

Programm Lebensgrundlage Umwelt
und ihre Sicherung (BWPLUS)

Zwischenbericht anlässlich des
Statusseminars des BWPLUS am 26.2. und 27.2.2002 im
Forschungszentrum Karlsruhe

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

A. Hartwig¹, A. Zeller¹, T. Schwerdtle¹, C. Menzel², D. Stüben²

¹Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie, Universität Karlsruhe

²Institut für Mineralogie und Geochemie, Universität Karlsruhe

Förderkennzeichen: BWB 20011

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

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

A. Hartwig¹, A. Zeller¹, T. Schwerdtle¹, C. Menzel², D. Stüben²

¹Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie, Universität Karlsruhe

²Institut für Mineralogie und Geochemie, Universität Karlsruhe

Summary

During the last years, comparatively high concentrations of platinum group elements derived from automobile catalysts have been detected along high-traffic streets and in cities. Nevertheless, only little is known about their toxic potentials. Aim of this project is to investigate potential genotoxic effects of platinum, palladium and rhodium compounds in mammalian cells in culture. A procedure was developed to quantitate platinum- and palladium-induced DNA adducts by HR-ICP-MS. First experiments demonstrated a dose-dependent induction of DNA adducts after exposure of A549 human lung cells towards platinum and palladium particles. The formation of PGE-induced DNA adducts was also time-dependent, thus excluding that DNA binding was simply due to metal-particles carried through the DNA isolation procedure.

Zusammenfassung

Vergleichsweise hohe PGE-Emissionen aus Autokatalysatoren sind in den letzten Jahren entlang von Autobahnen und in Städten nachgewiesen worden, über deren Toxizität bislang nur wenig bekannt ist. Ziel der Untersuchungen im Rahmen dieses Projektes ist die Abklärung genotoxischen Potentials von Platin-, Palladium- und Rhodiumverbindungen in A549 menschlichen Lungenzellen. Es konnte eine Methode zum quantitativen Nachweis von Pt- und Pd-induzierten DNA-Addukten mit Hilfe der hochauflösenden Massenspektrometrie mit induktiv gekoppelter Plasma-Ionisierung (HR-ICP-MS) entwickelt werden und erste Experimente zeigten eine dosisabhängige Pt- bzw. Pd-Bindung an DNA. Darüber hinaus ist die Adduktbildung zeitabhängig, was einen Artefakt – etwa durch Verschleppung der Metallpartikel während der Aufarbeitung – ausschließt.

1 Einleitung

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

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

Im Rahmen einer Vorstudie konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl partikuläres Platin- als auch Palladiumpulver zu DNA-Addukten führen. Dieses vorläufige Ergebnis sollte in der vergangenen Projektphase verifiziert und anhand detaillierterer Untersuchungen näher charakterisiert werden. Einschränkend muss allerdings an dieser Stelle angemerkt werden, dass das HR-ICP-MS als zentrales Gerät zur Analytik von Ende September 2001 bis Mitte Februar 2002 defekt war. Trotz intensivster Bemühungen von Seiten des Instituts für Mineralogie und Geochemie brauchte die Herstellerfirma für die Reparatur diese lange Zeitspanne.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

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

2.2 Vorbereitung der Partikel und Inkubation

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

2.3 DNA-Isolierung

Die Isolierung der DNA basiert auf einer modifizierten Methode nach Sambrook et al. (1998). Die abtrypsinierten Zellen ($3 - 6 \times 10^6$) wurden in eiskalter TBS-Lösung (0,0027 M KCl, 0,137 M NaCl, 0,025 M Tris-Base, pH 7,4) aufgenommen und 4 min bei 300 g (4°C) zentrifugiert. Nach einem erneuten Wasch- und Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet vorsichtig in 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8) aufgenommen und die Zellsuspension nach Zugabe von 900 µl Extraktionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8, 0,1 M EDTA, 20 µg/ml RNase (DNase-frei), 0,5 % SDS) 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von Proteinase K (Endkonzentration 100 µg/ml) und 3 h Verdau im Schüttelinkubator bei 50°C wurde die Lösung zunächst auf Raumtemperatur abgekühlt. Zur Abtrennung der DNA von den Proteinen wurde die Lösung mit dem gleichen Volumen einer Mischung aus trisgepuffertem Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, geschüttelt und danach zur Phasentrennung mit 10000g 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 Vol 10 M Ammoniumacetatlösung zur wässrigen DNA-Lösung und 2 Vol Ethanol (absolut) ausgefällt und 12 h bei -18°C aufbewahrt. Nach 10 min Zentrifugation bei 6000g (4°C) wurde das DNA-Pellet vorsichtig in 70%igem Ethanol aufgenommen und anschließend erneut bei 6000g (4°C) 10 min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde viermal wiederholt. Zuletzt wurde das gereinigte DNA-Pellet in einem definierten Volumen bidest. Wasser aufgenommen und die Konzentration wurde photometrisch anhand der Absorption bei 260 nm bestimmt. Die

