

**Untersuchungen zum genotoxischen Potenzial
von partikulären Platingruppenelementen
in kultivierten Lungenzellen**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
der Universität Karlsruhe (TH)
angenommene

DISSERTATION

von
Diplom-Lebensmittelchemiker

Andreas Zeller

aus Horb am Neckar

Dekan: Prof. Dr. M. Kappes
Referent: Prof. Dr. A. Hartwig
Koreferent: Prof. Dr. J. Podlech

Tag der mündlichen Prüfung: 07.05.2004

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	7
1 Zusammenfassung	9
2 Einleitung	10
2.1 Gesundheitsbelastung durch Feinstäube in der Atemluft	10
2.2 Platinmetalle in Feinstaubpartikeln der Atemluft	11
2.3 Einsatz von Katalysatoren zur Abgasreinigung in Kraftfahrzeugen	12
2.4 Emission PGE-haltiger Partikel durch Abgaskatalysatoren	12
2.5 Bisher bekannte Toxizität der PGE	14
2.6 Schutzmechanismen des Körpers gegenüber Schwebstäuben in der Atemluft .	16
2.7 Endozytose	16
2.8 Mögliche Genotoxizität von inhalierten PGE-Partikeln	19
3 Zielsetzung der Arbeit	20
4 Material und Methoden	21
4.1 Zellkultur	21
4.1.1 Gewährleistung der Keimfreiheit	21
4.1.2 Charakteristika der verwendeten Zelllinien	21
4.1.3 Kulturbedingungen	21
4.2 Verwendete Partikel	22
4.2.1 Angegebene Partikeleigenschaften	22
4.2.2 Partikelcharakterisierung durch Rasterelektronenmikroskopie	22
4.3 Versuche zur Löslichkeit der Partikel	23
4.3.1 Direkte Bestimmung der Löslichkeit in Kulturmedium	23
4.3.2 Zellinkubation mit Zentrifugationsüberstand	23
4.3.3 Lösliche Vergleichssubstanzen	24
4.4 Eigenschaften der kultivierten Lungenzellen	24
4.5 Inkubation der Zellen mit den Partikeln	24

Inhaltsverzeichnis

4.6	Koloniebildungsfähigkeit	25
4.7	Internalisierung der Partikel	25
4.8	Bestimmung des PGE-Gehalts der zellulären DNA	26
4.8.1	Zellaufschluss und DNA-Extraktion	26
4.8.2	Photometrie und Veraschung der Proben	27
4.8.3	Bestimmung des Platinmetallgehalts der DNA	28
4.9	Bestimmung der chemischen Stabilität der Pt-DNA-Addukte	29
4.10	Nähere Charakterisierung des Bindungspartners der Pt-DNA-Addukte	29
4.11	DNA-Isolierung mit der QIAGEN-Methode	30
4.12	Intrazelluläre Verteilung von Platin	32
4.12.1	Proteinisolierung	32
4.12.2	Bestimmung der Proteinausbeute	32
4.12.3	Bestimmung des Metallgehalts der Proteinlösungen	33
4.13	HPRT-Genmutationstest	34
4.14	Mikrokerntest	34
5	Ergebnisse und Diskussion	36
5.1	Beschreibung der verwendeten Partikel	36
5.2	Rasterelektronenmikroskopische Charakterisierung	36
5.2.1	Reine Metallpartikel	37
5.2.2	Al ₂ O ₃ -Pt-Partikel	37
5.3	Partikellöslichkeit	38
5.4	Inkubation der Zellen mit den Prüfsubstanzen	40
5.5	Zytotoxizität	41
5.6	Internalisierung der Partikel	42
5.6.1	Lichtmikroskopie	42
5.6.2	Video-unterstützte Lichtmikroskopie	44
5.6.3	Transmissionselektronenmikroskopie	45
5.7	PGE-Gehalt von zellulärer DNA	46
5.7.1	DNA-Isolierung aus kultivierten Zellen	46
5.7.2	Bestimmung des PGE-Gehalts der Proben	47
5.7.3	Reine Pd- und Pt-Partikel	47
5.7.4	Al ₂ O ₃ -Pt-Modellpartikel	49
5.7.5	Gelöste Platinspezies	51

Inhaltsverzeichnis

5.8	Resistenz der Addukte gegenüber Zyanid	53
5.9	Bindungsort an der DNA	55
5.9.1	Chromatographisches System	56
5.9.2	Enzymatischer Verdau	57
5.9.3	Platinverteilungsmuster	59
5.10	DNA-Isolierung mit der QIAGEN-Methode	62
5.11	Intrazelluläre Verteilung des Platins	64
5.12	Mutagenität am <i>hprt</i> -Lokus	68
5.13	Chromosomale Schäden im Mikrokerntest	69
6	Schlussfolgerungen	72
6.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	72
6.2	Risikoabschätzung	74
6.3	Ausblick	75
7	Literatur	76
8	Anhang	89
8.1	Liste der verwendeten Chemikalien	89
8.2	Liste der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien	90
8.3	Verwendete Lösungen und Puffer	92
8.4	Veröffentlichungen	95
9	Lebenslauf	100

Abbildungsverzeichnis

1	Aufbau eines Abgaskatalysators	13
2	Strukturformeln Cis- und Transplatin	15
3	Skizze: Ablauf der Phagozytose	18
4	Fließdiagramm der beschriebenen Methoden	31
5	REM-Aufnahmen der reinen Metallpartikel	37
6	REM-Aufnahmen der Al ₂ O ₃ -Pt-Partikel	38
7	Zytotoxizitätstests	41
8	Detailansicht von endozytierten Metall-Partikeln	42
9	konfluenter Zellmonolayer mit Partikeln	43
10	Subkonfluente Zellen mit Partikeln	44
11	TEM-Aufnahmen von Ultradünnschnitten durch Zellpräparate	45
12	Reine Metallpartikel: DNA-Adduktbildung	48
13	Al ₂ O ₃ -Pt-Partikel: Konzentrationsabhängige DNA-Adduktbildung	49
14	Al ₂ O ₃ -Pt-Partikel: Zeitabhängige DNA-Adduktbildung	50
15	DNA-Addukte nach Inkubation mit gelöstem Platin	52
16	Resistenz der DNA-Addukte gegenüber Zyanidionen	54
17	DNA: Beispielchromatogramme	57
18	Pt-Gehalt der HPLC-Fraktionen nach Verdau von A549-DNA / Al ₂ O ₃ -Pt- Partikel	61
19	Pt-Gehalt der HPLC-Fraktionen nach Verdau von Kalbsthymus-DNA / Cisplatin	61
20	Nukleosidzusammensetzung der mit QIAGEN-System isolierten DNA	63
21	Pt-Addukte an der mit QIAGEN-System isolierten DNA	63
22	Intrazelluläre Verteilung nach Inkubation mit Al ₂ O ₃ -Pt-Partikeln	65
23	Intrazelluläre Verteilung nach Inkubation mit gelöstem PtCl ₄	66
24	Mikrokerninduktion	70

Hinweis: Die Datei "ZellerVideoMikroskopie.avi" kann vom Internet-Server der Universitätsbibliothek Karlsruhe heruntergeladen werden. Sie gehört zur vorliegenden Dissertation.

Tabellenverzeichnis

1	Literaturangaben zu Cisplatinaddukten in Patientengewebe	16
2	Temperaturprogramm der AAS-Messungen	33
3	Löslichkeit der Partikel in Zellkulturmedium	39
4	Chromatographische Daten der Standardsubstanzen	56
5	Chromatographische Daten der Nukleoside aus dem DNA-Verdau	58
6	Ergebnisse des HPRT-Tests	69
7	Ergebnisse des Mikrokern-Tests	70

Abkürzungsverzeichnis

ATCC	American Tissue and Cell Collection
BSA	Rinderserumalbumin
Cisplatin	<i>cis</i> -Diammindichloroplatin(II)
dA	Desoxyadenosin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dC	Desoxycytidin
dG	Desoxyguanosin
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dT	Desoxythymidin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzymimmunoassay
ET-AAS	Atomabsorptionsspektroskopie mit elektrothermalen Ionisierung
FKS	Fötale Kälberserum
GSH	Glutathion
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppelter Plasma-Ionisierung
MOPS	3-Morpholino-1-propansulfonsäure
MT	Metallothionein
NMR	Kernmagnetische Resonanzspektroskopie
NQO	4-Nitrochinolin-N-oxid
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PGE	Platingruppenelemente
PM ₁₀	Feinstaub mit aerodynamischem Partikeldurchmesser $\leq 10 \mu\text{m}$
PM _{2,5}	Feinstaub mit aerodynamischem Partikeldurchmesser $\leq 2,5 \mu\text{m}$
rA	Adenosin
rC	Cytidin
REM	Rasterelektronenmikroskopie
rG	Guanosin
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RP	Umkehrphase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion

Abkürzungsverzeichnis

rU	Uridin
SD	Standardabweichung
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TSP	Gesamtstaubmenge

1 Zusammenfassung

Die zur Abgasreinigung in Kraftfahrzeugen eingesetzten Katalysatoren stoßen bei normalem Betrieb lungengängige Partikel aus, welche die Platingruppenelemente (PGE) Platin, Palladium und Rhodium enthalten. Die PGE scheinen auf den ersten Blick wegen ihrer chemischen Inertheit keine Bedrohung für die menschliche Gesundheit darzustellen. Untersuchungen mit Pt-haltigen Modellpartikeln, die den aus Abgaskatalysatoren emittierten ähneln, zeigen jedoch im Tierversuch eine überraschend hohe Bioverfügbarkeit von Platin aus diesen Partikeln.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit verschiedenen Mikroskopieverfahren nachgewiesen, dass kultivierte menschliche Lungenzellen PGE-haltige Feinstpartikel aufnehmen können. Anschließend kommt es zur Zunahme des Pt-Gehalts einer subzellulären Proteinfraction sowie zur Bildung von Addukten an zellulärer DNA.

Mit speziellen Katalysator-Modellpartikeln konnten ausführlichere Untersuchungen durchgeführt werden. Dabei wurde gezeigt, dass die entstandenen Addukte in ihren chemischen Eigenschaften teilweise den durch das platinhaltige Zytostatikum *cis*-Diammindichloroplatin(II) (Cisplatin) hervorgerufenen ähneln. Ihre Resistenz gegenüber dem Nukleophil CN^- ist jedoch deutlich geringer ausgeprägt als beim Cisplatin. Außerdem haben die aus der Partikelexposition resultierenden Addukte keine durch den HPRT-Test oder den Mikrokerntest nachweisbare mutagene, klastogene oder zytotoxische Wirkung.

Abschließend kann von einem genotoxischen Potenzial der untersuchten Substanzen gesprochen werden. Für präzisere Angaben, insbesondere eine quantitative Risikoabschätzung, müssen jedoch weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

2 Einleitung

2.1 Gesundheitsbelastung durch Feinstäube in der Atemluft

Bereits 1556 beschrieb Georgius Agricola in seiner Abhandlung *De Re Metallica*, dass Bergleute die dem Staub bestimmter Minen ausgesetzt sind, ein erhöhtes Risiko für verschiedene Krankheiten wie Auszehrung haben (Guthrie, 1997).

Epidemiologische Studien verbinden heute Luftverschmutzung durch Feinstäube mit einem erhöhten Risiko für Erkrankungen der Atmungsorgane, wie Lungenkrebs, und des Herz-Kreislauf-Systems (Abbey *et al.*, 1999). Speziell Schwebstäube mit einem Partikeldurchmesser unter $2,5 \mu\text{m}$ tragen zur Steigerung der Häufigkeit solcher Krankheiten bei. So steigt die Lungenkrebsinzidenz um 8 %, wenn $\text{PM}_{2,5}$ (particulate matter $\leq 2,5 \mu\text{m}$) um $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ zunimmt (Pope *et al.*, 2002). Die Gesamtstaubmenge TSP (total suspended particles) lässt sich nach dem aerodynamischen Durchmesser der Staubpartikel unterteilen. Dieser ist definiert als Durchmesser einer Kugel mit Dichte $1 \text{ g}/\text{cm}^3$, welche die gleiche Endsedimentationsgeschwindigkeit wie das untersuchte Partikel aufweist (Smith *et al.*, 1998). Die Einteilung erfolgt in grobe ($100 - 2,5 \mu\text{m}$), feine ($2,5 - 0,1 \mu\text{m}$) und ultrafeine ($\leq 0,1 \mu\text{m}$) Fraktionen (Krug, 2003). Durch die Luftmessstationen werden üblicherweise TSP und PM_{10} (particulate matter $\leq 10 \mu\text{m}$), manchmal auch $\text{PM}_{2,5}$ als Massenkonzentration erfasst (Diabaté *et al.*, 2002). Man geht davon aus, dass PM_{10} bis in die Bronchien vordringen kann, $\text{PM}_{2,5}$ sogar bis in die Alveolen (Valentine und Kennedy, 2001). Die Partikel können dann ihre Schadwirkung entweder direkt an dieser Stelle entfalten, oder nach Translokation, z.B. über das lymphatische System, auch andernorts. Der intraneuronale Transport von Partikeln ins Gehirn ist ursächlich mit Demenzerkrankungen verbunden (Schwartz und Utell, 2002; Calderon-Garciduenas *et al.*, 2003). Auch eine systemische Wirkung von eingeatmeten Partikeln wird diskutiert (Zanobetti *et al.*, 2000; Laden *et al.*, 2000; Nemmar *et al.*, 2002; Oberdörster *et al.*, 2002).

In den letzten Jahren konnte die TSP-Menge durch den Einsatz von Abgasfiltern und verbesserten Verbrennungsverfahren deutlich gesenkt werden. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass insbesondere die feinen Partikel mit ihrem großen Verhältnis von Oberfläche zu Masse für die schädlichen Wirkungen der Stäube verantwortlich sind. Ihre Zahl, gemessen als Teilchenkonzentration (N / m^3), nahm in den vergangenen Jahren sogar zu (Pitz *et al.*, 2001).

2.2 Platinmetalle in Feinstaubpartikeln der Atemluft

Nach welchem Mechanismus die Feinstäube ihre toxischen Effekte ausüben, ist noch weitgehend ungeklärt. So werden unter anderem die Oberflächeneigenschaften der Partikel, ihr Gehalt an Übergangsmetallen oder polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, sowie ein Endotoxingehalt für die Toxizität verantwortlich gemacht (Jimenez *et al.*, 2000; Laden *et al.*, 2000; Don Porto Carero *et al.*, 2001). Doch gilt es auch einen weiteren Faktor in Betracht zu ziehen, nämlich **Platingruppenelemente (PGE)**, die in atembaren Feinstäuben enthalten sind. Eine Quelle für solche Partikel sind Abgaskatalysatoren in Kraftfahrzeugen. Diese senken den Schadstoffausstoß, allerdings werden durch sie auch bis zu mehreren hundert Nanogramm PGE-haltige Partikel pro Kilometer Fahrtstrecke emittiert. Diese mikrometergroßen Teilchen bestehen hauptsächlich aus Aluminiumoxid (Al_2O_3)-Partikeln, auf deren Oberfläche sich nanometergroße PGE-Kristalle befinden (Nachtigall *et al.*, 1996). Bedingt durch den Dispersionsgrad dieser extrem kleinen Partikel werden die normalerweise reaktionsträgen Platinmetalle verstärkt korrodiert.

In Inhalationsversuchen mit Ratten war das Pt aus Modellpartikeln, die den tatsächlich emittierten sehr stark ähneln, bis zu 30 % bioverfügbar und reicherte sich in verschiedenen Organen wie Leber, Niere und Knochen an. Auch eine Bindung des Platins an Makromoleküle konnte so nachgewiesen werden, sie wurde jedoch nur grob spezifiziert (Artelt *et al.*, 1999).

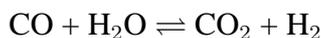
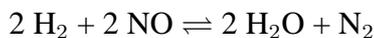
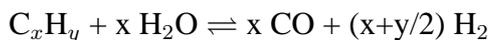
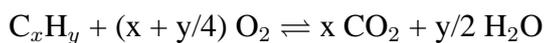
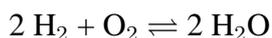
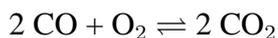
In Untersuchungen zur Kanzerogenität riefen partikuläre Nickelverbindungen viel stärkere Effekte als die gelösten Formen hervor. Deshalb wird vermutet, dass nach Exposition von Zellen gegenüber den partikulären Nickelverbindungen die Ni-Konzentration in intrazellulären Vakuolen sehr hoch sein kann, es wird über den *molaren* Bereich diskutiert (Abbraccio *et al.*, 1982). Für Platinmetalle wäre eine ähnliche Anreicherung, gefolgt von einer DNA-Bindung, denkbar. Die nach der Pearson-Theorie weichen Metalle, zu denen auch Pt und Pd zählen, können an DNA binden und so toxisch wirken (Clarke *et al.*, 1999; McLaughlin *et al.*, 1990; Reedijk, 1987; Tselepi-Kalouli und Katsaros, 1990; Hollemann und Wiberg, 1995).

Die Löslichkeit von hoch dispersen Platinmetallen ist im Vergleich zu kompaktem Material um ein Vielfaches erhöht, speziell in Verbindung mit gelöstem Chlorid und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), wie sie auch intrazellulär vorkommen (s.u.).

Es besteht also grundsätzlich die Möglichkeit, dass PGE-haltige Partikel von Lungenzellen aufgenommen werden und es in Folge dessen zur Bildung von toxischen und mutagenen Adukten an DNA kommt.

2.3 Einsatz von Katalysatoren zur Abgasreinigung in Kraftfahrzeugen

Beim Betrieb von Verbrennungsmotoren entsteht eine Reihe von Schadstoffen. Seit der Einführung des Abgaskatalysators in Europa 1985 konnte der Ausstoß von Stickoxiden, Kohlenstoffmonoxid und unverbrannten Kohlenwasserstoffen entscheidend gesenkt werden. Weltweit besitzen jetzt über 85 % der Neuwagen einen Katalysator (Bosteels und Searles, 2002). Er besteht üblicherweise aus einem monolithischen Cordierit-Träger in Wabenform ($2\text{MgO} \cdot 2\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{SiO}_2$), auf den ein "Washcoat" aus γ -Aluminiumoxid aufgebracht ist (Abb. 1). Dieser Washcoat ist mit PGE (zirka 0,1 % w/w) und Seltenerdmetallen dotiert. Die am häufigsten verwendeten PGE sind Platin, Palladium und Rhodium. Sie katalysieren den Abbau der oben genannten Hauptschadstoffe in ungiftigere Substanzen. Dabei laufen mindestens 60 Einzelreaktionen ab, die sich wie folgt zusammenfassen lassen (Zereini und Alt, 2000):



2.4 Emission PGE-haltiger Partikel durch Abgaskatalysatoren

Durch die thermische (bis zu 900 °C) und strömungsmechanische Belastung sowie durch fahrtbedingte Vibrationen werden aus Kfz-Katalysatoren je nach Fahrweise und Katalysatorbauart (Monolith oder veralteter Pellet-Typ) unterschiedliche Mengen an PGE-haltigen Partikeln freigesetzt (Palacios *et al.*, 2000). Vergleicht man Daten aus Motorteststandversuchen mit den in der Umwelt tatsächlich gefundenen PGE-Konzentrationen, so differieren sie um Größenordnungen voneinander. Im tatsächlichen Straßenverkehr wird offensichtlich ein Vielfaches der aus Motorteststandversuchen zu erwartenden Menge freigesetzt, da viele Automotoren schlecht eingestellt und gewartet sind (Moldovan *et al.*, 2002). So berichtet Helmers von bis zu 10 µg Pt-Ausstoß pro gefahrenem Kilometer, während König lediglich eine Emis-

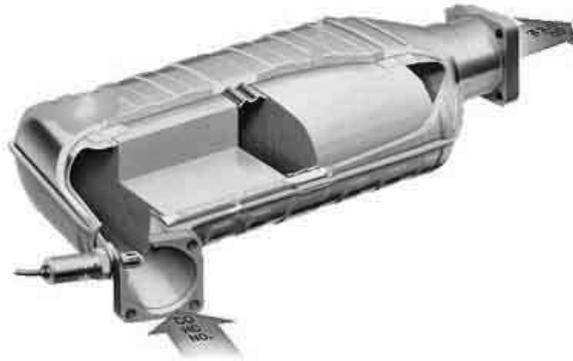


Abb. 1: Schnittbild eines modernen Abgaskatalysators. Erkennbar sind die Lambdasonde und die beiden Monolithen. Quelle: Eberspächer GmbH.

sion von zirka $0,1 \mu\text{g}/\text{km}$ messen konnte (Zereini und Alt, 2000). Realistisch dürften neuesten Angaben zufolge im Mittel zirka 9 bis $124 \text{ ng}/\text{km}$ freigesetzte PGE sein (Ravindra *et al.*, 2004). Die zunehmende Verwendung von speziellen Diesel-Katalysatoren wird aber den PGE-Ausstoß weiter steigern (Moldovan *et al.*, 2002).

Der Hauptanteil der Partikel besitzt einen aerodynamischen Durchmesser $\leq 15 \mu\text{m}$. So sind 11 – 36 % der Partikel kleiner als $3,14 \mu\text{m}$, 6 % sogar kleiner als $0,3 \mu\text{m}$ (Artelt *et al.*, 1999; Hill und Mayer, 1977). Auch Spurny (1998) berichtet, dass insbesondere die $\text{PM}_{2,5}$ -Fraktion Pt und Pd enthält. Platin liegt in den Partikeln überwiegend elementar vor, zirka 1 % aber oxidiert, vermutlich als Pt^{4+} (Schlögl *et al.*, 1987).

Die meisten Katalysatoren enthalten Pt und Rh im Verhältnis 5:1, und dieser Pt / Rh-Wert wird auch entlang von Straßen wiedergefunden. Das ist ein starker Hinweis auf einen ursächlichen Zusammenhang (Gomez *et al.*, 2002). Jährlich werden in Deutschland auf diese Weise etwa 200 kg PGE emittiert. Für die kommenden Jahre wird eine weitere Zunahme, insbesondere für Palladium, angenommen (Ravindra *et al.*, 2004).

Die Platinmetalle reichern sich in der Umgebung von Hauptverkehrswegen an. So enthält der Straßenstaub an Verkehrsknotenpunkten bis zu über $1000 \mu\text{g}/\text{kg}$ PGE (Ravindra *et al.*, 2004). Die Pt-Konzentration im Erz aus Platinbergwerken ist teilweise nur drei- bis zehnmal so hoch, und es gibt bereits Überlegungen für eine wirtschaftliche Nutzung dieser Ressourcen (Ely *et al.*, 2001).

Offensichtlich verändern sich die "inerten" Eigenschaften der PGE wenn sie in feinstver-

teilter Form vorliegen, denn ein Teil der Katalysator-bürtigen PGE im Straßenstaub ist sehr mobil und wird bereits durch Regenwasser gelöst (Stüben *et al.*, 2003). Die resultierenden Spezies werden von natürlichen Komplexbildnern wie Huminstoffen im Boden gebunden und von Pflanzen und Tieren aufgenommen; sie können so in Lebensmittel gelangen (Eckhardt und Schäfer, 1999; Zimmermann *et al.*, 2002).

Die Luftbelastung mit PGE ist extrem schwierig zu messen und die Literaturangaben unterliegen dementsprechend starken Schwankungen. Fernab der Straßen werden Werte von $0,02 \text{ pg/m}^3$ Pt gemessen, die in Verkehrsnähe auf bis zu 30 pg/m^3 ansteigen (Zereini und Alt, 2000).

Auch Menschen sind nachweisbar betroffen. Im Urin von verkehrsbelasteten italienischen Schulkindern wurden erhöhte Konzentrationen an Pd und Rh gefunden (Caroli *et al.*, 2001) und auch im Blut der australischen Bevölkerung ließen sich $0,6 \text{ ng/l}$ Pt nachweisen (Nygren *et al.*, 1990).

Außer durch PGE in Atemluft und Lebensmitteln sind Menschen durch weitere Quellen belastet. Hierzu gehören Zytostatika, wobei die Belastung entweder direkt als Patient oder durch Klinikabwasser auftritt (Kümmerer *et al.*, 1999). Auch PGE-haltige Dentallegierungen (Bege-row *et al.*, 1999) und Pt-Rückstände in Silikon-Brustimplantaten sind verantwortlich. Im Fall der Implantate wird Pt als Katalysator bei der Silikonherstellung verwendet und diffundiert in das umgebende Fettgewebe (Lykissa *et al.*, 1997; Flassbeck *et al.*, 2003). Hinzu kommen Expositionen von Beschäftigten in der PGE-verarbeitenden Industrie (Farago *et al.*, 1998).

2.5 Bisher bekannte Toxizität der PGE

Über die Toxizität der PGE ist vergleichsweise wenig bekannt. Die Elemente gelten als weitgehend ungiftig, allerdings gibt es einige stark toxische Verbindungen wie OsO_4 (Marquardt und Schäfer, 1997). Des Weiteren haben besonders Halogenverbindungen von Pt und Pd ein allergenes Potenzial (Kielhorn *et al.*, 2002; Farago *et al.*, 1998). Die am besten erforschte Gruppe der PGE-Verbindungen sind die Pt-Zytostatika. Ihre Wirkung wurde 1962 zufällig entdeckt (Rosenberg *et al.*, 1965). Sie bilden auch heute noch die Grundlage der Chemotherapie einer Reihe von Krebsarten. So ist die über 90 %ige Heilungsrate von rechtzeitig erkanntem Hodenkrebs dem Einsatz von Cisplatin zu verdanken (Lempers und Reedijk, 1991).

Der Wirkungsmechanismus der Pt-Zytostatika konnte hauptsächlich durch Arbeiten der Gruppen von Lippard, Eastman und Reedijk sehr genau aufgeklärt werden. Cisplatin (Abb. 2) ist

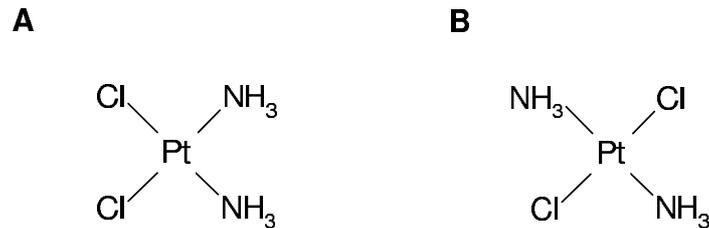


Abb. 2: Strukturformel von Cisplatin (A) und Transplatin (B).

ungeladen und im Serum ($[\text{Cl}^-] \simeq 100 \text{ mM}$) relativ stabil. Nach Diffusion in das Zellinnere ($[\text{Cl}^-] \simeq 4 \text{ mM}$) wird sehr schnell ein Chloro-Ligand gegen Wasser ausgetauscht, und das instabile Produkt reagiert mit nukleophilen Positionen von zellulären Molekülen, z. B. den freien Elektronenpaaren der exozyklischen Stickstoffatome von DNA-Purinbasen zu einem sogenannten Mono-Addukt. In einem zweiten, langsameren Schritt wird eine weitere kovalente Bindung zwischen Pt und einem nukleophilen Zentrum in unmittelbarer Nähe geknüpft, wodurch sich ein verbrückendes Addukt bildet. Es entsteht eine ganze Reihe von Pt-Addukten, z. B. sogenannte Interstrangaddukte zwischen verschiedenen DNA-Strängen sowie Protein-DNA-Verknüpfungen. Die quantitativ wichtigsten Addukte sind die Intrastrangaddukte zwischen direkt benachbarten Guanin-Basen, bzw. Guanin-Adenin oder Guanin-X-Adenin, wobei X eine beliebige Base ist. Die Pt-DNA-Addukte haben eine zytotoxische und mutagene Wirkung durch Verzerrung der DNA-Geometrie und daraus resultierender Hemmung von DNA-prozessierenden Enzymen (Jamieson und Lippard, 1999). Die Stereochemie der Pt-Spezies spielt dabei eine entscheidende Rolle. Das Stereoisomer trans-Platin (Abb. 2) bindet zwar ebenfalls kovalent an DNA, ist aber klinisch nicht antineoplastisch wirksam (Heiger-Bernays *et al.*, 1990; Johnson, 1982).

Bei Untersuchungen der DNA aus Patientenproben wie Leukozyten oder Tumorgewebe fällt auf, dass der Pt-Gehalt von isolierter DNA einer enormen Schwankungsbreite unterliegt: Tab. 1 zeigt dazu eine Übersicht der Literaturdaten.

Mögliche Erklärungen für die breite Streuung der Werte sowohl zwischen als auch innerhalb einzelner Untersuchungen könnten ein inhomogenes Patientenkollektiv, verschiedene Therapie-Abläufe und die unterschiedlichen Messmethoden sein. Ob der Behandlungserfolg mit den beim einzelnen Patienten erreichten Adduktzahlen zusammenhängt, ist Gegenstand kontroverser Diskussion (vgl. in der Tabelle genannte Literatur).

Tabelle 1: Übersicht der Literaturangaben zur Zahl der Platin-Addukte während / nach Chemotherapie mit Pt-Zytostatika. Dargestellt sind jeweils minimale und maximale Mittelwerte der gemessenen Adduktzahlen in den in der Literatur angegebenen Einheiten sowie umgerechnet auf Addukte / 10^8 Basenpaare. Leuz. = Leukozyten, Biop. = Biopsie von Tumorgewebe.

Autor	min	max	verwendete Maßeinheit	min Pt/ 10^8 Bp	max Pt/ 10^8 Bp	Herkunft	Methode
Knox <i>et al.</i> (1986)	2,2	28,8	nmol/g DNA	145	1901	Biop.	AAS
Bonetti <i>et al.</i> (1996)	1,91	2,61	fmol/ μ g DNA	126	172	Leuz.	ICP-MS
Kloft <i>et al.</i> (1999)	$1/10^5$	$12/10^5$	Pt/Nukleotid	500	6000	Leuz.	AAS
Parker <i>et al.</i> (1991)	4,5	536,1	fmol/ μ g DNA	297	35383	Leuz.	AAS
Reed <i>et al.</i> (1987)	0	ca. 390	amol/ μ g DNA	0	26	Leuz.	ELISA
Poirier <i>et al.</i> (1992)	80	632	amol/ μ g DNA	5	42	Biop.	ELISA
Reed <i>et al.</i> (1988)	3,3	34	Pt/ 10^6 Basen	165	1700	Biop.	AAS
Motzer <i>et al.</i> (1994)	0	39,11	fmol/ μ g DNA	0	2581	Leuz.	AAS
Motzer <i>et al.</i> (1994)	0	74,2	amol/ μ g DNA	0	5	Leuz.	ELISA

2.6 Schutzmechanismen des Körpers gegenüber Schwebstäuben in der Atemluft

Die Lunge ist eines der größten Organe. Über ihre Oberfläche von mehr als 100 m^2 werden täglich bis zu $20\,000 \text{ l}$ Luft ausgetauscht. Der menschliche Körper verfügt daher über eine Reihe effizienter Abwehrmaßnahmen gegen Feinstäube. So wird die Atemluft auf ihrem Weg durch Nase, Rachen und Bronchien in die Lunge an Schleimhäuten vorbeigeführt, die mit Flimmerhärchen (Zilien) besetzt sind. Schädliche Partikel schlagen sich zum Großteil in dem zähen Schleim (Mucus) nieder und werden durch die Bewegung der Zilien aus dem Respirationstrakt abtransportiert (mukoziliäre Clearance). In den Alveolen fehlt dieser Schutz, weil durch deren dünne Wände der Gasaustausch stattfindet. Die Partikel werden in der dünnen, niedrigviskosen Flüssigkeitsschicht (Surfactant) deponiert, die die Alveolen auskleidet (Gehr und Heyder, 2000).

