

Programm Lebensgrundlage Umwelt
und ihre Sicherung (BWPLUS)

Zwischenbericht anlässlich des
Statusseminars des BWPLUS am 26. und 27.2.2002 im
Forschungszentrum Karlsruhe

**Kombinationswirkungen umweltrelevanter Metallverbindungen in
Lungenzellen**

T. Schwerdtle, I. Mackiw, A. Pelzer, A. Zeller, A. Hartwig
Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie, Universität Karlsruhe

Förderkennzeichen: BWB 99007

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

Kombinationswirkungen umweltrelevanter Metallverbindungen in Lungenzellen

T. Schwerdtle, I. Mackiw, A. Pelzer, A. Zeller, A. Hartwig
Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie, Universität Karlsruhe

Summary

This project aims to investigate the genotoxicity of soluble and particulate, environmentally relevant metal compounds in human lung cells as primary targets of metal-induced carcinogenicity as well as indirect genotoxic effects in combination with benzo[*a*]pyrene as an important environmental mutagen. Within this project, we could demonstrate that in A549 cells both soluble NiCl₂ and particulate black NiO induce only little oxidative DNA damage in a non-cytotoxic range, whereas they show a pronounced repair inhibition of BPDE-DNA adducts. The intracellular distribution of nickel(II), frequently suggested to be responsible for differences in carcinogenicity of soluble and particulate nickel compounds, has been determined after incubation with different nickel compounds by AAS. First results show that in contrast to the current opinion in literature also soluble nickel(II) reaches the nucleus in significant amounts, a finding of major importance for risk assessment. Currently we investigate the induction of oxidative DNA damage by soluble and particulate cadmium compounds and the combined effects with benzo[*a*]pyrene. Additionally the induction of oxidative DNA damage by arsenite and its two methylated metabolites MMA(V) and DMA(V) has been examined. Our experiments demonstrate the formation of oxidative DNA modifications by all three compounds, indicating that methylation does not merely resemble detoxification of arsenic compounds.

Zusammenfassung

Gesamtziel des Projektes ist die Abklärung der Genotoxizität von löslichen und partikulären, umweltrelevanten Metallverbindungen in menschlichen Lungenzellen als Zielzellen der metallinduzierten Kanzerogenese sowie Kombinationswirkungen mit Benzo[*a*]pyren als wichtigem Umweltmutagen. Bisher konnte gezeigt werden, dass sowohl lösliches NiCl₂ als auch partikuläres schwarzes NiO im nicht-zytotoxischen Bereich in A549 Zellen lediglich eine geringe Anzahl an oxidativen DNA-Schäden induzieren, wohingegen sie die Reparatur von BPDE-induzierten DNA-Addukten in diesem Bereich erheblich hemmen. Die intrazelluläre Verteilung von Nickel, die oftmals für die Unterschiede in der Kanzerogenität von löslichen und partikulären Nickelverbindungen verantwortlich gemacht wird, wurde mit Hilfe der AAS untersucht. Erste Ergebnisse zeigen, dass Nickel entgegen anders lautenden Vermutungen in der Literatur auch nach Inkubation mit löslichen Nickelverbindungen in den Zellkern gelangt, was für die Risikobewertung von großer Bedeutung ist. Zur Zeit untersuchen wir die Induktion von oxidativen DNA Schäden durch lösliche und partikuläre Cadmiumverbindungen und Kombinationswirkungen der entsprechenden Cadmiumverbindungen mit Benzo[*a*]pyren. Zusätzlich wurde auch die Induktion oxidativer DNA-Schäden durch Arsenit und seine zwei methylierten Metabolite MMA(V) und DMA(V) getestet. Unsere Experimente weisen die

Entstehung oxidativer DNA-Basenschäden durch alle drei Verbindungen nach; dies deutet darauf hin, dass es sich bei der Methylierung nicht wie bislang angenommen um eine generelle Detoxifizierung handelt.

1 Einleitung

Aufgrund ihrer weiten Verbreitung hat die Gruppe der krebserzeugenden Metallverbindungen sowohl in der Umwelt als auch am Arbeitsplatz eine große praktische Bedeutung. Dennoch sind die zugrunde liegenden Mechanismen noch unklar, da mit Ausnahme von Chromaten die Mutagenität nur schwach und/oder erst bei hohen Konzentrationen nachweisbar ist. Demgegenüber zeigten eigene Untersuchungen, dass wasserlösliches Nickel(II) und Cadmium(II) zwar erst in vergleichsweise hohen Konzentrationen oxidative DNA-Schäden induzieren, aber in sehr geringen Konzentrationen die Reparatur endogener oxidativer und durch Umweltmutagene induzierter DNA-Schäden hemmen und so deren genotoxische Wirkung verstärken (zusammengefasst in Hartwig, 2000). Gesamtziel des Projektes ist zum einen die Untersuchung der direkten Genotoxizität von löslichen und umweltrelevanten partikulären Nickel- und Cadmiumverbindungen in Lungenzellen, den Zielzellen der metallinduzierten Kanzerogenese, sowie ihr Einfluss auf die Reparatur Benzo[*a*]pyren-induzierter DNA Schäden. Ausgehend von der Tatsache, dass Metallverbindungen sowohl in der allgemeinen Umwelt als auch am Arbeitsplatz nie allein auftreten, sondern praktisch immer vergesellschaftet mit anderen toxischen Substanzen wie beispielsweise polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, liefern die geplanten Versuche zum Einfluss der Metallverbindungen auf DNA-Reparaturprozesse eine wichtige Grundlage zur Abschätzung von Kombinationswirkungen mit anderen DNA-schädigenden Agenzien. In der ersten Projektphase konnte in menschlichen Lungenadenokarzinomzellen (A549) eine ausgeprägte Reparaturhemmung von BPDE-DNA-Addukten durch nicht-zytotoxische Konzentrationen von löslichem NiCl₂ und partikulärem schwarzen NiO gezeigt werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die zuvor in unserer Arbeitsgruppe in HeLa Zellen durch NiCl₂ beobachtete Hemmung der Reparatur UV-induzierter DNA-Schäden die Nukleotidexzisionsreparatur generell betrifft. Gleichzeitig konnte zum ersten Mal eine Reparaturhemmung durch eine umweltrelevante partikuläre Nickelverbindung gezeigt werden. Die Reparaturhemmung trifft folglich auch für weitgehend wasserunlösliche, umweltrelevante Formen von Nickel zu. Im zweiten Teil des Projektes wurden nun zum einen direkte genotoxische Effekte der Nickelverbindungen untersucht, zum anderen die intrazelluläre Verteilung von Nickel bestimmt. Grundlage für diese Fragestellung sind Befunde, nach denen sich unterschiedliche Verbindungen eines Metalls erheblich in ihrer Kanzerogenität unterscheiden. Als Ursache für die hohe Kanzerogenität von partikulären Nickelverbindungen im Vergleich zu wasserlöslichen wird die Bioverfügbarkeit der Substanzen gesehen. Nickelpartikel werden im Gegensatz zu löslichen Verbindungen phagozytiert und in Lysosomen in Kernnähe gebracht. Durch den sauren pH-Wert in den Lysosomen lösen sich die Partikel auf und sollen

dadurch verglichen mit löslichen Nickelverbindungen weitaus höhere Konzentrationen an Nickelionen im Zellkern bewirken (Costa et al., 1981; Fletcher et al., 1994). Neben den laufenden Untersuchungen zu Cadmium haben wir uns aufgrund der aktuellen Diskussion um eine Bewertung kanzerogener Effekte durch niedrige Arsenkonzentrationen im Trinkwasser (National Research Council, 2001) kurzfristig dazu entschlossen, zusätzlich auch die Genotoxizität von Arsenit und seinen Metaboliten zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Die menschlichen Zelllinien HeLa S3 und A549 wurden in F12-Medium bzw. DMEM-Medium bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit in Gewebekulturschalen kultiviert.

