

Entstehung von oxidativen Stressmarkern in
DNA und RNA nach der Behandlung mit den
Hormonen Angiotensin II und Aldosteron
in vitro und *in vivo*

Vergleich von drei Analysemethoden zum Nachweis von
8-Oxo-2'-desoxyguanosin in LLC-PK1-Zellen

Dissertation zur Erlangung
des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Philipp Mandel
aus Bremen

Würzburg 2014

Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am

Gutachter der schriftlichen Arbeit

1. Gutachter: Frau PD Dr. Nicole Schupp

2. Gutachter: Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums

1. Prüfer: _____

2. Prüfer: _____

3. Prüfer: _____

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums

Doktorurkunde ausgehändigt am

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Hypertonie und Krebs	1
1.2 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)	2
1.2.1 Das intrazelluläre RAAS	5
1.2.2 Wirkung von Angiotensin II durch den AT ₁ -Rezeptor	6
1.2.3 Wirkung von Aldosteron durch den Mineralokortikoidrezeptor	7
1.2.4 Inhibitoren des AT ₁ - und des Mineralokortikoidrezeptors	9
1.3 Oxidativer Stress und reaktive Sauerstoffspezies	10
1.4 Nomenklatur der verwendeten oxidativen Stressmarker	12
1.5 Oxidative Schädigung und Reparatur der DNA	13
1.5.1 Die häufigsten Reaktionen von Guanin mit ROS	13
1.5.1.1 Die Reaktion von Guanin mit dem Hydroxylradikal OH [•]	15
1.5.1.2 Die Reaktion von Guanin mit Singulett-Sauerstoff ¹ O ₂	16
1.5.1.3 Oxidation von 8-Oxoguanin	18
1.5.2 Folgen und Reparatur der DNA-Schäden	19
1.5.2.1 Die Basenexzisionsreparatur	20
1.5.2.2 Nukleotidexzisions- und DNA-Basenfehlpaarungsreparatur	20
1.6 Oxidative Schädigung und Reparatur der RNA	21
1.7 Die oxidative Schädigung des Nukleotidpools	22
1.8 Biomarker und Nachweismethoden für oxidative Schäden	24
1.9 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie	25
2 Fragestellung der Arbeit	26
3 Material und Methoden	27
3.1 Material	27
3.1.1 Zellkultur	38
3.1.2 Ernten der LLC-P1-Zellen	38
3.1.3 Generierung der Zellkulturproben	38
3.1.3.1 Dosis- und zeitabhängige Versuche mit Angiotensin II und Aldosteron	39
3.1.3.2 Behandlungen mit Methyleneblau und H ₂ O ₂	40

3.1.4	Verschiedene Behandlungen der Tierversuche	40
3.1.4.1	Intervention gegen die Wirkung von Angiotensin II	41
3.1.4.2	Mutation des Gens AT _{1a} bei C57BL/6-Mäusen.....	41
3.1.4.3	Knockout des Gens NOX4 bei C57BL/6-Mäusen.....	42
3.1.4.4	Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 durch verschiedene Behandlungen von Sprague-Dawley-Ratten	42
3.2	Methoden	43
3.2.1	Vitalitätstest.....	43
3.2.2	Comet-Assay	43
3.2.3	Bestimmung von Formamidopyrimidin-Glykosylase sensitiven Stellen.	45
3.2.4	Detektion von 8-oxodG durch immunzytochemische Färbung.....	45
3.2.5	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Tandem- Massenspektrometrie zum Nachweis oxidativer Stressmarker	46
3.2.5.1	Das Prinzip einer Säulenschaltung.....	46
3.2.5.2	Interne Standards für die HPLC-MS/MS-Messungen.....	48
3.2.5.3	Herstellung des internen Standards [¹⁵ N ₅]-8-oxodG.....	48
3.2.5.4	Isolierung und Hydrolyse der DNA	49
3.2.5.5	Isolierung und Hydrolyse der RNA	51
3.2.5.6	Isolierung von 8-oxodG aus dem Zytosol	52
3.2.5.7	Vorbereitung der Urinproben	52
3.2.5.8	HPLC-MS/MS-Methoden.....	53
3.2.5.9	Nachweis von 8-oxodG und 8-oxoGuo aus Nukleinsäuren	53
3.2.5.10	Nachweis der oxidativen Stressmarker in biologischen Flüssigkeiten	55
3.2.5.11	Nachweis der oxidativen Stressmarker nach Weimann et al.....	55
3.2.5.12	Nachweis der oxidativen Stressmarker nach Crow et al.....	56
3.2.5.13	Bestimmung von 2'-Desoxyguanosin und Guanosin aus den Nukleinsäuren.....	57
3.2.5.14	Einstellungen der verwendeten Massenspektrometer.....	57
3.2.5.15	Standardreihen und Qualitätskontrollen der HPLC- MS/MS-Messungen	58
3.2.6	Statistik	61
4	Ergebnisse.....	62
4.1	Vitalität der LLC-PK1-Zellen	62
4.2	Nachweisbarkeit von 8-oxodG mittels HPLC-MS/MS.....	63

4.2.1	Zunahme von 8-oxodG in DNA und cT-DNA nach Methylenblau-Behandlung.....	64
4.2.2	Zunahme von zytosolischem 8-oxodG nach Methylenblau-Behandlung65	
4.3	8-oxoGuo als Marker für oxidativ geschädigte RNA.....	65
4.3.1	H ₂ O ₂ führt zu einem dosisabhängigen Anstieg von 8-oxoGuo in der RNA ..	66
4.3.2	H ₂ O ₂ führt zu einem zeitabhängigen Anstieg von 8-oxoGuo in der RNA ..	67
4.4	Schädigung der DNA und RNA von LLC-PK1-Zellen durch Angiotensin II und Aldosteron.....	67
4.4.1	Auswirkung von Angiotensin II auf DNA und RNA in vitro	68
4.4.1.1	Angiotensin II bewirkt eine dosisabhängige Schädigung der DNA .	68
4.4.1.2	Zeitabhängige DNA-Schädigung durch Angiotensin II	70
4.4.1.3	Immunzytochemische Färbung zeigt zeitabhängigen Anstieg von 8-oxodG nach Angiotensin-II-Behandlung.....	71
4.4.1.4	Angiotensin II bewirkt einen Anstieg von 8-oxodG in der DNA.....	73
4.4.1.5	Kein Anstieg von 8-oxodG im Zytosol nach Angiotensin-II-Behandlung	74
4.4.1.6	Angiotensin II führt zu keinem Anstieg von 8-oxoGuo in der RNA .	75
4.4.2	Auswirkung von Aldosteron auf DNA und RNA in vitro	76
4.4.2.1	Aldosteron bewirkt eine dosisabhängige Schädigung der DNA.....	76
4.4.2.2	Aldosteron führt zu zeitunabhängigem DNA-Schaden	77
4.4.2.3	Immunzytochemische Färbung zeigt Anstieg von 8-oxodG nach Behandlung mit Aldosteron	79
4.4.2.4	Aldosteron bewirkt keinen Anstieg von 8-oxodG in der DNA.....	81
4.4.2.5	Aldosteron bewirkt keinen Anstieg von 8-oxodG im Zytosol.....	82
4.4.2.6	Aldosteron führt zu keinem Anstieg von 8-oxoGuo in der RNA.....	83
4.5	Schädigung der DNA und RNA durch Angiotensin II und Aldosteron <i>in vivo</i> 84	
4.5.1	Anstieg von 8-oxodG in Nierenzell-DNA nach Behandlung mit Angiotensin II	85
4.5.2	Exkretionsraten der oxidativen Stressmarker aus dem Interventionsversuch.....	86
4.5.2.1	Anstieg der Exkretionsrate von 8-oxoGua nach Behandlung mit Angiotensin II.....	86
4.5.2.2	Die durch Angiotensin II erhöhte Exkretionsrate von 8-oxodG wird von Candesartan signifikant gesenkt.....	87
4.5.2.3	Tempol senkt eine durch Angiotensin II gesteigerte Exkretionsrate von 8-oxoGuo nicht	88

4.5.3	Exkretionsraten der oxidativen Stressmarker nach Mutation des AT _{1a} -Rezeptors.....	89
4.5.3.1	Die Mutation im AT _{1a} -Gen hat keinen Einfluss auf die 8-oxoGua-Exkretion.....	89
4.5.3.2	Die Mutation im AT _{1a} -Gen bewirkt eine höhere Exkretion von 8-oxodG.....	90
4.5.3.3	Die 8-oxoGuo-Exkretion ist nach der Mutation des AT _{1a} -Gens erhöht	91
4.5.4	Exkretionsraten der oxidativen Stressmarker nach Knockout von NOX4 .	92
4.5.4.1	Der Knockout des NOX4-Gens erhöht die 8-oxoGua-Exkretion.....	92
4.5.4.2	Der Verlust von NOX4 bewirkt eine erhöhte Exkretion von 8-oxodG nach Gabe von Angiotensin II	93
4.5.4.3	Die 8-oxoGuo-Exkretion ist nach Knockout des NOX4-Gens erhöht..	94
4.5.5	Exkretionsraten der oxidativen Stressmarker aus dem Tierversuch zur Aktivierung von Nrf2.....	95
4.5.5.1	Erhöhte Exkretionsraten von 8-oxoGua nach Behandlung mit Aldosteron	96
4.5.5.2	Aldosteron führt zu keiner erhöhten Exkretionsrate von 8-oxodG ..	96
4.5.5.3	Die durch Aldosteron erhöhte Exkretionsrate von 8-oxodG wird durch Sulforaphan signifikant gesenkt.....	97
5	Diskussion.....	99
5.1	Die Etablierung der HPLC-MS/MS-Methoden	100
5.1.1	Der Einsatz von internen Standards	101
5.1.2	Qualität der HPLC-MS/MS-Methode zum Nachweis von 8-oxodG in der DNA	101
5.1.3	Qualität der HPLC-MS/MS-Methode zum Nachweis von 8-oxoGuo in RNA	102
5.1.4	Qualität der HPLC-MS/MS-Methode zum Nachweis von oxidativen Stressmarkern im Urin und Zytosol.....	103
5.1.4.1	Vergleich der Methoden nach Weimann et al. und Crow et al.....	103
5.1.4.2	Messung von 8-oxodG im Zytosol mittels HPLC-MS/MS	104
5.2	Vergleich der Nachweismethoden für 8-oxodG	104
5.2.1	Der Nachweis von 8-oxodG mittels FPG-Comet-Assay	105
5.2.2	Der Nachweis von 8-oxodG mittels immunzytochemischen Methoden.....	106
5.2.3	Der Nachweis von 8-oxodG mittels HPLC-MS/MS	107
5.3	Auswirkungen von Angiotensin II und Aldosteron auf die DNA <i>in vitro</i>	108

5.3.1	Erhöhte Konzentrationen von Angiotensin II und Aldosteron führen in vitro zu DNA-Schäden	109
5.3.2	Vergleich der Messmethoden zum Nachweis von 8-oxodG in zellulärer DNA nach Behandlung mit Angiotensin II oder Aldosteron.....	111
5.3.2.1	Nachweis von 8-oxodG mit dem FPG-Comet-Assay in zellulärer DNA.....	111
5.3.2.2	Immunzytochemische Färbung von 8-oxodG in zellulärer DNA ...	112
5.3.2.3	HPLC-MS/MS-Nachweis von 8-oxodG in zellulärer DNA	114
5.3.3	Der Nachweis von 8-oxoGuo in der RNA nach Behandlung mit Angiotensin II oder Aldosteron	116
5.3.4	Der Nachweis von 8-oxodG in Nierenzellen von C57BL/6-Mäusen	119
5.4	Der Nachweis von geschädigten Nukleotiden in biologischen Flüssigkeiten... ..	121
5.4.1	Der Nachweis von 8-oxodG im Zytosol.....	122
5.4.2	Der Nachweis von oxidativen Stressmarkern im Urin	123
5.4.2.1	Der Nachweis der oxidativen Stressmarker im Urin von C57BL/6-Mäusen.....	124
5.4.2.2	Der Nachweis der oxidativen Stressmarker im Urin von SD-Ratten... ..	127
5.5	Möglichkeiten und Belastbarkeit des Nachweises der oxidativen Stressmarker	129
5.6	Interpretation der Messung von oxidativen Stressmarkern.....	131
6	Zusammenfassung	133
7	Summary	135
8	Literaturverzeichnis	137
9	Anhang	159
9.1	Interventionen gegen Angiotensin II im Tierversuch mit C57BL/6-Mäusen	159
9.2	Interventionen gegen Aldosteron im Tierversuch mit SD-Ratten.....	162
	Danksagung	166

Abkürzungsverzeichnis

$^1\text{O}_2$	Singulett-Sauerstoff
8-oxodG	8-Oxo-2'-desoxyguanosin
8-oxoGua	8-Oxoguanin
8-oxoGuo	8-Oxoguanosin
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
ACN	Acetonitril
AT _{1a}	Isoform des AT ₁ R im Nagetier
AT _{1a} -KO	B6.129P2 Agtr1 ^{atm1Unc} /J-Mäuse
AT _{1b}	Isoform des AT ₁ R im Nagetier
AT ₁ R	Angiotensin-II-Typ1-Rezeptor
AT ₂ R	Angiotensin-II-Typ2-Rezeptor
BSA	Rinderserumalbumin
cT-DNA	Kalbsthymus-DNA
DABCO	1,4-Diazabicyclo(2,2,2)octen
dG	2'-Desoxyguanosin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECVAG	<i>European Comet Assay Validation Group</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
ESCODD	<i>European Standards Committee on Oxidative DNA Damage</i>
ESCLA	<i>European Standards Committee of Urinary Lesion Analysis</i>
ESI	Elektronenspray-Ionisation
FA	Ameisensäure

FBS	Fetales Kälberserum
FDA	Fluoresceindiacetat
FPG	Formamidopyrimidin-Glykosylase
Guo	Guanosin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMP	hochschmelzend
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
K	Kontrolle
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
LMP	niedrigschmelzend
LOD	Nachweisgrenze
LOQ	Bestimmungsgrenze
MeOH	Methanol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaI	Natriumiodid
NaOH	Natriumhydroxid
NO•	Stickstoffmonoxid
NOX	NADPH-Oxidase
NOX4-KO	C57BL/6-Knockout-Mäuse

NP	Normalphase
NUDT	Nukleosidtriphosphatase
$O_2^{\bullet-}$	Hyperoxid-Anion
ODS	<i>Octadecylsilica</i>
OGG1	<i>8-Oxoguanine glycosylase</i> , 8-Oxoguanin-DNA-Glykosylase
OH^{\bullet}	Hydroxylradikal
$ONOO^-$	Peroxynitrit-Anion
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDCT	Pyrrolidin Dithiocarbamat
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RP	<i>Reversed phase</i>
SD	Sprague-Dawley
SDS	Natriumlaurylsulfat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WT	Wildtyp C57BL/6-Mäuse
$ZnSO_4$	Zinksulfat

1 Einleitung

Eine Hypertonie steigert die Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), in welchem die Hormone Angiotensin II und Aldosteron eine Schlüsselrolle einnehmen. Sie regulieren Signalwege und lösen oxidativen Stress aus. Durch die Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase (NADPH-Oxidase) entstehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS), welche DNA und RNA schädigen können. Die Schädigung der DNA kann zu Punktmutationen führen, welche das Risiko erhöhen, an Nierenkrebs zu erkranken. Mit Hilfe des Nachweises der oxidativen Stressmarker 8-Oxoguanin (8-oxoGua), 8-Oxo-2'-desoxyguanosin (8-oxodG) und 8-Oxoguanosin (8-oxoGuo) in Nukleinsäuren, Zytosol oder Urin sollen die Auswirkungen von erhöhten Konzentrationen der RAAS-Hormone auf die oxidative Schädigung der DNA und RNA untersucht werden. Außerdem wird in dieser Arbeit die Wirkung von Inhibitoren auf die durch erhöhte Aktivität des RAAS entstandenen Schäden untersucht.

1.1 Hypertonie und Krebs

Weltweit gehören Hypertonie und Krebs zu den verbreitetsten Gesundheitsproblemen, die jeweils mit anderen Krankheiten in Verbindung gebracht werden (1). Hypertonie ist definiert für einen Blutdruck von höher als 140/90 mm Hg und im Jahr 2000 waren 37 % der Bevölkerung aus Industriestaaten davon betroffen (2). Weitere Studien sagen voraus, dass im Jahr 2025 über 1,5 Milliarden Menschen an Bluthochdruck leiden werden (3). Die Verknüpfung von Krebs, der weltweit für ca. 7,4 Millionen Tote im Jahr verantwortlich ist, mit Hypertonie wurde erstmals von Moss et al. im Jahre 1947 beschrieben (4, 5).

Epidemiologische Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen Hypertonie und einem erhöhten Nierenkrebsrisiko. In einer Studie konnte eine Verdopplung des Risikos, an Nierenkrebs zu erkranken, gezeigt werden, wenn Personen an Hypertonie litten (6). Weiter ist bekannt, dass die Behandlung von Hypertonie zu einer Verringerung der Sterblichkeit an Herz-Kreislauf-Erkrankungen führt und die Patienten länger leben, was das Risiko erhöht, an Krebs zu erkranken (7). Die Gründe für die Entstehung von Nierenkrebs im Zusammenhang mit Hypertonie sind nicht genau bekannt. Der zugrunde liegende biologische Mechanismus kann mit erhöhten

Konzentrationen von Inositoltriphosphat und zytosolischen Kalziumionen in Verbindung gebracht werden. Deren Erhöhung spielt sowohl bei Hypertonie als auch der Zellproliferation eine Rolle, welche durch Mitogene und Onkogene aktiviert werden kann (7). Zudem besitzen Neurohormone, wie Angiotensin II, Katecholamin, Vasopressin, Insulin und Wachstumshormone, die durch erhöhten Blutdruck reguliert werden, ebenso mitogene Effekte und fördern die Zellteilung (8). Die Apoptose, der Zelltod, kann durch Hypertonie dereguliert sein und im Falle einer Blockade zu ungehindertem Zellwachstum führen (9). Ebenso wurde gezeigt, dass Erkrankungen wie Diabetes und Adipositas (10) oder ein erhöhter Zigaretten- und Alkoholkonsum (11) eine Verbindung zwischen Krebs und Hypertonie herstellen können.

1.2 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Bereits im Jahr 1898 entdeckten Tigerstedt und Bergmann, dass Renin Einfluss auf den arteriellen Blutdruck hat, aber bis heute ist das RAAS nicht komplett verstanden (12). Als Hauptregulator des Herz-Kreislauf-Systems und für die Funktion der Nieren spielt das RAAS eine wichtige Rolle im Körper. Die Elektrolytbalance, den Flüssigkeitshaushalt und den arteriellen Blutdruck steuert das RAAS durch die Sekretion von Angiotensin II. Infolgedessen wird die Ausschüttung von Aldosteron aktiviert (13). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des RAAS ist die Synthese und Ausschüttung von Renin aus juxtaglomerulären Zellen (14).

Renin wird aus Prorenin gebildet, indem proteolytisch ein Aminosäuresegment vom N-Terminus abgespalten wird. Das in juxtaglomerulären Zellen gespeicherte Renin wird bei Abfall des Blutdrucks, einer Veränderung im Elektrolythaushalt oder durch die Aktivierung des sympathischen Nervensystems durch β_1 -Adrenozeptoren in den systemischen Kreislauf abgegeben. Auch im Gehirn, in der Nebenniere und in den Eierstöcken wird Renin gebildet (14). Vom primär in der Leber gebildeten Angiotensinogen wird durch Renin das biologisch inerte Dekapeptid Angiotensin I abgespalten. Angiotensinogen wird kontinuierlich sekretiert und besitzt daher eine gleichbleibende Konzentration im Plasma (15). Das Oktapeptid Angiotensin II wird durch die hydrolytische Entfernung zweier Aminosäuren vom C-Terminus des Angiotensin I durch das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE) gebildet. (Abbildung 1).

ACE ist eine membrangebundene Exopeptidase, die auf der Plasmamembran verschiedener Zelltypen, zum Beispiel proximalen Tubuluszellen, vorkommt (14). ACE baut andere Peptide, wie Bradykinin und Kallidin, zu inaktiven Metaboliten ab. Bei der Bildung von Angiotensin II und dem Abbau von Bradykinin wird die Vasokonstriktion erhöht und die Vasodilatation gesenkt (16).

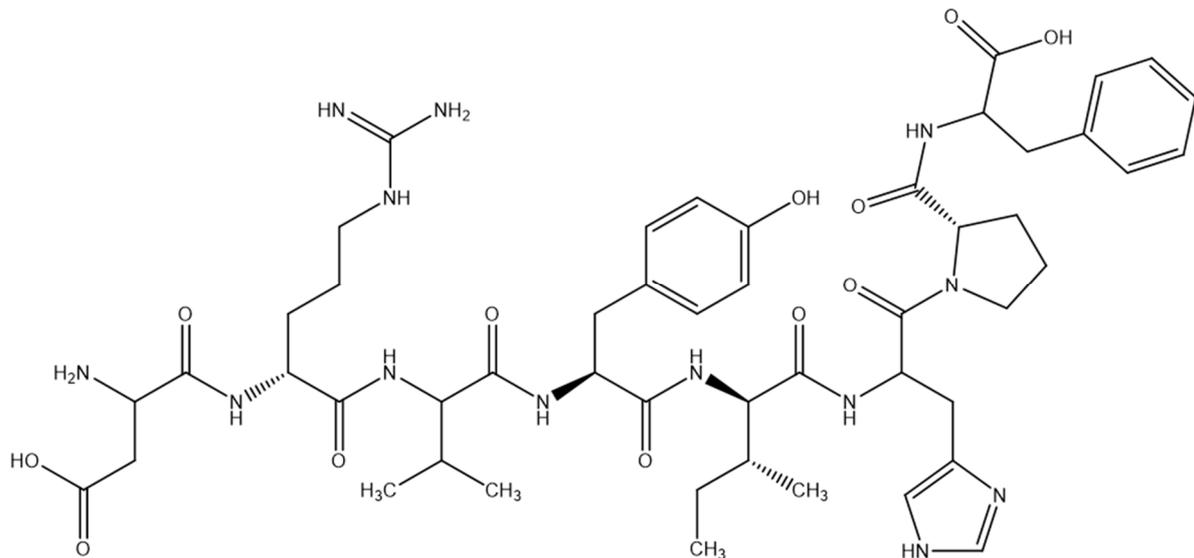


Abbildung 1

Chemische Struktur von Angiotensin II. Im 3-Buchstabencode ist die Aminosäuresequenz: -Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe.

Angiotensin II ist das Hauptprodukt des RAAS. Weitere Produkte sind Angiotensin III, Angiotensin IV oder Angiotensin-(1-7). Deren Effekte sind in einem Übersichtsartikel von Schmieder et al. ausführlich beschrieben (17). Die Effekte von Angiotensin II werden hauptsächlich durch den Angiotensin-II-Typ1-Rezeptor (AT₁R) ausgelöst, welcher auf der Zelloberfläche lokalisiert ist. Neben der Bindung an AT₁R kann Angiotensin II auch an AT₂R binden (Abbildung 2). Während der fötalen Phase ist der AT₂R stark exprimiert in Herz und Niere, danach nimmt seine Konzentration deutlich ab. Der AT₁R ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der sieben Transmembrandomänen besitzt. Der Rezeptor wird im Gefäßsystem, dem Herz, der Niere, dem Gehirn, der Nebenniere und im Darm exprimiert und vermittelt die physiologischen und pathophysiologischen Eigenschaften von Angiotensin II (14). Während der Mensch nur den AT₁R besitzt, existieren in Nagetieren zwei Isoformen (AT_{1a} und AT_{1b}) (18). Angiotensin II hat einen speziellen Einfluss auf die Erhöhung des Blutdrucks in der Niere.

Die Aufnahme von Natriumionen in die Nierentubuli, die Ausschüttung von Inhibitoren für die Renin-Produktion sowie die Stimulierung der Aldosteron-Synthese in der Nebennierenrinde werden durch Angiotensin II reguliert (19).

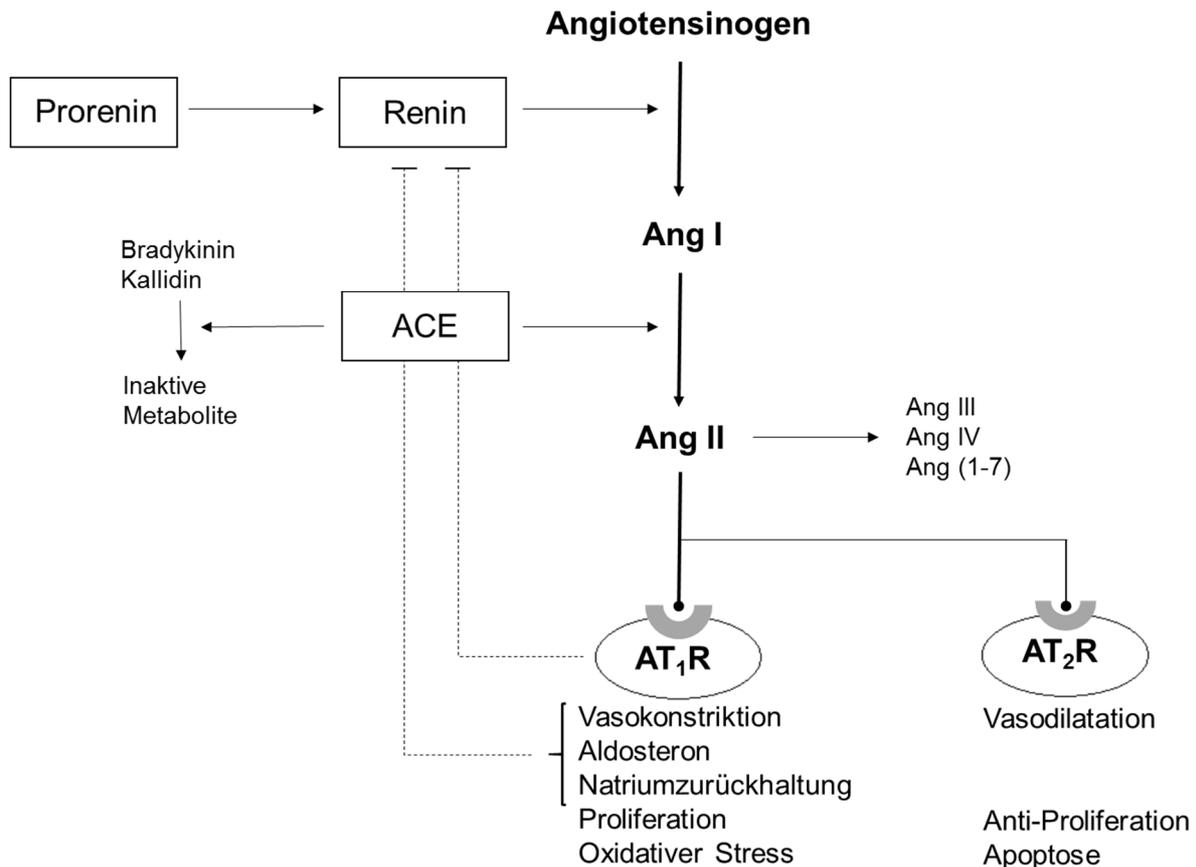


Abbildung 2

Vereinfachte Darstellung des klassischen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. Aus Angiotensinogen wird durch Renin Angiotensin I gebildet, welches durch das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE) zu Angiotensin II umgesetzt wird. Angiotensin II bindet an den Angiotensin-II-Typ1-Rezeptor (AT_1R) und aktiviert Signalwege in der Zelle. Zudem kann Angiotensin II von Enzymen in weitere Metaboliten umgesetzt werden oder mit dem AT_2R interagieren. Die Abbildung basiert auf Atlas et al. (14). Ang = Angiotensin.

Die Wirkung des Rezeptors ist unklar, aber es wird angenommen, dass er neben anti-proliferierenden und apoptotischen Effekten die Vasodilatation einleitet (14). Die Bindung von Angiotensin II an den AT_1R wirkt durch einen Rückkopplungsmechanismus inhibitorisch auf die Renin-Sekretion. Diese Rückkopplung wird durch Aldosteron, Vasokonstriktion und Natriumionenrückhalt verstärkt (13).

Aldosteron, ein Steroidhormon (Abbildung 3), wird in der Zona glomerulosa, der äußersten Schicht der Nebenniere, gebildet. Dort reguliert es durch die Bindung an den intrazellulären Mineralokortikoidrezeptor die Balance von Natrium- und Kaliumionen in der Zelle. Die Regulation erfolgt durch die Aufnahme von Natriumionen und Wasser sowie die Abgabe von Kalium in das extrazelluläre Volumen (20).

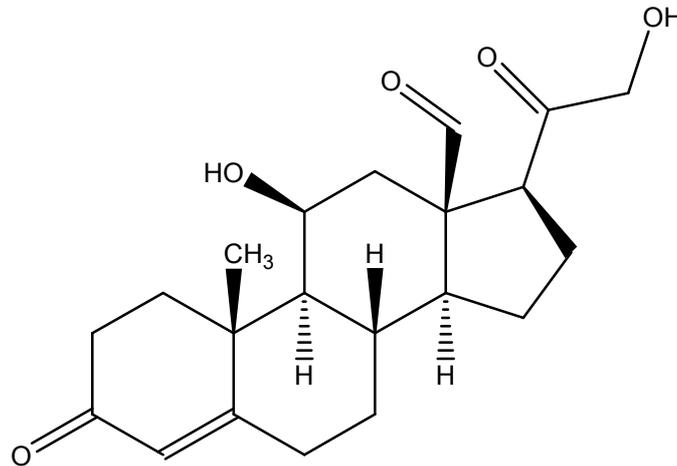


Abbildung 3
Chemische Struktur des Steroidhormons Aldosteron.

1.2.1 Das intrazelluläre RAAS

Neben dem zirkulierenden RAAS sind in diversen Organen verschiedene intrazelluläre Systeme bekannt. In der Leber, dem Herz, der Niere und dem Gehirn sind die Voraussetzungen für ein funktionierendes intrazelluläres RAAS vorhanden (21). In den proximalen Tubuluszellen kann neben dem zirkulierenden Angiotensin II auch lokales Angiotensin II die physiologischen und pathophysiologischen Wirkungen von Angiotensin II ausüben (22). Durch die Möglichkeit, Angiotensin II direkt in der Niere zu produzieren, wird das zirkulierende RAAS umgangen, trotzdem werden die Effekte von Angiotensin II weiterhin von den Rezeptoren AT₁R und AT₂R vermittelt. Die Aktivierung des intrazellulären RAAS erfolgt wahrscheinlich durch Angiotensin II, im Gegensatz zum zirkulierenden RAAS, in welchem Angiotensin II als Inhibitor fungiert (22). Der Wirkmechanismus des intrazellulären RAAS in der Niere beruht auf der Annahme, dass nicht alle internalisierten AT₁R und Angiotensin II zum Lysosom transportiert werden. Der AT₁R kann in andere Zellorganellen, z. B. in die Zellkernmembran, eingelagert werden und durch Bindung von Angiotensin II intrazelluläre Signalketten aktivieren (22).

Bekannt sind die Erhöhung von zytosolischen Kalziumionen und die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Die Aktivierung von NF- κ B bewirkt die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und Wachstumsfaktoren (22).

1.2.2 Wirkung von Angiotensin II durch den AT₁-Rezeptor

Der zur Familie der G-Protein-gekoppelten Proteine gehörende AT₁R wird durch die Bindung mit Angiotensin II aktiviert. Durch das G_q-Protein wird die Phospholipase C aktiviert, die innerhalb von Sekunden Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu Inositoltriphosphat und Diacylglycerin spaltet. Inositoltriphosphat sorgt mit der Bindung an seinen Rezeptor für die Ausschüttung von Ca²⁺ ins Zytosol (23). Dieser Signalweg wird bei normalen Angiotensin-II-Konzentrationen in den glatten Muskelzellen aktiviert und führt zur Vasokonstriktion. Außerdem werden mittels Angiotensin-II-Sekretion aus den Zellen Natriumionen in die renalen Tubuluszellen reabsorbiert und die Ausschüttung von Renin wird inhibiert (14). Höhere Angiotensin-II-Konzentrationen führen zu Wachstum, Hypertrophie und Entzündungsprozessen in den glatten Muskelzellen (24). Diese werden teilweise durch das Hyperoxid-Anion (O₂^{•-}) oder Wasserstoffperoxid (H₂O₂) ausgelöst. Für die Bildung von O₂^{•-} und H₂O₂ ist die NADPH-Oxidase verantwortlich, welche durch Angiotensin II aktiviert wird (Abbildung 4) (25). Dies verläuft entweder durch eine direkte Aktivierung der Untergruppen der NADPH-Oxidase oder mit der Phosphorylierung von p47 via Proteinkinase C (23, 26). In anderen Zelltypen kann die Proteinkinase C durch Phospholipase C und Diacylglycerin phosphoryliert werden und so für die Aktivierung der NADPH-Oxidase sorgen.

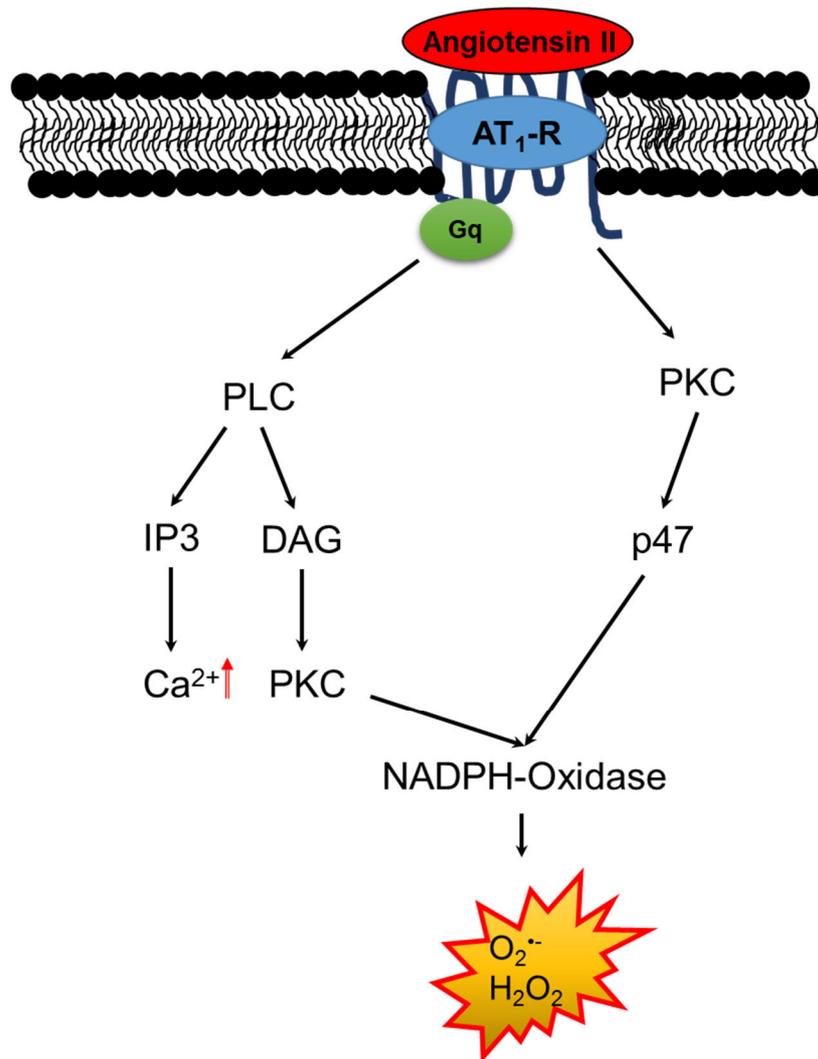


Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung der Signalwege, die durch die Bindung von Angiotensin II an den AT₁R reguliert werden und die NADPH-Oxidase aktivieren. Das Protein Gq wird durch die Phospholipase C (PLC) aktiviert und Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG) werden gebildet. Proteinkinase C (PKC) wird entweder durch DAG oder AT₁R direkt aktiviert. PKC aktiviert durch die Phosphorylierung von p47 die NADPH-Oxidase. IP₃ leitet die Ausschüttung von zytosolischen Kalziumionen ein. Die Abbildung basiert auf Queisser et al. (27).

1.2.3 Wirkung von Aldosteron durch den Mineralokortikoidrezeptor

Die Ausschüttung von Aldosteron wird durch erhöhte Konzentrationen an Angiotensin II, Kaliumionen oder Adrenocorticotropin im Blut angeregt. Die Biosynthese von Aldosteron findet hauptsächlich in der äußeren Schicht der Nebennierenrinde, der Zona glomerulosa, statt. Durch Phosphorylierung spezifischer Proteine wird die Aldosteron-Synthase (Cytochrom P450, CYP11B2) aktiviert, welche aus Cholesterin, mit den Zwischenstufen Progesteron und Kortikosteron, Aldosteron synthetisiert (14,

28). Aldosteron bindet im intrazellulären Raum an den Mineralokortikoidrezeptor und gelangt durch Translokation des Aldosteron-Rezeptor-Komplexes in den Zellkern (Abbildung 5). Die genomischen Auswirkungen durch den Mineralokortikoidrezeptor-Aldosteron-Komplex sind die Expression des epithelialen Natriumkanals und der Natrium-Kalium-ATPase-Pumpen (29). Die nicht genomischen Effekte werden durch den Mineralokortikoidrezeptor in Kombination mit einem sekundären Messenger ausgelöst (20, 30). Der Aldosteron-Mineralokortikoidrezeptor-Komplex stimuliert die Phospholipase C, aktiviert die Proteinkinase C und folgend die Produktion von $O_2^{\bullet-}$ und H_2O_2 durch die Aktivierung der NADPH-Oxidase (30). Neben der Hochregulierung von NADPH-Oxidase-Untereinheiten sorgt Aldosteron für oxidativen Stress durch eine Inhibierung der $NADP^+$ -Reduktion und die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO^{\bullet}) durch die NO-Synthase (31). Der durch Aldosteron induzierte oxidative Stress sorgt für DNA-Schäden.

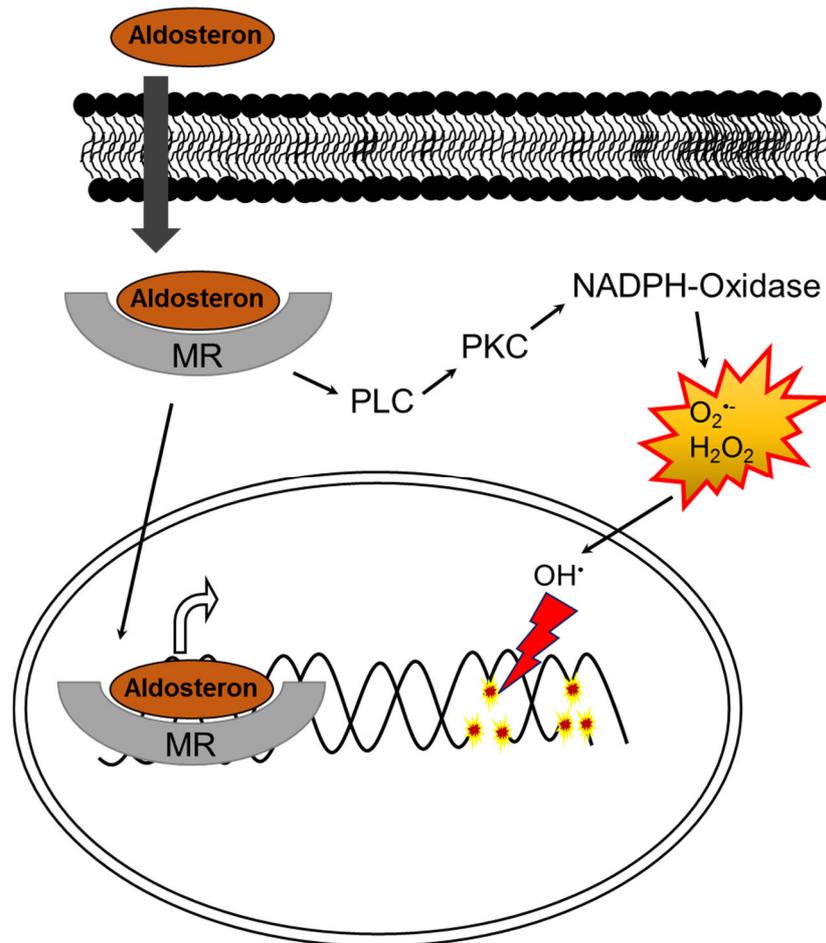


Abbildung 5

Vereinfachte Darstellung der Wirkung von Aldosteron in Verbindung mit dem Mineralokortikoidrezeptor (MR) zur Aktivierung der NADPH-Oxidase. Der nicht genomische Signalweg verläuft durch die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und der Proteinkinase C (PKC) sowie der NADPH-Oxidase. Der oxidative Stress sorgt für die Bildung von DNA-Schäden durch das Hydroxylradikal (OH^{\cdot}). Die Abbildung basiert auf Queisser et al. (27).

1.2.4 Inhibitoren des AT_1 - und des Mineralokortikoidrezeptors

Der Einsatz von Angiotensin-II-Rezeptor-Blockern inhibiert die Wirkung von Angiotensin II am AT_1R komplett und führt zu einer Reduzierung von Entzündungen und oxidativem Stress sowie einer Senkung des Blutdrucks (32). Anschließend führen die erhöhten Angiotensin-II-Level zu einer vermehrten Bindung an AT_2R und weitere Rezeptoren, die weitere Effekte auslösen können (33). Zudem kommt es zu einer Inhibition der negativen Rückkopplung durch Angiotensin II und zu einem Anstieg von zirkulierendem Renin (14). Eine Blockade der Aldosteron-Ausschüttung wird durch die Inhibierung der Angiotensin-II-Wirkung nicht erreicht (34).

Die Inhibition des Mineralokortikoidrezeptors wird mit steroidähnlichen Antagonisten erreicht. Spironolacton war der erste Mineralokortikoidrezeptor-Antagonist, welcher erfolgreich zu einer Senkung des Blutdrucks eingesetzt wurde. Zudem verringerte er Gefäßentzündungen und die Albuminurie (32). Als Nebenwirkung ist die Blockade von Progesteron- oder Androgen-Rezeptoren bekannt, die auf die Steroidstruktur des Mineralokortikoidrezeptor-Antagonisten zurückzuführen ist. Eplerenon ist die Weiterentwicklung von Spironolacton und verringert dessen Nebenwirkungen, besitzt aber eine geringere Affinität zum Mineralokortikoidrezeptor (35).

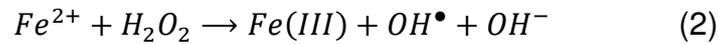
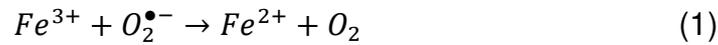
1.3 Oxidativer Stress und reaktive Sauerstoffspezies

Der Ausdruck „oxidativer Stress“ bezeichnet den Verlust des Gleichgewichts zwischen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und antioxidativen Abwehrmechanismen in der Zelle. Unter normalen Bedingungen werden die gebildeten ROS sofort durch die Abwehrmechanismen entfernt. Zu den wichtigsten enzymatischen Antioxidantien gehören die Superoxid-Dismutase, die Katalase, die Glutathion-Peroxidase, das Thioredoxin und Peroxiredoxin. Natürliche Antioxidantien sind die Vitamine A und E, die Karotinoide, das Resveratrol und die Flavonoide (36). Neben dieser ersten Abwehr kann die Zelle auch durch diverse Reparaturmechanismen oxidativ geschädigte Nukleinsäuren, Lipide und Proteine entfernen (37).

Zu den ROS gehören das Hyperoxid-Anion $O_2^{\bullet-}$ und das Hydroxylradikal OH^{\bullet} sowie H_2O_2 , der Singulett-Sauerstoff 1O_2 , das Ozon und das Hypochlorid-Anion. Durch vermehrte Bildung von ROS entsteht ein Ungleichgewicht zugunsten oxidierender Stoffe in der Zelle und als Folge dessen kommt es zur Schädigung von Zellkomponenten, wie Proteinen, Nukleinsäuren und Lipiden. Auch in endogenen Prozessen werden H_2O_2 und $O_2^{\bullet-}$ in der Atmungskette und von NADPH-Oxidasen gebildet (38).

Die Signalwege, welche durch Angiotensin II und Aldosteron injiziert werden, tragen zur Bildung von ROS durch die NADPH-Oxidase bei. Zu den durch exogene Faktoren gebildeten ROS gehören radioaktive und UV-Strahlung, Stress, Alkohol- und Tabakkonsum sowie eine unausgewogene Ernährung. Endogene ROS entstehen bei der Zellatmung unter aeroben Bedingungen (37). Lange wurde angenommen, dass OH^{\bullet} der Hauptauslöser von oxidativen Schäden ist. Bei der Fenton-Reaktion

(Gleichungen 1 und 2) wird aus H_2O_2 und Eisenionen (Fe^{2+}) OH^\bullet gebildet. Das Fe^{2+} wird durch die Reduktion von Fe^{3+} mittels $O_2^{\bullet-}$ aus Ferritin oder Fe-S-Komplexen herausgelöst und reagiert dann mit H_2O_2 zum Hydroxylradikal OH^\bullet (39, 40).



OH^\bullet reagiert mit biologischen Molekülen in seiner Umgebung. Die Reichweite des gebildeten OH^\bullet ist von der Viskosität des Lösungsmittels abhängig (41). Eine weitere Eigenschaft von $O_2^{\bullet-}$ ist die Reaktion mit freiem NO^\bullet , was zu der Bildung vom giftigen Peroxynitrit-Anion ($ONOO^-$) führt (42). In Abbildung 6 ist die Entstehung der verschiedenen ROS im menschlichen Körper dargestellt.

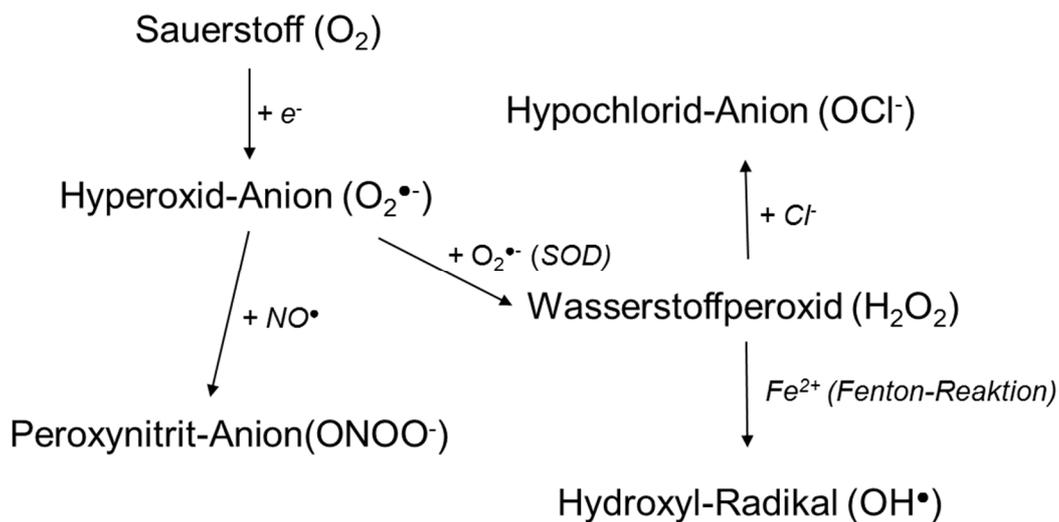


Abbildung 6

Vereinfacht können, ausgehend von Sauerstoff (O_2), verschiedene ROS in der Zelle gebildet werden. Durch Aufnahme eines Elektrons entsteht das Hyperoxid-Anion ($O_2^{\bullet-}$), welches entweder von der Superoxid-Dismutase (SOD) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) abgebaut wird oder mit dem Stickstoffmonoxid (NO^\bullet) zum giftigen Peroxynitrit-Anion ($ONOO^-$) weiterreagiert. H_2O_2 kann mit Fe^{2+} das giftige Hydroxylradikal (OH^\bullet) oder mit Cl^- das Hypochlorid-Anion (OCl^-) bilden. Die Abbildung basiert auf Hool (43).

Durch UV-A-Strahlung können Bilirubin, Flavine, Häm-Proteine oder Nicotinamidadenindinukleotid angeregt werden. Diese Anregungsenergie kann, neben anderen Möglichkeiten, auf O_2 übertragen werden, was zur Bildung von 1O_2 führt (44). Das gebildete 1O_2 reagiert mit Komponenten der Zelle und induziert Zellschäden (45).

1.5 Oxidative Schädigung und Reparatur der DNA

Das Hydroxylradikal OH^\bullet kann mit den Purinen und Pyrimidinen sowie den Zuckern und Phosphaten der DNA reagieren und deren Struktur destabilisieren (47). Durch die Reaktion mit dem Hydroxylradikal können Basenverknüpfungen innerhalb eines Strangs (Intra) oder mit dem gegenüberliegenden Strang (Inter) ausgebildet werden. Zudem sind Verknüpfungen von Proteinen, welche durch Oxidation verändert wurden, mit Basen der DNA möglich (46). Außerdem begünstigen oxidative Schäden die Bildung von Einzel- und Doppelstrangbrüchen der DNA, die zur genetischen Instabilität führen (41). Das Entstehen von oxidierten DNA-Basen kann zu Punktmutationen oder zum Abbruch der DNA-Polymerase-Reaktion führen (48). Die geschädigten Basen können entweder durch Basenexzisionsreparatur oder Nukleotidexzisionsreparatur entfernt werden. Daneben ist die Basenfehlpaarungsreparatur bekannt, welche Adenin entfernt, wenn es mit 8-oxoGua verbunden ist (49). Die Bildung von Einzel- und Doppelstrangbrüchen in der DNA geht wahrscheinlich auf sogenannte Intrastrang-Tandem-Basen-Modifikationen zurück (50). Diese Intrastrang-Tandem-Basen-Modifikationen entstehen, wenn innerhalb zweier Helix-Windungen der DNA zwei oxidierte Basen miteinander reagieren. Daneben gibt es auch die Möglichkeit von DNA-Protein-Verbindungen sowie der Bildung von Interstrang- und Intrastrang-Verknüpfungen (50). Für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen sind zwei Signalwege, die homologe Rekombination und die nichthomologe Endverknüpfung, ausführlich untersucht worden (51). Die Reparatur der Einzelstrangbrüche wird durch die Bindung der Poly-ADP-Ribose-Polymerase 1 eingeleitet. DNA-Ligasen interagieren mit Poly-ADP-Ribose-Polymerase 1 und führen die Reparatur der DNA durch (52).

1.5.1 Die häufigsten Reaktionen von Guanin mit ROS

Die Bildung von oxidativ geschädigten Purinen und Pyrimidinen ist hauptsächlich auf das Hydroxylradikal OH^\bullet zurückzuführen, da Radikale wie $\text{O}_2^{\bullet-}$ und H_2O_2 nicht direkt mit der DNA reagieren können (37). Das Hydroxylradikal OH^\bullet reagiert mit verschiedenen Mechanismen mit den Basen oder der Zuckerstruktur (47). Häufig wird eine Doppelbindung ausgebildet oder eine homolytische Spaltung einer C-H-Bindung der 2'-Desoxyribose erfolgt (53). Bisher sind über 80 verschiedene Strukturen bekannt,

die aus allen DNA-Basen entstehen können (54). Der Prozess der oxidativen DNA-Schädigung ist aber komplexer und die Wahrscheinlichkeit, dass ein ROS direkt auf ein Guanin trifft, ist sehr gering. Durch den Verlust eines Elektrons entsteht in der DNA, meist an einer Base, ein Radikalkation. Dieses Kation wandert durch die DNA, bis es eine irreversible chemische Reaktion eingeht und die geschädigte Base entsteht. Da Guanin das niedrigste Ionisierungspotential aller DNA-Basen besitzt, bildet sich ein Guaninradikalkation (**2**) und in wässriger Lösung entsteht 8-oxoGua (**4**) (55-57). In den Abbildungen 8-11 sind die theoretisch möglichen Reaktionswege dargestellt, welche mit Guanin ablaufen können, und deren wahrscheinlichsten Endprodukte. Die Reaktionsmechanismen sind bisher nur in wässriger Lösung nachgewiesen worden (47, 54, 58, 59). Guanin (**1**) kann durch eine Ein-Elektronen-Oxidation das Guaninradikalkation (**2**) bilden (Abbildung 8), welches auch in Verdacht steht, Ausgangspunkt für Querverknüpfungen in der DNA zu sein. Durch die Reaktion des Radikalkations (**2**) mit Wasser bildet sich das 8-Hydroxy-7,8-dihydroguaninradikal (**3**), welches auch durch die Reaktion von Guanin (**1**) mit einem Hydroxylradikal OH^\bullet entsteht (Abbildung 8) (56). Die oxidativen Schädigungen der übrigen Basen sowie weitere Reaktionsschritte sind in ausführlichen Übersichtsartikeln beschrieben (47, 54, 58, 59).

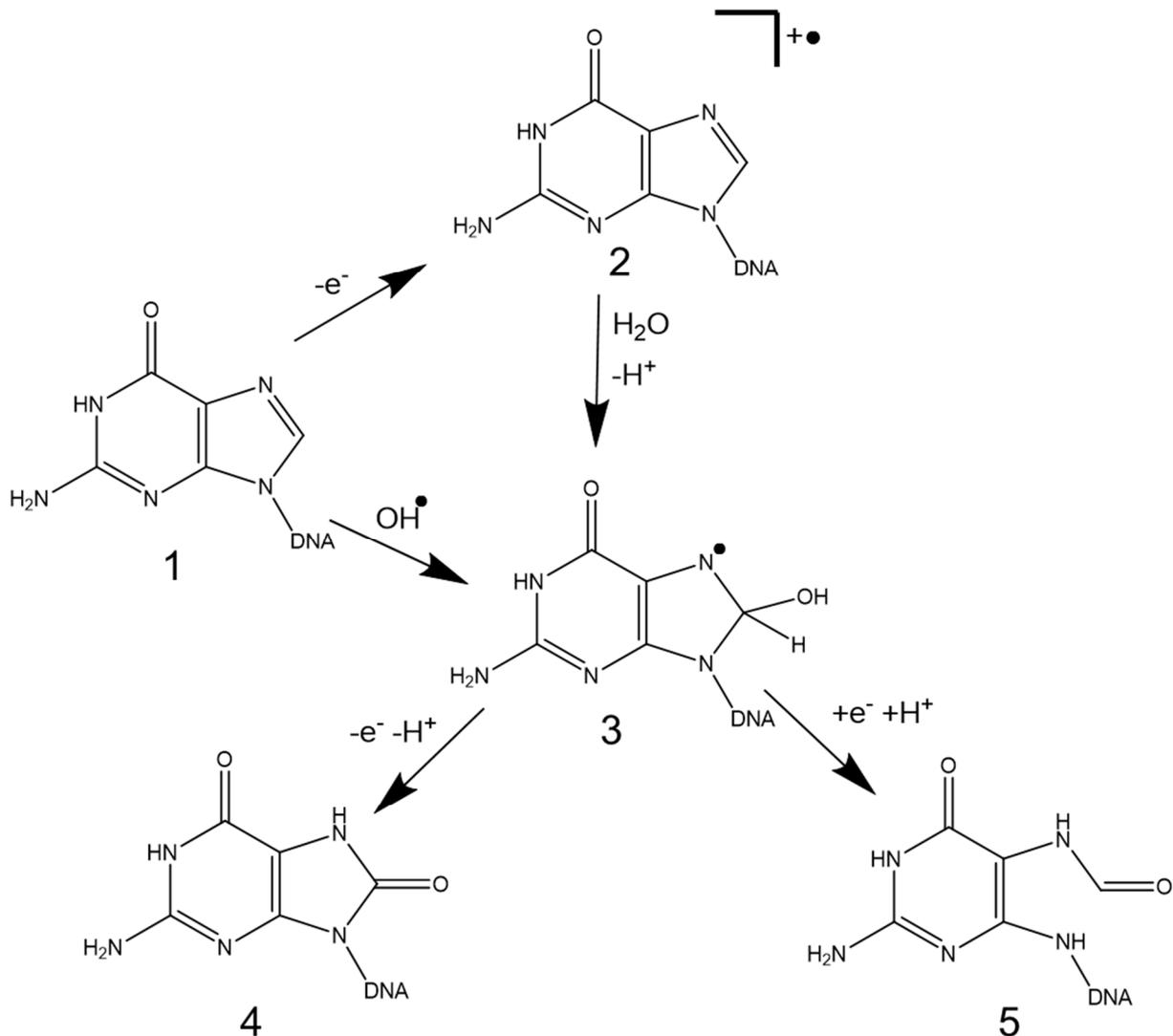


Abbildung 8

Die Reaktionen von Guanin (1) mit dem Hydroxylradikal OH^\bullet und einem Elektron (e^-). Das 8-Hydroxy-7,8-dihydroguaninradikal (3) und Guaninradikalkation (2) sind sehr reaktiv. (3) wird entweder zum 8-Oxoguanin (4) oxidiert oder zum 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin (5) reduziert. Die Reaktionsschritte sind entnommen aus Dizdaroglu (47) und Cadet et al. (54).

1.5.1.1 Die Reaktion von Guanin mit dem Hydroxylradikal OH^\bullet

Bei der Reaktion von OH^\bullet mit Guanin (1) entsteht neben dem 8-Hydroxy-7,8-dihydroguaninradikal (3) auch ein 4-Hydroxy-7,8-dihydroguaninradikal. 8-oxoGua (4) wird jedoch aus (3) gebildet, da die ROS unter diffusionskontrollierten Bedingungen mit (3) reagieren und nur langsam mit dem 4-Hydroxy-7,8-dihydroguaninradikal (56).

Die Öffnung des Imidazolrings mit anschließender Reduktion führt zum 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin (**5**) (Abbildung 8) (60). In sauerstofffreier Umgebung ist die Reduktion favorisiert, ansonsten wird durch eine Oxidation aus (**3**) das 8-oxoGua (**4**) gebildet (61). Zu berücksichtigen ist, dass die Reaktion von OH^\bullet mit der Aminogruppe am C2 des Guanins (**1**) zur Abspaltung eines H^\bullet und zur Bildung von Wasser führt (Abbildung 9). Die anschließende Tautomerisierung des Aminradikals (**6**) führt zu einem am C5 zentrierten Guaninradikal (**7**). Die Reaktion mit $\text{O}_2^{\bullet-}$ leitet dann die komplizierte Bildung eines Imidazol (**8**) und Oxazolons (**9**) in der DNA ein (54).