2.7 Endozytose

Im Surfactant nehmen spezielle Fress-Zellen, die Alveolarmakrophagen, eingedrungene Partikel auf. Sie können in kürzester Zeit ein Mehrfaches ihrer Zelloberfläche phagozytieren (Berman und Low, 1983). Die körpereigene Abwehr ist jedoch nicht perfekt. Übrig gebliebene

2 Einleitung

Partikel können von den Alveolarepithelzellen endozytiert werden. So hat Churg (1996) in autopsiertem Lungengewebe aus der gering belasteten Normalbevölkerung bis zu 10^7 Partikel/g Gewebe (Trockengewicht) nachgewiesen.

Da in der Literatur keine einheitliche Nomenklatur existiert, sollen an dieser Stelle zunächst die in dieser Arbeit verwendeten Begriffe für die Partikelaufnahme definiert werden. So soll "Phagozytose" für die Partikelaufnahme ins Innere von spezialisierten, professionellen Fresszellen wie Makrophagen oder polymorphkernigen Leukozyten stehen. "Endozytose" dagegen wird verwendet, wenn "nichtprofessionelle Phagozytierer", also fakultativ partikelaufnehmende Zellen, wie die hier untersuchten A549-Epithelzellen oder auch Fibroblasten gemeint sind (Couzinet *et al.*, 2000). Die bei praktisch allen Säugerzellen konstitutiv ablaufende Pinozytose (Steinman *et al.*, 1983) dient dem Austausch kleiner Flüssigkeitsvolumina, möglicherweise können auf diese Weise aber auch Partikel ≤ 200 nm unspezifisch in die Zelle eindringen (Pratten und Lloyd, 1986; Ryser *et al.*, 1982).

Generell läuft die Phagozytose wie in Abb. 3 gezeigt ab. Partikel kommen mit der Außenseite der Zellen in Kontakt. Entweder Rezeptor-vermittelt oder unspezifisch wird daraufhin im Zellinneren ein Reiz ausgelöst, der die Zellmembran eine Einbuchtung ("Pit") bilden lässt. Nach dem sogenannten "Zipper"- Mechanismus wird dann das Partikel von Pseudopodien umgeben und befindet sich anschließend in einem primären Phagosom. Dies geschieht innerhalb von Sekunden bis Minuten.

Der pH-Wert im primären Phagosom wird auf Werte zwischen 4,6 und 6,1 abgesenkt (Tycko und Maxfield, 1982), bevor sich Lysosomen anlagern, die lytische Enzyme in das Phagosom freisetzen. Es entsteht ein sekundäres Phagosom, auch Phagolysosom genannt. Außerdem werden von der Zelle reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet. Vermutlich dienen die Ansäuerung und die ROS-Synthese ursprünglich der Abwehr von in die Zelle eingedrungenen Mikroben und Parasiten, sie könnten aber auch eine Rolle bei der Solubilisierung von PGE aus endozytierten Partikeln spielen (Silverstein *et al.*, 1977; Geisow und Evans, 1984; Marsh *et al.*, 1983). Die sekundären Phagosomen werden schließlich entlang des Zytoskeletts in Kernnähe transportiert, dies geschieht häufig in "sprunghaften" Bewegungen (Dickson *et al.*, 1983; Evans *et al.*, 1982).

Der genaue Mechanismus der Endozytose bei der etablierten und in dieser Arbeit verwendeten Zelllinie A549 und auch bei anderen Epithelzellen ist bemerkenswert unerforscht, er könnte jedoch ähnlich wie der oben beschriebene Phagozytosemechanismus ablaufen (Stearns *et al.*,

2001; Foster *et al.*, 2001; Stringer *et al.*, 1996). Die Synthese von ROS in nichtprofessionellen Phagozytieren, nämlich Typ II-Lungenepithelzellen der Ratte, konnte dagegen bereits nachgewiesen werden (Kinnula *et al.*, 1991).

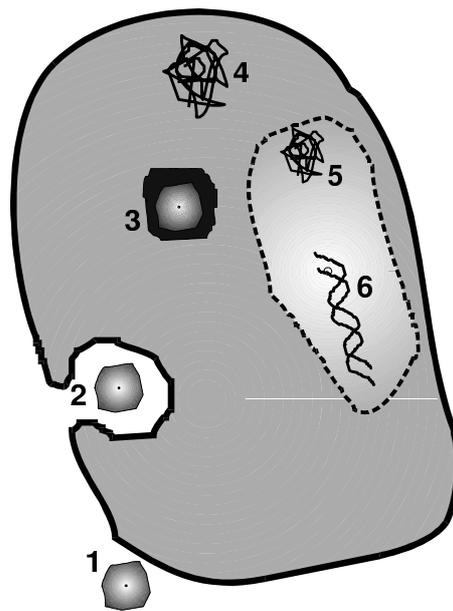


Abb. 3: Vereinfachte Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Phagozytose. Partikel kommen mit der Zellmembran in Kontakt (1), werden von der Zelle aufgenommen (2) und in spezielle Kompartimente (3) eingeschlossen. Dort findet möglicherweise ein Aktivierungsprozess durch Säure / ROS statt, infolgedessen zytosolische (4) und nukleäre Proteine (5) sowie DNA (6) in Kontakt mit gelösten Metallspezies kommen.

2.8 Mögliche Genotoxizität von inhalierten PGE-Partikeln

Die Aufnahme und darauf folgende Solubilisierung von PGE aus Feinstaubteilchen innerhalb von Zellen nach den oben dargestellten Mechanismen erscheint möglich. Weiter ist vorstellbar, dass auf diese Weise gelöste PGE-Spezies an zelluläre DNA binden und genotoxische Effekte ausüben.

In den aus der Literatur bekannten Abschätzungen des durch PGE-Partikelinhalation auftretenden Gesundheitsrisikos fehlt dieser Aspekt aber völlig. Es wurden lediglich toxikologische Daten zum sensibilisierenden Potenzial von löslichen Platin-Halogenverbindungen extrapoliert (Gomez *et al.*, 2002; Zereini und Alt, 2000).

In Tierversuchen wurde jedoch eine 30 %ige Bioverfügbarkeit von Pt aus inhalierten Partikeln sowie eine Bindung an zelluläre Makromoleküle nachgewiesen (Artelt *et al.*, 1999). Dabei wurde spekuliert, dass es sich bei diesen Makromolekülen um Proteine handelt. Eine mögliche DNA-Bindung wurde dagegen bisher nicht überprüft und es gibt auch keine weiteren systematischen Untersuchungen zur genotoxischen Wirkung von partikulären Platingruppenelementen in der Literatur. Aus der hohen Affinität von PGE zu DNA-Bestandteilen muss aber geschlossen werden, dass DNA ein bevorzugtes Ziel der Schadwirkung von PGE darstellt.

Partikuläre PGE treten verkehrsnah in hohen Konzentrationen auf. Für eine zuverlässigere Beurteilung des Risikos für die Bevölkerung sind Untersuchungen zu ihrem genotoxischen Potenzial daher dringend nötig.

3 Zielsetzung der Arbeit

Die Belastung der Umwelt mit PGE-haltigen Partikeln aus Abgaskatalysatoren nimmt zu. Diese Partikel können teilweise vom Menschen eingeatmet werden. So besteht ein positiver Zusammenhang zwischen der Verkehrsbelastung und dem Auftreten erhöhter Palladium- und Rhodium-Konzentrationen im Urin von italienischen Schulkindern. Platin aus Modellpartikeln, die den tatsächlich emittierten Teilchen weitestgehend ähneln, ist im Tierversuch an Ratten zu einem unerwartet hohen Maß bioverfügbar. Allerdings gibt es bisher keine genauen Untersuchungen darüber, wie das Pt im Körper vorliegt und welche eventuell toxischen Effekte es auf zellulärer Basis ausübt. Insbesondere eine DNA-Bindung analog der von Pt-Zytostatika bekannten kovalenten Bindung erscheint vorstellbar.

Gesamtziel dieser Arbeit ist daher die umfassende Untersuchung einer etwaigen genotoxischen Wirkung PGE-haltiger Partikel auf Zellen des primär exponierten Organs, der menschlichen Lunge.

Dabei gilt es zunächst geeignete Modellpartikel zu beschaffen und sie zu charakterisieren, insbesondere ihre Größenverteilung und Löslichkeit zu bestimmen. Anschließend muss eine mögliche Internalisierung der Partikel durch menschliche Lungenzellen untersucht werden. Dieser Vorgang wäre eine wichtige Grundlage für die Erklärung von Schadwirkungen.

Die Etablierung eines Testsystems zur empfindlichen Bestimmung von DNA-Addukten ist Voraussetzung für den Nachweis einer möglichen Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der Exposition von Zellen mit PGE-haltigen Partikeln und einer PGE-DNA-Bindung. Dabei muss gleichzeitig sichergestellt sein, dass keine Artefakte aus der geplanten Versuchsdurchführung resultieren. Wenn es tatsächlich zu einer Adduktbildung kommen sollte, muss näher untersucht werden, welche Form der PGE dafür verantwortlich ist. So ist für Nickel- und Cadmiumverbindungen bekannt, dass partikuläre Formen erheblich stärker toxisch sind als gelöste Spezies. Im weiteren Verlauf der Arbeit gilt es dann, mögliche DNA-Addukte näher zu charakterisieren: Bindungs-Art und Bindungs-Partner sind von größtem Interesse. Darüber hinaus bietet es sich an, die intrazelluläre Verteilung der PGE-Spezies auf verschiedene Proteinfractionen zu bestimmen.

Sollte sich in den so durchgeführten Experimenten Anzeichen für eine Genotoxizität von PGE finden, muss abschließend das mutagene Potenzial der Partikel mit geeigneten Testverfahren überprüft werden.

4 Material und Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Gewährleistung der Keimfreiheit

Sämtliche Verbrauchsmaterialien wurden vor der Verwendung mit trockener (180 °C) oder feuchter (121 °C) Hitze bzw. durch Filtrieren (0,2 µm) sterilisiert. Alle Arbeiten, die sterile Bedingungen erfordern, wurden mit Hilfe einer Laminar-Flow-Werkbank durchgeführt.

4.1.2 Charakteristika der verwendeten Zelllinien

Nahezu alle beschriebenen Versuche wurden mit der Zelllinie A549 (ATCC CCl 185) durchgeführt. Sie wurde 1972 aus Lungenepithelzellen eines 58-jährigen männlichen Weißen gewonnen.

Der in den Abschnitten 4.13 und 5.12 beschriebene HPRT-Test wurde mit der Zelllinie V79 durchgeführt. Diese Lungenfibroblasten aus dem Chinesischen Hamster sind ebenfalls sehr gut charakterisiert. Sie verdoppeln sich ungefähr alle 12 Stunden und haben einen stabilen Chromosomensatz, verfügen jedoch in Kultur nicht über ein funktionierendes Cytochrom P450-Enzymsystem (Bradley *et al.*, 1981).

4.1.3 Kulturbedingungen

Die Zellen wurden bei 37 °C und 100 % Luftfeuchtigkeit in einer Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert. Als Kulturmedium wurde DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) mit 10 % FKS (fötale Kälberserum) und 100 Einheiten/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin verwendet. Die Zellen wuchsen adherent als Monolayer in Zellkulturschalen aus Polystyrol. Vor Erreichen der Konfluenz, also einer vollständigen Bedeckung der Wachstumsfläche, wurden die Zellen "passagiert". Dazu wurden sie mit Hilfe von Trypsin von der Schale abgelöst, verdünnt und ein Aliquot mit frischem Medium neu ausgesät. Die Versuche wurden an Zellen der Passagen 6 bis 26, ausgehend von den durch ATCC erhaltenen, durchgeführt.

Langzeitkonservierung der Zellen A549- und V79-Zellen wurden in einer Mischung aus 90 % FKS und 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid) in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

4.2 Verwendete Partikel

Zur Etablierung der Testsysteme wurden Versuche mit kommerziell erhältlichen, reinen Metallpartikeln durchgeführt. Die spätere Verwendung von speziellen Modellpartikeln erlaubt zuverlässigere Aussagen zur Genotoxizität.

4.2.1 Angegebene Partikeleigenschaften

Reine Metallpartikel Die Pt-Partikel stammen von der Firma ALFA AESAR und haben laut Hersteller einen Durchmesser von 0,2 – 1,6 μm . Der Pt-Gehalt wird mit 99,9 % angegeben.

Die reinen Pd-Partikel stammen ebenfalls von der Firma ALFA AESAR und haben eine Teilchengröße von 0,25 – 0,55 μm , ihr Pd-Gehalt beträgt 99,95 %.

Al₂O₃-Pt-Partikel Von Rühle *et al.* (1997) wurden mehrere Chargen an Al₂O₃-Pt-Partikeln mit einem aerodynamischen Durchmesser $\leq 5 \mu\text{m}$ synthetisiert. Sie wurden mit einer Reihe von Methoden bezüglich ihrer Größenverteilung, ihres Pt-Gehalts, der Größe der einzelnen Pt-Nanopartikel auf den Al₂O₃-Trägerpartikeln, der Pt-Oxidationsstufe und den katalytischen Eigenschaften charakterisiert. Die Partikel entsprechen in allen Eigenschaften nahezu exakt den tatsächlich von Abgaskatalysatoren emittierten Teilchen, lediglich ihr Pt-Gehalt ist etwa 30-mal höher als der der tatsächlich emittierten Partikel, um die Sensitivität der toxikologischen Experimente zu steigern. Die in dieser Arbeit untersuchten Partikel stammen aus einer Charge ("pt-4") mit 3 % (w/w) Pt-Gehalt, die auch bei den Tierversuchen von Artelt *et al.* (1999) verwendet wurde. Der aerodynamische Durchmesser der Partikel ist als $\leq 5 \mu\text{m}$ mit einem Mittelwert von 1,3 μm angegeben (Nachtigall *et al.*, 1996).

4.2.2 Partikelcharakterisierung durch Rasterelektronenmikroskopie

Die Al₂O₃-Pt-Partikel wurden freundlicherweise von Herrn Axel Müller am Institut für Werkstoffe der Elektrotechnik der Universität Karlsruhe (TH) mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskops (REM) vom Typ LEO 1530 näher charakterisiert. Dabei wurden die Partikel auf eine Aluminiumscheibe aufgebracht und anschließend ohne weitere Behandlung im Hochvakuum des REM mit einem Elektronenstrahl rasterförmig abgetastet. Aus den rückgestreuten Elektronen wird bei diesem Verfahren ein hochaufgelöstes Bild (Vergrößerung bis über 50 000fach)

mit großer Schärfentiefe erzeugt, aus dem sich Rückschlüsse auf deren Größenverteilung ziehen lassen.

4.3 Versuche zur Löslichkeit der Partikel

Um eine Abschätzung des Beitrags der partikulären vs. gelösten Spezies an den biologischen Effekten treffen zu können, wurden Löslichkeitsversuche durchgeführt.

4.3.1 Direkte Bestimmung der Löslichkeit in Kulturmedium

Die Löslichkeit des in den Al_2O_3 -Pt-Partikeln enthaltenen Platins unter normalen Versuchsbedingungen wurde untersucht, indem 300 μg Al_2O_3 -Pt-Partikel, entsprechend 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, als Suspension zu 10 ml DMEM-Kulturmedium mit 10 % FKS in eine 100 mm-Kulturschale gegeben und analog zu den anderen Versuchen, aber ohne Zellen, für 24 h inkubiert wurden. Anschließend wurde der Schaleninhalt in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und bei $3220 \times g$ 1 h abzentrifugiert. 8 ml des Überstandes wurden vorsichtig abgenommen und gleichmäßig auf vier Mikroreaktionsgefäße (2 ml) verteilt. Dann wurde bei $20\,000 \times g$ 1 h abzentrifugiert, erneut 4 ml vom Überstand abgenommen und auf zwei Reaktionsgefäße verteilt. Nach einem dritten Zentrifugationsschritt bei $20\,000 \times g$ wurden je 1 ml der Lösung getrocknet, mit $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ verascht und wie unter 4.8.3 beschrieben quantifiziert.

4.3.2 Zellinkubation mit Zentrifugationsüberstand

Der Anteil von gelöst vs. partikulär in die Zelle aufgenommenem Platin wurde bestimmt, indem je 300 μg Al_2O_3 -Pt-Partikel, entsprechend 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, in vier Zellkulturschalen (\varnothing 100 mm) zu je 10 ml DMEM-Kulturmedium mit 10 % FKS gegeben und 24 h analog zu den üblichen Versuchen im Brutschrank bei 37 °C inkubiert wurden. Dann wurden ungelöste Partikel in zwei Zentrifugationsschritten mit je $3220 \times g$ für 1 h unter sterilen Bedingungen entfernt. Mit dem auf diese Weise von partikulärem Pt befreiten Medium wurden A549-Zellen analog den Partikel-Versuchen für 24 h inkubiert, bevor die DNA isoliert und ihr Pt-Gehalt gemessen wurde.

4.3.3 Lösliche Vergleichssubstanzen

Zum Vergleich zwischen partikulären und gelösten Pt-Spezies wurden zusätzlich die löslichen Platinverbindungen Cisplatin sowie Platintetrachlorid (PtCl₄) verwendet. Im Cisplatin liegt Pt zweiwertig, im PtCl₄ vierwertig vor. Die Stammlösungen wurden jeweils frisch angesetzt, beim Cisplatin 1 mM in DMSO, beim PtCl₄ 20 mM in dest. Wasser.

4.4 Eigenschaften der kultivierten Lungenzellen

In der menschlichen Lunge gibt es 40 bis 60 verschiedene Zelltypen. Die wichtigsten Epithelzellen in den Alveolen sind die flachen Typ I- und die kuboidalen Typ II-Zellen. Letztere dienen der Synthese von Surfactant sowie als Vorläuferzellen für die Typ I-Zellen.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinie A549 handelt es sich um Adenokarzinomzellen, die in ihren Eigenschaften weitgehend den Alveolarepithelzellen vom Typ II entsprechen. Sie haben auch in Kultur Lamellarkörperchen, produzieren pulmonares Surfactant (Speirs *et al.*, 1991) und kommunizieren miteinander, indem sie eine ganze Reihe von Mediatoren bilden (Khirwadkar *et al.*, 1993). Sie verfügen außerdem über eine umfangreiche Ausstattung mit Cytochrom-P450-Enzymen (Hukkanen *et al.*, 2000). Ihre Verdopplungszeit beträgt 24 h.

A549-Zellen wurden von Wottrich (2003) mittels Durchflusszytometrie auf mögliche "Auto-Apoptose" bzw. Nekrose nach konfluenter Langzeitkultur untersucht, zeigten jedoch erst nach 4 Tagen einen schwachen Anstieg der Zahl apoptotischer und nekrotischer Zellen und sind daher für die bei dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen uneingeschränkt verwendbar (Wottrich, 2003; Jyonouchi *et al.*, 1998).

4.5 Inkubation der Zellen mit den Partikeln

3 bis 6 mg Partikel wurden eingewogen, bei 120 °C für 1 h sterilisiert, in dest. Wasser aufgenommen und durch 10minütige Behandlung im Ultraschallbad sowie starkes Schütteln mit einem "Vortex" Vibrationsschüttler-Gerät suspendiert. 10 bis 100 µl der Suspension wurden in das Kulturmedium gegeben und sorgfältig verteilt.

Alle Versuche wurden mit 100 mm-Zellkulturschalen durchgeführt, die eine Wachstumsfläche von 60 cm² besitzen. Das Mediumvolumen betrug jeweils 10 ml.

4.6 Koloniebildungsfähigkeit

Die Zytotoxizität der Partikel wurde über die Koloniebildungsfähigkeit der Zellen ermittelt. Dazu wurden je 1×10^6 Zellen in eine Zellkulturschale ausgesät. Nach 24 h wurde mit der zu prüfenden Substanz inkubiert, die nach weiteren 24 h wieder abgewaschen wurde. Von den behandelten Zellen wurden 300 in eine weitere Zellkulturschale ausgesät. Nach 7 Tagen wurden die gebildeten Kolonien gewaschen, mit Ethanol fixiert und mit Giemsa-Lösung gefärbt. Sie wurden mit dem bloßen Auge unter Zuhilfenahme eines "Colony Counters" ausgezählt. Mit jeder zu prüfenden Konzentration wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt, das Ergebnis wurde bezogen auf die unbehandelte Kontrolle angegeben.

4.7 Internalisierung der Partikel

Die Aufnahme der Partikel in Zellen ist ein wesentlicher Bestandteil ihrer Toxizität. Zu ihrer Untersuchung wurden verschiedene Nachweismethoden verwendet.

Konventionelle Lichtmikroskopie A549-Zellen wurden nach Partikelinkubation sowohl mit dem ZEISS Axiovert Inversmikroskop als auch mit dem Phasenkontrastmikroskop ZEISS Axioskop beobachtet. Es wurden Aufnahmen mit 400 und 1000facher Vergrößerung gemacht. Die Dokumentation erfolgte fotografisch auf Kleinbildfilm.

Video-unterstützte Lichtmikroskopie Das Forschungszentrum Karlsruhe stellte freundlicherweise ein System zur zeitaufgelösten Video-Mikroskopie der Firma IMPROVISION zur Verfügung. Dabei ist ein Phasenkontrast-Mikroskop (NIKON "Eclipse" TS 100) mit einer CCD-Kamera gekoppelt. Durch eine klimatisierte ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5\% \text{ CO}_2$) Kammer um den Objektisch ist es möglich, lebende Zellen über einen längeren Zeitraum zu beobachten und die intrazellulären Bewegungen mithilfe der Software "OPENLAB" zu dokumentieren.

Transmissions-Elektronenmikroskopie A549-Zellen wurden in TRANSWELL-Kultursysteme auf Polyestermembranen mit $0,4\text{ }\mu\text{m}$ großen Löchern ausgesät und nach 24 h mit $5\text{ }\mu\text{g Al}_2\text{O}_3\text{-Pt-Partikeln / cm}^2$ Wachstumsfläche behandelt. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen wie in Wottrich (2003) beschrieben fixiert und kontrastiert. Diese Arbeiten wurden von mir

unter Anleitung durch Herrn Ralf Wottrich vom Institut für Toxikologie und Genetik (ITG) am Forschungszentrum Karlsruhe durchgeführt.

Die Polyesterfolien mit den Zellen wurden ausgeschnitten, mindestens 12 h mit 1 %igem Glutaraldehyd¹ in 0,2 M Cacodylatpuffer fixiert und anschließend mit Sucrosepuffer gewaschen. Zur Nachfixierung und Kontrastierung wurde 2 h mit OsO₄-Lösung behandelt, gefolgt von 1 h Inkubation mit 2 % wässrigem Uranylacetat. Alle diese Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Dann wurde mit einer aufsteigenden "Ethanolreihe" (50, 70, 80, 90, 95, 2 × 100 %) entwässert und in Spurr-Harz eingebettet. Die nach einer Woche ausgehärteten Harzblöcke wurden freundlicherweise von Herrn Wottrich mit einem LKB 2088 Ultratom in ca. 100 nm dicke Scheibchen geschnitten und dann mit einem ZEISS EM109T Elektronenmikroskop untersucht, die Dokumentation erfolgte mit fotografischem Film.

4.8 Bestimmung des PGE-Gehalts der zellulären DNA

Die direkte Untersuchung der PGE-Konzentration erfordert eine schonende DNA-Isolierung aus den Zellen, die genaue Bestimmung der DNA-Ausbeute sowie eine empfindlichen Messung der PGE-Konzentration.

4.8.1 Zellaufschluss und DNA-Extraktion

Das Verfahren basiert auf dem Zellaufschluss mit Detergens, dem anschließenden enzymatischen Verdau störender Proteine und RNA-Bestandteile und der Extraktion der DNA nach der Phenol-Chloroform-Methode (Sambrook *et al.*, 1989; Schwerdtle, 2002).

Für die Versuche wurden jeweils 2×10^6 A549-Zellen ausgesät. Nach 24 h wurden sie mit den Testsubstanzen inkubiert und diese nach weiteren 24 h wieder abgewaschen. Die abtrypsinisierten Zellen (zirka 7×10^6) wurden in 5 ml eiskalter Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS) aufgenommen und 4 min bei $300 \times g$ (4 °C) zentrifugiert. Nach einem erneuten Wasch- und Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet vorsichtig in 100 µl Tris-EDTA-Puffer (TE) aufgenommen und die Zellsuspension nach Zugabe von 900 µl Extraktionspuffer 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von Proteinase K (Endkonzentration 100 µg/ml) und 3 h Verdau im Schüttelinkubator bei 50 °C wurde die Lösung zunächst auf Raumtemperatur

¹Lösungen und Puffer siehe Anhang.

abgekühlt. Zur Abtrennung der DNA von den Proteinen wurde die Lösung mit dem gleichen Volumen einer Mischung aus Tris-gepuffertem Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, 1 min stark geschüttelt und danach zur Phasentrennung mit $10\,000 \times g$ bei Raumtemperatur 1 min zentrifugiert. Mit der oberen wässrigen Phase wurde die Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion ein- bis zweimal wiederholt, bis keine Interphase mehr beobachtet wurde. Zur vollständigen Entfernung des Phenols aus der wässrigen Phase schloss sich eine Extraktion mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) analog der Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion an.

Nachfolgend wurde die DNA durch Zugabe von 0,2 Volumenteilen 10 M Ammoniumacetatlösung zur wässrigen DNA-Lösung und 2 Volumenteilen Ethanol ausgefällt und mindestens 12 h bei -18 °C aufbewahrt. Nach 10 min Zentrifugation bei $6000 \times g$ (4 °C) wurde das DNA-Pellet vorsichtig in 70 %igem Ethanol aufgenommen und anschließend erneut bei $6000 \times g$ (4 °C) 10 min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt.

Bei jeder Versuchsreihe wurde zur Wachstumskontrolle der Zellen eine Kulturschale mit einem elektronischen CASY-Zellzählgerät analysiert.

4.8.2 Photometrie und Veraschung der Proben

Im Anschluss an die eigentliche Isolierung wurde das gereinigte DNA-Pellet in 500 μl bidest. Wasser aufgenommen. Für die unter Punkt 4.9 beschriebenen Versuche mit Zyanid wurde in 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,4); für den in Abschnitt 4.10 beschriebenen enzymatischen Verdau in 20 mM Natriumacetat-Puffer (pH 5,0) aufgenommen.

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch anhand der Absorption bei 260 nm bestimmt. Eine optische Dichte von 1 entspricht dabei 50 μg DNA. Die Quotienten A_{260}/A_{280} sowie A_{260}/A_{230} geben Aufschluss über die Reinheit der DNA. Reine, proteinfreie DNA hat ein Verhältnis $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$ und ein Verhältnis $A_{260}/A_{230} \geq 2,0$. Allerdings gibt es Zweifel an der Aussagekraft dieser photometrischen Methode (Wilfinger *et al.*, 1997). Eine eventuelle Verunreinigung mit Proteinen wurde daher zusätzlich mit dem Bradford-Verfahren (siehe 4.12.1) überprüft. Eine Kontamination mit RNA, z.B. durch unvollständigen Verdau mit RNase, wurde durch RT-PCR (Reverse Transkriptase - Polymerasekettenreaktion) nach dem in Ehleben (2002) angegebenen Protokoll überprüft.

Nach Bestimmung der Konzentration wurde die DNA erneut ausgefällt, getrocknet und anschließend mit einer Mischung aus je 100 μl konzentrierter HNO_3 ("subboiled") und 30 %igem

H₂O₂ ("suprapur") umgesetzt, und nach 1 h Wartezeit bei Zimmertemperatur durch Veraschen bei 85 °C über Nacht mineralisiert.

4.8.3 Bestimmung des Platinmetallgehalts der DNA

Die Massenspektrometrie mit induktiv gekoppelter Plasma-Ionisierung (ICP-MS) wurde zur Bestimmung des PGE-Gehalts der DNA verwendet. Neben der adsorptiven Voltammetrie ist die ICP-MS das zur Zeit am besten geeignete Verfahren für die Metall-Spurenanalytik (Cammann, 2003).

Die Messungen wurden freundlicherweise von Herrn Christoph Menzel, Frau Claudia Möbner und Frau Joulia Dikikh am Institut für Mineralogie und Geochemie der Universität Karlsruhe (TH) durchgeführt.

Bei dem ICP-MS Gerät handelt es sich um ein doppelt fokussierendes Modell "Axiom" der Firma THERMO VG ELEMENTAL. Seine maximale Auflösung liegt bei $R = 10000$. Die genaue Verfahrensbeschreibung ist von Menzel (2002) dargelegt.

Der mineralisierte Rückstand aus der Veraschung der DNA-Proben wurde in 2 ml (Gesamtvolumen nach Zugabe der internen Standards, s.u.) 1 % HNO₃ aufgenommen und bis zur vollständigen Lösung im Ultraschallbad behandelt. Es wurde eine externe Kalibrierung mit einer zertifizierten PGE-Multielementstandardlösung (SPEX-CERTI Prep. Inc.) gewählt. Zusätzlich wurde eine interne Standardisierung mit ¹¹⁵In für Pd und mit ¹⁶⁵Ho und ¹⁶⁹Tm für Pt durchgeführt, um Matrixeffekte und mögliche instrumentelle Drift auszugleichen.

Sämtliche Verdünnungen wurden mit 1 % v/v HNO₃ ("subboiled" Qualität) / 1 % v/v H₂O₂ ("suprapur") vorgenommen, um die Matrix der Kalibrationslösungen an die der Aufschlusslösungen anzugleichen. Um den Einfluss möglicher Interferenzen abzuschätzen, wurden zusätzlich bei jeder Messung die Intensitäten der für PGE typischen Störelemente (Cl, Cu, Zn, Sr, Zr, Cd, Hf) aufgenommen. Bei jeder zehnten Messung wurde die 125 ppt Standard-Lösung gemessen, um eine Kontrolle über die Hintergrundwerte zu haben. Die Aufnahme erfolgte bei $R = 400$ mit 3 Messungen pro Probe und 70 s Waschphase nach jeder Probe. Es werden die Mittelwerte der jeweils 3 Isotope ¹⁹⁴Pt, ¹⁹⁵Pt und ¹⁹⁶Pt beziehungsweise ¹⁰⁵Pd, ¹⁰⁶Pd und ¹⁰⁸Pd verwendet.

