

Projekt Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung (BWPLUS)

Forschungsbericht FZKA-BWPLUS

Identifizierung spezifischer DNA-Adduktmuster durch organische Verbindungen in der Außenluft: Biomarker für Luftschadstoffe

von

H.H. Schmeiser, C.A. Bieler, M. Fried, L. Erdinger und M. Wießler
Abt. Molekulare Toxikologie
DKFZ Heidelberg und Hygiene-Institut
Universität Heidelberg

Die Arbeiten des Projektes "Umwelt und Gesundheit" wurden mit Mitteln des Landes Baden-Württemberg gefördert

Förderkennzeichen: PUG L 96011

August 1999

Identifizierung spezifischer DNA-Adduktmuster durch organische Verbindungen in der Außenluft: Biomarker für Luftschadstoffe

H.H. Schmeiser, C.A. Bieler, M. Fried, L. Erdinger und M. Wießler

Abt. Molekulare Toxikologie, DKFZ Heidelberg und Hygiene-Institut, Universität Heidelberg

1. Einleitung

Bereits seit 1942 ist aus Tierexperimenten (LEITER & SHEAR 1942) bekannt, daß Luftschadstoffe Krebsrisikofaktoren für die Öffentlichkeit darstellen, da organische Extrakte von Luftstäuben in der Lage waren Tumoren in Mäusen zu erzeugen. Neben den bekannten carcinogenen polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK), wie B[a]P wurden auch andere bis jetzt nicht identifizierte carcinogene Substanzen für die Krebsentstehung in den Versuchstieren verantwortlich gemacht.

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 für eine Krebsrisiko-Abschätzung von Bedeutung, 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, Diesel-Ruß und in Luftstäuben nachgewiesen. Diese werden zum Teil erst in der Atmosphäre unter Beteiligung von NO_x, OH-Radikalen, Ozon und Licht gebildet und sind wie die Phenanthren-Reaktionsprodukte (ATKINSON & AREY 1994) oder vor allem die Nitrobenzanthrone (ENYA et al. 1997) ausgesprochen starke bakterielle Mutagene. Allerdings konnten wir durch bioassay-directed fractionation zeigen, daß die hauptsächliche bakterielle Mutagenität, die den in Baden-Württemberg gesammelten Luftstäuben innewohnt, nicht von Nitro-PAKs wie 1-Nitropyren, 6-Nitrobenzo[a]pyren oder den Nitrophenanthrenen stammt (ERDINGER et al. 1997). Gleiches gilt auch für die Extrakte der Standard-Stäube SRM 1649 und SRM 1648 aus amerikanischen Großstädten. Wie auch von GUNDEL et al. (1993) belegt, handelt es sich bei den Trägern der Hauptmutagenität um polare, komplexe PAK-Abkömmlinge mit sauren Eigenschaften. Diese polaren, mutagenen Verbindungen sind bis heute nicht identifiziert.

Die Mehrzahl der bekannten Carcinogene und Mutagene sind DNA-reaktive Stoffe, deren carcinogene bzw. mutagene Aktivität zumeist auf der Bildung von DNA-Addukten beruht. Daher war es das Ziel dieses Projektes, die erwiesene mutagene Wirkung der Extrakte von Luftstäuben sowie deren Fraktionen auf die Bildung von DNA-Addukten *in vitro* zu untersuchen und diese *in vitro* Genotoxizität mit der Mutagenität zu vergleichen. Die DNA-Adduktbildung wird mit dem empfindlichen ³²P-postlabeling Verfahren analysiert, da sich dieses besonders zur Untersuchung von komplexen, genotoxischen Schadstoffgemischen, 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 ³²P-postlabeling erhaltenen DNA-Addukte zu klassifizieren. Neben diesem diagnostischen Potential der Analysenmethode sollten durch unterschiedliche Aktivierungsmethoden, oxidativ bzw. reduktiv, weitere Hinweise auf die chemische Struktur

der DNA-Addukte erhalten werden und somit die DNA-adduktierenden Verbindungen, welche an Luftstäube adsorbiert sind, identifizieren zu helfen.

Anstatt der reinen *in vitro* Ansätze wurden auch DNA-Addukt-Analysen mit Säugerzellen (V79 Chinesische Hamsterzell-Linien), die humane Cytochrome P450 Enzyme definiert exprimieren, durchgeführt. Dadurch läßt sich der humane Metabolismus der Luftstaub-Extrakte simulieren, was eine toxikologische Risikobewertung erleichtert.

3-Nitrobenzanthron (3-NBA) wurde kürzlich als Luftschadstoff vor allem in Dieselabgasen und Luftstaubextrakten entdeckt (ENYA et al. 1997). Da sich diese Substanz als extrem starkes Mutagen im Ames Test erwies, haben wir 3-NBA in unsere Untersuchungen mit aufgenommen, auch vor dem Hintergrund die Bedeutung dieses oxidierten Nitro-PAK als neue Leitsubstanz zur Risikobewertung von Schadstoffen in der Luft zu definieren.

2. Material und Methoden

2.1. Extraktion der Luftstäube

Die verwendeten Luftstäube aus Freiburg (Probennahme: Freiburg-Mitte, Feb. '96) wurden gemäß den routinemäßigen Verfahren auf Glasfaser-Filtern gesammelt und aufbereitet. Einzelheiten hierzu finden sich ausführlich bei ERDINGER et al. (1997). Gleiches gilt auch für das vom NIST in den USA bezogene Referenzmaterial SRM 1648.

Die Extraktion der Schadstoffe und die Fraktionierung der Extrakte, entweder aufgrund ihrer Säure/Base-Eigenschaften oder mittels HPLC, wurden nach den dort beschriebenen Methoden durchgeführt. Auch die Mutagenitäts-Tests in den *Salmonella typhimurium*-Stämmen TA 98 und TA 100 sind dort im Detail erläutert.

Der trockene Rückstand nach Extraktion des Luftstaubs und Abblasen des Lösungsmittels wird als EOM (extractable organic matter) bezeichnet.

2.2. *In vitro* DNA-Adduktierungsversuche

Zur Untersuchung des DNA-Adduktbildungsvermögens der Luftstaubextrakte wurden *in vitro*-Inkubationen durchgeführt. Dazu wurden Aliquots der in DMSO vorliegenden Extrakte (50 µl, entsprechend 100 µg EOM bzw. 20 m³ Luft) in 0,5 ml mit Kalbsthymus-DNA (250 µg) für 2 h bei 37 °C umgesetzt. Als Reaktionsmedium diente Kaliumphosphat-Puffer (50 mM), dessen pH bei Inkubationen ohne Aktivierung oder unter oxidativen Bedingungen mit 100 µl S9-Mix (1,2 mg Protein/ml) 7,0 bzw. 5,8 bei reduktiver Aktivierung mit 5 mg Zn betrug (SCHMEISER et al. 1997). Als Negativ-Kontrolle diente der Extrakt, der von unbeladenen Glasfaser-Filtern gewonnen wurde.

Die Modifikation von CT-DNA mit 3-Nitrobenzanthron (3-NBA) erfolgte, indem entweder eine Lösung von 3-NBA in DMSO (Endkonzentration 300 µM) zu einer entgasten und argon-gesättigten Lösung von CT-DNA (4 mM in 50 mM Phosphatpuffer, pH 6,0, 1 mM Hypoxanthin) und 1 U Xanthinoxidase gegeben wurde oder zu einer S9 Mix (0,5 mg/mL) enthaltenden Lösung. Die Inkubationen wurden 4 h bei 37°C im Dunklen gehalten. Kontrollen wurden analog ohne S9 oder XO durchgeführt. Die Reaktionen wurden durch Extraktion mit 1 mL Ethylacetat beendet und die DNA nach der Phenol/Chloroform-Methode isoliert.

Die Umsetzungen mit Zink und 3-NBA in verschiedenen Konzentrationen erfolgten mit CT-DNA (4 mM) bei pH 5,8 in Phosphatpuffer, sowie die Kontrollversuche ohne 3-NBA oder Zn.

2.3. DNA-Adduktierungsversuche mit Säugerzellen

2.3.1 Zell-Linien

Die Untersuchungen zur DNA-Adduktbildung der Luftstaubextrakte wurden mit 3 Zell-Linien (PharmBioDyn Freiburg) durchgeführt: die Stamm-Linie V79MZ, eine Lungenzell-Linie des chin. Hamsters, die sich durch eine sehr geringe metabolische Aktivität bezüglich der Cytochrome P450 auszeichnet und daher als Kontrolle diente und zwei Abkömmlinge dieser Linie, die humanes Cytochrom P450 1A1 (V79MZ-h1A1, SCHMALIX et al. 1993) oder humanes Cytochrom P450 1A2 (V79MZ-h1A2, WÖLFEL et al. 1992) exprimieren.

