

INSTITUT FÜR WASSERCHEMIE UND CHEMISCHE BALNEOLOGIE  
LEHRSTUHL FÜR HYDROGEOLOGIE, HYDROCHEMIE UND UMWELTANALYTIK  
DER TECHNISCHEN UNIVERSITÄT MÜNCHEN

# Analyse und Reaktivität von Proteinen in atmosphärischen Aerosolen und Entwicklung neuer Immunoassays zur Messung von Nitroproteinen

Thomas Franze

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Univ.-Prof. Dr. M. Schuster
Prüfer der Dissertation:	1. Univ.-Prof. Dr. R. Nießner
	2. Univ.-Prof. Dr. Dr. K.-S. Boos, Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 28.06.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 26.07.2004 angenommen.



Fort, auf den Peißenberg!  
Da steigest Du auf Newtons Pfad,  
In der Natur geheimen Rath,  
Wohin Dich nur die Meßkunst leitet:  
Oh Meßkunst, Zaum der Phantasie,  
Wer Dir folget, irret nie,  
Wer ohne Dich will geh'n, der gleitet.

Churfürstlicher Geheimrat von Lori  
(1723 - 1787)

Gegen Ende des 18. Jahrhunderts gelangte die Bewegung der Aufklärung, ursprünglich aus Frankreich kommend, über Norddeutschland nach Bayern. Mit dieser Strömung kam auch die Begeisterung für die Naturforschung. So geschah es, dass Kurfürst Max Joseph III. im Jahr 1772, auf Anraten des Geheimrats von Lori, dem Stift Rottenbuch befahl, eine Sternwarte auf dem Hohenpeißenberg einzurichten. Max Josephs Nachfolger, Kurfürst Karl Theodor, veranlasste die Einrichtung eines meteorologischen Observatoriums. Ab 1. Januar 1781 begannen die Rottenbacher Chorherren mit kontinuierlichen meteorologischen Beobachtungen auf dem Hohenpeißenberg. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden Messungen am meteorologischen Observatorium Hohenpeißenberg durchgeführt.



## Danksagung

---

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2000 bis Dezember 2003 am Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie der Technischen Universität München durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn o. Univ.-Prof. Dr. Reinhard Nießner für die Themenstellung, die Bereitstellung technischer und finanzieller Mittel, die wissenschaftliche Betreuung und die weitgehenden Freiheiten zur selbstständigen Organisation und Durchführung dieser Arbeit.

Ganz besonders möchte ich Herrn Dr. Ulrich Pöschl danken, und zwar für die interessante Themenstellung, die Bereitstellung technischer und finanzieller Mittel, die wissenschaftliche Betreuung und die hilfreichen und ausführlichen Diskussionen sowie nicht zuletzt für die großzügige Ermöglichung des Besuchs zahlreicher Fachtagungen. Weiterhin danke ich ihm für die unermüdliche Motivation seiner Mitarbeiter und für die nette Atmosphäre während meiner gesamten Zeit am Institut.

Herrn PD Dr. Michael Weller danke ich für die ausgezeichnete Betreuung und Beratung insbesondere bei den Immunoassays, aber auch bei allen sonstigen Fragen der chemischen Analytik, die zahlreichen Hilfestellungen und wertvollen Diskussionen.

Ich danke Ramona Leube für die nette und freundliche Zusammenarbeit und ihre besonders gewissenhafte, fleißige und ausdauernde Hilfe bei der praktischen Durchführung dieser Arbeit und der überaus genauen Dokumentation der Einzelheiten.

Weiterhin danke ich den übrigen Kollegen aus der Aerosolgruppe, speziell Susanna Mahler, Christian Schauer und Axel Zerrath, mit denen ich am längsten zusammengearbeitet habe. Ebenso gilt mein Dank Kerstin Krause für die kompetente Etablierung der Fluoreszenz-Methode zur Aminosäureanalyse und für die Messung einiger Filterproben mit diesem Verfahren. Weiterhin danke ich Tobias Fehrenbach für die Übernahme und Fortsetzung der in dieser Arbeit begonnenen Themen und für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Außerdem danke ich Christoph Adelhelm, Swati Bhowmik, Michael Elsässer, Stefan Kamm, Armin Messerer, Jewgenij Mikhailov, Dieter Rothe und Ulrike Schaller für ihre Kollegialität und die gute Zusammenarbeit.

Auch allen anderen Mitarbeitern am IWC gebührt ein herzliches Dankeschön, für die angenehme Atmosphäre und die Unterstützung dieser Arbeit, namentlich möchte ich

dabei erwähnen: Matthias Alte, Petra Degelmann, Andreas Exner, Herbert Fink, Ralf Klein, Lutz Krämer, Thomas Letzel, Marion Lackhoff, Harald Prestel, Thomas Schmid und Christine Sternkopf. Aus der Bioanalytik-Gruppe danke ich Barbara Fall für das Überlassen der Humanseren und die diesbezügliche Einweisung. Frau Birgit Apel danke ich für die freundliche Messung der Anionen, Herrn Joachim Langer für die Messung der WSOC-Proben am TOC-Analysator.

Ich danke zudem:

Meinen Praktikanten Sebastian Bauer, Helena Keller, Oliver Lang, Lina Lässig und Maike Müller, die nicht unwesentlich zum Fortschritt dieser Arbeit beigetragen haben;

Herrn Harald Berresheim vom Meteorologischen Institut des Deutschen Wetterdienstes für die Bereitstellung der Infrastruktur zur Probenahme am Hohenpeißenberg;

Herrn Manfred Weber vom Bayerischen Landesamt für Umweltschutz und dem Institut für Toxikologie und Umwelthygiene an der TU München für die freundliche Überlassung der meteorologischen Messdaten und Spurengasmessdaten und für die zur Verfügung gestellte Infrastruktur zur Probenahme am Luise-Kiesselbach-Platz;

der Firma Alexis Corporation, Grünberg, für die kostenlose Überlassung einer Probe des Antikörpers mAk 39B6, mit der sämtliche in dieser Arbeit beschriebenen Experimente mit diesem Antikörper durchgeführt wurden;

Herrn Wolfgang Walcher vom Institut für Analytische Chemie und Radiochemie der Leopold-Franzens-Universität in Innsbruck und Prof. Dr. Christian Huber vom Institut für Instrumentelle Analytik und Bioanalytik der Universität des Saarlandes für die Zusammenarbeit bei der Messung von Nitro-BSA mittels LC-MS/MS;

und Herrn Eckhart Schultz vom Deutschen Wetterdienst in Freiburg i. Breisgau für die Bereitstellung von Filterproben.

Besonders möchte ich meinen Eltern und meiner gesamten Familie danken, die mir das Chemie-Studium ermöglicht haben und mir während dieser Arbeit kontinuierlich Motivation und Unterstützung gegeben haben. Meiner Schwester Doris danke ich zusätzlich für das überaus genaue Korrekturlesen dieser Arbeit. Ich danke meinen Freunden für ihre aufmunternde Unterstützung und dabei zusätzlich Roxana für ihre Hilfe und Ideen zur Verwendung von  $\text{\LaTeX}$  2 $\epsilon$ .

## Publikationsliste

Zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit waren bereits wesentliche Teile des Inhalts in Fachzeitschriften wie folgt veröffentlicht:

T. Franze, M. G. Weller, R. Niessner, U. Pöschl. Comparison of Nitrotyrosine Antibodies and Development of Immunoassays for the Detection of Nitrated Proteins.

*Analyst*, 129, DOI: 10.1039/b402624a, im Druck.

T. Franze, M. G. Weller, R. Niessner, U. Pöschl. Enzyme Immunoassays for the Investigation of Protein Nitration by Air Pollutants. *Analyst*, 128:824-831, 2003.

W. Walcher, T. Franze, M. G. Weller, U. Pöschl, C. G. Huber. Liquid- and Gas-Phase Nitration of Bovine Serum Albumin Studied by LC-MS and LC-MSMS Using Monolithic Columns. *J. Proteome Res.*, 2:534-542, 2003.



## Tagungsbeiträge (Auswahl)

T. Franze, K. Krause, R. Niessner, U. Pöschl. Proteins and Amino Acids in Air Particulate Matter. *J. Aerosol Sci.*, 34, S1:777-778, 2003.

T. Franze, R. Niessner, U. Pöschl. Protein Analysis in Aerosol Samples. *Euroanalysis 12, Abstracts of the Scientific Contributions*, P2-173, p. 598, Gesellschaft Deutscher Chemiker, Dortmund, 2002.

T. Franze, R. Niessner, U. Pöschl. Analysis of Proteins in Atmospheric Aerosols. *Bioaerosols Workshop*, GfA, Karlsruhe, 2002.

T. Franze, A. Zerrath, K. Krause, M. G. Weller, R. Niessner, U. Pöschl. Analysis of Biopolymers in Atmospheric Aerosol Samples, *NOSA Aerosol Symposium*, Nordic Aerosol Society, Lund, 2001.

T. Franze, A. Zerrath, M. G. Weller, R. Niessner, U. Pöschl. Analysis of Biopolymers in Road Dust and Atmospheric Aerosol Samples. *J. Aerosol Sci.*, 32, S1:501-502, 2001.

U. Pöschl, T. Franze, E. Mikhailov, U. Schaller, C. Schauer, A. Zerrath. Carbonaceous Components of Atmospheric Aerosols: Chemical Composition, Reactivity, and Water Vapor Interactions, *J. Aerosol Sci.*, 34, S2:1389-1390, 2003.

K. Krause, T. Franze, A. Zerrath, R. Niessner, U. Pöschl. Chemical Analysis of Biopolymers in Atmospheric Aerosols. *Transport and Chemical Transformation in the Troposphere - Proceedings of EUROTRAC Symposium 2002*, P.M. Midgley, M. Reuther, M. Williams (Editors), GUEST-11, pp. 1-4, Markgraf Verlag, Weikersheim, 2002.

A. Zerrath, K. Krause, T. Franze, C. Schauer, A. Messerer, S. Kamm, R. Niessner, U. Pöschl. Physical and Chemical Characterisation of Alpine Aerosols at the GAW Observatory Schneefernerhaus on Mount Zugspitze. *Transport and Chemical Transformation in the Troposphere - Proceedings of EUROTRAC Symposium 2002*, P.M. Midgley, M. Reuther, M. Williams (Editors), GUEST-22, pp. 1-4, Markgraf Verlag, Weikersheim, 2002.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>XIII</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Allgemeiner Teil</b>	<b>5</b>
2.1 Zusammensetzung der Atmosphäre . . . . .	5
2.1.1 Gasphase . . . . .	5
2.1.2 Partikelphase . . . . .	6
2.2 Proteine und Nitroproteine . . . . .	7
2.2.1 Zunahme von Allergien und mögliche Zusammenhänge mit verkehrbedingten Emissionen . . . . .	7
2.2.2 Bedeutung, Vorkommen und analytische Methoden für Nitrotyrosin und Nitroproteine . . . . .	9
2.2.3 Reaktion von Proteinen mit Ozon, NO <sub>2</sub> , RNS und Nitrierungsreagenzien . . . . .	11
2.3 Proteinquantifizierung . . . . .	12
2.3.1 Färbetests . . . . .	13
2.3.2 Alternative Methoden . . . . .	15
2.4 Aminosäuren und Aminosäureanalytik . . . . .	16
2.4.1 Proteinhydrolyse . . . . .	17
2.4.2 Analytik der Aminosäuren . . . . .	17
2.5 Immunologische Methoden . . . . .	20

---

2.5.1	Antikörper . . . . .	20
2.5.2	Immunoassays . . . . .	23
2.5.3	Auswertung der photometrischen Immunoassay-Messdaten . . . . .	30
<b>3</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>33</b>
3.1	Sammeln von Umweltproben . . . . .	33
3.1.1	Hochdurchsatz-Filtersammler . . . . .	33
3.1.2	Niedrigdurchsatz-Filtersammler . . . . .	34
3.1.3	Straßenstaub . . . . .	35
3.1.4	Weitere Proben . . . . .	36
3.2	Extraktion der Proben . . . . .	37
3.2.1	Extraktion mit Puffer . . . . .	37
3.2.2	Extraktion mit Wasser . . . . .	38
3.3	Bestimmung des Proteingehalts der Proben . . . . .	38
3.3.1	Größenausschlusschromatographie . . . . .	38
3.3.2	BCA-Assay . . . . .	39
3.3.3	Bradford-Assay . . . . .	42
3.4	Aminosäureanalytik . . . . .	42
3.4.1	Hydrolysen . . . . .	42
3.4.2	Voranreicherung von Nitrotyrosin . . . . .	44
3.4.3	HPLC-FD . . . . .	45
3.4.4	HPLC-UV/VIS . . . . .	47
3.4.5	HPAEC-PAD . . . . .	48
3.4.6	LC-APCI-TOF-MS . . . . .	55
3.5	Anorganische Anionenanalytik . . . . .	55
3.6	Kohlenstoffanalytik . . . . .	56
3.6.1	Gesamtkohlenstoff . . . . .	56
3.6.2	Elementarer Kohlenstoff . . . . .	57
3.6.3	Wasserlöslicher organischer Kohlenstoff . . . . .	58
3.7	Synthese und Charakterisierung der Nitroproteinstandards . . . . .	59
3.7.1	Synthese von Nitro-BSA . . . . .	59
3.7.2	Synthese von Nitro-Bet v 1 . . . . .	62
3.8	Nitroprotein- und Peptidanalytik mittels LC-MS/MS . . . . .	63
3.9	Enzymimmunoassays . . . . .	63
3.9.1	Indirekter kompetitiver Immunoassay . . . . .	63
3.9.2	Einseitiger nichtkompetitiver Immunoassay . . . . .	66

3.9.3	Sandwich-Immunoassay für Nitroproteine . . . . .	68
3.9.4	Immunoassays für Bet v 1 und Nitro-Bet v 1 . . . . .	68
3.10	Reaktion von Proteinen mit reaktiven Spurenstoffen . . . . .	72
3.10.1	Extraktion von Birkenpollen . . . . .	72
3.10.2	Herstellung von Protein-Filterproben . . . . .	72
3.10.3	Begasung von Proteinproben mit synthetischen Gasgemischen . . . . .	74
3.10.4	Begasung von Proteinproben mit Umgebungsluft . . . . .	77
3.10.5	Konzentrationsmessungen von Ozon, Stickoxiden und Wasserdampf . . . . .	78
<b>4</b>	<b>Protein- und Kohlenstoffmessergebnisse</b>	<b>80</b>
4.1	Charakterisierung des BCA-Assays . . . . .	80
4.1.1	Kreuzreaktivitäten . . . . .	80
4.1.2	Adsorption von Proteinen . . . . .	82
4.1.3	Sonstige mögliche Proteinverluste . . . . .	84
4.1.4	Bewertung des BCA-Assays zur Proteinmessung . . . . .	85
4.2	Charakterisierung des Bradford-Assays . . . . .	86
4.3	Atmosphärische Protein- und Kohlenstoffkonzentrationen . . . . .	88
4.4	WSOC in atmosphärischen Aerosolproben . . . . .	96
4.5	Sulfatkonzentrationen in atmosphärischen Aerosolproben . . . . .	101
4.6	Proteingehalt von Straßenstaub . . . . .	101
<b>5</b>	<b>Aminosäuremessergebnisse</b>	<b>104</b>
5.1	Anreicherungsmethoden für Nitrotyrosin . . . . .	104
5.1.1	Polymerharze XAD-II und XAD-7 . . . . .	104
5.1.2	Anionenaustauscherharz AG1-X8 . . . . .	108
5.2	Nitrotyrosinmessungen mittels HPLC-UV/VIS . . . . .	109
5.3	Tyrosin- und Nitrotyrosinanalytik mittels LC/MS . . . . .	110
5.4	HPAEC-PAD . . . . .	113
5.4.1	Ergebnisse der Analyse von Standardamino­säuren . . . . .	113
5.4.2	Ergebnisse der Analytik von Nitrotyrosin . . . . .	120
5.4.3	Bewertung der HPAEC-PAD-Methode . . . . .	123
5.5	Standardamino­säuremessungen mittels HPLC-FD . . . . .	124
<b>6</b>	<b>Antikörpercharakterisierung und Immunoassays</b>	<b>129</b>
6.1	Bet v 1-Immunoassays . . . . .	129
6.1.1	Einseitige Immunoassays mit Bet v 1 und Nitro-Bet v 1 . . . . .	129
6.1.2	Sandwich-Immunoassays mit Bet v 1 und Nitro-Bet v 1 . . . . .	131

---

6.2	Affinitäten . . . . .	133
6.3	Kreuzreaktivitäten . . . . .	140
6.4	Einseitige Tests für Nitroproteine . . . . .	143
6.5	Sandwich-Assays für Nitroproteine . . . . .	146
6.6	Ergebnisse der Nitroproteinmessungen in Umweltproben . . . . .	150
6.7	Zusammenfassung der Nitroproteinmessungen . . . . .	154
<b>7</b>	<b>Nitrierung von Proteinen durch Begasung</b>	<b>155</b>
7.1	Berechnung von Nitrierungsgraden . . . . .	155
7.2	Begasung mit Umgebungsluft . . . . .	155
7.2.1	Proteinwiederfindung . . . . .	155
7.2.2	Nitrierung . . . . .	160
7.3	Begasung mit synthetischen Gasgemischen . . . . .	163
7.3.1	Proteinwiederfindung nach Begasung mit Ozon . . . . .	163
7.3.2	Begasung von abgeschiedenen BSA-Partikeln mit NO <sub>2</sub> . . . . .	165
7.3.3	Simultane Begasungen mit NO <sub>2</sub> und Ozon . . . . .	166
7.3.4	Einfluss von Vorfiltern . . . . .	171
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>174</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>181</b>
9.1	Geräte und Chemikalien . . . . .	181
9.1.1	Geräte . . . . .	181
9.1.2	Software . . . . .	185
9.1.3	Chemikalien . . . . .	185
9.1.4	Puffer- und Stammlösungen . . . . .	187
9.1.5	Antikörper . . . . .	189
9.2	Standardprogramm <i>BioLC</i> . . . . .	191
9.3	Tabellen . . . . .	193
9.3.1	Tabellen A: Messergebnisse der Filterproben . . . . .	193
9.3.2	Tabellen B: Affinitäten und Kreuzreaktivitäten . . . . .	203
9.3.3	Tabellen C und D: Probenextraktionen und Proteinnitrierungsgrade mit Umgebungsluft begaster Proben . . . . .	205
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>208</b>

# Tabellenverzeichnis

2.1	Molare spektrale Absorptionskoeffizienten und Absorptionsmaxima der natürlichen aromatischen Aminosäuren . . . . .	16
3.1	Übersicht über Messkampagnen zur Probenahme von Filterproben . . . . .	34
3.2	Übersicht über Fensterstaubproben . . . . .	36
3.3	Übersicht über die Mengenverhältnisse bei der enzymatischen Hydrolyse von Straßenstaubproben . . . . .	44
3.4	Experimente zur Nitrotyrosinanreicherung mittels XAD-II . . . . .	45
3.5	Laufmittelgradient zur Trennung OPA/MPA-derivatisierter Aminosäuren	46
3.6	Gradientenverlauf zur Analyse von Standardaminosäuren am BioLC-System	52
3.7	Gradientenverlauf zur kombinierten Analyse von Standardaminosäuren und Nitrotyrosin . . . . .	53
3.8	Optimierte Parameter der Messungen mittels LC-APCI-TOF-MS . . . . .	55
3.9	Parameter der coulometrischen Kohlenstoffbestimmung . . . . .	58
3.10	Reaktionsbedingungen der Nitrierung von BSA mit Tetranitromethan . . . . .	61
3.11	Übersicht über die verwendeten Nitrotyrosin-Antikörper . . . . .	63
3.12	Optimierung des indirekten kompetitiven Tests . . . . .	64
3.13	Antikörperverdünnungen in den einseitigen Tests . . . . .	66
3.14	Eingesetzte Antikörper und Verdünnungen im Sandwich-Immunoassay für Nitroproteine . . . . .	69
3.15	Primärantikörper gegen Bet v 1 und verwendete Verdünnungen in einseitigen nichtkompetitiven Assays für Bet v 1 . . . . .	70
3.16	Übersicht über die Begasungsexperimente mit synthetischen Gasgemischen	75
3.17	Übersicht über die Begasungsexperimente mit Umgebungsluft . . . . .	77
4.1	Kreuzreaktivitäten verschiedener Substanzen im BCA-Assay . . . . .	81

4.2	Übersicht über die Wiederfindung von BSA auf Glasfaser- und Quarzfiltern	83
4.3	Adsorption von BSA an Glas- und Quarzfaserfiltern . . . . .	84
4.4	Mittelwerte der Partikel-, TC-, EC- und Proteinkonzentrationen und Verhältnisse dieser Parameter während verschiedener Messkampagnen . . . . .	91
4.5	Konzentrationen und Verhältnisse von WSOC in atmosphärischen Aerosolproben . . . . .	97
4.6	Proteinkonzentrationen im Straßen- und Fensterstaub . . . . .	102
5.1	Massenfragmente der enzymatisch hydrolysierten Straßenstaubprobe S6 .	110
5.2	Retentionszeiten und Nachweisgrenzen der Standardamino-säuren (HPAEC-PAD) . . . . .	115
5.3	Retentionszeiten und Nachweisgrenzen ( $3\sigma_B$ -Methode) der mittels HPLC-FD bestimmten Aminosäuren . . . . .	125
5.4	Absolutmengen und atmosphärische Konzentrationen der mittels HPLC-FD bestimmten Aminosäuren in Proben der Messkampagne ZSP-1 . . . . .	127
6.1	Affinitätskonstanten der untersuchten Antikörper gegen Nitrotyrosin . . .	135
6.2	Optimierte Nachweisgrenzen der einseitigen Tests für Nitro-(14.3)-BSA .	143
6.3	Optimierte Nachweisgrenzen der einseitigen Tests für verschiedene Nitroproteinstandards . . . . .	144
6.4	Effektive Nachweisgrenzen der einseitigen Tests für Nitrotyrosinreste . . .	145
6.5	Optimierte Verdünnungen der Sandwich-Immunoassays und Nachweisgrenzen für Nitro-(14.3)-BSA . . . . .	149
6.6	Übersicht über Nitro-(14.3)-BSA-Äquivalentkonzentrationen in positiv getesteten Umweltproben . . . . .	151
6.7	Übersicht über die errechneten Proteinnitrierungsgrade der untersuchten Umweltproben . . . . .	153
7.1	Übersicht der auf den begasten Filtern abgeschiedenen Proteinmengen während der Begasung mit Umgebungsluft . . . . .	160
7.2	Über die Versuchsdauer gemittelte Parameter der Begasungsexperimente am LKP . . . . .	161
7.3	Wiederfindung von mit BSA-Aerosolpartikeln belegten Spritzenfiltern nach Begasung mit Ozon . . . . .	165
9.1	Polyklonale Meerrettichperoxidase-markierte Antikörper . . . . .	189
9.2	Verwendete Antikörper, unmarkiert . . . . .	190
9.3	Messkampagne DWD-1 (Berlin): Konzentrationen von PM <sub>2.5</sub> und TC . .	193

---

9.4	Messkampagne DWD-2 (Freiburg): Konzentrationen von PM2.5 und TC	194
9.5	Messkampagne ZSP-1: Konzentrationen von PM2.5, TC, EC und Protein	195
9.6	Messkampagne ZSP-2: Konzentrationen von PM2.5 und TC . . . . .	196
9.7	Messkampagne HPB: Konzentrationen von PM2.5, TC, EC und Protein .	197
9.8	Messkampagne HPB (fortgesetzt): Konzentrationen von PM2.5, TC, EC und Protein . . . . .	198
9.9	Messkampagne IWC-1: Konzentrationen von PM2.5, TC, EC, Protein, WSOC und HM-WSOC . . . . .	199
9.10	Messkampagne IWC-2: Konzentrationen von PM2.5 und Protein . . . .	199
9.11	Messkampagne IWC-3: Konzentrationen von PM2.5, TC, EC und Protein	200
9.12	Messkampagne LKP: Konzentrationen von PM2.5, TC, EC, Protein, WSOC und HM-WSOC . . . . .	201
9.13	Messkampagne LKP (fortgesetzt): Konzentrationen von PM2.5, TC, EC, Protein, WSOC und HM-WSOC . . . . .	202
9.14	Affinitäten und Kreuzreaktivitäten des Antikörpers CAY für weitere Test- substanzen . . . . .	203
9.15	Molare Kreuzreaktivitäten verschiedener Nitrotyrosin-Antikörper . . . . .	204
9.16	Extraktion von Straßenstaubproben zur Untersuchung der Extrakte mit- tels einseitigen und Sandwich-Immunoassays auf Nitroproteine . . . . .	205
9.17	Extraktion von Filterproben zur Untersuchung der Extrakte mittels ein- seitigen und Sandwich-Immunoassays auf Nitroproteine . . . . .	206
9.18	Extraktion von sonstigen Proben zur Untersuchung der Extrakte mittels einseitigen und Sandwich-Immunoassays auf Nitroproteine . . . . .	206
9.19	Proteinnitrierungsgrade der begasten Proteinproben aus den Begasungs- experimenten mit Umgebungsluft am LKP und in München-Großhadern	207

# Abbildungsverzeichnis

2.1	Prinzip des BCA-Assays . . . . .	15
2.2	Strukturen der aus saurer Hydrolyse resultierenden Standardamino-säuren . . . . .	18
2.3	Reaktionsgleichung der Derivatisierung primärer Aminosäuren mittels o-Phthaldialdehyd (OPA) und Mercaptopropionsäure . . . . .	19
2.4	Schematischer Aufbau eines Latex-Anionenaustauschers . . . . .	19
2.5	Prinzipieller Aufbau eines Moleküls Immunglobulin G . . . . .	21
2.6	Prinzip des einseitigen nichtkompetitiven Immunoassays . . . . .	26
2.7	Prinzip des indirekten kompetitiven Immunoassays . . . . .	28
2.8	Prinzip des Sandwich-Immunoassays . . . . .	29
3.1	High-Volume-Sampler Digitel DHA 80 auf der Zugspitze mit Blick ins Innere . . . . .	35
3.2	Kalibriergerade des BCA-Assays . . . . .	40
3.3	Aufbau der HPLC-Anlage zur Messung von Aminosäuren mittels UV/Vis-Detektion . . . . .	48
3.4	<i>BioLC</i> -System der Firma Dionex . . . . .	49
3.5	Schematischer Aufbau des <i>BioLC</i> -Systems . . . . .	50
3.6	Graphische Darstellung der Potentialsequenz zur Aminosäure-detektion . . . . .	51
3.7	Kalibrierkurven von Tyrosin und Nitrotyrosin, bestimmt mittels HPAEC-PAD . . . . .	54
3.8	Schematischer Aufbau des Coulometers . . . . .	56
3.9	UV/Vis-Absorptionsspektren von Nitrotyrosin im Sauren und Alkalischen und von BSA, Nitro-BSA und den Reaktionsnebenprodukten . . . . .	60
3.10	Kalibriergerade von Nitrotyrosin in NaOH (UV/Vis-Spektrophotometrie) . . . . .	62
3.11	Kalibrierkurve des einseitigen nichtkompetitiven Immunoassays mit mAk CAY für Nitro-(14.3)-BSA . . . . .	67

---

3.12	Größenverteilung der BSA-Partikel gemessen mittels SMPS . . . . .	73
3.13	Versuchsaufbau zur Begasung von Proteinproben mit synthetischen Gasgemischen . . . . .	76
3.14	Versuchsaufbau zur Begasung von Proteinproben mit Umgebungsluft . .	78
3.15	Verlauf der VMVs von NO, NO <sub>2</sub> und NO <sub>x</sub> während einer 48-stündigen Begasung mit 100 ppb <sub>v</sub> NO <sub>2</sub> . . . . .	79
4.1	UV/VIS-Spektrum des Coomassie-Reagenz mit BSA und Kalibriergeraden des Bradford-Assays mit BSA bei unterschiedlichen Wellenlängen . .	87
4.2	Kalibriergeraden des Bradford-Assays mit BSA in deionisiertem Wasser, verdünntem PBS-Puffer und PBS-Puffer . . . . .	88
4.3	Probenahmeorte Schneefernerhaus am Zugspitzhang und Meteorologisches Observatorium am Hohenpeißenberg . . . . .	89
4.4	Probenahmeorte Großhadern vor dem Institut für Wasserchemie und Messcontainer des Bayerischen Landesamts für Umweltschutz am Luise-Kiesselbach Platz . . . . .	90
4.5	PM2.5-, TC-, EC- und Proteinkonzentrationen und Verhältnisse für Filter vom Probenahmeort Zugspitze (2001) . . . . .	92
4.6	PM2.5- und TC-Konzentrationen und Verhältnisse für Filter vom Probenahmeort Zugspitze (2002) . . . . .	92
4.7	PM2.5-, TC-, EC- und Proteinkonzentrationen und Verhältnisse für Filter vom Probenahmeort Hohenpeißenberg . . . . .	93
4.8	TSP- und Proteinkonzentrationen und relative Konzentration Protein/TSP für Filter vom Probenahmeort Freiburg . . . . .	93
4.9	PM2.5-, TC-, EC- und Proteinkonzentrationen und Verhältnisse für Filter vom Probenahmeort München-Großhadern . . . . .	94
4.10	PM10- und Proteinkonzentrationen und relative Konzentration Protein/PM10 für Filter vom Probenahmeort Berlin . . . . .	94
4.11	PM2.5-, TC-, EC- und Proteinkonzentrationen und Verhältnisse für Filter vom Probenahmeort Luise-Kiesselbach-Platz . . . . .	95
4.12	Konzentrationen und PM2.5-Massenanteile von TC, EC, WSOC, HM-WSOC und PC für Proben aus Großhadern (IWC-1) . . . . .	98
4.13	Konzentrationen von TC, EC, WSOC, HM-WSOC und PC für Proben vom Probenahmeort Zugspitze (ZSP-1) . . . . .	99
4.14	Konzentrationen von TC, EC, WSOC, HM-WSOC und PC für Proben vom Probenahmeort LKP . . . . .	99

---

4.15	Konzentrationen von Sulfat und Anteil von Sulfat am Feinstaub PM <sub>2.5</sub> am Probenahmeort LKP . . . . .	101
5.1	Anreicherung von Nitrotyrosin mittels XAD-II . . . . .	104
5.2	Anreicherung von Nitrotyrosin mittels XAD-7 . . . . .	105
5.3	Anreicherung von Nitrotyrosin mittels XAD-II aus verdünnter Lösung . .	106
5.4	Anwendung der Anreicherungs­methode von Nitrotyrosin mittels XAD-II auf eine enzymatisch hydrolysierte Straßenstaubprobe . . . . .	107
5.5	Anreicherung von Nitrotyrosin mittels Anionenaustauscherharz AG1-X8 .	108
5.6	HPLC-UV Chromatogramm der enzymatisch hydrolysierten Straßenstaubprobe S6 und eines Aminosäurestandards aus Nitrotyrosin, Phe, Trp und Tyr (UV-Absorption bei 220 nm) . . . . .	109
5.7	Trennung von Tyrosin und Nitrotyrosin und des aufgereinigten Hydrolysats der Probe S6: UV- und Totalionenchromatogramme . . . . .	111
5.8	Fragmentierungsmuster von Tyrosin und Nitrotyrosin im APCI-TOF-MS	112
5.9	Standardchromatogramm eines 17-Aminosäurestandards (HPAEC-PAD)	114
5.10	Blanklauf nach Analyse eines 17-Aminosäurestandards (HPAEC-PAD) .	116
5.11	Relative Restpeakflächen auf ein HPAEC-PAD-Standardchromatogramm folgender Blankläufe . . . . .	117
5.12	Chromatogramme von BSA-Hydrolysaten gemessen mittels HPAEC-PAD	118
5.13	Chromatogramm einer sauer hydrolysierten Straßenstaubprobe . . . . .	120
5.14	Verschiebung der Retentionszeiten von Nitrotyrosin durch Zusatz von Aceton (HPAEC-PAD) . . . . .	121
5.15	Chromatogramm einer alkalisch hydrolysierten Straßenstaubprobe bei isokratischer Elution (HPAEC-PAD) . . . . .	122
5.16	Standardchromatogramm des 17-Aminosäurestandards gemessen mittels HPLC-FD nach Derivatisierung mit OPA/MPA . . . . .	124
5.17	Chromatogramm der Probe 10, Messkampagne ZSP-1, gemessen mittels HPLC-FD nach Derivatisierung mit OPA/MPA . . . . .	126
5.18	Atmosphärische Konzentrationen von je neun Aminosäuren während der Messkampagne LKP im April/Mai 2001 . . . . .	128
6.1	Kalibrierkurven der einseitigen Immunoassays mit mAk Bv16 und pAk Kaninchen (Antikörper gegen Bet v 1) für Bet v 1 und Nitro-Bet v 1 . . . .	130
6.2	Kalibrierkurven des einseitigen nichtkompetitiven Immunoassays mit Serum eines Birkenpollenallergikers für Bet v 1 und Nitro-Bet v 1 . . . . .	131

6.3	Kalibrierkurven des Sandwich-Immunoassays mit polyklonalen Kaninchen-Anti-Bet v 1-Antikörpern und Serum eines Birkenpollenallergikers für Bet v 1 und Nitro-Bet v 1 . . . . .	132
6.4	Inhibitionskurven von 3-Nitrotyrosin, 3,5-Dinitrotyrosin und Nitro-(1)-peptid im indirekten kompetitiven Test mit mAk CAY . . . . .	133
6.5	Strukturformeln der in indirekten kompetitiven Tests untersuchten Verbindungen . . . . .	134
6.6	Grafische Darstellung der Affinitäten der untersuchten Nitrotyrosin-Antikörper für Nitrotyrosin, Nitro-(1)-Peptid und Nitro-(16.3)-BSA . . . . .	136
6.7	Strukturen eines 3-Nitrotyrosinrests in einer Polypeptidkette und des Immunogens für mAk 39B6 . . . . .	137
6.8	Darstellung der absoluten und normierten Affinitätskonstanten der untersuchten Nitrotyrosin-Antikörper für verschiedene Nitro-BSA-Standards, aufgetragen gegen die Anzahl der Nitrotyrosinreste pro Proteinmolekül .	138
6.9	Grafische Darstellung der Kreuzreaktivitäten der untersuchten Antikörper gegen Nitrotyrosin . . . . .	142
6.10	Nachweisgrenzen von verschiedenen Nitro-BSA-Standards, aufgetragen gegen die korrespondierenden Affinitäten der verwendeten Antikörper . . .	146
6.11	Kalibrierkurven des einseitigen nichtkompetitiven Immunoassays mit mAk 39B6 und des Sandwich-Assays Schaf- 39B6 mit Nitro-(14.3)-BSA in PBS mit unterschiedlich hohen BSA-Zusätzen . . . . .	147
6.12	Grafische Darstellung der Nachweisgrenzen der einseitigen nichtkompetitiven Immunoassays und Sandwich-Assays für Nitro-(14.3)-BSA in PBS mit unterschiedlich hohen BSA-Zusätzen . . . . .	148
6.13	Grafische Darstellung der Signalintensitäten der positiv auf Nitroproteine getesteten Proben im einseitigen Assay mit mAk 39B6 ohne und mit kompetitiver Inhibition durch Nitrotyrosin . . . . .	152
7.1	Versuchsaufbau zur Begasung von Proteinproben auf Spritzenfiltern mit Umgebungsluft im Messcontainer am LKP . . . . .	156
7.2	Grafische Darstellung der Wiederfindung von BSA im Filtereluat der mit Umgebungsluft begasten Filter und Blindproben im BCA-Assay . . . . .	158
7.3	Grafische Darstellung der Wiederfindung von Bet v 1 im Filtereluat der mit Umgebungsluft begasten Filter und Blindproben im Sandwich-Bet v 1-Immunoassay . . . . .	159

---

7.4	Grafische Darstellung der Proteinnitrierungsgrade der begasten BSA- und BPE-Proben aus den Begasungsexperimenten mit Umgebungsluft am LKP und in Großhadern . . . . .	162
7.5	Proteinwiederfindung nach Begasung von BSA und BPE mit Ozon auf Teflon- und Glasfaserfiltern . . . . .	164
7.6	Zeitlicher Verlauf der Nitrierung von BSA und BPE auf Glasfaserfiltern bei Begasung mit Ozon und NO <sub>2</sub> (500 ppb <sub>v</sub> und 1 ppm <sub>v</sub> ) . . . . .	168
7.7	Zeitlicher Verlauf der Nitrierung von BSA und BPE auf Glasfaserfiltern bei Begasung mit Ozon und NO <sub>2</sub> (bis 200 ppb <sub>v</sub> ) und Umgebungsluft . . .	169
7.8	Zeitlicher Verlauf der Nitrierung von BSA und BPE auf Cellulosefiltern bei Begasung mit Ozon und NO <sub>2</sub> (500 ppb <sub>v</sub> ) und mit Umgebungsluft . .	170
7.9	Einfluss der Position der Filter im Gasstrom bei serieller Begasung und Einfluss von vorgeschalteten Filtern auf die Proteinnitrierungsgrade . . .	172

## Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
Ak	Antikörper
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
BCA	Bicinchoninic Acid (Bicinchoninsäure)
Bet v 1	Hauptallergen der Birke ( <i>betula verrucosa</i> )
BPE	Birkenpollenextrakt
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
c	Konzentration
C	Testmittelpunkt der sigmoidalen Kalibrierkurve
CR	Kreuzreaktion
DIN	Deutsche Industrienorm
DMSO	Dimethylsulfoxid
DWD	Deutscher Wetterdienst
EC	Elemental Carbon (elementarer Kohlenstoff)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Fa.	Firma
FD	Fluoreszenzdetektion
GC	Gaschromatographie
GF	Glasfaser
h	Stunde
HM-WSOC	High-Molecular Water Soluble Organic Carbon (makromolekularer wasserlöslicher organischer Kohlenstoff)
HPAEC	High-Performance Anion Exchange Chromatography (Hochleistungsanionenaustauschchromatographie)
HPB	Hohenpeißenberg
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigchromatographie)
HULIS	Humic Like Substances (Huminstoff-ähnliche Substanzen)
HVS	High Volume Sampler (Hochdurchsatz-Filtersammler)
IC	Ionenchromatographie
i.d.	inner diameter (Innendurchmesser)
IC <sub>50</sub>	Testmittelpunkt sigmoidaler Kalibrierkurven (50 % Inhibition)

---

IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IPAD	integrierende gepulste Amperometrie
IWC	Institut für Wasserchemie und chemische Balneologie, TU München
kDa	Kilodalton
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin (Napfschneckenprotein aus <i>megatura crenulata</i> )
LC	Flüssigchromatographie
LKP	Luise-Kiesselbach-Platz
LVS	Low Volume Sampler (Niedrigdurchsatz-Filtersammler)
M	Molar (mol/L)
m	Masse
mAk	monoklonaler Antikörper
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
MTP	Mikrotiterplatte
MW	Mittelwert
n	Zählvariable (Anzahl der Messpunkte bzw. Wiederholungen einer Messung)
N	Normal (äquiv./L)
NWG	Nachweisgrenze
OC	Organic Carbon (organischer Kohlenstoff)
pAk	polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-Kochsalzpuffer)
PC	Proteingebundener Kohlenstoff
PEEK	Polyetherethylketon
PES	Polyethersulfon
PM2.5	Particulate matter, Partikeldurchmesser < 2.5 $\mu\text{m}$
PM10	Particulate matter, Partikeldurchmesser < 10 $\mu\text{m}$
PNG	Proteinnitrierungsgrad
POD	Peroxidase aus Meerrettich
ppb	parts per billion ( $10^9$ )
ppm	parts per million ( $10^6$ )
PTFE	Polytetrafluorethylen

---

RC	Regenerierte Cellulose
RH	Relative Humidity (Relative Feuchte)
RM	Rotameter
RNS	Reactive Nitrogen Species (Reaktive Stickstoffverbindungen)
RP	Reversed Phase (Umkehrphase)
RT	Raumtemperatur
s	Standardabweichung bzw. Sekunde
T	Teflon
TC	Total Carbon (Gesamtkohlenstoff)
TFA	Trifluoressigsäure
TIC	Totalionenchromatogramm
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNM	Tetranitromethan
TOF	Time-of-Flight (Flugzeit(-Massenspektrometer))
TSP	Total Suspended Particles (Gesamtstaub)
UV	Ultraviolett
V	Volumen
VDI	Verein Deutscher Ingenieure
VIS	visible (Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich)
VMV	Volumenmischungsverhältnis
WSOC	Water Soluble Organic Carbon (wasserlöslicher organischer Kohlenstoff)

# 1 Einleitung

„The global average surface temperature has increased over the 20th century by about 0.6 °C.“ [1]

Der Einfluss der erhöhten anthropogenen Emissionen von Treibhausgasen wie Kohlendioxid, Methan, Distickstoffoxid und fluorierten Chlorkohlenwasserstoffen auf das globale Klima gilt mittlerweile als gut verstanden. Hingegen wird das wissenschaftliche Verständnis des Effektes atmosphärischer Aerosolpartikel auf die Oberflächentemperatur der Erde vom Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) als „sehr niedrig“ angegeben. Aerosolpartikel können dabei sowohl abkühlende (direkte Rückstrahlung von Solarstrahlung; direkter Aerosoleffekt) als auch aufheizende Wirkung haben. Nur wenig charakterisiert ist v.a. der indirekte Aerosoleffekt, durch den über eine verstärkte Wolkenbildung sowohl Erwärmung als auch Abkühlung der Erdoberfläche eintreten kann. Eine wichtige Rolle bei diesen Effekten spielt die chemische Zusammensetzung der Aerosolpartikel, deren organischer Anteil noch unzureichend erforscht ist. Durch Verbrennung fossiler Brennstoffe und Biomasse, Hauptquellen anthropogen verursachter Aerosolpartikel, entstehen große Mengen dunkel bzw. schwarz gefärbter Kohlenstoffpartikel, sogenannter „Black Carbon“. Diese Partikel können durch direkte Strahlungsabsorption zur Erwärmung beitragen. Wasserlösliche organische Verbindungen, wie Monosaccharide oder Proteine, könnten als Kondensationskerne für Wolkenbildung wirken und den indirekten Aerosoleffekt verstärken.

In den meisten epidemiologischen Studien kann zwar auch ein Zusammenhang zwischen der bloßen Partikelanzahl und Gesundheitseffekten festgestellt werden, angezeigt durch die tägliche Sterblichkeit, Krankenhausaufnahmen aufgrund respiratorischer und kardiovaskulärer Erkrankungen oder Verschlechterung der Symptome von Asthmatikern [2–5]. Die chemische Zusammensetzung der Aerosolpartikel ist dennoch von zusätzlicher und wichtiger Bedeutung für deren gesundheitliche Auswirkungen. Der Zeitabstand zwischen der Exposition gegen cancerogene Substanzen in Aerosolpartikeln wie z.B. polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH) aus Verbrennungsabgasen und den gesundheitlichen Folgen kann dabei Jahrzehnte auseinander liegen. Auch die Entstehung

von Allergien ist oftmals ein langdauernder Prozess, bei dem viele Faktoren diskutiert wurden, jedoch noch kein allumfassendes Verständnis dieser Fehlreaktion des Immunsystems besteht. Die Symptome der allergischen Rhinitis und Konjunktivitis („Heuschnupfen“) oder des Asthma bronchiale werden oftmals von Pollenallergenen verursacht. Pollenzahl und Spezies werden routinemäßig durch Auszählen unter dem Mikroskop bestimmt. Nur wenige Daten sind bisher jedoch über die Summenkonzentrationen von Proteinen und Aminosäuren in atmosphärischen Aerosolen bekannt. Die Zunahme von Allergien in den westlichen Industrieländern blieb bisher weitgehend ungeklärt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Nitrierung von Modellproteinen bei Exposition gegen Stickstoffdioxid und abgasbelasteter Umgebungsluft untersucht. Die gefundenen Nitroproteine könnten eine Schlüsselrolle spielen im Zusammenhang des verstärkt in Industriestaaten auftretenden Sommersmogs und der gleichzeitigen Zunahme von Allergien in diesen Ländern.

# Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der chemischen Zusammensetzung des organischen Anteils atmosphärischer Aerosolpartikel, insbesondere der wasserlöslichen Proteine. Darüber hinaus sollten begonnene Reaktivitätsuntersuchungen zur Nitrierung von Proteinen in der Atmosphäre fortgesetzt und erweitert werden. Insbesondere die Kinetik der Nitrierung, der Einfluss von Ozon, Feuchte, unterschiedlichen Substraten und Vorfiltern stand dabei im Mittelpunkt. Die Reaktionsprodukte sollten möglichst genau charakterisiert werden.

Die Konzentration und chemische Zusammensetzung von atmosphärischem Feinstaub PM<sub>2.5</sub> wurde an zwei städtischen (Straßenkreuzung mit hohen verkehrsbedingten Emissionen sowie Stadtrand), an einem ruralen und einem alpinen Probenahmeort untersucht. Die Feinstaubpartikel wurden auf Glasfaser- bzw. Quarzfiltern abgeschieden und nach gravimetrischer Analyse die atmosphärischen Konzentrationen errechnet. Direkt wurden die Summenparameter Gesamtkohlenstoff und elementarer Kohlenstoff mittels Verbrennungsanalyse gemessen. Wasserlöslicher Kohlenstoff wurde durch Verbrennungsanalyse nach wässriger Extraktion bestimmt.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit bildete die Analyse des Proteinanteils der gesammelten Proben. Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentrationen erfolgte mittels Färbetests. Zur Analyse nitrierter Proteine in den Proben wurden drei monoklonale und drei polyklonale Antikörper gegen Nitrotyrosin ausführlich hinsichtlich Affinitäten und Kreuzreaktivitäten charakterisiert. Mit diesen Antikörpern wurden einseitige und Sandwich-Immunoassays entwickelt. Die Kalibrierung der Assays erfolgte mittels Nitroproteinstandards, die durch Reaktion mit Tetranitromethan in wässriger, gepufferter Lösung hergestellt wurden. Verschiedene Umweltproben sollten mit diesen Immunoassays auf die Gegenwart von Nitroproteinen untersucht werden. Ebenso erfolgten mit diesen Immunoassays die kinetischen Untersuchungen der Reaktionsprodukte der Begasung von Proteinen mit NO<sub>2</sub>, Ozon und Umgebungsluft. Weiterhin sollte die Bindung von huma-

nen Allergikersonen an native und nitrierte Pollenallergene untersucht und verglichen werden. In Zusammenarbeit mit dem Institut für Analytische Chemie und Radiochemie der Leopold-Franzens-Universität in Innsbruck wurden mit  $\text{NO}_2$  und Ozon begaste bzw. mit Tetranitromethan synthetisierte Proteinproben massenspektrometrisch charakterisiert.

Nach Hydrolyse der Feinstaubproben wurden Aminosäuren mittels HPLC-UV, HPLC-FD mit Vorsäulenderivatisierung und mittels HPAEC-PAD analysiert. Spezieller Fokus lag dabei auf der in nitrierten Proteinen enthaltene Aminosäure 3-Nitrotyrosin. Für diese Aminosäure sollten Anreicherungsverfahren entwickelt und angewandt werden, um auch Nitrotyrosin in Proben mit hohen Konzentrationen an Matrixbestandteilen, wie z.B. Straßenstaub, messen zu können.

## 2 Allgemeiner Teil

### 2.1 Zusammensetzung der Atmosphäre

Die Erdatmosphäre besteht aus einem Gemisch von Gasen und darin suspendierten festen und flüssigen Aerosolpartikeln. Die Anzahlkonzentration, Größenverteilung und chemische Zusammensetzung der Partikel sowie die Konzentrationen der reaktiven Spurengase sind hochvariabel.

#### 2.1.1 Gasphase

Die Hauptbestandteile der Erdatmosphäre sind Stickstoff (78.1%), Sauerstoff (21.0%) und das Edelgas Argon (0.93%), deren Volumenmischungsverhältnisse (VMV) bis zu einer Höhe von 100 km praktisch konstant sind. Der Anteil an Wasserdampf kann bis zu 4% betragen und ist sehr stark höhen- und temperaturabhängig. Neben diesen Hauptkomponenten gibt es zahlreiche weitere Spurenstoffe wie Kohlendioxid, Methan, Ozon, Distickstoffoxid, Kohlenmonoxid und Schwefeldioxid, die trotz ihrer geringen Menge (<0.1%) eine entscheidende Bedeutung für die Biosphäre (Stoffwechselkomponenten, Schadstoffe), das Klima (Treibhauseffekt) und die atmosphärische Photochemie (oxidative Selbstreinigung) haben. Diese Spurengase entstehen teils in der Stratosphäre ( $O_3$ ), teils durch Zersetzungs- und Fäulnisprozesse ( $NH_3$ ,  $CO$ ,  $CH_4$ ,  $N_2O$ ) und durch Witterungseinflüsse (Stickoxide). Verbrennungsprozesse stellen ebenfalls eine wichtige Quelle von Spurengasen dar (Emission von  $CO$ ,  $CO_2$ ,  $SO_2$ ,  $NO_x$ , Wasserdampf und Kohlenwasserstoffen). Die anthropogen bedingten Luftverunreinigungen wirken sich in Gebieten mit hoher Siedlungs-, Verkehrs- und Industriedichte oft nachteilig aus. Sie können belästigende, reizende oder gesundheitsgefährdende, meist schädliche Wirkungen auf Menschen, Tiere, Pflanzen oder Bauwerke ausüben.

Eine besondere Stellung nehmen neben den Treibhausgasen die reaktiven Spurengase  $O_3$ ,  $NO_x$ , und  $SO_2$  ein, die in homogenen und heterogenen Reaktionen (Gasphase und Partikelphase) die Chemie der Troposphäre erheblich beeinflussen. Durch die Bil-

dung von Schwefelsäure und Salpetersäure aus  $\text{SO}_2$  und  $\text{NO}_x$  (saurer Regen) werden z.B. Pflanzen (Waldschäden) und Bauwerke nachhaltig geschädigt. Dabei kann es zu einer Versauerung der Böden und Gewässer kommen, was wiederum eine Freisetzung verschiedenster für Pflanzen giftiger Metallionen (z.B.  $\text{Al}^{3+}$ , Schwermetalle) bewirken kann. Unter starker Sonneneinstrahlung können sich aus anthropogenen Quellen stammende Stickoxide und Kohlenwasserstoffe mit Sauerstoff zu Photooxidantien wie z.B. Ozon, Peroxyacetylnitrat (PAN) oder  $\text{NO}_3$  umwandeln. Bei sehr hohen VMV kann es dann zur Bildung von *Photosmog* kommen, der zu starken gesundheitlichen Belastungen wie Schleimhautreizungen bis hin zur Beeinträchtigung und Schädigung der Lungenfunktion führen kann [6–11].

### 2.1.2 Partikelphase

Partikel können direkt in die Atmosphäre gelangen, beispielsweise durch Winderosion, Vulkaneruptionen oder Pollenflug (Primärpartikel). Sie können auch durch Nukleation und das Zusammenwachsen von gasförmigen Molekülen (*Gas-to-Particle-Conversion*) entstehen, z.B. bei anthropogenen Emissionen oder natürlichen Emissionen von Waldgebieten (Sekundärpartikel) [12]. Abhängig von Ort, Höhe, Jahreszeit und meteorologischen Bedingungen können sehr unterschiedliche Substanzen in großen Variationen der Konzentration auftreten. Als Hauptbestandteile des atmosphärischen Aerosols treten jedoch oft anorganische Anionen (Nitrat, Ammonium, Sulfat), elementarer Kohlenstoff (Black Carbon, BC), organischer Kohlenstoff (OC) sowie an marinen Standorten Seesalz auf. Eine typische Probe urbaner Aerosolpartikel (PM<sub>2.5</sub>) kann sich z.B. aus 15 % Sulfat, 15 % Nitrat, 10 % Ammonium, 10 % EC, 30 % organischen und 20 % sonstigen Komponenten zusammensetzen [13]. Eine typische Zusammensetzung von PM<sub>1</sub> der unteren freien Troposphäre (Teneriffa, 2360 m ü. N. N.) enthielt z.B. 40–50 % OC, 30–40 % Sulfat und 10–20 % sonstige Bestandteile. Marines Aerosol auf Teneriffa enthielt ca. 20 % Seesalz, 30 % Sulfat 20 % OC und 30 % sonstige Anteile [14]. In dieser Arbeit lag der Schwerpunkt auf der Analyse des kohlenstoffhaltigen Anteils der Partikel. Eine Unterteilung dieser Fraktion erfolgt üblicherweise in *elementaren Kohlenstoff* (EC) und *organischen Kohlenstoff* (OC), eine weitere Unterteilung wird z.B. anhand der Wasserlöslichkeit getroffen. So wird zwischen WSOC (*Water Soluble Organic Carbon*) und WINSOC (*Water Insoluble Organic Carbon*) unterschieden. Varga et al. klassifizierten WSOC in drei weitere Gruppen: hydrophob, neutral und sauer [15]. Verschiedene andere Autoren haben ebenfalls über die Analytik, Herkunft und Konzentrationen von WSOC in der Troposphäre berichtet [16–24]. Elementarer Kohlenstoff [25–27] und andere schwarz

bzw. dunkel gefärbte Kohlenstoffverbindungen wie z.B. Huminstoff-ähnliche Substanzen (HULIS - *Humic Like Substances*) [28, 29] spielen durch ihre optischen Eigenschaften eine große Rolle bei der Streuung und Absorption von Strahlung in der Atmosphäre.

Als makromolekulare Komponenten des organischen Kohlenstoffs wurden neben Kohlenhydraten [30, 31] Proteine identifiziert. Miguel et al. [32] berichteten über Proteinkonzentrationen, bestimmt im BCA-Assay, von 1 bis  $6 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (urban und rural, Los Angeles, TSP) und  $2-4 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (PM10). Russische Wissenschaftler [33, 34] fanden Proteinkonzentrationen (Bradford-Assay) zwischen 0.2 (Dezember) und  $4 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (August) in Westsibirien (TSP). Schäppi et al. [35–37] bestimmte Bet v 1 und Phl p 5, die Hauptallergene von Birken- und Gräserpollen, mittels Sandwich-Immunoassay und fand Konzentrationen von bis zu  $1.2 \text{ ng}/\text{m}^3$  im Feinstaub ( $< 7.2 \mu\text{m}$ ). Latex-Partikel aus Reifenabrieb wurden durch Miguel et al. gemessen [38]. Freie und gebundene Aminosäuren in PM2.5 und in Tau wurden u.a. von Zhang und Anastasio sowie von Scheller bestimmt [39–41]. Quellen für Proteine in atmosphärischen Aerosolpartikeln sind u.a. Bakterien ( $0.5-5 \mu\text{m}$ ), Viren, Pilze und Sporen ( $2-10 \mu\text{m}$ ) [42, 43], Pollen und Pollenfragmente ( $5-200 \mu\text{m}$ ) [44–49], Pflanzenbestandteile, Insektenteile und tierische oder menschliche Hautschuppen [50].

## 2.2 Proteine und Nitroproteine

Das Wort Protein leitet sich ab von *Protos*, griechisch: der Erste, wodurch zum Ausdruck kommen soll, dass Proteine die stoffliche Grundlage des Lebens sind. Proteine gehören zu den häufigsten biologischen Makromolekülen und kommen in allen Zellen und Zellbestandteilen vor [51]. Proteine können durch reaktive Stickstoffverbindungen (RNS - *Reactive Nitrogen Species*) wie z.B. Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) leicht und effizient nitriert werden [52–55]. Peroxynitrit wird dabei aus Stickstoffmonoxid (NO) und Superoxid ( $\text{O}_2^-$ ) in der Zelle gebildet. Das Target der Proteinnitrierung ist nahezu ausschließlich Tyrosin, das in ortho-Position nitriert wird und zum 3-Nitrotyrosin reagiert [56].

### 2.2.1 Zunahme von Allergien und mögliche Zusammenhänge mit verkehrsbedingten Emissionen

Die Häufigkeit allergischer Erkrankungen steigt seit Jahren stetig an [57–61]. Dies betrifft besonders die allergische Rhinitis und Konjunktivitis, das atopische Ekzem (Neurodermitis) und das Asthma bronchiale. Die beobachtete Zunahme gilt nahezu für alle Länder in Europa und Nordamerika, wobei der Anstieg in den westlich geprägten Industriestaaten

ten besonders dramatisch zu sein scheint. Die Gründe für die beobachtete Zunahme allergischer Erkrankungen sind nach wie vor nicht eindeutig geklärt. Es ist aus heutiger Sicht aber sehr wahrscheinlich, dass mehrere Ursachen dafür verantwortlich sind [62–64]:

- Erhöhte Wahrnehmung;
- Genetische Veranlagungen;
- Psychosoziale Faktoren;
- Urwald-Hypothese;
- Luftverschmutzung;
- Nutzbarmachung des Landes durch den Menschen;
- Verstärkter Einsatz von Klimaanlage.

Latexpartikel haben Bedeutung aufgrund der Auslösung allergischer Symptome bei im medizinischen Bereich beschäftigten Personen [65,66]. Proteine in Innenräumen werden auch mit dem sogenannten *Sick Building Syndrome* in Verbindung gebracht [67]. Pollenallergene von Bäumen der Familie *Betulaceae* (z.B. Birke, Buche, Erle, Haselnuss) zählen in Mitteleuropa zu den Hauptauslösern allergischer Reaktionen bei Aufenthalt im Freien [68]. Bis zu 80 % aller Pollenallergiker sind sensibilisiert gegen Allergene der *Betulaceae* [69]. Pollen sind meist zu groß, um inhaliert zu werden. Daher werden die meisten allergischen Reaktionen durch spezifische Proteine auf kleineren Partikeln, z.B. Stärkekörnern, ausgelöst [70–72]. Der Zusammenhang der Zunahme von Pollenallergien mit Umweltfaktoren wurde immer wieder diskutiert. So bestand die erste Annahme darin, dass Pollenallergien dort besonders häufig seien, wo pauschal hohe Konzentrationen an Luftschadstoffen wie z.B.  $\text{SO}_2$ ,  $\text{NO}_x$ , Ozon und Partikel vorliegen. Nach der deutschen Wiedervereinigung zeigte sich jedoch, dass Allergien nicht etwa im von Umweltverschmutzung weit stärker betroffenen Osten häufiger waren, sondern im Westen [73–78]. Diese Erkenntnisse schienen vordergründig betrachtet die These nach Zusammenhängen mit Umweltfaktoren zu widerlegen. Doch weitere Forschungsergebnisse deuten inzwischen darauf hin, dass diese Schlussfolgerung voreilig war. Die kombinierte Emission von Schwermetallen und  $\text{SO}_2$ , also die Art der Luftverschmutzung, wie sie in der früheren DDR vorherrschte, scheint Birkenpollenallergene nicht nachhaltig zu verändern [79]. Die Exposition von Gräserpollen gegenüber  $\text{SO}_2$  führte sogar zu einer reduzierten Bioverfügbarkeit der Allergene [80]. Risse et al. stellten dagegen fest, dass gräserpollensensibilisierte Patienten im Haut-Prick-Test stärker auf Pollen des Wiesenlieschgrases

(*Phleum pratense* L.) reagierten, wenn diese zuvor verschiedenen Gemischen flüchtiger organischer Verbindungen (VOC) exponiert waren [81]. In Tierversuchen wurde eine Steigerung der Sensibilisierung gegenüber Allergenen (Ovalbumin, Bet v 1) durch vorherige Exposition gegen Formaldehyd [82], Stickstoffdioxid [83] und Ozon [84] gefunden. Der Einfluss von verkehrsbedingten Emissionen und die dadurch verstärkten allergischen Symptome wurden häufig diskutiert [85–89]. Allergische Asthmatiker zeigten gesteigerte bronchiale Reaktionen gegenüber Allergenen nach Exposition von Kraftfahrzeugabgasen in einem Straßentunnel [90]. Strand et al. führten eine Studie mit leicht gegen Birken- und Graspollen allergischen Personen durch. Diese wurden nach 30 min Exposition gegen 250 ppb<sub>v</sub> NO<sub>2</sub> bzw. gereinigter Luft einer individuell bestimmten Allergendosis ausgesetzt. Asthmatische Symptome waren signifikant erhöht bei der kombinierten NO<sub>2</sub>- und Allergenexposition [91]. Bei Kindern, die häufig verkehrsbedingten Emissionen und zusätzlich Zigarettenrauch ausgesetzt waren, wurde eine erhöhte Sensibilisierung gegenüber Allergenen beobachtet [92]. Nach Brunekreef [93] ist NO<sub>2</sub> ein Hauptrepräsentant der verkehrsbedingten Emissionen, deren Korrelation mit negativen Gesundheitseffekten in Populationsstudien nachgewiesen wurde.

### 2.2.2 Bedeutung, Vorkommen und analytische Methoden für Nitrotyrosin und Nitroproteine

Knowles et al. [94] diskutierten 1973 als erste die Möglichkeit einer endogenen Bildung von 3-Nitrotyrosin. Erst siebzehn Jahre später fanden Ohshima et al. weitere Hinweise auf eine endogene Bildung von 3-Nitrotyrosin mittels Gaschromatographie gekoppelt mit einem *Thermal Energy Analyzer* (Thermische-Energie-Analysator, GC-TEA) [95]. Es folgte eine rasche Entwicklung von analytischen Methoden zur quantitativen Bestimmung von 3-Nitrotyrosin in biologischen Geweben und Flüssigkeiten. Dazu wurden u.a. HPLC mit UV/VIS-Detektion [96–98], Fluoreszenzdetektion nach Vorsäulenderivatisierung [99] und elektrochemischer Detektion [100–104] eingesetzt. Liu et al. beschrieben eine HPLC-Methode mit Nachsäulenphotolyse und sich anschließender elektrochemischer Detektion des Nitrotyrosins [105, 106]. Weiterhin wurden sequentielle HPLC/GC-TEA [107], Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektion (GC-FID) [108], Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) [109–112] und Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) [55, 113–117] verwendet. Verschiedene Immunotechniken wie Immunostaining, Westernblot und Immunoassays wurden sowohl zur Quantifizierung von Nitrotyrosin als auch zum Anfärben von Geweben be-

nutzt [118–125]. Einen Überblick über die analytischen Methoden zum Nachweis von Nitrotyrosin gibt Herce-Pagliai [126].

Erhöhte Konzentrationen von Nitroproteinen wurden mittlerweile bei einer Vielzahl von Krankheiten in Organgeweben und in den meisten Zelltypen *in vivo* gefunden [127–129]. Dazu zählen u.a. Artherosklerose [118, 130], Parkinsonkrankheit [131, 132], Alzheimerkrankheit [133–135] und Tumore [136]. Abhängig von Krankheit und Gewebe wurde ein 2- 100facher Anstieg der 3-Nitrotyrosinkonzentration gefunden [129]. Die molaren Verhältnisse von Nitrotyrosin zu Tyrosin reichten dabei von weniger als 1 : 100 000 bis 1 : 20. Die Nitrierung von Proteinen ist ein selektiver Prozess [137, 138] und findet z.B. allgemein bei oxidativem Stress [139–143] und Entzündungsprozessen [144–147] statt. Darüber hinaus wird das biologische Altern häufig mit Proteinnitrierung in Verbindung gebracht [148–150]. Die biologischen Aktivitäten einer Reihe von Enzymen [151–155] und Hormonen [156, 157] werden durch Nitrierung verringert. Nitrierung von Bacteriorhodopsin reduziert dessen Lichtabsorption, verschiebt das Absorptionsmaximum und beeinflusst die Kinetik des Photozyklus [158, 159]. Die Hydrolyse von nitrierten Proteinen durch das Proteasom verläuft schneller als die Hydrolyse nativer Proteine. Dieser beschleunigte Abbau von Nitroproteinen könnte eine zelluläre Schutzfunktion vor oxidativem Stress sein [160]. Ebenso wurde bereits eine Denitrierung von Nitrotyrosin durch „Proteinnitratasen“ bei Ratten gefunden, ein möglicher weiterer Schutzmechanismus [161].

Es ist noch nicht geklärt, für welchen Zweck Peroxynitrit gebildet wird und warum Proteine in Entzündungsprozessen nitriert werden. Eine mögliche Erklärung ist, dass  $\text{NO}_2$ -Gruppen als Markierungen dienen können für körperfremde Proteine, die vom Immunsystem bekämpft werden müssen. Daher könnte die Aufnahme von Nitroproteinen oder anderen nitrierten Substanzen aus der Umwelt Immunreaktionen auslösen und die Entstehung von Allergien fördern. Eine Vielzahl von Studien hat bereits gezeigt, dass nitroaromatische Verbindungen leicht und effizient Immunantworten auslösen bzw. verstärken können. Zum Beispiel wurden 2,4-Dinitrophenyl-Gruppen, gekoppelt an Proteine und Peptide, erfolgreich eingesetzt, um die Immunantwort von sonst nicht immunogen wirksamen Substanzen auszulösen und zu verstärken [129]. Landsteiner und Jacobs zeigten bereits 1935, dass Meerschweinchen leicht sensibilisiert werden können durch Injektionen oder Hautkontakt von hochnitrierten aromatischen Verbindungen wie z.B. 1,2,4-Chlordinitrobenzol [162].

Eine kürzlich veröffentlichte Studie legte dar, dass Proteinnitrierung erfolgreich Immuntoleranzen aufheben kann [146], was impliziert, dass Nitrierung zu pathologischen Immunantworten führen kann. Ein Hauptaugenmerk der Forschung in diesem Bereich

liegt auf der Autoimmunität. Es konnte gezeigt werden, dass posttranslationale Veränderungen von körpereigenen Proteinen Autoimmunkrankheiten auslösen können [163]. In der Krebstherapie wurden Dinitrophenyl-modifizierte Vaccine eingesetzt, um die natürliche Toleranz des Wirtsorganismus gegenüber dem Tumor zu brechen [164]. Bei anderen Modifizierungen, wie z.B. der Isoaspartylisomerisierung, wurde gefunden, dass posttranslational modifizierte Peptide als frühzeitiges immunologisches Stimulanz bei Autoimmunkrankheiten wirken können [165]. Wiederholte Inhalation von Ovalbumin kann zu Immuntoleranz führen. Die vorherige Exposition gegen  $\text{NO}_2$  verhinderte diesen Toleranzmechanismus [166]. Posttranslationale Modifizierungen scheinen generell die Allergenität von Proteinen zu steigern [167]. Sie erhöhten bei Pollenallergenen deren IgE-Bindungskapazität deutlich, so dass sogar üblicherweise nicht allergene Proteine allergen wurden [168]. Die IgE-Bindung zu posttranslationalen Modifikationen des Gräserpollenallergens Phl p 1 war deutlich erhöht [169]. Die Entwicklung von Atemwegsüberempfindlichkeiten während einer Atemwegsentzündung nach Ovalbuminexposition steht im Zusammenhang mit der Freisetzung von Superoxid und NO und ist deshalb vermutlich RNS-abhängig [170]. IgE-Antikörper gegen Dinitrophenylhaptene zeigten umfangreiche Multispezifität [171]. Doyle et al. [172] postulierten, dass Antikörper gegen modifizierte Autoproteine fähig sein könnten, modifizierte und nicht modifizierte Formen des Proteins zu binden. Die Beibehaltung dieser Bindungseigenschaft wird vermutlich durch den Beitrag der unveränderten Aminosäuren benachbart zur modifizierten Stelle verursacht.

Luftgetragene Proteine, die durch atmosphärische reaktive Spurengase nitriert wurden, könnten daher Immunreaktionen auslösen und die Entstehung von Allergien fördern. Nitrierte Proteine könnten damit eine molekulare Erklärung für die Zunahme von Allergien mit der verkehrsbedingten Luftverschmutzung liefern. Weiterhin impliziert die beobachtete Multispezifität, dass sowohl Nitroproteine als auch native Proteine allergische Symptome auslösen können, nachdem Nitroproteine bereits zur Sensibilisierung geführt haben.

### 2.2.3 Reaktion von Proteinen mit Ozon, $\text{NO}_2$ , RNS und Nitrierungsreagenzien

Die Synthese von 3-Nitrotyrosin mit Tetranitromethan in leicht alkalisch gepufferter wässriger Lösung wurde bereits 1966 von Riordan und Sokolovsky beschrieben und ist einfach durchzuführen [173–176]. In der Atmosphäre ist bisher die Nitrierung von niedermolekularen aromatischen Substanzen wie z.B. Phenol gut bekannt [177–181]. Nitrierend

wirken dabei gasförmige Spurenstoffe wie  $\text{NO}_2$  und  $\text{NO}_3$ , das aus der Reaktion von  $\text{NO}_2$  mit Ozon gebildet wird [10,182–184]. Rasche Nitrierung von proteingebundenen Tyrosinresten wurde in wässriger Lösung mit Peroxyacetylnitrat (PAN) beobachtet [185], einer reaktiven Stickstoffverbindung mit häufigem Vorkommen in der Atmosphäre und z.B. in Zigarettenrauch. Goschnick und Schuricht zeigten, dass sich der Stickstoffgehalt in Pollen von Beifuß (*Artemisia tridentata*) und Birke (*Betula alba*) bei Begasung mit hoher  $\text{NO}_2$ -Dosis erhöht [186,187]. In einer anderen Studie wurden Nitrotyrosin und Dityrosin nach Exposition von N-Acetyltyrosin gegen Zigarettenrauch in wässriger Lösung innerhalb von wenigen Minuten gefunden. Die Reaktion wurde durch Antioxidantien wie Ascorbinsäure, Harnsäure oder reduziertes Gluthation deutlich inhibiert [188]. Greis et al. fanden bei der Nitrierung von humanem Oberflächenprotein A sowohl mit Peroxynitrit als auch mit TNM außer 3-Nitrotyrosin keine weiteren nitrierten Aminosäuren [113]. Petersson et al. berichteten hingegen über Dinitrierung von Tyrosin zum 3,5-Dinitrotyrosin bei Reaktion von Angiotensin II mit Tetranitromethan [189].

Nach Begasung mit hohen Ozonkonzentrationen von 2–3 Vol-% identifizierten Kotiaho et al. mittels ESI-MS für vier von 22 untersuchten Aminosäuren definierte Oxidationsprodukte. Bei Begasung in wässriger Lösung wurden bereits nach 30 s an Histidin drei Sauerstoffatome addiert, an Tryptophan zwei und an Methionin und Tyrosin je ein Sauerstoffatom. Di- bis Pentapeptide reagierten entsprechend ihrer Aminosäurezusammensetzung ähnlich wie die freien Aminosäuren [190]. Über die Wechselwirkung von Aerosolpartikeln, Pollen und Pollenallergenen mit Luftschadstoffen und dadurch bedingte Effekte auf die menschliche Gesundheit wurden bereits einige Übersichtsartikel veröffentlicht [48,191,192].

In dieser Arbeit wurde die Nitrierung von Modellproteinen untersucht. Dazu wurde Rinderserumalbumin, BSA, ein leicht verfügbares und häufig als Standard verwendetes 67 kDa-Protein, sowie Birkenpollenextrakt verwendet. Das Hauptallergen der Birke (*Betula verrucosa*), Bet v 1, ist ein gut charakterisiertes 17 kDa-Protein [193–197] und ist zu ca. 1% der Trockenmasse in Birkenpollenextrakt enthalten [198].

## 2.3 Proteinquantifizierung

Proteine sind aus bis zu 20 verschiedenen Aminosäuren in untereinander stark variablen Verhältnissen und variabler Gesamtzahl aufgebaut. Prosthetische Gruppen und Zuckerstrukturen erhöhen die Komplexität zusätzlich. Eine gezielte Anreicherung von Proteinen aus Staubproben und Abtrennung von anderen makromolekularen Naturstoffen wie beispielsweise Huminstoffen erscheint aufgrund der Komplexität der Substanzklasse na-

hezu unmöglich. Hingegen ist eine gezielte Anreicherung der makromolekularen Fraktion (Molekülmasse der meisten Proteine  $> 10$  kDa) und Abtrennung von störenden Substanzen mit niedrigem Molekulargewicht ( $< 1$  kDa) durch Trennmethode wie z.B. Dialyse, Größenausschlusschromatographie oder Ultrafiltration leicht möglich.

Objektive Methoden zur Quantifizierung von Proteinen sind die quantitative, jedoch aufwendige Aminosäureanalyse oder die Gewichtsbestimmung des reinen Proteins als Feststoff, die jedoch für Umweltproben nicht anwendbar ist. Farbreaktionen oder spektroskopische Methoden können nicht in gleicher Weise auf alle Eigenschaften eines Proteins ansprechen und sind daher subjektiver. Die Reaktion mit einem Farbstoff beziehungsweise die Absorption oder Emission bei einer bestimmten Wellenlänge betrifft jeweils einige wenige Funktionalitäten oder Gruppen des Proteins. Kommen sie in einem Protein oder Proteingemisch zufällig häufig vor, wird irrtümlich ein höherer Proteingehalt gemessen und umgekehrt [199].

### 2.3.1 Färbetests

Einige Farbreaktionen basieren auf der komplexbildenden oder reduzierenden Eigenschaft der Peptidbindung. Da die Anzahl der Peptidbindungen in einem Protein ein vergleichsweise gutes Mittel zur Quantifizierung von Proteinen darstellt, sind diese Reaktionen weniger von der individuellen Aminosäurezusammensetzung abhängig. Andere Methoden basieren hingegen stärker auf den Eigenschaften der Seitenketten und sind daher in höherem Maße von der jeweiligen Proteinzusammensetzung abhängig [199].

Das Analyseergebnis ist generell sowohl vom verwendeten Färbetest als auch vom Kalibrierstandard abhängig [200, 201]. Bei der Bestimmung der Proteinkonzentration von humanem Speichel ergaben sich so bei Verwendung von BSA als Standard Werte zwischen 0.9 (Bradford-Assay) und 2.3 mg/L (Biuret-Assay). Wurde jedoch Polylysin als Standard verwendet, so erhöhte sich der mit dem Bradford-Assay bestimmte Wert auf 65.5 mg/L, wohingegen das Ergebnis des Biuret-Assays nahezu konstant blieb [202].

Verschiedene kolorimetrische Methoden zur Proteinquantifizierung sind in [202–205] beschrieben und verglichen. Die am häufigsten verwendeten Methoden sind der Biuret-Assay [206, 207], der darauf basierende Lowry-Assay mit Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz [208, 209], der Bradford-Assay mit Coomassie Brilliant Blue G-250 [210, 211] und der BCA-Assay mit Bicinchoninsäure [212–214]. Sie sollen im Folgenden kurz beschrieben werden.

### **Biuret-Assay**

Der Biuret-Assay ist im Vergleich zu den anderen Farb-Assays relativ unempfindlich. Der Name beruht auf einer Farbreaktion mit gelöstem Biuret (Carbamoylharnstoff) und Kupfersulfat in alkalischem, wässrigem Milieu (Biuret-Reaktion). Es entsteht ein rotvioletter Farbkomplex zwischen den  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen und je zwei Biuretmolekülen. Die Reaktion ist typisch für Verbindungen mit mindestens zwei CO-NH-Gruppen (Peptidbindungen) und kann daher auch für Proteine verwendet werden (Bildung eines Kupfer-Protein-Komplexes). Tyrosinreste tragen ebenfalls durch die Komplexbildung von Kupfer-Ionen zur Farbstoffbildung bei. Die Messung der Farbintensität erfolgt bei 540-550 nm (Variation des Absorptionsmaximums je nach Protein).

### **Lowry-Assay**

Die von Lowry und Mitarbeitern 1951 [208] veröffentlichte Kombination von Biuret-Reaktion mit dem Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz wird als Lowry-Assay bezeichnet. In alkalischer Lösung bildet sich der oben erwähnte Kupfer-Protein-Komplex. Dieser unterstützt die Reduktion von Molybdat bzw. Wolframat, die in Form ihrer Heteropolyphosphorsäuren eingesetzt werden (Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz) durch vornehmlich Tyrosin, Tryptophan und, in geringerem Maße, Cystein, Cystin und Histidin des Proteins. Dabei wird vermutlich  $\text{Cu}^{2+}$  im Kupfer-Protein-Komplex zu  $\text{Cu}^+$  reduziert, das dann mit dem Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz reagiert. Aufgrund der zusätzlichen Farbreaktion ist die Sensitivität gegenüber dem reinen Biuret-Assay gesteigert. Die resultierende tiefblaue Färbung wird bei einer Wellenlänge von 750, 650 oder 540 nm vermessen. Für den Lowry-Assay sind in der Literatur eine Fülle von Modifikationen beschrieben um die recht hohe Störanfälligkeit zu verbessern [209].

### **Bradford-Assay**

Der von Bradford 1976 beschriebene Assay [210] beruht nicht auf Redoxreaktionen mit Kupferionen, sondern auf Komplexbildung mit blauen Säurefarbstoffen, die als Coomassie-Brillantblau bezeichnet werden. In Gegenwart von Proteinen und in saurem Milieu verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Coomassie-Brillantblaus G 250 von 465 zu 595 nm. Grund dafür ist vermutlich die Stabilisierung des Farbstoffs in seiner unprotonierten, anionischen Sulfonat-Form durch Komplexbildung zwischen Farbstoff und Protein. Der Farbstoff bindet dabei recht unspezifisch an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten der Proteine. Am wichtigsten sind die Wechselwirkungen mit Arginin, weniger die mit Lysin, Histidin, Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin.

Ein besonderer Vorteil des Bradford-Assays ist, dass dieser Assay nicht durch reduzierende Verbindungen gestört wird. Der größte Nachteil hingegen ist die Unspezifität der Wechselwirkungen des Farbstoffs und die daraus resultierenden Protein-zu-Protein-Variationen der Ergebnisse [199].

### BCA-Assay

Die in der vorliegenden Arbeit angegebenen Proteinkonzentrationen wurden mit dem BCA-Assay bestimmt. Dieser Assay beruht ebenso auf dem Prinzip der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  und anschließender Komplexbildung mit Bicinchoninsäure (BCA). Reduzierend wirken können u.a. Cystein, Cystin, Tyrosin, Tryptophan und die Peptidbindung [213]. BCA bildet spezifisch mit  $\text{Cu}^+$  einen Farbkomplex, der bei 562 nm sein Absorptionsmaximum besitzt (Abbildung 2.1). Die auftretende Protein-zu-Protein-Variation der Ergebnisse kann durch Anwendung des Assays bei erhöhter Temperatur ( $60^\circ\text{C}$ ) verringert werden [202]. Vorteile des BCA-Assays sind die einfache Durchführung, die niedrige Nachweisgrenze und die gute zeitliche Stabilität des gebildeten Farbkomplexes.

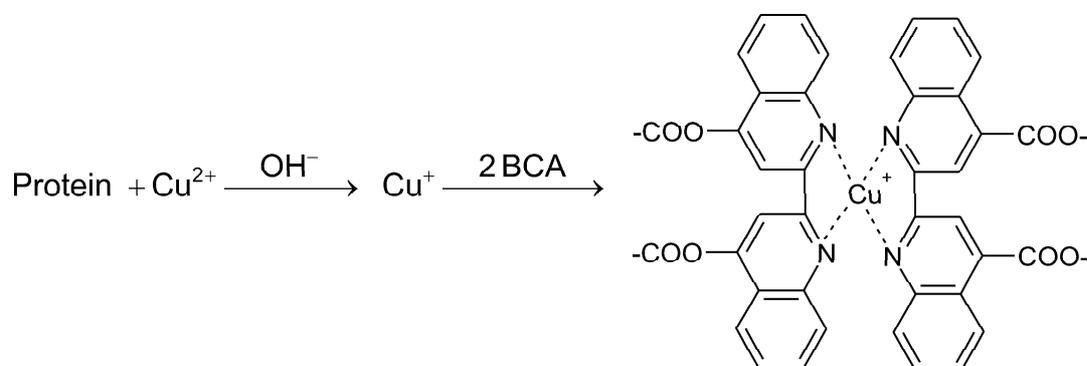


Abbildung 2.1: Prinzip des BCA-Assays.

### 2.3.2 Alternative Methoden

Ein sehr einfaches Verfahren zur Bestimmung des Proteingehaltes z.B. von Lebensmitteln ist die Methode von Kjeldahl [215]. Sie erfasst das Protein aufgrund seines annähernd konstanten Stickstoffgehaltes als *Rohprotein*. Die proteinhaltige Substanz wird durch Erhitzen mit konzentrierter Schwefelsäure und Katalysatoren mineralisiert, der

Stickstoff dabei zum  $\text{NH}_3$  reduziert und titrimetrisch bestimmt. Durch Multiplikation mit 6.25 des aus dem Ammoniakgehalt ermittelten N-Wertes wird der ungefähre Proteingehalt errechnet. Der Wert von 6.25 ergibt sich dabei aus dem durchschnittlich konstanten Stickstoffgehalt der Proteine von 16%. Allerdings reagieren bei der Methode von Kjeldahl nahezu alle stickstoffhaltigen Naturstoffe, was die Anwendbarkeit stark einschränkt [216].

Reine Proteine in relativ hohen Konzentrationen können spektrophotometrisch quantifiziert werden. Dazu wird die Lichtabsorption bei 280 nm gemessen. Die Absorption des Proteins lässt sich dabei hauptsächlich auf die Absorptionen von Tryptophan- und Tyrosinresten zurückführen und hängt damit von der Zusammensetzung des Proteins ab. Die dritte natürliche aromatische Aminosäure, Phenylalanin, trägt nur wenig zu den Absorptionseigenschaften von Proteinen bei. In Tabelle 2.1 sind die molaren spektralen Absorptionskoeffizienten von Trp, Tyr und Phe angegeben [199].

**Tabelle 2.1:** Molare spektrale Absorptionskoeffizienten  $\epsilon$  bei 280 nm und Absorptionsmaxima der natürlichen aromatischen Aminosäuren für wässrige Lösungen bei pH 7.1.

Aminosäure	Absorptionskoeffizient $\epsilon$ [ $10^{-3} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ]	Absorptionsmaxima [nm]
Tryptophan	5.559	219, 279
Tyrosin	1.197	193, 222, 275
Phenylalanin	0.0007	188, 206, 257

Eine weitere Alternative zu den Färbetests wurde von Zellmer et al. vorgeschlagen [217]. You et al. beschreiben eine Fluoreszenzmethode zur Proteinbestimmung mit 3-(4-Carboxybenzoyl)quinolin-2-carboxaldehyd [218], die auch bereits für atmosphärische Proben eingesetzt wurde [219]. Starodub et al. verwendeten optische Immunsensoren zur Proteinbestimmung im Aerosol einer biotechnologischen Produktionsstätte [220].

## 2.4 Aminosäuren und Aminosäureanalytik

Aminosäuren sind die Bausteine der Proteine. Sie können nach Hydrolyse der Peptidbindungen der Proteine analysiert werden. Die meisten chemischen Hydrolysemethoden sind ein Kompromiss zwischen vollständiger Freisetzung aller gebundenen Aminosäuren

und der chemischen Zersetzung der Aminosäuren, die simultan abläuft. Grob unterscheidet man saure, alkalische und enzymatische Hydrolysemethoden. Die Aminosäureanalyse wurde 1948 durch Stein und Moore begründet [221, 222]. Sie führten die Auftrennung der Aminosäuren zunächst an Stärkesäulen durch. Die Detektion der getrennten Aminosäuren erfolgte durch die Farbreaktion mit Ninhydrin. Mittlerweile existiert eine große Vielzahl an Publikationen zur Aminosäureanalyse [223–225].

### 2.4.1 Proteinhydrolyse

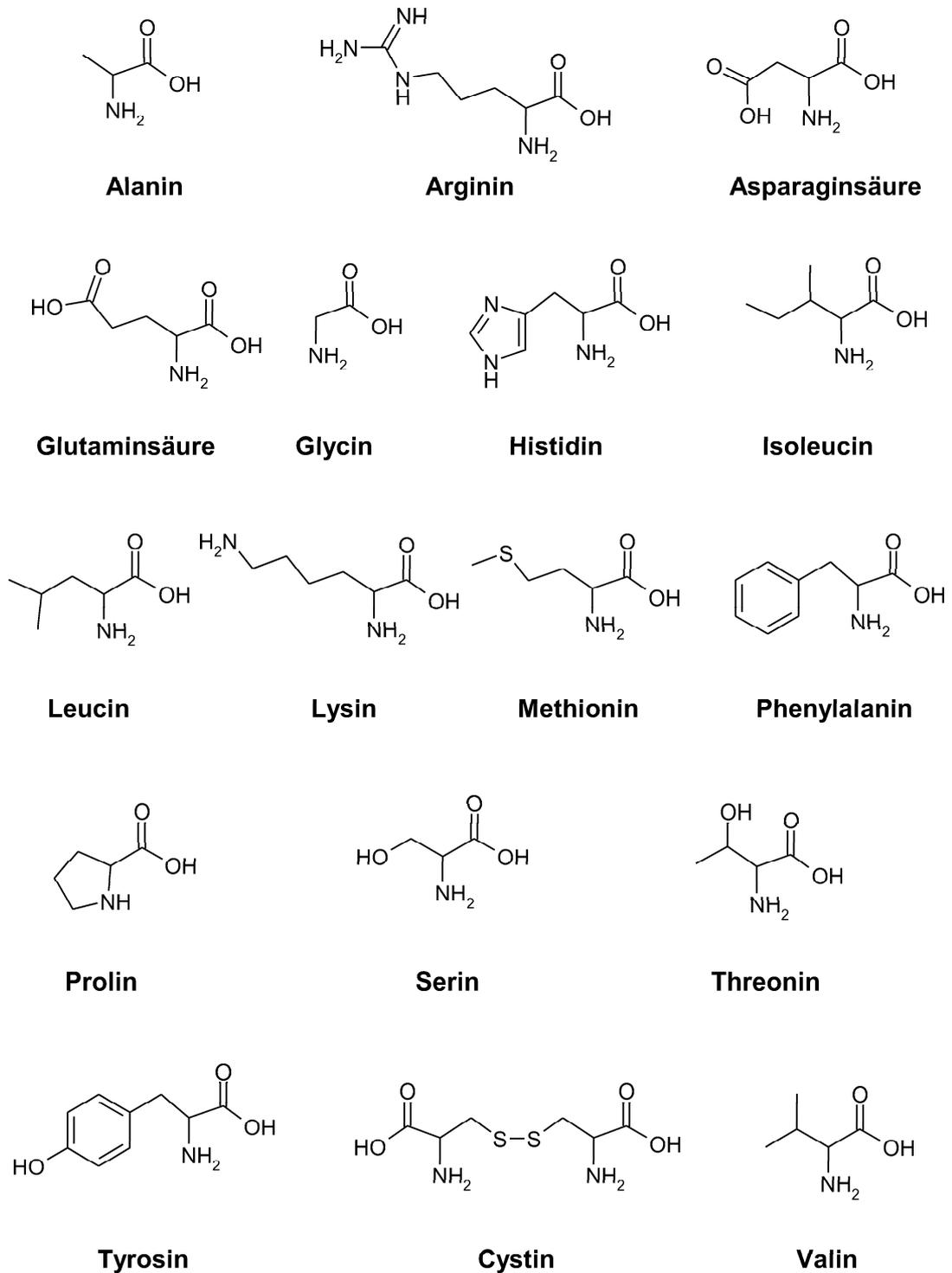
Die am häufigsten angewandte Methode ist die Hydrolyse mit 6 N Salzsäure für 20–24 h bei 110 °C unter Ausschluss von Sauerstoff [226, 227]. Glutamin und Asparagin werden dabei zu Glutaminsäure und Asparaginsäure hydrolysiert, Tryptophan nahezu völlig zerstört. Die chemischen Strukturen der aus der konventionellen sauren Hydrolyse resultierenden und in dieser Arbeit untersuchten Standardaminosäuren zeigt Abbildung 2.2.

