

Programm Lebensgrundlage Umwelt
und ihre Sicherung (BWPLUS)

Zwischenbericht anlässlich des
Statusseminars des BWPLUS am 11.3. und 12.3.2003 im
Forschungszentrum Karlsruhe

Spezies der KFZ-emittierten Platingruppenelemente (PGE) und ihre toxische Wirkung (Teil B)

A. Hartwig¹, A. Zeller¹, D. Grasnack¹, J.-D. Eckhardt², Z. Berner², D. Stüben²

¹Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie, Universität Karlsruhe

²Institut für Mineralogie und Geochemie, Universität Karlsruhe

Förderkennzeichen: BWB 20012

Die Arbeiten des Programms Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung werden mit
Mitteln des Landes Baden-Württemberg gefördert

Spezies der KFZ-emittierten Platingruppenelemente (PGE) und ihre toxische Wirkung

A. Hartwig¹, A. Zeller¹, D. Grasnack¹, J.-D. Eckhardt², Z. Berner², D. Stüben²

¹Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie, Universität Karlsruhe

²Institut für Mineralogie und Geochemie, Universität Karlsruhe

Summary

During the last years, comparatively high concentrations of platinum group elements derived from automobile catalysts have been detected along high-traffic streets and in cities. Nevertheless, only little is known about their toxic potentials. Aim of this project is to investigate potential genotoxic effects of platinum and palladium compounds in mammalian cells in culture. In cooperation with the group of Prof. Stüben a procedure was developed to quantitate platinum- and palladium-induced DNA adducts by HR-ICP-MS. Our experiments demonstrate a dose- and time-dependent induction of DNA adducts after exposure of A549 human lung cells towards platinum and palladium particles, including Al_2O_3 -Pt particles resembling closely those emitted from automobile catalysts. The resistance of DNA adducts towards nucleophils is comparable for Al_2O_3 -Pt particles and cis-Pt, indicating similar stability. Furthermore, experiments are in progress to determine Pt binding to intracellular proteins. Studies with water soluble PtCl_4 and with Al_2O_3 -Pt particles demonstrate a time-dependent increase of Pt binding to the nuclear protein fraction.

Zusammenfassung

Vergleichsweise hohe PGE-Emissionen aus Autokatalysatoren sind in den letzten Jahren entlang von Autobahnen und in Städten nachgewiesen worden, über deren Toxizität bislang nur wenig bekannt ist. Ziel der Untersuchungen im Rahmen dieses Projektes ist die Abklärung eines möglichen genotoxischen Potentials von Platin- und Palladiumverbindungen in A549 menschlichen Lungenzellen. Es konnte in Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Stüben eine Methode zum quantitativen Nachweis von Pt- und Pd-induzierten DNA-Addukten mit Hilfe der hochauflösenden Massenspektrometrie mit induktiv gekoppelter Plasma-Ionisierung (HR-ICP-MS) entwickelt werden. Unsere Experimente zeigen eine dosis- und zeitabhängige Pt- bzw. Pd-Bindung an DNA; dies gilt auch für Al_2O_3 -Pt-Partikel, die weitgehend den von Katalysatoren emittierten Partikeln ähneln. Die Resistenz der Pt-DNA-Addukte gegenüber nukleophilen Agentien ist vergleichbar nach Inkubation mit den Al_2O_3 -Pt-Partikeln und dem Chemotherapeutikum Cisplatin, so dass von einer ähnlichen Stabilität der Addukte ausgegangen werden kann. Derzeit werden darüber hinaus Untersuchungen zur intrazellulären Proteinbindung durchgeführt; erste Versuche mit wasserlöslichem PtCl_4 und mit Al_2O_3 -Pt-Partikeln zeigen eine zeitabhängige Anreicherung von Pt an Zellkernproteinen.

1 Einleitung

Platin-, Palladium- und Rhodiumverbindungen werden aus Automobil-Katalysatoren als Metallpartikel oder Metalloxide in geringen Konzentrationen in die Umwelt freigesetzt (Wei und Morrison, 1994; Cubelic et al., 1997; LfU, 1999). Während einige Literaturdaten zur Toxikologie löslicher Platin-, Palladium- und Rhodiumkomplexe vorliegen, ist über die toxische Wirkung chronischer Expositionen gegenüber Platingruppenelementen (PGE) aus Autokatalysatoren noch vergleichsweise wenig bekannt. Die Frage einer möglichen Bioverfügbarkeit von Platin aus Katalysatoren wurde von Artelt et al. (1999) untersucht. Hierbei wurde eine Modellsubstanz synthetisiert, bei der Platinpartikel ≥ 4 nm auf Aluminiumoxidpartikel ≤ 5 μ m aufgebracht wurden. Diese Modellsubstanz zeigte eine nur geringe Löslichkeit in reinem Wasser, aber eine vergleichsweise hohe Löslichkeit in physiologischer, 0,9 %iger Kochsalzlösung. In anschließenden Versuchen mit Ratten, die entweder durch intratracheale Instillation oder durch Inhalation exponiert wurden, waren bis zu 30 % der inhalierten Platinpartikel bioverfügbar. Toxikologische Untersuchungen, wie etwa eine mögliche DNA-Bindung oder Genotoxizität, wurden von uns durchgeführt und sind im Folgenden zusammengefasst.