2.2 Chemikalien

Partikuläres schwarzes NiO wurde uns freundlicherweise von Frau Dr. Adriana Oller, Fa. NIPERA (Nickel Producers Environmental Research Association), Durham, North Carolina, USA, zur Verfügung gestellt. Die Partikel sind bezüglich der Oberflächeneigenschaften gut charakterisiert; der Durchmesser beträgt $3,8 \pm 1,0 \mu\text{m}$. NiCl₂ wird von der Firma Fluka Chemie (Buchs, Deutschland) bezogen. Die Präparation der Partikel und Inkubationslösungen erfolgte wie im Zwischenbericht 2001 angegeben. AsNaO₂ ist ein Produkt der Firma Fluka Chemie (Buchs, Deutschland), DMA(V) der Firma Riedel-de Haën (Seelze, Deutschland). MMA(V) wird von der Firma Greyhound Chromatography and Allied Chemicals (Birkenhead Merseyside, UK) bezogen. Die Inkubationslösungen wurden in bidestilliertem Wasser angesetzt und sterilfiltriert. Benzo[a]pyren (HPLC-Grade, ca. 98%) ist ein Produkt der Firma Fluka. Die Inkubationslösungen wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn in DMSO angesetzt.

2.3 Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit

Logarithmisch wachsende Zellen wurden entsprechend den jeweiligen Versuchsbedingungen inkubiert, abtrypsiniert und jeweils 300 Zellen wurden zur Koloniebildung ausgesät. Nach 7 Tagen wurde das Medium abgesaugt, mit PBS gewaschen, mit Ethanol fixiert, mit Giemsa-Farbstoff gefärbt und die Kolonien wurden ausgezählt.

2.4 Alkalische Entwindung

Bei der Methode der Alkalischen Entwindung wird nach der Entwindung der DNA im Alkalischen, Fraktionierung von einzelsträngiger und doppelsträngiger DNA durch eine Hydroxylapatit-Chromatographie und fluorimetrischer Quantifizierung der Fraktionen, die Anzahl an DNA-Strangbrüchen und oxidativen DNA-Basenschäden bestimmt, die durch das

bakterielle Reparaturenzym Fpg (Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase) erkannt werden. Hierbei ist die Entwindung der DNA umso stärker ausgeprägt, je größer die Anzahl an oxidativen DNA-Schäden ist. Zur Quantifizierung der induzierten DNA-Schäden wurden jeweils $1 \cdot 10^5$ Zellen in Kulturschalen (40*10 mm) ausgesät und den jeweiligen Versuchsbedingungen entsprechend inkubiert. Die weitere Durchführung und Berechnung der induzierten DNA-Schäden erfolgte nach Hartwig et al. (1996).

2.5 Bestimmung der intrazellulären Nickelverteilung nach Inkubation von A549 Zellen mit NiCl₂ mittels Graphitrohr-AAS

Logarithmisch wachsende A549 Zellen wurden entsprechend den Versuchsbedingungen mit NiCl₂ inkubiert, nach der Inkubationszeit abtrypsiniert und mindestens dreimal mit kaltem PBS gewaschen. Nach der Bestimmung der Zellzahl (Dreifachbestimmungen) mit einem automatischen Zellzählgerät wurde die Zellsuspension zur Bestimmung von Nickel in der Gesamtzelle, im Cytoplasma und Zellkernextrakt aliquotiert. Nach der Präparation der Zellfraktionen erfolgte die Quantifizierung von Nickel an einer Graphitrohr-AAS.

Gesamtzelle

$1 - 2 \cdot 10^6$ Zellen wurden 12 h mit 65% HNO₃ suprapur und 30% H₂O₂ suprapur (1:1) bei 85°C verascht, die Asche wurde in 1% HNO₃ suprapur aufgenommen und zur AAS-Analyse eingesetzt.

Cytoplasma und Zellkernextrakt

Die Fraktionierung der Zelle basiert auf einer Methode zur Präparation von Zellkernextrakten (Hartmann und Hartwig, 1998). Die Methode wurde in einzelnen Punkten modifiziert und erweitert. Hierzu wurden $1 - 2 \cdot 10^6$ Zellen in 500 µl/10⁶ Zellen eiskaltem Zellysepuffer (10 mM HEPES pH 7,9, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,3 M Saccharose, 0,5 mM DTT, 0,6 mM PMSF, 4,7 mM Leupeptin) resuspendiert und 15 min auf Eis gestellt. Nach der Zugabe von eiskaltem 10%igem NP-40 (25 µl/10⁶ Zellen) wurde 10 s mittels Vortex gut durchmischt und bei 1500g und 4°C 15 min zentrifugiert. Der Überstand, welcher das Cytoplasma enthält, wurde vorsichtig abgenommen und ein Aliquot zur Proteinbestimmung nach Bradford eingesetzt (jeweils Dreifachbestimmungen). Der Rest wurde bis zur AAS-Analyse bei -80°C gelagert. Das Pellet mit den Zellkernen wurde mindestens zweimal mit dem Zellysepuffer gewaschen und für 30 min unter Schütteln auf Eis mit 100 µl/10⁶ Zellen Kernlysepuffer (10 mM HEPES pH 7,9, 400 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 25% Glycerin, 0,5 mM DTT, 0,6 mM PMSF, 4,7 mM Leupeptin) inkubiert. Nach erneutem Abzentrifugieren für 15 min bei 10000g und 4°C wurde der Überstand, welcher die Zellkernproteine enthält, vorsichtig abgenommen und ein Aliquot zur Proteinbestimmung nach Bradford eingesetzt. Der Rest wurde bis zur AAS-Analyse bei -80°C gelagert. Cytoplasma- und Zellkernproteinlösung wurden zur AAS-Analyse nach Bedarf verdünnt und mit HNO₃ suprapur (Endkonzentration 1%) versetzt. Die intrazelluläre

Nickelverteilung wurde zum einen auf das Zell- bzw. Zellkernvolumen bezogen, zum anderen auf den entsprechenden Proteingehalt in Cytoplasma und Zellkern.