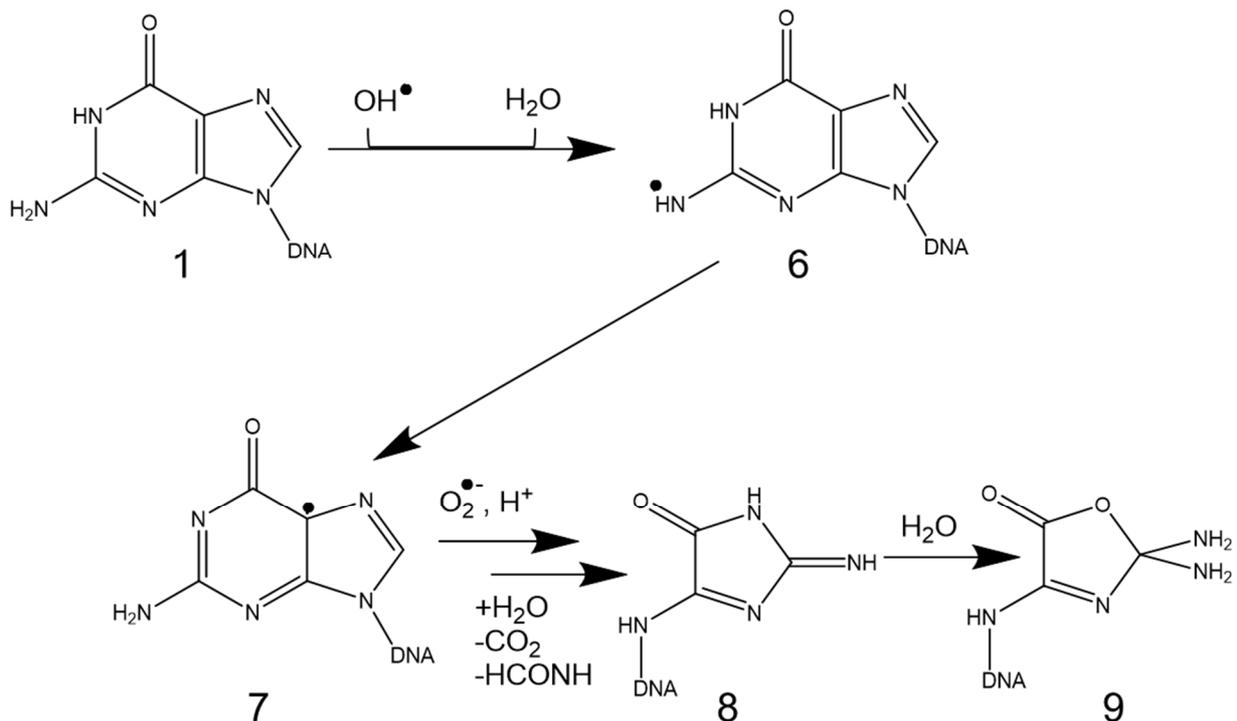


Abbildung 9

Die Bildung von 2-Amino-5-[2-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl]aminoimidazol-4-on (**8**) und 2,2-Diamino-4-[(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)amino]-5(2H)-oxazolone (**9**) aus Guanin (**1**) nach der Abstraktion eines Wasserstoffatoms durch ein Hydroxylradikal OH^\bullet an der 2-Aminogruppe. Reaktionsschritte nach Cadet et al. (54).

1.5.1.2 Die Reaktion von Guanin mit Singulett-Sauerstoff $^1\text{O}_2$

$^1\text{O}_2$ entsteht durch die Anregung eines Chromophors, zum Beispiel Karotin oder Ubichinon, mit Licht. In der sogenannten Typ-II-Reaktion wird die aufgenommene Energie auf Sauerstoff übertragen und $^1\text{O}_2$ entsteht (44, 62).

Bei der Typ-I-Reaktion des Chromophors mit Licht wird das angeregte Elektron direkt auf Guanin übertragen (62). $^1\text{O}_2$ kann auch durch die Reaktion von H_2O_2 mit dem Hyperchlorid-Anion, ONOO^- und NO^\bullet entstehen (45). Der $^1\text{O}_2$ reagiert mit dem Imidazoring des Guanins (**1**) in einer [4+2]-Cycloaddition (Abbildung 10). Aus dem gebildeten Paar diastereomeren 4,8-Endoperoxiden (**10**) entsteht durch Reorganisation 8-Hydroperoxyguanin (**11**), welches zum 8-oxoGua (**4**) reduziert werden kann (54). Die Hauptprodukte der Reaktion von (**1**) mit $^1\text{O}_2$ sind jedoch zwei Diastereomere des Spiroiminodihydantoin (**14**). Aus (**11**) entsteht durch komplexe Reaktionsschritte das sehr reaktive Chinonoid (**12**) (63). Das Chinonoid (**12**) reagiert mit Wasser zum 5-Hydroxy-8-oxoguanin (**13**), welches sich unter Abspaltung von Wasser zum Spiroiminodihydantoin (**14**) umlagert (Abbildung 10). Im Vergleich zur Reaktion von Guanin mit OH^\bullet führt die Reaktion mit $^1\text{O}_2$ nicht zu einem signifikanten Anstieg von Doppelstrangbrüchen oder alkalilabile Stellen in der DNA (64). Im Gegensatz dazu bewirkt $^1\text{O}_2$ einen Anstieg an Einzelstrangbrüchen, was mit der leichteren Zugänglichkeit der Basen erklärt wird (65).

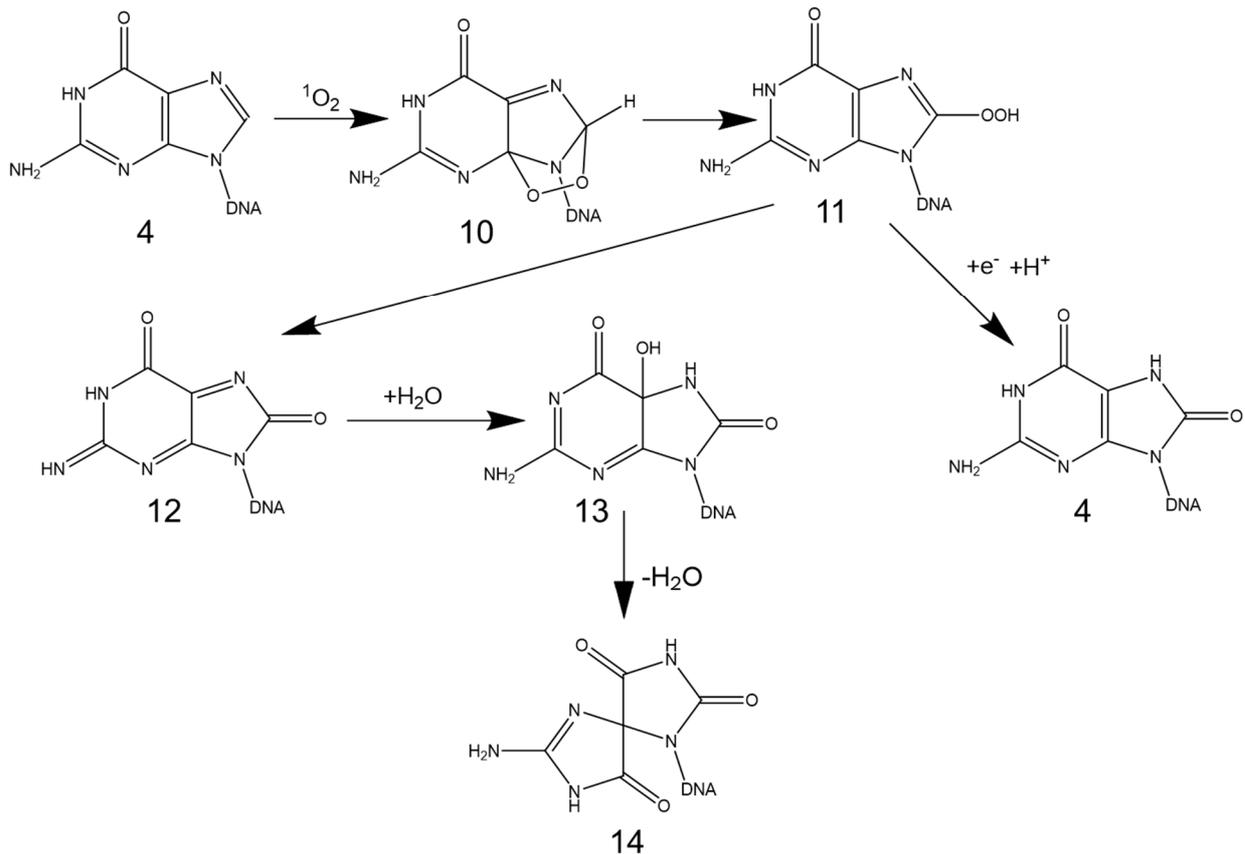
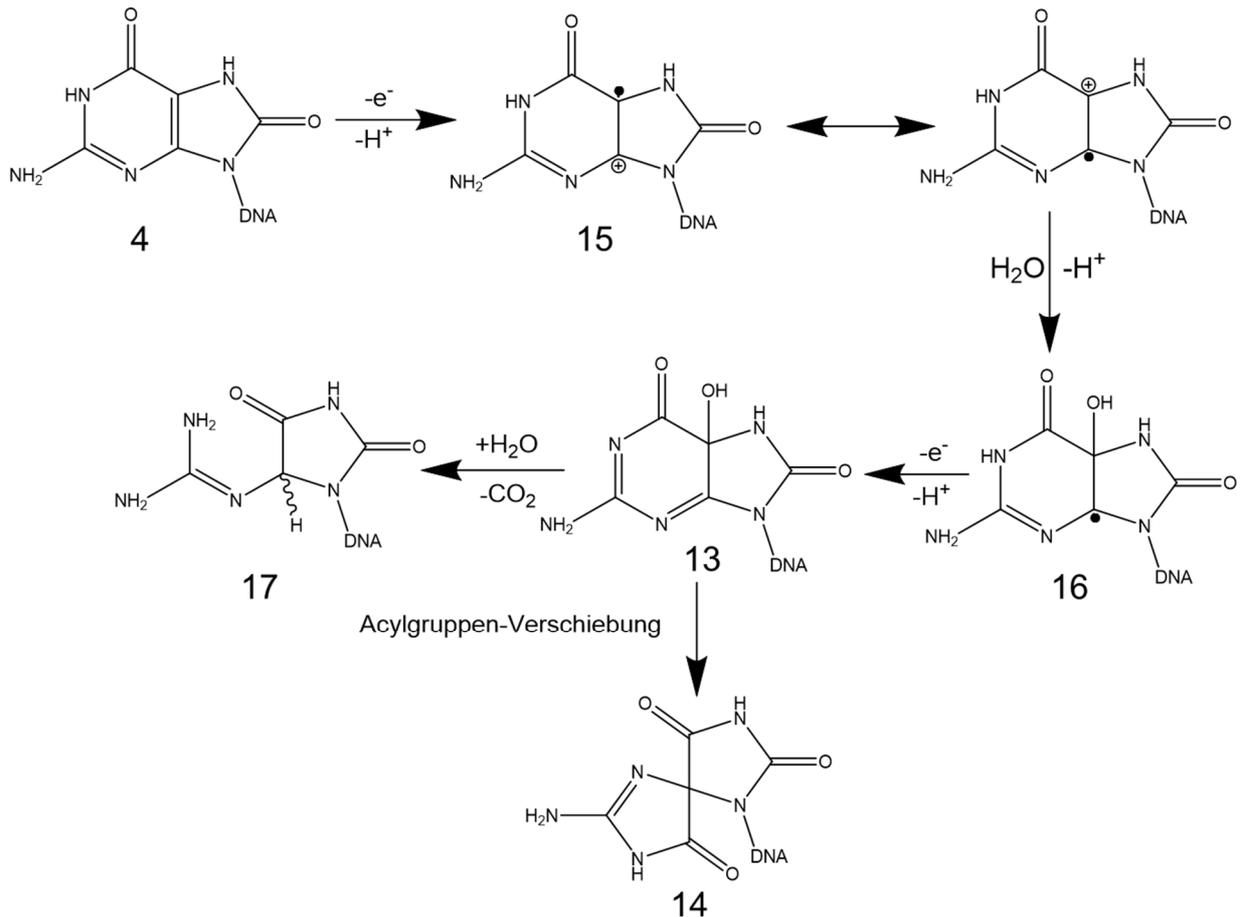


Abbildung 10

Reaktion von Guanin (1) mit Singulett-Sauerstoff 1O_2 . Durch die [4+2]-Cycloaddition des 1O_2 an Guanin (1) bildet sich nach Öffnung des Rings 8-Hydroperoxyguanin (11). Dies kann entweder durch Reduktion zum 8-oxoGua (4) oder unter Bildung eines Chinonoids (12) zu Spiroiminodihydroxyanthone (14) weiterreagieren. Reaktionsschritte nach Cadet et al. (54).

1.5.1.3 Oxidation von 8-Oxoguanin

Die Folgereaktion von 8-oxoGua ist wahrscheinlicher als die erneute Reaktion von Guanin. Das Ionisierungspotential von 8-oxoGua ist niedriger als das von Guanin, daher ist die Übertragung des Radikalkations auf 8-oxoGua die irreversible chemische Reaktion in der DNA (55, 66). Aus 8-Oxoguaninradikalkation (**15**) (Abbildung 11), welches mit Wasser zum 5-Hydroxy-8-oxoguaninradikal (**16**) reagiert. Nach einer Ein-Elektronen-Reaktion wird aus (**16**) das 5-Hydroxy-8-oxoguanin (**13**) gebildet (59). Je nach Reaktionsbedingungen entsteht aus (**13**) dann 5-Guanidinothioanthone (**17**) oder Spiroiminodihydroxyanthone (**14**) (45, 59).

**Abbildung 11**

Möglicher Reaktionsweg von 8-oxoGua (4) zu 5-Guanidinohydantoin (17) oder Spiroiminodihydantoin (14). Durch Bildung eines Radikalkations (15) kann mit einer weiteren Ein-Elektronen-Reaktion 5-Hydroxy-8-oxoguanin (13) entstehen. Reaktionsschritte nach Dizdaroglu und Jaruga (47).

1.5.2 Folgen und Reparatur der DNA-Schäden

Oxidativ geschädigte DNA führt zur genetischen Instabilität und kann in der Folge zu Krebs führen (67). Kommt es bei der Reparatur der DNA zu Fehlern, kann dies zur Mutagenese, Zytotoxizität und zum Zelltod führen (56, 68). Um dies zu verhindern, kann die Schädigung der DNA entfernt und die Struktur wieder hergestellt werden. Kommt es trotzdem zur DNA-Replikation mit einer geschädigten Base, gibt es drei Möglichkeiten:

1. Die DNA-Polymerase wird von der geschädigten Base geblockt und der Abbruch führt zum Zelltod.
2. Es wird eine inkorrekte Base eingebaut, was eine Punktmutation zur Folge hat.
3. Die richtige Base wird gegenüber der geschädigten eingebaut und die Schädigung hat keine negativen Auswirkungen (68). Die verschiedenen Mechanismen sowie weitere Informationen, wie die DNA-Reparatur initiiert wird, wurde von Sancar et al. beschrieben (69).

1.5.2.1 *Die Basenexzisionsreparatur*

Bei der Basenexzisionsreparatur wird das oxidierte Guanin durch eine DNA-Glykosylase unter Hydrolisierung der N-glykosidischen Bindung aus der DNA entfernt. Dabei entstehen eine abasische Stelle in der DNA und 8-Oxoguanin (49). Einige Glykosylasen besitzen auch Lyase-Aktivität und können die 3'-Phosphodiester-Bindung der abasischen Stelle hydrolysieren (49). Die Reaktionsprodukte sind ein α,β -ungesättigtes Aldehyd und ein 5'-Phosphat sowie ein Strangbruch. Die Struktur der DNA wird am Strangbruch durch Endonukleasen, DNA-Polymerasen und DNA-Ligasen wieder vollständig hergestellt. Die häufigste DNA-Glykosylase ist die 8-Oxoguanin-DNA-Glykosylase (OGG1). Neben 8-oxodG entfernt das OGG1-Enzym auch 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin, aber nicht 5-Guanidinohydantoin und Spiroiminodihydantoin. Die Endonuklease III hingegen ist spezifisch für geschädigte Pyrimidine und besitzt Lyase-Aktivität (70). Zudem sind die Endonukleasen VIII-like 1-3 im Menschen bekannt (71, 72). Endonukleasen VIII-like 1 und Endonukleasen VIII-like 3 besitzen nicht die Fähigkeit, 8-oxodG aus der DNA zu entfernen, können aber 5-Guanidinohydantoin und Spiroiminodihydantoin effektiv schneiden (73, 74). Die Substratspezifität und die weiteren Eigenschaften vieler DNA-Glykosylasen sind von Dizdaroglu et al. und David et al. untersucht worden (75, 76).

1.5.2.2 *Nukleotidexzisions- und DNA-Basenfehlpaarungsreparatur*

Für die Entfernung von Intrastrang-Tandem-Basen-Modifikationen und Intrastrang-Verknüpfungen als Folge von oxidativen Schäden ist die Nukleotidexzisionsreparatur verantwortlich.

Dabei werden erst die Stränge repariert, welche oft repliziert werden (49). Ein Enzymsystem, welches aus vielen Untereinheiten besteht, schneidet an zwei Stellen die DNA auf, um ein Oligodesoxynukleotid zu entfernen (69). Die entstandene Lücke wird von DNA-Polymerasen mit Nukleotiden gefüllt und die Stabilität der DNA wiederhergestellt. Der Nukleotidexzisionsreparatur-Mechanismus kann auch 8-oxodG entfernen (77). Ausführlich ist der Nukleotidexzisionsreparatur-Mechanismus von Friedberg beschrieben worden (78).

Der dritte Reparaturmechanismus wird durch das Enzym MutYh, eine N-Glykosylase mit Endonuklease-Aktivität, katalysiert. Dieser Mechanismus findet im Zellkern und den Mitochondrien statt (79). MutYh entfernt dabei Adenin gegenüber 8-oxodG und beschleunigt die Bindung von Cytosin mit 8-oxodG. Im zweiten Schritt wird 8-oxodG durch Basenexzisionsreparatur entfernt (49). Der Reparaturmechanismus wird als Basenfehlpaarungsreparatur bezeichnet.

1.6 Oxidative Schädigung und Reparatur der RNA

Die RNA wird, wie die DNA, vor allem von Radikalen wie OH^\bullet oxidativ geschädigt. Bisher sind über 20 verschiedene Produkte aus der Reaktion mit dem OH^\bullet bekannt (80). Die häufigste von ihnen ist 8-oxoGuo. Der Mechanismus ist dabei identisch mit der Bildung von 8-oxoGua in DNA. Zuerst wird ein C8-OH-Addukt-Radikal gebildet, welches durch Abgabe eines Elektrons und Protons zu 8-oxoGuo reagiert (81). Von den verschiedenen Typen der RNA wird am häufigsten mRNA oxidiert (81). Obwohl die mRNA nur 1–2 % der kompletten RNA einer Zelle ausmacht, ist sie die am besten in Bezug auf oxidative Schäden untersuchte RNA (82). Zudem werden nicht alle mRNAs willkürlich oxidiert, sondern es sind die mRNAs von bestimmten Proteinen betroffen. Der zugrunde liegende Mechanismus ist bisher unbekannt (83, 84).

Eine Folge von oxidiertem RNA ist unter anderem eine reduzierte Proteinbiosynthese. Dabei blockiert oxidierte mRNA die Ribosomen, sodass der Translationsprozess verlangsamt wird (85). Zusammenfassend führt oxidierte mRNA zu einem Verlust von Proteinen oder zur Bildung von funktionslosen Proteinen (85, 86). Bisher sind die Abwehrmechanismen, welche RNA vor Oxidation schützen, weitestgehend unbekannt (81). Kein Enzym konnte ermittelt werden, welches oxidierte mRNA repariert, obwohl so ein Enzym vorhanden sein könnte.

Denn für die Reparatur von Methylierungen der RNA ist die DNA-Demethylase hABH3 bekannt, welche die Hydroxylierung der Methylgruppe katalysiert und so entfernt (87). Neben der Reparatur spielt der Abbau der oxidierten mRNA eine Rolle. Hierbei bindet das YB-1-Protein an die oxidierte mRNA und führt diese zum Abbau dem Exosom zu (88). Auch kann die Polynukleotid-Phosphorylase oxidierte RNA erkennen und deren Abbau einleiten (89).

1.7 Die oxidative Schädigung des Nukleotidpools

Die frei vorliegenden Nukleotide des Nukleotidpools sind ebenso von ROS angreifbar wie doppelsträngige DNA und einzelsträngige RNA. Es wurde gezeigt, dass 8-oxodG aus freiem 2'-Desoxyguanosin über 20-fach schneller gebildet wird als 8-oxoGua in der DNA (90). 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat ist hauptsächlich im Zytosol lokalisiert und kann dort leichter von ROS angegriffen werden als Guanin, welches durch die histongebundene DNA geschützt wird (91). Genauso wie 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat kann auch Guanosin-5'-triphosphat oxidiert werden (92). Neben den beiden Triphosphaten können auch Monophosphate und Diphosphate vom 2'-Desoxyguanosin und Guanosin oxidiert werden (92, 93).

In Abbildung 12 sind am Beispiel der DNA-Synthese die Enzyme und die verschiedenen Produkte des Nukleotidpools dargestellt. Der Aufbau der RNA verläuft analog, nur wird sie durch RNA-Polymerasen synthetisiert. Die Schlüsselenzyme sind die Nukleosidtriphosphatasen (NUDT1, NUDT5 und NUDT15), welche die Hydrolyse der oxidierten Triphosphate von 2'-Desoxyguanosin und Guanosin zum jeweiligen Monophosphat katalysieren (56, 94).

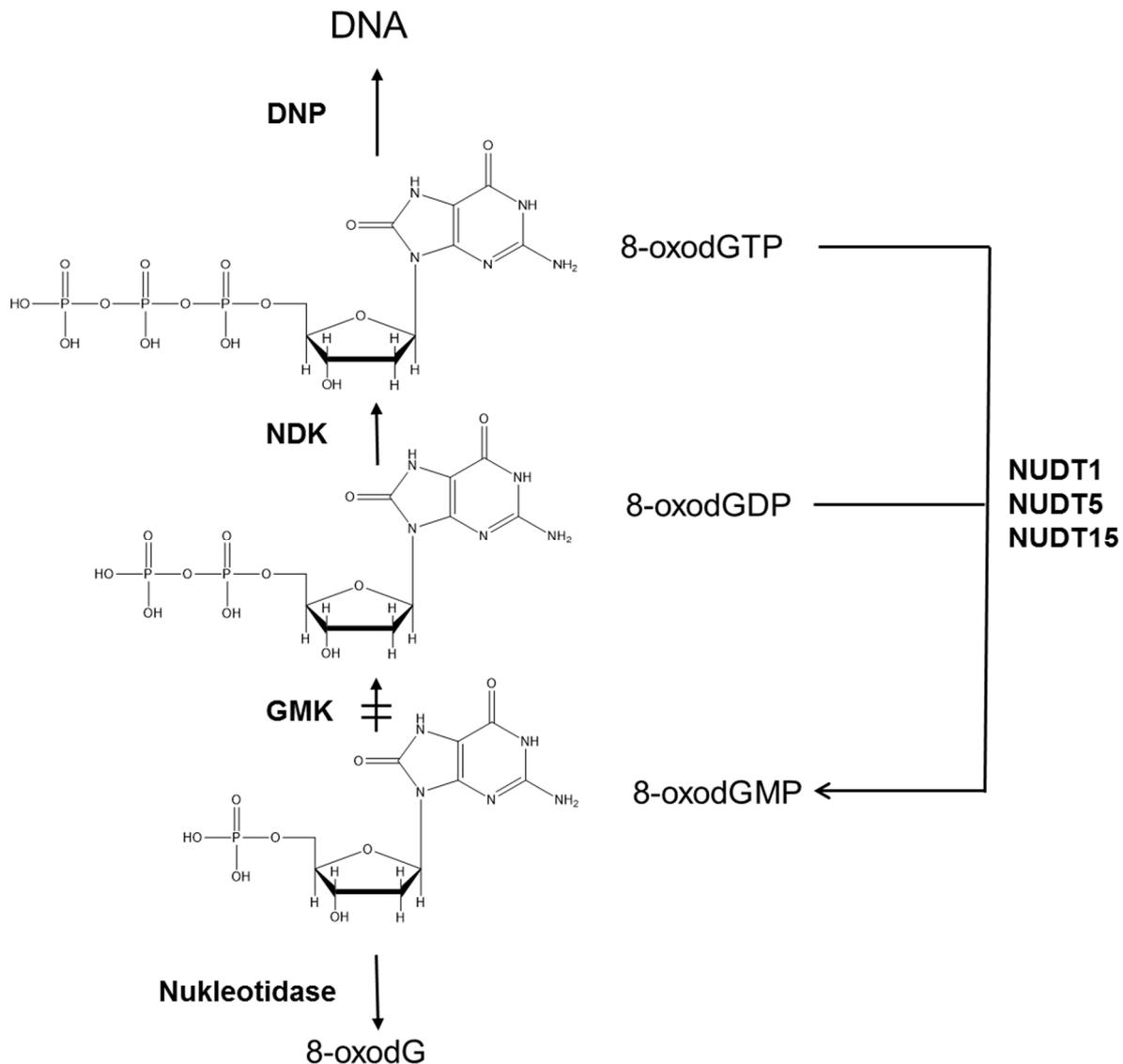


Abbildung 12

Aufbau der DNA aus dem oxidativ geschädigten Nukleotidpool. DNA-Polymerasen (DNP) bauen 8-Oxo-2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat (8-oxodGTP) in die DNA ein. Dieses wird entweder aus 8-Oxo-2'-Desoxyguanosin-5'-diphosphat (8-oxodGDP) durch Phosphorylierung durch Nukleotid-Kinase (NDK) gebildet oder es entsteht durch Oxidation. 8-Oxo-2'-Desoxyguanosin-5'-monophosphat (8-oxodGMP) ist ein Abfallprodukt, da es von der Guanylat-Kinase (GMK) nicht erkannt wird. NUDT1, NUDT5 und NUDT15 dephosphorylieren die geschädigten Nucleotide und entfernen sie aus dem Nucleotidpool. Nucleotidasen dephosphorylieren 8-oxodGMP und sorgen dafür, dass das ungeladene 8-oxodG die Zellmembran passieren kann. Abbildung basiert auf Sekiguchi et al. (92).

2'-Desoxyguanosin-5'-monophosphat ist ein Abfallprodukt, da die für die DNA-Synthese wichtigen Desoxyribonucleotide aus der Reduktion von Ribonucleotid-Diphosphaten gebildet werden (95). Die Reduktase reagiert dabei nur minimal mit 8-Oxo-2'-Desoxyguanosin-5'-diphosphat (93).

Die Guanylat-Kinase, welche Guanosin-5'-monophosphat zu Guanosin-5'-diphosphat phosphoryliert, interagiert nicht mit der oxidierten Form der Nukleotide (92). So sorgt die Bildung der Monophosphate von 8-oxodG und 8-oxoGuo durch NUDT1, NUDT5 oder NUDT15 für die Entfernung der oxidierten Nukleotide aus den beiden Nukleotidpools. Die Bildung von 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat und Guanosintriphosphat aus den jeweiligen Diphosphaten wird von der Nukleotid-Kinase katalysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung der Diphosphate von 8-oxodG und 8-oxoGuo durch die Nukleotid-Kinase mit ähnlicher Effizienz stattfindet wie die der nicht oxidierten Formen (92). Die RNA-Polymerase in *E.coli* baut 8-Oxoguanosin-5'-triphosphat mit einer Rate von 5–10 % im Vergleich zu Guanosintriphosphat in die RNA ein (96). Auch DNA-Polymerasen können nicht gut zwischen dem oxidierten und nicht oxidierten 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat unterscheiden. Die DNA-Polymerase III aus *E.coli* und die Polymerasen η und ζ nutzen 8-Oxo-2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat mit derselben Effizienz wie 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat (94, 97). Die oxidierten Monophosphate von 2'-Desoxyguanosin und Guanosin werden von Nukleotidasen dephosphoryliert und können die Zelle verlassen, da sie als ungeladenes Molekül die Membran passieren können (98).

1.8 Biomarker und Nachweismethoden für oxidative Schäden

Mit Biomarkern werden Produkte von Organismen bezeichnet, die als Indikatoren für Umweltbelastungen oder Krankheiten stehen. Die Messung von Biomarkern ist mit verschiedenen Methoden möglich und geht bis in die Antike zurück. Dort haben Ärzte an Farbe, Geruch und Geschmack von Urin die zugrunde liegende Krankheit festgestellt (99). 8-oxodG und 8-oxoGuo sind bei vielen unterschiedlichen Krankheiten erhöht und können daher als oxidative Stressmarker genutzt werden. Sie werden im Urin, Plasma, Liquor cerebrospinalis und direkt in der DNA oder RNA gemessen (100). Zur Messung von 8-oxodG und 8-oxoGuo aus flüssigen biologischen Proben, wie Urin, Plasma oder Liquor cerebrospinalis, steht die Chromatographie in Kombination mit der Massenspektrometrie oder elektrochemischen Detektoren im Vordergrund (101).

Ebenso sind immunochemische Methoden wie der Enzymgekoppelte Immunadsorptionstest (ELISA) im Einsatz. Neben dem ^{32}P -Postlabeling sind auch UV-Detektoren nicht mehr Mittel der ersten Wahl, da diese teuer, gesundheitsschädlich und nicht sensitiv genug sind (101). Mit dem Formamidopyrimidin-Glykosylase (FPG)-Comet-Assay gelingt es 8-oxodG direkt in der DNA nachzuweisen (102). Zudem kann die DNA isoliert und hydrolysiert werden und anschließend mittels HPLC-MS/MS der Gehalt an 8-oxodG bestimmt werden. Zum Nachweis oxidativer Schäden in der RNA kann ein Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)-Assay den Gehalt von 8-oxoGuo ermitteln (103).

1.9 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie

Die Kombination der Säulenchromatographie als Trennmethode und der Massenspektrometrie als Detektor ermöglichen eine schnelle und einfache Untersuchung von flüssigen Proben unter verschiedenen Gesichtspunkten. Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*High performance liquid chromatography*, HPLC) bietet viele Möglichkeiten durch die Kombination von verschiedenen Säulen, Eluenten und Gradienten, unterschiedlichste Proben aufgrund von Moleküleigenschaften aufzutrennen. Mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) können die Fragmentierungsmuster von Molekülen untersucht oder die Sensitivität eines quantitativen Nachweises deutlich verbessert werden. Um dies zu erreichen, werden Analysatoren, die von Kollisionszellen unterbrochen werden, hintereinander geschaltet. Durch Stöße mit Inertgas werden die Ionen fragmentiert. Dabei können durch Anlegen von verschiedenen Spannungen gezielt bestimmte Fragmentierungsmuster initiiert werden. Die Messung von ein oder zwei Fragment-Ionen ermöglicht eine Quantifizierung und Qualifizierung des untersuchten Moleküls. Werden zu jedem Zeitpunkt der Messung mehrere Übergangspaare von unterschiedlichen Molekülen detektiert, wird von *Multiple reaction monitoring* gesprochen (104, 105).

2 Fragestellung der Arbeit

Erhöhte Aktivität des RAAS bei Bluthochdruck führt zur Bildung von ROS durch die NADPH-Oxidase (106, 107). Die Schädigung der DNA durch oxidativen Stress kann zu Punktmutationen in den *RAS*-Onkogenen oder dem *p53*-Tumorunterdrückungsgen führen und so Krebs auslösen (108). Der Nachweis von oxidativem Stress im Körper wird mit den Markern 8-oxodG und 8-oxoGuo im Urin geführt. Zahlreiche Publikationen und Übersichtsartikel zeigen ein gehobenes Interesse an einer Optimierung der Messmethoden (100, 101, 109).

Ziel dieser Doktorarbeit war es, die oxidativen Stressmarker 8-oxoGua, 8-oxodG und 8-oxoGuo *in vivo* im Urin von hypertensiven C57BL/6-Mäusen und Sprague-Dawley-Ratten (SD-Ratten) nachzuweisen. Mit der *In-vitro*-Untersuchung sollten direkte oxidative Schäden durch Angiotensin II und Aldosteron in der DNA und RNA untersucht werden. Dazu wurden Schweinenierenzellen der Linie LLC-PK1 kultiviert und behandelt. Die Bildung von 8-oxodG in der DNA sollte mit drei unterschiedlichen Methoden nachgewiesen werden, um die Vor- und Nachteile dieser vergleichen zu können. Folgende Nachweismethoden wurden verglichen:

- Der Formamidopyrimidin-Glykosylase-Comet-Assay (FPG-Comet-Assay)
- Die immunzytochemische Färbung
- Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS)

Ein weiterer Punkt war die Etablierung je einer HPLC-MS/MS-Methode zum Nachweis von 8-oxodG in DNA und 8-oxoGuo in RNA. Dazu sollten bestehende HPLC-MS/MS-Methoden zur Messung von oxidativen Stressmarkern im Urin optimiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Die in dieser Arbeit verwendeten Materialien, Pufferlösungen, Zelllinien, Tiere und HPLC-Säulen sowie Geräte, Chemikalien und Software werden in Tabellen zusammengefasst, um eine gute Übersichtlichkeit zu gewährleisten.

Tabelle 1

Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Herstellern

Verbrauchsmaterial	Hersteller
6-well-Zellkulturplatte	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Deckgläser (24 x 24 mm, 21 x 26 mm)	Marienfeld (Lauda, Deutschland) Hartenstein (Würzburg, Deutschland)
Eppendorfcup	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Objektträger Superfrost (76 x 26 x 1 mm)	Thermo Scientific (Karlsruhe, Deutschland)
Ultrazentrifugen-Filtereinheiten	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Zellkulturflaschen (175, 75 und 25 cm ²)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Zellkulturschaber	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Osmotische Minipumpe	Alzet (Cupertino, USA)
<i>Low volume insert</i>	Brown (Wertheim, Deutschland)
<i>Crimp seal</i>	Brown (Wertheim, Deutschland)
Vials	Sigma (München, Deutschland)

Tabelle 2

Verwendete Chemikalien und Enzyme mit Herstellern

Chemikalien/Enzyme	Hersteller
1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO)	Sigma (München, Deutschland)
2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure (Hepes)	Roth (Karlsruhe, Deutschland) PAA (Pasching, Österreich)
2'-Desoxyguanosin	Sigma (München, Deutschland)
[¹⁵ N ₅]-2'-Desoxyguanosin	Silantes (München, Deutschland)

Chemikalien/Enzyme	Hersteller
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma (München, Deutschland)
8-Oxoguanin+HCl	Cayman (Ann Arbor, USA)
8-Oxoguanosin	Cayman (Ann Arbor, USA)
8-Mercapto-7,8-dihydroguanosin	Sigma (München, Deutschland)
8-Oxo-2'-desoxyguanosin	Wako (Neuss, Deutschland)
8-oxodG-Antikörper (SQP003.1)	Squarix (Marl, Deutschland)
Acetonitril (HPLC grade)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Aldosteron	Sigma (München, Deutschland)
Alkalische Phosphatase	Roche (Basel, Schweiz)
Ameisensäure	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ammoniumformiat	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Angiotensin II	Ray Bio (Norcross, USA)
Ascorbinsäure	Sigma (München, Deutschland)
Rinderserumalbumin (BSA)	PAA (Pasching, Österreich)
Bradford Lösung	Bio-Rad (München, Deutschland)
Kalbthymus-DNA	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Candesartan	Astra Zeneca (Wedel, Deutschland)
Katalase	Roche (Basel, Schweiz)
Chelex	Sigma (München, Deutschland)
Chloroform	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
cT-DNA	Sigma (München, Deutschland)
Cy3-gekoppelten goat anti-rabbit IgG-Zweitantikörper	Jackson Immunoresearch (Newmarket, Großbritannien)
Deferoxamin	Sigma (München, Deutschland)
Dikaliumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	PAA (Pasching, Österreich)
Eplerenon	Pfizer (Berlin, Deutschland)
Ethanol	Sigma (München, Deutschland)

Chemikalien/Enzyme	Hersteller
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Fetales Kälberserum (FBS)	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Fluorescein-Diacetat (FDA)	Sigma (München, Deutschland)
Formamidopyrimidin-DNA-glykosylase (FPG)	Selbst hergestellt
GelRED [®]	Biotium (Hayward, USA)
Glycin	Sigma (München, Deutschland)
Guanosin	Sigma (München, Deutschland)
hochschmelzende (HMP) Agarose	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Kaliumchlorid	Sigma (München, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Kaliumhydroxid	Sigma (München, Deutschland)
Konfokale Matrix	Micro Tech Lab (Graz, Österreich)
Kupfersulfat	Sigma (München, Deutschland)
L-Glutamin	PAA (Pasching, Österreich)
Lithiumacetat-2-hydrat	Sigma (München, Deutschland)
Niedrigschmelzende (LMP) Agarose	Sigma (München, Deutschland)
Magnesiumchlorid	Sigma (München, Deutschland)
Methanol (HPLC grade)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Methylenblau	Sigma (München, Deutschland)
Na-N-Lauroylsarcosin	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Natriumacetat	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumhydroxid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumiodid	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Nuklease P1	Sigma (München, Deutschland)
Penizillin/Streptomycin	PAA (Pasching, Österreich)
Proteinkinase K	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ramipril	Sanofi aventis (Frankfurt, Deutschland)

Chemikalien/Enzyme	Hersteller
RNase A	Sigma (München, Deutschland)
RNase T1	Sigma (München, Deutschland)
Saccharose	Sigma (München, Deutschland)
37%ige Salzsäure	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Spironolacton	Sigma (München, Deutschland)
Sulforaphan	Santa Cruz (Heidelberg, Deutschland)
Tempol	Sigma (München, Deutschland)
TRI Reagent®	Sigma (München, Deutschland)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Triton® X-100	Sigma (München, Deutschland)
Trypsin	PAA (Pasching, Österreich)
Tween (Polysorbat 20)	Sigma (München, Deutschland)
Wasser (HPLC grade)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Sigma (München, Deutschland)
Zinksulfat	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)

Tabelle 3

Verwendete Zelllinie mit Quelle sowie die im Tierversuch eingesetzten Tiergattungen, Arten und Hersteller

Zelllinie / Gattung	Quelle / Stamm	Hersteller
LLC-PK1 (Schweineniere)	ATCC ECA CC No. 8612112	CLS Heidelberg Order Nr. 607264
Maus	C57BL/6	Janvier (Saint-Berthevin, Frankreich)
Maus	B6.129P2-Agtr1a ^{tm1Unc/J}	Charles River (Köln, Deutschland)
Ratte	Sprague-Dawley	Janvier (Saint-Berthevin, Frankreich)

Tabelle 4*Verwendete Geräte mit Modell sowie Hersteller*

Geräte	Modell	Hersteller
Cytospinzentrifuge	Cytospin 3	Thermo Scientific (Karlsruhe, Deutschland)
Elektrophoresekammer		Haustechnik
Färbekästen	Typ Hellendahl	Hartenstein (Würzburg, Deutschland)
Fluoreszenzmikroskop	Diavert	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Homogenisator+ Glaskolben	15 ml	Hartenstein (Würzburg, Deutschland)
HPLC-MS/MS	Valco Ventil EHMA Bin Pump G1312A Entgaser G1379A ALS G1313A API 3000	Vici (Schenkon, Schweiz) Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland) Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
HPLC-MS/MS	Valco Ventil 06P0208V ALS G1313A Quat pump G1311A Entgaser G1322A Q-TRAP/API 2000	Vici (Schenkon, Schweiz) Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland) Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
HPLC-UV	VWD G1314A Pump Entgaser	Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)
Inkubator		Heraeus (Hanau, Deutschland)
Kamera	Luca S	Andor Technology (Belfast, UK)
Lyophilisator	Alpha 1-4 LSC	Christ (Osterode, Deutschland)
Mikroskop	Laborlux K	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Mikroskop	Precision Line	Thermo-DUX (Wertheim, Deutschland)

Geräte	Modell	Hersteller
Mikroskop	TCS SP5 konfokales Laserrastermikroskop	Leica (Wetzlar, Deutschland)
pH-Meter	Level 1	inoLab (Weilheim, Deutschland)
SpeedVac	VR-1/120/240	Heraeus (Hanau, Deutschland)
UV/VIS-Spektrometer	U-2000	Hitachi (Düsseldorf, Deutschland)
UV/VIS-Spektrometer	NanoDrop200c	Thermo Scientific (Karlsruhe, Deutschland)
Spritze	100 µl/ 1 ml	Hamilton (Höchst, Deutschland)
Sterilwerkbank	BSK-6	Anthos (Krefeld, Deutschland)
Stromquelle	Power Pac Basic 300	Bio-Rad (München, Deutschland)
Thermomixer	Comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Wärmeschrank		Heraeus (Hanau, Deutschland)
Zählkammer	Neubauer	HBG (Giessen, Deutschland)
Zentrifuge	Rotanta Typ 3502	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
Zentrifuge	Universal 16R	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
Zentrifuge	Universal 320R	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
Zentrifuge	RC-5B Plus	Thermo Scientific (Karlsruhe, Deutschland)

Tabelle 5*Verwendete HPLC-Säulen mit den Abmessungen sowie den Herstellern*

Säule	Abmessungen	Hersteller
AQ-ODS	RP C18, 5 µm, 150 x 4,6 mm	YMC (Dinslaken, Deutschland)
AQUA C18	RP C18, 4 x 2 mm	Dr. Maisch (Ammerbuch- Entringen, Deutschland)
Hypersil ODS	RP C18, 5 µm, 250 x 4,6 mm	Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland)
Luna 3µ Phenyl-Hexyl	RP mit Phenyl modifizierte C6, 3 µm 150 x 4,6 mm	Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland)
PerfectSil	RP C18, 5 µm, 50 x 4,6 mm	MZ-Analysentechnik (Mainz, Deutschland)
Phenyl C18	RP C18, 4 x 3 mm	Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland)
Polyamin-II-endcapped	NP mit Aminen modifizierte C18, 150 x 4,6 mm, 5 µm	YMC (Dinslaken, Deutschland)

Tabelle 6*Verwendete Software mit Version und Hersteller*

Computerprogramm	Version	Hersteller
Analyst Software	1.4.2	AB Sciex (Darmstadt, Deutschland)
ImageJ	1.40g	RSB Home (Bethesda, USA)
Komet	6.0	Andor Technology (Belfast, UK)
NanoDrop 2000/2002c	1.4.2	Thermo Scientific (Karlsruhe, Deutschland)
Origin	9.1	Origin Lab Corporation (Northampton, USA)

Tabelle 7

Für die jeweilige Methode angesetzte Medien, Puffer und Lösungen mit deren Zusammensetzung

Methode	Medium/Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Zellkultur	DMEM niedrig Glukose (1g/l)	<ul style="list-style-type: none"> - 10 % FBS - 1 % L-Glutamin - 0,4 % Penicillin und Streptomycin - 2,5 % Hepes
Isolierung von Nukleotiden aus Zellen	organische Lyselösung	<ul style="list-style-type: none"> - 2:2:1 Methanol:Acetonitril: 0,1 mM Deferoxamin - 100 µM 8-Mercapto-7,8-dihydroguanosin als internen Standard zugeben - Endkonzentration des internen Standards 250 nM
DNA-Isolierung	Puffer A	<ul style="list-style-type: none"> - 320 mM Saccharose - 5 mM MgCl₂ - 10 mM Tris - 0,1 mM Deferoxamin - 1 % Triton® X-100 - pH 7,5 einstellen - Lagerung bei 4 °C
	Puffer B	<ul style="list-style-type: none"> - 10 mM Tris - 5 mM Na₂EDTA - 0,15 mM Deferoxamin - pH-Wert 8 mit NaOH einstellen - Lagerung bei 4 °C

Methode	Medium/Puffer/Lösung	Zusammensetzung
	RNasepuffer	<ul style="list-style-type: none"> - 10 mM Tris - 1 mM EDTA - 2,5 mM Deferoxamin - pH-Wert 7,4 mit NaOH einstellen - Lagerung bei 4 °C
	Natriumiodidlösung	<ul style="list-style-type: none"> - 7,6 M NaI - 40 mM Tris - 20 mM Na₂EDTA - 0,3 mM Deferoxamin - pH-Wert 8 einstellen - Lagerung bei Raumtemperatur
DNA-Hydrolyse	Nukleasepuffer	<ul style="list-style-type: none"> - 300 mM Natriumacetat - 1 mM ZnSO₄ - pH-Wert 5,3 einstellen - Lagerung bei 4 °C
	10 x alkalische Phosphatasepuffer	<ul style="list-style-type: none"> - 500 mM Tris HCl - 1 mM EDTA - pH-Wert 8 einstellen - Lagerung bei 4 °C
Comet-Assay	Lysepuffer	<ul style="list-style-type: none"> - 2,5 M NaCl - 100 mM EDTA - 10 mM Tris - 1 % Natriumsarcosinat - pH-Wert 10 einstellen - Lagerung bei Raumtemperatur

Methode	Medium/Puffer/Lösung	Zusammensetzung
	Lyselösung	<ul style="list-style-type: none"> - 89 ml Lysepuffer - 10 ml DMSO - 1 ml Triton® x-100 - max. 1 Tag bei 4 °C lagern
	Enzympuffer F	<ul style="list-style-type: none"> - 40 mM Hepes - 0,1 M KCl - 0,5 mM EDTA - 0,2 mg/ml BSA - pH-Wert 8 mit KOH einstellen - Lagerung bei -20 °C
	Elektrophoresepuffer	<ul style="list-style-type: none"> - 0,3 M NaOH - 1 mM EDTA - max. 1 Tag bei 4 °C lagern
	Neutralisationspuffer	<ul style="list-style-type: none"> - 0,4 M Tris - pH-Wert 7,5 mit HCl einstellen - Lagerung bei Raumtemperatur
	0,5 % LMP-Agarose	<ul style="list-style-type: none"> - LMP-Agarose in PBS lösen und aufkochen - Lagerung bei 4 °C
	1,5 % HMP-Agarose	<ul style="list-style-type: none"> - HMP-Agarose in PBS lösen und aufkochen - Lagerung bei Raumtemperatur

Methode	Medium/Puffer/Lösung	Zusammensetzung
	GelRED®-Färbelösung	<ul style="list-style-type: none"> - 1 ml 1:10 mit Wasser verdünntes GelRED® - 3 ml DABCO - Lagerung bei Raumtemperatur
Allgemeiner Gebrauch	PBS	<ul style="list-style-type: none"> - 0,14 M NaCl - 2,68 mM KCl - 3,23 mM Na₂HPO₄ - 1,47 mM KH₂PO₄ - pH-Wert 7,4 einstellen - Lagerung bei 4 °C
	Chelex-20 mM Natriumphosphatpuffer	<ul style="list-style-type: none"> - 20 mM Natriumphosphat - pH-Wert 7 einstellen - Lagerung bei 4 °C
RNA-Isolierung	TRI Reagent®	<ul style="list-style-type: none"> - Mischung aus Phenol und Guanidin-Thiocyanat
Vitalitätstest	Vitalitätsfärbelösung	<ul style="list-style-type: none"> - 12 µl Fluorescindiacetat (5 mg/ml Aceton) - 2 µl GelRED® - 2 ml PBS - Lagerung für zwei Wochen bei 4 °C
Immunzytochemische Färbung	alkalische Lösung	<ul style="list-style-type: none"> - 60 % 70 mM NaOH - 140 mM NaCl - 40 % Methanol
	Proteinkinasepuffer	<ul style="list-style-type: none"> - 20 mM Tris/HCl - 2 mM CaCl₂ - pH-Wert 7,5 einstellen

3.1.1 Zellkultur

Die LLC-PK1-Zellen wurden bei 37 °C und 5 % (l/l) CO₂ in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) kultiviert. Das DMEM enthielt 1 g/l Glukose und wurde mit 10 % (l/l) Fetalem Kälberserum (FBS), 1 % (g/l) L-Glutamin, 2,5 % (g/l) Hepes, 0,4 % Antibiotika (50 U/ml Penizillin, 50 µg/ml Streptomycin) versetzt. Die LLC-PK1-Zellen wurden zweimal pro Woche gesplittet und nach dem Auftauen bis Passage 10 genutzt. Für die Behandlungen der LLC-PK1-Zellen wurden diese einen Tag vor dem Versuch ausgesät.

3.1.2 Ernten der LLC-P1-Zellen

Zum Ablösen der LLC-PK1-Zellen aus der Zellkulturflasche wurde das DMEM abgenommen und die Zellkulturflaschen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gespült. Zum Ablösen der LLC-PK1-Zellen von der Oberfläche der Zellkulturflasche wurde eine Lösung bestehend aus 0,5 g/l Trypsin und 0,2 g/l EDTA in die Flasche gegeben. Nach 5 Minuten bei 37 °C und 5 % (l/l) CO₂ wurde die Ablösereaktion durch Zugabe der zweifachen Menge eiskaltem DMEM gestoppt. Die Zellzahl in der Zellsuspension wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

3.1.3 Generierung der Zellkulturproben

Zur Generierung der Zellkulturproben für die verschiedenen Messmethoden wurden folgende Konzentrationen von Zellen einen Tag vor dem Versuch ausgesät (Tabelle 8).

Tabelle 8

Konzentrationen und Mediumvolumen für die Generierung für die verschiedenen Messmethoden

Methode	Zellen/ml DMEM	Volumen DMEM	Zellkulturflasche
Vitalitätstest	0,3–0,5*10 ⁵	3 ml	Zellkulturplatte (6 wells)
Comet-Assay	0,7*10 ⁵	5 ml	25 cm ²
DNA-Isolierung	0,1*10 ⁶	50 ml	175 cm ²
RNA-Isolierung	0,1*10 ⁶	20 ml	75 cm ²
Zytosol	0,1*10 ⁶	50 ml	175 cm ²

Nach der Behandlung der Zellen wurden diese mittels Trypsin geerntet, in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen überführt und bei $170 \times g$ für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden entweder in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert oder direkt die weiteren Schritte der jeweiligen Methode eingeleitet. Für die Generierung der Zytosolproben wurde wie unter Abschnitt 3.2.5.6 beschrieben geerntet.

Alle Konzentrationsangaben für die Probengenerierung sind Endkonzentrationen. Jedes Experiment wurde, wenn nicht anders angegeben, viermal wiederholt.

3.1.3.1 *Dosis- und zeitabhängige Versuche mit Angiotensin II und Aldosteron*

Für die dosisabhängigen Untersuchungen wurden die Zellen 30 Minuten lang mit 100, 200 oder 400 nM Angiotensin II behandelt. Für Aldosteron waren die verwendeten Konzentrationen 1, 10 oder 100 nM. Als Kontrolle wurde PBS verwendet. Die Stammlösungen waren jeweils 1000-fach höher konzentriert und Angiotensin II war in 100%igem DMSO gelöst und Aldosteron in PBS.

Für den Zeitversuch wurden 200 nM Angiotensin II oder 10 nM Aldosteron für den Comet-Assay eingesetzt. Für den Nachweis von 8-oxodG in der DNA und 8-oxoGuo in der RNA wurden 200 und 400 nM Angiotensin II oder 10 und 100 nM Aldosteron verwendet. Die Messzeitpunkte waren 15, 60 und 240 Minuten. Für die Messung von 8-oxodG im Zytosol wurden 200 nM Angiotensin II oder 100 nM Aldosteron eingesetzt und die Messzeitpunkte waren 30 und 60 Minuten.

Mit der immunzytochemischen Färbung wurde der Zeitversuch (1 und 4 Stunden) mit den folgenden Konzentrationen durchgeführt: Kontrolle (4 Stunden) und 200 nM Angiotensin II. Die Zellen wurden aus der Probengenerierung für die DNA-Isolierung entnommen.

3.1.3.2 *Behandlungen mit Methylenblau und H₂O₂*

Eine 1 mg/ml wässrige Lösung aus Kalbsthymus-DNA (cT-DNA) oder LLC-PK1-Zellen wurde mit verschiedenen Konzentrationen von Methylenblau behandelt. Für die Generierung von cT-DNA-Proben mit Methylenblau wurde die Vorgabe von Singh et al. verwendet (110). Die Hydrolyse der cT-DNA wurde wie unter 3.2.5.4 beschrieben durchgeführt. Für die Generierung der Proben aus Zellen wurden diese mit 1,6 mM (DNA-Isolierung) und 15,6 und 31,3 mM (Zytosolproben) Methylenblau behandelt. Die Proben wurden für 10 (DNA-Isolierung) und 30 (Zytosolproben) Minuten auf Eis mittels einer 60-Watt-Lampe (20 cm Entfernung) belichtet.

Für den Nachweis von 8-oxoGuo aus RNA-Proben wurden diese mit 100, 200 und 400 mM H₂O₂ für 30 Minuten behandelt. Zusätzlich wurde ein Zeitversuch mit 200 mM H₂O₂ und den Messzeiten 60 und 120 Minuten durchgeführt.

3.1.4 *Verschiedene Behandlungen der Tierversuche*

Im Folgenden sind die Tierversuche beschrieben, von denen Urinproben gemessen wurden. Alle Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Europäischen Gemeinschaft zur Handhabung von Versuchstieren und dem deutschen Gesetz zum Schutz von Tieren durchgeführt.

Drei Tierversuche wurden mit C57BL/6-Mäusen durchgeführt. Der erste wurde von Frau Dr. Brand betreut und hatte zum Ziel, die Wirkung von Angiotensin II auf den oxidativen Stress in der Maus zu untersuchen. Außerdem wurde die Wirkung von unterschiedlichen Interventionen auf den von Angiotensin II verursachten Schaden untersucht, im Folgenden als Interventionsversuch bezeichnet.

Die beiden weiteren Tierversuche wurden von Frau Dipl.-Biol. Zimnol betreut. Das Ziel des ersten Versuchs war es, die Auswirkung des Verlustes vom Angiotensin-II-Typ1a-Rezeptor (AT_{1a}) mittels einer Mutation im Gen dieses Rezeptors zu untersuchen. Die Mutation bewirkt, dass die mRNA gebildet wird, nicht aber das Protein. Das Gen für AT_{1b} ist vorhanden (18). Im zweiten Tierversuch wurde untersucht, wie sich der Verlust der NADPH-Oxidase 4 (NOX4) auf die Behandlung mit Angiotensin II auswirkt. Für diesen Versuch wurden C57BL/6-Mäuse mit einem Knockout des NOX4-Gens eingesetzt.

In allen Tierversuchen wurde den C57BL/6-Mäusen (männlich) eine osmotische Minipumpe eingesetzt, die entweder Angiotensin II (600 ng/kg*min) oder PBS für 4 Wochen enthielt. Zum Sammeln des Urins wurden die Mäuse einige Tage vor Ende des Versuchs in Stoffwechsellkäfige gesetzt. Das Urinvolumen wurde nach 20 Stunden bestimmt. Zur Entnahme der gewünschten Organe wurden die Tiere anästhesiert. Vom Interventionsversuch wurde aus Nierengewebe die DNA isoliert und bei -80 °C eingefroren.

Der Tierversuch mit Sprague-Dawley-Ratten (SD-Ratten) sollte die Wirkung von Aldosteron und die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 untersuchen. Dieser Versuch wurde von Frau Dr. Queisser betreut.

3.1.4.1 *Intervention gegen die Wirkung von Angiotensin II*

Es wurden C57BL/6-Mäuse verwendet, die im Alter von 17 Wochen in sieben Gruppen mit je acht Tieren eingeteilt wurden. Die fünf Interventionen waren: Candesartan (8 mg/kg*d), Ramipril (5 mg/kg*d), Hydralazin (15 mg/kg*d), Eplerenon (100 mg/kg*d) und Tempol (1mM). Eplerenon wurde mit dem Futter verabreicht, alle anderen Interventionen mit dem Trinkwasser.

Die in dieser Arbeit beschriebenen fünf Gruppen werden im Weiteren wie folgt bezeichnet: Kontrolle, Angiotensin-II, Candesartan/Angiotensin-II, Eplerenon/Angiotensin-II und Tempol/Angiotensin-II (111). Die Ergebnisse der Ramipril- und Hydralazin-Gruppe sind im Anhang zu finden (9.1).

3.1.4.2 *Mutation des Gens AT_{1a} bei C57BL/6-Mäusen*

Im zweiten Tierversuch wurden 24 Wildtyp-C57BL/6-Mäuse (WT) und 16 B6.129P2-Agtr1a^{tm1Unc}/J-Mäuse (AT_{1a}-KO), bei denen das Gen für AT_{1a} deaktiviert war, verwendet. Die WT-Mäuse wurden in drei Gruppen mit je acht Tieren aufgeteilt und die AT_{1a}-KO in zwei Gruppen zu je acht Tieren. Als Intervention gegen Angiotensin II wurde einer Gruppe C57BL/6-Mäusen Candesartan (10 mg/kg*d) mit dem Trinkwasser verabreicht.

Die fünf Gruppen werden im Weiteren wie folgt bezeichnet: AT_{1a}-WT-K, AT_{1a}-WT-Angiotensin-II, AT_{1a}-WT-Candesartan/Angiotensin-II, AT_{1a}-KO-K und AT_{1a}-KO-Angiotensin-II (112).

3.1.4.3 *Knockout des Gens NOX4 bei C57BL/6-Mäusen*

Für den dritten Tierversuch wurden 30 Wildtyp-C57BL/6-Mäuse (WT) sowie 21 C57BL/6-Knockout-Mäuse (NOX4-KO), mit einem Knockout für die *NOX4*, verwendet. Die Mäuse wurden in fünf Gruppen zu je zehn Tieren eingeteilt.

Die in dieser Arbeit beschriebenen vier Gruppen werden im Weiteren wie folgt bezeichnet: NOX4-WT-K, NOX4-WT-Angiotensin-II, NOX4-KO-K und NOX4-KO-Angiotensin-II (112).

3.1.4.4 *Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 durch verschiedene Behandlungen von Sprague-Dawley-Ratten*

Es wurden 61 männliche SD-Ratten im Alter von 8 Wochen von Janvier verwendet. Die Ratten wurden in acht Gruppen mit je acht Tieren eingeteilt, außer der Sulforaphangruppe, diese enthielt fünf Tiere. Drei Wochen nach Ankunft wurden den Tieren in sieben Gruppen eine osmotische Pumpe eingesetzt. Diese gab 0,75 mg/kg*h Aldosteron für 28 Tage ab. Die Kontroll- und die Sulforaphangruppe erhielten über die Pumpe PBS. Alle Tiere erhielten Trinkwasser, welches 1 % NaCl enthielt. Die Interventionen Spironolacton (75 mg/kg*d) und Pyrrolidin Dithiocarbamat (PDTC, 100 mg/kg*d) wurden im Spezialfutter verabreicht, L-NAME (25 mg/kg*d), Apocynin (50 mg/kg*d) und Sulforaphan (15 mg/kg*d) durch das Trinkwasser.