Quotienten A_{260}/A_{280} sowie A_{260}/A_{230} geben Aufschluß über die Reinheit der DNA. Ausserdem wurde der Protein-Assay-Kit der Firma Bio-Rad, München verwendet.

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

Zur Vorbereitung der Analyse wurde die DNA erneut in Ethanol ausgefällt und insgesamt viermal gewaschen. Anschließend wurde das DNA-Pellet bei Raumtemperatur 4 h getrocknet, mit 200 µl frisch angesetzter Aufschlußlösung (1 Teil HNO_3 65% v/v suprapur + 1 Teil H_2O_2 30 % v/v p.a.) versetzt, vorsichtig gemischt, 1 h bei RT stengelassen und dann über Nacht bei 85° C bei geöffnetem Reaktionsgefäß verascht. Unmittelbar vor der ICP-MS-Messung wurde die veraschte Probe in 2 ml 1 % v/v HNO_3 (subboiled) aufgenommen und gemessen. Sämtliche Gefäße, die mit der später eingesetzten Aufschlußlösung in Kontakt kommen, wurden zur Vermeidung von Kontaminationen mit 0,2%iger HNO_3 gespült. Der Ansatz der Kalibrierungslösungen und der Einsatz von Indium als internem Standard ist im Statusbericht der Arbeitsgruppe Prof. Stüben näher beschrieben (Stüben et al. 2002).

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Auswahl, Charakterisierung und Aufbereitung der Edelmetallpulver

Die in diesem Projektzeitraum eingesetzten Palladiumpartikel haben laut Hersteller (Alfa Aesar / Johnson Matthey, Karlsruhe) eine Korngröße von 0,25 bis 0,5 µm bei einer Reinheit von 99,95 %. Eine eigene Analyse bestätigte diese Partikelgröße und ergab eine kristalline Beschaffenheit (siehe Statusbericht 2001).

Darüber hinaus wurden Pt-Partikel der Firma Sigma-Aldrich, Deisenhofen verwendet. Laut Hersteller haben diese einen mit dem "Fisher-Sub-Sieve-Sizer" bestimmten Partikeldurchmesser von 0,27 – 0,47 µm. Dieser Größenbereich ist deutlich enger als bei den bisher verwendeten Partikeln von AA / JM; Versuche zur Quantifizierung der DNA-Addukte waren mit diesen Partikeln wesentlich reproduzierbarer.

3.2 Mikroskopische Bestimmung der Phagozytose von partikulärem Platin und Palladium

Ein Nachweis der Partikelphagozytose ist lichtmikroskopisch mit der an unserem Institut momentan zur Verfügung stehenden Ausstattung nicht möglich, er soll daher zukünftig durch Transmissions-Elektronenmikroskopie erfolgen. Eine Absprache zur Nutzung des entsprechenden Gerätes wurde bereits mit Herrn PD Dr. Krug (FZK) getroffen.

3.3 Analyse der DNA-Gehalte an Pd und Pt nach Inkubation von A 549 Zellen

Zunächst wurden logarithmisch wachsende A549 Zellen mit den Metall-Partikeln inkubiert und die DNA wurde wie beschrieben isoliert. Für die Analyse der Pd- und Pt-Gehalte durch die HR-ICP-MS wurde eine Veraschung durch $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass sowohl Platin- als auch Palladiumaddukte an der DNA nachweisbar waren. Die Nachweisgrenze der Methode konnte bei Einsatz von $100 \mu\text{g}$ DNA auf ca. 25 Addukte pro 10^8 Basenpaare verbessert werden.