2.6 HPLC-Fluoreszenz-Assay zur Quantifizierung von DNA-Addukten des Benzo[*a*]pyrens in zellulärer DNA

Die Etablierung des Assays und die Bestimmung von BPDE-DNA-Addukten erfolgte wie im Zwischenbericht 2001 und in Schwerdtle et al. (2002) beschrieben.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von Nickel auf die Reparatur von BPDE-induzierten DNA-Addukten

Im zweiten Teil des Projektes wurde zunächst die beobachtete Reparaturhemmung von BPDE-induzierten DNA-Addukten durch partikuläre und lösliche Nickelverbindungen durch weitere Versuche vervollständigt, bestätigt (siehe Abb. 1) und publiziert (Schwerdtle et al., 2002). Um Wechselwirkungen mit der Metabolisierung zu vermeiden wurde hierzu weiterhin der reaktive Metabolit (+)-*anti*-BPDE als schädigendes Agens eingesetzt, welcher stabile N²-Guanin-Addukte bildet und aus heutiger Sicht maßgeblich zur kanzerogenen Wirkung von Benzo[*a*]pyren (B[*a*]P) beiträgt.

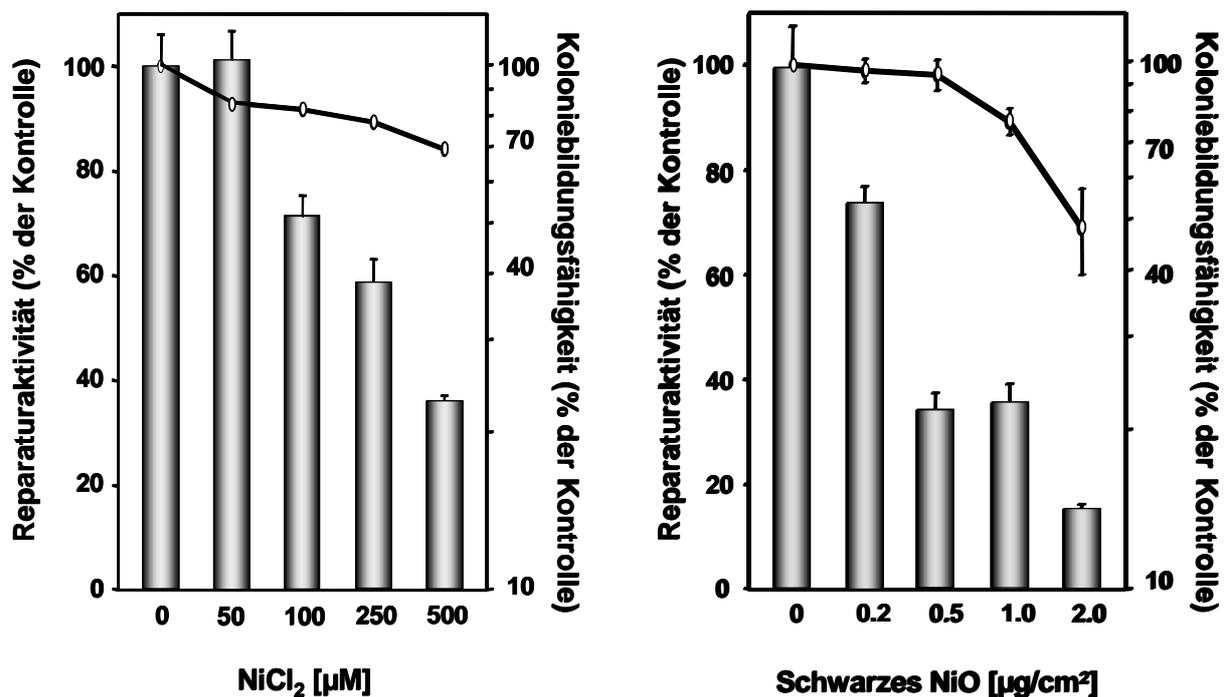


Abb.1: Einfluss von Nickel auf die Reparatur von BPDE-induzierten DNA-Addukten. Logarithmisch wachsende A549 Zellen wurden 20/24 h mit NiCl₂ bzw. NiO vorinkubiert, 2 h mit 50 nM (+)-*anti*-BPDE koinkubiert und 6 bzw. 8 h in Gegenwart von NiCl₂ bzw. NiO nachinkubiert. Reparaturaktivität: Mittelwerte aus mindestens vier unabhängigen Versuchen + SD; Koloniebildungsfähigkeit: Mittelwerte aus 12 Bestimmungen ± SD.

In neuerer Zeit diskutiert man jedoch auch mindestens zwei weitere Aktivierungswege des B[a]P, welche u.a. zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führen können (Cavalieri und Rogan, 1995). Zur Abklärung der Frage, inwieweit die untersuchten BPDE-DNA-Addukte auch für die Exposition gegenüber B[a]P von Bedeutung sind, wurde dessen DNA-Schadensspektrum in A549 Zellen untersucht. Die menschliche Lungenadenokarzinom-Zelllinie A549 zeigt bezüglich des Fremdstoffmetabolismus typische Eigenschaften von Typ-II Pneumozyten. Aufgrund der vorhandenen P450IA1-Aktivität kann B[a]P daher in diesem System ohne vorherige Aktivierung metabolisiert werden. Nach Inkubation der Zellen mit nicht-zytotoxischen Konzentrationen wurde zum einen die Bildung von BPDE-DNA-Addukten mit dem etablierten HPLC-Fluoreszenz-Assay, zum anderen die Bildung von DNA-Strangbrüchen und Fpg-sensitiven Stellen mit der Methode der Alkalischen Entwindung untersucht. Während B[a]P nach 24 und 48 h Inkubation lediglich eine geringe Anzahl an Strangbrüchen und Fpg-sensitiven Stellen induzierte (48 h siehe Abb. 2, 24 h nicht dargestellt), konnte für beide Inkubationszeiten selbst bei sehr geringen Konzentrationen von 50 – 750 nM B[a]P eine mindestens 20-fach höhere dosisabhängige Induktion von BPDE-DNA-Addukten gezeigt werden (Abb. 3). Diese Ergebnisse verdeutlichen die Relevanz der durchgeführten Untersuchungen zur Reparaturhemmung von BPDE-DNA-Addukten. Erstaunlicherweise scheint es ab Konzentrationen größer 750 nM zunächst zu einer Sättigung der Adduktzahlen, dann sogar zu einem Rückgang zu kommen. Binková et al. (2000) zeigten kürzlich ebenfalls diese Umkehr der Dosis-Wirkungsbeziehung bei der DNA-Adduktbildung von B[a]P. Mögliche Erklärungen hierfür könnten eine Sättigung der metabolisierenden Enzyme oder auch die Inaktivierung dieser Enzyme über eine Bildung von Protein-Addukten sein. Denkbar wäre auch eine Verlagerung der Aktivierungswege.