Ziel der toxikologischen Untersuchungen im Rahmen dieses Projektes ist die Abklärung der Partikelaufnahme in menschliche Zellen sowie eines möglichen genotoxischen Potentials von Platin- und Palladiumverbindungen in Säugerzellen. Von besonderem Interesse sind dabei zum einen partikuläre Verbindungen, die aus Katalysatoren emittiert werden, sowie die Verbindungsformen, die nach Transformationsprozessen in der Umwelt bzw. im menschlichen Organismus auftreten bzw. vermutet werden. Diese Untersuchungen sollen in möglichen Zielzellen der toxischen Wirkung (Lungenzellen, Darmepithelzellen) durchgeführt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

A549-Zellen (DSM, ATCC 107) werden in DMEM-Medium (10 % FKS, 100 U Penicillin / ml, 100 µg Streptomycin / ml) im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit als Monolayer kultiviert.

2.2 Vorbereitung der Partikel und Inkubation

Direkt vor Versuchsbeginn werden die Partikel im Trockenschrank 20 min bei 110°C sterilisiert und eine Stammsuspension (jeweils 2-3 mg Metallpulver / ml in bidestilliertem, autoklaviertem Wasser) 10 min in einem Ultraschallbad behandelt. Anschließend werden logarithmisch wachsende A549 Zellen inkubiert. Nachfolgend werden die Zellen viermal mit PBS gewaschen, abtrypsiniert und die DNA wird isoliert.

2.3 DNA-Isolierung

Die Isolierung der DNA basiert auf einer modifizierten Methode nach Sambrook et al. (1998). Die abtrypsinierten Zellen ($3 - 6 \times 10^6$) werden in eiskalter TBS-Lösung (0,0027 M KCl, 0,137 M NaCl, 0,025 M Tris-Base, pH 7,4) aufgenommen und 4 min bei 300 g (4°C) zentrifugiert. Nach einem erneuten Wasch- und Zentrifugationsschritt wird das Zellpellet vorsichtig in 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8) aufgenommen und die Zellsuspension nach Zugabe von 900 µl Extraktionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8, 0,1 M EDTA, 20 µg/ml RNase (DNase-frei), 0,5 % SDS) 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von Proteinase K (Endkonzentration 100 µg/ml) und 3 h Verdau im Schüttelinkubator bei 50°C wird die Lösung zunächst auf Raumtemperatur abgekühlt. Zur Abtrennung der DNA von den Proteinen wird die Lösung mit dem gleichen Volumen einer Mischung aus Tris-gepuffertem Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, geschüttelt und danach zur Phasentrennung mit 10000 g bei Raumtemperatur 1 min zentrifugiert. Mit der oberen wässrigen Phase wird die Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion ein- bis zweimal wiederholt, bis keine Interphase mehr beobachtet wird. Zur vollständigen Entfernung des Phenols aus der wässrigen Phase schließt sich eine Extraktion mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) analog der Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion an. Nachfolgend wird die DNA durch Zugabe von 0,2 Vol 10 M Ammoniumacetatlösung zur

wässrigen DNA-Lösung und 2 Vol Ethanol (absolut) ausgefällt und 12 h bei -18°C aufbewahrt. Nach 10 min Zentrifugation bei 6000 g (4°C) wird das DNA-Pellet vorsichtig in 70%igem Ethanol aufgenommen und anschließend erneut bei 6000 g (4°C) 10 min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wird viermal wiederholt. Zuletzt wird das gereinigte DNA-Pellet in einem definierten Volumen bidest. Wasser aufgenommen und die Konzentration wird photometrisch anhand der Absorption bei 260 nm bestimmt. Die Quotienten A_{260}/A_{280} sowie A_{260}/A_{230} geben Aufschluß über die Reinheit der DNA.

2.4 Quantifizierung der PGE-DNA-Addukte mittels HR-ICP-MS

Die Quantifizierung der PGE-DNA-Addukte erfolgt im Arbeitskreis von Prof. Stüben und ist im Teil A des Statusbericht detailliert beschrieben.

Zur Vorbereitung der Analyse wird die DNA erneut in Ethanol ausgefällt und insgesamt viermal gewaschen. Anschließend wird das DNA-Pellet bei Raumtemperatur 4 h getrocknet, mit 200 μl frisch angesetzter Aufschlußlösung (1 Teil HNO_3 65 % v/v suprapur + 1 Teil H_2O_2 30 % v/v p.a.) versetzt, vorsichtig gemischt, 1 h bei RT stengelassen und dann über Nacht bei 85°C bei geöffnetem Reaktionsgefäß verascht. Unmittelbar vor der ICP-MS-Messung wird die veraschte Probe in 2 ml 1 % v/v HNO_3 (subboiled) aufgenommen und gemessen. Sämtliche Gefäße, die mit der später eingesetzten Aufschlußlösung in Kontakt kommen, werden zur Vermeidung von Kontaminationen mit 0,2 %iger HNO_3 gespült. Die Details der Kalibrierung und der weiteren Messprozedur sind im Teil A des Statusberichts ausgeführt.

2.5 Bestimmung der Cytotoxizität der Partikel anhand der Koloniebildungsfähigkeit

Jeweils eine Million Zellen pro Ansatz werden in eine Kulturschale ausgesät und für einen Tag anwachsen gelassen. Dann wird 24 h mit den Partikeln inkubiert; nach dem Abwaschen der Partikel werden die Zellen abgelöst, gezählt und jeweils genau 300 Zellen werden erneut ausgesät. Nach 7 Tagen im Brutschrank werden die entstandenen Kolonien mit PBS gewaschen, mit Ethanol fixiert, mit Giemsa-Mischung gefärbt, erneut mit Wasser gewaschen und nach dem Trocknen ausgezählt. Ergebnisse werden bezogen auf die Kontrolle angegeben.