Die in dieser Arbeit beschriebenen fünf Gruppen werden im Weiteren wie folgt bezeichnet: Kontrolle, Aldosteron, Spironolacton/Aldosteron, Sulforaphan und Sulforaphan/Aldosteron. Die Ergebnisse der PDTC-, L-NAME- und Apocynin-Gruppe sind im Anhang zu finden (9.2).

Einen Tag vor Ende des Versuchs wurden die Tiere in Stoffwechsellkäfige gesetzt, um den Urin für 20 Stunden zu sammeln. Anschließend wurde das Urinvolumen bestimmt, um Rückschlüsse auf die Nierenfunktion ziehen zu können. Zur Entnahme der gewünschten Organe wurden die Tiere anästhesiert (113).

3.2 Methoden

3.2.1 Vitalitätstest

Um eine zytotoxische Wirkung der Behandlungen auf die LLC-PK1-Zellen auszuschließen, wurde ein Vitalitätstest durchgeführt. Beim Fluoresceindiacetat (FDA) GelRED®-Test wird der Farbstoff FDA von Zellen mit intakter Membran aufgenommen und von aktiven Esterasen hydrolysiert (114). Die Hydrolysereaktion setzt den grünen Farbstoff Fluorescein frei. Wenn die Zellmembran nicht mehr intakt ist, dringt GelRED® in die Zellen ein und bildet mit der DNA einen roten Komplex.

Die Vitalitätsfärbelösung bestand aus 72 nM FDA, 2 µl GelRED®-Lösung in 2 ml PBS. Der Zellrückstand wurde gevortext. 35 µl des Rückstandes wurden mit 15 µl Vitalitätsfärbelösung gemischt und 15 µl dieser Lösung auf einen Objektträger pipettiert. Mit einem 22 x 22 mm Deckglas wurde die Zellsuspension fixiert und anschließend am Fluoreszenzmikroskop (Diavert) ausgewertet. Von den grünen und roten Zellen wurden insgesamt 200 Zellen ausgezählt.

3.2.2 Comet-Assay

Der Comet-Assay wird auch als Einzelzellgelelektrophorese bezeichnet. Es ist eine schnelle, sensitive und einfache Methode, um DNA-Schäden in Form von Einzel- oder Doppelstrangbrüchen sowie alkalilabile Stellen nachzuweisen. Die behandelten Zellen werden in Agarose eingebettet und einer Zellyse in einem basischen Puffer ausgesetzt. Die Lyse sorgt dafür, dass die DNA in dem Agarosegel alleine fixiert wird, während das Zytosol und die Membran entfernt werden. Die in Agarose eingebettete DNA wird dann einer alkalischen Elektrophorese unterworfen. Dabei wandert die intakte DNA langsamer als die geschädigte, bruchstückhafte DNA aus dem Zellkern zum Pluspol, so entsteht ein Schweif aus geschädigter DNA.

Mit einer speziellen Software (Komet 6.0) und einem Fluoreszenzmikroskop (Diavert) kann das Maß der Schädigung der DNA abgelesen werden (115). Die behandelten und geernteten LLC-PK1-Zellen werden leicht gevortext. Die Zellsuspension wurde mit 0,5 % LMP-Agarose 1:10 verdünnt. 45 µl dieser Lösung wurden auf ein mit 1,5 % HMP-Agarose beschichtetem Objektträger pipettiert und mit einem 21 x 26 mm Deckglas fixiert und getrocknet. Nach Entfernung des Deckglases wurden die Objektträger in einer mit Lyselösung gefüllten, lichtgeschützten Küvette für 1 Stunde bei 4 °C aufbewahrt. Währenddessen wurde die Elektrophoresekammer mit 4 °C kaltem Elektrophoresepuffer vorbereitet. Nach Abschluss der Lyse wurden die Objektträger für 40 Minuten in die Lyselösung gelegt, um die DNA zu entwinden. Die Elektrophorese wurde mit 25 V bei 300 mA für 25 Minuten betrieben. Anschließend wurden die Objektträger für 5 Minuten in Neutralisationspuffer gelegt, zum Fixieren 5 Minuten in eiskaltem Methanol inkubiert und anschließend dunkel gelagert.

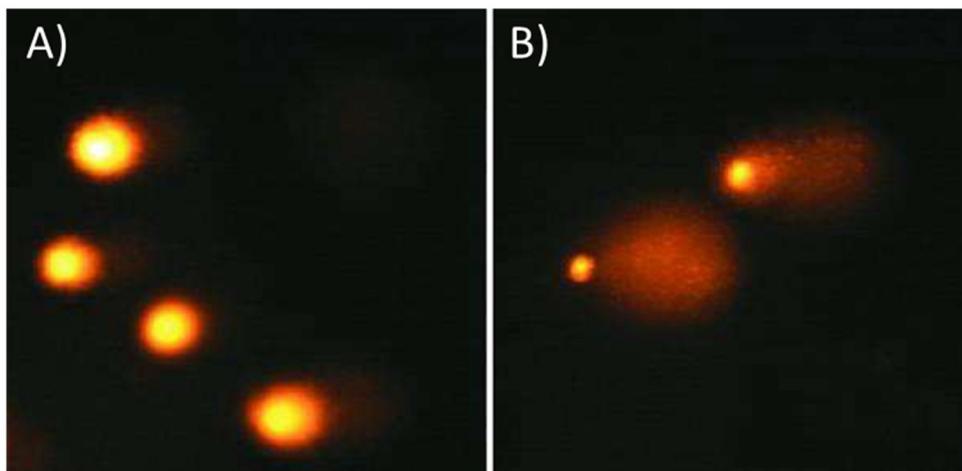


Abbildung 13

Repräsentative Abbildung von Zellkernen, die der Elektrophorese unterworfen waren. **A)** ungeschädigte Zellen. **B)** geschädigte Zellen, bei denen bruchstückhafte DNA (Einzel- oder Doppelstrangbrüche, alkalilabile Stellen) aus dem Zellkern herauswandert. Entnommen aus (116).

Zur Auswertung wurden die Objektträger mit 20 µl GelRED®-Färbelösung angefärbt. Auf das 21 x 26 mm Deckglas, mit dem die GelRED®-Färbelösung fixiert wurde, wurde ein Tropfen Öl gegeben, um am Fluoreszenzmikroskop (Diavert) die Objektträger bei einer 200-fachen Vergrößerung auszuwerten (Abbildung 13). Zur Auswertung wurde die Software Komet 6.0 (Andor Technology, Belfast, UK) verwendet, mit dem der prozentuale Anteil der DNA im Schweif des Kometen berechnet wurde. Es wurden jeweils 25 Zellen auf zwei Objektträgern pro Behandlung ausgewertet.

3.2.3 Bestimmung von Formamidopyrimidin-Glykosylase sensitiven Stellen

Das Standardprotokoll für den Comet-Assay kann durch den Einsatz von spezifischen DNA-Reparaturenzymen sensitiver gemacht werden. Dabei können Endonuklease III, 8-Oxoguanin-DNA-Glykosylase (*8-Oxoguanine glycosylase*, OGG1) und Formamidopyrimidin-Glykosylase (FPG) für diesen speziellen Comet-Assay verwendet werden. Der FPG-Comet-Assay wird um einen enzymatischen Inkubationsschritt erweitert, in dem oxidierte Purine erkannt und herausgeschnitten werden. Hauptsächlich wird 8-Oxo-2'-desoxyguanosin (8-oxodG) entfernt und eine alkalilabile Stelle hergestellt, welche dann in der Elektrophorese zu einem Strangbruch in der DNA führt (117). Der Inkubationsschritt folgt nach der Einbettung und Lyse der Zellen auf den Objektträgern. Die Reste der Lyselösung wurden durch Waschen der Objektträger in einer Küvette, gefüllt mit Enzympuffer F, für 5 Minuten bei 4 °C entfernt. Der Schritt wurde dreimal durchgeführt. Anschließend wurden die Objektträger mit 2 µg/ml FPG-Proteinlösung, gelöst in Enzympuffer F, in einer feuchten Kammer für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle diente der Enzympuffer F ohne FPG. Danach wurde der Comet-Assay wie unter 3.2.2 beschrieben beendet.

Ausgewertet wurden jeweils zwei Objektträger ohne FPG- und zwei Objektträger mit FPG-Behandlung pro Versuchsansatz. Die Differenz dieser beiden Messwerte zeigt den Anteil von FPG-sensitiven Stellen am gesamten DNA-Schaden an.

3.2.4 Detektion von 8-oxodG durch immunzytochemische Färbung

Nach der Behandlung wurden die Zellen geerntet und 500 µl der Zellsuspension für die DNA-Isolierung mit 750 µl PBS verdünnt. 750 µl der verdünnten Zellsuspension wurden per Zytospin-Zentrifugation auf einen Objektträger aufgetragen und in eiskaltem Methanol für mindestens 24 Stunden fixiert. Die Objektträger wurden für 10 Minuten mit PBS gewaschen, ehe die Zellen für eine Stunde bei 37 °C einem RNase-Verdau (200 µg/ml RNase A, 50 U/ml RNase T1) unterworfen wurden. Danach wurden die Zellen für 10 Minuten mit PBS gewaschen und bei 0 °C für 5 Minuten mit alkalischer Lösung behandelt, dann in PBS gewaschen und mit 0,1 % (g/l) Trypsin bei 37 °C für 30 Sekunden trypsiniert. Anschließend wurde für 10 Minuten Proteinkinase K (2 µg/ml in Proteinkinasepuffer) bei 37 °C auf die Objektträger gegeben.

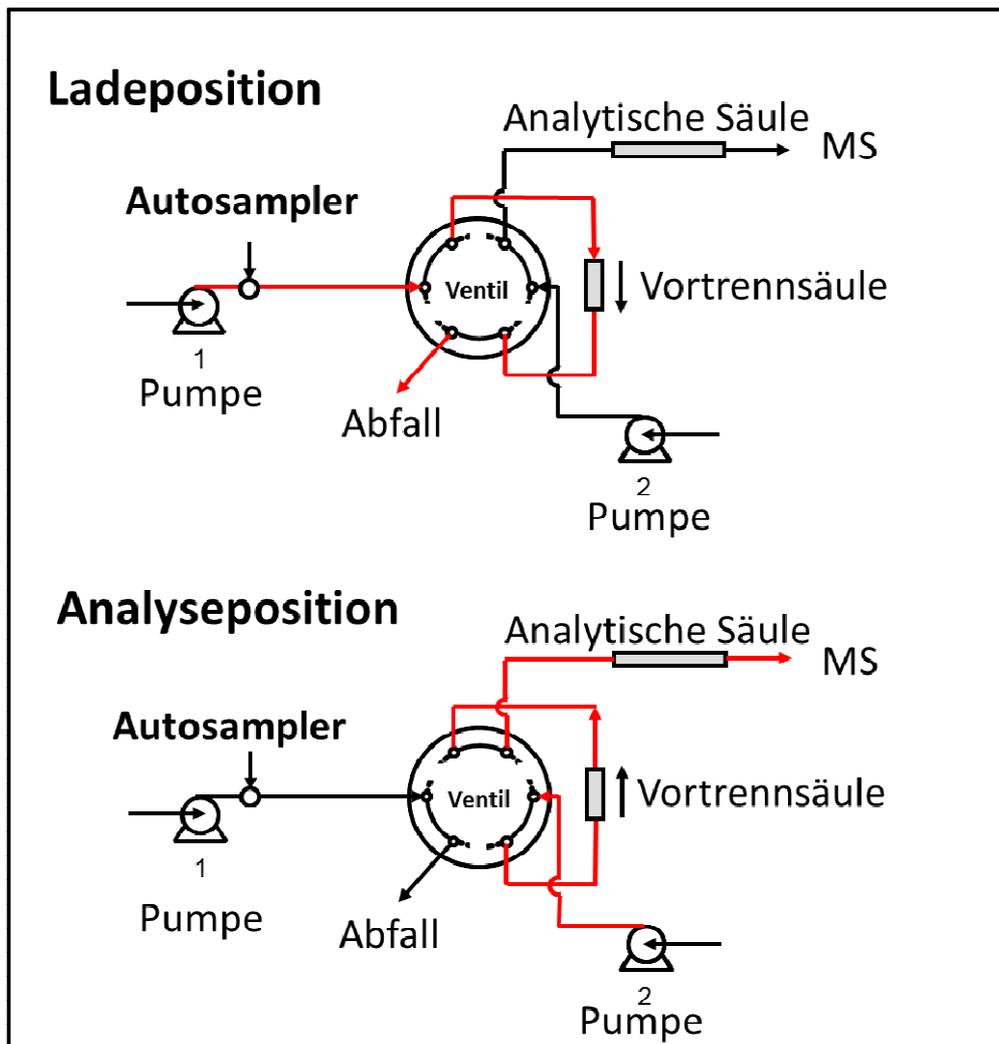
Die Zellen wurden erst in PBS und dann in 0,2 % (g/l) Glycin/PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 1 % (g/l) BSA/PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur geblockt und folgend mit 8-oxodG-Antikörper (Verdünnung 1:100) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen in 0,05 % (g/l) Tween/PBS gewaschen und mit einem Cy3-gekoppelten goat anti-rabbit IgG-Zweitantikörper (Verdünnung 1:700) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Behandlung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 0,01 mg/ml DAPI für 30 Minuten angefärbt. Anschließend wurden die Zellen mit konfokaler Matrix eingebettet und so für die Mikroskopie am konfokalen Laserrastermikroskop (TCS SP5) vorbereitet. Die konfokalen Abbildungen wurden bei den Fluoreszenzen 570 nm (λ_{exc} 550 nm) und 660 nm (λ_{exc} 633 nm) aufgenommen. Die Quantifizierung wurde mit der Messung der Grauwerte von 100 Zellen pro Behandlung mit dem Programm ImageJ 1.40g (RSB Home, Bethesda, USA) durchgeführt.

3.2.5 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Tandem-

Massenspektrometrie zum Nachweis oxidativer Stressmarker

3.2.5.1 *Das Prinzip einer Säulenschaltung*

Zur Messung von 8-oxodG und 8-oxoGuo aus der jeweiligen Nukleinsäure wurde eine veränderte Säulenschaltung nach Chao et al. verwendet (Abbildung 14). Es wurde eine Schaltung zur kompletten Abtrennung der ungeschädigten Basen genutzt und es kamen andere Säulen und Gradienten zum Einsatz (3.2.5.9). Diese Methode ermöglichte die Messung einer kleinen Menge 8-oxodG oder 8-oxoGuo, einem 8-oxodG in 10^6 dG oder einem 8-oxoGuo in 10^5 Guo, in einer Probe, welche eine große Menge anderer Nukleoside enthielt. Dabei wird sich zunutze gemacht, dass die Nukleoside unterschiedliche Retentionszeiten auf der Vortrennsäule besitzen. Eine Schaltung ermöglicht die zuverlässige Trennung der ungeschädigten Basen, welche in den Abfall fließen, und des gesuchten Biomarkers, der auf die analytische Säule übertragen wird. Außerdem wird durch die Abtrennung verhindert, dass eine große Menge von Nukleosiden den Detektor kontaminiert und der Ionisationsprozess der nachzuweisenden Moleküle behindert wird.

**Abbildung 14**

Schematische Darstellung der Säulenschaltung zur Auftrennung von oxidiertem und nicht oxidiertem 2'-Desoxyguanosin oder Guanosin. Zeichnung basiert auf Brink et al. (118).

Um die Schaltung zu optimieren, wurde die Fließgeschwindigkeit für die Pumpe 1 so eingestellt, bis sich die Retentionszeiten von geschädigter und ungeschädigter Base soweit unterschieden, dass sie sich trennen ließen. Abbildung 15 zeigt das Chromatogramm einer Mischung aus gleichen Teilen 8-oxoGuo und Guanosin, welche auf die Vortrennsäule aufgetragen wurde.

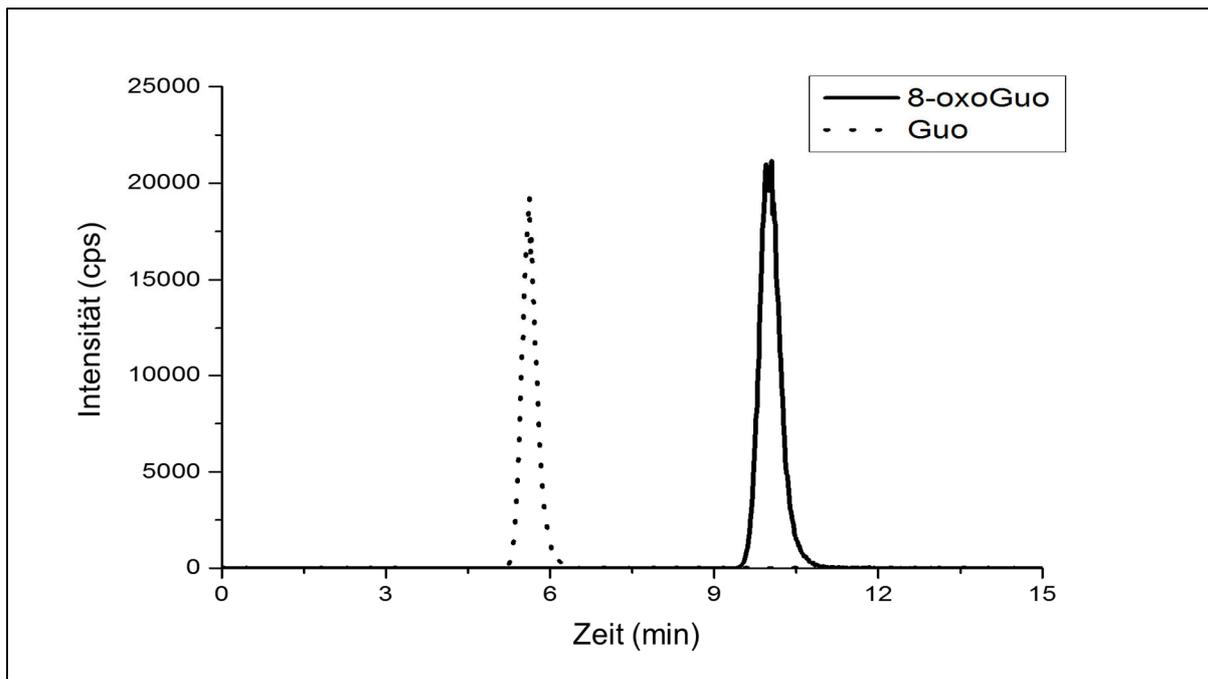


Abbildung 15

Repräsentatives Chromatogramm einer HPLC-MS/MS Messung an der API 3000 von 8-oxoGuo und Guanosin (Guo) gelöst in 5 % MeOH mit 0,1 % FA. Als HPLC-Säule wurde eine PerfectSil (RP C18, 50 x 4,6 mm, 5 µm) verwendet.

3.2.5.2 Interne Standards für die HPLC-MS/MS-Messungen

In dieser Arbeit wurden verschiedene interne Standards verwendet. Für Urin- und Zytosolproben wurde 8-Mercapto-7,8-dihydroguanosin zur Quantifizierung von 8-oxoGua, 8-oxodG und 8-oxoGuo verwendet. Für den Interventionsversuch (1. C57BL/6-Maus-Versuch) wurde [$^{15}\text{N}_5$]-dG zur Quantifizierung der geschädigten Basen eingesetzt. Für den Nachweis von 8-oxodG und 8-oxoGuo wurde [$^{15}\text{N}_5$]-8-oxodG eingesetzt.

3.2.5.3 Herstellung des internen Standards [$^{15}\text{N}_5$]-8-oxodG

Zur Herstellung wurden 3,25 mg [$^{15}\text{N}_5$]-dG in 1 ml Chelex-20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 gelöst. Davon wurden 180 µl eingesetzt und auf 500 µl mit den Endkonzentrationen von 1,2 mM Kupfersulfat, 170 mM Natriumascorbat und 370 mM Wasserstoffperoxid aufgefüllt. Nach 20 Minuten wurde die Oxidation von [$^{15}\text{N}_5$]-dG mit 150 µl Katalase (1 mg/ml) gestoppt.

Die Reaktionslösung wurde bei 4 °C für 45 Minuten mit 18600 x *g* durch einen Filter mit 5000 Da nomineller Molekulargewichtsgrenze ultrafiltriert. Mit einer Hypersil ODS (RP C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm) als Säule und einem UV/VIS-Detektor wurden dG (253 nm, $\epsilon = 13100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) und 8-oxodG (293 nm, $\epsilon = 10300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) getrennt und detektiert. Die mobile Phase bestand aus 10 % (v/v) Methanol in Wasser, wobei die Fließgeschwindigkeit 1 ml/min betrug. 8-oxodG wurde in einem 15-ml-Zentrifugenröhrchen gesammelt und anschließend das Methanol durch Belüften mit Stickstoff aus der Lösung getrieben. Die wässrige 8-oxodG-Lösung wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und über Nacht am Lyophilisator bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 1 ml Wasser (HPLC grade) gelöst und die Konzentration mit der Absorption bei 293 nm, $\epsilon = 10300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, mit einem UV/VIS-Spektrometer bestimmt. Der interne Standard wurde bei -20 °C gelagert (110, 119).

3.2.5.4 *Isolierung und Hydrolyse der DNA*

Um DNA aus LLC-PK1-Zellen zu isolieren, muss die Zellmembran zerstört werden. Anschließend werden Enzyme zur Zersetzung von Proteinen und RNA hinzugegeben. Allen Pufferlösungen wurde Deferoxamin zugesetzt, um weitere Oxidationsreaktionen während der Aufarbeitung zu verhindern.

Die Zellen wurden behandelt, geerntet und in 2 ml 4 °C kaltem PBS resuspendiert. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten bei 4 °C und 1500 x *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 2 ml Puffer A resuspendiert. Um DNA aus Nierengewebe zu gewinnen, wurden die eingefrorenen Nieren geschnitten, 100 mg abgewogen, mit 2 ml Puffer A in einen Homogenisator gefüllt und mit einem Glaskolben homogenisiert. Die Zellsuspension wurde gevortext und bei 4 °C für 10 Minuten mit 1500 x *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 2 ml Puffer A zum Zellpellet gegeben. Durch leichtes Schütteln wurde das Pellet gelöst. Die Zellsuspension wurde bei 4 °C für 10 Minuten mit 1500 x *g* zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach der Zugabe von 600 µl Puffer B und 35 µl 10 % (g/l) SDS wurde das Zellpellet gevortext. Mit 30 µl RNase A (1 mg/ml RNasepuffer) und 8 µl RNase T1 (1 U/µl RNasepuffer) wurde der Abbau der RNA eingeleitet. Für eine Stunde bei 37 °C wurde die Reaktionslösung in einem Thermomixer mit 550 rpm leicht

geschüttelt. Anschließend wurden 30 µl Proteinkinase K (20 mg/ml 0,1 mM Deferoxamin) zur Reaktionslösung gegeben, um die Proteine abzubauen. Die Reaktionslösung wurde für eine Stunde bei 37 °C in einem Thermomixer mit 550 rpm geschüttelt. Durch die Zugabe von 1,2 ml Natriumiodidlösung wurde die Reaktion gestoppt und die DNA-Fällung mit der Zugabe von 2 ml eiskaltem Isopropanol gestartet. Die 15-ml-Zentrifugenröhrchen mit der Reaktionslösung wurden langsam invertiert, um die Fällung einzuleiten. Zur Vervollständigung der DNA-Fällung wurde die Reaktionslösung für 15 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurde die DNA-Lösung bei 4 °C und 5000 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 1 ml eiskaltem 40 % (l/l) Isopropanol gewaschen. Die DNA-Lösung wurde bei 4 °C und 5000 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und 1 ml eiskaltes 70 % (l/l) Ethanol zum DNA-Pellet gegeben. Bei 4 °C und 5000 x g wurde für 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das DNA-Pellet wurde für 30 Minuten getrocknet und in 100 µl 0,1 mM Deferoxamin gelöst. Mit einem UV/VIS-Spektrometer (NanoDrop; Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland) wurde die DNA-Konzentration bestimmt. Deren Reinheit wurde mit dem Verhältnis der Absorptionen bei 260 und 280 nm bestimmt, wobei ein Wert von 1,6 reine DNA anzeigt. Die DNA-Lösung kann bei -20 °C gelagert werden (120, 121).

7,6 µl 97,4 nM [¹⁵N₅]-8-oxodG wurden der Reaktionslösung für die Hydrolyse der DNA zugesetzt. 50 µg der zuvor isolierten DNA wurden für die Hydrolyse eingesetzt. Um die Nukleoside zu isolieren, wurden 25 µl Nuklease P1 (200 U/ml in H₂O) mit 52 µl Nukleasepuffer zur DNA gegeben. Die Reaktionsgefäße wurden für zwei Stunden bei 37 °C in einem Thermomixer bei 550 rpm geschüttelt. Zur Entfernung der Phosphatgruppen wurden 10 µl alkalische Phosphatase (20 U/µl; gelöst in 10 x alkalischen Phosphatasepuffer) zur Hydrolyse-Lösung gegeben. Für weitere 1,5 Stunden wurde die Reaktionslösung bei 37 °C im Thermomixer mit 550 rpm geschüttelt. Die Hydrolyse wurde mit 10 µl 0,1 M HCl gestoppt und anschließend mit 5 % (l/l) MeOH in 0,1 % (l/l) Ameisensäure (FA) in Wasser auf 250 µl aufgefüllt. Die Proteine in der Reaktionslösung wurden bei 4 °C und 12000 x g für 15 Minuten abzentrifugiert.

3.2.5.5 *Isolierung und Hydrolyse der RNA*

Um RNA aus Zellen zu isolieren, muss die Zellmembran zerstört werden. Durch Anwendung von TRI Reagent[®], bestehend aus Phenol und Guanidinthiocyanat, wird die Zellmembran zerstört. Zugabe von Chloroform löst eine Phasentrennung der RNA, DNA und Proteine aus. Die RNA wird anschließend gefällt und zum Schluss gewaschen. Dem TRI Reagent[®] wurde 0,1 mM Deferoxamin zugesetzt, um weitere Oxidationsreaktionen während der Aufarbeitung zu verhindern. Die behandelten und geernteten Zellen wurden mit 1 ml TRI Reagent[®] versetzt und in ein 2-ml-Eppendorfcup überführt. Durch mehrmaliges Aufnehmen und Abgeben der Lösung wurde die Lyse der Zellen erleichtert. Nach 5 Minuten wurde dem TRI Reagent[®] 200 µl Chloroform zugesetzt und mehrmals invertiert, bis sich die Lösung komplett gemischt hatte. Nach 3 Minuten wurde die Lösung bei 4 °C und 12000 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Die Lösung trennte sich in drei Phasen, oben befanden sich die RNA, in der Mitte die DNA und in der untersten Phase die Proteine. Die obere Phase wurde in 500 µl eiskaltes Isopropanol überführt. Um die Fällung der RNA zu initiieren, wurde die Lösung geschüttelt. Nach 10 Minuten wurde die Lösung bei 4 °C und 12000 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet in 1 ml 70% (l/l) Ethanol aufgenommen. Die RNA-Lösung wurde bei 4 °C und 12000 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen worden war, wurde das RNA-Pellet für 30 Minuten getrocknet. Die nicht komplett trockene RNA wurde in 40 µl 0,1 mM Deferoxamin in RNase-freiem Wasser aufgenommen. Mit einem UV/VIS-Spektrometer (NanoDrop; Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland) wurde die RNA-Konzentration bestimmt. Deren Reinheit wurde mit dem Verhältnis der Absorptionen bei 260 und 280 nm bestimmt, wobei ein Wert von 2 eine gut aufgereinigte RNA-Probe anzeigt. Die Isolierung der RNA wurde an Hand des Protokolls zu TRI Reagent[®] von Life Technologies[®] durchgeführt.

6,5 µl 97,4 nM [¹⁵N₅]-8-oxodG wurde der Reaktionslösung für die Hydrolyse der RNA zugesetzt. 50 µg von der isolierten RNA wurden in die Hydrolyse (3.2.5.4) eingesetzt, wobei keine Salzsäure hinzugefügt wurde. Die Hydrolyse-Lösung wurde direkt mit 5 % (l/l) MeOH in 0,1 % (l/l) FA in Wasser auf 126 µl aufgefüllt.

3.2.5.6 *Isolierung von 8-oxodG aus dem Zytosol*

Neben 2'-Desoxyguanosin werden im Zytosol auch dessen Mono-, Di- und Triphosphate oxidiert (122). Um eine hohe Salzkonzentration in der HPLC-MS/MS-Messung zu vermeiden, wurde eine Mischung aus organischen Lösungsmitteln und Wasser zur Lyse der Zellen verwendet (123). Das Ernten der behandelten Zellen fand im 4°C-Raum statt. Die Zellen wurden mit einem Zellkulturschaber in 5 ml organische Lyselösung abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen der Zentrifuge (RC-5B Plus) überführt, gevortext und auf Eis gelagert. Die Zellsuspension wurde bei 4 °C und 48000 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Zur Entfernung der organischen Lösungsmittel wurde der Überstand unter Stickstoffstrom eingeeengt, bis ca. 1 ml der Zellsuspension übrig blieb. Die Zellsuspension wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend über Nacht am Lyophilisator bis zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wurde in 160 µl destilliertem Wasser aufgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorfcup überführt. Zur Reaktionslösung wurden 20 µl 10x alkalischer Phosphatasepuffer und 16 µl alkalische Phosphatase (2 U/µl) zugegeben. Für zwei Stunden bei 37 °C wurden die Reaktionslösungen mit 550 rpm im Thermomixer geschüttelt. Zum Stoppen der Enzymreaktion wurden 5 µl 0,1 M HCl zur Reaktionslösung gegeben. Für die HPLC-MS/MS-Messung wurde die Reaktionslösung 1:1 mit 0,1 % (l/l) FA in Wasser verdünnt und anschließend bei 4 °C und 18600 x g für 10 Minuten zentrifugiert.

3.2.5.7 *Vorbereitung der Urinproben*

Der Urin aus den Tierversuchen wurde in Aliquots (30, 60 oder 100 µl) bei -80 °C gelagert. Für die Probenvorbereitung wurde der Urin bei RT aufgetaut und dabei leicht geschüttelt. Der Urin (60 µl) wurde 1:1 mit internem Standard verdünnt und für 10 Minuten bei 550 rpm und 37 °C mit einem Thermomixer geschüttelt, um ein mögliches Ausfallen der Nukleoside ins Pellet zu verhindern. Die Urinproben wurden für 10 Minuten mit 10000 x g bei RT zentrifugiert. Mit dieser Aufarbeitung ist es möglich, 8-oxodG und 8-oxoGua aus dem Pellet zu lösen. Durch die Verdünnung mit internem Standard wurde eine Endkonzentration von 250 nM [¹⁵N₅]-dG oder 500 nM 8-Mercapto-7,8-dihydroguanosin in den Proben sowie in der Standardreihe eingestellt.

3.2.5.8 HPLC-MS/MS-Methoden

Die Software des HPLC-MS/MS-Systems mit Ventil wurde mit Analyst 1.4.2 (AB Sciex, Darmstadt, Deutschland) gesteuert. Das API 3000 (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) wurde mit den folgenden Einstellungen betrieben: Elektronenspray-Spannung 4500 V und Temperatur 475 °C. Beim Q-TRAP/API 2000 (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) waren es 4000 V Elektronenspray-Spannung und Temperatur 450 °C. Bei beiden Systemen wurde ein Vakuum von $3,1 \cdot 10^{-5}$ Torr eingestellt. Als Zerstäuber-, Kollisions- und entgegenströmendes Gas wurde Stickstoff verwendet. Das HPLC-System an beiden Massenspektrometern bestand aus zwei Pumpen, einem Entgaser und einem Autosampler.

Für die verschiedenen Nachweise wurde je ein bestimmtes Volumen der Probe in das Vial mit einem Einsatz für geringe Volumina (*Low volume insert*) pipettiert. Die Vials wurden mit einem Crimpverschluss (*Crimp seal*) verschlossen und bei Raumtemperatur in den Autosampler gestellt.

3.2.5.9 Nachweis von 8-oxodG und 8-oxoGuo aus Nukleinsäuren

Zur Messung von 8-oxodG und 8-oxoGuo aus Nukleinsäure wurde jeweils die Säulenschaltung (3.2.5.1) verwendet. Als Vortrennsäule wurde eine PerfectSil (RP C18, 50 x 4,6 mm, 5 µm) eingesetzt. Die Pumpe 1 wurde mit einem Gradienten betrieben, während die Pumpe 2 isokratisch arbeitete. Die Eluenten für Pumpe 1 waren A (5 % (v/v) MeOH in 0,1 % (v/v) FA in Wasser) und B (50 % (v/v) MeOH in 0,1 % (v/v) FA in Wasser).

Die Messung von 8-oxodG aus der DNA erfolgte mit einer AQ-ODS (RP C18, 150 x 4,6 mm, 5 µm) als analytische Säule. Der Gradient für die Pumpe 1 ist in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9

Einstellungen des Gradienten zur HPLC-MS/MS-Messung von 8-oxodG aus DNA-Proben. Die Einstellungen gelten für Pumpe 1. Als analytische Säule wurde eine AQ-ODS (RP C18, 150 x 4,6 mm, 5 µm) verwendet.

Schritt	Totalzeit [min]	Fließgeschwindigkeit [µl/min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	0	900	100	0
1	20	900	100	0
2	22,5	900	0	100
3	25	900	0	100
4	26	900	100	0
5	30	900	100	0

Für die Pumpe 2 wurde als Eluent 30 % (l/l) MeOH in 0,1 (l/l) % FA in Wasser eingesetzt. Die Fließgeschwindigkeit betrug 250 µl/min. Die Schaltung des Ventils in die Analyseposition erfolgte nach 7 Minuten, welche dann bis Minute 20 aktiv blieb. Die Messung von 8-oxoGuo aus RNA-Proben erfolgte mit einer Polyamin-II-endcapped (NP mit Aminen modifizierte C18, 150 x 4,6 mm, 5 µm) als analytische Säule. Der Gradient für die Pumpe 1 ist in Tabelle 10 gezeigt.

Tabelle 10

Einstellungen des Gradienten zur HPLC-MS/MS-Messung von 8-oxoGuo aus RNA-Proben. Die Einstellungen gelten für Pumpe 1. Als analytische Säule wurde eine Polyamin-II-endcapped (NP mit Aminen modifizierte C18, 150 x 4,6 mm, 5 µm) verwendet.

Schritt	Totalzeit [min]	Fließgeschwindigkeit [µl/min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	0	550	100	0
1	6	550	100	0
2	6,1	950	0	100
3	7,4	950	0	100
4	7,7	950	100	0
5	10	550	100	0
6	20	550	100	0

Die Pumpe 2 wurde mit dem Eluent 85 % (l/l) MeOH in 0,1 % (l/l) FA in Wasser betrieben. Die Fließgeschwindigkeit betrug 850 µl/min. Die Schaltung des Ventils in die Analyseposition erfolgte nach 6,1 Minuten, welche dann bis Minute 7,3 aktiv blieb.

3.2.5.10 *Nachweis der oxidativen Stressmarker in biologischen Flüssigkeiten*

Die Nachweise wurden mit zwei unterschiedlichen HPLC-MS/MS-Methoden durchgeführt, basierend auf den Publikationen von Weimann et al. und Crow et al. (124, 125). Zudem wurden zwei Massenspektrometer verwendet, die API 3000 (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) und die Q-TRAP/API 2000 (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland). Es wurde der HPLC-Säule ein Ventil nachgeschaltet, welches die ersten 10 Minuten in den Abfall leitete, um die Verschmutzung der Ionisierungszelle zu verringern. Die Säulen, die für die Methoden nach Weimann et al. und Crow et al. verwendet wurden, sind in Tabelle 11 dargestellt (124, 125).

Tabelle 11

Verwendete Vor- und analytische Säule für die beiden genutzten Nachweismethoden

Methode	Vorsäule	Analytische Säule
Weimann et al.	Phenyl C18 (4 x 2 mm)	Luna 3µ Phenyl-Hexyl (RP mit Phenyl modifizierte C6, 150 x 4,6 mm, 3 µm)
Crow et al.	AQUA C18 (4 x 2 mm)	AQ-ODS (RP C18, 150 x 4,6 mm, 5 µm)

3.2.5.11 *Nachweis der oxidativen Stressmarker nach Weimann et al.*

Die HPLC-MS/MS-Methode nutzt ein Puffersystem mit 10 mM Ammoniumformiat mit einem pH-Wert von 3,75. Der interne Standard, [¹⁵N₅]-dG, wurde in 50 mM Lithiumacetatpuffer (pH-Wert 6,4) gelöst. Diese Methode wurde nur an der Q-TRAP/API 2000 (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Als Eluent A wurde 10 mM Ammoniumformiat (pH-Wert 3,75) und als Eluent B 10 mM Ammoniumformiat in 30 % (l/l) Acetonitril (pH-Wert 3,75), jeweils mit Ameisensäure, eingestellt. In Tabelle 12 ist der Gradient für die HPLC-Pumpe dargestellt.

Tabelle 12

Einstellungen der HPLC-Pumpe für die Gradientenmethode zur MS/MS-Messung von oxidativen Stressmarkern aus biologischen Proben nach Weimann et al. (124)

Schritt	Totalzeit [min]	Fließgeschwindigkeit [µl/min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	0	200	100	0
1	10	200	100	30
2	40	200	30	70
3	40,5	200	0	100
4	43	200	0	100
5	43,5	200	100	0
6	60	200	100	0

3.2.5.12 Nachweis der oxidativen Stressmarker nach Crow et al.

Die HPLC-MS/MS-Methode von Crow et al. setzt zur Trennung der oxidativen Stressmarker ein organisch-wässriges System ein (125). Als interner Standard wurde 8 Mercapto-7,8-dihydroguanosin verwendet. Der interne Standard war in 0,1 mM Deferoxamin gelöst. Die mobile Phase bestand aus den beiden Eluenten A, 0,1 % (l/l) FA in Wasser, und B, 0,1 % (l/l) FA in MeOH. Die HPLC-Pumpe wurde mit einem Gradienten betrieben (Tabelle 13).

Tabelle 13

Einstellungen der HPLC-Pumpe für die Gradientenmethode zur MS/MS-Messung von oxidativen Stressmarkern aus biologischen Proben nach Crow et al. (125)

Schritt	Totalzeit [min]	Fließgeschwindigkeit [µl/min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	0	200	95	5
1	5	200	70	30
2	10	200	50	50
3	12	200	50	50
4	15	200	30	70
5	17	200	30	70
6	17,5	200	95	5
7	30	200	95	5

3.2.5.13 Bestimmung von 2'-Desoxyguanosin und Guanosin aus den Nukleinsäuren

Die Menge an nicht oxidiertem 2'-Desoxyguanosin und Guanosin wurde mit einer isokratischen HPLC-MS/MS-Methode bestimmt. Die Hydrolyse-Lösung wurde dafür mit 5 % (v/v) MeOH in 0,1 % (v/v) FA in Wasser 1:5000 verdünnt. Eine AQ-ODS (RP C18, 150 x 4,6 mm, 5 µm) wurde mit einer AQUA C18-Vorsäule (RP C18, 4 x 2 mm) verwendet. Die mobile Phase bestand aus 70 % (v/v) MeOH in 0,1 % (v/v) FA in Wasser. Die Fließgeschwindigkeit betrug 250 µl/min bei einer Gesamtmesszeit von 13 Minuten.

3.2.5.14 Einstellungen der verwendeten Massenspektrometer

Alle Messungen erfolgten im positiven Detektionsmodus. Zur Messung mit *Multiple reaction monitoring* wurden die in Tabelle 14 (API 3000; Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) und 15 (Q-TRAP/API 2000; Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) aufgelisteten Übergänge und Spannungen für die Nukleoside und internen Standards verwendet. Die verwendeten Übergänge und Spannungen wurden für alle Nukleoside und internen Standards durch individuelle Messungen ermittelt.

Tabelle 14

Einstellungen zur Messung an der API 3000. Übergänge in m/z und unterschiedliche Potentiale in Volt für das Multiple reaction monitoring.

Nukleosid	Übergang [m/z]	DP [V]	FP [V]	CE [V]	CXP [V]
8-oxoGua	168 → 140	20	200	30	15
dG	268,2 → 152,1	16	19	17	14
8-oxodG	284,1 → 168	21	110	21	16
Guo	284,1 → 152,1	25	110	35	12
[¹⁵ N ₅]-8-oxodG	289,0 → 173,0	21	110	21	16
8-oxoGuo	300,1 → 168,1	37	230	20	15
8-Mercapto	315,9 → 184	31	200	26	4

Anmerkungen: DP = Declustering potential, FP = Focusing potential, CE = Collision energy, CXP = Collision cell exit potential, 8-Mercapto = 8-Mercapto-7,8-dihydroguanosin, Guo = Guanosin, dG = 2'-Desoxyguanosin

Tabelle 15

Einstellungen zur Messung an der Q-TRAP/API 2000. Übergänge in m/z und unterschiedliche Potentiale in Volt für das Multiple reaction monitoring.

Nukleosid	Übergang [m/z]	DP [V]	EP [V]	CE [V]	CXP [V]
dG	267,8 → 152,0	26	10	17	4
8-oxodG	283,9 → 168,0	31	8	19	4
8-oxoGua	168 → 140	20	10	25	4
8-oxoGuo	299,9 → 168	41	9.5	21	4
[¹⁵ N ₅]-dG	273,2 → 157	26	10	17	4
8-Mercapto	315,9 → 184	31	12	25	6

Anmerkungen: DP = Declustering potential, EP = Entrance potential, CE = Collision energy, CXP = collision cell exit potential, 8-Mercapto = 8-Mercapto-7,8-dihydroguanosin, dG = 2'-Desoxyguanosin

3.2.5.15 Standardreihen und Qualitätskontrollen der HPLC-MS/MS-Messungen

Für die HPLC-MS/MS-Messungen wurden für die Nachweise der oxidativen Stressmarker verschiedene Standardreihen verwendet. Die Nukleoside für die Standardreihen wurden zur Erstellung einer Stammlösung (1 mg/ml Nukleosid) in 0,1 mM Deferoxamin gelöst und anschließend mit 0,1 mM Deferoxamin auf die gewünschte Konzentration des jeweiligen Standard 1 verdünnt (Tabelle 16 und 17). Die Standardreihe wurde in 5 % (v/v) MeOH in 0,1 % (v/v) FA in Wasser angesetzt und jeweils 1:1 verdünnt. Außer für die Messung von 8-oxodG aus DNA und Zytosol wurde zwischen den Standards 5 und 6 (DNA) und Standards 3 und 4 (Zytosol) 1:4 verdünnt. Die Nachweisgrenze (*limit of detection*, LOD) und die Bestimmungsgrenze (*limit of quantification*, LOQ) wurden nach DIN 32645 ermittelt (126). Ebenfalls ist die Linearität (R^2) der Standardreihen angegeben. Für den Variationskoeffizienten wurden die Steigungen aller erstellten Standardreihen eines Nukleosids miteinander verglichen und die prozentuale Abweichung dieser Steigungen ermittelt.

In Tabelle 16 (Messungen aus Nukleinsäuren) und Tabelle 17 (Messungen aus biologischen Flüssigkeiten) sind die ermittelten Werte zu den Standardreihen zusammengefasst. Die Standardreihen wurden jeweils vor und nach den Proben gemessen.

Tabelle 16

Standardreihen für den Nachweis von 8-oxodG und 8-oxoGuo aus Nukleinsäuren. Qualitätskontrolle der Methoden mit LOD, LOQ, R^2 und dem Variationskoeffizienten.

Standards	8-oxodG [nM]	dG [nM]	8-oxoGuo [nM]	Guo [nM]
Standard 6	1,04	-	1,9	
Standard 5	2,1	5,8	3,9	25
Standard 4	8,3	11,7	7,8	50
Standard 3	16,6	23,3	15,6	100
Standard 2	33,2	46,6	31,3	200
Standard 1	66,4	93,3	62,5	400
Qualitätskontrolle				
LOD	0,17 ± 0,01	1,5 ± 0,1	0,11 ± 0,01	5,2 ± 0,9
LOQ	0,57 ± 0,04	5,0 ± 0,3	0,37 ± 0,04	17 ± 3
R^2	0,999	0,998	0,997	0,999
Variationskoeffizient [%]	21 ± 6	25 ± 5	16 ± 3	10 ± 3

Anmerkungen: Guo = Guanosin, dG = 2'-Desoxyguanosin

Die Endkonzentrationen des internen Standards ($[^{15}\text{N}_5]$ -8-oxodG) waren für den Nachweis von 8-oxodG 822 nM und für 8-oxoGuo 1,37 μM .

Tabelle 17

Standardreihen für den Nachweis von 8-oxoGua, 8-oxodG, 8-oxoGuo in biologischen Flüssigkeiten (Urin und Zytosol).

Standards	Urin			Zytosol
	8-oxoGua [nM]	8-oxodG [nM]	8-oxoGuo [nM]	8-oxodG [nM]
Standard 7	78,1	3,91	3,91	-
Standard 6	156,3	7,82	7,82	-
Standard 5	312,5	15,6	15,6	0,98
Standard 4	625	31,3	31,3	1,96
Standard 3	1250	62,5	62,5	7,82
Standard 2	2500	125	125	15,6
Standard 1	5000	250	250	31,3

Die oxidativen Stressmarker aus biologischen Flüssigkeiten wurden mit zwei Massenspektrometern, API 3000 (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) und Q-TRAP/API 2000 (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland), und mit zwei Methoden, Weimann et al. und Crow et al., nachgewiesen (124, 125). In Tabelle 18 sind die ermittelten LOD, LOQ, die Linearität (R^2) und die Variationskoeffizienten der jeweiligen Standardreihe zusammengefasst.

Tabelle 18:

Gezeigt sind die Linearität R^2 und der Variationskoeffizient für die HPLC-MS/MS-Messungen an beiden Massenspektrometern mit beiden Methoden. Zudem werden das LOD und das LOQ der Nukleoside aufgezeigt.

Standardreihe	Methode	R^2		Variationskoeffizient		LOD	LOQ
		API	TRAP	API	TRAP		
8-oxoGua	Weiman et.al	nv	0,995	nv	24 ± 3	17 ± 4	57 ± 15
	Crow et al.	0,954	0,976	26 ± 4	30 ± 5		
8-oxodG	Weiman et al.	nv	0,999	nv	18 ± 9	0,15 ±	0,5 ±
	Crow et al.	0,974	0,998	12 ± 5	20 ± 4	0,02	0,1
8-oxoGuo	Weiman et al.	nv	0,999	nv	14 ± 7	0,08 ±	0,3 ±
	Crow et al.	0,996	0,998	30 ± 4	28 ± 7	0,01	0,3

Anmerkungen: API = API 3000. TRAP = Q-TRAP/API 2000. nv = nicht verwendet

Aufgrund der Instabilität von 8-oxoGua wurden höhere Konzentrationen eingesetzt. Zudem wurde 8-oxoGua jeweils frisch gelöst, da es in wässriger Lösung nicht stabil ist (127). Dazu wurden ca. 1 mg 8-oxoGua in 1 ml 2 M NaOH gelöst und anschließend die Konzentration von 8-oxoGua bei 293 nm ($\epsilon=10300 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) mit einem UV/VIS-Spektrometer bestimmt. Die Konzentration von 8-oxoGua wurde vorm ansetzen einer Standardreihe jeweils neu bestimmt. Für die Methode nach Weimann et al. wurden 250 nM [$^{15}\text{N}_5$]-dG und für die Methode nach Crow et al. 12,5 nM 8-Mercapto-7,8-dihydroguanosin zum jeweiligen Standard gegeben (124, 125).

3.2.6 Statistik

Für alle *In-vitro*-Versuche wurden 4 unabhängige Wiederholungen durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-Test für die Dosis- und Zeitabhängigkeit. Die Standardabweichung wird für die *In-vitro*-Versuche angegeben.

Bei allen *In-vivo*-Versuchen wurden die Gruppen (n = vier Tiere) mit einer Variationsanalyse auf signifikante Unterschiede hin untersucht. Dafür wurde die einfaktorielle Variationsanalyse in Verknüpfung mit dem Turkey-Test verwendet.

Für die Berechnungen wurde Origin 9.1 (Origin Lab Corporation, Northampton, USA) genutzt und ein p-Wert von $\leq 0,05$ zeigt eine statistisch relevante Signifikanz an. Alle Werte für die *In-vivo*-Versuche werden mit dem Standardfehler angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Vitalität der LLC-PK1-Zellen

Die Vitalität der LLC-PK1-Zellen nach der Behandlung mit H₂O₂, Angiotensin II und Aldosteron wurde überprüft, um sicherzustellen, dass den beobachteten genotoxischen Effekten keine zytotoxischen Mechanismen zugrunde lagen. Für die H₂O₂-Behandlung wurde die Vitalität der LLC-PK1-Zellen mit bis zu 400 µM H₂O₂ nach 30 Minuten und mit 200 µM H₂O₂ nach zwei Stunden überprüft (Tabelle 19).

Tabelle 19

Auswirkung von H₂O₂ auf die Vitalität von LLC-PK1-Zellen. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und die Ergebnisse als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben.

	Behandlung mit H ₂ O ₂	LLC-PK1-Zellen
% lebende Zellen (nach 30 min)	Kontrolle	99 ± 1
	100 µM	96 ± 1
	200 µM	96 ± 2
	400 µM	98 ± 1
% lebende Zellen (nach 2 h)	Kontrolle	97 ± 2
	200 µM	95 ± 3

Die Behandlung mit H₂O₂ führte zu keiner Veränderung der Vitalität der LLC-PK1-Zellen im Vergleich zur Kontrolle (Tabelle 19).

Ebenso wurde die Vitalität der LLC-PK1-Zellen nach 30-minütiger Behandlungszeit mit Angiotensin II (100–400 nM) und Aldosteron (1–100 nM) getestet. Zudem wurde die Vitalität der LLC-PK1-Zellen nach 4-stündiger Behandlung mit 400 nM Angiotensin II und 100 nM Aldosteron bestimmt. Alle Behandlungen führten zu keiner Veränderung der Vitalität der LLC-PK1-Zellen gegenüber der Kontrolle (Tabelle 20).

Tabelle 20

Auswirkung von Angiotensin II und Aldosteron auf die Vitalität der LLC-PK1-Zellen. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und die Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

	Hormon	Behandlung	LLC-PK1-Zellen
% lebende Zellen (nach 30 min)	-	Kontrolle	99 \pm 1
	Ang II	100 nM	98 \pm 0
		200 nM	99 \pm 1
		400 nM	99 \pm 1
	Aldo	1 nM	98 \pm 2
		10 nM	99 \pm 2
		100 nM	98 \pm 2
% lebende Zellen (nach 4 h)	-	Kontrolle	98 \pm 2
	Ang II	400 nM	97 \pm 2
	Aldo	100 nM	98 \pm 2

Anmerkungen: Ang II = Angiotensin II, Aldo = Aldosteron

4.2 Nachweisbarkeit von 8-oxodG mittels HPLC-MS/MS

Um die HPLC-MS/MS-Methode zum Nachweis von 8-oxodG aus der DNA zu prüfen, wurden Zellen oder cT-DNA mit Methylenblau behandelt. Methylenblau kann als ungeladene Verbindung leicht in die Zelle aufgenommen werden. Die Belichtung von Methylenblau ermöglicht die Bildung von Singulett-Sauerstoff oder freien Elektronen (128). Diese sorgen im Zytosol der Zelle für oxidativen Stress. In der DNA-Lösung führt die Reaktion zur Bildung von oxidativ geschädigten Produkten. Es wurden, wenn nicht anders angegeben, drei Experimente durchgeführt. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung.

4.2.1 Zunahme von 8-oxodG in DNA und cT-DNA nach Methylenblau-Behandlung

Die Behandlung von cT-DNA mit Methylenblau führte zu einem nicht signifikanten dosisabhängigen Anstieg von 8-oxodG (Abbildung 16A). Die Ergebnisse zeigten, dass die HPLC-MS/MS-Methode (3.2.5.9) geeignet ist, um 8-oxodG in DNA-Proben nachzuweisen.

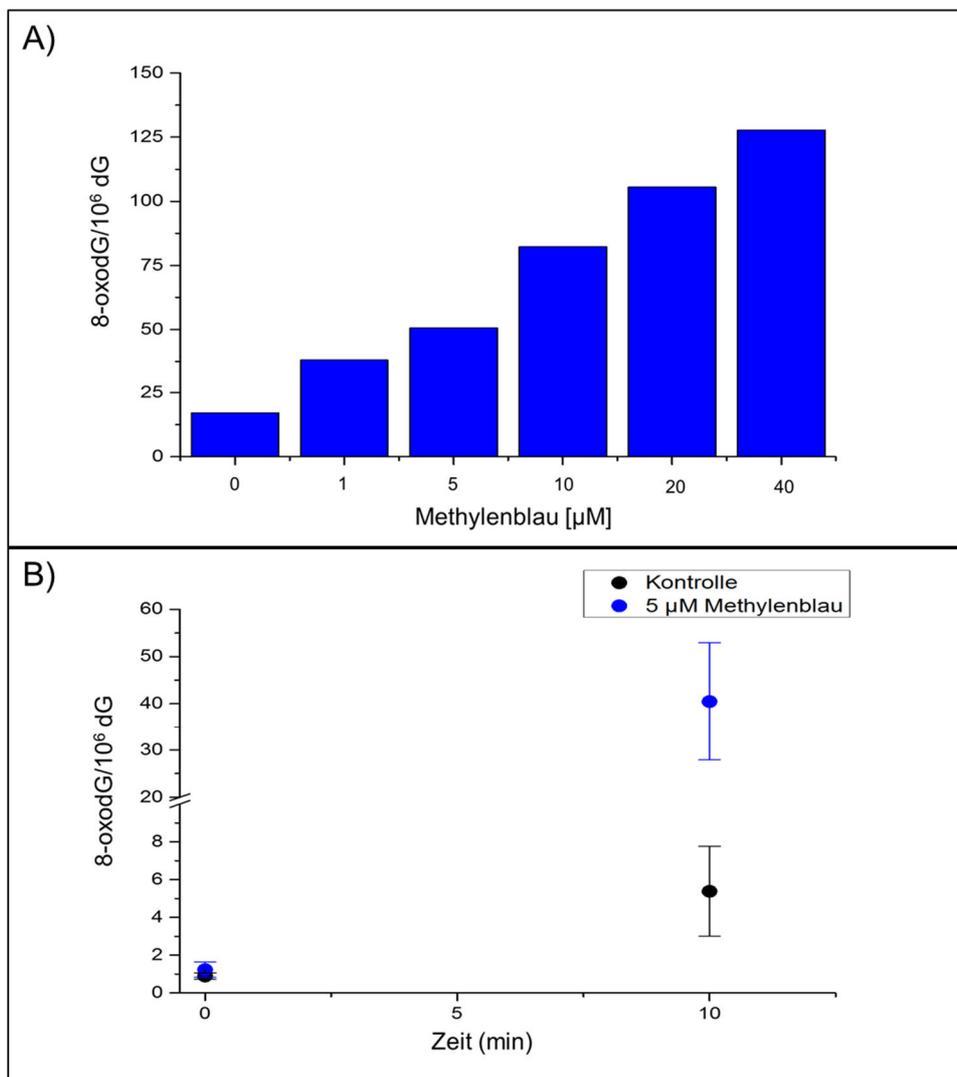


Abbildung 16

HPLC-MS/MS-Messungen von 8-oxodG aus cT-DNA und LLC-PK1-Proben. **A)** Die cT-DNA wurde mit 0, 1, 2, 5, 10, 20 und 40 µM Methylenblau für 10 Minuten belichtet. **B)** LLC-PK1-Zellen wurden für 10 Minuten mit 5 µM Methylenblau behandelt und belichtet. Die DNA wurde anschließend isoliert und hydrolysiert.

Der Einsatz von 5 µM Methylenblau in LLC-PK1-Zellen führte zu einem nicht signifikanten Anstieg von 8-oxodG in der DNA gegenüber der Kontrolle

(Abbildung 16B). Die Messungen zeigten, dass diese Methode (3.2.5.9) zum Nachweis von 8-oxodG, isoliert aus Zellen, geeignet ist.

4.2.2 Zunahme von zytosolischem 8-oxodG nach Methylenblau-Behandlung

Die Behandlung von LLC-PK1-Zellen mit Methylenblau führte zu einem Anstieg der Menge an 8-oxodG pro 10^3 dG im Zytosol nach 30-minütiger Belichtung (Abbildung 17). Eine Konzentrationsabhängigkeit für die Behandlung mit Methylenblau konnte nicht gezeigt werden.

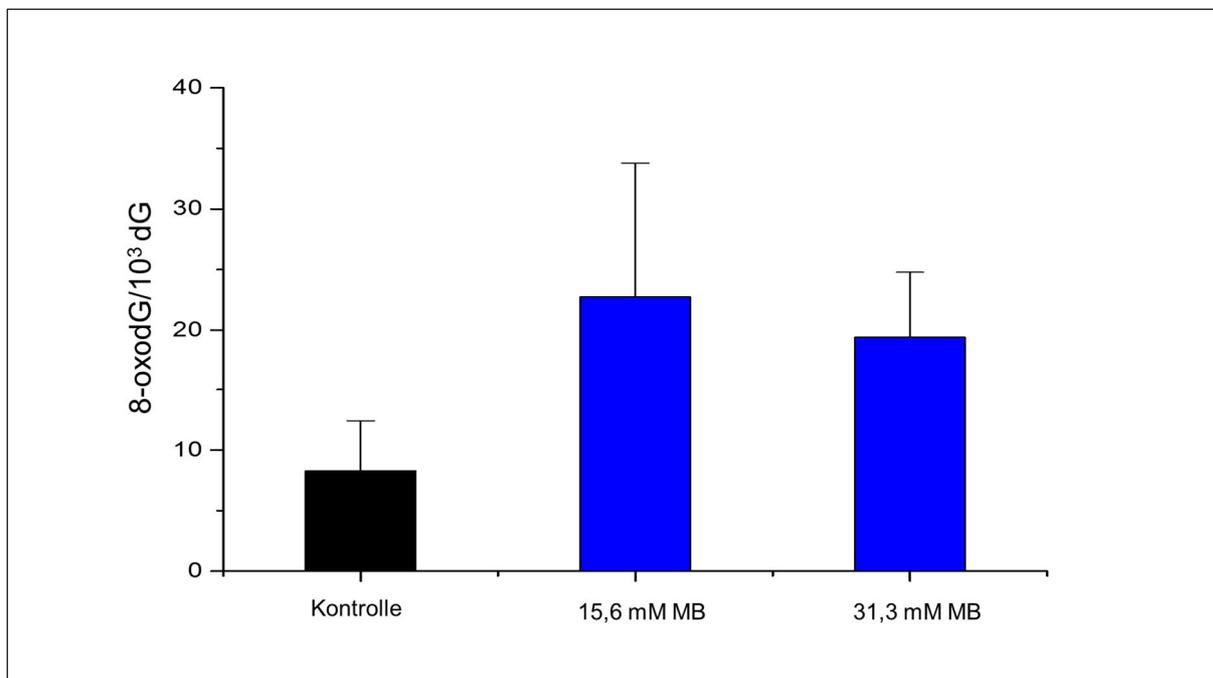


Abbildung 17

HPLC-MS/MS-Nachweis von 8-oxodG/ 10^3 dG im Zytosol von LLC-PK1-Zellen nach 30-minütiger Behandlung mit 15,6 und 31,3 mM Methylenblau (MB) und Belichtung. Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus vier Experimenten.