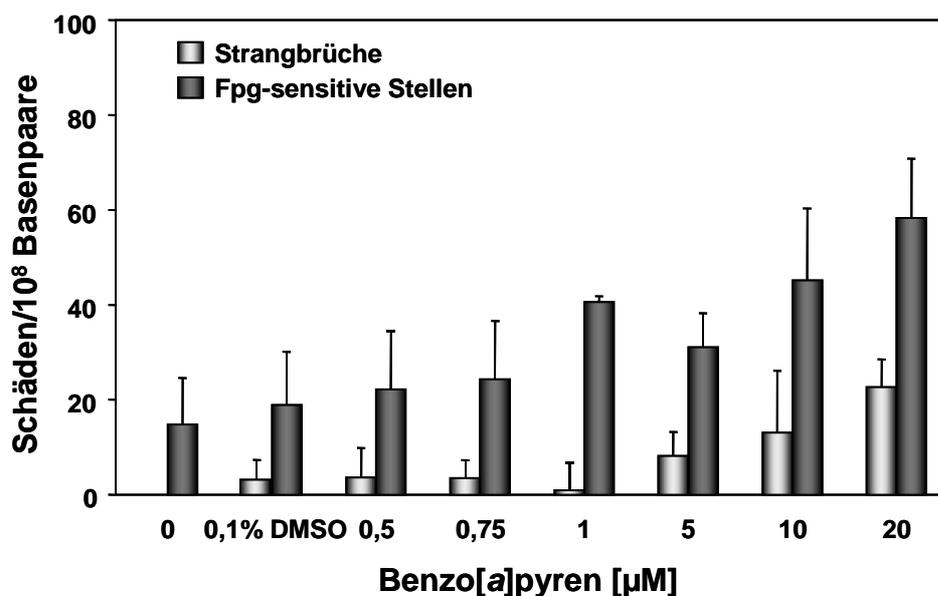


Abb.2: Induktion von DNA-Strangbrüchen und Fpg-sensitiven Stellen durch B[a]P. Logarithmisch wachsende A549 Zellen wurden 48 h mit B[a]P (Endkonzentration DMSO 0,1 %) inkubiert. Gezeigt sind Mittelwerte aus mindestens drei Versuchen + SD.

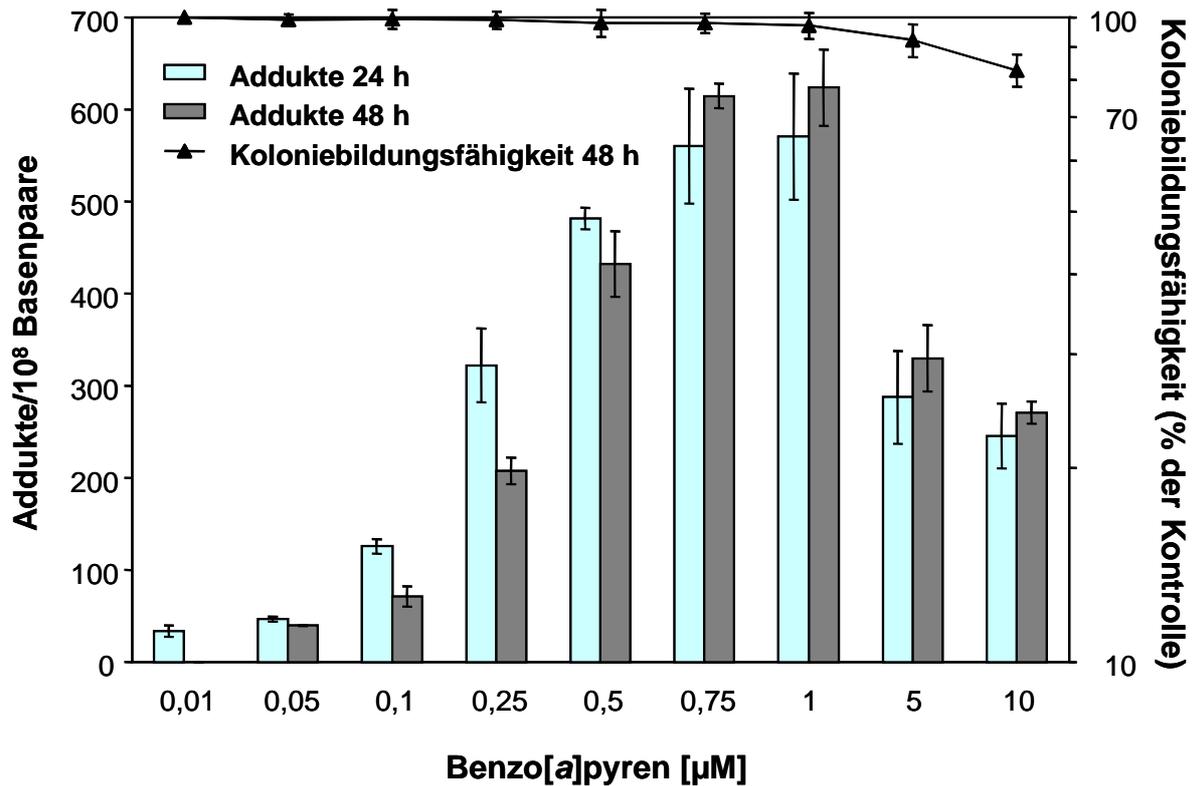


Abb.3: Induktion von BPDE-DNA-Addukten durch B[a]P. Logarithmisch wachsende A549 Zellen wurden 24 bzw. 48 h mit B[a]P (Endkonzentration DMSO 0,1 %) inkubiert. Addukte: Mittelwerte aus mindestens vier unabhängigen Studien \pm SD; Koloniebildungsfähigkeit: Mittelwerte aus 6 Bestimmungen \pm SD.

3.2 Induktion oxidativer DNA-Schäden durch NiCl₂ und schwarzes NiO

In einem nächsten Schritt sollten direkte genotoxische Effekte der beiden verwendeten Nickelverbindungen untersucht werden. Hierzu wurde mit der Methode der Alkalischen Entwindung zunächst in A549 Zellen die Induktion von DNA-Strangbrüchen und Fpg-sensitiven Stellen quantifiziert. Sowohl lösliches NiCl₂ als auch partikuläres schwarzes NiO induzierten in A549 Zellen im nicht-zytotoxischen Bereich lediglich eine geringe Anzahl an DNA-Strangbrüchen und Fpg-sensitiven Stellen (Abb. 4). In diesem nicht-zytotoxischen Bereich zeigten beide Nickelverbindungen bereits eine ausgeprägte Hemmung der Reparatur von BPDE-DNA-Addukten (siehe Abbildung 1).