Die Angabe der Zahl der Metall-Addukte pro 10⁸ Basenpaaren basiert auf der Annahme, dass 1 fmol Pt / µg DNA 66 Pt-Molekülen pro 10⁸ Basenpaaren entspricht (Reed *et al.*, 1988). Für Palladium gilt: 1 fmol Pd / µg DNA entspricht 122,5 Pd-Molekülen pro 10⁸ Basenpaaren.

4.9 Bestimmung der chemischen Stabilität der Pt-DNA-Addukte

Um eine Aussage über die Art der Adduktbindung an DNA treffen zu können, wurde ihre Resistenz gegenüber Zyanid-Ionen im Vergleich mit Cisplatin-Addukten ermittelt.

Die experimentelle Durchführung der Versuche war wie folgt: Die nach 24 h Inkubation der Zellen mit 5 µg Al₂O₃-Pt-Partikel / cm² bzw. mit 10 µM Cisplatin adduktivierte DNA wurde wie unter Punkt 4.8.1 beschrieben isoliert und in 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,4) gelöst. Dann wurden jeweils 200 µl DNA-Lösung mit 0 bis 100 µmol Zyanid (2 M NaCN in 50 mM Tris-HCl-Puffer) behandelt. Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug jeweils 300 µl.

Anschließend wurde die DNA mit NH₄Ac / EtOH ausgefällt und überschüssiges CN⁻ sowie abgelöstes [Pt(CN)₄]²⁻ abgewaschen. Nach Wiederauflösen und erneuter photometrischer Konzentrationsbestimmung der DNA-Lösung wurde sie zum zweiten Mal ausgefällt, wie unter Punkt 4.8.2 beschrieben verascht und der Rest-Metallgehalt an der DNA über ICP-MS quantifiziert.

4.10 Nähere Charakterisierung des Bindungspartners der Pt-DNA-Addukte

Für die Addukte des Zytostatikums Cisplatin an DNA konnte eine selektive Bindung an die exozyklischen N-Atome der Purinbasen Guanin und Adenin nachgewiesen werden. Um eine ähnliche Verteilung von Addukten aus Al₂O₃-Pt-Partikel-Exposition zu untersuchen, wurde die DNA enzymatisch gespalten und der Verdau mit präparativer Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) aufgetrennt. Der Platingehalt der auf diese Weise erhaltenen Fraktionen wurde mittels ICP-MS untersucht.

A549-Zellen wurden mit Al₂O₃-Pt-Partikeln inkubiert, ihre DNA wie unter 4.8.1 beschrieben isoliert und jeweils zirka 150 µg in 200 µl 20 mM Natriumacetat-Puffer (pH 5,0) gelöst. Die DNA-Lösung wurde nach Zugabe von 5 µl ZnSO₄ (20 mM) 2 min auf 95 °C erhitzt, um so die Doppelhelix aufzuschmelzen und besser für die Enzyme zugänglich zu machen. Anschließend wurde im Eisbad abgekühlt, mit 3 Einheiten Nuclease P1 versetzt und bei 50 °C im Schüttelinkubator zu den Nukleotiden verdaut. Nach einem Alkalisierungsschritt (10 µl 1 M Tris-HCl pH 8,5) wurde mit je 5 U alkalischer Phosphatase bei 37 °C zu den Nukleosiden verdaut. Nach dem Rücksäuern mit zirka 10 µl 3 M Ammoniumacetat (pH 5,0) wurden diese an einer RP-18 Säule (Europher-100 mit 5 µm Packung, 4,6 × 250 mm) isokratisch mit einer Mischung aus 75 % 50 mM Ammoniumacetat / 10 mM NaN₃ (pH 5,0) und 25 % Methanol bei 1 ml/min

mit einem GYNKOTEK-HPLC-System getrennt. Detektiert wurde mit einem UV-Detektor bei 254 und 280 nm. Die Peaks wurden über Kochromatographie mit Vergleichssubstanzen (Retentionszeit, Verhältnis der Absorption bei 254 und 280 nm) identifiziert. Zur Bestimmung des Pt-Gehalts der einzelnen Nukleoside wurden 30-sekündige Fraktionen geschnitten, das Fließmittel bei 90 °C abgedampft und der Rückstand mit HNO₃ / H₂O₂ verascht. Anschließend wurde der Pt-Gehalt mit ICP-MS gemessen; wenn er zu niedrig war, wurde angereichert indem mehrere HPLC-Läufe vereinigt wurden.

Um die aus Al₂O₃-Pt-Partikel-Exposition resultierenden DNA-Addukte mit den Cisplatin-DNA-Addukten vergleichen zu können, wurden auch Versuche mit Kalbsthymus-DNA durchgeführt. Die DNA wurde dazu *in vitro* mit Cisplatin umgesetzt. Kalbsthymus-DNA wurde in 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,4) gelöst und dann mit 100 µmol Cisplatin in DMSO für 24 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde mit EtOH / NH₄Ac gefällt, mehrfach mit 70 %igem EtOH gewaschen, in NaAc-Verdaupuffer aufgenommen und dann wie oben beschrieben enzymatisch umgesetzt.

In separaten Experimenten wurde ein möglicher Einfluss von Pt auf die Retentionszeit der Nukleoside überprüft. Dazu wurden käufliche Nukleosidstandards mit 500 µM Cisplatin für 24 h bei 37 °C umgesetzt und nach dem Verdünnen mit NaAc-Puffer mittels HPLC-UV untersucht.

4.11 DNA-Isolierung mit der QIAGEN-Methode

Als zweite Methode zur DNA-Isolierung wurde das kommerziell erhältliche QIAGEN-System "GenomicTip 100" nach dem Protokoll des Herstellers benutzt (Qiagen, 2001). Die Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen ist im Anhang unter Punkt 8.3 aufgeführt.

A549-Zellen wurden mit Al₂O₃-Pt-Partikeln inkubiert und nach 24 h abgewaschen (siehe Kapitel 4.5). Dann wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin von der Schale abgelöst und bei 1500 ×g abzentrifugiert. Nach zweimaligem Resuspendieren in PBS und anschließendem Abzentrifugieren wurde das Pellet in 2 ml PBS aufgenommen und mit 2 ml C1-Puffer sowie 6 ml dest. Wasser (jeweils 4 °C) vermischt. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde bei 1300 ×g abzentrifugiert und das Pellet erneut mit 2 ml C1-Puffer und 6 ml dest. Wasser (jeweils 4 °C) resuspendiert. Der letzte Zentrifugations- und Waschschrift wurde wiederholt, das Pellet aus den Zellkernen in 5 ml G2-Puffer resuspendiert und 100 µl Proteinase K-Lösung (20 mg/ml) zugegeben.

Der Ansatz wurde 1 h bei 50 °C inkubiert und dann auf eine mit 4 ml QBT-Puffer equilibrierte QIAGEN-Säule gegeben. Störsubstanzen wurden durch zweimaliges Waschen mit je 7,5 ml QC-Puffer entfernt und die DNA anschließend mit 5 ml QF-Puffer eluiert. Nach dem Ausfällen mit Isopropanol wurde die DNA in Wasser gelöst und der Gehalt photometrisch bestimmt. Die weitere Aufarbeitung geschah wie unter 4.8.2 beschrieben.

Der zusammengefasste Ablauf der beschriebenen Verfahren zur Untersuchung von PGE-DNA-Addukten ist vereinfacht in Abb. 4 dargestellt.

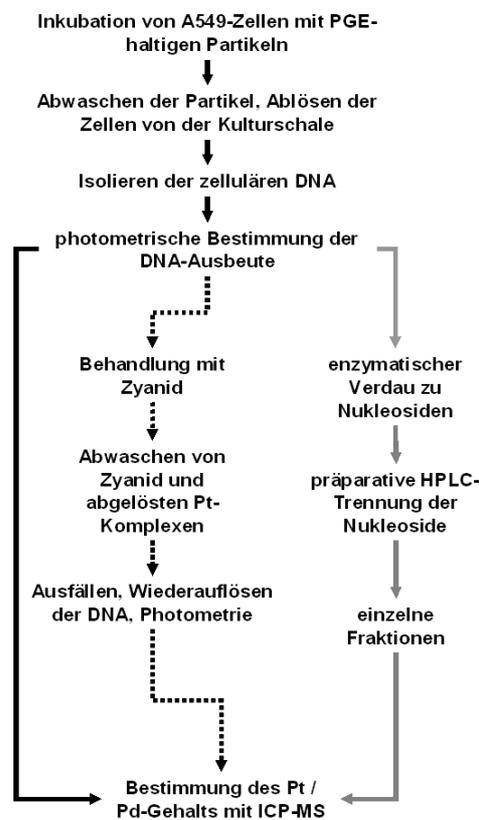


Abb. 4: Schema der verschiedenen Methoden die zur Charakterisierung von Zahl, Bindungsart sowie Bindungsort der Addukte an DNA angewandt wurden. Untersuchung von Konzentrations- und Zeitabhängigkeit sind durch schwarze Pfeile symbolisiert. Die Resistenz der Addukte gegenüber nukleophilem Angriff durch Zyanid-Ionen wird wie die gestrichelten Pfeile zeigen bestimmt (siehe 4.9) und die chromatographische Trennung nach Verdau verläuft wie von den grauen Pfeilen dargestellt (siehe 4.10). Die oberen vier Schritte sind unter Punkt 4.8.1 beschrieben.

4.12 Intrazelluläre Verteilung von Platin

A549-Zellen wurden mit Al_2O_3 -Pt-Partikeln und PtCl_4 inkubiert. Der Pt-Gehalt der beiden Zellkompartimente Zytosol und Zellkern wurde dann nach Isolierung der jeweiligen Proteinfractionen mit elektrothermaler Atomabsorptionsspektroskopie untersucht.

4.12.1 Proteinisolierung

Der Zellaufschluss zur Isolierung der intrazellulären Zytosol- und Kernproteine erfolgt in mehreren Schritten mit verschiedenen Detergenz-Konzentrationen. So wird sukzessive die äußere Zellmembran aufgeschlossen, die Zytoplasmaproteine nach einem Zentrifugationsschritt als Überstand abgenommen, die Zellkerne werden im Pellet in einem zweiten Lyseschritt aufgeschlossen und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt die Kernproteine als Überstand abgenommen. Die Methode basiert auf der von Hartmann und Hartwig (1998) beschriebenen, die verwendeten Puffer sind im Anhang aufgeführt.

Die Zellen wurden nach dem Abwaschen der Prüfsubstanzen mit Hilfe von Trypsin von der Kulturschale entfernt und in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) mit 10 % FKS aufgenommen. Nach 5 min Zentrifugation bei $100 \times g$ und 4°C wurde der Überstand entfernt und das Pellet mit PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Zentrifugations- und Waschschritt wurde zweimal wiederholt. Das Pellet wurde mit $500 \mu\text{l} / 10^6$ Zellen frisch zubereitetem Zellysepuffer resuspendiert und 15 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden $25 \mu\text{l} / 10^6$ Zellen 10 %iges eisgekühltes NP-40-Detergenz zugegeben und die Lösung für 10 s gevortext. Danach wurde für 15 min bei $3220 \times g$ und 4°C zentrifugiert, das im Überstand enthaltene Zytoplasma abgenommen und bei -80°C aufbewahrt. Das Pellet wurde zweimal mit Zellysepuffer gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in $100 \mu\text{l} / 10^6$ Zellen frisch zubereitetem Kernlysepuffer resuspendiert und nach Schütteln 30 min auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation bei $20\,000 \times g$ und 4°C für 15 min wurde der Überstand mit den Zellkernproteinen bei -80°C aufbewahrt.

4.12.2 Bestimmung der Proteinausbeute

Der Proteingehalt der nach 4.12.1 isolierten Lösungen wurde nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) mit dem BIO-RAD-Reagenz (siehe Anhang) und Rinderserumalbumin

(BSA) als Standard bestimmt. Hierfür wurde jeweils ein Aliquot der Proteinlösung mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt und mit 900 µl verdünntem Bradford-Reagenz von BIO-RAD (700 µl Wasser und 200 µl Reagenz) versetzt (Bradford, 1976). Die Proben der Kalibriergeraden und die zu messenden Proteinproben wurden in eine Mikrotiterplatte gegeben und mit einem Photometer (TECAN SpectraFlour) die Absorption bei 595 nm gemessen.

4.12.3 Bestimmung des Metallgehalts der Proteinlösungen

Zur Bestimmung des Pt-Gehalts der Proteinlösungen wurde die Atomabsorptionsspektroskopie mit elektrothormaler Ionisierung verwendet.

Die Messungen erfolgten mit dem AAS-Gerät 4110 ZL von PERKIN-ELMER und der Software AAWinLabAnalyst von PERKIN-ELMER. Es wurde eine Hohlkathodenlampe mit einer Emission bei 265,0 nm bei einer Stromstärke von 30 mA verwendet. Während des Heizvorganges wurde ein Argonstrom durch den Ofen geleitet, um eine Oxidation des Graphits zu verhindern und sich verflüchtigende Probenbestandteile aus dem Ofen zu entfernen. Dieser Gasstrom wurde bei der Messung der Absorption abgeschaltet, um das Messergebnis nicht zu verfälschen. Als Lösungsmittel für die Proben wurde 0,2 %ige Salpetersäure eingesetzt. Es wurde ein Probenvolumen von 20 µl in den Graphitrohröfen eingebracht. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe einer Kalibriergerade. Das Temperaturprogramm der Analyse war wie folgt:

Tabelle 2: Temperaturprogramm für die AAS-Messung von Platin. Als Inertgas wurden 250 ml Argon / min verwendet.

Prozess	Temperatur	Ramp time (s)	Hold time (s)	Inertgas
Trocknen	120°C	1	30	Ja
Trocknen	250°C	15	30	Ja
Pyrolyse	1200°C	10	20	Ja
Atomisierung	2550°C	0	5	Nein
Ausheizen	2600°C	1	3	Ja

4.13 HPRT-Genmutationstest

Mit diesem Verfahren werden Vorwärtsmutationen in dem für die Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase codierenden Gen erfasst. Dazu werden die Zellen in einem Selektivmedium gezüchtet.

Zu Versuchsbeginn wurden jeweils 500 000 V79-Zellen in 100 mm Kulturschalen ausgesät und nach 24 h mit der Testsubstanz inkubiert bzw. mit UVC-Licht als Positivkontrolle bestrahlt. Nach 24 h wurden die Zellen gewaschen und zur Expression des Phänotyps für die Dauer von 6 Tagen zweimal passagiert (1. und 2. Subkultur). Anschließend wurden je $5 \times 200\,000$ Zellen in Kulturschalen (\varnothing 100 mm) mit Selektivmedium gegeben. Zu diesem Zweck wurde DMEM mit 10 $\mu\text{g/l}$ 6-Thioguanin benutzt. Die resultierenden Mutanten-Kolonien wurden nach einigen Tagen gewaschen, mit Ethanol fixiert, mit Giemsa-Lösung gefärbt und ausgezählt. Jeweils zum Zeitpunkt der ersten Subkultur und der Selektion wurden darüber hinaus drei Aliquote von je 300 Zellen in normales DMEM-Medium ausgesät. Sie dienten zur Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit nach der Substanzbehandlung bzw. der Lebensfähigkeit zum Zeitpunkt der Selektion. Die Berechnung der Mutationsfrequenz erfolgte bezogen auf die Zahl lebensfähiger Zellen (Glatt, 1993).

4.14 Mikrokerntest

Der Mikrokerntest beruht auf der quantitativen Erfassung der Zahl der nach der Kernteilung auftretenden Mikrokerne. Er kann mit A549-Zellen durchgeführt werden und ist für die Erfassung von Schäden, die durch Partikel induziert werden, geeignet (Ohshima *et al.*, 1998).

Bei der Durchführung wurden je 50 000 Zellen in "QuadriPERM"-Schalen auf Objektträgern ausgesät und nach 24 h mit den Al_2O_3 -Pt-Partikeln inkubiert. Der zeitliche Ablauf wurde analog dem von Ohshima *et al.* (1998) für A549-Zellen beschriebenen gewählt. Nach weiteren 24 h wurden die Partikel abgewaschen und 48 h nach Ende der Partikelinkubation wurden die Zellen mit *Carnoy's Fixans* oder Formaldehydlösung fixiert. Zu diesem Zeitpunkt haben alle Zellen mindestens eine Zellteilung durchlaufen. Die Kerne wurden mit DAPI-Antifade (4', 6-Diamidino-2-phenylindol) angefärbt und mindestens 1000 Kerne pro Konzentration nach standardisierten Kriterien unter dem Fluoreszenz-Mikroskop ausgezählt. Mikrokerne liegen maximal drei Kerndurchmesser vom Hauptkern entfernt, weisen maximal $\frac{1}{3}$ Hauptkerndurchmesser auf, haben keine Verbindung zum Hauptkern, liegen in der gleichen Fokusebene und haben einen glatten, runden bis ovalen Umfang (Kirsch-Volders *et al.*, 2003; Fenech, 2000;

Countryman und Heddle, 1976).

Das verwendete Mikroskop ist ein NIKON "Eclipse" TE 400 kombiniert mit einer Spot-RT monochrom CCD-Digitalkamera (DIAGNOSTIC INSTRUMENTS) und der Software MetaView von METAVISION. Die Anregung erfolgte mit UV-Licht bei 330 – 380 nm, Emission wurde durch einen dichroistischen Spiegel (400 nm) und einen 420 nm Filter mit 10x Okular und 63 oder 100x Objektiv beobachtet.

5 Ergebnisse und Diskussion

Im Verlauf dieses Kapitels sollen zuerst die Daten bezüglich der Eigenschaften der Partikel und ihrer Aufnahme in Zellen präsentiert werden, bevor ihre Wechselwirkung mit der DNA beschrieben wird. Auf eventuelle Auswirkungen dieser DNA-Bindung wird am Ende des Kapitels, nach der Beschreibung der Proteinbindung, eingegangen.

5.1 Beschreibung der verwendeten Partikel

Um die verwendeten Testsysteme zu etablieren, wurden Versuche mit reinen Metallpartikeln durchgeführt. Diese sind jedoch nur ein sehr unvollkommenes Modell der Abgaskatalysator-Emissionen. So ist z. B. ihre Dichte um ein Vielfaches größer, was sie schneller sedimentieren lässt. Außerdem weisen sie eine im Vergleich zu den weiter unten beschriebenen Al_2O_3 -Pt-Partikeln inhomogene Größenverteilung auf und neigen zur Agglomeratbildung. Ihre Handhabung ist deshalb sehr schwierig.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde von Mitarbeitern des Fraunhofer Instituts für Toxikologie und Experimentelle Medizin (ITEM), Hannover, freundlicherweise eine Charge Pt-beschichteter Aluminiumoxidpartikel zur Verfügung gestellt. Diese Partikel entsprechen weitestgehend den tatsächlich von Abgaskatalysatoren emittierten und wurden daher in der vorliegenden Arbeit am gründlichsten untersucht.

Rhodium ist leider nicht in der benötigten Teilchengröße erhältlich. Auch mit den kleinsten auf dem Markt verfügbaren Partikeln ließ sich keine Suspension erzeugen, die länger als 10 s stabil war. Obwohl eine DNA-Bindung von Rh-Komplexen nachgewiesen wurde (Tselepi-Kalouli und Katsaros, 1990), konnten keine Versuche dazu durchgeführt werden.

5.2 Rasterelektronenmikroskopische Charakterisierung

Die Größenverteilung und das Agglomerationsverhalten der Partikel wurden am Institut für Werkstoffe der Elektrotechnik mit dem LEO 1530 Rasterelektronenmikroskop untersucht.

5.2.1 Reine Metallpartikel

Die von der Firma ALFA AESAR gemachten Angaben zum Durchmesser der reinen Metallpartikel konnten bestätigt werden, er war in beiden Fällen $\leq 1,5 \mu\text{m}$. Allerdings zeigte sich sowohl bei den Pt- (Abb. 5 A), als auch bei den Pd-Partikeln (Abb. 5 B) starke Agglomeration. Die eigentlich sehr kleinen Partikel lagern sich zu großen Aggregaten zusammen. Zum Aufbrechen dieser "Zusammenballungen" wurde vor der Zellinkubation eine Ultraschall-Behandlung durchgeführt (siehe 4.5).

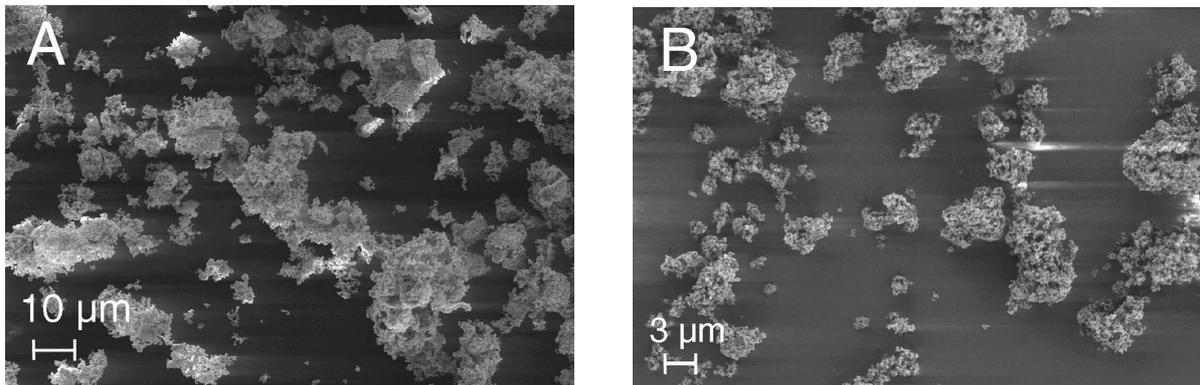


Abb. 5: REM-Aufnahmen der Pt- (Bild A, 2000fache Vergrößerung) **und Pd-Partikel** (Bild B, 5000fache Vergrößerung). Neben einzelnen Partikeln sind Partikel-Agglomerate zu erkennen. Der Balken entspricht 10 (Pt) bzw. 3 μm (Pd).

5.2.2 Al_2O_3 -Pt-Partikel

Auch von den Al_2O_3 -Pt-Partikeln konnten rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen gemacht werden. Sie zeigen sehr eindrucksvoll die Größenverteilung der Partikel. Die meisten von ihnen haben einen geometrischen Durchmesser von zirka $1 \mu\text{m}$, einige größere Partikel haben bis zu zirka 5, in Ausnahmefällen $30 \mu\text{m}$ Durchmesser (Abb. 6). Die von Rühle *et al.* (1997) angegebenen Daten konnten also bis auf das vereinzelte Auftreten von deutlich größeren Partikeln bestätigt werden.

Verglichen mit den oben beschriebenen Metallpartikeln kommt es bei den Al_2O_3 -Modellpartikeln kaum nicht zum Auftreten von Agglomeraten. Ihre Suspension in Wasser ist für mehrere Minuten stabil (Metallpartikel: wenige Sekunden) und dadurch exakter dosierbar.

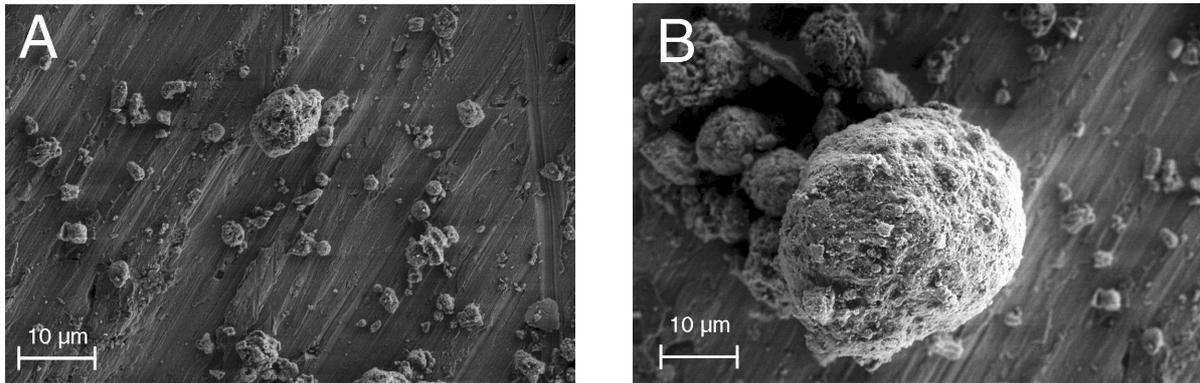


Abb. 6: REM-Aufnahmen der Al_2O_3 -Pt-Partikel. Bild A: Überblick der Größenverteilung bei 5000facher Vergrößerung. Die Mehrzahl der Partikel weist einen Durchmesser von zirka 1 – 2 μm auf, in der Bildmitte oben ist ein zirka 10 μm großes Partikel zu erkennen. Bild B: Einzelnes Partikel. Die Balken geben jeweils 10 μm an.

5.3 Partikellöslichkeit

Der in 2.8 postulierten Hypothese zufolge gelangen die Partikel durch einen endozytoseartigen Vorgang in die Zellen. Vorstellbar wäre aber auch ein partielles Auflösen von PGE-Partikeln außerhalb der Zelle, gefolgt von anschließender Diffusion oder aktiver Aufnahme der löslichen Spezies in die Zelle. Die Bestimmung der Löslichkeit ist daher sowohl für allgemeine Aussagen zur Bioverfügbarkeit, als auch für eine Abschätzung des Verhältnisses gelöst vs. partikulär in die Zellen aufgenommener PGE von maßgeblicher Bedeutung (siehe auch Kapitel 5.7.5).

Die Partikel wurden dazu analog den Versuchen mit A549-Zellen mit DMEM-Vollmedium behandelt und anschließend sehr sorgfältig abzentrifugiert. Der PGE-Gehalt des Überstandes wurde durch ICP-MS bestimmt, die Ergebnisse sind in Tab. 3 dargestellt.

Die vergleichsweise hohe Löslichkeit der Edelmetalle aus den Partikeln bereits unter chemisch milden Bedingungen bestätigt Messungen von Artelt *et al.* (1999), die für die hier verwendeten Al_2O_3 -Pt-Partikel eine Pt-Löslichkeit von 0,1 % angeben. Die entsprechenden Versuche wurden jedoch nur über einen Zeitraum von 30 min mit 0,9 %iger Kochsalzlösung durchgeführt². Nachtigall *et al.* (1996) konnten für die Löslichkeit ähnlicher Al_2O_3 -Pt-Partikel ("AC430") in 0,9 % NaCl einen Wert von 1,36 % bestimmen. Aus dem Vergleich der beiden dort verwendeten Verfahren adsorptive kathodische Voltammetrie und ICP-MS wurde geschlossen,

²Genaue Temperaturangaben fehlen leider.

Tabelle 3: Prozentuale Löslichkeit \pm SD der verschiedenen Partikel in Zellkulturmedium mit 10 % FKS. Die experimentellen Bedingungen waren exakt wie bei den Versuchen mit A549-Zellen (24 h bei 37 °C). Dargestellt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen \pm Standardabweichung (SD).

Probe	Löslichkeit in %
Pd-Partikel	0,09 \pm 0,009
Pt-Partikel	0,04 \pm 0,005
Al ₂ O ₃ -Pt-Partikel	1,5 \pm 0,05

dass die gelösten Spezies in ionischer Form vorlagen und nicht als suspendierte elementare Feinstpartikel. Diese könnten aus unzureichender Zentrifugation herrühren und das Ergebnis verfälschen.

Die Differenz der Literaturdaten zu den hier bestimmten Werten lässt sich mit den unterschiedlichen Versuchsbedingungen erklären.

Die Hauptursache für die hohe Löslichkeit ist in der geringen Teilchengröße der Partikel zu finden, sie ermöglicht nicht-klassische Korrosionsphänomene (Rühle *et al.*, 1997). Besonders auffällig wird dieser Zusammenhang beim Vergleich der reinen Pt-Partikel mit den Al₂O₃-Pt-Partikeln. Deren fein verteiltes Pt ist rund 35 mal besser löslich als Pt aus den kompakten Metallpartikeln.

Auch das Vorhandensein von Chloridionen erleichtert die Oxidation von Pt und Pd durch Sauerstoffspuren im Lösungsmittel (Holleman und Wiberg, 1995). Es kommt zu einer Absenkung des entsprechenden elektrochemischen Normalpotentials E_0 . Daraus lässt sich auch die bei vergleichbarem Partikeldurchmesser bessere Löslichkeit von Palladium ableiten.



5.4 Inkubation der Zellen mit den Prüfsubstanzen

Die reproduzierbare Inkubation der Zellen mit den Partikeln war von entscheidender Bedeutung für den Erfolg der Experimente.

Am besten geeignet erwies sich folgende Vorgehensweise: Die Partikelsuspension wurde genau 5 s mit dem Vibrationsschüttler "gevortext", dann sofort ein Aliquot ins Kulturmedium auf die Zellen gegeben und die Pipettenspitze zweimal gespült. Die Partikel wurden mit kreisförmigen Bewegungen gleichmäßig verteilt. Ebenfalls maßgeblich war nach der entsprechenden Inkubationszeit das Abwaschen der Partikel von den Zellen. Im Gegensatz zu Literaturangaben (Ohshima *et al.*, 1998) war es nicht ratsam, möglichst oft zu waschen. Entscheidend war vielmehr ein kraftvolles Pipettieren mit einer möglichst kleinen Pipette, auch am Schalenrand. Anschließend dürfen die abgelösten Partikel nicht wieder auf die Zellen sedimentieren, sondern müssen sofort mit der Waschlösung abgesaugt werden. Die Kontrolle unter dem Mikroskop zeigte den Wascherfolg. Dieser Wasch-Schritt war sehr kritisch: Wurde er nicht korrekt durchgeführt, kam es zu einer Verschleppung von Partikeln durch den Aufarbeitungsprozess hindurch und die gemessenen Werte waren um ein Mehrhundertfaches erhöht (nicht gezeigt).

5.5 Zytotoxizität

Die Zytotoxizität der Partikel wurde mit dem Test auf Koloniebildungsfähigkeit ermittelt. Dazu wurden A549-Zellen unter den gleichen Bedingungen wie bei den sonstigen Versuchen mit den Prüfsubstanzen inkubiert. Anschließend wurde eine exakt definierte Anzahl von Zellen für mehrere Tage normal weitergezüchtet. Anhand der Zahl der gebildeten Kolonien bezogen auf die unbehandelten Kontrollzellen ließ sich dann eine Aussage über die Zytotoxizität der Substanz treffen. Die Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit ist der aussagekräftigste der üblicherweise verwendeten Zytotoxizitätstests (Brown und Wouters, 1999).

Weder die gelöste Platinverbindung PtCl_4 , noch die untersuchten reinen Metallpartikel (Pd, Pt) waren im verwendeten Konzentrationsbereich stark zytotoxisch. Die Koloniebildungsfähigkeit nach 24 h Inkubation mit den Testsubstanzen lag stets bei über 70 % der Kontrolle. Die Al_2O_3 -Pt-Partikel zeigten in Konzentrationen bis $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ keine stark zytotoxische Wirkung, wie die Ergebnisse in Abb. 7 verdeutlichen.