4.3 8-oxoGuo als Marker für oxidativ geschädigte RNA

Zur Überprüfung, ob mit der HPLC-MS/MS-Methode (3.2.5.9) 8-oxoGuo in *In-vitro*-Proben nachgewiesen werden kann, wurden LLC-PK1-Zellen mit H_2O_2 behandelt. H_2O_2 löst in höheren Konzentrationen oxidativen Stress in der Zelle aus und reagiert, z. B. durch die Fenton-Reaktion, zum Hydroxylradikal OH^\bullet (37).

Die Bildung von 8-oxoGuo in der RNA wurde nach dosis- und zeitabhängiger H₂O₂-Behandlung der LLC-PK1-Zellen untersucht.

4.3.1 H₂O₂ führt zu einem dosisabhängigen Anstieg von 8-oxoGuo in der RNA

Die Menge an 8-oxoGuo in der RNA von LLC-PK1-Zellen wurde 30 Minuten nach Zugabe von H₂O₂ gemessen. Die unbehandelten Proben zeigten ein Niveau von weniger als einem Molekül 8-oxoGuo pro 10⁵ Guo in der RNA. Die Behandlung für 30 Minuten mit 100 µM H₂O₂ bewirkte keinen signifikanten Anstieg der Menge an 8-oxoGuo pro 10⁵ Guo in der RNA. Erst 200 µM H₂O₂ führten zum signifikanten Anstieg an 8-oxoGuo in der RNA im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 18). Dabei verdoppelte sich die Anzahl an 8-oxoGuo pro 10⁵ Guo in der RNA.

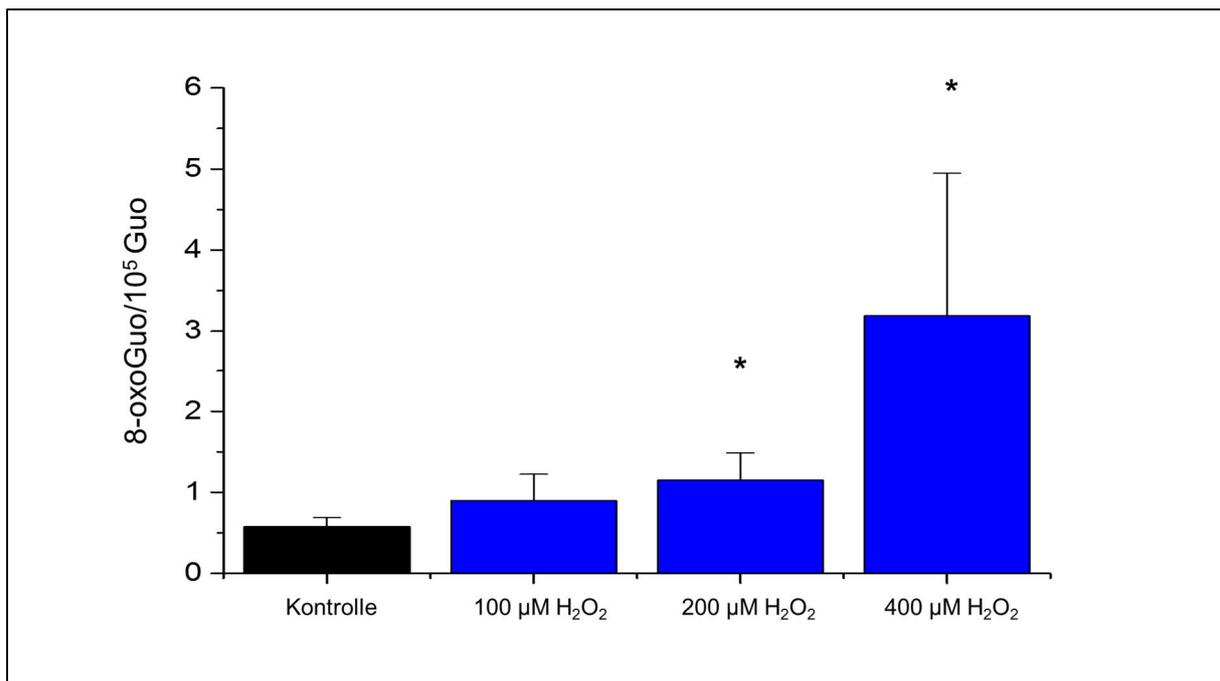


Abbildung 18

HPLC-MS/MS-Nachweis von 8-oxoGuo/10⁵Guo in der RNA nach 30-minütiger Behandlung von LLC-PK1-Zellen mit 100, 200 und 400 µM H₂O₂. Die RNA wurde isoliert und hydrolysiert. Gezeigt ist der Mittelwert ± Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten. * p ≤ 0,05.

4.3.2 H_2O_2 führt zu einem zeitabhängigen Anstieg von 8-oxoGuo in der RNA

Die 30-minütige Behandlung mit 200 μM H_2O_2 bewirkte einen signifikanten Anstieg von 8-oxoGuo in der RNA von LLC-PK1-Zellen und wurde im zeitabhängigen Versuch eingesetzt. Die Menge an 8-oxoGuo stieg bei längerer Behandlung weiter an und erreichte nach 120 Minuten einen Wert von 3,9 Molekülen 8-oxoGuo pro 10^5 Guo. Dieser Wert war signifikant gegenüber der Kontrolle (Abbildung 19).

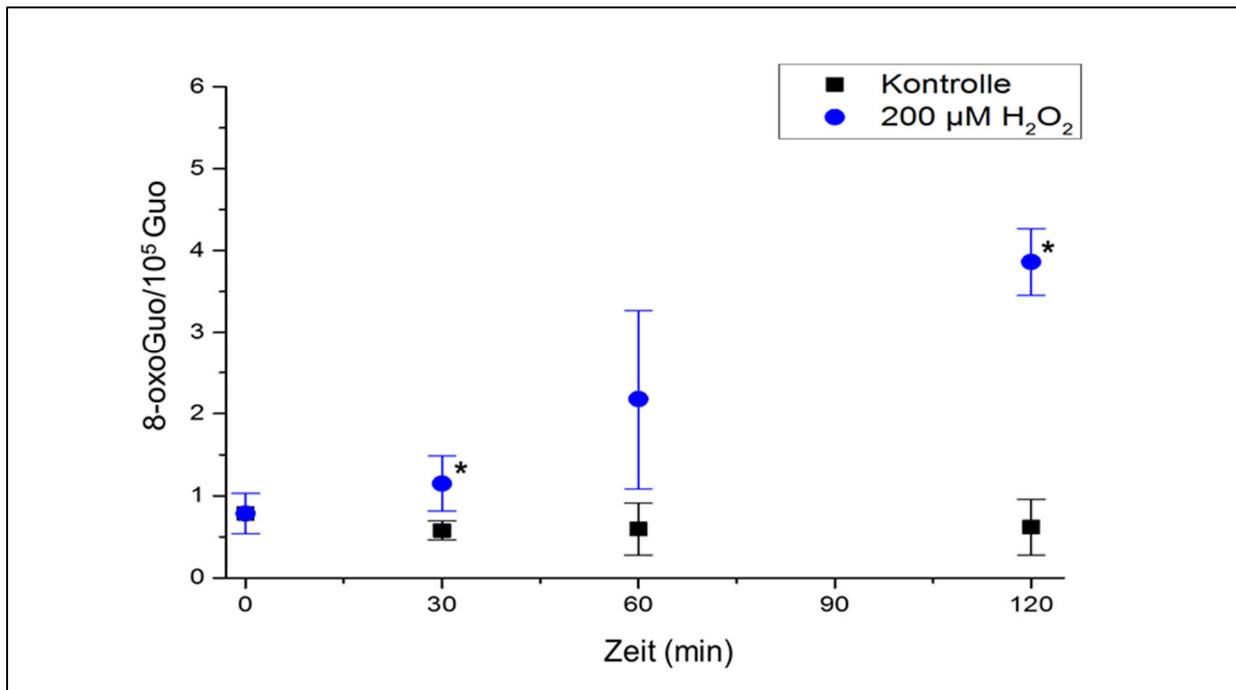


Abbildung 19

*HPLC-MS/MS-Nachweis von 8-oxoGuo/10⁵ Guo in der RNA von LLC-PK1-Zellen nach der Behandlung mit 200 μM H_2O_2 . Die RNA wurde isoliert und enzymatisch hydrolysiert. Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten. * $p \leq 0,05$.*

4.4 Schädigung der DNA und RNA von LLC-PK1-Zellen durch Angiotensin II und Aldosteron

Angiotensin II und Aldosteron werden bei Bluthochdruck in einer gesteigerten Rate ausgeschüttet. Als Folge kommt es zu oxidativem Stress und Schädigung der DNA (106, 129). Mit dem Einsatz von Angiotensin II und Aldosteron in erhöhten Konzentrationen sollten Schäden in den Zellen hervorgerufen werden.

Im Versuch mit LLC-PK1-Zellen wurden dosis- und zeitabhängige Untersuchungen durchgeführt. Der entstandene DNA-Schaden wurde mit dem Comet-Assay detektiert. In Kombination mit dem FPG-Enzym sollte der Comet-Assay zeigen, ob Schäden durch FPG-labile Stellen, wie z. B. die Bildung von 8-oxodG in der DNA, vorhanden waren. Mit einer immunzytochemischen Färbung sollte 8-oxodG direkt in der DNA von fixierten LLC-PK1-Zellen nachgewiesen werden. Aus isolierter DNA wurde 8-oxodG mittels HPLC-MS/MS detektiert, welches die sensitivste Messmethode darstellt, um die Ergebnisse aus dem FPG-Comet-Assay und der immunzytochemischen Färbung zu bestätigen. Die oxidative Schädigung des Nukleotidpools kann zum Einbau von 8-oxodG in die DNA führen, daher wurde die Menge an 8-oxodG im Zytosol von LLC-PK1-Zellen bestimmt. Der Nachweis von 8-oxoGuo wurde als Marker für oxidative Schädigung der RNA herangezogen.

Alle *In-vitro*-Experimente wurden viermal durchgeführt und mit Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Zur Kontrolle wurde immer PBS eingesetzt.

4.4.1 Auswirkung von Angiotensin II auf DNA und RNA in vitro

4.4.1.1 Angiotensin II bewirkt eine dosisabhängige Schädigung der DNA

Die LLC-PK1-Zellen wurden mit 100, 200 und 400 nM Angiotensin II für jeweils 30 Minuten behandelt. Mit dem Comet-Assay wurde eine dosisabhängige DNA-Schädigung der LLC-PK1-Zellen nach einer 30-minütigen Behandlung mit Angiotensin II nachgewiesen (Abbildung 20A). Diese Schädigung war signifikant gegenüber der Kontrolle.

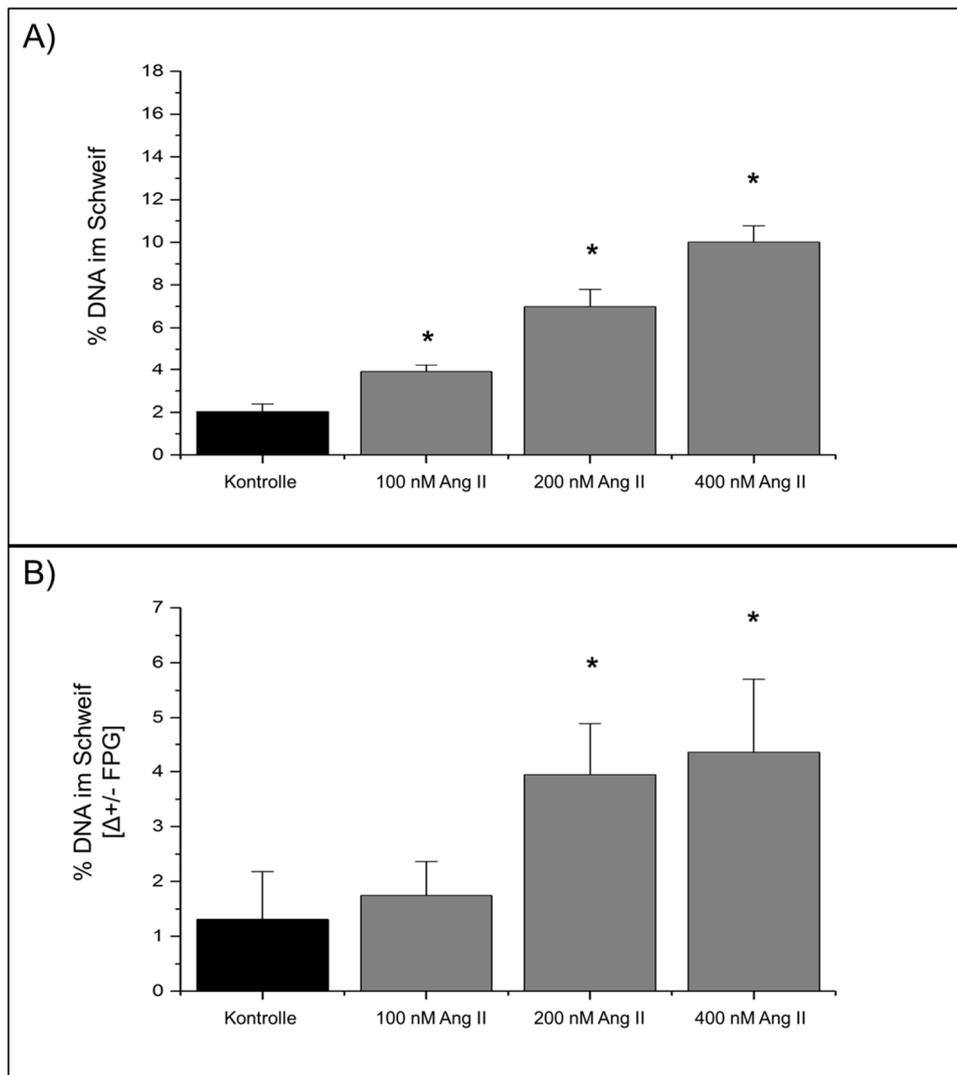


Abbildung 20

A) DNA-Schaden in LLC-PK1-Zellen nach 30-minütiger Behandlung mit Angiotensin II. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der DNA im Schweif. Die Behandlungen waren PBS (Kontrolle), 100, 200 und 400 nM Angiotensin II (Ang II). **B)** DNA-Schaden in LLC-PK1-Zellen nach Behandlung mit 0,5 µg/ml FPG-Enzym. Angegeben ist die Differenz vom DNA-Schaden mit und ohne FPG-Behandlung. Aufgetragen ist der prozentuale Anteil der DNA im Schweif. * $p \leq 0,05$ gegen Kontrolle.

Die Zugabe von 0,5 µg/ml FPG-Enzym vor der Elektrophorese des Comet-Assays führte zu einem höheren DNA-Schaden im Vergleich zu den unbehandelten Proben (Abbildung 20B). 200 und 400 nM Angiotensin II bewirkten einen signifikanten Anstieg des DNA-Schadens, nachgewiesen mit dem FPG-Comet-Assay, gegenüber der Kontrolle (Abbildung 20B). Im Vergleich zur Kontrolle führten 100 nM Angiotensin II in Verbindung mit dem FPG-Enzym zu keinem erhöhten DNA-Schaden.

4.4.1.2 Zeitabhängige DNA-Schädigung durch Angiotensin II

Die zeitabhängige Behandlung der LLC-PK1-Zellen mit 200 nM Angiotensin II führte zum signifikanten Anstieg des DNA-Schadens, nachgewiesen mit dem Comet-Assay, zu den jeweiligen Messzeitpunkten im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 21A). Nach 15- und 240-minütiger Behandlung mit 200 nM Angiotensin II ist der DNA-Schaden in den LLC-PK1-Zellen höher als bei den Messungen nach 30 und 60 Minuten (Abbildung 21A). Es zeigte sich kein zeitabhängiger Anstieg des signifikanten DNA-Schadens durch Angiotensin II.

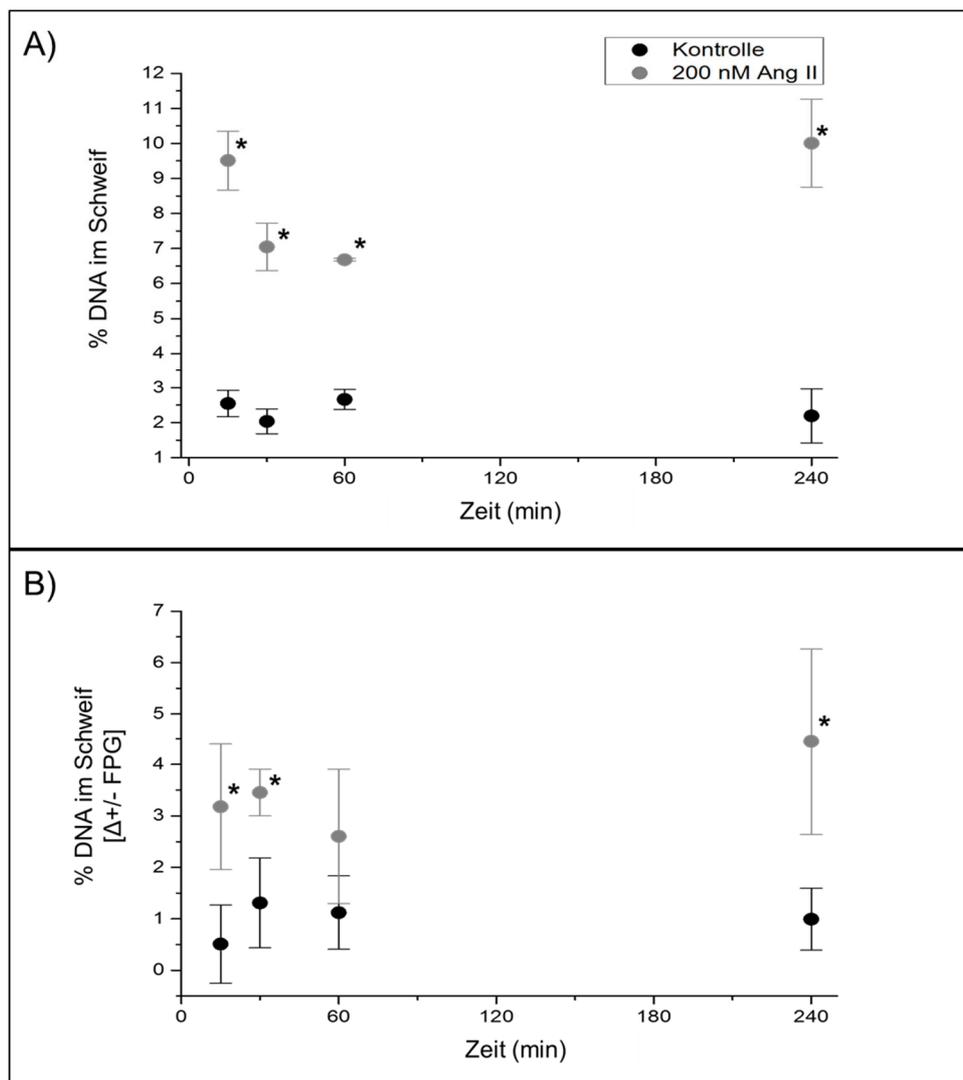


Abbildung 21

A) DNA-Schaden in LLC-PK1-Zellen nach Behandlung mit 200 nM Angiotensin II (Ang II) nach unterschiedlichen Zeitintervallen. Die LLC-PK1-Zellen wurden auf Objektträger überführt, lysiert und analysiert. **B)** DNA-Schaden in LLC-PK1-Zellen nach Behandlung mit 0,5 µg/ml FPG-Enzym. Angegeben ist die Differenz vom DNA-Schaden mit und ohne FPG-Behandlung. Aufgetragen ist der prozentuale Anteil der DNA im Schweif. * $p \leq 0,05$ gegen Kontrolle.

Eine Behandlung mit 0,5 µg/ml FPG-Enzym vor der Elektrophorese des Comet-Assays bewirkte einen signifikanten Anstieg des DNA-Schadens im Vergleich zur Kontrolle nach 15, 30 und 240 Minuten (Abbildung 18B). Durch die Behandlung mit dem FPG-Enzym stieg der DNA-Schaden im Vergleich zu den unbehandelten Proben an (Abbildung 21B). Nach 240-minütiger Behandlung der LLC-PK1-Zellen mit Angiotensin II kam es zu keinem weiteren Anstieg des DNA-Schadens im Vergleich zu den vorherigen Messzeitpunkten (Abbildung 21B).

4.4.1.3 *Immunzytochemische Färbung zeigt zeitabhängigen Anstieg von 8-oxodG nach Angiotensin-II-Behandlung*

Durch den Einsatz eines Antikörpers wurden die 8-oxodG-Foci in der DNA von LLC-PK1-Zellen sichtbar gemacht und mit konfokaler Mikroskopie detektiert. Mittels DAPI wurde die DNA angefärbt und so gezeigt, dass sich die durch den Antikörper detektierten 8-oxodG-Foci in der DNA befinden. Als *Overlay* ist die Überlagerung der DAPI-Färbung der DNA und der Antikörperfärbung gezeigt (Abbildung 22A). Die Quantifizierung zeigte einen zeitabhängigen signifikanten Anstieg an 8-oxodG in der DNA nach der Behandlung von LLC-PK1-Zellen mit 200 nM Angiotensin II für eine und vier Stunden im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 22B).

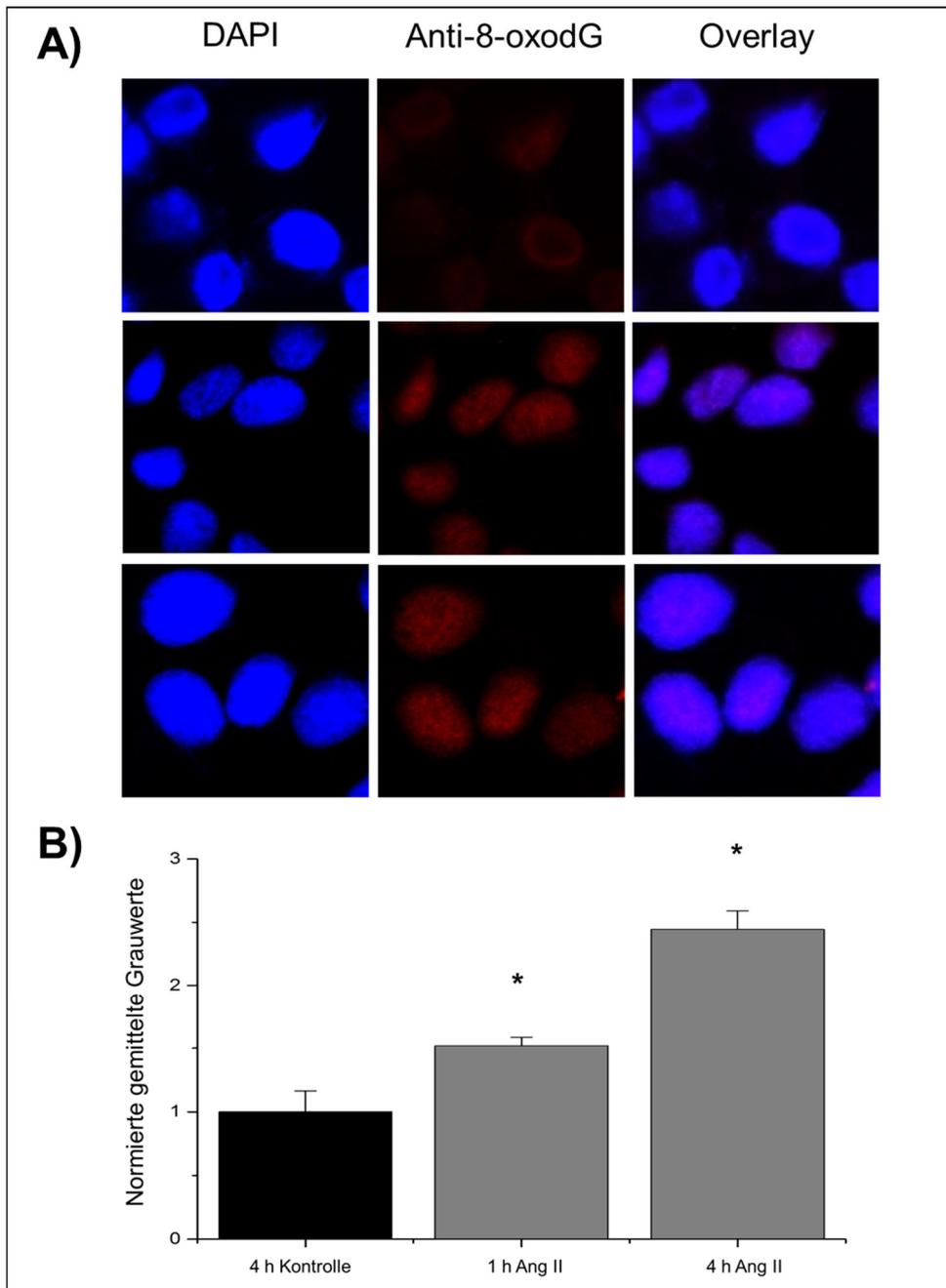


Abbildung 22

Nachweis von 8-oxodG mittels immunzytochemischer Färbung in LLC-PK1-Zellen nach Angiotensin-II-Behandlung. Die LLC-PK1-Zellen wurden mit 200 nM Angiotensin II (Ang II) für 1 und 4 h behandelt. **A)** Repräsentative Bilder der Kontrolle und der mit Angiotensin II behandelten LLC-PK1-Zellen nach angegebenen Zeitpunkten aufgenommen mit einem TCS SP5 Rasterlasermikroskop. **B)** Zur Quantifizierung wurden die Grauwerte von 100 Zellen mit ImageJ gemessen und auf den Kontrollwert normiert. * $p \leq 0,05$ gegen Kontrolle.

4.4.1.4 Angiotensin II bewirkt einen Anstieg von 8-oxodG in der DNA

Der HPLC-MS/MS-Nachweis von 8-oxodG in der DNA ergab einen Anstieg des oxidativen Stressmarkers nach 30-minütiger Behandlung der LLC-PK1-Zellen mit allen Angiotensin-II-Konzentrationen (Abbildung 23A). Mit 200 und 400 nM Angiotensin II wurde ein ähnlich hoher Anstieg an 8-oxodG pro 10^6 dG in der DNA detektiert (Abbildung 23A). Aufgrund der großen Standardabweichung der Ergebnisse mit 200 nM Angiotensin II ist nur der Anstieg mit 400 nM Angiotensin II statistisch signifikant gegenüber der Kontrolle.

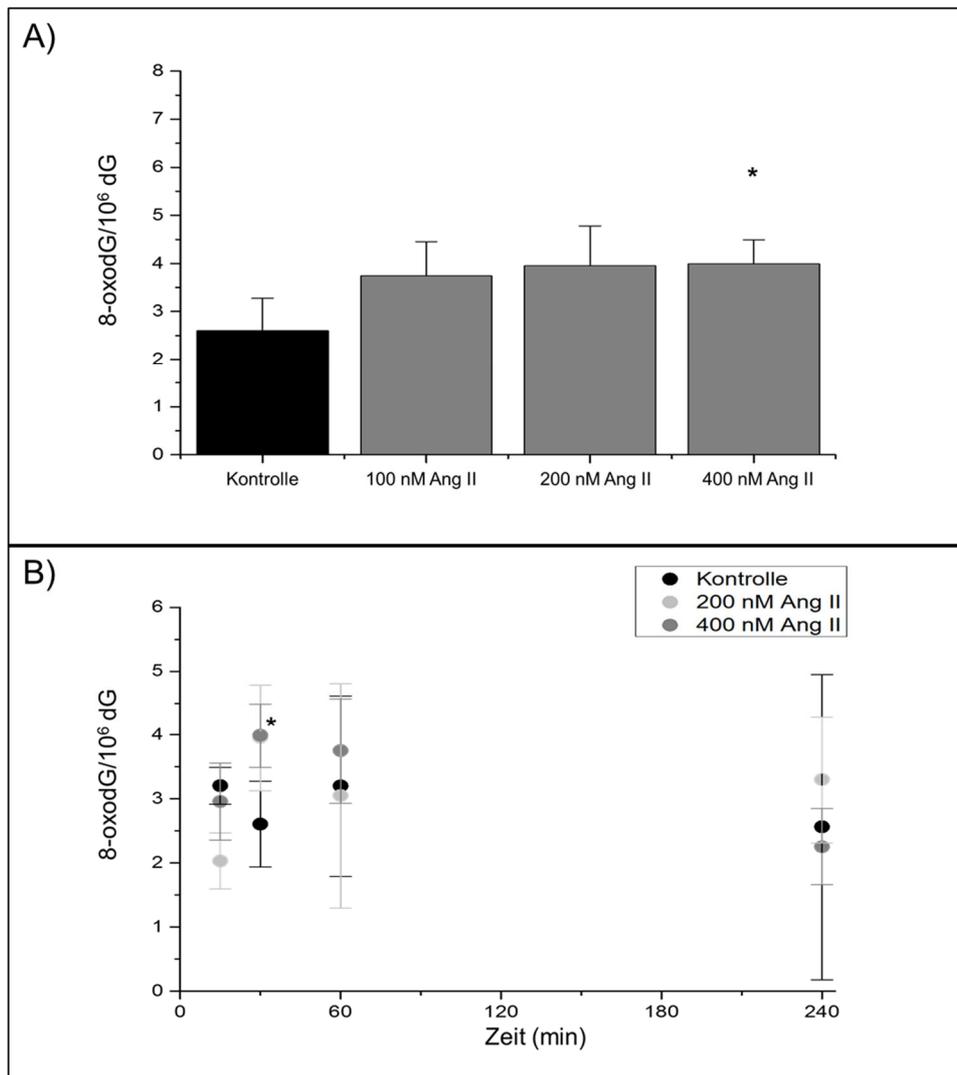


Abbildung 23

HPLC-MS/MS-Ergebnisse für 8-oxodG/10⁶ dG aus der DNA von LLC-PK1-Zellen. **A)** 30-minütige Behandlung der LLC-PK1-Zellen mit PBS (Kontrolle), 100, 200 und 400 nM Angiotensin II (Ang II). **B)** Zeitabhängige Behandlung der LLC-PK1-Zellen mit 200 und 400 nM Angiotensin II (Ang II) für 15, 30, 60 und 240 Minuten. Alle Messergebnisse von 8-oxodG sind auf 10^6 dG bezogen. * $p \leq 0,05$ gegen Kontrolle.

Die Behandlung mit 200 nM Angiotensin II führte nach 15 Minuten zu einer nicht signifikanten Abnahme, nach weiteren 15 Minuten zu einem nicht signifikanten Anstieg an 8-oxodG pro 10^6 dG (Abbildung 23B). Nach 60- und 240-minütiger Behandlung war die Menge an 8-oxoGuo pro 10^6 dG in der DNA auf Kontrollniveau zum gleichen Zeitpunkt. Der Einsatz von 400 nM Angiotensin II bewirkte einen signifikanten Anstieg an 8-oxodG pro 10^6 dG in der DNA nach 30 Minuten im Vergleich zur Kontrolle. Zu allen übrigen Messzeitpunkten war die Menge an 8-oxodG pro 10^6 dG nach Behandlung mit 400 nM Angiotensin II im Vergleich zur Kontrolle nicht erhöht.

4.4.1.5 *Kein Anstieg von 8-oxodG im Zytosol nach Angiotensin-II-Behandlung*

Die LLC-PK1-Zellen wurden mit 200 nM Angiotensin II zu verschiedenen Zeitpunkten behandelt und die Menge an 8-oxodG mittels HPLC-MS/MS gemessen. Im Zytosol führte 200 nM Angiotensin II nach 30 und 60 Minuten zu keinem Anstieg an 8-oxodG pro 10^3 dG im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 24).

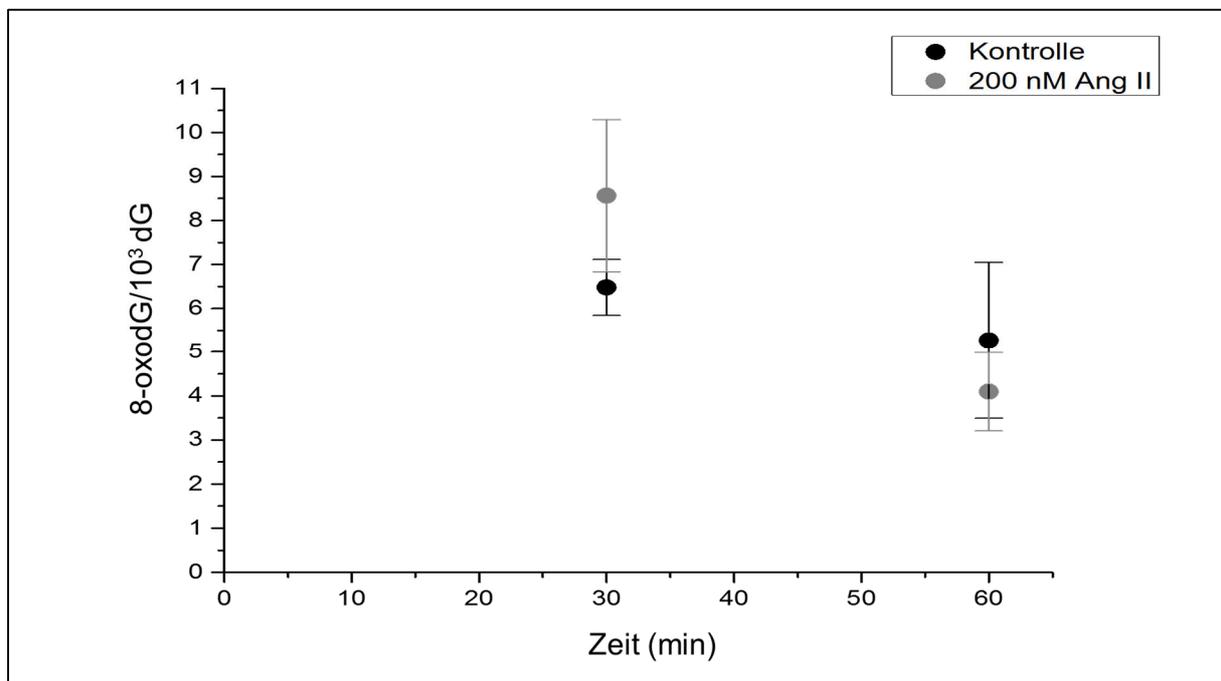


Abbildung 24

HPLC-MS/MS-Nachweis für 8-oxodG/10³ dG im Zytosol von LLC-PK1-Zellen. Diese wurden mit 200 nM Angiotensin II (Ang II) behandelt. Nach 30 und 60 Minuten wurden die Nukleotide isoliert, hydrolysiert und gemessen. Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

4.4.1.6 Angiotensin II führt zu keinem Anstieg von 8-oxoGuo in der RNA

Der HPLC-MS/MS-Nachweis von 8-oxoGuo aus der RNA von LLC-PK1-Zellen zeigte einen nicht signifikanten Anstieg von 8-oxoGuo pro 10^5 Guo nach 30-minütiger Behandlung mit 400 nM Angiotensin II im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 25A).

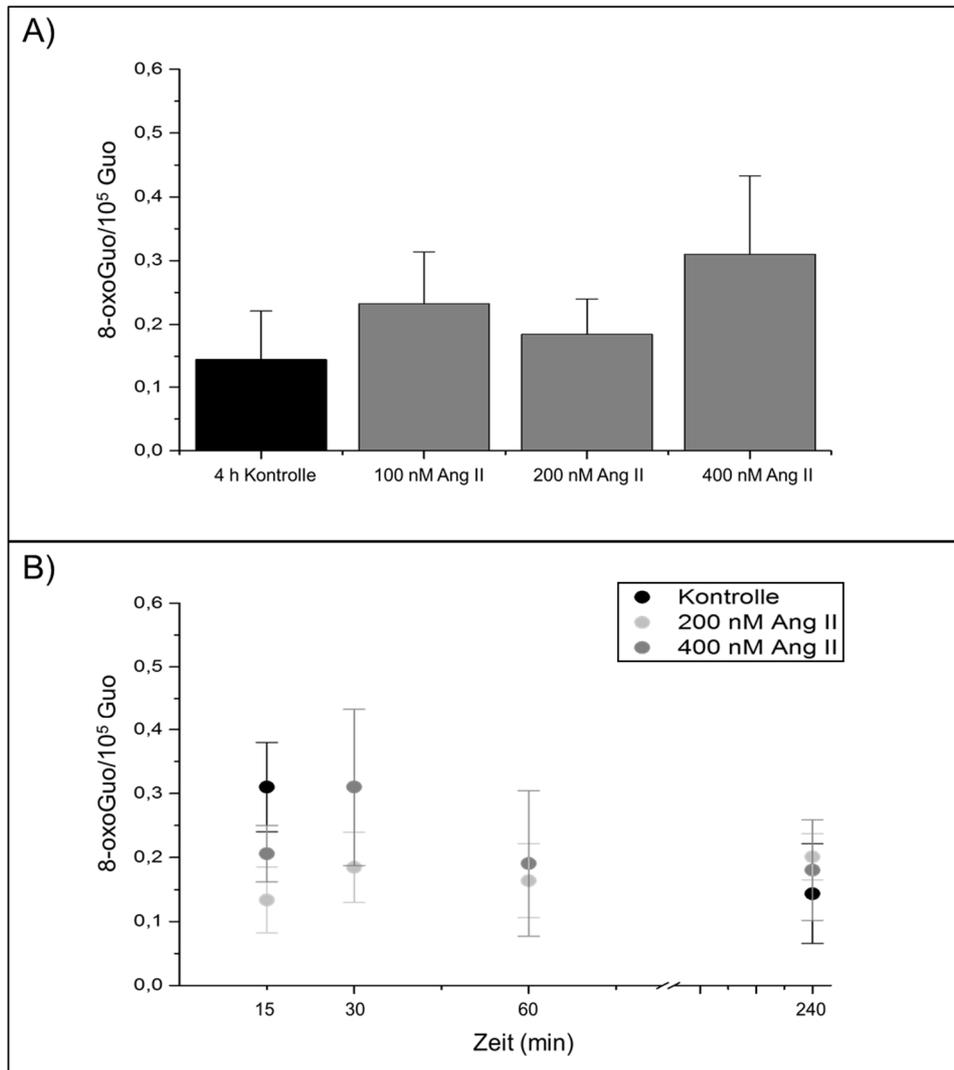


Abbildung 25

HPLC-MS/MS-Ergebnisse für 8-oxoGuo/10⁵ Guo in der RNA von LLC-PK1-Zellen. Die LLC-PK1-Zellen wurden mit Angiotensin II behandelt, die RNA isoliert und hydrolysiert. **A)** 8-oxoGuo nach 30-minütiger Behandlung mit PBS (4 h, Kontrolle), 100, 200 und 400 nM Angiotensin II (Ang II). **B)** 8-oxoGuo nach zeitabhängiger Behandlung mit 200 und 400 nM Angiotensin II (Ang II). Gemessen wurde nach 15, 30, 60 und 240 Minuten.

Die Behandlung mit 200 und 400 nM Angiotensin II bewirkte keinen Anstieg an 8-oxoGuo pro 10^5 Guo in der RNA zu allen Messzeitpunkten (Abbildung 25B).

4.4.2 Auswirkung von Aldosteron auf DNA und RNA in vitro

4.4.2.1 Aldosteron bewirkt eine dosisabhängige Schädigung der DNA

Die 30-minütige Behandlung von LLC-PK1-Zellen mit 1, 10 und 100 nM Aldosteron führte zu einem signifikanten Anstieg des DNA-Schadens, ermittelt mit dem Comet-Assay (Abbildung 26A). Der Anstieg des DNA-Schadens war dosisabhängig (Abbildung 26A).

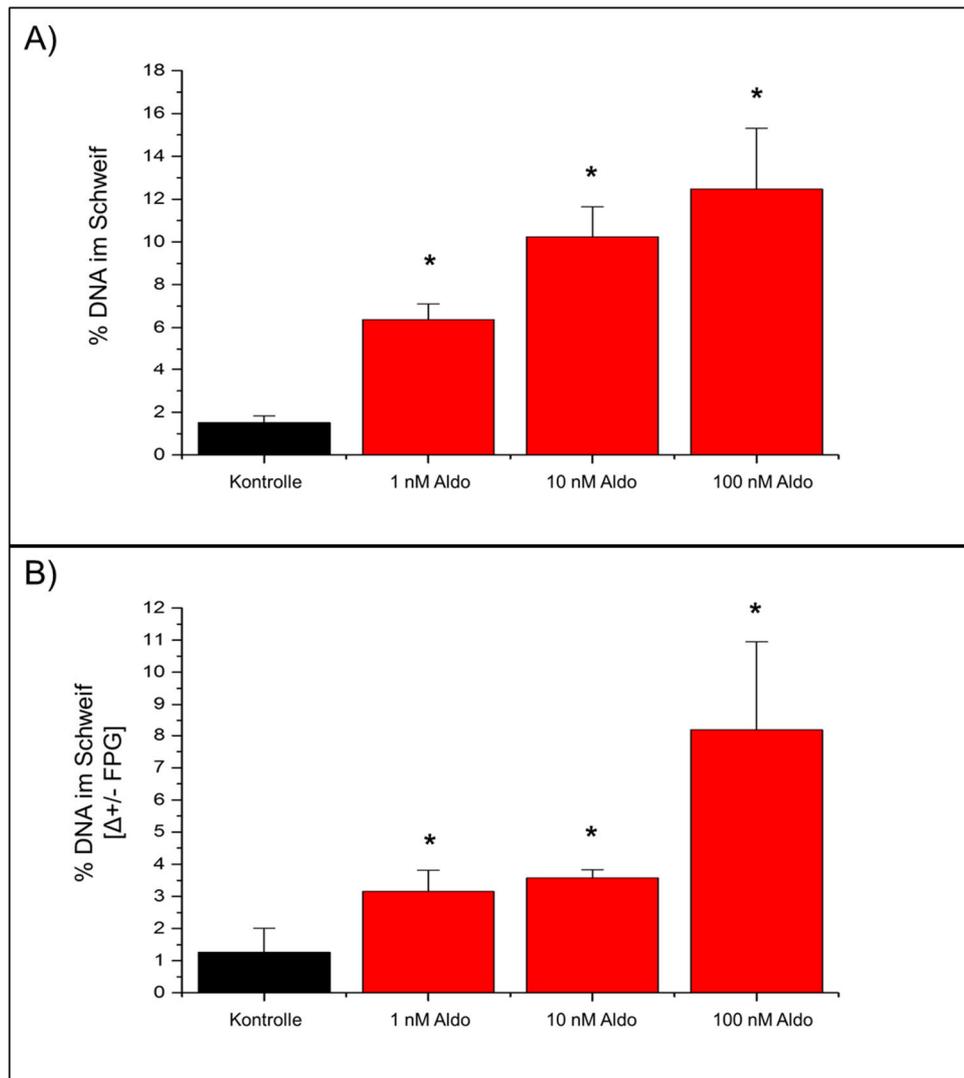


Abbildung 26

A) DNA-Schaden in LLC-PK1-Zellen nach 30-minütiger Behandlung mit Aldosteron, nachgewiesen mittels Comet-Assay. Gezeigt ist der prozentuale Anteil der DNA im Schweif. Die Behandlungen waren PBS (Kontrolle), 1, 10 und 100 nM Aldosteron (Aldo). **B)** DNA-Schaden in LLC-PK1-Zellen nach Behandlung mit 0,5 μ g/ml FPG-Enzym. Angegeben ist die Differenz vom DNA-Schaden mit und ohne FPG-Behandlung. * $p \leq 0,05$ gegen Kontrolle.

Mit dem Einsatz von 0,5 µg/ml FPG-Enzym vor der Elektrophorese des Comet-Assays, zur Untersuchung von FPG-sensitiven Stellen, erhöhte sich der DNA-Schaden im Vergleich zu den unbehandelten Dosen (Abbildung 26B). Mit 1, 10 und 100 nM Aldosteron kam es zu einem dosisabhängigen signifikanten Anstieg des DNA-Schadens im Vergleich zur Kontrolle.

4.4.2.2 *Aldosteron führt zu zeitunabhängigem DNA-Schaden*

Die LLC-PK1-Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit 10 nM Aldosteron behandelt. Der DNA-Schaden wurde mittels Comet-Assay bestimmt und wird in Abbildung 27A gezeigt. Die Behandlung führte nach 15 Minuten zu einem signifikanten DNA-Schaden im Vergleich zur Kontrolle. Der DNA-Schaden nahm nach 30 Minuten weiter zu (Abbildung 27A). Nach 60 Minuten Behandlungszeit mit Aldosteron fiel der DNA-Schaden ab. Ebenso zeigte die Comet-Assay-Auswertung nach 240 Minuten einen ähnlich hohen DNA-Schaden wie nach 60 Minuten an (Abbildung 27A). Der DNA-Schaden, ausgelöst durch Aldosteron, war zu jedem Messzeitpunkt signifikant gegenüber der Kontrolle.

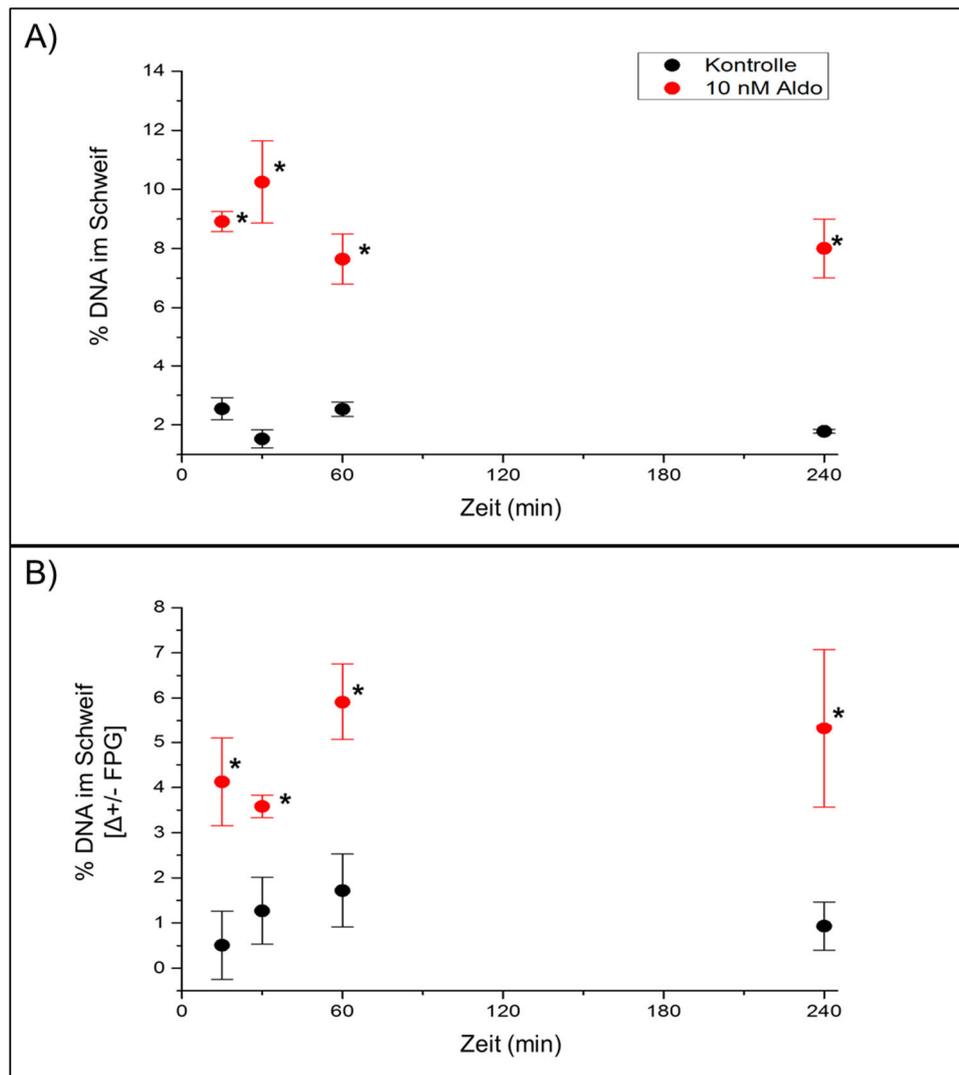


Abbildung 27

A) DNA-Schaden in LLC-PK1-Zellen, nachgewiesen mittels Comet-Assay, nach der Behandlung mit 10 nM Aldosteron (Aldo) zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Gezeigt ist der prozentuale Anteil der DNA im Schweif. **B)** DNA-Schaden in LLC-PK1-Zellen nach Behandlung mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ FPG-Enzym. Angegeben ist die Differenz vom DNA-Schaden mit und ohne FPG-Behandlung. * $p \leq 0,05$ gegen Kontrolle.

Die Behandlung einer Probe mit dem FPG-Enzym vor der Elektrophorese des Comet-Assays führte zu einem Anstieg des DNA-Schadens im Vergleich zur unbehandelten Probe zum gleichen Zeitpunkt (Abbildung 27B). Die Differenz des DNA-Schadens, ausgelöst durch das FPG-Enzym, war signifikant im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Eine Zeitabhängigkeit des DNA-Schadens durch die Zugabe des FPG-Enzyms war nicht zu erkennen (Abbildung 27B).

4.4.2.3 *Immunzytochemische Färbung zeigt Anstieg von 8-oxodG nach Behandlung mit Aldosteron*

Mittels Antikörper wurde 8-oxodG in der DNA von LLC-PK1-Zellen angefärbt und mit konfokaler Mikroskopie detektiert. Die Abbildung 24A zeigt die *Overlay*-Bilder von LLC-PK1-Zellen, die mit 10 nM Aldosteron oder PBS für vier Stunden behandelt wurden. Die Quantifizierung zeigte einen signifikanten Anstieg von 8-oxodG in der DNA nach vierstündiger Behandlung mit 10 nM Aldosteron im Vergleich zur Kontrolle zum gleichen Zeitpunkt. Die Messung nach einer Stunde war nicht signifikant gegenüber der Kontrolle (Abbildung 28B).

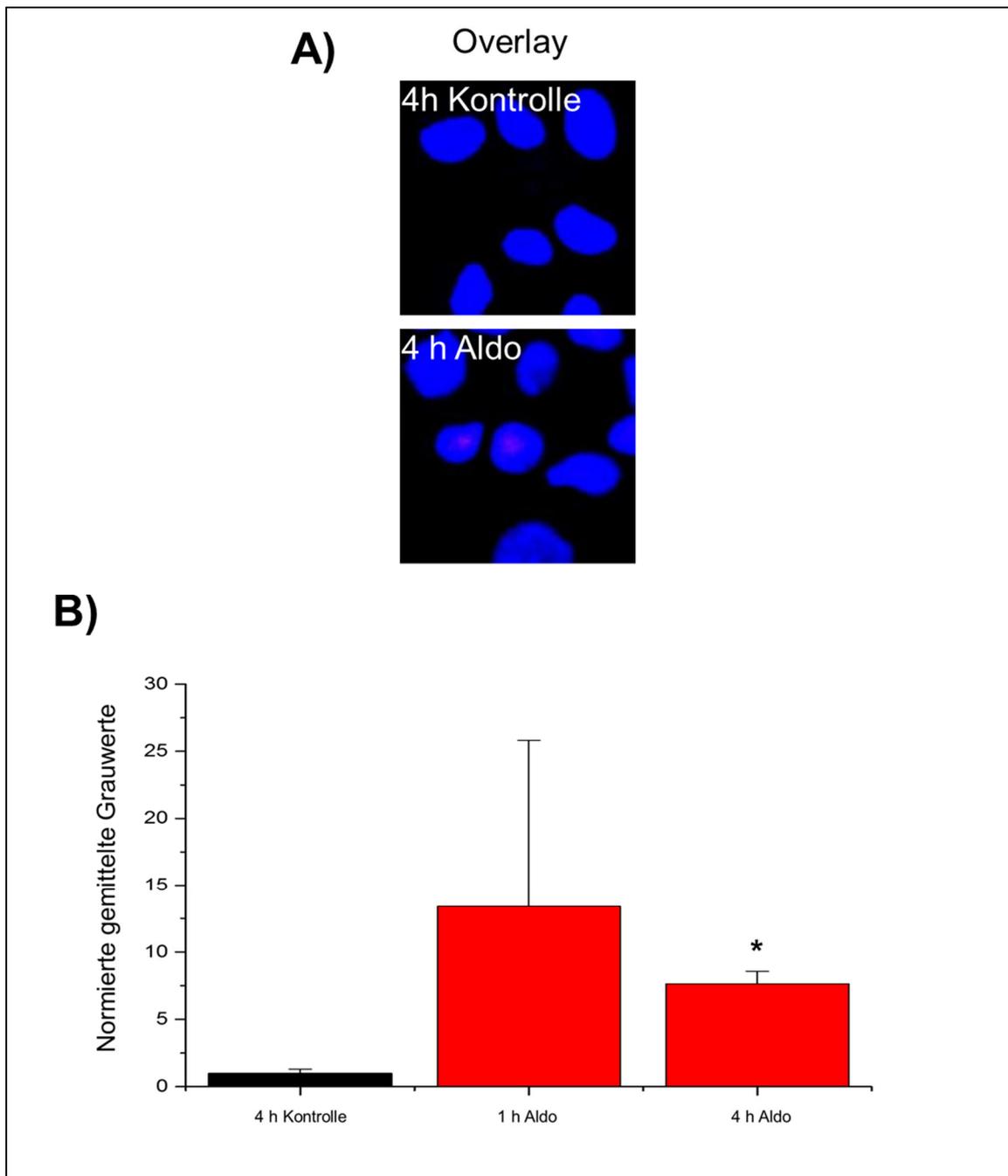


Abbildung 28

Nachweis von 8-oxodG in LLC-PK1-Zellen nach Aldosteron-Behandlung. Die LLC-PK1-Zellen wurden mit 10 nM Aldosteron für eine und vier Stunden behandelt. **A)** Repräsentative Bilder der Kontrolle und der mit Aldosteron (Aldo) behandelten LLC-PK1-Zellen nach angegebenen Zeitpunkten, aufgenommen mit einem TCS SP5 Rasterlasermikroskop. **B)** Zur Quantifizierung wurden die Grauwerte von 100 Zellen mit ImageJ gemessen und auf den Kontrollwert normiert. * $p \leq 0,05$. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten für 1 h Behandlungszeit und von drei unabhängigen Experimenten für 4 h Behandlungszeit. Die Ergebnisse stammen teilweise aus der Doktorarbeit von Frau Dr. Queisser (S. 73, 4 h Behandlungszeit) (130) und unveröffentlichten Daten von Frau Dr. Queisser (1 h Behandlungszeit) (131). * $p \leq 0,05$ gegen Kontrolle.

4.4.2.4 Aldosteron bewirkt keinen Anstieg von 8-oxodG in der DNA

Der HPLC-MS/MS-Nachweis von 8-oxodG in der DNA der LLC-PK1-Zellen ergab keine dosisabhängige Zunahme des oxidativen Stressmarkers 8-oxodG nach 30-minütiger Behandlung mit Aldosteron. Eine nicht signifikante Zunahme an 8-oxodG pro 10^6 dG in der DNA wurde für die Behandlung mit 1 und 100 nM Aldosteron im Vergleich zur Kontrolle detektiert (Abbildung 29A). Die Behandlung mit 10 nM Aldosteron führte hingegen zu keinem Anstieg an 8-oxodG pro 10^6 dG (Abbildung 29A).

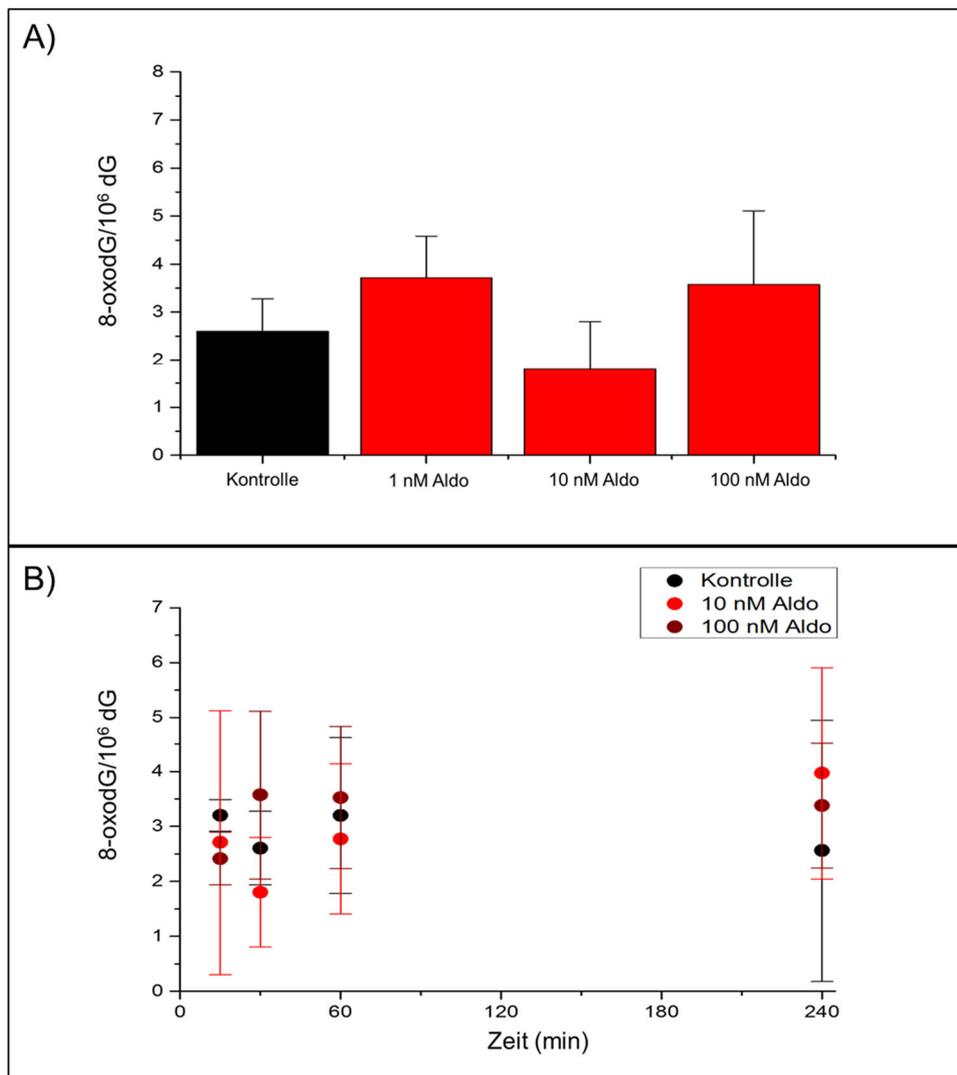


Abbildung 29

HPLC-MS/MS-Ergebnisse für 8-oxodG/10⁶ dG aus der DNA von LLC-PK1-Zellen. **A)** 30-minütige Behandlung der LLC-PK1-Zellen mit PBS (Kontrolle), 1, 10 und 100 nM Aldosteron (Aldo). **B)** Zeitabhängige Behandlung der LLC-PK1-Zellen mit 10 und 100 nM Aldosteron (Aldo) für 15, 30, 60 und 240 Minuten.