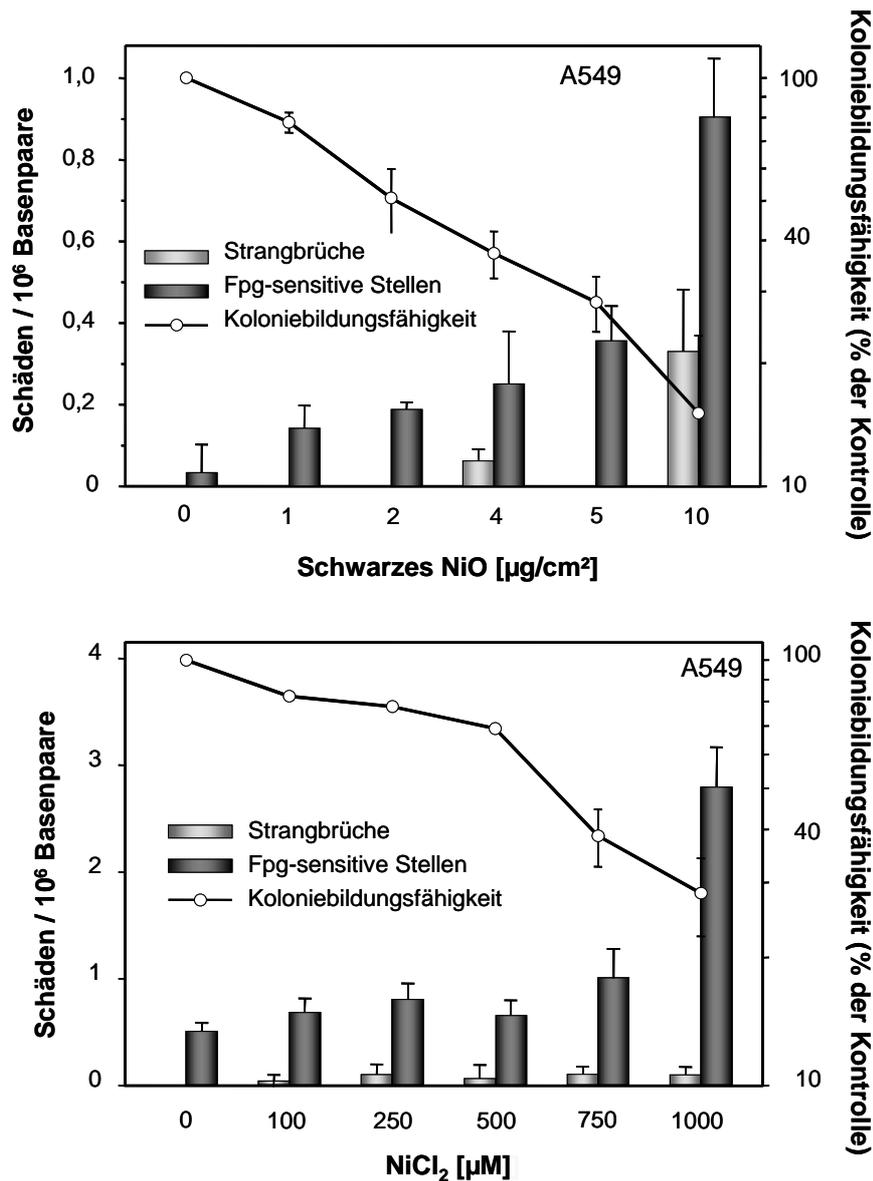


Abb.4: Induktion oxidativer DNA-Schäden durch lösliches NiCl₂ und partikuläres NiO in A549 Zellen. Logarithmisch wachsende A549 Zellen wurden 20 bzw. 24 h mit NiCl₂ und NiO inkubiert. Gezeigt sind Mittelwerte aus mindestens sechs Bestimmungen + SD.

Diese Ergebnisse bestätigen die Versuche in HeLa Zellen, bei denen nicht-zytotoxische Konzentrationen an löslichem NiCl₂ ebenfalls nur eine geringe Anzahl an oxidativen DNA-Schäden induzierten (Dally und Hartwig, 1997), wohingegen eine starke Reparaturhemmung von UV-induzierten DNA-Schäden gezeigt wurde (Hartwig et al., 1994). Erstaunlicherweise induzierte partikuläres schwarzes NiO in HeLa Zellen jedoch bereits im nicht-zytotoxischen Bereich eine hohe Anzahl an Fpg-sensitiven Stellen (Abb. 5). Mögliche Erklärungen hierfür könnten unterschiedliche Phagozytosekapazitäten und/oder unterschiedliche Kapazitäten zur Detoxifizierung reaktiver Sauerstoffspezies in den beiden Zelllinien sein. Zur Klärung dieser Fragen könnten Untersuchungen zur intrazellulären Verteilung von Nickel nach Inkubation mit den verschiedenen Nickelverbindungen in beiden Zelllinien hilfreich sein.

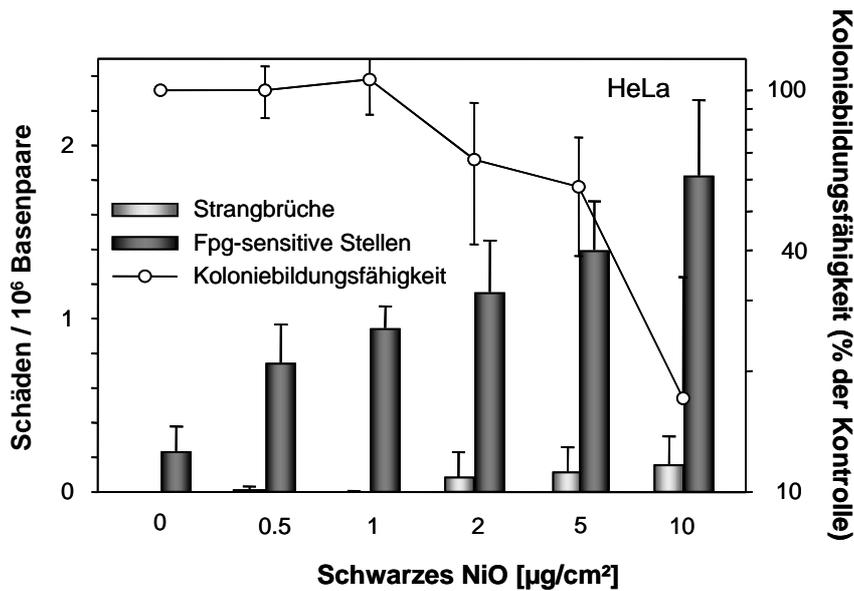


Abb.5: Induktion von Strangbrüchen und Fpg-sensitiven Stellen durch partikuläres NiO in HeLa S3 Zellen. Logarithmisch wachsende HeLa S3 Zellen wurden 24 h mit NiO inkubiert. Gezeigt sind Mittelwerte aus mindestens sechs Bestimmungen + SD.