Neben HCl werden zur sauren Hydrolyse häufig Sulfonsäuren, z.B. 4 M Methylsulfonsäure verwendet [228]. Auch Trifluoressigsäure-HCl-Mischungen werden eingesetzt [229]. Die alkalische Hydrolyse (meist mit 4.2 M NaOH) wird verwendet, wenn Tryptophan analysiert [230, 231] oder Nitrierungsartefakte wie z.B. Tyrosinnitrierung während der sauren Hydrolyse vermieden werden sollen [111]. Die enzymatische Hydrolyse ist eine sehr milde, aber eher selten gebräuchliche Hydrolysemethode [231, 232]. Für quantitative Aminosäureanalysen im Spurenbereich ist dabei die Autohydrolyse der Proteasen problematisch.

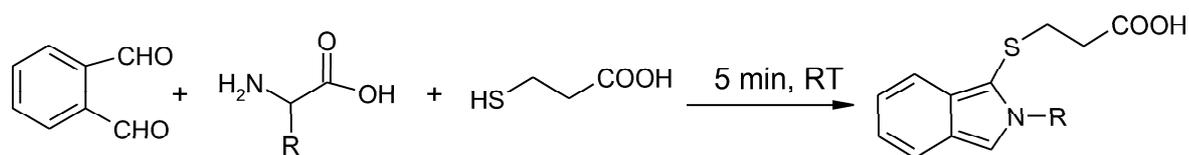
### 2.4.2 Analytik der Aminosäuren

Für die Analyse der Aminosäuren wurden leistungsfähige HPLC-Methoden mit Vor- und Nachsäulenderivatisierung entwickelt. Zur Vorsäulenderivatisierung wurden erfolgreich Fluorenylmethyloxycarbonylchlorid (FMOC) [233, 234], Phenylthiohydantoin (PTH) [235–238], Phenylisothiocyanat (PITC) [239, 240], Dabsylchlorid (DABS-Cl) [241, 242] oder Dansylchlorid [243, 244] eingesetzt. In dieser Arbeit wurden Aminosäuren nach Umsetzung mit o-Phthaldialdehyd (OPA) und Mercaptopropionsäure (MPA) mittels RP-C18-HPLC getrennt und die Fluoreszenz der Derivate detektiert [245–251]. Die Reaktionsgleichung für diese Derivatisierung ist in Abbildung 2.3 gezeigt.

Eine der ersten Methoden zur Trennung von Aminosäuren mittels Ionenaustauschern beschrieben Spackman, Stein und Moore 1958 [252]. Sie verwendeten zwei Kationenaustauschersäulen, postchromatographische Derivatisierung der Aminosäuren mit Ninhy-

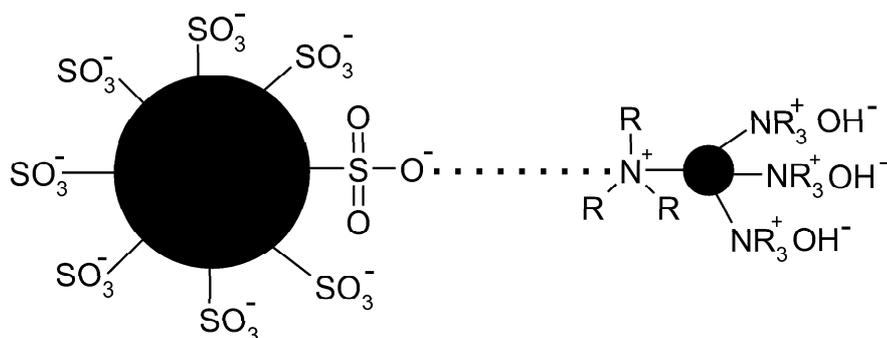


**Abbildung 2.2:** *Strukturen der aus saurer Hydrolyse resultierenden und in dieser Arbeit untersuchten siebzehn proteinogenen Standardamino-säuren.*



**Abbildung 2.3:** Reaktionsgleichung der Derivatisierung primärer Aminosäuren mittels *o*-Phthaldialdehyd (OPA) und Mercaptopropionsäure.

drin und anschließende Detektion der Lichtabsorption. Die Kationenaustauschchromatographie wurde in einer Vielzahl von Anwendungen zur Aminosäureanalyse beschrieben [253, 254]. Aminosäureanalytik mittels Anionenaustauschchromatographie und direkter Detektion mittels gepulster elektrochemischer Detektion wurde 1983 erstmals von Polta und Johnson beschrieben [255]. Jandik et al. entwickelten die Methode unter Verwendung der integrierenden gepulsten Amperometrie (IPAD) weiter [256–260]. Die verwendeten analytischen Säulen sind mit einem hydrophobem, polymeren, pellikularem Latex-Anionenaustauscharz gefüllt, das pH-stabil im Bereich von pH 0–14 ist (schematische Darstellung in Abbildung 2.4).



**Abbildung 2.4:** Schematischer Aufbau eines Latex-Anionenaustauschers.

Als Substrat dient ein Polystyrol/Divinylbenzol-Copolymer mit einem Partikeldurchmesser von  $8.5 \mu\text{m}$  und einem Vernetzungsgrad von 55 %. Die Latex-Teilchen (Durchmesser 80 nm) sind mit einem Alkylamin funktionalisiert und nur zu 1 % vernetzt [261, 262].

## 2.5 Immunologische Methoden

### 2.5.1 Antikörper

Antikörper sind globuläre Proteine, die eine wichtige Rolle im Immunsystem der Wirbeltiere spielen. Sie dienen als Fänger und Marker körperfremder Proteine und Organismen (Bakterien, Viren, Parasiten). Antikörper können bislang nicht synthetisch hergestellt werden, sondern werden durch Immunisierungen von Versuchstieren gewonnen. Man unterscheidet monoklonale und polyklonale Antikörper. In immunologischen Bestimmungsverfahren sind die Struktur der Antikörper und Eigenschaften wie Affinität und Selektivität äußerst bedeutsam. Daher sollen diese im Folgenden näher erläutert werden.

#### Struktur von Antikörpern

Für immunanalytische Zwecke werden hauptsächlich Antikörper aus Immunglobulin G (IgG) verwendet. Diese werden von den B-Lymphozyten gebildet und machen im Plasma und Extrazellularraum bei Säugetieren ca. 75% des gesamten Immunglobulins aus. Daneben werden noch vier weitere Immunglobulinklassen unterschieden, IgA, IgD, IgE und IgM. IgG-Antikörper besitzen eine Molekülmasse von etwa 150 000 Dalton und bestehen jeweils aus zwei identischen schweren (heavy, H) und leichten (light, L) Peptidketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Abbildung 2.5). Die beiden Antigenbindungsstellen werden von den variablen Teilen beider Ketten gebildet ( $V_H$  und  $V_L$ ).

Eine andere gebräuchliche Bezeichnung für Teilstrukturen eines IgG-Moleküls wurde von dessen Spaltbarkeit durch Proteasen hergeleitet. Das Enzym Papain spaltet z.B. das Y-förmige Molekül in den Gelenkregionen, so dass insgesamt drei Bruchstücke entstehen: Die zwei identischen, monovalenten  $F_{ab}$ -Fragmente ( $F_{ab}$ , antigen-bindendes Fragment) und der  $F_c$ -Teil (kristallisierbares Fragment). Der  $F_c$ -Teil verfügt über Kohlenhydratreste, so dass die Antikörper zu den Glycoproteinen gezählt werden.

Antikörper können über Wasserstoffbrücken- und Ionenbindungen, van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen bestimmte Moleküle fest binden. Diese werden Antigene genannt. Natürliche Antigene sind meistens Proteine oder auch Polysaccharide, seltener Glycolipide oder andere Substanzen. Antigene, die bei einem Säugetier eine Immunantwort erzeugen, heißen Immunogene. Eine Substanz, die zu klein ist, um selbst immunogen zu sein, jedoch bei Kopplung an einen geeigneten Träger immunogen wird, ist ein Hapten (meist  $< 1000$  Dalton). Die Bindungsstelle, an der ein Antikörper an das Antigen bindet, wird als *Epitop*, der antigenbindende Teil des Antikörpers

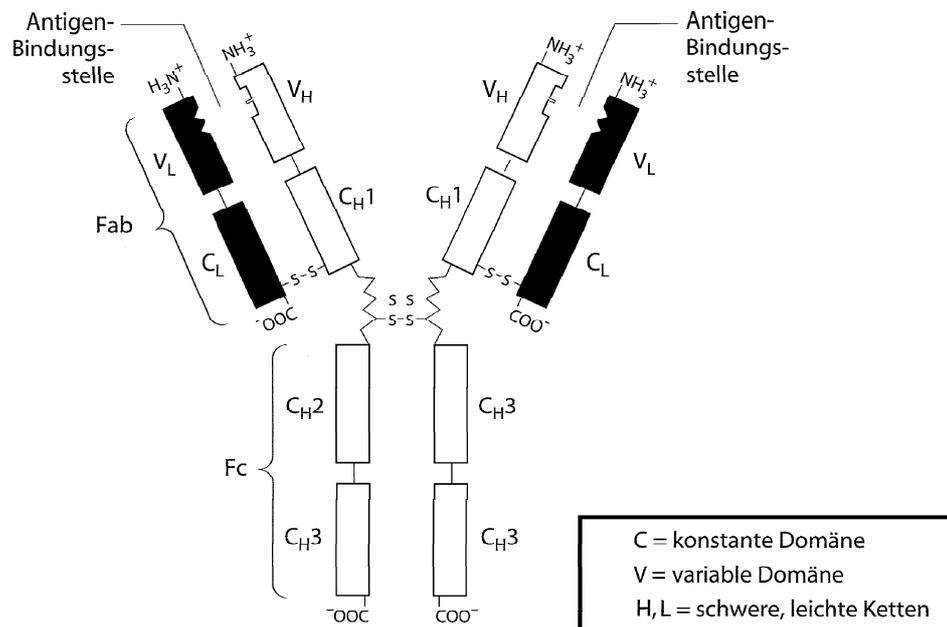


Abbildung 2.5: Prinzipieller Aufbau eines Moleküls Immunglobulin G [51].

als *Paratop* bezeichnet. Die Bindungseigenschaften eines Antikörpers sind abhängig von der Bindungsstärke (Avidität) zu seinem Antigen. Die Avidität setzt sich aus mehreren Teilkomponenten zusammen:

- Der Affinität, welche die monovalente Bindungsstärke zwischen Epitop und Paratop definiert, die über die Bestimmung der Gleichgewichtskonstante gemessen wird (thermodynamische Konstante);
- der Multivalenz von Antikörpern;
- der (oft vernachlässigten) Assoziation zwischen den nichtvarianten Teilen der IgG-Moleküle (konstante Domäne) nach Antigenbindung.

Der konstante Teil von Antikörpern variiert innerhalb von Arten nicht, ist jedoch von Art zu Art verschieden. Dies ist der Grund dafür, dass Antikörper einer Tierart für andere Tierarten Antigene darstellen und dass es möglich ist, Antikörper gegen Antikörper herzustellen.

### Gewinnung von polyklonalen und monoklonalen Antikörpern

Im Allgemeinen werden Antikörper nur gegen Moleküle hergestellt, die eine Molmasse von mindestens 5 000 Dalton besitzen [263]. Kleinere chemische Verbindungen müs-

sen an Carrierproteine gebunden werden, um das Immunsystem zu stimulieren. Als Trägermolekül werden häufig Rinderserumalbumin (BSA), Hämocyanin aus der Napfschnecke (KLH) oder Schweinethyroglobulin (PTG) verwendet [264]. Die nach einer Immunisierung gewonnenen polyklonalen Antikörper stellen keine einheitliche Substanz dar, sondern eine heterogene Mischung von Molekülen, die sich in ihren Spezifitäten und Bindungsstellen bezüglich ihres Zielantigens unterscheiden. Die Antigen-Antikörper-Komplexbildung ist daher bei polyklonalen Antikörpern auch häufig dann noch möglich, wenn das Antigen an einer Bindungsstelle leicht verändert wurde. Dieses leicht modifizierte Antigen kann von einem anderen Antikörper des Serums an einer anderen Bindungsstelle gebunden werden. Damit werden Immunoassays, in denen polyklonale Antikörper verwendet werden, nicht so leicht durch Veränderungen am Antigen gestört. Weiterhin ist die Gewinnung von polyklonalen Antikörpern relativ kostengünstig. Da jedoch jedes Tier anders auf eine Immunisierung reagiert, ist die Antikörpergewinnung an ein bestimmtes Individuum gebunden und die maximale Menge des erhältlichen Serums durch dieses Tier und seine Lebenserwartung begrenzt.

Monoklonale Antikörper werden gewonnen, indem nach wiederholter Immunisierung einem Tier (i.a. Maus) die Milz entnommen und die darin enthaltenen Zellen mit Myelomzellen zur Bildung der unbegrenzt vermehrungsfähigen Hybridomzellen fusioniert werden [265]. Antikörper-produzierende Zellen können nämlich nicht dauerhaft kultiviert werden. Sie können jedoch mit der sogenannten Hybridom-Technik mit einer Myelomzelle verschmolzen werden, und man erhält eine unbegrenzt teilungsfähige Zelle zur Produktion von monoklonalen Antikörpern. Diese Hybridomzellen werden vereinzelt und in einem Screening-Verfahren auf Antikörper gegen das injizierte Antigen getestet. Die Durchführung des Antikörper-Screenings entscheidet dabei, welche Zellen für die Antikörperproduktion ausgewählt werden. Es gibt dazu zwei grundlegende Verfahren, wobei zunächst entweder der zu untersuchende Antikörper oder das Antigen auf der Mikrotiterplatte immobilisiert wird.

Wird mit dem Antikörper vorbeschichtet, so erfolgt als nächster Schritt die Inkubation mit dem markierten Antigen. Dabei entspricht ein hohes Signal einem stark bindenden Antikörper. Geht das Signal bei zusätzlicher Zugabe des Haptens (bei Nitroproteinen wäre dies Nitrotyrosin) bereits bei geringen Konzentrationen stark zurück, so liegt ein hochaffiner Antikörper vor, bei dem Antigen und Hapten um die Bindungsstelle konkurrieren. Bindet der Antikörper mit niedriger Affinität, jedoch bivalent, so erfolgt die Inhibition erst durch hohe Hapten-Konzentrationen. Wird an einen Antikörper niedriger Affinität ein Antigen gebunden, so kann bei diesem Testformat an die zweite Bindungsstelle des Antikörpers zusätzlich ein Hapten gebunden werden, da die beiden Bindungs-

stellen unabhängig voneinander sind. Die kompetitive Hemmung der Antigenbindung tritt dabei erst bei viel höheren Haptenkonzentrationen durch Verschiebung des chemischen Gleichgewichts zugunsten der Antikörper-Hapten-Bindung auf. Somit können bei dieser Art des Screenings hochaffine und niedrigaffine Antikörper voneinander unterschieden werden, obwohl diese durch multivalente Bindung eine ähnliche Avidität besitzen können.

Werden im Screening jedoch nicht die Antikörper, sondern wird das Antigen immobilisiert, so können hoch- und niedrigaffine Antikörper unter Umständen nicht mehr unterschieden werden. Das immobilisierte Antigen wird im zweiten Schritt des Screenings mit den zu untersuchenden Antikörpern inkubiert. Dabei kann die Bindung niedrigaffiner Antikörper verstärkt werden, indem der zweite Arm des Y-förmigen IgG-Moleküls an ein zweites Epitop des Antigens bindet. Damit bindet auch dieser Antikörper, dessen Bindung zum Antigen mit nur einer Bindungsstelle eigentlich niedrigaffin erfolgt, so stark, dass Inhibition bei geringen Haptenkonzentrationen kaum stattfindet. Die Affinitätskonstanten der beiden Bindungsstellen ergeben dabei multiplikativ eine viel höhere Avidität und man erhält eine Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten des Antigen-Antikörper-Komplexes. Aus der zweifachen Bindung eines Antikörpers mit der Affinitätskonstante von  $10^4$  L/mol würde man eine Bindungskonstante (Avidität) von  $10^8$  L/mol erhalten. Hochaffine Antikörper binden mit Affinitätskonstanten im Bereich von  $10^8$  bis  $10^{10}$  L/mol [266]. Werden die Antikörper für Assays verwendet, in denen nur multivalente Antigene (wie z.B. hochnitrierte Proteine mit einem hohem Anteil an Nitrotyrosinresten) bestimmt werden sollen, so fällt der Unterschied zwischen hochaffinen Antikörpern und niedrigaffinen Antikörpern, die jedoch mit einer hohen Avidität binden, unter Umständen nicht auf. Größere Bedeutung erlangt dieser Unterschied dann, wenn man Antigene mit nur einem Epitop bestimmen möchte. Diese würden zwar sehr gut von hochaffinen Antikörpern gebunden werden, bei niedrigaffinen Antikörpern ist jedoch das Bindungsgleichgewicht auf die Seite der dissoziierten Komponenten verschoben.

### 2.5.2 Immunoassays

Immunochemische Bestimmungsmethoden werden seit der Entdeckung insulinbindender Antikörper von Berson und Yalow 1959 im Bereich der klinischen Chemie für die Diagnostik oder zu therapeutischen Zwecken eingesetzt [267]. Über die Herstellung von Antikörpern in der Umweltanalytik wurde erstmals 1968 gegen das Insektizid Parathion berichtet [268]. Immunoassays basieren auf der Reaktion des Analyten oder Antigens (AG) mit einem selektiven Antikörper (AK). Als Folge bildet sich ein Antigen-Antikörper

(AG-AK)-Komplex, der gemessen werden kann. Die Reaktion wird charakterisiert durch das Massenwirkungsgesetz:



$$K = \frac{[AG - AK]}{[AK] \cdot [AG]} \quad (2.2)$$

[AK]	Konzentration des Antikörpers [mol/L]
[AG]	Konzentration des Antigens [mol/L]
[AG-AK]	Konzentration des Antigen-Antikörper-Komplexes [mol/L]
K	Affinitätskonstante [L/mol].

Die ersten praktisch durchgeführten Immunoassays basierten auf radioaktiver Markierung einer der Testkomponenten (Radio-Immunoassay: RIA, Immunoradiometrie Assay: IRMA). Aufgrund der erforderlichen Messeinrichtung und wegen des radioaktiven Abfalls wurde zur Markierung mit Enzymen gewechselt, die eine vergleichbare Testsensitivität liefern (Enzymimmunoassay). Je nach Art der Markierung unterscheidet man zwischen Fluoreszenz-Immunoassay, Phosphoreszenz-Immunoassay und Chemilumineszenz-Immunoassay. Es gibt eine Reihe von verschiedenen Testformaten zur Durchführung von Immunoassays, die in zahlreichen Publikationen beschrieben sind [269, 270]. Sie werden prinzipiell in zwei Hauptkategorien unterteilt: homogene und heterogene Immunoassays. Eine weitere Unterscheidung erfolgt noch in kompetitive und nichtkompetitive Immunoassays.

Homogen bedeutet in diesem Zusammenhang, dass sowohl die Antikörperreaktion als auch die Messung des Signals in Lösung durchgeführt werden, ohne dass freie und von Antikörpern gebundene Spezies voneinander getrennt werden müssen [271]. Waschschritte sind bei homogenen Tests nicht notwendig.

Am häufigsten wird jedoch der heterogene Enzym-Immunoassay (EIA) wegen seiner Empfindlichkeit und problemlosen Durchführung verwendet. Dabei bedeutet heterogen, dass eine Komponente des AG-AK-Komplexes an einer Festphase gebunden vorliegt. Meist dienen dazu die Kunststoffoberflächen von Mikrotiterplatten oder modifizierte Glasoberflächen. Heterogene Immunoassays haben in der Regel niedrigere Nachweisgrenzen als homogene Assays. Das bekannteste Prinzip mit der häufigsten Anwendung ist der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). Es wird in zahlreichen Publikationen erläutert [272–278]. Die gebräuchlichsten Enzyme sind Alkalische Phosphatase,

Peroxidase,  $\beta$ -Galactosidase, Urease und Glucoseoxidase, wobei sich Peroxidase besonders durch ihre Umsatzgeschwindigkeit und Stabilität auszeichnet [279].

### Einseitiger nichtkompetitiver Immunoassay

Beim einseitigen nichtkompetitiven Immunoassay werden auf der Oberfläche einer Mikrotiterplatte eine konstante Menge an Coating-Antigen (Nitro-BSA) durch Adsorption immobilisiert. Proteine und Nitroproteine haften meist gut an der Oberfläche der Mikrotiterplatten, ohne dass Salze und niedermolekulare Bestandteile (ausgenommen Tenside) stören. Die Immobilisierung der Moleküle erfolgt dabei statistisch, d.h. bei ungünstiger Orientierung der Proteinmoleküle stehen diese nicht für die Bindung des Antikörpers zur Verfügung. Deshalb müssen bei diesem Testformat die Bedingungen für die Immobilisierung der Standardlösungen und der Probenlösungen identisch sein (gleichzeitiges Auftragen der Lösungen). Nach einer vorbestimmten Inkubationsdauer werden die Kavitäten (Vertiefungen) der Mikrotiterplatte gewaschen, und ungebundenes Coating-Antigen wird entfernt. Die noch freien Bindungsstellen der Plattenoberfläche werden mit einer konzentrierten Proteinlösung („Blocking“) abgesättigt. Dazu eignen sich z.B. Rinderserumalbumin, Casein oder kommerziell erhältliche Blockingreagenzien, die aus Proteingemischen bestehen. An das Blocking schließt sich ein Waschschriff an, bei dem alle in Lösung befindlichen Verbindungen (Blockingreagenz, Probenmatrix) entfernt werden. Daraufhin erfolgt die Inkubation mit einem gegen den Analyten gerichteten Antikörper (Primärantikörper, in dieser Arbeit Antikörper gegen Nitrotyrosin). Dabei wird umso mehr Antikörper gebunden, je mehr Analyt an der Oberfläche der Mikrotiterplatte adsorbiert ist bzw. in der Probe vorhanden war. Ein enzymmarkierter Sekundärantikörper (in dieser Arbeit Markierung mit Meerrettichperoxidase) bindet spezifisch die Antikörper an den Coating-Antigenen. Der Überschuss an Sekundärantikörper wird von der Platte gewaschen. Ein zugegebenes Substrat wird durch enzymatische Katalyse durch das Enzym am Sekundärantikörper in ein farbiges Produkt umgesetzt. In dieser Arbeit wurde dazu 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin verwendet, das durch die enzymatische Reaktion in einen blauen Charge-Transfer-Komplex überführt wird. Das Abstoppen der enzymatischen Reaktion durch Säurezusatz führt zu einem Farbumschlag nach gelb aufgrund der Bildung des Diphenochinondiimmoniumions [280]. Für eine Quantifizierung der Ergebnisse muss bei jedem Test eine Standardverdünnungsreihe mit aufgetragen werden. In Abbildung 2.6 ist das Prinzip des einseitigen nichtkompetitiven Immunoassays dargestellt.



### Indirekter kompetitiver Assay

Coating und Blocking der Mikrotiterplatte erfolgt wie beim einseitigen nichtkompetitiven Assay. Die Kavitäten werden nach dem Blocking gewaschen und anschließend Standardlösungen mit ansteigender Analytkonzentration oder Probelösungen in die Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettiert. Dazu wird eine konstante Menge Primärantikörper gegeben. Das immobilisierte Hapten und der frei vorliegende Analyt konkurrieren um die Bindungsstellen des im Unterschuss vorhandenen Antikörpers. Während der Inkubationszeit bilden sich AK-AG-Komplexe aus, wobei die Menge an freien Komplexen bei sonst gleichen Bedingungen abhängig von den Affinitäten des AK zu Testsubstanz bzw. immobilisiertem Hapten ist. Nach dem kompetitiven Schritt werden alle ungebundenen Bestandteile von der Mikrotiterplatte gewaschen. Es erfolgt die Inkubation mit einem enzymmarkierten Sekundärantikörper, Enzymreaktion und Abstoppen wie für den einseitigen nichtkompetitiven Assay beschrieben. Diese Art von Immunoassay wird typischerweise als Inhibitionstest bezeichnet, da eine hohe Analytkonzentration die Bindung des Antikörpers an der Platte bzw. dem Coating-Antigen verhindert. Das gebildete enzymatische Produkt ist direkt proportional zur gebundenen Menge an Primärantikörper auf der Platte und umgekehrt proportional zur Analytmenge im Standard bzw. in der Probe.

### Sandwich-Immunoassays

Sandwich-Immunoassays eignen sich besonders zur Detektion von Antigenen mit mehreren verschiedenen Epitopen [270]. Dabei werden zwei verschiedene Primärantikörper verwendet und potenziell eine höhere Selektivität als bei einseitigen Tests erzielt, da Kreuzreaktionen durch die doppelte Antikörpermarkierung unterdrückt werden können. Zu einem Überschuss an immobilisierten Antikörpern wird der Analyt gegeben. Nach einem Inkubations- und Waschschrift erfolgt die Addition des zweiten Primärantikörpers. Ist dieser unmarkiert, so muss ein dritter, markierter Antikörper (Sekundärantikörper) nach einem weiteren Waschschrift zugegeben werden. Die Entwicklung der Mikrotiterplatte erfolgt analog zum einseitigen nichtkompetitiven Immunoassay. Das Testprinzip eines Sandwich-Immunoassays ist in Abbildung 2.8 schematisch dargestellt. In der Literatur wurden bereits Sandwich-Immunoassays für Nitroproteine [281] sowie für Bet v 1 beschrieben [282, 283].

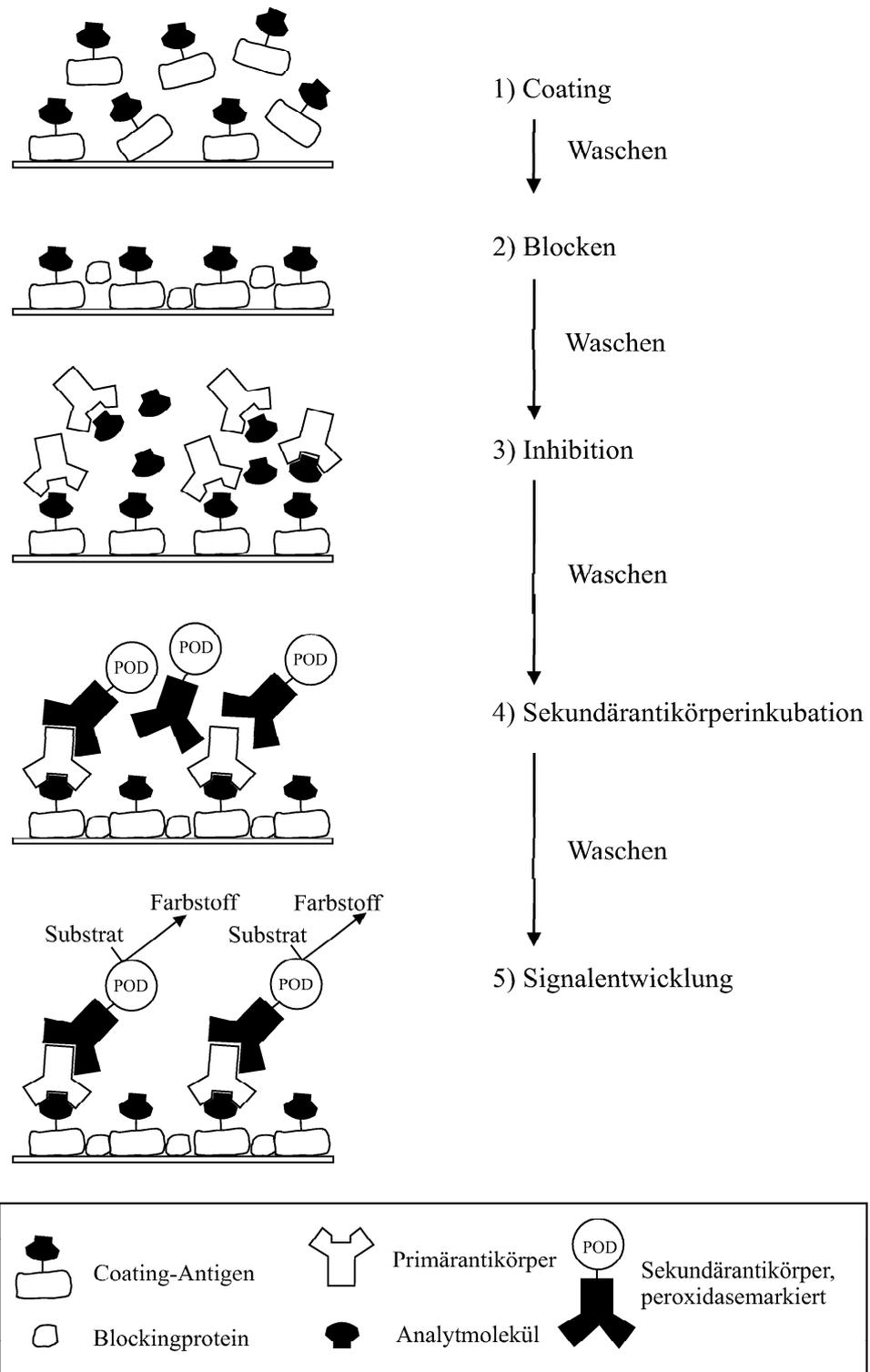


Abbildung 2.7: Prinzip des indirekten kompetitiven Immunoassays.

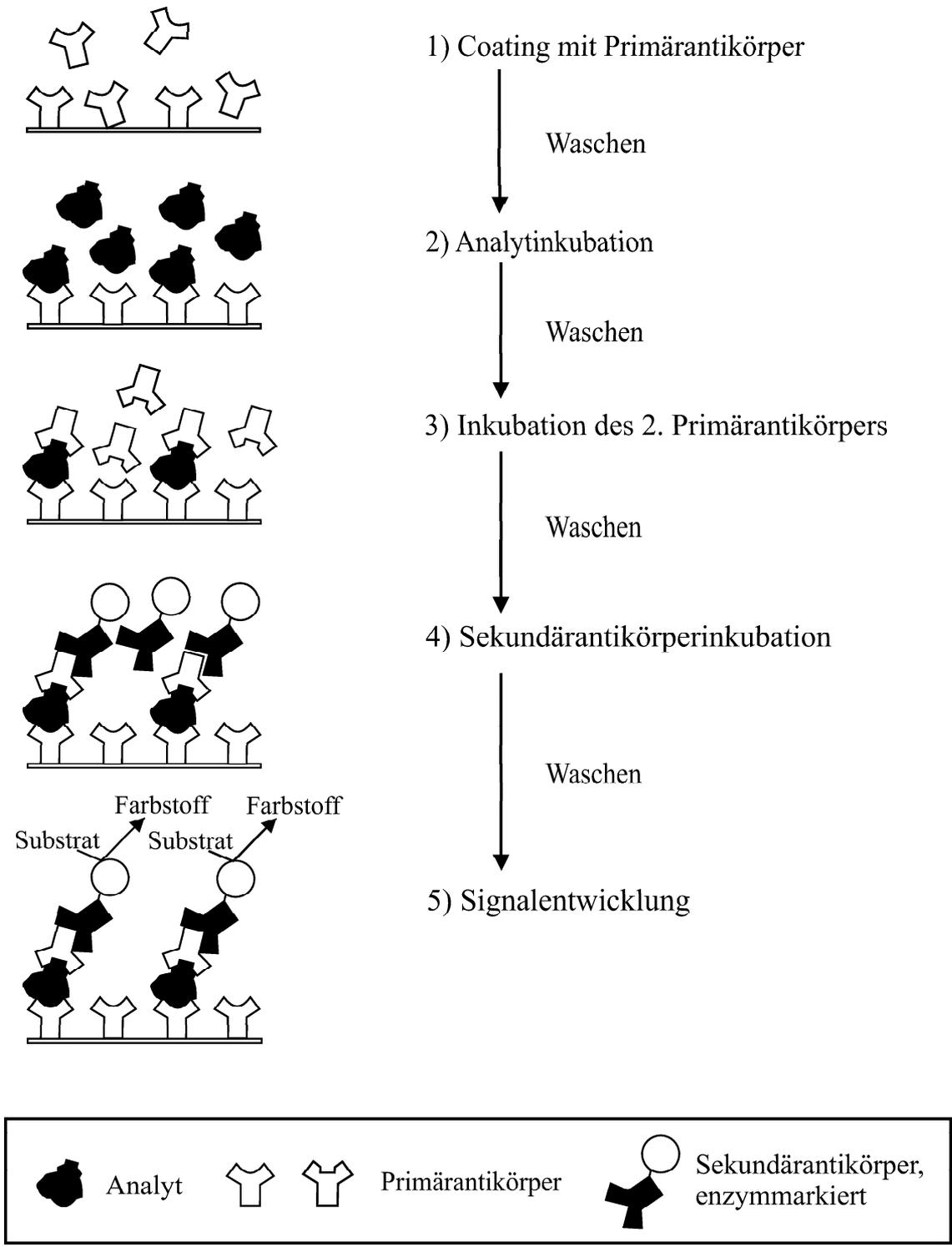


Abbildung 2.8: Prinzip des Sandwich-Immunoassays.

### 2.5.3 Auswertung der photometrischen Immunoassay-Messdaten

Bei Auftragung der photometrischen Absorptionswerte gegen den Logarithmus der Analytkonzentration wird eine sigmoidale Fitkurve erhalten. Die Auswertung der Rohdaten erfolgt mittels der vierparametrischen Gleichung nach Rodbard [284].

$$Y = \frac{A - D}{1 + \left[\frac{X}{C}\right]^B} + D \quad (2.3)$$

X	Analytkonzentration
Y	Absorption (450 nm)
A	Maximale Absorption (obere Asymptote)
B	Steigung am Testmittelpunkt
C	Testmittelpunkt (50 %-Wert)
D	Minimale Absorption (untere Asymptote).

Betrachtet man das Fehlerprofil einer sigmoidalen Kalibrierkurve, so zeigt sich, dass der Variationskoeffizient im steilen Bereich der Kurve klein und nahezu konstant ist, während er in den asymptotischen Randbereichen schnell größer wird. Deshalb ist der Testmittelpunkt, der im steilsten Bereich der Kurve liegt, eine wichtige Kenngröße eines Immunoassays, da dieser ungefähr die Mitte des Messbereichs des Assays angibt. Der Testmittelpunkt C ist gleich dem Wendepunkt der sigmoidalen Kurve. Mit dem Testmittelpunkt lässt sich die Empfindlichkeit eines Testes charakterisieren. Es können nur Proben, die im Konzentrationsbereich von etwa einer Zehnerpotenz um den Testmittelpunkt liegen, genau gemessen werden. Außerhalb dieses Bereiches sind die Messwerte mit größeren relativen Fehlern behaftet.

#### Bestimmung der Affinitätskonstanten

Die Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten einer Analyt-Antikörper-Bindung ist ein wichtiger Bestandteil der Charakterisierung eines Antikörpers. Die Affinität des Antikörpers gibt Aufschluss über die maximale Empfindlichkeit, die mit einem Immunoassay unter Verwendung dieses Antikörpers erreicht werden kann. Die Bestimmung der Affinitätskonstanten in der vorliegenden Arbeit erfolgte nach dem 1992 von Weller eingeführten Verfahren mittels kompetitivem Immunoassay [285]. Aus dem Massenwirkungsgesetz lässt sich mathematisch herleiten, dass sich die Affinitätskonstante K aus dem Kehrwert des minimalen Testmittelpunktes  $C_{min}$  ergibt. Dieses Minimum wird erreicht,

wenn sowohl die Konzentration des auf der Platte immobilisierten Analyten als auch die Antikörperkonzentration infinitesimal niedrig sind (Konzentration des immobilisierten Analyten  $\rightarrow 0$  und Konzentration des Antikörpers  $\rightarrow 0$ ).

$$K = \frac{1}{C_{min}} \quad (2.4)$$

Die experimentelle Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten mit dieser Methode erfolgt durch sequentielle Verdünnung der Analyt- und Antikörperkonzentration und Ermittlung des Testmittelpunktes. Ist der Testmittelpunkt am Minimum angelangt, so nimmt das maximale Signal aufgrund der Verdünnung stark ab. Diese Methode erreicht ihre Grenzen bei extrem hohen Antikörperaffinitäten, die in dieser Arbeit jedoch nicht beobachtet wurden. In einem derartigen Fall würde die Nachweisstärke des verwendeten enzymmarkierten Sekundärantikörperkonjugates die exakte Bestimmung der Affinitätskonstanten beschränken, es würde jedoch trotzdem eine Mindestaffinität erhalten werden.

### Kreuzreaktivitäten

Einen weiteren Beitrag zur Charakterisierung eines Antikörpers leistet die Bestimmung seines Kreuzreaktionsmusters, d. h. seiner Querempfindlichkeiten. Allgemein wird von Kreuzreaktion zwischen zwei Liganden (Analyten) bzgl. der Bindung zu einem Antikörper oder Rezeptor gesprochen, wenn beide Liganden dieselbe Bindungsstelle besetzen können und eine messbare Affinität zu ihr aufweisen. Die Messung der Kreuzreaktionen ist sowohl von analytischem Interesse als auch von Interesse für die molekularen Bindungsmechanismen des Antikörpers. Am eindeutigsten ist die Kreuzreaktion CR durch das Verhältnis der Affinitätskonstanten von Kreuzreaktant  $K_{KR}$  und Standard  $K_{Standard}$  zu einem gegebenen Antikörper definiert:

$$CR = \frac{K_{KR}}{K_{Standard}} \cdot 100 \% \quad (2.5)$$

Der reziproke Wert der durch Gleichung 2.5 definierten Kreuzreaktion wurde bereits 1976 von Johnston und Eisen [286] als „Selektivität“ eingeführt. In diesem Fall ist die Kreuzreaktion lediglich von der Temperatur abhängig, da die Affinitätskonstanten nach der Van't Hoff'schen Gleichung temperaturabhängig sind und diese Abhängigkeit für jede Antigen-Antikörper-Reaktion unterschiedlich ist. Da jedoch die Bestimmung der Affinitätskonstanten schwierig ist, werden in der Literatur zahlreiche weitere Definitionen verwendet, die eine leichtere Bestimmung der Kreuzreaktion ermöglichen. Die

unterschiedlichen Definitionen können in zwei Kategorien eingeteilt werden: Eine Variante besteht darin, Konzentrationen zueinander ins Verhältnis zu setzen, die notwendig sind, um im Test das gleiche Signal zu erzeugen. Bei der anderen Kategorie von Definitionen werden Signale zueinander ins Verhältnis gesetzt, die von gleichen Mengen an Standard und Kreuzreaktant erzeugt werden. Beide Arten von Definitionen haben Vor- und Nachteile. Es existieren einige Übersichtsartikel zu diesem Thema [287, 288].

In der am weitesten verbreiteten Definition, die auch in dieser Arbeit verwendet wird, berechnet sich die Kreuzreaktion CR im kompetitiven Testformat über das Verhältnis der Testmittelpunkte von Standard  $C_{Standard}$  und Kreuzreaktant  $C_{KR}$  (Abraham-Definition, Gleichung 2.6) [289]:

$$CR_{50\%} = \frac{C_{Standard}}{C_{KR}} \cdot 100\% \quad (2.6)$$

Je nachdem, ob die Testmittelpunkte als massenbezogene oder molare Konzentrationen angegeben werden, wird eine massenbezogene oder molare Kreuzreaktion erhalten. Für analytische Zwecke wird die Kreuzreaktion meist massenbezogen angegeben, zur strukturellen Charakterisierung von Antikörpern ist jedoch die molare Angabe der Kreuzreaktion besser geeignet. Die Abraham-Definition ist der Johnston-Eisen-Definition äquivalent, wenn die Bedingungen der Gleichung 2.4 erfüllt sind. Unter diesen Bedingungen lassen sich bei bekannten Kreuzreaktionen und bekannter Affinität des Standards die Affinitäten der Kreuzreaktanden zu einem Antikörper berechnen.

## 3 Experimenteller Teil

### 3.1 Sammeln von Umweltproben

#### 3.1.1 Hochdurchsatz-Filtersammler

Um atmosphärische Aerosolpartikel auf Faserfiltern abzuscheiden, wurde der Hochdurchsatz-Filtersammler (High Volume Sampler) Digital DHA80 der Firma Riemer Messtechnik eingesetzt. Das Gerät ist ein stand-alone Instrument für den Außeneinsatz mit programmierbarer Zeitsteuerung, Protokolldrucker, Druck- und Temperatursensor, Durchflusskontrolle, Heizung und automatischem Wechsler für bis zu 15 Filter. Es wurde mit einem PM2.5 Probenahmekopf betrieben (Partikelgröße  $< 2.5 \mu\text{m}$ ) und ist in Abbildung 3.1 abgebildet. Als Filter wurden Quarz- (Munktell) und Glasfaserfilter (Macherey-Nagel) mit 150 mm Durchmesser verwendet. Für Testzwecke wurden auch teflonbeschichtete Glasfaserfilter und Celluloseacetat-Filter benutzt (Pall-Gelman bzw. Infiltec). Das Gerät arbeitete mit  $30 \text{ m}^3/\text{h}$  Durchfluss, der über eine Lichtschranke an einem Rotameter im Gerät in Abhängigkeit der Höhe über dem Meeresspiegel eingestellt und geregelt wurde. Probenahmekopf und Elektronik wurden im Winter beheizt. Die Temperatur des Aerosolstroms, Luftdruck und Filterbeprobung wurde vom Gerät mitprotokolliert. Insgesamt wurden an vier verschiedenen Orten Proben gesammelt. Dabei handelte es sich um einen urbanen (Luise-Kiesselbach-Platz, München), suburbanen (Großhadern, München), ruralen (Hohenpeißenberg, 986 m ü. N.N.) und einen alpinen Standort (Schneefernerhaus, Zugspitze, 2650 m ü. N.N.). Tabelle 3.1 gibt einen Überblick über die einzelnen Probenahmekampagnen. Zusätzlich sind externe Filter, die vom Deutschen Wetterdienst zur Verfügung gestellt wurden (Abschnitt 3.1.4), aufgelistet.

Glasfaser- und Quarzfilter wurden bei  $300^\circ\text{C}$  für 12 h in einer Aluminiumschale in einem Muffelofen (Heraeus, Heidelberg) ausgeheizt und anschließend im Trockenexsikkator über Blaugel getrocknet. Zur Wägung wurden die Filter 48 h in einem Feuchte-Exsikkator (gesättigte Kaliumcarbonat-Lösung, 45 % RH) äquilibriert, anschließend auf einem Edeltstahlgitter gewogen (Mettler Toledo AT261 DeltaRange). Die Filter wurden

**Tabelle 3.1:** Übersicht über Messkampagnen zur Probenahme von Filterproben.

Messkampagne	Standort	Zeitraum	Größen- fraktion	Anzahl Proben
IWC-1	München-Großhadern	12.04. - 19.04.2001	PM2.5	4
LKP	Luise-Kiesselbach-Platz	19.04. - 05.07.2001	PM2.5	37
IWC-2	München-Großhadern	26.07. - 04.08.2001	PM2.5	6
ZSP-1	Zugspitze	09.08. - 19.12.2001	PM2.5	26
HPB	Hohenpeißenberg	16.05. - 21.09.2002	PM2.5	49
IWC-3	München-Großhadern	21.09. - 23.10.2002	PM2.5	11
ZSP-2	Zugspitze	30.10. - 26.11.2002	PM2.5	9
DWD-1	Berlin	15.10. - 29.11.2001	PM10	7
DWD-2	Freiburg	16.02. - 26.04.2001	TSP	15

vor und nach der Beprobung wieder im Trockenexsikkator getrocknet. Zur Bestimmung der Massenzunahme durch die Beprobung wurden die beladenen Filter wiederum 48 h im Feuchte-Exsikkator äquilibriert und gewogen. Nach der sich anschließenden Trocknung im Trockenexsikkator wurden die Proben bis zur Analyse bei  $-23^{\circ}\text{C}$  in einem Tiefkühlschrank gelagert.

### 3.1.2 Niedrigdurchsatz-Filtersammler

Mit einem KleinfILTERGERÄT (maximaler Durchfluss  $2.5 \text{ m}^3/\text{h}$ ) wurden am LKP zusätzliche Filterproben über je ca. eine Woche gesammelt. Das KleinfILTERGERÄT wurde mit einem Probenahmekopf für Gesamtstaub (TSP, *Total Suspended Particles*) betrieben. Es wurden Teflonfilter mit einem Durchmesser von 47 mm verwendet. Die Filter wurden aus rechteckigen Bögen des Filtermaterials (Gelman Sciences, Zefluor,  $3 \mu\text{m}$  Porenweite) von Hand mit einer Laborschere ausgeschnitten. Teflonfilter wurden über Blaugel getrocknet und gewogen. TSP-Konzentrationen können jedoch nicht angegeben werden, da zum einen die Volumenmessung des LVS nicht korrekt arbeitete und der Sampler sich zudem von selbst abschaltete. Zwei der Filter wurden mit PBS extrahiert (Tabelle 9.17) und mittels einseitigem Immunoassay auf Nitroproteine untersucht.



Abbildung 3.1: High-Volume-Sampler Digital DHA 80 auf der Zugspitze (links) mit Blick ins Innere (rechts).

### 3.1.3 Straßenstaub

Mit einem Akku-Staubsauger (EURAS XXL 100) wurden an verschiedenen öffentlichen Straßen und Plätzen in München im Rahmen der vorangegangenen Diplomarbeit im Zeitraum vom 15.03.2000 - 16.06.2000 und im Rahmen dieser Arbeit am 03.05.2001 Staubproben gesammelt. Es wurden gezielt Orte ausgesucht, an denen Birken wuchsen. So wurde hauptsächlich in der Würmtalstraße (südliche Straßenseite, Hausnummern 27-53) und Saalburgstraße (gesamter Bereich) in München-Großhadern gesammelt (beides Birkenalleen) sowie am Luise-Kiesselbach-Platz (Ecke Heckenstaller-/Pilsenseestraße), wo ebenfalls Birken stehen. Für die Probenahme wurde jeweils ein frischer Filterbeutel

in den Sauger eingesetzt und vor der Luftansaugöffnung im Innern des Saugers ein rechteckiges (7 x 7 cm) Stück des Filtermaterials (Freudenberg Vliesstoffe) gelegt, um Feinstaub zurückzuhalten. Mit dem Akku-Sauger wurden dann die ausgewählten Straßen- bzw. Geh- und Radwegabschnitte abgesaugt. Der Inhalt des Filterbeutels wurde auf ein Analysensieb (Stenzel, Hamburg, DIN 4188) der Maschenweite 1 mm entleert und mit einem Holzstiel ausgeklopft. Ebenso wurde das rechteckige Stück Filtermaterial auf das Sieb ausgeklopft. Die gesamte Probe wurde dann auf einer Siebmaschine (Analysette 03, Fritsch) 2-3 min lang gesiebt. Es wurden Siebe der Maschenweiten  $63\ \mu\text{m}$ ,  $125\ \mu\text{m}$  sowie 1 mm verwendet. Einige Proben wurden mittels einer Schallsiebmaschine mit Sieben der Maschenweiten  $32\ \mu\text{m}$ ,  $15\ \mu\text{m}$  und  $5\ \mu\text{m}$  weiter gesiebt (detailliert beschrieben unter [290]). Die groben Fraktionen 0.125-1 mm und größer als 1 mm wurden verworfen, die Fraktionen  $< 63\ \mu\text{m}$  und  $63-125\ \mu\text{m}$  wurden getrennt gewogen und im Dunkeln in sauber gespülten Rollrandgläschen (10-30 mL) aufbewahrt.

### 3.1.4 Weitere Proben

Weitere Filterproben wurden vom Deutschen Wetterdienst (DWD) in Freiburg zur Verfügung gestellt. Es wurden insgesamt 15 Proben (TSP) aus dem Stadtzentrum von Freiburg i. Breisgau (Dach des Deutschen Wetterdienstes, Stefan-Meierstr., Freiburg i. Br., 30 m über Grund) erhalten und sieben Filterproben (PM10), die nahe einer Stadtautobahn in Berlin mit einem Kleinfiltergerät mit maximalem Durchfluss von  $2.3\ \text{m}^3/\text{h}$  gesammelt wurden. Diese insgesamt 22 Filterproben sind ebenfalls in Tabelle 3.1 aufgelistet.

**Tabelle 3.2:** *Übersicht über Fensterstaubproben.*

Probenahmeort	Datum	Proben Bez.
Heiglhofstr. 49, M.-Großhadern, Fensterbrett außen	06/2001	Heig1+2
Garmischer Str. 288, M.-Sendling, Glasscheibe Eingangstür	06/2001	Garm
Toemlingerstr., M.-Großhadern, (1) Fensterscheibe außen	09/2003	Toem1
Toemlingerstr., M.-Großhadern, (2) Fensterzwischenraum	09/2003	Toem2

Zudem wurden fünf Proben gesammelt, indem von der Glasoberfläche von Fenster- und Türscheiben in München mit einer Scheckkarte adsorbierter Staub abgeschabt bzw. der Staub im Zwischenraum eines Doppelfensters aus Holz gesammelt wurde (Tabelle 3.2).

Eine Probe eines kompletten Lüftungsfilters aus Glasfaser (Fa. Chemfill, betrieben im Bettenhaus F vom 15.07.1997 - 20.08.2001) der Maße 65 cm x 55 cm wurde vom Klinikum Großhadern zur Verfügung gestellt.

## **3.2 Extraktion der Proben**

### **3.2.1 Extraktion mit Puffer**

#### **Standardprozedur für 150 mm-Filter**

Die 150 mm-Filter wurden auf einer Schneideplatte aus Aluminium mittels eines eigens angefertigten Schneidmessers in 8 gleiche Teile geteilt und anschließend wurde jeweils 1/8 eines Filter weiterverwendet. Dieses Filterstück wurde mittels eines Teppichmessers auf einer Glasplatte 4-5 mal weiter zerschnitten, in ein Schraubdeckelgläschen (Volumen ca. 15 mL) gegeben und 6 mL 10 % v/v PBS-Puffer mit 20 ppm Natriumazidzusatz zupipettiert. Nach Hinzufügen eines Rührfisches wurde auf einem Magnetrührer 90 min unter Rühren extrahiert. Dabei wurde die Rührgeschwindigkeit zu Beginn maximal hoch eingestellt, so dass die Filterstruktur zerstört wurde und der Filter zu einem Faserbrei umgesetzt wurde. Die Gläschen wurden während des Rührens mehrmalig kontrolliert. Die Suspension wurde in ein Zentrifugengläschen überführt, der Rückstand einmalig mit ca. 3 mL verdünntem PBS-Puffer nachgewaschen und ebenfalls in das Zentrifugenglas überführt. Bei 5000 U/min wurde 15 min abzentrifugiert (ungekühlte Zentrifuge Universal 30 F, Fa. Hettich). Der Überstand wurde abpipettiert und durch einen 0.45  $\mu$ m Celluloseacetat-Spritzenfilter mit Glasfaser-Vorfilter filtriert. Der Spritzenfilter wurde mit 1 mL verdünntem (10 % v/v) PBS-Puffer nachgewaschen. Die Lösung wurde im Stickstoffstrom so rasch wie möglich zur Trockene eingedampft, wobei für jede Probe eine neue Pasteurpipette als Zuleitung für den Stickstoff benutzt wurde. Standen nicht ausreichend Plätze zum Abdampfen im Stickstoffstrom zur Verfügung, wurden die Proben bei 4 °C über Nacht gelagert. Die eingedampften Proben wurden ebenfalls zur Lagerung auf 4 °C gekühlt und so schnell wie möglich weiterverwendet. Zur Analytik mittels BCA-Assay wurden die eingedampften Proben in 2 mL Wasser rekonstituiert. Dieser Extrakt entsprach damit einer extrahierten belegten Filterfläche von 9.6 cm<sup>2</sup>/mL.

### **Extraktion von Straßenstaub, Fensterstaub, etc.**

Die Extraktion wurde analog der Standardprozedur für Filter durchgeführt, die Mengen variierten dabei jedoch. Die genauen Probe- und Puffermengen sind im Anhang (Tabellen 9.16 bis 9.18) angegeben. Die Probenextrakte wurden zunächst auf Nitroproteine in einseitigen und Sandwich-Immunoassays untersucht, dabei positiv getestete Proben wurden auch im BCA-Assay gemessen.

### **3.2.2 Extraktion mit Wasser**

150 mm-Filter wurden zur Analytik von wasserlöslichem organischem Kohlenstoff (WSOC) und von Sulfat mit UV-behandeltem deionisiertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage mit 20 mg/L Natriumazidzusatz extrahiert. Die Extraktion verlief analog zu der unter 3.2.1 beschriebenen Prozedur unter der Verwendung von Wasser anstelle von Puffer. Die verwendeten Celluloseacetat-Spritzenfilter wurden zur WSOC-Analytik durch dreimaliges Vorspülen mit je 15 mL Wasser gereinigt, um den Kohlenstoff-Blindwert zu reduzieren. Eingedampfte Extrakte wurden mit 2 mL Wasser rekonstituiert.

## **3.3 Bestimmung des Proteingehalts der Proben**

### **3.3.1 Größenausschlusschromatographie**

Das zur Trockene eingedampfte Eluat aus 3.2.1 wurde in 2 mL Wasser aufgenommen und der Lösevorgang bei Bedarf durch 3 min Inkubation im Ultraschallbad beschleunigt. Von der entstandenen Lösung wurden 1 mL entnommen, auf eine mit 30 mL 10 % v/v PBS-Puffer vorgespülte Gelchromatographie-Säule (PD10, Sephadex-GM25) gegeben und mit PBS-Puffer eluiert. Das Eluat bei der Probenaufgabe sowie 1 mL darauf wurden verworfen (insgesamt 2 mL Abfall). Die folgenden 4 mL Eluat wurden als makromolekulare Fraktion separat in einem Schraubdeckelgläschen aufgefangen und wiederum im Stickstoffstrom eingedampft. Für die Analyse mittels BCA-Assay wurde dieser Rückstand erneut in 1 mL Wasser aufgenommen und bei Bedarf weiter mit PBS-Puffer verdünnt.

### 3.3.2 BCA-Assay

#### Durchführung des BCA-Assays

Der Proteingehalt der Proben aus 3.3.1 wurde mit dem BCA-Assay (Micro-BCA-Assay, Uptima) bestimmt. Zur Durchführung des Tests wurden auf eine 96-Napf-Mikrotiterplatte je 150  $\mu\text{L}$  Probe in 3-4 Wiederholungen pipettiert. Eine Kalibrierreihe mit BSA im Bereich von 0.5-40 mg/L (PBS) wurde auf jede Mikrotiterplatte mit aufgetragen (Schritte 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20 und 40 mg/L jeweils in 3-4facher Wiederholung). Vom BCA-Reagenz (frisch hergestellt aus 50 Volumenteilen BCA-Reagenz A, 48 Volumenteilen BCA-Reagenz B und 2 Volumenteilen BCA-Reagenz C) wurden je 150  $\mu\text{L}$  zupipettiert. Für eine 96-Feld-Mikrotiterplatte wurden daher benötigt:

- 8.00 mL Reagenz A ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$  und Natriumtartrat in 0.2 N NaOH)
- 7.68 mL Reagenz B (Bicinchoninsäure, 4% in Wasser)
- 0.32 mL Reagenz C (Kupfersulfatlösung, 4% in Wasser)

Bei hohen Proteinkonzentrationen trat bereits direkt nach dem Hinzugeben des BCA-Reagenz ein Farbumschlag von grün nach hellviolett ein.

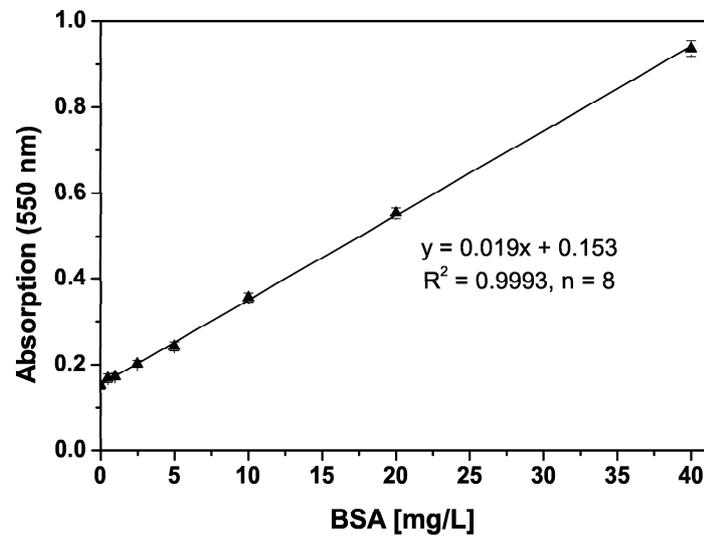
Die Mikrotiterplatte wurde in Alu-Folie eingeschlagen und bei 60 °C solange inkubiert, bis eine deutlich dunkelviolette Färbung des höchsten BSA-Standards zu sehen war (in der Regel 45-60 min). Da im verwendeten Acht-Kanal-Photometer nur bestimmte optische Filter ausgewählt werden konnten, erfolgte die Messung der MTP bei 550 nm, obwohl das Absorptionsmaximum des violetten Komplexes bei 562 nm liegt. Über die BSA-Kalibriergerade und die Absorption der jeweiligen Proben konnte der Proteingehalt der einzelnen Extrakte bestimmt werden. In Abbildung 3.2 ist eine typische Kalibrierkurve des BCA-Assays wiedergegeben.

#### Charakterisierung des BCA-Assays

Der BCA-Assay wurde bzgl. der Kreuzreaktivitäten verschiedener Proteine und Huminstoffe und hinsichtlich von Proteinverlusten durch Adsorption, Eindampfen und Größenausschlusschromatographie untersucht.

#### Kreuzreaktivitäten

Es wurden BCA-Assays mit den Proteinen Cellulase (*Aspergillus niger*),  $\alpha$ -Amylase (*Aspergillus oryzae*), Ovalbumin,  $\gamma$ -Rinderserumglobulin und Casein durchgeführt. Dazu



**Abbildung 3.2:** Kalibriergerade des BCA-Assays mit BSA (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung  $\pm 1s$ ).

wurden Lösungen der Proteine in PBS-Puffer analog den BSA Kalibrierlösungen von 0,5-40 mg/L verwendet. Die mittels der BSA-Kalibriergerade errechneten Konzentrationen wurden in Bezug zur BSA-Konzentration (100 %) gesetzt und so die Kreuzreaktivitäten bzw. der Proteingehalt (bei den Enzymen) berechnet.

Weiterhin wurden Huminstoffe auf Kreuzreaktivität im BCA-Assay untersucht: drei Huminsäuren, Huminsäure-Carbamidester und zwei Fulvinsäuren in Konzentrationen von 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100 und 250 mg/L. Diese Lösungen wurden als Proben im BCA-Assay gemessen. Zur Kontrolle wurde die Eigenabsorption der Humin- und Fulvinsäuren ohne Reagenz gemessen. Der Einfluss der Lichtabsorption der verwendeten Substanzen und Konzentrationen ohne BCA-Reagenz bei der Messwellenlänge von 550 nm wurde jedoch als vernachlässigbar eingeschätzt.

### Proteinverluste durch Adsorption

Achtelaliquote von frisch ausgeglühten Glasfaser- und Quarzfiltern sowie von einem Realfilter (GF, Sammelzeit drei Tage, März 2003, HPB, PM2.5) wurden mit 0-300  $\mu$ L BSA-Lösung (2 g/L in Wasser), entsprechend 0-600  $\mu$ g BSA belegt. Die Achtel wurden über Nacht in Alufolie im Trockenexsikkator über Blaugel aufbewahrt. Die Extraktion der Filterstücke erfolgte wie unter 3.2.1 beschrieben. Die Zentrifugate der Proben mit

den eingesetzten Mengen an BSA bis  $100\ \mu\text{g}$  wurden zur Aufkonzentrierung im Stickstoffstrom eingedampft und mit 2 mL deionisiertem Wasser wiederaufgenommen, Proben mit 200-300  $\mu\text{g}$  BSA wurden in Messkolben auf 10 mL und Proben mit 400-600  $\mu\text{g}$  auf 20 mL mit PBS aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben auf ihren Proteingehalt mittels BCA-Assay untersucht und die Wiederfindung an BSA bestimmt. Beim verwendeten Realfilter wurde die Wiederfindung nach Größenausschlusschromatographie und Abzug des Proteingehaltes der ungespikten Achtelstücke bestimmt. Um Adsorptionsverluste an Filtern ohne Eintrocknen zu untersuchen, wurden zusätzlich Achtelaliquote von Glasfaser- und Quarzfiltern in Rollrandgläschen mit BSA-Lösungen in PBS von 0-40 mg/L gegeben und 90 min intensiv gerührt. Anschließend wurde der Brei aus Glas- bzw. Quarzfasern, wie unter 3.2.1 beschrieben, zentrifugiert und die Zentrifugate direkt mittels BCA-Assay untersucht.

### **Proteinverluste durch Eindampfen**

Es wurden je 8 mL einer Verdünnungsreihe von BSA in 10 % v/v PBS-Puffer (6 Konzentrationen von 0-40 mg/L, dabei Konzentrationen 10 und 20 mg/L je doppelt) hergestellt. 1 mL dieser Lösung wurde als Ausgangslösung zum Vergleich aufbewahrt und später im BCA-Assay gemessen. Die restlichen 7 mL Lösung wurden im Stickstoffstrom über Nacht zur Trockene eingedampft. Die erhaltenen Rückstände wurden in 2 mL, bei 20 bzw. 40 mg/L BSA mit 3.5 bzw. 7 mL deionisiertem Wasser aufgenommen und ebenfalls im BCA-Assay gemessen. Die Konzentrationen vor und nach dem Eindampfen wurden berechnet und verglichen.

### **Proteinverluste durch Größenausschlusschromatographie**

Eine Verdünnungsreihe von BSA (5 Konzentrationen von 0-160 mg/L, davon 40, 80 und 160 mg/L doppelt) wurde wie unter 3.3.1 beschrieben durch eine Gelpermeations-säule chromatographisch getrennt. Die als makromolekulare Fraktion aufgefangenen 4 mL Eluat wurden in einem Rollrandgläschen gesammelt und direkt im BCA-Assay gemessen. Die ermittelten Konzentrationen an BSA wurden mit den Ausgangskonzentrationen verglichen.

### 3.3.3 Bradford-Assay

Zu je 150  $\mu\text{L}$  Probe wurden auf einer Mikrotiterplatte 150  $\mu\text{L}$  Coomassie Brilliant Blue G-250 (Uptima) gegeben und sofort mittels 8-Kanal-Photometer gemessen (Messwellenlänge 620 nm, Referenzwellenlänge 450 nm). BSA-Verdünnungsreihen in PBS, 10% v/v PBS und in deionisiertem Wasser (je sieben Konzentrationen, 0-20 mg/L) wurden mit dem Bradford-Assay gemessen. Kalibriergeraden wurden für die verschiedenen Verdünnungsreihen erstellt und verglichen. Zusätzlich wurden BSA-Kalibrierlösungen (1 mL) in PBS-Puffer mit dem Coomassie-Reagenz (1 mL) in Makroküvetten (PMMA) vermischt und Absorptionsspektren aufgezeichnet.

## 3.4 Aminosäureanalytik

### 3.4.1 Hydrolysen

Straßenstaub- und Filterproben wurden auf verschiedene Arten hydrolysiert. Mittels HPAEC-PAD wurden sauer hydrolysierte und anschließend mit NaOH neutralisierte, alkalisch und enzymatisch hydrolysierte Proben untersucht. Mittels HPLC-FD wurden sauer hydrolysierte Proben, bei denen die Salzsäure abgedampft wurde, analysiert.

#### Saure Hydrolyse

**Hydrolyse zur Analyse mittels HPLC** Je ein Achtel eines 150 mm-Filters wurde auf einer Glasplatte mit einem Teppichmesser zerschnitten, in eine Teflonbombe für Mikrowellenaufschlüsse (Berghoff) überführt und mit 6 mL 6 N HCl versetzt. Unmittelbar nach Zugabe der Säure wurde zwei Minuten lang Argon mittels einer frischen Pasteurpipette durch die Probe geleitet, das Gefäß sofort verschlossen und umgehend der Mikrowellenaufschluss gestartet (10 min, 140 °C). Nach Ablauf der Abkühlzeit von ca. 30 Minuten wurde die Suspension mit dem hydrolysierten Filter in Zentrifugengläser überführt und 20 Minuten lang bei 5000  $\text{min}^{-1}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in Schraubdeckelgläsern (15 mL Volumen) überführt. Das im Zentrifugenglas zurückgebliebene Filterpellet wurde mit weiteren 2 mL deionisiertem Wasser aufgeschlämmt und erneut zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt und im Stickstoffstrom zur Trockene eingedampft.

**Hydrolyse zur Analyse mittels HPAEC** Zu BSA und den Straßenstaubproben in Teflonbomben wurden 6 mL 6 N HCl zugesetzt, die Gefäße für 2 min mit N<sub>2</sub> gespült und sofort fest verschraubt. Die Hydrolyse erfolgte 15 min bei 140 °C. Nach dem Abkühlen wurden die Proben in 25 mL Messkolben mit 7.7 mL 4.2 M NaOH überführt und mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. Die aufgeschlossenen Proben wurden über Celluloseacetat-Spritzenfilter (0.45 µm) mit Glasfaservorfilter filtriert und 25 µL im *BioLC*-System auf eine AminoPac-PA10 Säule injiziert. Zu Testzwecken wurde zu den Proben auch Phenol als Oxidationsinhibitor zugegeben. Dazu wurden auf 6 mL HCl 60 µL von zur Schmelze (80 °C) erhitztem Phenol pipettiert. Der Phenolzusatz führte zu einem sehr breitem Doppelpeak bei 35 - 45 min im Chromatogramm und wurde daher nicht weiter verwendet.

### Alkalische Hydrolyse

0.4- 1.9 g Straßenstaub wurde in Teflonbomben für Mikrowellenaufschlüsse gefüllt, mit 5 mL 4.2 M NaOH versetzt und die Gefäße wurden fest verschraubt. Der Aufschluss wurde bei 140 °C über 60 min durchgeführt. Nach dem Abkühlen der Gefäße wurde zunächst über einen Papierfilter (Schwarzband, 90 mm) und anschließend über einen 0.45 µm Polysulfon-Spritzenfilter mit Glasfaservorfilter filtriert. Die Filtrate wurden in Messkolben mit deionisiertem Wasser auf 10 mL (0.4 g Probe) bzw. 25 mL (höhere Einwaagen) aufgefüllt. Die Proben wurden nochmals 1 : 10 (v/v) mit Wasser verdünnt und 25 µL im *BioLC*-System auf eine AminoPac-PA10 Säule injiziert.

### Enzymatische Hydrolyse

0.2- 0.4 g Straßenstaubproben, aufgeschlämmt mit 2 mL Phosphatpuffer (1.36 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 12.2 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in 1 L Wasser) bzw. 2 mL BSA-Lösung in Phosphatpuffer (10 mg/mL) wurden mit 1 mL Pronase-Lösung (1 mg/mL in Phosphatpuffer) versetzt und in einem Brutschrank bei 37 °C unter Rühren 24 h inkubiert. Die BSA-Probe wurde über einen 0.22 µm PES-Spritzenfilter filtriert, über eine Cellulose-Membran mit 10 kDa Cutoff 10 min bei 11 000 min<sup>-1</sup> zentrifugiert und 25 µL des Zentrifugats im *BioLC*-System auf eine AminoPac-PA10 Säule injiziert.

Die Straßenstaubproben wurden über einen 0.22 µm PES-Spritzenfilter filtriert, mittels konzentrierter Salzsäure auf pH = 0 angesäuert, über XAD-II-Harz weiter aufgereinigt (Abschnitt 3.4.2) und mittels HPLC-UV/Vis untersucht. Tabelle 3.3 gibt einen genauen Überblick über die verwendeten Mengen an Probe, Puffer und Enzymlösung.

**Tabelle 3.3:** Übersicht über die Mengenverhältnisse bei der enzymatischen Hydrolyse von Straßenstaubproben.

Probe	Abkürzung	Datum	Fraktion [ $\mu\text{m}$ ]	Einwaage [g]	Puffer [mL]	Enzymlösung [mL]
Blindprobe					2	1
BSA				0.02	2	1
Saalburgstr.	S6	28.04.00	63 - 125	0.5	2	1
Saalburgstr.	S9	25.05.00	< 63	1.0	4	2
Saalburgstr.	S9	25.05.00	63 - 125	1.0	4	2
Würmtalstr.	W12	25.05.00	63 - 125	3.0	9	4

### 3.4.2 Voranreicherung von Nitrotyrosin

#### Polymerharze XAD-II und XAD-7

XAD-II bzw. XAD-7-Harz wurde 4 h in Methanol vorgequollen und in eine 8 mL Glas säule gepackt, so dass diese zu drei Vierteln gefüllt war. Die Säule wurde am unteren und oberen Ende mittels einer Teflonfritte (Merck) verschlossen und mit 20 mL Wasser konditioniert. Bei einigen Proben wurde darüber noch etwa 1 cm Kieselgel, durch eine weitere Teflonfritte abgetrennt, geschichtet, um vorhandene Huminstoffe oder kolloidal gelöste makromolekulare Substanzen zurückzuhalten. Unterschiedliche Volumina Nitrotyrosinlösungen bzw. Proben wurden auf die Säulen aufgegeben und mit Wasser und Methanol Fraktionen von je ca. 250  $\mu\text{L}$  auf Mikrotiterplatten eluiert (Tabelle 3.4).

Die Lichtabsorption der Fraktionen wurde im alkalischen Milieu im 8-Kanal-Photometer bei 450 nm gemessen. Bei leicht sauren Proben wurde dazu je Napf (einheitlich für gesamte MTP) 50  $\mu\text{L}$  4 M NaOH, bei stark sauren Proben zunächst je 150  $\mu\text{L}$  Fraktion entnommen und 200  $\mu\text{L}$  4 M NaOH zupipettiert. Bei Verwendung der verdünnten Nitrotyrosinlösung mit 25 mg/L in 6 N HCl wurden während der Probenaufgabe zunächst Fraktionen von 4 mL in Glasvials eluiert. Tabelle 3.4 gibt einen Überblick über die durchgeführten Experimente mit XAD-II. Mit XAD-7 wurden parallele Experimente zur Anreicherung von Nitrotyrosin aus den salzsauren Lösungen durchgeführt und aufgrund der weniger scharfen Trennungen die weiteren Anreicherungsversuche mit dem besser geeigneten XAD-II durchgeführt.

Tabelle 3.4: Experimente zur Nitrotyrosinanreicherung mittels XAD-II.

Polymerharz	Probe, Konzentration, LM	Volumina [mL]		
		Probe	Wasser	Methanol
XAD-II, XAD-7	Nitrotyrosin, 2.5 g/L, 6 N HCl	0.4	16	8
XAD-II, XAD-7	Nitrotyrosin, 25 mg/L, 6 N HCl	20	2	8
XAD-II, XAD-7	Nitrotyrosin, 2.5 g/L, PBS	0.4	6	-
XAD-II	Nitrotyrosin, 2.5 g/L, 4 M NaOH	0.4	6	-
XAD-II	Straßenstaubhydrolysate	6-10	8	0.5 + 4

Bei den aufgetragenen Staubproben wurden die ersten 500  $\mu\text{L}$  Methanol-Eluat verworfen, die folgenden 4 mL der Methanolfraktion in Rollrandgläschen aufgefangen, über Spritzenfilter filtriert (Polyethersulfon, 0.22  $\mu\text{m}$ ) und im Stickstoffstrom zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 300  $\mu\text{L}$  Wasser aufgenommen. Die so erhaltenen wässrigen Lösungen wurden mittels HPLC-UV/VIS untersucht.

### Anionenaustauscherharz AG1-X8

Anreicherung von Nitrotyrosin durch AG1-X8 Harz wurde nach Crowley [109] durchgeführt. 2 mL Harz wurden in eine Kunststoffsäule (Biorad) gefüllt und durch Spülen mit 40 mL 1 M NaOH zunächst in die OH-Form und anschließend durch Spülen mit 12 mL 1 M Essigsäure in die Acetat-Form überführt. Mit einem pH-Meter wurde dabei kontrolliert, ob der pH-Wert des Eluats kleiner als 2 war (lt. Herstellervorschrift [291]). Anschließend wurde die Säule bis  $\text{pH} > 4.8$  mit Wasser gewaschen (bis zu 100 mL Wasser nötig). Auf die so konditionierte Säule wurden 2 mL einer Lösung von 20 mg/L Nitrotyrosin in 50 mM Ammoniumacetat-Puffer (3.854 g Ammoniumacetat auf 1 L Wasser) aufgegeben. Es wurde mit 4 mL Wasser gewaschen und mit 4 mL 1 M Essigsäure eluiert.

### 3.4.3 HPLC-FD

Die Quantifizierung der Aminosäuren in Filterproben aus dem HVS wurde nach deren Derivatisierung mit ortho-Phthaldialdehyd und Mercaptopropionsäure in einer HPLC-Anlage der Firma Unicam mit Fluoreszenzdetektor durchgeführt. Die hydrolysierten und eingedampften Proben aus 3.4.1 wurden in 250  $\mu\text{L}$  (Proben ZSP) bis 1000  $\mu\text{L}$  (Pro-

ben LKP) deionisiertem Wasser aufgenommen, 5 min im Ultraschallbad behandelt, in Eppendorfgefäße überführt und 5 min bei  $10\,000\text{ min}^{-1}$  abzentrifugiert. Die Überstände wurden 1 : 10 (v/v) mit deionisiertem Wasser verdünnt, die Proben vom Probenahmeort Zugspitze wurden z.T. auch unverdünnt gemessen, um die Aminosäuren, die in geringeren Konzentrationen vorlagen, bestimmen zu können. Aus den abzentrifugierten und z.T. verdünnten Lösungen wurden  $40\ \mu\text{L}$  in ein Eppendorfgefäß pipettiert, und  $200\ \mu\text{L}$  Kaliumboratpuffer (pH 10.0) und  $40\ \mu\text{L}$  des OPA/MPA-Reagenz zugegeben. Es wurde kurz geschüttelt, die Probe exakt 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen,  $100\ \mu\text{L}$  1 M Essigsäure zum Abbruch der Reaktion zugegeben und die Proben unmittelbar danach auf die HPLC-Säule injiziert. Kaliumboratpuffer, Essigsäure und OPA/MPA-Reagenz wurden 24 Stunden vor Verwendung hergestellt und bei  $4\ ^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Alle Lösungen wurden über Nacht bei  $4\ ^\circ\text{C}$  aufbewahrt und keine Lösung länger als fünf Tage verwendet.

Als analytische Trennsäule wurde eine Bakerbond, RP-C18-Säule,  $250 \times 4.6\text{ mm}$ , mit Vorsäule, bzw. Jupiter Octadecyl RP-C18,  $250 \times 4.6\text{ mm}$ , mit Security Guard System (Phenomenex) verwendet. Die Flussrate betrug  $1.5\text{ mL/min}$  und ergab dabei einen Säulenvordruck von ca. 240 bar (Bakerbond-Säule). Als Laufmittel kamen Acetonitril (Laufmittel A) und  $100\text{ mM}$  Natriumacetat-Puffer mit Zusatz von  $0.044\%$  Triethylamin und pH 6.5 zum Einsatz. Der Gradient ist in Tabelle 3.5 dargestellt.

**Tabelle 3.5:** *Laufmittelgradient zur Trennung OPA/MPA-derivatisierter Aminosäuren.*

Zeit [min]	Laufmittel A (Acetonitril)	Laufmittel B (Puffer)
0	5	95
30	70	30
35	100	0
36	5	95

Der Fluoreszenzdetektor wurde mit einer Anregungswellenlänge von  $330\text{ nm}$  betrieben und die Lichtintensität bei der Emissionswellenlänge von  $445\text{ nm}$  gemessen. Zudem wurden am Detektor die Parameter *Response* auf *fast* und *Attenuation* auf *X1* eingestellt. Die Kalibrierung der Methode erfolgte mittels eines 17-Aminosäurestandards von Sigma im Konzentrationsbereich von ( $0.75\text{ - }10\ \mu\text{M}$ ). Dieser Standard enthielt die Aminosäuren Ala, Arg, Asp, Cys, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr und Val

in der Konzentration 2.5 mmol/L sowie Cystin (Abkürzung: Cys2) in der Konzentration 1.25 mmol/L in 0.1 M HCl. Zusätzlich enthielt der Standard Ammoniumacetat mit ebenfalls 2.5 mmol/L. Zur Herstellung der Kalibrierlösungen wurde aus einer Ampulle (1 mL) des Standards 800  $\mu$ L entnommen und mit 7.2 mL Wasser auf ein Endvolumen von 8 mL verdünnt (1 : 10 Verdünnung). Von dieser Lösung wurde je 1 mL in ein Eppendorfgesäß pipettiert, bei -23 °C eingefroren und maximal vier Wochen gelagert. Aus diesen Standardlösungen mit je 250  $\mu$ mol/L wurden die eigentlichen Kalibrierlösungen hergestellt. Die verwendeten Puffer, Reagentien und Laufmittel wurden wie folgt hergestellt:

### Kaliumboratpuffer

3.092 g wasserfreie Borsäure wurden durch 20 minütige Behandlung im Ultraschallbad in 100 mL deionisiertem Wasser gelöst und der pH-Wert der Lösung mit 5 M KOH (28.922 g Kaliumhydroxid-Plätzchen auf 100 mL deionisiertes Wasser) auf 10.0 eingestellt.

### OPA/MPA-Reagenz

51.2 mg o-Phthaldialdehyd (OPA) wurden in 2.5 mL Methanol vollständig aufgelöst. Danach wurden 10 mL des Kaliumboratpuffers zugegeben und nach Durchmischen der Lösungen 100  $\mu$ L Mercaptopropionsäure (MPA) im Abzug hinzugeben.

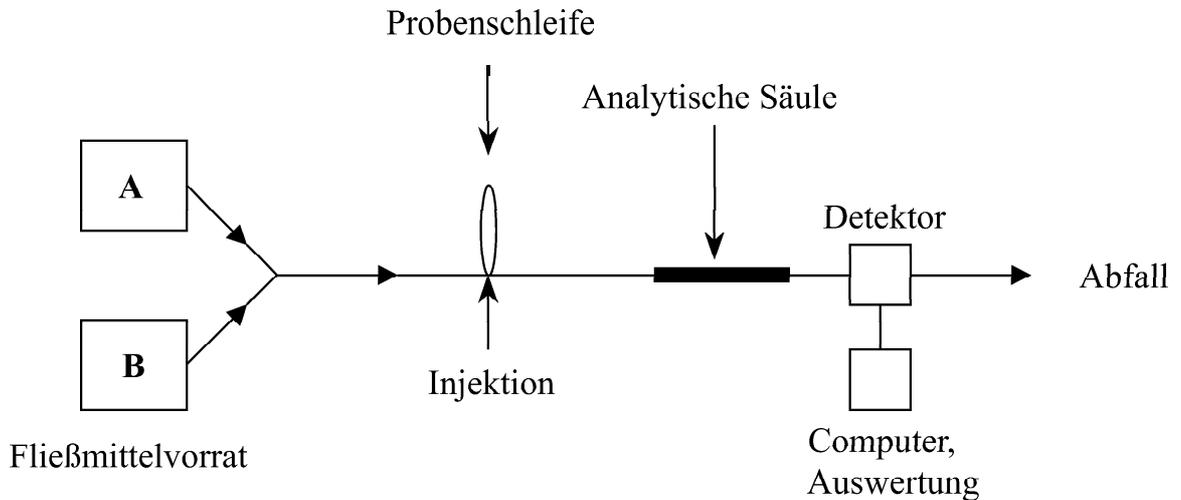
### Acetat-Puffer (Laufmittel)

16.415 g Natriumacetat wurden in 2 L deionisiertem Wasser gelöst, 1.212 mL Triethylamin zugegeben und der pH-Wert der Lösung mit konzentrierter Essigsäure auf 6.5 eingestellt, filtriert (0.45  $\mu$ m, Polypropylen-Membran) und 15 min im Ultraschallbad entgast.

### 3.4.4 HPLC-UV/VIS

Die Analyse der hydrolysierten Proben speziell auf die Gegenwart von Nitrotyrosin wurde mit der in Abbildung 3.3 gezeigten HPLC-Anlage (Merck-Hitachi) mit UV/VIS-Absorptionsdetektor durchgeführt.

Das System wurde durch eine HPLC-Pumpe mit den Lösungsmitteln Methanol (A) und Wasser, dem 0.1 % TFA zugesetzt wurde, (B) aus Vorratsbehältern versorgt. Die Lösungsmittel wurden vor dem Mischen durch einen speziellen online-Entgaser kontinuierlich entgast. Die Trennung wurde isokratisch mit dem Laufmittel Wasser(+TFA)/Methanol (90:10, v/v) und bei einem konstanten Fluss der mobilen Phase von 0.8 mL/min



**Abbildung 3.3:** Aufbau der HPLC-Anlage zur Messung von Aminosäuren mittels UV/Vis-Detektion.

durchgeführt. Es wurden per Hand stets  $50\ \mu\text{L}$  Probe mit einer Mikroliterspritze injiziert, wovon genau  $20\ \mu\text{L}$  durch die Probenschleife auf die Chromatographie-Säule gelangten. Der Zusatz von 0.1% TFA zum Laufmittel Wasser erfüllte zwei Funktionen. Zum einen ist die Chromatographie von Aminosäuren stark pH-abhängig, da diese protoniert, deprotoniert oder als Zwitterionen vorliegen können. Mit zugesetzter TFA wird der pH-Wert im verwendeten Wasser auf 2.1 eingestellt und man erhält definierte Trennbedingungen. Weiterhin kann das Trifluoracetat-Ion als Gegenion zu den Aminosäuren wirken und unterstützt eine Ionenpaarbildung. Als Trennsäule kam die analytische Säule Nucleosil 100-3C18 (Macherey-Nagel) zum Einsatz. Die Dauer eines Analysendurchgangs (Gesamtlaufzeit eines Chromatogramms) betrug 16 min. Sollte auch Tryptophan gemessen werden, so wurde die Laufzeit auf 40 min verlängert.

### 3.4.5 HPAEC-PAD

Aminosäureanalytik mittels Anionenaustauschchromatographie wurde auf einem *BioLC*-System der Firma Dionex durchgeführt. Als Vor- und Trennsäule wurden AminoPac PA10-Säulen, als Elutionsmittel ein Natriumhydroxid/Natriumacetat-Gradient eingesetzt. Die Detektion der Aminosäuren erfolgte in der amperometrischen Messzelle ED40 an einer Arbeitselektrode aus Gold. Abbildung 3.4 zeigt eine Abbildung des *BioLC*-Systems.

Als Pumpe wurde die Gradientenpumpe GS50 mit seriell arbeitenden Druckköpfen

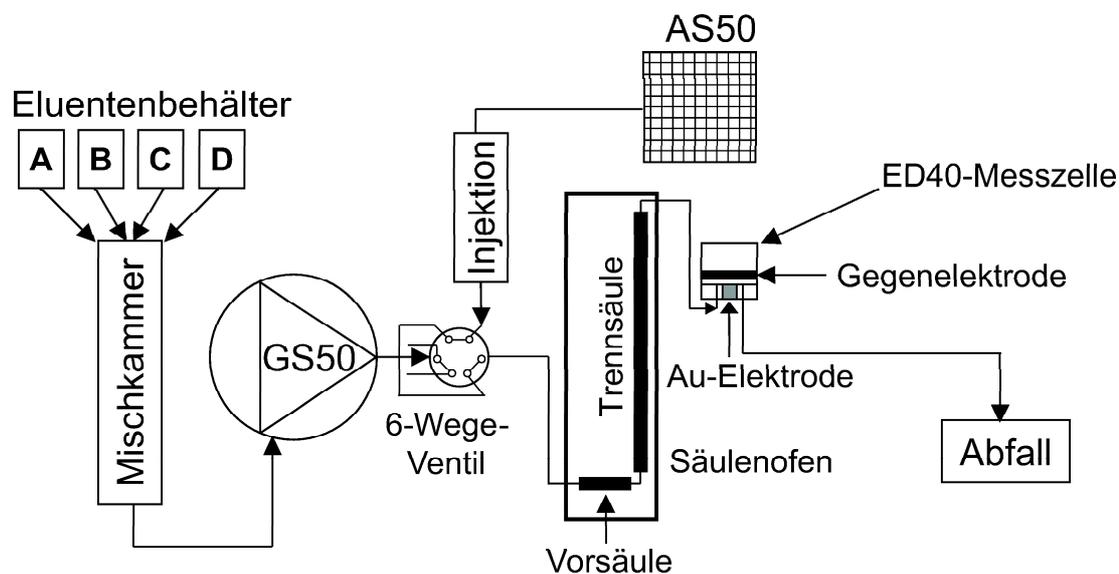


**Abbildung 3.4:** AAA-Direct-System der Firma Dionex (BioLC) [292].

verwendet. Ein thermostatisierbarer Autosampler (AS50) mit 100 Probenplätzen und automatischem 6-Wege-Injektionsventil wurde für die Probenaufgabe benutzt. Das Injektionsvolumen betrug für alle Proben  $25 \mu\text{L}$ . Die Proben wurden im Autosampler auf  $5^\circ\text{C}$  gekühlt und Säule und Vorsäule während der chromatographischen Läufe auf  $30^\circ\text{C}$  thermostatisiert. An den Eluentenbehältern und der Spülflasche des Autosamplers mit deionisiertem Wasser lag ein Helium-Kopfdruck von 3-4 psi an, um Kontamination der Eluenten,  $\text{CO}_2$ -Absorption aus der Luft und Blasenbildung in der Injektionspritze zu vermeiden. Abbildung 3.5 zeigt den Aufbau des verwendeten *BioLC*-Systems.