Bei der zeitabhängigen Behandlung der LLC-PK1-Zellen mit beiden Aldosteron-Konzentrationen blieb die Menge an 8-oxodG in der DNA auf einem Niveau (Abbildung 29B).

4.4.2.5 Aldosteron bewirkt keinen Anstieg von 8-oxodG im Zytosol

Die HPLC-MS/MS-Messung der Nukleoside im Zytosol von LLC-PK1-Zellen nach der 30-minütigen Behandlung mit 100 nM Aldosteron ergab eine nicht signifikante Abnahme der Menge an 8-oxodG pro 10^3 dG im Vergleich zur Kontrolle.

Nach weiteren 30 Minuten Behandlungszeit stieg 8-oxodG pro 10^3 dG auf das Kontrollniveau an (Abbildung 30).

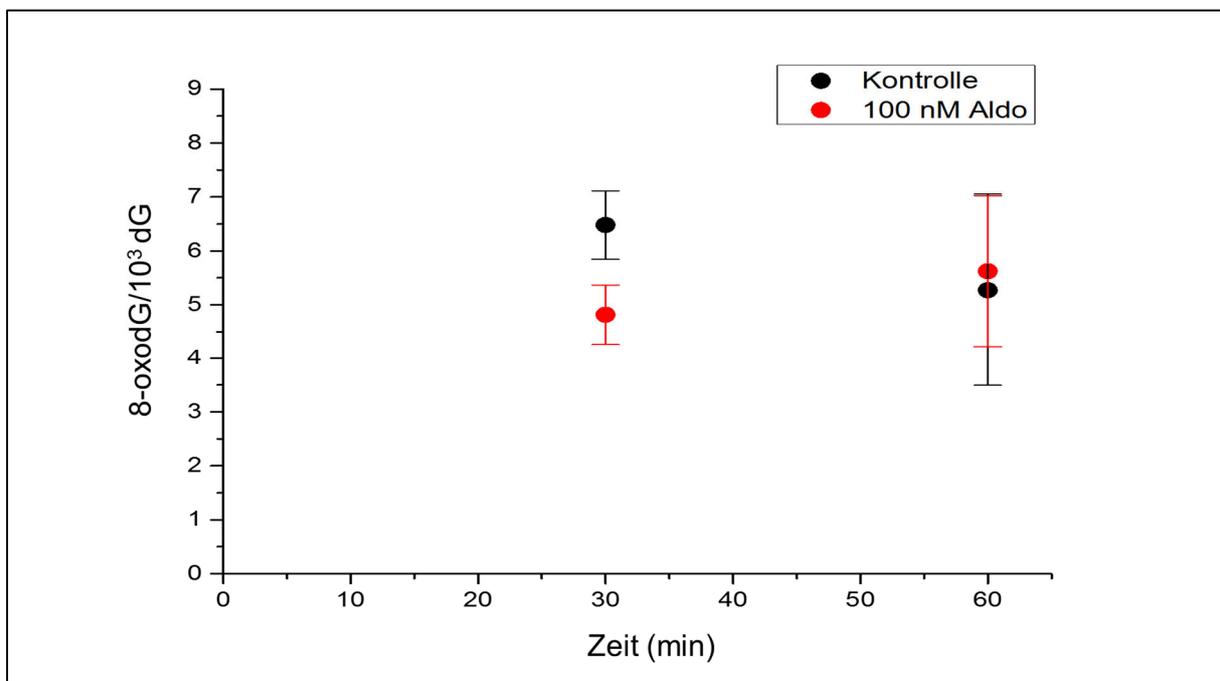


Abbildung 30

HPLC-MS/MS-Ergebnisse für 8-oxodG aus Zytosolproben. Die LLC-PK1-Zellen wurden mit 100 nM Aldosteron (Aldo) behandelt. Anschließend wurden die Nukleotide nach der unter 3.2.5.6. beschriebenen Methode isoliert und gemessen. Angegeben ist die Menge an 8-oxodG pro 10^3 dG. Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

4.4.2.6 Aldosteron führt zu keinem Anstieg von 8-oxoGuo in der RNA

Der HPLC-MS/MS-Nachweis von 8-oxoGuo aus der RNA von LLC-PK1-Zellen zeigte eine nicht signifikante Zunahme an 8-oxoGuo pro 10^5 Guo nach 30-minütiger Behandlung mit 10 nM Aldosteron im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 31A).

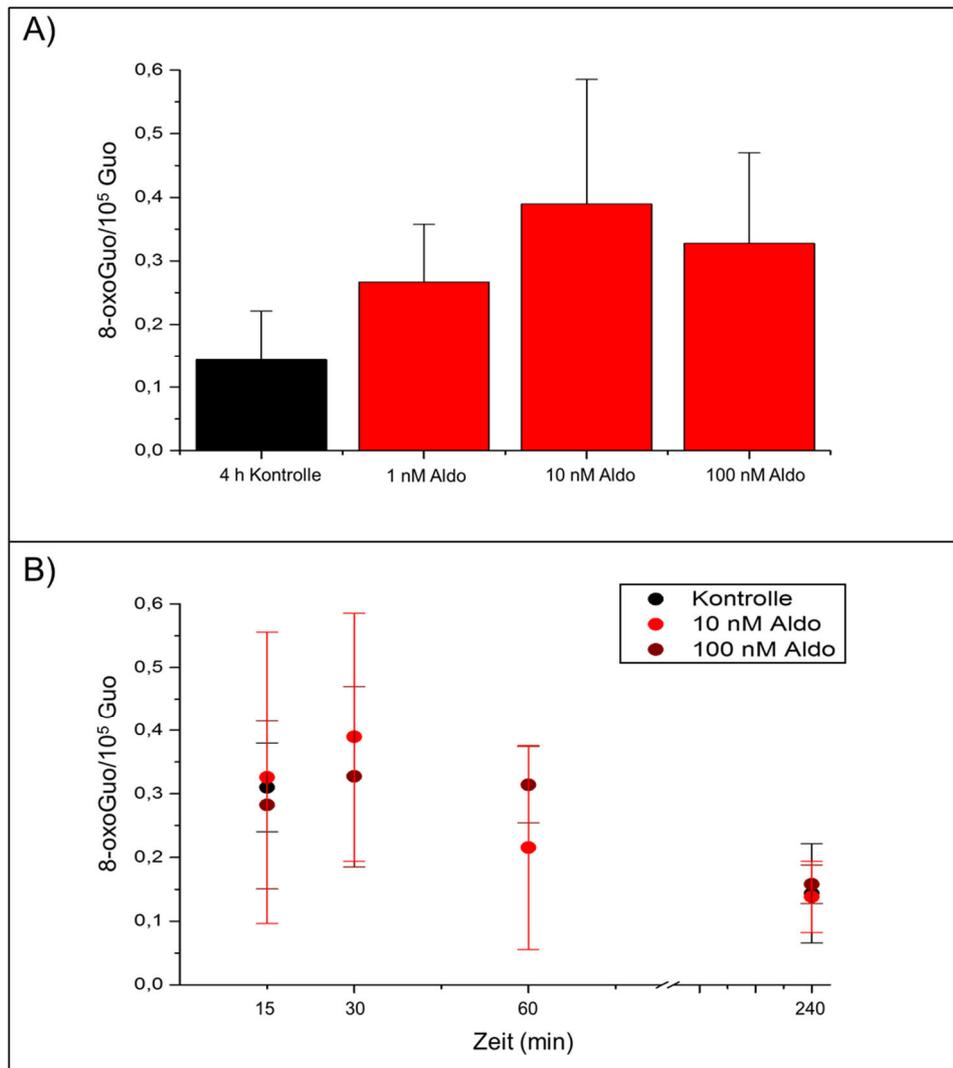


Abbildung 31

HPLC-MS/MS-Ergebnisse für 8-oxoGuo/10⁵ Guo in der RNA von LLC-PK1-Zellen. Die Zellen wurden mit Aldosteron behandelt, die RNA isoliert und hydrolysiert. **A)** 8-oxoGuo nach 30-minütiger Behandlung mit PBS (Kontrolle, 4 h), 1, 10 und 100 nM Aldosteron (Aldo). **B)** 8-oxoGuo nach zeitabhängiger Behandlung mit 10 und 100 nM Aldosteron (Aldo). Gemessen wurde nach 15, 30, 60 und 240 Minuten.

Zu keinem Messzeitpunkt konnte mittels HPLC-MS/MS ein signifikanter Anstieg an 8-oxoGuo/10⁵ Guo in der RNA nach Behandlung mit 10 oder 100 nM Aldosteron gemessen werden (Abbildung 31B).

4.5 Schädigung der DNA und RNA durch Angiotensin II und Aldosteron *in vivo*

In den Tierversuchen mit C57BL/6-Mäusen und SD-Ratten wurden diese mit erhöhten Angiotensin-II- (C57BL/6-Maus) und Aldosteron-Konzentrationen (SD-Ratten) für 28 Tage behandelt, um mögliche Schäden durch Hypertonie *in vivo* zu untersuchen. Um Auswirkungen auf die Integrität der DNA zu untersuchen, wurde mittels HPLC-MS/MS die Menge an 8-oxodG pro 10^6 dG in der DNA von Nierenzellen aus C57BL/6-Mäusen nachgewiesen (4.5.1) sowie die oxidativen Stressmarker im Urin gemessen (4.5.2). Zudem erlaubt der Nachweis von oxidierten Basen im Urin der Mäuse und Ratten, Rückschlüsse auf vorhandenen oxidativen Stress und den Schaden in der DNA oder RNA zu ziehen. In dieser Arbeit wurden folgende oxidativen Stressmarker gemessen:

- Der Marker 8-oxoGua ist das Produkt der Oxidation von Guanin mit ROS und wird durch DNA-Reparaturmechanismen, z. B. die Basenexzisionsreparatur, aus der DNA entfernt.
- Der Marker 8-oxodG entsteht bei der Nukleotidexzisionsreparatur oder der Oxidation des Nukleotidpools.
- Der Marker 8-oxoGuo wird bei der Oxidation von Guanosin in der RNA oder im Nukleotidpool gebildet.

Die Messungen der oxidativen Stressmarker wurden mit HPLC-MS/MS mit 20-h-Urin durchgeführt, um eine Exkretionsrate berechnen zu können.

Drei Tierversuche wurden zur Untersuchung der Auswirkung von Angiotensin II auf oxidativen Stress an C57BL/6-Mäusen durchgeführt. Im Folgenden sind die drei Tierversuche getrennt dargestellt, jeweils unterteilt in die drei untersuchten oxidativen Stressmarker. Der Interventionsversuch ist unter 4.5.2 beschrieben. Der zweite Tierversuch (4.5.3) hatte zum Ziel, die Auswirkung der Mutation des Gens *AT1a* zu untersuchen. Im dritten Tierversuch (4.5.4) war das Gen *NOX4* ausgeknockt. Die Auswirkungen des Verlusts von *NOX4* sollten untersucht werden.

Der Tierversuch (4.5.5) mit den SD-Ratten hatte zum Ziel, die Auswirkung von Aldosteron und Sulforaphan auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 zu untersuchen. Wenn nicht anders angegeben, bestand jede Gruppe aus acht Tieren

und es ist der Mittelwert \pm Standardfehler gezeigt. Die Kontrollgruppe erhielt immer PBS.

4.5.1 Anstieg von 8-oxodG in Nierenzell-DNA nach Behandlung mit Angiotensin II

In der DNA von Nieren der C57BL/6-Mäuse, die mit Angiotensin II, PBS oder Angiotensin II in Kombination mit verschiedenen Interventionen behandelt wurden, wurde der oxidative Stressmarker 8-oxodG mittels HPLC-MS/MS gemessen. Die Behandlung mit Angiotensin II über 28 Tage führte zu einem leichten, nicht signifikanten Anstieg von 8-oxodG pro 10^6 dG in der DNA der Nierenzellen (Abbildung 32).

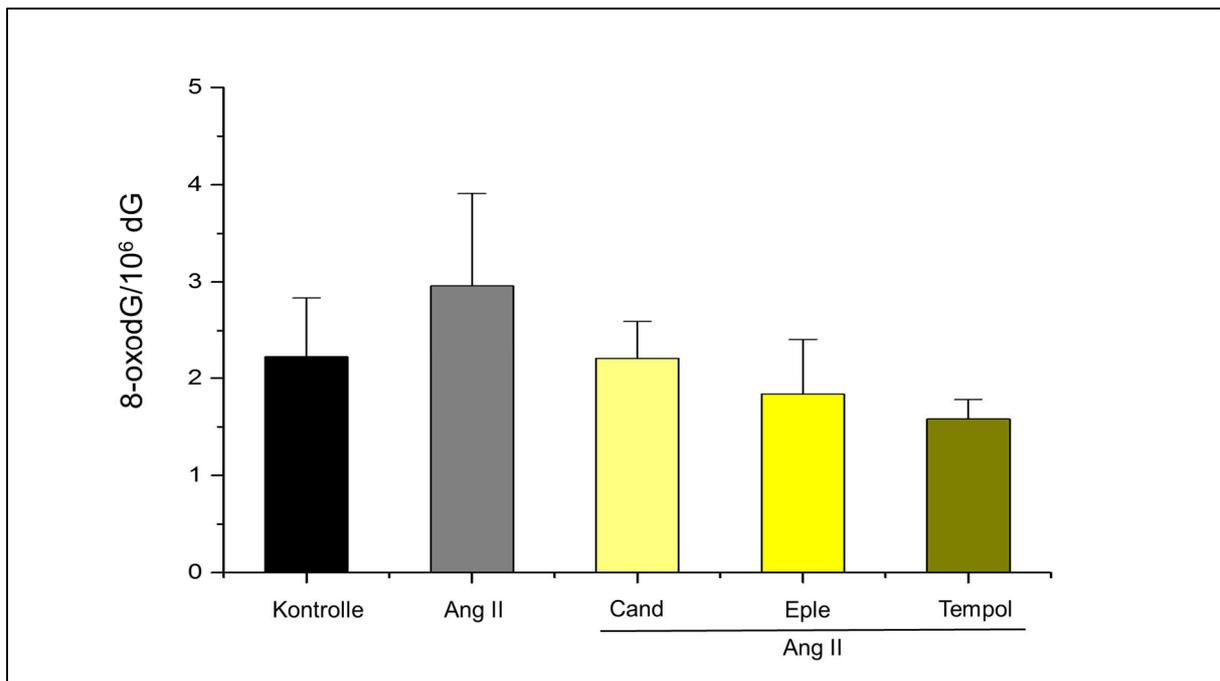


Abbildung 32

HPLC-MS/MS-Nachweis von 8-oxodG/10⁶ dG in Nierenzell-DNA von C57BL/6-Mäusen. Die DNA wurde aus der Niere isoliert und hydrolysiert. Untersucht wurden die Gruppen: Kontrolle, Angiotensin-II, Candesartan/Angiotensin-II, Eplerenon/Angiotensin-II und Tempol/Angiotensin-II. Die Eplerenon/Angiotensin-II-Gruppe bestand nur aus vier Tieren. Ang II = Angiotensin II, Cand = Candesartan, Eple = Eplerenon.

Als AT₁R-Blocker konnte Candesartan die Menge an 8-oxodG pro 10⁶ dG auf Kontrollniveau senken, gleiches bewirkten der Mineralokortikoidrezeptor-Antagonist Eplerenon und das Antioxidans Tempol (Abbildung 32).

4.5.2 Exkretionsraten der oxidativen Stressmarker aus dem Interventionsversuch

Im Folgenden werden die Auswirkungen der Behandlungen auf die Exkretion von 8-oxoGua, 8-oxodG und 8-oxoGuo im 20-h-Urin gezeigt. Zum Nachweis der oxidierten Basen wurde die unter 3.2.5.11 beschriebene HPLC-MS/MS-Methode am QTRAP/API 2000 verwendet.

4.5.2.1 Anstieg der Exkretionsrate von 8-oxoGua nach Behandlung mit Angiotensin II

Der HPLC-MS/MS-Nachweis von 8-oxoGua, dem Produkt der Basenexzisionsreparatur, im 20-h-Urin gelang für viele Tiere nicht. In der Kontrollgruppe konnte mehr als eine Urinprobe ausgewertet werden, ansonsten wurde 8-oxoGua in den anderen Gruppen nur in je einem Tier nachgewiesen (Abbildung 33).

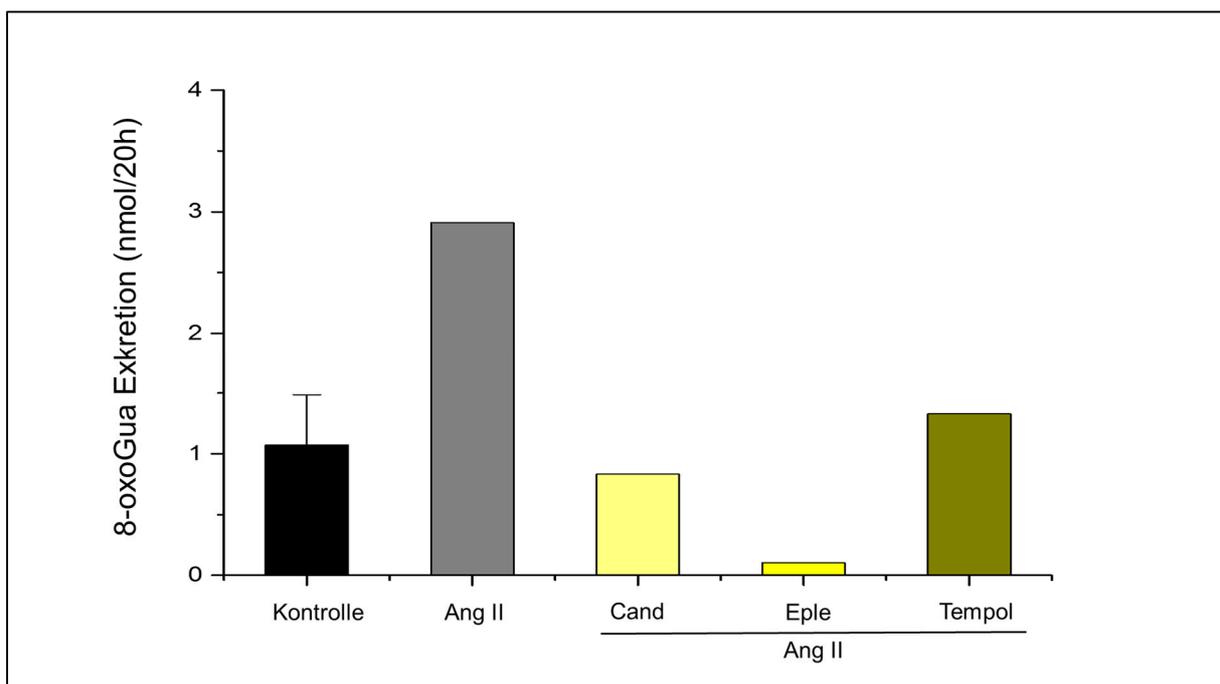


Abbildung 33

HPLC-MS/MS-Nachweis von 8-oxoGua im 20-h-Urin von C57BL/6-Mäusen. Der Urin wurde 1:1 mit internem Standard verdünnt. Untersucht wurden die Gruppen: Kontrolle, Angiotensin-II, Candesartan/Angiotensin-II, Eplerenon/Angiotensin-II und Tempol/Angiotensin-II. Die Eplerenon/Angiotensin-II-Gruppe bestand nur aus vier Tieren. Ang II = Angiotensin II, Cand = Candesartan, Eple = Eplerenon.

4.5.2.2 Die durch Angiotensin II erhöhte Exkretionsrate von 8-oxodG wird von Candesartan signifikant gesenkt

Angiotensin II bewirkte einen signifikanten Anstieg der Exkretionsrate von 8-oxodG, dem Produkt der Oxidation des Nukleotidpools, im Urin von C57BL/6 Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 34). Diese erhöhte Exkretionsrate konnte durch die Intervention mit Candesartan im Vergleich zur Angiotensin-II-Gruppe signifikant gesenkt werden (Abbildung 34).

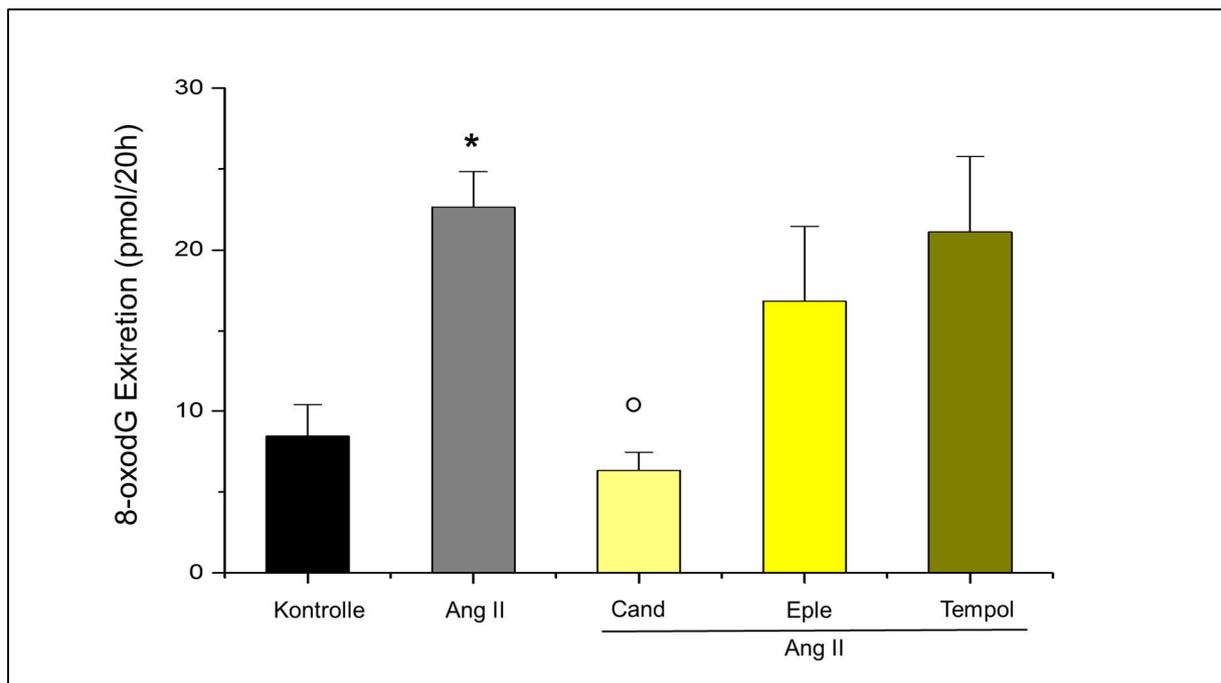


Abbildung 34

HPLC-MS/MS-Nachweis von 8-oxodG im 20-h-Urin von C57BL/6-Mäusen. Der Urin wurde 1:1 mit internem Standard verdünnt. Untersucht wurden die Gruppen: Kontrolle, Angiotensin-II, Candesartan/Angiotensin-II, Eplerenon/Angiotensin-II und Tempol/Angiotensin-II. Die Eplerenon/Angiotensin-II-Gruppe bestand nur aus vier Tieren. * $p \leq 0,05$ gegen Kontrollgruppe, o $p \leq 0,05$ gegen Angiotensin-II-Gruppe. Ang II = Angiotensin II, Cand = Candesartan, Eple = Eplerenon.

In der Eplerenon/Angiotensin-II-Gruppe wurde eine nicht signifikant niedrigere Exkretionsrate von 8-oxodG im Vergleich zur Angiotensin-II-Gruppe detektiert. Die Intervention mit Tempol konnte die signifikant erhöhte Exkretionsrate von 8-oxodG, hervorgerufen von Angiotensin II, nicht senken (Abbildung 34).

4.5.2.3 Tempol senkt eine durch Angiotensin II gesteigerte Exkretionsrate von 8-oxoGuo nicht

Die Behandlung mit Angiotensin II zeigte einen signifikanten Anstieg der Exkretionsrate von 8-oxoGuo, dem Produkt der RNA-Oxidation, im 20-h-Urin im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 35). Die HPLC-MS/MS-Messung ergab, dass die erhöhte Exkretionsrate von 8-oxoGuo durch die Intervention mit Candesartan signifikant auf Kontrollniveau gesenkt wurde.

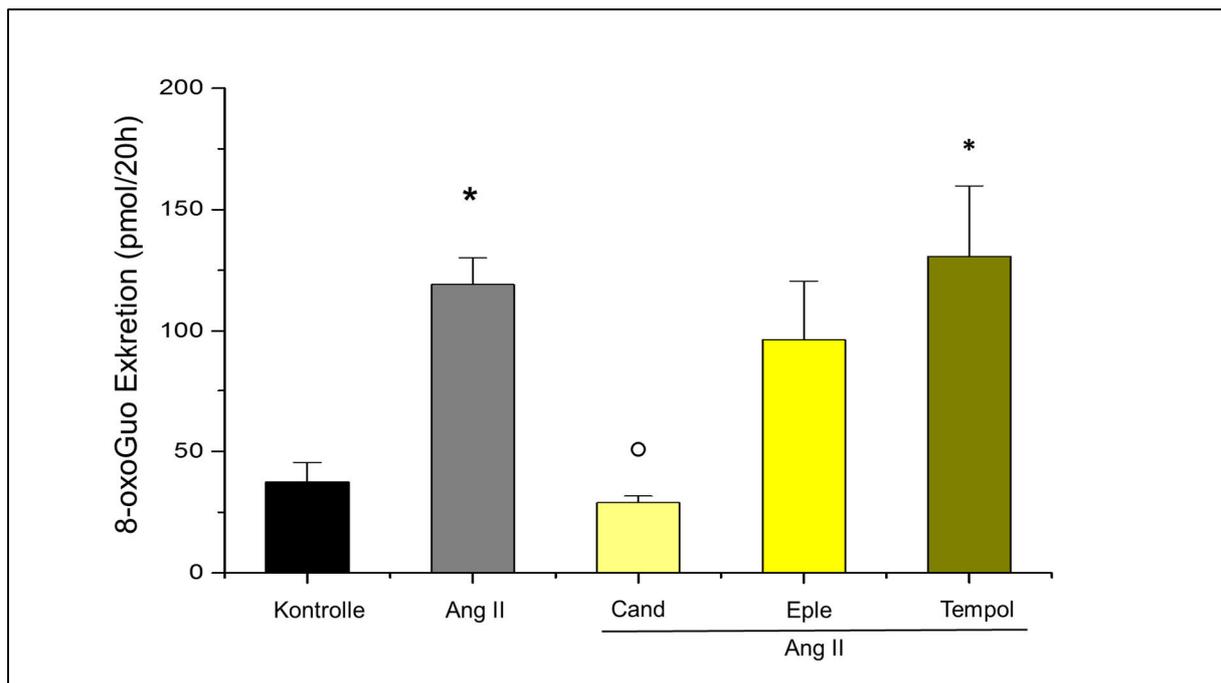


Abbildung 35

HPLC-MS/MS-Nachweis von 8-oxoGuo im 20-h-Urin von C57BL/6-Mäusen. Der Urin wurde 1:1 mit internem Standard verdünnt. Untersucht wurden die Gruppen: Kontrolle, Angiotensin-II, Candesartan/Angiotensin-II, Eplerenon/Angiotensin-II und Tempol/Angiotensin-II. Die Eplerenon/Angiotensin-II-Gruppe bestand nur aus vier Tieren. * $p \leq 0,05$ gegen Kontrollgruppe. o $p \leq 0,05$ gegen Angiotensin-II-Gruppe. Ang II = Angiotensin II, Cand = Candesartan, Eple = Eplerenon.

Die Intervention mit dem Antioxidans Tempol konnte den Anstieg der Exkretionsrate von 8-oxoGuo, ausgelöst durch Angiotensin II, nicht senken (Abbildung 35).

4.5.3 Exkretionsraten der oxidativen Stressmarker nach Mutation des AT_{1a} -Rezeptors

Im zweiten Tierversuch wurde die Auswirkung der Mutation des Gens für den AT_{1a} auf die Effekte von Angiotensin II untersucht. Im Folgenden sind die Auswirkungen der Behandlungen auf die Exkretion von 8-oxoGua, 8-oxodG und 8-oxoGuo im 20-h-Urin gezeigt. Zum Nachweis der oxidierten Basen wurde die unter 3.2.5.12 beschriebene HPLC-MS/MS-Methode am QTRAP/API 2000 verwendet.

4.5.3.1 Die Mutation im AT_{1a} -Gen hat keinen Einfluss auf die 8-oxoGua-Exkretion

Die Gruppen AT_{1a} -WT-Angiotensin-II und AT_{1a} -WT-Candesartan/Angiotensin-II zeigten eine Abnahme der Exkretionsrate von 8-oxoGua im Vergleich zur AT_{1a} -WT-K-Gruppe (Abbildung 36). Im Vergleich mit der AT_{1a} -WT-K-Gruppe blieb die Exkretionsrate von 8-oxoGua im Urin der Mäuse aus der AT_{1a} -KO-K-Gruppe auf gleichem Niveau. In der AT_{1a} -KO-Angiotensin-II-Gruppe wurde eine nicht signifikant gesteigerte Exkretionsrate von 8-oxoGua im Vergleich zur AT_{1a} -WT-Angiotensin-II-Gruppe detektiert (Abbildung 36).

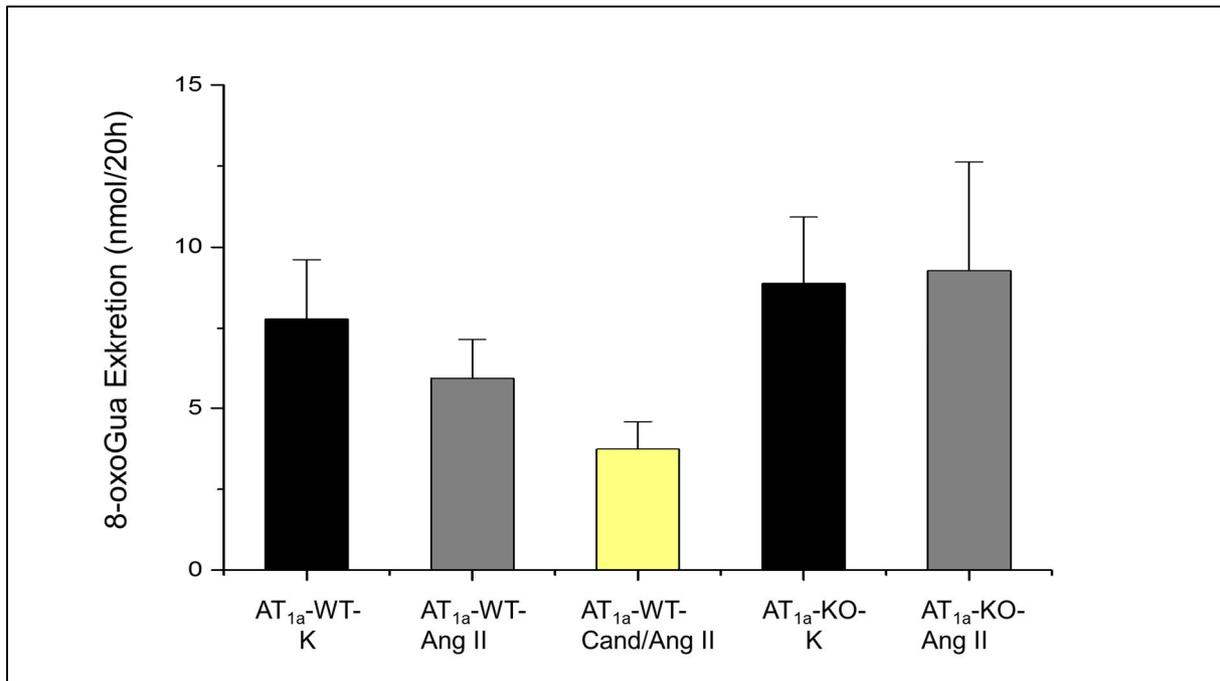


Abbildung 36

HPLC-MS/MS-Nachweis von 8-oxoGua im 20-h-Urin von C57BL/6-Mäusen. Der Urin wurde 1:1 mit internem Standard verdünnt. Die untersuchten Gruppen waren AT_{1a}-WT-K, AT_{1a}-WT-Angiotensin-II, AT_{1a}-WT-Candesartan/Angiotensin-II, AT_{1a}-KO-K und AT_{1a}-KO-Angiotensin-II. In der AT_{1a}-WT-Angiotensin II-Gruppe befanden sich sechs Tiere. Ang II = Angiotensin II, Cand = Candesartan.

4.5.3.2 Die Mutation im AT_{1a}-Gen bewirkt eine höhere Exkretion von 8-oxodG

Die Mutation des AT_{1a}-Gens bewirkte einen nicht signifikanten Anstieg der Exkretionsrate von 8-oxodG im Urin der AT_{1a}-KO-K-Tiere sowie in der AT_{1a}-KO-Angiotensin-II-Gruppe, im Vergleich zur jeweiligen AT_{1a}-WT-Gruppe (Abbildung 37). Die Intervention mit Candesartan gegen Angiotensin II bewirkte eine Abnahme der 8-oxodG-Exkretion auf das Niveau der AT_{1a}-WT-K-Gruppe.

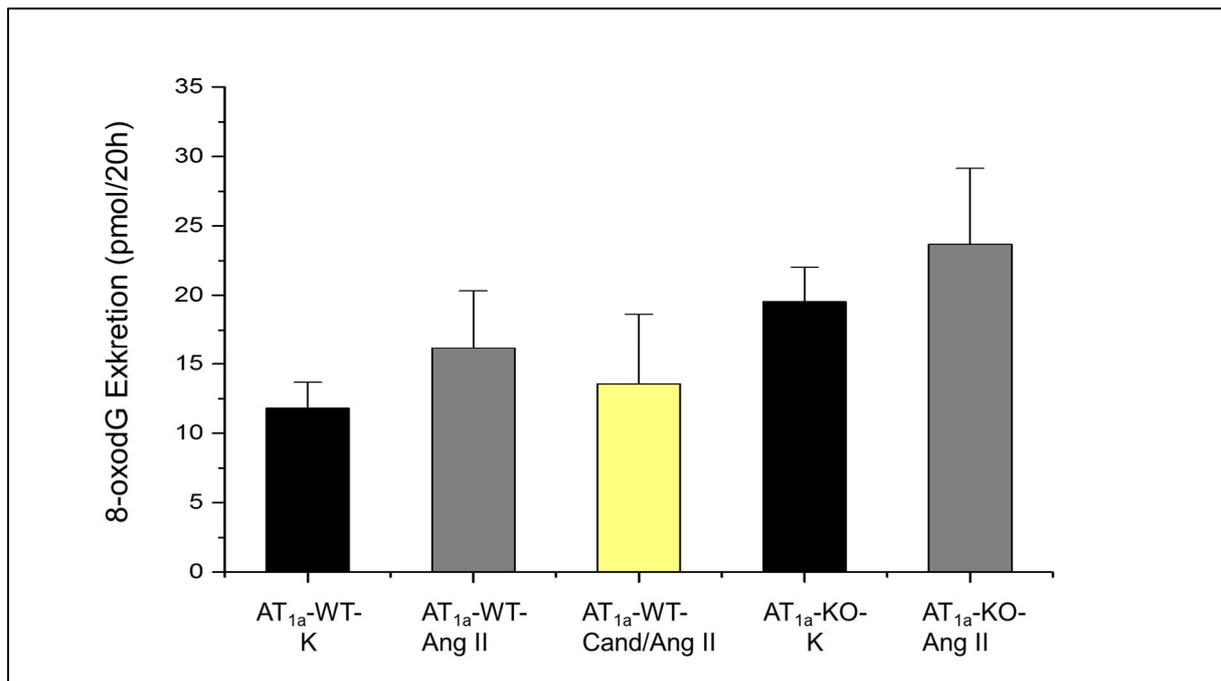


Abbildung 37

HPLC-MS/MS-Nachweis von 8-oxodG im 20-h-Urin von C57BL/6 Mäusen. Der Urin wurde 1:1 mit internem Standard verdünnt. Die untersuchten Gruppen waren AT_{1a}-WT-K, AT_{1a}-WT-Angiotensin-II, AT_{1a}-WT-Cand/Angiotensin-II, AT_{1a}-KO-K und AT_{1a}-KO-Angiotensin-II. In der AT_{1a}-WT-Angiotensin-II-Gruppe befanden sich sechs Tiere. Ang II = Angiotensin II, Cand = Candesartan.

4.5.3.3 Die 8-oxoGuo-Exkretion ist nach der Mutation des AT_{1a}-Gens erhöht

Die Exkretionsrate von 8-oxoGuo im Urin stieg in der AT_{1a}-WT-Angiotensin II-Gruppe gegenüber der AT_{1a}-WT-K-Gruppe nicht signifikant an. Die Intervention mit Candesartan konnte den Anstieg der Exkretionsrate wieder auf Kontrollniveau senken (Abbildung 38). Die Mutation im Gen des AT_{1a} bewirkte einen nicht signifikanten Anstieg der Exkretionsraten von 8-oxoGuo in der AT_{1a}-KO-K- und AT_{1a}-KO-Angiotensin-II-Gruppe im Vergleich zur jeweiligen AT_{1a}-WT-Gruppe. Die Behandlung mit Angiotensin II bewirkte bei den Tieren der AT_{1a}-KO-Angiotensin-II-Gruppe einen nicht signifikanten Anstieg der Exkretionsrate von 8-oxoGuo im Vergleich zur AT_{1a}-KO-K-Gruppe (Abbildung 38).

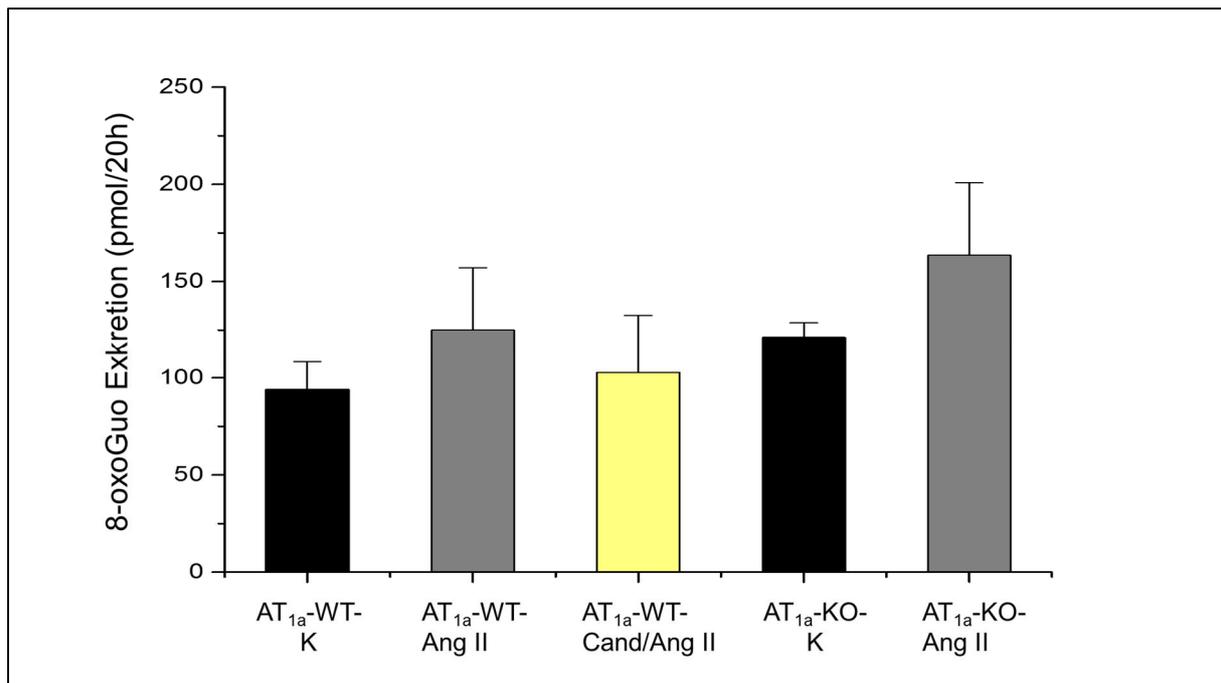


Abbildung 38

HPLC-MS/MS-Nachweis von 8-oxoGuo im 20-h-Urin von C57BL/6-Mäusen. Der Urin wurde 1:1 mit internem Standard verdünnt. Die untersuchten Gruppen waren AT_{1a}-WT-K, AT_{1a}-WT-Angiotensin-II, AT_{1a}-WT-Cand/Angiotensin-II, AT_{1a}-KO-K und AT_{1a}-KO-Angiotensin-II. In der AT_{1a}-WT-Angiotensin-II-Gruppe befanden sich sechs Tiere. Ang II = Angiotensin II, Cand = Candesartan.

4.5.4 Exkretionsraten der oxidativen Stressmarker nach Knockout von NOX4

Im dritten Tierversuch wurde die Auswirkung des Knockouts von NOX4 auf die Effekte von Angiotensin II untersucht. Im Folgenden sind die Auswirkungen der Behandlungen auf die Exkretion von 8-oxoGua, 8-oxodG und 8-oxoGuo im 20-h-Urin gezeigt. Zum Nachweis der oxidierten Basen wurde die unter 3.2.5.12 beschriebene HPLC-MS/MS-Methode am API 3000 verwendet.

4.5.4.1 Der Knockout des NOX4-Gens erhöht die 8-oxoGua-Exkretion

Beim Tierversuch zur Untersuchung des Knockouts von NOX4 wurde ein nicht signifikanter Anstieg der Exkretionsrate von 8-oxoGua im Urin der NOX4-WT-Angiotensin-II-Tiere im Vergleich zur NOX4-WT-K-Gruppe nachgewiesen (Abbildung 39). Der Knockout des NOX4-Gens führte zu einer nicht signifikanten Erhöhung der Exkretionsrate von 8-oxoGua im Vergleich zur NOX4-WT-K-Gruppe

(Abbildung 39). In der NOX4-KO-Angiotensin-II-Gruppe stieg die Exkretionsrate im Vergleich zur NOX4-WT-Angiotensin-II-Gruppe ebenfalls nicht signifikant an.

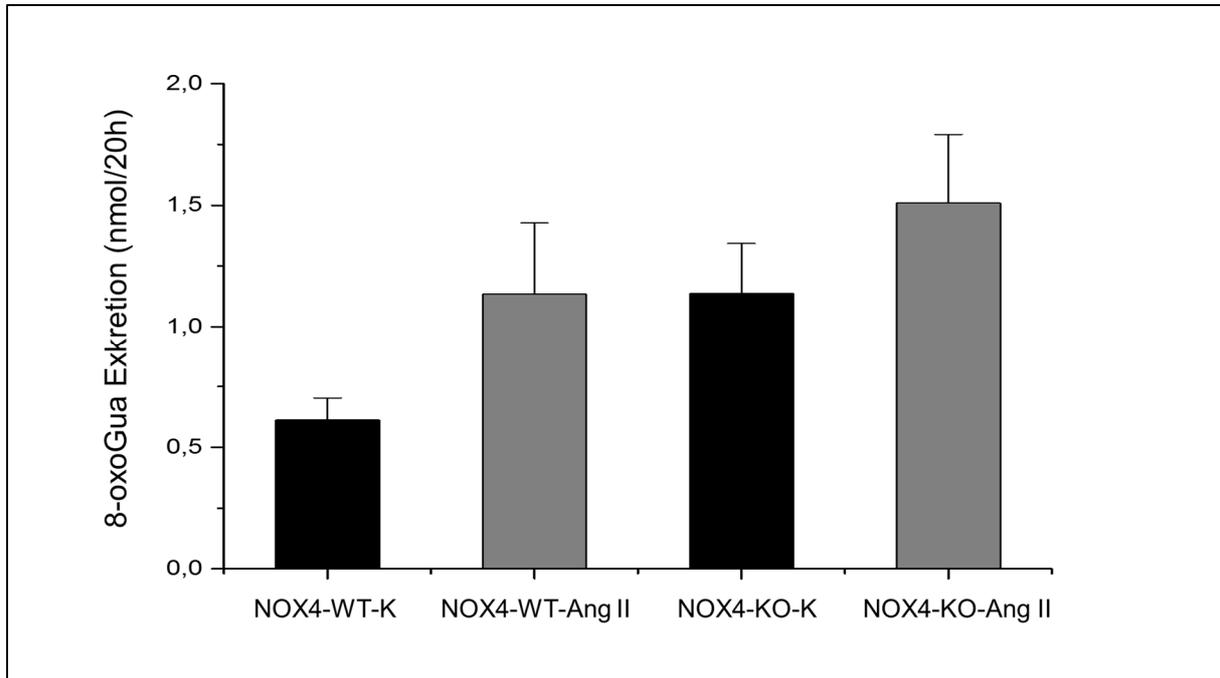


Abbildung 39

HPLC-MS/MS-Nachweis von 8-oxoGua im 20-h-Urin von C57BL/6-Mäusen. Der Urin wurde 1:1 mit internem Standard verdünnt. Die untersuchten Gruppen waren NOX4-WT-K (zehn Tiere), NOX4-WT-Angiotensin-II (acht Tiere), NOX4-KO-K (neun Tiere) und NOX4-KO-Angiotensin-II (zehn Tiere). Ang II = Angiotensin II.

4.5.4.2 Der Verlust von NOX4 bewirkt eine erhöhte Exkretion von 8-oxodG nach Gabe von Angiotensin II

Die Exkretionsrate von 8-oxodG im Urin war in den NOX4-KO-Angiotensin-II-Tieren signifikant erhöht im Vergleich zu den Tieren der NOX4-KO-K-Gruppe. Zudem führte die Behandlung von NOX4-WT-Mäusen mit Angiotensin II zu einem nicht signifikanten Anstieg der 8-oxodG-Exkretion im Vergleich zur NOX4-WT-K-Gruppe (Abbildung 40). Kein Anstieg der Exkretionsrate von 8-oxodG wurde durch den alleinigen Verlust des NOX4-Gens detektiert.

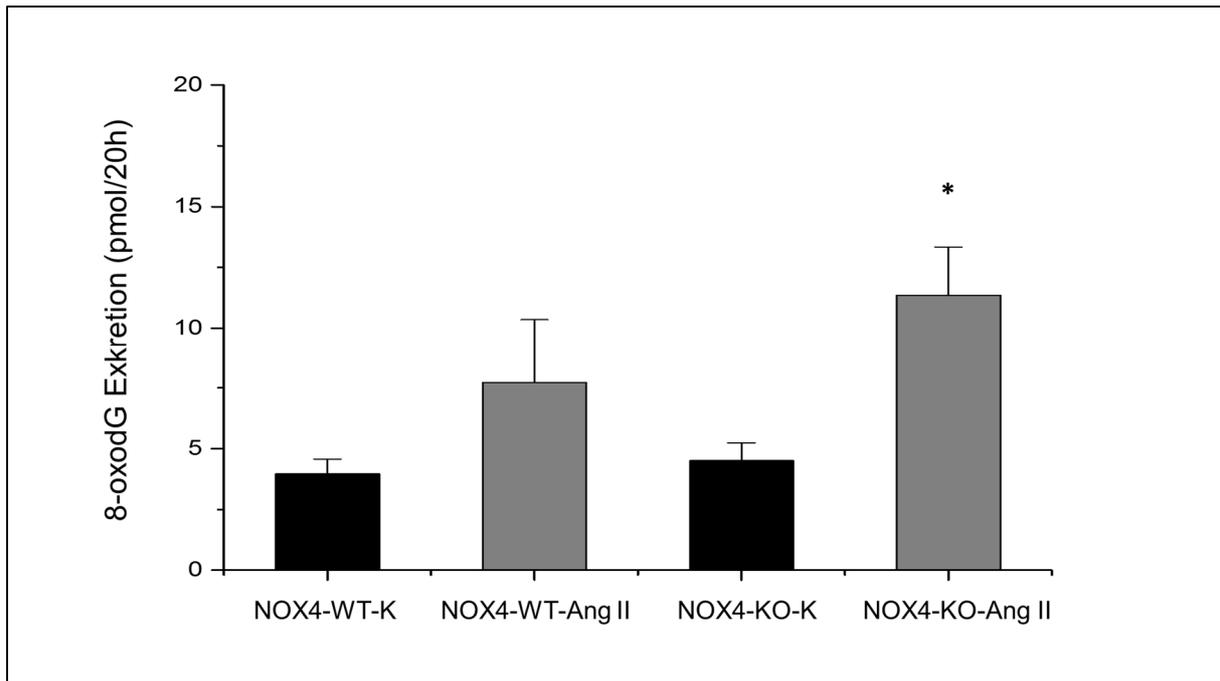


Abbildung 40

HPLC-MS/MS-Nachweis von 8-oxodG im 20-h-Urin von C57BL/6-Mäusen. Der Urin wurde 1:1 mit internem Standard verdünnt. Die untersuchten Gruppen waren NOX4-WT-K (zehn Tiere), NOX4-WT-Angiotensin-II (acht Tiere), NOX4-KO-K (neun Tiere) und NOX4-KO-Angiotensin-II (zehn Tiere). Ang II = Angiotensin II.

4.5.4.3 Die 8-oxoGuo-Exkretion ist nach Knockout des NOX4-Gens erhöht

Beim Tierversuch zur Untersuchung des Knockouts von NOX4 wurde ein nicht signifikanter Anstieg der Exkretionsrate von 8-oxoGuo im Urin von NOX4-WT-Angiotensin-II-Tieren im Vergleich zur NOX4-WT-K-Gruppe nachgewiesen (Abbildung 41). Der Knockout von NOX4 bewirkte keine erhöhte Exkretion von 8-oxoGuo in der NOX4-KO-K-Gruppe im Vergleich zur NOX4-WT-K-Gruppe. Die Tiere der NOX4-KO-Angiotensin-II-Gruppe zeigten eine nicht signifikant erhöhte Exkretion von 8-oxoGuo im Vergleich zur NOX4-WT-Angiotensin-II-Gruppe (Abbildung 41).

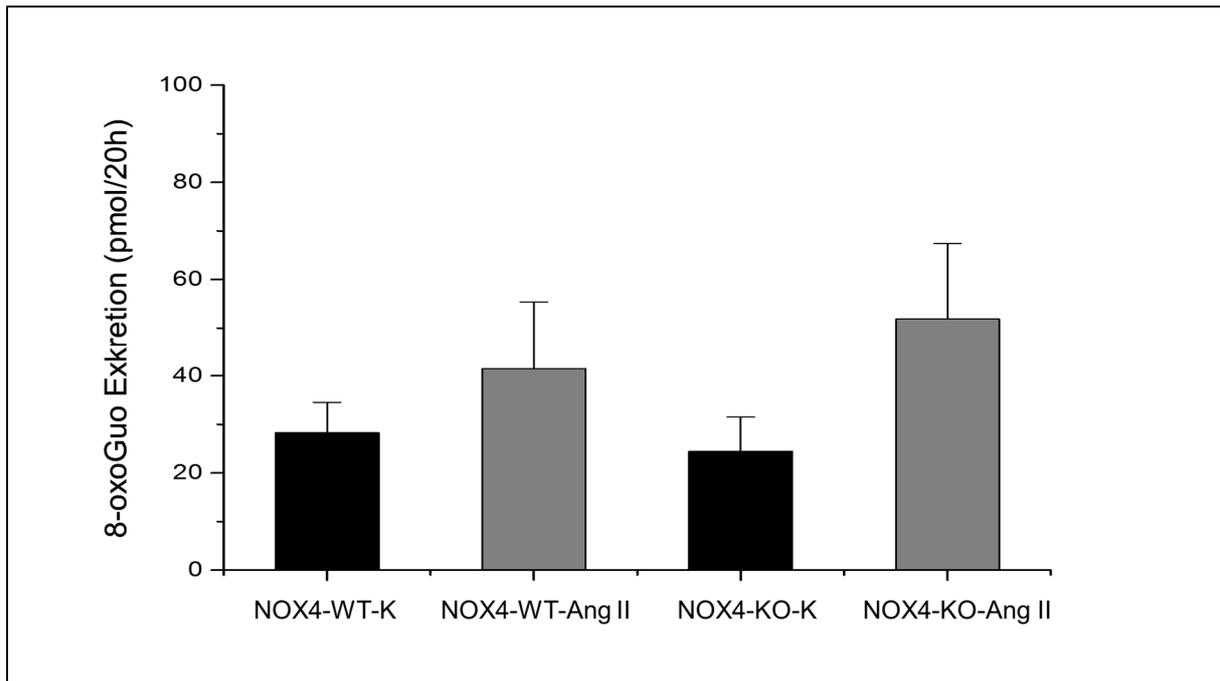


Abbildung 41

HPLC-MS/MS-Nachweis von 8-oxoGuo im 20-h-Urin von C57BL/6-Mäusen. Der Urin wurde 1:1 mit internem Standard verdünnt. Die untersuchten Gruppen waren NOX4-WT-K (zehn Tiere), NOX4-WT-Angiotensin-II (acht Tiere), NOX4-KO-K (neun Tiere) und NOX4-KO-Angiotensin-II (zehn Tiere). Ang II = Angiotensin II.

4.5.5 Exkretionsraten der oxidativen Stressmarker aus dem Tierversuch zur Aktivierung von Nrf2

Im Tierversuch mit SD-Ratten wurde die Auswirkung von Aldosteron auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 in SD-Ratten untersucht. Zudem wurde der Einfluss von Spironolacton, einem Mineralokortikoidrezeptor-Antagonist, und Sulforaphan, einem natürlichen Nrf2-Aktivator, auf den durch Aldosteron verursachten DNA-Schaden sowie die Aktivierung von Nrf2 geprüft (113).

Im Folgenden sind die Auswirkungen der Behandlungen auf die Exkretion von 8-oxoGua, 8-oxodG und 8-oxoGuo im 20-h-Urin gezeigt. Zum Nachweis der oxidierten Basen wurde die unter 3.2.5.12 beschriebene HPLC-MS/MS-Methode am API 3000 verwendet.

4.5.5.1 Erhöhte Exkretionsraten von 8-oxoGua nach Behandlung mit Aldosteron

Die Behandlung der SD-Ratten mit Aldosteron führte zu einer nicht signifikant erhöhten Exkretionsrate von 8-oxoGua im Urin im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 42). In Verbindung mit Aldosteron senkte Sulforaphan die Exkretionsrate von 8-oxoGua auf das Niveau der Kontrollgruppe (Abbildung 42). Die Behandlung der SD-Ratten mit Sulforaphan bewirkte keine Veränderung der Exkretionsrate von 8-oxoGua im Urin im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 42).

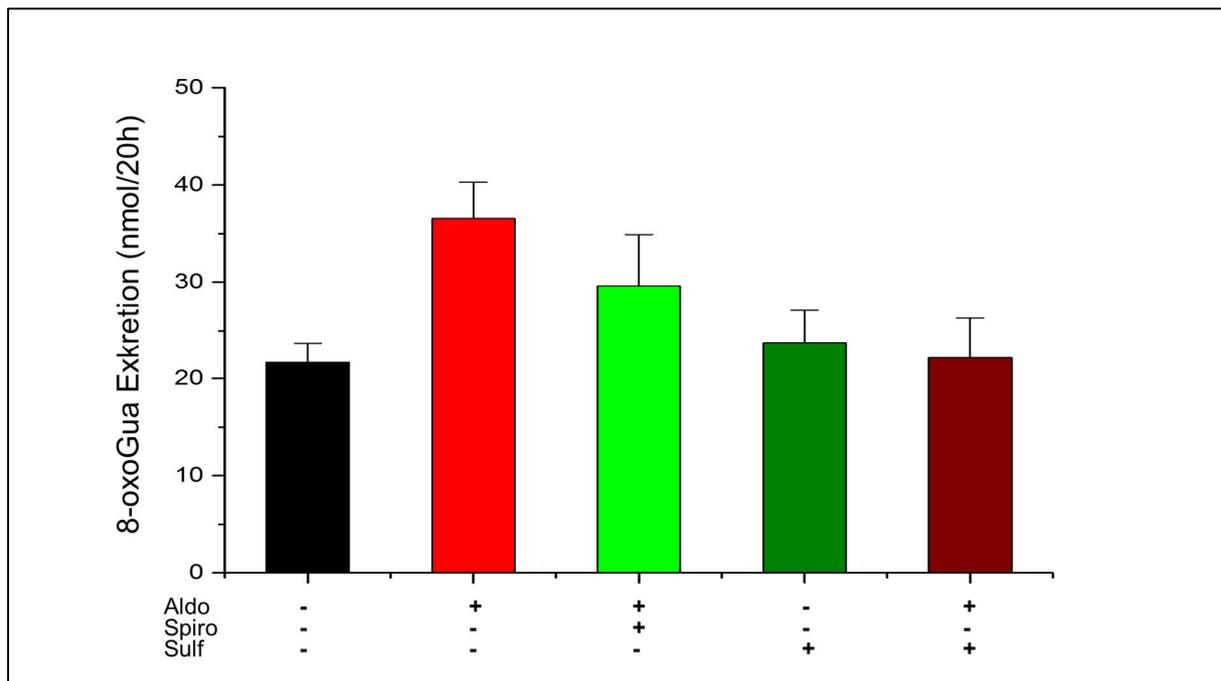


Abbildung 42

HPLC-MS/MS-Nachweis von 8-oxoGua im 20-h-Urin von SD-Ratten. Der Urin wurde 1:1 mit internem Standard verdünnt. Die fünf Gruppen waren: Kontrolle, Aldosteron, Spironolacton/Aldosteron, Sulforaphan und Sulforaphan/Aldosteron. Zur Berechnung der Exkretionsrate wurde der Urin über 20 h gesammelt und das Volumen bestimmt. Die Sulforaphan-Gruppe bestand aus fünf Tieren. Aldo = Aldosteron, Spiro = Spironolacton, Sulf = Sulforaphan.