3.3 Bestimmung der intrazellulären Verteilung von Nickel mittels Graphitrohr-AAS

Nach der Etablierung und Optimierung der Probenaufarbeitung und der AAS-Analyse wurde der Gehalt an Nickel im Cytoplasma und im Zellkernextrakt nach Inkubation von A549 Zellen mit löslichem NiCl_2 und partikulärem NiO untersucht. Die AAS-Analyse hat unter den gegebenen Voraussetzungen eine Nachweisgrenze von 0,5 ppb Nickel (definiert als dreifaches Basislinienrauschen). Die Kalibrierungen wurde im linearen Bereich von 2-20 ppb Nickel durchgeführt, wobei der Korrelationskoeffizient immer größer als 0,99 war. Um Matrixeffekte auszuschließen, wurden im Vorfeld zahlreiche Untersuchungen durchgeführt, welche zeigten, dass die Bestimmungen von Nickel im Cytoplasma und Zellkernextrakt direkt ohne vorherigen Aufschluss durchgeführt werden können. Abbildung 6 zeigt die dosisabhängige intrazelluläre Nickelverteilung nach Inkubation von A549 Zellen mit NiCl_2 bzw. mit schwarzem NiO. Die Versuche belegen, dass auch nach Inkubation mit einer löslichen Nickelverbindung Nickel in den Zellkern gelangt.

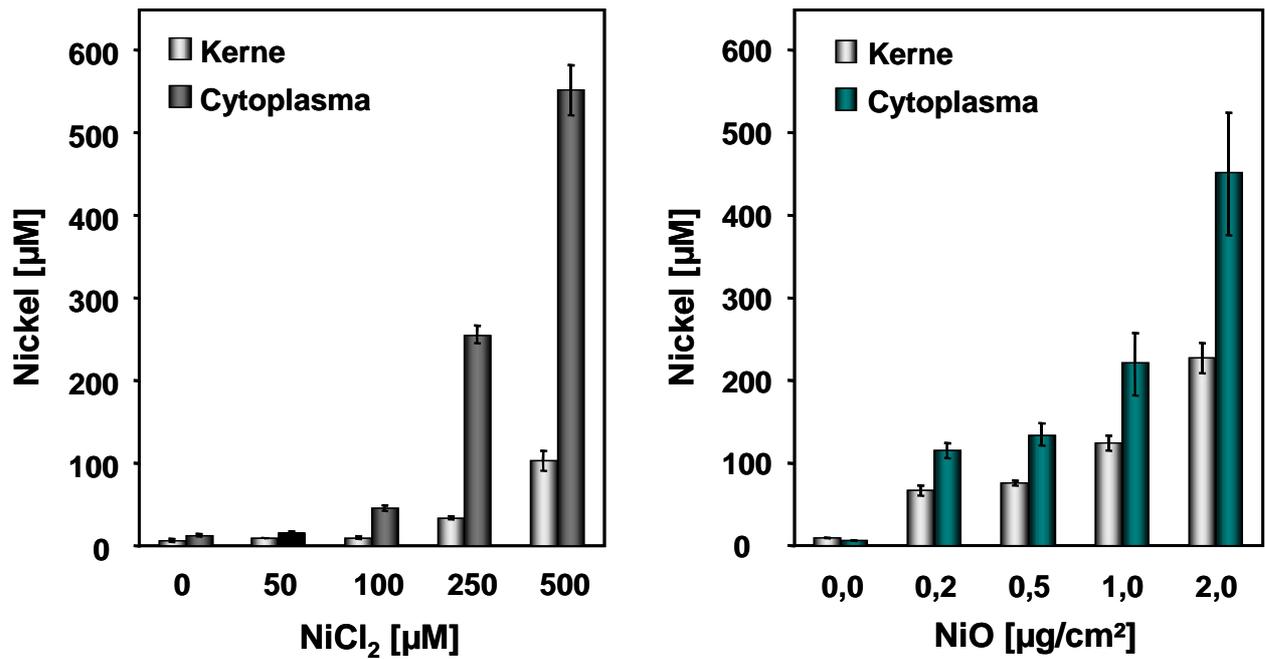


Abb.6: Intrazelluläre Nickelverteilung nach 20 / 24 h Inkubation von A549 Zellen mit NiCl₂ bzw. NiO. Das Zellvolumen wurde mittels eines automatischen Zellzählgerätes mit $1,96 \cdot 10^{-12}$ l, das Zellkernvolumen mit $2,68 \cdot 10^{-13}$ l bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte aus mindestens 4 unabhängigen Bestimmungen \pm SD.

3.4 Genotoxizität von Arsenit und seinen Metaboliten MMA und DMA

Anorganisches Arsen wird im menschlichen Körper über Methylierung in die beiden Metabolite Monomethylarsonsäure (MMA (V)) und Dimethylarsonsäure (DMA(V)) überführt. Während bislang die Methylierung aufgrund der Senkung der akuten Toxizität ausschließlich als Detoxifizierung betrachtet wurde, stellt sich in neuerer Zeit die Frage nach dem genotoxischen Potenzial der Metabolite. Im Rahmen dieser Studie wurde die Induktion von DNA-Strangbrüchen und Fpg-sensitiven Stellen durch Natriumarsenit, MMA und DMA in HeLa S3 Zellen nach Kurzzeit- und Langzeitexpositionen bestimmt. Selbst die sehr geringe Konzentration von 10 nM Natriumarsenit induziert bei Kurzzeitexpositionen von 0,5 – 3 h eine hohe Anzahl von bis zu 1,2 Fpg-sensitiven Stellen / 10^6 Basenpaare, was etwa 7200 Fpg-sensitiven Stellen/Zelle entspricht (Abb. 7). Auch beide Metabolite zeigten bei diesen Inkubationszeiten bereit eine hohe Anzahl an Fpg-sensitiven Stellen von bis zu 6000 Fpg-sensitiven Stellen/Zelle (Abb. 7). Demgegenüber induzierten alle drei Verbindungen bei allen Kurzzeitexpositionen lediglich eine geringe Anzahl an DNA-Strangbrüchen (Daten nicht dargestellt).

