

Forschungsbericht FZKA-BWPLUS

**In vivo DNA-Addukte des Luftschadstoffes 3-Nitrobenzanthron;  
Bildung und Identifizierung**

H.H. Schmeiser, V.M. Arlt, C.A. Bieler, B. Sorg, L. Erdinger, A. Rastall und M. Wiessler  
Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 280, 69120  
Heidelberg und Hygiene-Institut Heidelberg

Förderkennzeichen: BWB 20003

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

Oktober 2002

# **In vivo DNA-Addukte des Luftschadstoffes 3-Nitrobenzanthron; Bildung und Identifizierung**

H.H. Schmeiser, V.M. Arlt, C.A. Bieler, B. Sorg, L. Erdinger, A. Rastall und M. Wiessler

Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg und Hygiene-Institut Heidelberg

## **1. Einleitung**

Dieselabgase induzieren Tumoren im Tierversuch (LEITER & SHEAR 1942) und sind bei berufsbedingter Exposition mit einem erhöhten Lungen-Krebs-Risiko verbunden (FARMER 1997). Neben den bekannten carcinogenen polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK), wie B[a]P wurden auch andere bis jetzt nicht identifizierte carcinogene Substanzen, sowie die im Abgas auftretenden Rußpartikel selbst, für die Krebsentstehung in den Versuchstieren verantwortlich gemacht (FARMER 1997).

Später erkannte man, daß organische Extrakte von Luftstäuben, die in den USA, Japan, Deutschland oder Skandinavien gesammelt wurden, genotoxische Substanzen enthielten, die eine mutagene Aktivität vom Rasterschub-Typ im *Salmonella typhimurium* Stamm TA 98 zeigten (FINLAYSON-PITTS & PITTS 1997). Bemerkenswert war, daß eine metabolische Aktivierung nicht erforderlich war und folglich nicht nur PAKs enthalten sein konnten. Die Identifizierung dieser Partikel-gebundenen genotoxischen Schadstoffe ist nicht nur aus human-toxikologischer Sicht relevant, sondern ermöglicht es auch die Quellen bzw. die Entstehung dieser Luftschadstoffe aufzuklären und zu vermeiden.

Insbesondere polyzyklische Nitroaromaten (Nitro-PAK) wurden in jüngster Zeit in Automobilabgasen, Dieselruß und in Luftstäuben nachgewiesen (Purohit & Basu, 2000). Diese werden zum Teil erst in der Atmosphäre unter Beteiligung von NO<sub>x</sub>, OH-Radikalen, Ozon und Licht gebildet und sind wie die Phenanthren-Reaktionsprodukte (ATKINSON & AREY 1994) oder die Nitrobenzanthrone (ENYA et al. 1997) starke bakterielle Mutagene. Sowohl eine mutagene Aktivität in Säugerzellsystemen, als auch eine tumorigene Aktivität im Tierversuch ist von einigen Vertretern dieser Stoffklasse eindeutig belegt. Obwohl zur Zeit nicht bekannt ist welche Bedeutung den Nitro-PAK bei der Krebsentstehung zukommt, hat ihre Korrelation mit der Lungenkrebsrate in verkehrsbelasteten Gebieten und ihr direkter Nachweis im Gewebe von Lungenkrebspatienten (TOKIWA et al 1993) zu einem beträchtlichen Interesse an einer Risikoabschätzung geführt. Außerdem hat man Nitro-PAK in Flußablagerungen und in gegrillten Lebensmitteln (MÖLLER 1994) nachgewiesen, was darauf hindeutet, daß eine Exposition sowohl durch orale als auch durch inhalative Aufnahme erfolgen kann.

Kürzlich wurde in Dieselabgasen und in Luftstaubextrakten ein neuer Vertreter dieser Stoffklasse entdeckt -3-Nitrobenzanthron- (3-NBA, 3-Nitro-7H-benz[*d,e*]anthracen-7-on) (ENYA et al., 1997). Obwohl es nur in geringen Mengen (0,6-6,6 µg/g Partikel) vorkommt ist 3-NBA toxikologisch relevant, da es eines der stärksten im Ames-Test je getesteten Mutagene darstellt. Die Genotoxizität dieses potentiellen Carcinogens wurde durch Mikrokern-Induktion in der Maus und humanen Zellen, als auch durch die Induktion von Mutationen in humanen Zellen belegt (ENYA et al. 1997; PHOUSONGHOUNG et al 2000).

Weitere Bestätigung der genotoxischen Wirkung dieser Verbindung lieferte der Nachweis von 3-NBA-spezifischen DNA-Addukten *in vitro* nach Aktivierung mit Xanthin Oxidase, einer Säuger-Nitroreduktase, oder Rattenleber S9 (BIELER et al 1999).

Die Mehrzahl der bekannten Carcinogene und Mutagene bilden durch Metabolismus DNA-reaktive Stoffe, deren carcinogene bzw. mutagene Aktivität auf der Bildung von DNA-Addukten beruht. Für Nitro-PAK führt diese metabolische Aktivierung entweder über eine Reduktion der Nitrogruppe oder bzw. und eine Oxidation am Ringsystem. Katalysiert wird die Nitroreduktion sowohl durch cytosolische als auch durch mikrosomale Enzyme wie Aldehyd-Oxidase, Xanthin Oxidase, D,T-Diaphorase und die Cytochrom P450 Enzyme (Purohit & Basu, 2000). Weitere Biotransformationen durch Phase II-Enzyme, die zu reaktiven Estern führen, die durch hydrolytische Spaltung zu elektrophilen adduktbildenden Nitreniumionen zerfallen, sind möglich (FU 1990).

Daher war es das Ziel dieses Projektes, die *in vitro* erwiesene genotoxische Wirkung (DNA-Adduktbildung) von 3-NBA *in vivo* zu untersuchen. Durch die Bestimmung des genotoxischen Potentials (hazard) von 3-NBA im Säugerorganismus, sowie die Aufklärung des zugrunde liegenden molekularen Aktivierungsmechanismus sollten unsere Untersuchungen dazu dienen ein mögliches Krebsrisiko durch 3-NBA-Exposition besser abschätzen zu können.

Die Analyse von DNA-Addukten führen wir mit dem empfindlichen <sup>32</sup>P-postlabeling Verfahren durch, da sich dieses besonders zur Untersuchung von genotoxischen Schadstoffen, deren chemische Strukturen im voraus nicht bekannt sind, eignet. Durch Verwendung verschiedener Analysenbedingungen wie Anreicherung durch n-Butanol-Extraktion oder Nuclease P1-Verdau, sowie verschiedene Chromatographie- Bedingungen ist man in der Lage die nach <sup>32</sup>P-postlabeling erhaltenen DNA-Addukte zu klassifizieren. Mit diesem diagnostischen Potential der Analysenmethode sollten weitere Hinweise auf die chemische Struktur der 3-NBA-DNA-Addukte erhalten werden.

Zur Aufklärung des *in vivo* Metabolismus von 3-NBA wurden Studien mit Säugerzellen (V79 Chinesische Hamsterzell-Linien), die humane Phase I und Phase II-Enzyme definiert exprimieren, durchgeführt. Dadurch läßt sich der humane Metabolismus von 3-NBA simulieren und die an der Aktivierung beteiligten Enzyme identifizieren, was eine toxikologische Risikobewertung erleichtert.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Tierversuche

3-NBA (>99%) wurde von Dr. Suzuki (Department of Chemistry, Kyoto University, Japan) zur Verfügung gestellt. Weibliche Sprague-Dawley Ratten (220-250 g) wurden oral mit einer Einzeldosis 3-NBA von 2 mg/kg Körpergewicht behandelt. 3-NBA war gelöst in Tricaprylin (1 mg/ml). 2 Kontrolltiere enthielten nur Tricaprylin. Die Tiere wurden 4 Stunden nach der Behandlung getötet, die Organe entfernt und bis zur DNA-Isolierung bei -80°C tiefgefroren.

### 2.2. Herstellung der Referenzverbindungen

Desoxyadenosin- und Desoxyguanosin 3'-Monophosphat (4 µmol/ml) oder Kalbsthymus DNA wurden mit 3-NBA (300 µM) und Xanthin-Oxidase (1 U/ml) umgesetzt und 20 µl Aliquots der Inkubation direkt wie beschrieben (ARLT et al 2001) mit der Butanol-Extraktions-Anreicherungsmethode des <sup>32</sup>P-postlabeling Verfahrens untersucht.

### **2.3. DNA Isolierung und <sup>32</sup>P-postlabeling**

Die Organe wurden als Ganzes zerkleinert und DNA nach der Phenol-Extraktions-Methode isoliert. <sup>32</sup>P-postlabeling Analysen wurden wie beschrieben durchgeführt (ARLT et al 2001).