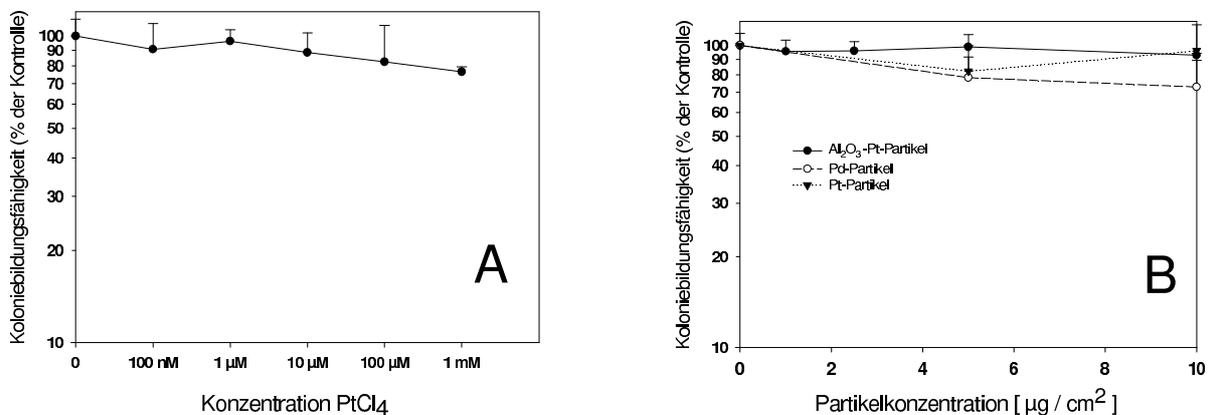


Abb. 7: Koloniebildungsfähigkeit von A549-Zellen nach 24 h Inkubation mit Prüfsubstanzen. Graphik A: gelöstes PtCl_4 , Graphik B: Pd-, Pt- und Al_2O_3 -Pt-Partikel. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens Dreifachbestimmungen + SD.

5.6 Internalisierung der Partikel

Eine ganze Reihe von Untersuchungen zeigten bereits, dass A549-Zellen prinzipiell Partikel mit einem Durchmesser von 50 nm – 10 μ m aufnehmen können (Stearns *et al.*, 2001; Foster *et al.*, 2001; Hetland *et al.*, 2001; Schins *et al.*, 2002; Wottrich, 2003). Die Aufnahme hängt jedoch von den jeweiligen Partikeln ab (Brück *et al.*, 2001). Daher war für den Fortgang der Arbeit entscheidend zu überprüfen, ob die untersuchten Partikel überhaupt in das Zellinnere gelangen können.

Ein zweifelsfreier Nachweis einer Partikelaufnahme in Zellen gilt als sehr schwierig. Er kann momentan nur durch zwei Methoden erfolgen, die konfokale Fluoreszenzmikroskopie und die optische oder Transmissionselektronenmikroskopie von fixierten Zellschnitten. Für erstere Methode eignen sich jedoch *per se* nur fluoreszenzaktive Partikel, üblicherweise handelt es sich dabei um markierte "Beads".

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die reinen Metallpartikel nur lichtmikroskopisch, die Al₂O₃-Pt-Partikel zusätzlich auch mit Elektronenmikroskopie untersucht.

5.6.1 Lichtmikroskopie

Man kann mit dem Auge und konventioneller Hellfeld-Mikroskopie bei starker Vergrößerung die Aufnahme von Pd-, Pt- und Al₂O₃-Pt-Partikeln in A549-Zellen wahrnehmen. Die photo-

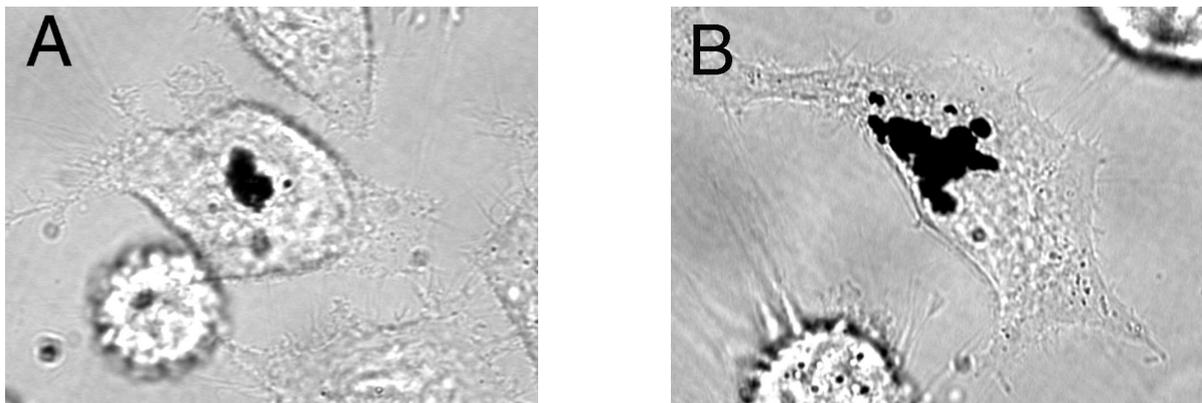


Abb. 8: A549-Zelle mit internalisierten Pt- (Bild A) und Pd-Partikeln (Bild B). Dunkle Bildteile stellen die Partikel dar. Vergrößerung: 1000fach.

grafische Dokumentation dieser Beobachtungen erwies sich aber als ungleich schwieriger. Mit den in Abb. 8 gezeigten Aufnahmen lässt sich auf Papier ausgedruckt nur schlecht beurteilen,

ob sich die als dunkle Punkte erkennbaren Partikel innerhalb der Zellen befinden oder nur an deren Oberfläche adheriert sind.

Bei geringerer Vergrößerung ist auch direkt am Mikroskop eine Aussage zur Partikelinternalisierung kaum mehr möglich. In Abb. 9 wird ein typischer Zell-Monolayer mit Pd- bzw. Al₂O₃-Pt-Partikeln bei 200facher Vergrößerung gezeigt. Eine Internalisierung ist nur schlecht erkennbar. Eine Ausnahme stellt die Aufnahme sehr großer Partikel dar, wie für die Pd-Partikel im Bild A gezeigt.

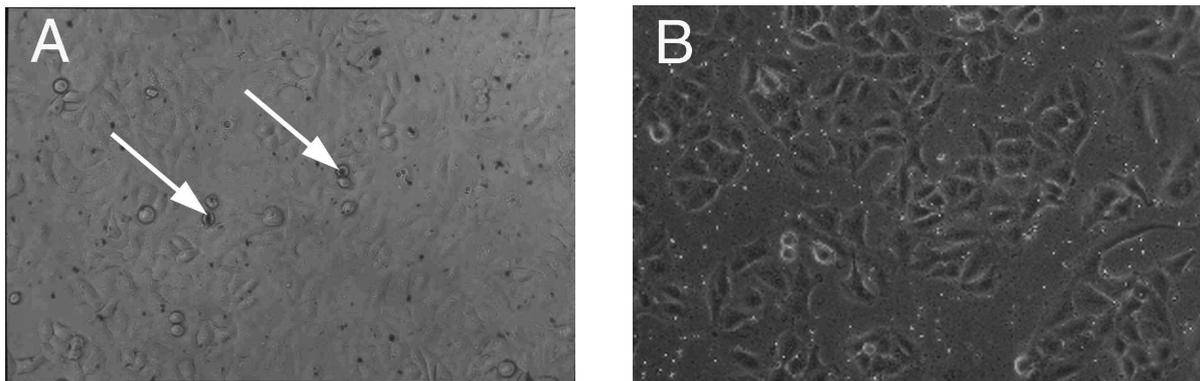


Abb. 9: A549-Zell-Monolayer mit Pd- (Bild A) und Al₂O₃-Pt-Partikeln (Bild B). Pfeile weisen in Abbildung A auf Zellen, die vermutlich Pd-Partikel aufgenommen haben. Vergrößerung: 200fach.

Die extreme Heterogenität der Aufnahme in Zellen war für alle lichtmikroskopisch beobachteten Partikel auffallend. Nur eine geringe Zahl (geschätzt $\leq 5\%$) der Zellen internalisierten sichtbar überhaupt Partikel. Sie füllten dann aber einen großen Anteil des jeweiligen Einzelzellvolumens aus. Diese Beobachtungen lassen sich leider nur schlecht dokumentieren (Abb. 10), da entweder bei hoher Vergrößerung die tatsächliche Internalisierung sichtbar ist, oder bei geringer Vergrößerung derselben Zellpopulation der Anteil vermutlich partikelhaltiger Zellen erkennbar wird.

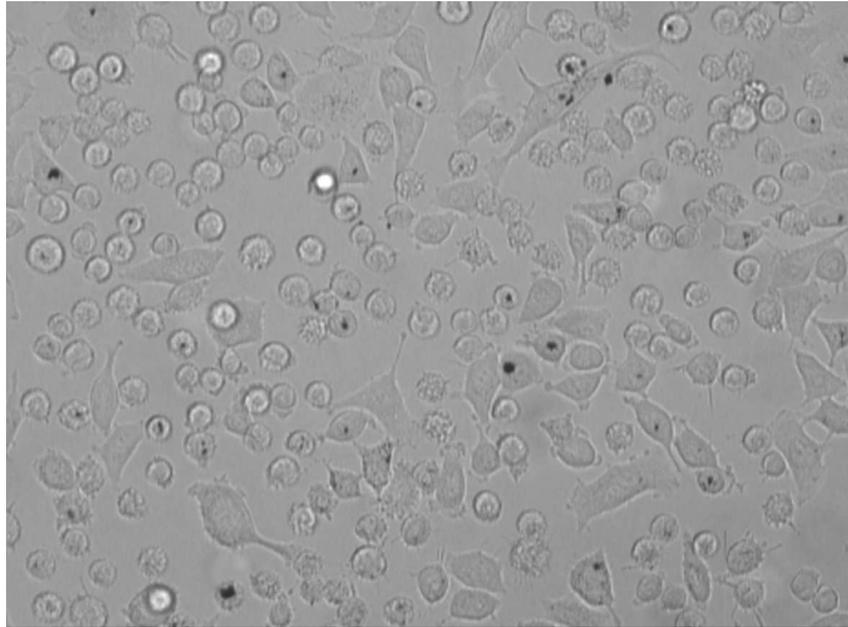


Abb. 10: Subkonfluentes A549-Zell-Monolayer mit reinen Pt-Partikeln. Die Zellen wurden 24 h mit den Partikeln inkubiert, dann abgewaschen und mikroskopiert. (Phasenkontrast-Aufnahme, Vergrößerung: 200fach).

5.6.2 Video-unterstützte Lichtmikroskopie

Bei Versuchen mit dem vom Forschungszentrum Karlsruhe bereitgestellten Videomikroskopie-System konnte mit Pd-Partikeln eine Serie von 90 Aufnahmen mit jeweils 10 s Abstand erstellt werden, die zusammen einen 15 Sekunden dauernden Zeitrafferfilm ergeben. Der Film kann gemeinsam mit der vorliegenden Dissertation vom Server der Universitätsbibliothek Karlsruhe heruntergeladen werden und trägt die Bezeichnung "ZellerVideoMikroskopie.avi". Im Film ist deutlich zu erkennen, dass eine A549-Zelle ein zirka 3 μm großes Pd-Partikel internalisiert hat. Im Zytoplasma der Zelle sind außerdem einige kleinere Partikel von zirka 0,5 μm Durchmesser zu erkennen, die sich mit der Zytoplasmaströmung zielgerichtet bewegen. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf ihre Lokalisierung innerhalb der Zelle.

Aufgrund der äußerst aufwändigen Versuchsdurchführung kann das Videomikroskopie-Verfahren leider nicht routinemäßig eingesetzt werden. Es beweist aber eindrucksvoll die Internalisierung der Partikel.

5.6.3 Transmissionselektronenmikroskopie

Wenn Zellen tatsächlich Partikel internalisiert haben, müssten sie in den Mikrotomschnitten der fixierten Harzpräparate vorzufinden sein. Dies war auch tatsächlich der Fall, ein Beweis für die Internalisierung der Al_2O_3 -Pt-Partikel durch A549-Zellen. Abb. 11 B und C zeigen beispielsweise die Kernregion sowie das Zytosol einer A549-Zelle nach Inkubation mit Al_2O_3 -Pt-Partikeln. Endozytierte Al_2O_3 -Pt-Partikel sind als kreisrunde elektronendichte, also dunkle, Regionen zu erkennen. Auf dem Bild der Negativkontrolle (Abb. 11 A) sind diese elektronendichten Stellen nicht zu sehen.

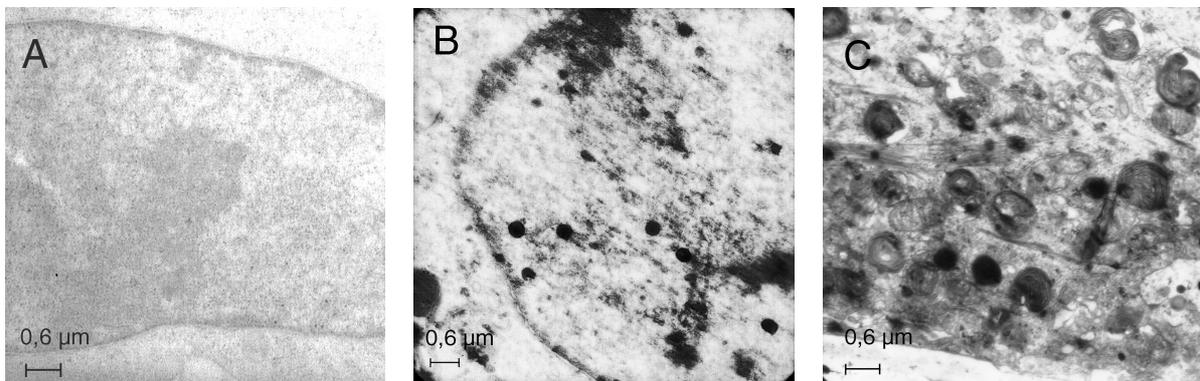


Abb. 11: Ultradünnschnitte durch A549-Zellen. Bild A: Kontrolle, Bild B: Kernregion nach 24 h Inkubation mit Al_2O_3 -Pt-Partikeln, Bild C: Zytosol nach 24 h Inkubation mit Al_2O_3 -Pt-Partikeln. Jeweils zirka 100 nm dicke Schnitte nach Fixierung mit Glutaraldehyd / OsO_4 , Einbettung in Spurr-Harz und Kontrastierung mit Uranylacetat. Graue Bereiche im Bild C sind Mitochondrien. Vergrößerung 12000fach, Balken geben 0,6 μm an.

Bei der Betrachtung der TEM-Aufnahmen fiel jedoch auf, dass in der Mehrzahl der untersuchten Ultradünnschnitte keine elektronendichten Stellen, also internalisierte Partikel, nachweisbar waren (nicht gezeigt). Das gemessen an der eingesetzten Partikelzahl seltene Auftreten von Partikeln in Zellschnitten beruht wahrscheinlich auf der bereits beschriebenen inhomogenen Verteilung der Partikelaufnahme innerhalb der Zellpopulation. Außerdem könnte eine apparative Einschränkung beteiligt sein. So sind für die TEM höchstens 100 nm dicke Zellschnitte möglich, sonst können sie von dem Elektronenstrahl nicht durchdrungen werden. Beim Schneiden dieser Ultradünnschnitte werden die harten Al_2O_3 -Pt-Partikel unter Umständen nicht mitgeschnitten, sondern werden vom Mikrotom-Messer aus den Harzblöcken "herausgedrückt" und gehen wie von Hetland *et al.* (2001) beschrieben, verloren. So können lediglich in Ausnahmefällen vereinzelte, noch kleinere Partikel in den Schnitten nachgewiesen werden.

Zusammengefasst ist die Aussagekraft der verwendeten lichtmikroskopischen Methoden begrenzt. Für einzelne Pt-, Pd- und Al₂O₃-Pt-Partikel konnte eine Internalisierung erkannt und auch in begrenztem Umfang dokumentiert werden. So gelang sogar die Aufnahme eines Zeitrasterfilms von Pd-Partikel-Bewegungen innerhalb von Zellen. Eine Quantifizierung durch Angabe eines "Phagozytose-Index", als Anteil partikelhaltiger Zellen an der Gesamtzellzahl, war jedoch nicht möglich.

Auch die Transmissionselektronenmikroskopie von Zellschnitten nach Al₂O₃-Pt-Partikel-Exposition beweist deren Internalisierung, lässt aber keine detaillierte Aussage zu. Die einzige denkbare Möglichkeit einer genaueren Untersuchung der Internalisierung von harten Partikeln mit einem Durchmesser zwischen 0,5 und 1,5 µm ist die Lichtmikroskopie von mehreren Mikrometer dicken Schnitten der in Harz fixierten Zellen (Schins *et al.*, 2002). Leider stand eine solche Methode beim Anfertigen der Arbeit nicht zur Verfügung.

Qualitativ betrachtet werden alle eingesetzten Partikelsorten von den A549-Zellen internalisiert, die Partikelaufnahme ist jedoch ungleichmäßig über die Zellpopulation verteilt. Auf Basis der lichtmikroskopischen Beobachtungen wurde geschätzt, dass zirka 1 % der Zellen Partikel aufgenommen haben.

5.7 PGE-Gehalt von zellulärer DNA

Zur zuverlässigen Bestimmung der PGE-Konzentration in DNA wurde ein geeignetes Testsystem etabliert und optimiert. Es basiert auf einer schonenden und gleichzeitig schnellen Methode zur DNA-Isolierung aus Zellen. Sie beruht auf einem weit verbreiteten Verfahren und wurde so modifiziert, dass möglichst viele Proben parallel aufgearbeitet werden konnten. Zum Testsystem gehört die anschließende Bestimmung der DNA-Ausbeute, die vollständige Mineralisierung und die empfindliche Messung des PGE-Gehalts mit einem ICP-MS-Gerät.

5.7.1 DNA-Isolierung aus kultivierten Zellen

Die Zellen wurden mit den Prüfsubstanzen inkubiert und nach maximal 30 h wieder abgewaschen. Dann wurden die Zellen von der Kulturschale abgelöst, die DNA mit dem unter Abschnitt 4.8.1 beschriebenen Phenol-Chloroform-Verfahren isoliert und die Ausbeute photometrisch bestimmt.

Die Quotienten A_{260}/A_{280} sowie A_{260}/A_{230} geben Aufschluss über die Reinheit der DNA. Reine, proteinfreie DNA hat ein Verhältnis $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$ und ein Verhältnis $A_{260}/A_{230} \geq 2,0$. Allerdings gibt es Zweifel an der Aussagekraft dieser photometrischen Methode (Wilfinger *et al.*, 1997). Eine eventuelle Verunreinigung mit Proteinen wurde daher zusätzlich mit dem Bradford-Verfahren (siehe 4.12.1) überprüft. Eine Kontamination mit RNA, z.B. durch unvollständigen Verdau mit RNase, wurde durch RT-PCR (Reverse Transkriptase - Polymerasekettenreaktion) nach dem in Ehleben (2002) angegebenen Protokoll überprüft.

Mit der verwendeten Zellzahl von 7×10^6 erbrachte die DNA-Isolierung durchschnittlich $108 \pm 21 \mu\text{g}$ DNA mit einem Verhältnis A_{260}/A_{280} von $1,83 \pm 0,04$ und einem Verhältnis A_{260}/A_{230} von $2,73 \pm 0,25$.

Kontaminationen durch Proteine oder RNA konnten auch mit dem Bradford-Proteinassay bzw. RT-PCR (siehe 4.12.1 und 4.8.1) nicht nachgewiesen werden. Zu dieser Problematik muss jedoch auf Punkt 5.9 verwiesen werden.

5.7.2 Bestimmung des PGE-Gehalts der Proben

Nach der Veraschung der Proben wurde ihr PGE-Gehalt gemessen. Dabei konnte trotz der schwierigen Matrix mit hohem Salzgehalt eine robuste und sensitive ICP-MS-Methode etabliert werden. Ihre instrumentelle Nachweisgrenze bei Massenauflösung $R = 400$ berechnet über das 3σ -Kriterium nach DIN EN ISO 11885 lag bei $1,3 \text{ ng/l}$ für Pt bzw. $3,3 \text{ ng/l}$ für Pd. Die relativen Standardabweichungen der aus den drei Isotopen gebildeten Mittelwerte der Einzelmessungen für eine Probe lagen für 91 % der Proben unter 3 %, bei 39 % der Proben sogar unter 1 % (Stüben *et al.*, 2003).

Bei einer typischen Ausbeute der DNA-Isolierung aus 7×10^6 Zellen von $108 \mu\text{g}$ entsprechen die PGE-Konzentrationen der obengenannten Nachweisgrenzen zirka 20 Pt- bzw. 80 Pd-Addukten pro 10^8 DNA-Basenpaaren und damit 1200 bzw. 4800 Addukten pro Zelle.

5.7.3 Reine Pd- und Pt-Partikel

In Versuchen mit reinen Metallpartikeln wurde zunächst die grundsätzliche Durchführbarkeit der Methode überprüft. Dazu wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an reinen, kommerziell erhältlichen Pt- und Pd-Partikeln inkubiert. Außerdem wurden sie für verschiedene Zeiträume einer konstanten Konzentration an Pd-Partikeln ausgesetzt.

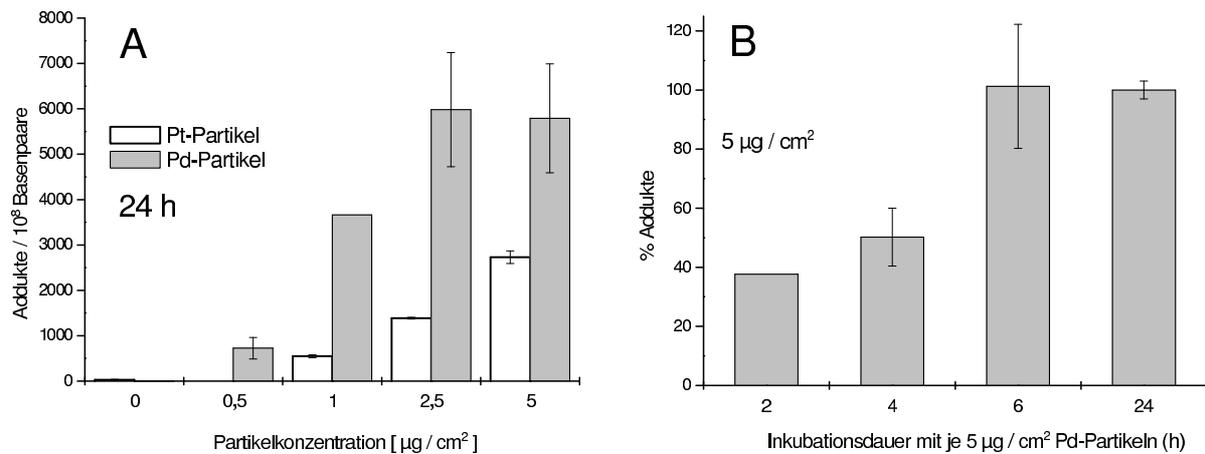


Abb. 12: DNA-Addukte in A549-Zellen nach Inkubation mit reinen Pt- und Pd-Partikeln. Graphik A: DNA-Addukte in A549-Zellen nach 24 h Inkubation mit Pt- oder Pd-Partikeln. Graphik B: Zeitabhängigkeit der Adduktbildung normiert auf 24 h-Wert. Dargestellt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen, Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Abb. 12 A zeigt die konzentrationsabhängige Zunahme der Zahl der Metall-Addukte nach 24 h Inkubation von A549-Zellen mit Partikeln aus reinem Platin und reinem Palladium. Die Suspensionen der reinen Metallpartikel sind sehr instabil. Sie neigen zur Agglomeration und sedimentieren schnell, so dass eine präzise Dosierung schwierig ist.

Dennoch lässt sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen eingesetzter Konzentration und Adduktzahl sowohl mit Pt- als auch mit Pd-Partikeln erkennen. Die Ergebnisse konnten in weiteren Versuchen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Dabei fiel auf, dass Pd bei gleicher Konzentration jeweils eine stärkere Wirkung als Pt erzeugte. Eine höhere Bioverfügbarkeit des Palladiums wie von Sures *et al.* (2002) beschrieben, lässt sich wegen der unterschiedlichen Teilchendurchmesser der Pt- und Pd-Partikel hieraus aber nicht ableiten.

Eine Zunahme der Adduktzahlen mit der Partikelkonzentration wäre wahrscheinlich auch gegeben, wenn die Addukte nicht aus der Inkubation mit den Partikeln selbst, sondern aus dem Aufarbeitungsprozess resultieren würden. Vorstellbar wäre z. B. eine Verschleppung der Partikel infolge unzureichendem Abwaschen der Zellen. Dass dies aber nicht der Fall ist, zeigt der zeitliche Verlauf der Adduktbildung. Wie in Abb. 12 B gezeigt wird, haben sich bereits nach 2 bis 4 h, 40 bzw 50 % der Addukte bezogen auf den 24 h-Wert gebildet, weitere 2 h später ist der Anteil auf 100 % gestiegen.

5.7.4 Al₂O₃-Pt-Modellpartikel

Die bisher verwendeten Metallpartikel sind, wie bereits in Abschnitt 4.2 beschrieben, nur sehr bedingt geeignet, um Aussagen über das genotoxische Potenzial von tatsächlich aus Katalysatoren emittierten Partikeln zu treffen. Daher wurden alle weiteren Versuche mit den Al₂O₃-Pt-Partikeln durchgeführt, die diesbezüglich eine hervorragendes Modell darstellen.

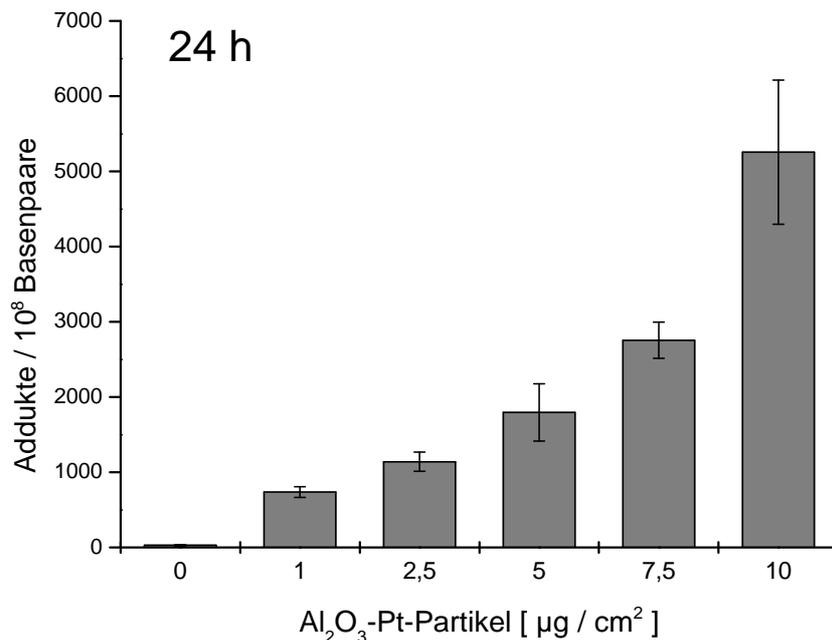


Abb. 13: Konzentrationsabhängigkeit der Adduktbildung. A549-Zellen wurden 24 h mit Al₂O₃-Pt-Partikeln inkubiert, anschließend die DNA isoliert und ihr Pt-Gehalt mittels ICP-MS bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen ± SD.

Konzentrationsabhängigkeit der Adduktbildung Die 24stündige Inkubation von A549-Zellen mit 1 – 10 µg Al₂O₃-Pt-Partikeln / cm² führt, wie in Abb. 13 dargestellt, zur konzentrationsabhängigen Bildung von zirka 700 bis über 5000 Pt-Addukten / 10⁸ Basenpaaren. Damit induzieren sie in den Zellen eine ähnlich große Zahl an Pt-DNA-Addukten wie die reinen Pt-Metallpartikel, obwohl die Al₂O₃-Pt-Partikel nur zu 3 % (w/w) aus Pt bestehen. Das feiner verteilte Platin der Katalysator-Modellpartikel ist also rund 30-mal besser bioverfügbar. Diese

Zahl stimmt gut mit dem Löslichkeitsunterschied überein (siehe Punkt 5.3).

Der große Einfluss der PGE-Partikelgröße auf die Bioverfügbarkeit und damit auch das genotoxische Potenzial macht deutlich, dass praxisrelevante Untersuchungen nur mit Modellpartikeln erfolgen können, die den realen Katalysator-Partikeln weitestmöglich entsprechen.

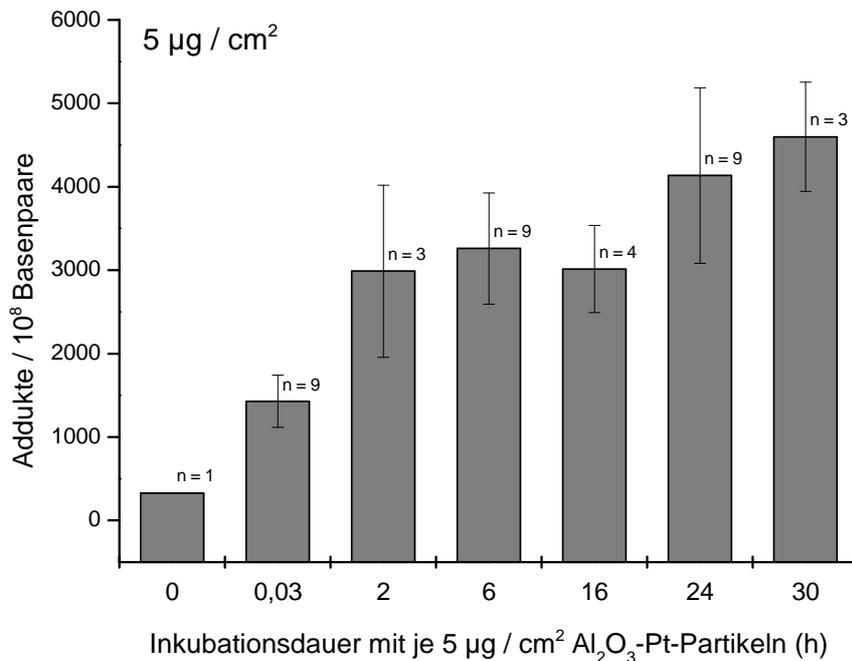


Abb. 14: Zeitabhängigkeit der Adduktbildung. Pt-Addukte an DNA von A549-Zellen nach Inkubation mit konstanter Menge ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) Al_2O_3 -Pt-Partikeln. Dargestellt sind Mittelwerte aus Mehrfachbestimmungen (n = Anzahl der Bestimmungen), Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die Werte bei 2 bis 30 h unterscheiden sich signifikant von den Werten bei 0,03 h (= 2 min): Student's t-Test jeweils $p \leq 0,006$.