In der beim Statuskolloquium 2001 präsentierten Vorstudie konnte aus ersten Versuchen ein dosisabhängiger Anstieg der Platin- und Palladium-Addukte an DNA nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Projektphase sollte nun zunächst ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um einen Artefakt – etwa durch Verschleppung der Partikel oder durch "unsaubere" DNA-Extraktion – handelt.

Eine wichtige Voraussetzung zur Interpretation der Ergebnisse ist die Qualität der DNA-Isolierung. Hierbei muss vor allem sichergestellt sein, dass keine Verunreinigung durch Proteine und RNA vorliegt. Um eine Verunreinigung der extrahierten DNA durch Proteine auszuschließen, wurden drei verschiedene Methoden angewandt:

- ⇒ Quotient A_{260}/A_{280}
- ⇒ Quotient A_{260}/A_{230}
- ⇒ Bradford Protein-Assay

In Versuchen mit Kalbsthymus-DNA und Rinderserumalbumin zeigte sich, dass lediglich die A_{260}/A_{230} -Methode uneingeschränkt für die Prüfung auf Proteinkontaminationen tauglich ist. Der in der Literatur häufig zitierte A_{260}/A_{280} – Quotient hängt nicht linear vom Proteingehalt einer DNA-Lösung ab und der Bradford-Assay verbraucht ein zu großes Volumen der Probelösung. Eine weitere mögliche Verunreinigung der DNA-Lösung ist zelluläre RNA, die beim enzymatischen Verdau nur unvollständig abgebaut wurde. Deshalb wurden Versuche mit RT-PCR und anschließendem Western-Blot unternommen. Es konnte jedoch in keinem der drei durchgeführten Versuche verbliebene RNA festgestellt werden.

3.3.1 Pt-Partikel

Mit den Pt-Partikeln von Sigma-Aldrich konnte analog zu den im ersten Projektzeitraum verwendeten Johnson Matthey / Alfa-Aesar-Partikeln eine Dosisabhängigkeit der DNA-Adduktzahl nachgewiesen werden, wie in Abb. 1 dargestellt.