### **2.4. Co-Chromatographische Analyse von <sup>32</sup>P-markierten 3',5'-Desoxyribonukleosid-Bisphosphaten mit Dünnschicht-Chromatographie und HPLC**

Die beim <sup>32</sup>P-postlabeling detektierten Addukt-Flecken wurden aus den TLC-Platten ausgeschnitten, extrahiert und mit den Referenz-Bisphosphat-Addukten wie beschrieben (ARLT et al 2001) cochromatographiert. Die HPLC-Analysen wurden auch wie dort beschrieben durchgeführt.

### **2.5. Co-Chromatographie mit N-Acetyl-3-Amino-2-(2'-Desoxyguanosin-3'-Monophosphat-8-yl)Benzanthron (dGp-N-Ac-ABA)**

Der dGp-N-Ac-ABA-Standard von Dr. Suzuki wurde in 200 µl Wasser gelöst und 1 µl einer 1:100 Verdünnung wurde zur <sup>32</sup>P-postlabeling Analyse wie oben beschrieben verwendet.

### **2.6. Zellkultur**

Verwendet wurden die Stammzell-Linie V79MZ, eine Lungenzell-Linie des chin. Hamsters, die sich durch eine sehr geringe metabolische Aktivität bezüglich der Cytochrome P450 Enzyme auszeichnet, sowie die transfizierten Zell-Linien (alle von PharmBioDyn, Freiburg) V79MZ-h1A1 (exprimiert humanes CYP1A1), V79MZ-h1A2 (exprimiert humanes CYP1A2), V79MZ-CYP1OR (exprimiert humanes CYP1OR) und V79MZ-h3A4-CYP1OR (exprimiert humanes CYP3A4 zusammen mit CYP1OR). Sowie V79NH Zellen, V79NH und V79NH-h1A2 (exprimiert humanes CYP1A2), die eine hohe Aktivität an Nitroreduktase und N,O-Acetyltransferase besitzen. Die Zell-Linien V79MZ-hNAT1 und V79MZ-hNAT2, die humane N,O-Acetyltransferase exprimieren und V79MZ-hSULT1A1 (exprimiert humane Sulfotransferase) wurden von Prof. Glatt, Potsdam-Rehbrücke entwickelt und zur Verfügung gestellt.

Alle Zell-Linien wurden in DMEM mit hohem Glucose-Gehalt (4,5 g D-Glucose/l) und Zusatz von 1mM Natriumpyruvat, 4 mM L-Glutamin, 5% FCS, 100 U Penizillin/ml und 100 µg/ml Streptomycin bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

### **2.7. Behandlung der V79-Zellen mit 3-NBA**

Die Aussaat der V79-Zellen erfolgte 24h vor der Behandlung in einer Dichte von 1x10<sup>5</sup> Zellen pro ml in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen in einem Gesamtvolumen von 30 ml DMEM. 3-NBA oder N-Ac-N-OH-ABA gelöst in DMSO wurde in einer Endkonzentration von 0.01, 0.1 oder 1 µM allen V79 Zellen zugegeben. Kontrollinkubationen wurden mit DMSO allein durchgeführt.

### **2.8. Zellernte und DNA-Isolierung**

Nach einer Inkubationszeit von 24h wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit 5 ml PBS gewaschen. Hierbei wurden alle toten Zellen entfernt. Nach Trypsinbehandlung wurden die Zellen zweimal mit 4 ml DMEM unter Zusatz von 5% FCS gewaschen, zentrifugiert (2000 rpm für 10 min) und aus dem Zellpellet die DNA mit Phenol-Extraktion isoliert. Die Anzahl der lebenden Zellen (% der Kontrolle) wurde mit dem Trypanblau Ausschluß-Verfahren bestimmt.

## 2.9. <sup>32</sup>P-postlabeling Analyse der V79 Zellen

Das <sup>32</sup>P-postlabeling Verfahren zur Analyse von 3-NBA-Addukten wurde wie oben beschrieben mit den Anreicherungsverfahren durch Nuklease-P1 Verdau und Butanol-Extraktion durchgeführt und ausgewertet.

## 2.10. Ames-Test mit den Salmonella Stämmen TA1538, TA1538/1,8-DNP, DJ400 und DJ460

Der Platten-Inkorporations-Test wurde wie bereits beschrieben durchgeführt (ARLT et al 2002).

# 3. Ergebnisse

## 3.1. Umsetzung von 3-NBA mit den 3'-Monophosphaten von Desoxyadenosin und Desoxyguanosin

Um Referenzverbindungen für das <sup>32</sup>P-postlabeling Verfahren zu erhalten wurden die 3'-Monophosphate von Desoxyadenosin und Desoxyguanosin mit 3-NBA in Gegenwart von Xanthin Oxidase unter anaeroben Bedingungen wie berichtet inkubiert (BIELER et al 1999). Aliquots der Inkubationsmischung wurden direkt nach der Butanol-Extraktionsmethode des <sup>32</sup>P-postlabeling Verfahrens markiert. In den Inkubationen mit 3'-Monophosphat-Desoxyadenosin wurden 2 Hauptflecken (spots 1 und 2) und mehrere Nebenflecken (Abb. 1B), in denen mit 3'-Monophosphat-Desoxyguanosin 3 Haupt- (spots 3, 4 und 5) und mehrere Nebenflecken (Abb. 1C) detektiert. Die cochromatographische Analyse auf Dünnschichtplatten mit Addukt-Flecken, die nach Inkubation von 3-NBA mit Kalbsthymus-DNA (Abb. 1A) unter gleichen Bedingungen beobachtet werden, ergab, daß alle mit Kalbsthymus-DNA erhaltenen Flecken, außer Addukt-Fleck 6, chromatographisch nicht von den Addukt-Flecken, die mit den Purin-3'-Monophosphaten entstehen, zu unterscheiden waren.

Diese Ergebnisse zeigen daher, daß die Addukt-Flecken 1 und 2 vom Desoxyadenosin und die Addukt-Flecken 3, 4 und 5 vom Desoxyguanosin stammen.

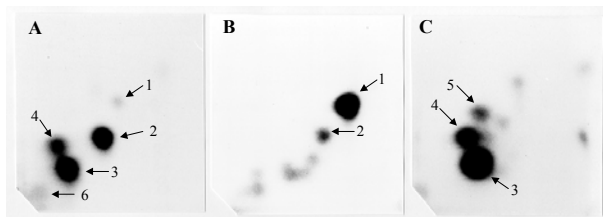


Abb.1:

Autoradiographische Aufnahmen von DNA-Addukten, die durch Inkubation mit 3-NBA und Aktivierung mittels Xanthin Oxidase pH 6.0 anaerob und Kalbsthymus-DNA (A), Desoxyadenosin 3'-Monophosphat (B) und Desoxyguanosin 3'-Monophosphat (C) erhalten wurden. Zur Detektion wurde die Butanol-Extraktion Anreicherung des <sup>32</sup>P-postlabeling Verfahrens verwendet (ARLT et al 2001).

## 3.2. DNA-Addukt Analyse in Ratten

Zur Untersuchung der DNA-Addukt-Bildung durch 3-NBA in Organen (Vormagen, Drüsenmagen, Niere, Leber, Lunge, Blase und Dünndarm) von weiblichen Sprague-Dawley Ratten wurden beide Anreicherungsverfahren (Nuklease P1-Verdau und Butanol-Extraktion) des <sup>32</sup>P-postlabeling Verfahrens verwendet (Abb. 2). 4 Stunden nach oraler Verabreichung waren 3-NBA-spezifische DNA-Adduktmuster ähnlich denen, die wir zuvor *in vitro* erhalten hatten (BIELER et al 1999), in allen Organen und mit beiden Anreicherungsverfahren

feststellbar. Die Butanolanreicherung ergab mehr Addukt-Flecken und eine höhere Addukt-Ausbeute als der Nuklease P1-Verdau. Mit dem Nuklease P1-Verdau erhielten wir insgesamt 3 Addukt-Flecken (Abb. 2A) mit der Butanolanreicherung dagegen 4 (Abb. 2B). Analoge Analysen mit DNA, die aus Organen der beiden Kontrolltiere isoliert wurde, zeigten keine Addukt-Flecken.

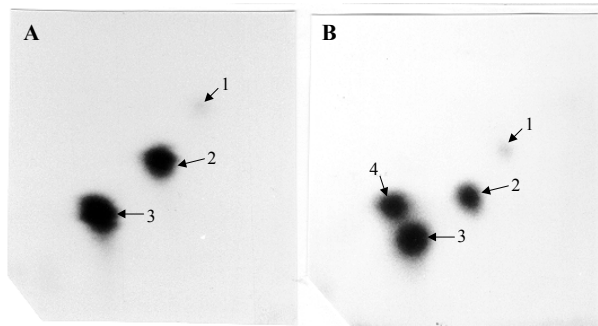


Abb. 2:  
Autoradiographische Aufnahmen von DNA-Addukten, die von Organen von 3-NBA behandelten Sprague-Dawley Ratten erhalten wurden. In (A) wurde die Anreicherung durch Nuklease P1 Verdau, in (B) durch Butanol-Extraktion des <sup>32</sup>P-postlabeling Verfahrens verwendet. Exemplarisch sind hier die Ergebnisse der DNA aus dem Vormagen von 3-NBA behandelten Ratten gezeigt (ARLT et al 2001).