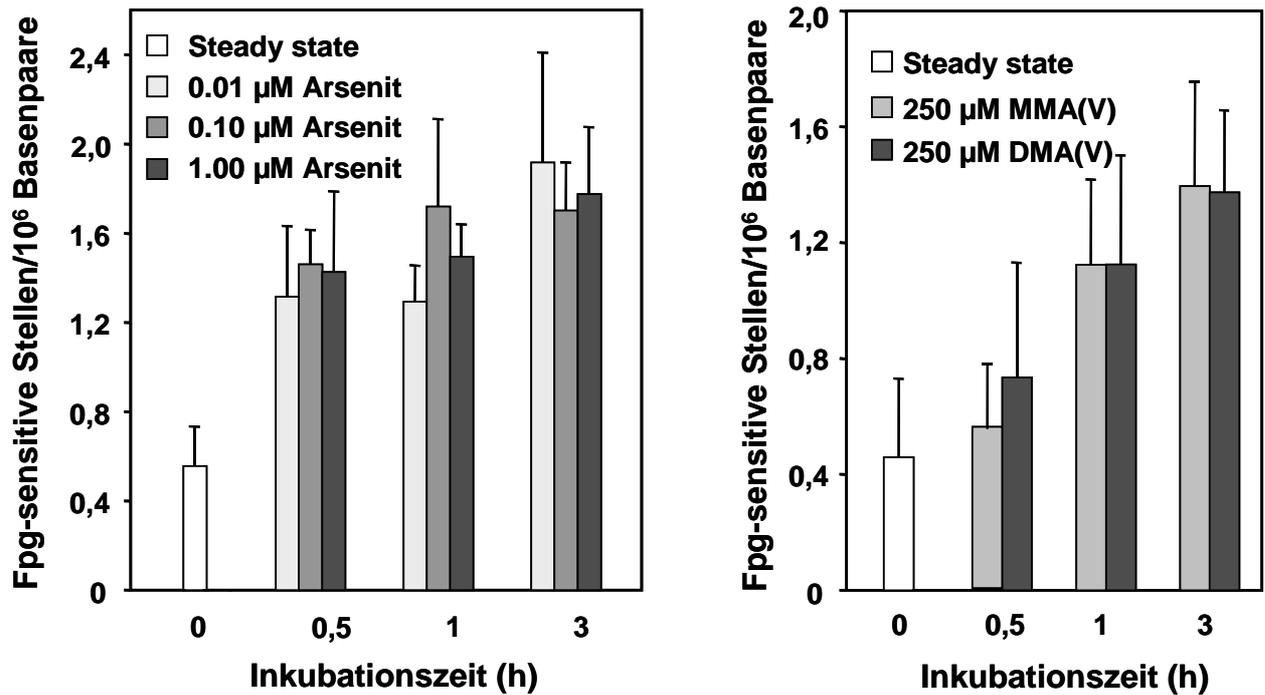


Abb.7: Induktion Fpg-sensitiver Stellen nach Kurzzeitexposition mit Arsenit, MMA(V) und DMA(V). Logarithmisch wachsende HeLa S3 Zellen wurden 0,5 – 3 h mit 0,01 – 1 μM Arsenit bzw. 250 μM MMA(V)/DMA(V) inkubiert. Gezeigt sind Mittelwerte aus mindestens sechs unabhängigen Bestimmungen + SD.

Während nach 18 h Inkubation mit Arsenit nur noch eine geringe Anzahl an Strangbrüchen und Fpg-sensitiven Stellen zu beobachten war (Abb. 8), verblieben im Fall der beiden Metabolite MMA(V) und DMA(V) auch nach 18 h im nicht-zytotoxischen Bereich eine hohe Anzahl an Fpg-sensitiven Stellen (Abb. 9). DMA(V) zeigte zudem eine konzentrationsabhängige Induktion von bis zu 0,3 Strangbrüchen/ 10^6 Basenpaare (500 μM), wohingegen MMA(V) keine Strangbrüche induzierte (Daten nicht dargestellt).

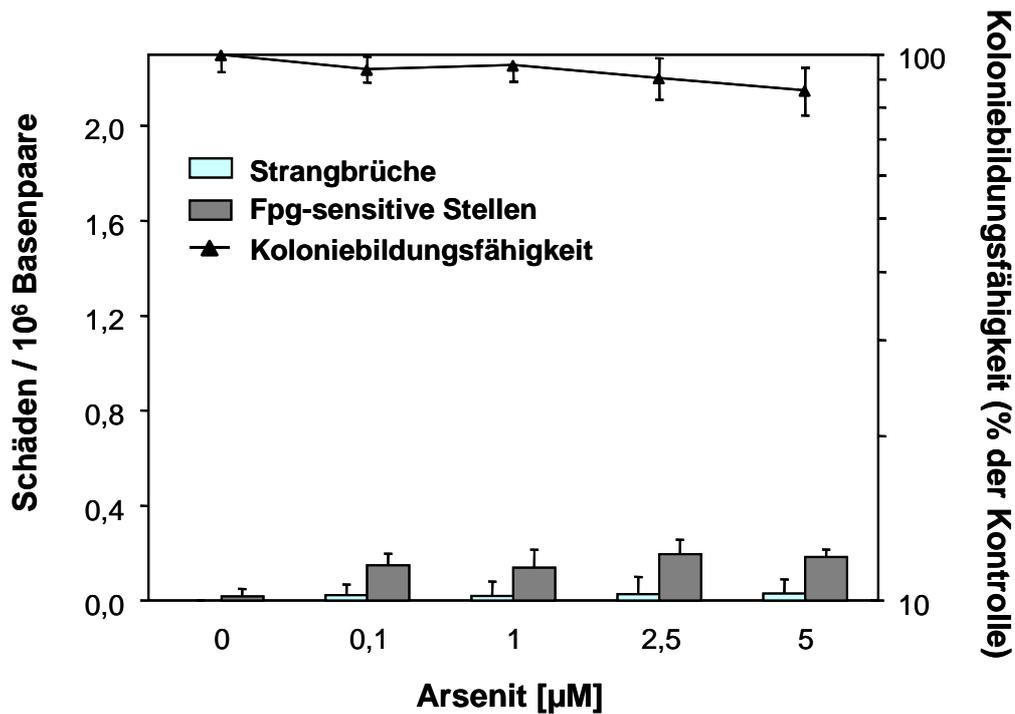


Abb.8: Induktion von Strangbrüchen und Fpg-sensitiven Stellen nach 18 h Inkubation mit Arsenit. DNA-Schäden: Mittelwerte aus mindestens sechs unabhängigen Bestimmungen + SD; Koloniebildungsfähigkeit: Mittelwerte aus 6 Bestimmungen ± SD