2.3.2 Zellkultur

Alle drei Zell-Linien wurden in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) mit einem Glucosegehalt von 4,5 g/l bei 37°C, 7% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Medium wurde vor Verwendung mit 1 mM Natriumpyruvat, 4 mM L-Glutamin, 10% fötalem Kälberserum sowie 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin supplementiert. Die Zellen wurden mit 0,25x10⁶ Zellen pro ml in 25 ml Medium in 75 cm² Kulturflaschen angesetzt und jeden dritten Tag passagiert.

2.3.3 Behandlung der V79-Zellen mit Luftstaubextrakten oder einzelnen Schadstoffen

Zu Beginn einer Versuchsreihe wurden jeweils 3x10⁶ Zellen der laufenden Kultur in einer 250 ml-Kulturflasche in 30 ml Medium für 24 h in Kultur gehalten. Diesen Ansätzen wurden dann jeweils 50 µl Luftstaubextrakt (100 µg EOM \cong 20 m³ Luft) in DMSO oder eine Lösung des reinen B[a]P in DMSO (Endkonzentration 1 µM), zugesetzt und weitere 24 h inkubiert.

2.3.4 Ernte der Zellen und DNA-Isolierung

Nach 24stündiger Inkubation wurde das Medium entfernt und die Zellen zur vollständigen Entfernung von Medium und Schadstoff-Lösung zweimal mit je 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Behandlung mit 2 ml einer Trypsin-Lösung (0,025% Trypsin und 0,01% EDTA in PBS) für 5 min vom Boden des Kulturgefäßes gelöst. Die Trypsin-Behandlung wurde dann durch Zugabe von 4 ml Medium gestoppt. Durch Zentrifugation bei 2000 U/min, Abheben des Mediums und zweimaliges Waschen mit PBS wurde ein Pellet erhalten, welches bis zur DNA-Isolierung bei -80°C gelagert wurde. DNA wurde schließlich unter Verwendung eines Qiagen Kits (Blood & Cell Culture DNA Kit) isoliert.

2.4. ³²P-postlabeling

Adduktisierte DNA aus den *in vitro*-Inkubationen wurde nach Extraktion des Reaktionsgemisches mit Essigsäureethylester durch Fällung mit Ethanol isoliert, zusätzlich wurden die Ansätze mit S9-Mix einer Phenol-Extraktion unterzogen. Salmonellen-DNA wurde entsprechend der Vorschrift von MALFATTI et al. (1995) isoliert, dazu wurden die Bakterien lysiert und die DNA nach Protease-Verdau mittels Phenol-Extraktion gereinigt und mit Ethanol gefällt.

Der ³²P-postlabeling assay wurde nach den standardisierten Verfahren wie bei REDDY et al. (1986) für den Nuklease P1-Verdau oder GUPTA & EARLEY (1988) für die Butanol-Extraktion beschrieben durchgeführt. Dazu wurden Aliquots der DNA (12,5 µg) enzymatisch zu Nukleosid-3'-phosphaten verdaut, angereichert und schließlich durch T4-Polynukleotid-Kinase mit 200 µCi [γ -³²P]-ATP je Probe radioaktiv markiert. Die anschließende dünnschichtchromatographische Trennung der Addukte erfolgte auf PEI-Cellulose unter

Standard-Bedingungen wie beschrieben bei GUPTA & EARLEY (1988). Die qualitative und quantitative Erfassung der Addukte erfolgte mittels eines Instant-Imager der Fa. Canberra-Packard.

Die Adduktraten werden als RAL-Werte angegeben (relative adduct labeling) und stellen das Verhältnis von Addukten zur Gesamtzahl der normalen (unmodifizierten) Nukleotide dar.

3. Ergebnisse

3.1. DNA-Addukt Analysen von *Salmonella typhimurium* TA 98 und TA 100

Gesamtextrakte von Luftstaub aus Freiburg, gesammelt im Februar 1996, und dem Referenzmaterial SRM 1648 (eingesetzt wurden 600 µg EOM bzw. 26 mg EOM) wurden analog den Bedingungen im Ames-Test in 15 ml Ansätzen (ca. 10^{10} Bakterien) inkubiert. Entsprechende Inkubationen wurden auch mit den im Ames-Test verwendeten Positivkontrollen 1-Nitropyren bzw. Natriumazid durchgeführt. Die ^{32}P -postlabeling Analysen, die mit beiden Anreicherungsverfahren durchgeführt wurden, zeigten nur für die Ansätze von TA 98 mit 1-Nitropyren, angereichert durch Butanol-Extraktion, einen charakteristischen Addukt-Fleck. Durch chromatographischen Vergleich mit Addukten, die durch Umsetzung von Kalbsthymus-DNA mit 1-Nitropyren nach Aktivierung mit Zink erhalten wurden, konnten wir zeigen, daß dieser Addukt-Fleck identisches Laufverhalten mit dem Hauptaddukt des 1-Nitropyrens, ein C-8 Guaninaddukt, aufwies. Wurden die Analysen für die adduktivierte Kalbsthymus-DNA mit NukleaseP1-Verdau anstatt mit Butanol-Extraktion angereichert, lag die Ausbeute für dieses C-8 Guaninaddukt nur bei ca. 1% und bestätigte das bekannte diagnostische Potential der Methode für C-8 Guaninaddukte. Alle anderen Analysen mit Bakterien-DNA ergaben keine Unterschiede zu den Kontrollen, in denen nur DMSO verwendet wurde.

3.2. Vorversuche

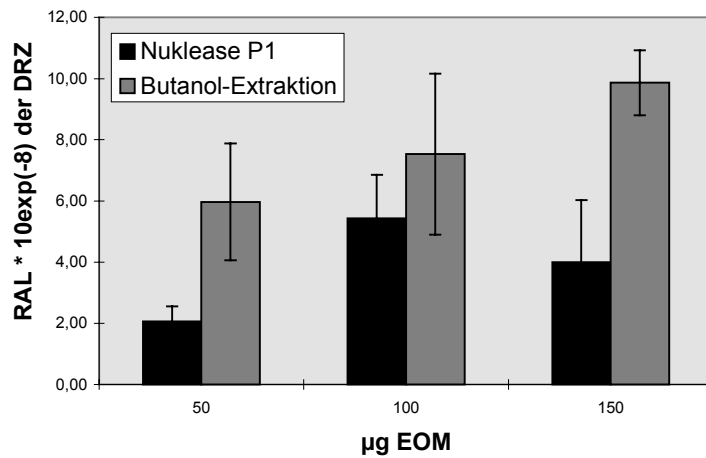
3.2.1 Untersuchungen zur Konzentrationsabhängigkeit

Der organische Gesamtextrakt von Luftstaub aus Freiburg (Freiburg-Mitte, Februar '96) (ERDINGER et al. 1997) wurde in Puffer, pH 7.0, mit Kalbsthymus-DNA in 3 unterschiedlichen Konzentrationen umgesetzt. Die Konzentrationen betragen 150 µg EOM (30 m³ Luft), 100 µg EOM (20 m³ Luft) oder 50 µg EOM (10 m³ Luft). Die DNA wurde isoliert und mit beiden Anreicherungsverfahren auf zusätzliche DNA-Addukt-Flecken im Vergleich zur Kontrolle (frischer Glasfaser-Filter) untersucht. In allen ^{32}P -postlabeling Analysen, außer der Kontrolle, konnten DNA-Addukte in Form einer diagonalen radioaktiven Zone (DRZ) nachgewiesen werden. Die quantitative Analyse ist in Abbildung 1 gezeigt und offenbart eine konzentrationsabhängige Zunahme der DNA-Adduktierung für beide Anreicherungsverfahren. Allerdings waren die RAL-Werte nach Butanol-Extraktion um das ca. 2-fache höher.

Abb. 1:

Mittelwerte aus 2 Bestimmungen von 2 *in vitro* Inkubationen.

Gesamtextrakt von Luftstaub aus Freiburg in EOM. DRZ: diagonale radioaktive Zone



3.2.2 Untersuchungen zum Einfluß des Aktivierungssystems

Gesamtextrakt von Luftstaub aus Freiburg (jeweils 100 µg EOM) wurde mit Kalbsthymus-DNA ohne Aktivierung (denaturierter S9-Mix), mit Zusatz von S9-Mix oder mit Zusatz von 5 mg Zinkpulver inkubiert. Die ³²P-postlabeling Analysen wurden sowohl mit Nuclease P1-Verdau als auch mit Butanol-Extraktion durchgeführt und ergaben in allen Fällen eine diagonale radioaktive Zone (DRZ). Wie in Abbildung 2 zu sehen, war diese DRZ, die auch ohne S9-Mix vorhanden war, für alle Inkubationen ähnlich, wenn auch nicht identisch. Ein deutlicher Unterschied war wieder zwischen den Anreicherungsverfahren zu erkennen. Zum einen war das Fleckenmuster der DRZs unterschiedlich, zum anderen lagen die Adduktierungsraten für die DRZs mit Anreicherung durch Butanol-Extraktion um das 2-fache höher als die Anreicherung durch Nuklease-Verdau. Folgende RAL-Werte pro 10⁷ Nukleotide wurden erhalten: mit S9-Mix 5.5 (Butanol-Ex.) und 2.5 (Nuklease P1), unter Zn-Aktivierung 6.2 (Butanol) und 2.0 (Nuklease P1), mit inaktiviertem S9-Mix 3.4 (Butanol) und 2.0 (Nuklease P1). Daher wurden alle folgenden Untersuchungen mit der Butanol-Extraktionsmethode durchgeführt. Wurde die Chromatographie analog der Reddy-Methode (REDDY ET AL. 1990) für weniger lipophile Addukte durchgeführt, zeigten sich keine zusätzlichen Addukt-Flecken, während sich die DRZ verkürzte oder ganz verschwand. Der als Negativ-Kontrolle verwendete Glasfaserfilter-Extrakt eines frischen Filters ergab mit oder ohne Aktivierung keine DRZ.

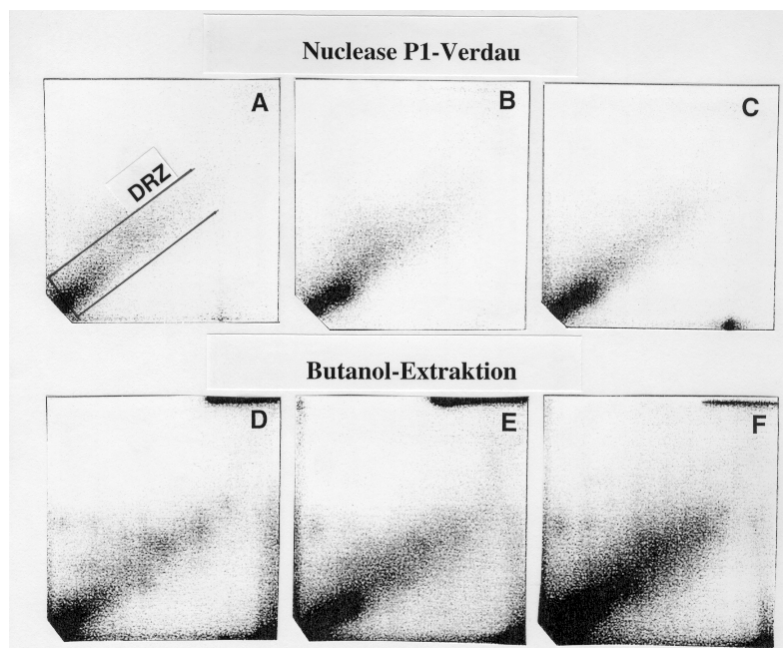


Abb. 2:

^{32}P -postlabeling Analysen durchgeführt mit den beiden Anreicherungsverfahren wie angegeben. Jeweils 100 μg EOM vom Gesamtextrakt eines Luftstaubes aus Freiburg wurden mit Kalbsthymus-DNA und denaturiertem S9-Mix (A,D) oder S9-Mix (B,E) oder mit Zink (C,F) inkubiert. Die Autoradiogramme wurden mit Instant Imager mit einer Expositionszeit von 20 min aufgenommen.

3.3. *In vitro* DNA-Addukt Analysen mit SRM 1648 Fraktionen nach Säure/Base-Trennung

Der organische Extrakt von SRM 1648 wurde wie von ERDINGER et al. (1997) beschrieben einer Säure/Base-Trennung unterworfen. Die 4 erhaltenen Fraktionen, starke Säuren (SA), schwache Säuren (WA), Basen (B) und neutrale Verbindungen (N), wurden in Mengen von jeweils 1.6 mg EOM *in vitro* inkubiert. Zusätzlich wurde der SRM-Gesamtextrakt in derselben Konzentration (1.6 mg EOM) untersucht. Qualitativ ergaben die ^{32}P -postlabeling Untersuchungen für alle Ansätze eine DRZ, die von Fraktion zu Fraktion wenig Unterschiede aufwies. Auch die Adduktierungsraten der DRZs, die in Abb. 3 gezeigt sind, zeigten keine gravierenden Unterschiede zwischen den aufgrund ihrer Säure/Base-Eigenschaften getrennten Fraktionen. Ebenso ergab die Zugabe von S9-Mix bzw. Zink keine deutlichen Unterschiede, weder in qualitativer noch quantitativer Hinsicht.

Analog hierzu wurden auch Untersuchungen mit dem Extrakt aus Freiburg durchgeführt. Jedoch wurden diese Inkubationen nicht auf die Massenverteilung der einzelnen Fraktionen bezogen, sondern die Fraktionen in gleichen Volumina in direkter Analogie zum Ames-Test aufgenommen. Als Ergebnis ergab sich qualitativ ein völlig identisches Bild zu den Resultaten mit dem Extrakt von SRM 1648, allerdings war quantitativ die Summe der Adduktierungsraten der einzelnen Fraktionen näherungsweise gleich dem RAL-Wert des Gesamtextraktes.

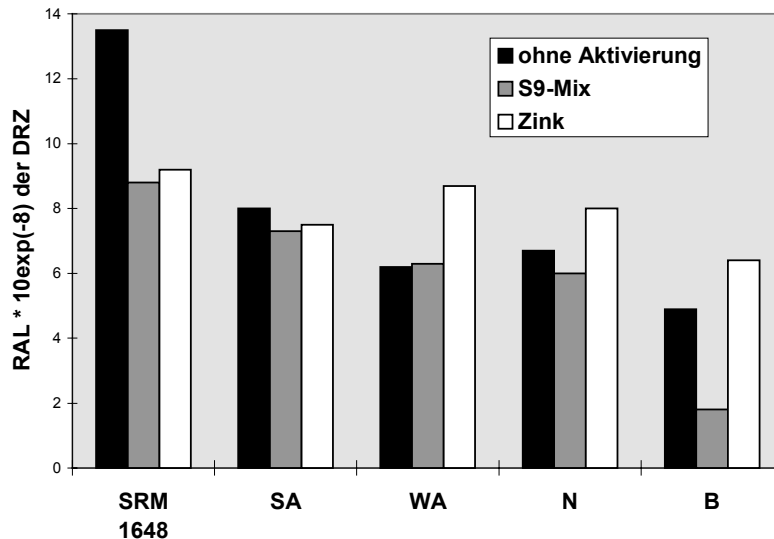


Abb.3: Postlabeling Analysen mit Butanol-Extraktion des Gesamtextraktes von SRM 1648; und der Fraktionen der starken Säuren (SA), der schwachen Säuren (WA), neutralen Verbindungen (N) und Basen (B). Dargestellt sind die RAL-Werte als Mittelwerte von 2 Bestimmungen aus *in vitro* Inkubationen mit jeweils 1.6 mg EOM.

3.4 *In vitro* DNA-Addukt Analysen mit 10 min-Fractionen von Luftstaub aus Freiburg nach HPLC-Trennung

Der organische Gesamtextrakt von Luftstaub aus Freiburg wurde wie bei SCHMEISER et al. (1998) beschrieben über HPLC in 10-Minuten Fraktionen aufgetrennt. Insgesamt wurden 25 mg EOM in 5 HPLC-Trennungen fraktioniert. Die Fraktionen einer Trennung wurden für den Ames-Test verwendet, die Fraktionen der restlichen 4 Trennungen wurden jeweils vereinigt und zur *in vitro* Adduktierung benutzt. Beispiele der erhaltenen ³²P-postlabeling Autoradiogramme sind in Abb. 4 dargestellt. Zu erkennen ist, dass die hauptsächliche DNA-Adduktbildung in den ersten 3 Fraktionen stattfindet, während in den Fraktionen 4-9 eine deutlich schwächere DRZ zu finden ist.

Wie in Abb. 5B gezeigt ergibt die Fraktion 3 (30-40 min) eindeutig die höchste Revertanzahl. Die chemisch-spektroskopische Analyse dieser Fraktion zeigte, daß relativ polare Verbindungen wie Phenanthren-carbonsäuren, Carbonsäureester und Benzothiazole enthalten waren. Die ³²P-postlabeling Analysen zeigten für alle Fraktionen ohne Aktivierung eine diagonale radioaktive Zone (DRZ) mit relativ unspezifischem Flecken-Muster. Fraktion 2 und 3 erzielten DRZs mit den höchsten RAL-Werten (Abb. 5C). Nach reduzierender Aktivierung der HPLC-Fraktionen mit Zink oder oxidativ mit Rattenleber S9 ergaben sich generell höhere Adduktierungsraten als ohne aktivierendes System. Hier erhält man die höchsten RAL-Werte für die ersten 3 Fraktionen.

3.5. Zwei-Minuten Fraktionen

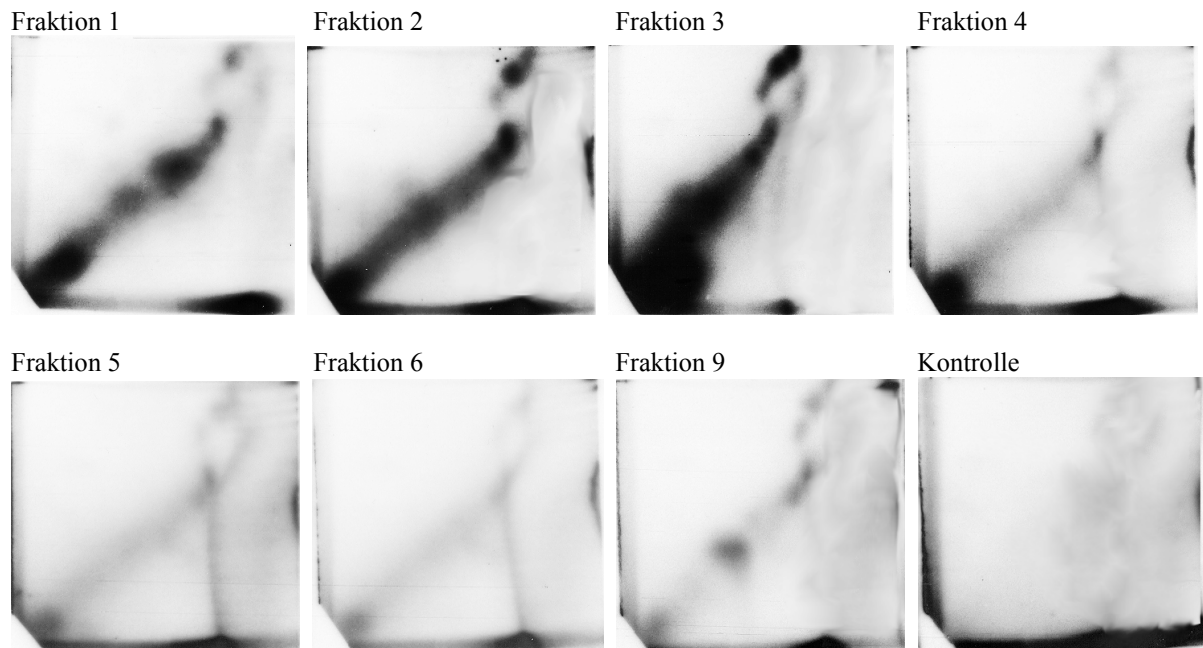
Analog der oben beschriebenen Fraktionierung des Gesamtextraktes aus Freiburg wurden auch HPLC-Trennungen in 2-Minutenschritten durchgeführt. Auf der Grundlage des erhaltenen Mutagramms (*Salmonella typhimurium* Stamm TA 98) wurden einige interessante Fraktionen (im Ganzen 13) ausgewählt, dargestellt in Tabelle I, und auf *in vitro* DNA-Addukt-Bildung wie beschrieben untersucht.

Die Fraktion von 4-6 Minuten, in welcher Benzo(a)pyren eluiert, war im Ames Test mit oder ohne S9 nur schwach mutagen, zeigte aber nach Aktivierung mit S9 in der ³²P-postlabeling Analyse einen diskreten Addukt-Fleck mit einem RAL-Wert von ca. 1 Addukt in 10⁷

Nukleotiden. Dieser Addukt-Fleck war chromatographisch nicht vom Hauptaddukt des Benzo(a)pyrens zu unterscheiden. Andere Fraktionen mit relativ hohen Revertanzahlen wie z.B. die Fraktion von 30-32 Minuten ergaben keine diskreten Addukt-Flecken sondern diffuse Bereiche in denen die Radioaktivität kaum über dem Hintergrund des Testsystems lag. Das gleiche gilt für die Fraktion von 10-12 Minuten, in der 3-Nitrobenzanthon eluiert, auch hier war nach reduktiver Aktivierung mit Zink kein eindeutiger DNA-Addukt-Fleck detektierbar.

Abb.4:

Autoradiographien eines ^{32}P -postlabeling-Experimentes mit HPLC-Fractionen des Luftstaub-Extrakes Freiburg-Mitte, Feb. 96, nach *in vitro* Inkubation von 100 μl Aliquots der Fraktionen unter reduktiver Aktivierung mit Zink. Kontrolle: DNA und Extrakt eines frischen Glasfaser-Filters.



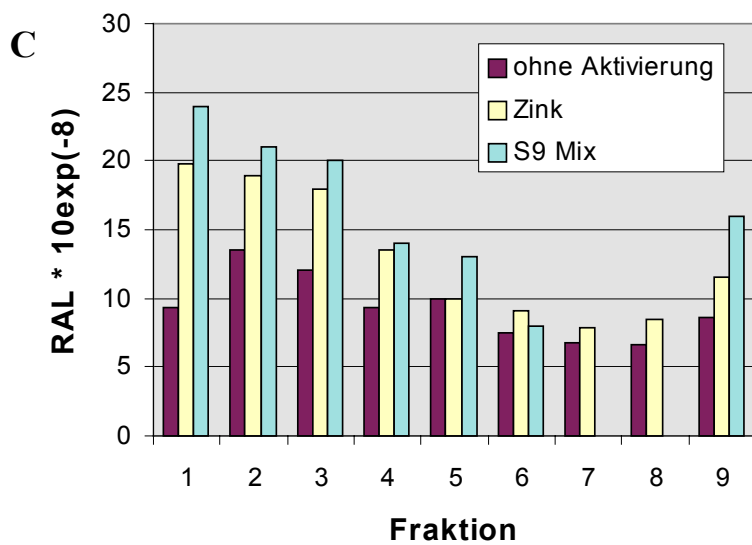
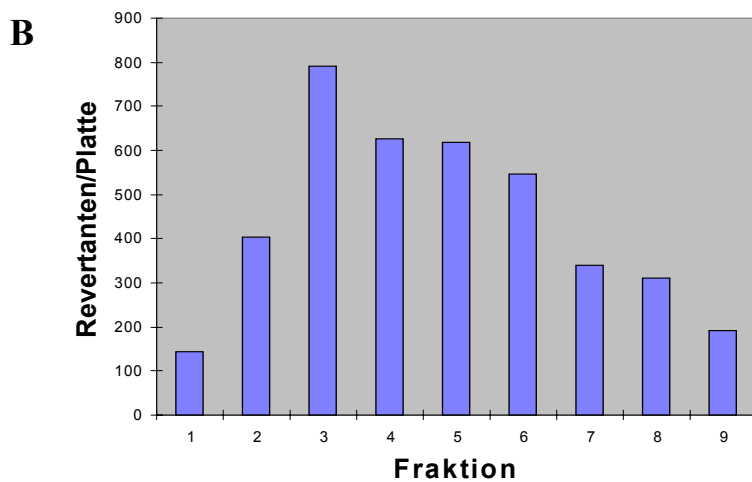
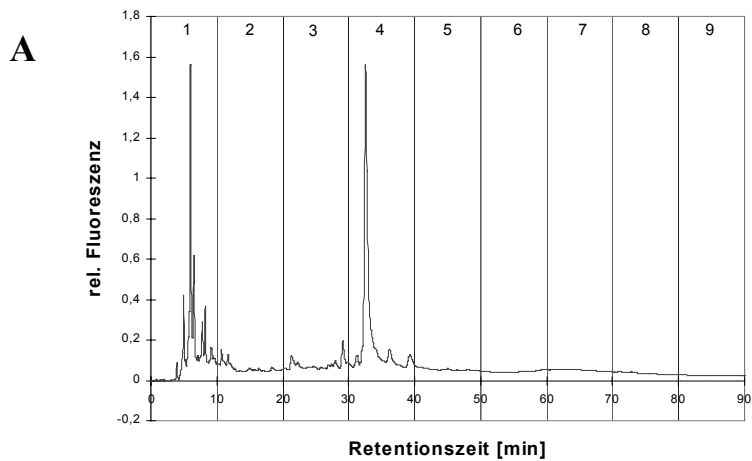


Abb. 5:

A
HPLC-Trennung des
Extraktes von Luftstaub aus
Freiburg mit
Fluoreszenzdetektion
Ex. 365 nm, Em. 420 nm

B
Mutagramm der HPLC-
Fraktionen (je 10 min) im
Stamm TA 98 (ohne S9-Mix)

C
RAL-Werte der HPLC-
Fraktionen nach ^{32}P -
postlabeling (Butanol-
Extraktion mit und ohne
Aktivierung
(Mittelwert aus mindestens 2
Analysen)

HPLC-Fraktion	Induktionsfaktor
Probe 1	1,4
Probe 2	1,0
Probe 3 Benzo(a)pyren	3,1
Probe 4	4,2
Probe 5 Nitro-B(a)P	9,2
Probe 6 3-Nitrobenzanthron	9,4
Probe 7	10,5
Probe 8	8,8
Probe 9	11,2
Probe 10	9,4
Probe 11	13,1
Probe 12	12,6
Probe 13	15,8
Probe 14	14,0
Probe 15	10,4
Probe 16 mutagenste Fraktion	21,1
Probe 17	10,1
Probe 18	7,0
Probe 19	4,4
Probe 20	7,4
Probe 21	4,7
Probe 22	3,0
Probe 23	3,6
Probe 24	3,8
Probe 25	4,6
Probe 26	2,0
Probe 27	3,5
Probe 28	2,9
Probe 29	2,6
Probe 30	2,0
Probe 31	0,9
Probe 32	cytotoxisch
Probe 33	0,6
Probe 34	0,4
Probe 35	1,1
Probe 36	1,4
Probe 37- 45	cytotoxisch
Probe 41	cytotoxisch

Tabelle I:
Ames-Test der HPLC-Trennung von Fr 2/96 in Zwei-Minuten-Fractionen (in TA 98 ohne S9)

3.6. DNA-Addukt-Bildung durch 3-Nitrobenzanthron (3-NBA) *in vitro*

Mittels ³²P-postlabeling wurde 3-Nitrobenzanthron, ein extrem starkes bakterielles Mutagen, auf seine Fähigkeit getestet, DNA-Addukte zu bilden (BIELER et al. 1999). Hierzu wurde 3-NBA mit Kalbsthymus-DNA zusammen mit verschiedenen Aktivierungssystemen umgesetzt.

Diese Inkubationen bestanden aus 300µM 3-NBA, 4mM dNp als Kalbsthymus-DNA. Die Aktivierung erfolgte entweder durch Xanthin Oxidase (XO) unter anaeroben Bedingungen oder durch chemische Reduktion mit Zink oder durch Rattenleber S9 unter aeroben Bedingungen. Die Analysen der erhaltenen DNA-Verdau durch die 2 Anreicherungs-Methoden des ³²P-postlabeling Verfahrens sind in Abb. 6 gezeigt. Die Untersuchungen nach dem Standard-Verfahren der Methode (REDDY & RANDERATH 1986) ergaben die Addukt-Flecken (1,2,3,4), welche eine 50-70%ige Addukt-Wiederfindungsrate nach Butanol-Extraktion aufwiesen und deshalb geeignet waren mit den Anreicherungs-Methoden untersucht zu werden. Ohne aktivierendes System waren nach Inkubation mit 3-NBA (300µM) keine Addukt-Flecken nachweisbar. Insgesamt erzeugte 3-NBA mit den 3 aktivierenden Systemen 7 einzelne chromatographisch getrennte Addukt-Flecken. Die Gesamt-DNA-Bindung nahm in der Reihenfolge Aktivierung mit Zink > Aktivierung mit XO > Aktivierung mit S9 ab. Für die Mehrzahl der 3-NBA-DNA-Addukte lieferte die Butanol-Extraktionsmethode bessere Ausbeuten als der Nuklease P1-Verdau (Tabellen II und III). Wie die Abb. 6B, 6C und 6E, 6F zeigen, lieferten die Inkubationen mit XO und S9 identische Adduktmuster bestehend aus 3 Hauptflecken 1,2,4 und einem schwächeren Fleck 3. Aus der Abb. 6 und Tabelle II erkennt man, daß Fleck 4 nicht Nuklease P1 resistent ist.

Tabelle. II: Quantitative Analyse von 3-Nitrobenzanthron-DNA-Addukten nach Aktivierung mit Xanthin-Oxidase oder S9 (Addukte pro 10⁸ Nukleotide)

Aktivierung	Nuklease P1		Butanol-Extraktion	
	Xanthin-Oxidase	S9 mix	Xanthin-Oxidase	S9 mix
spot 1	18,8 ± 5,6	14,6 ± 7,3	33,3 ± 9,8	22,0 ± 5,1
spot 2	21,2 ± 5,0	14,0 ± 6,2	20,8 ± 4,9	14,7 ± 4,4
spot 3	13,3 ± 3,5	2,0 ± 0,9	12,1 ± 1,1	3,6 ± 1,7
spot 4	3,5 ± 0,9	0,5 ± 0,6	9,2 ± 1,8	9,4 ± 3,6
gesamt	55,1 ± 8,9	31,1 ± 13,0	75,5 ± 12,0	48,6 ± 8,0

RAL-Werte : Mittelwert +/- SD von je 3 Bestimmungen aus 2 unabhängigen Experimenten

Die Aktivierung von 3-NBA durch Reduktion mit Zink ergab die Autoradiogramme Abb. 6A und D. Hier erhält man 3 Haupt-Addukt-Flecken, die 90% der DNA-Bindung ausmachen. Sowohl die Gesamtaddukt mengen als auch die Addukt mengen der einzelnen Flecken sind wie in Tabelle II gezeigt abhängig von der Dosis. Alle 7 nach ³²P-postlabeling erhaltenen 3-NBA spezifischen DNA-Addukt-Flecken befinden sich in der Nähe der diagonalen Zone auf den Dünnschicht-Platten.

3.7 DNA-Addukt Untersuchungen in Säugerzellen

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

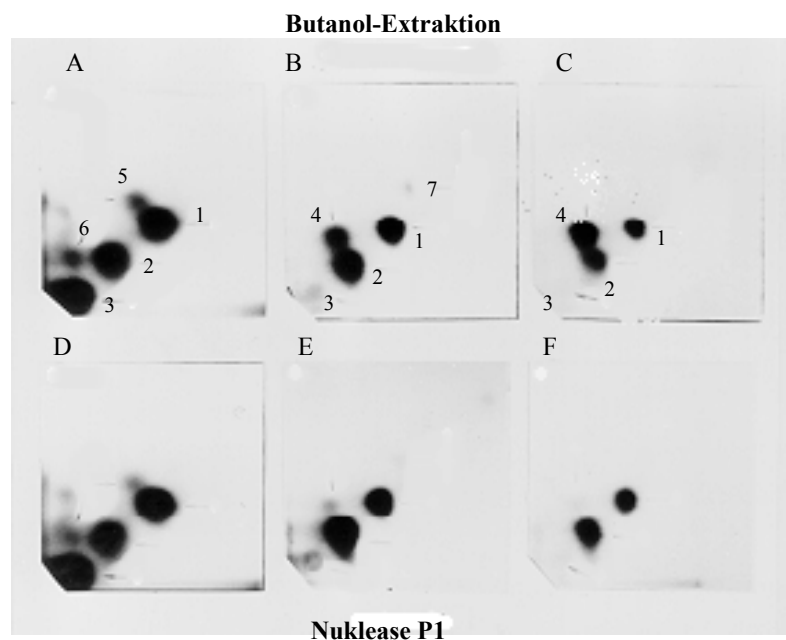
Kontrolle diente die Stamm-Zelllinie dieser beiden, V79 MZ, die sich durch eine sehr geringe metabolische Aktivität bzgl. der Cytochrome P450 auszeichnet, aber die Cytochrom-Oxidoreduktase, die im Metabolismus nitroaromatischer Verbindungen von Bedeutung ist, enthält (SCHMALIX et al. 1996).

Tabelle III: Quantitative Analyse von 3-Nitrobenzanthron-DNA-Addukten nach Aktivierung mit Zink (Addukte pro 10^8 Nukleotide)

Konzentration [μ M]	spot no.	Nuklease P1	Butanol-Extraktion
300	1	$17,2 \pm 4,7$	$24,8 \pm 18,6$
	2	$10,6 \pm 1,7$	$9,3 \pm 3,3$
	3	$30,8 \pm 8,0$	$37,3 \pm 9,6$
	5	$2,7 \pm 1,5$	$2,6 \pm 1,5$
	6	$2,4 \pm 0,8$	$4,6 \pm 1,0$
	total	$65,3 \pm 12,3$	$88,4 \pm 31,7$
150	1	$6,1 \pm 4,8$	$9,1 \pm 6,3$
	2	$5,1 \pm 2,3$	$4,4 \pm 1,3$
	3	$23,1 \pm 15,9$	$17,6 \pm 12,7$
	total	$35,3 \pm 22,0$	$31,0 \pm 20,0$
30	1	$1,4 \pm 0,7$	$1,5 \pm 1,0$
	2	$1,4 \pm 0,7$	$0,9 \pm 0,7$
	3	$1,2 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,5$
	total	$3,9 \pm 1,5$	$4,2 \pm 2,9$
3	-	n.d.	n.d.

RAL-Werte : Mittelwert \pm SD von je 3 Bestimmungen aus 2 unabhängigen Experimenten

Abb. 6:



Autoradiographien der mit 3-Nitrobenzanthron erhaltenen DNA-Addukte aus *in vitro* Inkubationen mit Kalbsthymus-DNA unter verschiedenen Aktivierungsbedingungen. A, D Aktivierung mit Zink; B, E Aktivierung mit Xanthin-Oxidase (anaerob); C, F Aktivierung mit S9 (aerob)

3.7.1 Gesamtextrakt von Luftstaub aus Freiburg

Die 3 Zelllinien wurden mit Gesamtextrakt des Luftstaubs aus Freiburg-Mitte vom Feb. 96 (100µg EOM \cong 20 m³ Luft) behandelt. Als Positiv-Kontrolle diente 1 µM B(a)P und als Negativ-Kontrolle der Extrakt von unbehandelten Glasfaser-Filtern. Wie zu erwarten ergab die ³²P-postlabeling Analyse der Inkubationen von B(a)P mit den Zelllinien (V79 h1A1 und h1A2) einen Adduktblock, der dem Hauptaddukt, B(a)P-N²-dG, zuzuordnen ist (s. Abb. 7D).

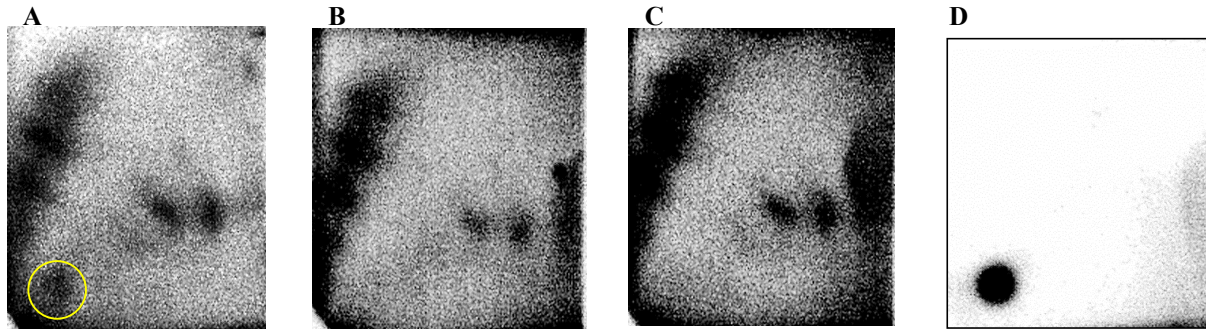


Abb. 7: Autoradiographien der ³²P-postlabeling Analysen von Inkubationen mit Gesamtextrakt Freiburg 2/96 (100 µg EOM) in den 3 Zelllinien. **A** V79MZh1A1, **B** V79MZh1A2, **C** V79MZ und **D** V79MZh1A1 mit 1 µM B(a)P (Positiv-Kontrolle)

Allerdings war die gebildete Menge in V79 h1A1 (RAL 1/10⁶) um das 100fache höher als in V79 h1A2. Dies ist nicht verwunderlich, da CYP 1A1 das Cytochrom-Isoenzym ist, welches bevorzugt PAKs metabolisiert. V79 MZ-Zellen, die keine nennenswerte Cytochrom P450-Aktivität besitzen, zeigten keine Adduktblocken. Auch der Gesamtextrakt erzeugte in V79 h1A1 einen zum B(a)P-Adduktblock (Abb. 7A) chromatographisch identischen Adduktblock (RAL 1/10⁹), während V79 h1A2 ebenso wie V79 MZ eine sehr schwache DRZ aufwies. Unbehandelte Glasfaser-Filter-Extrakte ergaben in keiner der Zelllinien Adduktblocken. Aufgrund der bevorzugten metabolischen Aktivierung von PAKs durch die Zelllinie V79 h1A1 überrascht es nicht, daß in unseren DNA-Addukt-Analysen mit Gesamtexttrakten ein PAK-DNA-Addukt erscheint.

3.7.2 Einzelne Fraktionen von Luftstaub aus Freiburg

10 min-Fraktionen des Luftstaubs aus Freiburg wurden gesammelt und die Rückstände der Fraktionen gelöst in DMSO mit den verschiedenen Zelllinien inkubiert.

Auch hier zeigte die erste Fraktion (bis 10 min) in der Zelllinie V79 h1A1 deutlich das Hauptaddukt des B(a)P im Bereich von 1 Addukt pro 10⁸ Nukleotide innerhalb der DRZ. Mit V79 h1A2-Zellen ergab sich das gleiche Bild, allerdings wesentlich diffuser, so daß das Addukt des B(a)P nicht mehr zu quantifizieren war. Die Linie V79 MZ wies lediglich eine sehr schwache DRZ und kein B(a)P-Addukt mehr auf. Die Inkubationen mit der Fraktion 2 (10-20 min) zeigten mit allen drei Zelllinien eine diagonale radioaktive Zone, die bei der CYP 1A2 exprimierenden Zelllinie am stärksten ausgeprägt war, bei CYP h1A1 etwas schwächer und bei V79 MZ nur noch minimal zu erkennen war. Dieses bietet einen Hinweis auf das Vorhandensein aromatischer Amine in dieser Fraktion. In der dritten Fraktion, der im Ames-Test mutagensten, war innerhalb einer diffusen DRZ ein einzelner Adduktblock in allen drei Zelllinien sichtbar (RAL: V79 h1A1 6/10⁹ Nukleotide, V79 h1A2 5/10⁹ und MZ 7/10⁹). Das Auftreten dieses Addukts in allen 3 Zelltypen weist auf eine von der CYP 1-Familie unabhängige Aktivierung hin. Mit der vierten Fraktion schließlich konnten in allen 3 Zelllinien

nur sehr schwache, diffuse Adduktflecken gefunden werden mit Ausnahme eines Adduktflecks in V79 MZ-Zellen (RAL: $9/10^9$).

4. Diskussion

Die ^{32}P -postlabeling Methode hat sich für den Nachweis von Expositionen gegenüber komplexen Gemischen von Umweltschadstoffen bewährt (BEACH & GUPTA 1992). Der wesentliche Vorteil dieser Methode liegt hierbei darin, daß die einzelnen Komponenten des komplexen Gemisches nicht bekannt sein müssen und dennoch das Ausmaß ihrer Bindung an die DNA bestimmt werden kann. Die Charakterisierung der chemischen Natur der zahlreichen DNA-Addukte, die durch Luftschadstoffe gebildet werden können, gestaltet sich allerdings durch ^{32}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. 1988) erreichen.

In diesem Projekt versuchen wir dieses diagnostische Potential auszunutzen, um die Anwesenheit von Nitroaromaten nachzuweisen. Als Positiv-Kontrolle haben wir DNA verwendet, die mit 1-Nitropyren und Zink umgesetzt wurde und konnten nach Anreicherung durch Nuclease P1-Verdau das entstandene Hauptaddukt nur noch in 1%iger Ausbeute bezogen auf die Anreicherung mit Butanol-Extraktion detektieren.

Da die Luftstaubextrakte im Ames-Test positiv sind, wurde zuerst versucht unter analogen Bedingungen DNA-Addukte in der Bakterien-DNA nachzuweisen. Dies gelang nicht, bedingt durch erstens die niedrigere Konzentration an EOM in den Ansätzen mit Bakterien (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in Inkubationen mit Salmonellen; 167 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in Inkubationen mit Kalbsthymus-DNA), und zweitens durch die erschwerte Aufnahme der genotoxischen Verbindungen durch die Membran in die Bakterienzelle sowie zusätzliche Proteinadduktierung.

Unsere Ergebnisse zeigen zum ersten Mal, daß Luftstaubextrakte *in vitro* DNA-Addukte bilden. Dies steht im Einklang mit ihrem bekannten genotoxischen Eigenschaften. Alle ^{32}P -postlabeling Analysen mit Luftstaubextrakten enthielten eine DRZ, wie sie für komplexe Schadstoffgemische aus Zigarettenrauch-Kondensat (RANDERATH et al. 1992), Dieselruß (GALLAGHER et al. 1988) oder Luftstaubextrakten aus Eisenhütten (SAVELA et al. 1996) bekannt sind.

Auch die RAL-Werte für die berichteten *in vitro* Experimente liegen je nach eingesetzter EOM-Konzentration in dem von uns gefundenen Bereich zwischen 1 Addukt in 10^7 - 10^8 Nukleotiden. Andere komplexe Gemische wie Zigarettenkondensat und Holzschutzmittel-Abfall (RANDERATH et al. 1992) benötigen ebenso wie Luftstaubextrakte keine metabolische Aktivierung um DNA-Addukte zu bilden. Dies steht im Widerspruch zu Ergebnissen die GALLAGHER et al. mit Dieselruß erhalten hatten (GALLAGHER et al. 1988).

Inkubationen ohne Aktivierungssystem mit steigenden Konzentrationen an Gesamtextrakt eines Luftstaubs aus Freiburg ergaben eine lineare Zunahme an DNA-reaktiven Produkten im untersuchten Konzentrationsbereich. Nach Säure/Base-Eigenschaften fraktionierter SRM 1648, der mit gleichen Massenanteilen EOM mit verschiedenen Aktivierungssystemen, oxidativ mit S9-Mix, reduktiv mit Zink oder ohne Aktivierung inkubiert wurde, zeigte jeweils DRZs, jedoch keine signifikanten Unterschiede in den Adduktierungsraten. Dies steht im Einklang mit den Resultaten des Ames-Tests, in welchem die Zugabe von S9-Mix keinen

deutlichen Einfluß auf die Mutationsrate dieses Luftstaubextraktes ausübte (ERDINGER et al. 1997). Lediglich qualitative Unterschiede in den DRZs waren feststellbar. Jedoch ergeben diese Fraktionen im Ames-Test deutlich verschiedene Revertanzahlen, so enthält beispielsweise die stark saure Fraktion (SA) etwa 60 % des mutagenen Potentials, während die basische nur mit 4 % zur Mutagenität beiträgt. Dies deutet darauf hin, daß nicht das Ausmaß an DNA-Adduktierung, sondern das genotoxische Agens per se, für die bakterielle Mutagenität entscheidend ist. Eine ähnliche Tendenz deutet sich auch in den analogen Experimenten mit Extrakt aus Freiburg, die hier nicht weiter beschrieben sind, an.

Trennt man den Extrakt der Freiburger Luftstaubprobe über HPLC in 9 Fraktionen auf, so zeigt die Fraktion 3, die dem Intervall von 30 bis 40 min entspricht, die höchste direkte mutagene Aktivität im Salmonella-Stamm TA 98. Auch die polaren Fraktionen 4 bis 9 sind mutagener als die unpolare Fraktion 1, die die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe enthält und deshalb oxidativ aktiviert werden müßte. Allerdings ergibt der Zusatz von S9-Mix keine signifikante Erhöhung der Mutagenität (ERDINGER et al. 1997). Untersuchungen mit Nitroreduktase-defizienten Stämmen haben gezeigt, daß nur ein geringer Teil der bakteriellen Mutagenität des Freiburger Luftstaubs auf Nitro-PAK's zurückzuführen ist (ERDINGER et al. 1997). Diese Nitroaromaten, die bevorzugt in den Fraktionen 2 u. 3 eluieren, sind daher nicht die Träger der in Abb. 5B gezeigten Mutagenität. Bemerkenswert ist das Auftreten einer relativ ähnlichen DRZ nach ³²P-postabeling Analyse für alle HPLC-Fraktionen ohne metabolische Aktivierung. Warum selbst nach vorheriger chromatographischer Trennung das DNA-Addukt-Fleckenmuster in Form einer DRZ im wesentlichen gleich bleibt, ist bisher nicht zu erklären, spricht aber für die Komplexität der Gemische. Nach reduktiver Aktivierung ergaben die ersten 3 Fraktionen, welche Nitroaromaten enthalten, die höchsten Adduktierungswerte. Die erhaltenen DNA-Addukt-Fleckenmuster sind besonders für die Fraktionen 1, 2, 3 und 9 spezifisch und enthalten auch einzelne diskrete Addukt-Flecken. Diese spezifischen Addukt-Muster können für ein späteres Biomonitoring zur Erfassung der Exposition gegenüber genotoxischen Luftstaubbestandteilen verwendet werden.

In den Fraktionen 1 und 2 eluieren, wie von uns durch Untersuchung von Standard-Verbindungen gezeigt, die klassischen PAKs, wie Benzo(a)pyren, Fluoranthren, Chrysen etc., als auch die Nitro-PAKs (1-Nitropyren, 6-Nitrochrysen, 3- und 9-Nitrophenanthren). Der Gesamtgehalt der mit HPLC fraktionierten Probe an PAKs lag bei 50 µg (in 25 mg EOM), davon 2 µg B(a)P. Nitro-PAKs waren nicht zu detektieren, ihr Gehalt lag unterhalb der Nachweisgrenze von 2ng/m³ Luft. Unsere DNA-Adduktierungswerte sprechen dafür, daß in der Fraktion 1 PAKs enthalten sind, welche durch S9 oxidativ aktiviert werden, als auch für das Vorhandensein von nitroaromatischen Verbindungen, die reduktiv zu DNA-bindenden Spezies führen. Dies bedeutet, daß die DNA-Addukt Analysen besser mit den PAK und Nitro-PAK- Gehalten der Extrakte korrelieren als die Mutagenitäts-Analysen.

Die Analysen der 2 min-Fraktionen des Extraktes aus Freiburg 2/96 zeigen, daß eine Feinfraktionierung des Luftstaubextraktes grundsätzlich auch zu spezifischeren DNA-Addukt-Mustern in der ³²P-postlabeling Analyse führt. Allerdings sind die Substanzmengen, die nach Fraktionierung von 20 mg EOM in den meisten 2-Minuten Fraktionen enthalten sind, anscheinend zu gering um über ihre DNA-Reaktivität detektiert werden zu können.

Unsere *in vitro* Inkubationen von Kalbsthymus-DNA mit 3-Nitrobenzanthron zeigten unter verschiedenen Aktivierungsbedingungen ein spezifisches Muster von insgesamt 7 verschiedenen DNA-Addukten. Von diesen war eines (bezeichnet als spot 4) deutlich besser mit Butanol als mit Nuklease P1 anzureichern. Diese Nuklease P1 Empfindlichkeit deutet auf ein N-substituiertes Aryl-Addukt, welches über C-8 des Guanins gebunden ist, hin (GUPTA

1985). Da alle Addukte nach Rattenleber S9-Aktivierung chromatographisch identisch mit den XO aktivierten Addukten waren, schließen wir, daß der Hauptaktivierungsweg für 3-NBA reduktiv verläuft, vermutlich über Nitroreduktion und nicht über Ringoxidation wie für 1-Nitropyren *in vivo* oder *in vitro* unter aeroben Bedingungen (EL-BAYOUMI & HECHT 1983). Alle von uns detektierten Addukte des 3-NBA 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. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß im Vergleich zu ähnlichen *in vitro* Untersuchungen mit anderen Nitroaromaten (SCHMEISER et al. 1997, GALLAGHER et al. 1991), das Ausmaß der DNA-Adduktbildung durch 3-NBA eher gering ist. Dies bedeutet, daß sich die extreme mutagene Aktivität dieser Verbindung im Ames Test nicht mit der *in vitro* DNA-Reaktivität erklären läßt. Allerdings können wir eine höhere DNA-Reaktivität in den Salmonellen nicht ausschließen. Da mit einer Konzentration von 3 µM 3-NBA nach Zink-Aktivierung mit der ³²P-postlabeling Methode keine Addukte nachzuweisen waren, ist es unwahrscheinlich 3-NBA-Addukt Flecken in analogen *in vitro* Analysen von Luftstaubextrakten zu finden. Die mit 3-NBA erhaltenen Ergebnisse sind vor dem Hintergrund, dass diese Verbindung ein extremes Mutagen und damit potentiell Carcinogen ist, sowie aufgrund seiner besonderen Umweltrelevanz von großer Bedeutung.

Die Mutagenität dieser Verbindung ist im Ames-Test im Stamm TA 98 direkt vergleichbar mit 1,8-Dinitropyren, dem bis dato stärksten bekannten bakteriellen Mutagen (im Stamm YG 1024 ist seine Mutagenität sogar 1,3fach höher als die von Dinitropyren). Quantitative Analysen zeigten das Vorhandensein von 3-Nitrobenzanthron in Konzentrationen zwischen 0,6 und 6,6 µg pro Gramm Dieselruß, dieser Konzentrationsbereich entspricht ebenfalls in etwa dem des 1,8-Dinitropyrens, welches in Mengen von 0,3-5,2 µg/g gefunden wird. Auch Staub-Partikel, die mittels Glasfaserfiltern in Tokio aus der Luft gesammelt wurden, enthielten diese Verbindung im Konzentrationsbereich von 5,2-11,5 pg/m³. Bemerkenswert vor diesem Hintergrund ist auch, dass die Konzentration von 3-Nitrobenzanthron proportional mit der Motorbelastung ansteigt, ein Punkt, der im Hinblick auf regulatorische Maßnahmen nahelegt, die Beladung von Dieselfahrzeugen und damit deren Motorbelastung bzw. den Rußausstoß möglichst gering zu halten.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis, welches die Umweltrelevanz belegt, ist die durch die japanische Arbeitsgruppe nachgewiesene Bildung von 3-Nitrobenzanthron und seinen Strukturisomeren in der Atmosphäre. Der zugrundeliegende polyzyklische Kohlenwasserstoff Benzanthron, einer der häufigsten, aber relativ unbeachteten partikelgebundenen PAKs in der Umwelt (Konzentration vergleichbar mit Pyren oder Fluoranthen), reagiert dabei mit Ozon und Stickoxiden (NO₂) zu den verschiedenen Nitrobenzanthronen, jedoch wird zu 80-90% das 3-Isomere gebildet. Die Bildung von 3-Nitrobenzanthron konnte hier in Lösung sowie in der Festphase nachgewiesen werden. So wurde beispielsweise Benzanthron, um die Oberfläche von Staubteilchen zu simulieren, an Teflonfilter adsorbiert und mit Ozon und NO₂ begast, auch metall-katalytische Einflüsse wurden anhand von Eisenpartikeln untersucht, hier zeigte sich sogar eine erleichterte Bildung der Substanz. Zusammengenommen läßt sich die Bedeutung dieses extremen Mutagens, dessen Bildung von DNA-Addukten und die damit mögliche Ursache seiner Mutagenität/Carcinogenität wir untersucht haben, vielleicht durch ein Zitat belegen. So betitelte im Oktober 1997 das englische Wissenschaftsmagazin „New

Scientist“ einen Artikel über das unmittelbar zuvor entdeckte 3-Nitrobenzanthron: „Devil in the diesel-Lorries belch out what may be the most carcinogenic chemical ever discovered“.

Gegen Ende des Projektes haben wir von reinen *in vitro*-Inkubationen mit Kalbsthymus-DNA und einfacher chem. oder enzymatischer Aktivierung auf Inkubationen in Zellkultur übergewechselt, ein Schritt, der unsere Experimente mehr in Richtung *in vivo* gebracht hat. Verwendet wurden hier Säugerzell-Linien (V79 chin. Hamster-Lungenzellen) mit definierter metabolischer Aktivität, die u.a. die Expression humaner Cytochrome P450, den hauptverantwortlichen Enzymen im Phase I-Fremdstoffmetabolismus, beinhaltet. Im Gegensatz zu unseren *in vitro* Experimenten lassen sich in der DNA dieser transformierten Zellen, die ähnlich einem intakten Organismus in der Lage sind, Fremdstoffe zu aktivieren, spezifische Addukte oder Adduktmuster von Substanzen, die erwiesenermaßen für Menschen schädlich sind, nachweisen. Dies gilt, wie von uns hier gezeigt, insbesondere für polyzyklische Kohlenwasserstoffe wie B(a)P.

Gerade im Hinblick auf weitere derartige Untersuchungen, sollten Experimente in Zellkultur intensiviert werden. Hierzu stehen weitere Säugerzell-Linien zur Verfügung, die ebenfalls der V79-Linie entstammen, aber eine native Aktivität an Nitroreduktase und N-Acetyltransferase, wichtigen Enzymen im Metabolismus von Nitroaromaten und aromatischen Aminen, kombiniert mit humanem CYP 1A2, besitzen. Diese Zell-Linien sollten geeignet sein, den humanen Metabolismus zu simulieren, um so insbesondere auch 3-Nitrobenzanthron weiter zu untersuchen.

5. Literatur

- ATKINSON, R. & AREY, J. (1994): Atmospheric chemistry of gas-phase polycyclic hydrocarbons: formation of atmospheric mutagens. *Environ. Health Perspect.* **102** Supplement 4, 117-125.
- EL-BAYOUMI, K. AND HECHT, S.S. (1983): Identification and mutagenicity of metabolites of 1-nitropyrene formed by rat liver. *Cancer Res.*, **43**, 3132-3137.
- BEACH, A.C. & GUPTA, R.C. (1992): Human biomonitoring and the ³²P-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.
- 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.
- ERDINGER, L., HÖPKER, K.-A., DÖRR, I., FRIED, M., DÜRR, M. (1997): Genotoxische organische Verbindungen in der Außenluft. Veröff. PAÖ, Band 25.
- FINLAYSON-PITTS, B.J. & PITTS, J.N. jr. (1997): Tropospheric air pollution: ozone, airborne toxics, polycyclic aromatic hydrocarbons, and particles. *Science* **276**, 1045-1052.
- GALLAGHER, J.E., KOHAN, M.J., GEORGE, M.H. AND LEWTAS, J. (1991): Improvement of the diagnostic potential of ³²P-postlabeling analysis demonstrated by the selective formation and comparative analysis of nitrated-PAH-derived adducts arising from diesel particle extracts. *Carcinogenesis*, **12**, 1685-1691.
- GUNDEL, L. A., DAISEY, J. M., DE CARVALHO, L. R. F., KADO, N. Y., SCHUETZLE, D. (1993): Polar organic matter in airborne particles: Chemical characterization and mutagenic activity. *Environ. Sci. Technol.* **27**, 2112-2119.
- GUPTA, R.C (1985): Enhanced sensitivity ³²P-postlabelling analysis of aromatic carcinogen-DNA adducts. *Cancer Res.*, **35**, 5656-5662.
- GUPTA, R.C. AND EARLEY, K. (1988) ³²P-adduct assay: comparative recoveries of structurally diverse DNA adducts in the various enhancement procedures. *Carcinogenesis* **9**, 1687-1693.
- HANNIGAN M. P.; CASS G. R.; PENMAN B. W.; CRESPI C. L.; LAFLEUR A. L.; BUSBY W. F.; THILLY W.G. (1997): Human cell mutagens in Los Angeles air. *Environ. Sci. Technol.* **31** (2), 438-447.
- 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.
- MALFATTI, M.A., SHEN, N.H., WU, R.W., TURTELTAUB, K.W. AND FELTON, J.S. (1995): A correlation of Salmonella mutagenicity with DNA adducts induced by the cooked-food mutagen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Mutagenesis* **10**, 425-431.
- NARDINI, B. & CLONFERO, E. (1992): Mutagens in urban air particulate. *Mutagenesis* **7**, 421-425.
- RANDERATH, E., DANNA, T.F. AND RANDERATH, K. (1992): DNA damage induced by cigarette smoking condensate *in vitro* as assayed by ³²P-postlabeling. Comparison with cigarette smoke-associated DNA adduct profiles *in vivo*. *Mut. Res.* **268**, 139-153.
- RANDERATH, K., ZHOU, G.D., DONNELLY, K.C., SAFE, S.H. AND RANDERATH, E. (1994): DNA damage induced by wood preserving waste extracts *in vitro* without metabolic activation, as assayed by ³²P-postlabeling. *Cancer Lett.* **83**, 123-128.
- REDDY, M.V. AND RANDERATH, K. (1986): Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of ³²P-postlabeling test for structurally diverse DNA adducts. *Carcinogenesis* **7**, 1543-1551.
- REDDY, M.V.; BLEICHER, W.T.; BLACKBURN, G.R. & MACKERER, C.R (1990): DNA adduction by phenol, hydroquinone or benzoquinone *in vitro* but not *in vivo*: nuclease P1-enhancement ³²P-postlabeling of adducts as labeled nucleoside bisphosphate dinucleotides and nucleoside monophosphates. *Carcinogenesis* **11**, 1349-1357.
- 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., MASER, 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.
- SCHMEISER, H.H., FREI, E., WIESSLER, M. AND STIBOROVA, M. (1997): Comparison of DNA adduct formation by aristolochic acids in various *in vitro* systems by ³²P-postlabeling: evidence for reductive activation by peroxidases. *Carcinogenesis* **18**, 1055-1062.
- SCHMEISER, H.H., BIELER, C.A., WIEBLER, M., FRIED, M., ERDINGER, L. (1998): Identifizierung spezifischer DNA-Adduktmuster durch organische Verbindungen in der Außenluft: Biomarker für Luftschadstoffe. <http://bwplus.fzk.de/pug/disk98/wiessler>.
- WÖLFEL, C., HEINRICH-HIRSCH, B., SCHULZ-SCHALGE, T., SEIDEL, A., FRANK, H., RAMP, U., WÄCHTER, F., WIEBEL, F.J., GONZALEZ, F., GREIM, H. AND DOEHMER, J. (1992): Genetically engineered V79 Chinese hamster cells for stable expression of human cytochrome P450 1A2. *Eur. J. Pharm.-Environ. Toxicology Section* **228**, 95-102.