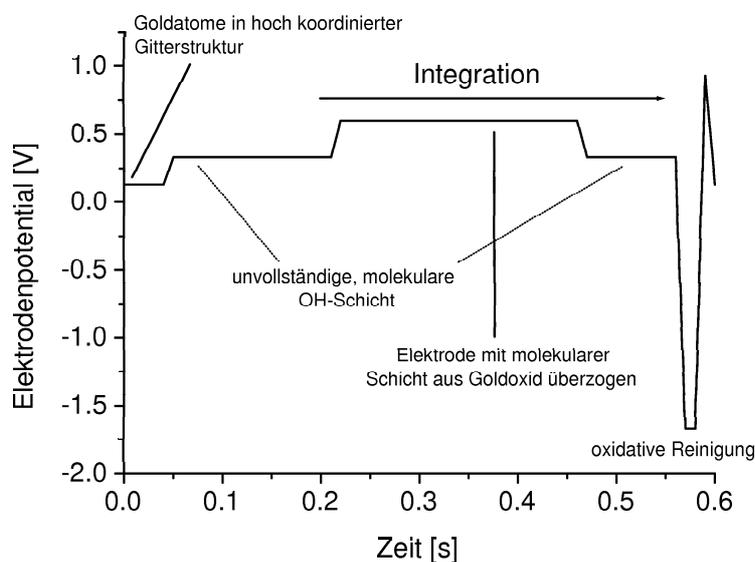
Die Trennung der Aminosäuren erfolgte auf der  $2 \times 250 \text{ mm}$  AminoPac PA10 Säule, vor die eine AminoPac PA10 Vorsäule ( $2 \times 50 \text{ mm}$ ) in den Eluentenstrom geschaltet war. Die Substanzen wurden am Säulenausgang mit integrierender gepulster Amperometrie (IPAD) detektiert. Der elektrochemische Detektor enthielt eine Flusszelle mit einer für die Aminosäureanalytik zertifizierten Goldelektrode (P/N 55832), die gegenüber einer pH-Referenzelektrode (P/N 44198) angeordnet war. An der Goldelektrode wurde ein Wechspotential mit 4 Stufen und einem Reinigungsschritt angelegt (Abbildung 3.6). Die Referenzelektrode musste regelmäßig in Pufferlösungen mit pH 4.0 und 10.0 kalibriert und je nach Beanspruchung in Zeitintervallen von 3-6 Monaten ausgetauscht werden.

Bei hohen Hintergrundsignalen, reduzierter Empfindlichkeit o.ä. wurde die Goldelektrode von Hand auf einem Polierpad (P/N 36121) poliert. Dazu wurden einige Tropfen Wasser und etwas grobes Poliermittel (P/N 36319) auf ca. einem Viertel eines neuen



**Abbildung 3.5:** Aufbau des BioLC-Systems mit Autosampler AS50 und serieller Zweikolbenpumpe GS50.

Pads zu einer Paste vermischt und die Elektrode 5 min poliert. Die Elektrode wurde mit reinem Wasser weiter auf einem neuen Viertel eines Pads nachpoliert und abschließend wieder auf einem neuen Polierpad 15 min mit einer Paste aus feinem Poliermittel (P/N 36318) in 8-förmigen kreisenden Bewegungen poliert. Mit einer Lupe wurde die Qualität der polierten Goldoberfläche kontrolliert und bei Bedarf weiter poliert. Nach einem derartigen Polierprozess wurde die Elektrode mit Wasser abgespült und in den elektrochemischen Detektor eingebaut. Die Elektrode wurde bei den Anfangsbedingungen des Eluentgradienten von 40 mM NaOH und Anwendung der Pulssequenz mehrere Stunden reäquilibriert, bis das Hintergrundsignal unter den Sollwert von 80 nC fiel. Die Kalibrierung des *BioLC*-Systems erfolgte mit dem 17-Aminosäurestandard (Sigma AA-S-18, 2.5 mmol/L in 0.1 N HCl), der mit Wasser verdünnt wurde. Im Anhang dieser Arbeit ist das Standardprogramm zur Analyse dieses Standards angegeben (Abschnitt 9.2). Der Verlauf des Gradienten ist aus Tabelle 3.6 ersichtlich. Die Form des Gradienten war dabei durch die in Klammern angegebenen ganzzahligen Parameter festgelegt, Veränderung der Parameter von 1 (aufwärtskonvex) über 5 (linear) bis 9 (aufwärtskonkav) war möglich. Sollte zusätzlich 3-Nitrotyrosin analysiert werden, so schloss sich an einen leicht veränderten Gradienten eine 25minütige isokratische Elution mit 95% 2 M NaAc und 5% 1 M NaOH an. Die Flussrate wurde dazu von 0.25 auf 0.20 mL/min reduziert (Tabelle 3.7). Als exemplarische Kalibrierkurven sind in Abbildung 3.7 Kalibrierkurven



**Abbildung 3.6:** Graphische Darstellung der Potentialsequenz zur Aminosäuredetektion mittels integrierender gepulster Amperometrie (IPAD) unter Verwendung der pH-Elektrode als Referenzelektrode [261].

für Tyrosin und Nitrotyrosin gezeigt.

Bei Vorbereitung und Durchführung der Aminosäureanalytik am *BioLC*-System war eine äußerst saubere Arbeitsweise nötig. So war es erforderlich, bei allen Arbeiten am chromatographischen System, bei der Eluentenbereitung, Probenvorbereitung etc. puderfreie Handschuhe aus Latex zu tragen, um das System nicht zu verunreinigen. Alle verwendeten Gefäße mussten vor der Verwendung mit 25 % NaOH und anschließend mit UV-behandeltem, sterilfiltriertem Reinstwasser aus einer Reinstwasseranlage, das nochmals mittels steril verpackten Nylon Nalgene Einweg-Filtrationseinheiten filtriert wurde, gespült werden. Bei der Inbetriebnahme des *BioLC*-Systems nach längerer Standzeit war zunächst eine Komplettreinigung erforderlich. Diese begann mit der Reinigung des gesamten Systems einschließlich der Eluentenbehälter, ausschließlich jedoch der Säulen und der elektrochemischen Messzelle. Dazu wurde durch jeden der vier Eluentkanäle jeweils mindestens 50 mL Wasser gepumpt. An der Pumpe konnte der Spülvorgang mit einer großen doppellippigen Spritze unterstützt werden. Dazu wurde der rechte Pumpenkopf etwas aufgedreht und mit der Spritze Eluent abgezogen. Nach Erreichen von annähernd neutralem pH-Wert wurde das System mit halbkonzentrierter Salpetersäure über Nacht gespült. Das System wurde mit Wasser erneut bis zum Erreichen von pH 4 gespült (mit

**Tabelle 3.6:** Gradientenverlauf zur Analyse von Standardamino­säuren am *BioLC*-System.

Zeit [min]	Wasser [%]	0.25 mM NaOH [%]	1 M NaAc [%]	Form des Gradienten
0.0	84	16	0	linear (5)
2.0	84	16	0	linear (5)
12.0	84	16	0	konkav (8)
16.0	68	32	0	linear (5)
24.0	36	24	40	konkav (8)
27.0	44	16	40	linear (5)
35.0	14	16	70	linear (5)
40.0	14	16	70	linear (5)
40.1	20	80	0	linear (5)
42.1	20	80	0	linear (5)
42.2	84	16	0	linear (5)
65.0	84	16	0	linear (5)

Indikatorpapier überprüft). Danach wurden die Eluentenflaschen mit ca. 25 % NaOH (50 % handelsübliche Natronlauge von J.T. Baker 1:1 mit Wasser verdünnt) gespült und anstelle der Salpetersäure über Nacht durch das System gepumpt. Die Eluentenbehälter wurden nochmals mit 25 % NaOH und dann mit sterilfiltriertem Wasser dreimal ausgespült. Dazu wurde eine auf die gleiche Art gereinigte Spritzflasche, gefüllt mit sterilfiltriertem Wasser, benutzt, die nur für Spülzwecke am *BioLC* reserviert war. Nach dieser intensiven Reinigungsprozedur wurden die Eluenten angesetzt und die Flaschen damit im He-Gegenstrom befüllt. Die Eluentenbehälter wurden wie folgt befüllt: Behälter A (Wasser oder leer), Behälter B (1.0 mol/L NaAc), Behälter C (Wasser), Behälter D (0.25 mol/L NaOH). Nach dem Befüllen und Verschließen der Eluentenbehälter wurden 3-4 psi Helium-Überdruck angelegt, um eine Kontamination des Eluenten zu vermeiden. Die Eluenten selbst wurden wie folgt angesetzt:

**Tabelle 3.7:** Gradientenverlauf zur kombinierten Analyse von Standardamino­säuren und Nitrotyrosin.

Zeit [min]	Flussrate [mL/min]	Wasser [%]	0.25M NaOH [%]	2 M NaAc [%]	1 M NaOH [%]	Form des Gradienten
0.0	0.25	80	20	0	0	linear (5)
2.0	0.25	84	16	0	0	linear (5)
12.0	0.25	84	16	0	0	konkav (8)
16.0	0.25	68	32	0	0	linear (5)
24.0	0.25	56	24	20	0	konkav (8)
40.0	0.25	56	24	20	0	linear (5)
40.1	0.20	0	0	95	5	linear (5)
65.0	0.20	0	0	95	5	linear (5)
65.1	0.20	80	20	0	0	linear (5)
95.0	0.20	80	20	0	0	linear (5)

### 1 M Natriumacetatlösung

In eine Portionsflasche mit  $82.0 \pm 0.5$  g Natriumacetat (Dionex, Volumen der Flasche 500 mL) wurden 450 mL Wasser gefüllt. Anschließend wurde die Flasche wieder verschraubt und von Hand geschüttelt, bis das Natriumacetat vollständig gelöst war. Diese Lösung wurde in eine 1 L-Nalgene-Flasche überführt. Die Portionsflasche wurde mit 100 mL Wasser gespült und diese Lösung ebenfalls in die 1 L-Nalgene-Flasche überführt. Es wurde bis zum Eichstrich auf 1 L mit Wasser aufgefüllt, verschlossen und von Hand kurz geschüttelt. Mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe wurde über die  $0.2 \mu\text{m}$  Nylon-Membran der sterilen Nalgene-Filtrationseinheit filtriert, wobei mit den ersten 50-100 mL Filtrat die Filtrierflasche gespült wurde. Diese Lösung wurde verworfen. Anschließend wurde die restliche Natriumacetatlösung filtriert und unmittelbar darauf im He-Gegenstrom in den Eluentenbehälter B eingefüllt.

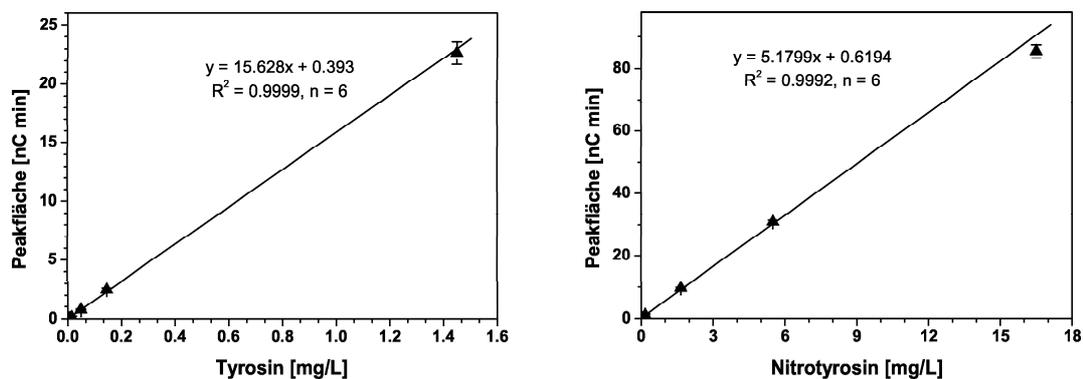


Abbildung 3.7: Kalibrierkurven von Tyrosin (links) und Nitrotyrosin (rechts), bestimmt mittels IPAD (MW aus je drei Messungen  $\pm 3s$ ).

### 0.25 und 1 M Natronlauge

Für die Bereitung von 0.25 M Natronlauge wurde 980 mL UV-behandeltes, deionisiertes Wasser in einer Einweg-Filtrationseinheit mit einer Wasserstrahlpumpe filtriert und unter He-Gegenstrom in den Eluentenbehälter D gefüllt. Mit einer steril verpackten 25 mL Kunststoff-Einwegpipette wurden 13.2 mL 50 %ige Natronlauge (Baker) abgemessen, die Pipette wurde im Heliumstrom in das Wasser im Eluentenbehälter eingetaucht und auslaufen gelassen. Dies wurde zügig durchgeführt, um die Absorption von Kohlendioxid aus der Luft so gering wie möglich zu halten. Für die Bereitung von 1 M NaOH wurden entsprechend 950 mL Wasser und 52 mL NaOH eingesetzt und die Lösung wurde auf die gleiche Weise hergestellt.

### 2 M Natriumacetatlösung

164.1 g Natriumacetat (Fluka 71179) wurden in 500 mL Wasser gelöst, auf 1 L aufgefüllt und in einen Eluentenbehälter gefüllt. In den Eluentenbehälter wurde 10 min Helium eingeleitet, um gelöste Luft auszutreiben. Die Eluentansaugleitungen enthielten Teflonfritten zur Abscheidung von Partikeln aus dem Eluenten. 2 M Natriumacetatlösung wurde zu Beginn der Arbeit zur Analyse von Nitrotyrosin verwendet. Zur Analyse von Standardamino-säuren wurden die Teflonfritten ausgebaut und ausschließlich auf die oben beschriebene Weise mit Dionex-Portionsflaschen hergestellte 1 M Natriumacetatlösung verwendet.

### 3.4.6 LC-APCI-TOF-MS

Für die Messung von Aminosäuren mit HPLC-MS-Kopplung wurde als HPLC das Gerät der Firma Waters und für die Aufnahme der Massenspektren das Flugzeitmassenspektrometer LCT der Firma Micromass verwendet. Die chromatographische Trennung der Aminosäuren erfolgte auf der analytischen Säule Nucleosil 120-7C6H5 mit 10% Methanol in Wasser (v/v) ohne Zusatz von TFA als Laufmittel. Nach der isokratischen Elution von der Säule wurde eine PEEK-Kapillare (0.005 inch i.d.) angeschlossen, danach ein Flussteiler. Am unteren Ausgang wurde die PEEK-Kapillare zum MS angeschlossen (0.007 inch i.d.) und am oberen Ausgang eine PEEK-Kapillare mit geringem Rückdruck (0.01 inch i.d.). Die Messungen wurden im Scan-Modus (TIC) mit einem Massenbereich von  $m/z$  120-300 durchgeführt. Die Datenauswertung erfolgte mit der Software MassLynx v3.3 (Fa. Micromass).

**Tabelle 3.8:** *Optimierte Parameter der Messungen mittels LC-APCI-TOF-MS.*

MS-Parameter	Wert (APCI)
Spannung der LC-Kapillarspitze	4000 V
Spannung des <i>Sample Cone</i>	30 V
Spannung des <i>Extraction Cone</i>	2 V
Temperatur der Quelle	130 °C
APCI-Temperatur	550 °C
Stickstoffstrom für Vernebelung	5 L/min
Stickstoffstrom für Desolvatisierung	2.5 L/min
Fluss	0.42 mL/min

## 3.5 Anorganische Anionenanalytik

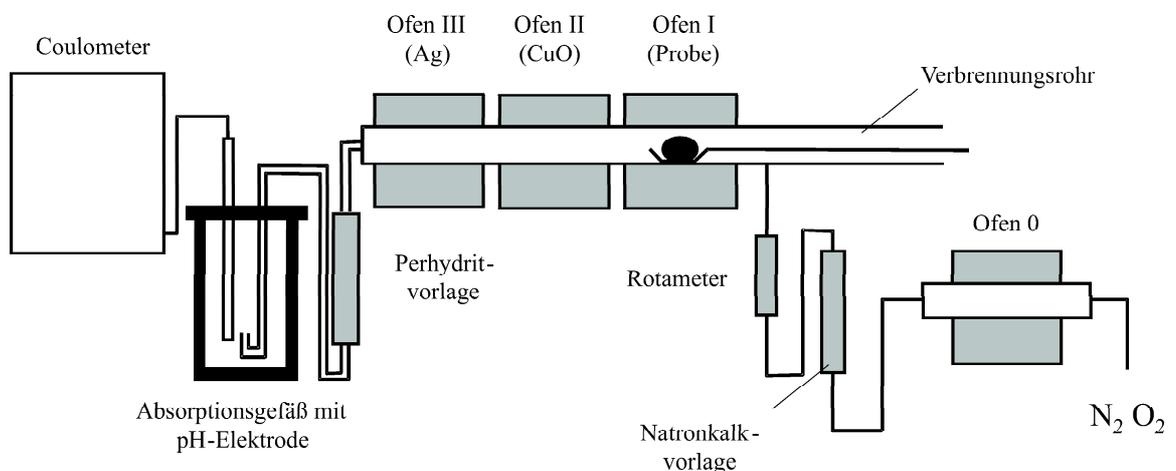
Die Analytik der Anionen aus wässrigen Filterextrakten erfolgte mittels Ionenchromatographie auf einem System der Firma Dionex (IC25/LC25) mit Anionentrennsäule AS4A und Vorsäule AG4A, Leitfähigkeitsdetektion und der Software Peaknet 6.0. Verlässlich

quantifiziert werden konnte nur Sulfat. Nitrat und Chlorid zeigten bei wiederholten Extraktionen zur Kontrolle hohe Schwankungen, weshalb die Werte aufgrund der geringen Datendichte als nicht aussagekräftig beurteilt wurden und daher nicht wiedergegeben werden. Die routinemäßig mitbestimmten Werte für weitere andere Anionen ( $F^-$ ,  $Br^-$ ,  $PO_4^{3-}$ ) lagen im Bereich der Blindwerte.

## 3.6 Kohlenstoffanalytik

### 3.6.1 Gesamtkohlenstoff

Der in den Staubproben enthaltene Gesamtkohlenstoff wurde in Anlehnung an die auf der Methode von Petzold und Nießner [293] basierende VDI-Richtlinie 2465 (Blatt 1) *Messen von Ruß (Immission); Chemisch-analytische Bestimmung des elementaren Kohlenstoffs nach Extraktion und Thermodesorption des organischen Kohlenstoffs* (VDI, 1996) bestimmt [294]. In Abbildung 3.8 ist der zur Kohlenstoffbestimmung verwendete Aufbau gezeigt.



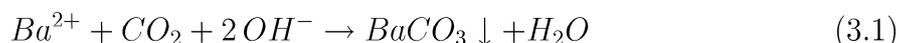
**Abbildung 3.8:** Schematischer Aufbau einer Anlage zur coulometrischen Kohlenstoffbestimmung [295].

Zur Analyse des Gesamtkohlenstoffs (TC) wurde ein unbehandeltes Filterröhrchen mit der belegten Seite nach oben auf das Probenschiffchen aufgebracht und in das Verbrennungsrohr eingeführt. Die Verbrennungseinheit wurde zuvor etwa zwei Minuten mit Stickstoff aus der Hausleitung gespült, um Sauerstofffreiheit des Verbrennungsrohres

zu gewährleisten. Nach Einbringen der Probe wurde das Coulometer gestartet. Ofen I wurde eine Minute lang auf der Betriebstemperatur von 200 °C gehalten und anschließend innerhalb von fünf Minuten auf 450 °C erhitzt und dort gehalten (siehe Tabelle 3.9). Die desorbierbare Fraktion des organischen Kohlenstoffs wurde dabei in der inerten Stickstoffatmosphäre verdampft und bei 900 °C in einem zweiten Ofen mit CuO/Pt-Katalysator oxidiert. Im auf 500 °C beheizten Ofen III wurden eventuell gebildete Schwefelverbindungen und Chlorwasserstoff aus dem Gasstrom entfernt. Die Perhydritvorlage vor dem Absorptionsgefäß diente zum Herausfiltern der schwefeligen Bestandteile des Verbrennungsgases, da diese die Kohlenstoffanalyse stören könnten. Während der zweiminütigen Nachtitrationsdauer erfolgte die Abkühlung auf die Betriebstemperatur von 200 °C.

An die Thermodesorption schloss sich die Oxidation des nicht desorbierbaren Kohlenstoffs im Sauerstoffstrom an. Der Stickstoffstrom wurde durch einen Strom von Sauerstoff der Reinheit 99.995% (4.5) ersetzt und das Coulometer erneut gestartet. Ofen I wurde dabei innerhalb von fünf Minuten auf 650 °C erhitzt und dort gehalten. Nachoxidation und Reinigung des Gasstromes erfolgten wie für die Thermodesorption beschrieben.

Das entstehende Kohlendioxid wurde aus dem Verbrennungsrohr in eine alkalische Bariumperchlorat-Lösung eingeleitet, in der es nach



absorbiert wurde. Die dabei verbrauchten OH<sup>-</sup>-Ionen wurden nach



elektrolytisch zurückgebildet und die verbrauchte Ladungsmenge wurde in Form von Impulsen angezeigt. Die Umrechnung der Impulszahl in die Kohlenstoffbeladung (in µg) erfolgte für das verwendete Coulometer des Typs Coulomat 702 mit Messeinschub Carbon 321.4 durch Kalibrierung des Messsystems mit Zitronensäure. 1 mg Zitronensäure (wasserfrei) entsprach dabei ca. 4900 counts. Tabelle 3.9 fasst die Parameter der coulometrischen Kohlenstoffbestimmung zusammen.

Als Blindwerte wurden in der Berechnung für die Messung im Stickstoffstrom 0.8 µg/cm<sup>2</sup> Kohlenstoff und für die Messung im Sauerstoffstrom 0.6 µg/cm<sup>2</sup> Kohlenstoff abgezogen. Das entspricht 247 µg Kohlenstoff pro Filter.

### 3.6.2 Elementarer Kohlenstoff

Ein Filterrachel wurde in einer Duranglas-Petrischale (Durchmesser 15 cm) mit 10 mL eines Lösungsmittelgemischs aus Isopropanol/Toluol (1 : 1, v/v) überschichtet, um die

**Tabelle 3.9:** *Parameter der coulometrischen Kohlenstoffbestimmung.*

Gerät		Coulomat 702, Fa. Ströhlein GmbH, Kaarst
Ofen 0	T = 1100 °C	Reinigung des Sauerstoffs
Ofen I	T = 450/650 °C	Probenaufnahme und Verbrennungseinheit
Ofen II	T = 900 °C	CuO/Pt-Katalysator zur Nachoxidation
Ofen III	T = 500 °C	Ag-Wolle zur Chemisorption
Trägergas		Sauerstoff 4.5 (99.995 %); Fluss 54 l/h
Zeiteinstellungen	1 min	T = 200 °C
	5 min	T = 450 °C (N <sub>2</sub> ) Thermodesorption bzw.
	5 min	T = 650 °C (O <sub>2</sub> ) Verbrennung
	2 min	T = 200 °C Nachtitration

extrahierbaren Bestandteile der Probe zu entfernen. Die Schale wurde verschlossen und 24 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach der Extraktion wurde das Lösungsmittel vorsichtig entfernt und die Filter wurden an der Luft getrocknet. Die verbleibende desorbierbare Fraktion des organischen Kohlenstoffs sowie anhaftende Lösungsmittelreste wurden durch Erhitzen der Probe durch Thermodesorption wie oben beschrieben in einer inerten Stickstoffatmosphäre bei 450 °C entfernt. Die anschließende Oxidation im Sauerstoffstrom ergab nach Umrechnung der elektrischen Impulse in Kohlenstoffmasse und Abzug des Blindwertes von 0.6 µg/cm<sup>2</sup> Kohlenstoff den Gehalt an elementarem Kohlenstoff.

### 3.6.3 Wasserlöslicher organischer Kohlenstoff

Wasserlöslicher organischer Kohlenstoff (WSOC) wurde nach wässriger Extraktion (Abschnitt 3.2.2) von 150 mm-Filterproben bestimmt. Dazu wurde 1 mL der Probe bei ausgeschalteter UV-Lampe in das Reaktionsgefäß eines TOC-Analysators der Firma Maihak injiziert. Das Gefäß war mit kohlenstofffreiem, auf einen pH-Wert zwischen 2 und 3 eingestelltem Wasser gefüllt. In dieses Reaktionsgefäß wurde 2 min 99.995 % Sauerstoff (Reinheit 4.5), der zuvor in einem Absorber mit Natronkalk von CO<sub>2</sub>-Resten befreit wurde, eingeleitet. Damit wurde der vorhandene anorganisch gebundene Kohlenstoff

ausgegast. Nach Einschalten der installierten Quecksilber-Niederdruckdampfampe wurde ein Integrator gestartet und die gelösten organischen Substanzen wurden vollständig oxidiert. Die Kalibrierung des Geräts erfolgte mittels einer Oxalsäurelösung der Konzentration 0.25 mmol/L, welche exakt 6 mg/L Kohlenstoff entspricht. Der Messbereich des Geräts lag zwischen 0.1 und 10 mg/L. Höher konzentrierte Proben wurden entsprechend mit deionisiertem Wasser verdünnt.

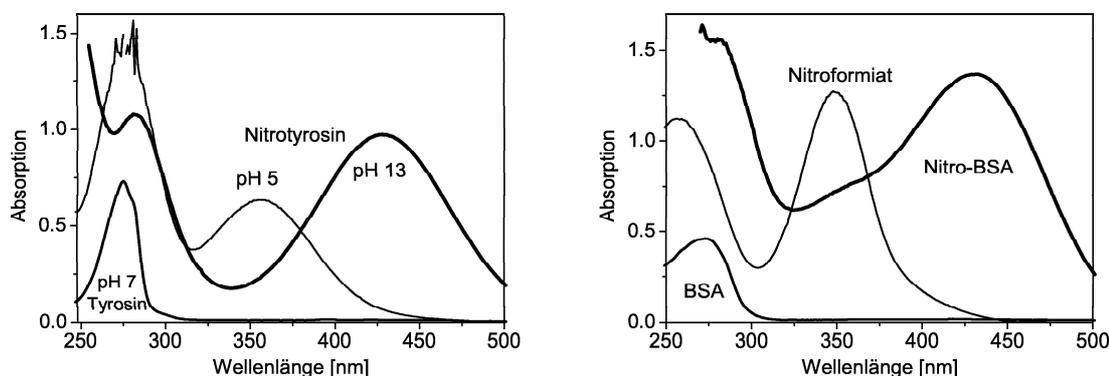
WSOC wurde auch durch Messung mittels Coulometrie bestimmt. Dazu wurden auf ausgeglühte Glasfaserfilter (Durchmesser 47 mm) Aliquote der wässrigen Extrakte aus 3.2.2 von 100-500  $\mu\text{L}$  (LKP, GH) bzw. 500-800  $\mu\text{L}$  (ZSP) durch schrittweises Pipetieren und Trocknen aufgetragen, entsprechend extrahierten Filterflächen von 1-5 bzw. 5-8  $\text{cm}^2$ . Die Filter wurden luftgetrocknet und der enthaltene Kohlenstoff wie unter 3.6.1 beschrieben im Stickstoff- bzw. Sauerstoffstrom verbrannt. Als Blindwerte wurden pro Filter jeweils 177  $\mu\text{g}$  WSOC und 88  $\mu\text{g}$  für HM-WSOC nach Größenausschlusschromatographie der wässrigen Extrakte (entsprechend 1.0 bzw. 0.5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) abgezogen.

## 3.7 Synthese und Charakterisierung der Nitroproteinstandards

Nitrierungen von BSA und Bet v 1 wurden mit Tetranitromethan durchgeführt und die Produkte mittels UV/Vis Spektrometrie charakterisiert. Durch die Einführung der Nitrogruppe ergibt sich im UV/VIS-Absorptionsspektrum von Nitrotyrosin neben dem Absorptionsmaximum des aromatischen Rings (277-281 nm) ein weiteres Maximum bei 356 nm im Sauren (pH 5) bzw. bei 429 nm im Alkalischen (pH 13). Die Nitrierung von BSA resultiert in der Bildung von Nitro-BSA (Absorptionsmaxima bei 281 und 429 nm im Alkalischen) und dem Nitroformiatanion  $\text{C}(\text{NO}_2)_3^-$  mit einem charakteristischen und scharfen Absorptionsmaximum im Alkalischen von 349 nm. Absorptionsspektren von Tyrosin und von Nitrotyrosin im Sauren und Neutralen sowie von BSA, Nitro-BSA und der niedermolekularen Nebenprodukte der Reaktion (v.a. Nitroformiat-Anion) sind in Abbildung 3.9 dargestellt.

### 3.7.1 Synthese von Nitro-BSA

Nitro-(14.3)-BSA (als Hauptstandard) wurde wie folgt hergestellt: 500 mg BSA wurden in 25 mL Carbonatpuffer gelöst und 500  $\mu\text{L}$  Tetranitromethan hinzupipettiert. Nach einer Stunde wurde der Überschuss Tetranitromethan mit 25 mL Dichlormethan extrahiert.



**Abbildung 3.9:** *UV/Vis-Absorptionsspektren von Nitrotyrosin im Sauren und Alkalischen (links) und von BSA, Nitro-BSA und den Reaktionsnebenprodukten (Nitroformiat, rechts).*

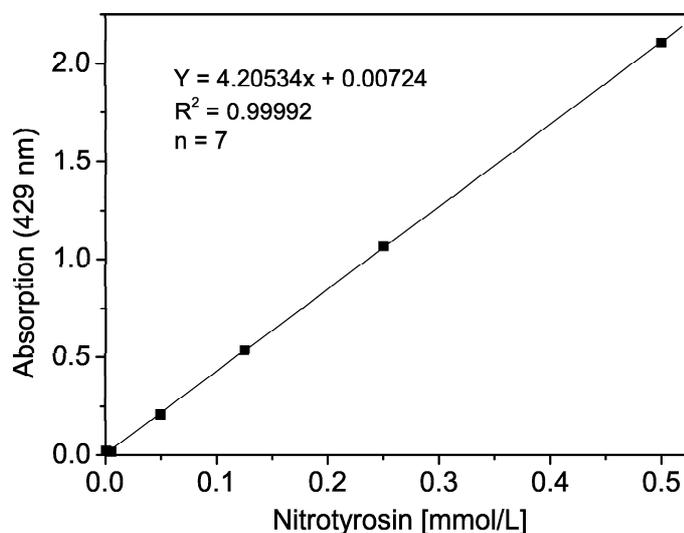
Die Lösung wurde zwei Tage gegen verdünnten PBS-Puffer dialysiert und lyophilisiert. Die Anzahl der gebildeten Nitrotyrosinreste wurde durch zwei unabhängige Methoden bestimmt. Mittels UV/Vis-Spektrophotometrie bei 429 nm in 0.05 M NaOH und Kalibrierung mit 3-Nitrotyrosin, wurden 13 Nitrotyrosin-Reste pro BSA-Molekül bestimmt. Saure Hydrolyse (6 mol/L HCl, 24 h bei 110 °C in einem evakuierten 1 mL Hydrolysenröhrchen) mit anschließender Neutralisation (5 mol/L NaOH) und RP-HPLC mit UV/Vis-Detektion (Abschnitt 3.4.4) ergab 14.3 Nitrotyrosinreste pro Molekül BSA. Die erhaltene Substanz wurde daher als Nitro-(14.3)-BSA benannt.

Weitere Nitro-BSA-Standards wurden wie folgt hergestellt: Je 3 mL einer Lösung von 50 g/L BSA in PBS wurden in ein Vial (20 mL) pipettiert. In dieses Gläschen wurden verschiedene Volumina einer methanolischen Tetranitromethanlösung (4 % v/v) pipettiert und die Lösungen mittels teflonbeschichteter Rührfische gerührt. Genaue Mengen (Molverhältnisse), Reaktionszeiten und Ergebnisse sind Tabelle 3.10 zu entnehmen. Der Gehalt an gebildeten Nitrotyrosinresten wurde jeweils mittels UV/VIS-Spektrometrie in 0.05 M NaOH bestimmt. Die Kalibrierkurve mit Nitrotyrosin und der Absorption bei 429 nm ist in Abbildung 3.10 dargestellt. Die durchschnittliche Anzahl  $X$  der Nitrotyrosinreste pro Proteinmolekül der Standards (Nachweisgrenze  $X = 0.1$ ) ist durch die Bezeichnung Nitro-( $X$ )-BSA angegeben.

Aliquote von 2.5 mL der Reaktionsmischungen wurden auf mit 40 mL Wasser vorkonditionierte PD10 Größenausschlusschromatographiesäulen pipettiert und mit Wasser in Mikrotiterplatten eluiert. Die Lichtabsorption der Fraktionen in den Mikrotiterplatten

**Tabelle 3.10:** *Molverhältnisse zwischen Tetranitromethan und Tyrosinresten in BSA, Reaktionszeiten und resultierende Anzahl an Nitrotyrosinresten im Produkt, bestimmt durch UV/Vis-Spektroskopie. Die Bezeichnung der Substanzen leitet sich aus der Anzahl der 3-Nitrotyrosinreste ab.*

Molverhältnis TNM/ Tyrosinreste	Reaktionszeit [min]	Nitrotyrosinreste X (UV/Vis)	Bezeichnung
0.02	140	< 0.1	Nitro-(<0.1)-BSA
0.05	115	0.2	Nitro-(0.2)-BSA
0.1	160	0.6	Nitro-(0.6)-BSA
0.2	160	1.6	Nitro-(1.6)-BSA
0.5	140	5.6	Nitro-(5.6)-BSA
1	140	9.4	Nitro-(9.4)-BSA
2	170	10.8	Nitro-(10.8)-BSA
3	170	11.8	Nitro-(11.8)-BSA
4	115	11.3	Nitro-(11.3)-BSA
4	200	14.4	Nitro-(14.4)-BSA
5	200	14.7	Nitro-(14.7)-BSA
8	230	16.8	Nitro-(16.8)-BSA
10	230	16.3	Nitro-(16.3)-BSA
27	60	14.3	Nitro-(14.3)-BSA



**Abbildung 3.10:** Kalibriergerade von Nitrotyrosin in 0.05 M NaOH zur Bestimmung von Nitrotyrosinresten in Nitroproteinen durch Messung der Lichtabsorption bei 429 nm. Nachweisgrenze ( $3s_B$ -Methode)  $3.4 \mu\text{mol/L}$ .

wurde im 8-Kanal-Photometer bei 450 nm gemessen und jeweils der Säulenvorlauf von ca. 2.5 mL verworfen. Die makromolekulare Fraktion, identifiziert anhand der höchsten Absorptionswerte (in etwa die folgenden 3 mL), wurde vereint, im Stickstoffstrom getrocknet und in 2 mL Wasser rekonstituiert. Die durchschnittliche Anzahl an Nitrotyrosinresten pro BSA-Molekül wurde nach Verdünnen mit 0.05 M NaOH (1 : 100, v/v), Messung der Lichtabsorption bei 429 nm und Kalibrierung auf 3-Nitrotyrosin in 0.05 M NaOH bestimmt.

### 3.7.2 Synthese von Nitro-Bet v 1

100  $\mu\text{L}$  einer Bet v 1-Stammlösung (6.3 g/L) wurden mit 100  $\mu\text{L}$  PBS verdünnt und 5  $\mu\text{L}$  einer ethanolischen Tetranitromethanlösung (30 g/L) hinzupipettiert. Nach 65 Minuten Reaktionszeit unter ständigem Rühren wurde der Reaktionsansatz auf eine PD10 Säule gegeben und aufgearbeitet, wie bereits für die Nitro-BSA-Standards beschrieben. Die Analytik des Produkts mittels UV/Vis-Photometrie (s.o.) ergab, dass 2.7 von 7 Tyrosinresten pro Molekül Bet v 1 nitriert wurden. Daher wurde die Bezeichnung Nitro-(3)-Bet v 1 gewählt.

## 3.8 Nitroprotein- und Peptidanalytik mittels LC-MS/MS

LC-MS/MS-Messungen wurden am Institut für Analytische Chemie der Universität Innsbruck in Kooperation mit Prof. Dr. C. Huber durchgeführt. Eine detaillierte Beschreibung der experimentellen Vorgehensweise wurde bereits veröffentlicht [296].

## 3.9 Enzymimmunoassays

Alle Enzymimmunoassays (EIA) wurden in farblosen Mikrotiterplatten (MTP) mit 96 Kavitäten (8 x 12) durchgeführt. Soweit nicht anders angegeben, erfolgten alle Inkubationsschritte bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler. Die Mikrotiterplatten wurden dazu mit Parafilm abgedeckt, um Verdunstung und Austrocknung zu verhindern. Zur Bestimmung der Kreuzreaktion wurde auf jeder Platte neben der Verdünnungsreihe des Kreuzreaktanden auch die von 3-Nitrotyrosin mitgeführt.

### 3.9.1 Indirekter kompetitiver Immunoassay

Tabelle 3.11 gibt einen Überblick über die verwendeten Antikörper gegen Nitrotyrosin. Zur Charakterisierung dieser Antikörper wurde der hier beschriebene indirekte kompetitive Test (Standardvorschrift) jeweils angepasst und optimiert (Minimierung des Testmittelpunktes).

**Tabelle 3.11:** Übersicht über die verwendeten Nitrotyrosin-Antikörper.

Name	Hersteller	Spezies	Abkürzung
CAY-189542	Cayman	mAk, Maus	CAY
SA-100	Biomol	mAk, Maus	SA100
39B6	Alexis	mAk, Maus	39B6
SA-297	Biomol	pAk, Kaninchen	Kaninchen
N2700-07	USBIO	pAk, Ziege	Ziege
24312	Oxis	pAk, Schaf	Schaf

**Tabelle 3.12:** *Optimierung des indirekten kompetitiven Tests für verschiedene Nitrotyrosin-Antikörper.*

Nitrotyrosin- Antikörper	Konzentration Beschichten [mg/L]	Verdünnung Primär-Ak	markierter Sekundär-Ak	Verdünnung Sekundär-Ak
CAY	0.33	1 : 700	Anti-Maus-IgG	1 : 50 000
SA100	0.2	1 : 1 000	Anti-Maus-IgG	1 : 20 000
39B6	0.1	1 : 20 000	Anti-Maus-IgG	1 : 40 000
Kaninchen	0.2	1 : 3 000	Anti-Kaninchen-IgG	1 : 20 000
Ziege	0.05	1 : 10 000	Anti-Ziege-IgG	1 : 20 000
Schaf	0.05	1 : 2 500	Anti-Schaf-IgG	1 : 20 000

Die Konzentrationen an Nitro-(14.3)-BSA zur Beschichtung, die Verdünnungen der Primärantikörperlösungen sowie Art und Verdünnung der markierten Sekundärantikörper sind im Detail in Tabelle 3.12 aufgelistet.

### Standardvorschrift

*Beschichten:* Nitro-(14.3)-BSA (0.05 - 0.33 mg/L, siehe Tabelle 3.12 in PBS, 100  $\mu$ L pro Kavität) wurde in die Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettiert und 14 - 20 Stunden bei RT inkubiert.

*Waschen:* Die Platten wurden dreimal mit PBS-Waschpuffer gewaschen, wobei die Kavitäten bei jedem Durchgang zweimal aufgefüllt und abgesaugt wurden. Der Waschpuffer enthielt Tween 20. Nach dem Waschschrift wurden noch anhaftende Flüssigkeitsreste durch Ausklopfen entfernt. Die weiteren Pipettierschritte erfolgten zügig, um ein Austrocknen der Kavitäten zu verhindern.

*Blocken:* 150  $\mu$ L einer BSA-Lösung (20 g/L in Wasser) und 100  $\mu$ L einer Lösung von Casein (20 g/L in Wasser, kurzes Erhitzen zum Sieden und Abfiltrieren notwendig) wurden in die Kavitäten pipettiert und ein bis drei Stunden inkubiert.

*Waschen:* siehe oben.

*Kompetition:* Jede Kavität wurde mit 100  $\mu\text{L}$  Standardlösung gefüllt. Unmittelbar daran anschließend wurden 100  $\mu\text{L}$  einer Lösung eines Antikörpers gegen Nitrotyrosin (in PBS, Details siehe Tabelle 3.12) mit Zusatz von 1 g/L BSA hinzugefügt. Diese beiden Lösungen wurden eine Stunde inkubiert. Die untersuchten Konzentrationsbereiche der Testsubstanzen reichten generell von 10 nmol/L bis 10 mmol/L in 10er Schritten (abhängig von der Löslichkeit; so war für L-Tyrosin die höchste untersuchte Konzentration 2 mmol/L, 4-Nitrophenol konnte bis 100 mmol/L gemessen werden, 2-Nitrophenol bis 50 mmol/L, 3,5-Dinitrotyrosin bis 15 mmol/L). Für unpolare Substanzen wurde eine Methanol/Wasser-Mischung (25 % v/v Methanol) zum Lösen der höchsten Konzentration verwendet. Die resultierende Methanol-Konzentration während der Inkubation von 12.5 % v/v hatte keinen gravierenden Einfluss auf den Assay, was durch Testexperimente mit PBS-Puffer mit Zusatz der gleichen Menge an Methanol überprüft wurde.

*Waschen:* siehe oben.

*Inkubation des markierten Sekundärantikörpers:* 100  $\mu\text{L}$  einer Lösung von Meerrettichperoxidase-markierten Anti-Spezies-Antikörperlösung (Verdünnung siehe Tabelle 3.12, PBS-Puffer mit Zusatz von 0.5 g/L BSA und 0.1 g/L TMB) wurden in die Kavitäten pipettiert und für mindestens 30 min inkubiert.

*Waschen:* siehe oben.

*Enzymreaktion:* In jede Kavität wurden 100  $\mu\text{L}$  der Substratlösung gegeben und 3-30 min bei RT geschüttelt. Die Entwicklung dauerte so lange, bis eine deutliche Blaufärbung eingetreten war, jedoch maximal 30 min, da bei längeren Entwicklungszeiten die Eigenoxidation des Substrats überwog. Bei Zugabe der Lösung war darauf zu achten, dass die einzelnen Kavitäten der Mikrotiterplatte zügig und in konstanten Abständen mit der Substratlösung befüllt wurden. Dadurch wurden Fehler vermieden, die durch unterschiedliche Dauer der Enzymreaktion entstehen hätten können. Während der Entwicklung wurde die MTP mit Aluminiumfolie abgedeckt, da der entstehende Farbstoff lichtempfindlich ist.

*Abstoppen:* Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  5%iger (v/v) Schwefelsäurelösung pro Kavität abgestoppt. Das Pipettieren der Stopplösung in die Kavitäten musste analog zur Zugabe der Substratlösung erfolgen (Einhalten der Reihenfolge und der Zeitabstände, mit dem die Spalten der Platte gefüllt wurden). Der

gebildete gelbe Farbstoff ist relativ stabil, die MTP wurde trotzdem innerhalb von zehn Minuten vermessen.

*Absorptionsmessung:* Die Absorption der Lösung in den Kavitäten wird bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620 nm in einem 8-Kanal-Photometer gemessen. Alternativ wurden einige Platten mit 550 nm Referenzwellenlänge gemessen, da zeitweise der Wellenlängenfilter mit 620 nm nicht zur Verfügung stand.

### 3.9.2 Einseitiger nichtkompetitiver Immunoassay

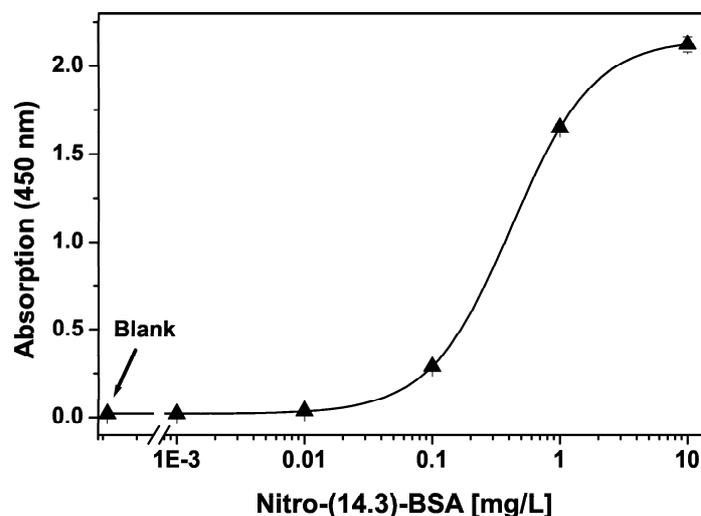
In den einseitigen Immunoassays wurden Lösungen der Primär- und Sekundär-Antikörper wie in 3.9.1 beschrieben, verwendet. Um minimale Nachweisgrenzen zu erreichen, wurde jedoch mit teilweise geringeren Verdünnungen der Antikörper gearbeitet (siehe Tabelle 3.13). Noch geringere Verdünnungen der Antikörper wurden getestet, führten jedoch aufgrund des simultanen Anstiegs des Hintergrundsignals nicht zu einer weiteren Reduktion der Nachweisgrenzen. Abbildung 3.11 zeigt eine typische Kalibrierkurve des einseitigen Assays mit Nitro-(14.3)-BSA, wie sie mit dem mAk CAY erhalten wurde.

**Tabelle 3.13:** Übersicht über Antikörperverdünnungen in den einseitigen Tests.

Nitrotyrosin- Antikörper	Verdünnung	Verdünnung Sekundär-Ak
CAY	1 : 500	1 : 20 000
SA-100	1 : 1 000	1 : 10 000
39B6	1 : 5 000	1 : 20 000
Kaninchen	1 : 1 000	1 : 20 000
Ziege	1 : 5 000	1 : 20 000
Schaf	1 : 2 500	1 : 10 000

#### Standardvorschrift

*Beschichten:* Eine Verdünnungsreihe des zu untersuchenden Nitro-BSA-Standards (sechs verschiedene Konzentrationen von 0.1  $\mu\text{g/L}$  bis 10  $\text{mg/L}$  in PBS, 100  $\mu\text{L}$  pro Ka-



**Abbildung 3.11:** Kalibrierkurve des einseitigen nichtkompetitiven Immunoassays mit mAk CAY für Nitro-(14.3)-BSA. Dargestellt sind Median und Spannweite von Dreifachmessungen. Die Linie repräsentiert die vierparametrische sigmoidale Fitfunktion mit den Fitparametern maximale Absorption 2.15, minimale Absorption 0.020, Konzentration am Testmittelpunkt 0.4 mg/L, Steigung am Testmittelpunkt 4  $\mu\text{g/L}$ .

vität) bzw. die zu untersuchenden Proben wurden mit drei bis sechs Wiederholungen in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte pipettiert und 14-20 Stunden bei RT inkubiert.

*Waschen, Blocken, Waschen:* wie in 3.9.1 beschrieben.

*Inkubation des Primärantikörpers:* 100  $\mu\text{L}$  der Primärantikörperlösung (siehe Tabelle 3.12 ausgenommen Abweichungen s. o.) in PBS mit Zusatz von 1 g/L BSA wurden in die Kavitäten pipettiert und für eine Stunde inkubiert.

*Waschen, Inkubation des markierten Sekundärantikörpers, erneutes Waschen, Enzymreaktion, Abstoppen und Absorptionsmessung:* wie in 3.9.1 beschrieben.

### 3.9.3 Sandwich-Immunoassay für Nitroproteine

Sandwich-Immunoassays wurden mit den zwei monoklonalen Antikörpern 39B6, CAY-189542 und den polyklonalen Antikörpern von Schaf und Ziege durchgeführt. Die jeweiligen Kombinationen, Verdünnungen und optimierten Nachweisgrenzen für Nitro-(14.3)-BSA (Berechnung mit der 5%-Methode) sind im Ergebnisteil in Tabelle 6.5 aufgelistet. Die Sandwich-Immunoassays wurden nach der folgenden Standardprozedur durchgeführt:

*Beschichten:* 100  $\mu\text{L}$  des Fänger-Antikörpers gegen Nitrotyrosin (verdünnt in Coatingpuffer, siehe Tabelle 3.14) wurde in die Kavitäten pipettiert und über Nacht 14-16 Stunden bei RT auf dem Schüttler inkubiert.

*Waschen, Blocken, Waschen:* wie in 3.9.1 beschrieben.

*Inkubation der Standards bzw. Proben:* 100  $\mu\text{L}$  der Probenlösung bzw. einer Verdünnungsreihe von Nitro-BSA in PBS-Azid-Puffer wurden in die Kavitäten pipettiert und eine Stunde bei RT auf dem Schüttler inkubiert.

*Waschen:* wie in 3.9.1 beschrieben.

*Inkubation des zweiten Primärantikörpers:* 100  $\mu\text{L}$  des zweiten Primärantikörpers in PBS (Verdünnung siehe Tabelle 3.14, mit Zusatz von 1 g/L BSA) wurden in die Kavitäten pipettiert und eine Stunde bei RT auf dem Schüttler inkubiert.

*Waschen, Inkubation des markierten Sekundärantikörpers, erneutes Waschen, Enzymreaktion, Abstoppen und Absorptionsmessung:* wie in 3.9.1 beschrieben.

### 3.9.4 Immunoassays für Bet v 1 und Nitro-Bet v 1

Sandwich-Immunoassay für Bet v 1 und Nitro-Bet v 1 wurden wie unter [290] beschrieben durchgeführt und Extrakte von Luftstaubproben (PM<sub>2.5</sub>) mit diesen Assays gemessen. Im Rahmen der erzielten Nachweisgrenzen konnte jedoch kein Bet v 1 nachgewiesen werden. Gründe dafür sind vermutlich in den zum Zeitpunkt der Messungen stark schwankenden Hintergrundsignalen auf den MTP zu suchen. Die Wiederfindung in den Filtereluatens der mit BPE belegten Spritzenfilter wurden mit dem Sandwich-Immunoassay für

**Tabelle 3.14:** *Eingesetzte Antikörper und Verdünnungen im Sandwich-Immunoassay für Nitroproteine.*

Fänger- Antikörper, Verdünnung	Zweiter Primär- Antikörper	Verdünnung	markierter Sekundär-Ak	Verdünnung Sekundär-Ak
Ziege, 1 : 10 000	CAY 39B6	1 : 500 1 : 10 000	Anti-Maus-IgG Anti-Maus-IgG	1 : 30 000 1 : 30 000
Schaf, 1 : 2 500	CAY 39B6	1 : 500 1 : 10 000	Anti-Maus-IgG Anti-Maus-IgG	1 : 30 000 1 : 30 000
39B6, 1 : 10 000	Ziege Schaf	1 : 10 000 1 : 2 500	Anti-Ziege-IgG Anti-Schaf-IgG	1 : 10 000 1 : 10 000

Bet v 1 untersucht. Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit speziell der Einfluss der Nitrierung von Bet v 1 auf dessen Erkennung durch verschiedene Antikörper untersucht. Dazu wurden folgende Assays mit jeweils Bet v 1 und Nitro-Bet v 1 durchgeführt:

- Einseitiger Assay mit polyklonalem Kaninchen-Anti-Bet v 1 Antikörper;
- einseitiger Assay mit monoklonalem Maus-Anti-Bet v 1 Antikörper;
- einseitiger Assay mit humanen Bet v 1-Allergikerseren („polyklonaler Human-Antikörper“);
- Sandwich-Immunoassay mit polyklonalem Kaninchen-Anti-Bet v 1-Antikörper (Fängerantikörper) und humanen Bet v 1-Allergikerseren als zweiten Primärantikörper.

### Einseitige Bet v 1-Assays

*Beschichten:* Parallel wurde je eine Verdünnungsreihe von Bet v 1 und Nitro-(3)-Bet v 1 in PBS-Puffer (für Bet v 1 bis zu sieben verschiedene Konzentrationen von 63 ng/L bis 63 mg/L, für Nitro-(3)-Bet v 1 bis zu sechs verschiedene Konzentrationen von 0.34 µg/L bis 34 mg/L, je 100 µL pro Kavität) mit drei Wiederholungen in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte pipettiert und 14-20 Stunden bei RT inkubiert.

**Tabelle 3.15:** Primärantikörper gegen Bet v 1 und verwendete Verdünnungen in einseitigen nichtkompetitiven Assays für Bet v 1.

Bet v 1-Antikörper	Verdünnung	Sekundär-Ak	Verdünnung
pAk Kaninchen	1 : 10 000	Anti-Kaninchen IgG-POD	1 : 10 000
mAk Bv16	1 : 1 000	Anti-Kaninchen IgG-POD	1 : 20 000
Humanseren MT4/12/59	1 : 10	Anti-Human IgE	1 : 1 000

*Waschen:* wie in 3.9.1 beschrieben.

*Blocken:* 200  $\mu\text{L}$  einer BSA-Lösung (20 g/L in PBS) wurden in die Kavitäten pipettiert und ein bis drei Stunden inkubiert.

*Waschen:* wie in 3.9.1 beschrieben.

*Inkubation des Primärantikörpers:* 100  $\mu\text{L}$  der Primärantikörperlösung (siehe Tabelle 3.15) in PBS mit Zusatz von 1 g/L BSA wurden in die Kavitäten pipettiert und für eine Stunde inkubiert.

*Waschen:* wie in 3.9.1 beschrieben.

*Inkubation der Sekundärantikörper:* Wurden Kaninchen- oder Maus-Antikörper als Primärantikörper benutzt, so erfolgte standardmäßig die Inkubation mit einem Meerrettichperoxidase-markiertem Sekundärantikörper gegen Kaninchen- bzw. Maus-IgG (siehe Abschnitt 3.9.1). Bei den Humanseren erfolgte zunächst die Inkubation mit einem Anti-Human-IgE-Antikörper (aus Ratte). Dazu wurden von Anti-Human-IgE LO-HE-10 und LO-HE-17 je 10  $\mu\text{L}$  auf 10 mL PBS mit Zusatz von 0.4 g/L BSA verdünnt und 100  $\mu\text{L}$  von dieser Lösung in die Kavitäten pipettiert. Bei den Humanseren erfolgte nach einem weiteren Waschschrift daher eine weitere Inkubation mit einem Tertiärantikörper: je 100  $\mu\text{L}$  Meerrettichperoxidase-markierte Anti-Ratte-IgG-Antikörper (1 : 10 000 in PBS verdünnt mit Zusatz von 0.8 g/L BSA) wurden in die Kavitäten pipettiert und eine bis zwei Stunden inkubiert. Die Enzymreaktion, Abstoppen und Messung der Platte erfolgte dann wiederum analog zu der oben (Abschnitt 3.9.1) beschriebenen Vorgehensweise.

### Sandwich-Bet v 1-Assay mit Humanseren

*Beschichten:* Je 100  $\mu\text{L}$  einer Verdünnung von 1 : 10 000 des polyklonalen Bet v 1 Kaninchen-Antikörpers in Coating-Puffer wurden in die Kavitäten einer MTP pipettiert.

*Waschen, Blocken, Waschen:* wie in 3.9.1 beschrieben.

*Inkubation mit den Standards:* Je eine Verdünnungsreihe von Bet v 1 und Nitro-(3)-Bet v 1 in PBS-Puffer (fünf verschiedene Konzentrationen: für Bet v 1 von 63 ng/L bis 0.63 mg/L, für Nitro-(3)-Bet v 1 von 0.34  $\mu\text{g/L}$  bis 3.4 mg/L, je 100  $\mu\text{L}$ ) wurde mit je drei Wiederholungen pro Konzentration in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte pipettiert und 1.5 bis 2 Stunden bei RT inkubiert.

*Waschen:* wie in 3.9.1 beschrieben.

*Inkubation der Allergikerseren:* Nach dem Auftauen wurden die Allergikerseren fünf Minuten bei 10 000  $\text{U}/\text{min}^{-1}$  zentrifugiert (Biofuge 28RS, 4 °C), um vorhandene Lipide abzutrennen. 1 mL Serum wurde mit 3 mL PBS-Puffer verdünnt, je 100  $\mu\text{L}$  davon in die Kavitäten pipettiert und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

*Waschen:* wie in 3.9.1 beschrieben.

*Inkubation der Sekundärantikörper:* 100  $\mu\text{L}$  einer Lösung von Anti-Human-IgE (LO-HE-10 und LO-HE-17 je 1 : 2 000 verdünnt) in PBS mit Zusatz von 0.4 g/L BSA wurden in die Kavitäten pipettiert und eine Stunde bei RT inkubiert.

*Inkubation der markierten Tertiärantikörper:* 100  $\mu\text{L}$  Meerrettichperoxidase-markierte Anti-Ratte-IgG-Antikörper (1 : 10 000 in PBS verdünnt mit Zusatz von 0.8 g/L BSA) wurden in die Kavitäten pipettiert und ein bis zwei Stunden inkubiert.

*Enzymreaktion, Abstoppen, Messung:* wie oben beschrieben (Abschnitt 3.9.1).

## 3.10 Reaktion von Proteinen mit reaktiven Spurenstoffen

### 3.10.1 Extraktion von Birkenpollen

2.0 g Birkenpollen wurden mit 10.0 mL deionisiertem Wasser versetzt und 80 Minuten gerührt. Dann wurde 15 Minuten bei  $17\,000\text{ min}^{-1}$  und  $14\text{ °C}$  abzentrifugiert (Heraeus Biofuge 28 RS) und der Rückstand erneut mit 9.4 mL Wasser versetzt, 70 min gerührt und zentrifugiert (25 min bei  $11\,000\text{ min}^{-1}$ , Hettich Universal 30 F, ungekühlt). Diese Prozedur wurde noch zweimal wiederholt. Die vier Fraktionen wurden vereinigt, über einen Polysulfon-Membranfilter (Lida,  $0.45\text{ }\mu\text{m}$ ) filtriert, bei  $-23\text{ °C}$  eingefroren und das Wasser in einer Gefriertrocknungsanlage bei 0.1 - 0.2 mbar entfernt. Der Extrakt wurde im getrockneten Zustand bei  $4\text{ °C}$  aufbewahrt. Die Gesamtmasse der als Extrakt isolierten wasserlöslichen Komponenten betrug 757 mg (38 % der Pollentrockenmasse). Die Masse des durch Zentrifugation abgetrennten und getrockneten Rückstands betrug 1.304 g.

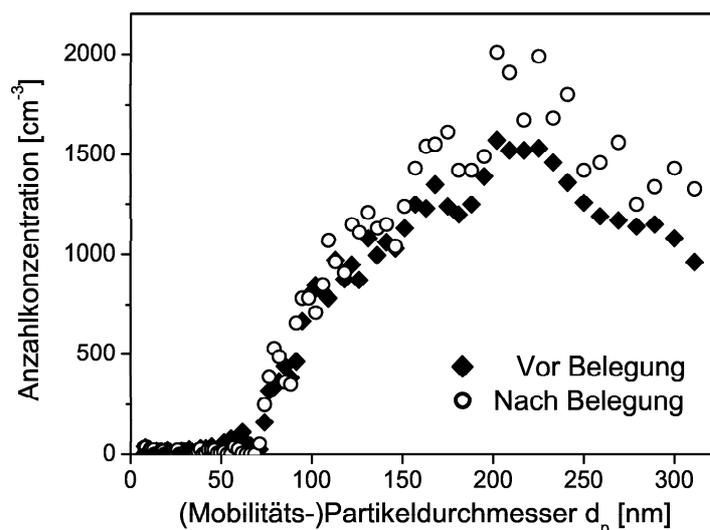
### 3.10.2 Herstellung von Protein-Filterproben

#### Protein-Filterproben durch Auftragen einer Proteinlösung

Spritzenfilter mit 25 mm Durchmesser aus Aluminiumoxid, Celluloseacetat (CA), Glasfaser (GF) und regenerierter Cellulose (RC) wurden parallel mit Proteinlösungen belegt. Die Filter wurden zunächst mit je 10 mL deionisiertem Wasser vorgespült und anschließend gefriergetrocknet. Mit einer  $50\text{ }\mu\text{L}$ -Pipette wurden dann je  $50\text{ }\mu\text{L}$  einer Lösung von 2.0 g/L BSA bzw.  $50\text{ }\mu\text{L}$  einer Lösung von 3.0 g/L Birkenpollenextrakt in deionisiertem Wasser gleichmäßig auf die Filter aufgetragen. Bei den Teflon-Filtern war es bei der Belegung erforderlich, die aufgetragene Lösung an der Auslassseite des Spritzenfilters mit Hilfe einer Spritze etwas anzusaugen, damit die Membran benetzt wurde. Als Blindprobe wurden für alle Versuche  $50\text{ }\mu\text{L}$  deionisiertes Wasser aufgetragen. Die Filter wurden 1 - 1.5 Stunden bei  $-23\text{ °C}$  eingefroren und unmittelbar danach für mindestens eine Stunde in die Gefriertrocknungsanlage gebracht, wo das Wasser durch Sublimation bei ca. 0.1 - 0.2 mbar entfernt wurde. Für die Laborversuche mit befeuchteten Gasgemischen wurden die Filter schließlich in einer verschlossenen Kunststoffbox in einer gesättigten Wasserdampfatmosfera 1.5 - 3 Stunden bei Raumtemperatur (ca.  $23\text{ °C}$ ) vorkonditioniert.

### Protein-Filterproben durch Abscheiden von Aerosolpartikeln

In einen 500 mL Dreihalskolben wurden 180 mL einer 0.1 %igen Lösung von BSA in Wasser gefüllt. In den Kolben wurde mittels eines Kreuzfluss-Zerstäubers Stickstoff (Reinheit 5.0, 99.999 %) mit 4 L/min eingeleitet. In einem Diffusionstrockner, der mit Kieselgel gefüllt war, wurden die dabei mitgerissenen Flüssigkeitspartikel getrocknet und so ein polydisperses BSA-Aerosol erzeugt. Die Gesamtpartikelanzahl wurde mittels eines Kondensationskernzählers (CNC) zu  $7 \cdot 10^4 \text{ cm}^{-3}$  bestimmt. Nach Einstellen des Ladungsgleichgewichts der Aerosolpartikel durch eine Krypton-85-Quelle wurde die Partikelgrößenverteilung mit einem Scanning Mobility Particle Sizer (SMPS) gemessen und mittels der Software Aerosol Instrument Manager (AIM) ausgelesen. Die dabei bestimmte Größenverteilung der Aerosolpartikel ist in Abbildung 3.12 wiedergegeben.



**Abbildung 3.12:** Größenverteilung der BSA-Partikel gemessen mittels SMPS.

Die so erzeugten, getrockneten BSA-Aerosolpartikel wurden auf Spritzenfiltern aus Glasfaser und Teflon ( $0.45 \mu\text{m}$ ) abgeschieden. Die Sammelzeit variierte dabei von 60 bis 135 Minuten. Durch Wägung wurde die Massenbeladung der Filter bestimmt. Dazu wurden die Spritzenfilter analog zur Wägung der 150 mm-Filter (3.1.1) in einem mit gesättigter Kaliumcarbonat-Lösung befüllten Feuchte-Exsikkator (RH 45 %) vor dem Wiegen für 48 h konditioniert.

### 3.10.3 Begasung von Proteinproben mit synthetischen

#### Gasgemischen

Die Proteinproben auf den Spritzenfiltern wurden mit definierten Gasgemischen aus Stickstoff, Stickstoffdioxid und Ozon begast, wobei in den meisten Experimenten auch Wasserdampf beigemischt wurde (siehe Tabelle 3.16). Abbildung 3.13 zeigt den Versuchsaufbau. Zunächst wurde der Stickstoffstrom am Rotameter 1 (RM 1) auf 1 - 3 L/min eingestellt und dann vorsichtig das Nadelventil mit dem Prüfgas aufgedreht, bis die gewünschte Endkonzentration  $\text{NO}_2$  erreicht war. Ozon wurde durch Photodissoziation von Sauerstoff mit Hilfe einer UV-Quecksilberdampfampe erzeugt [297].



Der Ozongenerator bestand aus einem 10 cm langen, polierten Aluminiumzylinder mit elliptischem Querschnitt. Zur optimalen Ozonausbeute wurde eine Hg-Lampe L 937-02 mit dem Emissionsmaximum bei 185 nm in der einen Brennachse der elliptischen Bohrung platziert, während  $\text{O}_2$  durch ein UV-transparentes Glasrohr (Suprasil-Rohr) in der anderen Brennachse geleitet wurde. Mit dem Ozongenerator konnten Ozon-Volumenmischungsverhältnisse zwischen 0.05 und 4 ppm eingestellt werden. Die beiden Gasströme  $\text{N}_2/\text{NO}_2$  und  $\text{O}_2/\text{O}_3$  wurden in einem Ringspaltmischer homogen vermischt. Für die Versuche mit Feuchtigkeit wurde ein zweiter Stickstoffstrom durch eine partiell mit Wasser gefüllte, thermostatisierte Waschflasche mit Glasfritteneinsatz geleitet. Am Rotameter 3 (RM 3) wurden Volumenströme zwischen 1 und 3 L/min eingestellt, um relative Feuchten im Bereich von 20 - 50 % zu erreichen (siehe Tabelle 3.16). Die Vermischung mit dem Ozon- und Stickstoffdioxid enthaltenden Gasstrom erfolgte mittels eines V-förmigen Schlauchverbinders unmittelbar vor den begasten Spritzenfiltern. Die relative Feuchtigkeit des synthetischen Gasgemischs wurde unmittelbar nach den begasten Spritzenfiltern mit einem kommerziellen kapazitiven Feuchtefühler (FH A646, Ahlborn, Holzkirchen) gemessen.

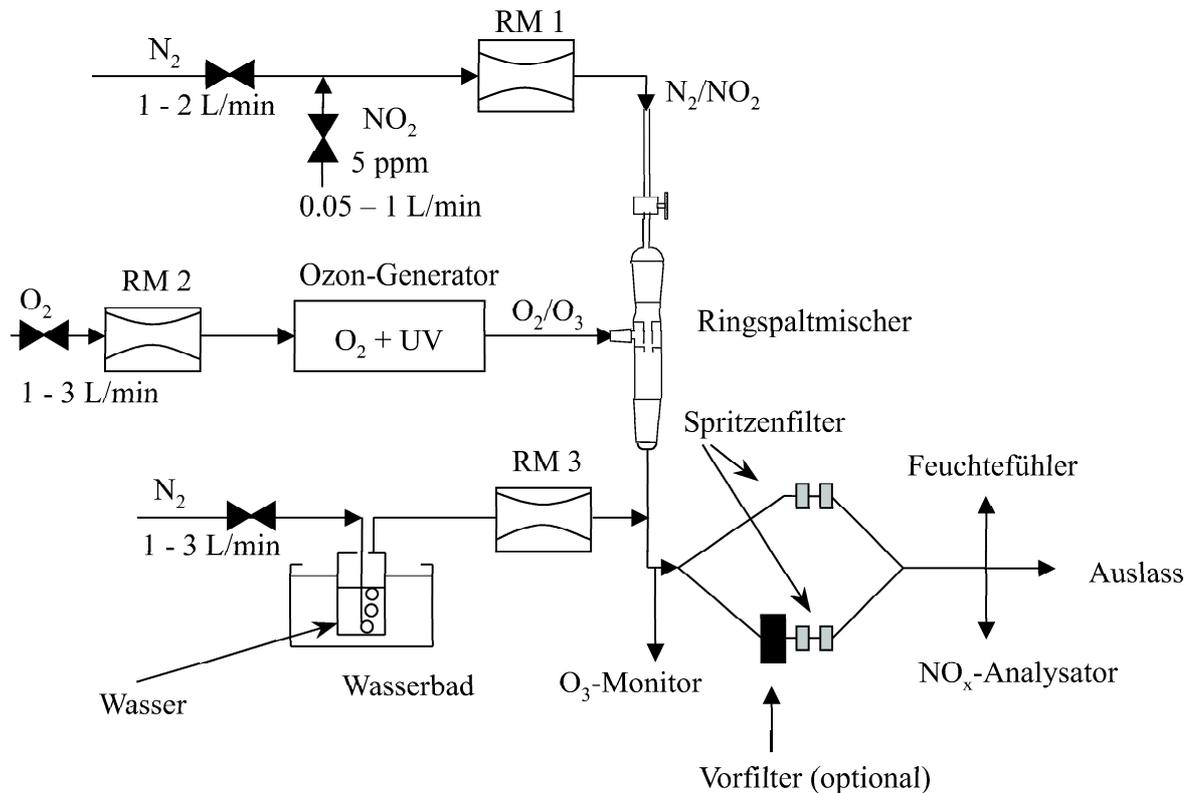
Zur Verbindung der einzelnen Elemente wurde Tygon-Schlauch (Innendurchmesser 6 mm) verwendet. Zur Verzweigung und Kupplung der Schlauchstücke wurden Schlauchverbinder aus Polypropylen benutzt. Der Stickstoffstrom wurde der Hausleitung (Reinheit 5.0; 99.999 %),  $\text{NO}_2$  einer Prüfgasflasche entnommen (4.57 ppm  $\text{NO}_2$  98 % in 5.0  $\text{N}_2$ ). Zumeist wurden parallel BSA und Birkenpollenextrakt untersucht. Tabelle 3.16 gibt einen Überblick über die durchgeführten Experimente mit synthetischen Gasgemischen.

Es wurden Ozon- und  $\text{NO}_2$ -VMV von 0.05 - 1 ppm über Zeiträume zwischen 2 und 167

Tabelle 3.16: Übersicht über die Begasungsexperimente mit synthetischen Gasgemischen.

Dauer [h]	VMV		RH [%]	Art der Belegung	Anzahl begaster Filter		
	NO <sub>2</sub> [ppm <sub>v</sub> ]	O <sub>3</sub> [ppm <sub>v</sub> ]			BSA/BPE		
					Glasfaser	Teflon	RC
<b>Begasung von abgeschiedenen Aerosolpartikeln</b>							
2.5	1.00	0.00		Partikel	2/0	2/0	
2.5/3.5	1.00	0.00	50 - 63	Partikel	2/0	2/0	
2	0.00	1.00		Partikel	2/0	2/0	
2	0.00	1.00	42 - 55	Partikel	2/0	2/0	
<b>Begasung von Proteinproben aus aufgetragenen Lösungen</b>							
2	0.00	1.00		Lösung	1/1	1/1	
2	0.00	0.70	2 - 16	Lösung	1/1	1/1	
1/2/3/4	1.00	1.00	29 - 42	Lösung	4/4		
1/2/3/4	0.50	0.50		Lösung	4/4		4/4
1/2/3/4	0.50	0.50	34 - 40	Lösung	4/4		4/4
7.5/23/32/48	0.20	0.20	25 - 53	Lösung	4/4		
6/22/31/46	0.10	0.10	51 - 57	Lösung	4/4		
6/23/31/48	0.10	0.00	30 - 40	Lösung	4/4		
29/93/118/165	0.05	0.05	44 - 54	Lösung	4/4		
<b>Zusätzliche Begasungsversuche</b>							
27/52 <sup>1</sup>	0.20	0.20	32 - 35	Lösung	4/4		
67 <sup>2</sup>	0.20	0.20	29 - 37	Lösung	4/4		
8 - 167 <sup>3</sup>	0.05	0.05	46 - 64	Lösung	13/13		

<sup>1</sup>Versuch mit Partikelvorfilter<sup>2</sup>Versuch mit Teflonvorfilter<sup>3</sup>parallele Begasung



**Abbildung 3.13:** Versuchsaufbau zur Begasung von Proteinproben mit synthetischen Gasgemischen.

Stunden untersucht. Bei zwei Versuchen wurden zusätzliche Vorfilter vor die begasten Proben eingebaut: ein Absolut-Partikelfilter (Headline Filters Limited, Grade DIF-N50) bzw. ein Teflon-Spritzenfilter (Roth, 0.45  $\mu\text{m}$  Porenweite).

Die verwendeten Spritzenfilter wurden nach Versuchsende zur Elution der Proteine mit jeweils insgesamt 4 mL PBS-Azid-Puffer gespült. Dazu wurde mit 5 mL Einwegspritzen zunächst 1 mL Puffer durch den Filter gespült, fünf Minuten gewartet und sodann die restlichen 3 mL durch den Filter gespült. Die so erhaltenen Lösungen wurden in verschlossenen Rollrandgläschen bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt und mittels einseitigem Immunoassay mit mAk CAY auf nitrierte Proteine untersucht. Einige Filtereluate (Begasung mit Umgebungsluft, Begasung nur mit Ozon) wurden mittels BCA-Assay (BSA-Proben) und mittels Bet v 1-Sandwich-Assay (BPE-Proben) auf Proteinwiederfindung untersucht.

### 3.10.4 Begasung von Proteinproben mit Umgebungsluft

In insgesamt fünf Experimenten wurde mittels einer Membranpumpe Umgebungsluft durch die mit Protein belegten Spritzenfilter gesaugt. Die Versuche wurden an einem Verkehrsknotenpunkt in München (Luise-Kiesselbach-Platz) mit hoher verkehrsbedingter Abgasbelastung durchgeführt. Parallel dazu wurden Begasungen mit gering belasteter Umgebungsluft auf dem Gelände des Klinikums Großhadern durchgeführt. Am LKP wurde, um  $\text{NO}_2$  und andere reaktive Spurengase nicht durch Reaktion mit der Schlauchwand zu verlieren, vom Ansaugrohr (aus Glas) bis zu den ersten Spritzenfiltern Schlauch aus Teflon (1 m Länge) verwendet und die zur Verbindung notwendigen Schlauchstücke aus Tygon auf wenige mm Länge gekürzt. Die Volumenströme wurden mittels Schlauchklemmen reguliert und für alle Filter mittels drei paralleler Rotameter gleich eingestellt (0.15 - 1.0 L/min).  $\text{NO}_2$  und andere reaktive Spurengase wurden für die Vergleichsproben mittels Aktivkohle abgeschieden. Dazu wurde ein mit Aktivkohle gefüllter Diffusionsabscheider (Länge x Durchmesser 55 x 1 cm, LKP) bzw. Glasturm (35 x 5 cm, GH) in die Apparatur eingebaut. Abbildung 3.14 zeigt den Versuchsaufbau mit neun Spritzenfiltern parallel, wie er zur Untersuchung von drei verschiedenen Filtermaterialien verwendet wurde. Die Anordnung von jeweils drei Spritzenfiltern des gleichen Materials ist ebenfalls dieser Abbildung zu entnehmen. So wurde der mit Wasser belegte Spritzenfilter stets in die Mitte des Kreuzverbindungsstückes platziert und die mit BSA und BPE belegten Filter im rechten Winkel dazu. Tabelle 3.17 gibt einen Überblick über die durchgeführten Experimente.

**Tabelle 3.17:** Übersicht über die Begasungsexperimente mit Umgebungsluft.

Zeitraum	Dauer [h]	Filtermaterial
15.04.2002 - 22.04.2002	174	CA, GF, RC
22.04.2002 - 29.04.2002	165	Al, CA, GF
29.04.2002 - 06.05.2002	171	CA, GF, RC
06.05.2002 - 15.05.2002	209	CA, GF, RC
29.05.2002 - 05.06.2002	162	CA, GF, RC

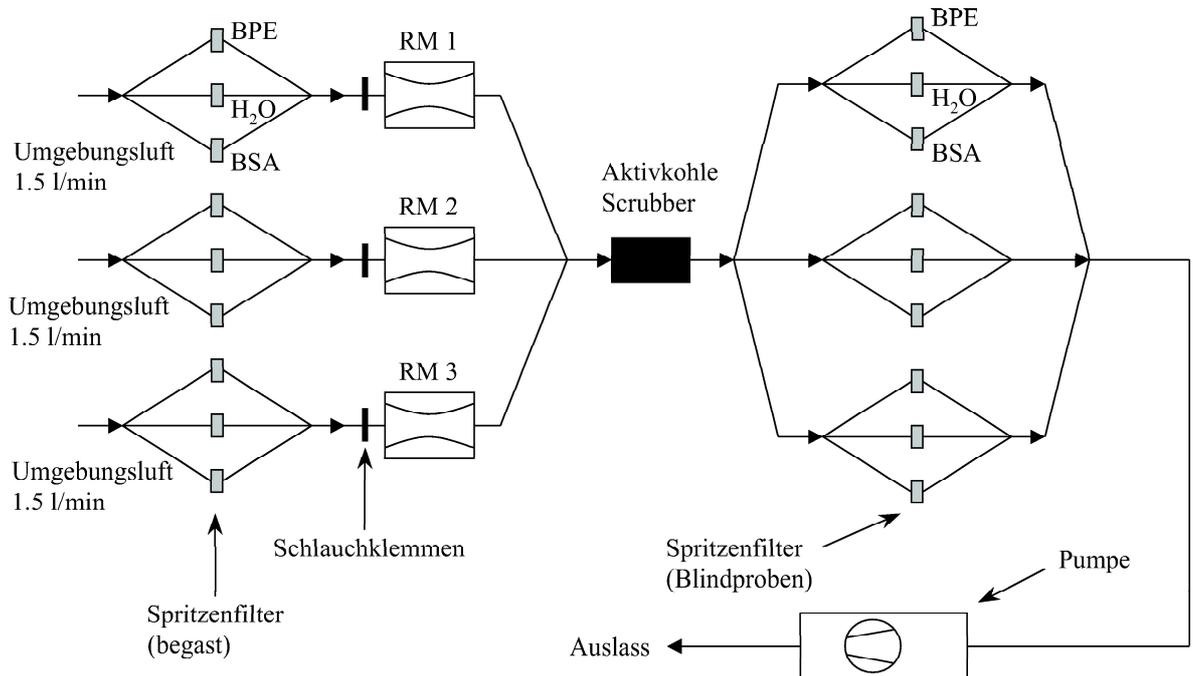


Abbildung 3.14: Versuchsaufbau zur Begasung von Proteinproben mit Umgebungsluft.

### 3.10.5 Konzentrationsmessungen von Ozon, Stickoxiden und Wasserdampf

Die Messung der Ozon-VMVs bei den Experimenten mit synthetischen Gasgemischen erfolgte mit einem kommerziellen O<sub>3</sub>-Analysator (41M, Ansyco, Karlsruhe) unmittelbar vor den beströmten Spritzenfiltern. Die VMV von NO, NO<sub>2</sub> und NO<sub>x</sub> wurden nach Durchgang des Gasstroms durch die Filter mit einem NO<sub>x</sub>-Analysator (CLD 700 Al, Eco Physics, München) gemessen, die Zehnstunden-Mittelwerte mittels einer *Labview*-basierten Software (*NO<sub>x</sub>-View*, EcoPhysics, München) an einen Messrechner übertragen und mittels *Excel 2000* ausgewertet. Eine grafische Darstellung des Verlaufs der NO, NO<sub>2</sub> und NO<sub>x</sub>-VMV zeigt Abbildung 3.15 für eine Begasung mit 100 ppb<sub>v</sub> NO<sub>2</sub> (Sollwert). Im Diagramm sind auch die drei Entnahmen von Filtern aus dem Gasstrom markiert. Die dazu notwendige kurze Unterbrechung des Gasstroms ist als kurzfristiges Absinken des VMV von NO<sub>2</sub> klar zu erkennen.

Bei den Versuchen mit Umgebungsluft wurden die Stickoxide in Großhadern ebenso mit dem NO<sub>x</sub>-Analysator CLD 700 Al, jedoch mit einer älteren, DOS-basierten Software gemessen. Am Luise-Kiesselbach-Platz wurden die NO<sub>2</sub>-Volumenmischungsverhält-

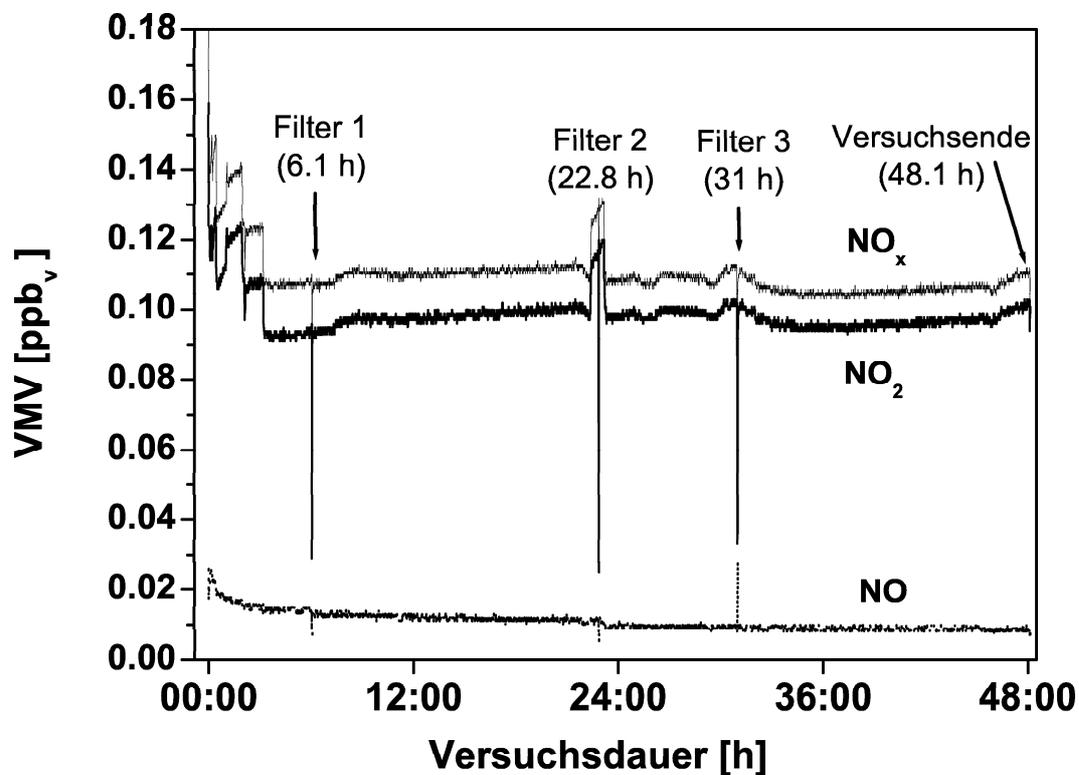


Abbildung 3.15: Verlauf der VMVs von NO, NO<sub>2</sub> und NO<sub>x</sub> während einer 48-stündigen Begasung mit 100 ppb<sub>v</sub> NO<sub>2</sub> (Sollwert). Die Mittelwerte der VMVs betragen für NO/NO<sub>2</sub>/NO<sub>x</sub> und Filter 1: 104/16/120; Filter 2: 100/13/113; Filter 3: 100/12/112; Filter 4: 99/11/110 [ppb<sub>v</sub>].

nisse parallel von einem NO<sub>x</sub>-Analysator (Eco Physics) des Bayerischen Landesamts für Umweltschutz gemessen und zusammen mit weiteren Messdaten (VMV von NO, NO<sub>x</sub>, O<sub>3</sub>, CO, SO<sub>2</sub>, PM10-Konzentrationen, RH, Temperatur) als Halbstundenmittelwerte zur Verfügung gestellt.

# 4 Protein- und Kohlenstoffmessergebnisse

## 4.1 Charakterisierung des BCA-Assays

### 4.1.1 Kreuzreaktivitäten

Der BCA-Assay wurde standardmäßig auf Rinderserumalbumin, BSA, mit einer Masse von 67 kDa kalibriert. Da in Umweltproben eine komplexe Mischung von sehr vielen Proteinen zu erwarten ist, wurden die Kreuzreaktivitäten verschiedener Substanzen untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.1 aufgelistet. Die höchste Kreuzreaktivität bezüglich BSA zeigte dabei das  $\gamma$ -Rinderserumglobulin (83 %), das ebenso wie BSA aus Rinderserum stammt. Ovalbumin und Casein wiesen bereits deutlich geringere Kreuzreaktivitäten von 66 bzw. 53 % auf. Die für die Enzyme Amylase und Cellulase bestimmten relativen Konzentrationen von 34 bzw. 19 % sind besser als „Proteingehalt“ der Proben zu interpretieren. Üblicherweise sind kommerziell erhältliche Enzyme keine Reinsubstanzen, sondern können noch Kohlenhydrate, andere Proteine, Puffersubstanzen und weitere Substanzen enthalten. Idealerweise sollten sich die Kreuzreaktivitäten, bezogen auf den Kalibrierstandard, im Bereich von wenigen Prozent Abweichung von 100 % bewegen. Die große Vielfalt der Substanzklasse der Proteine bezüglich Aminosäurezusammensetzung, Größe und mögliche Modifizierung der Seitenketten erschwert jedoch die Erfüllung dieser Bedingung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher das häufig verwendete Protein BSA als Kalibrierstandard verwendet, auf das auch eine Vielzahl anderer Proteinmessungen bezogen sind [32].

Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass mittels BCA-Assay keine absoluten Konzentrationen bestimmt werden können, sondern nur „BSA-Äquivalentkonzentrationen“. Zur quantitativen Analyse von Proteingehalten in Umweltproben erscheint eine Reduktion der Komplexität der Proben ratsam. Dies kann z.B. durch Hydrolyse der Proteine zu den Aminosäuren erzielt werden, wobei dann je nach Art der Hydrolyse nur noch

17-20 Substanzen quantifiziert werden müssen. Allerdings sind bei der Aminosäureanalytik auch Nachteile zu berücksichtigen, wie z.B. der stark erhöhte apparative und zeitliche Aufwand, Substanzverluste bei der Hydrolyse, erhöhte Blindwerte durch die ubiquitäre Verteilung der Aminosäuren, etc. Aminosäuremessungen wurden auch im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt (Kapitel 5).

**Tabelle 4.1:** Kreuzreaktivitäten verschiedener Substanzen im BCA-Assay (BSA = 100 %-Wert). Angabe des arithmetischen Mittels der je 3-4fach parallel bestimmten Mittelwerte von 1-8 Konzentrationen und je einer Standardabweichung dieses arithmetischen Mittels.

Testsubstanz	Molekül- masse [kDa]	Kreuz- reaktivität [%]	Konzentra- tionsbereich [mg/L]	Anzahl Konz. (Wdh.)
Rinderserumalbumin	67	100		
$\gamma$ -Rinderserumglobulin	90	$83 \pm 6$	10 - 40	3 (4)
Ovalbumin	45	$66 \pm 4$	10 - 40	3 (4)
Casein		$53 \pm 5$	10 - 40	3 (4)
$\alpha$ -Amylase, <i>Aspergillus oryzae</i>	51	$34 \pm 2$	10 - 40	3 (4)
Cellulase, <i>Aspergillus niger</i>	31	$19 \pm 9$	20 - 200	3 (4)
Huminsäure, Roth,		$43 \pm 4$	5 - 100	7 (4)
Huminsäure, Fluka		$31 \pm 5$	5 - 100	7 (4)
Huminsäure-Carbamidester		$23 \pm 3$	5 - 100	7 (4)
Huminsäure aus Kompost		$23 \pm 0$	130	1 (3)
Fulvinsäure (I), IWC		$8 \pm 0$	200	1 (3)
Fulvinsäure, Melaza Ac., IWC		$2 \pm 4$	5 - 250	8 (4)

Ergebnisse der Messungen der Kreuzreaktivitäten von Humin- und Fulvinsäuren im BCA-Assay sind ebenso aus Tabelle 4.1 zu entnehmen. Die ausgewählten Huminsäuren zeigten Kreuzreaktivitäten von 23-43 %, d.h. bei Vorhandensein von 1 mg Huminsäure in der Probe würden 0.2 bis 0.4 mg BSA-Äquivalentprotein zu viel bestimmt werden. Die Fulvinsäuren stellen mit lediglich 2-8 % Kreuzreaktivität eine weitaus geringere potentielle Störung des BCA-Assays dar. Eine vollständige Trennung von Huminsäuren,

Fulvinsäuren und Proteinen ist aufgrund der großen Komplexizität beider Substanzen und überlappenden Eigenschaften äußerst schwierig. Zudem können Aminosäuren und Peptide kovalente Bindungen mit Huminsäuren eingehen, die bei einer Trennung der Substanzgruppen selektiv gelöst werden müssten. Auch durch die in der Probenanalytik angewandte Größenausschlusschromatographie ist keine Abtrennung der HULIS aus Umweltproben zu erzielen, da diese ebenso wie die Proteine makromolekulare Substanzen sind.