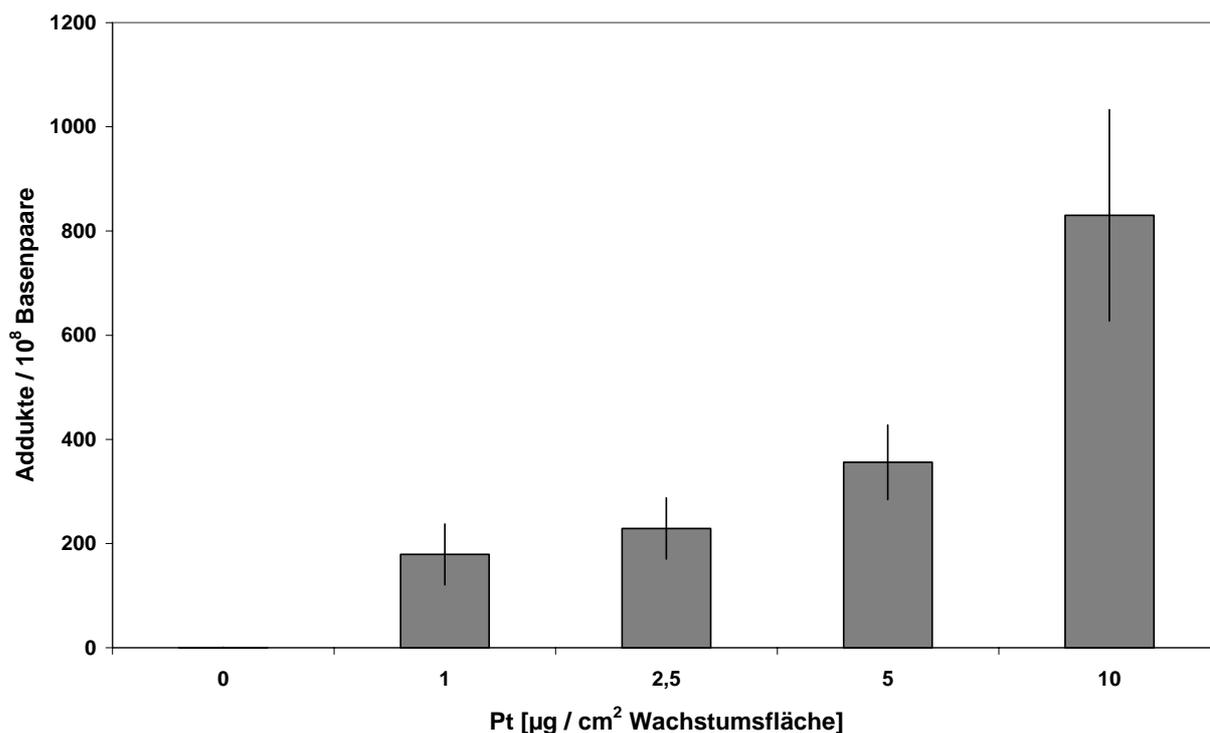


Abb.1: Dosisabhängigkeit: Induktion von Pt-DNA-Addukten nach 24 h Inkubation von A549-Zellen mit Pt-Partikeln. Dargestellt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen, Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Im gezeigten Konzentrationsbereich wurde keine signifikante Verringerung der Koloniebildungsfähigkeit beobachtet.

Im Statusbericht 2001 wurde die Dosisabhängigkeit der Pt-Addukte an DNA dargestellt. Da jedoch die Partikel an der Zelloberfläche anhaften und sich auch nur sehr schwer und unvollständig am Ende der Inkubationszeit herunterwaschen lassen, ist es besonders wichtig, eine Verschleppung der Partikel während der Aufarbeitung auszuschließen. Daher wurden Versuche zur Aufnahmekinetik durchgeführt, bei denen die Zellen für unterschiedlich lange Zeitintervalle mit gleichen Partikeldosen inkubiert wurden. Hier konnte eine Zunahme der DNA-Bindung mit der Zeit festgestellt werden, sie ist graphisch in Abb. 2 dargestellt. Dies deutet sehr stark darauf hin, dass keine "Verschleppung" vorliegt, da diese bei allen Versuchszeiten konstant sein sollte.

