidative DNA damage. *FEBS Letters* 363: 363-367 (1998).
 117. Okamoto, K.; Toyokuni, S.; Uchida, K.; Ogawa, O.; Takenawa, J.; Kahehi, Y.; Kinoshita, H.; Hattori-Nakakuki, Y.; Hiai, H.; Yoshida, O.: Formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in human renal-cell carcinoma. *Int J Cancer* 58: 825-829 (1994).
 118. Watzl, B.; Rechkemmer, G.: Phenolsäuren. *Ernährungs-Umschau* 48: 413-416 (2001).

Korrespondenzadresse:
Dipl. Chem. Andreas Wagner
Prof. Dr. Gerhard Jahreis
 Institut für Ernährungswissenschaften
 Friedrich-Schiller-Universität Jena
 Dornburger Straße 24
 07743 Jena
 E-Mail: b6jage@uni-jena.de