2.6 Messung der Reversibilität der Metall-DNA-Bindung

Art und Festigkeit der Bindung des Metalls an die DNA werden durch Ablösungsversuche bestimmt.

Die nach Inkubation der Zellen mit den Partikeln adduktivierte DNA wird wie unter Punkt 2.3 beschrieben isoliert und eine konstante Menge an DNA wird mit den gelösten Nukleophilen Zyanid und Thioharnstoff (je 1 Volumenteil 100 mM Nukleophil für 24 h bei 37 °C) behandelt. Anschliessend wird die DNA erneut ausgefällt und die Reagentien sowie die von ihnen abgelösten Metalle werden abgewaschen. Nach Wiederauflösen und erneuter photometrischer Konzentrationsbestimmung der DNA-Lösung wird zum zweitenmal ausgefällt, wie unter Punkt 2.3 beschrieben verascht und der Rest-Metallgehalt an der DNA über ICP-MS im Labor von Prof. Stüben quantifiziert (Fichtinger-Schepman et al. 1995, Lemaire, et al. 1991).

2.7 Intrazelluläre Proteinbindung nach Platin-Inkubation

Zusätzlich zur DNA-Bindung wurden die Metallgehalte verschiedener zellulärer Proteinfractionen mittels Graphitrohr-AAS bestimmt. A549-Zellen werden mit gelöstem PtCl₄ beziehungsweise Al₂O₃-Pt-Partikeln inkubiert, anschliessend abtrypsinisiert und gewaschen. Nach der Bestimmung der Zellzahl mit einem automatischen Zellzählgerät wird die Zellsuspension zur Bestimmung von Platin in Cytoplasma und Zellkernextrakt aliquotiert. Nach der anschliessenden Proteinisolierung aus den Zellfraktionen wird zunächst jeweils der Proteingehalt mit der Bradford-Methode (bezogen auf Rinderserumalbumin) bestimmt und anschliessend der Platingehalt mittels Graphitrohr-AAS (Atomabsorptionsspektroskopie) gemessen. Daraus wird der Metallgehalt bezogen auf die Proteinmenge berechnet.

Die Fraktionierung der Zellen basiert auf einer Methode zur Präparation von Zellkernextrakten (Hartmann und Hartwig, 1998). Die Methode wurde in einzelnen Punkten modifiziert und erweitert.

Hierzu werden 1 – 2*10⁶ Zellen in 500 µl/10⁶ Zellen eiskaltem Zellysepuffer (10 mM HEPES pH 7,9, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,3 M Saccharose, 0,5 mM DTT, 0,6 mM PMSF, 4,7 mM Leupeptin) resuspendiert und 15 min auf Eis gestellt. Nach der Zugabe von eiskaltem 10 %igem NP-40 (25 µl/10⁶ Zellen) wird 10 s mittels Vortex gut durchmischt und bei 1500 g und 4°C 15 min zentrifugiert. Der Überstand, welcher die Cytoplasmaproteine enthält, wird vorsichtig abgenommen und ein Aliquot zur Proteinbestimmung (Bradford) eingesetzt. Der Rest wird bis zur AAS-Analyse bei –80°C gelagert. Das Pellet mit den Zellkernen wird mindestens zweimal mit dem Zellysepuffer gewaschen und 30 min unter Schütteln auf Eis mit 100 µl/10⁶ Zellen Kernlysepuffer (10 mM HEPES pH 7,9, 400 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 25 % Glycerin, 0,5 mM DTT, 0,6 mM PMSF, 4,7 mM Leupeptin) inkubiert. Nach erneutem Abzentrifugieren (15 min bei 10000g und 4°C) wird der Überstand,

welcher die Zellkernproteine enthält, vorsichtig abgenommen und ein Aliquot zur Proteinbestimmung nach Bradford eingesetzt. Der Rest wird bis zur AAS-Analyse bei -80°C gelagert. Cytoplasma- und Zellkernproteinlösung werden zur AAS-Analyse nach Bedarf verdünnt und in HNO_3 suprapur (Endkonzentration 1 %) gelöst. Vor jeder AAS-Analyse wird eine Kalibriergerade mit käuflicher Pt-Standardlösung (Alfa-Aesar) aufgenommen .

3 Ergebnisse und Diskussion

In den bisherigen Projektphasen konnte für käufliche Platin- und Palladiumpartikel nach Inkubation von menschlichen Lungenzellen eine dosis- und zeitabhängige Zunahme der Metalladdukte an zellulärer DNA nachgewiesen werden. Dabei waren keine cytotoxischen Effekte bezüglich der Koloniebildungsfähigkeit nachweisbar. In diesem Berichtszeitraum wurde die Bildung von DNA-Addukten nach Inkubation mit den in der Einleitung beschriebenen Al_2O_3 -Pt-Modellpartikeln untersucht.

3.1 Auswahl, Charakterisierung und Aufbereitung der Edelmetallpulver

Das Fraunhofer Institut für Toxikologie und Aerosolforschung in Hannover stellte uns freundlicherweise speziell synthetisierte Aluminiumoxidpartikel (Al_2O_3) aus "Siralox" zur Verfügung, die mit 3 % (w/w) elementarem Platin beschichtet sind. Dies sind auch die Partikel, die von Artelt et al. in den ursprünglichen Versuchen zur Bioverfügbarkeit nach Inhalation in Ratten verwendet wurden (s.o.). Die Partikel wurden von uns zunächst rasterelektronenmikroskopisch charakterisiert (Abbildung 1). Auf diesem Bild ist sehr gut die im Vergleich zu den bisher verwendeten Partikeln (Bilder siehe zurückliegende Statusberichte) homogenere Größenverteilung zu erkennen.