Zeitabhängigkeit der Adduktbildung Die in Abb. 14 dargestellten Daten zeigen die zeitabhängige Bildung von DNA-Addukten nach Inkubation von A549-Zellen mit Al_2O_3 -Pt-Partikeln. Auch hier kann daraus geschlossen werden, dass es sich bei den Pt-DNA-Addukten nicht um experimentelle Artefakte handelt. Die Zunahme der Adduktzahl geschieht innerhalb der ersten beiden Stunden sehr schnell und verlangsamt sich dann. Die Werte nach 2 h Inkubation unterscheiden sich statistisch nicht mehr signifikant³ von den folgenden. Man kann

³Student's t-Test $p \geq 0,08$.

von der Bildung einer Art "Plateau" sprechen. Über die Ursache für diese Sättigung der Adduktbildung kann nur spekuliert werden. Möglicherweise werden die Addukte von zellulären Systemen repariert, und es bildet sich ein Fließgleichgewicht zwischen Adduktentstehung und Reparatur. Vorstellbar wäre aber auch die Sättigung eines aktiven Pt-Transports bzw. einer passiven Pt-Wanderung zum Kern. Die Plateaubildung lässt sich nicht mit einer Zunahme der DNA-Menge und daraus resultierender Abnahme des Verhältnisses Pt/DNA im Verlauf des Zellzyklusses erklären. Die isolierte DNA-Menge bleibt im Versuchsverlauf praktisch konstant.

5.7.5 Gelöste Platinspezies

Der Vergleich zwischen partikulären und gelösten Pt-Spezies war ein entscheidender Punkt der Arbeit. So wurde untersucht, ob die nachgewiesenen Pt-Addukte aus einer Internalisierung der Partikel oder aus der Aufnahme bereits gelöster Spezies in die Zellen resultieren.

Als lösliche Platinverbindungen wurden Cisplatin sowie Platintetrachlorid (PtCl_4) eingesetzt. Das Pt-Atom im Cisplatin-Molekül hat die Oxidationsstufe +2, während Pt in Platintetrachlorid vierwertig ist und damit der vermutlichen Oxidationsstufe des oxidierten Platinanteils in tatsächlich von Katalysatoren emittierten Partikeln entspricht (Schlögl *et al.*, 1987). Pt^{4+} kann im Körper z. B. durch Glutathion (GSH) zu Pt^{2+} reduziert werden und wird für die Anwendung in neuen, oral einsetzbaren Platin-Medikamenten getestet (Natile und Coluccia, 2001). Die bei der Partikel-Auflösung entstehenden Pt-Spezies könnten sich aber auch vom PtCl_4 unterscheiden. Aus diesem Grund wurde zusätzlich ein Versuch mit bereits gelösten Al_2O_3 -Pt-Partikeln durchgeführt. Dazu wurden, wie in Abschnitt 4.3.2 beschrieben, Zellen mit dem Zentrifugationsüberstand von Partikel-Lösungsversuchen ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) inkubiert und nach 24 h analog den unter Punkt 5.7.4 beschriebenen Versuchen die DNA isoliert und ihr Pt-Gehalt gemessen.

Die in Abb. 15 dargestellten Resultate zeigen, dass die nach Partikelexposition gemessenen Adduktzahlen erst nach Inkubation mit sehr großen Konzentrationen an gelöstem PtCl_4 erreicht werden (siehe Abb. 13 und 14). Eine 1 mM Lösung erzeugt ungefähr genauso viele Pt-DNA-Addukte wie $10 \mu\text{g Al}_2\text{O}_3\text{-Pt-Partikel} / \text{cm}^2$. Im Fall der Partikel enthält das Zellkulturmedium dann aber nur 136 nmol Pt/l, also rund 7400 mal weniger (siehe Kapitel 5.3).

Der Zentrifugationsüberstand, also das gelöste Platin aus den Partikeln, induzierte lediglich 145 Addukte / 10^8 Basenpaare. Das ist in Übereinstimmung mit den weiter oben angeführ-

ten Resultaten ein deutlicher Hinweis darauf, dass der überwiegende Teil der Pt-Addukte an die DNA aus einer Partikelinternalisierung und nicht aus der Aufnahme bereits gelöster Metalle herrührt. Die Endozytose ist also ein wesentlicher Aspekt der Toxizität von Pt-haltigen Partikeln.

Der Einfluss der eingesetzten Pt-Spezies zeigt sich auch beim Vergleich mit Cisplatin. Die 24stündige Inkubation der Zellen mit einer 10 μM Cisplatin-Lösung induziert zirka 1000 Addukte / 10^8 Basenpaare. Das ist mehr als das Zwölfwache der Werte beim PtCl_4 , vermutlich weil die ungeladenen Cisplatin-Moleküle besser als die Pt-Ionen durch die Zellmembran diffundieren können.

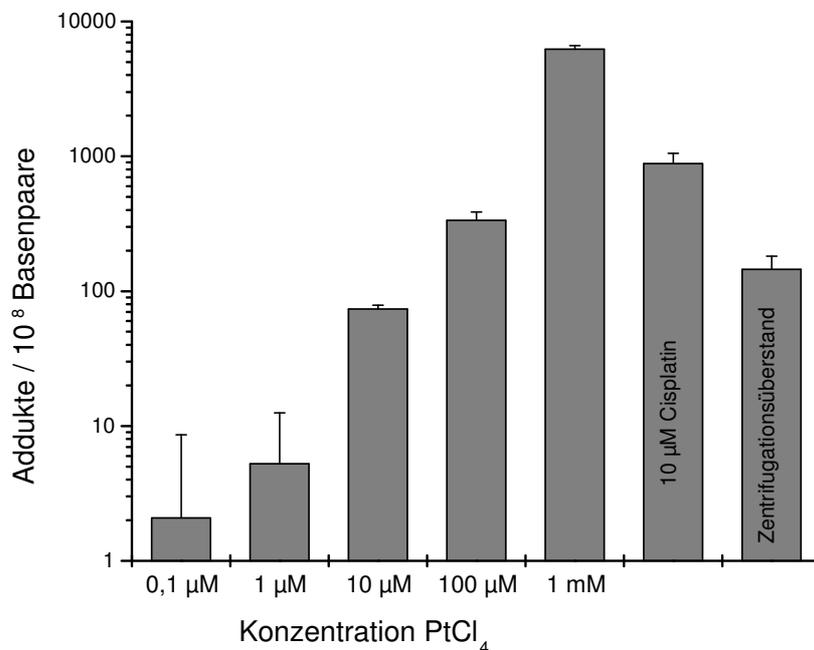


Abb. 15: Pt-DNA-Addukte in A549-Zellen nach 24 h Inkubation mit gelöstem PtCl_4 und Cisplatin bzw. Zentrifugationsüberstand aus Partikel-Löslichkeitsversuchen. Gezeigt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen, Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Man beachte die halblogarithmische Darstellung.

5.8 Resistenz der Addukte gegenüber Zyanid

Die bisher beschriebenen Ergebnisse zeigen eine konzentrations- und zeitabhängige Induktion von DNA-Addukten durch PGE-haltige Partikel. Allerdings lassen sie offen, auf welche Art und Weise die Metalle an DNA gebunden sind. Vorstellbar wären z. B. eine kovalente Bindung, oder eine elektrostatische Wechselwirkung der Metallkationen mit dem polyanionischen DNA-Rückgrat (Clarke *et al.*, 1999). Es ist für die toxikologische Beurteilung von entscheidender Relevanz, Aussagen über die Bindungsart treffen zu können.

Aus Versuchen mit dem Chemotherapeutikum Cisplatin ist bekannt, dass Platinaddukte an die DNA teilweise äußerst stabil sind und nur durch sehr starke Nukleophile wieder von ihr abgelöst werden können. Die dazu verwendeten Zyanid-Ionen CN^- bilden mit Platin den extrem stabilen Komplex $[\text{Pt}(\text{CN})_4]^{2-}$ ($K_s = 10^{41}$). Bei den hier vorgestellten Untersuchungen wurde daher ein Vergleich zwischen den sehr genau charakterisierten Cisplatin-DNA-Addukten und den durch Partikel induzierten Addukten durchgeführt (Jamieson und Lippard, 1999; Bauer *et al.*, 1978).

Zu diesem Zweck wurden Zellen mit Cisplatin oder den Al_2O_3 -Pt-Partikeln inkubiert, die DNA isoliert und anschließend mit Zyanid umgesetzt. Entstandene Zyanid-Pt-Komplexe wurden abgewaschen und der Rest-Platingehalt der DNA mit ICP-MS quantifiziert (siehe 4.9).

Die Methode konnte etabliert und entsprechende Experimente erfolgreich durchgeführt werden. Die Zyanid-Ionen führten nicht zu photometrisch messbaren Schäden der DNA. Auch den Literaturangaben zufolge wird DNA nicht durch CN^- angegriffen und es entstehen keine Schäden wie z.B. Strangbrüche (Olinski *et al.*, 1992).

Abb. 16 demonstriert die Resistenz der Addukte gegenüber Zyanid-Ionen. Wie von Lemaire *et al.* (1991) beschrieben sind die verschiedenen Cisplatin-DNA-Addukte teilweise von enormer Stabilität gegenüber nukleophilen bzw. komplexbildenden Reagenzien. Selbst in mehr als 160 mM Zyanidlösung lassen sich nur maximal 40 % der Addukte von der DNA ablösen. Vermutlich ist ein nukleophiler Angriff durch CN^- -Ionen auf bestimmte Addukte von den exozyklischen Sauerstoffatomen benachbarter Thyminbasen sterisch gehemmt (Frommer und Lippert, 1990). Die Kurve zeigt bei 100 mM einen Knick; das bestätigt mit ähnlichen CN^- -Konzentrationen (200 mM) erzielte Ergebnisse, denen zufolge die verschiedenen Cisplatin-Addukte auch unterschiedlich resistent gegenüber Zyanid sind (Decoville *et al.*, 1993).

Bei den aus Al_2O_3 -Pt-Partikel-Exposition resultierenden Addukten bietet sich ein anderes Bild. Ein deutlich größerer Anteil der Addukte kann abgelöst werden, aber auch hier verbleibt

ein Rest von zirka 20 % nach Inkubation in 166 mM CN^- an der DNA. Dieser Teil der Addukte ist also ähnlich resistent gegenüber Zyanid wie die Cisplatin-Addukte. Der Verlauf der als graue Linie dargestellten Kurve ist im Anfangsbereich bis 20 mM CN^- deutlich steiler als beim Cisplatin und knickt dann ab. Das deutet darauf hin, dass auch hier mindestens zwei verschiedene Addukte gebildet werden: ein gegen CN^- relativ empfindliches und ein stabileres, das aber bei Weitem nicht so persistent wie das entsprechende Cisplatin-Addukt ist. Um die Addukte näher zu charakterisieren, wurden Experimente mit dem Komplexbildner Ethylendiamintetraacetat (EDTA) und dem im Gegensatz zum "harten" Zyanid "weichen" Nukleophil Thioharnstoff durchgeführt. Sie erbrachten leider keine befriedigenden Ergebnisse. Das Vorhandensein von mindestens zwei verschiedenen Addukten könnte jedoch mit Hilfe von NMR-Spektroskopie der ^{195}Pt - bzw. ^1H -Kerne näher aufgeklärt werden (Hartwig und Lippard, 1992; Comess *et al.*, 1990).

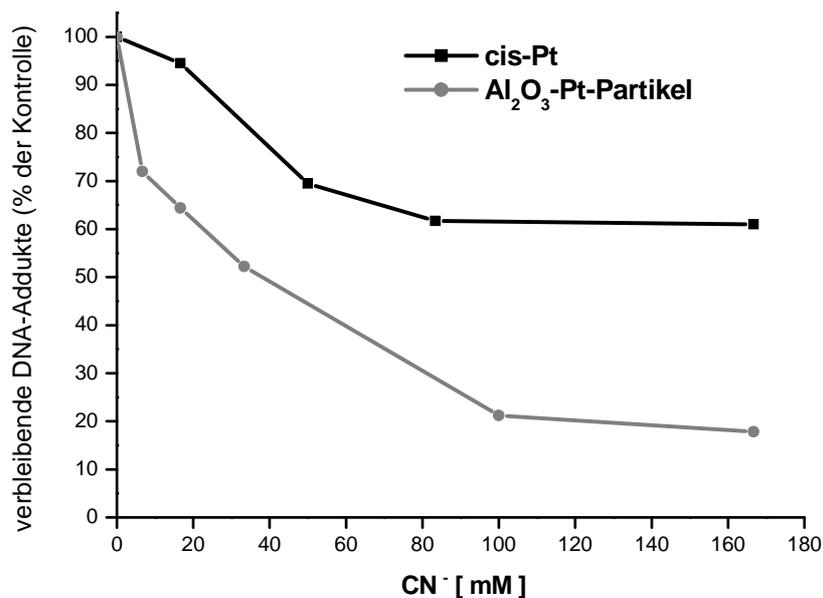


Abb. 16: Resistenz der Addukte aus Cisplatin- und Al_2O_3 -Pt-Partikel-Exposition der Zellen gegenüber CN^- . Adduktierte DNA wurde aus Zellen isoliert, mit CN^- behandelt und nach dem Abwaschen der Zyanid-Pt-Komplexe das verbleibende Pt mit ICP-MS bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse je eines Versuchs; vergleichbare Effekte wurden in Wiederholungsversuchen beobachtet.

Die angeführten Resultate lassen zusammengefasst den Schluss zu, dass es nach Cisplatin- und Partikelexposition der Zellen jeweils zur Bildung verschiedener Addukte kommt. In beiden Fällen ist aber mindestens eine Fraktion dieser Addukte vollkommen resistent gegenüber einem nukleophilen Angriff durch Zyanid-Ionen. Insgesamt sind die Partikel-induzierten Addukte deutlich empfindlicher gegenüber CN^- als die Cisplatin-Addukte.

5.9 Bindungsort an der DNA

Etwa 80 % der Cisplatin-DNA-Addukte betreffen die Purinbasen Desoxyguanin und Desoxyadenin. Um eine mögliche Basenspezifität der durch Al_2O_3 -Pt-Partikel entstandenen Addukte zu untersuchen, wurde die DNA enzymatisch verdaut, auf der Nukleosidebene mit HPLC getrennt und der Pt-Gehalt im Eluat gemessen⁴.

Wie Fichtinger-Schepman *et al.* (1985) mit Hilfe von präparativer HPLC in Kombination mit AAS herausgefunden haben, kommt es im Fall einer *in vitro* Umsetzung von Kalbsthymus-DNA mit Cisplatin hauptsächlich zur Bildung von folgenden Addukten: dG-Pt-dG (50 %) und dA-Pt-dG (28 %), sowie zu einer Reihe weiterer Addukte mit Anteilen unter 10 %. Wegen der vergleichsweise geringen Empfindlichkeit der AAS musste bei diesen Experimenten jedoch DNA verwendet werden, die $3,2 \times 10^6$ Pt-Addukte / 10^8 Basenpaare enthielt. Durch Anwendung von ICP-MS anstelle von AAS waren immer noch 2×10^6 Pt-Addukte / 10^8 Basenpaare für eine Bestimmung nötig (Morrison *et al.*, 1993). Erst durch Einsatz radioaktiver Isotope und RP-HPLC (RP = Umkehrphase) konnte der für die Analyse benötigte Pt-Gehalt der DNA auf 50 000 Addukte / 10^8 Basenpaare erniedrigt werden (Eastman, 1983). Auch für zelluläre DNA konnte mit der Radioisotopenmethode eine Adduktcharakterisierung erfolgen (Eastman, 1991).

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden keine radioaktiven Isotope eingesetzt, doch bestand die Hoffnung, mit moderner ICP-MS-Technologie die Nachweisgrenze für diese Art von Experiment deutlich zu senken. Dazu wurde eine Kombination der Trennmethode von Eastman (RP-HPLC) mit einem hochauflösenden ICP-MS-Gerät angewandt.

In Vorversuchen zeigte sich jedoch, dass die Empfindlichkeit des ICP-MS-Verfahrens nicht ausreicht, um den Platingehalt direkt im Eluat zu messen. Daher wurden Fraktionen mit je-

⁴In diesem Kapitel verwendete Abkürzungen: dA = Desoxyadenosin, dC = Desoxycytidin, dG = Desoxyguanin, dT = Desoxythymidin, rA = Adenosin, rC = Cytidin, rG = Guanosin, rU = Uridin.

weils gleicher Retentionszeit vereinigt und durch Trocknen bei 80 °C aufkonzentriert. Die Retentionszeiten der Nucleoside waren, wie aus Tab. 5 zu erkennen, ausreichend konstant um diese Vorgehensweise, genannt "Poolen", zu erlauben. Die Verwendung des flüchtigen Puffers Ammoniumacetat erniedrigte dabei die Salzbelastung der ICP-MS-Anlage. Bei einer Salzkonzentration $\geq 0,5\%$ muss deren Einlasssystem sonst unverhältnismäßig oft gereinigt werden, und es kann zu Matrixeffekten kommen. Eine eventuell verringerte Messpräzision durch den erhöhten Salzgehalt wäre am Signal des internen Standards erkennbar.

5.9.1 Chromatographisches System

Die Nucleoside wurden mit einem Gynkotek-HPLC-System an einer Eurospher 100 RP-18-Säule isokratisch getrennt. Als Eluent wurde ein NH_4Ac -Puffer / Methanol-Gemisch verwendet. Die Peakreinheit wurde über das optische Absorptionsverhältnis bei 254 und 280 nm bestimmt.

Tabelle 4: Retentionszeiten und Absorptionsverhältnisse der Referenzsubstanzen. Retentionszeit = t_{ret} (in Minuten), Variationskoeffizient = VK (in %), optisches Absorptionsverhältnis = $A_{254/280}$ (Wellenlängen in nm), Abkürzungen der Nucleoside siehe Abkürzungsverzeichnis.

Peak	t_{ret} (min)	VK (%)	$A_{254 \text{ nm} / 280 \text{ nm}}$	VK (%)
rC	3,33	0,41	0,94	0,94
rU	3,58	1,37	1,97	6,05
dC	3,62	0,49	0,89	0,81
Salz	3,97	0,40	2,15	15,36
rG	4,37	0,85	1,55	1,23
dG	5,04	0,73	1,61	2,07
dT	5,45	0,61	0,98	8,63
rA	7,58	1,17	3,70	7,84
dA	9,61	1,14	3,93	2,01

Die in Tab. 4 dargestellten Daten veranschaulichen die Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten (Variationskoeffizient $\leq 2\%$) und Absorptionsverhältnisse der Nucleosid-Standards. Das gewählte System ist zur Trennung der Desoxyribonucleoside hervorragend geeignet. Selbst die beiden am schlechtesten getrennten Desoxyribonucleosid-Peaks dG und dT eluieren mit

25 s Abstand voneinander. Das Salz stammt aus dem Verdau sowie aus dem Rücksäuerungs-Schritt.

Auch nach Inkubation mit Cisplatin änderte sich die Retentionszeit der Nukleosidstandards nicht (Daten nicht gezeigt). Ein Einfluss von gebundenem Platin auf das chromatographische Verhalten der Nukleoside ist also nicht gegeben.

5.9.2 Enzymatischer Verdau

Wie die in Abb. 17 dargestellten Chromatogramme zeigen, gelang sowohl bei Kalbsthymus-DNA als auch bei aus A549-Zellen isolierter DNA der enzymatische Verdau in einzelne Nukleoside und deren chromatographische Trennung. Die einzelnen Nukleoside wurden anhand von Kochromatographie mit Vergleichssubstanzen und anhand ihrer Absorptionsverhältnisse bei 254/280 nm identifiziert. Tab. 5 gibt einen Überblick der chromatografischen Daten der einzelnen Nukleoside aus dem Verdau von DNA im Vergleich mit kommerziellen Nukleosidstandards.

Mehrere Autoren berichten von einer Deaminase-Kontamination der käuflichen alkalischen Phosphatase (Singhal und Landes, 1988; Gehrke *et al.*, 1984; Iwasaki *et al.*, 1985). Die während dieser Arbeit benutzte Charge des Enzyms wurde daraufhin überprüft, eine entsprechende Kontamination war nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

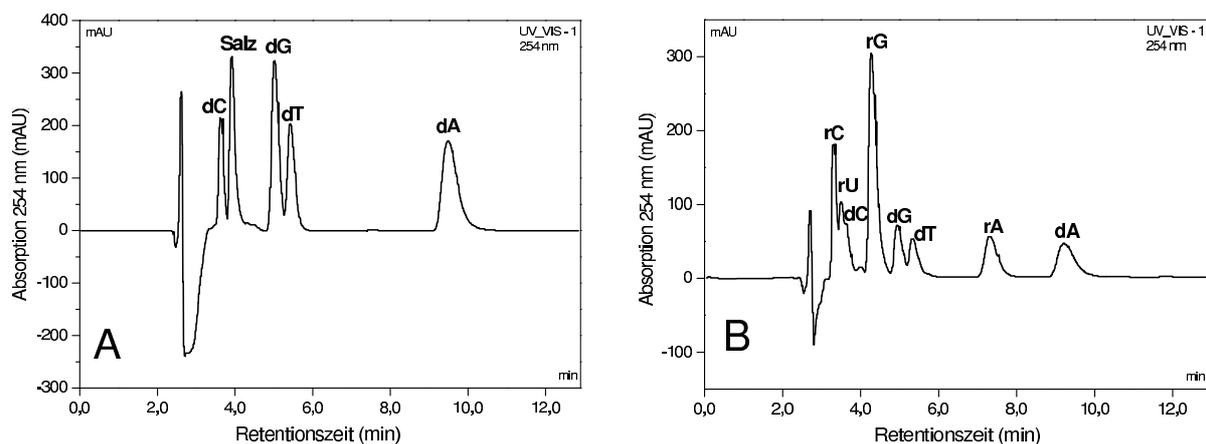


Abb. 17: HPLC-Chromatogramme. Graphik A: Kalbsthymus-DNA, Graphik B: A549-DNA, isoliert mit der unter 4.8.1 beschriebenen Phenol-Chloroform-Methode. Man beachte die zusätzlichen Ribonukleosid-Peaks im Chromatogramm B. Abkürzungen der Nukleoside siehe Abkürzungsverzeichnis.

Auftreten von Ribonukleosiden Wie man aus Abb. 17 A und B erkennen kann, enthält die mit der in Abschnitt 4.8.1 beschriebenen Methode aus Zellen isolierte DNA im Vergleich zur gekauften DNA zusätzliche Peaks. Sie konnten anhand von Retentionszeit und photometrischem Absorptionsverhältnis bei 254/280 nm als Ribonukleoside identifiziert werden. Trotz der mehrfach mit RT-PCR durchgeführten Untersuchungen auf RNA (alle negativ), enthält die aus A549 isolierte DNA also Ribonukleoside. Ein aus dem Verdau resultierender Artefakt konnte ausgeschlossen werden, da die Ribonukleoside weder beim Verdau von Kalbsthymus-DNA, noch bei der Inkubation von Referenz-Nukleosiden mit den Verdauenzymen auftraten (Daten nicht gezeigt). Offensichtlich hat das bei der Aufarbeitung der Zellen verwendete Enzym RNase die zelluläre RNA soweit abgebaut, dass mit RT-PCR keine hochmolekulare RNA mehr nachweisbar war. Bei der anschließenden Ethanol-fällung wurden, in Widerspruch zu Angaben in der Literatur, wohl Abbauprodukte der RNase verschleppt (Sambrook *et al.*, 1989; Mülhardt, 2002). Sie konnten erst mit Hilfe der HPLC nachgewiesen werden.

Das Verhältnis DNA / RNA-stämmiger Nukleoside wurde anhand des Peakflächenverhältnisses der beiden am besten getrennten Nukleoside dA / rA quantifiziert. Dabei zeigte sich, dass bei typischen Versuchen zirka 50 % der isolierten Nukleinsäure-Menge aus RNA bestand.

Bezüglich der Konsequenzen aus diesen Ergebnissen sei auf Punkt 5.10 verwiesen.

Tabelle 5: Retentionszeiten und Absorptionsverhältnisse der Nukleosidstandards im Vergleich zu Verdauprodukten aus zellulärer DNA. Std. = Nukleosidstandard, Retentionszeit = t_{ret} (in Minuten), Variationskoeffizient = VK (in %), optisches Absorptionsverhältnis = $A_{254/280}$ (Wellenlängen in nm), weitere Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis. Δ = Differenz der beiden jeweils links nebenstehenden Werte in %.

Peak	t_{ret} Std. (min)	t_{ret} Probe (min)	Δ (%)	$A_{254/280}$ Std	$A_{254/280}$ Probe	Δ (%)
rC	3,33	3,29	-1,27	0,94	0,84	-11,75
rU	3,58	3,50	-2,33	1,97	1,74	-12,13
dC	3,62	3,61	-0,33	0,89	0,94	5,13
Salz	3,97	4,00	0,77	2,15	2,14	-0,28
rG	4,37	4,30	-1,79	1,55	1,64	5,34
dG	5,04	4,96	-1,72	1,61	1,63	0,98
dT	5,45	5,38	-1,44	0,98	1,02	4,27
rA	7,58	7,40	-2,43	3,70	3,79	2,53
dA	9,61	9,37	-2,52	3,93	3,92	-0,22

5.9.3 Platinverteilungsmuster

Der Pt-Gehalt der HPLC-Fractionen wurde bestimmt, um eine eventuelle basenspezifische Pt-Adduktbildung nachzuweisen. Vom Cisplatin ist eine solche Spezifität für dG und dA bekannt. Für A549-DNA, die nach 24stündiger Inkubation der Zellen mit $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Al_2O_3 -Pt-Partikeln isoliert und verdaut wurde, zeigt Abb. 18 in einem kombinierten Diagramm die HPLC-Spur und die Pt-Konzentration der jeweils 30 sekundigen Eluatfraktionen. Wie unter Punkt 5.9 bereits erläutert, mussten die aus dem Eluat der HPLC geschnittenen Fraktionen vor der ICP-MS-Messung gepoolt werden. Dadurch stiegen leider auch die Pt-Untergrundwerte an. Trotzdem ist für die Nukleoside Adenin (rA) und Desoxyadenin (dA) ein leicht erhöhter Pt-Gehalt erkennbar. Der Großteil des Platins eluiert unmittelbar nach dem Leervolumen der Säule und überdeckt so auch eine mögliche Pt-Anreicherung beim Desoxyguanin-Peak.

Zum Vergleich ist in Abb. 19 das Pt-Elutionsmuster nach *in vitro* Umsetzung von Kalbsthymus-DNA mit Cisplatin zu sehen. Auch in diesem Fall ist gleichzeitig mit dem Desoxyadenin- und dem Desoxyguanin-Peak eine leichte Zunahme des Pt-Gehalts im Eluat zu beobachten, während erneut der Großteil des Platins kurz nach dem Leervolumen eluiert.

Im Gegensatz zu den erhofften Resultaten mit einem spezifisch einzelnen Nukleosidpeaks zugeordneten Platinmuster verändert sich also der Metallgehalt der einzelnen Fraktionen sowohl bei den Al_2O_3 -Pt-Partikeln als auch bei Cisplatin / Kalbsthymus-DNA relativ kontinuierlich. Der Großteil der Pt-Menge eluiert im bzw. kurz nach dem Leervolumen des HPLC-Laufs, wenig akzentuierte Pt-Anreicherungen finden sich bei dem Deoxyadenosinpeak der Kalbsthymus-DNA sowie den rA und dA-Peaks der A549-DNA. Für dieses Muster des Pt-Gehalts der Fraktionen bieten sich drei mögliche Erklärungen an:

- Der Nukleotid-Verdau durch die alkalische Phosphatase wird durch Pt gehemmt. Dadurch würden die Nukleotide zumindest teilweise nicht in die Nukleoside verdaut werden und früher eluieren (Mueller und Holler, 1989).
- Der enzymatische Verdau wird durch Pt-Addukte nicht gehemmt, die entstandenen modifizierten Addukte haben aber eine veränderte Retentionszeit. Weil ihr Anteil an der Gesamt-Nukleosidmenge sehr klein ($\leq 0,01$ %) ist, lassen sie sich mit dem UV-Vis-Detektor der HPLC nicht nachweisen oder werden überdeckt, wohl aber mit der empfindlicheren ICP-MS. Die Veränderung der Retentionszeit würde aber den Ergebnissen der Vorversuche mit Cisplatin und Nukleosidstandards widersprechen (siehe 5.9.1).

- Die Bindung zwischen Pt und Nukleosid wird durch den enzymatischen Verdau gelöst, und das Platin freigesetzt. Dieses Verhalten konnte im Fall von Cisplatin jedoch nicht beobachtet werden, und über die enzymatische Spaltung einer Metall-Nukleosid-Bindung gibt es auch keine Berichte in der Literatur.

Zusammenfassend ist die offline mit der ICP-MS gekoppelte HPLC-Methode zu unempfindlich um den Pt-Gehalt der einzelnen DNA-Nukleosidfraktionen zu bestimmen. Vermutlich ist der Anteil der Pt-modifizierten Nukleoside an der Gesamtnukleosidmenge zu gering.

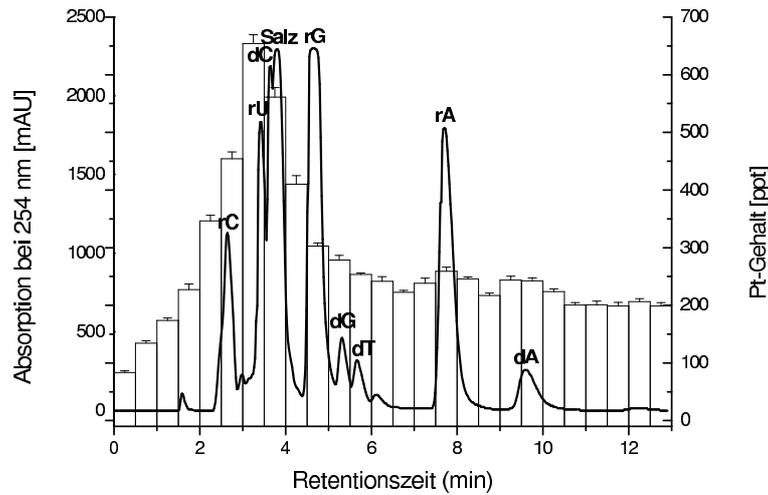


Abb. 18: Pt-Gehalt in Fraktionen der präparativen HPLC. A549-Zellen wurden 24 h mit $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Al_2O_3 -Pt-Partikeln inkubiert, die DNA isoliert und zu den Nucleosiden verdaut. Der mit ICP-MS bestimmte Pt-Gehalt der Fraktionen bezieht sich auf vier vereinigte HPLC-Läufe.