Wie aus Abb. 2 zu ersehen ist, war der Addukt-Fleck 4 nur mit der Butanol-Extraktionsmethode detektierbar. Dies ist typisch für N-substituierte Aryladdukte, die über die C-8 Position des Guanins gebunden sind. Addukt-Fleck 1 ist gegenüber dem Nuklease P1 Verdau ebenfalls nicht ganz resistent. Aus der Tabelle I ist zu entnehmen, daß die DNA-Adduktierung unabhängig von der Anreicherungsmethode im Dünndarm am höchsten war, gefolgt von Vormagen, Drüsenmagen, Niere, Leber, Lunge und Blase.

**Tabelle I: Quantitative Analyse der DNA-Bindung in Organen von 3- NBA behandelten Ratten.**

Gewebe	Gesamt RAL <sup>1</sup> (Mittelwert ± SD / 10 <sup>8</sup> Nukleotide)	
	Nuklease P1	Butanol
Dünndarm	16.8 ± 2.2	37.6 ± 6.6
Vormagen	11.4 ± 4.2	33.2 ± 8.0
Drüsenmagen	9.9 ± 3.6	23.6 ± 9.8
Niere	7.5 ± 2.0	12.6 ± 3.0
Leber	5.4 ± 0.9	10.3 ± 5.2
Lunge	4.1 ± 0.9	9.5 ± 3.9
Harnblase	1.4 ± 0.7	n.b. <sup>2</sup>

<sup>1</sup> RAL (relative adduct labeling)-Werte sind der Mittelwert ± SD aus drei behandelten Ratten, jedes Organ wurde doppelt analysiert,<sup>2</sup> nicht bestimmt.

Vergleicht man die durch 3-NBA induzierten Adduktmuster in den untersuchten Organen mit einander, so stellt man fest, daß diese im wesentlichen gleich sind und je nach Anreicherungsmethode aus 4 bzw. 3 Haupt-Addukten bestehen (Abb. 3). Das Gleiche gilt für die relative Menge einzelner Addukte in den verschiedenen Organen wie aus Abb. 3 zu ersehen ist.

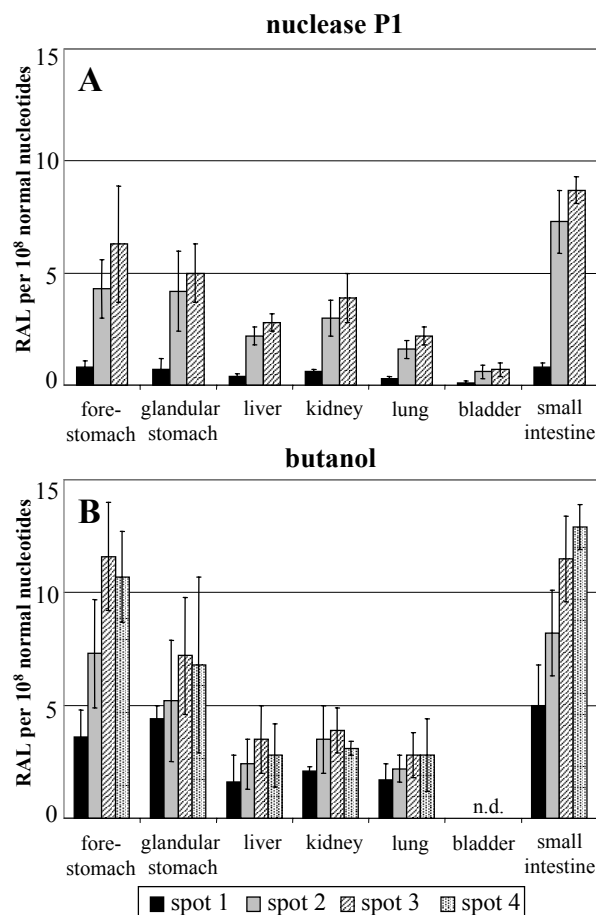


Abb. 3: Säulen zeigen relative adduct labeling (RAL)-Werte (mean  $\pm$  SD) der individuellen Addukt-Flecken von verschiedenen Organen (forestomach, glandular stomach, liver, kidney, lung, bladder, small intestine) von Ratten, die mit 2 mg/kg body weight 3-NBA behandelt wurden. Nuclease P1 Anreicherung (A) oder Butanol Anreicherung (B) Verfahren der  $^{32}\text{P}$ -postlabeling Methode. N.d. = not determined.

### 3.3. HPLC-Analysen der DNA-Addukte von 3-NBA behandelten Ratten

Zur weiteren Absicherung der Identität der *in vivo* beobachteten DNA-Addukte wurde eine vergleichende Untersuchung auch mittels HPLC-Analyse durchgeführt (Abb. 4). Aus Abb. 4 wird deutlich, dass die Flecken 1 und 2, die mit einer Retentionszeit von 19,1 bzw. 14,3 min eluieren mit den Flecken, die von Desoxyadenosin abstammen identisch sind. Das gleiche gilt für die Addukt-Flecken 3 und 4, die dieselbe Retentionszeit wie die von Desoxyguanosin abgeleiteten Addukte besitzen. Diese Untersuchung bestätigte die zuvor mit der Dünnschicht-Chromatographie erhaltenen Ergebnisse und beweist, daß die Addukt-Flecken 1 und 2 durch Reaktion mit Desoxyadenosin und die Flecken 3 und 4 durch Reaktion mit Desoxyguanosin entstehen.

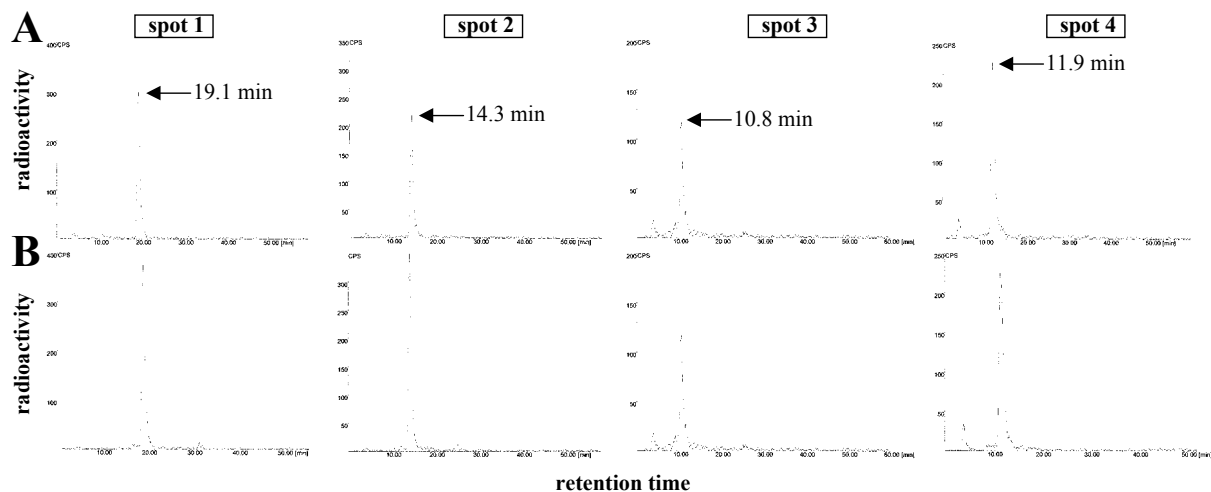


Abb.4: Trennung der  $^{32}\text{P}$ -markierten Nucleoside 3',5'-bisphosphat-Addukte auf einer Phenyl-modifizierten reversed-phase Säule. Chromatographische Bedingungen sind in Material und Methoden beschrieben. Addukte wurden aus den TLC-Platten ausgeschnitten und extrahiert, gelöst und injiziert. (A) Spots 1, 2, 3 und 4 waren von 3-NBA behandelten Ratten Abb. 2; (B) Spots 1, 2, 3 and 4 waren von Purin 3'-monophosphaten Abb. 1B and 1C.