Bei Berechnung der Kreuzreaktivitäten für unterschiedliche Huminsäurekonzentrationen im Bereich von 5 mg/L bis 250 mg/L ergaben sich nahezu identische Einzelwerte mit Schwankungen von jeweils nur wenigen Prozent. Die Eigenabsorptionen von mit Huminsäurelösungen gefüllten Kavitäten der MTP lagen zudem im Bereich von 0.2-0.3 bei 250 mg/L. Sie waren damit nur leicht erhöht im Vergleich zum Hintergrundwert für das BCA-Reagenz mit PBS-Puffer (0.15 bis 0.2). Die Absorption der Fulvinsäuren ohne BCA-Reagenz lag z.T. sogar unter diesem Wert (0.06 für 250 mg/L Fulvinsäure Ac. Melaza, IWC). Daher wurde auf besondere Berechnungen unter Einbezug der Eigenfärbung der Humin- und Fulvinsäuren in den untersuchten Beispielen bei der Messwellenlänge von 550 nm verzichtet.

#### 4.1.2 Adsorption von Proteinen

Proteine sind makromolekulare Substanzen, die an polaren Oberflächen schnell und dauerhaft adsorbiert werden können, u.a. beruht das Prinzip des ELISA in Mikrotiterplatten aus aktiviertem Polystyrol auf dieser Eigenschaft. Für die Spurenanalytik von Proteinen scheiden daher Probengefäße aus Kunststoff (außer Teflon) wie z.B. Eppendorf-Caps aus. In der vorliegenden Arbeit wurden Glasgefäße für die Proteinanalytik benutzt. Proteine können jedoch ebenso - wenn auch weniger stark - an Glas- und auch Quarzoberflächen adsorbieren. Faserfilter stellen durch ihre hohe Oberfläche im Vergleich zu einfachen Glaswandungen ein Medium mit hoher Adsorptionskapazität dar. Durch die gesetzten Analysenziele für die gesammelten Luftstaubproben war jedoch die Verwendung von Glasfaser- bzw. Quarzfiltern bereits festgelegt. Die parallel durchgeführte Bestimmung des Gesamtkohlenstoffgehalts durch Verbrennungsanalyse (Abschnitt 4.3) ließ die Verwendung von kohlenstoffhaltigen Filtern wie z.B. teflonbeschichteten Glasfaserfiltern (Emfab, Fiberfilm), Teflonfiltern oder Cellulosenitratfiltern nicht zu.

Ausgeglühte Glasfaser- und Quarzfilter wurden daher auf ihre Eigenschaften bezüglich der Adsorptionsfähigkeit von Proteinen untersucht. Dazu wurden wässrige Proteinlösungen auf diese Filter aufgetragen und nach Eintrocknen und Elution mit PBS-Puffer die

Wiederfindung bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.2 dargestellt. Das Adsorptionsverhalten von BSA auf Glasfaser- und Quarzfiltern unterschied sich dabei nicht sehr stark. Es fiel auf, dass bei geringen BSA-Mengen auch die Wiederfindung sehr gering war und nur etwa im Bereich von 10 % lag. Mit der aufgetragenen Menge an BSA stieg die Wiederfindung bis über 50 % für 600  $\mu\text{g}$  BSA an. Die typischerweise gefundenen Absolutmengen an Protein auf Achtelstücken eines Realfilters lagen zwischen 50 und 200  $\mu\text{g}$ . Zu beachten ist bei diesen Ergebnissen, dass es sich um Modellexperimente mit frisch ausgeglühten, absolut sauberen Filtern handelte, deren Adsorptionsfähigkeit nicht durch andere Substanzen, wie sie in Realproben vorhanden sind, beeinträchtigt wurde. Um das Adsorptionsverhalten eines Realfilters zu untersuchen, wurde ein Additionsexperiment mit einem drei Tage lang am Hohenpeißenberg mit PM<sub>2.5</sub> belegten Glasfaserfilter durchgeführt. Bei mittleren BSA-Mengen zeigte der Realfilter in etwa das gleiche Adsorptionsverhalten wie die Modellfilter. Beim Auftragen von 600  $\mu\text{g}$  BSA wurde eine deutlich höhere Wiederfindung von 63 % erzielt.

**Tabelle 4.2:** Übersicht über die Wiederfindung von BSA auf Glasfaser- und Quarzfiltern nach Auftragen und Eindampfen einer wässrigen Lösung. Werte bestimmt im BCA-Assay nach Extraktion mit verdünntem (10 %) PBS-Puffer, beim Realfilter zusätzlich Aufreinigung durch Größenausschlusschromatographie und Abzug der Proteinkonzentration der nicht aufgestockten Filterstücke. Angabe der Mittelwerte  $\pm$  Spannweite der Wiederfindungen von je zwei parallel behandelten, je vierfach gemessenen Filterstücken.

Menge BSA [ $\mu\text{g}$ ]	Modellfilter	Realfilter	Modellfilter
	Glasfaser [%]	Glasfaser [%]	Quarz [%]
20	$8 \pm 3$	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>
50	$16 \pm 1$	- <sup>1</sup>	$12 \pm 1$
100	$20 \pm 0$	- <sup>1</sup>	$11 \pm 1$
200	$37 \pm 4$	$29 \pm 5$	$30 \pm 9$
300	$36 \pm 5$	$40 \pm 2$	$39 \pm 7$
400	$46 \pm 2$	- <sup>1</sup>	$39 \pm 3$
600	$46 \pm 13$	$63 \pm 2$	$53 \pm 3$

<sup>1</sup>kein Wert verfügbar

Auch wurden in vorgegebene BSA-Lösungen bekannter Konzentration Achtelstücke von 150 mm-Filtern gegeben, analog wie bei den durchgeführten Extraktionen gerührt und die Konzentrationen vor und nach der Filterstückzugabe untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.3 aufgelistet. Die Verluste, die durch Adsorption an frisch ausgeglühte Filter auftraten, lagen demnach im Bereich von 14 (Glasfaser) bis 28 % (Quarz).

**Tabelle 4.3:** Übersicht über die BSA-Wiederfindung von Glasfaser- und Quarzfiltern. Angabe der Verhältnisse  $\pm$  Spannweiten der BSA-Konzentration nach 90 min Rühren mit einem Achtelstück eines frisch ausgeglühten 150 mm-Filters im Vergleich zur BSA-Konzentration der Ausgangslösung.

Konzentration BSA [mg/L]	Wiederfindung Glasfaser [%]	Anzahl paralleler Exp.	Wiederfindung Quarz [%]	Anzahl paralleler Exp.
5	115 $\pm$ 37	2	79	1
10	83 $\pm$ 17	4	81 $\pm$ 18	2
20	75 $\pm$ 8	3	63 $\pm$ 18	4
40	81 $\pm$ 2	2	80 $\pm$ 8	2
Mittelwert $\pm$ 1s	86 $\pm$ 17	11	72 $\pm$ 12	9

### 4.1.3 Sonstige mögliche Proteinverluste

Die Wiederfindung von BSA nach dem Eindampfen im Stickstoffstrom und Wiederaufnahme in Wasser betrug  $86 \pm 10\%$  (Mittelwert  $\pm$  1s) bei einer Versuchsreihe mit sieben Lösungen der Konzentrationen 2.5 bis 40 mg/L. Damit kann nicht ausgeschlossen werden, dass Verluste in der Größenordnung von 10 % auch durch die Arbeitsschritte Verdünnen-Eindampfen-Wiederaufnahme auftreten können. Mögliche Ursachen dafür könnten z.B. wiederum Adsorptionsverluste oder verringerte Löslichkeit sein, z.B. aufgrund von Denaturierung oder Änderungen in der Tertiärstruktur des Proteins.

Weiterhin wurde die Größenausschlusschromatographie auf mögliche Proteinverluste untersucht. Sieben BSA-Lösungen wurden vor und nach der (simulierten) Aufreinigung durch eine PD10 Säule im BCA-Assay gemessen. Dabei traten im Mittel keine Verluste auf. Die Wiederfindung betrug  $101 \pm 14\%$  (Mittelwert  $\pm$  1s) für die verwendeten Konzentrationen im Bereich von 20 bis 160 mg/L.

#### 4.1.4 Bewertung des BCA-Assays zur Proteinmessung

Die Ergebnisse des BCA-Assays werden von zahlreichen verschiedenen Faktoren bestimmt. Aufgrund der Kalibrierung auf BSA empfiehlt es sich, bei den Ergebnissen des BCA-Assays von „*BSA-Äquivalentkonzentrationen*“ zu sprechen. Verringerte Kreuzreaktivität von Proteinen könnte bis zu 50 % Unterbestimmung im BCA-Assay beitragen (z.B. Casein). Allerdings kann aufgrund der nur stichprobenartigen Überprüfung einiger Proteine auch nicht ausgeschlossen werden, dass nicht auch Kreuzreaktivitäten größer als 100 % im BCA-Assay auftreten können. Diese Unzulänglichkeiten des BCA-Assays bzw. von Proteinassays im Allgemeinen ist bereits hinlänglich bekannt und in der Literatur beschrieben (für Übersichtszwecke siehe [204]). Eine universelle Methode zur Lösung sämtlicher auftretender Probleme bezüglich Kreuzreaktivitäten in den Färbetests ist momentan jedoch nicht bekannt.

Die Verluste an Modellfiltern setzen sich zusammen aus verringerter Löslichkeit/Adsorption nach der Extraktion (10-15 %) sowie Adsorptionsverlusten an den Filteroberflächen (15-30 %). Die Verluste nach Eintrocknen einer Proteinlösung auf Modellfiltern und anschließender Extraktion waren zudem mengenabhängig: Während bei sehr geringer Proteinbelegung sehr hohe (90 %) prozentuale Adsorptionsverluste auftraten, reduzierten sich diese Verluste auf 40-50 % bei Erhöhung der Absolutmenge Protein. Weiterhin muss beachtet werden, dass nicht alle potentiell vorhandenen Proteine unter den Extraktionsbedingungen pufferlöslich sind. Verluste durch die Größenausschlusschromatographie traten hingegen nicht auf.

Da auch Huminsäuren und Fulvinsäuren bzw. allgemein Huminstoff-ähnliche Substanzen im Test zwischen 2 und 43 % kreuzreagierten, kann der Begriff *makromolekulare Substanzen mit proteinähnlichen Reduktionseigenschaften* in Betracht gezogen werden. Eine Abtrennung der Huminstoff-ähnlichen Substanzen ist chemisch nur sehr unvollständig möglich. Diese Substanzgruppe trägt deshalb zur Erhöhung des bestimmten Proteingehaltes bei. Der BCA-Assay ist daher im Allgemeinen nicht als quantitative Methode zur Messung des Proteingehaltes atmosphärischer Aerosolproben und anderer komplexer Umweltproben zu betrachten, sondern liefert aufgrund der Gegebenheiten halbquantitative Ergebnisse, die als Anhaltspunkt für die wahre Proteinkonzentration dienen können.

## 4.2 Charakterisierung des Bradford-Assays

Das Coomassie-Reagenz besitzt zwei Absorptionsmaxima, bei 455 nm und 635 nm. Durch die Komplexbildung mit Proteinen verschiebt sich das Absorptionsmaximum zu 595 nm (Abbildung 4.1 oben). Im verwendeten Acht-Kanal-Photometer konnten nur einige feste optische Filter ausgewählt werden, u.a. 620 nm, nicht jedoch 595 nm. Daher wurden zunächst BSA-Kalibrierlösungen (1 mL) in PBS-Puffer mit dem Coomassie-Reagenz (1 mL) in Makroküvetten vermischt, die Lichtabsorption im Einstrahlphotometer gemessen, Kalibriergeraden bei 595 nm und 620 nm erstellt und verglichen (Abbildung 4.1 unten). Die Kalibriergerade bei 620 nm verläuft etwas flacher und mit etwas größerem Ordinatenabschnitt als die Gerade bei 595 nm, ist jedoch prinzipiell ebenso zur Kalibrierung geeignet. Die Subtraktion der Absorption bei 450 nm (Referenzwellenlänge) vergrößert die Steigung der Kalibriergerade und reduziert den Einfluss von Untergrundabsorptionen, die durch unterschiedliche Probenmatrices verursacht werden könnten. Für die Durchführung des Bradford-Assays in dieser Arbeit in Mikrotiterplatten wurde deshalb die Differenz der Absorption bei 620 und 450 nm verwendet. Zor und Selinger [211] zeigten zudem, dass auch das Verhältnis der Absorptionen bei 590 und 450 nm zur Kalibrierung geeignet ist. Der lineare Bereich des Bradford-Assays reichte bis ca. 25 mg/L. Bei Messung höherer BSA-Konzentrationen von 50 und 100 mg/L flachten die Kalibrierkurven in diesem Bereich deutlich ab.

Zur Messung in Mikrotiterplatten wurden drei Kalibriergeraden mit dem Bradford-Assay erstellt. BSA wurde im Konzentrationsbereich von 0.5 bis 25 mg/L in PBS, in 10 % v/v PBS und in deionisiertem Wasser gemessen. Die Ergebnisse für die Kalibrierreihen in verschiedenen Lösungsmitteln unterschieden sich jedoch erheblich (Abbildung 4.2). Diese Beobachtungen waren in Wiederholungsexperimenten sehr gut reproduzierbar. Der pH-Wert nach Zugabe des Coomassie-Reagenz zu den unterschiedlichen Kalibrierlösungen wurde mittels Indikatorpapier überprüft, zeigte jedoch konstant stark saure Werte im Bereich von pH 0.5-1, wie sie für den Bradford-Assay notwendig sind. Da sich die Kalibrierlösungen somit nur in der Ionenstärke unterschieden, könnte dies eventuell Einfluss haben. Bradford [210] berichtete über Störungen des Tests durch Detergenzien wie Triton-X 100, Natriumdodecylsulfat oder auch gängige Spülmittel für Glasgeräte.

Zu Testzwecken wurden auch einige Extrakte von Filter- und Straßenstaubproben mit dem Bradford-Assay gemessen und die Ergebnisse mit dem BCA-Assay verglichen. Die Auswertung dieser Experimente zeigte jedoch ebenfalls, dass der Bradford-Assay nicht für die Untersuchung von Umweltproben geeignet war. Bei der angewandten Prozedur der Extraktion mit wiederholtem Eindampfen und Wiederaufnahme der Lösungen,

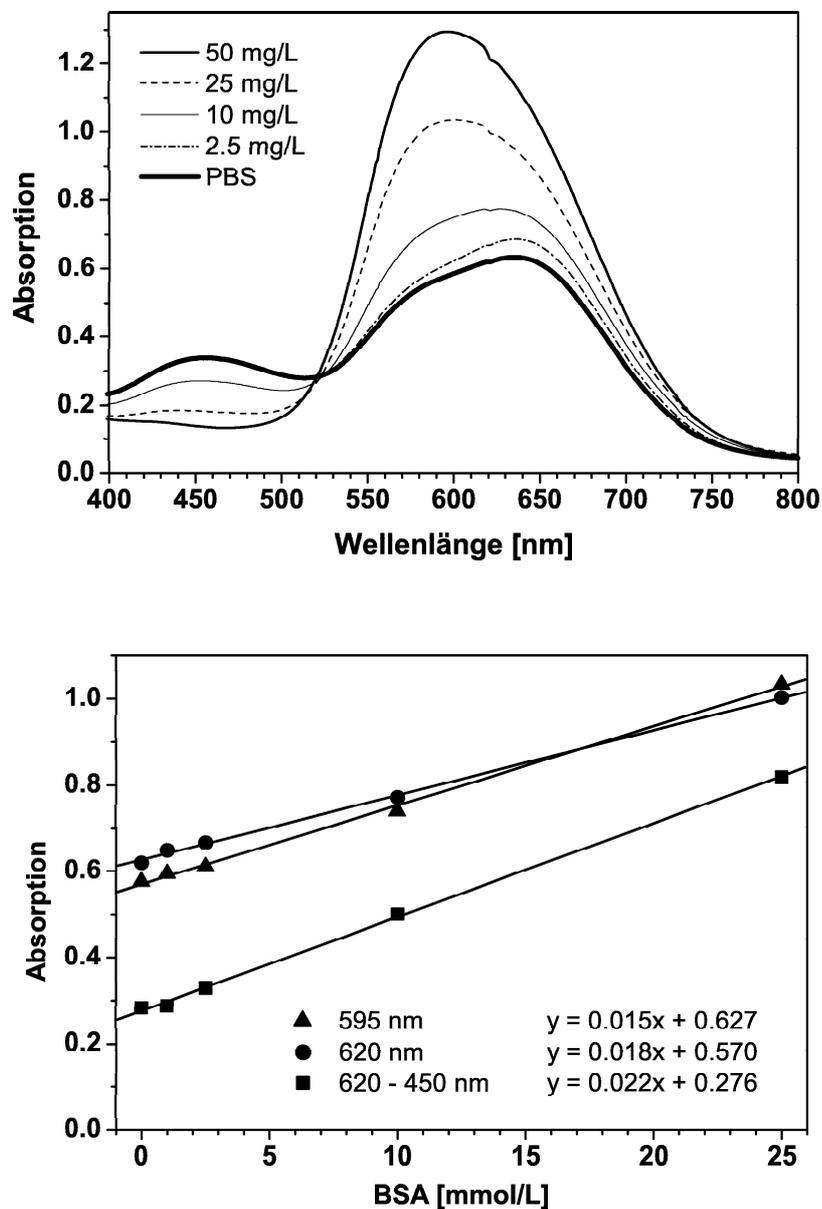


Abbildung 4.1: UV/VIS-Spektrum des Coomassie-Reagenz in PBS und in PBS mit ansteigenden Konzentrationen an BSA, gemessen in 10 mm Einweg-PMMA-Makroküvetten (oben) und resultierende Kalibriergeraden des Bradford-Assays mit BSA bei unterschiedlichen Wellenlängen (unten).

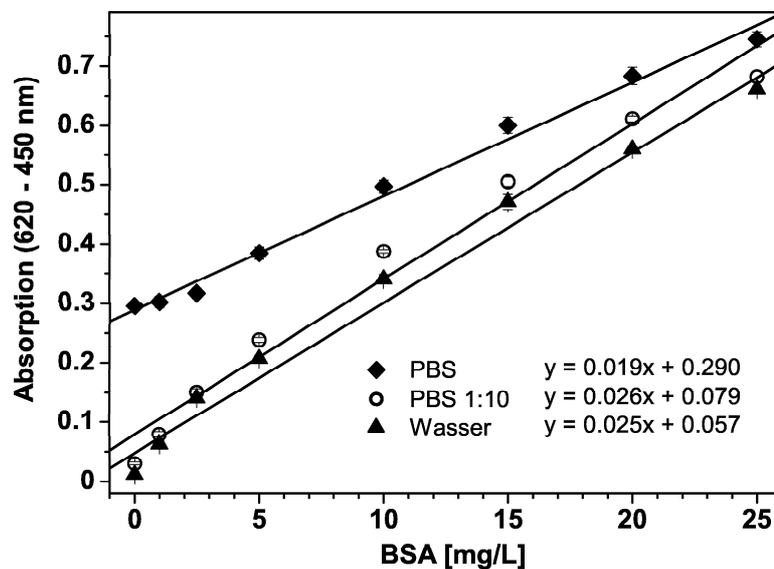


Abbildung 4.2: Kalibriergeraden des Bradford-Assays mit BSA in deionisiertem Wasser, verdünntem PBS-Puffer und PBS-Puffer.

der Verdünnung durch die Größenausschlusschromatographie und durch unterschiedliche Probemengen und -eigenschaften waren die resultierenden Salzkonzentrationen nicht exakt definiert. Da die für den Bradford-Assay notwendigen standardisierten Bedingungen damit nicht ausreichend gesichert waren, kam der Bradford-Assay in dieser Arbeit nicht weiter zur Anwendung.

### 4.3 Atmosphärische Protein- und Kohlenstoffkonzentrationen

Insgesamt wurden 164 Filter mit abgedehnten atmosphärischen Aerosolpartikeln untersucht. Die Mittelwerte der Partikel-, Kohlenstoff- und Proteinkonzentrationen sowie wichtige Verhältnisse dieser Substanzklassen bei den unterschiedlichen Messkampagnen sind in Tabelle 4.4 dargestellt. Da bei einigen Messkampagnen (z.B. LKP und ZSP-1) bei einigen wenigen Filtern kein TC bzw. kein Protein bestimmt wurde (z.B. da für andere Analysen, Wiederholungsmessungen etc. schon der gesamte Filter aufgebraucht war), ergaben sich bei den Verhältnissen z.T. minimale Abweichungen vom Quotient der



**Abbildung 4.3:** *Probenahmeorte Schneefernerhaus am Zugspitzhang (links) und Meteorologisches Observatorium am Hohenpeißenberg (rechts).*

angegebenen Mittelwerte für die Konzentrationen. Die angegebenen Mittelwerte sind jedoch stets volumengewichtete Mittelwerte mit der maximalen Anzahl der verfügbaren Werte. Für die Filter vom Deutschen Wetterdienst konnte kein Kohlenstoff bestimmt werden (zu geringe Probemengen bzw. nicht ausgeglühte Filter).

Die mittlere PM<sub>2.5</sub>-Konzentration war am geringsten auf der Zugspitze (3-5  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ). An diesem Probenahmeort war auch eine deutliche Abnahme der Partikelmassenkonzentration vom Sommer zum Herbst/Winter zu beobachten. Speziell der Kohlenstoffanteil der Aerosolpartikel wurde dabei geringer (Abbildung 4.5 und 4.6). Am Hohenpeißenberg lag die PM<sub>2.5</sub>-Konzentration im mittleren Bereich (11  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ), mit starken Schwankungen der Einzelwerte zwischen 4 und 21  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ . Der relative TC-, EC- und Proteingehalt nahm im Messzeitraum von Mai bis September 2002 leicht zu (Abbildung 4.7). In München-Großhadern war ein Maximum der Feinstaub- und Proteinkonzentration in den Monaten Juli und August zu erkennen. Die Absolutkonzentrationen an PM<sub>2.5</sub> lagen ebenfalls im mittleren Bereich (7-18  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ). Kohlenstoffmessungen wurden hier nur im Frühling und Herbst durchgeführt und zeigten, dass der EC-Anteil am Gesamtkohlenstoff bei den Proben vom September/Oktober 2002 erhöht war. Erwartungsgemäß war am Verkehrsknotenpunkt Luise-Kiesselbach-Platz die gemittelte Feinstaubkonzentration



**Abbildung 4.4:** *Probenahmeorte Großhadern vor dem Institut für Wasserchemie (links) und Messcontainer des Bayerischen Landesamts für Umweltschutz am Luise-Kiesselbach-Platz (rechts).*

am höchsten ( $22 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ). Die vom Bayerischen Landesamt für Umweltschutz am LKP gemessenen PM10-Konzentrationen lagen im Mittel von Anfang April bis Anfang Juli 2001 bei  $31.5 \pm 9.2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , von Ende Mai bis Ende Juli 2000 bei  $32 \pm 10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  und von Anfang April bis Mitte Mai 2002 bei  $35 \pm 13 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (Tagesmittelwerte  $\pm 1\text{s}$ ). Das Verhältnis von PM2.5 zu PM10 betrug damit für die durchgeführten Messungen von April bis Juli 2001 0.71. Dieser Wert liegt im oberen Bereich im Vergleich zu Messdaten aus der Literatur. So variierten z.B. die PM2.5/PM10-Verhältnisse während der „Six City Study“ zwischen 0.47 und 0.63 [2]. Für Philadelphia wurde ein Wert von 0.71 gefunden [298]. Brook et al. untersuchte das Verhältnis von PM2.5 zu PM10 an verschiedenen Orten in Kannada und fand Werte zwischen 0.36 und 0.65 [299, 300].

Die wesentlich höheren Konzentrationen für PM10 von  $58 \mu\text{g}/\text{m}^3$  in Berlin und TSP von  $36 \mu\text{g}/\text{m}^3$  in Freiburg waren aufgrund der unterschiedlichen Größenfraktion nicht unmittelbar mit den PM2.5-Daten der übrigen Probenahmeorte vergleichbar, liegen jedoch in Übereinstimmung mit Literaturdaten. So fanden z.B. Riediker et al. im Stadtzentrum von Zürich von März bis August 1998 durchschnittlich  $23 \mu\text{g}/\text{m}^3$  PM10 [87].

Ein Vergleich der chemischen Zusammensetzung der gesammelten Aerosolpartikel an unterschiedlichen Probenahmeorten zeigt, dass der Massenanteil von TC im Bereich von 10 (Zugspitze) bis 51 % (LKP) schwankte. Dies bedeutet, dass am alpinen Probenahmeort Zugspitze der Anteil an anorganischen Partikeln wesentlich höher war als in urbanen Gebieten (ausgeprägtere Vegetation und direkte Emissionen aus Verkehr, Industrie und Haushalt). Die hohen verkehrsbedingten Emissionen am LKP bedingten wiederum den höchsten prozentualen Anteil von elementarem Kohlenstoff am TC von ca. 2/3,

**Tabelle 4.4:** Mittelwerte  $\pm$  1s der Partikelmassenkonzentration (PM2.5; Berlin PM10 und Freiburg TSP), TC, EC und Protein sowie über wichtige Verhältnisse dieser Substanzklassen bei verschiedenen Messkampagnen.

Messkampagne und Zeitraum	Filter	Konzentration [ $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ]					Verhältnis [%]				
		PM	TC	EC	Protein	TC/PM	Protein/PM	EC/TC	PC/TC		
ZSP-1 09.08. - 19.12.2001	26	4.6 $\pm$ 2.4	0.7 $\pm$ 0.6	0.25 $\pm$ 0.23	0.15 $\pm$ 0.25	18 $\pm$ 10	3.7 $\pm$ 2.9	32 $\pm$ 11	10 $\pm$ 5		
ZSP-2 30.10. - 26.11.2002	9	2.4 $\pm$ 1.2	0.2 $\pm$ 0.1			9 $\pm$ 3					
HPB 16.05. - 21.09.2002	49	10.8 $\pm$ 4.5	2.1 $\pm$ 1.1	0.57 $\pm$ 0.34	0.44 $\pm$ 0.25	19 $\pm$ 6	4.0 $\pm$ 1.4	28 $\pm$ 9	11 $\pm$ 2		
IWC-1 12.04. - 19.04.2001	4	6.8 $\pm$ 2.3	3.1 $\pm$ 1.7	0.68 $\pm$ 0.39	0.18 $\pm$ 0.13	45 $\pm$ 25	2.6 $\pm$ 1.7	22 $\pm$ 26	3 $\pm$ 3		
IWC-2 26.07. - 04.08.2001	6	17.6 $\pm$ 5.6			1.16 $\pm$ 0.49		6.6 $\pm$ 3.2				
IWC-3 21.09. - 23.10.2002	11	12.1 $\pm$ 6.0	3.1 $\pm$ 1.3	1.34 $\pm$ 0.46	0.37 $\pm$ 0.11	26 $\pm$ 9	3.1 $\pm$ 1.0	43 $\pm$ 11	6 $\pm$ 2		
LKP 19.04. - 05.07.2001	37	22.4 $\pm$ 6.7	11.1 $\pm$ 2.9	7.30 $\pm$ 1.86	0.45 $\pm$ 0.32	50 $\pm$ 13	1.9 $\pm$ 1.3	65 $\pm$ 11	2 $\pm$ 1		
Berlin 15.10. - 29.11.2001	7	58.2 $\pm$ 17.7			0.45 $\pm$ 0.21		0.8 $\pm$ 0.2				
Freiburg 16.02. - 26.04.2001	15	35.6 $\pm$ 16.5			1.08 $\pm$ 0.69		3.0 $\pm$ 1.2				

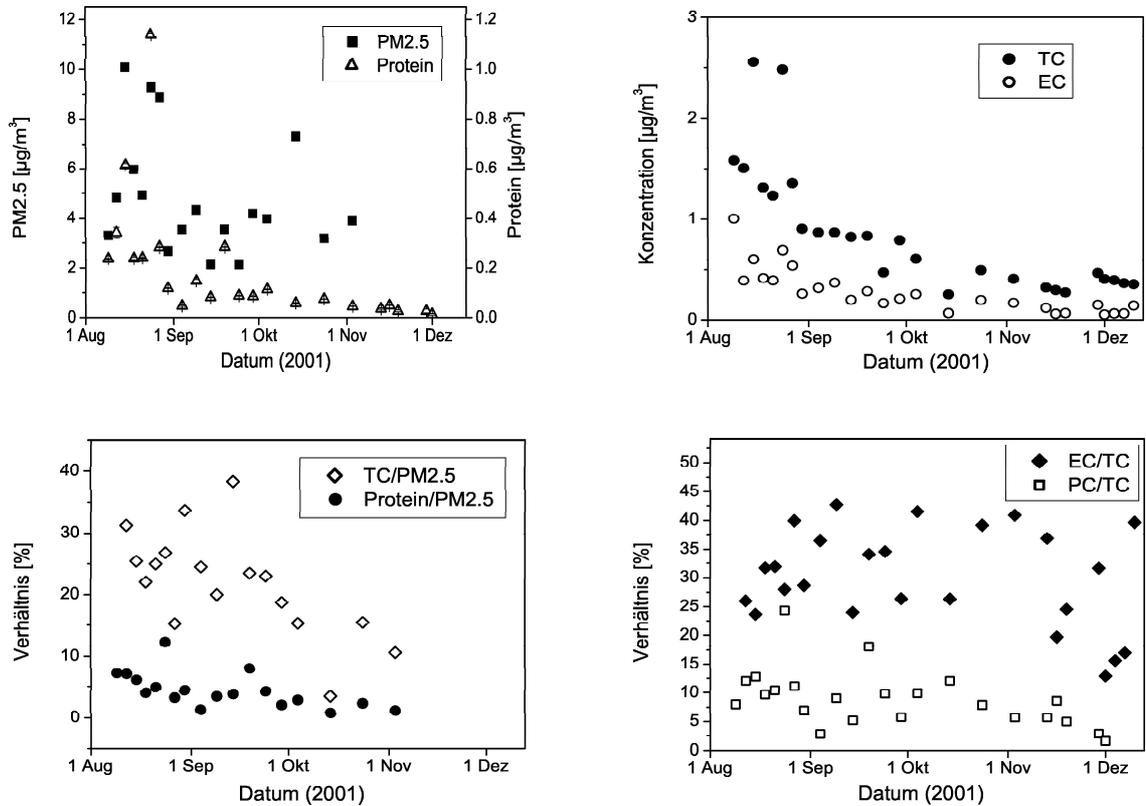


Abbildung 4.5:  $\text{PM}_{2.5}$ -, TC-, EC- und Proteinkonzentrationen und Verhältnisse für Filter vom Probenahmeort Zugspitze (2001).

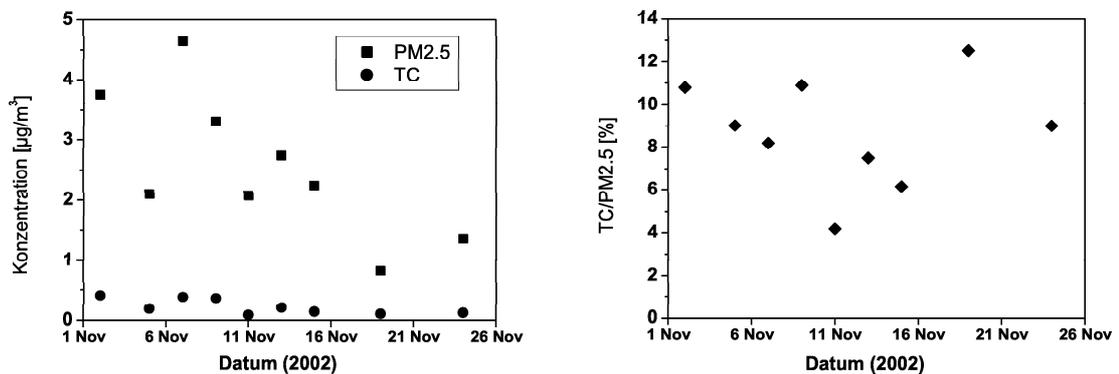


Abbildung 4.6:  $\text{PM}_{2.5}$ - und TC-Konzentrationen und Verhältnisse für Filter vom Probenahmeort Zugspitze (2002).

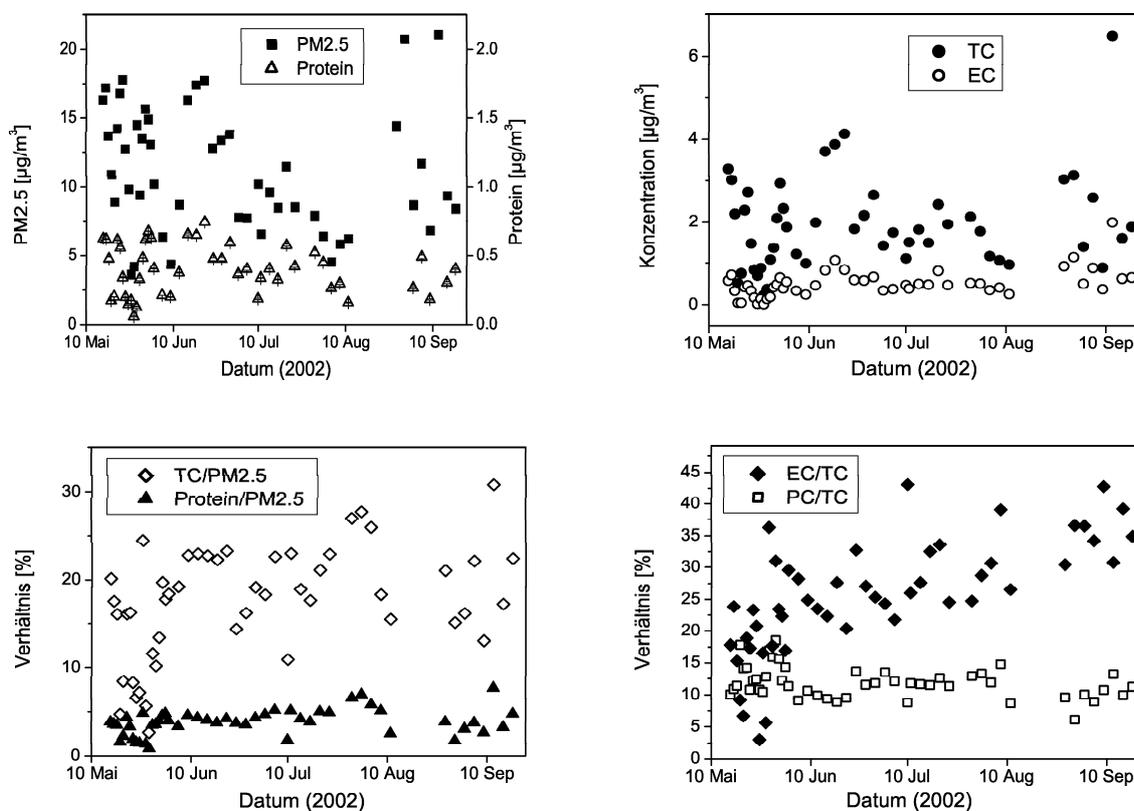


Abbildung 4.7:  $PM_{2.5}$ -, TC-, EC- und Proteinkonzentrationen und Verhältnisse für Filter vom Probenahmeort Hohenpeißenberg.

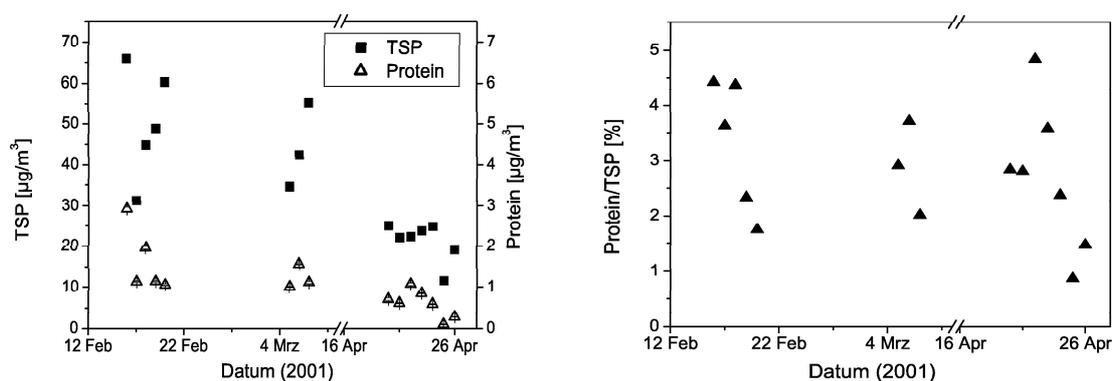


Abbildung 4.8: TSP- und Proteinkonzentrationen und relative Konzentration Protein/TSP für Filter vom Probenahmeort Freiburg 2001.

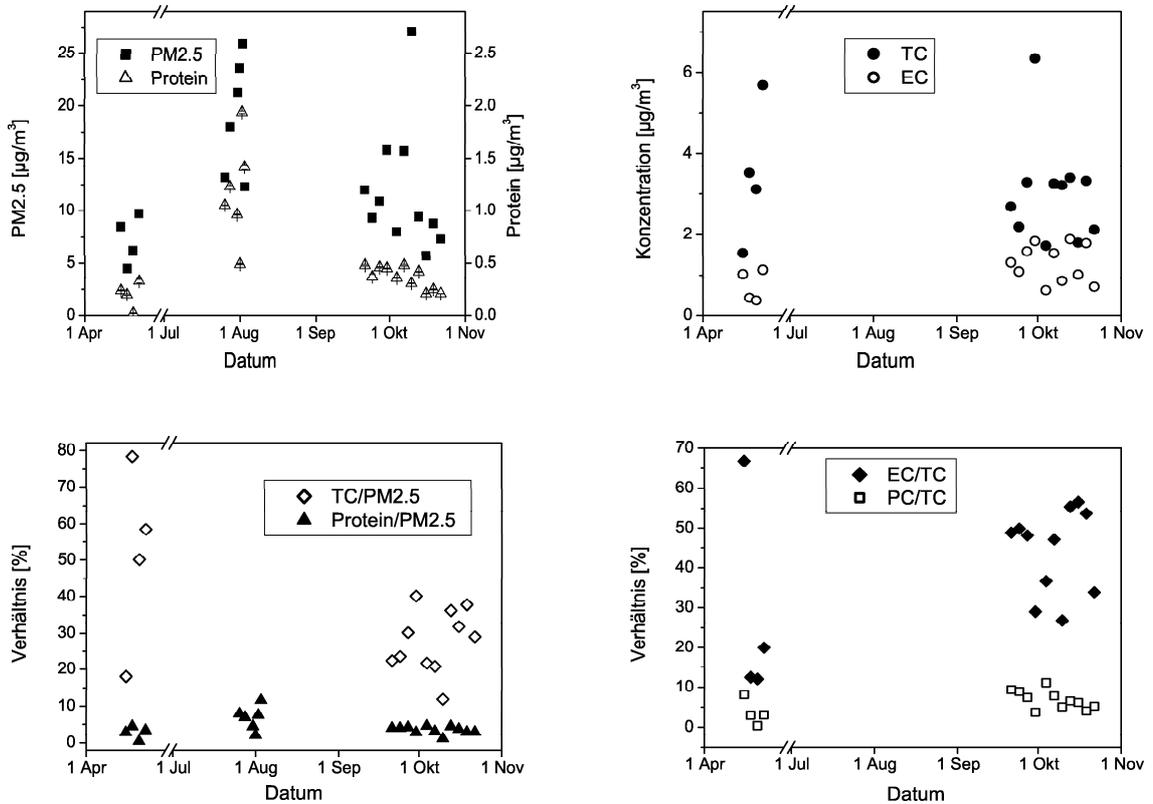


Abbildung 4.9:  $PM_{2.5}$ -, TC-, EC- und Proteinkonzentrationen und Verhältnisse für Filter vom Probenahmeort München-Großhadern; Probenahme 2001 (April und Juli/August) bzw. 2002 (September/Oktober).

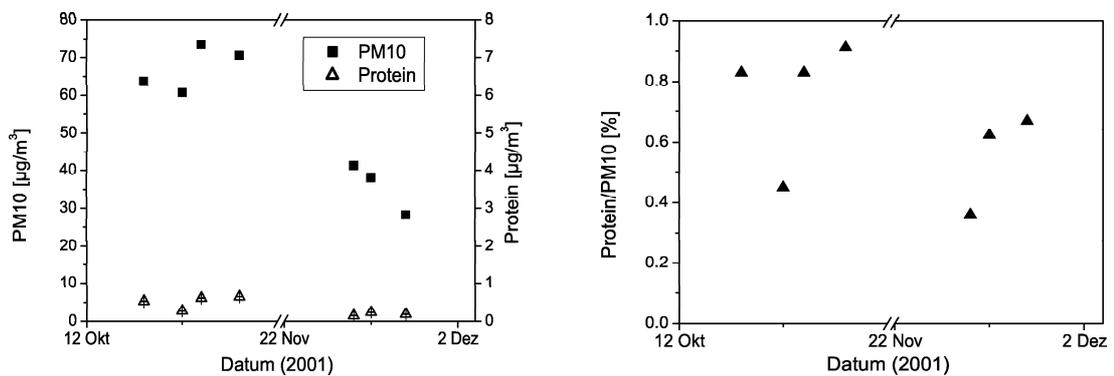


Abbildung 4.10:  $PM_{10}$ - und Proteinkonzentrationen und relative Konzentration Protein/ $PM_{10}$  für Filter vom Probenahmeort Berlin 2001.

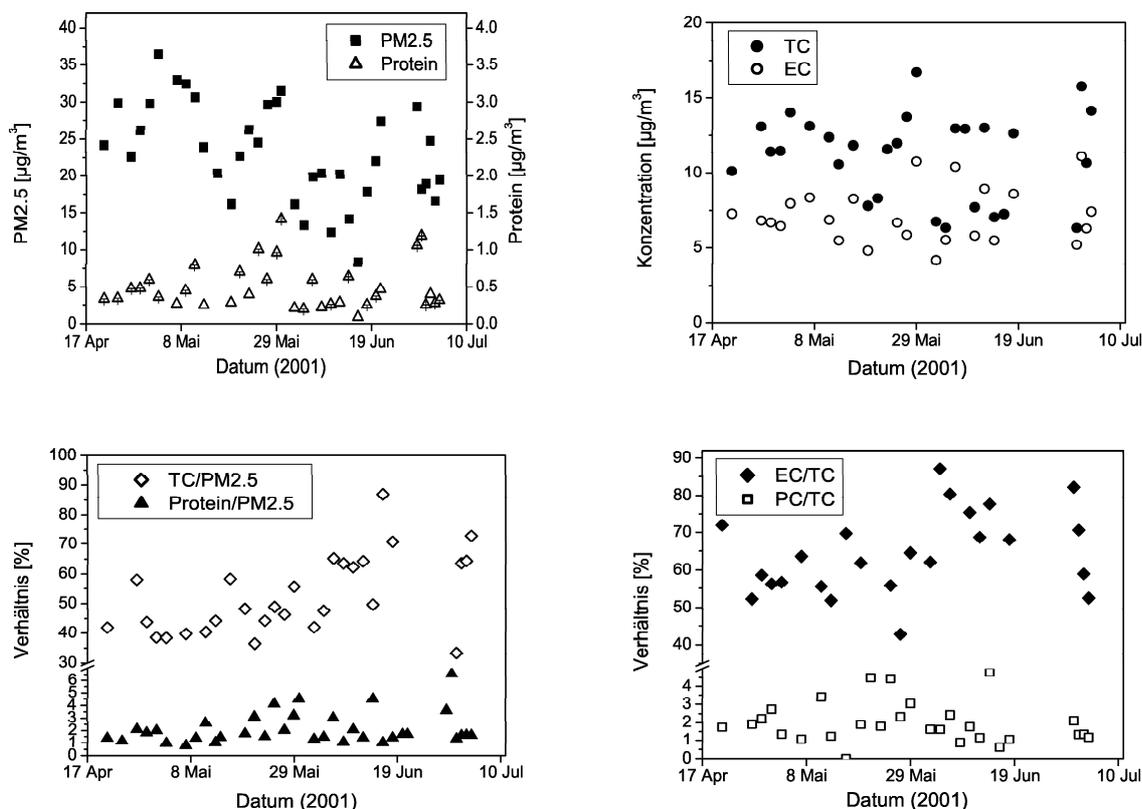


Abbildung 4.11:  $PM_{2.5}$ -, TC-, EC- und Proteinkonzentrationen und Verhältnisse für Filter vom Probenahmeort Luise-Kiesselbach-Platz, München.

bekanntermaßen hauptsächlich durch Dieselfahrzeuge verursacht [301]. Der Anteil des von Proteinen stammendem Kohlenstoff betrug am LKP mit 1.9% nur ein Fünftel des Anteils auf der Zugspitze bzw. am Hohenpeißenberg. Der Anteil von EC am Gesamtkohlenstoff an den Standorten Großhadern, Hohenpeißenberg und Zugspitze betrug in etwa 1/3. In Großhadern wurden z.B. im Mittel zwischen 24% (April) und 43% (September/Oktober) EC/TC bestimmt. Zu beachten ist jedoch bei der Betrachtung der EC-Werte, dass die angewandte Messmethode für den verkehrsnahen Bereich entwickelt und optimiert wurde. Es ist bekannt, dass z.B. optische Methoden zur EC-Bestimmung im verkehrsnahen Bereich gute Übereinstimmungen mit der angewandten Methode nach VDI-Norm 2465 ergeben, die Werte jedoch stärker voneinander abweichen, wenn diese Bedingung nicht mehr erfüllt ist [302].

Die Proteinmessungen ergaben die höchsten absoluten und prozentualen Proteinkonzentrationen in München-Großhadern in den Sommermonaten (Juli/August  $1.2 \mu\text{g}/\text{m}^3$  bzw. 6.6%  $PM_{2.5}$ -Massenanteil). Die geringsten prozentualen Konzentrationen wurden

am Standort nahe einer Stadtautobahn in Berlin im Herbst (Oktober/November) gemessen (0.8% PM10-Massenanteil). Die geringsten Absolutkonzentrationen an Protein wurden auf der Zugspitze bestimmt ( $0.15 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ), mit einer deutlich fallenden Tendenz der Einzelwerte von Sommer zu Winter (Abbildung 4.5). Die mittleren Proteinanteile an der Partikelmasse an den übrigen Standorten schwankten zwischen 2 und 4%.

Die detaillierten Werte für jeden einzelnen gemessenen Filter inklusive der Parameter Probenahmevolumen und Gesamtmasse abgeschiedener Partikel sind im Anhang in den Tabellen 9.5 bis 9.13 angegeben. Die Abbildungen 4.5 bis 4.11 zeigen atmosphärische Partikel-, Kohlenstoff- und Proteinkonzentrationen, sowie die Verhältnisse von Gesamtkohlenstoff und Protein zu Partikelmasse sowie die Anteile von elementarem und proteingebundenem Kohlenstoff am Gesamtkohlenstoff (EC/TC und PC/TC).

## 4.4 WSOC in atmosphärischen Aerosolproben

Wasserlöslicher organischer Kohlenstoff wurde für Filter der Messkampagnen ZSP-1, IWC-1 und LKP bestimmt. Die Messungen erfolgten mit dem DOC-Analysator der Fa. Maihak und dem Coulometer der Fa. Ströhlein. Die im Folgenden angegebenen Werte für WSOC und HM-WSOC sind Mittelwerte, die z.T. aus Doppelbestimmungen mit beiden Geräten stammen. Die Abweichungen verschiedener Extraktionen und Messungen lagen i.A. unter 20%, bei einzelnen Messungen traten auch bis zu 50% Abweichungen auf, da die WSOC-Analytik durch die ubiquitäre Verteilung von Kohlenstoffverbindungen sehr anfällig bezüglich Einschleppungen von organischen Verunreinigungen jeglicher Art ist.

Dem Extraktionsmedium Wasser wurde 20 mg/L Natriumazid zugesetzt, um mikrobielles Wachstum zu unterbinden. Die Kohlenstoffblindwerte des Reinstwassers mit und ohne Natriumazidzusatz unterschieden sich nicht signifikant. Typische Werte für belegte Filter lagen im Bereich von 1 - 7 mg WSOC/Filter bei einer Feinstaubbelegung der Filter mit 3 - 50 mg PM2.5.

Die WSOC-Konzentrationen waren erwartungsgemäß am niedrigsten im alpinen Bereich ( $0.8 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) und stiegen beim Übergang über den suburbanen Bereich (IWC-1;  $1.3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) zum städtischen Bereich bis auf  $2.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$  an. Im Gegensatz dazu fiel der WSOC-Anteil am Gesamtkohlenstoff von 66 (ZSP) über 41 (IWC) auf 18% (LKP). Dies bestätigte die zuvor gefundenen Ergebnisse, dass der TC-Gehalt im städtischen Bereich hauptsächlich von elementarem Kohlenstoff durch Emissionen von Dieselfahrzeugen bestimmt wird (65% EC/TC am LKP). Die gefundenen Ergebnisse sind in Tabelle 4.5 als Mittelwerte dargestellt und liegen in guter Übereinstimmung mit früher bestimmten Werten anderer Autoren von 20 - 70% WSOC/TC, abhängig vom Probe-

**Tabelle 4.5:** *Mittlere Konzentrationen ( $\pm 1s$ ) von TC, WSOC und HM-WSOC und wichtige Verhältnisse dieser Größen während der Messkampagnen ZSP-1, IWC-1 und LKP (Anzahl der untersuchten Filter in Klammern).*

Filter	Zeitraum	Konzentrationen [ $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ]			Verhältnisse [%]			
		TC	WSOC	HM-WSOC	WSOC	HM-WSOC		PC <sup>1</sup>
						TC	WSOC	
ZSP-1 (9)	15.08. - 19.09.2001	$1.3 \pm 0.7$	$0.8 \pm 0.6$	$0.33 \pm 0.48$	$66 \pm 21$	$39 \pm 21$	$48 \pm 18$	
IWC-1 (4)	12.04. - 19.04.2001	$3.1 \pm 1.7$	$1.3 \pm 0.7$	$0.35 \pm 0.16$	$41 \pm 13$	$27 \pm 15$	$27 \pm 21$	
LKP (21)	19.04. - 05.07.2001	$11.3 \pm 2.8$	$2.1 \pm 1.1$	$0.77 \pm 0.38$	$18 \pm 8$	$35 \pm 14$	$36 \pm 18$	

<sup>1</sup>proteingebundener Kohlenstoff

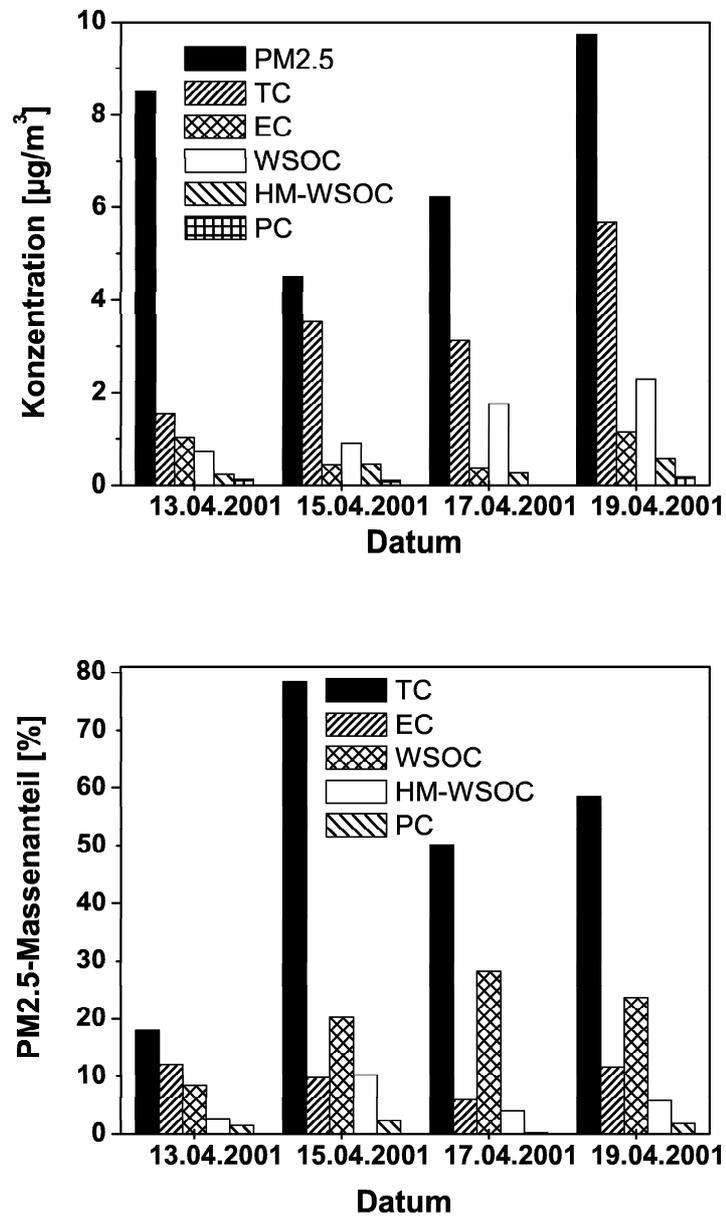


Abbildung 4.12: Konzentrationen und PM<sub>2.5</sub>-Massenanteile von TC, EC, WSOC, HM-WSOC und PC für Proben aus Großhadern (IWC-1).

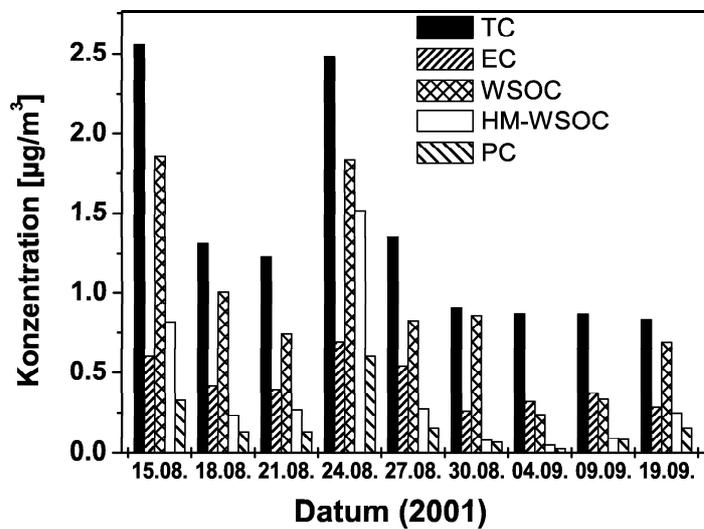


Abbildung 4.13: Konzentrationen von TC, EC, WSOC, HM-WSOC und PC für Proben vom Probenahmeort Zugspitze (2001).

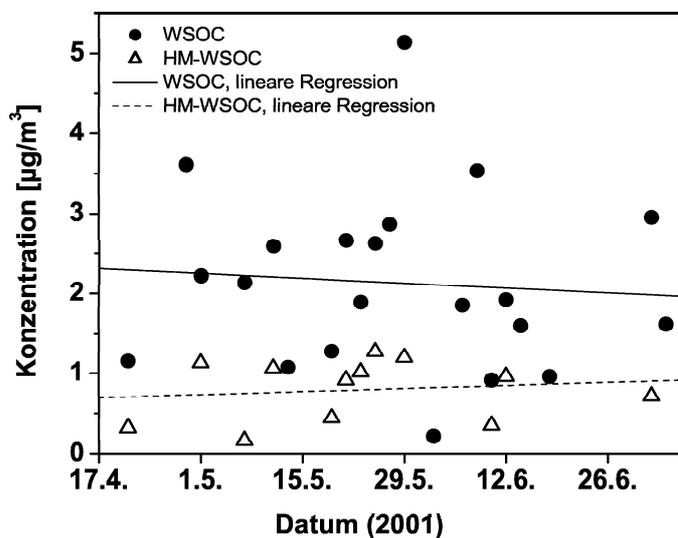


Abbildung 4.14: Konzentrationen von WSOC und HM-WSOC für Proben vom Probenahmeort LKP.

nahmeort [13, 16, 17]. Die Fehlerangaben in der Tabelle geben eine Standardabweichung der gefundenen Werte für die untersuchten Filter wieder. In die Mittelwerte einbezogen wurden nur Filter, für die in der Messkampagne auch alle relevanten Parameter gemessen wurden, die Werte sind daher Mittelwerte über die analysierten Filterproben, nicht unbedingt jedoch über den gesamten angegebenen Zeitraum. Alle Einzelergebnisse sind im Anhang in den Tabellen 9.5, 9.9, 9.12 und 9.13 detailliert wiedergegeben. Die Konzentrationen von hochmolekularem WSOC lagen im alpinen Bereich ähnlich hoch wie im suburbanen Bereich ( $0.3-0.4 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) und im städtischen Bereich etwa doppelt so hoch ( $0.8 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ). Der Anteil der hochmolekularen Komponenten ( $> 5 \text{ kDa}$ ) im WSOC war über alle drei Probenahmeorte relativ einheitlich bei 30-40%. Setzt man die Ergebnisse aus den Proteinmessungen mittels BCA-Assay in Relation zum hochmolekularen WSOC-Anteil, so erhält man Anteile des proteinogenen Kohlenstoffs PC am HM-WSOC von etwa 30-50% (IWC bzw. ZSP). Damit wären 50-70% des HM-WSOC anderen organischen Makromolekülen zuzuordnen (Cellulose, Lignin, HULIS, etc.).

Intensive Untersuchungen der Extraktionsmethode, wie z.B. Vergleich von Ultraschall-extraktion und Extraktion durch Rühren, ergaben keine signifikanten Unterschiede der beiden Methoden und lassen Gleichwertigkeit der Extraktionsmethoden vermuten. Besondere Bedeutung bei der WSOC-Bestimmung besitzt die Verwendung absolut sauberer Gefäße, die keinerlei organische Rückstände wie Detergenzien oder Staubpartikel enthalten dürfen. Decesari et al. haben dazu u.a. die Reinigung sämtlicher Glasgefäße mittels 30%iger Wasserstoffperoxidlösung vorgeschlagen [21]. Zudem dürfen keinerlei Gefäße aus Kunststoff bzw. Glasgefäße mit Kunststoffdeckel oder -stopfen verwendet werden. Schraubdeckel laborüblicher Glasfläschchen z.B. enthalten oft Dichtungen aus Butylkautschuk und könnten daher organische Verbindungen abgeben. Kunststoffschraubdeckel ohne Dichtungen schließen jedoch nicht gut genug, um eventuelle Verdunstung und Aufkonzentration der Lösungen zu verhindern. In der vorliegenden Arbeit wurde daher Aluminiumfolie als Verschluss benutzt, z.T. auch als Dichtungsersatz für verschraubte Deckel. Als Verschluss geeignet sind auch Schliffstopfen. Weiterhin können hohe Blindwerte verursacht werden durch Verunreinigungen des Reinstwassers, das routinemäßig nicht auf organische Verunreinigungen, sondern nur auf ionische Verunreinigungen über Messung der elektrischen Leitfähigkeit überprüft wurde. Mikrobielle Verunreinigungen können jedoch u.U. sehr plötzlich und unbemerkt auftreten. Die Erfahrung am IWC in der DOC-Analytik von Abwasserproben hatte auch gezeigt, dass z.B. die Absorption von organischen Lösungsmitteldämpfen aus der Luft von benachbarten Arbeitsplätzen eine Rolle spielen können [303].

## 4.5 Sulfatkonzentrationen in atmosphärischen Aerosolproben

Sulfat wurde in neun Filterproben vom Luise-Kiesselbach-Platz bestimmt. Der Mittelwert ( $\pm 1s$ ) der atmosphärischen Sulfatkonzentration lag bei  $4.9 \pm 1.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , der mittlere Anteil von Sulfat an  $\text{PM}_{2.5}$  bei  $19 \pm 3\%$  und der mittlere Anteil von Sulfat an der anorganischen Fraktion der Proben betrug  $40 \pm 15\%$ . In Abbildung 4.15 ist die Sulfatkonzentration von April-Juli 2001 am LKP und der Anteil von Sulfat am Feinstaub aufgetragen. Während der Messkampagne stiegen die absoluten und relativen Sulfatkonzentrationen stetig an und lagen Anfang Juli etwa doppelt so hoch wie Mitte April (Abbildung 4.15).

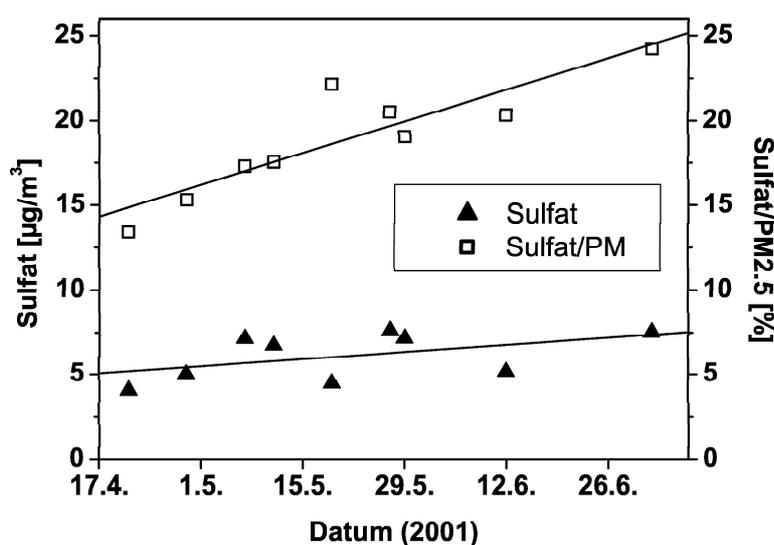


Abbildung 4.15: Konzentrationen von Sulfat und Anteil von Sulfat am Feinstaub  $\text{PM}_{2.5}$  am Probenahmeort LKP und Darstellung der linearen Fitkurven.

## 4.6 Proteingehalt von Straßenstaub

Unterschiedliche Größenfraktionen von Straßenstaub und Fensterstaubproben (Tabelle 3.2), wurden auf ihren Proteingehalt hin untersucht. Die Einzelergebnisse zeigt Ta-

**Tabelle 4.6:** Proteinkonzentrationen im Straßen- und Fensterstaub, bestimmt nach Extraktion mittels PBS-Puffer im BCA-Assay und Kalibrierung auf BSA. Angabe von Mittelwert der Dreifachmessungen  $\pm 1s$ .

Probe	Probenahmeort	Datum	Größenfraktion [ $\mu\text{m}$ ]	Proteingehalt [g/kg]
Balkonprobe	Stuttgart	13.06.2000 <sup>1</sup>	0 - 63	22 $\pm$ 0
Heig2	Heighofstr.	06/2001	Fensterstaub <sup>2</sup>	4.4 $\pm$ 0.1
K10	LKP	28.04.2000	5 - 32	2.8 $\pm$ 0.0
K10	LKP	28.04.2000	32 - 63	2.4 $\pm$ 0.0
K101	LKP	03.05.2001	63 - 125	1.7 $\pm$ 0.0
L2	Ligusterstr.	26.05.2000	0 - 63	1.8 $\pm$ 0.0
S8	Saalburgstr.	10.05.2000	5 - 32	1.2 $\pm$ 0.0
S8	Saalburgstr.	10.05.2000	0 - 63	2.0 $\pm$ 0.0
Toem1	Toemlingerstr.	09/2003	Fensterstaub <sup>2</sup>	1.8 $\pm$ 0.1
Toem2	Toemlingerstr.	09/2003	Fensterstaub <sup>2</sup>	2.1 $\pm$ 0.0
W10	Würmtalstr.	10.05.2000	15 - 32	0.9 $\pm$ 0.0
W10	Würmtalstr.	10.05.2000	0 - 63	1.4 $\pm$ 0.0
W10	Würmtalstr.	10.05.2000	63 - 125	1.5 $\pm$ 0.1
W101	Würmtalstr.	03.05.2001	63 - 125	1.4 $\pm$ 0.0
W12	Würmtalstr.	25.05.2000	0 - 63	0.1 $\pm$ 0.0
W14	Würmtalstr.	16.06.2000	0 - 63	0.1 $\pm$ 0.0

<sup>1</sup>Erhalt der Probe, genaues Datum der Probenahme unbekannt

<sup>2</sup>Keine Größenfraktionierung

belle 4.6. Die bestimmten BSA-Äquivalentkonzentrationen lagen für die meisten Proben im Bereich von 1 bis 4 mg/kg Protein/Staub. Proben, die z.B. im Frühling oder Sommer zur Blütezeit von Birken an Probenahmeorten mit starkem Birkenbestand gezogen wurden, lagen bis zu einer Größenordnung über diesen Werten (Probe aus Stuttgart). Im Vergleich zu den Filterproben mit abgeschiedenen atmosphärischen Aerosolpartikeln liegen die Proteinkonzentrationen jedoch um ca. eine Größenordnung niedriger. Ähnliche Ergebnisse hatten bereits Miguel et al. im Gebiet von Los Angeles/CA gefunden [32]. Vermutlich liegt dies am höheren Anteil von mineralischen Partikeln im Straßenstaub, die aufgrund der relativ hohen Dichte und ihrer Wasserunlöslichkeit weniger leicht mobilisiert werden und sich daher akkumulieren können.

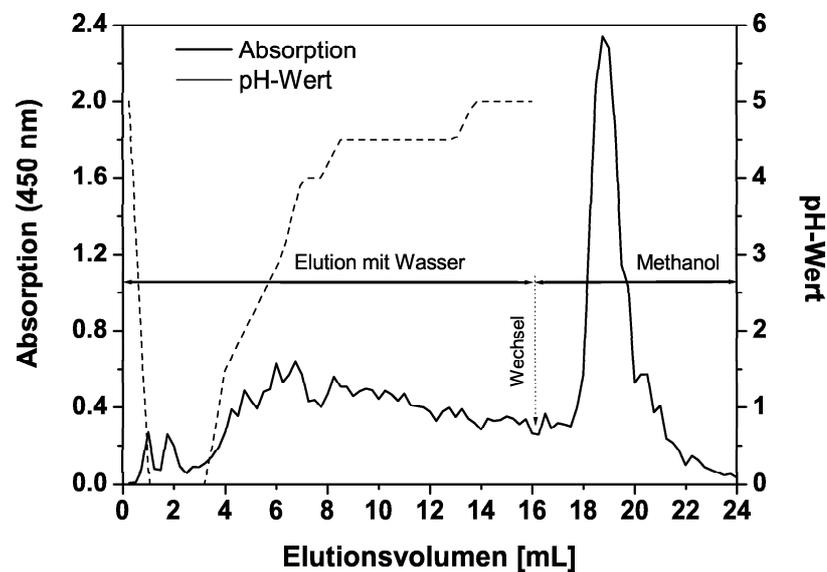
Die Proteingehalte von Straßenstaub wurden nur stichprobenartig untersucht und keine Zeitreihen wie bei den Filterproben untersucht. Insbesondere auch als Bezug zu den gefundenen Nitroproteinen (Abschnitt 6.6) sind diese Werte wichtig. Signifikante Unterschiede für verschiedene Größenfraktionen von bestimmten Proben des Straßenstaubs konnten nicht ausgemacht werden; die Proteinkonzentrationen in den unterschiedlichen Fraktionen verhielten sich ähnlich.

# 5 Aminosäuremessergebnisse

## 5.1 Anreicherungsverfahren für Nitrotyrosin

### 5.1.1 Polymerharze XAD-II und XAD-7

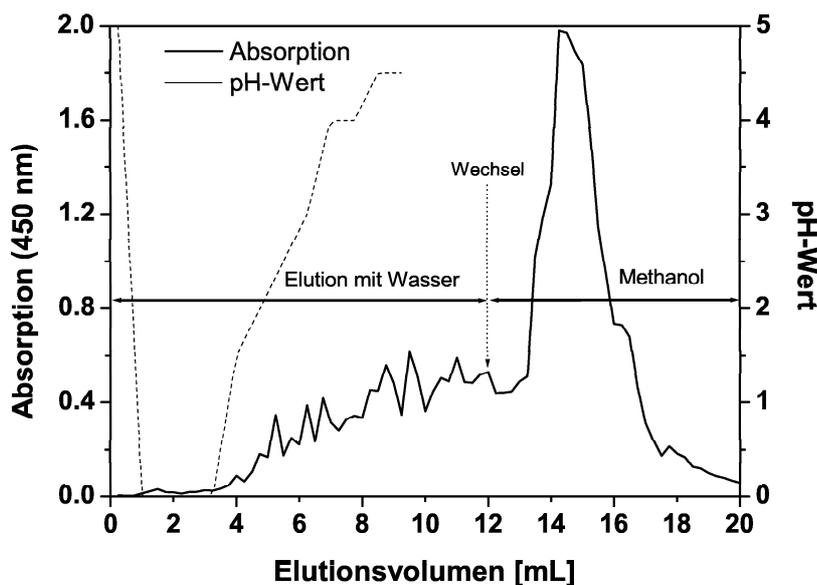
Mittels der beiden Polymerharze XAD-II (aromatisches Harz auf Divinylbenzolbasis) und XAD-7 (Polyacrylharz) wurde die Anreicherung von Nitrotyrosin anhand von Testlösungen untersucht. In Abbildung 5.1 ist der Verlauf eines Testexperiments an einer mit XAD-II gepackten Säule dargestellt.



**Abbildung 5.1:** *Selektive Anreicherung von Nitrotyrosin mittels XAD-II. Auftragen von 400  $\mu$ L Nitrotyrosinlösung (2.5 g/L in 6 N HCl), Elution mit 16 mL Wasser, dann Wechsel des Elutionsmittels auf 100 % Methanol. Messung der Lichtabsorption der Fraktionen bei 450 nm im Alkalischen.*

Als Probe wurden 400  $\mu\text{L}$  Nitrotyrosinlösung (2.5 g/L in 6 N HCl) aufgetragen und zunächst mit 16 mL Wasser eluiert. Nach dem Wechsel des Laufmittels auf 100 % Methanol eluierte Nitrotyrosin verzögert um das Totvolumen der Säule von 1.5 mL mit relativ scharfem Peak von 2.5 mL Breite. Im Diagramm ist sowohl der Verlauf der Lichtabsorption als auch der Verlauf des pH-Wertes der Fraktionen dargestellt.

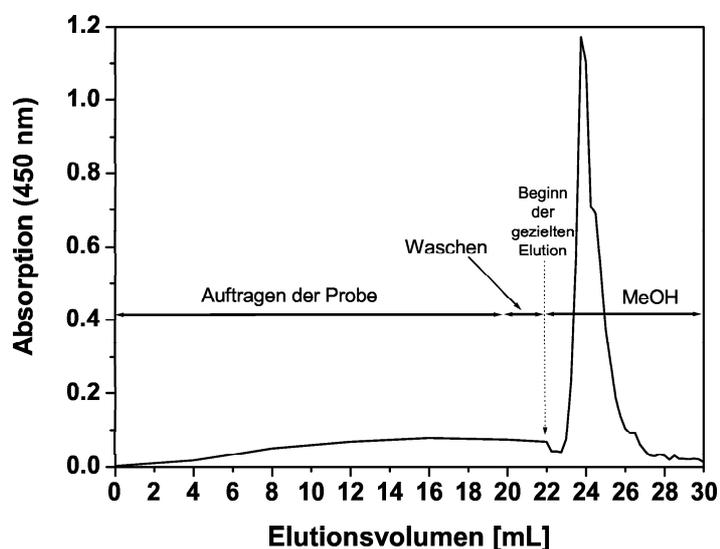
Abbildung 5.2 zeigt ein ähnliches Testexperiment mit XAD-7. Analog wurden 400  $\mu\text{L}$  Nitrotyrosinlösung (2.5 g/L in 6 N HCl) auf eine mit XAD-7 gepackte Säule aufgetragen und mit 12 mL Wasser eluiert. Deutlich erkennbar war der Anstieg der eluierten Nitrotyrosinmenge mit dem gleichzeitigen Anstieg des pH-Wertes. Die vor dem Wechsel zu Methanol bei 12 mL Elutionsvolumen eluierte Nitrotyrosinmenge war jedoch erheblich größer als bei XAD-II. Auch war der erhaltene Nitrotyrosinpeak mit 4 mL breiter als bei XAD-II. XAD-7 war damit weniger gut zur Abtrennung von Nitrotyrosin geeignet als XAD-II.



**Abbildung 5.2:** Anreicherung von Nitrotyrosin mittels XAD-7. Auftragen von 400  $\mu\text{L}$  Nitrotyrosinlösung (2.5 g/L in 6 N HCl), Elution mit 12 mL Wasser, dann Wechsel des Elutionsmittels auf 100 % Methanol. Messung der Lichtabsorption der Fraktionen bei 450 nm im Alkalischen. pH-Wert bestimmt mit pH-Indikatorstäbchen (pH 0 - 6).

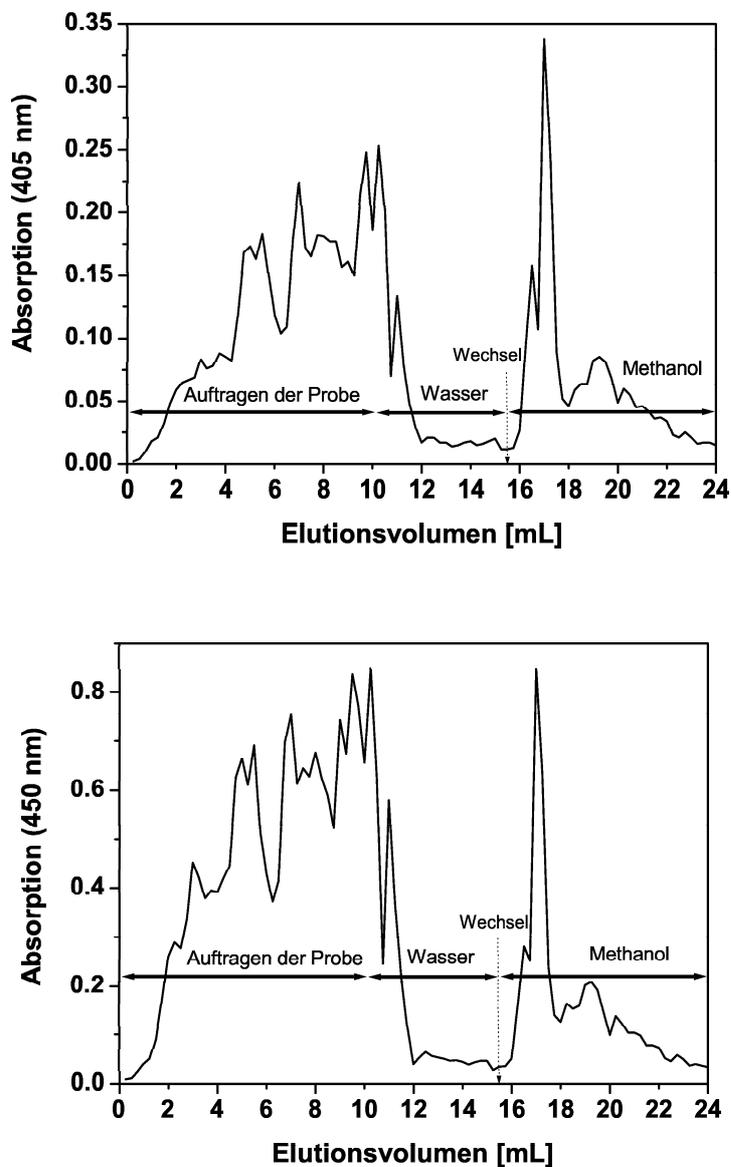
Die zu erwartenden Konzentrationen von Nitrotyrosin in Hydrolysaten von Umweltprouen sind relativ gering. Daher wurde untersucht, ob mit XAD-II auch die Anreiche-

Die Anreicherung von Nitrotyrosin aus großen Probenvolumina stark verdünnter Lösungen möglich ist. Auf eine mit XAD-II gepackte Säule wurden 20 mL einer verdünnten Lösung von Nitrotyrosin (25 mg/L) in 6 N HCl aufgetragen, mit 2 mL Wasser gewaschen und mit 100 % Methanol eluiert. Obwohl Nitrotyrosin-Verluste durch vorzeitige Elution auftraten, wurde ein scharfer Peak von Nitrotyrosin erhalten (Abbildung 5.3). Die Anreicherung von Nitrotyrosin in neutralem oder alkalischem Milieu mittels XAD-II war hingegen nicht möglich. Es erfolgte kaum Retardierung des Nitrotyrosins und die Substanz eluierte bereits unmittelbar nach Beginn des Auftragens der Probe.



**Abbildung 5.3:** *Selektive Anreicherung von Nitrotyrosin mittels XAD-II aus einer verdünnten Lösung. Auftragen von 20 mL Nitrotyrosinlösung (2.5 mg/L in 6 N HCl), Waschen mit 2 mL Wasser, dann Elution mit 100 % Methanol. Messung der Lichtabsorption der Fraktionen bei 450 nm im Alkalischen.*

Die optimierte Methode zur Anreicherung von Nitrotyrosin wurde auf enzymatisch hydrolysierte, mit Salzsäure angesäuerte Straßenstaubproben angewandt. Ein Säulenchromatogramm der Aufreinigung einer Straßenstaubprobe mit XAD-II zeigt Abbildung 5.4. Dabei ist sowohl die Messung der Fraktionen im Sauren bei 405 nm und im Alkalischen nach NaOH-Zugabe bei 450 nm dargestellt. Bei einem derartigen Wechsel von sauren zu alkalischen pH-Werten und zu höherer Messwellenlänge ist der molare Extinktionskoeffizient von Nitrotyrosin größer. Im gezeigten Beispiel steigt jedoch die Absorption der

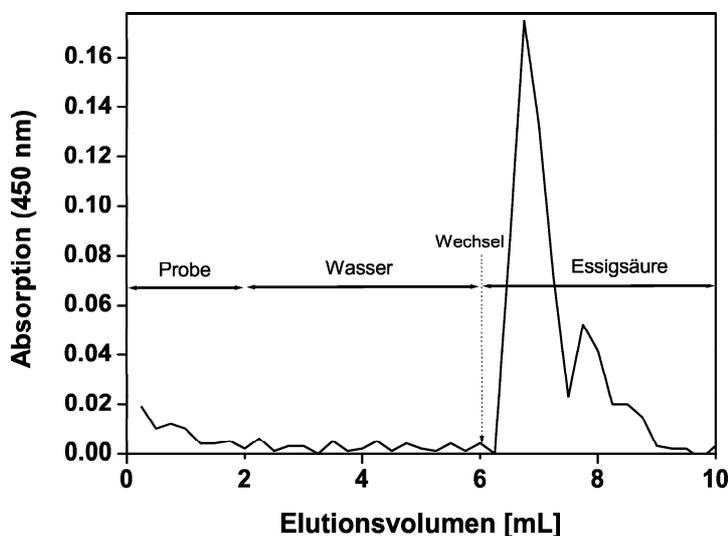


**Abbildung 5.4:** Anwendung der Anreicherungsverfahren mittels XAD-II auf eine enzymatisch hydrolysierte Straßenstaubprobe (S9, Saalburgstr. 25.05.00, 63-125 $\mu$ m). Aufragen von 10 mL angesäuertem enzymatischem Hydrolysat, Waschen mit 5.5 mL Wasser, dann Elution mit 100% Methanol. Messung der Lichtabsorption der Fraktionen bei 405 nm im Sauren (oben) und bei 450 nm im Alkalischen (unten).

früh eluierenden Substanzen stärker an als die Absorption der mit Methanol eluierenden Fraktion. Daraus wurde geschlossen, dass die methanolische Fraktion nicht hauptsächlich Nitrotyrosin oder andere nitrophenolische Verbindungen enthielt. Einige derartig gewonnene methanolische Fraktionen wurden mittels HPLC-UV/VIS auf Nitrotyrosin untersucht (Abschnitt 5.2).

### 5.1.2 Anionenaustauscherharz AG1-X8

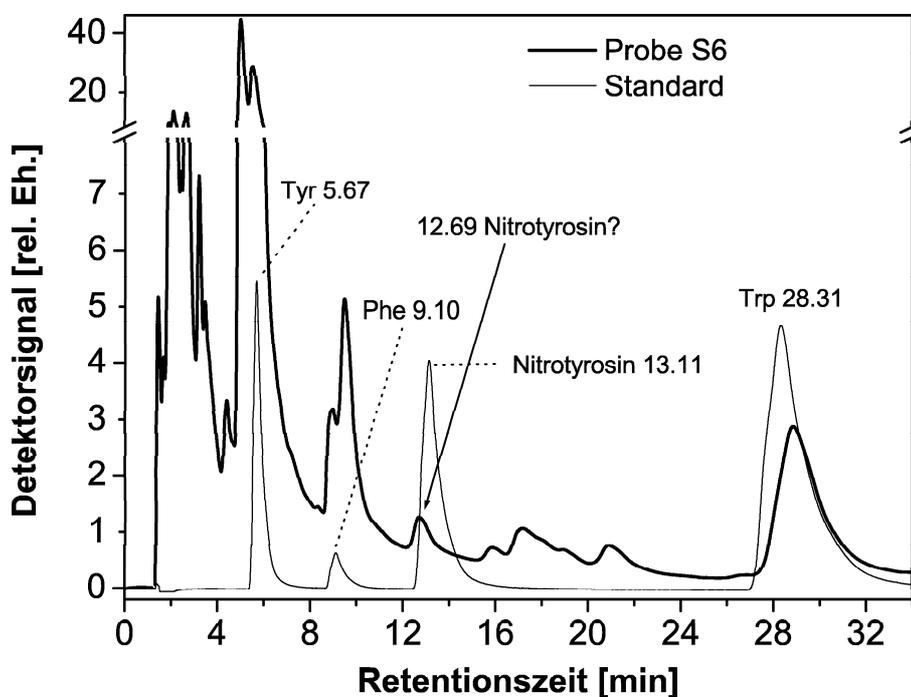
Anionenaustauscherharz AG1-X8 wurde in kleine Kunststoffsäulen von 2 mL Volumen gepackt. Mit diesen gepackten Säulen wurden Testexperimente durchgeführt. Abbildung 5.5 zeigt das Ergebnis eines solchen Experiments. 2 mL Nitrotyrosinlösung (20 mg/L in 50 mM Ammoniumcarbonat-Puffer) wurden auf das Harz (Acetat-Form) aufgetragen, mit 4 mL Wasser gewaschen und mit 4 mL 1 M Essigsäure eluiert. Die Messung der Fraktionen erfolgte im 8-Kanal-Photometer bei 450 nm im Alkalischen. Es wurden keine Nitrotyrosinverluste durch vorzeitige Elution beobachtet. Mit AG1-X8 erfolgte damit eine sehr saubere Anreicherung von Nitrotyrosin bereits im neutralen Milieu.



**Abbildung 5.5:** Anreicherung von Nitrotyrosin mittels AG1-X8 aus neutraler Lösung. Auftragen von 2 mL Nitrotyrosinlösung (20 mg/L in 50 mM  $\text{NH}_4\text{CO}_3$ -Puffer), Waschen mit 4 mL Wasser, Elution mit 4 mL 1 M Essigsäure. Messung der Lichtabsorption der Fraktionen bei 450 nm nach Zugabe von 40  $\mu\text{L}$  4 M NaOH.

## 5.2 Nitrotyrosinmessungen mittels HPLC-UV/VIS

Mittels HPLC-UV/VIS wurden die zur Trockene eingedampften und wieder in Wasser aufgenommenen methanolischen Fraktionen der über XAD-II-Harz aufgereinigten Proben (Tabelle 3.3) auf die Gegenwart von Nitrotyrosin untersucht. Abbildung 5.6 zeigt das Chromatogramm des enzymatischen Hydrolysats der Probe S6  $< 63 \mu\text{m}$  mit einem überlagerten Standardchromatogramm der Trennung von Tyrosin, Phenylalanin, Nitrotyrosin und Tryptophan mit je 25 mg/L. Bei 12.69 min eluierte ein Peak, der aufgrund der ähnlichen Retentionszeit auf Nitrotyrosin hinwies.



**Abbildung 5.6:** Chromatogramm der enzymatisch hydrolysierten Straßenstaubprobe S6 (Saalburgstraße, 28.04.00, Fraktion  $< 63 \mu\text{m}$ ) und eines Aminosäurestandards aus Nitrotyrosin, Phe, Trp und Tyr, je 25 mg/L, Säule Nucleosil 100-3C18, Laufmittel Wasser (+ 0.1 % TFA)/Methanol (90:10, v/v), isokratisch, Fluss der mobilen Phase 0.8 mL/min, Injektionsvolumen 20  $\mu\text{L}$ , Messung der UV-Absorption bei 220 nm.

Aus der Peakfläche des Peaks bei 12.69 min wurde eine potenzielle Nitrotyrosinkonzentration von 3.3 mg/l berechnet, entsprechend einem Nitrotyrosingehalt von 2 mg/kg im

Straßenstaub. Da jedoch mit der HPLC-UV/Vis-Methode keine eindeutige Identifizierung des Peaks möglich war, wurden weitere Untersuchungen mittels LC-APCI-TOF-MS durchgeführt.

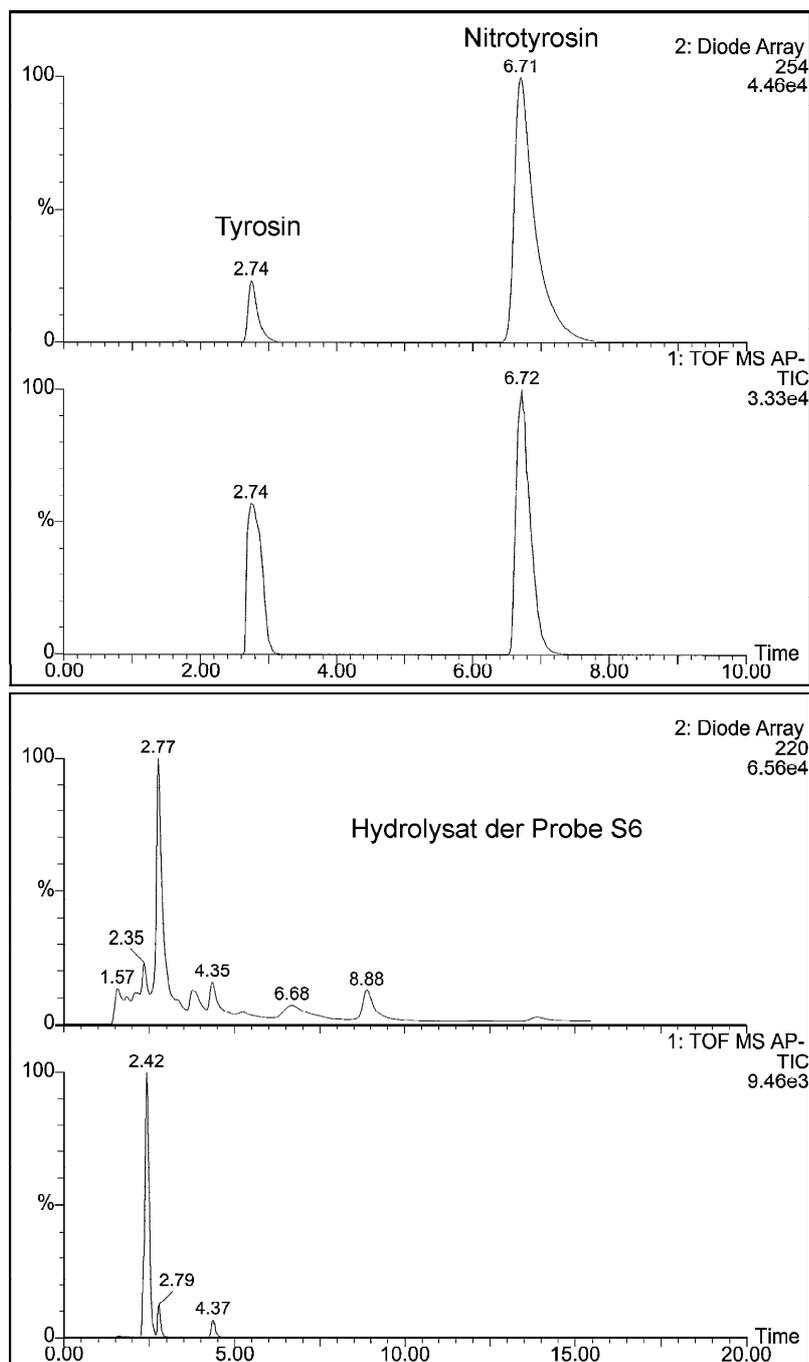
### 5.3 Tyrosin- und Nitrotyrosinanalytik mittels LC/MS

Bei Messungen mittels LC-APCI-TOF-MS wurde kein TFA zum Eluent zugesetzt, da TFA die Signalintensität im Massenspektrometer stark reduziert. Zudem ergab sich mit TFA ein dem Peak von Nitrotyrosin ( $m/z$  225) benachbarter und störender Peak hoher Intensität bei  $m/z$  227 des TFA-Dimers. Die Parameter des LC-APCI-TOF-MS wurden auf die maximale Intensität des Nitrotyrosinpeaks im Totalionenchromatogramm (TIC) optimiert.