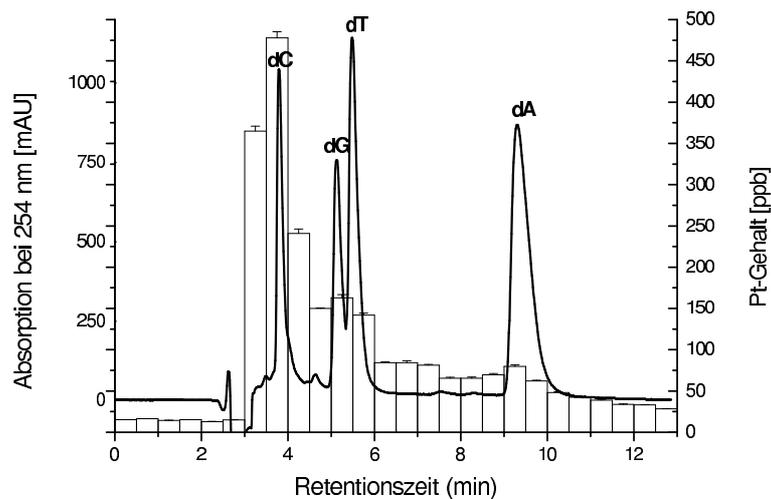


Abb. 19: Pt-Gehalt in Fraktionen der präparativen HPLC. Kalbsthymus-DNA wurde mit Cisplatin (100 μM , 24 h) umgesetzt, anschließend zu den Nucleosiden verdaut und mit präparativer HPLC getrennt. Der Pt-Gehalt der 30 s-Fractionen wurde durch ICP-MS bestimmt.

5.10 DNA-Isolierung mit der QIAGEN-Methode

Die unter 5.9 beschriebenen Versuche wurden zeitlich nach den unter 5.7.4 und 5.8 beschriebenen Versuchen durchgeführt. Die überraschenden Ergebnisse bezüglich des Vorkommens von RNA-Abbauprodukten stellten das postulierte Auftreten von Pt-DNA-Addukten in Frage. Es wäre auch möglich, dass es sich bei dem gemessenen Pt-Gehalt der aus Zellen isolierten Nukleinsäuren um RNA-Addukte handelt. Daher wurde zur Isolierung der DNA und Quantifizierung der DNA-Addukte zusätzlich das kommerzielle QIAGEN-System verwendet.

Mit diesem Verfahren ließen sich aus der gleichen Anzahl von Zellen wie bei der Phenol-Chloroform-Methode durchschnittlich $35,6 \pm 14,2 \mu\text{g}$ DNA mit einem optischen Absorptionsverhältnis A_{260}/A_{280} von $1,62 \pm 0,17$ sowie A_{260}/A_{230} von $1,89 \pm 0,41$ isolieren. Das ist leider nur $\frac{1}{3}$ der mittels Phenol-Chloroform-Methode erzielbaren Menge und auch die photometrischen Werte der mit dem QIAGEN-Kit erzeugten DNA sind deutlich schlechter. Die so isolierte DNA enthält demnach mehr Salze und Proteine. Geht man aber davon aus, dass die mit dem ursprünglichen Verfahren isolierten Nukleinsäuren zur Hälfte aus RNA bestehen, relativieren sich diese Zahlen. Gravierende Nachteile des QIAGEN-Verfahrens sind jedoch der 20 mal höhere Preis und der Platin-Hintergrundwert der Säulen (Abb. 21).

Aus dem in Abb. 20 dargestellten Chromatogramm ist der niedrige Ribonukleosid-Gehalt der mit dem QIAGEN-Verfahren isolierten DNA ersichtlich, er liegt bei unter 5 %. Gleichzeitig kommt es zu einer konzentrationsabhängigen Bildung von Pt-DNA-Addukten nach Inkubation von A549-Zellen mit Al_2O_3 -Pt-Partikeln (Abb. 21). Ihre Zahl ist etwa halb so hoch wie bei den in Abschnitt 5.7.4 gezeigten Versuchen nach Phenol-Chloroform-Isolierung. Vermutlich kommt es also auch zur Bildung von RNA-Pt-Addukten, sie wurden jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht.

Durch die Versuche mit dem kommerziellen DNA-Isolierungs-Kit ist jedoch nachgewiesen, dass es sich bei den bisher beschriebenen Addukten tatsächlich auch um DNA-Addukte handelt. Aus den Daten ist aber auch ersichtlich, dass aus dem QIAGEN-Verfahren ein erhöhter Platin-Blindwert resultiert. Die Firma QIAGEN verneinte auf Anfrage jedoch die Verwendung platinhaltiger Substanzen bei der Produktion der Säulen.

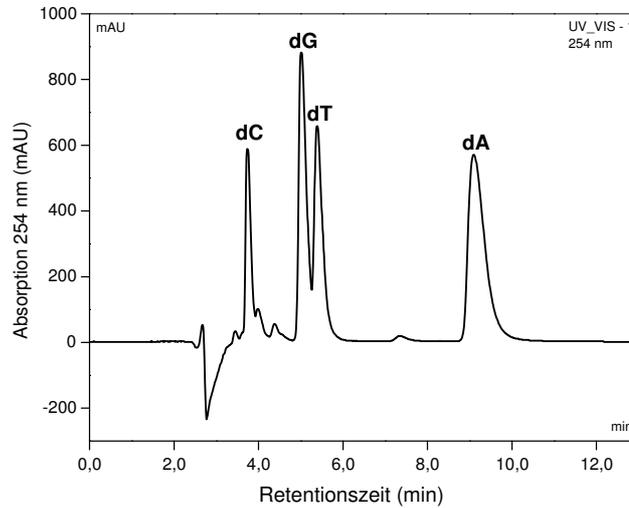


Abb. 20: Nukleosidzusammensetzung der mit dem QIAGEN-System isolierten zellulären DNA. A549-DNA wurden nach dem QIAGEN-Protokoll isoliert, zu den Nukleosiden verdaut und mit HPLC getrennt.

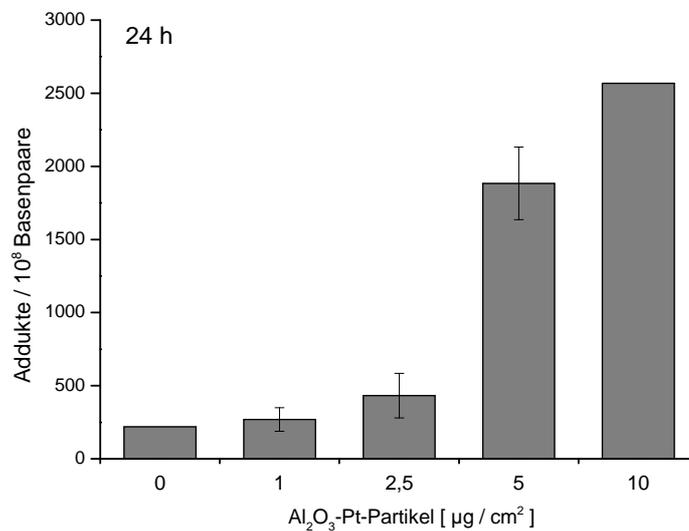


Abb. 21: Konzentrationsabhängige Bildung von Pt-Addukten an A549-DNA. Die Zellen wurden 24 h lang mit 1 – 10 µg/cm² Al₂O₃-Pt-Partikeln inkubiert, dann nach dem QIAGEN-Protokoll isoliert und der Pt-Gehalt der DNA mit ICP-MS bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen ± SD.

5.11 Intrazelluläre Verteilung des Platins

Ein wichtiges Kriterium für die Beurteilung der toxischen Effekte der untersuchten Partikel ist die eventuelle Wechselwirkung mit zellulären Proteinen und die intrazelluläre Verteilung der Platin-Spezies.

Das etablierte Verfahren zur Unterscheidung von Kern- und Zytoplasmaproteinen von Hartmann und Hartwig (1998) wurde auf die Al_2O_3 -Pt-Partikel und gelöstes PtCl_4 erfolgreich angewandt. Im Unterschied zu der unter Abschnitt 5.8 und 5.9 beschriebenen genaueren Untersuchung der Pt-Wechselwirkung mit DNA kann bei zellulären Proteinen nur der Gesamtplatingehalt als "Summenparameter" bestimmt werden, da es sich um eine extrem inhomogene Substanzgruppe handelt.

Mit dem angewandten Verfahren konnten aus 7×10^6 Zellen jeweils zirka 50 – 100 μg Zellkernproteine sowie zirka 1000 μg Zytoplasmaproteine isoliert werden (Angaben bezogen auf BSA). Die Pt-Gehalte dieser beiden Fraktionen wurden mit der Graphitrohr-AAS bestimmt.

Al_2O_3 -Pt-Partikel Während nach 24stündiger Inkubation der Zellen mit Partikeln für die Kernproteinfraktion eine konzentrationsabhängige Zunahme des Pt-Gehalts gemessen werden konnte, blieben die entsprechenden Werte für die zytosolischen Proteine weitgehend konstant (Abb. 22). Dadurch ändert sich mit steigender Pt-Konzentration das Verhältnis Kernprotein-gebundenes Pt zu Zytosolprotein-gebundenem Pt⁵. Für NiCl_2 und partikuläres NiO wurden ähnliche Beobachtungen bereits von Schwerdtle (2002) beschrieben.

Pt ist bei niedrigen Partikelkonzentrationen etwa gleichmäßig auf die Zytosol- bzw. Kernfraktion verteilt, die Inkubation mit einer hohen Partikeldosis führt dagegen zur Anreicherung des Platins in der Zellkernproteinfraktion. So befindet sich nach Inkubation mit 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Modellpartikeln 60 % des Platins in der Kernfraktion, nach Inkubation mit 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ dagegen 75 %. Dieser Zusammenhang deutet in Einklang mit der Literatur auf eine Anreicherung von endozytierten Partikeln in Kernnähe, gefolgt von einer Diffusion gelöster Pt-Spezies in den Zellkern (Hesterberg *et al.*, 1986; Wagner und Hynes, 1982).

⁵Bezieht man die Pt-Konzentration auf das Zell- bzw. Kernvolumen ergibt sich qualitativ das gleiche Ergebnis.

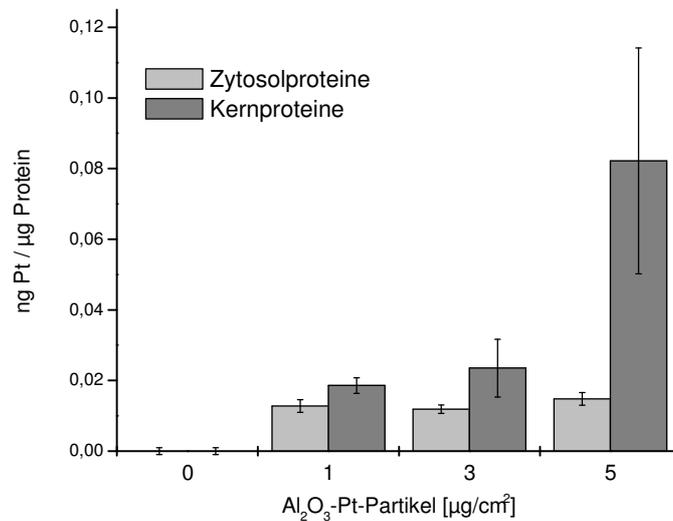


Abb. 22: Pt-Gehalt der zellulären Proteinfractionen nach Exposition gegenüber Al₂O₃-Pt-Partikeln. A549-Zellen wurden 24 h mit 1 – 5 µg Al₂O₃-Pt-Partikeln / cm² inkubiert, anschließend die Zytosol- und Kernproteine isoliert und deren Pt-Gehalt mit AAS bestimmt. Angaben sind bezogen auf die Proteinmenge (BSA) nach Bradford. Dargestellt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen ± SD.

Gelöstes Platintetrachlorid Um, wie bei der Untersuchung der DNA-Adduktbildung, zwischen endozytiertem und gelöst aufgenommenem Platin vergleichen zu können, wurden Versuche mit PtCl₄ durchgeführt.

Wie Abb. 23 deutlich macht, zeigen sich dabei grundsätzliche Unterschiede. Am auffälligsten ist, dass sich der Hauptanteil (78 bis 94 %) der gelöst in die Zelle aufgenommenen Pt-Spezies im Zytosol fand, während Pt aus endozytierten Partikeln, wie oben gezeigt, vermehrt in der Kernproteinfraction auftauchte (nur 15 bis 41 % im Zytosol). Außerdem blieb der Pt-Gehalt nach PtCl₄-Inkubation im Zytosol nicht wie bei den Al₂O₃-Pt-Partikeln weitgehend konstant, sondern stieg mit der eingesetzten Konzentration an. Dieses Verhalten war für gelöste Substanzen zu erwarten.

Mit PtCl₄ wurden auch Versuche zur Zeitabhängigkeit der intrazellulären Pt-Verteilung im Intervall 24 bis 48 h durchgeführt. Die in Abb. 23 dargestellten Ergebnisse zeigen für beide Proteinfractionen einen mit längerer Inkubationsdauer zunehmenden Pt-Gehalt. Der Anstieg ist bei der Kernproteinfraction drei- bis viermal stärker ausgeprägt als bei den Zytosol-Proteinen. Man kann daher von einer "Wanderung" in Richtung Zellkern sprechen.

5 Ergebnisse und Diskussion

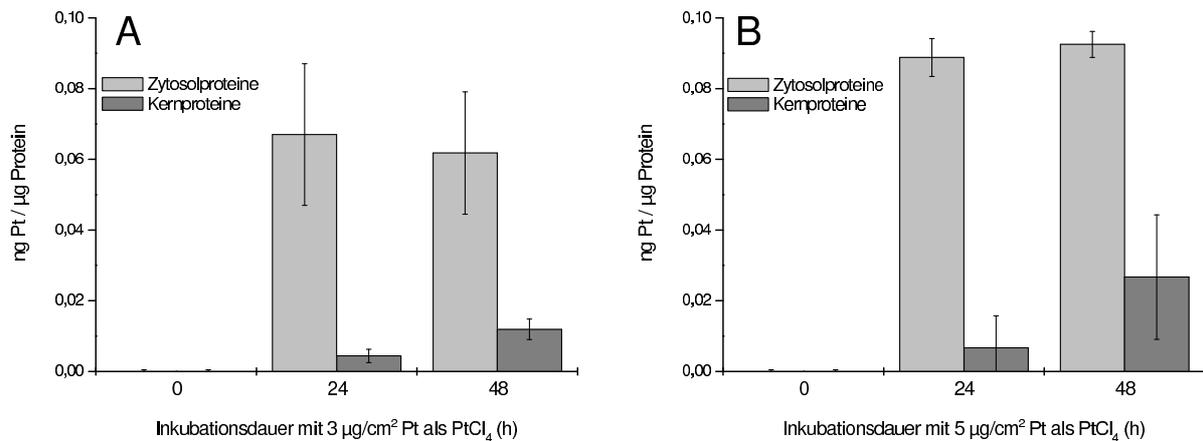


Abb. 23: Pt-Gehalt der zellulären Proteinfraktionen nach Exposition gegenüber gelöstem PtCl₄. A549-Zellen wurden 24 und 48 h mit gelöstem PtCl₄ inkubiert, anschließend die Zytosol- und Kernproteine isoliert und deren Pt-Gehalt mit AAS bestimmt. Graphik A: Inkubation mit 66,8 µM (entsprechend 3 µg Pt / cm²) Graphik B: Inkubation mit 111,3 µM (entsprechend 5 µg Pt / cm²). Angaben sind bezogen auf die Proteinmenge (BSA) nach Bradford. Dargestellt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen ± SD.

Vergleicht man die Al₂O₃-Pt-Partikel und das gelöste Platin auf der Ebene der eingesetzten und der gemessenen Pt-Konzentrationen, so wird wie schon bei der DNA-Adduktbildung deutlich, dass Platin aus den Partikeln erheblich besser bioverfügbar ist (siehe Abschnitt 5.7.5). Die gesamte Pt-Menge aus 5 µg/cm² Partikelkonzentration ergäbe im Kulturmedium lediglich eine 4,6 µM-Lösung und erzeugt doch 0,08 ng Pt / µg Kernprotein. Hingegen war mehr als 100 µM gelöstes PtCl₄ notwendig um vergleichbare Pt-Gehalte in den Zytosolfractionen hervorzurufen.

Eine Erklärung für die beobachteten Phänomene findet sich in dem postulierten Mechanismus der Endozytose. Wenn partikuläres Platin innerhalb von Vakuolen in Kernnähe transportiert würde, wäre eine lokale Anreicherung in der Kernproteinfraktion denkbar (Hesterberg *et al.*, 1986; Wagner und Hynes, 1982). Durch den Einschluss in die Vakuolen wäre außerdem ein Austausch mit dem Zytoplasma gehemmt und dessen geringerer Pt-Gehalt erklärbar.

Der relativ konstante Pt-Gehalt der zytosolischen Proteine nach Inkubation mit partikulärem und gelöstem Platin lässt sich über eine Bindung von Pt an zytosolisches Glutathion oder Metallothionein (MT) erklären. Diese beiden Peptide wurden bereits mit Resistenz gegenüber Cisplatin in Verbindung gebracht (Kelland, 2000). MT und GSH können Pt-Spezies binden und MT ist auch durch Pt induzierbar (Zhong *et al.*, 1997; Nielson *et al.*, 1985; Dabrowiak

et al., 2002). Bei einer Pt-abhängigen Zunahme des zytosolischen MT-Spiegels könnte also das Platin/Protein-Verhältnis trotz steigender Pt-Konzentration weitgehend konstant bleiben. Eine tatsächliche Pt-Abhängigkeit des MT- bzw. GSH-Gehalts im Zytosol wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht.

Die Inkubation von kultivierten Lungenepithelzellen mit Al₂O₃-Pt-Partikeln und gelöstem Platintetrachlorid führt also zu einer jeweils anderen Verteilung des Pt-Gehalts von zellulären Proteinfractionen. Während Pt aus endozytierten Partikeln hauptsächlich im Zellkern angereichert wird, führen gelöste Pt-Ionen überwiegend zu einem Anstieg des Pt-Gehalts der zytosolischen Proteinfraction. Außerdem ist partikuläres Platin bezogen auf die Proteinfractionen stärker bioverfügbar als gelöste Pt-Spezies.

5.12 Mutagenität am *hprt*-Lokus

Mit den bisher präsentierten Ergebnissen konnte eine konzentrations- und zeitabhängige Bildung von PGE-DNA-Addukten nach Exposition von Lungenzellen gegenüber den entsprechenden Partikeln nachgewiesen werden. Diese Addukte ähneln in einigen ihrer chemischen Eigenschaften den von Cisplatin induzierten Addukten. Um eine Abschätzung über das genotoxische Potenzial der Addukte treffen zu können, wurde daher ein Mutagenitätstest durchgeführt.

Der Test auf Mutationen im Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase-Gen (*hprt*) basiert auf der Toxizität des Purinanalogs 6-Thioguanin, welches durch das HPRT-Protein in den Nucleotid-Pool eingebracht wird und nach Einbau in DNA zum Zelltod führt. Tragen die Zellen jedoch eine funktionelle Mutation im *hprt*-Gen, können sie im Selektivmedium überleben und Kolonien bilden. Das *hprt*-Gen ist auf dem X-Chromosom lokalisiert, männliche Zellen sind daher hemizygot für das Gen, und die Mutation eines Allels genügt für den Aktivitätsverlust. Obwohl A549-Zellen von einem männlichen Spender stammen, haben sie zwei X-Chromosomen (Park *et al.*, 2001; Struski *et al.*, 2001). Daher wurden die Versuche zur 6-Thioguanin-Resistenz mit V79-Zellen (siehe 4.1.2) durchgeführt.

Das Verfahren konnte erfolgreich etabliert werden. Das Kontrollmutagen UVC-Strahlung wurde vom Testsystem eindeutig erkannt, während die Zahl der Spontanmutationen in den Kontrollproben unterhalb von 25 Mutanten / 10^6 lebensfähigen Zellen lag.

Weder die Al_2O_3 -Pt-Partikel, noch die Pd-Partikel erhöhten in den eingesetzten Konzentrationen bis zu $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ die Zahl der Mutanten über das Niveau der Kontrolle (Tab. 6). Im Vergleich dazu führen starke Mutagene wie aromatische Amine zu Mutationsfrequenzen von über 1000 / 10^6 lebensfähige Zellen.

Die Al_2O_3 -Pt-Partikel induzierten also keine vom Testsystem erkennbaren Mutationen in V79-Zellen, obwohl dessen Nachweisspektrum außerordentlich breit ist (Glatt, 1994). Allerdings konnte im Gegensatz zu den Versuchen mit A549-Zellen der Nachweis einer Partikelaufnahme nicht geführt werden. Die Internalisierung von Al_2O_3 -Pt-Partikeln in V79-Zellen konnte unter dem Mikroskop zwar beobachtet, aber nicht dokumentiert werden. Auch die direkte Bestimmung des Pt-Gehalts von V79-DNA, wie in Punkt 5.7.4 beschrieben, gelang nicht. Die V79-Zellen haften offensichtlich nicht so fest an den Kulturschalen wie die A549-Zellen. Sie lösten sich bei forciertem Abwaschen der Partikel mit von der Schale ab.

Tabelle 6: Ergebnisse des HPRT-Genmutationstests. V79-Lungenzellen des Chinesischen Hamsters wurden 24 h mit Al₂O₃-Pt-Partikeln inkubiert (als Positivkontrolle wurde UVC-Strahlung verwendet) und ihre Koloniebildungsfähigkeit bestimmt. Es folgte eine 6tägige Expressionsphase, dann die Mutanten-Selektion in Kulturmedium mit 10 µg/l 6-Thioguanin. Die Kolonien wurden nach 7 Tagen fixiert, gefärbt und gezählt. Dargestellt sind die Daten aus zwei unabhängigen Versuchen. Koloniebildungsfähigkeit nach Substanzexposition ist jeweils als Mittelwert aus Dreifachbestimmungen ± SD angegeben.

Probe	Versuch 1 (5 J/m ² UVC)		Versuch 2 (2 J/m ² UVC)	
	Mutanten / 10 ⁶ lebensfähige Zellen	Koloniebildungsfähigkeit (%der Kontrolle)	Mutanten / 10 ⁶ lebensfähige Zellen	Koloniebildungsfähigkeit (%der Kontrolle)
Kontrolle	6,3	100 ± 9,7	23	100 ± 7,6
UVC-Strahlung	386,6	28,6 ± 7,6	70,7	92,4 ± 1,7
10 µg/cm ² Pd-Partikel	6,7	86,7 ± 3	-	-
10 µg/cm ² Al ₂ O ₃ -Pt-Partikel	2,8	95,0 ± 7	17,7	108,3 ± 1,2

Das negative Resultat im HPRT-Test mit V79-Zellen kann deshalb nicht ohne weiteres auf die A549-Epithelzellen übertragen werden. Daher wurde ein weiterer Genotoxizitätstest eingesetzt.

5.13 Chromosomale Schäden im Mikrokerntest

Der Mikrokerntest lässt sich mit A549-Zellen durchführen und wurde mit diesen (Ohshima *et al.*, 1998) und anderen etablierten Zelllinien bereits bei der Untersuchung von genotoxischen Partikelwirkungen benutzt (Liu *et al.*, 1996; Rahman *et al.*, 2002). Auch die genotoxische Wirkung von Cisplatin lässt sich mit ihm nachweisen (Gebel *et al.*, 1997).

Mikrokerne enthalten Chromatin, sind von einer Kernhülle umgeben und können zusätzlich zum Hauptkern in einer Zelle vorkommen. Sie entstehen beispielsweise nachdem die Zellen klastogenen oder aneugen Substanzen exponiert wurden. Klastogene Verbindungen führen zu Mikrokernen die Chromosomenbruchstücke enthalten, während aneugene Verbindungen z.B. den Spindelapparat stören. Es wird davon ausgegangen, dass die Mikrokerne anschlie-

ßend ganze Chromosomen enthalten.

Abb. 24 zeigt Beispielbilder von mikrokernhaltigen Zellen. Das Verfahren konnte erfolgreich angewandt werden, die beiden Kontrollsubstanzen Cisplatin (Abb. 24 A) und NQO (4-Nitrochinolin-N-oxid) wurden eindeutig als Mikrokern-induzierende Substanzen erkannt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnte einfach zwischen endozytierten Partikeln und den lichtemittierenden Mikrokernen unterschieden werden, eine Verwechslungsgefahr bestand wie in Abb. 24 B gezeigt nicht.

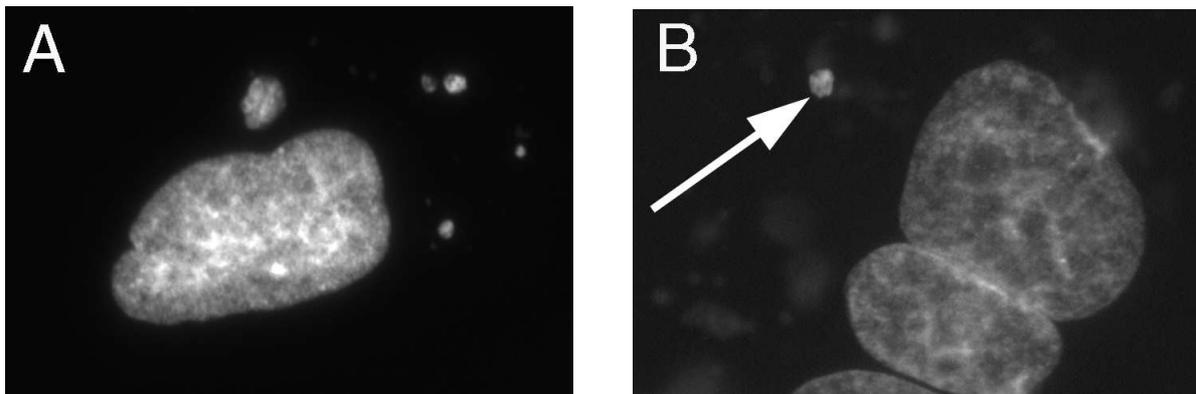


Abb. 24: A549-Zellen mit Mikrokernen nach Cisplatin- (Bild A) und Al_2O_3 -Pt-Partikel- (Bild B) Behandlung. Zellen wurden auf Objektträger ausgesät und für 24 h mit $10 \mu\text{M}$ Cisplatin oder $30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Al_2O_3 -Pt-Partikeln behandelt. Nach weiteren 48 h wurden die Zellen fixiert und die DNA mit DAPI gefärbt. Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Bilder in 400facher Vergrößerung. Die hellgrauen Bereiche in Bild B sind Partikel, sie unterscheiden sich deutlich von dem Fluoreszenzlichtemittierenden Mikrokern (Pfeil).

Tabelle 7: Induktion von Mikrokernen bei der Teilung der A549-Zellen nach 24 h Inkubation mit Prüf- und Kontrollsubstanzen. Cisplatin und NQO waren in DMSO gelöst, die Konzentration dieses Lösungsmittels im Medium betrug maximal 0,2 %.

Prüfsubstanz	Zahl Mikrokern-haltiger Zellen / 1000 Zellen \pm SD
Kontrolle	$14,9 \pm 4$
$10 \mu\text{M}$ Cisplatin	$105,6 \pm 79,8$
$0,5 \mu\text{M}$ NQO	$83,4 \pm 0,3$
$30 \mu\text{g}$ Al_2O_3 -Pt-Partikel / cm^2	$13,9 \pm 2,7$

Wie in Tab. 7 gezeigt, führt eine 24stündige Inkubation mit der vergleichsweise hohen Dosis von $30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Al_2O_3 -Pt-Partikeln nicht zu einer zusätzlichen Induktion von Mikrokernen in A549-Zellen. Sie sind also auch von diesem Prüfverfahren nicht als "genotoxisch" erkannt worden.

Bei der Anwendung des Mikrokerntests ist insbesondere der zeitliche Ablauf kritisch. Die Mikrokerne treten erst nach einer auf die Substanzinkubation folgenden Zellteilung auf. Ein negatives Ergebnis könnte daher auch an einem unzulänglichen Protokoll liegen, z. B. einer zu kurzen Wartezeit. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Wartezeit von 48 h entspricht zwei Zellzyklen und wurde auch von Ohshima *et al.* (1998) erfolgreich für die Untersuchung von Partikeleffekten auf A549-Zellen angewandt. Ausführlichere Untersuchungen mit verschiedenen Inkubations- und Wartezeiten konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden.

Eine weitere Erklärung der negativen Resultate könnte in der äußerst inhomogenen Verteilung der Partikelaufnahme in die Zellen begründet sein. Geht man von einer Partikelinternalisierung und daraus resultierender Adduktbildung in geschätzt 1 % der Zellen aus, so würden zwar diese wenigen Zellen sehr stark geschädigt werden, die überwiegende Zahl der Zellen jedoch überhaupt nicht. Bei gelösten Prüfsubstanzen ist dagegen das Schadensprofil in der Zellpopulation normalverteilt und auf die Erfassung solcher Schäden sind auch die meisten Testsysteme ausgelegt.

Zusammenfassend basieren die angewendeten Testverfahren HPRT-Test und Mikrokerntest auf verschiedenen Prinzipien und erkennen unterschiedliche Endpunkte. Sie wurden in zwei Lungen-Zelllinien erfolgreich durchgeführt. Die Al_2O_3 -Pt-Partikel zeigten in keinem der Versuche ein mutagenes oder klastogenes Potenzial. Das ist jedoch kein endgültiger Beweis für das Fehlen eines solchen, da von einer inhomogenen Verteilung der induzierten Schäden ausgegangen werden muss. Dadurch würden einige Zellen sehr stark, der Großteil jedoch gar nicht geschädigt werden. Dieses Schadensprofil ist mit herkömmlichen Testsystemen nur schlecht erfassbar.

6 Schlussfolgerungen

6.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde das genotoxische Potenzial von inhalierbaren, **Platingruppenelement**-haltigen Partikeln untersucht, die von Autoabgaskatalysatoren in der Größenordnung von ng/km Fahrstrecke emittiert werden.

Zu Beginn der Arbeit wurden kommerziell erhältliche Platin- und Palladium-Metallpartikel verwendet, um die Methode zu etablieren. Im weiteren Verlauf wurden hauptsächlich spezielle Modellpartikel angewandt. Diese wurden von Mitarbeitern des Fraunhofer-Instituts für Toxikologie und experimentelle Medizin (ITEM) in Hannover synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Al₂O₃-Pt-Partikel entsprechen weitestgehend den tatsächlich von Kfz-Katalysatoren ausgestoßenen Partikeln.

Die durchgeführten Untersuchungen sollten eine möglichst umfassende und auf die "Realität" übertragbare Beurteilung ermöglichen, daher wurde eine Vielzahl von Methoden angewandt. Sie wurden auf Zellen des primär exponierten Organs einer genotoxischen Partikelwirkung, der Lunge, angewandt.

Die Eigenschaften der verwendeten Partikel wurden in Lösungsversuchen sowie mittels Rasterelektronenmikroskopie charakterisiert. Dabei wurde eine unerwartet hohe Löslichkeit von Platinmetallen beobachtet, die auf den sehr kleinen Teilchendurchmesser zurückzuführen ist.