### 3.4. Vergleich des Addukt-Standards dGp-N-Ac-ABA mit den in der Ratte gebildeten 3-NBA-Addukten

Die Markierung eines Aliquots des dGp-N-Ac-ABA Standards im  $^{32}\text{P}$ -postlabeling ergab einen Hauptaddukt-Fleck, der aber nach Vergleich mittels Dünnschicht-Chromatographie und HPLC mit keinem der 3-NBA-Addukte aus der Ratte comigrierte (ARLT et al 2001). Auch das Aufstocken der DNA-Verdaus aus dem Rattenexperiment mit dGp-N-Ac-ABA zeigte eindeutig, daß dieses DNA-Addukt nicht *in vivo* gebildet wird.

### 3.5. DNA-Adduktbildung von 3-NBA in V79 Zellen, die humane CYP Enzyme exprimieren

Allgemein gelten die Cytochrome der Familie CYP 1 als die Enzyme, die im wesentlichen für den Fremdstoff-Metabolismus beim Menschen verantwortlich sind. Dies stellte ein wichtiges Kriterium für unsere Auswahl der Zelllinien dar. CYP 1A1 wird vor allem in der Lunge exprimiert und ist dort durch PAKs induzierbar. Die entsprechende Zelllinie (V79 h1A1) stellt daher ein gutes Modell dar, um die humane metabolische Aktivierung von PAKs aus Luftschadstoffgemischen in einem *in vitro* System zu untersuchen. Dieses ist beispielsweise für B(a)P oder Dibenzo(a,l)pyren bereits beschrieben (SCHMALIX et al. 1993; LUCH et al. 1998). Von CYP 1A2 (Zelllinie V79 h1A2) ist demgegenüber bekannt, daß es PAKs nur in geringerem Maße oxidiert, jedoch in der Lage ist, aromatische Amine zu aktivieren. Als Kontrolle diente die Stamm-Zelllinie dieser beiden, V79 MZ, die sich durch eine sehr geringe metabolische Aktivität bzgl. der Cytochrome P450 auszeichnet, aber die Cytochrom-Oxidoreduktase, die im Metabolismus nitroaromatischer Verbindungen von Bedeutung ist, enthält (SCHMALIX et al. 1996).

V79MZ Zellen, welche humane CYP1A1, CYP1A2, CYP1OR allein oder CYP3A4 zusammen mit CYP1OR exprimieren, wurden mit 1  $\mu\text{M}$  3-NBA behandelt und mit beiden Anreicherungsmethoden des  $^{32}\text{P}$ -postlabeling Verfahrens untersucht. Diese Analysen ergaben für alle V79MZ Zellen ein ähnliches Adduktmuster wie wir es auch für die Organe der 3-NBA behandelten Ratten erhalten hatten. Die quantitative Auswertung zeigte, daß die höchsten Adduktspiegel in den V79 Zellen zu finden waren, die humane NADPH:CYP



Oxidoreduktase (CYPhOR) allein oder in Kombination mit CYPh3A4 exprimieren und die niedrigsten Adduktspiegel in den Stammzellen V79MZ (Abb. 5)

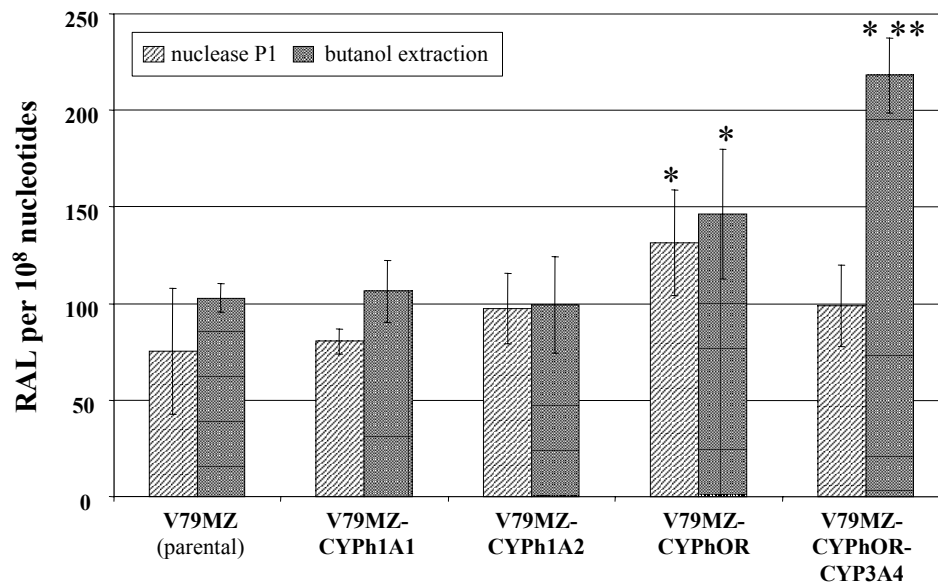


Abb. 5: Säulen geben die RAL-Werte (Mittelwert  $\pm$  SD) der Gesamt DNA-Adduktspiegel in V79MZ Zellen nach Behandlung mit 1  $\mu$ M 3-NBA an, die mit Nuklease P1-Verdau oder Butanol Anreicherung des <sup>32</sup>P-postlabeling Verfahrens erhalten wurden. Statistische Analyse wurde mit dem paired t-test durchgeführt: \* p < 0.05 im Vergleich zu Wild Typ V79MZ; \*\* p < 0.05 im Vergleich zu V79MZ-CYPhOR.

Ein Vergleich der Gesamtadduktierung in den V79MZ Zellen ergab signifikant höhere Adduktspiegel in V79MZ-CYPhOR und V79MZ-h3A4-CYPhOR Zellen. Dies läßt den Schluß zu, daß sowohl CYPhOR als auch CYPh3A4 an der Bioaktivierung von 3-NBA im Menschen beteiligt sind. Mit den V79 Zellen, die humane Cytochrome der 1A Familie exprimieren (1A1 und 1A2) wurden keine signifikanten Änderungen der Adduktspiegel im Vergleich zu den V79MZ Zellen erhalten. Der Anteil an lebenden Zellen nach 3-NBA Behandlung, die für die Auswertung mittels <sup>32</sup>P-postlabeling Verfahren verwendet wurden, lag bei ca. 55 % der Kontrolle.

### 3.6. DNA-Adduktbildung durch 3-NBA in V79 Zellen, die Nitroreduktase und Acetyltransferase exprimieren

Nach 3-NBA Exposition von V79NH Zellen, die keine CYP-Aktivität, aber hohe Nitroreduktase und Acetyltransferase Aktivitäten besitzen, wurde, unabhängig von der verwendeten Anreicherungstechnik, ein ähnliches Adduktmuster wie jenes in V79MZ Zellen beobachtet. Die Adduktierung in V79NH Zellen ist im Bereich zwischen 0.01-1  $\mu$ M 3-NBA dosisabhängig und erreicht bemerkenswert hohe Adduktspiegel von bis zu 1 Addukt in 10<sup>4</sup> Nucleotiden (Abb. 6). Der Anteil der lebenden Zellen war im Vergleich zur Kontrolle nur noch 10 % für die beiden hohen 3-NBA Dosierungen und ca. 70 % mit der 0.01  $\mu$ M Dosis.

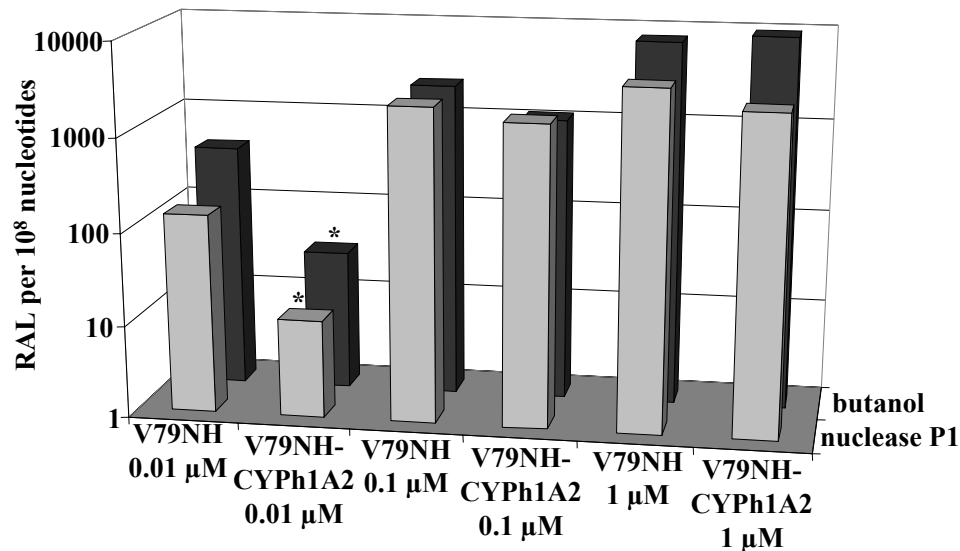


Abb. 6: Säulen geben den RAL Mittelwert der Gesamt-DNA-Adduktspiegel in V79NH Zellen nach Behandlung mit 0,01, 0,1 oder 1  $\mu\text{M}$  3-NBA an, die mit dem Nuklease P1-Verdau oder Butanol-Anreicherung des  $^{32}\text{P}$ -postlabeling Verfahrens erhalten wurden. Statistische Analyse wurde mit dem paired t-test durchgeführt: \*  $p < 0.05$  im Vergleich zu Wild Typ V79NH.