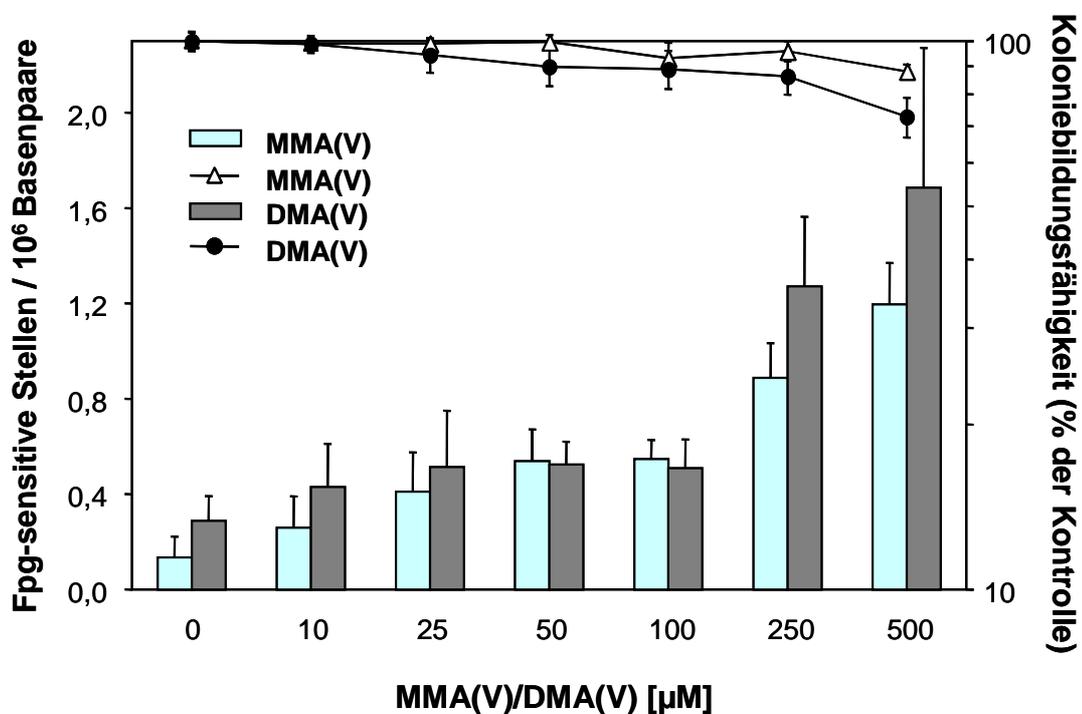


Abb.9: Induktion von Fpg-sensitiven Stellen nach 18 h Inkubation mit MMA(V) und DMA(V). DNA-Schäden: Mittelwerte aus mindestens sechs Bestimmungen + SD; Koloniebildungsfähigkeit: Mittelwerte aus 6 Bestimmungen ± SD

4 Zusammenfassende Bewertung und Ausblick

In der zweiten Projektphase wurde die Induktion von oxidativen DNA Schäden durch NiCl_2 und NiO untersucht. Beide Nickelverbindungen induzieren in A549 Zellen im nicht-zytotoxischen Bereich lediglich eine geringe Anzahl an oxidativen DNA-Schäden. In diesem Bereich konnte in der ersten Projektphase eine ausgeprägte Hemmung der Reparatur von BPDE-induzierten DNA-Addukten gezeigt werden. Nach der Optimierung einer Messmethode zur intrazellulären Verteilung von Nickel wurden erste Untersuchungen mit NiCl_2 in A549 Zellen durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Nickel auch nach Inkubation mit einer löslichen Nickelverbindung im Kern ankommt, was in der Literatur nach wie vor umstritten ist, jedoch für die Risikobewertung löslicher Nickelverbindungen von großer Bedeutung ist. In Anlehnung an die Nickeluntersuchungen wurde kürzlich begonnen, die Genotoxizität von löslichen und partikulären Cadmiumverbindungen zu untersuchen. Hierbei werden zum einen die Induktion oxidativer DNA-Schäden und zum anderen Kombinationswirkungen des Metalls mit Benzo[*a*]pyren untersucht. Experimente zur Induktion von oxidativen DNA-Schäden durch Arsen und seine Metabolite MMA(V) und DMA(V) belegen erstmals ein genotoxisches Potenzial auch der beiden Metabolite, wobei kaum DNA-Strangbrüche, aber deutlich oxidative DNA-Basenmodifikationen induziert wurden. Diese Ergebnisse sind neu und es erscheint fraglich, ob die Methylierung von anorganischem Arsen, wie lange Zeit angenommen, ausschließlich als Detoxifizierung betrachtet werden kann. Arsenit induzierte nach Kurzzeitexpositionen schon bei einer Konzentration von 10 nM eine erhebliche Anzahl an oxidativen DNA-Basenmodifikationen, deren Ausmaß nach 18 h jedoch deutlich zurückgegangen war. Basierend auf diesen Ergebnissen sind weitere Untersuchungen mit Arsenit und seinen Metaboliten u. a. zur Spezifizierung der Schäden und zum Mechanismus der Schädigung geplant.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass im Fall von Nickelverbindungen die indirekten genotoxischen Effekte, gemessen als Einfluss auf die Reparatur Benzo[*a*]pyren-induzierter DNA-Schäden, in A549 Lungenzellen ausgeprägter sind als die direkte DNA-Schädigung. Hervorzuheben ist weiterhin, dass dies sowohl für wasserlösliche als auch für partikuläre Nickelverbindungen zutrifft; auch in der intrazellulären Verteilung konnten wir die vermuteten großen Unterschiede nicht verifizieren. Die wesentlich stärkere Kanzerogenität der partikulären Nickelverbindungen ist vermutlich eher in der längeren Retentionszeit in der Lunge begründet. Entsprechende vergleichende Ergebnisse zu Cadmium- und Arsenverbindungen werden zu Ende der dritten Projektphase vorliegen.

Danksagung

Unser besonderer Dank gilt Frau Dr. Adriana Oller, Fa. NIPERA, Durham, North Carolina, USA für die Überlassung des NiO und Herrn Dr. Serge Boiteux, Fontenay aux Roses, Frankreich, für die freundliche Überlassung des Fpg-Proteins. Für die praktische Unterstützung im Labor danken wir Herrn Martin Chavillie. Dem Institut für Mineralogie und Geochemie danken wir für die Möglichkeit zur Mitbenutzung der Graphitrohr-AAS.

Referenzen

- Binkova, B., Y. Giguere, P. Rössner, M. Dostal and R.J. Sram (2000). The effect of dibenzo[*a,l*]pyrene and benzo[*a*]pyrene on human diploid lung fibroblasts: the induction of DNA adducts, expression of p53 and p21(WAF1) proteins and cell cycle distribution. *Mutat Res* 471(1-2): 57-70.
- Cavalieri, E. L. and E. G. Rogan (1995). Central role of radical cations in metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Xenobiotica* 25(7), 677-88.
- Costa, M., J. Simmons-Hansen, C.W.M. Bedrossian, J. Bonura and R.M. Caprioli (1981) Phagocytosis, cellular distribution and carcinogenic activity of particulate nickel compounds in cell culture. *Cancer Res.*, 41, 2868 - 2876.
- Dally, H. and A. Hartwig (1997). Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells. *Carcinogenesis* 18(5), 1021-6.
- Fletcher, G.G., F.E. Rosetto, J.D. Turnbull and E. Nieboer (1994) Toxicity, uptake, and mutagenicity of particulate and soluble nickel compounds. *Environ. Health Perspect.*, 102, Suppl. 3, 69 - 79.
- Hartmann, M. and A. Hartwig (1998) Disturbance of DNA damage recognition after UV-irradiation by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells. *Carcinogenesis* 19 (4), 617-621
- Hartwig, A., L.H. Mullenders, R. Schlepegrell, U. Kasten, D. Beyersmann (1994) Nickel(II) interferes with the incision step in nucleotide excision repair in mammalian cells. *Cancer Res.* 54(15),4045-51.
- Hartwig, A., R. Schlepegrell, H. Dally, M. Hartmann (1996) Interaction of carcinogenic metal compounds with deoxyribonucleic acid repair processes. *Ann Clin Lab Sci.* 26(1), 31-8.
- Hartwig, A. (2000) Recent advances in metal carcinogenicity. *Pure Appl. Chem.*, 72, 1007 – 1014.
- National Research Council (2001) Arsenic in Drinking Water: 2001 update
- Schwerdtle, T., A. Seidel and A. Hartwig (2002) Effect of soluble and particulate nickel compounds on the formation and repair of stable benzo[*a*]pyrene DNA adducts in human lung cells. *Carcinogenesis* 23, 47-53.