In den darauf folgenden Experimenten konnte mit Hilfe von Licht- und Transmissionselektronenmikroskopie eine Internalisierung der Partikel von menschlichen Lungenepithelzellen nachgewiesen werden.

Werden diese Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen bzw. über unterschiedliche Zeiträume mit PGE-haltigen Partikeln inkubiert, so zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine konzentrations- und zeitabhängige Entstehung von Metall-Addukten an die zelluläre DNA.

Die bei nur 3 % Platingehalt der Modellpartikel mit den reinen Metallpartikeln vergleichbare Wirkung macht deutlich, dass die Teilchengröße der Metalle einen entscheidenden Einfluss auf ihre Toxizität ausübt. Je kleiner die untersuchten Partikel waren, desto stärker ausgeprägt war ihre toxische Wirkung. Ein Vergleich mit gelösten Pt-Spezies zeigte, dass die überwiegende Zahl der DNA-Addukte aus der Internalisierung der Partikel resultiert und nicht aus der Aufnahme bereits extrazellulär gelöster Spezies stammt.

Bei der Durchführung der Experimente zur Spezifizierung des Pt-Bindungsorts an DNA (s.u.) wurde entdeckt, dass die nach einem häufig in der Literatur beschriebenen Verfahren isolierte DNA mit RNA-Abbauprodukten verunreinigt ist. Mit einem kommerziellen DNA-Isolierungs-Kit konnte jedoch nachgewiesen werden, dass es sich bei den beschriebenen Pt-DNA-Addukten nicht um Artefakte handelt.

Von größter Bedeutung für eine toxikologische Beurteilung ist die genauere Charakterisierung der beschriebenen Addukte. Daher wurden Untersuchungen zur Art und zum Ort der Bindung an DNA als Vergleich zu Addukten die vom Zytostatikum Cisplatin induziert wurden, durchgeführt. Die jeweiligen Testsysteme konnten innerhalb der Arbeitsgruppe erfolgreich etabliert werden. Die Resistenz der Partikel-induzierten Addukte gegenüber Zyanid-Ionen liegt zwar in der gleichen Größenordnung wie die der Cisplatin-Addukte, ist aber doch deutlich schwächer ausgeprägt. In beiden Fällen ist eine Fraktion der Addukte sogar völlig resistent gegenüber einem nukleophilen Angriff durch CN^- .

Eine spezifische Pt-Bindung an bestimmte DNA-Bestandteile konnte mit der verwendeten HPLC-Methode in Kombination mit ICP-MS nicht nachgewiesen werden. Vermutlich ist das Verfahren zu unempfindlich.

Mit Hilfe der elektrothermalen Atomabsorptionsspektroskopie wurde zudem die intrazelluläre Verteilung des Platins untersucht. Dabei konnte eine konzentrationsabhängige Zunahme des Pt-Gehalts von Zellkernproteinen nach Inkubation mit partikulärem Platin beobachtet werden, während die zytosolische Pt-Konzentration konstant blieb. Dieses Verhalten deutet auf eine Anreicherung von endozytiertem Pt im Zellkern hin. Gelöst in die Zelle aufgenommenes Platin hingegen verbleibt hauptsächlich im Zytosol. Auffällig war auch hier die hohe Bioverfügbarkeit des Platins aus den Katalysator-Modellpartikeln.

Addukte an DNA können mutagen sein. Um eine tatsächliche Mutagenität der Partikel festzustellen, wurden zwei verschiedene Tests an kultivierten Lungenzellen durchgeführt. Die beiden Testsysteme konnten im Arbeitskreis erfolgreich etabliert werden.

Die Al_2O_3 -Pt-Partikel wurden weder vom HPRT-Testsystem in V79-Zellen als mutagen erkannt, noch führten sie zur Induktion von Mikrokernen in A549-Zellen. Ob die aus Partikelexposition stammenden Addukte lediglich von den Testverfahren nicht als "positiv" erkannt wurden oder tatsächlich nicht mutagen wirken, kann jedoch nicht abschließend beurteilt werden.

Eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen dem Auftreten von DNA-Addukten und dem Fehlen ihrer nachweisbaren zytotoxischen oder mutagenen Wirkung könnte in der heterogenen

Verteilung der Partikelinternalisierung in der Zellpopulation liegen. Während DNA-Addukte vom verwendeten Testverfahren als Summenparameter gemessen werden, erfassen die Testsysteme zur Koloniebildungsfähigkeit und Mutagenität bzw. Klastogenität Effekte auf Einzelzellebene.

Das führt bei löslichen Prüfsubstanzen, deren Schadensprofil über die Zellpopulation normalverteilt ist, zu korrekten Ergebnissen. Partikuläre Noxen, die beispielsweise nur 1 % der Zellen schädigen, können so offensichtlich nicht charakterisiert werden.

6.2 Risikoabschätzung

Wie von Don Porto Carero *et al.* (2001) gezeigt, soll nun eine Abschätzung des tatsächlichen Gesundheitsrisikos für die Bevölkerung gemacht werden. Dabei wird ein *worst case*-Szenario angenommen und insbesondere bei der PGE-Belastung der Atemluft von möglichen Höchstwerten, nicht von Durchschnittswerten ausgegangen.

Der Mensch atmet täglich bis zu 20 000 l Luft. Sie enthält in unmittelbarer Nähe von Straßen bis zu 30 pg/m³ an Platin (Ravindra *et al.*, 2004). Wenn von den aus Katalysatoren emittierten Partikeln alle in alveolargängiger Größe vorliegen und dort auch zu 100 % deponiert werden, ohne von Alveolarmakrophagen aufgenommen zu werden, kommt es bei 100 m² Lungenfläche (Marquardt und Schäfer, 1997) und gleichmäßiger Verteilung zu einer Belastung von 6×10^{-10} µg/cm². Dadurch entstehen nach dem hier aufgestellten Modell und bei gleicher Bioverfügbarkeit des Pt aus Modellpartikeln und realen Partikeln maximal 2×10^{-8} DNA-Addukte / 10⁸ Basenpaaren und damit auch maximal etwa $1,2 \times 10^{-5}$ Addukte pro Epithelzelle.

Allerdings muss berücksichtigt werden, dass dieser Rechnung eine linearen Extrapolation der Dosis-Wirkungsbeziehung und eine gleichmäßige Verteilung von Pt aus eingeatmeten Partikeln in der Lunge zugrunde liegt. Es erscheint nach den geschilderten mikroskopischen Beobachtungen zur heterogenen Verteilung der Partikelaufnahme eher denkbar, dass lediglich in sehr seltenen Fällen ein einzelnes PGE-haltiges Partikel von einer Epithelzelle aufgenommen wird. Dann ist jedoch nach den Resultaten der vorliegenden Arbeit vorstellbar, dass es durch die Partikelinternalisierung tatsächlich zu einer erheblichen DNA-Adduktbildung kommt.

6.3 Ausblick

Das genotoxische Potenzial von PGE-haltigen Feinstäuben wurde im Rahmen dieser Arbeit mit einer Reihe verschiedener Methoden untersucht, dennoch bleiben Fragen offen.

So existieren für das in jüngerer Zeit zur Katalysator-Fertigung verstärkt eingesetzte Palladium keine Modellsubstanzen, die den hier verwendeten Al_2O_3 -Pt-Partikeln vergleichbar sind. Sie wären jedoch für toxikologische Untersuchungen von größtem Interesse, da Pd vermutlich noch stärker bioverfügbar als Pt ist. Leider existieren auch von den Pt-Modellpartikeln nur noch sehr geringe Mengen. Die erneute Produktion solcher Substanzen wäre für eine weitergehende Beurteilung der Genotoxizität also dringend nötig.

Eine quantitative Aussage über die Verteilung der DNA-Adduktzahlen innerhalb der Zellpopulation ist für eine Risikoabschätzung von maßgeblicher Bedeutung. Die massive Schädigung einzelner Zellen, wie aus der Endozytose-Hypothese anzunehmen, wäre nämlich, im Vergleich zur homogenen Verteilung der PGE-Schäden auf eine große Anzahl von Zellen, erheblich kritischer zu beurteilen. Daher muss eine Analysenmethode entwickelt werden, mit der bei einer lokalen Auflösung von $\leq 5 \mu\text{m}^2$, also eine Zellfläche, Pt-Konzentrationen von wenigen Tausend Atomen gemessen werden können. Vorstellbar wäre dabei eine Anwendung von Verfahren, die rasterartig den Zell-Monolayer abtasten.

Auch der Mechanismus der Aufnahme der Partikel in Lungenzellen wäre von großem Interesse. Ob es sich dabei um einen energieabhängigen Transport oder eine unspezifische Internalisierung handelt, könnte durch Versuche bei erniedrigter Temperatur oder mit Endozytose-Hemmstoffen wie Cytochalasin D näher beleuchtet werden.

Der Einfluss der Bindungsart auf die toxischen Effekte von Pt-DNA-Addukten wird aus dem Vergleich zwischen Cisplatin und seinem inaktiven trans-Stereoisomer deutlich. Nach den hier durchgeführten Experimenten gibt es auch im Fall der Partikel-induzierten Addukte mindestens zwei verschiedene Adduktarten. Sie könnten mittels kernmagnetischer Resonanzspektroskopie (NMR) eingehender erforscht werden. Voraussetzung für solche Untersuchungen, insbesondere mit ^{195}Pt -NMR, ist wegen der geringen Empfindlichkeit jedoch ein Anreicherungsverfahren, das leistungsstärker als die in dieser Arbeit verwendete HPLC ist.

Schließlich ist auch die eventuelle Reparatur der DNA-Schäden durch zelluläre Systeme zu berücksichtigen. Ihr Einfluss auf die Persistenz der Addukte ließe sich durch die Verwendung von reparaturdefizienten Zelllinien näher beurteilen.

7 Literatur

- Abbey, D. E., Nishino, N., McDonnell, W. F., Burchette, R. J., Knutsen, S. F., Lawrence Beeson, W. und Yang, J. X. (1999) Long-term inhalable particles and other air pollutants related to mortality in nonsmokers, *Am J Respir Crit Care Med*, **159** (2) 373–82. 10
- Abbracchio, M. P., Simmons-Hansen, J. und Costa, M. (1982) Cytoplasmic dissolution of phagocytized crystalline nickel sulfide particles: a prerequisite for nuclear uptake of nickel, *J Toxicol Environ Health*, **9** (4) 663–76. 11
- Artelt, S., Creutzenberg, O., Kock, H., Levsen, K., Nachtigall, D., Heinrich, U., Rühle, T. und Schlögl, R. (1999) Bioavailability of fine dispersed platinum as emitted from automotive catalytic converters: a model study, *The Science of the Total Environment*, **228** 219–242. 11, 13, 19, 22, 38
- Bauer, W., Gonias, S. L., Kam, S. K., Wu, K. C. und Lippard, S. J. (1978) Binding of the anti-tumor drug platinum uracil blue to closed and nicked circular duplex DNAs, *Biochemistry*, **17** (6) 1060–8. 53
- Begerow, J., Neuendorf, J., Raab, W., Turfeld, M. und Dunemann, L. (1999) Der Beitrag von edelmetallhaltigem Zahnersatz zur Gesamtbelastung der Bevölkerung mit Platin, Palladium und Gold, in Meißner, D. (Hg.), Spurenelemente: Speziationsanalyse, Supplementierung und Therapie, WVG, Stuttgart. 14
- Besterman, J. M. und Low, R. B. (1983) Endocytosis: a review of mechanisms and plasma membrane dynamics, *Biochem J*, **210** (1) 1–13. 16
- Bonetti, A., Apostoli, P., Zaninelli, M., Pavanel, F., Colombatti, M., Cetto, G. L., Franceschi, T., Sperotto, L. und Leone, R. (1996) Inductively coupled plasma mass spectroscopy quantitation of platinum-DNA adducts in peripheral blood leukocytes of patients receiving cisplatin- or carboplatin-based chemotherapy, *Clin Cancer Res*, **2** (11) 1829–1835. 16
- Bosteels, D. und Searles, R. a. (2002) Exhaust Emission Catalyst Technology, *Platinum Metals Review*, **46** (1) 27–36. 12
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, **72** 248 – 254. 32, 33

- Bradley, M. O., Bhuyan, B., Francis, M. C., Langenbach, R., Peterson, A. und Huberman, E. (1981) Mutagenesis by chemical agents in V79 chinese hamster cells: a review and analysis of the literature. A report of the Gene-Tox Program, *Mutat Res*, **87** (2) 81–142. 21
- Brück, A., Abu-Dahab, R., Borchard, G., Schafer, U. F. und Lehr, C. M. (2001) Lectin-functionalized liposomes for pulmonary drug delivery: interaction with human alveolar epithelial cells, *J. Drug Targeting*, **9** (4) 241–251. 42
- Brown, J. M. und Wouters, B. G. (1999) Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents, *Cancer Res*, **59** (7) 1391–9. 41
- Calderon-Garciduenas, L., Maronpot, R. R., Torres-Jardon, R., Henriquez-Roldan, C., Schoonhoven, R., Acuna-Ayala, H., Villarreal-Calderon, A., Nakamura, J., Fernando, R., Reed, W., Azzarelli, B. und Swenberg, J. A. (2003) DNA damage in nasal and brain tissues of canines exposed to air pollutants is associated with evidence of chronic brain inflammation and neurodegeneration, *Toxicol Pathol*, **31** (5) 524–38. 10
- Cammann, K. (2003) Instrumentelle Analytische Chemie, Spektrum, Heidelberg. 28
- Caroli, S., Alimonti, A., Petrucci, F., Bocca, B., Krachler, M., Forastiere, F., Sacerdote, M. T. und Mallone, S. (2001) Assessment of exposure to platinum-group metals in urban children, *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy*, **56B** (7) 1241–1248. 14
- Churg, A. (1996) The uptake of mineral particles by pulmonary epithelial cells, *Am J Respir Crit Care Med*, **154** (4 Pt 1) 1124–40. 17
- Clarke, M. J., Zhu, F. und Frasca, D. R. (1999) Non-platinum chemotherapeutic metallopharmaceuticals, *Chem Rev*, **99** (9) 2511–34. 11, 53
- Comess, K. M., Costello, C. E. und Lippard, S. J. (1990) Identification and characterization of a novel linkage isomerization in the reaction of trans-diamminedichloroplatinum(II) with 5'-d(TCTACGCGTTCT), *Biochemistry*, **29** (8) 2102–10. 54
- Countryman, P. und Heddle, J. (1976) The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes, *Mutat Res*, **41** 312–332. 35
- Couzinet, S., Cejas, E., Schittny, J., Deplazes, P., Weber, R. und Zimmerli, S. (2000) Phagocytic uptake of Encephalitozoon cuniculi by nonprofessional phagocytes, *Infect Immun*, **68** (12) 6939–45. 17

- Dabrowiak, J. C., Goodisman, J. und Souid, A.-K. (2002) Kinetic study of the reaction of cisplatin with thiols, *Drug Metabolism and Disposition*, **30** (12) 1378–1384. 66
- Decoville, M., Schwartz, A., Locker, D. und Leng, M. (1993) Detection of minor adducts in cisplatin-modified DNA by transcription footprinting, *FEBS Letters*, **323** (1-2) 55–8. 53
- Diabaté, S., Völkel, K. und Wottrich, R. (2002) Krank durch Nanopartikel, *Forschungszentrum Karlsruhe - Nachrichten - Biomedizin*, **34** (1/2002). 10
- Dickson, R. B., Beguinot, L., Hanover, J. A., Richert, N. D., Willingham, M. C. und Pastan, I. (1983) Isolation and characterization of a highly enriched preparation of receptosomes (endosomes) from a human cell line, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80** (17) 5335–9. 17
- Don Porto Carero, A., Hoet, P. H., Verschaeve, L., Schoeters, G. und Nemery, B. (2001) Genotoxic effects of carbon black particles, diesel exhaust particles, and urban air particulates and their extracts on a human alveolar epithelial cell line (A549) and a human monocytic cell line (THP-1), *Environ Mol Mutagen*, **37** (2) 155–63. 11, 74
- Eastman, A. (1983) Characterization of the adducts produced in DNA by cis- diamminedichloroplatinum(II) and cis- dichloro(ethylenediamine)platinum(II), *Biochemistry*, **22** (16) 3927–33. 55
- Eastman, A. (1991) Analysis and quantitation of the DNA damage produced in cells by the cisplatin analog cis-[3H]dichloro(ethylenediamine)platinum(II), *Anal Biochem*, **197** (2) 311–15. 55
- Eckhardt, J. D. und Schäfer, J. (1999) Plant availability and soil-plant transfer, *Emissionen von Platinmetallen* 229–237. 14
- Ehleben, I. (2002) Einfluss kanzerogener Metallverbindungen auf den Zellzyklus und seine Kontrolle, Dissertation, Universität Karlsruhe (TH). 27, 47
- Ely, J. C., Neal, C. R., Kulpa, C. F., Schneegurt, M. A., Seidler, J. A. und Jain, J. C. (2001) Implications of platinum-group element accumulation along U.S. roads from catalytic-converter attrition, *Environ Sci Technol*, **35** (19) 3816–22. 13
- Evans, R. M., Davies, P. J. und Costa, M. (1982) Video time-lapse microscopy of phagocytosis and intracellular fate of crystalline nickel sulfide particles in cultured mammalian cells, *Cancer Res*, **42** (7) 2729–35. 17

- Farago, M. E., Kavanagh, P., Blanks, R., Kelly, J., Kazantzis, G., Thornton, I., Simpson, P. R., Cook, J. M., Trevor Delves, H. und Hall, G. E. M. (1998) Platinum concentrations in urban road dust and soil, and in blood and urine in the United Kingdom, *Analyst*, **123** (3) 451–454. 14
- Fenech, M. (2000) The in vitro micronucleus technique, *Mutat Res*, **455** (1-2) 81–95. 34
- Fichtinger-Schepman, A. M., van der Veer, J. L., den Hartog, J. H., Lohman, P. H. und Reedijk, J. (1985) Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation, *Biochemistry*, **24** (3) 707–13. 55
- Flassbeck, D., Pfeleiderer, B., Klemens, P., Heumann, K. G., Eltze, E. und Hirner, A. V. (2003) Determination of siloxanes, silicon, and platinum in tissues of women with silicone gel-filled implants, *Anal Bioanal Chem*, **375** (3) 356–62. 14
- Foster, K. A., Yazdanian, M. und Audus, K. L. (2001) Microparticulate uptake mechanisms of in-vitro cell culture models of the respiratory epithelium, *J. Pharm. Pharmacol.*, **53** (1) 57–66. 18, 42
- Frommer, G. und Lippert, B. (1990) Head-tail oriented nucleobases (B = guanine, cytosine) in platinum complexes cis-A₂PtB₂ resisting cyanide substitution. Implications for the nature of strongly DNA-bound cisplatin, *Inorganic Chemistry*, **29** (17) 3259–60. 53
- Gebel, T., Lantsch, H., Plessow, K. und Dunkelberg, H. (1997) Genotoxicity of platinum and palladium compounds in human and bacterial cells, *Mutat Res*, **389** (2,3) 183–190. 69
- Gehr, P. und Heyder, J. (2000) Lung Biology in Health and Disease: Particle-Lung Interactions, Band 143, Marcel Dekker, New York. 16
- Gehrke, C. W., McCune, R. A., Gama-Sosa, M. A., Ehrlich, M. und Kuo, K. C. (1984) Quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatography of major and modified nucleosides in DNA, *Journal of Chromatography*, **301** (1) 199–219. 57
- Geisow, M. J. und Evans, W. H. (1984) pH in the endosome. Measurements during pinocytosis and receptor-mediated endocytosis, *Exp Cell Res*, **150** (1) 36–46. 17
- Glatt, H. (1993) HPRT-Genmutationstest in V79-Zellen des chinesischen Hamsters, in Fahrig, R. (Hg.), Mutationsforschung und genetische Toxikologie, Wiss. Buchges., Darmstadt. 34

- Glatt, H. (1994) Comparison of common gene mutation tests in mammalian cells in culture: a position paper of the GUM Commission for the Development of Guidelines for Genotoxicity Testing, *Mutat Res*, **313** (1) 7–20. 68
- Gomez, B., Palacios, M. A., Gomez, M., Sanchez, J. L., Morrison, G., Rauch, S., McLeod, C., Ma, R., Caroli, S., Alimonti, A., Petrucci, E., Bocca, B., Schramel, P., Zischka, M., Petterson, C. und Wass, U. (2002) Levels and risk assessment for humans and ecosystems of platinum-group elements in the airborne particles and road dust of some European cities, *The Science of the Total Environment*, **299** (1-3) 1–19. 13, 19
- Guthrie, G. D. J. (1997) Mineral Properties and Their Contributions to Particle Toxicity, *Environ Health Perspect*, **105** (Suppl 5) 1003–1011. 10
- Hartmann, M. und Hartwig, A. (1998) Disturbance of DNA damage recognition after UV-irradiation by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells, *Carcinogenesis*, **19** (4) 617–21. 32, 64
- Hartwig, J. F. und Lippard, S. J. (1992) DNA binding properties of [Pt(NH₃)(C₆H₁₁NH₂)Cl₂], a metabolite of an orally active platinum anticancer drug, *J Am Chem Soc*, **114** (14) 5646–54. 54
- Heiger-Bernays, W. J., Essigmann, J. M. und Lippard, S. J. (1990) Effect of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) and related platinum complexes on eukaryotic DNA replication, *Biochemistry*, **29** (36) 8461–6. 15
- Hesterberg, T. W., Butterick, C. J., Oshimura, M., Brody, A. R. und Barrett, J. C. (1986) Role of phagocytosis in Syrian hamster cell transformation and cytogenetic effects induced by asbestos and short and long glass fibers, *Cancer Res*, **46** (11) 5795–802. 64, 66
- Hetland, R. B., Schwarze, P. E., Johansen, B. V., Myran, T., Uthus, N. und Refsnes, M. (2001) Silica-induced cytokine release from A549 cells: importance of surface area versus size, *Hum Exp Toxicol*, **20** (1) 46–55. 42, 45
- Hill, R. und Mayer, W. (1977) Radiometric determination of Pt and Pd attrition from automotive catalysts, *TEEE Trans Nucl Sci*, **24** 2549–2554. 13
- Holleman, A. und Wiberg, E. (1995) Lehrbuch der anorganischen Chemie, de Gruyter, Berlin, 101. Auflage. 11, 39

- Hukkanen, J., Lassila, A., Paivarinta, K., Valanne, S., Sarpo, S., Hakkola, J., Pelkonen, O. und Raunio, H. (2000) Induction and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450s in the human A549 lung adenocarcinoma cell line, *Am J Respir Cell Mol Biol*, **22** (3) 360–6. 24
- Iwasaki, S., Tanaka, H., Nakazawa, K. und Arima, M. (1985) Quantitative high-performance liquid chromatography of bases and nucleosides in cerebral DNA of rat fetus, *Journal of Chromatography*, **341** (1) 182–6. 57
- Jamieson, E. R. und Lippard, S. J. (1999) Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts, *Chem Rev*, **99** (9) 2467–98. 15, 53
- Jimenez, L. A., Thompson, J., Brown, D. A., Rahman, I., Antonicelli, F., Duffin, R., Drost, E. M., Hay, R. T., Donaldson, K. und MacNee, W. (2000) Activation of NF-kappaB by PM(10) occurs via an iron-mediated mechanism in the absence of IkappaB degradation, *Toxicol Appl Pharmacol*, **166** (2) 101–10. 11
- Johnson, N. P. (1982) Preliminary characterization of the adducts formed between the antitumor compound cis-dichlorodiammineplatinum and DNA, *Biochem Biophys Res Commun*, **104** (4) 1394–400. 15
- Jyonouchi, H., Sun, S., Abiru, T., Chareancholvanich, S. und Ingbar, D. H. (1998) The effects of hyperoxic injury and antioxidant vitamins on death and proliferation of human small airway epithelial cells, *Am J Respir Cell Mol Biol*, **19** (3) 426–36. 24
- Kelland, L. R. (2000) Preclinical perspectives on platinum resistance, *Drugs*, **59 Suppl 4** 1–8. 66
- Khirwadkar, K., Zilow, G., Oppermann, M., Kabelitz, D. und Rother, K. (1993) Interleukin-4 augments production of the third complement component by the alveolar epithelial cell line A549, *Int Arch Allergy Immunol*, **100** (1) 35–41. 24
- Kielhorn, J., Melber, C., Keller, D. und Mangelsdorf, I. (2002) Palladium—a review of exposure and effects to human health, *Int J Hyg Environ Health*, **205** (6) 417–32. 14
- Kinnula, V. L., Everitt, J. I., Whorton, A. R. und Crapo, J. D. (1991) Hydrogen peroxide production by alveolar type II cells, alveolar macrophages, and endothelial cells, *Am J Physiol*, **261** (2 Pt 1) L84–91. 18

- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishide, M., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles, J., Vanhauwaert, A. und Wakata, A. (2003) Report from the in vitro micronucleus assay working group, *Mutat Res*, **540** (2) 153–163. 34
- Kloft, C., Eickhoff, C., Schulze-Forster, K., Maurer, H. R., Schunack, W. und Jaehde, U. (1999) Development and application of a simple assay to quantify cellular adducts of platinum complexes with DNA, *Pharmaceutical Research*, **16** (3) 470–473. 16
- Kümmerer, K., Helmers, E., Hubner, P., Mascart, G., Milandri, M., Reinthaler, F. und Zwaikenberg, M. (1999) European hospitals as a source for platinum in the environment in comparison with other sources, *Sci Total Environ*, **225** (1-2) 155–65. 14
- Knox, R. J., Friedlos, F., Lydall, D. A. und Roberts, J. J. (1986) Mechanism of cytotoxicity of anticancer platinum drugs: evidence that cis-diamminedichloroplatinum(II) and cis-diammine-(1,1-cyclobutanedicarboxylato)platinum(II) differ only in the kinetics of their interaction with DNA, *Cancer Res*, **46** (4 Pt 2) 1972–9. 16
- Krug, H. F. (2003) Nanopartikel: Gesundheitsrisiko, Therapiechance ?, *Nachrichten aus der Chemie*, **51** (12) 1241–1246. 10
- Laden, F., Neas, L. M., Dockery, D. W. und Schwartz, J. (2000) Association of fine particulate matter from different sources with daily mortality in six U.S. cities, *Environ Health Perspect*, **108** (10) 941–7. 10, 11
- Lemaire, M. A., Schwartz, A., Rahmouni, A. R. und Leng, M. (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. 53
- Lempers, E. L. M. und Reedijk, J. (1991) Interactions of Platinum Amine Compounds with Sulfur-containing Biomolecules and DNA Fragments, in Sykes, A. G. (Hg.), *Advances in Inorganic Chemistry*, Band 37, AP, San Diego, 175 – 218. 14
- Liu, X., Keane, M. J., Zhong, B. Z., Ong, T. M. und Wallace, W. E. (1996) Micronucleus formation in V79 cells treated with respirable silica dispersed in medium and in simulated pulmonary surfactant, *Mutat Res*, **361** (2-3) 89–94. 69

- Lykissa, E. D., Kala, S. V., Hurley, J. B. und Lebovitz, R. M. (1997) Release of low molecular weight silicones and platinum from silicone breast implants, *Anal Chem*, **69** (23) 4912–6. 14
- Marquardt, H. und Schäfer, S. (1997) Lehrbuch der Toxikologie, Spektrum, Heidelberg. 14, 74
- Marsh, M., Bolzau, E. und Helenius, A. (1983) Penetration of Semliki Forest virus from acidic prelysosomal vacuoles, *Cell*, **32** (3) 931–40. 17
- McLaughlin, M. L., Cronan, J., John M., Schaller, T. R. und Snelling, R. D. (1990) DNA-metal binding by antitumor-active metallocene dichlorides from inductively coupled plasma spectroscopy analysis: titanocene dichloride forms DNA-Cp₂Ti or DNA-CpTi adducts depending on pH, *J Am Chem Soc*, **112** (24) 8949–52. 11
- Menzel, C. (2002) Bestimmung und Verteilung aquatischer PGE-Spezies in urbanen Systemen, Dissertation, Universität Karlsruhe (TH). 28
- Mülhardt, C. (2002) Der Experimentator - Molekularbiologie / Genomics, Spektrum, Heidelberg, 3. Auflage. 58
- Moldovan, M., Palacios, M. A., Gomez, M. M., Morrison, G., Rauch, S., McLeod, C., Ma, R., Caroli, S., Alimonti, A., Petrucci, F., Bocca, B., Schramel, P., Zischka, M., Pettersson, C., Wass, U., Luna, M., Saenz, J. C. und Santamaria, J. (2002) Environmental risk of particulate and soluble platinum group elements released from gasoline and diesel engine catalytic converters, *The Science of the Total Environment*, **296** (1-3) 199–208. 12, 13
- Morrison, J. G., Bissett, D., Stephens, I. F. D., McKay, K., Brown, R., Graham, M. A., Fichtinger-Schepman, A. M. und Kerr, D. J. (1993) The isolation and identification of cis-diamminedichloroplatinum(II)-DNA adducts by anion exchange HPLC and inductively coupled plasma mass spectrometry, *Int. J. Oncol.*, **2** (1) 33–7. 55
- Motzer, R. J., Reed, E., Perera, F., Tang, D., Shamkhani, H., Poirier, M. C., Tsai, W. Y., Parker, R. J. und Bosl, G. J. (1994) Platinum-DNA adducts assayed in leukocytes of patients with germ cell tumors measured by atomic absorbance spectrometry and enzyme-linked immunosorbent assay, *Cancer*, **73** (11) 2843–52. 16

- Mueller, F. und Holler, E. (1989) The effect of cis-platinum on nucleotide metabolism, *Inorg Chim Acta*, **159** (1) 121–4. 59
- Nachtigall, D., Kock, H., Artelt, S., Levsen, K., Wünsch, G., Rühle, T. und Schlögl, R. (1996) Platinum solubility of a substance designed as a model for emissions of automobile catalytic converters, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, **354** 742–746. 11, 22, 38
- Natile, G. und Coluccia, M. (2001) Current status of trans-platinum compounds in cancer therapy, *Coordination Chemistry Reviews*, **216-217** 383–410. 51
- Nemmar, A., Hoet, P. H., Vanquickenborne, B., Dinsdale, D., Thomeer, M., Hoylaerts, M. F., Vanbilloen, H., Mortelmans, L. und Nemery, B. (2002) Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans, *Circulation*, **105** (4) 411–4. 10
- Nielson, K. B., Atkin, C. L. und Winge, D. R. (1985) Distinct metal-binding configurations in metallothionein, *J Biol Chem*, **260** (9) 5342–50. 66
- Nygren, O., Vaughan, G., Florence, T., Morrison, G. P., Warner, I. und Dale, L. (1990) Determination of platinum in blood by adsorptive voltammetry, *Anal Chem*, **62** 1637–1640. 14
- Oberdörster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Lunts, A., Kreyling, W. und Cox, C. (2002) Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats, *Journal of Toxicology and Environmental Health A*, **65** 1531–1543. 10
- Ohshima, S., Xu, Y. und Takahama, M. (1998) Effects of uranium ore dust on cultured human lung cells, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **5** (4) 267–271. 34, 40, 69, 71
- Olinski, R., Briggs, R. C., Basinger, M. und Jones, M. M. (1992) Effectiveness of chemical agents in removing platinum from DNA isolated from cisplatin-treated HL-60 cells, *Acta Biochimica Polonica*, **39** (4) 327–34. 53
- Palacios, M. A., Gomez, M. M., Moldovan, M., Morrison, G., Rauch, S., McLeod, C., Ma, R., Laserna, J., Lucena, P., Caroli, S., Alimonti, A., Petrucci, F., Bocca, B., Schramel, P., Lustig, S., Zischka, M., Wass, U., Stenbom, B., Luna, M., Saenz, J. C., Santamaria, J. und Torrens, J. M. (2000) Platinum-group elements: quantification in collected exhaust fumes and studies of catalyst surfaces, *The Science of the Total Environment*, **257** (1) 1–15. 12