### 3.7. Metabolische Aktivierung von 3-NBA und dem Metaboliten N-Ac-N-OH-ABA durch humane Acetyltransferasen und humane Sulfotransferase

Die Aktivierung von Nitro-PAKs verläuft hauptsächlich durch Nitroreduktion katalysiert mittels cytosolischen Reduktasen oder auch oxidativ katalysiert mittels Cytochrom P450 (CYP) Enzyme (FU 1990). Die bei der Reduktion entstehenden N-Hydroxylarylamine können aber durch Phase II Enzyme, wie N,O-Acetyltransferasen (NATs) oder Sulfotransferasen (SULTs), konjugiert werden. Diese Konjugationen führen zur Bildung von reaktiven Estern, welche nach heterolytischer Spaltung der N-O Bindung die elektrophilen Nitreniumionen produzieren, die letztendlich mit der DNA DNA-Addukte bilden.

Das Ziel dieser Studien war herauszufinden welche Rolle die humanen NATs (NAT 1 und NAT 2) und die humane SULT1A1 bei der metabolischen Aktivierung von 3-NBA und seinem möglichen Metaboliten N-Acetyl-N-Hydroxy-3-Aminobenzanthron (N-Ac-N-OH-ABA) spielen. Hierzu wurde die Genotoxizität beider Verbindungen durch die Bestimmung der DNA-Adduktbildung in rekombinanten V79 Chinesischen Hamster Lungenfibroblasten untersucht. Die Mutagenität beider Verbindungen wurde parallel dazu in genetisch modifizierten *Salmonella typhimurium* Stämmen im Amestest verglichen.

#### 3.7.1. Mutagene Aktivität von 3-NBA und N-Ac-N-OH-ABA in *Salmonella*, die rekombinante humane NAT 1 und NAT 2 exprimieren

Wie Tabelle II zeigt, ist die mutagene Potenz von 3-NBA im Stamm TA1538, der bakterielle O-Acetyltransferase besitzt 4,3-fach höher als im Acetyltransferase-defizienten Stamm TA1538/1,8-DNP. Ebenso erhöhten die Stämme DJ400 und DJ460, welche humane NAT 1 und NAT 2 im Stamm TA1538/1,8-DNP exprimieren, die Mutagenität von 3-NBA um das 3,8 bzw. 16,8-fache. Im Gegensatz dazu war unter diesen Bedingungen N-Ac-N-OH-ABA nur schwach mutagen und eine Dosis-Wirkungsbeziehung wurde nur mit DJ460 erhalten. Verglichen mit 3-NBA war N-Ac-N-OH-ABA um das 27,2-fache in TA1538, um das 29,2-fache in DJ400 und um das 25,8-fache in DJ460 schwächer mutagen.

**Table II.** Bakterielle Mutagenität von 3-NBA und *N*-Ac-*N*-OH-ABA in verschiedenen TA1538-*Salmonella typhimurium* Stämmen

<i>Salmonella</i> Stamm	Revertanten/nmol <sup>1</sup>	
	3-NBA	<i>N</i> -Ac- <i>N</i> -OH-ABA
TA1538	8672 ± 980 (10)	316 ± 102 (25)
TA1538/1,8-DNP	1989 ± 526 (10)	- <sup>2</sup>
DJ400	7572 ± 1523 (2.5)	258 ± 151 (25)
DJ460	33568 ± 4679 (2.5)	1259 ± 253 (25)

<sup>1</sup> Werte sind der Mittelwert ± SD aus sechs Platten. Die Konzentrationen mit denen die Anzahl der Revertanten/nmol berechnet wurden stehen in Klammern (ng/plate).

<sup>2</sup> Nicht mutagen.

### 3.7.2. DNA-Adduktbildung von 3-NBA in V79 Zellen, die rekombinante humane NAT1, NAT2 und humane SULT1A1 exprimieren

Um die Cytotoxizität durch Trypan-Blau Ausschluß zu bestimmen wurden alle V79 Zell-Linien, die Eltern-Zell-Linie V79 und die rekombinanten V79 Zell-Linien mit 0.01, 0.1 und 1 µM 3-NBA behandelt. In der Eltern-Zell-Linie war die Zell-Überlebensrate nur bei der höchsten Konzentration leicht erniedrigt. Dagegen war die Überlebensrate der V79 Zellen, welche NAT2 exprimieren, drastisch erniedrigt. In V79 Zellen mit Expression von humaner NAT1 und humaner SULT1A1 war nur die hohe Konzentration stark toxisch. Deshalb wurde der Vergleich zwischen den DNA-Adduktbildungs-Raten in den verschiedenen V79 Zellen mit einer Konzentration von 0.01 µM 3-NBA durchgeführt.

Die <sup>32</sup>P-postlabeling Analyse von DNA, isoliert aus V79MZ Zellen, ergab bis zu 8 Addukt-Flecken (Abb. 7). Das Adduktmuster war in allen Zell-Linien im wesentlichen identisch und bestand je nach Anreicherungsmethode aus 4 Hauptflecken (Flecken 1,2,3 und 4) mit der Butanol-Extraktionsmethode oder 3 Hauptflecken (Flecken 1,2,3) mit dem Nuklease-P1 Verdau. Analoge Analysen mit DNA von Zellen, die mit dem Lösungsmittel (DMSO) behandelt wurden, zeigten keine Addukt-Flecken (Abb. 7A und D).

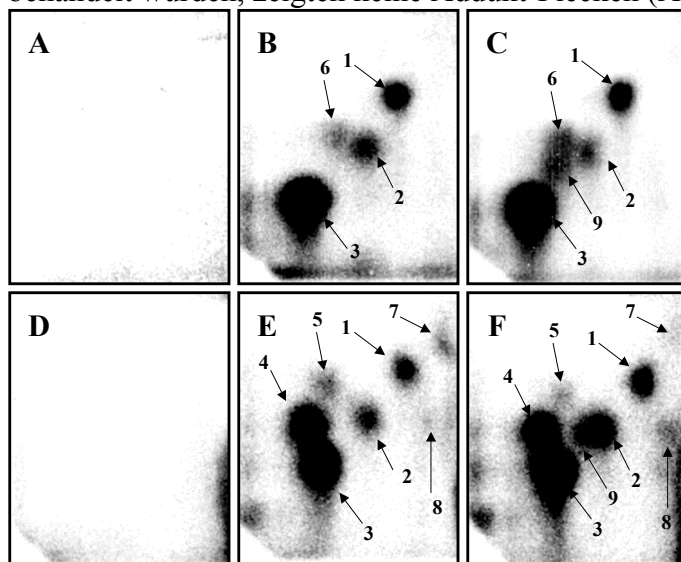


Abb. 7: Autoradiographische Profile von DNA-Addukten erhalten mit der Eltern-Zell-Linie V79MZ behandelt mit 1 µM 3-NBA (B und E), 1 µM *N*-Ac-*N*-OH-ABA (C und F) oder nur mit Vehikel, DMSO, (A und D), mittels Nuclease P1 (obere Reihe) oder Butanol (untere Reihe) Anreicherung der <sup>32</sup>P-postlabelling Methode (ARLT et al 2002).

Die quantitative Auswertung zeigte (Abb. 8), daß die Gesamt-DNA-Adduktbildung von 3-NBA in V79MZ Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration von ca. 0,5 auf 70 Addukte

pro  $10^8$  Nukleotide anstieg. Verglichen mit den V79MZ Zellen war die Gesamt-DNA-Adduktbildung durch 3-NBA in den V79MZ-hNAT2 Zellen um das 500-fache, in den V79MZ-hSULT1A1 Zellen um das 62-102-fache und in den V79MZ-hNAT1 Zellen um das 30-35-fache erhöht. Dies zeigt, daß die humane NAT2 stark zur metabolischen Aktivierung von 3-NBA beiträgt, während humane SULT1A1 und NAT1 auch zur Aktivierung beitragen allerdings nicht in so hohem Ausmaß (ARLT et al 2002).