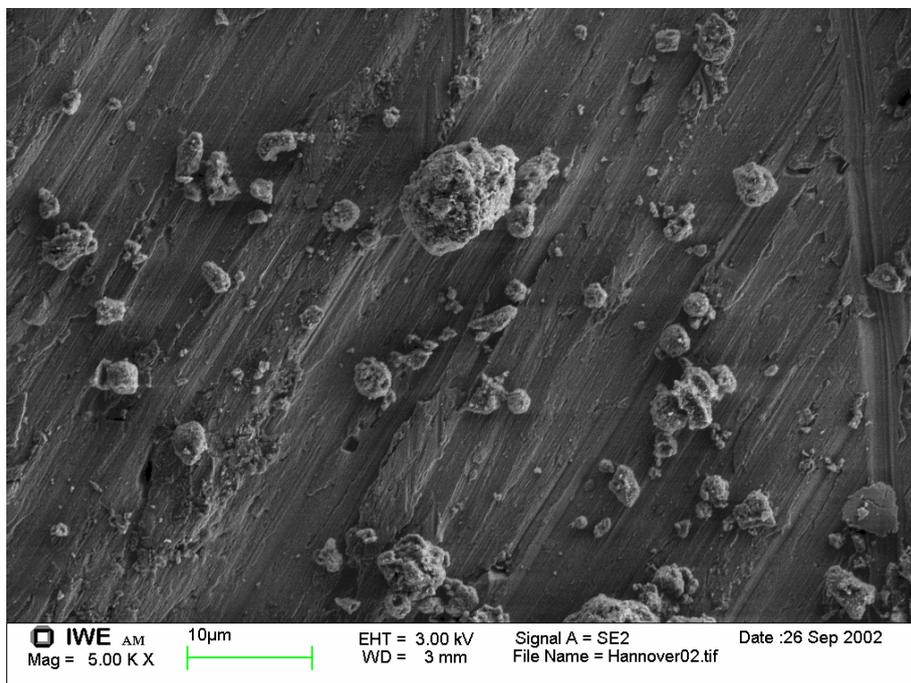


Abb. 1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Al_2O_3 -Pt-Partikel in 5000facher Vergrößerung. Die Riefen im Hintergrund stammen von dem metallischen Objektträger.

3.2 Mikroskopische Bestimmung der Partikelpagozytose

Ein quantitativer Nachweis der Phagozytose ist mit einem einfachen Lichtmikroskop momentan nicht möglich. Durch Kooperation mit Herrn PD Dr. Krug vom Forschungszentrum Karlsruhe konnten jedoch Aufnahmen mit dem Videomikroskop durchgeführt werden: dabei ist sehr schön zu erkennen, wie sich kleinere Pd-Partikel innerhalb einer Zelle im Cytoplasma bewegen. Der Zeitraffer-Film über 15 min vermittelt einen Eindruck, welche Wegstrecken die phagozytierten Partikel innerhalb der Zelle zurücklegen. Ähnliche Versuche sollen auch mit den Al_2O_3 -Pt-Partikeln durchgeführt werden.

3.3 Cytotoxizität der untersuchten Partikel

Wie unter 2.5 beschrieben, wurden Untersuchungen zur Cytotoxizität von Al_2O_3 – Pt - Partikeln durchgeführt. Dabei zeigte sich bei Dosen bis zu $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Wachstumsfläche keine signifikante Hemmung der Koloniebildungsfähigkeit. Das Ergebnis ist in Abbildung 2 dargestellt.

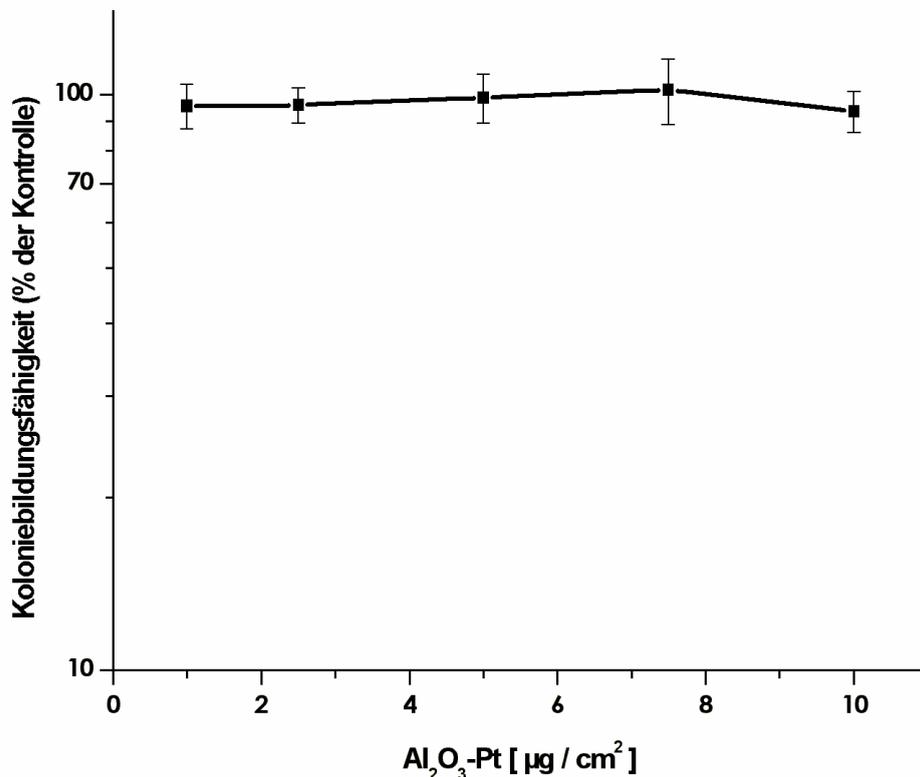


Abb. 2: Koloniebildungsfähigkeit von A549-Zellen nach 24 h Exposition mit Al_2O_3 – Pt - Partikeln