4.5.5.2 Aldosteron führt zu keiner erhöhten Exkretionsrate von 8-oxodG

Die Abbildung 43 zeigt die Exkretionsrate von 8-oxodG im 20-h-Urin von SD-Ratten. Die 8-oxodG-Exkretion erhöhte sich durch die Gabe von Aldosteron nicht im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 43). Die Intervention mit Spironolacton bewirkte keine

Änderung der 8-oxodG-Exkretion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Sulforaphan führte zu einem nicht signifikanten Anstieg der 8-oxodG-Exkretionsrate im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Sulforaphan/Aldosteron-Gruppe zeigte eine signifikante Senkung der Exkretionsrate von 8-oxodG im Vergleich zur Behandlung der SD-Ratten mit Sulforaphan (Abbildung 43).

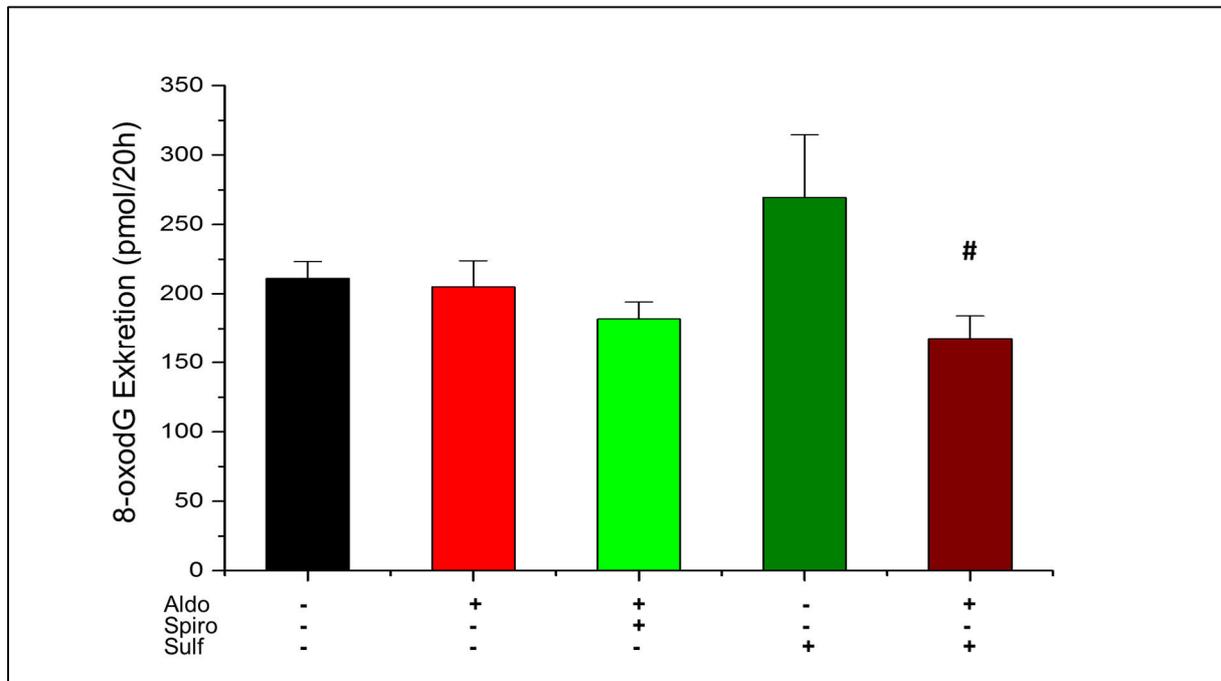


Abbildung 43

HPLC-MS/MS-Nachweis von 8-oxodG im 20-h-Urin von SD-Ratten. Der Urin wurde 1:1 mit internem Standard verdünnt. Die fünf Gruppen waren: Kontrolle, Aldosteron, Spironolacton/Aldosteron, Sulforaphan und Sulforaphan/Aldosteron. Zur Berechnung der Exkretionsrate wurde der Urin über 20 h gesammelt und das Volumen bestimmt. Die Sulforaphan-Gruppe bestand aus fünf Tieren. # $p \leq 0,05$ gegen die Sulforaphan-Gruppe. Aldo = Aldosteron, Spiro = Spironolacton, Sulf = Sulforaphan.

4.5.5.3 Die durch Aldosteron erhöhte Exkretionsrate von 8-oxodG wird durch Sulforaphan signifikant gesenkt

Nach der Behandlung mit Aldosteron stieg die Exkretionsrate von 8-oxoGuo im 20-h-Urin von SD-Ratten im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant an (Abbildung 44). Die Intervention mit Spironolacton konnte die Exkretionsrate von 8-oxoGuo im Vergleich zur Aldosteron-Gruppe senken (Abbildung 44).

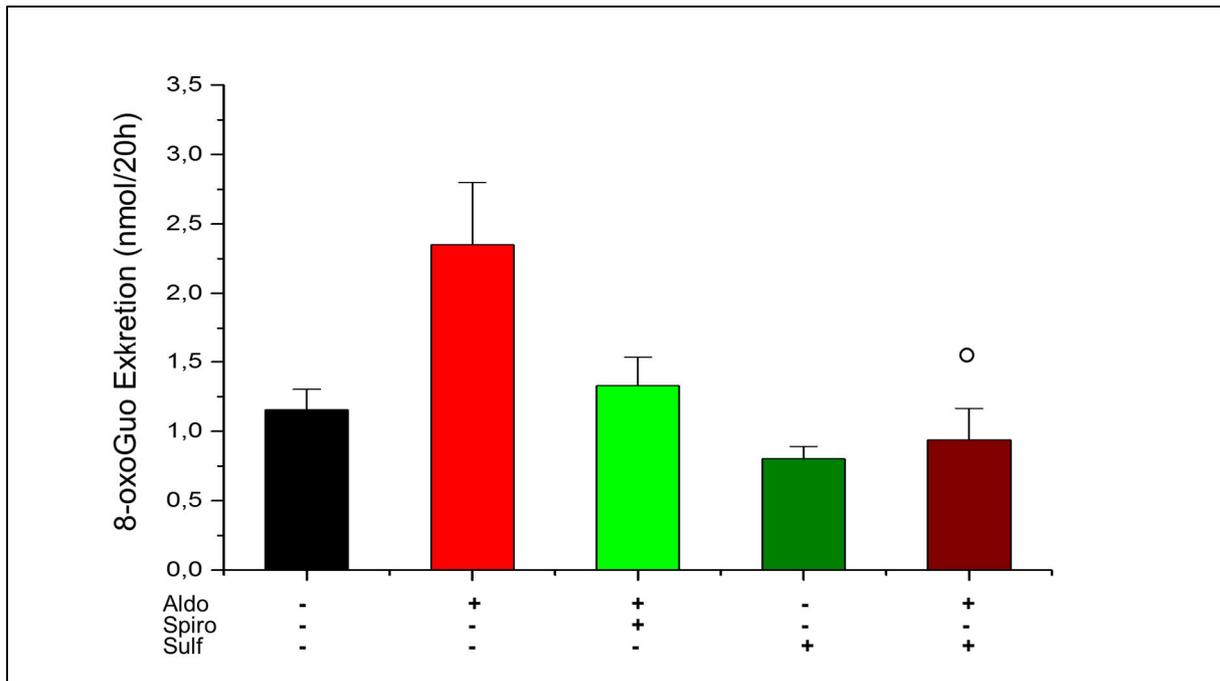


Abbildung 44

HPLC-MS/MS-Nachweis von 8-oxoGuo im 20-h-Urin von SD-Ratten. Der Urin wurde 1:1 mit internem Standard verdünnt. Die fünf Gruppen waren: Kontrolle, Aldosteron, Spironolacton/Aldosteron, Sulforaphan und Sulforaphan/Aldosteron. Zur Berechnung der Exkretionsrate wurde der Urin über 20 h gesammelt und das Volumen bestimmt. Die Sulforaphan-Gruppe bestand aus fünf Tieren. \circ $p \leq 0,05$ gegen die Aldosteron-Gruppe. Aldo = Aldosteron, Spiro = Spironolacton, Sulf = Sulforaphan.

In der Sulforaphan/Aldosteron-Gruppe war die Exkretionsrate von 8-oxodG signifikant niedriger im Vergleich zur Aldosteron-Gruppe (Abbildung 44).

5 Diskussion

Die Messung eines Biomarkers (oxidativen Stressmarkers) hat zum Ziel, Informationen über eine Erkrankung zu erhalten. Bei Krebs-, Parkinson-, Diabetes- oder Alzheimererkrankungen wird eine Erhöhung der oxidativen Stressmarker detektiert. Auch Umwelteinflüsse, wie Strahlung oder Schadstoffe, können zu einer Erhöhung dieser Marker führen. Allgemein werden Biomarker nach ihrer Bedeutung in verschiedene Gruppen eingeteilt. Prognostische Biomarker führen zu Aussagen über den Krankheitsverlauf oder Heilungschancen. Diagnostische Biomarker erlauben es, die Erkrankung eines Patienten innerhalb einer Auswahl von Krankheiten zu bestimmen. Prädiktive Biomarker zeigen an, wie wahrscheinlich es ist, an einer Krankheit zu erkranken. Dabei können Marker auch mehreren Gruppen zugeordnet werden, da die Übergänge fließend sind. Zur Messung werden molekularbiologische Methoden eingesetzt, wie z. B. Nachweis von DNA-Methylierungen mittels Differentieller Spaltung durch Modifikations-sensitive Restriktionsendonukleasen, Nachweis von Proteinphosphorylierungen mittels 2D-Gelelektrophorese oder Western-Blot, Ermittlung der RNA-Kopienzahl mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder Genexpressionsanalyse (132-134).

In dieser Arbeit wurden die oxidativen Stressmarker für Nukleinsäuren, 8-oxodG und 8-oxoGuo, eingehend untersucht. 8-oxodG und 8-oxoGuo wird großes klinisches Potential bei der Prognose von verschiedenen Krankheiten zugeschrieben, dabei steht vor allem der Nachweis in Urinproben im Vordergrund (135). Neben dem Urin aus diversen Tierversuchen wurden die oxidativen Stressmarker in dieser Arbeit auch direkt in der Zelle nachgewiesen.

Um die verwendeten HPLC-MS/MS-Methoden zum Nachweis der oxidativen Stressmarker 8-oxodG und 8-oxoGuo in Nukleinsäuren zu validieren, wurden Zellen mit zwei verschiedenen Substanzen behandelt, von denen bekannt ist, dass sie oxidativen Stress induzieren. Methylenblau kann nach Lichtaktivierung einerseits durch die Bildung von Singulett-Sauerstoff $^1\text{O}_2$ oder durch eine Ein-Elektronen-Übertragungsreaktion zur Oxidation von Guanin führen (136).

H₂O₂ kann mit zweiwertigen Übergangsmetallionen, wie Eisen (Fe²⁺) oder Kupfer (Cu²⁺), durch die Fenton-Reaktion reagieren und zur Bildung von intrazellulären Hydroxylradikalen OH• führen, welche Guanosin zu 8-oxoGuo oxidieren können (39, 137).

8-oxodG konnte in Zellen nach Angiotensin-II- bzw. Aldosteron-Behandlung mittels der modifizierten HPLC-MS/MS-Methode (3.2.5.9) nach Chao et al. in zellulärer DNA nachgewiesen werden (138). Diese Resultate wurden mit den Messungen von 8-oxodG mittels Formamidopyrimidin-Glykosylase-Comet-Assay (FPG-Comet-Assay) und immunzytochemischer Färbung verglichen und interpretiert. Daneben wurden die Ergebnisse aus dem Nachweis von 8-oxoGuo in der RNA zum weiteren Verständnis herangezogen. Durch den Nachweis von 8-oxodG im Zytosol wurde die Betrachtung auf zellulärer Ebene abgeschlossen. Den Auftakt zur *In-vivo*-Untersuchung des Markers 8-oxodG bildete dessen Nachweis in der DNA der Niere von C57BL/6-Mäusen. Der Nachweis der oxidativen Stressmarker im Urin von Mäusen und Ratten, welche bei der Oxidation der DNA und RNA entstehen, setzte die Untersuchungen fort. Die Interpretation des Nachweises erfolgte im Hinblick auf die Fragestellung des jeweiligen Tierversuchs (3.1.4). Den Abschluss bildete eine Einschätzung, wie belastbar die Messergebnisse der oxidativen Stressmarker sind und welche Untersuchungen folgen könnten.

5.1 Die Etablierung der HPLC-MS/MS-Methoden

Die Methodenentwicklung oder -veränderung ist eine aufwändige Aufgabe. Ziel einer neuen oder veränderten Methode ist es, die vorherigen zu verbessern und dabei stabil und robust zu funktionieren. Für die in dieser Arbeit veränderten HPLC-MS/MS-Methoden zur Messung von oxidativen Stressmarkern in Urin, der DNA und der RNA wurde keine Validierung durchgeführt. Einige Charakteristika wurden bestimmt, wie die Nachweisgrenze, die Spezifität, die Selektivität, die Robustheit, die Linearität und die Variation, um die Genauigkeit und Qualität der Messungen zu überprüfen (139). Die Kriterien für die vollständige Validierung einer Analysemethode wurden von Eurachem[®] in Handbüchern publiziert. Zudem werden in weiteren Publikationen Qualitätsstandards, Akkreditierungskriterien und Fachausdrücke der analytischen Chemie beschrieben (140).

5.1.1 Der Einsatz von internen Standards

Die Verwendung eines internen Standards für HPLC-MS/MS-Methoden ist für die spätere Quantifizierung der Konzentration des gemessenen Moleküls von großer Wichtigkeit. Dabei ist die Verwendung eines isotoopenmarkierten internen Standards die erste Wahl (141). Das isotoopenmarkierte Molekül verhält sich während der Aufarbeitung und Messung so wie das natürlich auftretende Molekül. Dadurch, dass die Menge des isotoopenmarkierten Moleküls in der Probe und Standardreihe bekannt ist, kann mit dem Verhältnis der beiden Peakflächen die Menge des natürlich vorkommenden Moleküls sehr genau bestimmt werden (141, 142). Die Verwendung von isotoopenmarkierten Standards ist jedoch sehr zeit- und kostenintensiv (125, 143). Daher kann auf die Verwendung von nicht isotoopenmarkierten Standards zurückgegriffen werden, wobei diese ähnlich gute Ergebnisse erzielen können. In dieser Arbeit bot sich die Verwendung von 8-Mercapto-7,8-dihydroguanosin als interner Standard für die Urinmessung an, da es 8-oxodG und 8-oxoGuo strukturell sehr ähnelt und eine ähnliche Fragmentierung in der Massenspektrometrie aufweist (125). Durch die Verwendung von internen Standards werden Matrixeffekte und Ionensuppression ausgeglichen; aber die Möglichkeit von Interaktionen der Probenmoleküle muss berücksichtigt werden (144).

5.1.2 Qualität der HPLC-MS/MS-Methode zum Nachweis von 8-oxodG in der DNA

Die in dieser Arbeit verwendete HPLC-MS/MS-Methode zum Nachweis von 8-oxodG aus DNA-Proben basiert auf den Publikationen von Brink et al. und Chao et al. (118, 121). Die 2'-Desoxyguanosin-Konzentration wurde mit einer weiteren HPLC-MS/MS-Methode aus der verdünnten DNA-Probe ermittelt. Die komplette Entfernung des dG diente dazu, einer Oxidation von 2'-Desoxyguanosin zu 8-oxodG während der Ionisation vorzubeugen. Zudem wurden nur die oxidierten Nukleotide detektiert, um eine Sättigung des Massendetektors zu verhindern. Die Robustheit der Methode wurde durch die Aufnahme von Standardreihen an mehreren Messtagen überprüft. Der Variationskoeffizient lag bei 21 % bei einer Standardreihe von 1–66 nM 8-oxodG und erzielte somit eine akzeptable Robustheit (118, 121). Wie akzeptabel die Variation ist, beruht auf den Bedingungen des Assays.

Ein Enzymassay sollte einen Wert von $> 10\%$ erreichen, während *In-vivo*- und zellbasierte Assays eine Variation zwischen 20 und 50 % aufweisen können (145). Die Linearität war durch eine Genauigkeit der Standardreihe von $R^2 = 0,999$ gegeben. Durch die ermittelten Parameter ist sichergestellt, dass die Messung von 8-oxodG mit dieser HPLC-MS/MS-Methode verlässliche Werte liefert.

Die Testversuche mit freier cT-DNA und LLC-PK1-Zellen nach Methylenblau-Behandlung zeigten, dass die HPLC-MS/MS-Methode geeignet ist, konzentrationsabhängige Anstiege von 8-oxodG in der DNA nachzuweisen (128, 136).

5.1.3 Qualität der HPLC-MS/MS-Methode zum Nachweis von 8-oxoGuo in RNA

Die Messung von 8-oxoGuo mittels HPLC-MS/MS basiert auf dem Prinzip der Säulenschaltung (3.2.5.1) und ähnelt der Messung von 8-oxodG nach Chao et al. (121). Die strukturelle Ähnlichkeit von 8-oxodG und 8-oxoGuo ermöglichte es, diese Methode leicht abgewandelt zu nutzen. Dafür wurden lediglich die Einstellungen für das *Multiple reaction monitoring* auf die Messung von 8-oxoGuo und Guanosin umgestellt. Der Gradient der Pumpe 1 wurde so verändert, dass die Trennung von 8-oxoGuo und Guanosin auf der Vortrennsäule optimal ablief. Die Verwendung von [$^{15}\text{N}_5$]-8-oxodG als internen Standard ist nicht die beste Lösung, da 8-oxoGuo und 8-oxodG strukturell Unterschiede aufweisen. Optimal wäre der Einsatz eines isotopenmarkierten 8-oxoGuo als internen Standard für diese Messung, wovon aus Zeit- und Kostengründen abgesehen wurde.

Das ermittelte LOQ lag bei 370 pM in der RNA-Lösung und damit deutlich unter dem Wert für 8-oxodG. Die Genauigkeit der Methode wurde mit einem Variationskoeffizient von 16 % und einer Linearität der Standardreihe von 2-63 nM 8-oxoGuo mit $R^2 = 0,996$ gewährleistet. Die Testversuche mit der RNA aus mit H_2O_2 -behandelten LLC-PK1-Zellen zeigten, dass die HPLC-MS/MS Methode geeignet ist, einen dosis- und zeitabhängigen Anstieg von 8-oxoGuo in der RNA nachzuweisen (146, 147).

5.1.4 Qualität der HPLC-MS/MS-Methode zum Nachweis von oxidativen Stressmarkern im Urin und Zytosol

Die im Urin und Zytosol vorhandenen oxidierten Nukleotide sind ein Hinweis auf oxidativen Stress im Körper (122, 148, 149). Der Nachweis der verschiedenen oxidierten Nukleotide kann aber auch einen Rückschluss auf die DNA-Reparatur, die RNA-Reparatur oder deren Degradation erlauben (150). Die HPLC-MS/MS-Methode von Weimann et al. basiert auf der Verwendung von Ammoniumformiat als Puffersystem für einen konstanten pH-Wert (124). Die ermittelten Standardreihen der oxidativen Stressmarker zeigten eine Linearität von $R^2 = 0,995$ – $0,999$ bei Konzentrationen von 4–250 nM 8-oxodG und 8-oxoGuo sowie 78,1–5000 nM 8-oxoGua. Die Mehrtages-Variation für das System lag bei ca. 20 %. Mit der HPLC-MS/MS-Methode nach Crow et al., die auf organisch-wässrige Eluenten aufbaut, waren die ermittelten Werte für die Linearität, vor allem für 8-oxoGua, deutlich schlechter ($R^2 = 0,995$ mit der Methode nach Weimann et al. nur $R^2 = 0,954$). Das LOD für 8-oxodG konnte bei einer Linearität $R^2 = 0,974$ im Bereich von 4-250 nM 8-oxodG auf 15 pM verbessert werden. Die Linearität, das LOD sowie LOQ von 8-oxoGuo liegen in einem Bereich, der in wissenschaftlichen Publikationen erreicht wird, und erlauben daher den Einsatz beider HPLC-MS/MS-Methoden. Einzig für 8-oxoGua sind die eingesetzten Methoden an beiden Massenspektrometern nicht sehr genau (Linearität von $R^2 = 0,954$ und $0,976$ im Konzentrationsbereich von 78,1–5000 nM mit der Methode nach Crow et al.). Auch die Mehrtages-Variation von ca. 30 % zeigt Schwächen der Methode an. Diese beruhen vor allem auf der Instabilität von 8-oxoGua in wässriger Lösung und der schlechten Ionisierbarkeit des Moleküls (127).

5.1.4.1 Vergleich der Methoden nach Weimann et al. und Crow et al.

Die Ammoniumformiat-HPLC-MS/MS-Methode von Weimann et al. hat den Vorteil einer besseren Linearität und eines stabileren pH-Wertes im Vergleich zur organisch-wässrigen Methode von Crow et al. (124, 125). In der Robustheit, der Nachweisgrenze und der Selektivität unterschieden sich beide Methoden nicht voneinander. Die Vorteile der organisch-wässrigen Methode sind die kürzere Messzeit und die geringere Salzkonzentration im HPLC-System. Da beide Methoden zu keinem

Unterschied in den Ergebnissen führten, wurde im weiteren Verlauf die organisch-wässrige Methode eingesetzt.

5.1.4.2 *Messung von 8-oxodG im Zytosol mittels HPLC-MS/MS*

Der Nachweis von zytosolischem 8-oxodG als Marker für oxidativen Stress wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Die Methode zur Isolierung von Nukleotiden aus dem Zytosol wurde von Bähre und Kaefer übernommen und abgewandelt (123). Die Zellyse in einer organisch-wässrigen Lösung hat das Ziel, die Salzkonzentration für die spätere HPLC-MS/MS-Messung gering zu halten. Hohe Salzkonzentrationen können die Kapillaren der HPLC verstopfen, für Ionensuppression während des Ionisationsprozesses sorgen oder mit den Analyten Komplexe bilden (151, 152). Zur Isolierung und Messung von 8-oxodG und 2'-Desoxyguanosin wurden die lysierten Zellen zentrifugiert und der Überstand bis zur Trockne eingeeengt. Die vorhandenen Tri-, Di- und Monophosphate von 8-oxodG wurden mit alkalischer Phosphatase in 8-oxodG umgewandelt. Obwohl es möglich ist, verschieden phosphorylierte 8-oxodGs zu messen, war es in erster Linie von Bedeutung, ob es zu einem Anstieg von zytosolischem 8-oxodG insgesamt kam (153).

5.2 Vergleich der Nachweismethoden für 8-oxodG

Das 8-oxodG wurde vor mehr als 25 Jahren von zwei unabhängigen Gruppen entdeckt und ist heute als Biomarker für oxidativ geschädigte DNA akzeptiert (154, 155). Die Toxikologie von Partikeln, Auswirkung des Alterns, Effekte von Antioxidantien und Phytochemikalien sowie die Auswirkung von Umweltgiften wurden mit dem Biomarker 8-oxodG untersucht. Zudem wird diskutiert, ob die Bestimmung von 8-oxodG und 8-oxoGua im Urin zur Untersuchung von Krankheitsfortschritten, wie Krebs und Diabetes, genutzt werden kann (156).

Viele Methoden zur genauen Bestimmung von 8-oxodG sind getestet worden, wovon sich drei etabliert haben.

1. Enzymatische Methoden, die mit spezifischen DNA-Reparatur-Enzymen kleine Veränderungen in der Bildungsfrequenz der Läsion feststellen können.
2. Immunzytochemische Methoden mit Antikörpererkennung von 8-oxodG.
3. HPLC-MS/MS-Methoden, welche sehr sensitiv sind und die Möglichkeit bieten, 8-oxodG zu quantifizieren (156).

Im Jahre 2005 stellte das *European Standards Committee on Oxidative DNA Damage* (ESCODD) im Rahmen seiner Versuchsreihe fest, dass die mit HPLC-MS/MS-Methoden ermittelte 8-oxodG-Konzentration im Vergleich zu den Ergebnissen mit dem FPG-Comet-Assay bis zu 10-fach höher war (157). Dabei bewegte sich die Varianz beim FPG-Comet-Assay zwischen 0,15 und 0,55 Molekülen 8 oxodG/10⁶ dG, während die verschiedenen HPLC-Methoden zwischen 0,2 und 6,7 Molekülen 8-oxodG/10⁶ dG variierten. Diese Varianz verhindert eine Vergleichbarkeit von Messungen, die in unterschiedlichen Laboratorien durchgeführt wurden (156). Um die Messergebnisse von 8-oxodG zu interpretieren, ist zu berücksichtigen, ob die Methoden zu einer Über- oder einer Unterbestimmung von 8-oxodG führen können (158).

5.2.1 Der Nachweis von 8-oxodG mittels FPG-Comet-Assay

Mit dem Comet-Assay ist es relativ einfach, dosisabhängige DNA-Schäden nachzuweisen. Die technischen Eigenschaften und die Durchführung sind gut bekannt (159). Der große Nachteil des Comet-Assays ist die schlechte Vergleichbarkeit der Ergebnisse an verschiedenen Tagen oder in unterschiedlichen Laboren. Zudem fehlt bisher ein Standard-Assay-Protokoll sowie ein interner Standard (160). Seit 2010 versucht die *European Comet Assay Validation Group* (ECVAG) die Schwankungen der Ergebnisse aus unterschiedlichen Laboren zu reduzieren und die Methode zu vereinheitlichen (156). Dabei ist zu beachten, dass es große Schwankungen der DNA-Wanderung in verschiedenen Gelen des gleichen Versuchs geben kann. Auch können in einem Gel an verschiedenen Stellen unterschiedliche Eigenschaften für die Wanderung herrschen (156). Eine erste Idee, wie diese Probleme zu lösen sind, war der Einsatz von 5'-Brom-2'-desoxyuridin als Referenzsubstanz in jeder Zelle. Mit einem

Antikörper-Test wird 5'-Brom-2'-desoxyuridin angefärbt und detektiert. Versuchsreihen zeigten eine deutlich verbesserte Vergleichbarkeit von Experimenten intern und extern (161). Ein Vorteil des FPG-Comet-Assays ist das geringe Auftreten einer Folgeoxidation des 8-oxodGs während der Probenvorbereitung. Die Verwendung des FPG-Enzyms zur Detektion von 8-oxodG in der DNA hat den Nachteil, dass das FPG-Enzym nicht spezifisch für 8-oxodG ist. Es erkennt auch Oxidationsprodukte, die aus Ringöffnung von Purinen entstehen sowie Formamidopyrimidine. Zudem besitzt es die Eigenschaft, DNA-Brüche an alkalilabilen Stellen auszulösen (162). Um eine bessere Spezifität zu erreichen, bietet sich der Einsatz vom OGG1-Enzym an, welches nur 8-oxodG und 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin schneidet, wenn diese mit Cytosin verbunden sind (163). Durch die Reaktion mit dem Hydroxylradikal OH^\bullet können Intrastrang-Tandem-Basen-Modifikationen in der DNA gebildet werden, die 8-oxodG enthalten. Diese sind teilweise stabil gegenüber dem FPG- und OGG1-Enzym, was zu einer Unterbestimmung von 8-oxodG führen kann (164).

5.2.2 Der Nachweis von 8-oxodG mittels immunzytochemischen

Methoden

Für die immunzytochemische Färbung von 8-oxodG werden Antikörper verwendet, die spezifisch diese DNA-Läsion erkennen sollen (165). Für die immunzytochemische Färbung von Zellen auf Objektträgern sind die Antikörper 1F7 und N45.1 im Einsatz (166, 167). Der Antikörper 1F7 bindet 8-oxodG, aber mit niedrigerer Affinität auch Guanin, Guanosin und 2'-Desoxyguanosin. Mit 1F7 wurde im ELISA eine höhere Konzentration von 8-oxodG detektiert als mit einer HPLC mit elektrochemischem Detektor (168). Der Antikörper N45.1 reagiert hingegen nicht mit anderen DNA-Basen oder deren Oxidationsprodukten und auch nicht mit Komponenten des Urins. Mit N45.1-ELISA und HPLC mit elektrochemischer Detektion wurden bisher ähnliche Ergebnisse für den Nachweis von 8-oxodG ermittelt (166). Die Vorteile der immunzytochemischen Methode sind die Umgehung der DNA-Isolierung und die Lokalisierung von 8-oxodG in der Zelle. Aufgrund von Kreuzreaktionen, die nicht auszuschließen sind, zeigen sich die Ergebnisse aus immunzytochemischen Färbungen zu unpräzise für eine Quantifizierung (165).

Von dem in dieser Arbeit verwendeten 8-oxodG-Antikörper von SQARIX ist nicht bekannt, ob es sich um 1F7, N45.1 oder einen anderen Antikörper handelt. Die von SQARIX angegebene Literatur zum hier verwendeten Antikörper beschreibt Kreuzreaktionen des Antikörpers mit diversen Komponenten der DNA und RNA (169). Eine Überbestimmung von 8-oxodG ist bei immunzytochemischen Messungen von LLC-PK1-Zellen daher sehr wahrscheinlich.

5.2.3 Der Nachweis von 8-oxodG mittels HPLC-MS/MS

Die sensibelste und spezifischste analytische Methode zum Nachweis von oxidativ gebildeten DNA-Läsionen in der DNA ist die HPLC-MS/MS (170). Neben 8-oxodG können weitere oxidativ gebildete DNA-Basenprodukte gleichzeitig oder einzeln detektiert werden. Die Möglichkeit, für jedes gesuchte Molekül die optimalen Einstellungen für das *Multiple reaction monitoring* zu ermitteln, erlaubt die Detektion von 8-oxodG im femtomolaren Bereich. Um sicherzustellen, dass es sich um das gesuchte Nukleotid handelt, können verschiedene Übergänge von diesem detektiert werden (171). Dafür wird die isolierte DNA enzymatisch hydrolysiert und direkt auf die HPLC-Säule gegeben. Auf der Säule wird das geschädigte Nukleotid von den intakten Nukleotiden getrennt, um eine optimale Quantifizierung zu ermöglichen (124). Unterbleibt diese Trennung, stört die große Menge intakter Nukleotide den Nachweis des geschädigten Nukleotids. Die größten Nachteile der Methode sind die Oxidation von 8-oxodG und 2'-Desoxyguanosin während der Probenaufarbeitung sowie die Oxidation von 2'-Desoxyguanosin während des Ionisierungsprozesses (152, 170). Um den großen Einfluss der Oxidation während der Aufarbeitung zu verstehen, ist zu beachten, dass in normalen Zellen eine geschädigte Base pro 10^6 intakter Basen auftritt (172). Kommt es bei der Aufarbeitung zu einer 0,1%igen Oxidation der DNA, ist dieser Schaden um drei Zehnerpotenzen höher als der natürlich auftretende Schaden in der DNA. Die Aufarbeitung der DNA-Probe hat somit den größten Einfluss auf die mit HPLC-MS/MS detektierte Menge an 8-oxodG (170). Der dritte Nachteil der HPLC-MS/MS sind die teuren Geräte und die Verwendung von isotopenmarkierten Standards für jedes untersuchte Molekül (101).

Mit HPLC-MS/MS-Methoden ist es möglich, nanomolare Konzentrationen oxidativer DNA-Läsionen in biologischen Flüssigkeiten wie Urin zu detektieren (98). Die Messung

von Urinproben besitzt den Vorteil, dass sie, im Vergleich zur Blut- und Gewebeproben, einfach zugänglich sind. Das *European Standards Committee of Urinary Lesion Analysis* (ESCULA) hat das Ziel, die Messungen von 8-oxodG zu validieren und mit einer immunchemischen Methode, dem ELISA, zu vergleichen (149). Da es beim ELISA zur Überbestimmung von 8-oxodG im Urin kommt, aufgrund von Kreuzreaktionen des Antikörpers, zum Beispiel mit Urea, ist hier die HPLC-MS/MS die Methode der ersten Wahl (173).

5.3 Auswirkungen von Angiotensin II und Aldosteron auf die DNA *in vitro*

Die genotoxische Wirkung von erhöhten Konzentrationen der Hormone des RAAS sind von der Arbeitsgruppe Schupp eingehend beschrieben worden (106, 174, 175). Angiotensin II bewirkt eine Vasokonstriktion, reguliert den Blutdruck sowie die Aufrechterhaltung des Elektrolythaushaltes (14). Die Untersuchungen an der isolierten, perfundierten Niere von C57BL/6-Mäusen zeigten, dass der entstehende DNA-Schaden unabhängig von der Vasokonstriktion ist (174). *In vitro* konnten ein Anstieg von DNA-Doppelstrangbrüchen, die Bildung von Mikrokernen sowie mittels FPG-Comet-Assay die Entstehung von oxidativen Läsionen in der DNA festgestellt werden (174). Die Behandlungen wurden vier Stunden oder länger durchgeführt, um die Wirkung einer hohen Angiotensin-II-Konzentration zu simulieren. Die schädlichen Auswirkungen von Angiotensin II konnten durch den Einsatz von Candesartan, einem AT₁R-Blocker, unterbunden werden (176).

Aldosteron spielt eine wichtige Rolle im Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushalt der Zellen und reguliert den Blutdruck. Seine Wirkung entwickelt Aldosteron durch die Bindung an den Mineralokortikoidrezeptor mit anschließender Lokalisierung in den Zellkern (106). Eine erhöhte Konzentration von Aldosteron sorgt neben der genomischen Wirkung auch für nicht genomische Effekte. Queisser et al. detektierten DNA-Schäden und Mikrokern, die dosis- und zeitabhängig entstanden (106). Dabei wurden Konzentrationen von 1–100 nM Aldosteron für 5–240 Minuten eingesetzt. Darüber hinaus konnte ein Anstieg von O₂[•] in den behandelten LLC-PK1-Zellen nachgewiesen werden. Zudem wurden oxidative Läsionen in der DNA mittels FPG-Comet-Assay detektiert. 8-oxodG konnte mittels HPLC-MS/MS-Messung spezifisch nachgewiesen

werden (106). Der Einsatz von Spironolacton als Mineralokortikoidrezeptor-Antagonist und des Antioxidans Tempol konnten die schädlichen Auswirkungen von Aldosteron unterbinden (175).

Der Mechanismus zur Bildung von oxidativen Schäden an der DNA durch Angiotensin II und Aldosteron ist gut untersucht. Die Bindung von Angiotensin II an den AT₁R führt zur Aktivierung von NADPH-Oxidase und zur Bildung von O₂^{•-} (177). Zudem konnten Fazeli et al. zeigen, dass die Bildung von O₂^{•-} durch Angiotensin II *in vitro* von NOX4 abhängig ist (107). Aldosteron bewirkt durch die Bindung an den Mineralokortikoidrezeptor die Aktivierung der NADPH-Oxidase und folgend die Bildung von O₂^{•-} (178). Alle bisherigen Studien zeigten, dass NOX2 durch Aldosteron hochreguliert wird (179). Eine Hochregulierung von NOX4 durch Aldosteron kann angenommen werden, ist bisher aber nicht bestätigt. Die Regulierung der NADPH-Oxidasen ist auf die genomische Wirkung von Aldosteron zurückzuführen (179).

5.3.1 Erhöhte Konzentrationen von Angiotensin II und Aldosteron führen *in vitro* zu DNA-Schäden

Der DNA-Schaden in LLC-PK1-Zellen, ausgelöst durch erhöhte Angiotensin-II-Konzentrationen, wurde nach 24-stündiger Behandlungszeit mittels Comet-Assay und Mikrokerntest detektiert (176). In dieser Arbeit wird gezeigt, dass sich der DNA-Schaden schon nach 15- und 30-minütiger Behandlung mit 200 nM Angiotensin II ausbildete und statistisch signifikant war. Zudem konnte auch eine Dosisabhängigkeit gezeigt werden. Die Bindung von Angiotensin II an seinen Rezeptor, die Aktivierung der NADPH-Oxidase und folgend die Bildung von O₂^{•-} verläuft innerhalb von Minuten. Es konnte auch gezeigt werden, dass der DNA-Schaden, ausgelöst durch Angiotensin II, über die Zeit nicht zunahm, dieses Ergebnis unterscheidet sich von Queisser et al. (27). Es kann mit der DNA-Reparatur erklärt werden oder einer verringerten ROS-Zunahme in den Zellen. Queisser et al. (27) zeigten, dass ein stetiger Anstieg von ROS einen Anstieg des DNA-Schadens in den LLC-PK1-Zellen zur Folge hatte. Schmid et al. zeigten, dass die Reparaturmechanismen den DNA-Schaden in LLC-PK1-Zellen schon 15 Minuten nach dem Entfernen von Angiotensin II aus dem Medium zur Hälfte reduziert hatten (174).

Die Reparatur von DNA-Strangbrüchen ist in den meisten Zellen ein sehr schneller Prozess mit einer Halbwertszeit von wenigen Minuten (180). Es kann angenommen werden, dass eine stärkere DNA-Reparatur in Verbindung mit einem geringeren Anstieg der ROS eine zeitabhängige Zunahme des DNA-Schadens, ausgelöst durch Angiotensin II, verhinderte.

Die Schädigung der DNA durch erhöhte Aldosteron-Konzentrationen konnte bestätigt werden. Im Vergleich zu Queisser et al. wurde jedoch ein leicht höherer DNA-Schaden, gemessen mittels Comet-Assay nach 30-minütiger Behandlung mit 10 nM Aldosteron, ermittelt (106). Dies kann damit begründet werden, dass beim Comet-Assay die Ergebnisse stark voneinander abweichen, wenn sie mit unterschiedlichen Protokollen an verschiedenen Tagen und von anderen Wissenschaftlern durchgeführt wurden (160). Queisser zeigte eine zeitabhängige Zunahme des DNA-Schadens, gemessen mittels Comet-Assay über vier Stunden nach der Behandlung mit 10 nM Aldosteron (130). Im Unterschied dazu wurde in dieser Arbeit ein Anstieg des DNA-Schadens nur innerhalb der ersten 30 Minuten detektiert, welcher dann konstant blieb. Die nicht genomische Wirkung von Aldosteron durch die NADPH-Oxidase verläuft innerhalb von Minuten und führt, wie von Queisser gezeigt, zu signifikantem DNA-Schaden nach 5-minütiger Behandlung (130). Ebenso ist die DNA-Reparatur in wenigen Minuten in der Lage, den DNA-Schaden wieder zu entfernen (180). Das Zusammenspiel von Schädigung der DNA und deren Reparatur spielt bei der Interpretation der beiden unterschiedlichen Ergebnisse eine Rolle. Die individuellen DNA-Reparatur-Kapazitäten haben Auswirkungen, wie schnell und effektiv ein Zellen und Organe einen entstandenen DNA-Schaden entfernen können (158). Es besteht daher die Möglichkeit, dass die von Schweinen isolierten LLC-PK1-Zelllinien in ihrer DNA-Reparatur-Kapazität variieren. In einer Versuchsreihe konnte von Queisser gezeigt werden, dass die DNA-Reparatur schnell aktiviert wurde, aber dann nicht in der Lage war, einen ansteigenden DNA-Schaden zu verhindern (130). Die in dieser Arbeit gemessene Versuchsreihe zeigte hingegen eine langsamere Aktivierung der DNA-Reparatur, die dazu in der Lage war, ein weiteres Ansteigen des DNA-Schadens zu verhindern. Der DNA-Schaden für die Messung nach vierstündiger Behandlung mit 10 nM Aldosteron war in beiden Arbeiten auf gleichem Niveau, welches wahrscheinlich durch unterschiedliche Wege erreicht wurde.

5.3.2 Vergleich der Messmethoden zum Nachweis von 8-oxodG in zellulärer DNA nach Behandlung mit Angiotensin II oder Aldosteron

Der Nachweis von 8-oxodG als Marker für oxidative Schäden in der DNA ist weit verbreitet und etabliert (181). Das 8-oxodG wurde in dieser Arbeit mit drei Methoden nachgewiesen. Die Ergebnisse aus dem FPG-Comet-Assay, einer immunzytochemischen Färbung und der HPLC-MS/MS-Messung werden in den folgenden Abschnitten interpretiert und verglichen.

5.3.2.1 Nachweis von 8-oxodG mit dem FPG-Comet-Assay in zellulärer DNA

Der Comet-Assay ist eine schnelle Methode zum Nachweis von DNA-Schäden in Zellen oder Gewebe (159). Durch den Zusatz des FPG-Enzyms wird dieser spezifischer für oxidative Basenschädigungen in der DNA. Das FPG-Enzym schneidet 8-oxodG aus der DNA, aber auch Formamidopyrimidine und besitzt zudem die Eigenschaft, DNA-Brüche an alkalilabilen Stellen auszulösen (162). Mit dem FPG-Comet-Assay kann daher nicht spezifisch 8-oxodG nachgewiesen werden.

Die dosisabhängigen Versuche mit Angiotensin II und Aldosteron mit LLC-PK1-Zellen für 30 Minuten zeigten einen signifikant höheren DNA-Schaden nach Behandlung mit dem FPG-Enzym als ohne dessen Einsatz. Bei beiden Behandlungen war der entstandene DNA-Schaden nach 15 Minuten signifikant und verblieb die restliche Messzeit auf diesem Niveau. Der dosisabhängige Anstieg von oxidativ geschädigten DNA-Basen zeigt, dass die angewendete Konzentration eine Rolle spielt, während die Zeit anscheinend keine Auswirkung hat. Eine Erklärung ist das Einsetzen der Basenexzisionsreparatur, welche geschädigte Basen innerhalb von Minuten reparieren kann. Schmid et al. zeigten in ihrem Reparaturversuch, dass der Beitrag zum DNA-Schaden durch oxidativ geschädigte Basen schneller zurückgeht als der allgemeine Schaden (174). Es kann daher angenommen werden, dass die Basenreparatur schneller abläuft als die Reparatur von Einzel- oder Doppelstrangbrüchen. Die Basenexzisionsreparatur wird in Abhängigkeit vom oxidativen Stress reguliert.

Die mRNA von OGG1 wird bei oxidativem Stress, ausgelöst durch H₂O₂ oder Methansulfonat, hochreguliert (182). Ebenso wird die mRNA von Neil1 bei Anwesenheit von ROS hochreguliert (183). Die Behandlung mit ionisierender Strahlung bewirkt eine Hochregulierung der Endonukleasen (III und VIII1-3) und OGG1. Diese Enzyme spielen bei der Basenexzisionsreparatur eine Rolle (184). Diese Beobachtungen bestätigen, dass es über die Zeit zu keiner weiteren Zunahme der oxidativen Basenschädigung kommen muss.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse des FPG-Comet-Assays ist zu beachten, dass das FPG-Enzym im eigenen Labor aus Bakterien isoliert wurde. Dabei wurde die Proteinkonzentration der Lösung, welche das FPG-Enzym enthielt, bestimmt. Die Angabe von 2 µg/ml FPG-Enzym bezieht sich nicht auf reines FPG-Enzym, sondern auf die Proteinmischung. Zudem wurde die FPG-Aktivität der Enzymlösung nicht getestet. Zur Überprüfung, ob die eingesetzte Konzentration des FPG-Enzyms alle oxidativ geschädigten DNA-Basen schneidet, wurden verschiedene FPG-Enzym-Konzentrationen getestet. Dafür wurden LLC-PK1-Zellen mit 1,6 mM Methylenblau behandelt und 10 Minuten belichtet. Die niedrigste FPG-Enzym-Konzentration, bei der der prozentuale Anteil der DNA im Schweif nicht mehr zunahm, wurde in den weiteren Versuchen mit Angiotensin II und Aldosteron eingesetzt. Diese Auswahl beruht auf der Annahme, dass bei dieser Konzentration die Enzymreaktion vollständig abläuft und alle FPG-sensitiven Stellen mit dem FPG-Enzym reagiert haben.

5.3.2.2 *Immunzytochemische Färbung von 8-oxodG in zellulärer DNA*

Durch die immunzytochemische Färbung von 8-oxodG in der DNA der Zelle wird die Isolierung der DNA umgangen. Der Nachteil der immunzytochemischen Färbung ist die Kreuzreaktion des Antikörpers. Eine Überbestimmung des DNA-Schadens durch oxidierte DNA-Basen ist daher wahrscheinlich (165).

Die Betrachtung der Ergebnisse der einstündigen Behandlung von LLC-PK1-Zellen mit 10 nM Aldosteron zeigte, dass bereits bei zwei Messungen sehr unterschiedliche Ergebnisse auftreten können. Die Behandlung mit 200 nM Angiotensin II ergab dagegen einen signifikanten Anstieg von 8-oxodG. Im Gegensatz zu den Ergebnissen des FPG-Comet-Assays, dort war der gemessene DNA-Schaden durch oxidierte

Basen konstant, zeigte die immunzytochemische Färbung einen Anstieg von 8-oxodG über die Zeit. Dieser Unterschied im Nachweis von oxidierten Basen mit dem FPG-Comet-Assay und der immunzytochemischen Färbung lässt sich mit der Art der oxidierten Basen erklären.

Erhöhte Konzentrationen von Angiotensin II und Aldosteron führen zur Aktivierung der NADPH-Oxidase. Die NADPH-Oxidase bewirkt die Produktion von $O_2^{\bullet-}$, welches von Superoxid-Dismutase in H_2O_2 umgewandelt wird, welches dann durch die Fenton-Reaktion zum Hydroxylradikal OH^{\bullet} weiterreagiert. Die Reaktion der DNA mit OH^{\bullet} sorgt für die Bildung von 8-oxodG, welches zu 50 % in Intrastrang-Tandem-Basen-Modifikationen gebunden sein kann (164). Dies konnte bisher jedoch nicht in zellulärer DNA gezeigt werden, sondern nur in wässriger DNA-Lösung (185). Im Rahmen der Untersuchungen konnte präsentiert werden, dass OGG1 nicht in der Lage war, die Intrastrang-Tandem-Basen-Modifikationen aus doppelsträngiger DNA zu schneiden (164). Dieser Umstand könnte zu einem weiteren Anstieg des DNA-Schadens führen, der durch die immunzytochemische Färbung detektiert wurde. Die Nukleotidexzisionsreparatur hingegen wäre in der Lage, die Intrastrang-Tandem-Basen-Modifikationen zu entfernen, doch dieser Reparaturmechanismus ist langsamer als die Basenexzisionsreparatur und daher eher nicht in der Lage, den oxidativen Schaden über die Zeit zu reparieren (186). Das FPG-Enzym konnte die Intrastrang-Tandem-Basen-Modifikationen nicht aus der DNA entfernen und daher kam es zu keinem Anstieg des DNA-Schadens im FPG-Comet-Assay. Um diese Annahme zu bestätigen, könnte ein Reparaturversuch durchgeführt werden. Dafür wird der Auslöser des oxidativen Stresses aus dem Medium entfernt und eine bestimmte Zeit gewartet, bevor die Zellen geerntet werden.

Das Auftreten von Kreuzreaktionen des Antikörpers mit weiteren oxidativ geschädigten DNA-Basen ist möglich. Viele verschiedene Reaktionsprodukte der DNA mit ROS sind beschrieben und besitzen ähnliche Strukturen wie 8-oxodG (50). Die immunzytochemische Färbung als Nachweis für 8-oxodG zu benutzen, greift zu kurz. Vielmehr werden, wie beim FPG-Comet-Assay, auch 8-oxodG ähnliche Strukturen detektiert und dies führt zu einer Überbestimmung von 8-oxodG in der untersuchten Zelle. Die immunzytochemische Färbung zeigt an, dass in der DNA oxidativ geschädigte Basen vorhanden sind, die vom Antikörper für 8-oxodG erkannt werden können. Die Färbung zeigt aber auch, dass die Zellen unterschiedlich stark vom

oxidativen Stress betroffen sein können. Queisser et al. zeigten, dass durch erhöhte Gabe von Aldosteron 8-oxodG vor allem in den Zellen der Nierenrinde und dem Nierenmark auftrat, aber nicht in anderen Zelltypen der Niere (187). Für die Untersuchung von Gewebeproben gibt die immunzytochemische Färbung einen Hinweis, welche Zelltypen vom oxidativen Stress betroffen sind und welche nicht. Diese Ergebnisse können dann Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen sein oder Wirkungsmechanismen von Substanzen erklären.

Die weitere Verbesserung der Antikörper-Qualität kann die Kreuzreaktionen nicht vollständig ausschließen, da bisher noch nicht alle möglichen Oxidationsprodukte der DNA analysiert sind. Viele Produkte von oxidativ geschädigten DNA-Basen wurden bisher nur in isolierter DNA detektiert, was die Wahrscheinlichkeit einer Überbestimmung von 8-oxodG erhöht (50, 185).

5.3.2.3 HPLC-MS/MS-Nachweis von 8-oxodG in zellulärer DNA

Im Vergleich mit dem FPG-Comet-Assay und der immunzytochemischen Färbung ist die HPLC-MS/MS-Methode die einzige, die 8-oxodG spezifisch nachweisen kann. Dies gelingt mittels der molekularen Masse und des Fragmentierungsmusters von 8-oxodG. Mit *Multiple reaction monitoring* werden diese Eigenschaften genutzt, um die Moleküle selektiv nachzuweisen (148). In Verknüpfung mit der HPLC gelingt es, die Komponenten der Probe zu trennen und das gewünschte Molekül mit dem Massenspektrometer zu detektieren. Störende Komponenten der Matrix werden bei diesem Prozess entfernt.

Der Nachweis von 8-oxodG in der DNA mit Angiotensin II und Aldosteron behandelten LLC-PK1-Zellen hat den Nachteil der DNA-Isolierung und -Aufarbeitung. Während der Isolierung und enzymatischen Hydrolyse der DNA kann es zur Oxidation dieser kommen. Trotz der Verwendung von Deferoxamin als Chelator für Übergangsmetalle und Natriumiod zum Fällen der DNA, wie vom ESCODD vorgeschlagen, können Oxidationsreaktionen nicht ausgeschlossen werden (172). Zudem können verbliebene Proteine mit der DNA oder den Nukleotiden interagieren.

Ein Einfluss von Oxidationsreaktionen während der Aufarbeitung der DNA kann angenommen werden, da die Messung der Kontrollproben ein Level von 2-3 Molekülen

8-oxodG pro 10^6 dG in der DNA ergab. Ein Normallevel von 8-oxodG in Zellen wird vom ESCODD mit einem 8-oxodG pro 10^6 dG angegeben (172). Nach 30-minütiger Behandlung mit Angiotensin II und Aldosteron war ein geringer Anstieg an 8-oxodG in der DNA nachweisbar. Dies kann durch Einsetzen der Basenexzisionsreparatur erklärt werden. Es besteht die Möglichkeit, dass unterschiedliche Zellsysteme unterschiedlich stark auf ROS reagieren (158). Eine weitere Erklärung wäre die Weiterreaktion von 8-oxoGua zu 5-Guanidinohydantoin (**17**) und Spiroiminodihydantoin (**14**) (45). Der Reaktionsweg zur Bildung von (**17**) und (**14**) ist in Kapitel 1.5.1.3 (Abbildung 11) dargestellt. Der Nachweis der Produkte aus der Oxidation von 8-oxoGua ist theoretisch möglich, wurde bisher aber nicht in zellulärer DNA durchgeführt (188, 189). Die Zunahme an 8-oxodG in der DNA war weder für Angiotensin II, noch für Aldosteron dosisabhängig. Dies könnte damit erklärt werden, dass 8-oxodG nur ein Zwischenprodukt der DNA-Oxidation ist (66). 8-oxodG reagiert entweder weiter zu anderen Oxidationsprodukten oder wird durch Basenexzisionsreparatur aus der DNA entfernt (45, 49). Der Anstieg von 8-oxodG blieb bei allen eingesetzten Dosen von Angiotensin II und Aldosteron konstant. Dies führt zu der Annahme, dass durch eine gesteigerte Bildung von 8-oxodG dessen Oxidation sowie Reparatur wahrscheinlicher wird und so die Menge an 8-oxodG in der DNA konstant bleibt. Zudem ist bekannt, dass durch Basenexzisionsreparatur entferntes 8-oxoGua an H-, K- und N-Ras binden kann und so die Aktivität von OGG1 weiter erhöht wird (190). Dieser Umstand unterstützt die Theorie, dass je mehr 8-oxodG gebildet wird, umso wahrscheinlicher dessen Oxidation und/oder Reparatur ist.

Der zeitabhängige Nachweis bestätigte die Vermutung, dass es zu einer Folgereaktion bzw. zur Reparatur durch die Basenexzisionsreparatur kommt. Die Werte für alle Behandlungen schwankten zwischen zwei und vier 8-oxodG pro 10^6 dG in der DNA. Durch das Stoppen der Reaktion und die Isolierung der DNA wurden die Reaktionen, welche in der Zelle ablaufen, unterbrochen. Die 8-oxodG-Messung gibt einen Einblick, wie es zu diesem Zeitpunkt in der DNA aller ca. 10^7 Millionen ausgesäten LLC-PK1-Zellen aussah. Die Verhältnisse können direkt vor oder nach der Unterbrechung ganz anders ausgesehen haben. Dies lässt sich mit der Messung von 8-oxodG in der DNA nicht nachweisen (100). Zudem ist 8-oxodG kein Endpunkt der Oxidationsreaktion, sondern ein Zwischenprodukt, welches in großer Zahl auftritt und daher als Marker für oxidativen Stress geeignet ist (59).

Mit den Ergebnissen für den 8-oxodG-Nachweis in der DNA nach Behandlung mit Angiotensin II und Aldosteron lässt sich feststellen, dass diese nur einen geringen Einfluss auf die Veränderung von 8-oxodG in der DNA von LLC-PK1-Zellen hatten. Zudem muss beachtet werden, dass in der DNA gebundenes Guanin nicht so leicht oxidiert wird wie freies Guanin (191). Durch die aktivierte NADPH-Oxidase wird O_2^{\bullet} gebildet, welches nicht direkt mit der DNA reagieren kann, sondern erst, wenn es durch die Superoxid-Dismutase und die Fenton-Reaktion in das Hydroxylradikal OH^{\bullet} umgewandelt wurde (192). Das OH^{\bullet} entsteht hauptsächlich im Zytosol und die Wahrscheinlichkeit, dass es die DNA im Zellkern erreicht, ist gering. Eher wird das OH^{\bullet} mit den DNA-Nukleotiden oder anderen Zellkomponenten im Zytosol reagieren (155). Haghdoost et al. haben gezeigt, dass freie Desoxyguanosine und Guanosine schutzlos Angriffen durch das OH^{\bullet} ausgeliefert sind (122). Werden diese Reaktionen hinzugenommen, erweitert sich der Mechanismus für das Entstehen von 8-oxodG um den Schritt des Einbaus von oxidativ geschädigten Basen in die DNA. Dieser nun sehr komplexe Mechanismus lässt sich durch den Nachweis des Zwischenproduktes 8-oxodG nicht aufklären. Es konnte gezeigt werden, dass eine Inhibierung von Enzyme der Basenexzisionsreparatur und des Nukleotidpools einen Anstieg an 8-oxodG in der DNA zur Folge hatte (122, 193). Dies beweist, dass die Menge an 8-oxodG in der DNA von der Reparatur und einem geschädigten Nukleotidpool abhängig ist. Bei der Inhibition von Enzymen der Basenexzisionsreparatur ist jedoch darauf zu achten, dass diese nicht zytotoxisch wirkt, da sonst keine Aussage zur Wirkung von Angiotensin II oder Aldosteron getroffen werden kann.

5.3.3 Der Nachweis von 8-oxoGuo in der RNA nach Behandlung mit Angiotensin II oder Aldosteron

Die oxidative Schädigung der RNA hat zur Folge, dass es zur Blockade der Proteinbiosynthese oder zur Bildung fehlerhafter Proteine kommen kann (81). Bisher ist wenig über den Abbau oder die Reparatur von oxidierte RNA bekannt. Zurzeit werden bekannte Mechanismen untersucht, ob sie eine Rolle spielen könnten bei der Reparatur von oxidierte RNA. Zudem ist bisher kein Reparaturenzym für oxidierte RNA bekannt (194). Der Nachweis von 8-oxoGuo, dem Hauptprodukt in oxidierte RNA (150), gelingt mittels einer HPLC-MS/MS-Methode (3.2.5.9).

Die für die Kontrolle ermittelten Werte schwanken in dieser Arbeit zwischen 0,2 und 0,6 Molekülen 8-oxodG pro 10^5 Guo. In der Literatur finden sich Kontrollwerte, welche auf einem ähnlichen Niveau liegen. Hofer et al. und Gan et al. ermittelten in der RNA aus verschiedenen Organen von Mäusen und Ratten Kontrollwerte von 0,5 Molekülen 8-oxoGuo pro 10^5 Guo. Für HeLa-Zellen hingegen wurde ein Wert von 2,5 Molekülen 8-oxoGuo pro 10^5 Guo ermittelt, allerdings mit einer Messmethode von 1989 (89, 195, 196). Die Messergebnisse in dieser Arbeit wurden mit der Kontrolle nach vier Stunden verglichen, da die Kontrolle nach 30 Minuten nicht im gleichen Probenet gemessen wurde. Der Ausfall beider Massenspektrometer verhinderte die Wiederholung der Messungen mit einem neuen Probenet. Der Einsatz der 4-Stunden-Kontrolle ist nicht optimal, aber unter der Annahme, dass die Gabe von PBS keine Auswirkung auf die Bildung von 8-oxoGuo hat, kann dieser Wert verwendet werden. Zudem zeigten die Kontrollproben mit PBS, welche beim FPG-Comet-Assay, der immunzytochemischen Färbung oder der HPLC-MS/MS-Messung in der DNA zu jedem Zeitpunkt gemessen wurden, keine Veränderung der 8-oxodG-Menge über die Zeit.

Die Behandlungen von LLC-PK1-Zellen mit Angiotensin II und Aldosteron führten zu einem dosisabhängigen Anstieg von 8-oxoGuo pro 10^5 Guo in der RNA. Die oxidative Schädigung der RNA entsteht wahrscheinlich ähnlich wie bei der DNA. Durch die NADPH-Oxidase wird über mehrere Schritte das Hydroxylradikal OH^\bullet gebildet, welches dann mit der RNA reagiert (192). Die Behandlungen zeigten, dass wahrscheinlich ein Gleichgewicht zwischen oxidativem Stress und RNA-Schädigung vorliegt, wie es für die DNA bekannt ist (100). Der durch Angiotensin II und Aldosteron ausgelöste oxidative Stress initiiert eine schnelle Antwort der Zelle gegen die Oxidation der RNA. So wäre zu erklären, dass die Menge an 8-oxoGuo pro 10^5 Guo in der RNA nicht zunimmt bei höheren Konzentrationen.

Beim Zeitversuch offenbarte sich, dass die Aufarbeitung der RNA nicht immer optimal funktioniert hat. Dies zeigte die dreimal so hohe Menge an 8-oxoGuo in der Kontrollprobe nach 15 Minuten im Vergleich zur Messung nach 240 Minuten. Das Auftreten von Oxidationsreaktionen während der Aufarbeitung der RNA ist höchstwahrscheinlich dafür verantwortlich, dass die durch Angiotensin II oder Aldosteron ausgelösten RNA-Schäden überdeckt wurden.

Wird der Verlauf der Menge an 8-oxoGuo pro 10^5 Guo nach Behandlung mit Angiotensin II oder Aldosteron über die Zeit betrachtet, kann ein Trend angenommen werden, der jedoch nicht mit signifikanten Messwerten bestätigt werden konnte.