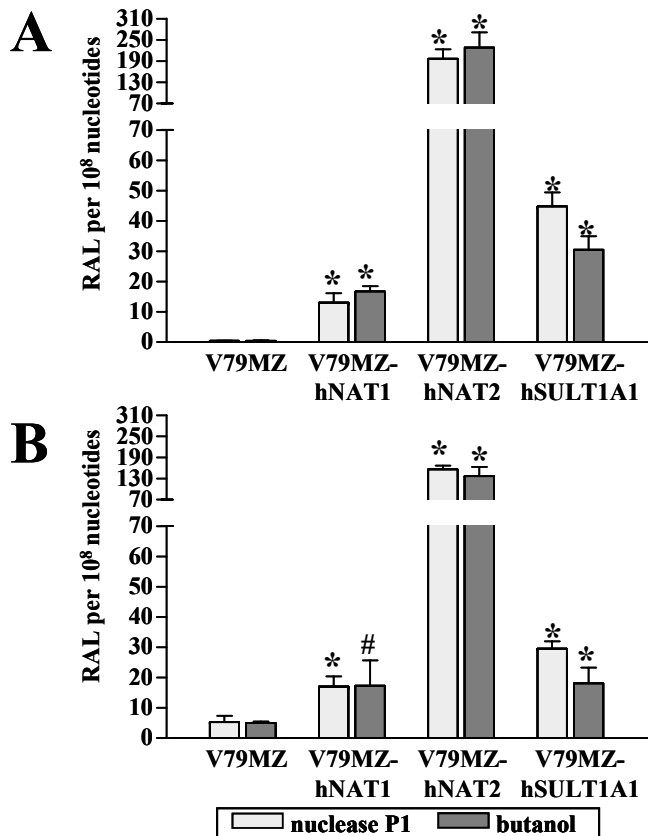


Abb. 8: RAL-Werte (relative adduct labelling) der Gesamt-DNA-Adduktspiegel erhalten in Eltern- und rekombinanten V79MZ Zellen nach Behandlung mit  $0.01 \mu\text{M}$  3-NBA (A) oder  $0.1 \mu\text{M}$  *N-Ac-N-OH-ABA* (B) mit dem Nuklease P1-Verdau oder Butanol Anreicherung des  $^{32}\text{P}$ -postlabelling Verfahrens. Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD von drei separaten Inkubationen jeweils durch zwei postlabelling Analysen bestimmt. Statistische Analyse wurde mit dem t-test durchgeführt: \*  $p < 0.01$ , #  $p < 0.05$  im Vergleich zur Eltern V79MZ.

### 3.7.3. DNA-Adduktbildung von *N-Ac-N-OH-ABA* in V79 Zellen, die rekombinante humane NAT1, NAT2 und humane SULT1A1 exprimieren

Auch der potentielle Metabolit von 3-NBA, *N-Ac-N-OH-ABA* wurde auf Cytotoxizität in allen V79 Zell-Linien bei drei Konzentrationen ( $0.01$ ,  $0.1$ ,  $1 \mu\text{M}$ ) getestet. In allen V79 Zell-Linien war die Überlebensrate bei der hohen Konzentration deutlich reduziert, so daß die vergleichenden DNA-Addukt-Analysen mit der mittleren Konzentration ( $0.1 \mu\text{M}$  3-NBA) durchgeführt wurden.

Wie in Abb. 7C und F gezeigt, ergab die  $^{32}\text{P}$ -postlabelling Analyse ein sehr ähnliches Adduktmuster wie mit 3-NBA und dies in allen V79 Zell-Linien. Der hauptsächliche Unterschied zu den Inkubationen mit 3-NBA war das Auftreten eines zusätzlichen, aber schwachen Addukt-Flecks, Fleck 9 bei der höchsten verwendeten Konzentration. Die Gesamtadduktierung durch *N-Ac-N-OH-ABA* lag in allen Zellen im gleichen Bereich wie mit 3-NBA, allerdings bei Inkubation mit einer 10-fach höheren Konzentration. Auch hier war in

den V79 Zellen, welche die humane NAT2 exprimieren, die Adduktierung am höchsten (Abb. 8B). Verglichen mit den V79MZ Zellen war die Gesamt-DNA-Adduktbildung durch N-Ac-N-OH-ABA in den V79MZ-hNAT2 Zellen um das 28-30-fache, in den V79MZ-hSULT1A1 Zellen um das 4-6-fache und in den V79MZ-hNAT1 Zellen um das 3-4-fache erhöht. Daher trägt wieder die humane NAT2 stärker zur metabolischen Aktivierung des Metaboliten bei als die humane SULT1A1 und NAT1 (ARLT et al 2002).

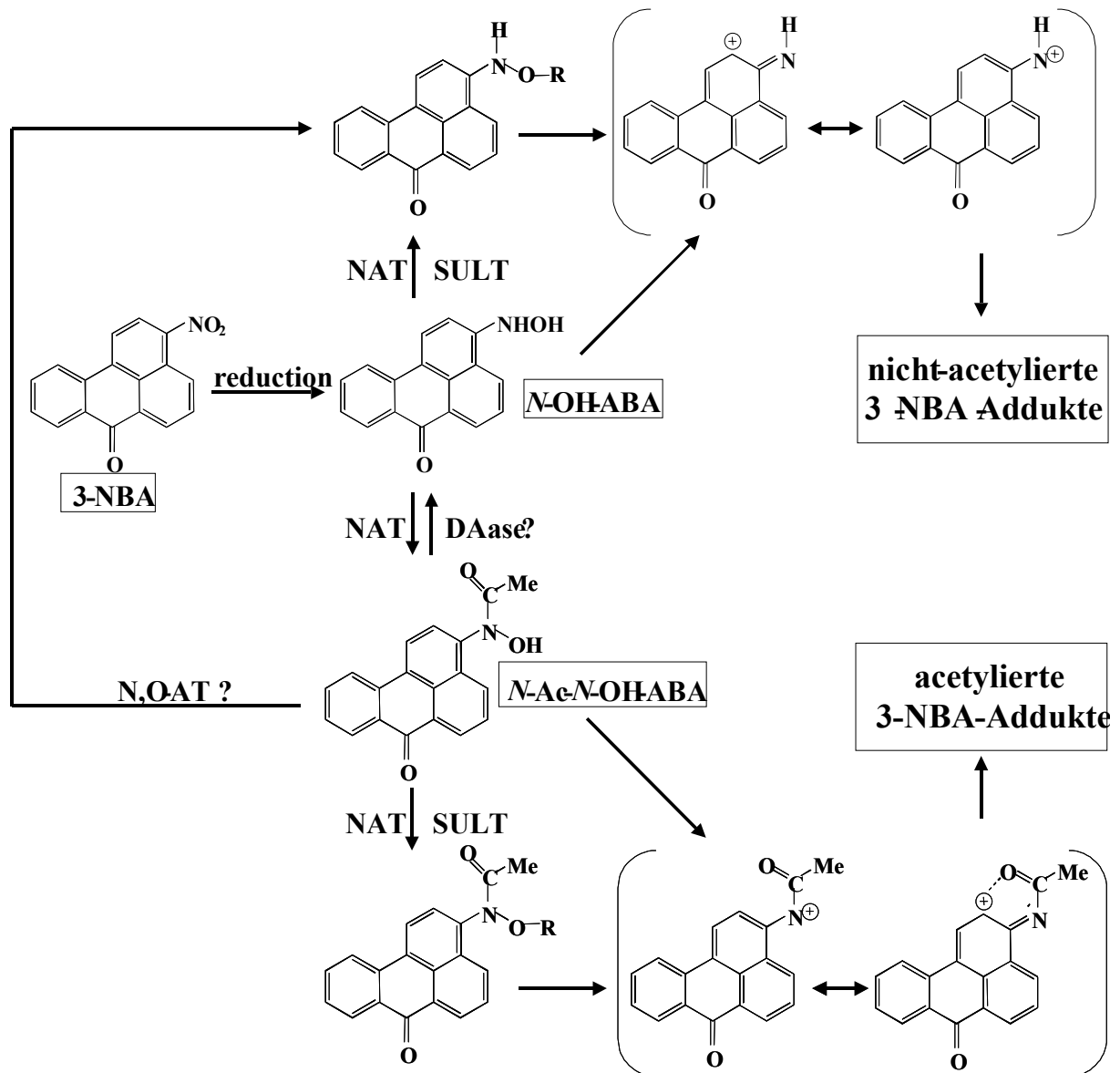


Abb. 9: Mögliche metabolische Aktivierungspfade und DNA-Adduktbildung von 3-NBA.

Abkürzungen: N-OH-ABA, N-hydroxy-3-aminobenzanthron; N-Ac-N-OH-ABA, N-acetyl-N-hydroxy-3-aminobenzanthron; NAT, N,O-Acetyltransferase; N,O-AT, N,O-Acetyl-Transfer; DAase, Deacetylase; SULT, Sulfotransferase; R = -COCH<sub>3</sub> or -SO<sub>3</sub>H; Me = -CH<sub>3</sub>.