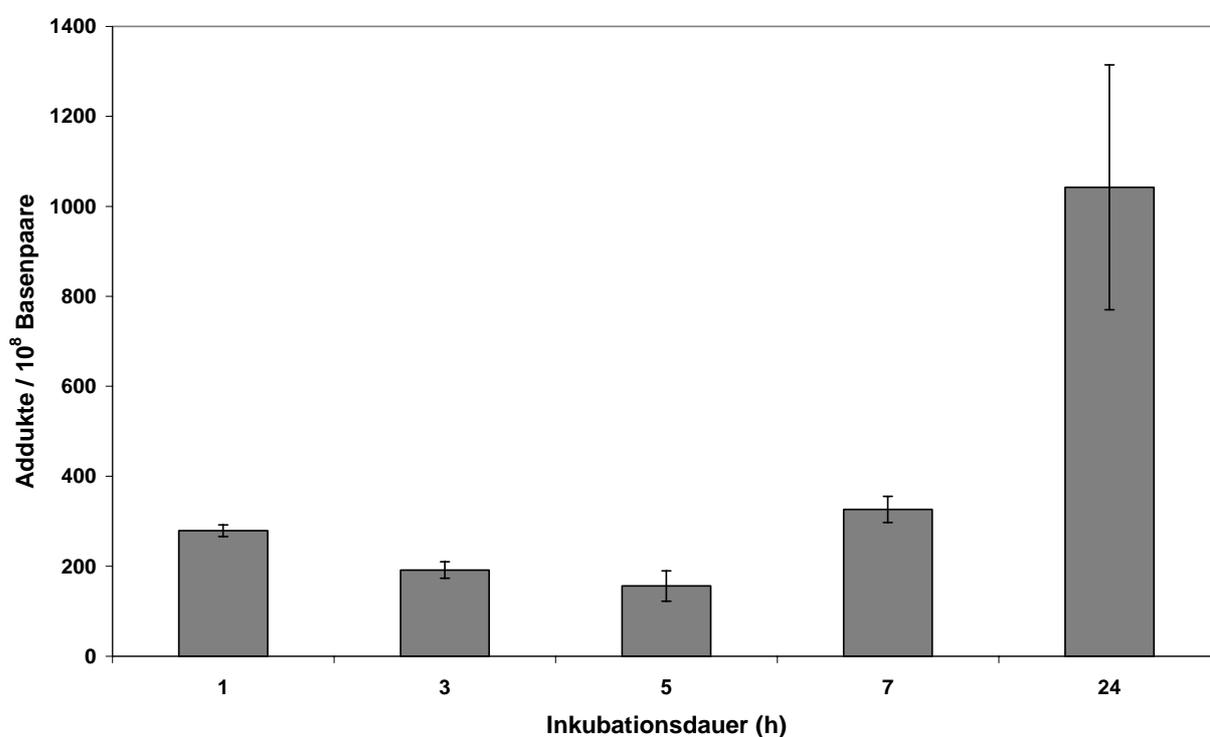


Abb. 2: Adduktbildungskinetik: Kinetik der DNA-Adduktbildung in A549-Zellen nach Inkubation mit je $5 \mu\text{g Pt} / \text{cm}^2$ Wachstumsfläche. Dargestellt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen, Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Im gezeigten Konzentrationsbereich wurde keine signifikante Verringerung der Koloniebildungsfähigkeit beobachtet.

3.3.2 Pd-Partikel

Analog zu Pt wurde auch für Pd Versuche zur Dosis- und Zeitabhängigkeit der DNA-Addukte durchgeführt. Die Ergebnisse zur Dosisabhängigkeit wurden für Pd bereits im Statusbericht 2001 dargestellt.

In Abbildung 3 sind die Ergebnisse der Zeitabhängigkeit der DNA-Adduktbildung für Pd-Partikel dargestellt.