Die Erklärung eines wahrscheinlichen Verlaufs der Bildung und des Abbaus von 8-oxoGuo bietet sich trotzdem an. Für alle drei möglichen Erklärungen gilt, dass Angiotensin II und Aldosteron durch die NADPH-Oxidase innerhalb von Minuten oxidativen Stress in der Zelle auslösen (106, 129). Die entstehenden ROS reagieren mit der RNA und es entsteht 8-oxoGuo. Eine Abnahme der Menge an 8-oxoGuo pro 10^5 Guo würde sich wie folgt erklären lassen:

1. Eine Verschiebung des Gleichgewichts von RNA-Abbau gegen oxidativen Schaden in Richtung Abbau.
2. Entfernung von 8-oxoGuo aus dem Nukleotidpool und somit kein weiterer Einbau von 8-oxoGuo in die RNA.
3. Oxidationsreaktionen von 8-oxoGuo führen zu Folgeprodukten.

Zu erstens: In dieser Arbeit wurde der Anstieg der Exkretionsrate 8-oxoGuo im Urin von C57BL/6-Mäusen und SD-Ratten gezeigt, welche mit Angiotensin II und Aldosteron behandelt wurden. Dies kann ein Zeichen für eine gesteigerte Degradierung der RNA sein. Der Abbau der RNA ist Aufgabe der Polynukleotid-Phosphorylase. Das Enzym ist Teil des Degradosoms für die RNA, wobei es mit höherer Affinität an oxidierte RNA bindet. Ein Verlust des Polynukleotid-Phosphorylase bewirkt einen Anstieg an 8-oxoGuo in der RNA von *E.coli* (89). Ebenfalls kann das YB-1-Protein spezifisch 8-oxoGuo in der RNA erkennen und binden. Die oxidierte RNA wird so von intakter RNA getrennt und dem Abbau zugeführt (88). Bisher ist wenig über diese Mechanismen bekannt, die zum Abbau oxidierter RNA führen. Eine Untersuchung der Genexpression oder Aktivität der involvierten Enzyme bietet sich daher an. Eine RNA-Reparatur hingegen ist bisher nicht bekannt (81).

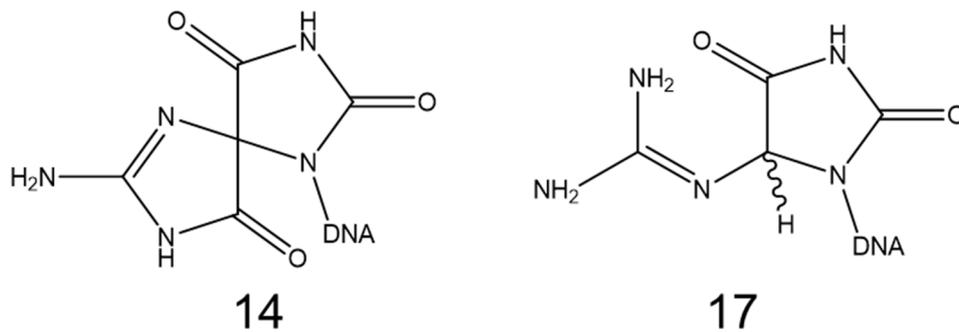
Zu zweitens: Die Entfernung von 8-oxoGuo aus dem Nukleotidpool ist in *E.coli* gut untersucht. Sekiguchi et al. zeigten, dass das MutT-Protein, eine Nukleosidtriphosphatase (NUDT) und das bakterielle Homolog zum NUDT1-Protein, innerhalb von 30 Minuten eine bestimmte Menge an 8-oxoGTP selektiv in 8-oxoGMP umwandelt (92). Für NUDT1, NUDT15 und NUDT18 zeigten Takagi et al., dass diese Enzyme selektiv und innerhalb von 15 Minuten 8-oxodGTP oder 8-oxodGDP in

8-oxoGMP umwandeln können (197). Beide Untersuchungen fanden in zellfreien Systemen statt. Eine erhöhte Aktivität oder Genexpression der beteiligten Enzyme NUDT1, NUDT5, NUDT15 und NUDT18 könnte durch PCR oder Western-Blot nachgewiesen werden. Eine HPLC-MS/MS-Messung von 8-oxoGTP, 8-oxoGDP und 8-oxoGMP im Zytosol würde Hinweise auf die Entfernung von 8-oxoGuo aus dem Nukleotidpool geben können.

Zu drittens: Bisher sind keine Produkte aus einer Reaktion von 8-oxoGuo mit ROS bekannt. Es ist aber anzunehmen, dass sich 8-oxoGuo aufgrund der Struktur ähnlich wie 8-oxodG verhält. Daher ist es durchaus möglich, dass 8-oxoGuo mit ROS reagiert und so die nachgewiesene Menge in der RNA mit der Zeit abnehmen kann. Am wahrscheinlichsten ist, dass eine Kombination aller drei Erklärungen den zeitlichen Trend der Bildung und des Abbaus von 8-oxoGuo in der RNA beschreiben kann.

5.3.4 Der Nachweis von 8-oxodG in Nierenzellen von C57BL/6-Mäusen

Bei der Isolierung der DNA aus dem Nierengewebe sowie deren Aufarbeitung kann es zu Folgeoxidationen kommen, die den Nachweis von 8-oxodG erschweren (181). Der Nachweis von 8-oxodG mittels HPLC-MS/MS-Messung ergab für die Kontrollgruppe leicht erhöhte Werte von zwei Molekülen 8-oxodG pro 10^6 dG in der DNA. Der Normallevel von 8-oxodG in der DNA wird mit einem 8-oxodG pro 10^6 dG angenommen (170, 172), die in dieser Arbeit ermittelten höheren Werte können durch die Folgeoxidation während der Probenaufarbeitung erklärt werden. Die Behandlung mit Angiotensin II führte zu einem leichten Anstieg von 8-oxodG im Vergleich zur Kontrolle. Wird 8-oxodG nicht durch Basenexzisionsreparatur oder andere Reparaturmechanismen aus der DNA entfernt, kann es zu Punktmutationen kommen (198). Am häufigsten ist dabei die Umwandlung von G→T bei der Replikation der DNA. Dies wurde in *E.coli* und COS7-Zellen beobachtet (199, 200). Bei einer Mutationsfrequenz von bis zu 5 % ist 8-oxodG nicht so mutagen wie seine möglichen Oxidationsprodukte (201). Durch Weiteroxidation von 8-oxodG können Spiroiminodihydantoin (**14**) und 5-Guanidinohydantoin (**17**) in der DNA entstehen (Abbildung 45), welche in *E.coli* eine Mutationsfrequenz von 100 % für G→T- und G→C-Mutationen aufweisen (202).

**Abbildung 45**

Strukturen von DNA-Läsionen, die sich nach der Oxidation von 8-oxoGua hauptsächlich in der DNA bilden können (46).

Auf der anderen Seite erkennen die DNA-Polymerasen meist die weiteroxidierte Base und sorgen für einen Abbruch der Replikation. In *E.coli* wird Sp mit einer Wahrscheinlichkeit von 10-20 % abgelesen, während Gh beim Ablesen von 5'-G-Guanin-A-3' mit einer Wahrscheinlichkeit von 80 % abgelesen wird. 8-oxodG wird hingegen mit 90%iger Wahrscheinlichkeit abgelesen (198). Bei einem Anstieg von 8-oxodG kommt es folglich auch zu einer Zunahme von weiteroxidierten Produkten, da die Oxidation von 8-oxodG wahrscheinlicher ist als die von 2'-Desoxyguanosin (66). Daher kann angenommen werden, dass Angiotensin II durch die gezeigte nicht signifikante Zunahme von 8-oxodG in der DNA mutagene Wirkung besitzt.

Um die Wirkung von Angiotensin II zu unterbinden, wurde bei den C57BL/6-Mäusen eine Intervention mit Candesartan, welches die Bindung von Angiotensin II an den AT₁R inhibiert (32), durchgeführt. Das Candesartan senkte den Blutdruck der Mäuse auf Kontrollniveau und verringerte den DNA-Schaden, gemessen mit dem Comet-Assay, und die ROS-Produktion in der Niere nicht signifikant (111). Der HPLC-MS/MS-Nachweis von 8-oxodG bestätigt diese Ergebnisse. Eplerenon ist ein Antagonist des Mineralokortikoidrezeptors und verhindert die Bindung von Aldosteron an diesen (32). Eine Intervention mit Eplerenon sollte die Wirkung von Aldosteron blockieren, welches durch die erhöhte Plasmakonzentrationen von Angiotensin II ausgeschüttet wird (203, 204). Es konnten keine Verringerung des Blutdrucks sowie eine Abnahme des DNA-Schadens und der ROS-Produktion detektiert werden (111). Im Gegensatz dazu steht die Verringerung der Menge an 8-oxodG in der DNA in der Angiotensin II/Eplerenon-Gruppe. Die histopathologische Untersuchung in der Niere der Angiotensin II/Eplerenon-Gruppe zeigten eine starke Schädigung der Glomeruli,

während das Tubulussystem der Niere nicht geschädigt war (111). Dies könnte die verringerte Menge an 8-oxodG in der Nierenzell-DNA erklären, da zur HPLC-MS/MS-Messung ein Teil der Niere (ca. 100 mg) homogenisiert wird. Durch diesen Schritt kommt es zu einer Verdünnung von 8-oxodG, da oxidativ geschädigte und nicht geschädigte Nierenzellen vermischt werden. Tempol ist ein Antioxidans und besitzt eine ähnliche Wirkung wie die Superoxid-Dismutase. Zusätzlich besitzt es weitere antioxidative Kapazitäten und kann mit dem Hydroxylradikal OH^\bullet reagieren (205). Tempol konnte den erhöhten Blutdruck in den C57BL/6-Mäusen nicht senken. Der DNA-Schaden sowie die Produktion von ROS wurde verringert (111). Die HPLC-MS/MS-Messung von 8-oxodG in der Nierenzell-DNA bestätigte diese Ergebnisse. Die antioxidative Wirkung von Tempol wurde bestätigt. Der HPLC-MS/MS-Nachweis von 8-oxodG in der Nierenzell-DNA bestätigte die Ergebnisse aus dem Comet-Assay und der Messung von ROS in der Niere der C57BL/6-Mäuse (111). Da dieser Nachweis sehr aufwändig und kostenintensiv ist und der Erkenntnisgewinn eher gering war, ist die Methode zum Nachweis von oxidativem Stress in Organen nicht zu empfehlen.

5.4 Der Nachweis von geschädigten Nukleotiden in biologischen Flüssigkeiten

Die DNA gilt in der histonengebundenen Form im Zellkern als gut geschützt vor ROS-Angriffen (155). Durch den Einbau von oxidierten Nukleotiden in die DNA ist eine Schädigung dieser jedoch möglich (122). Die Messung von zytosolischen Nukleotiden ist mittels HPLC-MS/MS möglich und zeigt, wie geschädigt der Nukleotidpool durch die Behandlung mit Angiotensin II und Aldosteron ist (123, 206). Der Nachweis von 8-oxodG und anderen oxidativen Stressmarkern im Urin gilt als Beweis für das Vorhandensein von oxidativem Stress im untersuchten Individuum (98, 207). Dabei ist im Unterschied zum Zytosol zu beachten, dass die im Urin nachgewiesenen Nukleotide nicht mehr für Punktmutationen in der DNA in Frage kommen (198).

5.4.1 Der Nachweis von 8-oxodG im Zytosol

In Ratten wurden 1:20.000 8-oxoGuo/Guanosin im Zytosol gemessen, was einer 15-fach höheren Oxidationsrate entspricht als in der RNA. Zudem ist zu beachten, dass der Anteil von Guanin im Nukleotidpool gering ist im Vergleich zur RNA und DNA. Dies führt zu einer hohen Oxidationsrate im Pool sowie zu gesteigerten Einbauraten geschädigter Nukleotide in die RNA oder DNA (100). Die Einbauraten steigen an, weil die DNA-Polymerasen γ , η und ζ nicht zwischen oxidativ geschädigten und nicht geschädigten Nukleotiden unterscheiden können (94, 208). Beim HPLC-MS/MS-Nachweis von 8-oxodG in den Zytosolproben ist zu beachten, dass es, wie bei der DNA-Isolierung, zu Oxidationsreaktionen während der Probenaufarbeitung kommen kann. Daher wurde Deferoxamin als Chelator für Übergangsmetalle eingesetzt, um so das Auftreten von Oxidationen zu minimieren (172).

Die HPLC-MS/MS-Messungen gaben die erhöhte Oxidationsrate der freien Nukleotide im Vergleich zur DNA wider. Im Zytosol wurde für die Kontrollprobe eine 7000-fach größere Menge an 8-oxodG nachgewiesen als in der DNA. Der Einfluss von Angiotensin II und Aldosteron auf die Konzentration an oxidierten Desoxyguanosinen war hingegen gering. Es kam zu keinem Messzeitpunkt zu einer Zunahme der Menge an 8-oxodG im Zytosol. Der Nachweis eines Übergangsproduktes führte nicht dazu, den Anstieg der oxidativen Schädigung im Nukleotidpool nachzuweisen. Dies hat mehrere Gründe: Erstens werden die oxidierten Desoxyguanosine entweder in die DNA eingebaut (94) oder durch Enzyme aus der Zelle entfernt. Dabei sorgen die Nukleosidtriphosphatasen NUDT1 und NUDT15 für einen Abbau von 8-oxo-2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat zum 8-oxo-2'-Desoxyguanosin-5'-monophosphat und NUDT15 und NUDT18 für den Abbau von 8-oxo-2-Desoxyguanosin-5'-diphosphat zu 8-oxo-2'-Desoxyguanosin-5'-monophosphat (197). Die Bildung von 8-oxo-2'-Desoxyguanosin-5'-monophosphat ist entscheidend, da es nicht von der Guanylat-Kinase erkannt und so aus dem Nukleotidpool entfernt wird (92). Einige Nukleotidasen sorgen für den Abbau von 8-oxo-2'-Desoxyguanosin-5'-monophosphat zu 8-oxodG, welches dann die Zelle verlassen kann (194, 209). Zweitens zeigten Boldogh et al., dass 8-oxoGua im Zytosol an OGG1 binden kann und einen Signalweg in Gang setzt, an deren Ende die Verhinderung des Einbaus von 8-oxodG in die DNA steht (190).

Der Nachweis von 8-oxodG im Zytosol lässt die Annahme zu, dass die oxidative Schädigung und Reparatur der DNA sowie Einbau und Entfernung oxidierter Nukleotide aus dem Pool im Gleichgewicht zueinander stehen. Es kommt daher, trotz des Anstieges des oxidativen Stresses, nicht zu einer Zunahme an 8-oxodG im Zytosol. Interessant wäre der Nachweis der Tri-, Di- und Monophosphate von 8 oxodG zu verschiedenen Zeitpunkten der Behandlung, um den Mechanismus zur Entfernung des schädlichen 8-oxodG besser verstehen zu können.

5.4.2 Der Nachweis von oxidativen Stressmarkern im Urin

Vielfach wird die Messung von oxidativ geschädigten Nukleotiden im Urin als Marker für oxidativen Stress im Individuum angesehen. Zudem ist der Nachweis der drei Hauptprodukte aus der Oxidation von Guanin und Guanosin weit verbreitet (100). Der Nachweis von 8-oxoGua ist nicht belastbar, wie die Messung aus dem Urin des Interventionsversuchs gegen Angiotensin II (4.5.2) zeigte. Die beiden übrigen oxidierten Nukleotide, 8-oxodG und 8-oxoGuo, werden aufgrund ihrer Nachweisbarkeit im Urin und als Marker für oxidativen Stress verwendet (100). Dabei ist zu beachten, dass die gemessene Konzentration der oxidierten Nukleotide auf das Volumen des 24-h-Urins bezogen werden sollte. So kann eine kurzfristige Veränderung der Bedingungen im Körper, zum Beispiel erhöhter Stress oder erhöhte DNA-Reparatur, ausgeschlossen werden. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Versuchen erhielten die Tiere unterschiedliche Medikamente und Hormone. Während der Behandlung stellte sich über die Zeit ein Gleichgewicht zwischen oxidativem Stress und DNA-Reparatur sowie RNA-Abbau ein. Der Nachweis des oxidativen Stresses ist daher unabhängig von der DNA-Reparatur und dem RNA-Abbau möglich (100). Der Einfluss von Nahrungsaufnahme und Zelltod auf die Exkretionsrate der oxidierten Nukleotide konnte durch verschiedene Untersuchungen weitestgehend ausgeschlossen werden (156). Die Messung der drei oxidierten Nukleotide ist sinnvoll, da sie unterschiedliche Reparaturmechanismen in der Zelle wiedergeben. 8-oxoGua ist das Produkt der Basenexzisionsreparatur. 8-oxodG ist das Produkt der Nukleotidexzisionsreparatur oder der Oxidation von freiem 8-Oxo-2'-desoxyguanosin (98). 8-oxoGuo entsteht durch Oxidation von Guanosin und durch den Abbau von oxidativ geschädigter RNA (210).

5.4.2.1 *Der Nachweis der oxidativen Stressmarker im Urin von C57BL/6-Mäusen*

Ein Vergleich der drei Versuche (3.1.4.1, 3.1.4.2 und 3.1.4.3) mit C57BL/6-Mäusen zeigte, dass die gemessenen Exkretionsraten der Stressmarker voneinander abweichen. Es unterschieden sich die Exkretionsraten von 8-oxodG in den Kontrollgruppen um das Zehnfache. Eine Erklärung dafür ist, dass die jeweiligen C57BL/6-Mäuse unterschiedlich stark auf die Behandlung reagiert haben (211). Dies lässt sich auch an den unterschiedlich großen Urinvolumen in den einzelnen Tierversuchen zeigen.

Der Interventionsversuch gegen Angiotensin II in C57BL/6-Mäusen zeigte einen Anstieg der Exkretionsraten für 8-oxodG und 8-oxoGuo im Urin nach 28-tägiger Behandlung mit Angiotensin II. Der Anstieg der Exkretionsrate war statistisch signifikant gegenüber der Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse zeigten, dass die DNA, RNA und der Nukleotidpool durch ROS oxidiert wurden. Diese Schädigung verläuft durch die Aktivierung der NADPH-Oxidase, ausgelöst durch die Bindung von Angiotensin II an den AT₁R und den folgenden Signalweg. Candésartan konnte den durch Angiotensin II ausgelösten DNA-Schaden sowie die Produktion von ROS durch die Inhibierung des AT₁R unterbinden (111). Als Folge davon fiel die Exkretionsrate der Stressmarker auf das Kontrollniveau. Dies beweist, dass die Hauptwirkung von Angiotensin II durch die Bindung an seinen Rezeptor ausgelöst wird. Eplerenon, ein Inhibitor des Mineralokortikoidrezeptors, sollte die Wirkung von Aldosteron unterbinden, welches durch erhöhte Angiotensin-II-Konzentrationen im Plasma ausgeschüttet wird. Eplerenon war nicht in der Lage, die durch Angiotensin II ausgelösten DNA-Schäden und die ROS-Produktion in der Niere zu unterbinden (111). Eine Interaktion von Angiotensin II und Aldosteron, mit ihrem jeweiligen Rezeptor, ist bekannt und in einem Übersichtsartikel beschrieben (212). Die Verhinderung des oxidativen Stresses, ausgelöst durch Aldosteron, durch die Blockade des Mineralokortikoidrezeptors mit Eplerenon könnte das leichte Absinken der Exkretionsrate erklären. Dagegen sprechen die nachgewiesenen DNA-Schäden und die erhöhte ROS-Produktion in der Niere (111). Ein weiterer Erklärungsansatz wäre die Untersuchung des Ausmaßes der Zellschädigung in der Niere.

Aldosteron löst deutliche Schäden im Tubulussystem sowie in den Glomeruli von Rattennieren aus (187), während in den Eplerenon/Angiotensin-II-Tieren nur eine Schädigung der Glomeruli histopathologisch nachgewiesen wurde (111). Die Gabe von Eplerenon könnte die Schädigung des Tubulussystems verhindern und als Folge davon kommt es zu einer leicht geringeren Exkretion der oxidativen Stressmarker. Tempol wirkt als Antioxidans und sollte das durch die aktivierte NADPH-Oxidase gebildete $O_2^{\bullet-}$ zu H_2O_2 neutralisieren. Zudem kann Tempol mit dem Hydroxylradikal OH^{\bullet} reagieren (205). Der Nachweis von ROS in der Niere zeigte, dass Tempol diese verringern konnte. Zudem senkte es deutlich den DNA-Schaden, detektiert mit dem Comet-Assay. Auch wurde die Aktivität der DNA-Reparatur, gemessen mit einer Färbung von Poly-ADP-Ribose, deutlich gesenkt (111). Abweichend davon war die Exkretionsrate der oxidativen Stressmarker auf dem Niveau der Angiotensin-II-Gruppe. Eine mögliche Erklärung für die hohe Exkretionsrate wäre eine Schädigung der Glomeruli in der Niere, welche festgestellt wurde (111). In den Glomeruli wird das Blut gefiltert und der Harn gebildet (213). Durch den erhöhten oxidativen Stress in den Glomeruli könnten die dort gebildeten oxidativen Stressmarker sofort in den Harn gelangen und die Exkretionsrate erhöhen, während der Anteil von oxidativen Stressmarkern aus dem übrigen Körper durch den Einsatz von Tempol gering bleibt. In der Angiotensin-II- und Eplerenon/Angiotensin-II-Gruppe treten ebenfalls Schäden in den Glomeruli auf, bei einer ähnlich hohen Exkretionsrate der oxidativen Stressmarker. Treten hingegen keine Schäden in den Glomeruli auf, wie in der Kontroll- und Candesartan/Angiotensin-II-Gruppe, ist auch die Exkretionsrate der oxidativen Stressmarker niedriger. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um zu bestimmen, ob die Schädigung der Glomeruli einen großen Einfluss auf die Bildung von oxidativen Stressmarkern im Urin besitzt, wenn die Niere gezielt von oxidativem Stress betroffen ist.

Im Tierversuch zur Untersuchung der Mutation des AT_{1a} -Gens zeigten die Exkretionsraten von 8-oxodG und 8-oxoGuo nach Behandlung mit Angiotensin II und der Intervention mit Candesartan einen ähnlichen Trend wie beim Interventionsversuch. Zudem ergaben auch andere Untersuchungen eine geringere Ausprägungen der DNA-Schädigung als im Interventionsversuch (112). Diese Abweichungen sind der Schwierigkeit der Wiederholbarkeit eines Tierversuchs geschuldet (211).

C57BL/6-Mäuse besitzen neben dem Gen für AT_{1a} auch das Gen für AT_{1b} (18). Die Mutation des AT_{1a} -Gens sollte zeigen, ob es zu einer Verminderung des oxidativen Stresses und den damit verbundenen Schäden in der C57BL/6-Maus kommt. Die AT_{1a} -KO-K-Gruppe zeigte eine höhere Exkretionsrate von 8-oxodG und 8-oxoGuo im Vergleich zur AT_{1a} -WT-Gruppe. Zhu et al. zeigten, dass die Mutation des Gens AT_{1a} einen Einfluss auf die durch Kalziumionen ausgelösten Signalwege in der Maus hat. Die Menge an intrazellulären Kalziumionen ist in den glatten Muskelzellen der Mäuse mit dem mutierten AT_{1a} -Gen höher als im Wildtyp (214). Diese Auswirkung in den AT_{1a} -KO-Mäusen könnte einen höheren oxidativen Stress auslösen und einen Anstieg der Exkretionsraten von 8-oxodG und 8-oxoGuo erklären. Im Vergleich zur AT_{1a} -KO-K-Gruppe stieg die Exkretionsrate von 8-oxodG und 8-oxoGuo nach Gabe von Angiotensin II an. Ryan et al. zeigten, dass der oxidative Stress, ausgelöst durch Angiotensin II, durch eine Mutation des AT_{1a} -Gens nicht reduziert werden konnte (215). Es kann daher angenommen werden, dass Angiotensin II an den vom Gen AT_{1b} gebildeten Rezeptor bindet und der oxidative Stress durch die NADPH-Oxidase ausgelöst wird. Die Mutation des AT_{1a} -Gens kann die oxidative Schädigung, ausgelöst durch Angiotensin II, in der Maus nicht unterbinden. Grund dafür ist das AT_{1b} -Gen, welches für die Bildung des AT_1R verantwortlich ist. Es kann angenommen werden, dass im Menschen eine Mutation des AT_1 -Gens die Wirkung von Angiotensin II unterbindet, da im humanen Genom keine Kopie des Gens bekannt ist. Der Abbau von Angiotensin II würde durch alternative Stoffwechselwege ablaufen, was zur Bildung von Angiotensin-(1-7) oder Angiotensin IV führt (216). Die Auswirkungen dieser Veränderung sind noch nicht abschließend untersucht, aber erste Untersuchungen des Angiotensin-(1-7)-Signalweges zeigten positive Ansätze für die Therapie von Hypertonie und Nierenkrankheiten (217).

Der Knockout des $NOX4$ -Gens in C57BL/6-Mäusen hatte eine geringe Auswirkung auf die Exkretionsraten der oxidativen Stressmarker. In $NOX4$ -WT- und $NOX4$ -KO-Mäusen war die Exkretionsrate von 8-oxodG und 8-oxoGuo nach Behandlung mit Angiotensin II gegenüber der jeweiligen Kontrolle erhöht. Neben $NOX4$, welches hauptsächlich in der Niere vorkommt, werden auch $NOX1$ und $NOX2$ dort exprimiert (38). Die Expression von $NOX1$, $NOX2$ und $NOX4$ ist bei oxidativem Stress erhöht (218). Angiotensin II löst im Herzen eine erhöhte ROS-Produktion aus (219).

Dies könnte mit der gesteigerten Aktivität von NOX1 im kardiovaskulären System zusammenhängen (220). Durch den Knockout von NOX4 kam es daher zu keiner Verminderung des oxidativen Stresses im Körper der Maus. Es kann angenommen werden, dass die Bildung der ROS vermehrt durch NOX1 und NOX2 erfolgte. Daher veränderten sich die Exkretionsraten der oxidativen Stressmarker in der KO-Gruppe nicht im Vergleich zur WT-Gruppe. Eine höhere Expression von NOX1 und NOX2 in Herz und Niere müsste durch einen Nachweis der Proteine im Western-Blot oder der mRNA mittels PCR geführt werden. Der Vergleich der Exkretionsraten von 8-oxodG und 8-oxoGuo zeigte, dass die RNA ca. fünfmal stärker oxidiert war als die DNA. Die RNA liegt als Einzelstrang vor und kann daher leichter oxidiert werden als die DNA (150). Das Verhältnis wird nicht durch erhöhten oxidativen Stress verändert. Dies ist nicht überraschend, da eine größere Menge ROS zwar die Oxidation der DNA und RNA erhöht, aber in gleichem Maße.

5.4.2.2 *Der Nachweis der oxidativen Stressmarker im Urin von SD-Ratten*

Die Aldosteron-Behandlung von SD-Ratten sorgte für die Ausbildung einer Hypertonie in den Tieren. Zudem wurden ein erhöhter DNA-Schaden und eine gesteigerte ROS-Produktion in der Niere nachgewiesen (187). Diese Ergebnisse wurden durch den Anstieg der Exkretionsraten von 8-oxoGua und 8-oxoGuo in der Aldosteron-Gruppe bestätigt. Die Exkretionsrate von 8-oxodG hingegen stieg im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht an. Aldosteron wirkt, im Gegensatz zum Angiotensin II, gezielt in distalen Tubuluszellen der Niere (221). Aber Queisser et al. zeigten, dass auch die Leber nach der Behandlung mit Aldosteron oxidativ geschädigt ist (222). 8-oxodG entsteht durch die Reparatur der DNA mit der Nukleotidexzisionsreparatur und durch die Oxidation des Nukleotidpools. Eine Erklärung für die gleichbleibende Exkretionsrate von 8-oxodG kann entweder eine nicht hochregulierte Nukleotidexzisionsreparatur oder ausbleibender oxidativer Stress sein. Da ein Anstieg des oxidativen Stresses mit anderen Methoden bewiesen wurde (187), ist es wahrscheinlicher, dass die Nukleotidexzisionsreparatur nicht hochreguliert war. Der leichte Anstieg der Exkretionsrate von 8-oxoGua zeigte, dass die Basenexzisionsreparatur wahrscheinlich hochreguliert wurde. Zur Prüfung dieser

Annahmen könnten die Expressionen von Nukleotidexzisionsreparatur- und Basenexzisionsreparatur-Enzymen mittels PCR oder Western-Blot untersucht werden. Die deutlich erhöhte Exkretionsrate von 8-oxoGuo kann mit der leichteren Oxidation der RNA erklärt werden.

Aldosteron reagiert im Zytosol mit dem Mineralokortikoidrezeptor und löst die Entstehung von ROS aus. Die Reaktion der ROS mit der RNA und den freien Nukleotiden ist daher wahrscheinlicher als die Reaktion mit der DNA im Zellkern (30). Neben der kurzen Halbwertszeit der ROS (z. B. Hydroxylradikal $\text{OH}^\bullet = 1 \mu\text{s}$) im Zytosol ist die DNA zudem durch die Zellkernmembran, Histone und die stabile Doppelstrangstruktur geschützt (150, 223, 224). Spironolacton führt durch die Inhibition des Mineralokortikoidrezeptors zu einer Unterbindung des durch Aldosteron ausgelösten oxidativen Stresses und des DNA-Schadens. Der Einsatz in subtherapeutischer Dosis wies darauf hin, dass der oxidative Stress unabhängig vom erhöhten Blutdruck ist (187). Diese Ergebnisse wurden durch die niedrigeren Exkretionsraten von 8-oxodGuo und 8-oxodG bestätigt. Auf die Exkretionsrate von 8-oxoGua hatte Spironolacton wenig Einfluss. Durch die Blockade von Progesteron- oder Androgen-Rezeptoren durch Spironolacton könnten Signalwege ausgelöst werden, die für eine erhöhte Basenexzisionsreparatur-Kapazität sorgen. Somjen et al. postulierten einen komplexen Mechanismus zwischen Androgen, dessen Inhibition und den Auswirkungen auf die DNA-Synthese in vaskulären glatten Muskelzellen (225). Eine Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen der Inhibition von Steroid-Rezeptoren und der Basenexzisionsreparatur-Kapazität wurde bisher nicht durchgeführt. Käme es durch die Inhibition zu einer erhöhten BER-Kapazität, hätte dies zur Folge, dass die Exkretionsrate von 8-oxoGua nicht sinkt. Die Annahme einer erhöhten Basenexzisionsreparatur-Kapazität könnte mit dem Nachweis einer erhöhten Expression und Aktivität von Basenexzisionsreparatur-Enzymen bestätigt werden.

Sulforaphan gehört zur Gruppe der Isothiocyanaten und kann aus Brokkoli isoliert werden (226). Es beeinflusst die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 und kann als Antioxidans wirken (227, 228). Die Exkretionsrate von 8-oxodG stieg nach Behandlung mit Sulforaphan im Vergleich zur Kontrollgruppe an, während sich die Exkretionsraten für 8-oxoGua und 8-oxoGuo nicht veränderten. Dies könnte mit der Wirkweise von Sulforaphan erklärt werden. Sulforaphan aktiviert einen Nrf2-Signalweg, der als Regulator der Zytoprotektion wirkt (228). Piberger et al.

zeigten, dass die Aktivität vom Xeroderma Pigmentosum A-Protein, ein Enzym der Nukleotidexzisionsreparatur, durch Sulforaphan beeinflusst wird (229). Eine erhöhte Aktivität der Nukleotidexzisionsreparatur, ausgelöst durch Sulforaphan, könnte eine gesteigerte Exkretionsrate von 8-oxodG erklären. Ob es zu einer erhöhten Nukleotidexzisionsreparatur-Aktivität kommt, müsste mit dem Nachweis einer erhöhten Expression und Aktivität von Enzymen der Nukleotidexzisionsreparatur bestätigt werden. Queisser et al. zeigten, dass die Gabe von Sulforaphan die Aktivität von Nrf2 erhöhte und die Niere so vor oxidativen Schäden durch Aldosteron schützte (113). Dies konnte durch die niedrigen Exkretionsraten der oxidativen Stressmarker in der Sulforaphan/Aldosteron-Gruppe bestätigt werden.

Ein Vergleich der Exkretionsraten von 8-oxodG und 8-oxoGuo zeigt, dass die Exkretionsrate von 8-oxoGuo höher als die von 8-oxodG ist. Dies beweist, dass eine Oxidation der RNA wahrscheinlicher ist als die der DNA (150). Keine Interpretationshilfe liefert das Verhältnis bei der Begründung für Anstieg oder Abfall der Exkretionsraten. Die Exkretionsraten hängen dabei nicht nur vom oxidativen Stress ab, sondern können auch durch Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen beeinflusst werden (100).

5.5 Möglichkeiten und Belastbarkeit des Nachweises der oxidativen Stressmarker

Bei der Betrachtung der oxidativen Stressmarker ist zu erwähnen, dass bisher keine Methode die genaue Menge des jeweiligen Markers bestimmen konnte (150). Daher sind die ermittelten Werte immer mit Vorsicht zu betrachten. 8-oxoGua und 8-oxodG werden in der DNA nachgewiesen und sollen den oxidativen Stress in den Zellen u. a. bei Alterung, Krebs, Alzheimer und Parkinson anzeigen (100, 150, 230). Krebsstudien belegen, dass 8-oxoGua als potentieller Biomarker für die Transversion von G→T verwendet werden kann (231). Die Messung von 8-oxoGua in DNA-Proben aus Organen hat jedoch den Nachteil eines invasiven Eingriffs. Die Messung von 8-oxoGua und 8-oxodG im Urin ist populär geworden, da sie nicht invasiv ist. Zudem wurde durch Verbesserungen der Chromatographie in Verbindung mit MS/MS oder elektrochemischen Detektoren die Nachweisgrenze in Urinproben soweit gesenkt, dass belastbare Ergebnisse detektiert werden können (100).

Dabei wird häufig nur 8-oxodG gemessen, da ELISA-Kits und moderne HPLC-MS/MS-Methoden und andere Massenspektrometrie-Methoden, wie z. B. Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation, nun deutlich nutzerfreundlicher geworden sind (98, 148). 8-oxoGua ist das Produkt der Basenexzisionsreparatur, der Hauptweg in der DNA-Reparatur für geschädigte Basen, während 8-oxodG meist bei der Oxidation von freien Nukleotiden oder der DNA-Reparatur mittels Nukleotidexzisionsreparatur entsteht. 8-oxoGua ist jedoch instabiler und schlechter ionisierbar als 8-oxodG und daher ist sein Nachweis komplexer (156). Die Messung von 8-oxoGua und 8-oxodG soll die DNA-Reparaturkapazität im Individuum wiedergeben, wobei eine Verbindung zwischen den Exkretionsraten von 8-oxoGua und 8-oxodG besteht. Dies lässt die Annahme zu, dass beide Marker den gleichen oxidativen Stress abbilden.

8-oxoGuo ist als Marker für oxidativ geschädigte RNA interessant, da 80 % der DNA in RNA umgeschrieben werden (232). Zurzeit ist wenig über die Oxidation von einzelnen RNAs bekannt. Am besten sind bisher die rRNA und mRNA untersucht (86, 233, 234). Zudem ist 8-oxoGuo das am häufigsten untersuchte Produkt der oxidativen RNA-Schädigung (150). Mit HPLC-MS/MS ist es möglich, bis zu 12,5 fmol 8-oxoGuo im Urin zu detektieren (124). Bisher war die Untersuchung von Gewebeproben interessanter, aber dafür werden 50–100 mg RNA-Probe benötigt (150). Die oxidative Schädigung der RNA hat keinen Einfluss auf mögliche Mutationen, sondern spielt vor allem in chronischen Krankheiten wie Alzheimer und Parkinson eine Rolle. Die Folgen der RNA-Oxidation sind eine fehlerhafte oder unterbrochene Proteinbiosynthese und ein gesteigerter Abbau und Reparatur der RNA (81). Bisher werden vier Möglichkeiten diskutiert, wie oxidativ geschädigte mRNA erkannt, abgebaut und repariert wird:

1. Die Translation wird an der oxidierten Stelle abgebrochen und es entsteht ein verkürztes Protein.
2. Oxidierte Basen der mRNA verändern die Basenpaarung mit der tRNA und sorgen für funktionslose Proteine.
3. Die oxidierte RNA wird von Enzymen erkannt und abgebaut.
4. Die oxidierte Base wird durch bisher unbekannte Enzyme repariert (81).

Die Exkretionsrate von 8-oxodG und 8-oxoGuo im Urin wird gern als Nachweis von DNA- oder RNA-Oxidation interpretiert. Dabei ist das Wissen über die Abbau- und Reparaturmechanismen sowie den Transport der Nukleotide in den Urin sehr

lückenhaft (100). Die Interpretation der Menge an oxidativen Stressmarkern im Urin ist mitunter komplex. Für eine optimale Bestimmung der Exkretion der oxidativen Stressmarker ist die Messung von 24-h-Urin die erste Wahl. Dabei wird die Einstellung eines Gleichgewichts zwischen Schädigung und Reparatur sowie Abbau berücksichtigt, um eine Aussage treffen zu können. Dabei erschweren kurzfristige Änderungen des oxidativen Stresses oder der Reparatur eine Interpretation der Messung (100). Noch komplizierter wird die Interpretation, wenn eine 24-h-Messung nicht möglich ist. Der Nachweis der Marker im Spontanurin soll durch die Berücksichtigung der Kreatinin-Konzentration ermöglicht werden (109). Dafür wird die Konzentration des oxidativen Stressmarkers durch die von Kreatinin dividiert. Das Verhältnis wird größer, wenn die Konzentration des Markers steigt oder die des Kreatinins fällt. Daher gelingt die Verwendung des Verhältnisses nur, wenn die Kreatinin-Exkretion als konstant angenommen werden kann (109). Zur Interpretation der Exkretion der oxidativen Stressmarker muss zudem berücksichtigt werden, dass die gesamte DNA- und RNA-Oxidation im Urin gesammelt wird. Jedes Organ im untersuchten Individuum steuert einen Anteil nach seinem Gewichtsanteil im Körper bei. So ist die Untersuchung der oxidativen Stressmarker am sinnvollsten, wenn große Organe betroffen sind oder der komplette Körper für den Anstieg verantwortlich ist (100).

5.6 Interpretation der Messung von oxidativen Stressmarkern

Die Untersuchung der Stressmarker für oxidativ geschädigte Nukleinsäuren im Urin kann nur ein Anhaltspunkt für weitere Untersuchungen sein. Ein Ziel sollte dabei sein, wenn möglich in Gewebe- oder Zellkulturproben die oxidative Schädigung nachzuweisen. So kann Grundlagenforschung betrieben und das Zusammenspiel von Schädigung und Reparatur besser verstanden werden. Die Konzentration der oxidativen Stressmarker im Urin hängt von vielen Faktoren ab, zudem sind einige Transportwege bisher unbekannt. Ein Ziel sollte es sein, den Transportweg der oxidierten Nukleotide von der Zellen in den Urin aufzuklären (100).

Trotz einiger offener Fragen kann die Messung der oxidativen Stressmarker zur Beobachtung von Krankheits- oder Heilungsentwicklungen herangezogen werden, da deren Messung einfacher geworden ist und erste Anhaltspunkte liefern kann (100). Zudem hat die Entwicklung einer Messmethode, die die genaue Konzentration von 8-oxodG bzw. 8-oxoGuo direkt in der Nukleinsäure nachweisen kann, oberste Priorität. Die hier eingesetzten HPLC-MS/MS-Methoden sind nur ein Schritt in die Richtung einer optimalen Bestimmung von 8-oxodG bzw. 8-oxoGuo. Bisher ist noch wenig bekannt, ob sich in der RNA nicht auch weiteroxidierte Produkte finden lassen wie in der DNA. Ein weiteres Ziel sollte daher sein, Endprodukte der Oxidationsreaktion der Nukleinsäuren zu messen und nicht die Zwischenprodukte, wie es 8-oxodG und 8-oxoGuo sind. Durch den Nachweis der Endprodukte, könnten die Mechanismen der Oxidation besser verstanden werden. Ein weiterer Schritt wäre dann, die DNA auf bestimmte Regionen hin zu untersuchen, in welchen gehäuft oxidative Schäden auftreten. Die bisher durchgeführten Bestimmungen der Menge an oxidativ geschädigten Basen stellt den vorhandenen oxidativen Stress dar, zeigt aber nicht die potentielle Schädigung der Zellen bzw. Organe durch die Veränderung der DNA bzw. RNA an.

6 Zusammenfassung

Der Nachweis von oxidativen Stressmarkern hat bei der Untersuchung von Krankheiten wie Diabetes, Krebs und Hypertonie an großer Bedeutung gewonnen. Vor allem 8-Oxo-2'-desoxyguanosin (8-oxodG) wird gezielt mit verschiedenen Methoden gemessen und als Marker für oxidativen Stress herangezogen. Daneben haben 8-Oxoguanin (8-oxoGua), als Produkt aus der Basenexzisionsreparatur der DNA, sowie 8-Oxoguanosin (8-oxoGuo), als Biomarker für oxidativ geschädigte RNA, bisher weniger Aufmerksamkeit bekommen. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) spielt eine wichtige Rolle in der Regulierung des Blutdrucks. Im Falle einer Hypertonie werden Angiotensin II (Ang II) und Aldosteron (Aldo) über einen langen Zeitraum in erhöhter Konzentration ausgeschüttet. Dieser Umstand bewirkt eine nicht physiologische Wirkung der Hormone des RAAS, welche zu einer Induktion von oxidativem Stress führt. Die Zielsetzung dieser Arbeit ist es, die oxidative Schädigung, ausgelöst durch Ang II und Aldo, in der DNA und der RNA *in vitro* und *in vivo* nachzuweisen und dabei speziell den Biomarker 8-oxodG zu untersuchen.

In-vitro-Experimente wurden mit LLC-PK1-Zellen, einer Schweinenierenzelllinie, durchgeführt. Ang II und Aldo lösten einen dosisabhängigen Anstieg der DNA-Schäden in LLC-PK1-Zellen aus. Eine Zeitabhängigkeit wurde für die ersten 30 Minuten gezeigt. Für die restliche Zeit (4 h) blieb der nachgewiesene DNA-Schaden konstant. Der FPG-Comet-Assay und die immunzytochemische Färbung zeigten jeweils eine signifikante Zunahme von 8-oxodG in LLC-PK1-Zellen an, während die HPLC-MS/MS-Messung nur geringe Veränderungen nachwies. Das FPG-Enzym erkennt neben 8-oxodG auch andere oxidierte Purine und sorgte so für eine Überbestimmung des DNA-Schadens. Bei der immunzytochemischen Färbung entsteht die Überbestimmung durch Kreuzreaktionen des 8-oxodG-Antikörpers mit oxidierten Strukturen in der DNA. Der Vorteil beider Analysemethoden ist die direkte Messung von Schädigungen in der Zelle, während die HPLC-MS/MS eine Isolierung der Nukleinsäuren voraussetzt. Bei diesem Schritt kann es zur Oxidation der Marker für oxidativen Stress kommen, welche einen genauen Nachweis erschwert.

In-vivo-Versuche hatten zum Ziel, die oxidativen Stressmarker 8-oxoGua, 8-oxodG und 8-oxoGuo im Urin nachzuweisen. Die Behandlung der C57BL/6-Mäuse und Sprague-Dawley-Ratten (SD-Ratten) mit den Hormonen des RAAS zeigten einen

Anstieg des Blutdrucks, erhöhte DNA-Schäden durch oxidativen Stress sowie erhöhte Exkretionsraten der oxidativen Stressmarker. Durch eine Inhibierung des Angiotensin-II-Typ1- oder Mineralkortikoidrezeptors sowie die Mutation des Gens *AT_{1a}* konnte gezeigt werden, dass die Schädigungen unabhängig vom Blutdruck sind. Zudem konnte gezeigt werden, dass neben NOX4 auch andere NADPH-Oxidase für den oxidativen Stress verantwortlich sein müssen. Eine Aktivierung des Nrf2-Signalweges in den SD-Ratten hat Einfluss auf die Wirkung von Aldo.

Die Exkretionsrate der oxidativen Biomarker im 20-h-Urin der behandelten Tiere zeigen, wie sich das Gleichgewicht zwischen DNA-Reparatur und oxidativem Stress verändert. Da 80 % der DNA in RNA umgeschrieben werden, ist der Nachweis von 8-oxoGuo in den Fokus gerückt. In der praktischen Anwendung kann mit der Messung von 8-oxodG und 8-oxoGuo ein Krankheits- oder Heilungsprozess auf nicht invasive Weise verfolgt werden. Der Nachweis von 8-oxodG und 8-oxoGuo in den Nucleinsäuren stellt einen Einstieg für die Grundlagenforschung dar, da sie nur eine Momentaufnahme der Nucleinsäureschädigung in der Zelle zeigen. Meist findet eine Überbestimmung, ausgelöst durch die Messmethode, statt. In Gewebeproben kann eine Unterbestimmung vorliegen, falls nicht alle Zelltypen vom oxidativen Stress betroffen sind. Daher sollte es ein vorrangiges Ziel sein, ein stabileres Oxidationsprodukt des Guanins nachzuweisen, um das Gleichgewicht der DNA-Oxidation und Reparatur besser zu verstehen.

7 Summary

The detection of oxidative stress markers has gained increasing importance in the early investigation of diseases like diabetes, cancer or hypertension. 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) is the main marker, which is used for the intracellular detection of oxidative stress levels. However, the oxidative stress markers 8-oxoguanine (8-oxoGua), a product of the DNA base excision repair and 8-oxoguanosine (8-oxoGuo), a marker for oxidative damaged RNA have received less attention up to now.

The renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) plays an important role in the regulation processes of the blood pressure system. During hypertension angiotensin II (Ang II) and aldosterone (Aldo) are released in high concentrations over a longer period leading to non-physiological effects of the RAAS hormones. Subsequently, an increase of the intracellular oxidative stress level in kidney cells can be measured. The aim of this thesis is the *in vitro* and *in vivo* detection of the oxidative damage in DNA and RNA by measuring oxidative stress markers, especially 8-oxodG which is triggered by Ang II and Aldo.

In vitro experiments were carried out in LLC-PK1, a cell line originated from porcine kidney cells. It could be shown that Ang II and Aldo led to a dose-dependent increase of DNA damage in the cells. A time-dependent increase was detected for the first 30 minutes of the treatment. For the rest of the experimental set up (4 h) the level of detected DNA damage remained constant. The FPG comet assay and the immunocytochemical staining showed a significant increase of 8-oxodG in the cells, whereas the HPLC-MS/MS measurement only detected a small increase of 8-oxodG in the DNA. The FPG enzyme, which recognises also other oxidized purines besides 8-oxodG, which led to an overestimation of 8-oxodG in the comet assay. Also, the 8-oxodG antibody, which was used in the immunocytochemical analysis, detected higher amounts of 8-oxodG most likely due to its side reactions with other oxidized DNA structures. One of the main advantages of the last mentioned methods is the direct measurement in damaged cells, whereas the HPLC-MS/MS requires an isolation of the DNA. During this isolation process the oxidative stress markers can be oxidized and the detection can become imprecise.

The main purpose of the *in vivo* experiments was the detection of the oxidative stress marker 8-oxoGua, 8-oxodG and 8-oxoGuo in the urine of test animals. The treatment of C57BL/6 mice and Sprague Dawley (SD) rats with the RAAS hormones led to an increase of the blood pressure, higher DNA damage due to oxidative stress as well as an increased excretion rate of oxidative stress markers. The inhibition of the angiotensin II type 1- or mineralocorticoid receptor and a mutation of the AT_{1a} gene could show, that the DNA damage is independent from the hypertension. In addition, it was shown that the NOX4 is not alone responsible for the oxidative stress. Other NADPH oxidases must contribute to the induction of oxidative stress inside the cell. Moreover, the activation of the Nrf2 pathway has an influence on the effect of Aldo in SD rats.

The excretion rate of the oxidative stress markers in the 20 h urine of the treated animals showed how the equilibrium between the DNA repair and the oxidative stress level was changing over time. The measurement of 8-oxoGuo became more and more popular, because up to the fact that 80 % of the DNA is translated into RNA. Overall, the detection of 8-oxodG and 8-oxoGuo is feasible for monitoring the disease or the healing process, because the measurement is non-invasive. The detection of 8-oxodG and 8-oxoGuo in nucleic acids is a first step into the field of basic research methods, because it reveals a snapshot of the nucleic acid damage in the cell at a specific time point. Usually, there will be an overestimation of the oxidative stress marker resulting from the analytical method. Although, it is possible to detect an underestimation of oxidative stress markers in tissue samples if not all cell types are damaged equally. Therefore, a primary goal should be the detection of a stable oxidation product of guanine to insure a reliable detection strategy and for a better understanding of the equilibrium of DNA oxidation and repair.

8 Literaturverzeichnis

1. Wuerzner, G., Burnier, M., Waeber, B.; Critical review of cancer risk associated with angiotensin receptor blocker therapy. *Vasc Health Risk Manag* (2011); 7:741-7.
2. Kearney, P.M., Whelton, M., Reynolds, K., Muntner, P., Whelton, P.K., He, J.; Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* (2005); 365(9455):217-23.
3. Coleman, M.P., Forman, D., Bryant, H., et al.; Cancer survival in Australia, Canada, Denmark, Norway, Sweden, and the UK, 1995-2007 (the International Cancer Benchmarking Partnership): an analysis of population-based cancer registry data. *Lancet* (2011); 377(9760):127-38.
4. Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., et al.; Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* (2013); 49(6):1374-403.
5. Moss, W.T.; Common peculiarities of patients with adenocarcinoma of the endometrium with special reference to obesity, body build, diabetes and hypertension. *Am J Roentgenol Radium Ther* (1947); 58(2):203-10.
6. Colt, J.S., Schwartz, K., Graubard, B.I., et al.; Hypertension and risk of renal cell carcinoma among white and black Americans. *Epidemiology* (2011); 22(6):797-804.
7. Grossman, E., Messerli, F.H., Boyko, V., Goldbourt, U.; Is there an association between hypertension and cancer mortality? *Am. J. Med.* (2002); 112(6):479-486.
8. Meyer, P.; Increased intracellular calcium: from hypertension to cancer. *J Hypertens Suppl* (1987); 5(4):S3-4.
9. Hamet, P.; Cancer and hypertension. An unresolved issue. *Hypertension* (1996); 28(3):321-4.
10. Lago, R.M., Singh, P.P., Nesto, R.W.; Diabetes and hypertension. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* (2007); 3(10):667.
11. Wannamethee, G., Shaper, A.G.; Blood pressure and cancer in middle-aged British men. *Int J Epidemiol* (1996); 25(1):22-31.
12. Phillips, M.I., Schmidt-Ott, K.M.; The Discovery of Renin 100 Years Ago. *News Physiol Sci* (1999); 14:271-274.
13. Kumar, R., Yong, Q.C., Thomas, C.M., Baker, K.M.; Intracardiac intracellular angiotensin system in diabetes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2012); 302(5):R510-7.

14. Atlas, S.A.; The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm* (2007); 13(8 Suppl B):9-20.
15. Morgan, L., Broughton Pipkin, F., Kalsheker, N.; Angiotensinogen: molecular biology, biochemistry and physiology. *Int J Biochem Cell Biol* (1996); 28(11):1211-22.
16. Carey, R.M., Siragy, H.M.; Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev* (2003); 24(3):261-71.
17. Schmieder, R.E., Hilgers, K.F., Schlaich, M.P., Schmidt, B.M.W.; Renin-angiotensin system and cardiovascular risk. *Lancet* (2007); 369(9568):1208-1219.
18. Conti, S., Cassis, P., Benigni, A.; Aging and the renin-angiotensin system. *Hypertension* (2012); 60(4):878-83.
19. Carey, R.M.; Aldosterone and cardiovascular disease. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* (2010); 17(3):194-8.
20. Funder, J.W.; Minireview: aldosterone and the cardiovascular system: genomic and nongenomic effects. *Endocrinology* (2006); 147(12):5564-7.
21. Gwathmey, T.M., Alzayadneh, E.M., Pendergrass, K.D., Chappell, M.C.; Novel roles of nuclear angiotensin receptors and signaling mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2012); 302(5):R518-30.
22. Ellis, B., Li, X.C., Miguel-Qin, E., Gu, V., Zhuo, J.L.; Evidence for a functional intracellular angiotensin system in the proximal tubule of the kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2012); 302(5):R494-509.
23. Mehta, P.K., Griendling, K.K.; Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* (2007); 292(1):C82-97.
24. Touyz, R.M., Schiffrin, E.L.; Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol* (2004); 122(4):339-52.
25. Griendling, K.K., Minieri, C.A., Ollerenshaw, J.D., Alexander, R.W.; Angiotensin-II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth-muscle cells. *Circ Res* (1994); 74(6):1141-1148.
26. Manea, A., Manea, S.A., Gafencu, A.V., Raicu, M., Simionescu, M.; AP-1-dependent transcriptional regulation of NADPH oxidase in human aortic smooth muscle cells: role of p22phox subunit. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2008); 28(5):878-85.

27. Queisser, N., Fazeli, G., Schupp, N.; Superoxide anion and hydrogen peroxide-induced signaling and damage in angiotensin II and aldosterone action. *Biol Chem* (2010); 391(11):1265-79.
28. Bassett, M.H., White, P.C., Rainey, W.E.; The regulation of aldosterone synthase expression. *Mol Cell Endocrinol* (2004); 217(1-2):67-74.
29. Wenzel, U.; Aldosterone antagonists: silver bullet or just sodium excretion and potassium retention? *Kidney Int* (2007); 71(5):374-6.
30. Williams, J.S.; Evolving research in nongenomic actions of aldosterone. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* (2013); 20(3):198-203.
31. Marney, A.M., Brown, N.J.; Aldosterone and end-organ damage. *Clin Sci (Lond)* (2007); 113(6):267-78.
32. Pacurari, M., Kafoury, R., Tchounwou, P.B., Ndebele, K.; The Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Vascular Inflammation and Remodeling. *Int J Inflam* (2014); 2014:689360.
33. Hernandez-Hernandez, R., Sosa-Canache, B., Velasco, M., Armas-Hernandez, M.J., Armas-Padilla, M.C., Cammarata, R.; Angiotensin II receptor antagonists role in arterial hypertension. *J Hum Hypertens* (2002); 16 Suppl 1:S93-9.
34. McKelvie, R.S., Yusuf, S., Pericak, D., et al.; Comparison of candesartan, enalapril, and their combination in congestive heart failure: randomized evaluation of strategies for left ventricular dysfunction (RESOLVD) pilot study. The RESOLVD Pilot Study Investigators. *Circulation* (1999); 100(10):1056-64.
35. Hargovan, M., Ferro, A.; Aldosterone synthase inhibitors in hypertension: current status and future possibilities. *JRSM Cardiovasc Dis* (2014); 3:2048004014522440.
36. Halliwell, B.; Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev* (2012); 70(5):257-65.
37. Halliwell, B.; Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* (2007); 35(Pt 5):1147-50.
38. Bedard, K., Krause, K.H.; The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* (2007); 87(1):245-313.
39. Aruoma, O.I., Halliwell, B., Dizdaroglu, M.; Iron ion-dependent modification of bases in DNA by the superoxide radical-generating system hypoxanthine/xanthine oxidase. *J Biol Chem* (1989); 264(22):13024-8.

40. Paul, T.; Effect of a prolonged superoxide flux on transferrin and ferritin. *Arch Biochem Biophys* (2000); 382(2):253-61.
41. Sonntag, C. Free-Radical-Induced DNA Damage and Its Repair: A Chemical Perspective. Springer, 2006.
42. Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., Freeman, B.A.; Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1990); 87(4):1620-4.
43. Hool, L.C.; Reactive oxygen species in cardiac signalling: from mitochondria to plasma membrane ion channels. *Clin Exp Pharmacol Physiol* (2006); 33(1-2):146-51.
44. Maisch, T., Baier, J., Franz, B., et al.; The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2007); 104(17):7223-8.
45. Agnez-Lima, L.F., Melo, J.T., Silva, A.E., et al.; DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms. *Mutat Res* (2012).
46. Cadet, J., Loft, S., Olinski, R., et al.; Biologically relevant oxidants and terminology, classification and nomenclature of oxidatively generated damage to nucleobases and 2-deoxyribose in nucleic acids. *Free Radic Res* (2012); 46(4):367-81.
47. Dizdaroglu, M., Jaruga, P.; Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Res* (2012); 46(4):382-419.
48. Wallace, S.S.; Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. *Free Radic Biol Med* (2002); 33(1):1-14.
49. Friedberg, E.C., Aguilera, A., Gellert, M., et al.; DNA repair: From molecular mechanism to human disease. *DNA Repair* (2006); 5(8):986-996.
50. Cadet, J., Ravanat, J.L., TavernaPorro, M., Menoni, H., Angelov, D.; Oxidatively generated complex DNA damage: tandem and clustered lesions. *Cancer Lett* (2012); 327(1-2):5-15.
51. Chapman, J.R., Taylor, M.R., Boulton, S.J.; Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell* (2012); 47(4):497-510.
52. Leppard, J.B., Dong, Z., Mackey, Z.B., Tomkinson, A.E.; Physical and functional interaction between DNA ligase IIIalpha and poly(ADP-Ribose) polymerase 1 in DNA single-strand break repair. *Mol Cell Biol* (2003); 23(16):5919-27.

53. Dedon, P.C.; The chemical toxicology of 2-deoxyribose oxidation in DNA. *Chem Res Toxicol* (2008); 21(1):206-19.
54. Cadet, J., Douki, T., Ravanat, J.L.; Oxidatively generated base damage to cellular DNA. *Free Radic Biol Med* (2010); 49(1):9-21.
55. Kanvah, S., Joseph, J., Schuster, G.B., Barnett, R.N., Cleveland, C.L., Landman, U.; Oxidation of DNA: Damage to Nucleobases. *Accounts of Chemical Research* (2009); 43(2):280-287.
56. Dizdaroglu, M.; Oxidatively induced DNA damage: mechanisms, repair and disease. *Cancer Lett* (2012); 327(1-2):26-47.
57. Radak, Z., Boldogh, I.; 8-Oxo-7,8-dihydroguanine: links to gene expression, aging, and defense against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* (2010); 49(4):587-96.
58. Epe, B.; DNA damage spectra induced by photosensitization. *Photochem Photobiol Sci* (2012); 11(1):98-106.
59. Neeley, W.L., Essigmann, J.M.; Mechanisms of formation, genotoxicity, and mutation of guanine oxidation products. *Chem Res Toxicol* (2006); 19(4):491-505.
60. Evans, M.D., Cooke, M.S.; Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *BioEssays* (2004); 26(5):533-42.
61. Cadet, J., Douki, T., Ravanat, J.L.; Oxidatively generated damage to the guanine moiety of DNA: mechanistic aspects and formation in cells. *Acc Chem Res* (2008); 41(8):1075-83.
62. Foote, C.S.; Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol* (1991); 54(5):659.
63. Ye, Y., Muller, J.G., Luo, W., et al.; Formation of ¹³C-, ¹⁵N-, and ¹⁸O-labeled guanidinohydantoin from guanosine oxidation with singlet oxygen. Implications for structure and mechanism. *J Am Chem Soc* (2003); 125(46):13926-7.
64. Ravanat, J.L., Martinez, G.R., Medeiros, M.H., Di Mascio, P., Cadet, J.; Mechanistic aspects of the oxidation of DNA constituents mediated by singlet molecular oxygen. *Arch Biochem Biophys* (2004); 423(1):23-30.
65. Sies, H.; Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* (1997); 82(2):291-295.