3.4 Analyse der Pt-DNA-Gehalte nach Inkubation von A 549 Zellen

Zunächst wurden logarithmisch wachsende A549 Zellen mit Al_2O_3 -Pt-Partikeln inkubiert und die DNA wurde wie beschrieben isoliert. Für die Analyse der Pt-Gehalte durch die HR-ICP-MS wurde eine Veraschung mit $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ durchgeführt.

In den letzten beiden Statusberichten wurden Daten präsentiert, die eine dosis- und zeitabhängige Zunahme der DNA-Adduktzahlen nach Inkubation mit reinen Platin- und Palladiumpartikeln zeigen. Diese Partikel sind jedoch wegen ihrer hohen Dichte und inhomogenen Größenverteilung nur sehr schwer handhabbar. Die im letzten Projektabschnitt hauptsächlich verwendeten Aluminiumoxidpartikel sind hier überlegen und ähneln außerdem weitestgehend den durch Katalysatoren emittierten Partikeln.

In Abbildung 3 ist die dosisabhängige Zunahme an Pt-DNA-Addukten dargestellt.

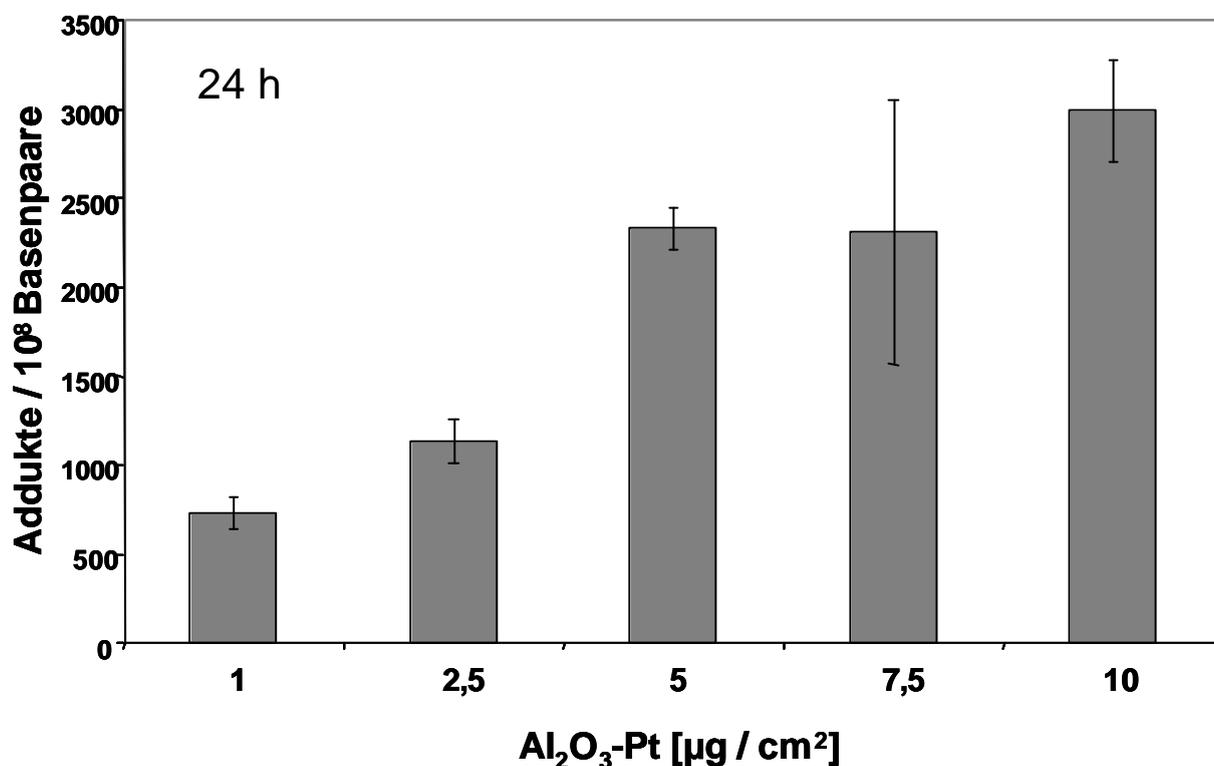


Abb. 3: Konzentrationsabhängige Bildung von Pt-DNA-Addukten: A549-Zellen wurden mit verschiedenen Mengen an $\text{Al}_2\text{O}_3 - \text{Pt} / \text{cm}^2$ Wachstumsfläche 24 h inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen, Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Um auszuschließen, dass die Adduktbildung auf einer Verschleppung der Partikel während der Aufarbeitung beruht, wurden Versuche zur Zeitabhängigkeit der Adduktbildung durchgeführt. Dabei wurde über unterschiedliche Zeiträume mit konstanter Partikelmenge inkubiert. Wie in Abbildung 4 erkennbar ist, besteht auch hier ein Zusammenhang zwischen Inkubationsdauer und der Adduktzahl.