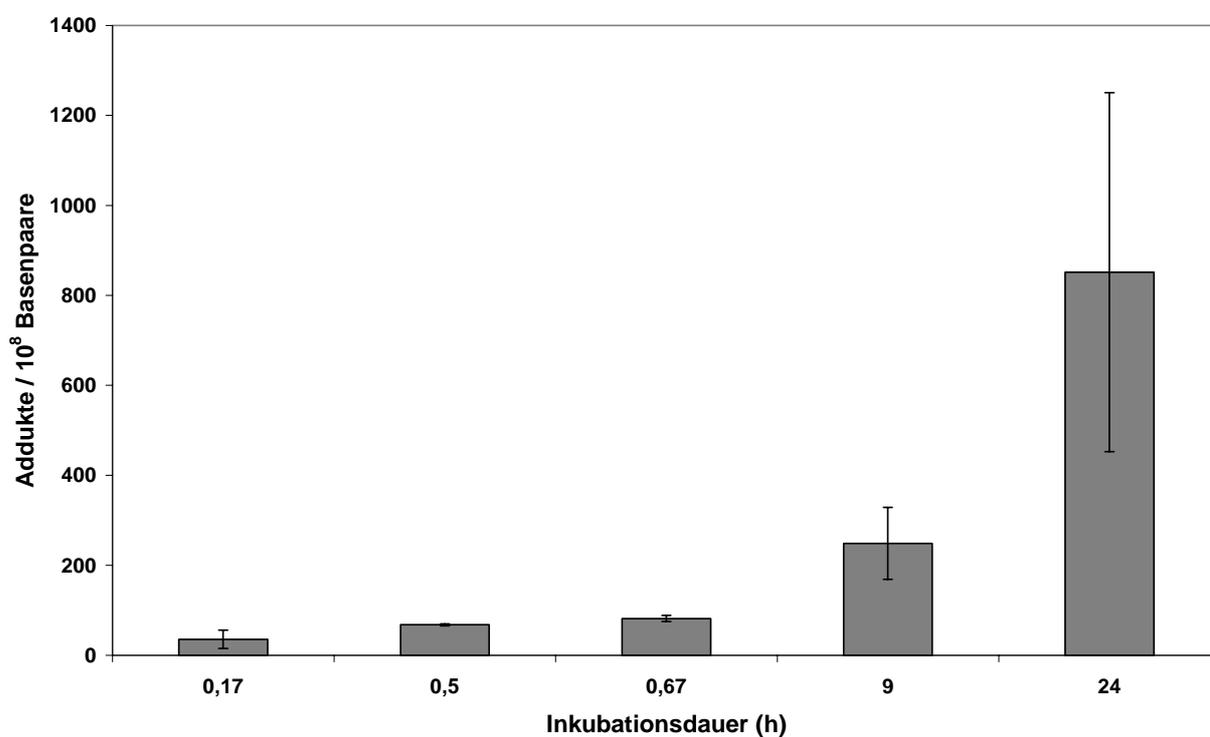


Abb. 3: Adduktbildungskinetik: Kinetik der DNA-Adduktbildung in A549-Zellen nach Inkubation mit je $5 \mu\text{g Pd} / \text{cm}^2$ Wachstumsfläche. Dargestellt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen, Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Im gezeigten Konzentrationsbereich wurde keine signifikante Verringerung der Koloniebildungsfähigkeit beobachtet.

3.3.3 Platintetrachlorid

Zum Vergleich wurden die Zellen auch mit gelöstem Platintetrachlorid inkubiert. Es ergab sich eine konzentrationsabhängige Anzahl an DNA-Addukten, wobei jedoch erst bei sehr hohen, bereits schwach zytotoxischen Dosen den partikulären PGE vergleichbare Adduktspiegel an die DNA auftraten (im Bereich von 0,1 bis 100 μM PtCl_4 wurde keine signifikante Veränderung der Koloniebildungsfähigkeit beobachtet, bei einer Dosis von 1000 μM PtCl_4 war die Koloniebildungsfähigkeit auf 77 % der Kontrolle erniedrigt). Das deutet darauf hin, dass die nach partikulärer Exposition gemessenen Adduktlevel eher aus einer Phagozytose der Partikel herrühren und nicht durch von den Partikeln im Kulturmedium gelöstes Metall entstanden sind.