66. Steenken, S., Jovanovic, S.V., Bietti, M., Bernhard, K.; The Trap Depth (in DNA) of 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine as Derived from Electron-Transfer Equilibria in Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.* (2000); 122(10):2373-2374.
67. Loeb, L.A.; Mutator phenotype in cancer: origin and consequences. *Semin Cancer Biol* (2010); 20(5):279-80.
68. Dizdaroglu, M., Jaruga, P.; Oxidatively Induced DNA Damage and Cancer. *J Mol Biomarkers Diagn* (2012); 01(S2).
69. Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Unsal-Kacmaz, K., Linn, S.; Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* (2004); 73:39-85.
70. Leipold, M.D., Workman, H., Muller, J.G., Burrows, C.J., David, S.S.; Recognition and removal of oxidized guanines in duplex DNA by the base excision repair enzymes hOGG1, yOGG1, and yOGG2. *Biochemistry* (2003); 42(38):11373-11381.
71. Rosenquist, T.A., Zaika, E., Fernandes, A.S., Zharkov, D.O., Miller, H., Grollman, A.P.; The novel DNA glycosylase, NEIL1, protects mammalian cells from radiation-mediated cell death. *DNA Repair (Amst)* (2003); 2(5):581-91.
72. Torisu, K., Tsuchimoto, D., Ohnishi, Y., Nakabeppu, Y.; Hematopoietic tissue-specific expression of mouse Neil3 for endonuclease VIII-like protein. *J Biochem* (2005); 138(6):763-72.
73. Liu, M., Bandaru, V., Bond, J.P., et al.; The mouse ortholog of NEIL3 is a functional DNA glycosylase in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2010); 107(11):4925-30.
74. Muftuoglu, M., de Souza-Pinto, N.C., Dogan, A., et al.; Cockayne syndrome group B protein stimulates repair of formamidopyrimidines by NEIL1 DNA glycosylase. *J Biol Chem* (2009); 284(14):9270-9.
75. Dizdaroglu, M.; Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNA glycosylases. *Mutat Res* (2005); 591(1-2):45-59.
76. David, S.S., O'Shea, V.L., Kundu, S.; Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature* (2007); 447(7147):941-50.
77. Reardon, J.T., Bessho, T., Kung, H.C., Bolton, P.H., Sancar, A.; In vitro repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: possible

- explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997); 94(17):9463-8.
78. Friedberg, E.C.; Nucleotide excision repair of DNA: The very early history. *DNA Repair (Amst)* (2011); 10(7):668-72.
79. Ohtsubo, T., Nishioka, K., Imaiso, Y., et al.; Identification of human MutY homolog (hMYH) as a repair enzyme for 2-hydroxyadenine in DNA and detection of multiple forms of hMYH located in nuclei and mitochondria. *Nucleic Acids Res* (2000); 28(6):1355-64.
80. Barciszewski, J., Barciszewska, M.Z., Siboska, G., Rattan, S.I., Clark, B.F.; Some unusual nucleic acid bases are products of hydroxyl radical oxidation of DNA and RNA. *Mol Biol Rep* (1999); 26(4):231-8.
81. Kong, Q., Lin, C.L.; Oxidative damage to RNA: mechanisms, consequences, and diseases. *Cell Mol Life Sci* (2010); 67(11):1817-29.
82. Nelson, P.T., Keller, J.N.; RNA in brain disease: no longer just "the messenger in the middle". *J Neuropathol Exp Neurol* (2007); 66(6):461-8.
83. Shan, X., Lin, C.L.; Quantification of oxidized RNAs in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* (2006); 27(5):657-62.
84. Chang, Y., Kong, Q., Shan, X., et al.; Messenger RNA oxidation occurs early in disease pathogenesis and promotes motor neuron degeneration in ALS. *PLoS One* (2008); 3(8):e2849.
85. Shan, X., Chang, Y., Lin, C.-L.G.; Messenger RNA oxidation is an early event preceding cell death and causes reduced protein expression. *Faseb J.* (2007); 21(11):2753-2764.
86. Ding, Q., Dimayuga, E., Keller, J.N.; Oxidative stress alters neuronal RNA- and protein-synthesis: Implications for neural viability. *Free Radic Res* (2007); 41(8):903-10.
87. Aas, P.A., Otterlei, M., Falnes, P.O., et al.; Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA. *Nature* (2003); 421(6925):859-63.
88. Hayakawa, H., Uchiumi, T., Fukuda, T., et al.; Binding capacity of human YB-1 protein for RNA containing 8-oxoguanine. *Biochemistry* (2002); 41(42):12739-12744.

89. Wu, J., Li, Z.; Human polynucleotide phosphorylase reduces oxidative RNA damage and protects HeLa cell against oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2008); 372(2):288-292.
90. Svoboda, P., Harms-Ringdahl, M.; Protection or sensitization by thiols or ascorbate in irradiated solutions of DNA or deoxyguanosine. *Radiat Res* (1999); 151(5):605-16.
91. Henderson, P.T., Evans, M.D., Cooke, M.S.; Salvage of oxidized guanine derivatives in the (2'-deoxy)ribonucleotide pool as source of mutations in DNA. *Mutat Res* (2010); 703(1):11-7.
92. Sekiguchi, T., Ito, R., Hayakawa, H., Sekiguchi, M.; Elimination and utilization of oxidized guanine nucleotides in the synthesis of RNA and its precursors. *J Biol Chem* (2013); 288(12):8128-35.
93. Hayakawa, H., Hofer, A., Thelander, L., et al.; Metabolic fate of oxidized guanine ribonucleotides in mammalian cells. *Biochemistry* (1999); 38(12):3610-4.
94. Kamiya, H.; Mutagenicity of oxidized DNA precursors in living cells: Roles of nucleotide pool sanitization and DNA repair enzymes, and translesion synthesis DNA polymerases. *Mutat Res* (2010); 703(1):32-6.
95. Elledge, S.J., Zhou, Z., Allen, J.B.; Ribonucleotide reductase: regulation, regulation, regulation. *Trends Biochem Sci* (1992); 17(3):119-23.
96. Taddei, F.; Counteraction by MutT Protein of Transcriptional Errors Caused by Oxidative Damage. *Science* (1997); 278(5335):128-130.
97. Maki, H., Sekiguchi, M.; MutT protein specifically hydrolyzes a potent mutagenic substrate for DNA-synthesis. *Nature* (1992); 355(6357):273-275.
98. Evans, M.D., Sapparbaev, M., Cooke, M.S.; DNA repair and the origins of urinary oxidized 2'-deoxyribonucleosides. *Mutagenesis* (2010); 25(5):433-42.
99. Falagas, M.E., Zarkadoulia, E.A., Bliziotis, I.A., Samonis, G.; Science in Greece: from the age of Hippocrates to the age of the genome. *Faseb J.* (2006); 20(12):1946-50.
100. Poulsen, H.E., Nadal, L.L., Broedbaek, K., Nielsen, P.E., Weimann, A.; Detection and interpretation of 8-oxodG and 8-oxoGua in urine, plasma and cerebrospinal fluid. *Biochim Biophys Acta* (2014); 1840(2):801-8.

101. Weimann, A., Broedbaek, K., Henriksen, T., Stovgaard, E.S., Poulsen, H.; Assays for urinary biomarkers of oxidatively damaged nucleic acids. *Free Radical Res.* (2012); 46(4):10.
102. Collins, A.R.; Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochim Biophys Acta* (2014); 1840(2):794-800.
103. Gong, X., Tao, R., Li, Z.; Quantification of RNA damage by reverse transcription polymerase chain reactions. *Anal Biochem* (2006); 357(1):58-67.
104. Addona, T.A., Abbatiello, S.E., Schilling, B., et al.; Multi-site assessment of the precision and reproducibility of multiple reaction monitoring-based measurements of proteins in plasma. *Nat Biotechnol* (2009); 27(7):633-41.
105. Yamashita, M., Fenn, J.B.; Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem.* (1984); 88(20):4451-4459.
106. Queisser, N., Oteiza, P.I., Stopper, H., Oli, R.G., Schupp, N.; Aldosterone induces oxidative stress, oxidative DNA damage and NF-kappaB-activation in kidney tubule cells. *Mol Carcinog* (2011); 50(2):123-35.
107. Fazeli, G., Stopper, H., Schinzel, R., Ni, C.-W., Jo, H., Schupp, N.; Angiotensin II induces DNA damage via AT1 receptor and NADPH oxidase isoform Nox4. *Mutagenesis* (2012); 27(6):673-681.
108. Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Lunec, J.; Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *Faseb J.* (2003); 17(10):1195-214.
109. Barregard, L., Moller, P., Henriksen, T., et al.; Human and methodological sources of variability in the measurement of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine. *Antioxid Redox Signal* (2013); 18(18):2377-91.
110. Singh, R., McEwan, M., Lamb, J.H., Santella, R.M., Farmer, P.B.; An improved liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the determination of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in DNA samples using immunoaffinity column purification. *Rapid Commun Mass Spectrom* (2003); 17(2):126-34.
111. Brand, S.; Oxidativer Stress und DNA-Schäden induziert durch das Peptidhormon Angiotensin II in vivo; doctoral dissertation, Universität Würzburg Department, (2012).
112. Zimnol, A. Universität Würzburg, unveröffentliche Daten, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, (2014).

113. Queisser, N., Oteiza, P.I., Link, S., Hey, V., Stopper, H., Schupp, N.; Aldosterone activates transcription factor Nrf2 in kidney cells both in vitro and in vivo. *Antioxid Redox Signal* (2014).
114. Rotman, B., Papermaster, B.W.; Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1966); 55(1):134-41.
115. Collins, A.R.; The comet assay for DNA damage and repair - Principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.* (2004); 26(3):249-261.
116. Comet assay blog. (2014) <http://cometassayuoc.blogspot.de/>. (accessed Date Accessed, 2014 Accessed)
117. Azqueta, A., Arbillaga, L., Lopez de Cerain, A., Collins, A.; Enhancing the sensitivity of the comet assay as a genotoxicity test, by combining it with bacterial repair enzyme FPG. *Mutagenesis* (2013); 28(3):271-7.
118. Brink, A., Lutz, U., Volkel, W., Lutz, W.K.; Simultaneous determination of O6-methyl-2'-deoxyguanosine, 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, and 1,N6-etheno-2'-deoxyadenosine in DNA using on-line sample preparation by HPLC column switching coupled to ESI-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* (2006); 830(2):255-61.
119. Cooke, M.S., Singh, R., Hall, G.K., et al.; Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography-tandem mass spectrometry methodology for the analysis of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in saliva and urine. *Free Radic Biol Med* (2006); 41(12):1829-36.
120. Ravanat, J.L., Douki, T., Duez, P., et al.; Cellular background level of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: an isotope based method to evaluate artefactual oxidation of DNA during its extraction and subsequent work-up. *Carcinogenesis* (2002); 23(11):8.
121. Chao, M.R., Yen, C.C., Hu, C.W.; Prevention of artifactual oxidation in determination of cellular 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by isotope-dilution LC-MS/MS with automated solid-phase extraction. *Free Radic Biol Med* (2008); 44(3):464-73.
122. Haghdoost, S., Sjolander, L., Czene, S., Harms-Ringdahl, M.; The nucleotide pool is a significant target for oxidative stress. *Free Radic Biol Med* (2006); 41(4):620-6.

123. Bahre, H., Kaefer, V.; Measurement of 2',3'-cyclic nucleotides by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in cells. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* (2014); 964:208-11.
124. Weimann, A., Belling, D., Poulsen, H.; Quantification of 8-oxo-guanine and guanine as the nucleobase, nucleoside and deoxynucleoside forms in human urine by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Nucleic Acids Res.* (2002); 30(2):8.
125. Crow, B., Bishop, M., Kovalcik, K., Norton, D., George, J., Bralley, J.A.; A simple and cost effective method for the quantification of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine from urine using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* (2008); 22(4):394-401.
126. Materialprüfung, D.I.f.N.N. Chemische Analytik: Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen ; Begriffe, Verfahren, Auswertung. Beuth, 2008.
127. Olinski, R., Rozalski, R., Gackowski, D., Foksinski, M., Siomek, A., Cooke, M.S.; Urinary measurement of 8-OxodG, 8-OxoGua, and 5HMUra: a noninvasive assessment of oxidative damage to DNA. *Antioxid Redox Signal* (2006); 8(5-6):1011-9.
128. Singh, R., Teichert, F., Verschoyle, R.D., et al.; Simultaneous determination of 8-oxo-2'-deoxyguanosine and 8-oxo-2'-deoxyadenosine in DNA using online column-switching liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* (2009); 23(1):151-60.
129. Brand, S., Amann, K., Schupp, N.; Angiotensin II-induced hypertension dose-dependently leads to oxidative stress and DNA damage in mouse kidneys and hearts. *J Hypertens* (2013); 31(2):333-344.
130. Queisser, N.; Oxidative and nitrosative stress induced by the mineralocorticoid aldosterone; doctoral dissertation, Universität Würzburg Department, (2010).
131. Queisser, N. Universität Würzburg, unveröffentliche Daten, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, (2014).
132. Puntmann, V.O.; How-to guide on biomarkers: biomarker definitions, validation and applications with examples from cardiovascular disease. *Postgrad Med J* (2009); 85(1008):538-45.

133. Mah, W.C., Lee, C.G.; DNA methylation: potential biomarker in Hepatocellular Carcinoma. *Biomark Res* (2014); 2(1):5.
134. Wang, C., Li, C., Gong, W., Lou, T.; New urinary biomarkers for diabetic kidney disease. *Biomark Res* (2013); 1(1):9.
135. Grew, I.S., Cejvanovic, V., Broedbaek, K., et al.; Diurnal variation of urinary markers of nucleic acid oxidation. *Scand J Clin Lab Invest* (2014); 74(4):336-43.
136. Buchko, G.W., Wagner, J.R., Cadet, J., Raoul, S., Weinfeld, M.; Methylene blue-mediated photooxidation of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine. *BBA. Gene structure and expression* (1995); 1263(1):17-24.
137. Aruoma, O.I., Halliwell, B., Gajewski, E., Dizdaroglu, M.; Copper-ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem J* (1991); 273 (Pt 3):601-4.
138. Schupp, N., Kolkhof, P., Queisser, N., et al.; Mineralocorticoid receptor-mediated DNA damage in kidneys of DOCA-salt hypertensive rats. *Faseb J.* (2011); 25(3):968-78.
139. ICH; Harmonised tripartite guideline. In: Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, <http://www.ich.org>, (2005).
140. Eurachem. (2014) <http://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/mv>. (accessed Date Accessed, 2014 Accessed)
141. Cadet, J., Douki, T., Frelon, S., Sauvaigo, S., Pouget, J.P., Ravanat, J.L.; Assessment of oxidative base damage to isolated and cellular DNA by HPLC-MS/MS measurement. *Free Radical Biol. Med.* (2002); 33(4):441-449.
142. Kupiec, T.P.; Quality-Control Analytical Methods: High-Performance Liquid Chromatography. *Int J Pharm Compd* (2004); 8(3):223-227.
143. Hu, C.W., Wu, M.T., Chao, M.R., et al.; Comparison of analyses of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by isotope-dilution liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry and by enzyme-linked immunosorbent assay. *Rapid Commun Mass Spectrom* (2004); 18(4):505-10.
144. Pitt, J.J.; Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clin Biochem Rev* (2009); 30(1):19-34.

145. BioSciences Research Associates Inc. (2014) <http://www.bsrlabs.com/assay-validation.html>. (accessed Date Accessed, 2014 Accessed)
146. Liu, M., Gong, X., Alluri, R.K., Wu, J., Sablo, T., Li, Z.; Characterization of RNA damage under oxidative stress in Escherichia coli. *Biol Chem* (2012); 393(3):123-32.
147. Poulsen, H.E., Specht, E., Broedbaek, K., et al.; RNA modifications by oxidation: a novel disease mechanism? *Free Radic Biol Med* (2012); 52(8):1353-61.
148. Henriksen, T., Hillestrom, P.R., Poulsen, H.E., Weimann, A.; Automated method for the direct analysis of 8-oxo-guanosine and 8-oxo-2'-deoxyguanosine in human urine using ultraperformance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Free Radic Biol Med* (2009); 47(5):629-35.
149. Evans, M.D., Olinski, R., Loft, S., Cooke, M.S.; Toward consensus in the analysis of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine as a noninvasive biomarker of oxidative stress. *Faseb J.* (2010); 24(4):1249-60.
150. Jacob, K.D., Noren Hooten, N., Trzeciak, A.R., Evans, M.K.; Markers of oxidant stress that are clinically relevant in aging and age-related disease. *Mech Ageing Dev* (2013); 134(3-4):139-57.
151. Holcapek, M., Volna, K., Jandera, P., et al.; Effects of ion-pairing reagents on the electrospray signal suppression of sulphonated dyes and intermediates. *J Mass Spectrom* (2004); 39(1):43-50.
152. Ravanat, J.L., Duret, B., Guiller, A., Douki, T., Cadet, J.; Isotope dilution high-performance liquid chromatography - electrospray tandem mass spectrometry assay for the measurement of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in biological samples. *J. Chromatogr. B* (1998); 715(2):349-356.
153. Hah, S.S., Mundt, J.M., Kim, H.M., Sumbad, R.A., Turteltaub, K.W., Henderson, P.T.; Measurement of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine metabolism in MCF-7 cells at low concentrations using accelerator mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2007); 104(27):11203-8.
154. Dizdaroglu, M.; Formation of an 8-hydroxyguanine moiety in deoxyribonucleic acid on gamma-irradiation in aqueous solution. *Biochemistry* (1985); 24(16):4476-81.
155. Kasai, H., Tanooka, H., Nishimura, S.; Formation of 8-hydroxyguanine residues in DNA by X-irradiation. *Gann* (1984); 75(12):1037-9.

156. Moller, P., Cooke, M.S., Collins, A., Olinski, R., Rozalski, R., Loft, S.; Harmonising measurements of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in cellular DNA and urine. *Free Radic Res* (2012); 46(4):541-53.
157. Gedik, C.M., Collins, A.; Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study. *Faseb J.* (2005); 19(1):82-4.
158. Collins, A.R., Cadet, J., Möller, L., Poulsen, H.E., Viña, J.; Are we sure we know how to measure 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA from human cells? *Arch. Biochem. Biophys.* (2004); 423(1):57-65.
159. Collins, A.R., Oscoz, A.A., Brunborg, G., et al.; The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* (2008); 23(3):143-51.
160. Garcia, O., Mandina, T., Lamadrid, A.I., et al.; Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay. Results of an inter-laboratory scoring exercise with the use of silver staining. *Mutat Res* (2004); 556(1-2):25-34.
161. Zainol, M., Stoute, J., Almeida, G.M., Rapp, A., Bowman, K.J., Jones, G.D.; Introducing a true internal standard for the Comet assay to minimize intra- and inter-experiment variability in measures of DNA damage and repair. *Nucleic Acids Res* (2009); 37(22):e150.
162. Jensen, A., Lohr, M., Eriksen, L., et al.; Influence of the OGG1 Ser326Cys polymorphism on oxidatively damaged DNA and repair activity. *Free Radic Biol Med* (2012); 52(1):118-25.
163. Smith, C.C., O'Donovan, M.R., Martin, E.A.; hOGG1 recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDOIII. *Mutagenesis* (2006); 21(3):185-90.
164. Bergeron, F., Auvre, F., Radicella, J.P., Ravanat, J.L.; HO* radicals induce an unexpected high proportion of tandem base lesions refractory to repair by DNA glycosylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2010); 107(12):5528-33.
165. Rossner, P., Jr., Sram, R.J.; Immunochemical detection of oxidatively damaged DNA. *Free Radic Res* (2012); 46(4):492-522.
166. Toyokuni, S., Tanaka, T., Hattori, Y., et al.; Quantitative immunohistochemical determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by a monoclonal antibody N45.1: its application to ferric nitrilotriacetate-induced renal carcinogenesis model. *Lab Invest* (1997); 76(3):365-74.

167. Yarborough, A., Zhang, Y.J., Hsu, T.M., Santella, R.M.; Immunoperoxidase detection of 8-hydroxydeoxyguanosine in aflatoxin B1-treated rat liver and human oral mucosal cells. *Cancer Res* (1996); 56(4):683-8.
168. Chiou, C.C., Chang, P.Y., Chan, E.C., Wu, T.L., Tsao, K.C., Wu, J.T.; Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine and its analogs as DNA marker of oxidative stress: development of an ELISA and measurement in both bladder and prostate cancers. *Clin Chim Acta* (2003); 334(1-2):87-94.
169. Nehls, P., Seiler, F., Rehn, B., Greferath, R., Bruch, J.; Formation and persistence of 8-oxoguanine in rat lung cells as an important determinant for tumor formation following particle exposure. *Environ Health Perspect* (1997); 105 Suppl 5:1291-6.
170. Ravanat, J.L.; Chromatographic methods for the analysis of oxidatively damaged DNA. *Free Radic Res* (2012); 46(4):479-91.
171. Regulus, P., Spessotto, S., Gateau, M., Cadet, J., Favier, A., Ravanat, J.L.; Detection of new radiation-induced DNA lesions by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* (2004); 18(19):2223-8.
172. ESCODD; Measurement of DNA oxidation in human cells by chromatographic and enzymic methods. *Free Radical Biol. Med.* (2003); 34(8):1089-1099.
173. Cadet, J., Poulsen, H.; Measurement of oxidatively generated base damage in cellular DNA and urine. *Free Radic Biol Med* (2010); 48(11):1457-9.
174. Schmid, U., Stopper, H., Schweda, F., Queisser, N., Schupp, N.; Angiotensin II induces DNA damage in the kidney. *Cancer Res* (2008); 68(22):9239-46.
175. Schupp, N., Queisser, N., Wolf, M., et al.; Aldosterone causes DNA strand breaks and chromosomal damage in renal cells, which are prevented by mineralocorticoid receptor antagonists. *Horm Metab Res* (2010); 42(6):458-65.
176. Schupp, N., Schmid, U., Rutkowski, P., et al.; Angiotensin II-induced genomic damage in renal cells can be prevented by angiotensin II type 1 receptor blockage or radical scavenging. *Am J Physiol Renal Physiol* (2007); 292(5):F1427-34.
177. Hannken, T., Schroeder, R., Stahl, R.A., Wolf, G.; Angiotensin II-mediated expression of p27Kip1 and induction of cellular hypertrophy in renal tubular cells depend on the generation of oxygen radicals. *Kidney Int* (1998); 54(6):1923-33.

178. Hayashi, H., Kobara, M., Abe, M., et al.; Aldosterone nongenomically produces NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species and induces myocyte apoptosis. *Hypertens Res* (2008); 31(2):363-375.
179. Queisser, N., Schupp, N.; Aldosterone, oxidative stress, and NF-kappa B activation in hypertension-related cardiovascular and renal diseases. *Free Radic Biol Med* (2012); 53(2):314-327.
180. Frankenberg-Schwager, M.; Review of repair kinetics for DNA damage induced in eukaryotic cells in vitro by ionizing radiation. *Radiother Oncol* (1989); 14(4):307-20.
181. Collins, A.R., Gedik, C., Wood, S., et al.; Inter-laboratory Validation of Procedures for Measuring 8-oxo-7,8-dihydroguanine/8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in DNA. *Free Radical Res.* (2002); 36(3):239-245.
182. Sampath, H., McCullough, A.K., Lloyd, R.S.; Regulation of DNA glycosylases and their role in limiting disease. *Free Radic Res* (2012); 46(4):460-78.
183. Das, A., Hazra, T.K., Boldogh, I., Mitra, S., Bhakat, K.K.; Induction of the human oxidized base-specific DNA glycosylase NEIL1 by reactive oxygen species. *J Biol Chem* (2005); 280(42):35272-80.
184. Inoue, M., Shen, G.P., Chaudhry, M.A., Galick, H., Blaisdell, J.O., Wallace, S.S.; Expression of the oxidative base excision repair enzymes is not induced in TK6 human lymphoblastoid cells after low doses of ionizing radiation. *Radiat Res* (2004); 161(4):409-17.
185. Bourdat, A.G., Gasparutto, D., Cadet, J.; Synthesis and enzymatic processing of oligodeoxynucleotides containing tandem base damage. *Nucleic Acids Res* (1999); 27(4):1015-24.
186. Ravanat, J.L., Cadet, J., Douki, T.; Oxidatively generated DNA lesions as potential biomarkers of in vivo oxidative stress. *Curr Mol Med* (2012); 12(6):655-71.
187. Queisser, N., Amann, K., Hey, V., Habib, S.L., Schupp, N.; Blood pressure has only minor influence on aldosterone-induced oxidative stress and DNA damage in vivo. *Free Radic Biol Med* (2013); 54:17-25.
188. Grey, C.E., Adlercreutz, P.; Time and concentration dependence of Fenton-induced oxidation of dG. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* (2006); 25(3):259-78.
189. Fleming, A.M., Muller, J.G., Ji, I., Burrows, C.J.; Characterization of 2'-deoxyguanosine oxidation products observed in the Fenton-like system

- Cu(II)/H₂O₂/reductant in nucleoside and oligodeoxynucleotide contexts. *Org Biomol Chem* (2011); 9(9):3338-48.
190. Boldogh, I., Hajas, G., Aguilera-Aguirre, L., et al.; Activation of ras signaling pathway by 8-oxoguanine DNA glycosylase bound to its excision product, 8-oxoguanine. *J Biol Chem* (2012); 287(25):20769-73.
191. Russo, M.T., De Luca, G., Degan, P., et al.; Accumulation of the oxidative base lesion 8-hydroxyguanine in DNA of tumor-prone mice defective in both the Myh and Ogg1 DNA glycosylases. *Cancer Res* (2004); 64(13):4411-4.
192. Kawanishi, S., Hiraku, Y., Oikawa, S.; Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutat Res* (2001); 488(1):65-76.
193. Jacobs, A.C., Calkins, M.J., Jadhav, A., et al.; Inhibition of DNA glycosylases via small molecule purine analogs. *PLoS One* (2013); 8(12):e81667.
194. Li, Z., Malla, S., Shin, B., Li, J.M.; Battle against RNA oxidation: molecular mechanisms for reducing oxidized RNA to protect cells. *Wiley Interdiscip Rev RNA* (2014); 5(3):335-46.
195. Hofer, T., Seo, A.Y., Prudencio, M., Leeuwenburgh, C.; A method to determine RNA and DNA oxidation simultaneously by HPLC-ECD: greater RNA than DNA oxidation in rat liver after doxorubicin administration. *Biol Chem* (2006); 387(1):103-11.
196. Gan, W., Nie, B., Shi, F., et al.; Age-dependent increases in the oxidative damage of DNA, RNA, and their metabolites in normal and senescence-accelerated mice analyzed by LC-MS/MS: urinary 8-oxoguanosine as a novel biomarker of aging. *Free Radic Biol Med* (2012); 52(9):1700-7.
197. Takagi, Y., Setoyama, D., Ito, R., Kamiya, H., Yamagata, Y., Sekiguchi, M.; Human MTH3 (NUDT18) protein hydrolyzes oxidized forms of guanosine and deoxyguanosine diphosphates: comparison with MTH1 and MTH2. *J Biol Chem* (2012); 287(25):21541-9.
198. Delaney, S., Jarem, D.A., Volle, C.B., Yennie, C.J.; Chemical and biological consequences of oxidatively damaged guanine in DNA. *Free Radic Res* (2012); 46(4):420-41.
199. Moriya, M., Grollman, A.P.; Mutations in the mutY gene of *Escherichia coli* enhance the frequency of targeted G:C-->T:a transversions induced by a single 8-oxoguanine residue in single-stranded DNA. *Mol Gen Genet* (1993); 239(1-2):72-6.

200. Moriya, M., Ou, C., Bodepudi, V., Johnson, F., Takeshita, M., Grollman, A.P.; Site-specific mutagenesis using a gapped duplex vector: a study of translesion synthesis past 8-oxodeoxyguanosine in *E. coli*. *Mutat Res* (1991); 254(3):281-8.
201. Hailer, M.K., Slade, P.G., Martin, B.D., Rosenquist, T.A., Sugden, K.D.; Recognition of the oxidized lesions spiroiminodihydantoin and guanidinohydantoin in DNA by the mammalian base excision repair glycosylases NEIL1 and NEIL2. *DNA Repair (Amst)* (2005); 4(1):41-50.
202. Delaney, S., Neeley, W.L., Delaney, J.C., Essigmann, J.M.; The substrate specificity of MutY for hyperoxidized guanine lesions in vivo. *Biochemistry* (2007); 46(5):1448-1455.
203. Fiebeler, A., Schmidt, F., Muller, D.N., et al.; Mineralocorticoid receptor affects AP-1 and nuclear factor-kappaB activation in angiotensin II-induced cardiac injury. *Hypertension* (2001); 37(2 Pt 2):787-93.
204. Viridis, A., Neves, M.F., Amiri, F., Viel, E., Touyz, R.M., Schiffrin, E.L.; Spironolactone improves angiotensin-induced vascular changes and oxidative stress. *Hypertension* (2002); 40(4):504-10.
205. Wilcox, C.S.; Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress. *Pharmacol Ther* (2010); 126(2):119-45.
206. Jansen, R.S., Rosing, H., Schellens, J.H., Beijnen, J.H.; Mass spectrometry in the quantitative analysis of therapeutic intracellular nucleotide analogs. *Mass Spectrom Rev* (2011); 30(2):321-43.
207. Wu, L.L., Chiou, C.C., Chang, P.Y., Wu, J.T.; Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta* (2004); 339(1-2):1-9.
208. Pursell, Z.F., McDonald, J.T., Mathews, C.K., Kunkel, T.A.; Trace amounts of 8-oxo-dGTP in mitochondrial dNTP pools reduce DNA polymerase gamma replication fidelity. *Nucleic Acids Res* (2008); 36(7):2174-81.
209. Nie, B., Gan, W., Shi, F., et al.; Age-dependent accumulation of 8-oxoguanine in the DNA and RNA in various rat tissues. *Oxid Med Cell Longev* (2013); 2013:303181.
210. Loft, S., Velthuis-te Wierik, E.J., van den Berg, H., Poulsen, H.E.; Energy restriction and oxidative DNA damage in humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (1995); 4(5):515-9.

211. Richter, S.H., Garner, J.P., Würbel, H.; Environmental standardization: cure or cause of poor reproducibility in animal experiments? *Nat Methods* (2009); 6(4):257-261.
212. Lemarie, C.A., Paradis, P., Schiffrin, E.L.; New insights on signaling cascades induced by cross-talk between angiotensin II and aldosterone. *J Mol Med (Berl)* (2008); 86(6):673-8.
213. Menon, M.C., Chuang, P.Y., He, C.J.; The glomerular filtration barrier: components and crosstalk. *Int J Nephrol* (2012); 2012:749010.
214. Zhu, Z., Zhang, S.H., Wagner, C., et al.; Angiotensin AT1B receptor mediates calcium signaling in vascular smooth muscle cells of AT1A receptor-deficient mice. *Hypertension* (1998); 31(5):1171-7.
215. Ryan, M.J., Didion, S.P., Mathur, S., Faraci, F.M., Sigmund, C.D.; Angiotensin II-induced vascular dysfunction is mediated by the AT1A receptor in mice. *Hypertension* (2004); 43(5):1074-9.
216. Wolf, G.; [The renin-angiotensin-aldosterone system -- more complex as previously thought]. *Med Klin (Munich)* (2005); 100(8):471-7.
217. Moon, J.Y.; Recent Update of Renin-angiotensin-aldosterone System in the Pathogenesis of Hypertension. *Electrolyte Blood Press* (2013); 11(2):41-5.
218. Montezano, A.C., Touyz, R.M.; Oxidative stress, Noxs, and hypertension: experimental evidence and clinical controversies. *Ann Med* (2012); 44 Suppl 1:S2-16.
219. Cave, A., Grieve, D., Johar, S., Zhang, M., Shah, A.M.; NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in cardiac pathophysiology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* (2005); 360(1464):2327-34.
220. Dikalova, A.E., Gongora, M.C., Harrison, D.G., Lambeth, J.D., Dikalov, S., Griending, K.K.; Upregulation of Nox1 in vascular smooth muscle leads to impaired endothelium-dependent relaxation via eNOS uncoupling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2010); 299(3):H673-9.
221. Fuller, P.J., Yao, Y., Yang, J., Young, M.J.; Mechanisms of ligand specificity of the mineralocorticoid receptor. *J Endocrinol* (2012); 213(1):15-24.
222. Queisser, N., Happ, K., Link, S., et al.; Aldosterone induces fibrosis, oxidative stress and DNA damage in livers of male rats independent of blood pressure changes. *Toxicol Appl Pharmacol* (2014).

223. Sies, H.; Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* (1993); 215(2):213-9.
224. Giorgio, M., Trinei, M., Migliaccio, E., Pelicci, P.G.; Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol* (2007); 8(9):722-8.
225. Somjen, D., Kohen, F., Jaffe, A., Amir-Zaltsman, Y., Knoll, E., Stern, N.; Effects of gonadal steroids and their antagonists on DNA synthesis in human vascular cells. *Hypertension* (1998); 32(1):39-45.
226. Zhang, Y., Kensler, T.W., Cho, C.G., Posner, G.H., Talalay, P.; Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1994); 91(8):3147-50.
227. Guerrero-Beltran, C.E., Mukhopadhyay, P., Horvath, B., et al.; Sulforaphane, a natural constituent of broccoli, prevents cell death and inflammation in nephropathy. *J Nutr Biochem* (2012); 23(5):494-500.
228. Kansanen, E., Kuosmanen, S.M., Leinonen, H., Levonen, A.L.; The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol* (2013); 1(1):45-9.
229. Piberger, A.L., Koberle, B., Hartwig, A.; The broccoli-born isothiocyanate sulforaphane impairs nucleotide excision repair: XPA as one potential target. *Arch Toxicol* (2014); 88(3):647-58.
230. Moller, P., Loft, S.; Oxidative damage to DNA and lipids as biomarkers of exposure to air pollution. *Environ Health Perspect* (2010); 118(8):1126-36.
231. Hussain, S.P., Harris, C.C.; Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int J Cancer* (2007); 121(11):2373-80.
232. Birney, E., Stamatoyannopoulos, J.A., Dutta, A., et al.; Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* (2007); 447(7146):799-816.
233. Honda, K., Smith, M.A., Zhu, X., et al.; Ribosomal RNA in Alzheimer disease is oxidized by bound redox-active iron. *J Biol Chem* (2005); 280(22):20978-86.
234. Nunomura, A., Honda, K., Takeda, A., et al.; Oxidative damage to RNA in neurodegenerative diseases. *J Biomed Biotechnol* (2006); 2006(3):82323.
235. Danser, A.H.; Local renin–angiotensin systems: the unanswered questions. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* (2003); 35(6):759-768.

236. Lopez-Sendon, J., Swedberg, K., McMurray, J., et al.; Expert consensus document on angiotensin converting enzyme inhibitors in cardiovascular disease. The Task Force on ACE-inhibitors of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* (2004); 25(16):1454-70.
237. Urata, H., Healy, B., Stewart, R.W., Bumpus, F.M., Husain, A.; Angiotensin II-forming pathways in normal and failing human hearts. *Circ Res* (1990); 66(4):883-90.
238. Hollenberg, N.K., Fisher, N.D., Price, D.A.; Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue: evidence from comparative pharmacological interruption of the renin system. *Hypertension* (1998); 32(3):387-92.
239. Bray, G.A.; Reciprocal relation of food intake and sympathetic activity: experimental observations and clinical implications. *Int J Obes Relat Metab Disord* (2000); 24 Suppl 2:S8-17.
240. Nonogaki, K.; New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia* (2000); 43(5):533-49.
241. Ikeda, F., Azuma, K., Ogihara, T., et al.; Angiotensin II type 1 receptor blocker reduces monocyte adhesion to endothelial cells in spontaneously hypertensive rats. *Endocr J* (2007); 54(4):605-12.
242. Karin, M., Cao, Y., Greten, F.R., Li, Z.W.; NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* (2002); 2(4):301-10.
243. Brennan, P., O'Neill, L.A.; 2-mercaptoethanol restores the ability of nuclear factor kappa B (NF kappa B) to bind DNA in nuclear extracts from interleukin 1-treated cells incubated with pyrrolidine dithiocarbamate (PDTTC). Evidence for oxidation of glutathione in the mechanism of inhibition of NF kappa B by PDTTC. *Biochem J* (1996); 320 (Pt 3):975-81.
244. Unnikrishnan, A., Raffoul, J.J., Patel, H.V., et al.; Oxidative stress alters base excision repair pathway and increases apoptotic response in apurinic/aprimidinic endonuclease 1/redox factor-1 haploinsufficient mice. *Free Radic Biol Med* (2009); 46(11):1488-99.
245. Ivan, A.L., Campanini, M.Z., Martinez, R.M., et al.; Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits UVB-induced skin inflammation and oxidative stress in hairless mice and exhibits antioxidant activity in vitro. *J Photochem Photobiol B* (2014); 138:124-33.

246. Furuta, S., Ortiz, F., Zhu Sun, X., Wu, H.H., Mason, A., Momand, J.; Copper uptake is required for pyrrolidine dithiocarbamate-mediated oxidation and protein level increase of p53 in cells. *Biochem J* (2002); 365(Pt 3):639-48.
247. Queisser, N., Schupp, N., Stopper, H., Schinzel, R., Oteiza, P.I.; Aldosterone increases kidney tubule cell oxidants through calcium-mediated activation of NADPH oxidase and nitric oxide synthase. *Free Radic Biol Med* (2011); 51(11):1996-2006.
248. Squadrito, G.L., Pryor, W.A.; Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radic Biol Med* (1998); 25(4-5):392-403.
249. Cui, L., Ye, W., Prestwich, E.G., et al.; Comparative analysis of four oxidized guanine lesions from reactions of DNA with peroxynitrite, singlet oxygen, and gamma-radiation. *Chem Res Toxicol* (2013); 26(2):195-202.
250. Li, N., Zhang, G., Yi, F.X., Zou, A.P., Li, P.L.; Activation of NAD(P)H oxidase by outward movements of H⁺ ions in renal medullary thick ascending limb of Henle. *Am J Physiol Renal Physiol* (2005); 289(5):F1048-56.

9 Anhang

9.1 Interventionen gegen Angiotensin II im Tierversuch mit C57BL/6-Mäusen

Der Urin der C57BL/6-Mäuse aus dem Interventionsversuch wurde gesammelt. 60 µl des Urins wurden 1:1 mit internem Standard versetzt (3.2.5.7) (111). Die Stressmarker wurden mit der HPLC-MS/MS-Methode (3.2.5.11) nachgewiesen. Es werden Ergebnisse der Messung von 8-oxodG und 8-oxoGuo diskutiert. 8-oxoGua konnte nicht detektiert werden. Die Exkretion von 8-oxodG und 8-oxoGuo in der Ramipril/Angiotensin-II-Gruppe war nicht signifikant niedriger als in der Angiotensin-II-Gruppe (Abbildung 46). In der Hydralazin/Angiotensin-II-Gruppe nahm die Exkretion von 8-oxoGuo im Vergleich zur Angiotensin-II-Gruppe nicht signifikant zu, während sie für 8-oxodG auf gleichem Niveau blieb (Abbildung 46).

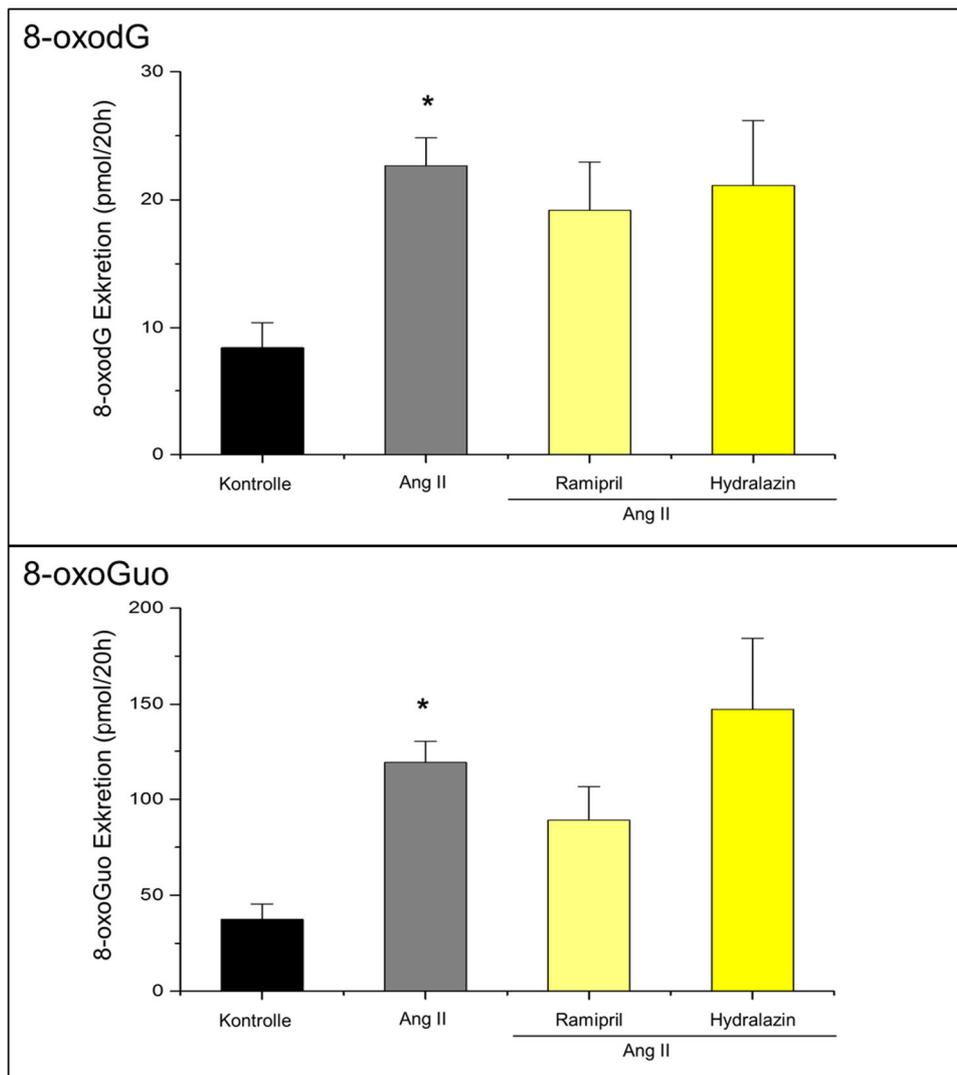


Abbildung 46

HPLC-MS/MS-Nachweis von 8-oxodG und 8-oxoGuo im 20-h-Urin von C57BL/6-Mäusen aus dem Interventionsversuch. Der Urin wurde 1:1 mit internem Standard verdünnt. Untersucht wurden die Gruppen: Kontrolle, Angiotensin-II, Ramipril/Angiotensin-II, und Hydralazin/Angiotensin-II. Die Ramipril/Angiotensin-II- und die Hydralazin/Angiotensin II-Gruppe bestanden je aus 5 Tieren. * $p \leq 0,05$ gegen Kontrollgruppe. Ang II = Angiotensin II.

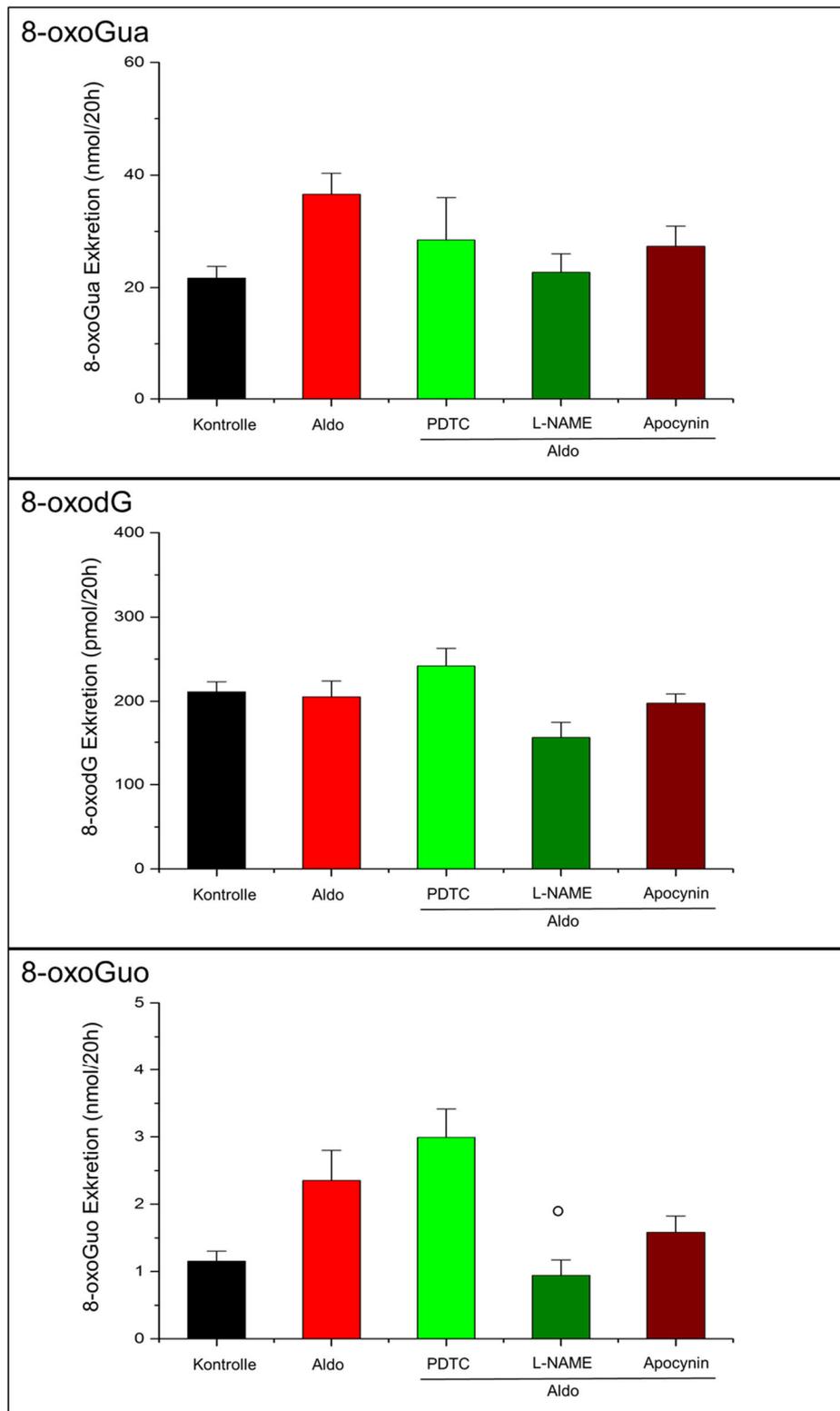
Ramipril ist ein ACE-Hemmer, welcher die Bildung von Angiotensin II aus Angiotensin I und den Abbau von Bradykinin blockiert (235). Dabei kommt es zu einem Anstieg von zirkulierendem Angiotensin I und Renin im Plasma. Angiotensin II wird vermehrt durch andere Enzyme gebildet und aus Angiotensin I können weitere aktive Peptide, wie Angiotensin-(1-7), gebildet werden (14). Lopez-Sendon et al. (2004) zeigten, dass bei einer längeren Behandlung mit ACE-Hemmer die Wirkungen von Angiotensin II wieder vermehrt auftreten kann (236).

Ramipril bewirkte keine Abnahme des Bluthochdrucks, konnte aber den DNA-Schaden (Comet-Assay) sowie den oxidativen Stress leicht verringern (111). Die Exkretionsraten von 8-oxodG und 8-oxoGuo nach Behandlung mit Ramipril zeigten, dass die Inhibierung von ACE nicht den durch Angiotensin II ausgelösten oxidativen Schaden verhindern konnte. ACE-unabhängige Signalwege können für die Bildung von 40 % Angiotensin II in der Niere verantwortlich sein. Im Herzen ist nicht ACE, sondern Chymase für die Umwandlung von Angiotensin I in Angiotensin II zuständig, welches von Ramipril nicht inhibiert wird (237, 238). Zudem ist zu beachten, dass Ramipril die Bildung von Angiotensin II aus Angiotensin I verhindert und nicht die Wirkung von Angiotensin II inhibiert. Da Angiotensin II in einer erhöhten Konzentration vorliegt, wird durch Rückkopplung die Ausschüttung von Renin inhibiert und so auch die Bildung von Angiotensin II (14). Die Wirkung von Ramipril ist daher gering, da durch die Inhibierung der Renin-Ausschüttung durch Angiotensin II bereits die Bildung von Angiotensin II im Körper verringert wird. Der leichte Rückgang der Exkretionsrate von 8-oxodG und 8-oxoGuo in der Ramipril/Angiotensin-II-Gruppe im Vergleich zur Angiotensin-II-Gruppe könnte so erklärt werden (Abbildung 42).

Hydralazin wurde als Vasodilatator eingesetzt und sollte den erhöhten Blutdruck, ausgelöst durch Angiotensin II, senken. So sollte gezeigt werden, ob der erhöhte Blutdruck oder Angiotensin II für den DNA-Schaden verantwortlich ist. Hydralazin konnte den Blutdruck bis zum 12. Messtag stetig senken, im weiteren Versuchsverlauf stieg dieser jedoch wieder auf das Niveau der Angiotensin-II-Gruppe an. Auch eine Erhöhung der Hydralazin-Konzentration konnte den Blutdruck nicht wieder senken (111). In der Hydralazin/Angiotensin-II-Gruppe zeigte sich daher keine Abnahme der Exkretionsrate von 8-oxodG im Vergleich zur Angiotensin-II-Gruppe. Der Anstieg der Exkretion von 8-oxoGuo könnte durch eine verminderte Aufnahme des Futters sowie daraus folgend einen erhöhten Aufwand für die Energieregulierung erklärt werden (239, 240). Ikeda et al. zeigten, dass Hydralazin eine Senkung des Blutdrucks bewirkt, aber die Exkretionsrate von 8-oxodG im Vergleich zur Kontrolle nicht abnimmt (241). Dies bestätigt die Annahme, dass der oxidative DNA-Schaden durch Angiotensin II entsteht und nicht durch den erhöhten Blutdruck.

9.2 Interventionen gegen Aldosteron im Tierversuch mit SD-Ratten

Der Urin der SD-Ratten aus dem Tierversuch zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 wurde gesammelt und 60 µl davon 1:1 mit internem Standard versetzt (3.2.5.7) (113). Die Stressmarker wurden mit der HPLC-MS/MS-Methode (3.2.5.12) nachgewiesen. Die Exkretion von 8-oxoGua war in allen Behandlungsgruppen nicht signifikant niedriger als in der Aldo-Gruppe (Abbildung 43). 8-oxodG und 8-oxoGuo wurden in der PDTC/Aldosteron-Gruppe mit einer nicht signifikant höheren Exkretionsrate ausgeschieden als in der Aldosteron-Gruppe (Abbildung 47). Die Apocynin/Aldosteron-Gruppe zeigte für die Exkretionsrate von 8-oxodG keine Veränderung im Vergleich zur Aldosteron-Gruppe, für 8-oxoGuo nahm die Exkretion jedoch nicht signifikant ab (Abbildung 47). L-NAME konnte die Exkretionsrate von 8-oxodG und 8-oxoGuo jeweils senken im Vergleich zur Aldosteron-Gruppe, für 8-oxoGuo war die Verringerung statistisch signifikant.

**Abbildung 47**

HPLC-MS/MS-Nachweis von 8-oxoGua, 8-oxodG und 8-oxoGuo im 20-h-Urin von SD-Ratten. Der Urin wurde 1:1 mit internem Standard verdünnt. Die 5 Gruppen waren: Kontrolle, Aldosteron, PDTC/Aldosteron, L-NAME/Aldosteron und Apocynin/Aldosteron. Zur Berechnung der Exkretionsrate wurde das Urinvolumen über 20 h bestimmt. ○ $p \leq 0,05$ gegen Aldosteron-Gruppe. Aldo = Aldosteron

PDTC ist ein Inhibitor für NF- κ B, welcher durch Aldosteron aktiviert wird, und sollte dessen Regulierung der Immunantwort und Entzündungen unterbinden. Weiterhin ist die Untersuchung von NF- κ B-Signalwegen für die Krebsforschung von Bedeutung (106, 242). Zudem kann PDTC oxidierend in Zellen wirken (243). PDTC wirkt im ganzen Körper der SD-Ratte und nicht spezifisch in der Niere, wo Aldosteron hauptsächlich aktiv ist. Unter Berücksichtigung, dass im Urin die im ganzen Körper gebildeten oxidierten Nukleotide gesammelt sind, ist die Diskussion der Wirkung von PDTC komplex (100). NF- κ B spielt eine Rolle bei der Basenexzisionsreparatur und so könnte eine Abnahme der Exkretion von 8-oxoGua, dem Produkt der Basenexzisionsreparatur, erklärt werden, wenn die Wirkung von NF- κ B durch PDTC inhibiert wird (244). Die Anstiege der Exkretionsraten von 8-oxodG und 8-oxoGuo in der PDTC/Aldosteron-Gruppe könnten auf die oxidierenden Eigenschaften von PDTC zurückgeführt werden (243). Im Gegenzug zeigten Ivan et al., dass PDTC *in vitro* antioxidative Kapazitäten besitzt (245). Die Wirkung von PDTC ist vielfältig, zum Beispiel zeigten Furuta et al. (2002), dass Kupfer in Verbindung mit PDTC das Protein p53 oxidieren kann, welches neben weiteren Signalwegen auch die DNA-Reparatur reguliert (246). Diese Eigenschaft würde wiederum einen Anstieg der Exkretionsraten erklären können. Weitere Untersuchungen der mit PDTC behandelten SD-Ratten stehen noch aus.

In erhöhten Konzentrationen aktiviert Aldosteron die Stickstoffmonoxid-Synthase und kann nitrosativen Stress in Tubuluszellen der Niere auslösen (247). L-NAME ist ein Inhibitor der Stickstoffmonoxid-Synthase und mit der L-NAME/Aldosteron-Gruppe sollte dessen Wirkung untersucht werden. Stickstoffmonoxid (NO \bullet) bildet mit O $_2^{\bullet-}$ das Peroxynitrit-Anion (ONOO $^-$), welches sehr viel reaktiver ist als die beiden Ausgangsstoffe (248). ONOO $^-$ reagiert mit der DNA und kann dort 8-oxoGua bilden, was bisher nur in wässriger DNA-Lösung gezeigt werden konnte (249). L-NAME bewirkte eine Abnahme der Exkretionsrate von 8-oxoGua, 8-oxodG und 8-oxoGuo im Vergleich zur Aldosteron-Gruppe. Für 8-oxodG und 8-oxoGuo fielen die Exkretionsraten unter das Niveau der Kontrollgruppe. Dies kann damit erklärt werden, dass L-NAME auch den von Aldo unabhängigen nitrosativen Stress unterbindet.

In erhöhter Konzentration aktiviert Aldosteron die NADPH-Oxidase und sorgt so für oxidativen Stress in Tubuluszellen der Niere (247). Apocynin ist ein sehr selektiver Inhibitor der NADPH-Oxidase (250). Mit Apocynin sollte die durch Aldo aktivierte

NADPH-Oxidase inhibiert und der oxidative Stress verringert werden. Die Exkretionsraten von 8-oxoGua und 8-oxoGuo sanken in der Apocynin/Aldosteron-Gruppe im Vergleich zur Aldosteron-Gruppe. Diese Nachweise bestätigen, dass Apocynin den durch NADPH-Oxidase ausgelösten oxidativen DNA-Schaden verhindern konnte. Für 8-oxodG konnte in der Apocynin/Aldosteron-Gruppe keine Veränderung der Exkretionsrate im Vergleich zur Aldosteron-Gruppe detektiert werden. Dies ist nicht überraschend, da Aldosteron keine Wirkung auf die Exkretion von 8-oxodG hatte, konnte der Inhibitor auch keine Wirkung verhindern. Weitere Untersuchungen, die dieses Ergebnis bestätigen, werden mit den SD-Ratten der Apocynin/Aldosteron-Gruppe noch durchgeführt.

Danksagung

Ich möchte mich bei Frau PD Dr. Nicole Schupp für die Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit am Institut für Toxikologie anfertigen zu dürfen. Vielen Dank, Nicole, für die großartige Betreuung, die Hilfestellungen und die Geduld beim Korrigieren.

Außerdem bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe aus der Fakultät für Chemie und Pharmazie für die Bereitschaft, meine Doktorarbeit als Erstgutachter zu betreuen.

Vielen Dank auch an Frau PD Dr. Angela Mally und Herrn Prof. Dr. Wolfgang Dekant vom Institut für Toxikologie für die Möglichkeit, meine HPLC-MS/MS-Messungen an ihren Geräten durchzuführen.

Ein besonderes Dankeschön geht aber an Bankoglu Eylül, die mir in vielen Diskussionen rund um 8-oxodG weitergeholfen hat und auch sonst immer ein offenes Ohr für mich hatte. Auch bedanken möchte ich mich bei Silvana Wunram, Laura Vogel, Miriam Kral und Elisabeth Stein, die mich bei vielen Arbeiten im Labor sehr unterstützt haben.

Ich bedanke mich bei allen Kollegen vom dritten Stock der Toxikologie für die schöne Arbeitsatmosphäre. Ein besonderer Dank geht auch an meine Korrekturleser, Frau Dr. Nina Queisser, Patricia Bellwon und Anna Zimnol, die so einige Verbesserungsvorschläge eingebracht haben, und Nataly Bittner, die mich an der HPLC-MS/MS mit viel Geduld eingewiesen und immer eine Lösung für meine Messprobleme hatte.

Auch möchte ich mich sehr bei meiner Frau Katharina Mandel bedanken, die mich immer motiviert und unterstützt hat. Außerdem geht ein großer Dank an meine Schwester Katharina Mandel, die mir durch ihre Korrekturarbeiten sehr weitergeholfen hat. Zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie für die Unterstützung in den letzten drei Jahren.