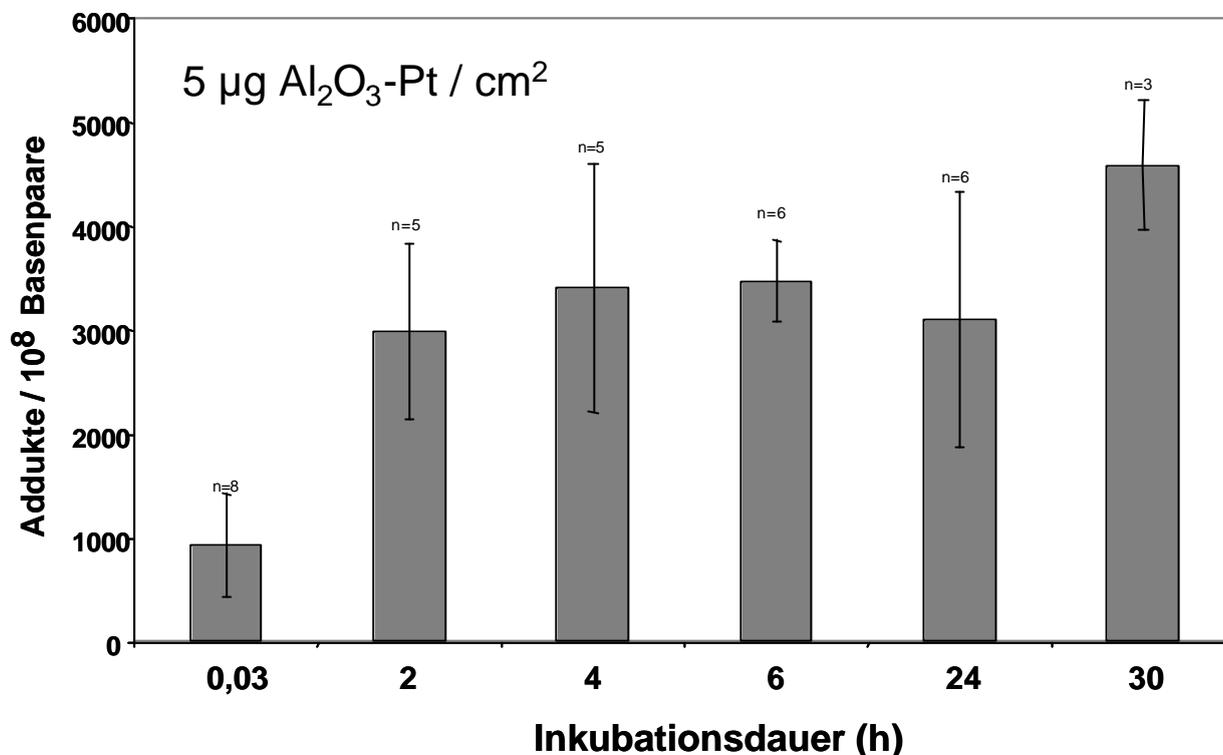


Abb. 4: Adduktbildungskinetik: A549-Zellen wurden mit einer konstanten Menge von $5 \mu\text{g Al}_2\text{O}_3 - \text{Pt / cm}^2$ Wachstumsfläche inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen, Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

3.6 Reversibilität der Metallbindung an DNA

Die experimentelle Durchführung dieser Versuche ist unter Punkt 2.6 beschrieben, die Ergebnisse sind in Abbildung 5 dargestellt. Zyanid und Thioharnstoff lassen die DNA intakt, entfernen jedoch die Platinaddukte teilweise, wobei Zyanid bei äquimolarer Menge die Addukte effektiver als Thioharnstoff ablöst. Die durch die Partikel induzierten Addukte sind etwas labiler gegenüber Zyanid aber etwas stabiler gegenüber Thioharnstoff verglichen mit den Addukten, die durch Cisplatin induziert werden; insgesamt lässt sich aber schlussfolgern, dass beide Platinverbindungen zu chemisch ähnlich stabilen DNA-Addukten führen.