## 4. Diskussion

Die  $^{32}\text{P}$ -postlabeling Methode hat sich für den Nachweis von Expositionen gegenüber Umweltschadstoffen bewährt (BEACH & GUPTA 1992). Der wesentliche Vorteil dieser Methode liegt hierbei darin, daß die Strukturen der DNA-Addukte nicht bekannt sein müssen und dennoch das Ausmaß ihrer Bildung bestimmt werden kann. Die Charakterisierung der zahlreichen DNA-Addukte, die durch Luftschadstoffe gebildet werden können, gestaltet sich allerdings durch  $^{32}\text{P}$ -postlabeling als eher schwierig, wurde aber auch von anderen Gruppen durch *in vitro* Analysen versucht (LEWTAS et al. 1993, SAVELA et al. 1996)). Einige Berichte belegen, daß mehrere mit Arylaminen erhaltene Addukte, die an die C-8 Position des Guanins binden, eine ausgesprochene Empfindlichkeit gegenüber der Monophosphatase-Aktivität der Nuclease P1 besitzen und daher nur Labeling-Effizienzen von 1-5 % (GUPTA & EARLEY 1988, GALLAGHER et al. 1991) erreichen. Auch in diesem Projekt haben wir dieses diagnostische Potential ausgenutzt, um die Struktur der detektierten Addukte zu bestimmen.

Alle von uns detektierten Addukte des 3-NBA, ob *in vitro* oder *in vivo*, lagen im Bereich der typischen diagonalen radioaktiven Zone. Innerhalb dieser diagonalen Zone befinden sich die zahlreichen DNA-Addukte, die von komplexen Gemischen wie Dieselabgasen oder Zigaretten-Kondensat gebildet werden. Daher ist es sehr wahrscheinlich, daß die durch 3-NBA gebildeten DNA-Addukte Teil der diagonalen radioaktiven Zone sind, welche durch Luftschadstoffe entsteht und deshalb zur Genotoxizität dieses komplexen Gemisches beiträgt. Wie andere Nitro-PAK ist auch 3-NBA ein Umweltschadstoff der in komplexen Gemischen ubiquitär in der Umwelt verteilt ist. Quantitative Analysen ergaben, dass 3-Nitrobenzanthron in Konzentrationen zwischen 0,6 und 6,6  $\mu\text{g}$  pro Gramm Dieselruß auftritt. Dieser Konzentrationsbereich entspricht in etwa dem des 1,8-Dinitropyrens, welches in Mengen von 0,3-5,2  $\mu\text{g/g}$  gefunden wird. Auch Staubpartikel, die mittels Glasfaserfiltern in Tokio aus der Luft gesammelt wurden, enthielten diese Verbindung im Konzentrationsbereich von 5,2-11,5  $\text{pg/m}^3$ . Folglich ist sowohl eine orale als auch eine inhalative Aufnahme für den Menschen möglich. Kürzlich konnten SEIDEL et al (2002) zum ersten Mal die Aufnahme von 3-NBA im Menschen bestätigen. Sie detektierten 3-ABA (Abb. 9) im Urin von Arbeitern eines Salzbergwerks, die mit Dieselabgas exponiert worden waren.

Wir konnten durch die Anwendung des  $^{32}\text{P}$ -postlabeling Verfahrens zeigen, daß 3-NBA nach metabolischer Aktivierung mehrere DNA-Addukte *in vitro* (BIELER et al 1999) als auch *in vivo* (ARLT et al 2001) in der Ratte bildet. Die Ergebnisse der *in vitro* Studien mit Xanthin Oxidase belegen, daß alle Hauptaddukte Reaktionsprodukte der Nitroreduktion von 3-NBA mit Purinbasen darstellen. Diese Schlußfolgerung basiert auf dem chromatographischen Vergleich in 2 unabhängigen Trennsystemen zwischen Addukten, die *in vitro* mit Kalbsthymus-DNA und nach Ersatz der DNA mit Purin 3'-Monophosphaten erhalten wurden. Da von Xanthin Oxidase nicht bekannt ist, daß sie Ketogruppen zu reduzieren vermag, gehen wir davon aus, daß alle *in vitro* beobachteten 3-NBA-Addukte durch einfache Nitroreduktion gebildet werden.

Unsere  $^{32}\text{P}$ -postlabeling Analysen von DNA aus Organen von 3-NBA behandelten Ratten zeigten qualitativ ähnliche Adduktmuster wie jene aus den *in vitro* Experimenten. Daher waren keine anderen oder zusätzlichen DNA-Addukte *in vivo* detektierbar. Auf Grund der oralen Verabreichung per Schlundsonde findet man die höchsten Adduktspiegel in den Organen des Gastrointestinal-Traktes (Dünndarm, Vormagen und Drüsenmagen). In gleicher Weise wie die *in vitro* erhaltenen Addukte konnten auch die *in vivo* erhaltenen Addukte mittels ihrer chromatographischen Eigenschaften teilweise identifiziert werden. Damit zeigt sich, daß auch *in vivo* die Purinbasen der DNA die bevorzugten Ziele der reaktiven Metabolite sind. Diese Reaktivität von Nitro-PAK gegenüber den Purinen ist bekannt und wurde in anderen *in vivo* Studien bestätigt (FU et al 1991; NORTIER et al 2000). Da wir keinen Hinweis auf eine Ringoxidation im aktivierenden Metabolismus des 3-NBA fanden,

gehen wir davon aus, daß die Nitroreduktion primär für die Adduktbildung *in vivo* in der Ratte verantwortlich ist (Abb. 9). Allerdings kann die Bildung reaktiver Ester, wie N-Acetoxy- oder N-sulfonyloxyester, nach erfolgter Nitroreduktion für den *in vivo* Metabolismus des 3-NBA nicht ausgeschlossen werden. Interessant ist auch, daß die relative 3-NBA-Addukt-Verteilung in allen untersuchten Organen nahezu identisch ist, was den Schluß zuläßt, daß in allen Geweben die selbe reaktive Spezies, die zur Adduktbildung führt, vorhanden ist. Die Identität der Nitroreduktase, die 3-NBA *in vivo* aktiviert ist nicht bekannt, aber die Aktivierung von 3-NBA in V79 Zellen, die humane CYP3A4 exprimieren zeigt, daß dieses Enzym zur Bioaktivierung von 3-NBA beiträgt. Außerdem nahm die DNA-Adduktierung in V79 Zellen, die CYP3A4 zusammen mit CYP3A5 exprimieren, signifikant zu, so daß auch CYP3A4 an der Aktivierung von 3-NBA im Menschen beteiligt sein kann. Andere Autoren berichteten ebenfalls von der Beteiligung von CYP3A4 an der Nitroreduktion von 4-Nitropyren (CHAE et al 1999), 6-Nitrochrysen (CHAE et al 1993) und 1,6-Dinitropyren (SHIMADA et al 1990). Daß die Nitroreduktion der Hauptaktivierungsweg für 3-NBA ist wird ebenfalls dadurch gestützt, daß in V79 Zellen, die hohe Nitroreduktase und N,O-Acetyltransferase Aktivitäten exprimieren, nach Exposition mit nur 0.01 µM 3-NBA 2- bis 4-fach höhere DNA-Adduktspiegel erreicht werden als in V79MZ Zellen nach Exposition mit der 100mal höheren Dosis. Auch die dramatische Abnahme der lebenden V79NH Zellen auf 10 % nach Behandlung mit 0.1 oder 1 µM 3-NBA bestätigt, daß eine starke Aktivierung von 3-NBA zu toxischen Produkten in diesen Zellen vorliegt. Die Aktivierung von 3-NBA in V79NH Zellen verläuft daher wahrscheinlich über die Reduktion der Nitrogruppe und eine daran anschließende Acetylierung der gebildeten N-Hydroxylarylamine, katalysiert durch N,O-Acetyltransferasen. Diese Annahme steht im Einklang mit Ergebnissen aus dem Ames-Test (ENYA et al 1997), denn 3-NBA zeigt im Stamm YG1024, der eine erhöhte O-Acetyltransferase Aktivität gegenüber TA98 aufweist, eine 30-fach höhere mutagene Aktivität.

Aus unseren Studien zur metabolischen Aktivierung von 3-NBA mit rekombinanten V79 Zellen, die die humanen Phase II-Enzyme NAT1, NAT2 und SULT1A1 exprimieren, schließen wir, dass alle 3 Enzyme an der Aktivierung beteiligt sind (Abb. 9). Auch die erhöhte Cytotoxizität in den rekombinanten Zellen verglichen mit der Eltern-Zell-Linie spricht für diese Einschätzung. Ferner zeigen die Ergebnisse mit dem Metaboliten *N*-acetyl-*N*-hydroxy-3-aminobenzanthron, dass dieser nicht eines der Hauptzwischenprodukte auf dem Weg zur Bildung von 3-NBA-DNA-Addukten darstellt. Ganz im Gegenteil, unsere Daten deuten eher darauf hin, dass *N*-acetyl-*N*-hydroxy-3-aminobenzanthron zu *N*-OH-ABA deacetyliert wird, welches nach Veresterung zum N-Acetoxy- oder N-Sulfoxyester direkt mit DNA reagieren kann (Abb. 9). Daher sind wir der Meinung, dass diese beiden reaktiven Ester nach vorheriger Nitroreduktion von 3-NBA hauptverantwortlich für die DNA-Adduktbildung durch 3-NBA sind und deshalb ausschließlich nicht acetylierte Addukte *in vivo* gefunden werden.

Diese Studien über die Bioaktivierung von 3-NBA bilden die Grundlage zur Entwicklung von Methoden, die den Nachweis und die Kontrolle von Expositionen gegenüber 3-NBA beim Menschen möglich machen. Allerdings sollten diese *in vivo* Ergebnisse in einem größeren Tierversuch mit inhalativer 3-NBA-Exposition bestätigt werden.

## 5. Literatur

- ARLT, V.M, BIELER, C.A, MIER, W., WIESSLER, M., SCHMEISER, H.H. (2001): DNA adduct formation by the ubiquitous environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone in rats determined by <sup>32</sup>P-postlabeling. *Int J Cancer* **93**, 450-454.
- ARLT, V.M., GLATT, H., MUCKEL, E., PABEL, U., SORG, B:L., SCHMEISER, H.H., PHILLIPS, D.H. (2002): Metabolic activation of the environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone by human acetyltransferases and sulfotransferase. *Carcinogenesis* **11**, accepted.
- ATKINSON, R. & AREY, J. (1994): Atmospheric chemistry of gas-phase polycyclic hydrocarbons:formation of atmospheric mutagens. *Environ. Health Perspect.* **102** Supplement 4, 117-125.
- BEACH, A.C. & GUPTA, R.C. (1992): Human biomonitoring and the <sup>32</sup>P-postlabelling assay. *Carcinogenesis* **13**, 1053-1074.
- BIELER, C.A., WIEBLER, M., ERDINGER, L., SUZUKI, H., ENYA, T. AND SCHMEISER, H.H. (1999): DNA adduct formation from the mutagenic air pollutant 3-nitrobenzanthrone. *Mutation Res.* **439**, 307-311.
- CHAE, YH, JI, BY, LIN, JM, FU PP, Cho BP, El-Bayoumy K. (1999): Nitroreduction of 4-nitropyrene is primarily responsible for DNA adduct formation in the mammary gland of female CD rats. *Chem Res Toxicol.* **12**, 180-186.
- CHAE, YH, YUN, CH, GUENGERICH, FP, KADLUBAR, FF, EL-BAYOUMY, K. (1993): Roles of human hepatic and pulmonary cytochrome P450 enzymes in the metabolism of the environmental carcinogen 6-nitrochrysene. *Cancer Res.* **53**, 2028-2034.
- ENYA, T., SUZUKI, H., WATANABE, T., HIRAYAMA, T. & HISAMATSU, Y. (1997):3-Nitro-benzanthrone, a powerful bacterial mutagen and suspected human carcinogen found in diesel exhaust and airborne particulates. *Environ. Sci. Technol.* **31**, 2772-2776.
- FARMER, P.B. (1997): Diesel fuel and exhaust emissions: is there a human carcinogenic risk? *The Lancet* **350**, 1118-1119.
- FINLAYSON-PITTS, B.J. & PITTS, J.N. jr. (1997): Tropospheric air pollution: ozone, airborne toxics, polycyclic aromatic hydrocarbons, and particles. *Science* **276**, 1045-1052.
- FU, P.P. (1990): Metabolism of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab. Rev.*, **22**, 209-268.
- FU, P.P, Miller DW, VON TUNGELN, LS, BRYANT, MS, LAY, Jr, JO, HUANG, K, JONES, L, EVANS, FE. (1991): Formation of C8-modified deoxyguanosine and C8-modified deoxyadenosine as major DNA adducts from 2-nitropyrene metabolism mediated by rat and mouse liver microsomes and cytosols. *Carcinogenesis* **12**, 609-616.
- GALLAGHER, J.E., KOHAN, M.J., GEORGE, M.H. AND LEWTAS, J. (1991): Improvement of the diagnostic potential of <sup>32</sup>P-postlabeling analysis demonstrated by the selective formation and comparative analysis of nitrated-PAH-derived adducts arising from diesel particle extracts. *Carcinogenesis*, **12**, 1685-1691.
- GUPTA, R.C. AND EARLEY, K. (1988) <sup>32</sup>P-adduct assay: comparative recoveries of structurally diverse DNA adducts in the various enhancement procedures. *Carcinogenesis* **9**, 1687-1693.
- LEITER, J. & SHEAR, M.J. (1942): Production of tumors in mice with tars from city air dusts. *J. Natl. Cancer Inst.* **3**, 167-174.
- LEWTAS, J. MUMFORD, J., EVERSON, R.B., HULKA, B., WILCOSKY, T., KOZUMBO, W., THOMPSON, C., GEORGE, M., DOBIAS, L., SRAM, R., LI, X. AND GALLAGHER, J. (1993): Comparison of DNA adducts from exposure to complex mixtures in various human tissues and experimental systems. *Environ. Health Perspect.* **99**, 89-97.
- LUCH, A., COFFING, S.L., TANG, Y.M., SCHNEIDER, A., SOBALLA, V., GREIM, H., JEFCOATE, C.R., SEIDEL, A., GREENLEE, W.F., BAIRD, W.M. AND DOEHMER, J. (1998): Stable expression of human cytochrome P450 1B1 in V79 Chinese hamster cells and metabolic catalyzed DNA adduct formation of dibenzo(a,l)pyrene. *Chem. Res. Toxicol.*, **11**, 686-695.
- MÖLLER, L.(1994): In vivo metabolism and genotoxic effects of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ Health Perspect.* **102** (Suppl 4): 139-146.
- NORTIER, JL, MUNIZ, MC, SCHMEISER, H.H, ARLT, VM, BIELER, CA, PETEIN, M, et al. (2000): Urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (*Aristolochia fangchi*). *N Engl J Med.* **342**, 1686-1692.
- PHOUSONGPHOUNG, P.T, GROSOVSKY, A.J, EASTMOND, D.A, COVARRUBIAS, M, AREY, J.(2000): The genotoxicity of 3-nitrobenzanthrone and the nitropyrene lactones in human lymphoblasts. *Mutat Res.* **472**, 93-103.



- PUROHIT, V.& BASU, A.K.(2000): Mutagenicity of nitroaromatic compounds. *Chem Res Toxicol.* **13**, 673-692.
- SAVELA, K., KOHAN, M.J., WALSH, D., PERERA, F., HEMMINKI, K. AND LEWTAS, J. (1996): *in vitro* characterization of DNA adducts formed by foundry air particulate matter. *Environ. Health Perspect.* **104** Supplement 3, 687-690. SAVELA, K., KOHAN, M.J., WALSH, D., PERERA, F., HEMMINKI, K. AND LEWTAS, J. (1996): *in vitro* characterization of DNA adducts formed by foundry air particulate matter. *Environ. Health Perspect.* **104** Supplement 3, 687-690.
- SCHMALIX, W.A., MÄSER, H., KIEFER, F., REEN, R., WIEBEL, F.J., GONZALEZ, F., SEIDEL, A., GLATT, H., GREIM, H. AND DOEHMER, J. (1993): Stable expression of human cytochrome P450 1A1 cDNA in V79 Chinese hamster cells and metabolic activation of benzo[a]pyrene. *Eur. J. Pharm.-Environ. Toxicology Section* **248**, 251-261.
- SCHMALIX, W.A., LANG, D., SCHNEIDER, A., BOCKER, R., GREIM, H. AND DOEHMER, J. (1996): Stable expression and coexpression of human cytochrome P450 1A2 in V79 Chinese hamster cells: sensitivity to quinones and biotransformation of 7-alkoxyresorufines and triazines. *Drug Metabol. Disposition*, **24**, 1314-1319.
- SEIDEL, A., DAHMANN, D., KREKELER, H., JACOB, J. (2002): Biomonitoring of polycyclic aromatic compounds in the urine of mining workers occupationally exposed to diesel exhaust. *Int. J. Hyg. Environ Health*, **204**, 333-338.
- SHIMADA, T, GUENGERICH, F.P. (1990): Inactivation of 1,3-, 1,6-, and 1,8-Dinitropyrene by cytochrome P-450 enzymes in human and rat liver microsomes. *Cancer Res.* **50**, 2036-2043.
- TOKIWA, H., SERA, N., HORIKAWA, K., NAKANISHI, Y., SHIGEMATU, N. (1993): The presence of mutagens/carcinogens in the excised lung and analysis of lung cancer induction. *Carcinogenesis* **14**, 1933-1938.