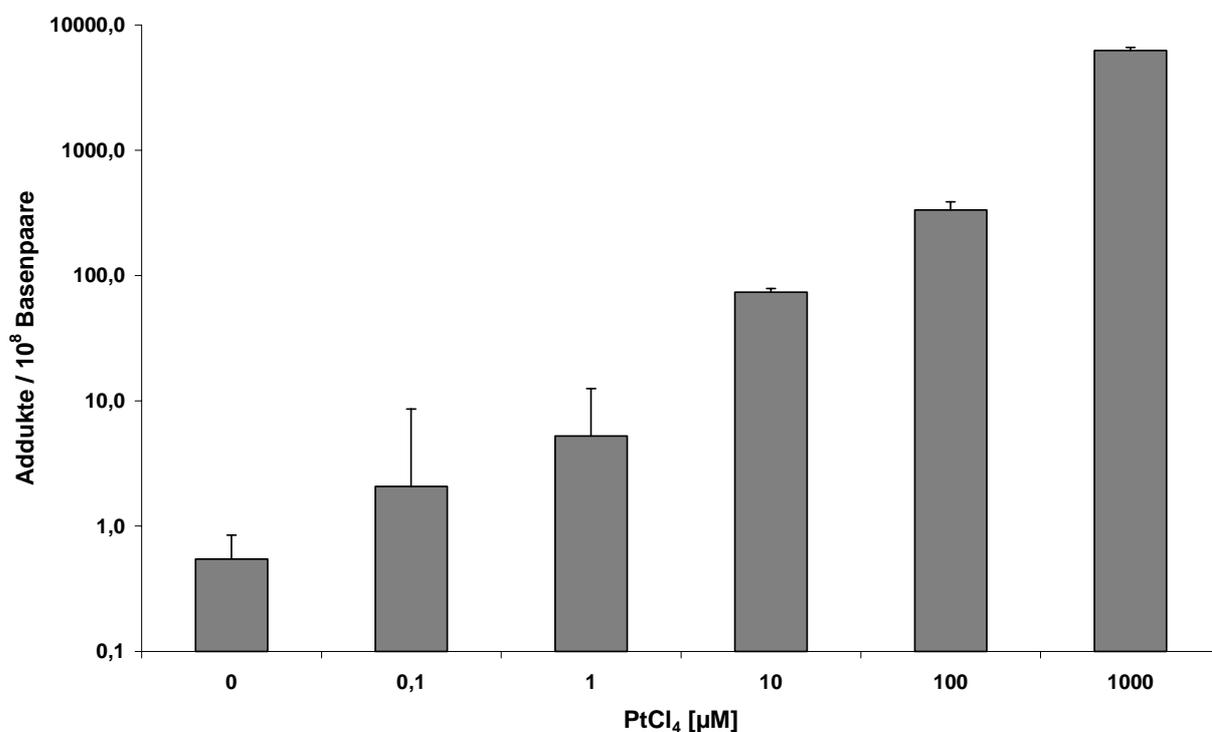


Abb. 3: **Konzentrationsabhängigkeit:** Induktion von Pt-DNA-Addukten nach 24 h Inkubation von A549-Zellen mit PtCl_4 (halblogarithmische Darstellung). Gezeigt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen, Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

4 Zusammenfassende Bewertung und Ausblick

Ziel dieser Projektphase war zunächst die Bestätigung der Ergebnisse der Vorstudie, die auf eine DNA-Bindung der aus Autokatalysatoren freigesetzten PGE hinwies. Dabei wurde ein Testsystem verwendet, mit dessen Hilfe DNA-PGE-Gehalte reproduzierbar quantifiziert werden können. Dieses umfasst die Isolierung der DNA aus exponierten Zellen, einen geeigneten Säureaufschluss und schließlich den Nachweis durch HR-ICP-MS. Die Ergebnisse zeigen messbare dosis- und zeitabhängige DNA-Adduktzahlen für Pd- und Pt-Partikel.

Diese Resultate sind neu und deuten darauf hin, dass elementare PGE-Partikel unter physiologischen Bedingungen bioverfügbar sind. Somit bieten die bisherigen Versuche eine geeignete Grundlage, die im Antrag beschriebenen Untersuchungen zur Zytotoxizität, Phagozytose, Genotoxizität, DNA-Reparatur und PGE-Mobilität weiterzuführen. Besonders relevant werden entsprechende Versuche mit den eingangs erwähnten Platin-beschichteten Aluminiumoxid-Partikeln sein, die uns bereits vom Fraunhofer Institut für Toxikologie und Aerosolforschung, Hannover, zur Verfügung gestellt wurden. Darüber hinaus hat sich seit Antragstellung die Möglichkeit eröffnet, die Platin-induzierten DNA-Addukte mit Hilfe monoklonaler Antikörper näher zu charakterisieren und sie mit den DNA-Schäden zu vergleichen, die durch zytostatische Platinverbindungen induziert werden. Entsprechende Experimente sind in Kooperation mit Herrn PD Dr. Jürgen Thomale, Universität Essen, geplant, dessen Arbeitsgruppe erstmals die Herstellung für die jeweiligen DNA-Schäden spezifischer Antikörper gelungen ist.

Vorläufige Ergebnisse des Projekts wurden beim "THIRD INTERNATIONAL MEETING ON MOLECULAR MECHANISMS OF METAL TOXICITY AND CARCINOGENICITY" in Stintino, Italien, in Form eines Posters präsentiert und mit führenden Metalltoxikologen diskutiert.

Referenzen

- Artelt, S., Creutzenberg, O., Kock, H., Levsen, K., Nachtigall, D., Heinrich, U, Rühle, T. and Schlegel, R. (1999) Bioavailability of fine dispersed platinum as emitted from automotive catalytic converters: a model study. *Sci. Total Environ.*, 228, 219 – 242.
- Cubelic, M., Peccoroni, R, Schäfer, J., Eckhardt, J.-D., Berner, Z. and Stüben, D. (1997) Verteilung verkehrsbedingter Edelmetallimmissionen im Straßenrandbereich. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung* 9 (5), 249 – 258.
- LfU (1999) Wirkungen von Emissionen des Kfz-Verkehrs auf die Pflanzen und die Umwelt. Literaturstudie

- Sambrock, Fritsch, Maniatis (1989) *Molecular cloning*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Stüben D., Menzel C. M., Eckhardt J.D., Zeller A. und Hartwig, A. (2002) Spezies der KFZ-emittierten Platingruppenelemente (PGE) und ihre toxische Wirkung (Teil A)
- Wei, C. and Morrison, G.M. (1994) Platinum analysis and speciation in urban gullypots. *Analytica Chemica Acta*, 284, 587 – 592.