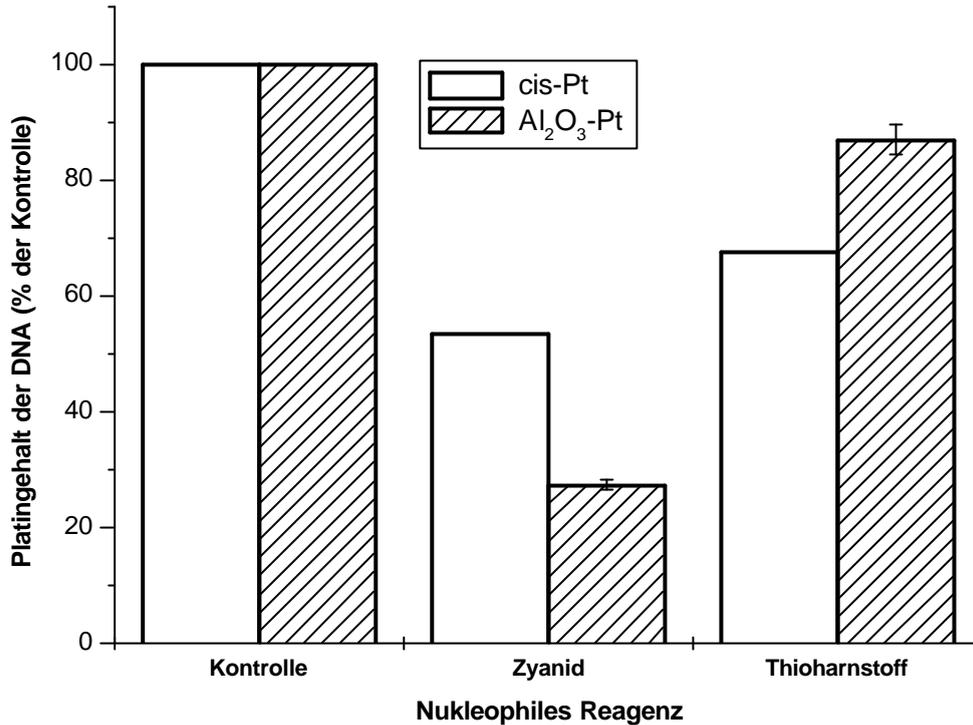


Abb. 5: Einfluss nukleophiler Reagentien auf die Persistenz von Pt-DNA-Addukten nach Inkubation von A549-Zellen mit Cisplatin oder Al₂O₃-Pt-Partikeln.

3.7 Intrazelluläre Proteinbindung nach Platin-Inkubation

Zusätzlich zur Pt-Bindung an zelluläre DNA soll die intrazelluläre Proteinbindung und diesbezügliche Verteilung von Pt untersucht werden. Es wurde zunächst mit gelöstem PtCl₄ inkubiert, um das System zu etablieren, anschließend wurde mit Partikeln gearbeitet. Dabei konnten Platin-Addukte an zellulären Proteinen nachgewiesen werden. Wie Abbildungen 6 und 7 zeigen, nimmt nach Inkubation mit gelöstem PtCl₄ die Zahl der Platin-Addukte an cytosolischen Proteinen mit zunehmender Inkubationszeit ab bzw. bleibt im Fall von Al₂O₃-Pt-Partikeln gleich, während der Pt-Gehalt der Kernproteine zunimmt. Dieser Befund deutet auf eine Anreicherung von Platin im Kern hin.

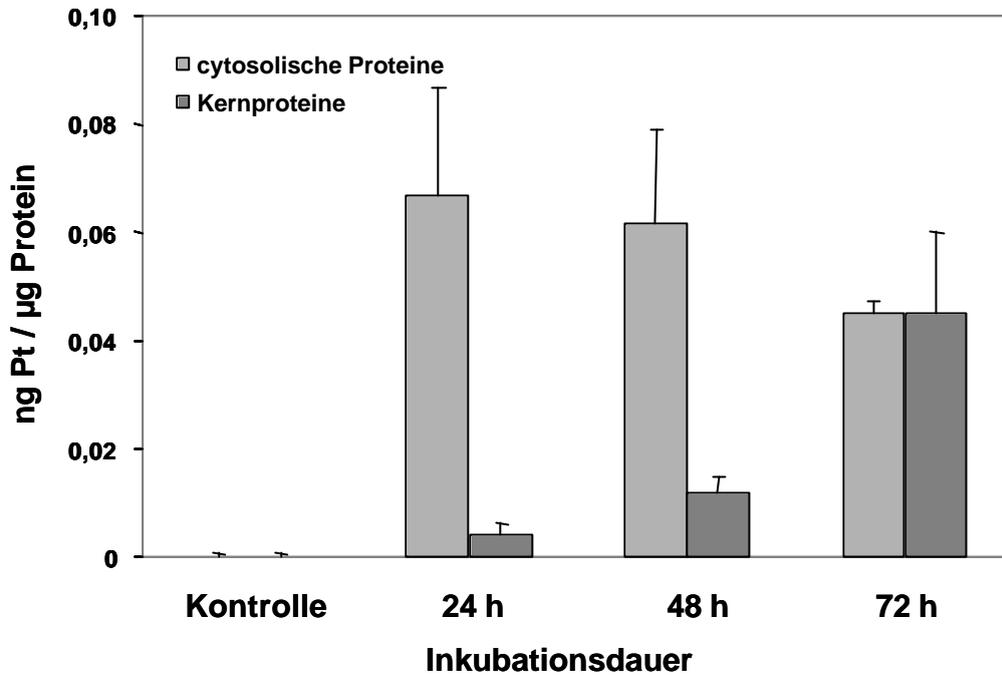


Abb. 6: Nachweis der Platinbindung an cytosolische Proteine und Kernproteine nach Inkubation von A549 – Zellen mit 67 µM PtCl₄ für 24, 48 und 72 h. Gezeigt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen, Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