**Tabelle 5.1:** Massenfragmente der enzymatisch hydrolysierten Straßenstaubprobe S6 (Fettdruck der intensivsten Signale).

Retentionszeit [min]	MS-Signal [m/z]	Substanz	M [g/mol]
1.83	<b>116</b> , 161, 179, 193		
2.41	<b>130</b>		
2.70	117, <b>180</b>	Tyr	181.19
3.5-3.6	113, <b>151</b>		
4.27	147, <b>164</b>	Phe	165.19
6.70	<b>167</b>		
8.71	155, 167, <b>203</b> , 248	Trp	204.23

Zunächst wurde eine Mischung von Tyrosin und Nitrotyrosin mit je 50 mg/l in Wasser gemessen. Abbildung 5.7 (oben) zeigt das zugehörige Chromatogramm mit UV-Detektion bei 254 nm und das Totalionenchromatogramm (TIC). Tyrosin eluierte nach 2.74 min und Nitrotyrosin nach 6.71 min. Beide Substanzen waren bei einer Konzentration von 5 mg/L noch gut mit UV-Detektion und auch im TIC zu detektieren. Bei Verdünnung auf 1 mg/L konnten jedoch im TIC weder für Tyrosin noch für Nitrotyrosin erhöhte Signale gemessen werden. Die Nachweisgrenze für beide Substanzen im



**Abbildung 5.7:** Trennung von Tyrosin und Nitrotyrosin, je 50 mg/l (oberes Diagramm) und der Probe S6 (unteres Diagramm). Säule Nucleosil 120-7C6H5, 10 % Methanol in Wasser (v/v) (isokratisch, 0.42 mL/min). Chromatogramm mit UV-Detektion bei 254 nm (Tyrosin/Nitrotyrosin) bzw. 220 nm (Probe S6) und darunter jeweils zugehörige Totalionenchromatogramme.

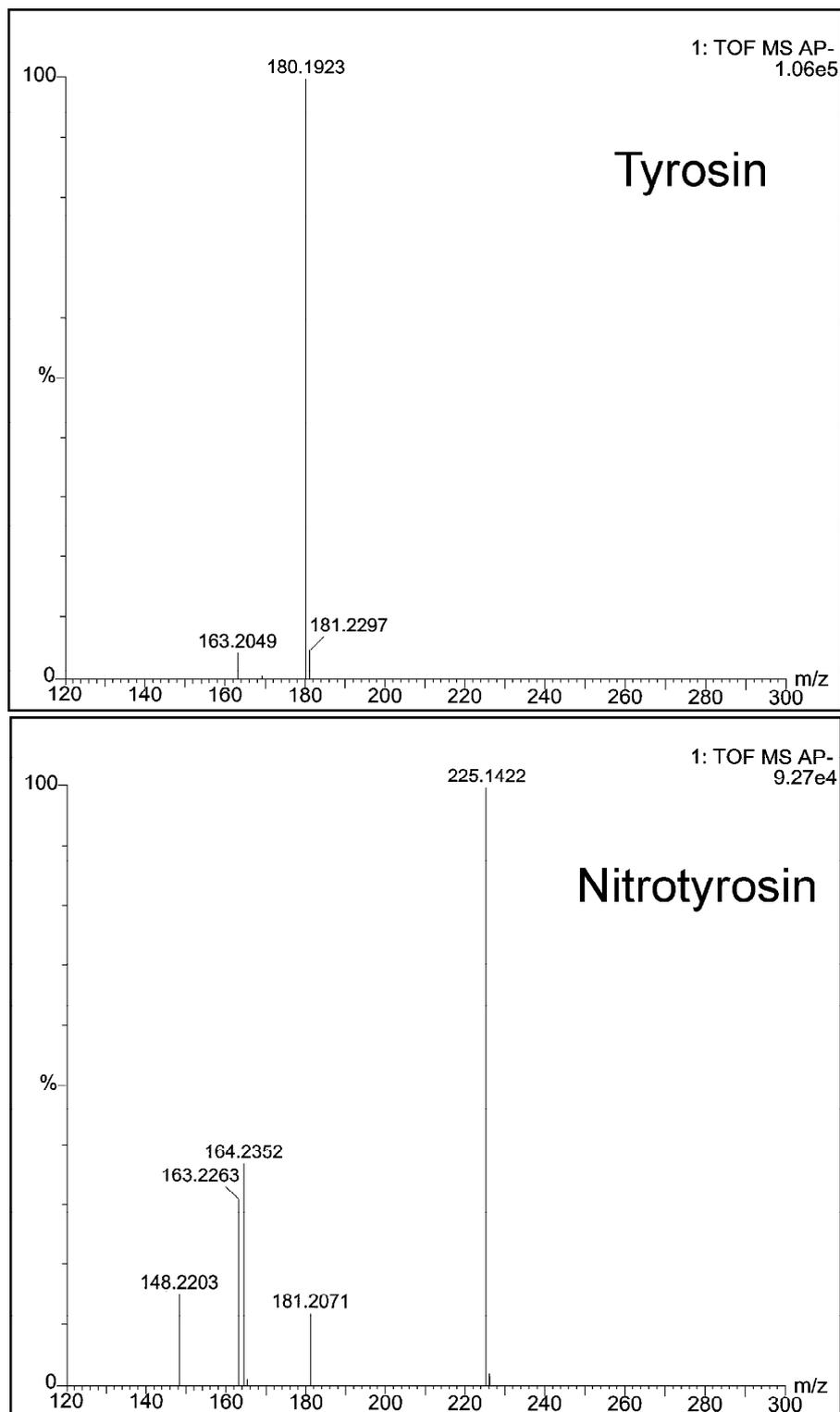


Abbildung 5.8: Fragmentierungsmuster von Tyrosin und Nitrotyrosin im APCI-TOF-MS, negativer APCI-Modus, Fragmentierungsspannung 30 V.

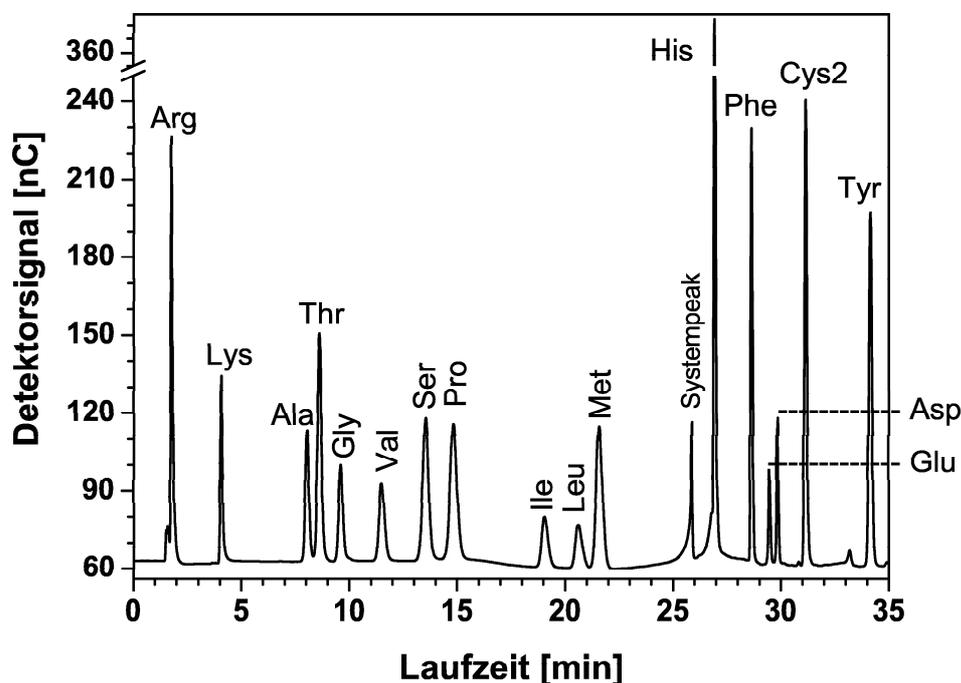
TIC lag damit zwischen 1 und 5 mg/L, also um zwei Größenordnungen höher als mit UV-Detektion bei 220 nm. In Abbildung 5.7 (unten) ist die HPLC-Trennung mit UV-Detektion bei 220 nm und das TIC des Hydrolysats der Probe S6 gezeigt. Bei 6.68 min ist ein Peak einer bei 220 nm absorbierenden Substanz zu erkennen. Dieser Peak könnte von Nitrotyrosin stammen, allerdings wurden keine entsprechenden Massenfragmente ( $m/z$  225, 181, 164, 163 oder 148) gefunden, sondern nur  $m/z$  167. Die in der Probe gefundenen Massenfragmente sind in Tabelle 5.1 mit den zugehörigen Retentionszeiten aufgelistet. Die Fragmentierungsmuster von Tyrosin und Nitrotyrosin (Standards) sind in Abbildung 5.8 gezeigt.

## 5.4 Aminosäuremessungen mittels HPAEC-PAD

Das verwendete *BioLC*- bzw. *AAA-Direct*-System (Amino Acid Analysis) der Firma Dionex wurde speziell zur Trennung und Quantifizierung natürlicher Aminosäuren, Aminozucker und Kohlenhydrate entwickelt. Es wurde in der vorliegenden Arbeit nach Kalibrierung und Charakterisierung zur Messung einiger alkalischer, saurer und enzymatischer Hydrolysate von BSA und Straßenstaub eingesetzt. Die Einführung der Methode war mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden. Im Einzelnen lag dies an über Nacht auftretenden, stark erhöhten Hintergrundsignalen, persistenten Pulsationen und Druckschwankungen, wechselnder Qualität des eingesetzten Natriumacetats, sich rasant verschlechternder chromatographischer Auflösung der Säulen, sich verringernder Signalintensität bei Analyse von Standards und im Blanklauf auftretenden, nur allmählich verschwindenden Memory-Peaks aus vorherigen Standardläufen. Das System wurde nach intensiven Bemühungen auch der Firma Dionex mittels Multiaminosäurestandard kalibriert und einige Protein- und Probenhydrolysate injiziert. Auch die Trennung von Nitrotyrosin von den Standardamino­säuren wurde optimiert und eine Methode zur Bestimmung von Nitrotyrosin entwickelt.

### 5.4.1 Ergebnisse der Analyse von Standardamino­säuren

Das *BioLC*-System wurde mit einem Multiaminosäurestandard mit 17 Aminosäuren kalibriert. Abbildung 5.9 zeigt ein Chromatogramm der Trennung der Aminosäuren unter idealen Bedingungen mit fabrikneuer Vor- und Trennsäule. Alle Aminosäuren sind basisliniengetrennt. Die Retentionszeiten und Nachweisgrenzen sind in Tabelle 5.2 aufgelistet.



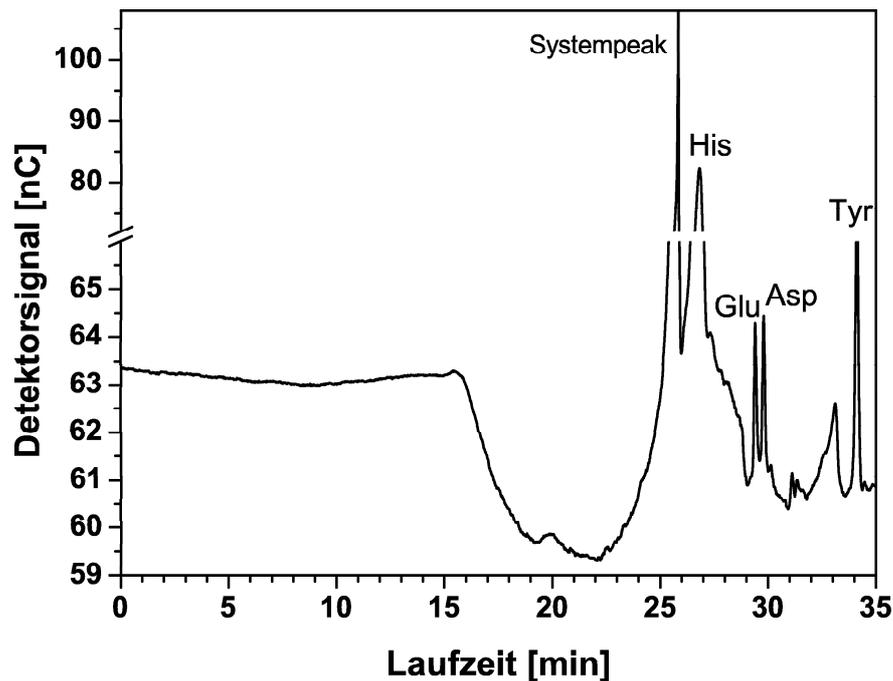
**Abbildung 5.9:** Chromatogramm der Trennung eines 17-Aminosäurestandards der Konzentration  $8\ \mu\text{mol/L}$  mittels HPAEC-PAD und NaOH/NaAc-Gradientenelution für Standardamino­säuren.

Bei  $RT = 25.88\ \text{min}$  erscheint ein Systempeak im Chromatogramm, der von  $\text{OH}^-$ -Ionen, verursacht wird, die aufgrund des ansteigenden Natriumacetat-Gradienten eluieren. Die Elutionsreihenfolge wird u.a. stark durch die  $pK_s$ -Werte der Aminosäuren beeinflusst (Tabelle 5.2). Die basischen Aminosäuren Arginin und Lysin eluieren bereits unter den schwachen Ausgangsbedingungen nach 2 bzw. 4 min. Dann folgen aliphatische und polare Aminosäuren. Aromatische (Phe, Tyr) und saure Aminosäuren (Asp, Glu) eluieren spät im Chromatogramm unter den schärferen Elutionsbedingungen mit Natriumacetat als Elutionsmittel. Die mit der  $3s_B$ -Methode ermittelten Nachweisgrenzen liegen im Bereich von  $1\text{--}20\ \mu\text{g/L}$  bzw.  $10\text{--}150\ \text{nmol/L}$  und sind damit im Mittel etwa um eine Größenordnung niedriger als die mit OPA-Vorsäulenderivatisierung und HPLC-Fluoreszenz erreichten Nachweisgrenzen (Tabelle 5.2 bzw. 5.3). Histidin besitzt durch den hohen Response-Faktor die niedrigste Nachweisgrenze von  $1\ \mu\text{g/L}$ . Aminosäuren wie z.B. Glutamat können durch die geringe Empfindlichkeit des elektrochemischen Detektors nur mit höheren Nachweisgrenzen bestimmt werden. Bei Arginin, das unmit-

**Tabelle 5.2:** Retentionszeiten, Nachweisgrenzen ( $3s_B$ -Methode), isoelektrische Punkte und  $pK_s$ -Werte [304, 305] der untersuchten 17 Standardamino-säuren (Strukturformeln siehe Abbildung 2.2).

Aminosäure	Code	RT	Nachweisgrenzen		IEP	$pK_1$	$pK_2$	$pK_3$	$pK_4$
		[min]	$[\mu\text{g/L}]$	$[\text{nmol/L}]$					
Arginin	Arg	1.74	23.5	135	10.76	2.01	9.04	12.48	
Lysin	Lys	4.06	5.5	38	9.47	2.18	8.95	10.53	
Alanin	Ala	8.03	12.9	145	6.11	2.35	9.87		
Threonin	Thr	8.61	2.0	17	5.60	2.09	9.10		
Glycin	Gly	9.60	6.9	92	6.06	2.35	9.78		
Valin	Val	11.49	5.6	48	6.02	2.29	9.74		
Serin	Ser	13.53	4.3	41	5.70	2.19	9.21		
Prolin	Pro	14.82	5.9	51	6.30	2.00	10.60		
Isoleucin	Ile	19.03	3.7	28	6.04	2.32	9.76		
Leucin	Leu	20.60	3.3	25	6.04	2.33	9.74		
Methionin	Met	21.57	6.4	43	5.71	2.13	9.28		
Histidin	His	26.92	1.1	7	7.64	1.77	6.10	9.18	
Phenylalanin	Phe	28.63	7.2	44	5.76	2.20	9.31		
Glutamat	Glu	29.47	18.2	124	3.08	2.10	4.07	9.47	
Aspartat	Asp	29.84	6.4	48	2.98	2.10	3.86	9.82	
Cystin	Cys2	31.15	4.9	21	5.02	1.04	2.05	8.00	10.25
Tyrosin	Tyr	34.15	5.8	32	5.63	2.20	9.11	10.07	

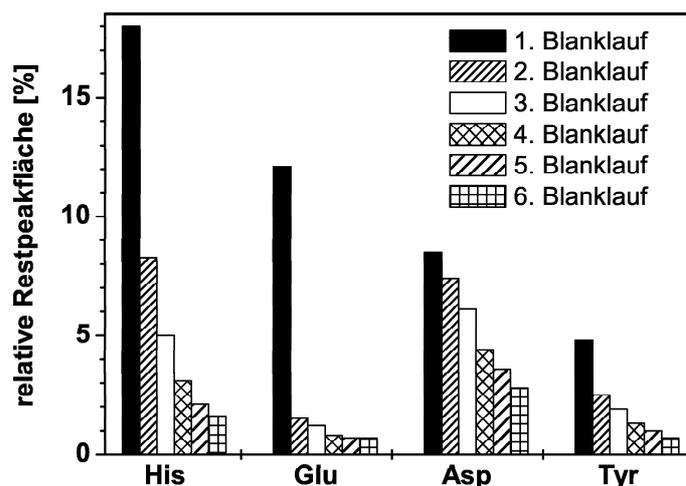
telbar nach der Totzeit des Systems eluiert, resultiert die erhöhte Nachweisgrenze aus den häufiger auftretenden Überlappungen mit einem unregelmäßigen Dip aus dem Injektionsvorgang. Eine allmähliche Belegung der Säule hatte besonders Einfluss auf die jeweils nahe beieinander liegenden Peaks Alanin/Threonin, Serin/Prolin, Leucin/Methionin und Glutamat/Aspartat und war dort am frühesten anhand der verschlechterten chromatographischen Auflösung zu erkennen.



**Abbildung 5.10:** *Chromatogramm des Blanklaufes unmittelbar nach Injektion des 17-Aminosäurestandards aus Abbildung 5.9.*

Bei der Kalibrierung des Systems mit dem Multiaminosäurestandard und Konzentrationen bis  $8 \mu\text{mol/L}$  fielen bei darauffolgenden Blankläufen Restpeaks mit exakt der gleichen Retentionszeit wie im Standardchromatogramm auf. Um Störungen durch evtl. auf der Säule haftende Verunreinigungen auszuschließen, wurde diese Beobachtung in einer Sequenz mit fabrikneuen Säulen überprüft. Der Effekt trat speziell bei den vier spät eluierenden Aminosäuren Histidin, Glutamat, Aspartat und Tyrosin auf. In Abbildung 5.10 ist der Blanklauf gezeigt, der auf den Standardlauf aus Abbildung 5.9 folgte. Dabei wurde keine Injektion vorgenommen, sondern nur das Gradientenprogramm ablaufen gelassen. Das Injektionsventil wurde dabei nicht betätigt. Verschleppungen aus

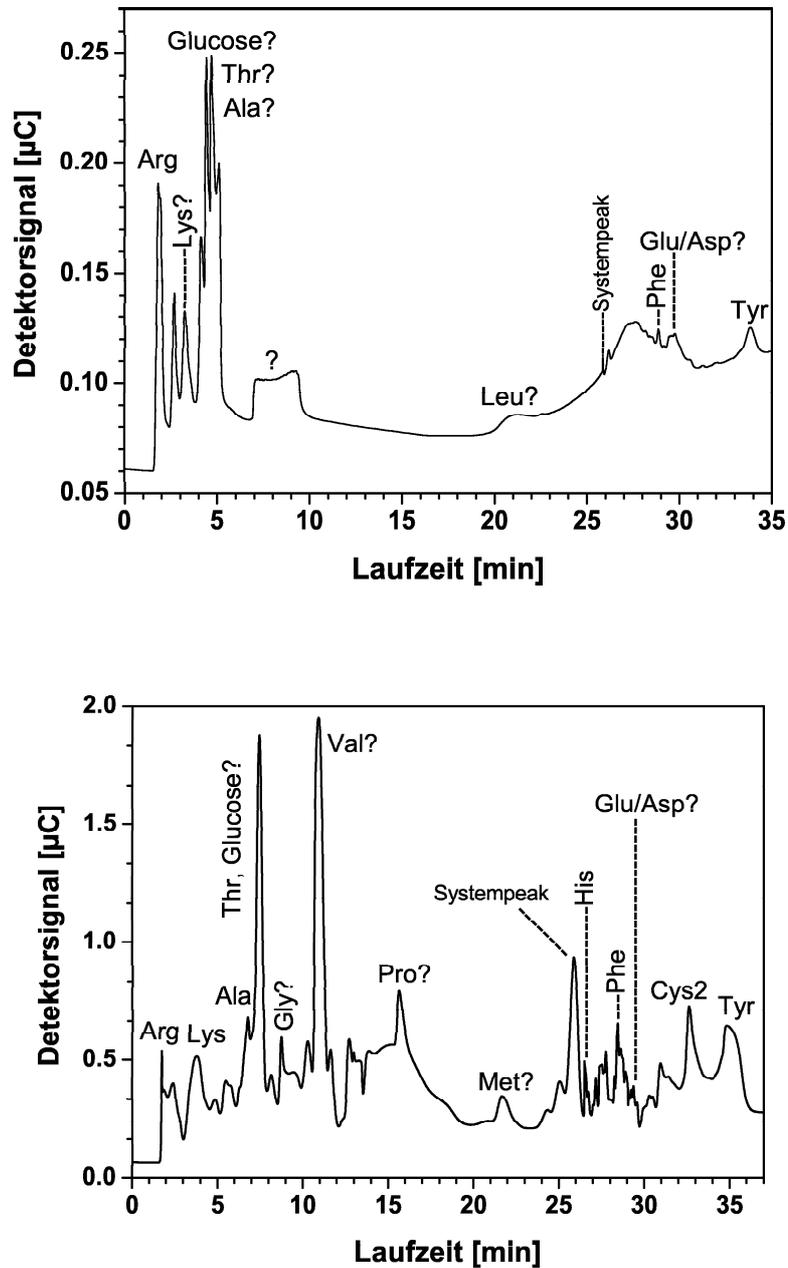
einer unsauberen Spritze, durch verbliebene Reste der Standardlösung vom Septum eines Gläschens o.ä. waren daher unwahrscheinlich. Deutlich waren die Memory-Peaks zu erkennen. Der auftretende Peak bei Histidin hatte eine Fläche von 18 % des ursprünglichen 8  $\mu$ M Standards und würde damit noch immer einer Konzentration von 1.5  $\mu$ mol/L entsprechen.



**Abbildung 5.11:** Grafische Darstellung der relativen Restpeakflächen, die nach Injektion eines 17-Aminosäurestandards mit 8  $\mu$ mol/L in sechs aufeinanderfolgenden Blankläufen auftraten.

Die exakte Kalibrierung des Systems für die jeweiligen Aminosäuren war durch derartige Restpeaks erheblich erschwert. Eine zusätzliche Untersuchung von fünf weiteren Blankläufen ergab das in Abbildung 5.11 dargestellte Ergebnis. Die Peaks gingen sukzessive zurück. Allerdings waren auch nach dem sechsten Blanklauf (Zeitbedarf für diese Blankläufe insgesamt: 6.5 Stunden) zwischen 1 und 3% der ursprünglichen Substanzmenge vorhanden. In der Praxis erscheint es jedoch nicht besonders vorteilhaft, nach einem Standardchromatogramm mehr als sechs Stunden Gerätezeit auf die Reinigung des Systems zu verwenden, insbesondere da die Proben rasch durch Mikroorganismen verändert und deshalb nicht lange gelagert werden können.

Die Anwendung der Methode zur quantitativen Analyse von Aminosäuren in Umweltproben mit hohen Konzentrationen an unbekannter Matrix erscheint unter diesen Bedingungen schwierig, da mit Verstärkung dieser Effekte gerechnet werden muss. Abbildung 5.12 zeigt zwei Beispiele von hydrolysiertem BSA. Im oberen Chromatogramm ist das Analysenergebnis einer sauer hydrolysierten BSA-Probe (8 mg BSA mit 6 mL



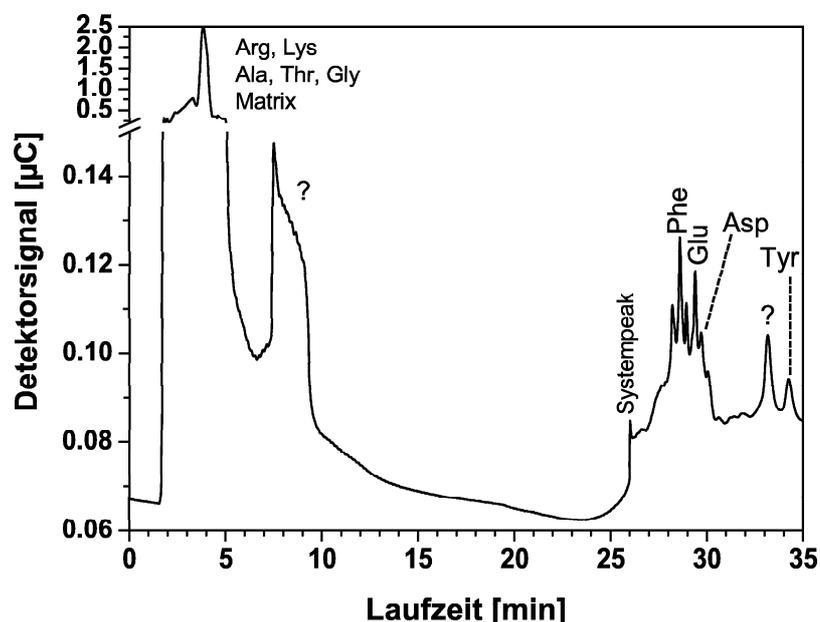
**Abbildung 5.12:** Chromatogramme von sauer (oben) und enzymatisch hydrolysiertem BSA (unten). Hydrolyse von 8 mg BSA mit 6 mL 6 N HCl (Mikrowellenaufschluss, 15 min, 140°C) bzw. 20 mg BSA mit 1 mg Pronase E (24 h, 37°C); Verdünnungen entsprechen 0.32 (sauer) und 6.7 mg/mL BSA (enzymatisch). Gradientenelution für Standardamino-säuren und Detektion mittels IPAD.

6 N HCl, anschließend Teilneutralisation mit 7.7 mL NaOH) gezeigt. Es sind nur wenige Peaks zu identifizieren, einige Aminosäuren sind überhaupt nicht zu finden. Speziell im vorderen Bereich des Chromatogramms bis 5 min erschien eine Vielzahl von Peaks, die nicht zuordenbar sind. Im späteren Teil des Chromatogramms können Phe, Glu/Asp und Tyr identifiziert werden. Eine quantitative Auswertung ist jedoch aufgrund der schwankenden Basislinie schwierig.

Die Peakverschiebung hin zu früheren Retentionszeiten im vorderen Bereich des Gradienten könnte u.a. mit allmählicher Belegung der Säulen durch die vorherige Injektion von Realproben mit hoher Konzentration an Matrixbestandteilen zusammenhängen. Die enorme Salzfracht an Natriumchlorid aus der Neutralisation der Salzsäure (Endkonzentration in injizierter Probe ca. 1.4 mol/L) trug ebenfalls zu einer Verschiebung der Peaks zu früheren Retentionszeiten bei. Bei späteren Proben, die mit HPLC-FD analysiert wurden, wurde deshalb die Salzsäure durch Abdampfen im Stickstoffstrom entfernt.

Bei der enzymatisch hydrolysierten BSA-Probe (Abbildung 5.12 unten) zeigte das Chromatogramm bereits größere Ähnlichkeit mit dem Standardchromatogramm. Arg, Lys, Ala, Thr, Gly, Val, Pro, Met, His, Phe, Glu/Asp, Cys2 und Tyr konnten zugeordnet werden. Es waren jedoch darüber hinaus noch eine Vielzahl weiterer Peaks vorhanden, die z.B. von phosphorylierten Aminosäuren, Aminozuckern, Monosacchariden o.ä. stammen könnten. Die Einschleppung derartiger Substanzen durch das Enzymgemisch und die variierende Autohydrolyse der Proteasen stellt ein schwer zu kontrollierendes Problem der quantitativen Analyse von Aminosäuren nach enzymatischer Hydrolyse dar.

In Abbildung 5.13 ist ein Chromatogramm der sauer hydrolysierten Straßenstaubprobe K13 dargestellt. Besonders auffällig sind die beiden breiten, nicht aufgelösten Signalberge mit sehr hoher Intensität von 1.5-6.5 min und 7-9 min. Verborgен unter diesen beiden Flächen liegen vermutlich sämtliche Peaks der mit Natronlauge eluierenden Aminosäuren. Im späteren Abschnitt des Chromatogramms können dann einzelne Aminosäuren wie Phe, Glu, Asp und Tyr identifiziert werden. Die Intensität dieser Peaks liegt in etwa um drei Größenordnungen unter der Intensität des breiten Signals zu Beginn des Chromatogramms. Die Ursachen für die extrem verschlechterte chromatographische Auflösung und die Verschiebung der Peaks zu geringeren Retentionszeiten sind vermutlich wie bei der Analyse von BSA-Hydrolysaten in allmählicher Säulenbelegung und der hohen Salzfracht zu suchen. Zum Natriumchlorid aus der Neutralisation der Salzsäure kommen bei den Straßenstaubproben auch alle anderen salzsäurelöslichen Salze der Probe aus z.B. mineralischen Bestandteilen hinzu.

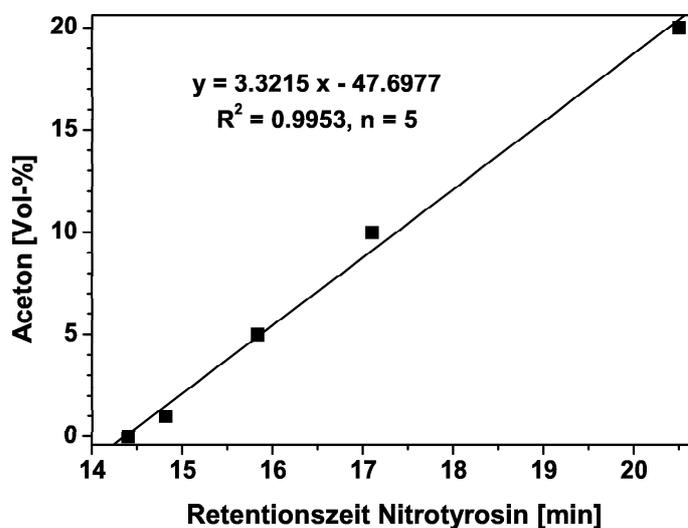


**Abbildung 5.13:** Chromatogramm der sauer hydrolysierten Straßenstaubprobe K13. Mikrowellenaufschluss ( $140^{\circ}\text{C}$ , 15 min) von 408 mg Staub (LKP, Fraktion  $< 63\ \mu\text{m}$ , 15.05.00, ) mit 6 mL 6 N HCl. Zugabe von 7.7 mL 4.2 M NaOH, Verdünnung auf 25 mL Endvolumen und Filtration über  $0.45\ \mu\text{m}$  Spritzenfilter. Injektion von 25  $\mu\text{L}$  und NaOH/NaAc-Gradientenelution für Standardamino-säuren.

### 5.4.2 Ergebnisse der Analytik von Nitrotyrosin

3-Nitrotyrosin besitzt deutlich saure Eigenschaften ( $\text{pK}_s$ -Wert der phenolischen Hydroxygruppe: 7.5). Daher sind für Nitrotyrosin noch stärkere Elutionsbedingungen und längere Elutionszeiten als für das bereits spät eluierende Tyrosin ( $\text{RT} = 34\ \text{min}$ ) notwendig. Unter Verwendung des Standardgradienten, wie er für die Aminosäuren in Tabelle 5.2 angewandt wurde, eluierte Nitrotyrosin während der gesamten Laufzeit inklusive Wasch- und Äquilibrierschritte von 65 Minuten nicht von der Säule. Erst unter Verwendung von 2 M NaAc als Eluent und isokratischer Elution mit 95 % 2 M NaAc, 5 % 1 M NaOH erschien im Chromatogramm bei 14.2 min ein Peak von Nitrotyrosin. Der minimierte Zusatz von Natriumhydroxid war dabei für die korrekte Arbeitsweise der ED40-Messzelle notwendig.

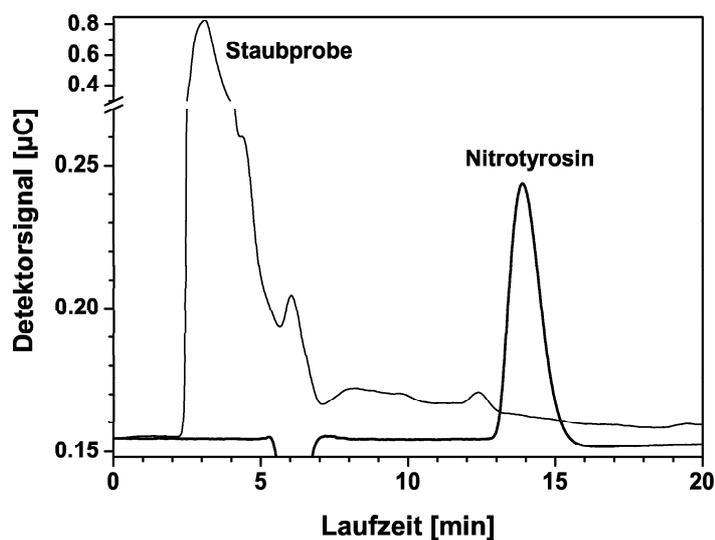
Übliche organische HPLC-Lösungsmittel wie Methanol und Acetonitril zur beschleunigen



**Abbildung 5.14:** Verschiebung der Retentionszeiten von Nitrotyrosin bei isokratischer Elution mit 2 M NaAc und 1 M NaOH (95/5 v/v) durch Teilsubstitution von 2 M NaAc durch Aceton (1-20 %).

nigten Elution von Nitrotyrosin konnten nicht eingesetzt werden. Methanol wird selbst an der Goldoberfläche oxidiert, und bei Verwendung von Acetonitril kann die Arbeitselektrode passiviert werden [306]. Testweise wurde Aceton in Anteilen von 1-20 % beigemischt, wobei jeweils der Anteil der 2 M Natriumacetat-Lösung auf 94-75 % reduziert wurde und die NaOH-Konzentration mit 5 % 1 M NaOH konstant gehalten wurde. Diese Beimischung von Aceton resultierte in einer Verschiebung des Nitrotyrosinpeaks zu höheren Retentionszeiten (Abbildung 5.14), weshalb im Folgenden auf den Zusatz organischer Lösungsmittel zu den Eluenten verzichtet wurde.

Bei Erhöhung der Natriumacetat-Konzentration des Eluenten auf 4 mol/L war durch die erhöhte Viskosität eine Erniedrigung der Flussrate auf 0.1 mL/min notwendig. Dadurch wurde der eventuell mögliche Vorteil wieder kompensiert und es konnte keine weitere Reduktion der Retentionszeit erzielt werden (RT 14.9 min). Ein Chromatogramm von Nitrotyrosin unter den isokratischen Elutionsbedingungen mit 2 M NaAc und 1 M NaOH (95/5 v/v) ist in Abbildung 5.15 dargestellt. Die entwickelte isokratische Methode konnte auch als Zusatzschritt an die Methode für Standardamino-säuren angehängt werden. Sollten Proben jedoch nur auf Nitrotyrosin untersucht werden, so wurde wie in Abbildung 5.15 nur isokratisch eluiert. Somit konnte die Analysenzeit auf 20 min reduziert werden, und es war aufgrund der isokratischen Bedingungen keine lange Äqui-



**Abbildung 5.15:** Chromatogramm des alkalisch hydrolysierten Straßenstaubs S8 und von Nitrotyrosin der Konzentration 16.5 mg/L als Vergleichsstandard. Mikrowellenaufschluss (140°C, 60 min) von 365 mg Staub (Fraktion 32-63 µm, Saalburgstraße, München, 28.04.00) mit 5 mL NaOH (4.2 M). Filtration der Probe und Verdünnung mit Wasser 1:20. Injektion von 25 µL und isokratische Elution mit 2 M NaAc und 1 M NaOH (95/5 v/v).

librierung des Systems erforderlich. Eine Kalibrierung mit dieser Methode ergab eine  $3s_B$ -Nachweisgrenze für Nitrotyrosin von 22 µg/L, was ziemlich genau der mit HPLC-UV/VIS-Analytik erzielten Nachweisgrenze entspricht [96, 144, 290]. Die Wiederfindung von Nitrotyrosin nach saurer Hydrolyse mit Salzsäure unter Standardbedingungen (Abschnitt 3.4.1) betrug bei einer eingesetzten Menge von 165 µg Nitrotyrosin  $75.7 \pm 1.4\%$  (Mittelwert aus fünf je dreifach bestimmten Hydrolysen  $\pm 1s$ ). Damit ist Nitrotyrosin als relativ hydrolysestabil zu betrachten. Mit der entwickelten Methode wurden auch alkalisch hydrolysierte Straßenstaubproben untersucht. In den erhaltenen Chromatogrammen konnte jedoch kein 3-Nitrotyrosin identifiziert werden. Ein Beispielchromatogramm ist ebenfalls in Abbildung 5.15 gezeigt.

### 5.4.3 Bewertung der HPAEC-PAD-Methode

Die Methode der direkten Aminosäureanalyse mittels HPAEC-PAD bietet verschiedene Vorzüge gegenüber klassischer HPLC-Analytik mit Vor- oder Nachsäulenderivatisierung. Sie ermöglicht eine Trennung und Quantifizierung von 17 Aminosäuren in 35 Minuten ohne Derivatisierung und mit wässrigen Eluenten ohne organische Eluentenzusätze. Aufgrund der langen Äquilibrierphase beträgt jedoch die Gesamtlaufzeit 65 Minuten. Die Kalibrierung mittels Multiaminosäurestandards ergab lineare Kalibrierkurven im Konzentrationsbereich von 0 bis ca. 8  $\mu\text{mol/L}$ , je nach Detektionsempfindlichkeit der Aminosäuren auch höher. Die Nachweisgrenzen lagen bei 1 - 20  $\mu\text{g/L}$  und damit um etwa eine Größenordnung niedriger als die mit der HPLC-Fluoreszenzmethode OPA-derivatisierter Aminosäuren erreichten Detektionslimits.

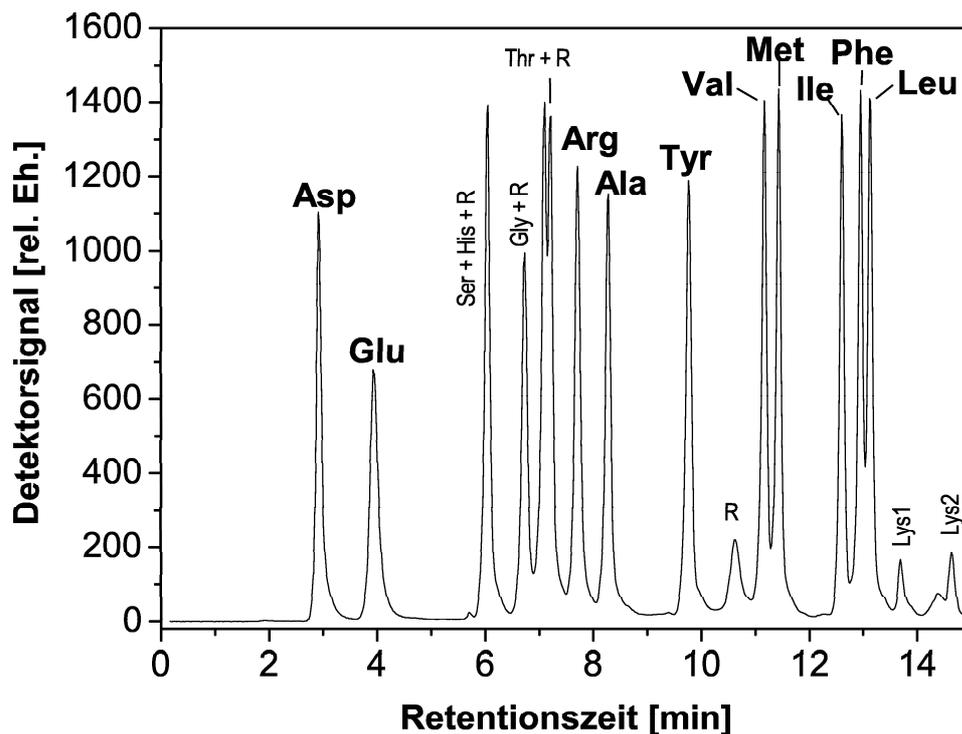
Nicht akzeptabel waren indes die aufgetretenen Verschleppungen nach Analyse von Standards. Von der Fa. Dionex wurde hierzu mittlerweile ein Zwischenschritt mit der Injektion von Schwefelsäure vorgeschlagen.

Bei hydrolysierten Staubproben war die Identifizierung von nur einigen wenigen Peaks möglich. Es eluierten breite, nicht aufgelöste Signalberge, und die Retentionszeiten der Standardsubstanzen waren stark verschoben. Darüber hinaus traten häufig zusätzliche unbekannte Peaks auf. Verlässliche Quantifizierungen von Aminosäuren in Straßenstaub oder atmosphärischem Feinstaub waren deshalb mit der Methode nicht möglich.

Da mit der AAA-Direct-Methode selbst im Applikationslabor von Dionex in Idstein zu Beginn der Arbeit nur wenig Erfahrung vorlag und die speziellen Erfordernisse der Methode nicht ausreichend bekannt waren, wurde zunächst auf konventionelle Weise gearbeitet (Verwendung von Standardvorschriften zur Eluentbereitung, Probenhandhabung etc.). Die besonderen notwendigen Vorkehrungen für die Anwendung der AAA-Direct-Methode sind mittlerweile unter [292] beschrieben. Die Hydrolysevorschrift wurde im Verlauf der Arbeit ebenfalls optimiert, so dass bei späteren Proben die Salzsäure durch Abdampfen im Stickstoffstrom entfernt wurde. Unter Berücksichtigung dieser beiden Punkte könnten in Zukunft vermutlich einige Verbesserungen der Analysenergebnisse erzielt und eventuell sogar quantitative Aminosäurebestimmungen in Staub- oder Filterproben durchgeführt werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde das *BioLC*-System jedoch zur Kohlenhydratanalytik eingesetzt. Aufgrund der aufgetretenen Schwierigkeiten mit der HPAEC-PAD-Analytik wurde eine Methode zur Aminosäureanalyse mittels HPLC-FD nach Vorsäulenderivatisierung mit o-Phthaldialdehyd und Mercaptopropionsäure entwickelt. Der elektrochemische Detektor ED40 wurde mittlerweile an die Firma Dionex zurückgegeben und anstelle dessen ein Fluoreszenzdetektor zur Messung von NBDF- und OPA-derivatisierter Aminosäuren angeschafft.

## 5.5 Standardaminosäuremessungen mittels HPLC-FD

Mittels HPLC-FD nach Vorsäulenderivatisierung mit *o*-Phthaldialdehyd und Mercaptopropionsäure konnten insgesamt 10 Aminosäuren quantifiziert werden. Diese sind im Standardchromatogramm in Abbildung 5.16 fett beschriftet.



**Abbildung 5.16:** Standardchromatogramm des 17-Aminosäurestandards (Sigma, 10  $\mu\text{mol/L}$ ), gemessen mittels HPLC-FD nach Derivatisierung mit OPA/MPA. Säule Bakerbond RP-C18, 4.6 x 250 mm, Injektionsvolumen 25  $\mu\text{L}$ , Flussrate 1.5 mL/min, Acetonitril/Natriumacetat-Puffer Gradient (Tabelle 3.5), Anregungswellenlänge 330 nm, Messung der Lichtemission bei 445 nm. Dünner und kleiner dargestellte Aminosäuren konnten nicht quantifiziert werden (z.B. Koelution mit Reagenzienpeaks, R).

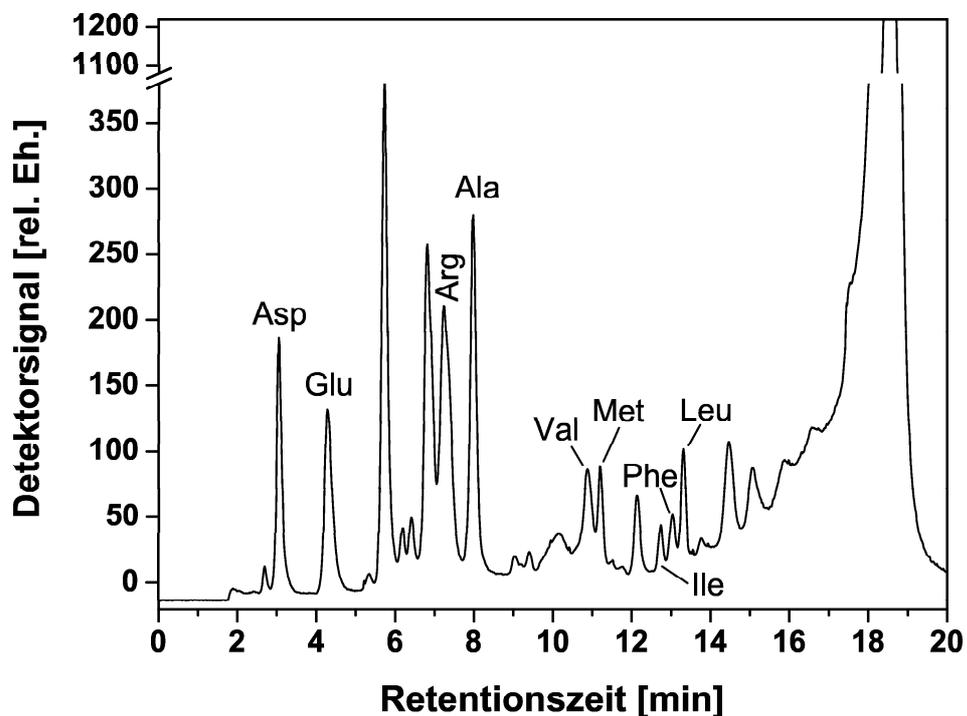
Prolin reagierte als sekundäre Aminosäure nicht mit dem Derivatisierungsreagenz, ebenso kam es beim Cystin zu keiner Reaktion. Lysin bildete in Abhängigkeit von der Reaktionszeit zwei Derivate, gekennzeichnet in Abbildung 5.16 mit Lys1 und Lys2. Peaks,

die zusätzlich zur Beschriftung mit dem Aminosäure-Code noch die Bezeichnung R tragen, koeluierten mit Reagentienpeaks und waren daher nicht quantifizierbar (kleinere Peakbeschriftung). Davon waren v.a. Histidin und Serin betroffen. Eine Trennung von Glycin und Threonin war nicht immer möglich, daher erfolgte für diese Substanzen keine Quantifizierung. Bei Verwendung eines weniger steilen Laufmittelgradienten, war eine vollständige Trennung sämtlicher Aminosäuren erzielbar, allerdings erhöhte sich die Analysenzeit auf etwa 90 Minuten. Mit dieser Methode wurde also ein Kompromiss zwischen Probendurchsatz und Trennleistung erreicht. Gegen Ende der vorliegenden Arbeit wurde der lineare Laufmittelgradient durch einen mehrstufigen Gradienten mit Natriumacetatpuffer und einer 50/50 (v/v) Mischung aus Methanol und Acetonitril als organisches Lösungsmittel verwendet, die vom GC-/HPLC-Labor des Lehrstuhls für Technologie der Brauerei I der TUM in Freising-Weihenstephan übernommen wurde. Tabelle 5.3 zeigt die mit der Fluoreszenz-Methode erzielten Nachweisgrenzen ( $3s_B$ -Methode). Diese lagen im Bereich von 30-100  $\mu\text{g/L}$  und damit im Mittel um etwa eine Größenordnung höher als die mit HPAEC-PAD erreichten Detektionslimits.

**Tabelle 5.3:** *Retentionszeiten und Nachweisgrenzen ( $3s_B$ -Methode) der mittels HPLC-FD bestimmten Aminosäuren*

	RT	Nachweisgrenzen	
	[min]	[ $\mu\text{mol/L}$ ]	[ $\mu\text{g/L}$ ]
Asparaginsäure	2.59	0.38	51
Glutaminsäure	2.98	0.57	84
Arginin	6.31	0.29	50
Alanin	7.32	0.72	64
Tyrosin	8.61	0.21	39
Valin	10.23	0.67	78
Methionin	10.53	0.33	50
Isoleucin	11.73	0.26	34
Phenylalanin	12.08	0.61	101
Leucin	12.25	0.40	53

Abbildung 5.17 zeigt ein Chromatogramm einer sauer mit 6 N HCl hydrolysierten PM<sub>2.5</sub>-Probe der Messkampagne ZSP-1 nach Abdampfen der HCl und Derivatisierung mittels OPA/MPA. Die quantifizierten Aminosäuren sind fett beschriftet. Die Herkunft des außerordentlich intensiven und breiten Peaks von 14-19 min Retentionszeit ist unklar. Der Peak trat jedoch in analoger Form in allen gemessenen Filterproben der Messkampagnen ZSP-1 und LKP auf. Es könnte sich hierbei um OPA-derivatisierte Amine oder aber auch um Substanzen mit Eigenfluoreszenz wie z.B. PAHs handeln.



**Abbildung 5.17:** Chromatogramm der Probe 10, Messkampagne ZSP-1, gemessen mittels HPLC-FD nach Derivatisierung mit OPA/MPA. Säule Bakerbond RP-C18, 4.6 x 250 mm, Injektionsvolumen 25  $\mu$ L, Flussrate 1.5 mL/min, Acetonitril/Natriumacetat-Puffer Gradient (Tabelle 3.5), Anregungswellenlänge 330 nm, Messung der Lichtemission bei 445 nm.

Die gefundenen Mengen der Aminosäuren pro Filter und die daraus errechneten atmosphärischen Aminosäurekonzentrationen sind in Tabelle 5.4 für die gezeigte Probe und zwei weitere Proben der selben Messkampagne auf der Zugspitze im September

2001 aufgelistet. Die Konzentrationen liegen im Bereich von einigen wenigen ng pro m<sup>3</sup> (0.3-14 µg/Filter) und sind damit relativ gering.

**Tabelle 5.4:** *Absolutmengen und atmosphärische Konzentrationen der mittels HPLC-FD bestimmten Aminosäuren in Proben der Messkampagne ZSP-1 im September 2001.*

	Probe 9		Probe 10		Probe 11	
Zeitraum (2001)	04.09.-09.09.		09.09.-14.09.		14.09.-19.09.	
	[µg]	[ng/m <sup>3</sup> ]	[µg]	[ng/m <sup>3</sup> ]	[µg]	[ng/m <sup>3</sup> ]
Asparaginsäure	8.0	2.8	5.1	1.8	n.d.	n.d.
Glutaminsäure	14.4	5.1	6.6	2.3	0.6	0.6
Arginin	5.8	2.0	4.7	1.6	0.3	0.3
Alanin	7.6	2.7	7.7	2.7	1.1	1.1
Valin	6.5	2.3	4.8	1.7	0.8	0.8
Isoleucin	1.4	0.5	6.7	2.3	n.d.	n.d.
Phenylalanin	2.3	0.8	3.0	1.0	n.d.	n.d.
Leucin	4.3	1.5	3.9	1.4	n.d.	n.d.

In Abbildung 5.18 sind die atmosphärischen Konzentrationen von je neun Aminosäuren während der Messkampagne LKP im April/Mai 2001 grafisch dargestellt. Die Messungen wurden von Dr. Kerstin Krause durchgeführt. Glutamat und Aspartat besaßen Maximalkonzentrationen von bis zu 60 ng/m<sup>3</sup>, die Konzentrationen der anderen Aminosäuren lagen meist zwischen 10 und 20 ng/m<sup>3</sup>. Extrapoliert man die Gesamtsumme der elf ursprünglichen Aminosäuren (die Amide Asparagin und Glutamin wurden während der sauren Hydrolyse in die entsprechenden Säuren Asp und Glu umgewandelt) auf 20 natürliche, proteinogene Aminosäuren, so erhält man für die gemessenen Proben einen Mittelwert ( $\pm 1s$ ) von  $314 \pm 181$  ng/m<sup>3</sup>. Der entsprechende Mittelwert der BCA-Proteinsummenbestimmung der Proben betrug  $436 \pm 167$  ng/m<sup>3</sup>. Die Werte stimmen damit trotz der Näherung und der Extrapolation relativ gut überein. Durch diese stichprobenartige Aminosäurebestimmung wurden damit die Ergebnisse des BCA-Assays am LKP mittels HPLC-FD bestätigt.

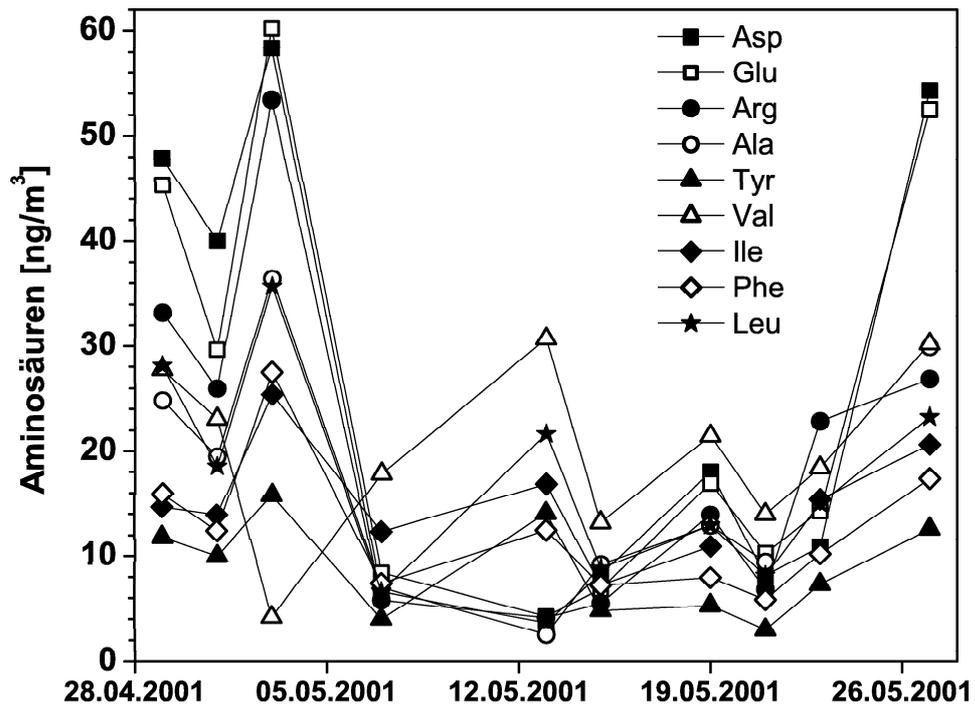


Abbildung 5.18: Atmosphärische Konzentrationen von je neun Aminosäuren während der Messkampagne LKP im April/Mai 2001 bestimmt anhand der Proben LKP 9-11, 13, 18, 20, 24-26 und LKP 28. Analyse der Proben nach saurer Hydrolyse mittels HPLC-FD wie in Abbildung 5.16 beschrieben. Durchführung der Messungen: Dr. Kerstin Krause.

# 6 Antikörpercharakterisierung und Immunoassays

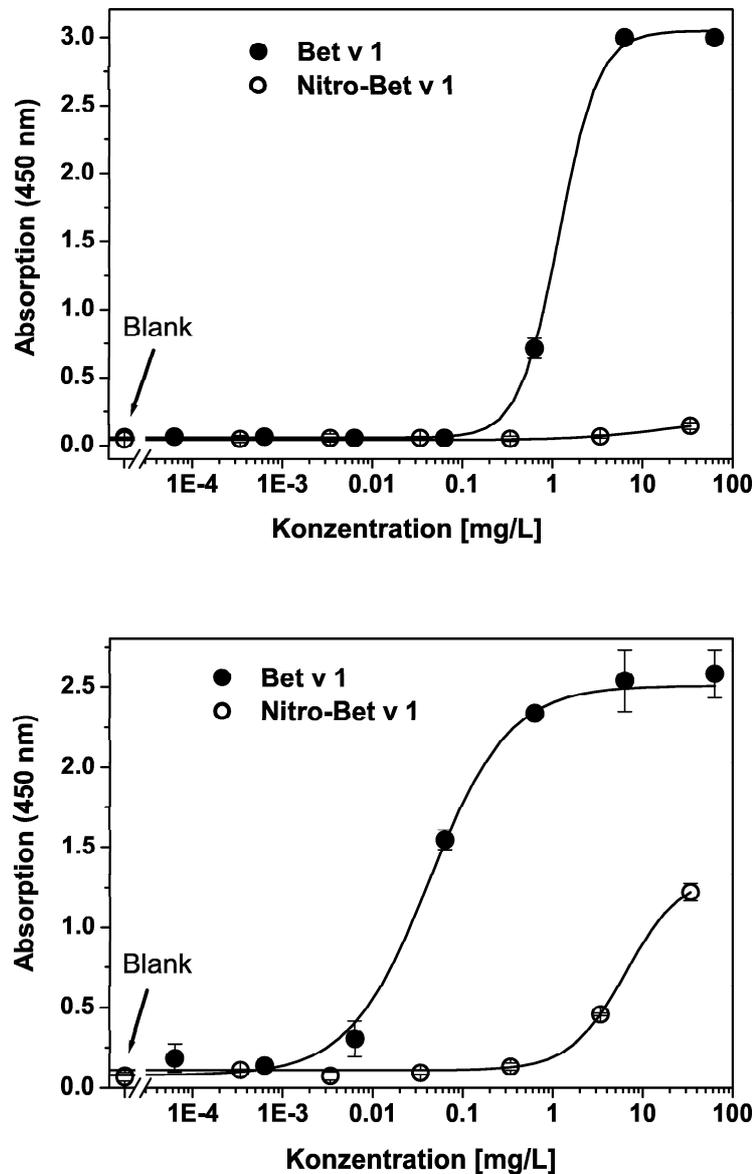
## 6.1 Vergleich von Immunoassays mit Bet v 1 und Nitro-(3)-Bet v 1

### 6.1.1 Einseitige Immunoassays mit Bet v 1 und Nitro-Bet v 1

Einseitige Assays mit Bet v 1 und Nitro-(3)-Bet v 1 wurden mit mAk von Maus, pAk von Kaninchen und Seren von Birkenpollenallergikern durchgeführt. Es sollte untersucht werden, ob eventuell Birkenpollenallergiker-IgE eine höhere Affinität zu Nitro-Bet v 1 als zu natürlichem Bet v 1 zeigt. Ein derartiges Ergebnis könnte die Hypothese der Allergie-Entwicklung über nitrierte Pollenallergene unterstützen. Zur Durchführung dieser Untersuchungen wurden Mikrotiterplatten mit Bet v 1 und Nitro-(3)-Bet v 1 beschichtet und anschließend einseitige Immunoassays durchgeführt. Abbildung 6.1 zeigt die Ergebnisse für den mAk Bv16 und den pAk von Kaninchen (beide ALK-Abelló, Hørsholm). Beide Antikörper zeigten geringere Bindung für nitriertes Bet v 1 als für das natürliche Allergen.

Beim mAk Bv16 steigt das Signal mit Nitro-Bet v 1 kaum an, die beiden Kurven für Bv16 sind daher schwierig quantitativ untereinander zu vergleichen. Fixiert man die Asymptote der sigmoidalen Fitkurve bei  $A_2 = 0.2$ , so erhält man einen Wert für den Testmittelpunkt von 17 mg/L, um eine Größenordnung höher als für Bet v 1.

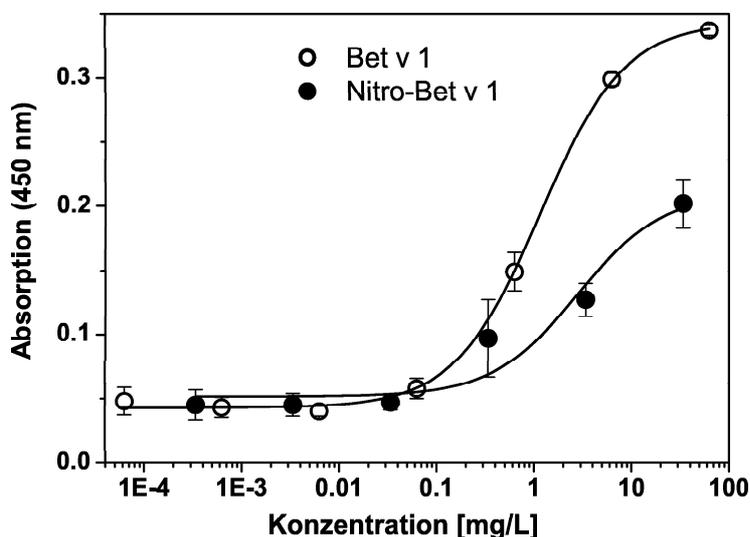
Die Kalibrierkurve des einseitigen Bet v 1-Assay mit den polyklonalen Anti-Bet v 1-Antikörpern von Kaninchen steigt bereits etwa zwei Größenordnungen früher deutlich an, ein Effekt, der vermutlich auf die Multispezifität des pAk zurückzuführen ist und auch bei den einseitigen Tests für Nitro-BSA beobachtet wurde (Abschnitt 6.4). Man erhält somit einen Testmittelpunkt von 6 mg/L für Nitro-Bet v 1, etwa zwei Größenordnungen höher als für Bet v 1 (0.04 mg/L). Der Signalanstieg der Kalibrierkurve für Nitro-Bet v 1



**Abbildung 6.1:** Einseitige Immunoassays mit mAk Bv16 und pAk Kaninchen (Anti-Bet v 1-Antikörper) für Bet v 1 und Nitro-Bet v 1 im direkten Vergleich. Parameter für Bet v 1 (Nitro-(3)-Bet v 1) und mAk Bv16 (oben): maximale Absorption 3.05 (0.20), minimale Absorption 0.06 (0.04), Testmittelpunkt 1.18 (16.80) mg/L, Steigung am Testmittelpunkt 2.00 (0.91) L/mg. Parameter für Bet v 1 (Nitro-(3)-Bet v 1) und pAk Kaninchen (unten): maximale Absorption 2.51 (1.33), minimale Absorption 0.08 (0.11), Testmittelpunkt 0.04 (6.45) mg/L, Steigung am Testmittelpunkt 0.98 (1.42) L/mg.

fällt deutlich stärker aus, es wurde eine maximale Absorption von 1.3 errechnet.

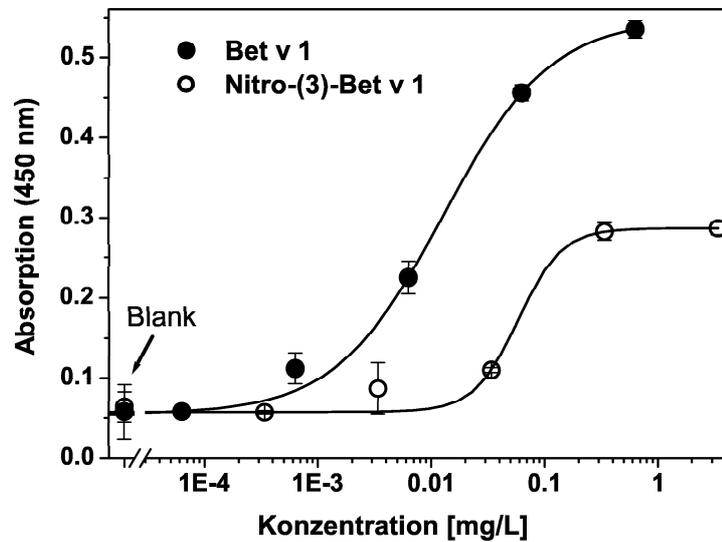
Abbildung 6.2 zeigt das Ergebnis eines einseitigen Immunoassays für Bet v 1 und Nitro-Bet v 1 mit dem Serum eines starken Birkenpollenallergikers. Die Steigung der beiden sigmoidalen Fitkurven wurde für bessere Vergleichbarkeit mit 1 fixiert. In diesem Test wurde zwar noch immer mehr Human-IgE durch Bet v 1 als durch Nitro-Bet v 1 gebunden, die resultierenden Testmittelpunkte weichen jedoch nur mehr um ca. den Faktor 2 voneinander ab und auch die maximal erreichten Absorptionen liegen weniger als Faktor 2 auseinander. Die Unterschiede der beiden Kalibrierkurven sind damit geringer als beim pAk von Kaninchen. Eventuell könnte dies schon als ein unterstützender Hinweis für die Hypothese der Allergieentstehung über nitrierte Inhalationsallergene gedeutet werden.



**Abbildung 6.2:** Einseitiger Immunoassay mit Serum MT59 eines Birkenpollenallergikers für Bet v 1 und Nitro-Bet v 1. Darstellung von Median und Spannweite. Parameter für Bet v 1 (Nitro-(3)-Bet v 1): maximale Absorption 0.34 (0.21), minimale Absorption 0.04 (0.05), Testmittelpunkt 1.14 (2.79) mg/L, Steigung am Testmittelpunkt je 1.0 L/mg (fixiert).

### 6.1.2 Sandwich-Immunoassays mit Bet v 1 und Nitro-Bet v 1

Auch Sandwich-Immunoassays mit Humansenen und Nitro-Bet v 1 waren möglich. Eine exemplarische Kalibrierkurve ist in Abbildung 6.3 für einen Sandwich-Assay mit polyklonalen Kaninchen-Anti-Bet v 1-Antikörpern als Fängerantikörper und dem Serum MT12 eines Birkenpollenallergikers gezeigt.

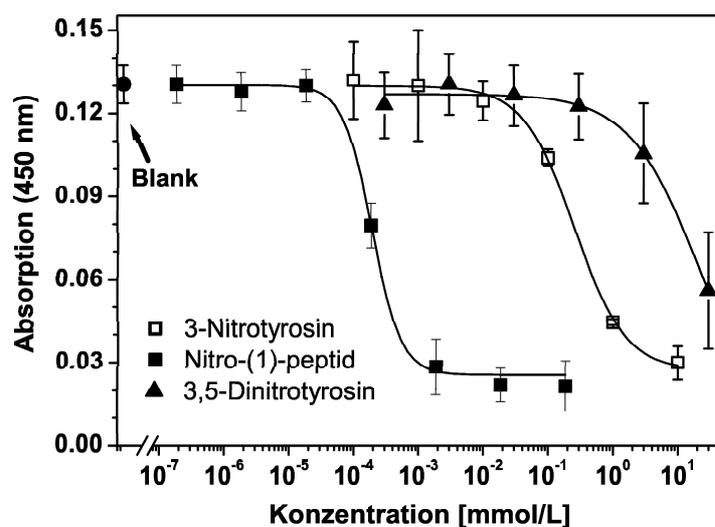


**Abbildung 6.3:** Sandwich-Assay mit polyklonalen Kaninchen-Anti-Bet v 1-Antikörpern und Serum MT12 eines Birkenpollenallergikers für Bet v 1 und Nitro-Bet v 1. Darstellung von Median und Spannweite. Parameter für Bet v 1 (Nitro-(3)-Bet v 1): maximale Absorption 0.55 (0.29), minimale Absorption 0.05 (0.06), Testmittelpunkt 12.7 (58.4)  $\mu\text{g/L}$ , Steigung am Testmittelpunkt 0.91 (2.23)  $\text{L/mg}$ .

Der Sättigungsbereich der Kurve wurde für Nitro-Bet v 1 schon bei 0.3 mg/L erreicht. Die Testmittelpunkte liegen bei 13 (Bet v 1) bzw. 58  $\mu\text{g/L}$  (Nitro-Bet v 1), deutlich niedriger als bei den einseitigen Tests. Ein weiteres Allergikerserum ergab ein analoges Ergebnis (MT28; Testmittelpunkte 9  $\mu\text{g/L}$  für Bet v 1 bzw. 67  $\mu\text{g/L}$  für Nitro-Bet v 1; ohne Abbildung). Die Sandwich-Assays mit den Humanseren waren damit wesentlich empfindlicher als die einseitigen Assays. Der Unterschied der Testmittelpunkte der Kurven für Bet v 1 und Nitro-Bet v 1 betrug etwa Faktor 5-7. Sie lagen damit zwischen den korrespondierenden Werten für einseitige Tests mit Kaninchen-pAk (zwei Größenordnungen) und Humanserum (Faktor 2). Die Tatsache, dass IgE-Moleküle von Birkenpollenallergikern nicht nur native Pollenallergene, sondern auch gut deren nitrierte Derivate binden können, unterstützt die Hypothese, dass diese nitrierten Proteine bei der Entwicklung der Allergie eventuell eine Rolle gespielt haben könnten. Zusätzliche klärende Untersuchungen z.B. mit Zellkulturen oder in Tierexperimenten sind zur weiteren Bestätigung dieser Theorie jedoch zwingend erforderlich.

## 6.2 Affinitäten der Nitrotyrosinantikörper

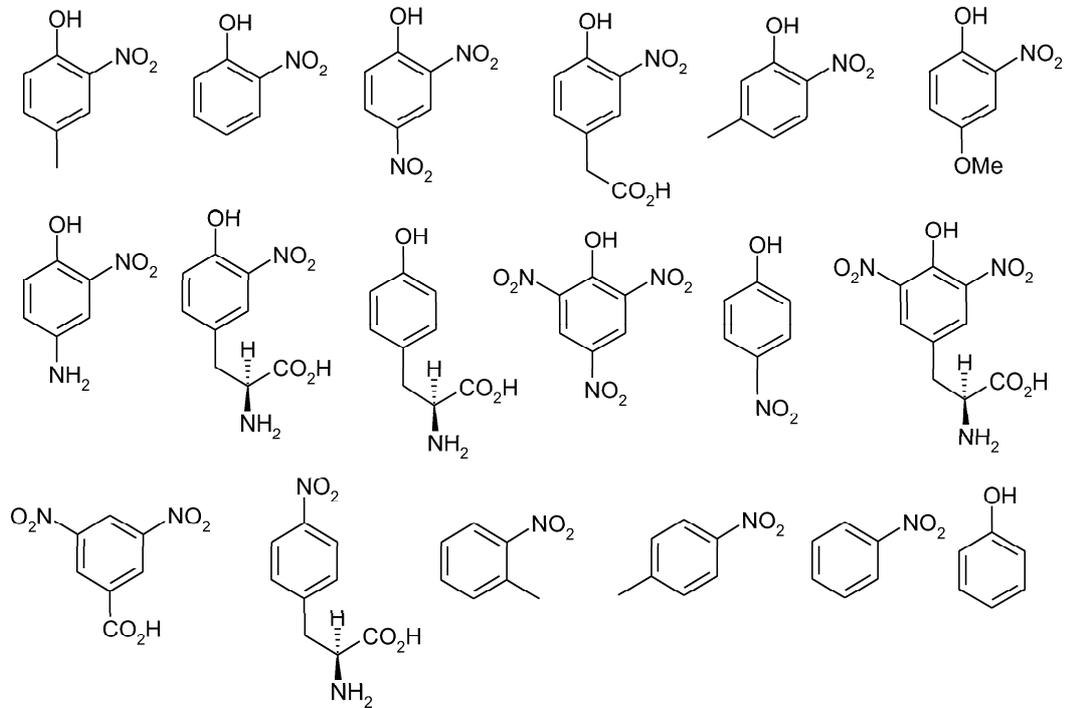
Die Affinitätskonstanten der verwendeten Antikörper wurden aus den invertierten, minimierten Testmittelpunkten indirekter kompetitiver Immunoassays nach der Methode von Weller [285] bestimmt. Abbildung 6.4 zeigt beispielhaft für 3-Nitrotyrosin, 3,5-Dinitrotyrosin und Nitro-(1)-peptid die Inhibitionskurven.



**Abbildung 6.4:** Inhibitionskurven von 3-Nitrotyrosin, 3,5-Dinitrotyrosin und H-Thr-Arg-Pro-Ile-Ile-Thr-Thr-m-nitro-Tyr-Gly-Pro-Ser-Asp-Asp-Lys-(2-Aminobenzoyl)-Tyr-OH, bestimmt im indirekten kompetitiven Test mit mAk CAY. Darstellung von Median und Spannweite (Vierfachmessungen) und der sigmoidalen Fitkurven.

Drei polyklonale und drei monoklonale IgG-Antikörper zur Analyse von 3-Nitrotyrosin (Tabelle 3.11) wurden untersucht und die Affinitäten für 24 Testsubstanzen bestimmt: 3-Nitrotyrosin, acht aromatische Verbindungen mit verwandter chemischer Struktur (Aminosäuren, Phenole und Kresole), 14 nitrierte BSA-Standards mit unterschiedlicher Anzahl von Nitrotyrosinresten pro Proteinmolekül (Nitro-( $<0.1$ )-BSA bis Nitro-(16.8)-BSA) und ein durch Peptidsynthese hergestelltes Peptid, das einen einzelnen Nitrotyrosinrest enthielt und als wohldefinierte Modells substanz für einfach-nitrierte Proteine fungierte (H-Thr-Arg-Pro-Ile-Ile-Thr-Thr-m-nitro-Tyr-Gly-Pro-Ser-Asp-Asp-Lys-(2-Aminobenzoyl)-Tyr-OH, abgekürzt Nitro-(1)-peptid). Die bestimmten Affinitätskonstanten sind in der Tabelle 6.1 wiedergegeben. Der Antikörper CAY wurde zusätzlich für einige weitere Substanzen charakterisiert. Die ermittelten Affinitäten sind im Anhang in

Tabelle 9.14 aufgelistet. Abbildung 6.5 zeigt die Strukturformeln der auf Kreuzreaktionen getesteten niedermolekularen Substanzen.



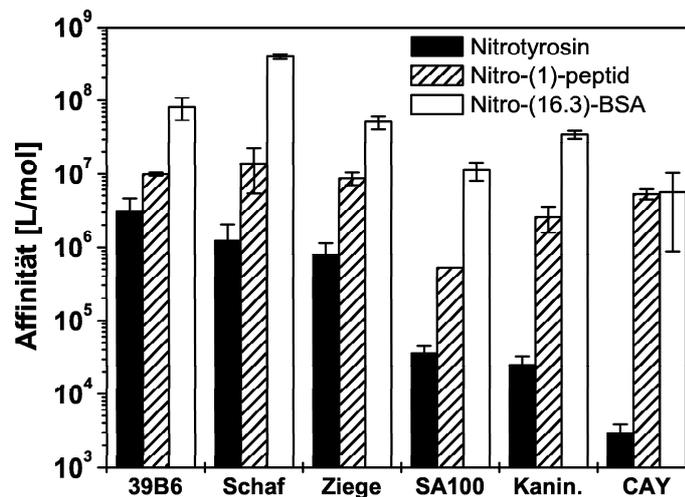
**Abbildung 6.5:** Strukturformeln der in indirekten kompetitiven Tests untersuchten Verbindungen; Anordnung der Substanzen nach absteigender Affinität zu mAk CAY von links nach rechts, von oben nach unten: 2-Nitro-p-kresol, 2-Nitrophenol, 2,4-Dinitrophenol, 4-Hydroxy-3-nitrophenylelessigsäure, 6-Nitro-m-kresol, 4-Methoxy-2-nitrophenol, 4-Amino-2-nitrophenol, 3-Nitrotyrosin, L-Tyrosin, 2,4,6-Trinitrophenol (Pikrinsäure), 4-Nitrophenol, 3,5-Dinitrotyrosin, 3,5-Dinitrobenzoesäure, 4-Nitrophenylalanin, 2-Nitrotoluol, 4-Nitrotoluol, Nitrobenzol, Phenol.

Tabelle 6.1: Affinitätskonstanten der untersuchten Antikörper gegen Nitrotyrosin.

Testsubstanz	Schaf	Ziege	Kaninchen	SA-100	39B6	CAY
Nitro-(16.8)-BSA	$(3.3 \pm 0.1) \cdot 10^8$	$(4.3 \pm 0.2) \cdot 10^7$	$(2.9 \pm 0.1) \cdot 10^7$	$(6.5 \pm 1.1) \cdot 10^6$	n.d. <sup>1</sup>	$(4.2 \pm 1.2) \cdot 10^6$
Nitro-(16.3)-BSA	$(4.0 \pm 0.1) \cdot 10^8$	$(5.1 \pm 0.3) \cdot 10^7$	$(3.5 \pm 0.1) \cdot 10^7$	$(1.1 \pm 0.1) \cdot 10^7$	$(8.1 \pm 0.9) \cdot 10^7$	$(5.6 \pm 2.2) \cdot 10^6$
Nitro-(14.7)-BSA	$(2.4 \pm 0.2) \cdot 10^8$	$(2.8 \pm 0.5) \cdot 10^7$	$(2.2 \pm 0.2) \cdot 10^7$	$(3.8 \pm 0.5) \cdot 10^6$	n.d. <sup>1</sup>	$(2.6 \pm 0.8) \cdot 10^6$
Nitro-(14.4)-BSA	$(2.1 \pm 0.3) \cdot 10^8$	$(2.7 \pm 0.3) \cdot 10^7$	$(2.1 \pm 0.1) \cdot 10^7$	$(3.6 \pm 0.6) \cdot 10^6$	$(1.2 \pm 0.1) \cdot 10^8$	$(2.7 \pm 0.5) \cdot 10^6$
Nitro-(14)-BSA	$(5.3 \pm 0.8) \cdot 10^7$	$(7.4 \pm 0.1) \cdot 10^7$	$(3.4 \pm 0.4) \cdot 10^7$	$(2.3 \pm 0.2) \cdot 10^7$	$(1.4 \pm 0.6) \cdot 10^8$	$(1.8 \pm 0.1) \cdot 10^7$
Nitro-(11.8)-BSA	$(1.4 \pm 0.1) \cdot 10^8$	$(2.0 \pm 0.1) \cdot 10^7$	$(1.7 \pm 0.4) \cdot 10^7$	$(2.0 \pm 0.3) \cdot 10^6$	n.d. <sup>1</sup>	$(2.0 \pm 0.4) \cdot 10^6$
Nitro-(11.3)-BSA	$(1.4 \pm 0.1) \cdot 10^8$	$(1.7 \pm 0.4) \cdot 10^7$	$(1.7 \pm 0.0) \cdot 10^7$	$(3.8 \pm 0.2) \cdot 10^6$	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
Nitro-(10.8)-BSA	$(1.2 \pm 0.0) \cdot 10^8$	$(1.7 \pm 0.6) \cdot 10^7$	$(1.5 \pm 0.3) \cdot 10^7$	$(1.8 \pm 0.2) \cdot 10^6$	n.d. <sup>1</sup>	$(1.9 \pm 0.2) \cdot 10^6$
Nitro-(9.4)-BSA	$(7.6 \pm 0.3) \cdot 10^7$	$(1.3 \pm 0.2) \cdot 10^7$	$(1.3 \pm 0.1) \cdot 10^7$	$(1.2 \pm 0.1) \cdot 10^6$	$(6.1 \pm 0.1) \cdot 10^7$	$(2.2 \pm 0.7) \cdot 10^6$
Nitro-(5.6)-BSA	$(4.0 \pm 0.5) \cdot 10^7$	$(8.7 \pm 1.9) \cdot 10^6$	$(6.7 \pm 1.6) \cdot 10^6$	$(6.2 \pm 1.3) \cdot 10^5$	$(1.3 \pm 0.4) \cdot 10^7$	$(1.5 \pm 0.4) \cdot 10^6$
Nitro-(1.6)-BSA	$(6.6 \pm 0.6) \cdot 10^6$	$(1.3 \pm 0.2) \cdot 10^6$	$(3.3 \pm 0.2) \cdot 10^5$	$(9.0 \pm 1.1) \cdot 10^4$	$(3.2 \pm 1.3) \cdot 10^6$	n.d. <sup>1</sup>
Nitro-(1)-peptid	$(1.4 \pm 0.5) \cdot 10^7$	$(8.6 \pm 0.6) \cdot 10^6$	$(1.9 \pm 0.2) \cdot 10^6$	$(4.2 \pm 0.4) \cdot 10^5$	$(9.8 \pm 0.2) \cdot 10^6$	$(5.3 \pm 0.3) \cdot 10^6$
Nitro-(0.6)-BSA	$(1.7 \pm 0.2) \cdot 10^6$	$(8.5 \pm 1.3) \cdot 10^5$	$(1.2 \pm 0.1) \cdot 10^5$	$(3.2 \pm 0.3) \cdot 10^4$	$(1.1 \pm 0.5) \cdot 10^6$	n.d. <sup>1</sup>
Nitro-(0.2)-BSA	$(2.7 \pm 0.3) \cdot 10^5$	$(9.2 \pm 0.7) \cdot 10^4$	$(2.3 \pm 0.2) \cdot 10^4$	$(8.2 \pm 0.7) \cdot 10^3$	$(1.5 \pm 0.5) \cdot 10^5$	n.d. <sup>1</sup>
Nitro-( $<0.1$ )-BSA	$(9.2 \pm 2.3) \cdot 10^3$	$(1.6 \pm 0.4) \cdot 10^4$	$(5.9 \pm 0.2) \cdot 10^3$	$(5.5 \pm 0.3) \cdot 10^3$	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
2-Nitrophenol	$(7.1 \pm 1.0) \cdot 10^6$	$(3.0 \pm 0.4) \cdot 10^5$	$(1.0 \pm 0.1) \cdot 10^4$	$(1.8 \pm 0.3) \cdot 10^5$	$(1.8 \pm 0.3) \cdot 10^7$	$(3.1 \pm 0.4) \cdot 10^4$
2-Nitro-p-kresol	$(1.9 \pm 0.1) \cdot 10^6$	$(1.0 \pm 0.1) \cdot 10^6$	$(2.0 \pm 0.1) \cdot 10^4$	$(1.7 \pm 0.0) \cdot 10^5$	$(1.7 \pm 0.1) \cdot 10^9$	$(1.1 \pm 0.1) \cdot 10^5$
6-Nitro-m-kresol	$(1.6 \pm 0.1) \cdot 10^6$	$(3.0 \pm 0.4) \cdot 10^5$	$(1.4 \pm 0.7) \cdot 10^2$	$(1.1 \pm 0.2) \cdot 10^4$	$(1.9 \pm 0.6) \cdot 10^8$	$(2.5 \pm 0.3) \cdot 10^4$
3-Nitrotyrosin	$(1.2 \pm 0.8) \cdot 10^6$	$(8.0 \pm 3.3) \cdot 10^5$	$(2.5 \pm 0.7) \cdot 10^4$	$(3.6 \pm 0.9) \cdot 10^4$	$(3.0 \pm 1.3) \cdot 10^6$	$(3.0 \pm 0.9) \cdot 10^3$
2,4-Dinitrophenol	$(4.4 \pm 0.4) \cdot 10^5$	$(4.0 \pm 0.4) \cdot 10^5$	$(1.3 \pm 0.0) \cdot 10^4$	$(9.1 \pm 0.4) \cdot 10^4$	$(1.8 \pm 0.1) \cdot 10^8$	$(2.2 \pm 0.7) \cdot 10^4$
4-Nitrophenol	$(9.6 \pm 2.9) \cdot 10^3$	$(1.5 \pm 1.2) \cdot 10^5$	$(4.9 \pm 0.1) \cdot 10^1$	$(1.3 \pm 0.2) \cdot 10^3$	$(3.1 \pm 1.3) \cdot 10^4$	$(2.4 \pm 1.4) \cdot 10^2$
3,5-Dinitrotyrosin	$(4.3 \pm 1.5) \cdot 10^4$	$(3.2 \pm 1.9) \cdot 10^5$	$(1.7 \pm 0.2) \cdot 10^3$	$(5.4 \pm 0.6) \cdot 10^3$	$(3.3 \pm 0.3) \cdot 10^4$	$(0.5 \pm 1.6) \cdot 10^2$
L-Tyrosin	$(8.5 \pm 5.9) \cdot 10^2$	$(4.0 \pm 1.3) \cdot 10^2$	n.d. <sup>1</sup>	$(6.2 \pm 0.7) \cdot 10^1$	$(6.4 \pm 3.3) \cdot 10^2$	$(1.0 \pm 0.2) \cdot 10^2$
4-Nitrophenylalanin	$(5.3 \pm 1.5) \cdot 10^2$	$(2.3 \pm 1.0) \cdot 10^3$	$1.7 \pm 2.5$	$(3.3 \pm 0.3) \cdot 10^1$	$(6.4 \pm 1.6) \cdot 10^2$	$3.0 \pm 3.1$

<sup>1</sup>kein signifikantes Signal über der Nachweisgrenze detektiert

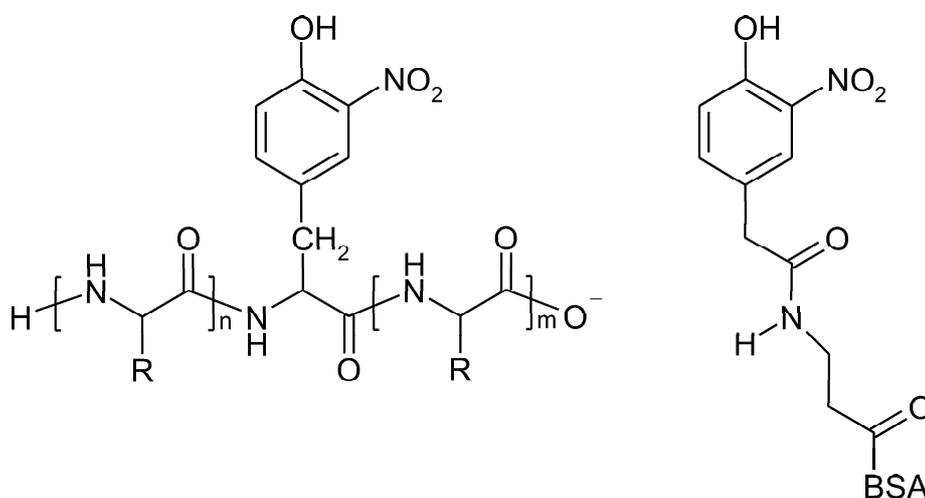
In Abbildung 6.6 sind charakteristische Unterschiede zwischen den untersuchten Antikörpern und Testsubstanzen gezeigt. Die Affinitäten für 3-Nitrotyrosin variierten um drei Größenordnungen und reichten von  $3 \cdot 10^3$  L/mol (mAk CAY) bis  $3 \cdot 10^6$  L/mol (mAk 39B6). Ebenso sehr hohe Affinitäten gegenüber Nitrotyrosin zeigten die Antikörper Schaf und Ziege mit  $1.2 \cdot 10^6$  bzw.  $8 \cdot 10^5$  L/mol, wohingegen die Antikörper Kaninchen und SA100 geringere Affinitäten im Bereich von  $10^4$  L/mol besaßen. Die Affinitäten für das Nitro-(1)-peptid lagen höher und zeigten eine geringere Schwankung bei Vergleich der sechs Antikörper untereinander. Sie reichten von  $5 \cdot 10^5$  L/mol (SA100) bis  $1 \cdot 10^7$  L/mol (39B6). Die Affinitäten für den hoch nitrierten Nitro-(16.3)-BSA-Standard lagen im Allgemeinen etwa eine Größenordnung höher als für das Nitro-(1)-peptid. Nur der mAk CAY zeigte für beide Substanzen die gleiche Affinität von  $5 \cdot 10^6$  L/mol.



**Abbildung 6.6:** Affinitäten der untersuchten Nitrotyrosin-Antikörper für Nitrotyrosin, Nitro-(1)-Peptid und Nitro-(16.3)-BSA: Angabe von *inversem Testmittelpunkt*  $\pm$  *dreifachem Standardfehler der sigmoidalen Fitkurve (Origin 6.0) für Nitro-(1)-Peptid und Nitro-(16.3)-BSA (Vierfachmessungen), für 3-Nitrotyrosin: Angabe von Mittelwert  $\pm$  3s aus 10-13 Assays (jeweils Vierfachmessungen).*

Die höheren Affinitäten für gebundene Nitrotyrosinreste können über den Einfluss von geladenen Gruppen auf die Antikörper-Antigen-Bindung erklärt werden. Durch die kovalente Bindung der Amino- und Carboxylgruppe von Nitrotyrosin in Nitroproteinen

oder Nitropeptiden werden die vorhandenen Ladungen weitgehend abgeschwächt, und diese Nitrotyrosinreste können fester gebunden werden als die freie Aminosäure. Die unterschiedlichen Affinitäten von CAY und 39B6 für 3-Nitrotyrosin können auf die Unterschiede der verwendeten Immunogene zurückgeführt werden. Für die Gewinnung des Antikörpers CAY wurde Peroxynitrit-behandeltes KLH benutzt, welches statistisch nitriert wurde [118]. Der Antikörper 39B6 hingegen wurde durch Immunisierung mit einem 3-(4-Hydroxy-3-nitrophenylacetamido)propionsäure-BSA-Konjugat gewonnen [307]. Dieses Konjugat enthält eine Nitrotyrosin ähnliche Struktur, die mit einem Spacer an BSA gekoppelt ist. Abbildung 6.7 zeigt die beiden Strukturen im direkten Vergleich. Im BSA-Konjugat ist die 4-Hydroxy-3-nitrophenylgruppe wesentlich stärker exponiert und kann leichter als Angriffspunkt für das Immunsystem fungieren als ein in eine Peptidkette eingebundenes 3-Nitrotyrosin. Bei Immunisierungen mit z.B. nitriertem KLH oder einem anderen Nitroprotein ist es daher wahrscheinlich, dass die gebildeten Antikörper nicht nur spezifisch Nitrotyrosin, sondern auch die chemische Umgebung dieses Nitrotyrosins miterkennen. Liegt in einem anderen Nitroprotein nicht mehr genau die partielle Aminosäuresequenz wie im Immunogen vor, so wird dieser Analyt nur noch schwächer und unspezifischer gebunden.



**Abbildung 6.7:** *Strukturen eines 3-Nitrotyrosinrests in einer Polypeptidkette (links, R steht für den Rest einer beliebigen natürlichen Aminosäure) und des Immunogens zur Gewinnung von mAk 39B6 (rechts).*

In Abbildung 6.8 (oben) sind die Affinitätskonstanten der untersuchten Nitrotyrosin-Antikörper für Nitro-BSA-Standards gegen die Anzahl der Nitrotyrosinreste pro Proteinmolekül (X) aufgetragen (logarithmische Skalen). Die Affinitäten steigen mit der

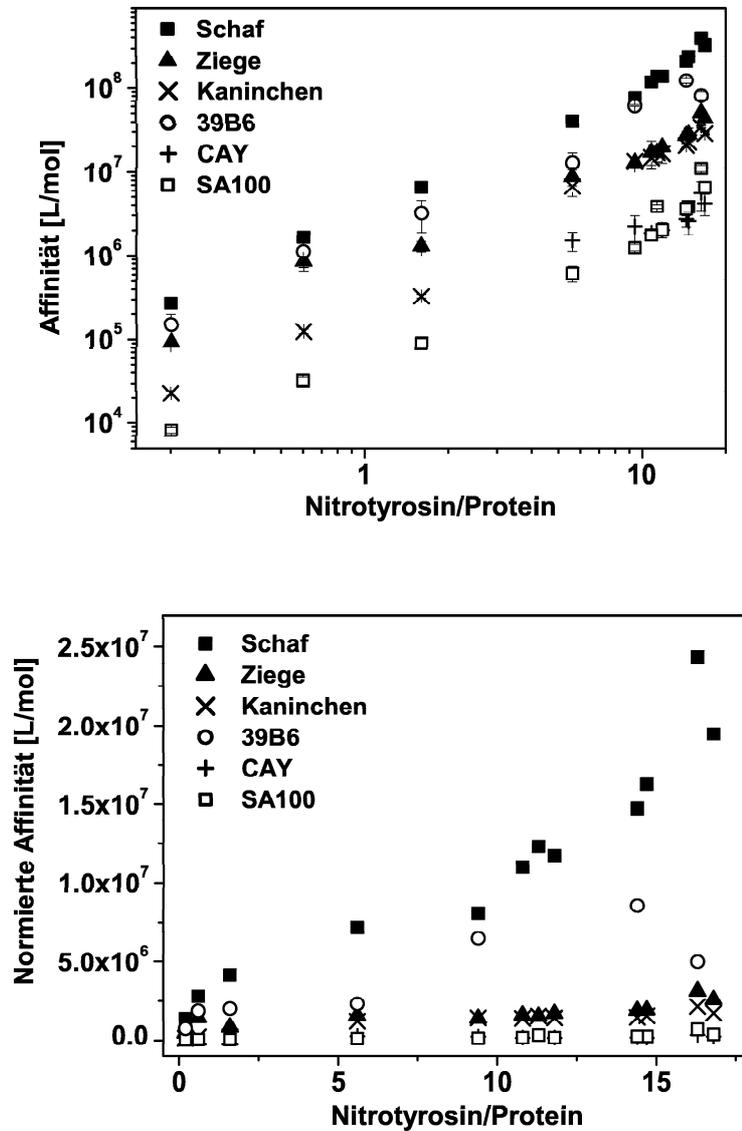


Abbildung 6.8: Darstellung der absoluten (oben) und der durch Division durch die Anzahl der Nitrotyrosinreste pro Molekül normierten Affinitätskonstanten (unten) der untersuchten Nitrotyrosin-Antikörper für verschiedene Nitro-BSA-Standards, aufgetragen gegen die Anzahl der Nitrotyrosinreste pro Proteinmolekül.

Anzahl der Nitrotyrosinreste für die jeweiligen Antikörper vom Nitro-(0.2)-BSA bis zum Nitro-(16.8)-BSA um etwa drei Größenordnungen parallel an. Für die untere Grafik in Abbildung 6.8 (unten) wurden die Affinitäten durch die jeweilige Anzahl von Nitrotyrosinresten im Molekül dividiert und auf diese Weise normiert. Der Anstieg dieser Konstanten mit X ist weitaus geringer ausgeprägt (Anstieg um eine Größenordnung). Dies zeigt, dass die Affinitätskonstanten der untersuchten Antikörper zu Nitroproteinen nicht nur durch die Anzahl, sondern auch die Lage der Nitrotyrosinreste im Molekül bestimmt werden. Weiterhin lässt der relativ geringe und kontinuierliche Anstieg der normierten Affinitäten mit X darauf schließen, dass monovalente Bindung zwischen Nitroproteinen und den Antikörpern beim kompetitiven Assay vorliegt, da bei einem Wechsel zu bivalenter Bindung ein sprunghafter Anstieg zu beobachten sein müsste [308].

Die gefundenen Werte liegen in guter Übereinstimmung mit verschiedenen Literaturdaten. Girault et al. [307] entwickelten den monoklonalen Antikörper 39B6 und charakterisierten ihn in einem indirekten kompetitiven Assay mit auf Mikrotiterplatten immobilisiertem TNM-nitriertem Ovalbumin mit 2 Nitrotyrosinresten pro Molekül. Für Konkurrenz mit Nitrotyrosin und Tyrosin ermittelten sie Testmittelpunkte von  $0.6 \mu\text{mol/L}$  bzw.  $0.5 \text{ mmol/L}$ . Die damit korrelierenden Affinitäten von  $2 \cdot 10^6 \text{ L/mol}$  für Nitrotyrosin und  $2 \cdot 10^3 \text{ L/mol}$  für Tyrosin liegen in guter Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit bestimmten Werten von  $3 \cdot 10^6 \text{ L/mol}$  für Nitrotyrosin bzw.  $6 \cdot 10^2 \text{ L/mol}$  für Tyrosin. Für einen anderen kommerziell erhältlichen monoklonalen Nitrotyrosin-Antikörper (Lot 14016, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA) ermittelten sie einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $80 \mu\text{mol/L}$ , entsprechend einer Affinität von  $10^4 \text{ L/mol}$ . Ein kommerziell erhältlicher polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen Nitrotyrosin (Lot 15274, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA) ergab einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $1 \mu\text{mol/L}$ , entsprechend einer Affinitätskonstante von  $10^6 \text{ L/mol}$ .

Khan et al. [121] charakterisierten einen polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen Nitrotyrosin, gewonnen durch Immunisierung mit nitriertem KLH (Upstate Biotechnology, TCS Biologicals, Bucks, U.K.) mittels indirektem kompetitiven Assay mit auf Mikrotiterplatten immobilisiertem Nitro-BSA, das drei bis sechs Nitrotyrosinreste enthielt. Für ungebundenes Nitrotyrosin berichteten sie einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $300 \mu\text{mol/L}$ . Dies würde einer Affinität von  $3 \cdot 10^3 \text{ L/mol}$  entsprechen, analog zur in dieser Arbeit bestimmten Affinität des mAk CAY, aber um eine Größenordnung niedriger als die Affinität des Kaninchen-Ak (diese Arbeit) und drei Größenordnungen niedriger als die Affinität des mAk 39B6. Für ein Tetrapeptid mit einem Nitrotyrosinrest (Gly-Gly-Ntyr-Arg) ermittelten sie einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $1 \mu\text{mol/L}$ , entsprechend einer Affinitätskonstante von  $10^6 \text{ L/mol}$  und in etwa gleich mit der Affinität, die in dieser Arbeit für den pAk Kanin-

chen zum Nitro-(1)-peptid bestimmt wurde. Für BSA und Humanserumalbumin (HSA), die jeweils drei bis sechs Nitrotyrosinreste pro Proteinmolekül enthielten, bestimmten sie einen  $IC_{50}$ -Wert von 17 nmol/L, entsprechend einer Affinitätskonstante von  $6 \cdot 10^7$  L/mol. Andere nitrierte Proteine (KLH, Fibrinogen, Pepsinogen,  $\alpha_1$ -Antiproteinase) ergaben  $IC_{50}$ -Werte zwischen 5 nmol/L (KLH) und 100 nmol/L ( $\alpha_1$ -Antiproteinase), entsprechend Affinitätskonstanten von  $1 \cdot 10^7$  bis  $2 \cdot 10^8$  L/mol. Daraus leiteten sie Unterschiede in der Bindung der untersuchten Antikörper an Nitrotyrosinreste in unterschiedlichen Proteinumgebungen ab.

Für Tyrosin, Phenylalanin, 4-Nitrophenylalanin, Aminotyrosin, Phosphotyrosin, Nitrit und Nitrat, sowie für Peroxynitrit-behandeltes Cystein, Methionin und Tryptophan (jeweils bis zu 10 mmol/L) beobachteten Khan et al. keine signifikanten Kreuzreaktivitäten. Bei einer Konzentration von 0.74 mmol/L führten sowohl BSA als auch HSA zu einer Inhibition von 22 %, welche sie der endogenen Nitrierung dieser Proteine zuschrieben.

Für den mAk SA100 (Klon HM12) berichteten ter Steege et al. [281] eine Nachweisgrenze von 0.2 nmol/L für Nitrotyrosinreste in Humanplasmaproteinen (Sandwich-Assay mit Klon HM12 als Fängerantikörper und biotinmarkiertem HM12 als zweitem Primärantikörper). Sie beobachteten Totalinhibition bei Nitrotyrosinkonzentrationen  $> 400 \mu\text{mol/L}$  und schlossen daraus auf eine wesentlich höhere Affinität des Antikörpers für gebundenes als für freies Nitrotyrosin. Beckman et al. [118] entwickelten einen monoklonalen Maus- und polyklonale Kaninchen-Antikörper gegen Nitrotyrosin. Für Anwendung dieser Antikörper im Immunostaining von Nitroproteinen in Humanewebe wurde Totalinhibition durch Nitrotyrosin (10 mmol/L) beobachtet, aber keine Inhibition durch Amino- oder Phosphotyrosin der gleichen Konzentration [118, 309].

### 6.3 Kreuzreaktivitäten der Nitrotyrosin-Antikörper

Molare Kreuzreaktivitäten von Testsubstanzen wurden berechnet, indem deren Affinitäten zur Affinität von 3-Nitrotyrosin (= 100-%-Wert) ins Verhältnis gesetzt wurden. Stellt man die erhaltenen Werte graphisch wie in Abbildung 6.9 dar, so kann man bestimmte Kreuzreaktivitätsmuster erkennen. Die Kreuzreaktivitäten von L-Tyrosin und 4-Nitrophenylalanin waren im Allgemeinen kleiner als 1 % und von 3,5-Dinitrotyrosin und 4-Nitrophenol kleiner als 10 % (ausgenommen Ziege: 40 %). Die Kreuzreaktivitäten von 2,4-Dinitrophenol, 6-Nitro-m-kresol, 2-Nitro-p-kresol und 2-Nitrophenol lagen typischerweise in der Größenordnung von  $10^2$ - $10^3$  % (ausgenommen 39B6:  $3 \cdot 10^4$  %). Die Kreuzreaktivitäten niedrig nitrierter BSA-Standards zeigten eine stetige Zunahme mit der Anzahl an Nitrotyrosinresten pro Proteinmolekül, von 1-10 % für Nitro-( $<0.1$ -

BSA bis  $10^2$  -  $10^3$  % für Nitro-(1.6)-BSA. Die Kreuzreaktivitäten hoch nitrierter BSA-Standards und des Nitro-(1)-peptids lagen typischerweise im Bereich von  $10^3$  -  $10^5$  %.

Die Unterschiede der Kreuzreaktivitäten des Nitro-(1)-peptids und unterschiedlich hoch nitrierter BSA-Standards liegen meist innerhalb einer Größenordnung. Dies zeigt, dass die Nitrotyrosin-Antikörper in Lösung ausschließlich monovalent an Nitroproteine binden, unabhängig von der Anzahl der Nitrotyrosinreste pro Molekül. An das nur eine Nitrogruppe tragende Nitro-(1)-peptid können die Antikörper nicht bivalent binden, und für hoch nitrierte BSA-Standards mit bis zu 17 Nitrotyrosinresten sollte ein Wechsel vom monovalenten zum bivalenten Bindungsmodus zu einem scharf getrennten, stufenartigen Anstieg der Kreuzreaktivität um mehrere Größenordnungen führen [308].

Aufgrund der hohen Affinität von 39B6 zu Nitrotyrosin sind die beobachteten Kreuzreaktivitäten relativ niedriger als z.B. für den Antikörper CAY, welcher eine um drei Größenordnungen geringere Affinität zu 3-Nitrotyrosin besitzt. Die Kreuzreaktivitäten für das im Mittel weniger als einen Nitrotyrosinrest enthaltende Nitro-(0.6)-BSA liegen mit einer Ausnahme für alle Antikörper niedriger als 100%. Nur beim Kaninchen-Antikörper wurden 340 % ermittelt; die absolute Affinität ist jedoch mit  $1.2 \cdot 10^5$  L/mol noch immer eine Größenordnung niedriger als die entsprechenden Affinitäten der Antikörper von Schaf, Ziege oder des mAk 39B6. Die Kreuzreaktivität von Nitro-(0.2)-BSA liegt für alle untersuchten Antikörper einheitlich niedriger als 100 %.

Die ermittelten Kreuzreaktivitäten im Einzelnen sind im Anhang in Tabelle 9.15 aufgelistet. Der mAk CAY wurde zusätzlich auf einige weitere Substanzen untersucht. Die ermittelten Kreuzreaktivitäten sind im Anhang in Tabelle 9.14 angegeben. Die Substanzen 2- und 4-Nitrotoluol, Nitrobenzol und Phenol wurden mit CAY getestet, ergaben jedoch sehr geringe bzw. nicht messbare Kreuzreaktionen.

Für einige niedermolekulare Substanzen wie z.B. für 2-Nitro-p-kresol mit großer struktureller Ähnlichkeit zu Nitrotyrosin, aber ohne geladene Gruppen, wurden speziell mit mAk 39B6 besonders hohe Kreuzreaktivitäten gemessen. Um das Risiko einer Störung der nichtkompetitiven Immunoassays in dieser Arbeit durch derartige Substanzen zu überprüfen, wurden 2-Nitrophenol, 2-Nitro-p-kresol, 6-Nitro-m-kresol und 2,4-Dinitrophenol in den Konzentrationsbereichen von  $1 \mu\text{g/L}$  bis  $1 \text{g/L}$  in PBS und in PBS mit  $0.1 \text{g/L}$  BSA (Matrixsimulation) auf Mikrotiterplatten inkubiert und anschließend einseitige Tests mit dem mAk 39B6 durchgeführt. Dabei wurde keine Signalerhöhung durch die inkubierten niedermolekularen Substanzen im Vergleich zum Blindwert detektiert. Deshalb wurde die Möglichkeit einer Störung der einseitigen Tests durch Kreuzreaktionen dieser Substanzen weitgehend ausgeschlossen. In Sandwich-Assays ist aufgrund

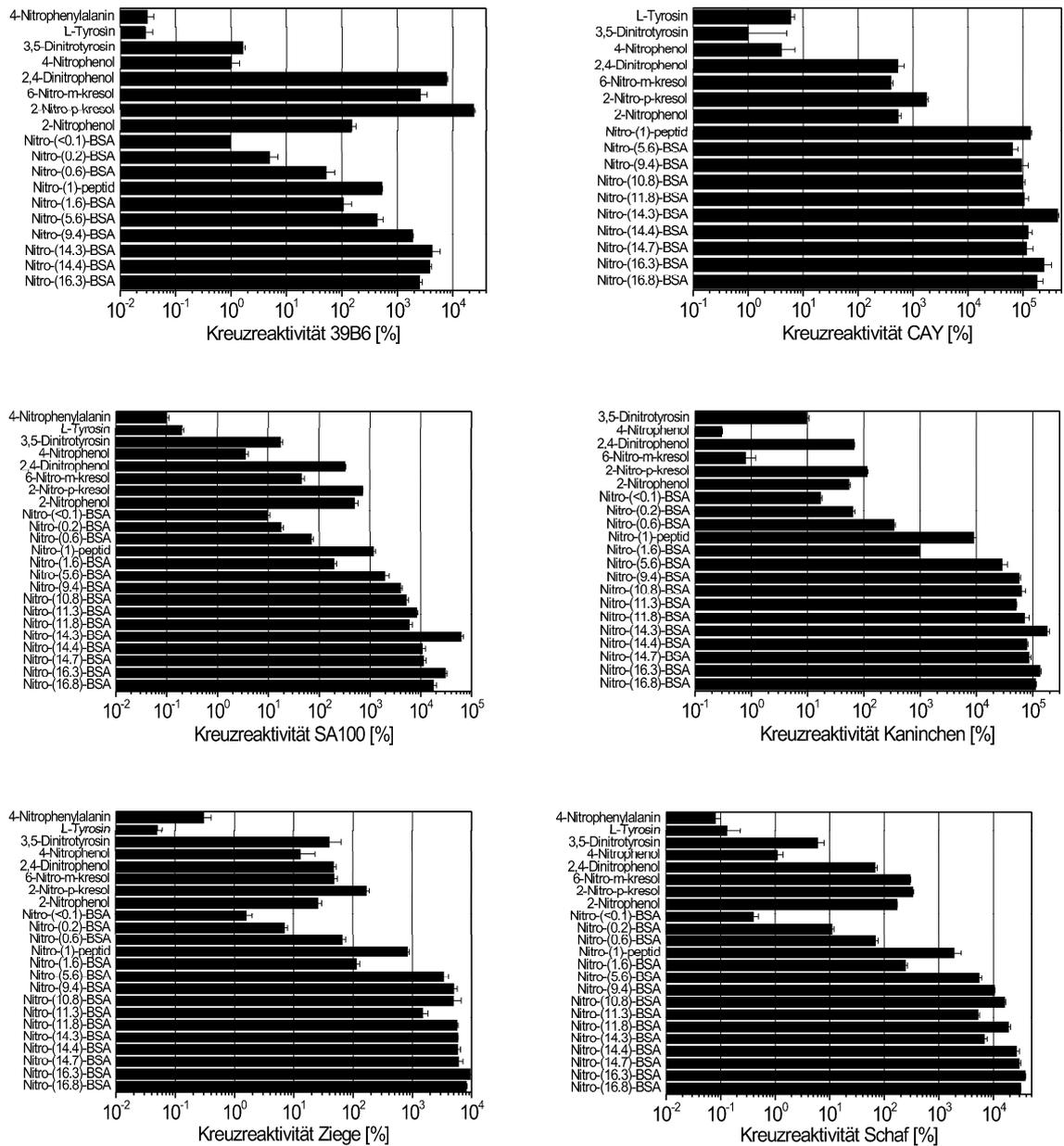


Abbildung 6.9: Kreuzreaktivitäten der Antikörper 39B6, CAY, SA100, Kaninchen, Ziege und Schaf (Nitrotyrosin = 100 %-Wert).

des fehlenden zweiten Epitopes bei den Nitrophenolen bzw. -kresolen und der sterischen Verhältnisse ebenfalls nicht mit einer Störung der Assays zu rechnen.

## 6.4 Einseitige Tests für Nitroproteine

Die optimierten Nachweisgrenzen der einseitigen Tests für Nitro-(14.3)-BSA wurden mittels der 5% Methode bestimmt und sind in Tabelle 6.2 aufgelistet. Für die Berechnung wurde dabei zum Wert der unteren Asymptote der sigmoidalen Fitkurven 5% der Differenz zwischen der oberen und der unteren Asymptote des sigmoidalen Fits addiert und diese Summe in die Kalibrierfunktion eingesetzt. Die Steigung der sigmoidalen Kurven am Testmittelpunkt wurde mit 1 fixiert. Dadurch wurden die Kalibrierungen robuster gegenüber einzelnen Ausreißern und waren besser geeignet zum Vergleich von verschiedenen Antikörpern.

**Tabelle 6.2:** Übersicht über optimierte Antikörper-Verdünnungen und Nachweisgrenzen der einseitigen Tests für Nitro-(14.3)-BSA (5%-Methode).

	Verdünnungen		NWG [nmol/L]
	Nitrotyrosin-Ak	Sekundär-Ak	
CAY	1 : 500	1 : 20 000	0.11
SA100	1 : 500	1 : 10 000	0.96
39B6	1 : 5000	1 : 20 000	0.15
Kaninchen	1 : 500	1 : 20 000	0.35
Ziege	1 : 500	1 : 10 000	0.04
Schaf	1 : 2500	1 : 10 000	0.05

Wie in Tabelle 6.2 abzulesen, mussten die monoklonalen Antikörper CAY und SA100 in relativ hohen Konzentrationen eingesetzt werden (Verdünnung 1 : 500, entspricht ca. 1 mg/L), um die optimalen Nachweisgrenzen von 0.11 bzw. 1.0 nmol/L für Nitro-(14.3)-BSA zu erhalten. Mit dem mAk 39B6 konnte mit einer zehnfach stärkeren Verdünnung eine Nachweisgrenze in der Größenordnung des CAY-Antikörper und um eine Größenordnung niedriger als mit SA100 erreicht werden. Die polyklonalen Antikörper von Schaf und Ziege erlaubten noch niedrigere Nachweisgrenzen von 0.05 bzw. 0.08 nmol/L bei

analogen Verdünnungen (1:5000 für das Ziegenserum und 1:2500 für das als 1:1 PBS-Vorverdünnung gelieferte Schafserum). Eine zehnfache Konzentrationserhöhung für den Ziege-Ak (Verdünnung 1:500) reduzierte die Nachweisgrenze weiter um den Faktor 2 auf 0.04 nmol/L. Beim Schaf-Ak führte jedoch eine Erhöhung der Konzentration (Verdünnung 1:500) aufgrund der gleichzeitigen Zunahme unspezifischer Antikörperbindung zu einer erhöhten Nachweisgrenze (0.3 nmol/L).

**Tabelle 6.3:** Übersicht über die Nachweisgrenzen von Nitro-BSA-Standards mit unterschiedlicher Anzahl an Nitrotyrosinresten pro Proteinmolekül ( $X$ ) in einseitigen Immunoassays mit den untersuchten Antikörpern (5 %-Methode).

X	NWG für Nitroproteine [nmol/L]					
	Schaf	Ziege	Kan	SA100	39B6	CAY
0.2	2.73	1.05	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
0.6	1.19	0.99	3.46	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	8.64
1.6	0.82	0.72	2.29	6.47	1.10	4.12
5.6	0.12	0.23	1.41	1.86	1.10	1.67
9.4	0.01	0.10	0.13	1.27	0.67	1.29
16.8	0.01	0.06	0.34	0.46	0.34	0.50

<sup>1</sup>kein signifikantes Signal über der Nachweisgrenze detektiert

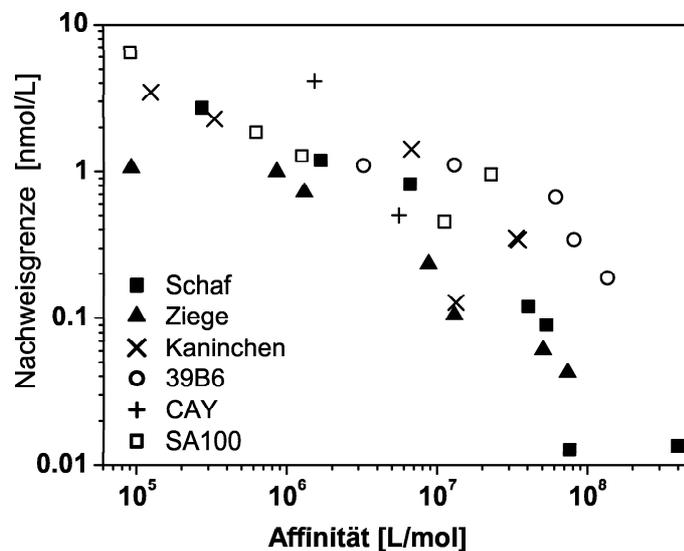
In Tabelle 6.3 sind die Nachweisgrenzen für verschiedene Nitro-BSA-Standards im einseitigen Assay mit den verschiedenen Antikörpern aufgelistet. Für jeweils einen bestimmten Antikörper wurde für verschiedene Nitro-BSA-Standards bei einem Anstieg von  $X$  von 0.2 bis 16.8 eine Erniedrigung der Nachweisgrenze um bis zu zwei Größenordnungen erhalten. Nitro-(0.2)-BSA konnte nur mit den pAk von Schaf und Ziege detektiert werden, Nitro-(0.6)-BSA mit allen polyklonalen Antikörpern und mit CAY. Für die jeweiligen Standards variierten die Nachweisgrenzen mit verschiedenen Antikörpern ebenso um zwei Größenordnungen. Die beobachteten Verschiebungen sind konsistent mit dem Anstieg der Affinitäten und der erwähnten monovalenten Bindung zwischen Nitroprotein- und Antikörpermolekülen. In Abbildung 6.10 sind die ermittelten Nachweisgrenzen der Nitro-BSA-Standards gegen die Affinitäten der untersuchten Antikörper aufgetragen. Die Grafik zeigt einen indirekten Zusammenhang zwischen den beiden Parametern.

**Tabelle 6.4:** Nachweisgrenzen von Nitrotyrosinresten verschiedener Nitro-BSA-Standards mit unterschiedlicher Anzahl an Nitrotyrosinresten (X) in den einseitigen Immunoassays (5%-Methode).

X	NWG für Nitrotyrosinreste [ $\mu\text{mol/L}$ ]					
	Schaf	Ziege	Kan	SA100	39B6	CAY
0.2	0.5	0.2	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>
0.6	0.7	0.6	2.1	n.d. <sup>1</sup>	n.d. <sup>1</sup>	5.2
1.6	1.3	1.2	3.7	10.4	1.8	6.6
5.6	0.7	1.3	7.9	10.4	6.2	9.4
9.4	0.1	1.0	1.2	11.9	6.3	12.1
16.8	0.2	1.0	5.6	7.5	5.6	8.2
MW	0.6	0.9	4.1	10.0	5.0	8.3
1s	0.4	0.4	2.7	1.9	2.2	2.7

<sup>1</sup>kein signifikantes Signal über der Nachweisgrenze detektiert

Durch Multiplikation mit X können die Nachweisgrenzen der Nitro-BSA-Standards aus Tabelle 6.3 in effektive Nachweisgrenzen für die enthaltenen Nitrotyrosinreste in den Nitroproteinmolekülen umgerechnet werden (Tabelle 6.4). Diese effektiven Nachweisgrenzen für Nitrotyrosinreste zeigen keine systematische Korrelation mit X, d.h. sie können als weitgehend unabhängig vom Nitrierungsgrad der Proteine betrachtet werden. Die relativen Standardabweichungen von 20-60% können auf die experimentellen Schwankungen der einseitigen Tests mit unterschiedlichen Antikörpern, Standardsubstanzen und MTP zurückgeführt werden. Die Mittelwerte der effektiven Nachweisgrenzen für Nitrotyrosinreste stehen nicht in unmittelbarer Korrelation zu den korrespondierenden Affinitäten der Antikörper. Alle untersuchten polyklonalen Antikörper zeigten niedrigere Nachweisgrenzen für Nitrotyrosinreste als die untersuchten mAks (Tabelle 6.4), obwohl z.B. der mAks 39B6 höhere Affinitäten für hoch nitrierte Proteine, Nitro-(1)-peptid und freies Nitrotyrosin besitzt als die polyklonalen Antikörper von Kaninchen (Abbildung 6.6). Offensichtlich hängen die Nachweisgrenzen der einseitigen Tests nicht nur von den Affinitäten, sondern auch von der Multispezifität der verwendeten Antikörper ab, die für polyklonale Antikörper naturgemäß höher als für monoklonale Antikörper ist.



**Abbildung 6.10:** Grafische Darstellung der Nachweisgrenzen der untersuchten Nitro-BSA-Standards (bestimmt in einseitigen Immunoassays), aufgetragen gegen die korrespondierenden Affinitäten der verwendeten Antikörper (bestimmt in den indirekten kompetitiven Immunoassays).

## 6.5 Sandwich-Assays für Nitroproteine

Sandwich-Immunoassays für Nitroproteine wurden mit den pAk Schaf und Ziege und den mAk 39B6 und CAY entwickelt. Der mAk CAY war nicht als Fängerantikörper geeignet. Weiterhin waren Sandwich-Kombinationen von Schaf mit Ziege aufgrund von hohen Hintergrundsignalen nicht möglich, was auf die große Ähnlichkeit der IgG-Moleküle der beiden Spezies zurückzuführen ist (Kreuzreaktion von Anti-Ziege-IgG-Antikörpern mit Schafserum bzw. von Anti-Schaf-IgG-Antikörpern mit Ziegenserum). Die erfolgreichen Antikörperkombinationen, optimierten Verdünnungen und Nachweisgrenzen für Nitro-(14.3)-BSA sind in Tabelle 6.5 angegeben. Die niedrigste Nachweisgrenze wurde mit der Kombination pAk Schaf als Fängerantikörper und mAk 39B6 als zweitem Primärantikörper erreicht (0.3 nmol/L). Schaf war als Fänger-Ak am besten geeignet, gefolgt von Ziege (NWG  $\leq 1$  nmol/L). Der monoklonale Antikörper 39B6 gab dabei bei Verwendung als zweiter Primärantikörper bessere Nachweisgrenzen als mAk CAY. 39B6 war ebenso als Fänger-Ak geeignet, jedoch aufgrund der geringeren Multispezifität weniger effizient (NWG  $> 2$  nmol/L).

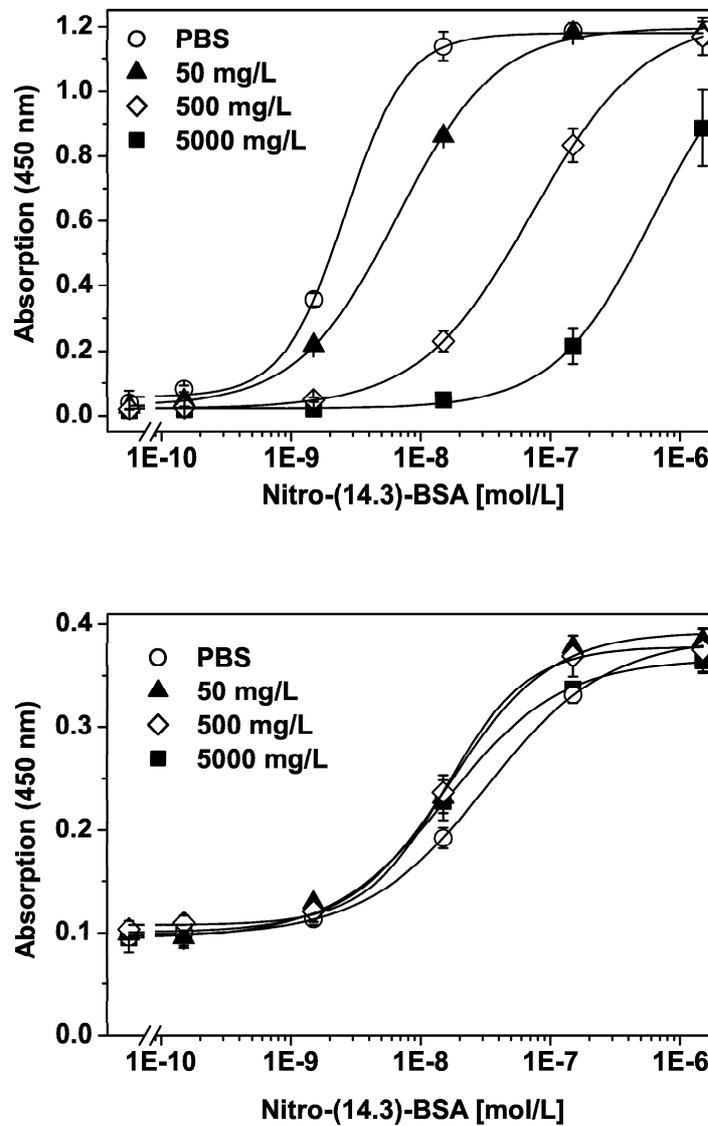
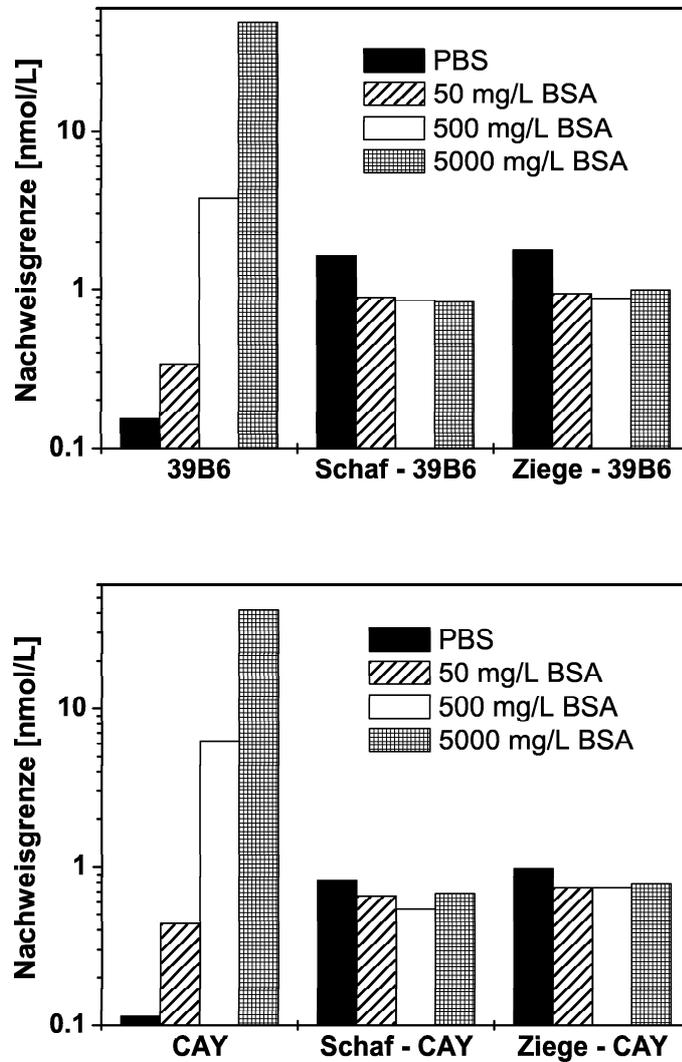


Abbildung 6.11: Kalibrierkurven des einseitigen nichtkompetitiven Immunoassay mit mAk 39B6 (oben) und des Sandwich-Assay Schaf-39B6 (unten) mit Nitro-(14.3)-BSA in PBS mit unterschiedlich hohen BSA-Zusätzen (0, 50, 500 und 5000 mg/L).



**Abbildung 6.12:** Nachweisgrenzen des nichtkompetitiven Immunoassays mit mAk 39B6, der Sandwich-Assays Schaf-39B6 und Ziege-39B6 (oben), des einseitigen Assays mit mAk CAY und der Sandwich-Assays Schaf-CAY und Ziege-CAY (unten) mit Nitro-(14.3)-BSA in PBS mit unterschiedlich hohen BSA-Zusätzen (0, 50, 500 und 5000 mg/L).

**Tabelle 6.5:** *Optimierte Verdünnungen der Sandwich-Immunoassays und Nachweisgrenzen für Nitro-(14.3)-BSA (5 %-Methode).*

Fänger-Ak	2. Primär-Ak	POD-Konjugat	NWG [nmol/L]
Schaf	39B6	Anti-Maus-IgG, 1 : 30 000	0.3
	CAY	Anti-Maus-IgG	0.5
Ziege	39B6	Anti-Maus-IgG, 1 : 30 000	0.7
	CAY	Anti-Maus-IgG	1.0
39B6	Ziege	Anti-Ziege-IgG, 1 : 10 000	2.5
	Schaf	Anti-Schaf-IgG	5.9

Die Robustheit der entwickelten Sandwich-Assays gegenüber Matrixeffekten wurde durch Kalibrierung mit Nitro-(14.3)-BSA in PBS und mit Nitro-(14.3)-BSA in PBS mit unterschiedlichen BSA-Konzentrationen (50, 500 und 5000 mg/L) gezeigt. Im Gegensatz zu den einseitigen Assays, mit denen analoge Kalibrierungen durchgeführt wurden, wurden die Sandwich-Assays nicht durch kompetitive Adsorption an die MTP-Oberfläche beeinträchtigt. Abbildung 6.11 zeigt im direkten Vergleich Kalibrierkurven für den einseitigen Assay mit 39B6 und den Sandwich-Assay mit Schaf-39B6. Während die Kalibrierkurven des einseitigen Tests eine ausgeprägte Verschiebung des Testmittelpunktes zu höheren Nitro-(14.3)-BSA-Konzentrationen bei Erhöhung der zugesetzten BSA-Menge zeigten (statistische Verdünnung des Nitroproteins), hatte dieser Zusatz beim Sandwich-Assay keinen signifikanten Einfluss auf die Kurven. Die Verschiebung der Testmittelpunkte bei den einseitigen Tests war in etwa proportional zum Anstieg der BSA-Konzentration. Der korrespondierende Anstieg der Nachweisgrenzen für Nitro-(14.3)-BSA ist für diese und analoge Experimente mit pAk Ziege bzw. mAk CAY in Abbildung 6.12 illustriert. Die Nachweisgrenzen für die Sandwich-Assays bleiben konstant niedrig. Sie sind sogar in reinem Puffer etwas höher als in PBS mit BSA, was auf den verstärkten Blocking-Effekt durch das zugesetzte BSA zurückgeführt werden kann. Daher erlauben die entwickelten Sandwich-Immunoassays die Detektion von Spuren hochnitrierter Nitroproteine in Proben mit einem hohen Überschuss an nicht nitrierten Proteinen, ein Nitrierungsmuster wie es z.B. für biologische Proben oder Umweltproben mit groben Aerosol- oder Straßenstaubpartikeln zu erwarten ist. Voraussetzung für die Detektion im Sandwich-Assay ist jedoch eine zumindest zweifache Nitrierung der Proteine. Weiterhin ist zu beachten, dass die erzielten Nachweisgrenzen für Nitro-(14.3)-BSA

im Sandwich-Assay (Schaf-39B6) um Faktor sechs höher liegen als in den einseitigen Assays mit pAk Schaf (0.05 nmol/L).

## 6.6 Ergebnisse der Nitroproteinmessungen in Umweltproben

29 Umweltproben wurden mit mAk 39B6 im einseitigen Assay und in den Sandwich-Assays Schaf-39B6 und Ziege-39B6 gemessen: 16 Straßenstaubproben, fünf Filterproben vom Hochdurchsatz-Filtersammler (PM2.5), zwei Filterproben eines Niedrigdurchsatz-Sammlers (TSP), fünf Fensterstaubproben und eine Probe eines Lufterlassfilters der Frischluftversorgung des Klinikums München-Großhadern. In zehn der 29 untersuchten Proben wurden dabei Nitroproteine gefunden, neun Proben wurden im einseitigen Test positiv getestet und fünf Proben in den Sandwich-Assays. Sieben dieser positiv getesteten Proben wurden zusätzlich in einseitigen Assays mit den pAk Schaf und Ziege untersucht und ebenfalls Nitroproteine detektiert. Die Einzelwerte sind in Tabelle 6.6 aufgelistet. Von sieben positiven Proben wurde mittels BCA-Assay der Proteingehalt bestimmt und Proteinnitrierungsgrade aus dem Verhältnis von Nitro-(14.3)-BSA-Äquivalentkonzentration und Gesamtproteinkonzentration berechnet (Tabelle 6.7). Die Nachweisgrenzen wurden mittels der  $3s_B$ -Methode durch Einsetzen der Summe aus Mittelwert und der dreifachen Standardabweichung von bis zu 48 PBS-Blindwerten je MTP in die Kalibrierfunktion errechnet. Dies erwies sich als besser geeignet für die Auswertung einzelner Immunoassays mit den spezifischen Schwankungen der individuellen Mikrotiterplatten. Die statistisch verteilte hohe Anzahl an Blindwerten ermöglichte dabei, Trends auf einzelnen Platten zu erkennen und bei Bedarf zu korrigieren.

Die im einseitigen Assay mit mAk 39B6 bestimmten Nitro-(14.3)-BSA-Äquivalentkonzentrationen betragen für die Filterprobe LKP-7 7.4 mg/kg, für die Fensterstaubproben (alle positiv getestet) 0.12-1.5 mg/kg und für den Straßenstaub 0.05-0.29 mg/kg. Alle Ergebnisse wurden mittels kompetitiver Inhibition mit Nitrotyrosin (0.1 mol/L, PBS) verifiziert (Abbildung 6.13). Die in einseitigen Tests mit pAk von Schaf und Ziege bestimmten Nitro-(14.3)-BSA-Äquivalentkonzentrationen lagen einheitlich höher. Diese betragen für die Fensterstaubproben 8-11 mg/kg (Ziege) bzw. 13-17 mg/kg (Schaf) und 1.2-2.1 mg/kg (Ziege) bzw. 1.6-4.2 mg/kg (Schaf) für Straßenstaubproben. Diese höheren Konzentrationen sind durch die Multispezifität der polyklonalen Antikörper bedingt, die im Gegensatz zu monoklonalen Antikörpern eine größere Vielfalt unterschiedlicher Nitroproteine binden können und dadurch höhere Konzentrationen als Ergebnis liefern.

**Tabelle 6.6:** Übersicht über Nitro-(14.3)-BSA-Äquivalentkonzentrationen [mg/kg] in positiv getesteten Umweltproben (einseitige Assays und Sandwich-Assays).

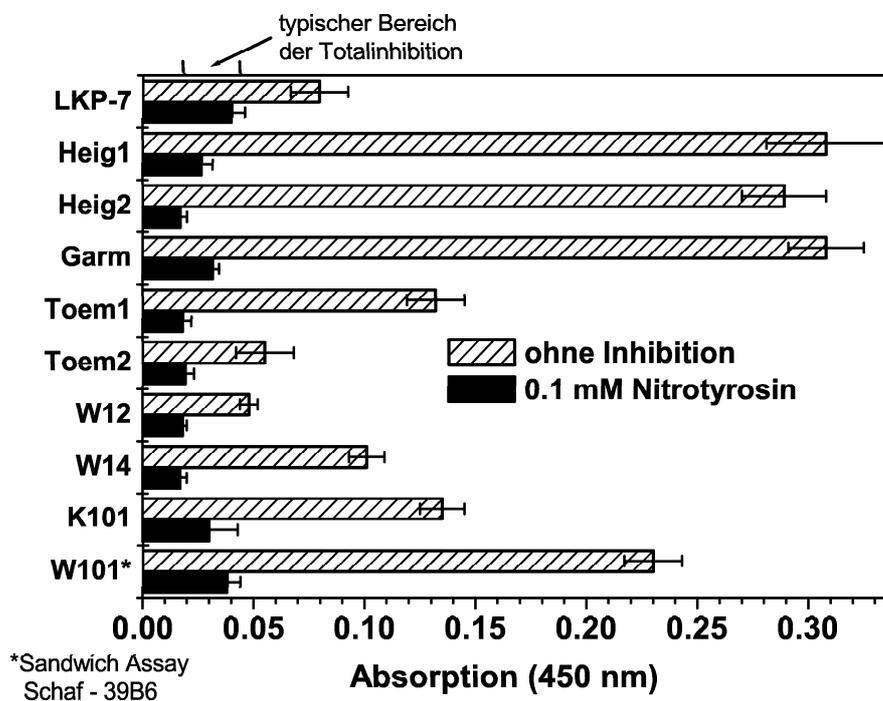
Proben- bezeichnung	Datum	Probenart	Nitroproteingehalt <sup>1</sup> [mg/kg]					
			einseitige Assays			Sandwich		
			39B6	Ziege	Schaf	Ziege	Schaf	
						-39B6	-39B6	
LKP-7	04/01	PM2.5	7.43	- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>	n.d. <sup>3</sup>	n.d. <sup>3</sup>	
Heig1	06/01	{ Staub von Fenstern u. Eingangstür siehe Tabelle 3.2	1.49	- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>	n.d. <sup>3</sup>	n.d. <sup>3</sup>	
IHeig2	06/01		0.65	11.0	15.7	n.d. <sup>3</sup>	n.d. <sup>3</sup>	
Garm	06/01		1.43	- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>	n.d. <sup>3</sup>	n.d. <sup>3</sup>	
Toem1	09/03		1.19	8.2	13.1	10.3	23.2	
Toem2	09/03		0.12	8.3	17.2	2.5	6.0	
W12	05/00	{ Straßenstaub < 63 $\mu\text{m}$	0.05	2.1	4.2	n.d. <sup>3</sup>	n.d. <sup>3</sup>	
W14	06/00		0.13	2.1	3.9	1.6	n.d. <sup>3</sup>	
W101	05/01	{ Straßenstaub 63 - 125 $\mu\text{m}$	n.d. <sup>3</sup>	1.3	1.6	4.1	10.2	
K101	05/01		0.29	1.2	1.6	13.8	42.2	

<sup>1</sup>Nitro-(14.3)-BSA-Äquivalentkonzentration

<sup>2</sup>kein Wert verfügbar

<sup>3</sup>kein signifikantes Signal über der Nachweisgrenze detektiert

Die bestimmten Konzentrationen in den Sandwich-Assays reichten von 1.6 bis 42 mg/kg (Straßenstaub) und von 2.5 bis 23 mg/kg (Fensterstaubproben) und lagen damit meist höher als die bestimmten Konzentrationen in den einseitigen Assays. Der bei den einseitigen Assays beobachtete Verdünnungseffekt während des Beschichtungsprozesses auf der MTP bewirkt hierbei für Proben mit hoher Proteinmatrix eine Verringerung der ermittelten Nitroproteingehalte im einseitigen Assay (Abbildungen 6.11 und 6.12). Die Sandwich-Assays bleiben unbeeinflusst von der Proteinmatrix und sind auch



**Abbildung 6.13:** Signalintensitäten (Lichtabsorption bei 450 nm) der positiv auf Nitroproteine getesteten Proben im einseitigen Assay mit mAk 39B6 (W101: Sandwich-Assay Schaf-39B6) ohne und mit kompetitiver Inhibition durch Nitrotyrosin (0.1 mmol/L). Darstellung von Median und Spannweite der Dreifachbestimmungen.

bei hohen Gesamtproteinkonzentrationen zur Messung von mehrfachnitrierten Proteinen gut geeignet. Bei fünf im einseitigen Assay positiv getesteten Proben wurden in den Sandwich-Assays keine mehrfachnitrierten Proteine gefunden (Tabelle 6.6).

Die mittels BCA-Assay bestimmten Gesamtproteinkonzentrationen sind in Tabelle 6.7 zusammen mit den daraus berechneten Proteinnitrierungsgraden aufgelistet. Für die meisten Proben und Assays lagen diese Nitrierungsgrade niedriger als 1%. Bei den Straßenstaubproben W12 und W14 (Fraktion < 63  $\mu\text{m}$ ) stiegen die Nitrierungsgrade im einseitigen Assay mit pAk Schaf auf 3-5% an; bei diesen Proben war die Bezugsgröße Gesamtprotein sehr niedrig und der relative Nitroproteingehalt erhöht. Im Sandwich-Assay wurde bei diesen Proben kein Nitroprotein detektiert. Ein analoges Ergebnis ergab die Untersuchung von PM<sub>2.5</sub>: Für die Probe LKP-7 wurde im einseitigen Assay ein PNG von 0.04% ermittelt, in den Sandwich-Assays konnten jedoch keine Nitroproteine detek-

**Tabelle 6.7:** Übersicht über die Proteingehalte der untersuchten Umweltproben und die daraus mit den Werten aus Tabelle 6.6 errechneten Proteinnitrierungsgrade (einseitige und Sandwich-Assays).

Probe	Protein [mg/kg]	Proteinnitrierungsgrad [%]				
		einseitige Assays			Sandwich-Assays	
		39B6	Ziege	Schaf	Ziege-39B6	Schaf-39B6
LKP-7	21000	0.04	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	n.d. <sup>2</sup>	n.d. <sup>2</sup>
Heig2	4426	0.01	0.25	0.36	n.d. <sup>2</sup>	n.d. <sup>2</sup>
Toem1	1848	0.06	0.44	0.71	0.56	1.25
Toem2	2141	0.01	0.39	0.80	0.12	0.28
W12	80	0.06	2.66	5.31	n.d. <sup>2</sup>	n.d. <sup>2</sup>
W14	140	0.10	1.47	2.81	1.14	n.d. <sup>2</sup>
W101	1399	n.d.	0.10	0.12	0.29	0.73
K101	1657	0.02	0.07	0.09	0.83	2.55

<sup>1</sup>kein Wert verfügbar

<sup>2</sup>kein signifikantes Signal über der Nachweisgrenze detektiert

tiert werden. Das zeigt, dass diese Feinstaubproben relativ gleichmäßig nitriert waren und Proteine mit einem (oder wenigen, für die Antikörperbindung nicht alle gleichzeitig zugänglichen) Nitrotyrosinresten enthielten, aber kaum höhernitrierte Proteine. Die Straßenstaubproben der Fraktion 63-125  $\mu\text{m}$  zeigten hingegen in den Sandwich-Assays um ein bis zwei Größenordnungen höhere Proteinnitrierungsgrade als in den einseitigen Assays. Diese Proben enthielten damit insgesamt wenig Nitroproteine, die dafür jedoch mehrfach nitriert waren. Das kleinere Oberfläche/Volumen-Verhältnis dieser größeren Partikel könnte dabei eine wichtige Rolle spielen.

## 6.7 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen zur Messung von Nitroproteinen mittels Immunoassays

Mit den entwickelten Immunoassays konnten erstmalig nitrierte Proteine in Umweltproben im mg/kg-Konzentrationsbereich (Staub bzw. abgeschiedene Partikelmasse) nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass die Nitrierung von Proteinen durch atmosphärische Spurenstoffe nicht allein eine Entdeckung von akademischem Wert ist, sondern regelmäßig und häufig in der Umwelt auftritt. Die Ergebnisse zeigen auch den enormen Fortschritt zu früheren Ergebnissen [290], in denen die Detektion von Nitroproteinen in Umweltproben im einseitigen Assay mit dem niedrigaffinen CAY-Antikörper nicht erfolgreich war. Die entwickelten Immunoassays sind schnell und einfach für eine große Anzahl an Proben einsetzbar, die erhaltenen Ergebnisse werden jedoch methodisch bedingt stets semiquantitativ bleiben. Für genaue Quantifizierungen sind instrumentelle Methoden wie HPLC-FD von hydrolysierten, OPA oder NBD-F-derivatisierten Proben und GC-MS mit *Negativ Ion Chemical Ionisation* (NICI) besser geeignet und werden im Augenblick am IWC entwickelt. Bei diesen Methoden müssen jedoch spezielle Vorkehrungen getroffen werden, um Artefaktbildungen zu vermeiden, die durch Nitrierung der Proben während der Hydrolyse durch RNS aus evtl. vorhandenem Nitrat, Nitrit, Nitroverbindungen und der verwendeten Säuren auftreten könnten.

# 7 Ergebnisse der Untersuchungen zur Nitrierung von Proteinen durch Begasung

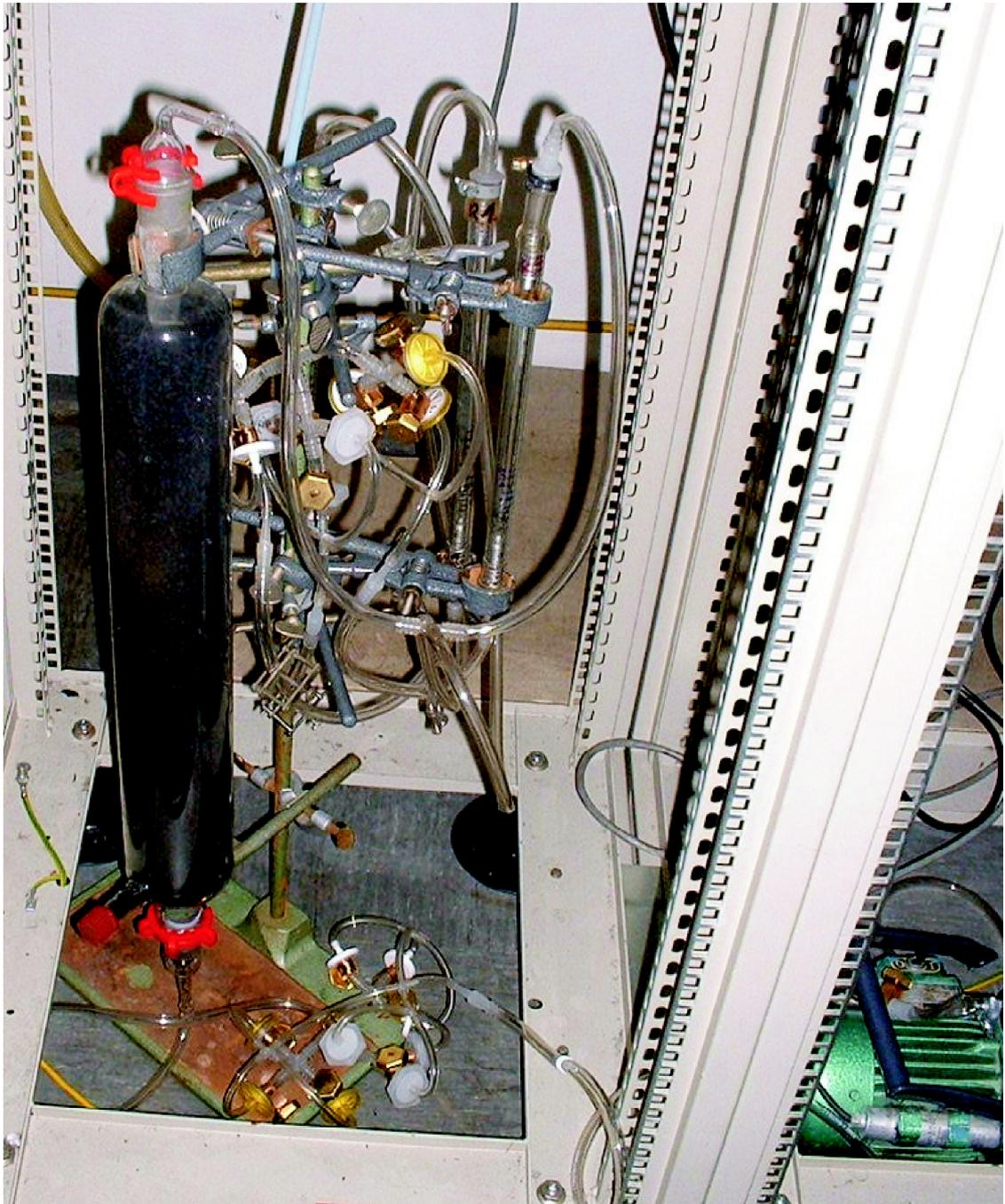
## 7.1 Berechnung von Nitrierungsgraden

Der Proteinnitrierungsgrad (PNG) gibt das Verhältnis der Masse von detektierbarem Nitroprotein, bestimmt im einseitigen Immunoassay mit mAk CAY und berechnet als Nitro-(14.3)-BSA-Äquivalentkonzentration, zur Gesamtproteinmasse an. Als Gesamtproteinmasse wurde für BSA- und BPE-belegte Filter einheitlich verwendet.

## 7.2 Begasung mit Umgebungsluft

### 7.2.1 Proteinwiederfindung

Die Wiederfindungen der an Umgebungsluft exponierten Proteinproben bzgl. Gesamtprotein und Bet v 1 wurden als Verhältnis der wiedergefundenen zur eingesetzten Substanz berechnet. Abbildung 7.2 zeigt die über 4 bzw. 5 Versuchsreihen gemittelten Daten der Wiederfindungen von BSA im BCA-Assay und Abbildung 7.3 die Wiederfindungen von Bet v 1 im Bet v 1-Sandwich-Immunoassay. Für beide Parameter und Assays wurden generell abnehmende Konzentrationen in der Reihenfolge Blindprobe im Kühlschrank (nicht bestrahlt), Blindprobe im aktivkohlegereinigten Gasstrom und umgebungsluftexponierte Probe gemessen. So sinkt z.B. die Wiederfindung von BSA auf regenerierter Cellulose in dieser Reihenfolge von 68 auf 52 bzw. 42% am LKP und von 68 auf 60 bzw. 34% in Großhadern. Als mögliche Ursachen für diesen Trend werden Proteinabbauprozesse durch Oxidation und Reaktion mit reaktiven Spurensubstanzen wie Ozon, NO<sub>3</sub>, Peroxyacetylnitrat u.ä. vermutet. Vermutlich spielen die beobachteten Effekte der



**Abbildung 7.1:** Versuchsaufbau zur Begasung von Proteinproben auf Spritzenfiltern mit Umgebungsluft im Messcontainer am LKP. Zu erkennen sind die beströmten Spritzenfilter, der mit Aktivkohle gefüllte Diffusionsdenuder (links), die drei Rotameter mit identischem Durchfluss und die Pumpe (rechts).

verringerten Proteinwiederfindung nach Beströmung der Proben auch als Artefakte bei der Bestimmung von Proteinkonzentrationen in atmosphärischen Aerosolpartikeln eine Rolle, obwohl die Sammelzeiten mit ein bis drei Tagen dort meist deutlich kürzer waren.

Die Wiederfindungen auf CA sind für alle Versuchsreihen höher als auf RC und diese wiederum höher als auf Glasfaserfiltern. Für Glasfaser und Quarz wurden schon bei der Untersuchung der Rundfilter mit 150 mm Durchmesser zur Probenahme im HVS (Abschnitt 4.1.2) hohe Adsorptionsverluste von BSA an die hydrophile Oberfläche beobachtet. Die Verluste in der Wiederfindung sind am LKP mit hohen verkehrsbedingten Emissionen größer als im suburbanen Großhadern. Besonders stark ausgeprägt sind die Unterschiede bei den Bet v 1-Wiederfindungen. Während in Großhadern für die Blindproben im Gasstrom 15-50 % des Bet v 1 wiedergefunden wurde (6-12 % für die exponierten Proben), so nahm die Wiederfindung am LKP rasch auf 5-12 % bzw. 3-6 % für Blind- und begaste Proben ab. Die Wiederfindungen sind damit deutlich niedriger als im BCA-Assay für BSA, da Sandwich-Immunoassays generell bereits durch eine leicht veränderte Tertiärstruktur aufgrund chemischer Modifikation des Zielproteins (Bet v 1) gestört werden.

Die höhere gefundene Proteinmenge für die am LKP exponierten Filter im Vergleich zu den dortigen Blindfiltern ist durch das Ansammeln von TSP auf den Filtern zu erklären und stammt damit also von zusätzlichem Protein, das bei der ursprünglichen Belegung der Filter nicht vorhanden war (vgl. Tabelle 7.1). Die Akkumulation von neuem Protein überwog dabei den Proteinabbau. Da bei allen Versuchen stets drei Filter parallel (belegt mit BSA- und BPE-Lösung sowie deionisiertem Wasser als Blindprobe) eingesetzt wurden, konnte die abgeschiedene Proteinmenge abgeschätzt werden. Die ursprünglich nur mit Wasser belegten Filter wurden ebenso extrahiert und im BCA-Assay gemessen. Die gefundenen Konzentrationen wurden um die Blindwerte der gekühlt gelagerten, unbelegten und nicht exponierten Blindfilter korrigiert und sind in Tabelle 7.1 angegeben. Während die mit Proteinlösung belegten Filter 100  $\mu\text{g}$  BSA und 150  $\mu\text{g}$  BPE enthielten, wurde bei den exponierten Filtern am LKP ca. 20 bis 25  $\mu\text{g}$  BCA-Protein je Filter gefunden. Die GF- und CA-Filter in Großhadern enthielten bis zu 10  $\mu\text{g}$  BCA-Protein. Die Vergleichswerte der Filter, bei denen der Gasstrom zuvor mittels Aktivkohle gereinigt wurde, sind nicht erhöht (Totalverlust der Partikel beim Durchströmen des Glasturms) bzw. betragen nur ein Zehntel bis ein Fünftel der Werte für die beströmten Filter am LKP (Verwendung eines Diffusionsdenuders und teilweise Partikelabscheidung durch die Filterwirkung der beströmten Filter).

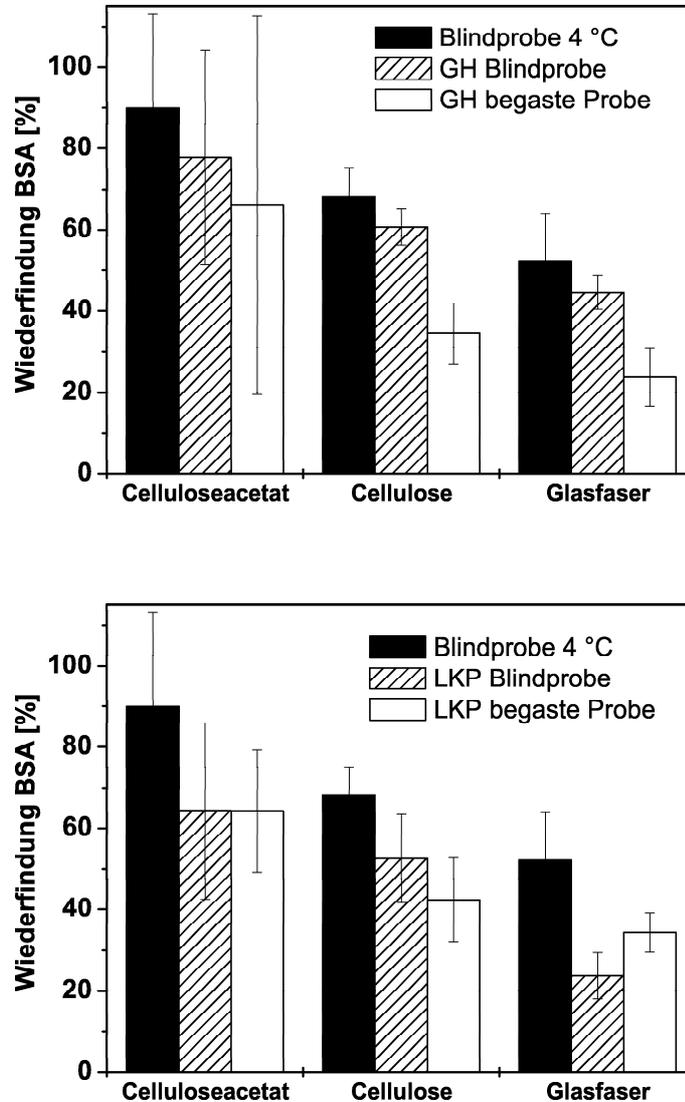


Abbildung 7.2: Grafische Darstellung der Wiederfindung von BSA im Filtereluat von unbeströmten, mit Umgebungsluft und mit Aktivkohle-gereinigter Umgebungsluft beströmten, BSA-belegten Filter in Großhadern (oben) und am LKP (unten). Darstellung der Mittelwerte  $\pm 1s$  im BCA-Assay von fünf (GF, CA) bzw. vier Experimenten (RC).

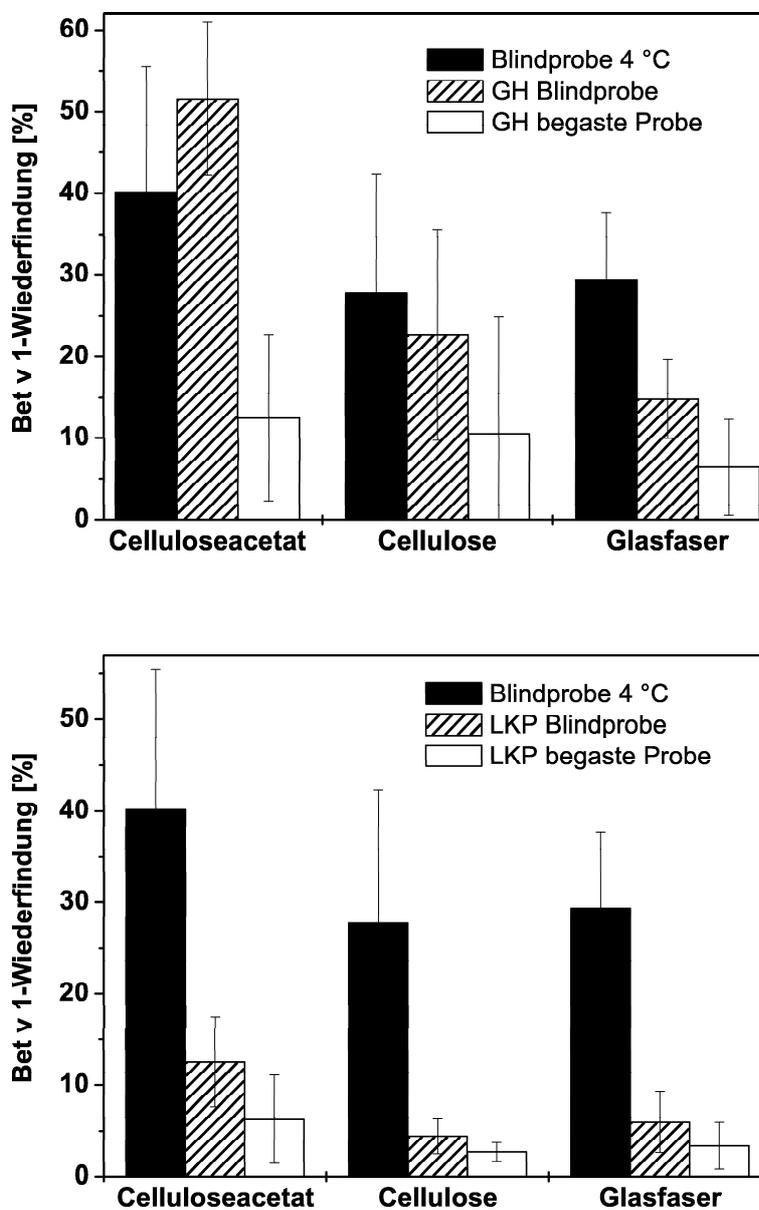


Abbildung 7.3: Grafische Darstellung der Wiederfindung von Bet v 1 im Filtereluat der mit Umgebungsluft begasten Filter und Blindproben im Sandwich-Bet v 1-Immunoassay. Darstellung der Mittelwerte von jeweils Dreifachbestimmungen über fünf (GF, CA) bzw. vier Experimente (RC)  $\pm 1s$ .

**Tabelle 7.1:** Übersicht der auf den begasten Filtern abgetrennten Proteinmengen während der Begasung mit Umgebungsluft. Angabe in  $\mu\text{g}$  BCA-Protein (Kalibrierung auf BSA) nach Abzug des Wertes für den bei  $4^\circ\text{C}$  gelagerten Blindfilter (Mittelwerte von jeweils Dreifachbestimmungen über fünf (GF, CA) bzw. vier Experimente (RC)  $\pm 1s$ ).

	GF	RC	CA
GH (Glasturm)	$0.0 \pm 2.5$	$< 0$	$< 0$
GH (exponiert)	$9.9 \pm 6.0$	$0.4 \pm 4.0$	$8.8 \pm 4.1$
LKP (Denuder)	$2.9 \pm 2.3$	$2.8 \pm 3.3$	$4.7 \pm 4.3$
LKP (exponiert)	$18.1 \pm 4.2$	$17.3 \pm 1.6$	$25.2 \pm 11.4$

## 7.2.2 Nitrierung

Die Proteinnitrierungsgrade der mit Umgebungsluft begasten Proteine lagen für die meisten Proben nach einer Woche Versuchsdauer zwischen 0.2 und 0.4 %. Die BSA-Proben waren dabei nahezu durchgängig höher nitriert als die Birkenpollenextrakt-Proben. Mit Ausnahme des ersten Begasungsexperiments, bei dem nur BSA auf dem Celluloseacetat-Filter am LKP nitriert war (gleichzeitig auch die kälteste Versuchsperiode), wurden alle BSA-Proben nitriert. Beim begasten Birkenpollenextrakt konnten im Gegensatz dazu bei etwa der Hälfte der Proben keine Nitroproteine nachgewiesen werden (einseitiger Immunoassay mit mAk CAY und kalibriert auf Nitro-(14.3)-BSA). Klare Unterschiede bzw. einheitliche Tendenzen bei Vergleich der Nitrierungen in Großhadern und am LKP konnten nicht abgeleitet werden. Der direkte Vergleich der parallelen Experimente war problematisch v.a. aufgrund der häufigen Ausfälle der Thermostatisierung des Messcontainers in Großhadern, der sich dadurch an sonnigen Nachmittagen auf Temperaturen von  $35\text{-}40^\circ\text{C}$  aufheizte. Durch eingedrungenes Regenwasser oder Überlast verursachte die installierte Klimaanlage häufige elektrische Sicherheitsausfälle, die zwar nicht die Pumpe und den  $\text{NO}_x$ -Analysator beeinträchtigten (separate Stromversorgung), stets jedoch den Einsatz von Serviceleuten erforderten. Der Messcontainer am LKP hingegen war konstant auf  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  thermostatisiert. So ist es zu erklären, dass die PNGs in Großhadern für einige Experimente und speziell für die Nitrierung von BSA auf Glasfaserfiltern höher liegen als am LKP (PNG in Großhadern mit bis zu 6% zehnfach höher als am LKP), obwohl die Konzentrationen der Stickoxide am LKP etwa doppelt so hoch lagen. Die über die Versuchsdauer gemittelten Volumenmischungsverhältnisse

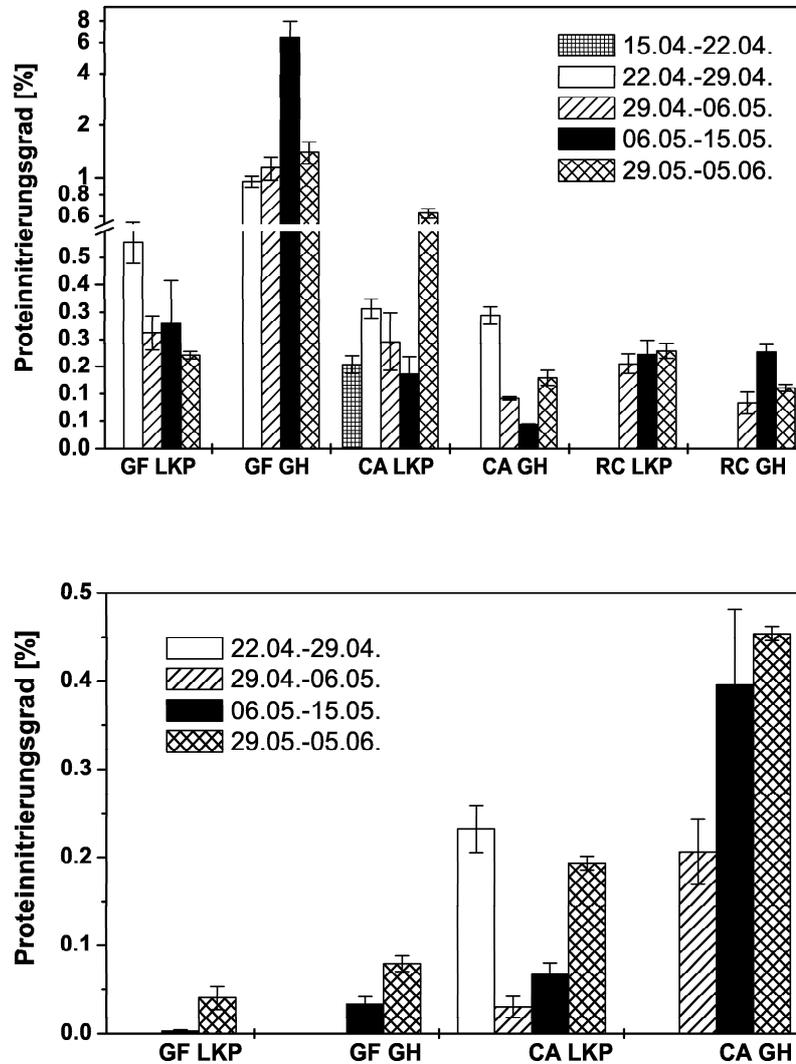
lagen am LKP relativ einheitlich bei 30 bis 35 ppm<sub>v</sub> für NO<sub>2</sub> und bei 75 bis 105 ppm<sub>v</sub> für NO<sub>x</sub>. Volumenmischungsverhältnisse und Konzentrationen von Spurenstoffen am LKP sowie Daten für Ozon, relative Feuchte und Temperatur an der Messstation München-Lothstraße, wurden vom Bayerischen Landesamt für Umweltschutz gemessen und zur Verfügung gestellt (Tabelle 7.2).

**Tabelle 7.2:** *Über die Versuchsdauer gemittelte Parameter der Begasungsexperimente am LKP. Angaben für Ozon, relative Feuchte und Temperatur stammen von der Messstation München-Lothstraße. Datenquelle: Bayerisches Landesamt für Umweltschutz.*

Datum	PM10 [μg/m <sup>3</sup> ]	SO <sub>2</sub> [ppb <sub>v</sub> ]	NO <sub>2</sub> [ppb <sub>v</sub> ]	NO [ppb <sub>v</sub> ]	NO <sub>x</sub> [ppb <sub>v</sub> ]	O <sub>3</sub> [ppb <sub>v</sub> ]	RH [%]	T [°C]
15.04. - 22.04.2002	35.6	1.6	36.4	69.9	106.3	20.9	74	8.0
22.04. - 29.04.2002	29.4	1.1	35.2	60.9	96.1	26.8	67	11.3
29.04. - 06.05.2002	26.0	1.6	30.9	51.2	82.0	24.5	70	11.4
06.05. - 15.05.2002	29.5	1.0	35.6	53.6	89.2	28.5	65	15.1
29.05. - 05.06.2002	31.1	1.1	34.2	39.2	73.4	33.5	56	16.9

Bei den Begasungen mit Umgebungsluft in Großhadern wurden die Stickoxide mit einem NO<sub>x</sub>-Analysator und einer DOS-basierten Software gemessen. Die Datenübertragung an einen Rechner wurde jedoch ohne erkennbaren Defekt regelmäßig beim Datumswechsel und auch im Tagesverlauf häufig unterbrochen. Daher liegt kein vollständiger Datensatz für die Stickoxidkonzentrationen in Großhadern während der Begasungsexperimente vor, sondern nur Messwerte über einige Stunden bis zu etwas mehr als einem halben Tag. Die daraus bestimmten Mittelwerte für einzelne Tage lagen in Großhadern für NO<sub>2</sub> bei 5-22 ppm<sub>v</sub>, für NO bei 10-34 ppm<sub>v</sub> und für NO<sub>x</sub> bei 17-57 ppm<sub>v</sub>. Die DOS-Software wurde später durch eine Labview-basierte Software ersetzt, mit der die Datenaufzeichnung bei den Experimenten mit synthetischen Gasgemischen problemlos funktionierte.

Auf den drei Filtermaterialien Glasfaser, Celluloseacetat und regenerierte Cellulose erfolgte deutliche Nitrierung der Proteine. Proteinproben auf Aluminiumoxidfiltern wurden im zweiten durchgeführten Experiment beströmt, jedoch wurden keine Nitro-



**Abbildung 7.4:** Grafische Darstellung der Proteinnitrierungsgrade der begasten BSA-Proben (oben) und BPE-Proben (unten) aus den Begasungsexperimenten mit Umgebungsluft am LKP und in München-Großhadern. Darstellung von Mittelwerten  $\pm$  Spannweite aus Dreifachbestimmungen. Grafik für BSA mit Achsenunterbrechung und logarithmischer Skalierung nach Achsenbruch.

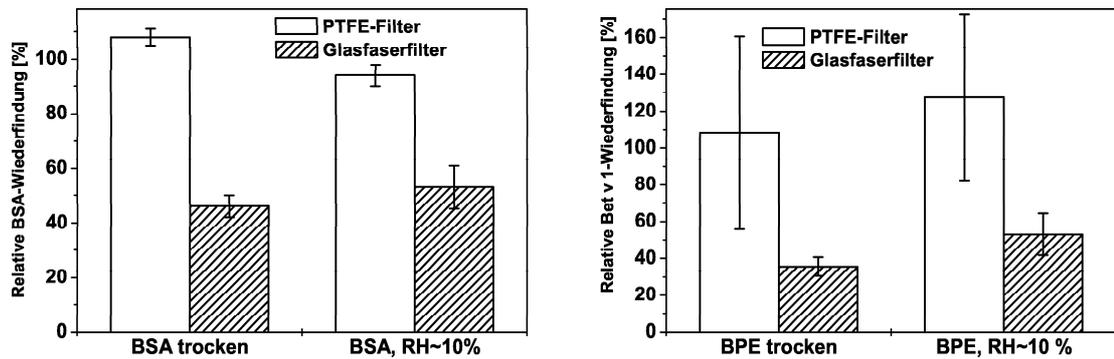
proteine gefunden und diese Filter nicht weiter verwendet. Für Birkenpollenextrakt auf Cellulosefiltern konnte bei den vier durchgeführten Experimenten ebenfalls keine Nitrierung nachgewiesen werden. Aus der Kombination dieser Daten mit den in einer früheren Arbeit gemessenen Daten [290] lässt sich schließen, dass die Nitrierung von Proteinen durch Umgebungsluft auf Silikat- und Cellulose-Trägern rasch und ausgeprägt innerhalb von wenigen Tagen erfolgt und positiv mit der verkehrsbedingten Abgasbelastung und der Temperatur korreliert ist. Eine grafische Darstellung der Proteinnitrierungsgrade zeigt Abbildung 7.4, die Einzelwerte sind zusätzlich im Anhang in Tabelle 9.19 aufgelistet. Die gefundenen Nitrierungsgrade sind teilweise auch in den Grafiken des Abschnitts 7.3.2 mit eingezeichnet, um Vergleiche zu den Begasungen mit synthetischen Gasgemischen bei niedrigen VMV von  $\text{NO}_2$  und Ozon ziehen zu können.

## 7.3 Begasung mit synthetischen Gasgemischen

### 7.3.1 Proteinwiederfindung nach Begasung mit Ozon

Die Wiederfindung von BSA und Bet v 1 von mit Ozon begasten BSA- bzw. BPE-Proben, die durch Auftragen und Trocknen einer Proteinlösung auf Spritzenfiltern hergestellt wurden, reduzierte sich auf Glasfaserfiltern deutlich, auf Teflonfiltern hingegen jedoch nicht. Abbildung 7.5 zeigt die Verhältnisse der Konzentrationen von mit 0.7-1.1 ppm<sub>v</sub> Ozon über zwei Stunden mit 0 % (trocken) und ca. 10 % RH begasten Filtern und unbegasten Blindfiltern (relative Wiederfindung). Nach Elution der Proteine von den Filtern wurde BSA mittels BCA-Assay und Bet v 1 mittels Bet v 1-Sandwich-Immunoassay gemessen. Die Konzentrationen der unbegasten und begasten Filter wurden ins Verhältnis gesetzt, um die Effekte der unterschiedlichen Proteinadsorption der Filtermaterialien zu eliminieren (z.B. stets höhere Wiederfindung bei Elution von Teflonfiltern als von Glasfaserfiltern). BSA auf Teflonfiltern wurde zu 100 % wiedergefunden, auf Glasfaser jedoch nur zu rund 50 %. Für Bet v 1 waren die angegebenen Fehler (Spannweite im Immunoassay zwischen Minimal- und Maximalwert) testbedingt deutlich größer, es ergab sich jedoch ein analoges Ergebnis. Während Bet v 1 durch die Begasung mit Ozon auf Teflonfiltern nicht signifikant abgebaut wurde, waren auf den Glasfaserfiltern Verluste von etwa 50-65 % zu beobachten. Wesentliche Unterschiede zwischen der trockenen Begasung und der Begasung mit 10 % RH waren nicht zu beobachten.

In einer früheren Studie wurden bereits Unterschiede in der Reaktivität von getrockneten Proteinlösungen auf Teflonfiltern und auf Glasfaser-, Cellulose- oder anderen hydrophilen Filtern beobachtet [290]. Die wässrige Lösung zerfließt nach dem Auftragen auf



**Abbildung 7.5:** Relative Proteinwiederfindung nach zweistündiger Begasung von BSA und BPE mit Ozon auf Teflon- und Glasfaserfiltern. Trockene Begasung mit 1.1 ppm<sub>v</sub> O<sub>3</sub>, feuchte Begasung mit 0.7 ppm<sub>v</sub> O<sub>3</sub> und 10 % RH. Diagramm links: Verhältnisse der Mittelwerte ± 1s aus Dreifachbestimmungen der BSA-Konzentrationen der Eluate begaster und unbegaster, mit BSA belegter Filter (BCA-Assay). Diagramm rechts: Verhältnisse der Mittelwerte ± Spannweite der Bet v 1-Konzentrationen der Eluate begaster und unbegaster, mit BPE belegter Filter (Sandwich-Immunoassay).

die hydrophobe Teflon-Oberfläche aufgrund der Oberflächenspannung nicht, sondern bildet einzelne Tropfen und trocknet an einer oder wenigen Stellen des Filters. Die für eine Reaktion mit gasförmigen Komponenten zur Verfügung stehende Oberfläche ist dabei geringer als beim großflächigem Zerfließen der Lösung wie z.B. auf Glasfaser substraten. Um Proteinproben auf Teflonfiltern mit hoher Oberfläche herzustellen, wurde BSA in wässriger Lösung vernebelt, das entstandene Aerosol in einem Diffusionstrockner getrocknet und die polydispersen Aerosolpartikel auf Spritzenfiltern aus Teflon abgeschieden. Glasfaserfilter wurden parallel mit den Aerosolpartikeln belegt. Die Proteinbeladung wurde gravimetrisch ermittelt und die Filter zwei Stunden mit 1 ppm<sub>v</sub> Ozon trocken bzw. mit 47-55 % RH begast. Tabelle 7.3 zeigt die Ergebnisse. Die bestimmte Gewichtszunahme der Filter nach der Belegung mit BSA betrug zwischen 160 und 210 µg. Die Wiederfindung von BSA wurde analog nach Elution mit PBS-Puffer als Verhältnis der im BCA-Assay gefundenen BSA-Menge und der gravimetrisch ermittelten Menge bestimmt. Die Wiederfindung für nur mit N<sub>2</sub> begaste Blindfilter aus Glasfaser liegt um 7-11 % höher als für die zwei Stunden mit Ozon begasten Filter. Die Abnahme bei der Begasung mit Feuchtigkeit war dabei höher als bei der trockenen Begasung. Auch die Teflonfilter zeigten geringere Wiederfindung nach Begasung mit Ozon und Feuchtigkeit (17 statt 23 %),

allerdings ist zu beachten, dass die Schwankung von zwei parallel begasten Filtern relativ hoch war. Bei der trockenen Begasung von BSA auf Teflonfiltern war kein Proteinabbau zu beobachten. Generell fällt bei Vergleich von Glasfaser- und Teflonfiltern auf, dass die wiedergefundene Menge auf Teflon nur etwa halb so hoch war wie bei Glasfaser, obwohl dies bei den übrigen Elutionsversuchen stets umgekehrt war. Eventuell könnte diese Erscheinung auf Unsicherheiten bei der Wägung zurückzuführen sein, da Teflonfilter sich leichter elektrostatisch aufladen und dadurch die Wägung stärker beeinflussen können.

**Tabelle 7.3:** *Wiederfindung von mit BSA-Aerosolpartikeln belegten Spritzenfiltern. Angabe der Belegung (gravimetrisch) und der Proteinwiederfindung (BCA-Assay) nach zweistündiger Begasung mit  $N_2$  bzw.  $N_2$  und  $1\text{ ppm}_v$  Ozon jeweils ohne und mit Zumischen von Wasserdampf (RH 47-55 %). Angabe von Mittelwerten  $\pm 1s$  der Dreifach-Wägungen (Belegung), Mittelwerte  $\pm 1s$  von BCA-Dreifachmessungen (WF Blindfilter) und der Mittelwerte  $\pm$  Spannweite der Wiederfindungen von je zwei parallel mit Ozon begasten Filtern (BCA-Assay).*

	Glasfaser		Teflon	
	Belegung	WF (BCA)	Belegung	WF (BCA)
	[ $\mu\text{g}$ ]	[%]	[ $\mu\text{g}$ ]	[%]
Trocken begaste Blindfilter ( $N_2$ )	$193 \pm 1$	$43 \pm 1$	$171 \pm 7$	$22 \pm 3$
Trocken begaste Filter ( $N_2/O_3$ )	$167 \pm 1$	$36 \pm 4$	$166 \pm 4$	$23 \pm 7$
Feucht begaste Blindfilter ( $N_2$ )	$160 \pm 2$	$50 \pm 2$	$169 \pm 2$	$23 \pm 1$
Feucht begaste Filter ( $N_2/O_3$ )	$181 \pm 4$	$39 \pm 6$	$212 \pm 1$	$17 \pm 7$

### 7.3.2 Begasung von abgeschiedenen BSA-Partikeln mit $NO_2$

Je vier mit BSA-Aerosolpartikeln belegte Teflon- und Glasfaserfilter wurden mit  $NO_2$  begast ( $1\text{ ppm}_v$ , trocken und mit RH 50-63 %, Dauer 2.5-3.5 h). Die Filtereluate wurden im einseitigen Immunoassay mit mAk CAY untersucht. Aufgrund der zu diesem Zeitpunkt der experimentellen Arbeiten stark schwankenden Signalintensitäten im Immunoassay (unspezifische Bindung, Plattentrends, Qualitätsunterschiede der Reagenzien etc.) konnten keine Nitroproteine eindeutig nachgewiesen werden. Damit wurde bislang

auf Teflonfiltern in keinem Experiment Nitrierung von BSA oder BPE gefunden. Eventuell könnten weitere Experimente mit Abscheidung von monodispersen BSA-Partikeln mit Partikeldurchmessern  $< 100$  nm, anschließender Begasung und Anwendung von Immunoassays mit höheraffinen Ak wie z.B. 39B6, Schaf oder Ziege zum erfolgreichen Nachweis der Nitrierung auf Teflonfiltern führen.

### 7.3.3 Simultane Begasungen mit $\text{NO}_2$ und Ozon

BSA und BPE wurden mit äquimolaren Kombinationen von  $\text{NO}_2$  und Ozon mit und ohne Feuchtigkeit begast. Die ermittelten Proteinnitrierungsgrade sind in den Abbildungen 7.6 und 7.7 für Nitrierung auf Glasfaserfiltern und in Abbildung 7.8 für Nitrierung auf Cellulosefiltern dargestellt. Abbildung 7.6 zeigt die Ergebnisse von Begasungsexperimenten mit hohen, regelmäßig in Deutschland nicht auftretenden VMV. Die mit BSA und BPE belegten Filter wurden mit  $1 \text{ ppm}_v$  (30-40 % RH) und  $500 \text{ ppb}_v$  (mit 0 und ca. 30-40 % RH) seriell begast und nach 1, 2, 3 und 4 Stunden jeweils der im Gasstrom vorderste Filter entfernt. Die Protein nitrierungsgrade steigen mit zunehmender Expositionszeit an, für den trockenen Versuch mit  $500 \text{ ppb}_v$  wurde jedoch nur eine sehr flache Kurve für den PNG erhalten. Das Zumischen von Wasserdampf hat hier also einen wichtigen positiven Effekt für die Nitrierung. Beim Birkenpollenextrakt verlief der Anstieg des PNG für die höhere Konzentration von  $1 \text{ ppm}_v$  etwas steiler als für  $500 \text{ ppb}_v$ , jedoch weitgehend ähnlich. Für BSA war bei der Begasung mit  $1 \text{ ppm}_v$  ein Abflachen und sogar ein Rückgang des PNG nach drei und vier Stunden Begasungsdauer zu beobachten. Es ist noch unklar, ob dies als ein Artefakt der Messung zu betrachten ist oder durch Proteinabbau und -oxidation aufgrund der hohen Ozonkonzentration verursacht wurde.

Die Experimente mit niedrigeren Volumenmischungsverhältnissen von  $50$ - $200 \text{ ppb}_v$  dauerten zwischen  $6$  und  $165$  Stunden. Die Proben wurden ebenfalls seriell begast und sukzessive die jeweils vordersten Filter entnommen. Abbildung 7.7 zeigt die PNGs aufgetragen gegen die Versuchsdauer auf doppelt logarithmischen Achsen. BSA und BPE zeigten ähnliches Verhalten. Die Nitrierung nahm mit den VMV und der Zeit kontinuierlich zu. Die Begasung mit  $200 \text{ ppb}_v$   $\text{NO}_2$  und Ozon führte zu maximalen PNGs des BPE von bis zu  $15$  % nach  $48$  h. Die maximal erreichten Vergleichswerte für BSA lagen bei knapp  $4$  %. Die Kurve der PNGs bei Begasung mit  $100 \text{ ppb}_v$   $\text{NO}_2$  ohne Beimischung von Ozon (offene Symbole) verlief deutlich unterhalb der Kurve der kombinierten Begasung mit je  $100 \text{ ppb}_v$   $\text{NO}_2$  und Ozon. Ozon spielt damit eine wichtige Rolle im Nitrierungsprozess der Proteine.

Als Kreuze sind in Abbildung 7.7 zusätzlich die PNGs der mit Umgebungsluft begasten Proteinproben eingezeichnet. Die Begasungsdauer war hier relativ einheitlich bei 170-210 h und die VMV von Ozon und  $\text{NO}_2$  variierten zwischen 20 und 35 bzw. 5 und 35  $\text{ppb}_v$ . Durch den direkten Vergleich der PNGs aus den Experimenten mit den synthetischen Gasgemischen und der Umgebungsluft erkennt man den sich gegenseitig ergänzenden Charakter der Experimente. Verlängert man die eingezeichneten Kurven für die PNGs von BSA, so liegen die Punkte der mit Umgebungsluft begasten Proben in genau diesem Bereich. Die Konzentrationen an  $\text{NO}_2$  und Ozon sind zwar in der Umgebungsluft niedriger, durch Photochemie können hier jedoch eine Reihe von nicht gemessenen Verbindungen in unterschiedlichen Konzentrationen auftreten und die Nitrierungsreaktionen maßgeblich mit beeinflussen. Insbesondere das aus  $\text{NO}_2$  und Ozon gebildete  $\text{NO}_3$  sowie PAN (Peroxyacetylnitrat) sind hier zu erwähnen. Auf dem sich langsam aufbauenden „Filterkuchen“ aus Aerosolpartikeln können zudem reaktive Nitroverbindungen adsorbiert werden und stehen länger zur Reaktion mit den Proteinen zur Verfügung. Die Nitrierung von Birkenpollenextrakt mit Umgebungsluft war im Vergleich zur Nitrierung von BSA deutlich schwächer und fiel mehr in den Bereich der Kurven mit 50  $\text{ppb}_v$   $\text{NO}_2$  und Ozon oder 100  $\text{ppb}_v$   $\text{NO}_2$  ohne Ozon.

Auf Cellulosefiltern wurden Begasungen mit 500  $\text{ppb}_v$  mit und ohne Zumischen von Wasserdampf für maximal vier Stunden durchgeführt. Abbildung 7.8 zeigt die Ergebnisse. Sie waren weitgehend analog zur Nitrierung auf Glasfaserfiltern. Zwischen BSA und BPE waren nur geringe Unterschiede auszumachen. Maximal erreichte PNGs nach vier Stunden Begasungsdauer lagen bei etwa 0.25 %. Die Nitrierung verlief bei BSA und BPE mit trockener Begasung deutlich schwächer als mit Zumischen von Wasserdampf. Die Verlängerung der Kurven der Begasung mit 500  $\text{ppb}_v$  (in etwa das 20-30fache der durchschnittlichen VMV in München) erreicht in diesem Fall nicht die PNGs der mit Umgebungsluft begasten Proben (Kreuze in Abbildung 7.8), sondern liegt deutlich über diesen Messpunkten. Für BPE lag zudem nur ein einziger Wert für die Nitrierung mit Umgebungsluft (LKP) über der Nachweisgrenze im einseitigen Immunoassay. Die Experimente zeigen, dass die hauptsächlich mit Glasfaserfiltern durchgeführten Experimente auch mit Cellulosefiltern durchführbar sind und dabei analoge Ergebnisse erhalten werden.

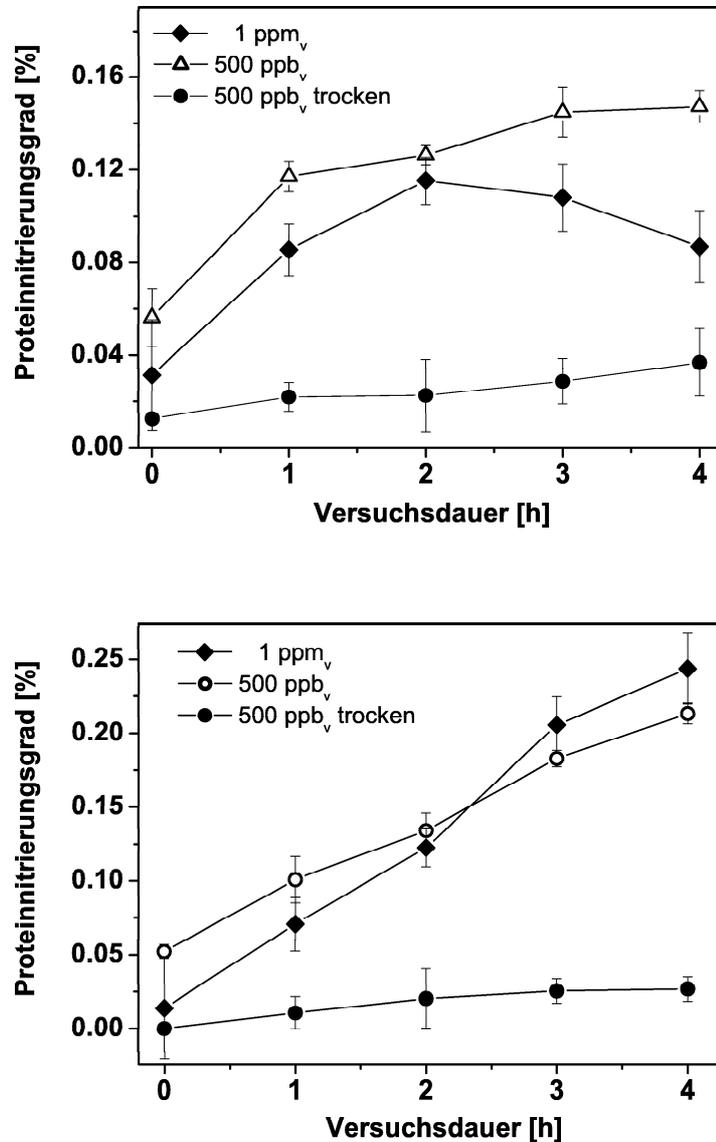


Abbildung 7.6: Grafische Darstellung der Proteinnitrierungsgrade von BSA (oben) und BPE (unten) nach Begasung auf Glasfaserfiltern mit Ozon und NO<sub>2</sub> (je 500 ppb<sub>v</sub> und 1 ppm<sub>v</sub>) unter Beimischung von Feuchtigkeit (30-40 % RH) und ohne Feuchtigkeit (je 500 ppb<sub>v</sub>). Messung der Filtrate in einseitigen Immunoassay mit mAk CAY, Umrechnung in PNGs und Darstellung der Mittelwerte und Spannweite der drei- bis achtfachen Wiederholungsmessungen im Immunoassay.

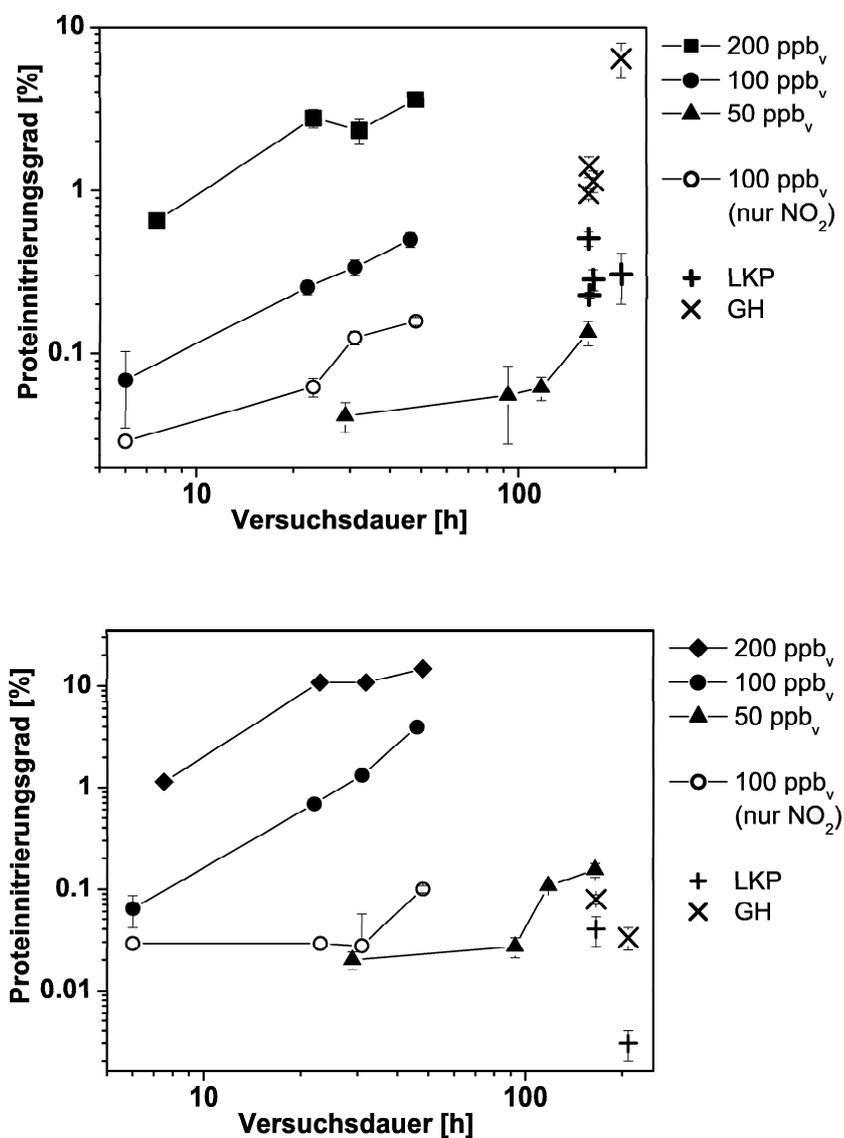


Abbildung 7.7: Grafische Darstellung der PNGs von BSA (oben) und BPE (unten) nach Begasung auf Glasfaserfiltern mit Ozon und NO<sub>2</sub> (0-200 ppb<sub>v</sub>, RH 30-50%) und Umgebungsluft. Darstellung der Mittelwerte und Spannweite der drei- bis sechsfachen Wiederholungsmessungen im einseitigen Immunoassay mit mAk CAY.

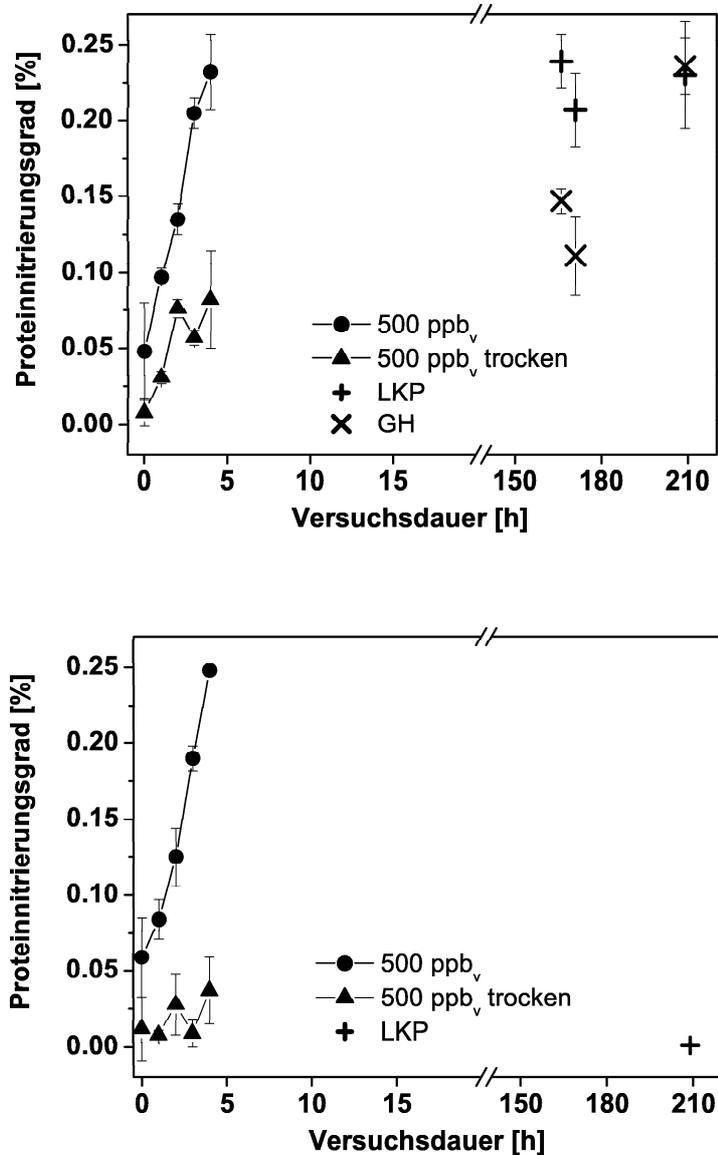


Abbildung 7.8: Grafische Darstellung der PNGs von BSA (oben) und BPE (unten) nach Begasung auf Cellulosefiltern mit Ozon und NO<sub>2</sub> (500 ppb<sub>v</sub>) in Abhängigkeit von der Begasungsdauer. Messung der Filtereluate im einseitigen Immunoassay mit mAk CAY und Darstellung der Mittelwerte und Spannweite der drei- bis sechsfachen Wiederholungsmessungen im einseitigen Immunoassay mit mAk CAY.

### 7.3.4 Einfluss von Vorfiltern

Als Vorfilter für die Begasung von BPE und BSA auf Glasfaserfiltern wurden Absolut-Partikelfilter (DIF-N50, Headline Filters) und Teflonfilter (hydrophob  $0.45 \mu\text{m}$ ) benutzt. Die PNGs der durchgeführten Experimente sind in Abbildung 7.9 dargestellt. Abbildung 7.9 oben zeigt den Rückgang der Nitrierung auf  $< 0.1\%$  PNG durch den Partikelfilter gezeigt. Vier parallele Filter wurden 27 h begast, die restlichen vier Filter 52 h. Der PNG stieg für alle Filter mit der Begasungsdauer an, die starke Reduktion durch die Partikelfilter war jedoch stets gleich. Da im verwendeten synthetischen Gasgemisch keine nennenswerte Anzahl an Partikel vorhanden sein sollten, wurde geschlussfolgert, dass nicht die Rückhaltung von Partikeln, sondern die reduzierte Konzentration reaktiver Substanzen für die verringerte Reaktion verantwortlich ist. Im unteren Diagramm sind die PNGs des Experiments mit der konstanten Begasungszeit von 67 h für insgesamt acht Filter gezeigt. Die PNGs der Filter mit Teflonvorfilter waren ebenfalls erniedrigt, jedoch war der Rückgang nicht so stark ausgeprägt wie bei Verwendung des Partikelfilters. Die relative Verringerung der PNGs wurde sowohl für BSA und BPE in beiden Experimenten weitgehend analog beobachtet, wenn auch teilweise die Absolutwerte der PNGs schwanken.

Aus den Experimenten wird ersichtlich, dass bei serieller Begasung der Filter die vorderen Filter als Vorfilter für nachfolgende Filter wirken und dass daher die Reihenfolge im Gasstrom bedeutsam ist. Daher ist es wahrscheinlich, dass die in dieser Arbeit bestimmten Zeitreihen, die durch serielle Begasung ermittelt wurden, insgesamt zu flache Steigungen besitzen. Für absolut quantitative Messungen wäre daher eine parallele Begasung von Filtern notwendig. Dies wurde in einem Experiment mit insgesamt 26 parallel geschalteten Spritzenfiltern, die nacheinander dem Gasstrom entnommen wurden, versucht. Die ermittelten PNGs schwankten jedoch sehr stark und es zeigte sich, dass ein derartiges Experiment mit dem in dieser Arbeit beschriebenen Versuchsaufbau mit einer Reihe von Schwierigkeiten verknüpft ist. Zum einen ändert sich durch die sukzessive Entnahme paralleler Filter die Verteilung der Gasflüsse durch die einhergehende Veränderung der Begasungsaufbaus und damit der Rückdruckverhältnisse. Es erwies sich als äußerst schwierig, die Gasflüsse konstant zu halten. Es wäre notwendig, bei einem derartig weit verzweigten Versuchsaufbau für jeden einzelnen Filter die Durchgängigkeit und den Fluss zu prüfen (Verwendung von je einem Rotameter je Filter). Die parallele Begasung erfordert zudem einen insgesamt viel höheren Gasfluss als eine serielle Begasung und erhöht damit den Ressourcenverbrauch stark. Der aus dem erhöhten Gasfluss entstehende höhere Rückdruck und die daraus resultierende Gefahr der Undichtigkeit des Systems macht für derartige Experimente eine Neukonstruktion des Versuchsaufbaus notwendig.

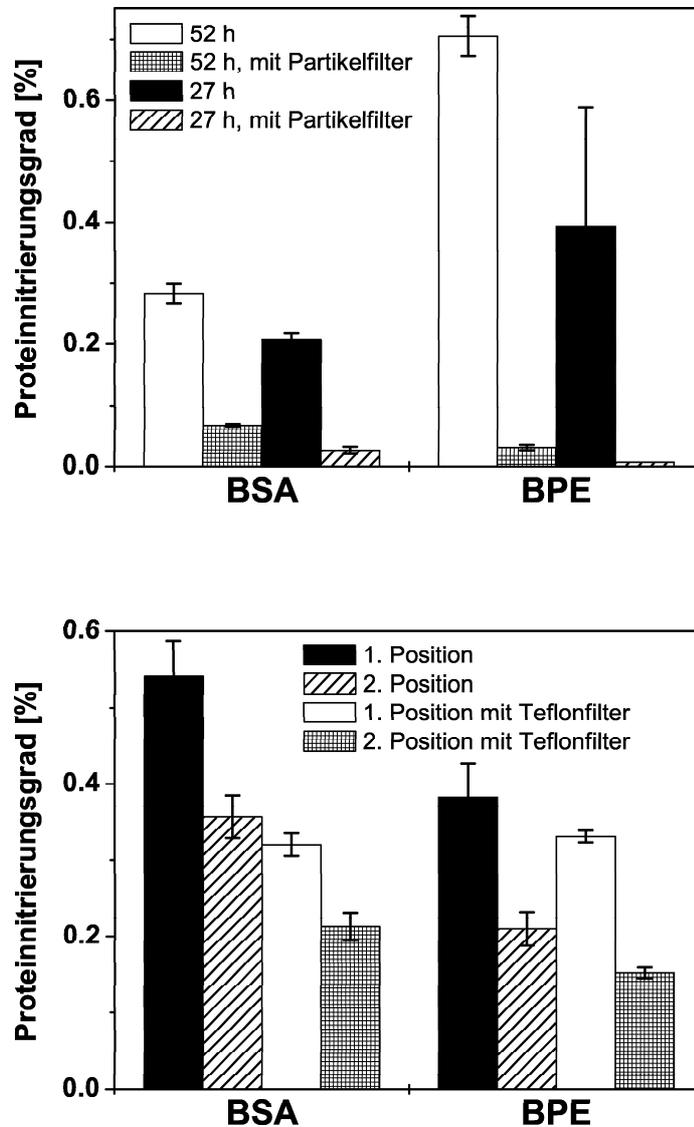


Abbildung 7.9: Grafische Darstellung des Einflusses der Position der Filter im Gasstrom bei serieller Begasung und Einfluss von vorgeschalteten Partikelfiltern (DIF-N 50, oben) oder Teflon-Spritzenfiltern ( $0.45\ \mu\text{m}$ , unten) auf die Proteinnitrierungsgrade. Begasung mit je  $200\ \text{ppb}_v$   $\text{NO}_2$  und Ozon mit ca. 35% RH. Darstellung der Mittelwerte und Spannweite der vierfachen Wiederholungsmessungen im einseitigen Immunoassay mit mAk CAY.

In Überlegung gezogen wurden dazu bereits Begasungskammern mit darin aufgehängten Filtern, die zuvor in Proteinlösungen getaucht und anschließend getrocknet wurden. Durch Abschneiden von Aliquoten von diesen Filtern könnten dann ebenso unterschiedliche Begasungsdauern erreicht werden und kinetische Studien durchgeführt werden. Bei Optimierung der parallelen Begasung für exakte Kinetikstudien wäre es zudem erforderlich, besser quantitative Analysenmethoden als die Immunoassays zu verwenden, die aufgrund der in Kapitel 6 erläuterten Gründe wenig gut zur Unterscheidung von einfach oder mehrfach nitrierten Proteinen geeignet sind.

## 8 Zusammenfassung

Die chemische Zusammensetzung des atmosphärischen Aerosols variiert stark und ist noch wenig im Detail erforscht. Sie hat jedoch einen entscheidenden Einfluss auf die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Aerosolpartikel und damit auf die klimatischen und gesundheitlichen Effekte.

In dieser Arbeit wurden Aerosolproben gesammelt und gravimetrisch sowie chemisch analysiert. Der Schwerpunkt lag dabei auf kohlenstoffhaltigen Komponenten, insbesondere auf der Bestimmung von Proteinen und Nitroproteinen. Dazu wurden neben der Anwendung bereits etablierter Methoden wie Verbrennungsanalyse und HPLC-Methoden eine Reihe von neuen Methoden angewandt. Speziell Immunoassays zur Analyse von Nitroproteinen wurden entwickelt und ausführlich charakterisiert. Der Einfluss von  $\text{NO}_2$ , Ozon und abgasbelasteter Umgebungsluft auf Proteine wurde untersucht.

### Feinstaubkonzentrationen

Die Konzentrationen von  $\text{PM}_{2.5}$  lagen auf der Zugspitze (Angaben jeweils Mittelwerte  $\pm 1\text{s}$ ) bei  $4.6 \pm 2.4 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (August - Dezember 2001) bzw. bei  $2.4 \pm 1.2 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (Oktober/November 2002). Die Drei- bis Zehntagesmittelwerte schwankten dabei zwischen 2 und  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . Am Hohenpeißenberg wurden  $10.8 \pm 4.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$   $\text{PM}_{2.5}$  gemessen (Mai - September 2002, Bereich von 4 -  $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ), in Großhadern wurden  $6.8 \pm 2.3 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (April 2001),  $17.6 \pm 5.6 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (Juli/August 2001) bzw.  $12.1 \pm 6.0 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (September/Oktober 2002)  $\text{PM}_{2.5}$  gefunden. Am Verkehrsknotenpunkt Luise-Kiesselbach-Platz war die ermittelte Feinstaubkonzentration am höchsten ( $22.4 \pm 6.7 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , April - Juli 2001, Streuung der Ein- bis Dreitagesmittelwerte von 10 -  $36 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ). Das Verhältnis von  $\text{PM}_{2.5}$  zu  $\text{PM}_{10}$  am LKP betrug im Mittel 0.7 und lag damit in guter Übereinstimmung mit Literaturdaten für andere städtische Probenahmeorte. Erwartungsgemäß war die Feinstaubkonzentration am Verkehrsknotenpunkt Luise-Kiesselbach-Platz wesentlich höher als in den Reinluftgebieten Hohenpeißenberg oder Zugspitze.

## Kohlenstoff und Sulfat

Die höchsten Anteile des Gesamtkohlenstoffs (TC) an der PM<sub>2.5</sub>-Gesamtmasse wiesen die städtischen Probenahmeorte Großhadern mit  $45 \pm 25\%$  (April 2001) und LKP mit  $50 \pm 13\%$  (April - Juli 2001) auf (atmosphärische Konzentrationen bis zu 6 bzw.  $17 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ). Am LKP bestand die Kohlenstofffraktion dabei zu 2/3 aus EC, verursacht hauptsächlich durch Partikel aus Dieselaabgasen. Der PM<sub>2.5</sub>-Kohlenstoffanteil an den Standorten Zugspitze und HPB betrug nur 10 - 20% ( $18 \pm 10\%$ , Zugspitze August - November 2001,  $9 \pm 3\%$ , Zugspitze Oktober/November 2002 und  $19 \pm 6\%$  am HPB, Mai - September 2002). An diesen Reinluftstandorten wurde ein EC/TC-Verhältnis von ca. 1/3 gemessen. Die WSOC-Konzentrationen waren am niedrigsten im alpinen Bereich ( $0.8 \pm 0.6 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , Zugspitze August/September 2001) und stiegen beim Übergang über den suburbanen Bereich ( $1.3 \pm 0.7 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , Großhadern April 2001) zum städtischen Bereich bis auf  $2.1 \pm 1.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (LKP, April - Juli 2001) an. Im Gegensatz dazu fiel der WSOC-Anteil am Gesamtkohlenstoff von 66 (ZSP) auf 41 (IWC) bzw. 18% (LKP). Der hochmolekulare ( $> 5 \text{ kDa}$ ) WSOC-Anteil war relativ einheitlich und lag zwischen 30 und 40% ( $27 \pm 15\%$  in Großhadern,  $35 \pm 14\%$  am LKP und  $39 \pm 21\%$  auf der Zugspitze, jeweils gleiche Zeiträume wie WSOC). Bei Umrechnung der gefundenen Proteinkonzentrationen in Proteinkohlenstoff (PC, Annahme eines Kohlenstoffanteils von 53% analog zu BSA) und Berechnung des Anteils am Gesamtkohlenstoff (PC/TC), erhält man Werte, die von  $2 \pm 1\%$  am LKP bis zu  $10 \pm 5\%$  (Zugspitze, August - November 2001) und  $11 \pm 2\%$  (HPB, Mai - September 2002) reichen. Sulfat wurde nur am LKP bestimmt und  $4.9 \pm 1.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$  gefunden. Das entspricht einem durchschnittlichen Anteil an der Partikelgesamtmasse von 19% und macht in etwa 40% der anorganischen Probenbestandteile aus.

## Proteinkonzentrationen

In dieser Arbeit wurden der Bradford-Assay mit Coomassie-Brillantblau und der BCA-Assay untersucht. Experimente mit dem Bradford-Assay ergaben je nach Lösungsmittel (Salzkonzentration) unterschiedliche Kalibrierkurven und der Assay wurde daher nicht weiter verwendet. Die atmosphärischen Proteinkonzentrationen wurden mit dem BCA-Assay mit Rinderserumalbumin als Kalibrierstandard gemessen (*BSA-Äquivalentkonzentrationen*). Kreuzreaktivitäten anderer Proteine waren meist geringer als 100% (50-80%). Humin- und Fulvinsäuren zeigten Kreuzreaktivitäten von 2-40%. Da damit auch andere makromolekulare Substanzen als Proteine im BCA-Assay bestimmt werden, wäre evtl. die Verwendung des Begriffes *makromolekulare Substanzen mit proteinähnlichen*

*Reduktionseigenschaften* in Erwägung zu ziehen. Andererseits können unvollständige Extraktion und Adsorptionsverluste auch zu Unterbestimmungen der Proteinkonzentration führen (Wiederfindung bei Additionsexperiment mit BSA auf Realfilterprobe ca. 65 %).

Die atmosphärischen Proteinkonzentrationen (PM<sub>2.5</sub>) reichten von  $0.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$  auf der Zugspitze im Herbst/Winter bis  $1.2 \mu\text{g}/\text{m}^3$  in Großhadern (Sommer). Die Mittelwerte ( $\pm 1s$ ) betragen  $0.15 \pm 0.25 \mu\text{g}/\text{m}^3$  auf der Zugspitze (August - November 2001),  $0.44 \pm 0.25 \mu\text{g}/\text{m}^3$  am HPB (Mai - September 2002) und  $0.45 \pm 0.32 \mu\text{g}/\text{m}^3$  am LKP (April - Juli 2001). In Großhadern wurden  $0.18 \pm 0.13 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (April),  $0.37 \pm 0.11 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (September/Oktober 2001) und  $1.16 \pm 0.49 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (Juli/August 2001) gemessen. Der prozentuale Anteil von Protein an PM<sub>2.5</sub> betrug generell zwischen 1 und 7 %, mit höheren Anteilen in den Sommermonaten. Auf der Zugspitze wurden dabei  $3.7 \pm 2.9 \%$  (Mittelwert  $\pm 1s$ , August - Dezember 2001), am HPB  $4.0 \pm 1.4 \%$  und am LKP  $1.9 \pm 1.3 \%$  Anteil an PM<sub>2.5</sub> bestimmt. Der PM<sub>10</sub>-Proteinanteil (Berlin, Stadtautobahn, Oktober/November 2001) lag bei  $0.8 \pm 0.2 \%$  und der TSP-Proteinanteil bei  $3.0 \pm 1.2 \%$  (Freiburg, Stadtzentrum, Februar - April 2001).

Aminosäurebestimmungen nach Hydrolyse wurden nur für einzelne Proben durchgeführt (HPLC-Fluoreszenzmethode nach Vorsäulenderivatisierung mit o-Phthaldialdehyd und Mercaptopropionsäure). Für den Probenahmeort LKP wurden Maximalkonzentrationen von Glutamat und Aspartat von bis zu  $60 \text{ ng}/\text{m}^3$  gefunden, die Konzentrationen der übrigen sieben bestimmten Aminosäuren lagen meist zwischen 10 und  $20 \text{ ng}/\text{m}^3$ . Bei Extrapolation der elf quantifizierten Aminosäuren auf 20 proteinogene Aminosäuren, wurde für die Messkampagne am LKP ein Mittelwert ( $\pm 1s$ ) von  $314 \pm 181 \text{ ng}/\text{m}^3$  erhalten. Der entsprechende Mittelwert der Proteinsummenbestimmung mittels BCA-Assay betrug  $436 \pm 167 \text{ ng}/\text{m}^3$  und stimmt bei Berücksichtigung der angewandten Näherungen gut überein.

Straßenstaub enthielt im Mittel nur ein Zehntel des Proteinanteils, der in den Aerosolproben gefunden wurde ( $1 - 3 \text{ g}/\text{kg}$ , BCA-Assay). Signifikante Unterschiede der Proteinkonzentrationen in verschiedenen Größenfraktionen des Straßenstaubs konnten nicht ausgemacht werden.

### Antikörpercharakterisierung

Drei monoklonale und drei polyklonale IgG-Antikörper zur Analyse von 3-Nitrotyrosin wurden ausführlich charakterisiert und die Affinitäten und Kreuzreaktivitäten für 24 Testsubstanzen bestimmt.

Die Affinitäten für 3-Nitrotyrosin variierten um drei Größenordnungen und reichten von  $3 \cdot 10^3 \text{ L}/\text{mol}$  (mAk CAY) bis  $3 \cdot 10^6 \text{ L}/\text{mol}$  (mAk 39B6). Ebenso sehr hohe Affini-

täten gegenüber Nitrotyrosin zeigten die Antikörper Schaf und Ziege mit  $1.2 \cdot 10^6$  bzw.  $8 \cdot 10^5$  L/mol, wohingegen die Antikörper Kaninchen und SA100 geringere Affinitäten im Bereich von  $10^4$  L/mol besaßen. Die Affinitäten für ein einfach nitriertes Peptid (Nitro-(1)-peptid) lagen höher und zeigten eine geringere Schwankung bei Vergleich der sechs Antikörper untereinander. Sie reichten von  $5 \cdot 10^5$  L/mol (SA100) bis  $1 \cdot 10^7$  L/mol (39B6). Die Affinitäten für den hoch nitrierten Nitro-(16.3)-BSA-Standard lagen im Allgemeinen etwa eine Größenordnung höher als für das Nitro-(1)-peptid. Nur der mAk CAY zeigte für beide Substanzen die gleiche Affinität von  $5 \cdot 10^6$  L/mol.

Die Kreuzreaktivitäten von L-Tyrosin und 4-Nitrophenylalanin waren im Allgemeinen kleiner als 1%, und die von 3,5-Dinitrotyrosin und 4-Nitrophenol kleiner als 10% (ausgenommen Ziege: 40%). Für 2,4-Dinitrophenol, 6-Nitro-m-kresol, 2-Nitro-p-kresol und 2-Nitrophenol lagen die Kreuzreaktivitäten typischerweise in der Größenordnung von  $10^2 - 10^3$  % (ausgenommen 39B6:  $3 \cdot 10^4$  %). Niedrig nitrierte BSA-Standards zeigten eine stetige Zunahme der Kreuzreaktivitäten mit der Anzahl an Nitrotyrosinresten pro Proteinmolekül, von 1-10% für Nitro-( $<0.1$ )-BSA bis  $10^2 - 10^3$  % für Nitro-(1.6)-BSA. Die Kreuzreaktivitäten hoch nitrierter BSA-Standards und des Nitro-(1)-peptids lagen typischerweise im Bereich von  $10^3 - 10^5$  %.

## Immunoassays und Nitroproteinbestimmung

Für den Nachweis von Nitroproteinen wurden einseitige und Sandwich-Immunoassays entwickelt. In einseitigen Immunoassays konnten mit den polyklonalen Antikörpern von Schaf Nachweisgrenzen von 0.01 nmol/L für hochnitrierte BSA-Standards erzielt werden. Matrixproteine erhöhten dabei die Nachweisgrenzen durch kompetitive Absorption an die Mikrotiterplatten. Die entwickelten Sandwich-Immunoassays wurden nicht von Matrixbestandteilen beeinflusst und zeigten Nachweisgrenzen zwischen 0.3 nmol/L (Kombination pAk Schaf (Fänger-Ak) - mAk 39B6) und 6 nmol/L (Kombination mAk 39B6 (Fänger-Ak) - pAk Schaf). Sowohl mit den einseitigen als auch mit den Sandwich-Immunoassays konnten Nitroproteine in Umweltproben nachgewiesen werden, insbesondere in allen Fensterstaubproben. Die Komplexität der Substanzgruppe nitrierter Proteine (Variation der Aminosäurezusammensetzung, Molekülgröße, Anzahl und Verteilung der Nitrotyrosinreste etc.) erschwert eine exakt quantitative Analytik von Nitroproteinen. Mit den entwickelten Immunoassays konnten jedoch semiquantitative Ergebnisse erzielt werden, die durch die Ergebnisse der Analytik von begasten Proteinproben bekräftigt wurden.

### Nitrotyrosinbestimmung

Nitrotyrosin konnte im Sauren mittels XAD-II selektiv angereichert und als methanolische Fraktion eluiert werden. XAD-7-Harz war dazu prinzipiell auch geeignet, jedoch waren die in Testexperimenten erzielten Trennungen nicht so scharf. Am besten zur Anreicherung von Nitrotyrosin geeignet war das Anionenaustauscherharz AG1-X8, bei dem die Probenaufgabe im Neutralen und die Elution im Sauren erfolgte. Mittels HPLC-UV konnte in den untersuchten Straßenstaubproben kein Nitrotyrosin nachgewiesen werden. Eine HPAEC-PAD-Methode zur Bestimmung von Nitrotyrosin wurde ebenfalls entwickelt. Die Nachweisgrenze lag ebenso niedrig wie mit HPLC-UV ( $20 \mu\text{g/L}$ ). Testexperimente mit LC-APCI-TOF-MS ergaben eine sehr hohe Nachweisgrenze für Nitrotyrosin ( $> 1 \text{ mg/L}$ ), LC-ESI-TOF-MS wäre vermutlich besser geeignet. Am nachweisstärksten sind jedoch GC-MS-Methoden mit chemischer Ionisierung, die parallel zu dieser Arbeit am IWC entwickelt wurden. Vorläufige erste Ergebnisse bekräftigten den Nachweis von Nitrotyrosin in Umweltproben.

### Proteinnitrierung durch Begasung

In Laborversuchen wurden Birkenpollenextrakt und Rinderserumalbumin auf Spritzenfiltern mit synthetischen Gasgemischen aus Stickstoff,  $\text{NO}_2$ , Ozon und Wasserdampf begast. Die Proteine wurden von den Filtern eluiert und die Eluate mittels einseitigem Immunoassay mit mAk CAY untersucht.

Die Proteinnitrierungsgrade von begastem Birkenpollenextrakt und BSA stiegen meist linear mit der Expositionsdauer an. Die Nitrierung verlief deutlich schneller, wenn Ozon und Feuchtigkeit zusätzlich zu  $\text{NO}_2$  vorhanden waren. Bei Volumenmischungsverhältnissen bis  $500 \text{ ppb}_v$  ergab die Steigerung der Spurengaskonzentration einen schnelleren Verlauf der Nitrierung und führte zu höheren Proteinnitrierungsgraden. Die PNGs nach vier Stunden simultaner Begasung mit  $500 \text{ ppb}_v$   $\text{NO}_2$ , Ozon und Beimischung von Feuchte lagen bei ca.  $0.2\%$ . Der Proteinnitrierungsgrad von Birkenpollenextrakt reichte bis zu  $15\%$  nach 48-stündiger Begasung mit  $200 \text{ ppb}_v$   $\text{NO}_2$  und Ozon unter Beimischung von Wasserdampf. Der PNG von BSA betrug unter diesen Bedingungen  $4\%$ . Begasung mit  $50 \text{ ppb}_v$   $\text{NO}_2$ , Ozon und Wasserdampf über 165 Stunden resultierte für BPE und BSA in PNGs von  $0.1-0.2\%$ .

Bei höheren VMV ( $1 \text{ ppm}_v$ ) war keine weitere Zunahme der Nitrierungsrate zu beobachten. Vermutlich aufgrund des ozonbedingten Proteinabbaus nahmen die gemessenen Nitrierungsgrade z.T. sogar wieder ab. Durch die Begasung mit  $1 \text{ ppm}_v$  Ozon über zwei Stunden wurde die Proteinwiederfindung auf Glasfaserfiltern um die Hälfte reduziert,

bei Teflonfiltern hingegen nicht, was vermutlich mit der hydrophoben Oberfläche von Teflon und dadurch bedingter punktueller Beschichtung der Teflonfilter zusammenhing.

Aus einer vorangegangenen Studie [290] war bereits die starke Reduktion der erzielten PNGs durch vorgeschaltete Partikel- oder Teflonfilter bekannt. Die Ursache dieses Effekts wurde damals jedoch noch nicht geklärt. Vermutet wurden Verluste von hochreaktiven Gasen oder von katalytisch wirkenden Partikeln. Experimente mit Partikelfiltern und synthetischen Gasgemischen haben nun gezeigt, dass der Verlust hochreaktiver Gase verantwortlich ist. Bei in Reihe begasten Filtern waren die im Gasstrom zuerst exponierten Filter u.a. höheren Ozonkonzentrationen ausgesetzt als Filter später im Gasstrom. Daraus wurde geschlossen, dass für exakte Untersuchungen der Reaktionskinetik parallele Begasung bzw. ein anders gestalteter Versuchsaufbau notwendig wäre.

Am Luise-Kiesselbach-Platz und in Großhadern wurden Begasungsversuche mit Umgebungsluft durchgeführt. Dabei wurden Proteinproben auf Spritzenfiltern aus Celluloseacetat, Glasfaser und regenerierter Cellulose mit Umgebungsluft durchströmt (Expositionszeit je ca. 1 Woche). Die Filtereluat wurden analog zu den Experimenten mit synthetischen Gasgemischen auf Nitroproteine untersucht. Die PNGs für BSA betragen bis zu 6%. Birkenpollenextrakt war weniger stark nitriert (PNG bis zu 0.5%). Auf Cellulosefiltern wurde BPE nicht nitriert. Die Nitrierung von BSA auf den Substraten Glasfaser, Cellulose und Celluloseacetat verlief hingegen weitgehend analog.

## Nitroproteine und Allergieentstehung

In dieser Arbeit wurde die effiziente Nitrierung von Proteinen bei simultaner Exposition gegen die Spurengase Stickstoffdioxid, Ozon und Wasserdampf bzw. Umgebungsluft nachgewiesen. Zugleich wurden in atmosphärischen Aerosol-, Straßenstaub- und Fensterstaubproben Nitroproteine mittels Immunoassay nachgewiesen. Parallel zu dieser Arbeit am IWC durchgeführte GC-MS-Messungen zeigten ebenfalls das Vorkommen von Nitrotyrosin in diesen Umweltproben an. Damit ist die Proteinnitrierung als ein häufiger und weit verbreitet auftretender Prozess anzusehen.

Posttranslational modifizierte Proteine besitzen häufig eine höhere Allergenität als unveränderte Moleküle und nitrierte Proteine können Immunantworten auslösen. Dies wurde in zahlreichen Studien bereits nachgewiesen (Abschnitt 2.2). Nitrierte Fremdproteine, die z.B. durch Inhalation in die Lunge gelangen, könnten daher eine allergieauslösende Wirkung haben. Pollenallergene in oder auf kleineren Partikeln (z.B. Stärkepartikel) besitzen eine ausreichend lange Verweilzeit in der Atmosphäre, um nitriert zu werden, und können umso weiter in die Atemwege eindringen, je kleiner ihr Durchmesser ist. Nach Deposition in der Lunge können die nitrierten Pollenallergene dann direkt in Wechsel-

wirkung mit dem Immunsystem treten.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Proteine über alle Jahreszeiten hinweg an den unterschiedlichsten Probenahmeorten Bestandteil des atmosphärischen Feinstaubes sind und dass Proteine durch Stickoxide und Ozon unter atmosphärischen Bedingungen nitrifiziert werden können. Unter Photosmog-Bedingungen ist eine erhöhte Konzentration von Nitroproteinen in der Luft zu erwarten. Durch Inhalation der feinen Aerosolpartikel können die Nitroproteine in die Lunge gelangen und dort Immunantworten auslösen. Diese Arbeit gibt damit eine mögliche Erklärung auf molekularer Basis für den Zusammenhang zwischen der verkehrsbedingten Luftverschmutzung und der Zunahme von Pollenallergien in den westlichen Industriestaaten.

# 9 Anhang

## 9.1 Geräte und Chemikalien

### 9.1.1 Geräte

#### **Begasungsexperimente**

Antistatischer Schlauch R-3603, 6 mm (Tygon, Ohio, USA)

Einfache Kunststoffbox mit Deckel, 11 x 11 cm

Gefriertrocknungsanlage Lyovac GT 2 (Finn-Aqua, Hürth)

Membranpumpe KNF Miniport (Neuberger, Freiburg)

NO<sub>x</sub>-Analysator (CLD 700 AL, Eco Physics, München)

Ringspaltmischer (Eigenbau)

Rotameter zur Durchflussmessung L 63/2400-19762, L 40/1600-9028, L 6.3/250-13370, L 6.3/50-11805, L 1/50-8324, L 1/50-3786, L 0.63/33-8658 (Rota Yokogawa, Ratingen)

Schlauchverbinder, Y-Form, Kreuzform, Reduzierstücke aus Polypropylen (Roth, Karlsruhe)

#### **Stickstoffbefeuchter und Feuchtemessung**

Datenlogger ALMEMO 2290-8 (Ahlborn, Holzkirchen)

Temperatur- und Feuchtefühler FH A646 (Ahlborn, Holzkirchen)

Umwälzbad-Thermostat Modell D8 (Haake Messtechnik, Karlsruhe)

Waschflasche mit Fritte (Schott, Mainz)

### Ozonerzeugung und Konzentrationsmessung

Analamp Power Supply (Monrovia, USA)  
Hg-Lampe (185 nm) L 937-02 (Hamamatsu, Herrsching)  
Ozon-Analysator Modell O<sub>3</sub> 41M (Ansyco GmbH, Karlsruhe)  
Polierte Aluminiumzelle (Eigenbau)  
Teflonschlauch (Roth, Karlsruhe)  
UV-transparentes Suprasil-Rohr (Schott, Mainz)

### Aerosolherzeugung und -charakterisierung

Aerosol-Neutralisator/Kryptonquelle (Eigenbau)  
Elektrostatischer Klassifizierer Modell 3071 (TSI, Aachen)  
Kondensationskernzähler Modell 3025 (TSI, Aachen)

### Spritzenfilter

Aluminiumoxid 0.2  $\mu\text{m}$ , (68092022, Whatman, Maidstone, England)  
Celluloseacetat-Membran 1.2  $\mu\text{m}$ , (17593 K, Sartorius, Göttingen)  
Glasfaser 1  $\mu\text{m}$ , (2511, Alltech, Unterhaching)  
Polyethersulfon-Membran, 0.22  $\mu\text{m}$ , steril, 25 mm, (Roth, Karlsruhe)  
Polysulfon-Membran, 0.45  $\mu\text{m}$ , (5501-06, Lida Manufacturing Corp.)  
Polysulfon-Membran 0.45  $\mu\text{m}$  mit Glasfaservorfilter (SM 17829 K, Sartorius, Göttingen)  
Regenerierte Cellulose-Membran 0.45  $\mu\text{m}$  (17765, Sartorius, Göttingen)  
Teflon-Membran, hydrophob 0.45  $\mu\text{m}$  (P 816, Roth, Karlsruhe)

### Sonstige Filter

Partikelfilter DIF-N50 (Headline Filters, Aylesford, England)  
Rundfilter, Celluloseacetat, Durchmesser 150 mm, (Infiltec, Speyer)  
Rundfilter, Emfab, Durchmesser 150 mm, (TX40HI20-WW, Pall-Gelman, Dreieich)  
Rundfilter, Fiberfilm, Durchmesser 150 mm, (T60A20, Pall-Gelman, Dreieich)  
Rundfilter, Glasfaser, Durchmesser 150 mm, MN85/90BF (Macherey-Nagel, Düren)  
Rundfilter, Papier, Weißband, Durchmesser 110 mm, (Schleicher und Schuell, Dassel)  
Rundfilter, Papier, Schwarzband, Durchmesser 90 mm (Schleicher und Schuell, Dassel)

Rundfilter, Quarzfaser, MK360, Durchmesser 150 mm (Munktell, Grycksbo, Schweden)  
Zeffluor-Membranscheiben, Teflon, Porenweite 3  $\mu\text{m}$ , rechteckige Bögen, 20 x 25 cm (P5PI001, Pall-Gelman, Dreieich)  
Zentrifugen-Membran-Filter, regenerierte Cellulose, UFC4 LGC25 (Millipore, Bedford, USA)

### Enzymimmunoassay-Analytik

8-Kanal-Photometer (Reader) für Mikrotiterplatten (TR 400, SLT, Overath)  
8-Kanalpipette 50 - 200  $\mu\text{L}$  (S8/200, Dynatech, Denkendorf)  
8-Kanal-Waschgerät (Washer) für Mikrotiterplatten (EAS 2/4, SLT, Overath)  
Einwegspritzen, 2 mL (Amefa, Kriftel)  
Mikrotiterplatten, Flachboden, hohe Bindungskapazität (655061, Greiner, Nürtingen)  
Multipipette (4780, Eppendorf, Hamburg)  
Orbital-Schüttler für Mikrotiterplatten (Institut Virion, Würzburg)  
Parafilm M, 4 x 250 ft. (American National Can, Greenwich, USA)  
Varipetten 10 - 100  $\mu\text{L}$ , 100 - 1000  $\mu\text{L}$  (Eppendorf, Hamburg)  
Transferpipette-8 20 - 200  $\mu\text{L}$  (Brand, Wertheim)

### Glasgeräte

Diffusionsabscheider, 55 x 7 cm (Eigenbau)  
Glasturm, 35 x 4.5 cm  
Pasteurpipetten 145 mm (Brand, Wertheim)  
Schraubdeckelgläschen, 4 - 30 mL (Roth, Karlsruhe)  
Zentrifugengläser (Duranglas), 12 mL (Schott, Mainz)

### HPLC-Analytik

*BioLC*-System mit Gradientenpumpe GS50, Autosampler AS50, Elektrochemischer Detektor ED40 (Dionex, Idstein)  
DCU-Einheit (PU 6030 Philips)  
Fluoreszenzdetektor PU 4027 (Philips)  
HPLC-Pumpe (Crystal 200, Unicam, Kassel)

HPLC-Pumpe (L-6200A Intelligent Pump, Merck, Darmstadt)

On-line-Entgaser (3415a, ERC, Alteglofsheim)

UV-VIS-Detektor (L-4250, Merck, Darmstadt)

### **Analytische Säulen**

AminoPac PA10 Vorsäule (2 x 50 mm) und Trennsäule 2 x 250 mm (Dionex, Idstein)

Bakerbond, RP-C18 mit Vorsäule, 250 x 4.6 mm (Baker, Deventer, Niederlande)

Jupiter RP-C18, 250 x 4.6 mm, mit Security Guard System (Phenomenex, Aschaffenburg)

Nucleosil 100-3C18, Vorsäule und Trennsäule (125 x 4 mm) (Macherey-Nagel, Düren)

Nucleosil 120-7C6H5, Trennsäule (250 x 4.6 mm) (Macherey-Nagel, Düren)

### **HPLC-APCI-TOF-MS-System**

APCI-Interface Z-Spray (Micromass, Manchester, GB)

Diodenarray UV-VIS-Detektor 996 (Waters, Eschborn)

Flugzeit-Massenspektrometer LCT (Micromass, Manchester, GB)

HPLC-System Separations Module 2690 (Waters, Eschborn)

Micro Splitter Valve, Flussteiler P-451 (Upchurch Scientific, Oak Harbor, WA, USA)

### **Sonstige Geräte**

Akku-Staubsauger EURAS XXL 100, (Euras Elektro GmbH, Dachau)

Coulomat 702 DR/C (Ströhlein, Kaarst)

DOC(TOC)/TIC/TC-Analysator TOCOR 3 (Maihak, Hamburg)

Größenausschlusschromatographie-Säulen PD10, Sephadex G-25M (Pharmacia, Uppsala, Schweden)

Halbmikro- und Makroküvetten aus PMMA, 759115 und 759105 (Brand, Wertheim)

Halbmikroküvette aus Quarzglas, Suprasil QS 1.000, 10 mm Länge (Hellma, Mühlheim)

Kopierpapier, DIN A 4 (Viking Direkt, Hallbergmoos)

Kunststoffsäule (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA 94547, USA)

Latex-Einweghandschuhe, puderfrei

Mikroliterspritze (Hamilton, Bonaduz, Schweiz)

Mikrowelle DAP-30 (Berghof, Eningen)  
Muffelofen MR 170 E (Heraeus, Heidelberg)  
Nylon Nalgene Vakuumfiltrationseinheiten (513J1542, Merck, Darmstadt)  
pH-Indikatorstäbchen, nicht blutend pH 0-6 (1.09531, Merck, Darmstadt)  
pH-Indikatorstäbchen, nicht blutend pH 5-10 (1.09533, Merck, Darmstadt)  
pH-Indikatorstäbchen, nicht blutend pH 7.5-14 (1.09532, Merck, Darmstadt)  
Pipetten 1 - 5 mL (Thermo Labsystems)  
Serologische Pipetten 25 mL (Kunststoff-Einwegpipetten N245.1, Roth, Karlsruhe)  
Siebmaschine Analysette 03 (Fritsch GmbH, Idar-Oberstein)  
Temperatureregelter Heizrührer, (Roth, Karlsruhe)  
Ultraschallbad Sonorex Modell RK 510S (Bandelin, Berlin)  
UV-VIS-Spektrometer DU 650 (Beckman Instruments, Fullerton, USA)  
Vliesstoff Type LRP 363, (Freudenberg, Weinheim)  
Waage AT261 DeltaRange (Mettler Toledo, Gießen)  
Zentrifuge Biofuge 28RS (Heraeus Sepatech, Osterode)  
Zentrifuge Universal 30F (Hettich, Tuttlingen)

### 9.1.2 Software

ChromStar 4.10 (SCPA, Stuhr)  
MassLynx v3.3 (Micromass, Manchester, GB)  
Peaknet 6.20 (Dionex, Idstein)  
Unicam Integrated Chromatography Software 4880, Version 2.01 (Unicam, Kassel)

### 9.1.3 Chemikalien

$\alpha$ -Amylase, *Aspergillus oryzae* (48175/1, Fluka, Neu-Ulm)  
 $\gamma$ -Rinderserumglobulin, 98 % (22550, Serva, Heidelberg)  
2,4-Dinitrophenol (NIT8, Promochem, Wesel)  
2-Nitrophenol (N19702, Sigma-Aldrich, Schnelldorf)  
2-Nitro-p-kresol (M62808, Sigma-Aldrich, Schnelldorf)  
2-Nitrotoluol (NIT2, Promochem, Wesel)  
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (1.08622, Merck, Darmstadt)  
3,5-Dinitrobenzoesäure (45971, Riedel-de Haen, Seelze)  
3,5-Dinitrotyrosin -Monohydrat (375780, Sigma-Aldrich, Schnelldorf)

3-Mercaptopropionsäure, 99.5 % (Fluka, Neu-Ulm)  
3-Nitrotyrosin (106-020-G001, Alexis, Grünberg)  
4-Amino-2-nitrophenol (164230050, Acros, Geel, Belgien)  
4-Hydroxy-3-nitrophenylelessigsäure (204890010, Acros, Geel, Belgien)  
4-Methoxy-2-nitrophenol (325100050, Acros, Geel, Belgien)  
4-Nitrophenol (425753, Sigma-Aldrich, Schnellendorf)  
4-Nitrotoluol (NIT4, Promochem, Wesel)  
6-Nitro-m-kresol (137790, Sigma-Aldrich, Schnellendorf)  
Acetonitril, HPLC Grade (LiChrosolv, Merck, Darmstadt)  
AG1-X8 Harz, 100-200 mesh, Chloridform (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)  
L-Aminosäure-Kit (LAA21, Sigma-Aldrich, Schnellendorf)  
BCA-Assay (UP75860a, Uptima, Montlucon Cedex, Frankreich)  
Bet v 1 (rekombinant, ALK-Abelló, Hørsholm, Dänemark)  
Birkenpollen, *Betula alba* (P-6770, Sigma-Aldrich, Schnellendorf)  
Borsäure, > 99.0 % (Fluka, Neu-Ulm)  
Rinderserumalbumin (1.12018, Merck, Darmstadt)  
Casein (C5890, Sigma-Aldrich, Schnellendorf)  
Cellulase, *Aspergillus niger* (413230/1, Fluka, Neu-Ulm)  
Deionisiertes Wasser, Milli Q, UV-behandelt (Millipore, Eschborn)  
Essigsäure, > 99 % (Sigma-Aldrich, Schnellendorf)  
Fulvinsäure (I), pH 7.00 (IWC, München)  
Fulvinsäure, Melaza Ac. Fulvico, pH 7.02 (IWC, München)  
Huminsäure aus Kompost (IWC, München)  
Huminsäure (7821, Roth, Karlsruhe)  
Huminsäure (Fluka, Neu-Ulm)  
Huminsäure-Carbamidester, Miozän, techn. (6293, Roth, Karlsruhe)  
Kaliumhydroxid Plätzchen, 97 % (Sigma-Aldrich, Schnellendorf)  
Kieselgel (Merck, Darmstadt)  
Methanol, HPLC Grade (LiChrosolv, Merck, Darmstadt)  
Multi-Aminosäurestandard (AA-S-18, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA)  
Natriumacetat, wasserfrei, 99.0 % (71179, Fluka, Neu-Ulm)  
Natriumacetat, für *AAA-Direct* (P/N 05932, Dionex, Idstein)  
Natriumhydroxid Plätzchen, 97 % (Sigma-Aldrich, Schnellendorf)  
Natronlauge-Lösung, 50 % (J.T. Baker, Deventer, Niederlande)  
Nitrobenzol (NIT1, Promochem, Wesel)  
ortho-Phthaldialdehyd, > 99.5 % (Merck, Darmstadt)

Ovalbumin (A-5253, Sigma-Aldrich, Schnellendorf)  
Peptid H-Gly-Tyr-Gly-OH (H-3670, Bachem, Heidelberg)  
Peptid H-Thr-Arg-Pro-Ile-Ile-Thr-Thr-m-nitro-Tyr-Gly-Pro-Ser-Asp-Asp-Lys(Abz)-Tyr-OH (M-2360, Bachem, Heidelberg)  
Phenol (Fluka, Neu-Ulm)  
Pikrinsäure (45994, Riedel-de Haen, Seelze)  
p-Nitrophenylalanin (F-1895, Bachem, Heidelberg)  
Pronase E (81748, Fluka, Neu-Ulm)  
Puffer pH 4, pH 7 und pH 10 (Merck, Darmstadt)  
Schwefelsäure (Merck, Darmstadt)  
Tetranitromethan (509-14-B, Sigma-Aldrich, Schnellendorf)  
Triethylamin, 99.5 % (Fluka, Neu-Ulm)  
Wasserstoffperoxid, 30 % (1.08597, Merck, Darmstadt)  
XAD-II-Harz (9060-05-3, Sigma, St. Louis, USA)  
XAD-7-Harz (06445, Fluka, Neu-Ulm)

#### 9.1.4 Puffer- und Stammlösungen

##### Carbonatpuffer (Coating-Puffer, pH 9.6):

1.59 g (15 mmol)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$   
2.93 g (25 mmol)  $\text{NaHCO}_3$   
0.20 g (3 mmol)  $\text{NaN}_3$   
1000 mL Wasser (UV-behandelt)

##### Phosphat-Kochsalz-Puffer (PBS, pH 7.6):

1.36 g (10 mmol)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
12.20 g (70 mmol)  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   
8.50 g (145 mmol)  $\text{NaCl}$   
1000 mL Wasser (UV-behandelt)

**Waschpuffer (PBS-Tween, pH 7.6):**

0.136 g (1 mmol)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
1.129 g (7 mmol)  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   
0.876 g (15 mmol) NaCl  
0.005 g (33  $\mu\text{mol}$ ) Sorbinsäure, Kaliumsalz  
0.5 mL Tween 20  
1000 mL Wasser (UV-behandelt)

**Substratpuffer (pH ca. 3.8):**

46.04 g (200 mmol)  $\text{KH}_2$ -Citrat  
0.1 g Sorbinsäure, Kaliumsalz  
1000 mL Wasser (UV-behandelt)

**TMB-Stammlösung:**

0.375 g 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin  
5 mL DMSO  
25 mL Methanol

**Wasserstoffperoxid-Stammlösung:**

3 mL 30 % Wasserstoffperoxid  
100 mL Wasser

**Substratlösung:**

25 mL Substratpuffer  
300  $\mu\text{l}$  TMB-Stammlösung  
100  $\mu\text{l}$  Wasserstoffperoxid-Stammlösung

**Stopplösung**

5 %ige Schwefelsäure mit 0.01 % Natriumdodecylsulfat

**9.1.5 Antikörper**

Humanseren MT12, MT28 und MT59, Medizintechnik-Studie, März 2000, Poliklinik für Dermatologie und Allergologie, Am Biederstein, München

Weitere verwendete Antikörper in den Tabellen 9.1 und 9.2

**Tabelle 9.1:** *Polyklonale Meerrettichperoxidase-markierte Antikörper.*

Bezeichnung	Tier	Hersteller/Lieferant	Immunogen
PI-1000	Ziege	Vector, Burlingame, USA	Kaninchen-IgG
PI-2000	Pferd	Vector, Burlingame, USA	Maus-IgG
PI-9500	Pferd	Vector, Burlingame, USA	Ziege-IgG
050H-8920	Ziege	Sigma, Deisenhofen	Kaninchen-IgG
117H9250	Ziege	Sigma, Deisenhofen	Ratte-IgG
A-3415	Esel	Sigma, Saint Louis, USA	Schaf-IgG

Tabelle 9.2: *Verwendete Antikörper, unmarkiert.*

Bezeichnung	Typ	Tier	Hersteller/Lieferant	Immunogen
CAY-189542	mAk	Maus	Cayman Chemical, Denver, USA	Peroxyinitrit- behandeltes KLH
SA-100	mAk	Maus	Biomol Research Hamburg	nitriertes KLH
SA-297	pAk	Kaninchen		
39B6	mAk	Maus	Alexis, Grünberg	3-(4-Hydroxy-3- nitrophenylacet- amido)propionsäu- re-BSA-Konjugat
N2700-07	pAk	Ziege	USBIO, Swampscott, Massachusetts, USA	gereinigtes, nitriertes KLH
24312	pAk	Schaf	Oxis/Natutec, Frankfurt	nitriertes KLH
Bv16	mAk	Maus	ALK-Abelló, Hørsholm, DK	Bet v 1
–	pAk	Kaninchen		Bet v 1
LO-HE-10	mAk	Ratte	Tec 151, Techno- pharm, Clichy, F	Human-IgE
LO-HE-17	mAk	Ratte		Human-IgE

## 9.2 Standardprogramm *BioLC*

```
Pressure.LowerLimit = 250
Pressure.UpperLimit = 3500
%A.Equate = „Leer“
%B.Equate = „1,0 mol/L NaAc“
%C.Equate = „H2O“
%D.Equate = „0,25 mol/L NaOH“
Electrode = pH
Flush Volume = 750
Wait FlushState
TrayTemperature = 5
ColumnTemperature = 30
NeedleHeight = 1
CutSegmentVolume = 10
SyringeSpeed = 3
Cycle = 0
ECD.Data_Collection_Rate = 0.8
ECD_1.Step = 0.50
ECD_1.Average = On
Cell = On
Log Pressure.Value
Waveform Time = 0.00, Potential = 0.13
Waveform Time = 0.04, Potential = 0.13
Waveform Time = 0.05, Potential = 0.33
Waveform Time = 0.21, Potential = 0.33, Integration = Begin
Waveform Time = 0.22, Potential = 0.60
Waveform Time = 0.46, Potential = 0.60
Waveform Time = 0.47, Potential = 0.33
Waveform Time = 0.56, Potential = 0.33, Integration = End
Waveform Time = 0.57, Potential = -1.67
Waveform Time = 0.58, Potential = -1.67
Waveform Time = 0.59, Potential = 0.93
Waveform Time = 0.60, Potential = 0.13
WaitForTemperature = False
```

---

```
0.000 Load %D = 16.0
Inject Curve = 5
Wait InjectState 40.000 Flow = 0.25
ECD_1.AcqOn %B = 70.0
Flow = 0.25 %C = 14.0
%B = 0.0 %D = 16.0
%C = 84.0 Curve = 5
%D = 16.0 40.100 Flow = 0.25
Curve = 5 %B = 0.0
2.000 Flow = 0.25 %C = 20.0
%B = 0.0 %D = 80.0
%C = 84.0 Curve = 5
%D = 16.0 42.100 Flow = 0.25
Curve = 5 %B = 0.0
12.000 Flow = 0.25 %C = 20.0
%B = 0.0 %D = 80.0
%C = 84.0 Curve = 5
%D = 16.0 42.200 Flow = 0.25
Curve = 8 %B = 0.0
16.000 Flow = 0.25 %C = 84.0
%B = 0.0 %D = 16.0
%C = 68.0 Curve = 5
%D = 32.0 Curve = 5 65.000 ECD_1.AcqOff
24.000 Flow = 0.25 Flow = 0.25
%B = 40.0 %B = 0.0
%C = 36.0 %C = 84.0
%D = 24.0 %D = 16.0
Curve = 8 Curve = 5
27.000 Flow = 0.25 End
%B = 40.0
%C = 44.0
%D = 16.0
Curve = 5
35.000 Flow = 0.25
%B = 70.0
%C = 14.0
```

## 9.3 Tabellen

### 9.3.1 Tabellen A: Messergebnisse der Filterproben

**Tabelle 9.3:** *Messkampagne DWD-1 (Berlin): Konzentrationen von PM10 und Protein.*

Datum	Probe	V	m	Konzentrationen	
				PM10	Protein
		[Nm <sup>3</sup> ]	[mg]	[ $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ]	[ $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ]
15.10.2001	B-664	115	7.34	63.7	0.53
17.10.2001	B-666	55	3.31	60.8	0.27
18.10.2001	B-668	54	3.95	73.5	0.61
19.10.2001	B-670	166	11.69	70.6	0.64
26.11.2001	B-712	54	2.21	41.3	0.15
27.11.2001	B-714	55	2.08	38.1	0.24
29.11.2001	B-718	55	1.55	28.2	0.19

**Tabelle 9.4:** *Messkampagne DWD-2 (Freiburg): Konzentrationen von TSP und Protein.*

Datum	Probe	V	m	Konzentrationen	
				PM10	Protein
		[Nm <sup>3</sup> ]	[mg]	[ $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ]	[ $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ]
16.02.2001	FR-109	672	44.4	66.04	2.92
17.02.2001	FR-110	680	21.3	31.34	1.14
18.02.2001	FR-111	679	30.4	44.78	1.96
19.02.2001	FR-112	675	32.9	48.78	1.14
20.02.2001	FR-113	677	40.8	60.29	1.05
05.03.2001	FR-126	670	23.2	34.62	1.01
06.03.2001	FR-127	668	28.3	42.36	1.57
07.03.2001	FR-128	663	36.6	55.20	1.11
20.04.2001	FR-172	667	16.7	25.05	0.71
21.04.2001	FR-173	669	14.8	22.11	0.62
22.04.2001	FR-174	665	14.8	22.25	1.08
23.04.2001	FR-175	660	15.7	23.78	0.85
24.04.2001	FR-176	656	16.3	24.85	0.59
25.04.2001	FR-177	665	7.7	11.58	0.10
26.04.2001	FR-178	640	12.3	19.22	0.28

**Tabelle 9.5:** Messkampagne ZSP-1: Konzentrationen von PM<sub>2.5</sub>, TC, EC und Protein (Glasfaser- und Quarzfilter, wie in Spalte 3 angegeben). Die Datumsangabe (2001) kennzeichnet jeweils den Probenahmestart.

Dat.	Probe & Mat.	V [Nm <sup>3</sup> ]	m [mg]	Konzentrationen [ $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ]				HM-	
				PM <sub>2.5</sub>	TC	EC	WSOC	WSOC	Prot.
09.08.	1 GF	1710	5.67	3.32	1.58	1.01	-	-	0.24
12.08.	2 GF	1683	8.12	4.82	1.51	0.39	-	-	0.34
15.08.	3 QF	1676	16.90	10.08	2.56	0.60	1.86	0.82	0.62
18.08.	4 GF	1680	10.04	5.97	1.31	0.42	1.01	0.23	0.24
21.08.	5 GF	1687	8.32	4.93	1.23	0.39	0.74	0.27	0.24
24.08.	6 QF	1674	15.51	9.27	2.48	0.69	1.84	1.52	1.14
27.08.	7 GF	1683	14.95	8.89	1.36	0.54	0.83	0.27	0.28
30.08.	8 GF	2832	7.63	2.69	0.91	0.26	0.86	0.08	0.12
04.09.	9 QF	2844	10.11	3.56	0.87	0.32	0.24	0.04	0.05
09.09.	10 GF	2865	12.46	4.35	0.87	0.37	0.33	0.09	0.15
14.09.	11 GF	2858	6.13	2.14	0.82	0.20	-	-	0.08
19.09.	12 GF	2822	10.04	3.56	0.83	0.28	0.69	0.25	0.28
24.09.	13 GF	2815	5.81	2.06	0.47	0.16	-	-	0.09
29.09.	14 QF	2804	11.83	4.22	0.79	0.21	-	-	0.09
04.10.	15 GF	5609	22.42	4.00	0.61	0.25	-	-	0.11
14.10.	17s GF	5645	41.21	7.30	0.25	0.07	-	-	0.06
24.10.	17b GF	5708	18.33	3.21	0.50	0.19	-	-	0.07
03.11.	18 GF	5666	21.91	3.87	0.41	0.17	-	-	0.04
13.11.	19 GF	1708	-	-	0.32	0.12	-	-	0.03
16.11.	20 GF	1693	-	-	0.30	0.06	-	-	0.05
19.11.	21 GF	1711	-	-	0.27	0.07	-	-	0.03
29.11.	23 QF	1042	-	-	0.47	0.15	-	-	0.03
01.12.	24 QF	1698	-	-	0.41	0.05	-	-	0.01
04.12.	26 QF	1713	-	-	0.40	0.06	-	-	-
07.12.	27 QF	1708	-	-	0.37	0.06	-	-	-
10.12.	28 QF	5142	-	-	0.35	0.14	-	-	-

**Tabelle 9.6:** *Messkampagne ZSP-2: Konzentrationen von PM<sub>2.5</sub> und TC (Quarzfilter). Die Datumsangabe kennzeichnet stets den jeweiligen Probenahmestart.*

Datum	Probe	V	m	Konzentrationen	
				PM <sub>2.5</sub>	TC
		[Nm <sup>3</sup> ]	[mg]	[μg/m <sup>3</sup> ]	[μg/m <sup>3</sup> ]
30.10.2002	SX02-2	2789	10.49	3.76	0.41
04.11.2002	SX02-3	1091	2.29	2.10	0.19
06.11.2002	SX02-4	1139	5.29	4.64	0.38
08.11.2002	SX02-5	1135	3.76	3.31	0.36
10.11.2002	SX02-6	1132	2.35	2.07	0.09
12.11.2002	SX02-7	1120	3.07	2.74	0.21
14.11.2002	SX02-8	1112	2.49	2.24	0.14
16.11.2002	SX02-9	2793	2.31	0.83	0.10
21.11.2002	SX02-10	2793	3.79	1.36	0.12

**Tabelle 9.7:** *Messkampagne HPB: Konzentrationen von PM<sub>2.5</sub>, TC, EC und Protein (Quarzfilter).*

Datum	Probe	V	m	Konzentrationen			
				PM <sub>2.5</sub>	TC	EC	Protein
		[Nm <sup>3</sup> ]	[mg]	[μg/m <sup>3</sup> ]	[μg/m <sup>3</sup> ]	[μg/m <sup>3</sup> ]	[μg/m <sup>3</sup> ]
16.05.02	HPB-2	495	8.06	16.30	3.28	0.59	0.62
17.05.02	HPB-3	619	10.64	17.19	3.02	0.72	0.62
18.05.02	HPB-4	626	8.58	13.71	2.20	0.34	0.47
19.05.02	HPB-5	633	6.91	10.91	0.52	0.05	0.17
20.05.02	HPB-6	632	5.62	8.90	0.75	0.05	0.20
21.05.02	HPB-7	621	8.82	14.22	2.29	0.43	0.61
22.05.02	HPB-8	618	10.35	16.77	2.72	0.47	0.56
23.05.02	HPB-9	627	11.16	17.80	1.48	0.35	0.34
24.05.02	HPB-10	630	8.01	12.72	0.84	0.17	0.20
25.05.02	HPB-11	631	6.20	9.83	0.71	0.02	0.14
26.05.02	HPB-12	628	2.26	3.60	0.88	0.15	0.17
27.05.02	HPB-13	634	2.66	4.19	0.24	0.01	0.06
28.05.02	HPB-14	633	9.18	14.50	0.38	0.14	0.12
29.05.02	HPB-15	631	5.92	9.38	1.09	0.19	0.33
30.05.02	HPB-16	628	8.47	13.50	1.38	0.43	0.48
31.05.02	HPB-18	629	9.84	15.65	2.10	0.49	0.62
01.06.02	HPB-19	625	9.31	14.89	2.94	0.66	0.68
02.06.02	HPB-20	624	8.16	13.08	2.33	0.39	0.63
03.06.02	HPB-21	1864	19.02	10.21	1.88	0.56	0.40
06.06.02	HPB-22	1881	11.97	6.36	1.22	0.35	0.21
09.06.02	HPB-23	1894	8.25	4.36	0.99	0.25	0.20
12.06.02	HPB-24	1860	16.16	8.69	1.99	0.47	0.37
15.06.02	HPB-25	1847	30.08	16.29	3.70	0.83	0.66
18.06.02	HPB-27	1847	32.12	17.40	3.87	1.07	0.65
21.06.02	HPB-28	1853	32.88	17.74	4.13	0.84	0.75

**Tabelle 9.8:** *Messkampagne HPB (fortgesetzt): Konzentrationen von PM2.5, TC, EC und Protein (Quarzfilter).*

Datum	Probe	V	m	Konzentrationen			
				PM2.5	TC	EC	Protein
		[Nm <sup>3</sup> ]	[mg]	[μg/m <sup>3</sup> ]	[μg/m <sup>3</sup> ]	[μg/m <sup>3</sup> ]	[μg/m <sup>3</sup> ]
24.06.02	HPB-29	1870	23.94	12.80	1.84	0.60	0.47
27.06.02	HPB-30	1881	25.17	13.38	2.17	0.59	0.47
30.06.02	HPB-31	1864	25.79	13.83	2.65	0.67	0.59
03.07.02	HPB-32	1873	14.59	7.79	1.43	0.35	0.36
06.07.02	HPB-33	1864	14.43	7.74	1.75	0.38	0.40
10.07.02	HPB-35	466	4.74	10.19	1.11	0.48	0.18
11.07.02	HPB-36	1873	12.31	6.58	1.51	0.39	0.34
14.07.02	HPB-37	1866	17.96	9.63	1.82	0.50	0.40
17.07.02	HPB-38	1875	15.90	8.48	1.50	0.49	0.33
20.07.02	HPB-39	1864	21.37	11.47	2.42	0.81	0.58
23.07.02	HPB-40	1873	15.98	8.53	1.95	0.48	0.42
30.07.02	HPB-42	1858	14.71	7.92	2.13	0.53	0.52
02.08.02	HPB-43	1866	11.99	6.42	1.78	0.51	0.45
05.08.02	HPB-44	1877	8.47	4.51	1.17	0.36	0.26
08.08.02	HPB-45	1864	10.90	5.85	1.07	0.42	0.30
11.08.02	HPB-48	1879	11.69	6.22	0.96	0.26	0.16
28.08.02	HPB-49	1781	25.68	14.42	3.03	0.92	0.55
31.08.02	HPB-50	1879	38.95	20.73	3.13	1.15	0.36
03.09.02	HPB-51	1870	16.22	8.67	1.40	0.51	0.27
06.09.02	HPB-52	1862	21.78	11.70	2.59	0.88	0.44
09.09.02	HPB-53	1881	12.85	6.83	0.89	0.38	0.18
12.09.02	HPB-56	1886	39.71	21.06	6.49	2.00	1.62
15.09.02	HPB-57	1886	17.62	9.35	1.61	0.63	0.30
18.09.02	HPB-58	1333	11.21	8.41	1.88	0.66	0.40

**Tabelle 9.9:** *Messkampagne IWC-1: Konzentrationen von PM<sub>2.5</sub>, TC, EC, WSOC, HM-WSOC und Protein (Glasfaserfilter).*

Dat.	Probe	V [Nm <sup>3</sup> ]	m [mg]	Konzentrationen [ $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ]				HM-	
				PM <sub>2.5</sub>	TC	EC	WSOC	WSOC	Prot.
12.04.01	IWC1-1	1302	11.08	8.51	1.54	1.03	0.72	0.23	0.24
14.04.01	IWC1-2	1294	5.82	4.50	3.53	0.44	0.91	0.46	0.20
16.04.01	IWC1-3	1290	8.04	6.23	3.12	0.38	1.76	0.26	0.02
18.04.01	IWC1-4	553	5.38	9.72	5.68	1.13	2.30	0.57	0.33

**Tabelle 9.10:** *Messkampagne IWC-2: Konzentrationen von PM<sub>2.5</sub> und Protein (Glasfaserfilter).*

Datum	Probe	V [Nm <sup>3</sup> ]	m [mg]	Konzentrationen	
				PM <sub>2.5</sub> [ $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ]	Protein [ $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ]
26.07.2001	IWC2-3 <sup>1</sup>	1899	25.03	13.18	1.05
28.07.2001	IWC2-4	1780	31.96	17.95	1.23
31.07.2001	IWC2-5	633	13.47	21.30	0.96
01.08.2001	IWC2-6	635	14.97	23.58	0.49
02.08.2001	IWC2-7	629	16.30	25.91	1.94
03.08.2001	IWC2-8	636	7.81	12.27	1.42

<sup>1</sup>Quarzfaser

**Tabelle 9.11:** *Messkampagne IWC-3: Konzentrationen von PM2.5, TC, EC und Protein (Quarzfilter).*

Datum	Probe	V	m	Konzentrationen			
				PM2.5	TC	EC	Protein
		[Nm <sup>3</sup> ]	[mg]	[μg/m <sup>3</sup> ]	[μg/m <sup>3</sup> ]	[μg/m <sup>3</sup> ]	[μg/m <sup>3</sup> ]
21.09.2002	IWC3-1	1922	23.10	12.02	2.68	1.31	0.48
24.09.2002	IWC3-2	1955	18.18	9.30	2.19	1.09	0.37
27.09.2002	IWC3-3	1961	21.39	10.91	3.29	1.58	0.46
30.09.2002	IWC3-5	1946	30.72	15.78	6.34	1.84	0.45
04.10.2002	IWC3-6	1948	15.50	7.95	1.72	0.63	0.36
07.10.2002	IWC3-7	1950	30.55	15.66	3.26	1.54	0.48
10.10.2002	IWC3-9	1944	52.63	27.07	3.22	0.87	0.31
13.10.2002	IWC3-10	1940	18.26	9.41	3.41	1.89	0.42
16.10.2002	IWC3-11	1931	10.91	5.65	1.80	1.02	0.21
19.10.2002	IWC3-12	1948	17.16	8.81	3.33	1.79	0.25
22.10.2002	IWC3-13	638	4.66	7.31	2.12	0.72	0.21

**Tabelle 9.12:** *Messkampagne LKP (2001): Konzentrationen von PM<sub>2.5</sub>, TC, EC, Protein, WSOC und HM-WSOC (falls nicht anders angegeben: Glasfaserfilter).*

Dat.	Probe	V [Nm <sup>3</sup> ]	m [mg]	Konzentrationen [ $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ]				HM-	
				PM <sub>2.5</sub>	TC	EC	WSOC	WSOC	Prot.
19.04.	LKP-5	2267	54.84	24.19	10.13	7.29	1.15	0.32	0.33
23.04.	LKP-6	1879	56.07	29.84	-	-	-	-	0.34
26.04.	LKP-7	1258	28.41	22.58	13.09	6.83	-	-	0.47
28.04.	LKP-9	1253	32.78	26.17	11.44	6.71	3.61	-	0.48
30.04.	LKP-10	1248	37.16	29.77	11.48	6.46	2.22	1.13	0.60
02.05.	LKP-11	1233	44.99	36.50	14.03	7.95	-	-	0.36
04.05.	LKP-12 <sup>1</sup>	1149	-	-	-	-	-	-	-
06.05.	LKP-13	1273	42.00	33.00	13.12	8.35	2.14	0.17	0.26
08.05.	LKP-14 <sup>1</sup>	1234	40.00	32.42	-	-	-	-	0.45
10.05.	LKP-15	1243	38.06	30.63	12.38	6.88	2.59	1.06	0.80
12.05.	LKP-18	1257	30.11	23.96	10.59	5.49	1.08	-	0.25
15.05.	LKP-20	1302	26.51	20.36	11.86	8.27	-	-	-
18.05.	LKP-24	1299	20.96	16.14	7.79	4.82	1.28	0.44	0.28
20.05.	LKP-25	1279	29.02	22.69	8.29	-	2.66	0.92	0.70
22.05.	LKP-26	1273	33.36	26.21	11.60	-	1.89	1.01	0.39
24.05.	LKP-27	1273	31.22	24.53	12.00	6.69	2.63	1.27	1.01
26.05.	LKP-28	1261	37.39	29.65	13.74	5.87	2.87	-	0.60
28.05.	LKP-29	1247	37.46	30.04	16.70	10.78	5.14	1.20	0.96

<sup>1</sup>Celluloseacetat-Filter

**Tabelle 9.13:** Messkampagne LKP (fortgesetzt, 2001): Konzentrationen von PM2.5, TC, EC, Protein, WSOC und HM-WSOC (falls nicht anders angegeben: Glasfaserfilter).

Dat.	Probe	V [Nm <sup>3</sup> ]	m [mg]	Konzentrationen [ $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ]				HM-	
				PM2.5	TC	EC	WSOC	WSOC	Prot.
30.05.	LKP-31 <sup>1</sup>	224	7.04	31.45	-	-	-	-	1.42
01.06.	LKP-30	1302	20.99	16.12	6.77	4.20	0.22	-	0.21
03.06.	LKP-32	1299	17.30	13.32	6.34	5.53	-	-	0.19
05.06.	LKP-33	1269	25.23	19.89	12.96	10.42	1.85	-	0.60
07.06.	LKP-34	1267	25.79	20.35	12.93	-	3.53	-	0.22
09.06.	LKP-35	1284	15.88	12.37	7.70	5.81	0.92	0.35	0.26
11.06.	LKP-36	1273	25.76	20.24	13.01	8.93	1.92	0.96	0.28
13.06.	LKP-37	1273	18.07	14.19	7.06	5.48	1.60	-	0.64
15.06.	LKP-38	1276	10.66	8.35	7.26	-	-	-	0.09
17.06.	LKP-39	1645	29.36	17.85	12.63	8.59	0.96	-	0.25
20.06.	LKP-40 <sup>2</sup>	632	13.92	22.02	-	-	-	-	0.37
21.06.	LKP-41 <sup>2</sup>	625	17.11	27.37	-	-	-	-	0.47
29.06.	LKP-43 <sup>2</sup>	499	14.67	29.38	-	-	-	-	1.06
30.06.	LKP-43a <sup>1</sup>	621	11.30	18.21	-	-	-	-	1.19
01.07.	LKP-47	640	12.13	18.95	6.33	5.21	-	-	0.25
02.07.	LKP-48	635	15.73	24.77	15.76	11.12	2.96	0.72	0.40
03.07.	LKP-49	638	10.59	16.60	10.69	6.30	-	-	0.27
04.07.	LKP-50	633	12.31	19.45	14.15	7.43	1.62	-	0.31

<sup>1</sup>Emfab-Filter

<sup>2</sup>Fiberfilm-Filter

## 9.3.2 Tabellen B: Affinitäten und Kreuzreaktivitäten

**Tabelle 9.14:** *Übersicht über Affinitäten und Kreuzreaktivitäten des Antikörpers CAY für weitere Testsubstanzen.*

Testsubstanz	Affinität [L/mol]	Kreuzreaktivität [%]
4-Hydroxy-3-nitrophenylelessigsäure	$(9.1 \pm 0.3) \cdot 10^3$	$(4.2 \pm 0.1) \cdot 10^2$
4-Methoxy-2-nitrophenol	$(8.1 \pm 0.4) \cdot 10^3$	$(3.7 \pm 0.2) \cdot 10^2$
4-Amino-2-nitrophenol	$(5.7 \pm 0.6) \cdot 10^3$	$(2.0 \pm 0.2) \cdot 10^2$
Rinderserumalbumin	$(4.5 \pm 1.1) \cdot 10^2$	$8.4 \pm 2.0$
Pikrinsäure	$(1.6 \pm 0.9) \cdot 10^2$	$5.4 \pm 3.2$
Birkenpollenextrakt ( $\bar{M}_{rel}=10$ kDa)	$(3.3 \pm 0.1) \cdot 10^1$	$6.2 \pm 0.2$
3,5-Dinitrobenzoesäure	$(2.2 \pm 0.9) \cdot 10^1$	$0.5 \pm 0.2$

Tabelle 9.15: Molare Kreuzreaktivitäten verschiedener Nitrotyrosin-Antikörper (Nitrotyrosin = 100 %-Wert).

Testsubstanz	Schaf	Ziege	Kaninchen	SA-100	39B6	CAY
Nitro-(16.8)-BSA	$(3.1 \pm 0.0) \cdot 10^4$	$(8.0 \pm 0.3) \cdot 10^3$	$(1.1 \pm 0.0) \cdot 10^5$	$(1.8 \pm 0.3) \cdot 10^4$	$_{-1}$	$(1.7 \pm 0.5) \cdot 10^5$
Nitro-(16.3)-BSA	$(3.8 \pm 0.1) \cdot 10^4$	$(9.4 \pm 0.6) \cdot 10^3$	$(1.3 \pm 0.1) \cdot 10^5$	$(3.0 \pm 0.3) \cdot 10^4$	$(2.5 \pm 0.3) \cdot 10^3$	$(2.4 \pm 0.9) \cdot 10^5$
Nitro-(14.7)-BSA	$(2.9 \pm 0.2) \cdot 10^4$	$(6.0 \pm 1.2) \cdot 10^3$	$(8.5 \pm 0.7) \cdot 10^4$	$(1.1 \pm 0.2) \cdot 10^4$	$_{-1}$	$(1.2 \pm 0.4) \cdot 10^5$
Nitro-(14.4)-BSA	$(2.6 \pm 0.4) \cdot 10^4$	$(5.8 \pm 0.7) \cdot 10^3$	$(7.8 \pm 0.4) \cdot 10^4$	$(1.1 \pm 0.2) \cdot 10^4$	$(3.8 \pm 0.3) \cdot 10^3$	$(1.2 \pm 0.2) \cdot 10^5$
Nitro-(14.3)-BSA	$(6.7 \pm 1.0) \cdot 10^3$	$(5.8 \pm 0.1) \cdot 10^3$	$(1.8 \pm 0.2) \cdot 10^5$	$(6.2 \pm 0.6) \cdot 10^4$	$(4.2 \pm 1.7) \cdot 10^3$	$(4.3 \pm 0.2) \cdot 10^5$
Nitro-(11.8)-BSA	$(1.9 \pm 0.2) \cdot 10^4$	$(5.7 \pm 0.2) \cdot 10^3$	$(7.1 \pm 1.6) \cdot 10^4$	$(5.9 \pm 1.0) \cdot 10^3$	$_{-1}$	$(1.1 \pm 0.2) \cdot 10^5$
Nitro-(11.3)-BSA	$(5.2 \pm 0.4) \cdot 10^3$	$(1.5 \pm 0.3) \cdot 10^3$	$(5.0 \pm 0.1) \cdot 10^4$	$(8.3 \pm 0.4) \cdot 10^3$	$_{-1}$	$_{-1}$
Nitro-(10.8)-BSA	$(1.6 \pm 0.1) \cdot 10^4$	$(4.9 \pm 1.7) \cdot 10^3$	$(6.3 \pm 1.1) \cdot 10^4$	$(5.1 \pm 0.6) \cdot 10^3$	$_{-1}$	$(9.7 \pm 1.1) \cdot 10^4$
Nitro-(9.4)-BSA	$(1.0 \pm 0.0) \cdot 10^4$	$(5.0 \pm 0.7) \cdot 10^3$	$(5.7 \pm 0.4) \cdot 10^4$	$(4.0 \pm 0.4) \cdot 10^3$	$(1.9 \pm 0.0) \cdot 10^3$	$(9.4 \pm 3.1) \cdot 10^4$
Nitro-(5.6)-BSA	$(5.4 \pm 0.7) \cdot 10^3$	$(3.3 \pm 0.7) \cdot 10^3$	$(2.9 \pm 0.7) \cdot 10^4$	$(2.0 \pm 0.4) \cdot 10^3$	$(4.3 \pm 1.3) \cdot 10^2$	$(6.4 \pm 1.6) \cdot 10^4$
Nitro-(1.6)-BSA	$(2.4 \pm 0.2) \cdot 10^2$	$(1.1 \pm 0.2) \cdot 10^2$	$(9.7 \pm 0.4) \cdot 10^2$	$(2.0 \pm 0.2) \cdot 10^2$	$(1.1 \pm 0.4) \cdot 10^2$	$_{-1}$
Nitro-(1)-peptid	$(1.9 \pm 0.7) \cdot 10^3$	$(8.3 \pm 0.6) \cdot 10^2$	$(9.0 \pm 1.0) \cdot 10^3$	$(1.2 \pm 0.1) \cdot 10^3$	$(5.3 \pm 0.1) \cdot 10^2$	$(1.4 \pm 0.1) \cdot 10^5$
Nitro-(0.6)-BSA	$(6.8 \pm 0.9) \cdot 10^1$	$(6.5 \pm 1.0) \cdot 10^1$	$(3.4 \pm 0.2) \cdot 10^2$	$(7.0 \pm 0.7) \cdot 10^1$	$(5.1 \pm 2.2) \cdot 10^1$	$_{-1}$
Nitro-(0.2)-BSA	$(1.1 \pm 0.1) \cdot 10^1$	$7.0 \pm 0.5$	$(6.4 \pm 0.5) \cdot 10^1$	$(1.8 \pm 0.2) \cdot 10^1$	$6.9 \pm 2.3$	$_{-1}$
Nitro-( $<0.1$ )-BSA	$(4.4 \pm 0.1) \cdot 10^{-1}$	$1.6 \pm 0.4$	$(1.7 \pm 0.1) \cdot 10^1$	$(1.0 \pm 0.1) \cdot 10^1$	$_{-1}$	$_{-1}$
2-Nitrophenol	$(1.7 \pm 0.0) \cdot 10^2$	$(2.6 \pm 0.4) \cdot 10^1$	$(5.4 \pm 0.4) \cdot 10^1$	$(5.0 \pm 0.9) \cdot 10^2$	$(1.5 \pm 0.3) \cdot 10^2$	$(5.4 \pm 0.7) \cdot 10^2$
2-Nitro-p-kresol	$(3.3 \pm 0.1) \cdot 10^2$	$(1.7 \pm 0.2) \cdot 10^2$	$(1.1 \pm 0.0) \cdot 10^2$	$(7.3 \pm 0.1) \cdot 10^2$	$(2.4 \pm 0.1) \cdot 10^4$	$(1.8 \pm 0.1) \cdot 10^3$
6-Nitro-m-kresol	$(3.0 \pm 1.0) \cdot 10^2$	$(4.8 \pm 0.7) \cdot 10^1$	$(8.1 \pm 4.0) \cdot 10^{-1}$	$(4.5 \pm 0.7) \cdot 10^1$	$(2.6 \pm 0.9) \cdot 10^3$	$(3.9 \pm 0.4) \cdot 10^2$
3-Nitrotyrosin	$1.0 \cdot 10^2$					
2,4-Dinitrophenol	$(6.7 \pm 0.7) \cdot 10^1$	$(4.7 \pm 0.5) \cdot 10^1$	$(6.7 \pm 0.2) \cdot 10^1$	$(3.2 \pm 0.2) \cdot 10^2$	$(7.8 \pm 0.4) \cdot 10^3$	$(5.2 \pm 1.6) \cdot 10^2$
4-Nitrophenol	$1.1 \pm 0.3$	$(1.3 \pm 1.0) \cdot 10^1$	$(2.7 \pm 0.1) \cdot 10^{-1}$	$3.6 \pm 0.5$	$(9.6 \pm 4.0) \cdot 10^{-1}$	$4.1 \pm 2.5$
3,5-Dinitrotyrosin	$6.2 \pm 2.1$	$(4.0 \pm 2.4) \cdot 10^1$	$9.5 \pm 1.0$	$(1.8 \pm 0.2) \cdot 10^1$	$1.6 \pm 0.2$	$1.2 \pm 4.2$
L-Tyrosin	$(1.3 \pm 0.9) \cdot 10^{-1}$	$<0.1$	$_{-1}$	$(2.2 \pm 0.2) \cdot 10^{-1}$	$<0.1$	$6.2 \pm 1.0$
4-Nitrophenylalanin	$<0.1$	$(3.0 \pm 1.3) \cdot 10^{-1}$	$<0.1$	$(1.1 \pm 0.1) \cdot 10^{-1}$	$<0.1$	$(1.3 \pm 1.3) \cdot 10^{-1}$

<sup>1</sup>kein Wert verfügbar

### 9.3.3 Tabellen C und D: Probenextraktionen und Proteinnitrierungsgrade mit Umgebungsluft begaster Proben

**Tabelle 9.16:** *Extraktion von Straßenstaubproben zur Untersuchung der Extrakte mittels einseitigen und Sandwich-Immunoassays auf Nitroproteine. Sammeln der Proben mit tragbarem Akku-Staubsauger und Extraktion mittels PBS-Puffer/Wasser 1 : 10 (v/v).*

Probe	Größenfraktion [ $\mu\text{m}$ ]	Datum	Ort	Einwaage [mg]	Puffer [mL]
L1	32-63	02.05.00	Ligusterstr.	207.9	4
K4	32-63	03.04.00	LKP	227.9	4
K10	32-63	28.04.00	LKP	215.4	4
K13	< 63	15.05.00	LKP	287.2	4
K15	63-125	02.06.00	LKP	255.1	4
K16	< 63	16.06.00	LKP	232.3	6
K101	< 63	03.05.01	LKP	205.9	4
K101	63-125	03.05.01	LKP	209.9	4
S8	< 63	10.05.00	Saalburgstr.	221.4	4
W10	< 63	10.05.00	Würmtalstr.	218.2	4
W10	63-125	10.05.00	Würmtalstr.	241.5	4
W12	< 63	25.05.00	Würmtalstr.	221.6	6
W14	< 63	16.06.00	Würmtalstr.	212.2	6
W14	63-125	16.06.00	Würmtalstr.	215.1	6
W101	< 63	03.05.01	Würmtalstr.	205.2	6
W101	63-125	03.05.01	Würmtalstr.	202.7	6

**Tabelle 9.17:** *Extraktion von Filterproben zur Untersuchung der Extrakte mittels einseitigen und Sandwich-Immunoassays auf Nitroproteine. Probenahmeort LKP (ausgenommen Probe FM), Probenahmejahr 2001, Extraktion mittels PBS-Puffer/Wasser 1 : 10 (v/v).*

Probe	Fraktion	Filter	Sampler	Zeitraum	Einwaage [mg]	Puffer [mL]
LKP-24	PM2.5	GF	HVS	18.05. - 20.05.	7.9	10
LKP-5	PM2.5	GF	HVS	19.04. - 23.04.	6.9	6
LKP-6	PM2.5	GF	HVS	23.04. - 26.04.	3.6	6
LKP-7	PM2.5	GF	HVS	26.04. - 28.04.	10.2	10
LKP-43a	PM2.5	Emfab	HVS	30.06. - 01.07.	4.2	10
LVS-1	TSP	Teflon	LVS	18.05. - 26.05.	13.5	5
LVS-5	TSP	Teflon	LVS	15.06. - 21.06.	7.2	5
FM <sup>1</sup>	TSP	GF	15.07.1997 - 20.08.2001	446 <sup>2</sup>	15	

<sup>1</sup>Filtermatte, Klinikum Großhadern, Bettenhaus F

<sup>2</sup>Bruttoeinwaage Filter + Probe

**Tabelle 9.18:** *Extraktion von sonstigen Proben zur Untersuchung der Extrakte mittels einseitigen und Sandwich-Immunoassays auf Nitroproteine. Extraktion mittels PBS-Puffer/Wasser 1 : 10 (v/v).*

Probe	Datum	Art der Probe	Ort	Einwaage [mg]	Puffer [mL]
Garm	06/01	Glasscheibe Haustür	Garmischer Str.	114.7	4
Heig1	06/01	Fensterscheibe	Heighofstr.	144.6	4
Heig2	06/01	Fensterscheibe	Heighofstr.	157.9	6
Toem1	09/03	Fensterscheibe	Toemlingerstr.	48.7	6
Toem2	09/03	Fensterzwischenraum	Toemlingerstr.	136.5	6

**Tabelle 9.19:** Proteinmittierungsgrade der begasten Proteinproben aus den Begasungsexperimenten mit Umgebungsluft am LKP und in München-Großhadern. Angabe des Mittelwertes und der Spannweite von Dreifachmessungen im einseitigen Immunoassay mit mAk CAY.

Datum	Luise-Kieselbach-Platz			Großhadern		
	GF	CA	RC	GF	CA	RC
<b>Rinderserumalbumin<sup>1,2</sup></b>						
15.04.2002 - 22.04.2002	n.d.	0.205 ± 0.022	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
22.04.2002 - 29.04.2002	0.503 ± 0.050	0.342 ± 0.024	-	0.953 ± 0.073	0.325 ± 0.021	-
29.04.2002 - 06.05.2002	0.283 ± 0.041	0.261 ± 0.070	0.207 ± 0.024	1.140 ± 0.171	0.122 ± 0.004	0.111 ± 0.026
06.05.2002 - 15.05.2002	0.305 ± 0.105	0.181 ± 0.043	0.230 ± 0.035	6.421 ± 1.535	0.058 ± 0.002	0.236 ± 0.019
29.05.2002 - 05.06.2002	0.228 ± 0.009	0.624 ± 0.038	0.239 ± 0.018	1.402 ± 0.203	0.172 ± 0.019	0.147 ± 0.008
<b>Birkenpollenextrakt<sup>1,2</sup></b>						
15.04.2002 - 22.04.2002	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
22.04.2002 - 29.04.2002	n.d.	0.232 ± 0.027	-	n.d.	n.d.	-
29.04.2002 - 06.05.2002	n.d.	0.030 ± 0.012	n.d.	n.d.	0.206 ± 0.037	n.d.
06.05.2002 - 15.05.2002	0.003 ± 0.001	0.067 ± 0.013	0.001 ± 0.001	0.033 ± 0.008	0.395 ± 0.086	n.d.
29.05.2002 - 05.06.2002	0.040 ± 0.013	0.193 ± 0.008	n.d.	0.079 ± 0.009	0.454 ± 0.008	n.d.

<sup>1</sup>n.d. = kein signifikantes Signal über der Nachweisgrenze detektiert

<sup>2</sup>- kein Wert verfügbar

# Literaturverzeichnis

- [1] J. T. Houghton, Y. Ding, D. J. Griggs, M. Noguera, P. J. van der Linden, X. Dai, K. Maskell, and C. A. Johnson. *Climate Change 2001 - The Scientific Basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2001.
- [2] D. W. Dockery, C. A. Pope, X. Xu, J. D. Spengler, J. H. Ware, M. E. Fay, B. G. Ferris, and F. E. Speizer. An Association between Air Pollution and Mortality in six U.S. Cities. *New England J. Med.*, 329:1753–1759, 1993.
- [3] H.-E. Wichmann. Epidemiologische Erfahrungen zur Wirkung von Fein- und Ultrastäuben. In W. Mücke, editor, *Wirkung und Erfassung von Fein- und Ultrastäuben*, pages 17–50. Institut für Toxikologie und Umwelthygiene der Technischen Universität München, München, 2002.
- [4] P. Tiittanen, K. L. Timonen, J. Ruuskanen, A. Mirme, and J. Pekkanen. Fine Particulate Air Pollution, Resuspended Road Dust and Respiratory Health Among Symptomatic Children. *Eur. Respir. J.*, 13:266–273, 1999.
- [5] K. Ito and C. Hayes. Associations of London, England, Daily Mortality with Particulate Matter, Sulfur Dioxide and Acidic Aerosol Pollution. *Arch. Environ. Health*, 48:213–220, 1993.
- [6] T. N. Graedel and P. J. Crutzen. *Chemie der Atmosphäre: Bedeutung für Klima und Umwelt*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1994.
- [7] A. Heintz and G. A. Reinhardt. *Chemie und Umwelt*. Vieweg & Sohn, Wiesbaden, 1996.
- [8] M. Kremer. Photosmog im Modell. *Chem. unserer Zeit*, 32:192–196, 1998.

- [9] J. H. Seinfeld and S. N. Pandis. *Atmospheric Chemistry and Physics*. John Wiley & Sons, New York, 1998.
- [10] B. J. Finlayson-Pitts and J. N. Pitts. *Chemistry of the Upper and Lower Atmosphere*. Academic Press, San Diego, 2000.
- [11] R. P. Wayne. *Chemistry of Atmospheres*. University Press, Oxford, 2000.
- [12] H. Horvath. Aerosols - an Introduction. *J. Environ. Radioact.*, 51:5–25, 2000.
- [13] S. Zappoli, A. Andracchio, S. Fuzzi, M. C. Facchini, A. Gelencser, G. Kiss, Z. Krivacsy, A. Molnar, E. Meszaros, H. C. Hansson, K. Rosman, and Y. Zebuhr. Inorganic, Organic and Macromolecular Components of Fine Aerosol in Different Areas of Europe in Relation to their Water Solubility. *Atmos. Environ.*, 33:2733–2743, 1999.
- [14] F. Raes, R. Van Dingenen, E. Vignati, J. Wilson, J. P. Putaud, J. H. Seinfeld, and P. Adams. Formation and Cycling of Aerosols in the Global Troposphere. *Atmos. Environ.*, 34:4215–4240, 2000.
- [15] B. Varga, G. Kiss, I. Ganszky, A. Gelencser, and Z. Krivacsy. Isolation of Water Soluble Organic Matter from Atmospheric Aerosol. *Talanta*, 55:561–572, 2001.
- [16] R. Sempere and K. Kawamura. Comparative Distributions of Dicarboxylic Acids and Related Polar Compounds in Snow, Rain and Aerosols from Urban Atmosphere. *Atmos. Environ.*, 28:449–459, 1994.
- [17] P. Saxena and L. M. Hildemann. Water Soluble Organics in Atmospheric Particles: A Critical Review of the Literature and Application of Thermodynamics to Identify Candidate Compounds. *J. Atmos. Chem.*, 24:57–109, 1996.
- [18] M. C. Facchini, S. Fuzzi, S. Zappoli, A. Andracchio, A. Gelencser, G. Kiss, Z. Krivacsy, E. Meszaros, H. C. Hansson, T. Alsberg, and Y. Zebuhr. Partitioning of the Organic Aerosol Component between Fog Droplets and Interstitial Air. *J. Geophys. Res.-Atmos.*, 104:26821–26832, 1999.
- [19] S. Decesari, M. C. Facchini, S. Fuzzi, and E. Tagliavini. Characterization of Water-Soluble Organic Compounds in Atmospheric Aerosol: A New Approach. *J. Geophys. Res.-Atmos.*, 105:1481–1489, 2000.

- [20] B. K. Pun, C. Seigneur, D. Grosjean, and P. Saxena. Gas-Phase Formation of Water Soluble Organic Compounds in the Atmosphere: A Retrosynthetic Analysis. *J. Atmos. Chem.*, 35:199–223, 1999.
- [21] S. Decesari, M. C. Facchini, E. Matta, F. Lettini, M. Mircea, S. Fuzzi, E. Tagliavini, and J. P. Putaud. Chemical Features and Seasonal Variation of Fine Aerosol Water-Soluble Organic Compounds in the Po Valley, Italy. *Atmos. Environ.*, 35:3691–3699, 2001.
- [22] S. Fuzzi, S. Decesari, M. C. Facchini, E. Matta, M. Mircea, and E. Tagliavini. A Simplified Model of the Water Soluble Organic Component of Atmospheric Aerosols. *Geophys. Res. Lett.*, 28:4079–4082, 2001.
- [23] Z. Krivacsy, A. Gelencser, G. Kiss, E. Meszaros, A. Molnar, A. Hoffer, T. Meszaros, Z. Sarvari, D. Temesi, B. Varga, U. Baltensperger, S. Nyeki, and E. Weingartner. Study on the Chemical Character of Water Soluble Organic Compounds in Fine Atmospheric Aerosol at the Jungfraujoch. *J. Atmos. Chem.*, 39:235–259, 2001.
- [24] S. Decesari, M. C. Facchini, E. Matta, M. Mircea, S. Fuzzi, A. R. Chughtai, and D. M. Smith. Water Soluble Organic Compounds Formed by Oxidation of Soot. *Atmos. Environ.*, 36:1827–1832, 2002.
- [25] V. M. H. Lavanchy, H. W. Gaggeler, S. Nyeki, and U. Baltensperger. Elemental Carbon (EC) and Black Carbon (BC) Measurements with a Thermal Method and an Aethalometer at the High-Alpine Research Station Jungfraujoch. *Atmos. Environ.*, 33:2759–2769, 1999.
- [26] R. Hitzenberger, A. Berner, H. Glebl, K. Drobesh, A. Kasper-Giebl, M. Loefflund, H. Urban, and H. Puxbaum. Black Carbon (BC) in Alpine Aerosols and Cloud Water - Concentrations and Scavenging Efficiencies. *Atmos. Environ.*, 35:5135–5141, 2001.
- [27] Z. Krivacsy, A. Hoffer, Z. Sarvari, D. Temesi, U. Baltensperger, S. Nyeki, E. Weingartner, S. Kleefeld, and S. G. Jennings. Role of Organic and Black Carbon in the Chemical Composition of Atmospheric Aerosol at European Background Sites. *Atmos. Environ.*, 35:6231–6244, 2001.
- [28] N. Havers, P. Burba, J. Lambert, and D. Klockow. Spectroscopic Characterization of Humic-Like Substances in Airborne Particulate Matter. *J. Atmos. Chem.*, 29:45–54, 1998.

- [29] Z. Krivacsy, G. Kiss, B. Varga, I. Galambos, Z. Sarvari, A. Gelencser, A. Molnar, S. Fuzzi, M. C. Facchini, S. Zappoli, A. Andracchio, T. Alsberg, H. C. Hansson, and L. Persson. Study of Humic-Like Substances in Fog and Interstitial Aerosol by Size-Exclusion Chromatography and Capillary Electrophoresis. *Atmos. Environ.*, 34:4273–4281, 2000.
- [30] M. Kunit and H. Puxbaum. Enzymatic Determination of the Cellulose Content of Atmospheric Aerosols. *Atmos. Environ.*, 30:1233–1236, 1996.
- [31] A. Zerrath. *Bestimmung von Cellulose und Glucose in atmosphärischen Aerosolproben*. Diplomarbeit, Technische Universität München, 2000.
- [32] A. G. Miguel, G. R. Cass, M. M. Glovsky, and J. Weiss. Allergens in Paved Road Dust and Airborne Particles. *Environ. Sci. Technol.*, 33:4159–4168, 1999.
- [33] B. D. Belan, A. I. Borodulin, G. A. Buryak, Y. V. Marchenko, S. E. Olkin, M. V. Panchenko, O. V. Pyankov, and A. S. Safatov. Annual Changes in Concentration of Protein Content of Atmospheric Aerosol in the South of Western Siberia. *J. Aerosol Sci.*, 31, S1:963–964, 2000.
- [34] A. N. Ankilov, A. M. Baklanov, B. D. Belan, A. I. Boroudulin, G. A. Buryak, Y. V. Marchenko, S. E. Olkin, M. V. Panchenko, V. V. Penenko, O. V. Pyankov, I. K. Reznikova, A. S. Safatov, A. N. Sergeev, E. A. Tsvetova, and A. L. Vlasenko. The Relation between the Changes Observed in the Concentration of the Summary Protein in the Atmosphere of the South of Western Siberia and its possible Sources. *J. Aerosol Sci.*, 32 S1:135–136, 2001.
- [35] F. S. Schäppi, C. Monn, B. Wüthrich, and H. U. Wanner. Direct Determination of Allergens in Ambient Aerosols: Methodological Aspects. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 110:364–370, 1996.
- [36] G. F. Schäppi, C. Suphioglu, P. E. Taylor, and R. B. Knox. Concentrations of the Major Birch Tree Allergen Bet v 1 in Pollen and Respirable Fine Particles in the Atmosphere. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 100:656–661, 1997.
- [37] G. F. Schäppi, P. E. Taylor, I. A. Staff, C. Suphioglu, and R. B. Knox. Source of Bet v 1 Loaded Inhalable Particles from Birch Revealed. *Sex. Plant Reprod.*, 10:315–323, 1997.
- [38] A. G. Miguel, G. R. Cass, J. Weiss, and M. M. Glovsky. Latex Allergens in Tire Dust and Airborne Particles. *Environ. Health Persp.*, 104:1180–1186, 1996.

- [39] Q. Zhang and C. Anastasio. Chemistry of Fog Waters in California's Central Valley - Part 3: Concentrations and Speciation of Organic and Inorganic Nitrogen. *Atmos. Environ.*, 35:5629–5643, 2001.
- [40] Q. Zhang and C. Anastasio. Free and Combined Amino Compounds in Atmospheric Fine Particles (PM<sub>2.5</sub>) and Fog Waters from Northern California. *Atmos. Environ.*, 37:2247–2258, 2003.
- [41] E. Scheller. Amino Acids in Dew - Origin and Seasonal Variation. *Atmos. Environ.*, 35:2179–2192, 2001.
- [42] F. T. M. Spijkema. Aerobiology of Inhalatory Allergen Carriers. *Allergol. Immunopathol.*, 23:20–23, 1995.
- [43] H. Bauer, A. Kasper-Giebl, M. Loflund, H. Giebl, R. Hitzenberger, F. Zibuschka, and H. Puxbaum. The Contribution of Bacteria and Fungal Spores to the Organic Carbon Content of Cloud Water, Precipitation and Aerosols. *Atmos. Res.*, 64:109–119, 2002.
- [44] G. Erdtman. *An Introduction to Pollen Analysis*. Chronica Botanica Company, Waltham, USA, 1954.
- [45] S. Nilsson, J. Pragłowski, and L. Nilsson. *Atlas of Airborne Pollen Grains and Spores in Northern Europe*. Natur och Kultur, Stockholm, 1977.
- [46] A. Rantio-Lehtimäki. Aerobiology of pollen and pollen antigens. In C. S. Cox and C. M. Wathes, editors, *Bioaerosols Handbook*, pages 387–406. CRC Press, Boca Raton, USA, 1995.
- [47] C. Suphioglu. Thunderstorm Asthma due to Grass Pollen. *Internat. Arch. Allergy Immunol.*, 116:253–260, 1998.
- [48] H. A. E. Schinko, W. Medinger, and W. Hager. Pollen, Pollen Allergens and Particulate Matter - Change of View. *Allergologie*, 17:514–525, 1994.
- [49] J. Huss-Marp. *Untersuchung zur Bedeutung der relativen Luftfeuchte für die Allergenfreisetzung aus Pollen*. Dissertation, Technische Universität München, 2000.
- [50] C. Monn and H. S. Koren. Bioaerosols in Ambient Air Particulates: A Review and Research Needs. *Rev. Environ. Health*, 14:79–89, 1999.
- [51] A. L. Lehninger, D. Nelson, and M. Cox. *Biochemie*. Springer, Berlin, 2001.

- [52] A. Graham, N. Hogg, B. Kalyanaraman, V. O'Leary, V. Darley-Usmar, and S. Moncada. Peroxynitrite Modification of Low-Density Lipoprotein Leads to Recognition by the Macrophage Scavenger Receptor. *FEBS Letters*, 330:181–185, 1993.
- [53] J. P. Crow and H. Ischiropoulos. Detection and Quantitation of Nitrotyrosine Residues in Proteins: In vivo Marker of Peroxynitrite. *Methods Enzymol.*, 269:185–94, 1996.
- [54] B. Halliwell. What Nitrates Tyrosine? Is Nitrotyrosine Specific as a Biomarker of Peroxynitrite Formation in vivo? *FEBS Letters*, 411:157–160, 1997.
- [55] D. H. Yi, G. A. Smythe, B. C. Blount, and M. W. Duncan. Peroxynitrite-mediated Nitration of Peptides: Characterization of the Products by Electrospray and Combined Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Arch. Biochem. Biophys.*, 344:253–259, 1997.
- [56] R. Daiber and V. Ullrich. Radikalchemie im Organismus - Stickstoffmonoxid, Superoxid und Peroxynitrit. *Chem. unserer Zeit*, 36:366–375, 2002.
- [57] J. Ring, U. Krämer, T. Schäfer, and H. Behrendt. Why are Allergies Increasing? *Curr. Opin. Immunol.*, 13:701–708, 2001.
- [58] R. Beasley, J. Crane, C. K. W. Lai, and N. Pearce. Prevalence and Etiology of Asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 105:S466–S472, 2000.
- [59] U. Krämer, H. Behrendt, R. Dolgner, U. Ranft, J. Ring, H. Willer, and H. W. Schlipkötter. Airway Diseases and Allergies in East and West German Children During the First 5 Years after Reunification: Time Trends and the Impact of Sulphur Dioxide and Total Suspended Particles. *Int. J. Epidemiol.*, 28:865–873, 1999.
- [60] N. Aberg. Asthma and Allergic Rhinitis in Swedish Conscripts. *Clin. Exp. Allergy*, 19:59–63, 1989.
- [61] B. Wüthrich. Epidemiology of the Allergic Diseases: Are They Really on the Increase? *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 90:3–10, 1989.
- [62] B. Fall. *Entwicklung eines chemilumineszenzbasierten Microarrays zur Detektion von allergenspezifischem IgE*. Dissertation, Technische Universität München, 2003.

- [63] J. Ring. Allergy and Hypersensitivity - Allergies on the Increase. *Curr. Opin. Immunol.*, 13:699–700, 2001.
- [64] U. Wahn. What Drives the Allergic March? *Allergy*, 55:591–599, 2000.
- [65] O. Vandenas, J. P. Delwiche, G. Evrared, P. Aimont, S. Van der Brempt, J. Jarmart, and L. Delaunois. Prevalence of Occupational Asthma due to Latex among Hospital Personnel. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, 151:54–60, 1995.
- [66] X. Baur. Measurement of Airborne Latex Allergens. *Methods*, 27:59–62, 2002.
- [67] S. K. Poruthoor, P. K. Dasgupta, and Z. Genfa. Indoor Air Pollution and Sick Building Syndrome. Monitoring Aerosol Protein as a Measure of Bioaerosols. *Environ. Sci. Technol.*, 32:1147–1152, 1998.
- [68] B. Wüthrich, C. Schindler, P. Leuenberger, and U. Ackermann-Liebrich. Prevalence of Atopy and Pollinosis in the Adult Population of Switzerland. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 106:149–156, 1995.
- [69] E. Jarolim, H. Rumpold, A. T. Endler, H. Ebner, M. Breitenbach, O. Scheiner, and D. Kraft. IgE and IgG Antibodies of Patients with Allergy to Birch Pollen as Tools to Define the Allergen Profile of *Betula Verrucosa*. *Allergy*, 44:385–395, 1989.
- [70] W. W. Busse, C. E. Reed, and J. H. Hoehne. Where is the Allergic Reaction in Ragweed Asthma? II. Demonstration of Ragweed Antigen in Airborne Particles Smaller than Pollen. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 50:289–293, 1972.
- [71] R. B. Knox. Grass Pollen, Thunderstorms and Asthma. *Clin. Exp. Allergy*, 23:354–359, 1993.
- [72] H. Behrendt, J. Tomczok, W. Sliwa-Tomczok, A. Kasche, C. E. von Eschenbach, W. M. Becker, and J. Ring. Timothy Grass (*Phleum pratense* L.) Pollen as Allergen Carriers and Initiators of an Allergic Response. *Internat. Arch. Allergy Immunol.*, 118:414–418, 1999.
- [73] S. Kahle, H. Behrendt, J. Ring, D. Vieluf, I. Hinrichs, U. Krämer, R. Dolgner, and H. W. Schlipkötter. Epidemiologische Untersuchung zur Prävalenz allergischer Erkrankungen bei 6jährigen Kindern in Halle/Sachsen-Anhalt. *Allergologie*, 15:58, 1992.

- [74] H. Behrendt, U. Krämer, R. Dolgner, J. Hinrichs, H. Willer, H. Hagenbeck, and H. W. Schlipkötter. Elevated Levels of Total IgE in East German Children: Atopy, Parasites or Pollutants? *Allergo J.*, 2:31–40, 1993.
- [75] E. Von Mutius, C. Fritzsche, S. K. Weiland, G. Röhl, and H. Magnussen. Prevalence of Asthma and Allergic Disorders among Children in United Germany: A Descriptive Comparison. *Br. Med. J.*, 305:1392–1395, 1992.
- [76] E. Von Mutius, F. D. Martinez, C. Fritzsche, T. Nicolai, G. Roell, and H. H. Thiemann. Prevalence of Asthma and Atopy in two Areas of West and East Germany. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 149:358–364, 1994.
- [77] H. E. Wichmann. Environment, Life-Style and Allergy: The German Answer. *Allergo J.*, 4:315–316, 1995.
- [78] J. Ring, U. Kramer, T. Schafer, D. Abeck, D. Vieluf, and H. Behrendt. Environmental Risk Factors for Respiratory and Skin Atopy: Results from Epidemiological Studies in Former East and West Germany. *Internat. Arch. Allergy Immunol.*, 118:403–407, 1999.
- [79] M. L. Helander, J. Savolainen, and J. Ahlholm. Effects of Air Pollution and other Environmental Factors on Birch Pollen Allergens. *Allergy*, 52:1207–1214, 1997.
- [80] H. Behrendt, W. M. Becker, C. Fritzsche, W. Sliwa-Tomczok, J. Tomczok, K. H. Friedrichs, and J. Ring. Air Pollution and Allergy: Experimental Studies on Modulation of Allergen Release from Pollen by Air Pollutants. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 113:69–74, 1997.
- [81] U. Risse, U. Darsow, J. Ring, and H. Behrendt. Schadstoffexponierte Pollen beeinflussen die Haut-Prick-Test-Reaktion am Menschen. *Allergo J.*, 8:37, 1999.
- [82] F. Riedel, E. Hasenauer, P. J. Barth, A. Kozirowski, and C. H. L. Rieger. Formaldehyde Exposure Enhances Inhalative Allergic Sensitization in the Guinea Pig. *Allergy*, 51:94–99, 1996.
- [83] F. Riedel, T. Damerow, S. Daum, and H. Behrendt. Airway Sensitization to Ovalbumin and Birchpollen Extract is Enhanced by Nitrogen Dioxide Exposure in the Guinea Pig. *Pedr. Allergy*, S8:65, 1995.
- [84] U. Neuhaus-Steinmetz, F. Uffhausen, U. Herz, and H. Renz. Priming of Allergic Immune Responses by Repeated Ozone Exposure in Mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 23:228–233, 2000.

- [85] U. Krämer, T. Koch, U. Ranft, J. Ring, and H. Behrendt. Traffic-Related Air Pollution is Associated with Atopy in Children Living in Urban Areas. *Epidemiology*, 11:64–70, 2000.
- [86] J. Ring, B. Eberlein-Koenig, and H. Behrendt. Environmental Pollution and Allergy. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 87:2–6, 2001.
- [87] M. Riediker, C. Monn, T. Koller, W. A. Stahel, and B. Wüthrich. Air Pollutants Enhance Rhinoconjunctivitis Symptoms in Pollen-allergic Individuals. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 87:311–318, 2001.
- [88] B. Brunekreef and J. Sunyer. Asthma, Rhinitis and Air Pollution: Is Traffic to Blame? *Eur. Respir. J.*, 21:913–915, 2003.
- [89] Y. L. Lee, C. K. Shaw, H. J. Su, J. S. Lai, Y. C. Ko, S. L. Huang, F. C. Sung, and Y. L. Guo. Climate, Traffic-Related Air Pollutants and Allergic Rhinitis Prevalence in Middle-School Children in Taiwan. *Eur. Respir. J.*, 21:964–970, 2003.
- [90] M. Svartengren, V. Strand, G. Bylin, L. Jarup, and G. Pershagen. Short-Term Exposure to Air Pollution in a Road Tunnel Enhances the Asthmatic Response to Allergen. *Eur. Respir. J.*, 15:716–724, 2000.
- [91] V. Strand, M. Svartengren, S. Rak, C. Barck, and G. Bylin. Repeated Exposure to an Ambient Level of NO<sub>2</sub> Enhances Asthmatic Response to a Nonsymptomatic Allergen Dose. *Eur. Respir. J.*, 12:6–12, 1998.
- [92] T. Nicolai, D. Carr, S. K. Weiland, H. Duhme, O. von Ehrenstein, C. Wagner, and E. von Mutius. Urban Traffic and Pollutant Exposure Related to Respiratory Outcomes and Atopy in a Large Sample of Children. *Eur. Respir. J.*, 21:956–963, 2003.
- [93] B. Brunekreef. NO<sub>2</sub>: The Gas, that won't Go Away. *Clin. Exp. Allergy*, 31:1170–1172, 2001.
- [94] M.E. Knowles, M.J. McWeeny, L. Couchman, and M. Thorogood. Interaction of Nitrite with Proteins at Gastric pH. *Nature*, 247:288–289, 1974.
- [95] H. Ohshima, M. Friesen, I. Brouet, and H. Bartsch. Nitrotyrosine as a New Marker for Endogenous Nitrosation and Nitration of Proteins. *Food Chem. Toxicol.*, 28:647–652, 1990.

- [96] J. P. Crow and J. S. Beckmann. Quantitation of Protein Tyrosine, 3-Nitrotyrosine and 3-Aminotyrosine Utilizing HPLC and Intrinsic Ultraviolet Absorbance. *Methods*, 7:116–120, 1995.
- [97] N. Fukuyama, Y. Takebayashi, M. Hida, H. Ishida, K. Ichimori, and H. Nakazawa. Clinical Evidence of Peroxynitrite Formation in Chronic Renal Failure Patients with Septic Shock. *Free Radical Biol. Med.*, 22:771–774, 1997.
- [98] A. van der Vliet, C. A. O'Neill, B. Halliwell, C. E. Cross, and H. Kaur. Aromatic Hydroxylation and Nitration of Phenylalanine and Tyrosine by Peroxynitrite; Evidence for Hydroxyl Radical Production from Peroxynitrite. *FEBS Letters*, 339:89–92, 1994.
- [99] Y. Kamisaki, K. Wada, K. Nakamoto, Y. Kishimoto, M. Kitano, and T. Itoh. Sensitive Determination of Nitrotyrosine in Human Plasma by Isocratic High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. B*, 685:343–347, 1996.
- [100] K. Hensley, M. L. Maitt, Q. N. Pye, C. A. Stewart, M. Wack, T. Tabatabaie, and R. A. Floyd. Quantitation of Protein-Bound 3-Nitrotyrosine and 3,4-Dihydroxyphenylalanine by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Array Detection. *Anal. Biochem.*, 251:187–195, 1997.
- [101] J. P. Crow. Measurement and Significance of Free and Protein-Bound 3-Nitrotyrosine, 3-Chlorotyrosine and Free 3-Nitro-4-hydroxyphenylacetic Acid in Biologic Samples: A High-Performance Liquid Chromatography Method Using Electrochemical Detection. *Methods Enzymol.: Nitric Oxide Part C*, 301:151–160, 1999.
- [102] H. Ohshima, I. Celan, L. Chazotte, B. Pignatelli, and H. F. Mower. Analysis of 3-Nitrotyrosine in Biological Fluids and Protein Hydrolyzates by High-Performance Liquid Chromatography Using a Postseparation, On-line Reduction Column and Electrochemical Detection: Results with Various Nitrating Agents. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 3:132–141, 1999.
- [103] M. K. Shigenaga. Quantitation of Protein-Bound 3-Nitrotyrosine by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. *Methods Enzymol.: Nitric Oxide Part C*, 301:27–40, 1999.
- [104] R. S. Sodum, S. A. Akerkar, and E. S. Fiala. Determination of 3-Nitrotyrosine by High-Pressure Liquid Chromatography with a Dual-Mode Electrochemical Detector. *Anal. Biochem.*, 280:278–285, 2000.

- [105] H. W. Liu, C. T. Duda, T. H. Huang, W. O. Aruda, and P. T. Kissinger. Optimization of Post-Column Photolysis and Electrochemical Detection for the Liquid Chromatographic Determination of 3-Nitro-L-tyrosine. *J. Chromatogr. A*, 818:69–75, 1998.
- [106] H. W. Liu, T. H. Huang, C. B. Kissinger, and P. T. Kissinger. Comparison of Detection Methods for Liquid Chromatographic Determination of 3-Nitro-L-tyrosine. *J. Chromatogr. B*, 713:289–295, 1998.
- [107] S. Petruzzelli, R. Puntoni, P. Mimotti, N. Pulera, F. Baliva, E. Fornai, and C. Giuntini. Plasma 3-Nitrotyrosine in Cigarette Smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 156:1902–1907, 1997.
- [108] M. Schwemmer, B. Fink, R. Kockerbauer, and E. Bassenge. How Urine Analysis Reflects Oxidative Stress - Nitrotyrosine as a Potential Marker. *Clin. Chim. Acta*, 297:207–216, 2000.
- [109] J. R. Crowley, K. Yarasheski, C. Leeuwenburgh, J. Turk, and J. W. Heinecke. Isotope Dilution Mass Spectrometric Quantification of 3-Nitrotyrosine in Proteins and Tissues is Facilitated by Reduction to 3-Aminotyrosine. *Anal. Biochem.*, 259:127–135, 1998.
- [110] H. Jiang and M. Balazy. Detection of 3-Nitrotyrosine in Human Platelets Exposed to Peroxynitrite by a New Gas Chromatography/Mass Spectrometry Assay. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 2:350–359, 1998.
- [111] M. T. Frost, B. Halliwell, and K. P. Moore. Analysis of Free and Protein-Bound Nitrotyrosine in Human Plasma by a Gas Chromatography/Mass Spectrometry Method that Avoids Nitration Artifacts. *Biochem. J.*, 345:453–458, 2000.
- [112] E. Schwedhelm, D. Tsikas, F. M. Gutzki, and J. C. Frolich. Gas Chromatographic-Tandem Mass Spectrometric Quantification of Free 3-Nitrotyrosine in Human Plasma at the Basal State. *Anal. Biochem.*, 276:195–203, 1999.
- [113] K. D. Greis, S. Zhu, and S. Matalon. Identification of Nitration Sites on Surfactant Protein A by Tandem Electrospray Mass Spectrometry. *Arch. Biochem. Biophys.*, 335:396–402, 1996.
- [114] C. Ducrocq, M. Dendane, O. Laprevote, L. Serani, B. C. Das, N. Bouchemal-Chibani, B. T. Doan, B. Gillet, A. Karim, A. Carayon, and D. Payen. Chemical

- Modifications of the Vasoconstrictor Peptide Angiotensin II by Nitrogen Oxides (NO, HNO<sub>2</sub>, HOONO) - Evaluation by Mass Spectrometry. *Eur. J. Biochem.*, 253:146–153, 1998.
- [115] D. H. Yi, B. A. Ingelse, M. W. Duncan, and G. A. Smythe. Quantification of 3-Nitrotyrosine in Biological Tissues and Fluids: Generating Valid Results by Eliminating Artifactual Formation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 11:578–586, 2000.
- [116] J. S. Althaus, K. R. Schmidt, S. T. Fountain, M. T. Tseng, R. T. Carroll, P. Galat-sis, and E. D. Hall. LC-MS/MS Detection of Peroxynitrite-Derived 3-Nitrotyrosine in Rat Microvessels. *Free Radical Biol. Med.*, 29:1085–1095, 2000.
- [117] L. F. Marvin, T. Delatour, T. Tavazzi, L. B. Fay, C. Cupp, and P. A. Guy. Quan-tification of o,o'-Dityrosine, o-Nitrotyrosine, and o-Tyrosine in Cat Urine Samp-les by LC/Electrospray Ionization-MS/MS Using Isotope Dilution. *Anal. Chem.*, 75:261–267, 2003.
- [118] J. S. Beckman, Y. Zu Ye, P. G. Anderson, J. Chen, M. A. Accavitti, M. M. Tarpey, and C. R. White. Extensive Nitration of Protein Tyrosines in Human Atheroscle-rosis Detected by Immunohistochemistry. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 375:81–88, 1994.
- [119] L. A. MacMillan-Crow, J. P. Crow, J. D. Kerby, J. S. Beckman, and J. A. Thomp-son. Nitration and Inactivation of Manganese Superoxide Dismutase in Chronic Rejection of Human Renal Allografts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:11853–11858, 1996.
- [120] L. Myatt, R. B. Rosenfield, A. L. W. Eis, D. E. Brockman, I. Greer, and F. Lyall. Nitrotyrosine Residues in Placenta. *Hypertension*, 28:488–493, 1996.
- [121] J. Khan, D. M. Brennan, N. Bradley, B. R. Gao, R. Bruckdorfer, and M. Jacobs. 3-Nitrotyrosine in the Proteins of Human Plasma Determined by an ELISA Method. *Biochem. J.*, 330:795–801, 1998.
- [122] K. M. Naseem, S. Y. Low, M. Sabetkar, N. J. Bradley, J. Khan, M. Jacobs, and K. R. Bruckdorfer. The Nitration of Platelet Cytosolic Proteins during Agonist-Induced Activation of Platelets. *FEBS Letters*, 473:119–122, 2000.
- [123] S. L. de Menezes and O. Augusto. EPR Detection of Glutathionyl and Protein-Tyrosyl Radicals during the Interaction of Peroxynitrite with Macrophages (J774). *J. Biol. Chem.*, 276:39879–39884, 2001.

- [124] S. Y. Low, M. Sabetkar, K. R. Bruckdorfer, and K. M. Naseem. The Role of Protein Nitration in the Inhibition of Platelet Activation by Peroxynitrite. *FEBS Letters*, 511:59–64, 2002.
- [125] H. Pfister, K. A. Remer, M. Brcic, R. Fatzer, S. Christen, S. Leib, and T. W. Jungi. Inducible Nitric Oxide Synthase and Nitrotyrosine in Listeric Encephalitis: A Cross-Species Study in Ruminants. *Vet. Pathol.*, 39:190–199, 2002.
- [126] C. Herce-Pagliai, S. Kotecha, and D. E. G. Shuker. Analytical Methods for 3-Nitrotyrosine as a Marker of Exposure to Reactive Nitrogen Species: A Review. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 2:324–336, 1998.
- [127] H. Ischiropoulos. Biological Tyrosine Nitration: A Pathophysiological Function of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species. *Arch. Biochem. Biophys.*, 356:1–11, 1998.
- [128] B. Halliwell, K. Zhao, M. Whiteman, and B. Kalyanaraman. Nitric Oxide and Peroxynitrite. The Ugly, the Uglier and the not so Good: A Personal View of Recent Controversies. *Free Radical Res.*, 31:651–669, 1999.
- [129] S. A. B. Greenacre and H. Ischiropoulos. Tyrosine Nitration: Localisation, Quantification, Consequences for Protein Function and Signal Transduction. *Free Radical Res.*, 34:541–581, 2001.
- [130] O. M. Panasenko, K. Briviba, L. O. Klotz, and H. Sies. Oxidative Modification and Nitration of Human Low-Density Lipoproteins by the Reaction of Hypochlorous Acid with Nitrite. *Arch. Biochem. Biophys.*, 343:254–259, 1997.
- [131] P. F. Good, A. Hsu, P. Werner, D. P. Perl, and C. W. Olanow. Protein Nitration in Parkinson's Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 57:338–342, 1998.
- [132] S. Pennathur, V. Jackson-Lewis, S. Przedborski, and J. W. Heinecke. Mass Spectrometric Quantification of 3-Nitrotyrosine, o-Tyrosine, and o,o'-Dityrosine in Brain Tissue of 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin-treated Mice, a Model of Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *J. Biol. Chem.*, 274:34621–34628, 1999.
- [133] K. Hensley, M. L. Maidt, Z. Yu, H. Sang, W. R. Markesbery, and R. A. Floyd. Electrochemical Analysis of Protein Nitrotyrosine and Dityrosine in the Alzheimer Brain Indicates Region-Specific Accumulation. *J. Neuroscience*, 18:8126–8132, 1998.

- [134] M. A. Smith, H. P. Richey, L. M. Sayre, J. S. Beckman, and G. Perry. Widespread Peroxynitrite-Mediated Damage in Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.*, 17:2653–2657, 1997.
- [135] J. H. Su, G. Deng, and C. W. Cotman. Neuronal DNA Damage Precedes Tangle Formation and is Associated with Up-Regulation of Nitrotyrosine in Alzheimer's Disease Brain. *Brain Res.*, 774:193–199, 1997.
- [136] A. S. Haqqani, J. F. Kelly, and H. C. Birnboim. Selective Nitration of Histone Tyrosine Residues in vivo in Mutatect Tumors. *J. Biol. Chem.*, 277:3614–3621, 2002.
- [137] J. M. Souza, E. Daikhin, M. Yudkoff, C. S. Raman, and H. Ischiropoulos. Factors Determining the Selectivity of Protein Tyrosine Nitration. *Arch. Biochem. Biophys.*, 371:169–178, 1999.
- [138] K. S. Jiao, S. Mandapati, P. L. Skipper, S. R. Tannenbaum, and J. S. Wishnok. Site-Selective Nitration of Tyrosine in Human Serum Albumin by Peroxynitrite. *Anal. Biochem.*, 293:43–52, 2001.
- [139] B. Halliwell. Free Radicals, Proteins and DNA: Oxidative Damage Versus Redox Regulation. *Biochem. Soc. Trans.*, 24:1023–1027, 1996.
- [140] W. Maruyama, Y. Hashizume, K. Matsubara, and M. Naoi. Identification of 3-Nitro-L-tyrosine, a Product of Nitric Oxide and Superoxide, as an Indicator of Oxidative Stress in the Human Brain. *J. Chromatogr. B*, 676:343–347, 1996.
- [141] B. A. Banks, H. Ischiropoulos, M. McClelland, P. L. Ballard, and R. A. Ballard. Plasma 3-Nitrotyrosine is Elevated in Premature Infants who Develop Bronchopulmonary Dysplasia. *Pediatrics*, 101:870–874, 1998.
- [142] E. Schwedhelm. *Isoprostane und 3-Nitrotyrosin als neue Indexparameter des oxidativen Stresses in vivo: Analytik, Bildung, Metabolismus und biologische Bedeutung*. Dissertation, Universität Hannover, 2000.
- [143] G. Nikov, V. Bhat, J. S. Wishnok, and S. R. Tannenbaum. Analysis of Nitrated Proteins by Nitrotyrosine-Specific Affinity Probes and Mass Spectrometry. *Anal. Biochem.*, 320:214–222, 2003.
- [144] H. Kaur and B. Halliwell. Evidence for Nitric Oxide-Mediated Oxidative Damage in Chronic Inflammation. Nitrotyrosine in Serum and Synovial Fluid from Rheumatoid Patients. *FEBS Letters*, 350:9–12, 1994.

- [145] D. A. Kaminsky, J. Mitchell, N. Carroll, A. James, R. Soultanakis, and Y. Janssen. Nitrotyrosine Formation in the Airways and Lung Parenchyma of Patients with Asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 104:747–754, 1999.
- [146] H. C. Birnboim, A. M. Lemay, D. K. Y. Lam, R. Goldstein, and J. R. Webb. Cutting edge: MHC Class II-Restricted Peptides Containing the Inflammation-Associated Marker 3-Nitrotyrosine Evade Central Tolerance and Elicit a Robust Cell-Mediated Immune Response. *J. Immunol.*, 171:528–532, 2003.
- [147] H. Ischiropoulos. Biological Selectivity and Functional Aspects of Protein Tyrosine Nitration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 305:776–783, 2003.
- [148] L. O. Uttenthal, D. Alonso, A. P. Fernandez, R. O. Campbell, M. A. Moro, J. C. Leza, I. Lizasoain, F. J. Esteban, J. B. Barroso, R. Valderrama, J. A. Pedrosa, M. A. Peinado, J. Serrano, A. Richart, M. L. Bentura, M. Santacana, R. Martinez-Murillo, and J. Rodrigo. Neuronal and Inducible Nitric Oxide Synthase and Nitrotyrosine Immunoreactivities in the Cerebral Cortex of the Aging Rat. *Microsc. Res. Tech.*, 43:75–88, 1998.
- [149] R. I. Viner, D. A. Ferrington, T. D. Williams, D. J. Bigelow, and C. Schöneich. Protein Modification During Biological Aging: Selective Tyrosine Nitration of the SERCA2a Isoform of the Sarcoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in Skeletal Muscle. *Biochem. J.*, 340:657–669, 1999.
- [150] J. A. Sloane, W. Hollander, M. B. Moss, D. L. Rosene, and C. R. Abraham. Increased Microglial Activation and Protein Nitration in White Matter of the Ageing Monkey. *Neurobiol. Aging*, 20:395–405, 1999.
- [151] A. Hausladen and I. Fridovich. Superoxide and Peroxynitrite Inactivate Aconitases, but Nitric Oxide does not. *J. Biol. Chem.*, 269:29405–29408, 1994.
- [152] B. S. Berlett, B. Friguet, M. B. Yim, P. B. Chock, and E. R. Stadtman. Peroxynitrite-Mediated Nitration of Tyrosine Residues in Escherichia Coli Glutamine Synthetase Mimics Adenylylation: Relevance to Signal Transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:1776–1780, 1996.
- [153] P. G. Richards, D. J. Walton, and J. Heptinstall. The Effects of Nitration on the Structure and Function of Hen Egg-White Lysozyme. *Biochem. J.*, 315:473–479, 1996.

- [154] F. Yamakura, H. Taka, T. Fujimura, and K. Murayama. Inactivation of Human Manganese-Superoxide Dismutase by Peroxynitrite is Caused by Exclusive Nitration of Tyrosine 34 to 3-Nitrotyrosine. *J. Biol. Chem.*, 273:14085–14089, 1998.
- [155] T. Nakaki and T. Fujii. Nitration Modifying Function of Proteins, Hormones and Neurotransmitters. *Jpn. J. Pharmacol.*, 79:125–129, 1999.
- [156] T. T. Andersen, M. M. Zamierowski, and K. E. Ebner. Effect of Nitration on Prolactin Activities. *Arch. Biochem. Biophys.*, 192:112–119, 1979.
- [157] W. K. Liu and D. N. Ward. Effect of Selective Nitration of Ovine Lutropin on the Subunit Association and Biological Activity of the Hormone. *J. Biol. Chem.*, 251:316–319, 1976.
- [158] P. Scherrer and W. Stoeckenius. Selective Nitration of Tyrosine-26 and -64 in Bacteriorhodopsin with Tetranitromethane. *Biochemistry*, 23:6195–6202, 1984.
- [159] P. Scherrer and W. Stoeckenius. Effects of Tyrosine-26 and Tyrosine-64 Nitration on the Photoreactions of Bacteriorhodopsin. *Biochemistry*, 24:7733–7740, 1985.
- [160] J. M. Souza, I. Choi, Q. Chen, M. Weisse, E. Daikhin, M. Yudkoff, M. Obin, J. Ara, J. Horwitz, and H. Ischiropoulos. Proteolytic Degradation of Tyrosine Nitrated Proteins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 380:360–366, 2000.
- [161] W. N. Kuo, R. N. Kanadia, V. P. Shanbhag, and R. Toro. Denitration of Peroxynitrite-Treated Proteins by 'Protein Nitrates' from Rat Brain and Heart. *Mol. Cell. Biochem.*, 201:11–16, 1999.
- [162] K. Landsteiner and J. Jacobs. Studies on the Sensitization of Animals with Simple Chemical Compounds. *J. Exp. Med.*, 61:643–656, 1935.
- [163] H. A. Doyle and M. J. Mamula. Posttranslational Protein Modifications: New Flavors in the Menu of Autoantigens. *Curr. Opin. Rheumat.*, 14:244–249, 2002.
- [164] T. Sato. Dinitrophenyl-Modified Autologous Melanoma Vaccine Induces a T Cell Response to Hapten-Modified, Melanoma Peptides. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 85:265–272, 1997.
- [165] M. J. Mamula, R. J. Gee, J. I. Elliott, A. Sette, S. Southwood, P.-J. Jones, and P. R. Blier. Isoaspartyl Posttranslational Modification Triggers Autoimmune Responses to Self-Proteins. *J. Biol. Chem.*, 274:22321–22327, 1999.

- [166] P. G. Holt, D. Britten, and J. D. Sedgwick. Suppression of IgE Responses by Antigen Inhalation - Studies on the Role of Genetic and Environmental Factors. *Immunol.*, 60:97–102, 1987.
- [167] R. D. J. Huby, R. J. Dearman, and I. Kimber. Why are some Proteins Allergens? *Tox. Sci.*, 55:235–246, 2000.
- [168] L. Berrens and A. M. Luis. Haptenic Side Chains as Posttranslational IgE-Binding Determinants among Pollen Protein Allergens. *Internat. Arch. Allergy Immunol.*, 113:236–237, 1997.
- [169] A. Petersen, G. Schramm, M. Schlaak, and W. M. Becker. Posttranslational Modifications Influence IgE Reactivity to the Major Allergen Phl p 1 of Timothy Grass Pollen. *Clin. Exp. Allerg.*, 28:315–321, 1998.
- [170] R. B. R. Muijsers, I. van Ark, G. Folkerts, A. S. Koster, A. J. M. van Oosterhout, D. S. Postma, and F. P. Nijkamp. Apocynin and 1400 W Prevents Airway Hyperresponsiveness during Allergic Reactions in Mice. *Br. J. Pharmacol.*, 134:434–440, 2001.
- [171] L. C. James, P. Roversi, and D. S. Tawfik. Antibody Multispecificity Mediated by Conformational Diversity. *Science*, 299:1362–1367, 2003.
- [172] H. A. Doyle and M. J. Mamula. Post-translational Protein Modifications in Antigen Recognition and Autoimmunity. *Trends Immunol.*, 22:443–449, 2001.
- [173] M. Sokolovsky, J. F. Riordan, and B. L. Vallee. Tetranitromethane. A Reagent for the Nitration of Tyrosyl Residues in Proteins. *Biochemistry*, 5:3582–3589, 1966.
- [174] J. F. Riordan, M. Sokolovsky, and B. L. Vallee. Tetranitromethane. A Reagent for the Nitration of Tyrosine and Tyrosyl Residues of Proteins. *J. Amer. Chem. Soc.*, 88:4104–4105, 1966.
- [175] A. N. Glazer, R. J. DeLange, and D. S. Sigman. *Chemical Modifications of Proteins*. Elsevier, Amsterdam, 1975.
- [176] L. Ebersson and M. P. Hartshorn. The Formation and Reactions of Adducts from the Photochemical Reactions of Aromatic Compounds with Tetranitromethane and other X-NO<sub>2</sub> Reagents. *Aust. J. Chem.*, 51:1061–1081, 1998.

- [177] J. Luttke, V. Scheer, K. Levsen, G. Wunsch, J. N. Cape, K. J. Hargreaves, R. L. Storeton-West, K. Acker, W. Wieprecht, and B. Jones. Occurrence and Formation of Nitrated Phenols in and out of Cloud. *Atmos. Environ.*, 31:2637–2648, 1997.
- [178] J. Luttke and K. Levsen. Phase Partitioning of Phenol and Nitrophenols in Clouds. *Atmos. Environ.*, 31:2649–2655, 1997.
- [179] R. Belloli, B. Barletta, E. Bolzacchini, S. Meinardi, M. Orlandi, and B. Rindone. Determination of Toxic Nitrophenols in the Atmosphere by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A*, 846:277–281, 1999.
- [180] J. Luttke, K. Levsen, K. Acker, W. Wieprecht, and D. Moller. Phenols and Nitrated Phenols in Clouds at Mount Brocken. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 74:69–89, 1999.
- [181] E. Bolzacchini, M. Bruschi, J. Hjorth, S. Meinardi, M. Orlandi, B. Rindone, and E. Rosenbohm. Atmospheric Nitration of Polar Aromatic Compounds. *CMD Annual Report '00*, pages 127–130, 2000.
- [182] P. Barzaghi and H. Herrmann. A Mechanistic Study of the Oxidation of Phenol by OH/NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> in Aqueous Solution. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 4:3669–3675, 2002.
- [183] T. Umschlag, R. Zellner, and H. Herrmann. Laser-Based Studies of NO<sub>3</sub> Radical Reactions with Selected Aromatic Compounds in Aqueous Solution. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 4:2975–2982, 2002.
- [184] E. Bolzacchini, M. Bruschi, J. Hjorth, S. Meinardi, M. Orlandi, B. Rindone, and E. Rosenbohm. Gas-Phase Reaction of Phenol with NO<sub>3</sub>. *Environ. Sci. Technol.*, 35:1791–1797, 2001.
- [185] J. K. Lin, K. J. Chen, G. Y. Liu, Y. R. Chu, and S. Y. Lin-Shiau. Nitration and Hydroxylation of Aromatic Amino Acid and Guanine by the Air Pollutant Peroxyacetyl Nitrate. *Chemico-Biological Interactions*, 127:219–236, 2000.
- [186] J. Goschnick and J. Schuricht. Untersuchungen der Oberflächenzusammensetzung von allergenen Pollen auf Veränderungen durch Luftschadstoffe. *FZKA-PUG 17, Forschungszentrum Karlsruhe*, pages 187–196, 1995.
- [187] J. Goschnick and J. Schuricht. The Influence of NO<sub>2</sub> on Allergenic Pollen Studied by Secondary Ion Mass Spectrometry. *J. Aerosol Sci.*, 26:885–886, 1995.

- [188] J. P. Eiserich, V. Vossen, C. A. O'Neill, B. Halliwell, C. E. Cross, and A. van der Vliet. Molecular Mechanisms of Damage by Excess Nitrogen Oxides: Nitration of Tyrosine by Gas-Phase Cigarette Smoke. *FEBS Letters*, 353:53–56, 1994.
- [189] A. S. Petersson, H. Steen, D. E. Kalume, K. Caidahl, and P. Roepstorff. Investigation of Tyrosine Nitration in Proteins by Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 36:616–625, 2001.
- [190] T. Kotiaho, M. N. Eberlin, P. Vainiotalo, and R. Kostianen. Electrospray Mass and Tandem Mass Spectrometry Identification of Ozone Oxidation Products of Amino Acids and Small Peptides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 11:526–535, 2000.
- [191] J. Emberlin. Interaction between Air Pollutants and Aeroallergens. *Clin. Exp. Allergy*, 25, S3:33–39, 1995.
- [192] C. Monn. Exposure Assessment of Air Pollutants: a Review on Spatial Heterogeneity and Indoor/Outdoor/Personal Exposure to Suspended Particulate Matter, Nitrogen Dioxide and Ozone. *Atmos. Environ.*, 35:1–32, 2001.
- [193] H. Ipsen and H. Lowenstein. Isolation and Immunochemical Charakterization of the Major Allergen of Birch Pollen (*Betula verrucosa*). *J. Allergy Clin. Immunol.*, 72:150–159, 1983.
- [194] M. Gajhede, P. Osmark, F. M. Poulsen, H. Ipsen, J. N. Larsen, R. J. J. van Neerven, C. Schou, H. Löwenstein, and M. Spangfort. X-Ray and NMR Structure of Bet v 1, the Origin of Birch Pollen Allergy. *Nature Structural Biology*, 3:1040–1045, 1996.
- [195] M. D. Spangfort, H. Ipsen, S. H. Sparholt, S. Aasmul-Olsen, M. R. Larsen, E. Mörtz, P. Roepstorff, and J. N. Larsen. Characterization of Purified Recombinant Bet v 1 with Authentic N-Terminus, Cloned in Fusion with Maltose-Binding Protein. *Protein Express. Purif.*, 8:365–373, 1996.
- [196] M. D. Spangfort, O. Mirza, J. Holm, J. N. Larsen, H. Ipsen, and H. Lowenstein. The Structure of Major Birch Pollen Allergens - Epitopes, Reactivity and Cross-Reactivity. *Allergy*, 54:23–26, 1999.
- [197] M. D. Spangfort, O. Mirza, L. A. Svensson, J. N. Larsen, M. Gajhede, and H. Ipsen. Crystallization and Preliminary X-ray Analysis of Birch-Pollen Allergen Bet v 1 in Complex with a Murine Monoclonal IgG Fab Fragment. *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.*, 55:2035–2036, 1999.

- [198] B. I. Fall, M. Schedl, M. G. Weller, and R. Niessner. The Application of the PASA System in the Field of Allergy Diagnosis. In *2. Biosensor Symposium*, <http://w210.ub.uni-tuebingen.de/dbt/volltexte/2001/376>, Tübingen, 2001.
- [199] F. Lottspeich and H. Zorbas. *Bioanalytik*. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 1998.
- [200] K. A. Greive, D. H. Balazs, and W. D. Comper. Protein Fragments in Urine Have Been Considerably Underestimated by Various Protein Assays. *Clin. Chem.*, 47:1717–1719, 2001.
- [201] V. Ng and P. Cho. The Relationship between Total Tear Protein Concentrations Determined by Different Methods and Standards. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 238:571–576, 2000.
- [202] J. W. Jenzano, S. L. Hogan, C. M. Noyes, G. L. Featherstone, and R. L. Lundblad. Comparison of Five Techniques for the Determination of Protein Concentration. *Anal. Biochem.*, 159:370–376, 1986.
- [203] M. Fountoulakis, J. F. Juranville, and M. Manneberg. Comparison of the Coomassie Brilliant Blue, Bicinchoninic Acid and Lowry Quantitation Assays, Using Non-Glycosylated and Glycosylated Proteins. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 24:265–274, 1992.
- [204] C. V. Sapan, R. L. Lundblad, and N. C. Price. Colorimetric Protein Assay Techniques. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 29:99–108, 1999.
- [205] M. Brush. Standard Techniques and New Methods Provide Alternatives for the Quantitation of Proteins in Solution. *The Scientist*, 14:23–30, 2000.
- [206] A. G. Gornall, C. J. Bardawill, and M. M. David. Determination of Serum Proteins by Means of the Biuret Reaction. *J. Biol. Chem.*, 177:751–766, 1949.
- [207] D. B. Barnes, G. F. Pierce, D. Lichti, M. Landt, J. König, and K. M. Chan. Effects of Dextran on Five Biuret-Based Procedures for Total Protein in Serum. *Clin. Chem.*, 31:2018–2019, 1985.
- [208] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. Protein Measurement with the Folin-Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265–275, 1951.
- [209] E. F. Hartree. Determination of Protein: A Modification of the Lowry Method that gives a Linear Photometric Response. *Anal. Biochem.*, 48:422–427, 1972.

- [210] M. M. Bradford. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, 72:248–254, 1976.
- [211] T. Zor and Z. Selinger. Linearization of the Bradford Protein Assay Increases its Sensitivity: Theoretical and Experimental Studies. *Anal. Biochem.*, 236:302–308, 1996.
- [212] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermansen, A. K. Malia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.*, 150:76–85, 1985.
- [213] K. J. Wiechelman, R. D. Braun, and J. D. Fitzpatrick. Investigation of the Bicinchoninic Acid Protein Assay: Identification of the Groups Responsible for Color Formation. *Anal. Biochem.*, 175:231–237, 1988.
- [214] A. J. Brenner and E. D. Harris. A Quantitative Test for Copper Using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.*, 226:80–84, 1995.
- [215] O. Minari and D. P. Zilversmit. Use of KCN for Stabilization of Color in Direct Nesslerization of Kjeldahl Digests. *Anal. Biochem.*, 6:320–327, 1963.
- [216] W. Heimann. *Grundzüge der Lebensmittelchemie*. Verlag Theodor Steinkopff, Dresden, 1969.
- [217] S. Zellmer, G. Kaltenborn, U. Rothe, H. Lehnich, J. Lasch, and H.-D. Pauer. Quantiation of Lipids, Liposomes, Amino Acids, and Proteins by Thermal Ultramicrodigestion and an Ultramicrocoulometric Assay, Based on the Reaction of Hypobromite with Ammonia. *Anal. Biochem.*, 273:163–167, 1999.
- [218] W. W. You, R. P. Haugland, D. K. Ryan, and R. P. Haugland. 3-(4-Carboxybenzoyl)quinoline-2-carboxaldehyde, a Reagent with Broad Dynamic Range for the Assay of Proteins and Lipoproteins in Solution. *Anal. Biochem.*, 244:277–282, 1997.
- [219] A. S. Safatov, I. S. Andreeva, B. D. Belan, A. I. Borodulin, G. A. Buryak, Y. V. Marchenko, V. V. Marchenko, S. E. Olkin, M. V. Panchenko, V. A. Petrishchenko, O. V. Pyankov, I. K. Reznikova, and A. N. Sergeev. The Study of Yearly Dynamics of the Biogenic Component of Atmospheric Aerosol in the South of Western Siberia at the Altitudes up to 7 km. *J. Aerosol Sci.*, S1:S683–S684, 2003.

- [220] V. M. Starodub, L. L. Fedorenko, and N. F. Starodub. Optical Immune Sensors for the Monitoring Protein Substances in the Air. *Sens. Actuator B-Chem.*, 68:40–47, 2000.
- [221] W. H. Stein and S. Moore. Chromatography of Amino Acids on Starch Columns. Separation of Phenylalanine, Leucine, Isoleucine, Methionine, Tyrosine, and Valine. *J. Biol. Chem.*, 176:337–365, 1948.
- [222] S. Moore and W. H. Stein. Photometric Ninhydrin Method for Use in the Chromatography of Amino Acids. *J. Biol. Chem.*, 176:367–388, 1948.
- [223] M. Fountoulakis and H. W. Lahm. Hydrolysis and Amino Acid Composition Analysis of Proteins. *J. Chromatogr. A*, 826:109–134, 1998.
- [224] M. Weiss, M. Manneberg, J. F. Juranville, H. W. Lahm, and M. Fountoulakis. Effect of the Hydrolysis Method on the Determination of the Amino Acid Composition of Proteins. *J. Chromatogr. A*, 795:263–275, 1998.
- [225] P. Husek and P. Simek. Advances in Amino Acid Analysis. *LC GC North America*, 19:986–999, 2001.
- [226] C. H. W. Hirs, W. H. Stein, and S. Moore. The Amino Acid Composition of Ribonuclease. *J. Biol. Chem.*, 211:941–950, 1954.
- [227] I. Davidson. Hydrolysis of Samples for Amino Acid Analysis. In Smith. B. J., editor, *Protein Sequencing Protocols*, volume 64, pages 119–129. Humana Press, Totowa, New Jersey, 1997.
- [228] R. J. Simpson, M. R. Neuberger, and T.-Y. Liu. Complete Amino Acid Analysis of Proteins from a Single Hydrolysate. *J. Biol. Chem.*, 251:1936–1940, 1976.
- [229] J. G. Hoogerheide and C. M. Campbell. Determination of Cysteine Plus Half-Cystine in Protein and Peptide Hydrolysates: Use of Dithiodiglycolic Acid and Phenylisothiocyanate Derivatization. *Anal. Biochem.*, 201:146–151, 1992.
- [230] T. E. Hugli and S. Moore. Determination of the Tryptophan Content of Proteins by Ion Exchange Chromatography of Alkaline Hydrolysis. *J. Biol. Chem.*, 247:2828–2834, 1972.
- [231] T. J. Simat and H. Steinhart. Oxidation of Free Tryptophan and Tryptophan Residues in Peptides and Proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 46:490–498, 1998.

- [232] R. E. Beltz, E. C. Herrmann, and H. Nordbo. Pronase Digestion of Carious Dentin. *Caries Res.*, 33:468–472, 1999.
- [233] S. Einarsson, B. Josefsson, and S. Lagerkvist. Determination of Amino Acids with 9-Fluorenylmethyl Chloroformate and Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr.*, 282:609–618, 1983.
- [234] S. Einarsson, S. Folestad, B. Josefsson, and S. Lagerkvist. High-Resolution Reversed-Phase Liquid Chromatography System for the Analysis of Complex Solutions of Primary and Secondary Amino Acids. *Anal. Chem.*, 58:1638–1643, 1986.
- [235] M. Abrahamsson and K. Gröningsson. Separation of PTH-Amino Acids by Isocratic High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr.*, 154:313–317, 1978.
- [236] B.-L. Johannsson and K. Isaksson. Separation of Phenylthiohydantoin-Amino Acids by fast Protein Liquid Chromatography. *J. Chromatogr.*, 356:383–392, 1986.
- [237] J. L. Glajch and J. J. Kirkland. Mobile-Phase Optimization in Gradient-Elution HPLC for the Separation of the Phenylthiohydantoin-Amino Acids. *J. Chromatogr. Sci.*, 25:4–11, 1987.
- [238] S. A. Cohen and D. J. Strydom. Amino Acid Analysis Utilizing Phenylisothiocyanate Derivatives. *Anal. Biochem.*, 174:1–16, 1988.
- [239] R. L. Henrikson and S. C. Meredith. Amino Acid Analysis by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography: Precolumn Derivatization with Phenylisothiocyanate. *Anal. Biochem.*, 136:65–74, 1984.
- [240] H. Scholze. Determination of Phenylthiocarbamyl Amino Acids by Reversed-phase High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr.*, 350:453–460, 1985.
- [241] V. Stocchi, G. Piccoli, M. Magnani, F. Palma, B. Biagiarelli, and L. Cucchiari. Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography Separation of Dimethylaminoazobenzene Sulfonyl- and Dimethylaminoazobenzene Thiohydantoin-Amino Acid Derivatives for Amino Acid Analysis and Microsequencing Studies at the Picomole Level. *Anal. Biochem.*, 178:107–117, 1989.
- [242] E. H. J. M. Jansen, R. H. Ber, R. Both-Miedema, and L. Doorn. Advantages and Limitations of Pre-Column Derivatization of Amino Acids with Dabsyl Chloride. *J. Chromatogr.*, 553:123–133, 1991.

- [243] N. Kaneda, M. Sato, and K. Yagi. Analysis of Dansyl Amino Acids by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Biochem.*, 127:49–54, 1982.
- [244] M. Simmaco, D. Biase, D. Barra, and F. Bossa. Automated Amino Acid Analysis Using Precolumn Derivatization with Dansylchloride and Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr.*, 504:129–138, 1990.
- [245] W. D. Hill, F. H. Walters, T. D. Wilson, and J. D. Stuart. High Performance Liquid Chromatographic Determination of Amino Acids in the Picomole Range. *Anal. Chem.*, 51:1338–1341, 1979.
- [246] H. Umagat, P. Kucera, and L. F. Wen. Total Amino-Acid-Analysis Using Precolumn Fluorescence Derivatization. *J. Chromatogr.*, 239:463–474, 1982.
- [247] M. C. Roach and M. D. Harmony. Determination of Amino Acids at Subfemtomole Levels by High-Performance Liquid Chromatography with Laser-Induced Fluorescence Detection. *Anal. Chem.*, 59:411–415, 1987.
- [248] I. Molnar-Perl and I. Bozor. Comparison of the Stability and UV and Fluorescence Characteristics of the o-Phthaldialdehyde/3-Mercaptopropionic Acid and o-Phthaldialdehyde/N-Acetyl-L-cysteine Reagents and those of their Amino Acids and Derivatives. *J. Chromatogr. A*, 798:37–46, 1998.
- [249] F. R. Antoine, C. I. Wei, R. C. Littell, and M. R. Marshall. HPLC Method for Analysis of Free Amino Acids in Fish Using o-Phthaldialdehyde Precolumn Derivatization. *J. Agric. Food Chem.*, 47:5100–5107, 1999.
- [250] I. Molnar-Perl and A. Vasanits. Stability and Characteristics of the o-Phthaldialdehyde/3-Mercaptopropionic Acid and o-Phthaldialdehyde/N-Acetyl-L-cysteine Reagents and their Amino Acid Derivatives Measured by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A*, 835:73–91, 1999.
- [251] A. Vasanits, D. Kutlan, P. Sass, and I. Molnar-Perl. Retention/Quantitation Properties of the o-Phthaldialdehyde-3-mercaptopropionic Acid and o-Phthaldialdehyde-N-acetyl-L-cysteine Amino Acid Derivatives in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A*, 870:271–287, 2000.
- [252] D. H. Spackman, W. H. Stein, and S. Moore. Automatic Recording Apparatus for Use in Chromatography of Amino Acids. *Anal. Chem.*, 30:1190–1206, 1958.

- [253] N. Lepage, N. McDonald, L. Dallaire, and M. Lambert. Age-Specific Distribution of Plasma Amino Acid Concentrations in a Healthy Pediatric Population. *Clin. Chem.*, 43:2397–2402, 1997.
- [254] M. H. Jia, N. Keutgen, S. Matsushashi, C. Mitzuniwa, T. Ito, T. Fujimura, and S. Hashimoto. Ion Chromatographic Analysis of Selected Free Amino Acids and Cations to Investigate the Change of Nitrogen Metabolism by Herbicide Stress in Soybean (*Glycine max*). *J. Agric. Food Chem.*, 49:276–280, 2001.
- [255] J. A. Polta and D. C. Johnson. The Direct Electrochemical Detection of Amino Acids at a Platinum Electrode in Alkaline Chromatographic Effluent. *J. Liq. Chrom.*, 6:1727–1743, 1983.
- [256] A. P. Clarke, P. Jandik, R. D. Rocklin, Y. Liu, and N. Avdalovic. An Integrated Amperometry Waveform for the Direct, Sensitive Detection of Amino Acids and Amino Sugars Following Anion-Exchange Chromatography. *Anal. Chem.*, 71:2774–2781, 1999.
- [257] P. Jandik, A. P. Clarke, N. Avdalovic, D. C. Andersen, and J. Cacia. Analyzing Mixtures of Amino Acids and Carbohydrates Using Bi-Modal Integrated Amperometric Detection. *J. Chromatogr.*, 732:193–201, 1999.
- [258] P. Jandik, J. Cheng, D. Jensen, S. Manz, and N. Avdalovic. New Technique for Increasing Retention of Arginine on an Anion-Exchange Column. *Anal. Biochem.*, 287:38–44, 2000.
- [259] P. Jandik, J. Cheng, J. Evrovski, and N. Avdalovic. Simultaneous Analysis of Homocysteine and Methionine in Plasma. *J. Chromatogr. B*, 759:145–151, 2001.
- [260] P. Jandik, J. Cheng, D. Jensen, S. Manz, and N. Avdalovic. Simplified In-Line Sample Preparation for Amino Acid Analysis in Carbohydrate Containing Samples. *J. Chromatogr. B*, 758:189–196, 2001.
- [261] D. Jensen. *Grundlagen der Ionenchromatographie*. Dionex GmbH, Idstein, 2000.
- [262] J. Weiß. *Ionenchromatographie*. VCH-Wiley, Weinheim, 2001.
- [263] H. Baumgarten. *Monoklonale Antikörper: Herstellung und Charakterisierung*. Springer, Berlin, 1990.
- [264] B. F. Erlanger. The Preparation of Antigenic Hapten-Carrier Conjugates: A Survey. *Methods Enzymol.*, 70:85–104, 1980.

- [265] G. Köhler and C. Milstein. Continuous Cultures of Fused Cells Screening Antibody of Predefined Specificity. *Nature*, 256:495–497, 1975.
- [266] P. Tijssen. *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*. Elsevier, Amsterdam, 1985.
- [267] S. A. Berson and R. S. Yalow. Assay of Plasma Insulin in Human Subjects by Immunological Methods. *Nature*, 164:1648–1649, 1959.
- [268] J. G. Haas and E. J. Guardia. Production of Antibodies against Insecticide-Protein Conjugates. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 129:546–551, 1968.
- [269] J. P. Sherry. Environmental Chemistry: The Immunoassay Option. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 23:217–300, 1992.
- [270] T. T. Ngo. *Enzyme-Mediated Immunoassay*. Plenum Press, New York, 1985.
- [271] S. H. Jenkins. Homogeneous Enzyme Immunoassay. *J. Immunol. Meth.*, 150:91–97, 1992.
- [272] E. Engvall and P. Perlmann. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) - Quantitative Assay of Immunoglobulin G, Immunochemistry. *Immunochemistry*, 8:871–874, 1971.
- [273] E. Engvall and P. Perlmann. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA - III. Quantitation of Specific Antibodies by Enzyme-Labeled Anti-Immunoglobulin in Antigen-Coated Tubes. *J. Immunol.*, 109:129–135, 1972.
- [274] B. K. van Weemen and A. H. W. M. Schuurs. Immunoassay Using Antigen-Enzyme Conjugates. *FEBS Letters*, 15:232–236, 1971.
- [275] B. K. van Weemen and A. H. W. M. Schuurs. Immunoassay Using Hapten-Enzyme Conjugates. *FEBS Letters*, 24:77–81, 1972.
- [276] D. Monroe. Enzyme Immunoassay. *Anal. Chem.*, 56:920A–931A, 1984.
- [277] J. N. Miller and R. Niessner. Enzyme and Immunoassays. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, pages 129–153. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1994.
- [278] R. Niessner. Immunoassays in Environmental Chemistry: Some Thoughts on Trends and Status. *Anal. Methods Instrumentation*, 1:134–144, 1993.

- [279] R. Presentini and B. Terrana. Influence of the Antibody-Peroxidase Coupling Methods on the Conjugates Stability and on the Methodologies for the Preservation of the Activity in Time. *J. Immunoassay*, 16:309–324, 1995.
- [280] P. D. Josephy, T. Eling, and R. P. Mason. The Horseradish Peroxidase-Catalyzed Oxidation of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin - Free Radical and Charge Transfer Complex Intermediates. *J. Biol. Chem.*, 257:3669–3675, 1982.
- [281] J. C. A. ter Steege, L. Koster-Kamphuis, E. A. van Straaten, P. P. Forget, and W. A. Buurman. Nitrotyrosine in Plasma of Celiac Disease Patients as Detected by a New Sandwich ELISA. *Free Radical Biol. Med.*, 25:953–963, 1998.
- [282] J. Ramirez, J. A. Carpizo, H. Ipsen, J. Carreira, and M. Lombardero. Quantification in Mass Units of Bet v 1, the Main Allergen of Betula Verrucosa Pollen, by a Monoclonal Antibody Based-ELISA. *Clin. Exp. Allergy*, 24:926–931, 1997.
- [283] A. Rantio-Lehtimäki, M. Viander, and A. Koivikko. Airborne Birch Pollen Antigens in Different Particle Sizes. *Clin. Exp. Allergy*, 24:23–28, 1994.
- [284] D. Rodbard. *Ligand Assay*. Masson Publishing, New York, 1981.
- [285] M. G. Weller. *Strukturelle und kinetische Untersuchungen zur Entwicklung und Optimierung von Hapten-Enzymimmunoassays (ELISAs) am Beispiel der Bestimmung von Triazinherbiziden*. Dissertation, Technische Universität München, 1992.
- [286] M. F. M. Johnston and H. N. Eisen. Cross-Reactions between 2,4-Dinitrophenyl and Menadione (Vitamin K3) and the General Problem of Antibody Specificity. *J. Immunol.*, 117:1189–1196, 1976.
- [287] J. A. Berzofsky and A. N. Schechter. The Concepts of Crossreactivity and Specificity in Immunology. *Mol. Immunol.*, 18:751–763, 1981.
- [288] J. J. Miller and J. R. Valdes. Methods for Calculating Crossreactivity in Immunoassays. *J. Clin. Immunoassay*, 15:97–107, 1992.
- [289] G. E. Abraham. Solid-Phase Radioimmunoassay of Estradiol-17 $\beta$ . *J. Clin. Endocrin. Metabol.*, 29:866–870, 1969.
- [290] T. Franze. *Untersuchungen zur Nitrierung von Proteinen durch atmosphärische Spurenstoffe*. Diplomarbeit, Technische Universität München, 2000.

- [291] *Ag 1, AG MP-1 and AG 2 Strong Anion Exchange Resin Instruction Manual*. Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA.
- [292] Dionex Corporation. Installation Instructions and Troubleshooting Guide for the AAA Direct Amino Acid Analysis System. *Document Nr. 031481-05*, 2001.
- [293] A. Petzold and R. Niessner. Method Comparison Study on Soot-Selective Techniques. *Mikrochim. Acta*, 117:215–237, 1995.
- [294] Verein Deutscher Ingenieure. Messen von Ruß (Immission); Chemisch-analytische Bestimmung des elementaren Kohlenstoffes nach Extraktion und Thermodesorption des organischen Kohlenstoffes. *VDI 2465*, 1996.
- [295] M. Theisen. *Quellidentifizierung und Luftstaubanalytik unter Verwendung der Totalreflexions-Röntgenfluoreszenz-Spektroskopie*. Dissertation, Technische Universität München, 1999.
- [296] W. Walcher, T. Franze, M. G. Weller, U. Pöschl, and C. G. Huber. Liquid- and Gas-Phase Nitration of Bovine Serum Albumin Studied by LC-MS and LC-MSMS Using Monolithic Columns. *J. Proteome Res.*, 2:534–542, 2003.
- [297] B. Eliasson and U. Kogelschatz. Ozone Generation with Narrow-Band UV Radiation. *Ozone-Sci. Eng.*, 13:365–373, 1991.
- [298] US-EPA. Air quality criteria for particulate matter. Technical report, US-Environmental Protection Agency, 1996.
- [299] J. R. Brook, A. H. Wiebe, S. A. Woodhouse, C. V. Audette, T. F. Dann, S. Callaghan, M. Piechowski, E. Dabek-Zlotorzynska, and J. F. Dlough. Temporal and Spatial Relationship in Fine Particle Strong Acidity, Sulphate, PM10, and PM2.5 across multiple Canadian Locations. *Atmos. Environ.*, 31:4223–4236, 1997.
- [300] J. R. Brook, T. F. Dann, and R. T. Burnett. The Relationship among TSP, PM10, PM2.5, and Inorganic Constituents of Atmospheric Particulate Matter at multiple Canadian Locations. *J. Air Waste Management Association*, 42:2–19, 1997.
- [301] H. A. Gray and G. R. Cass. Source Contributions to Atmospheric Fine Carbon Particle Concentrations. *Atmos. Environ.*, 32:3805–3825, 1998.
- [302] E. Schultz. Deutscher Wetterdienst, GF Medizin-Meteorologie, Freiburg i. Br. *Persönliche Mitteilung*, 2002.

- [303] J. Langer. *Persönliche Mitteilung*, 2002.
- [304] *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 66th edition, 1985.
- [305] R. M. C. Dawson, D. C. Elliott, W. H. Elliot, and K. M. Jones. *Data for Biochemical Research*. Oxford, 3rd edition, 1986.
- [306] H. Herrmann. Dionex GmbH, Idstein. *Persönliche Mitteilung*, 2000.
- [307] I. Girault, A. E. Karu, M. Schaper, M. H. Barcellos-Hoff, T. Hagen, D. S. Vogel, B. N. Ames, S. Christen, and M. K. Shigenaga. Immunodetection of 3-Nitrotyrosine in the Liver of Zymosan-Treated Rats with a New Monoclonal Antibody: Comparison to Analysis by HPLC. *Free Radical Biol. Med.*, 31:1375–1387, 2001.
- [308] I. M. Roitt. *Essential Immunology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1991.
- [309] N. W. Kooy, J. A. Royall, Y. Zu Ye, D. R. Kelly, and J. S. Beckmann. Evidence for In vivo Peroxynitrite Production in Human Acute Lung Injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 151:1250–1254, 1995.