- Park, S. Y., Choi, H. C., Chun, Y. H., Kim, H. und Park, S. H. (2001) Characterization of chromosomal aberrations in lung cancer cell lines by cross-species color banding, *Cancer Genet Cytogenet*, **124** (1) 62–70. 68
- Parker, R. J., Gill, I., Tarone, R., Vionnet, J. A., Grunberg, S., Muggia, F. M. und Reed, E. (1991) Platinum-DNA damage in leukocyte DNA of patients receiving carboplatin and cisplatin chemotherapy, measured by atomic absorption spectrometry, *Carcinogenesis*, **12** (7) 1253–8. 16
- Pitz, M., Kreyling, W., Hölscher, B., Cyrus, J., Wichmann, H. und Heinrich, J. (2001) Change of the ambient particle size distribution in East Germany between 1993 and 1999, *Atmospheric Environment*, **35** 4357–4366. 10
- Poirier, M. C., Reed, E., Litterst, C. L., Katz, D. und Gupta-Burt, S. (1992) Persistence of platinum-amine-DNA adducts in gonads and kidneys of rats and multiple tissues from cancer patients, *Cancer Res*, **52** (1) 149–53. 16
- Pope, C. A., Burnett, R. T., Thun, M. J., Calle, E. E., Krewski, D., Ito, K. und Thurston, G. D. (2002) Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution, *Jama*, **287** (9) 1132–41. 10
- Pratten, M. K. und Lloyd, J. B. (1986) Pinocytosis and phagocytosis: the effect of size of a particulate substrate on its mode of capture by rat peritoneal macrophages cultured in vitro, *Biochim Biophys Acta*, **881** (3) 307–13. 17
- Qiagen (2001) QIAGEN Genomic DNA Handbook, (08/2001) 24–27, 44–47. 30
- Rahman, Q., Lohani, M., Dopp, E., Pemsel, H., Jonas, L., Weiss, D. G. und Schiffmann, D. (2002) Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts, *Environmental Health Perspectives*, **110** (8) 797–800. 69
- Ravindra, K., Bencs, L. und van Grieken, R. (2004) Platinum group elements in the environment and their relative health risk, *The Science of the Total Environment*, **318** 1–43. 13, 74
- Reed, E., Ozols, R. F., Tarone, R., Yuspa, S. H. und Poirier, M. C. (1987) Platinum-DNA adducts in leukocyte DNA correlate with disease response in ovarian cancer patients receiving platinum-based chemotherapy, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84** (14) 5024–8. 16

- Reed, E., Sauerhoff, S. und Poirier, M. C. (1988) Quantitation of platinum-DNA binding after therapeutic levels of drug exposure - a novel use of graphite furnace spectrometry, *At Spectrosc*, **9** (3) 93–5. 16, 28
- Reedijk, J. (1987) The mechanism of action of platinum antitumor drugs, *Pure Appl Chem*, **59** (2) 181–92. 11
- Rühle, T., Schneider, H., Find, J., Herein, D., Pfänder, N., Wild, U., Schlögl, R., Nachtigall, D., Artelt, S. und Heinrich, U. (1997) Preparation and characterisation of Pt/Al₂O₃ aerosol precursors as model Pt-emissions from catalytic converters, *Applied Catalysis B*, **14** 69–84. 22, 37, 39
- Rosenberg, B., L., v. und Krigas, T. (1965) Inhibition of Cell Division in Escherichia coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode, *Nature*, **205** 698–699. 14
- Ryser, H. J., Drummond, I. und Shen, W. C. (1982) The cellular uptake of horseradish peroxidase and its poly(lysine) conjugate by cultured fibroblasts is qualitatively similar despite a 900-fold difference in rate, *J Cell Physiol*, **113** (1) 167–78. 17
- Sambrook, J., Maniatis, T. und Fritsch, E. F. (1989) Molecular cloning : a laboratory manual, Band 2, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2. Auflage. 26, 58
- Schins, R. P., Duffin, R., Hohr, D., Knaapen, A. M., Shi, T., Weishaupt, C., Stone, V., Donaldson, K. und Borm, P. J. (2002) Surface modification of quartz inhibits toxicity, particle uptake, and oxidative DNA damage in human lung epithelial cells, *Chem Res Toxicol*, **15** (9) 1166–73. 42, 46
- Schlögl, R., Indlekofer, G. und Oelhafen, P. (1987) Mikropartikelemissionen von Verbrennungsmotoren mit Abgasreinigung - Röntgen-Photoelektronenspektroskopie in der Umweltanalytik, *Angew Chem*, **99** 312–322. 13, 51
- Schwartz, J. und Utell, M. J. (2002) Ultrafine Particles in the Urban Air: To the Respiratory Tract - And Beyond?, *Environ Health Perspect*, **110** (8) A440 – A441. 10
- Schwerdtle, T. (2002) Induktion oxidativer DNA-Schäden und Beeinflussung der Nukleotidexzisionsreparatur durch Arsen-, Cadmium- und Nickelverbindungen, Dissertation, Universität Karlsruhe (TH). 26, 64

- Silverstein, S. C., Steinman, R. M. und Cohn, Z. A. (1977) Endocytosis, *Annu Rev Biochem*, **46** 669–722. 17
- Singhal, R. P. und Landes, J. P. (1988) High-performance liquid chromatographic analysis of DNA composition and DNA modification by chloroacetaldehyde, *Journal of Chromatography*, **458** 117–28. 57
- Smith, K. R., Veranth, J. M., Lighty, J. S. und Aust, A. E. (1998) Mobilization of iron from coal fly ash was dependent upon the particle size and the source of coal, *Chem Res Toxicol*, **11** (12) 1494–500. 10
- Speirs, V., Ray, K. P. und Freshney, R. I. (1991) Paracrine control of differentiation in the alveolar carcinoma, A549, by human foetal lung fibroblasts, *Br J Cancer*, **64** (4) 693–9. 24
- Spurny, K. R. (1998) On the physics, chemistry and toxicology of ultrafine anthropogenic, atmospheric aerosols (UAAA): new advances, *Toxicol Lett*, **96-97** 253–61. 13
- Stüben, D., Eckhardt, J. D., Berner, Z., Dikikh, J., Fliegel, D., Menzel, C. M., Zeller, A. und Hartwig, A. (2003) Spezies der Kfz-emittierten Platingrupenelemente (PGE) und ihre toxische Wirkung. 14, 47
- Stearns, R. C., Paulauskis, J. D. und Godleski, J. J. (2001) Endocytosis of ultrafine particles by A549 cells, *Am J Respir Cell Mol Biol*, **24** (2) 108–15. 17, 42
- Steinman, R. M., Mellman, I. S., Muller, W. A. und Cohn, Z. A. (1983) Endocytosis and the recycling of plasma membrane, *J. Cell Biol.*, **96** (1) 1–27. 17
- Stringer, B., Imrich, A. und Kobzik, L. (1996) Lung epithelial cell (A549) interaction with unopsonized environmental particulates: quantitation of particle-specific binding and IL-8 production, *Exp Lung Res*, **22** (5) 495–508. 18
- Struski, S., Doco-Fenzy, M., Trussardi, A., Masson, L., Gruson, N., Ulrich, E., Prout, M., Jardillier, J. C., Potron, G. und Cornillet-Lefebvre, P. (2001) Identification of chromosomal loci associated with non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance to topoisomerase II inhibitor in lung adenocarcinoma cell line by comparative genomic hybridization, *Genes Chromosomes Cancer*, **30** (2) 136–42. 68

- Sures, B., Zimmermann, S., Messerschmidt, J. und von Bohlen, A. (2002) Relevance and analysis of traffic related platinum group metals (Pt, Pd, Rh) in the aquatic biosphere, with emphasis on palladium, *Ecotoxicology*, **11** (5) 385–92. 48
- Tselepi-Kalouli, E. und Katsaros, N. (1990) The interaction of rhodium(II) and rhodium(III) with DNA, *J. Inorg. Biochem.*, **40** (2) 95–102. 11, 36
- Tycko, B. und Maxfield, F. R. (1982) Rapid acidification of endocytic vesicles containing alpha 2- macroglobulin, *Cell*, **28** (3) 643–51. 17
- Valentine, R. und Kennedy, G. L. J. (2001) Inhalation Toxicology, in Hayes, W. (Hg.), Principles and methods of toxicology, Taylor and Francis, Philadelphia, 4. Auflage. 10
- Wagner, D. D. und Hynes, R. O. (1982) Fibronectin-coated beads are endocytosed by cells and align with microfilament bundles, *Exp Cell Res*, **140** (2) 373–81. 64, 66
- Wilfinger, W. W., Mackey, K. und Chomczynski, P. (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity, *Biotechniques*, **22** (3) 474–6, 478–81. 27, 47
- Wottrich, R. (2003) Zur toxikologischen Untersuchung ultrafeiner Partikel: Entwicklung und Einsatz eines realitätsnahen in vitro Lungenmodells, Dissertation, Forschungszentrum Karlsruhe. 24, 25, 42
- Zanobetti, A., Schwartz, J. und Dockery, D. W. (2000) Airborne particles are a risk factor for hospital admissions for heart and lung disease, *Environ Health Perspect*, **108** (11) 1071–7. 10
- Zereini, F. und Alt, F. (2000) Anthropogenic Platinum-Group Element Emissions, Springer, Berlin. 12, 13, 14, 19
- Zhong, W., Zhang, Q., Yan, Y., Yue, S., Zhang, B. und Tang, W. (1997) Interaction of sodium chloroplatinate and iproplatin with metallothionein in vivo, *J Inorg Biochem*, **66** (3) 159–64. 66
- Zimmermann, S., Alt, F., Messerschmidt, J., von Bohlen, A., Taraschewski, H. und Sures, B. (2002) Biological availability of traffic-related platinum-group elements (palladium, platinum, and rhodium) and other metals to the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in water containing road dust, *Environ Toxicol Chem*, **21** (12) 2713–8. 14

8 Anhang

8.1 Liste der verwendeten Chemikalien

3-Morpholino-1-propansulfonsäure (MOPS)	Sigma
4-Nitrochinolin-N-Oxid (NQO)	Sigma
6-Thioguanin	Sigma
alkalische Phosphatase	Roche
Ammoniumacetat	Merck
Bradford-Reagenz	Bio-Rad
Chloroform	Fluka
Cisplatin, 98 %	Sigma
DMEM	Sigma
DMSO	Sigma
EDTA	Riedel-de-Häen
Ethanol, p.a.	Roth
Fötale Kälberserum (FKS)	Sigma
Giensa-Lösung	Merck
Guanidin-HCl	Roth
H₂O₂, suprapur	Merck
HNO₃, subboiled	Merck
Isoamylalkohol	Fluka
Isopropanol	Texaco
K₂HPO₄	Merck
Kalbsthymus-DNA	Serva
KCl p.a.	Merck
KH₂PO₄	Merck
Leupeptin	Serva
Methanol, HPLC-Grade	Riedel-de-Häen
MgCl₂ · 6 H₂O	Roth
Na₂HPO₄	Merck
NaCN	Merck
NaH₂PO₄	Merck
NaHCO₃	Fluka

NaN₃	Merck
NaOH	Fluka
Natriumacetat	Fluka
Nuclease P1	Roche
Nukeosidstandards	Sigma
Paraformaldehyd	Merck
Penicillin/Streptomycin-Mischung	Gibco BRL
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Mischung	Roth
Proteinase K	Merck
PtCl₄, 99,9 %	Sigma
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma
RNase A	Roche
Saccharose	Merck
SDS 10 %, wässrig	Merck
Thioharnstoff	Fluka
Tris-Base	Sigma
Triton X-100	Fluka
Trypsin, 10×	Sigma
Tween 20	Serva
Wasser, HPLC-Grade	Riedel-de-Häen

8.2 Liste der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien

AAS-System 4110 ZL	Perkin-Elmer
Auflichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss
Autoklav	Gössner
Biofreezer	GFL
Biofuge	Heraeus
Biophotometer	Eppendorf
Bottle Top Filter (0,2 µm)	Nalgene
Brutschrank	Hera cell Heraeus
Degasser Degasys DG-1310	Dionex
elektronische Waage Bp 61 S	Sartorius
elektronische Waage Micro	Sartorius

elektronische Waage	Kern
elektronisches Zellzählgerät Casy-1 TT	Schärfe System
Epifluoreszenzmikroskop Eclipse TS 400E	Nikon
Gewindeglasvials, 1,5 ml	Trott
Glaspipetten	Brand
Hohlkathodenlampen für AAS	Perkin-Elmer
HPLC-Autosampler GINA 50	Gynkotec
HPLC-Detektor UVD 160	Gynkotec
HPLC-Pumpe M480	Gynkotec
HPLC-Software Gynkosoft	Gynkotec
HPLC-Trennsäule Eurospher 100 (250×4,6 mm)	Knauer
HR-ICP-MS "Axiom"	Thermo VG Elemental
Inversmikroskop Axiovert	Zeiss
Kolbenhubpipetten	Eppendorf
Koloniezählgerät Colony counter BZG 30	WTW
Kryoröhrchen	Greiner
Kühlschrank	Liebherr
Küvetten (UVetten)	Eppendorf
Lochplatten	Sarstedt
Magnetrührer MR 3001 K	Heidolph
Mikroreaktionsgefäße 1,5 ; 2 ml	Eppendorf
Mikroreaktionsgefäße 2,2 ml	Greiner
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld
pH-Meter pH 320	WTW
Pipettenspitzen	Plastibrand
Pipettierhilfe	pipetus akku Hirschmann
QuadriPERM-Schalen	Heraeus
Rasterelektronenmikroskop Typ 1530	LEO
Schüttelgerät Vortex Genie	Scientific Industries
Schüttelinkubator	Infors
Spülmaschine Mielabor	Miele
Sterilbank	Hera safe Heraeus
Stickstoffbehälter	MVE
Transmissionslektronenmikroskop EM 109	Zeiss

TransWell-Zellkultursysteme	Costar
Trockenschrank	Memmert
Ultraschallbad Sonorex TK 30	Bandelin
Vibrationsschüttler VortexGenie 2	Scientific Industries
Wasserbad	Memmert
Zellkulturschalen	Biochrom
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf
Zentrifugenröhrchen	Sarstedt

8.3 Verwendete Lösungen und Puffer

PBS 0,1 M NaCl; 0,007 M Na₂HPO₄; 0,0045 M KCl; 0,003 M KH₂PO₄; pH 7,4

TBS 0,027 M KCl; 0,137 M NaCl; 0,025 M Tris; pH 7,4

DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) Nach Vorschrift aus Fertigprodukt von SIGMA-ALDRICH angesetzt.

Trypsin 1 % in PBS mit nur 0,003 M KCl aber zusätzlich 0,0005 M EDTA

Cisplatin 1 mM Lösung in DMSO frisch angesetzt.

PtCl₄ 20 mM in Wasser frisch angesetzt.

TE 0,01 M Tris-HCl pH 8,0 und 0,001 M EDTA

DNA-Extraktionspuffer 0,01 M Tris-HCl pH 8,0; 0,1 M EDTA; 20 µg/ml RNase; 0,5 % SDS

Proteinase K 20 mg / ml in H₂O

RNase 10 mg / ml in H₂O; 1 h bei 90 °C zur Inaktivierung von DNAsen

Zellysepuffer 0,01 M HEPES pH 7,9 ; 0,01 M KCl; 0,0015 M MgCl₂; 0,3 M Saccharose; 0,0005 M DTT; 0,0006 M PMSF; 0,00047 M Leupeptin

Kernlysepuffer 0,01 M HEPES pH 7,9 ; 0,4 M KCl; 0,0015 M MgCl₂; 15 % Glycerin; 0,0005 M DTT; 0,0006 M PMSF; 0,00047 M Leupeptin

2xCB-Puffer Der Puffer besteht aus 137 mM NaCl; 5mM KCl; 1,1 mM Na₂HPO₄; 0,4 mM KH₂PO₄; 2 mM MgCl₂; 2mM EDTA; 5 mM Pipes und 5,5 mM Glukose; pH 6,1.

Formaldehyd-Fixans Es werden 3,5 g Paraformaldehyd in 50 ml Wasser suspendiert und mit 1 ml NaOH-Lösung (1 M) gemischt. Für 5 min auf 60 °C erhitzen. Davon 40 ml mit dem gleichen Volumen 2xCB-Puffer mischen und den pH-Wert auf 6,1 einstellen.

Es werden 2 ml Triton X-100-Lösung zugemischt. Die Lösung ist im Kühlschrank etwa 4 h haltbar.

Carnoy's Fixans 3 Volumenteile Methanol werden mit 1 Volumenteil Eisessig gemischt. Bei -20 °C lagern.

Antifade-Lösung 100 mg p-Phenylendiamin-dihydrochlorid (Sigma) in 10 ml PBS-Lösung lösen und mit NaHCO₃-Lösung (0,5 M, pH 9,0 mit NaOH) auf pH 8,0 einstellen. Mit Glycerin auf 100 ml auffüllen. Sterilfiltrieren und bei -20 °C lichtgeschützt aufbewahren.

DAPI-Antifade-Lösung In 10 ml Antifade-Lösung werden 10 µl DAPI-Lösung (1 mg/ml in H₂O) gelöst (Konz.: 1 µg/ml). In Portionen à ca. 0,7 ml lichtgeschützt bei -20 °C aufbewahren.

DAPI-Antifade-Verdünnung DAPI-Antifade-Lösung wird mit Antifade-Lösung 1:10 (v/v) verdünnt (Konz.: 0,1 µg/ml). Die Lösung wird lichtgeschützt bei -20 °C aufbewahrt.

Nuclease P1-Lösung 1 mg / ml in NaAc-Puffer lösen, Aliquote bei -20 °C einfrieren.

HPLC-Fließmittel 3,35 g Ammoniumacetat wird in 800 ml Wasser gelöst und mit Eisessig auf pH 5,0 eingestellt. Dann werden 0,65 g NaN₃ zugegeben und auf 1 l aufgefüllt.

NH₄Ac-Lösung zum Rücksäuern 3M Ammoniumacetat, mit Essigsäure auf pH 5,0 einstellen.

Zyanid-Lösung 2 M NaCN in H₂O

Reagenzien für die Transmissionselektronenmikroskopie

0,2 M Cacodylatpuffer 21,4 g Natriumcacodylat · 3 H₂O, Aq. bidest. ad 500 ml, pH 7,0

Fixierungspuffer 0,4 ml 25 % Glutaraldehyd, 5 ml Aq. bidest., 4,6 ml 0,2 M Cacodylatpuffer

Sucrosepuffer 10 ml 0,2 M Cacodylatpuffer, 10 ml Aq. bidest., 7 % Sucrose

Veronalpuffer 2,94 g Veronal, 1,94 g Natriumacetat · H₂O, Aq. bidest ad 100 ml

Osmiumtetroxid-Veronalpuffer (nach Pallade) 1 ml Veronalpuffer, 1 ml 0,1 M HCl, 4 % ige OsO₄-Lösung

Bleicitrat-Lösung 1,33 g Pb(NO₃)₂, 1,76 g Natriumcitrat · 2 H₂O, 1 ml 1 N NaOH

Spurr-Einbettungsharz 10 g 3,4-Epoxy-cyclohexylmethyl-34-epoxy-cyclohexylcarboxylat (ERL 4206), 6 g DER 736, 26 g Nonenylsuccinic anhydride (NSA), 0,2 g Dimethylaminoethanol (DMAE)

Uranylacetat, wässrige Lösung 2 % Uranylacetat in Aq. bidest.

Uranylacetat, methanolische Lösung 2 % Uranylacetat in Methanol

Sörensenpuffer, Lösung A 9,08 g KH_2PO_4 , Aq. bidest. ad 1000 ml

Sörensenpuffer, Lösung B 11,88 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Aq. bidest. ad 1000 ml

Sörensenpuffer pH 7,0 61,2 ml Sörensen-Lösung B, 38,8 ml Sörensen-Lösung A

QIAGEN-Puffer

C1 43,81 g Saccharose, 0,4 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ und 0,48 g Tris-Base werden in 68 ml Wasser gelöst. Nach Zugabe von 4,2 g Triton X-100 (100 %) wird mit HCl auf pH 7,5 eingestellt und das Volumen auf 100 ml aufgefüllt.

G2 7,64 g Guanidin-HCl, 1,12 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ und 0,36 g Tris-Base werden in 60 ml Wasser gelöst. Nach Zugabe von 25 ml 20 % Tween-20 Lösung und 5 ml Triton X-100 (10 %) wird mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt und auf 100 ml aufgefüllt.

QBT 4,38 g NaCl und 1,05 g MOPS (freie Säure) werden in 80 ml Wasser gelöst. Der pH wird mit NaOH auf 7,0 eingestellt und 15 ml Isopropanol und 1,5 ml Triton X-100 (10 %) zugegeben, dann wird auf 100 ml aufgefüllt.

QC 5,84 g NaCl und 1,05 g MOPS (freie Säure) werden in 80 ml Wasser gelöst. Der pH wird mit NaOH auf 7,0 eingestellt und 15 ml Isopropanol zugegeben, dann wird auf 100 ml aufgefüllt.

QF 7,3 g NaCl und 0,61 g Tris-Base werden in 80 ml Wasser gelöst. Der pH wird mit HCl auf 8,5 eingestellt und 15 ml Isopropanol zugegeben, dann wird auf 100 ml aufgefüllt.

8.4 Veröffentlichungen

Veröffentlichte Abstracts und Zwischenberichte

Zeller, A., T. Schwerdtle und A. Hartwig (2001) *Oxidative DNA-Schäden durch Benzo[a]pyren in kultivierten Säugerzellen*. Lebensmittelchemie, 55 (5): 133

Schwerdtle, T., A. Nold und A. Zeller (2001) *Einfluß partikulärer Nickelverbindungen auf die Induktion und Reparatur von DNA-Schäden*. Lebensmittelchemie, 55 (5): 133-134

A. Hartwig, A. Zeller, T. Schwerdtle, C. Menzel, D. Stüben (2001) *Spezies der KFZ-emittierten Platingruppenelemente (PGE) und ihre toxische Wirkung*. Zwischenbericht anlässlich des Statusseminars des BWPLUS am 28.2. und 1.3.2001 im Forschungszentrum Karlsruhe

<http://hikwww10.fzk.de/berichte/ZBer/2001/ZBerbwb20011.pdf>

Schwerdtle, T., Mackiw, I., Pelzer, A., Zeller, A., Hartwig, A. (2002) *Kombinationswirkungen umweltrelevanter Metallverbindungen in Lungenzellen*. Zwischenbericht anlässlich des Statusseminars des BWPLUS am 26. und 27.2.2002 im Forschungszentrum Karlsruhe

<http://www.bwplus.fzk.de/berichte/ZBer/2002/ZBerbwb99007.pdf>

A. Hartwig, A. Zeller, T. Schwerdtle, C. Menzel, D. Stüben (2002) *Spezies der KFZ-emittierten Platingruppenelemente (PGE) und ihre toxische Wirkung*. Zwischenbericht anlässlich des Statusseminars des BWPLUS am 26.2. und 27.2.2002 im Forschungszentrum Karlsruhe

<http://www.bwplus.fzk.de/berichte/ZBer/2002/ZBerbwb20012.pdf>

A. Hartwig, A. Zeller, D. Grasnack, J.-D. Eckhardt, Z. Berner, D. Stüben (2003) *Spezies der KFZ-emittierten Platingruppenelemente (PGE) und ihre toxische Wirkung*. Zwischenbericht anlässlich des Statusseminars des BWPLUS am 11.3. und 12.3.2003 im Forschungszentrum Karlsruhe

<http://www.bwplus.fzk.de/berichte/ZBer/2003/ZBerbwb20012.pdf>

A. Hartwig, A. Zeller, D. Grasnack, J.-D. Eckhardt, Z. Berner, D. Stüben (2004) *Spezies der KFZ-emittierten Platingruppenelemente (PGE) und ihre toxische Wirkung*. Zwischenbericht anlässlich des Statusseminars des BWPLUS am 2.3. und 3.3.2004 im Forschungszentrum Karlsruhe

Vorträge auf Fachtagungen

Edelmetall-Anwendertreffen, 7. - 8. Oktober 2002, Karlsruhe

Untersuchungen zum gentoxischen Potential von inhalierbaren Platin- und Palladiumpartikeln in menschlichen Lungenzellen

9th International Inhalation Symposium (ITEM / U.S. EPA), 11. - 14. Juni 2003, Hannover

DNA adducts after exposure of human lung cells to particulate platinum-group elements modelling emissions from automobile catalysts

Posterbeiträge auf Fachtagungen

GDCH Regionalverband Süd-West Arbeitstagung 2001, 2.- 3.4.2001, Kaiserslautern

A. Zeller, T. Schwerdtle, A. Hartwig

Oxidative DNA-Schäden durch Benzo[a]pyren in kultivierten Säugerzellen

Third International Meeting on molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenicity 2. - 5.9.2001, Sardegna, Italy

A. Zeller, C. Menzel, D. Stüben, A. Hartwig

DNA ADDUCTS INDUCED BY VEHICLE-EMITTED PLATINUM GROUP ELEMENTS (PGE)

19. GUM-Tagung, 25. - 28.9.2001, Karlsruhe

A. Zeller, T. Schwerdtle, A. Hartwig

Spectrum of oxidative DNA damage in human lung cells by benzo[a]pyrene

32nd Annual Meeting of the EEMS, 3. - 7.9.2002, Warsaw, Poland

A. Zeller, A. Hartwig

DNA ADDUCTS INDUCED BY VEHICLE EMITTED INHALABLE PARTICLES CONTAINING PLATINUM-GROUP ELEMENTS (PGE)

Deutscher Lebensmittelchemikertag 2002, 9. - 11.9.2002, Frankfurt

A. Zeller, C. Menzel, D. Stüben, A. Hartwig

DNA-Addukte durch Platingruppenelemente (PGE) aus Kraftfahrzeugkatalysatoren

7. Tagung des DNA-Reparaturnetzwerks 2002, 17. - 20.9.2002, Karlsruhe

A. Zeller, C. Menzel, R. Wottrich, D. Stüben, A. Hartwig

PLATINUM-GROUP ELEMENT (PGE) DNA-ADDUCTS INDUCED BY MOTORVEHICLE EMITTED INHALABLE PARTICLES

Publikation in Fachzeitschriften

A. Zeller, Z. Berner, D. Eckhardt, D. Stüben, A. Hartwig (2004) Genotoxic effects of Al₂O₃-Pt-particles modeling automobile catalyst emissions in cultured human lung cells, Manuskript in Vorbereitung.

A. Zeller, Z. Berner, D. Eckhardt, A. Hartwig, D. Stüben (2004) Development of methods for the sensitive determination of Platinum-Group-Element Adducts to DNA of cultivated human lung cells, Manuskript in Vorbereitung.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Arbeit selbständig verfasst zu haben und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben.

Die Arbeit wurde keiner anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt oder anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet.

Karlsruhe, den 24.03.2004

Dank

Ich möchte mich bedanken bei:

Frau Prof. Andrea Hartwig, die mir die Möglichkeit zur Promotion an diesem interessantem Thema gegeben hat, für die wissenschaftliche Betreuung sowie die zahlreichen anregenden Diskussionen.

Allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelchemie und Toxikologie der Universität Karlsruhe für die überaus offene und kollegiale Arbeitsatmosphäre: sie hat viel Frust über missglückte Versuche vergessen lassen!

Anke, David, Doric, Gunnar, Harald, Inge, Ingo, Lars, Leane, Ollum, Renate, Simone, Stefan, Tanja, Woiciech... für hilfreiche Diskussionen.

Den Mitarbeitern vom ITEM Hannover, die die Al_2O_3 -Pt-Partikel zur Verfügung gestellt haben. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Den Mitgliedern des Instituts für Mineralogie und Geochemie der Universität Karlsruhe (TH) Detlef Eckhardt, Christoph Menzel, Zsolt Berner, Joulia Dikikh, Claudia Mößner, Tine Preuß, Utz Kramar und Frau Prof. Stüben für die partnerschaftliche Zusammenarbeit während der vergangenen drei Jahre.

PD Dr. Harald Krug für die bereitwillige Aufnahme im Arbeitskreis und großzügigst gewährte technische Unterstützung.

Ralf Wottrich für die sorgfältige Anfertigung der transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Dorit Grasnick für die Bestimmung der intrazellulären Verteilung des Platins im Rahmen ihrer Diplomarbeit.

Ute Herzer und Christina Thuy für die Durchführung der RT-PCR-Analysen.

Axel Müller und Christiane Glaser für die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Dem Land Baden-Württemberg für die finanzielle Unterstützung durch das Programm BWPLUS (Förderkennzeichen 20012).

Meiner Familie und meiner Freundin Ann-Lore: jta!

9 Lebenslauf

Name Andreas Zeller

Geburtsdatum 27. Mai 1975

Geburtsort Horb am Neckar

Staatsangehörigkeit deutsch

Schulbildung

1981-1985 Grundschule Schopfloch

1985-1989 Progymnasium Dornstetten

1989-1994 Kepler-Gymnasium Freudenstadt Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Dienst

1994-1995 Ableistung des Zivildienstes als Rettungshelfer beim Rettungsdienst des Deutschen Roten Kreuzes in Freudenstadt

Hochschulausbildung

Oktober 1995 - April 2000 Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Karlsruhe (TH)

April 2000 Erster Prüfungsabschnitt der staatlichen Prüfung für Lebensmittelchemiker

Mai - November 2000 wissenschaftliche Abschlussarbeit mit dem Thema 'Oxidative DNA-Schäden in menschlichen Lungenzellen durch Benzo[*a*]pyren'

Seit 1. November 2000 Wissenschaftlicher Angestellter an der Universität Karlsruhe (TH), Fachbereich Chemie, Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie, AK Prof. Dr. A. Hartwig