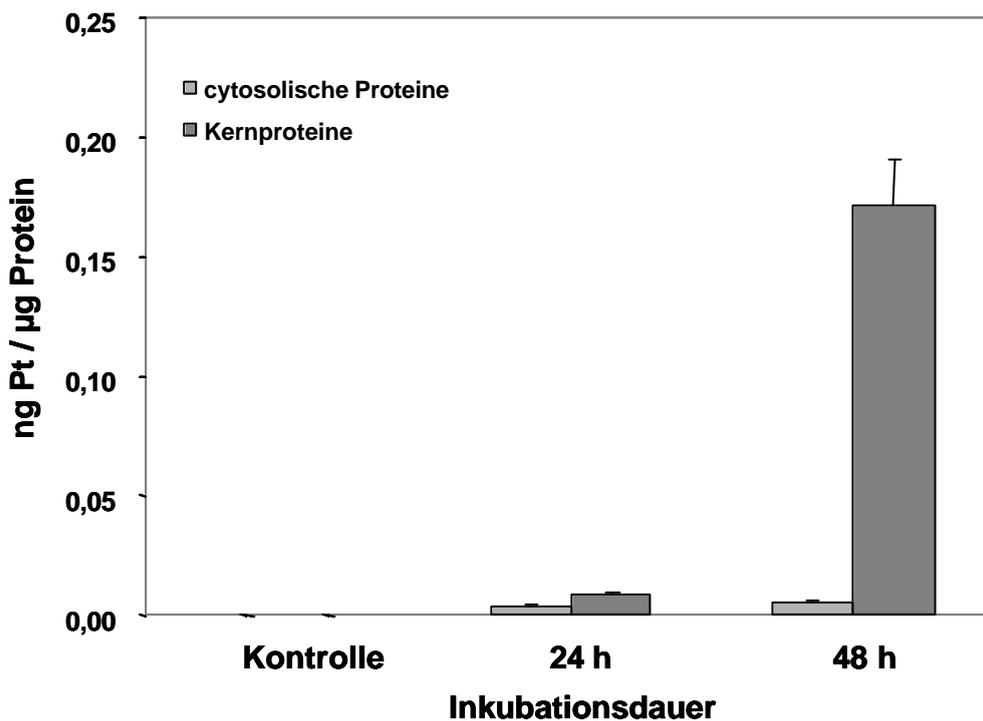


Abb. 7: Nachweis der Platinbindung an cytosolische Proteine und Kernproteine nach Inkubation von A549 – Zellen mit 3 µg/cm² Al₂O₃-Pt-Partikeln für 24 und 48 h. Gezeigt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen, Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

4 Zusammenfassende Bewertung und Ausblick

In den vorangegangenen Projektphasen wurde zunächst in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Stüben ein empfindliches System etabliert, mit dem der PGE-Gehalt von zellulärer DNA nach Exposition durch PGE-Partikel bestimmt werden kann. Anschließend wurde eine konzentrations- und zeitabhängige Bildung von DNA-Addukten durch reine Platin- und Palladiumpartikel nachgewiesen.

In diesem Berichtszeitraum wurden ähnliche Untersuchungen mit synthetischen platinbeschichteten Al_2O_3 -Pt-Partikeln durchgeführt, die den von Kfz emittierten Partikeln sehr stark ähneln. Obwohl sie nicht cytotoxisch sind, konnte analog zu den reinen Edelmetallpartikeln eine dosis- und zeitabhängige Zunahme Pt-DNA-Addukte nachgewiesen werden. Die Zeitabhängigkeit schließt Artefakte, beispielsweise nach Verschleppung von Partikeln während der Aufarbeitungsprozedur, aus. Bezogen auf den Pt-Gehalt werden bei gleicher Partikelmenge wesentlich mehr DNA-Addukte gebildet als bei reinen Pt-Partikeln, was auf eine erhöhte Bioverfügbarkeit hindeutet.

Durch Untersuchungen zur Reversibilität der Metall-DNA-Bindung durch nukleophile Agentien konnte gezeigt werden, dass die gebildeten Metalladdukte ähnlich stabil sind wie die Addukte, die nach Exposition gegenüber dem Cytostatikum Cisplatin entstehen.

Schließlich ergaben Versuche zur Pt-Proteinbindung mit zunächst wasserlöslichem PtCl_4 eine deutliche "Wanderung" des Platins in den Zellkern mit zunehmender Inkubationsdauer. In Kürze sollen entsprechende Untersuchungen mit den platinbeschichteten Al_2O_3 -Partikeln erfolgen. Darüber hinaus sind Versuche zur Löslichkeit der Partikel in unterschiedlichen Medien, zur Identifizierung der von der Pt-Bindung betroffenen DNA-Basen sowie zur resultierenden Mutagenität der Partikel geplant.

Referenzen

- Artelt, S., Creutzenberg, O., Kock, H., Levsen, K., Nachtigall, D., Heinrich, U., Rühle, T. and Schlegel, R. (1999) Bioavailability of fine dispersed platinum as emitted from automotive catalytic converters: a model study. *Sci. Total Environ.*, 228, 219 – 242.
- Cubelic, M., Peccoroni, R, Schäfer, J., Eckhardt, J.-D., Berner, Z. and Stüben, D. (1997) Verteilung verkehrsbedingter Edelmetallimmissionen im Straßenrandbereich. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung* 9 (5), 249 – 258.
- Fichtinger-Schepman, A. M., H. C. van Dijk-Knijenburg, et al. (1995). Effects of thiourea and ammonium bicarbonate on the formation and stability of bifunctional cisplatin-DNA adducts: consequences for the accurate quantification of adducts in (cellular) DNA. *J Inorg Biochem* 58(3): 177-91
- Hartmann, M. and A. Hartwig (1998) Disturbance of DNA damage recognition after UV-irradiation by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells. *Carcinogenesis* 19 (4), 617-621
- Lemaire, M. A., A. Schwartz, et al. (1991). Interstrand cross-links are preferentially formed at the d(GC) sites in the reaction between cis-diamminedichloroplatinum (II) and DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(5): 1982-5
- LfU (1999) Wirkungen von Emissionen des Kfz-Verkehrs auf die Pflanzen und die Umwelt. Literaturstudie
- Sambrook, Fritsch, Maniatis (1989) *Molecular cloning*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Wei, C. and Morrison, G.M. (1994) Platinum analysis and speciation in urban gullypots. *Analytica Chemica Acta*, 284, 587 – 592.

Danksagung

Unser besonderer Dank gilt Herrn Ralf Wottrich (FZK) für die Durchführung der Videomikroskopischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen, sowie Herrn PD Dr. Krug für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen.

Auch Herrn Axel Müller vom Institut für Werkstoffe der Elektrotechnik der Universität Karlsruhe gilt Dank für die Rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen.