

Institut für Hygiene und Arbeitsmedizin
Universitätsklinikum Essen

***Zelluläre Aufnahme, subzelluläre
Verteilung und Toxizität von
Arsenverbindungen in methylierenden
und nicht-methylierenden Zellen***

PD Dr. Elke Dopp

Institut für Hygiene und Arbeitsmedizin Universitätsklinikum Essen Universität Duisburg-Essen

Bereiche des Instituts:

- ***Belastungs- und Effect- Monitoring***
- ***Medizinische Leistungen in den Bereichen Arbeitsmedizin, Hygiene und Umweltmedizin***
- ***In vitro- und Molekulare Toxikologie***

www.uni-due.de/arbeitsmedizin

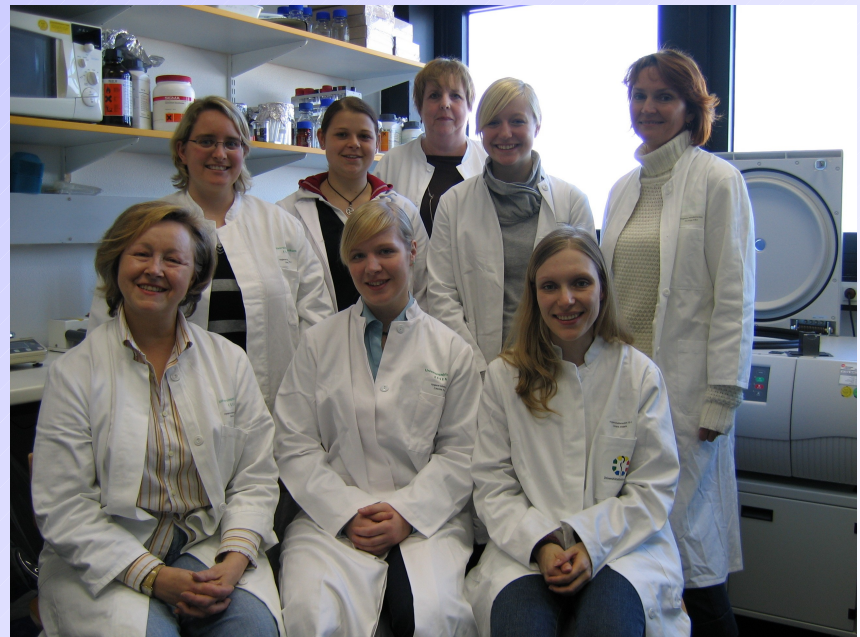


Arbeitsschwerpunkt

➤ Untersuchung des Schädigungsprofils und der Wirkmechanismen umweltrelevanter und arbeitsplatzbezogener Noxen, Einstufung von Arbeits- und Umweltstoffen entsprechend ihres Gefährdungspotenzials für die menschliche Gesundheit

Projekte

- Toxizität metall(oid)organischer Verbindungen
- Zelluläre Effekte von Partikeln und Fasern
- Umweltöstrogene
- „Water related pollutants“
- „Food contaminants“
- Additive Effekte



Toxikologische Endpunkte:



Gentoxizität (direkt)

- Mikrokerntest
- Chromosomenaberrationen
- Comet Assay
- oxidative DNA-Schädigung (8-OHdG)
- Apoptose

Gentoxizität (indirekt)

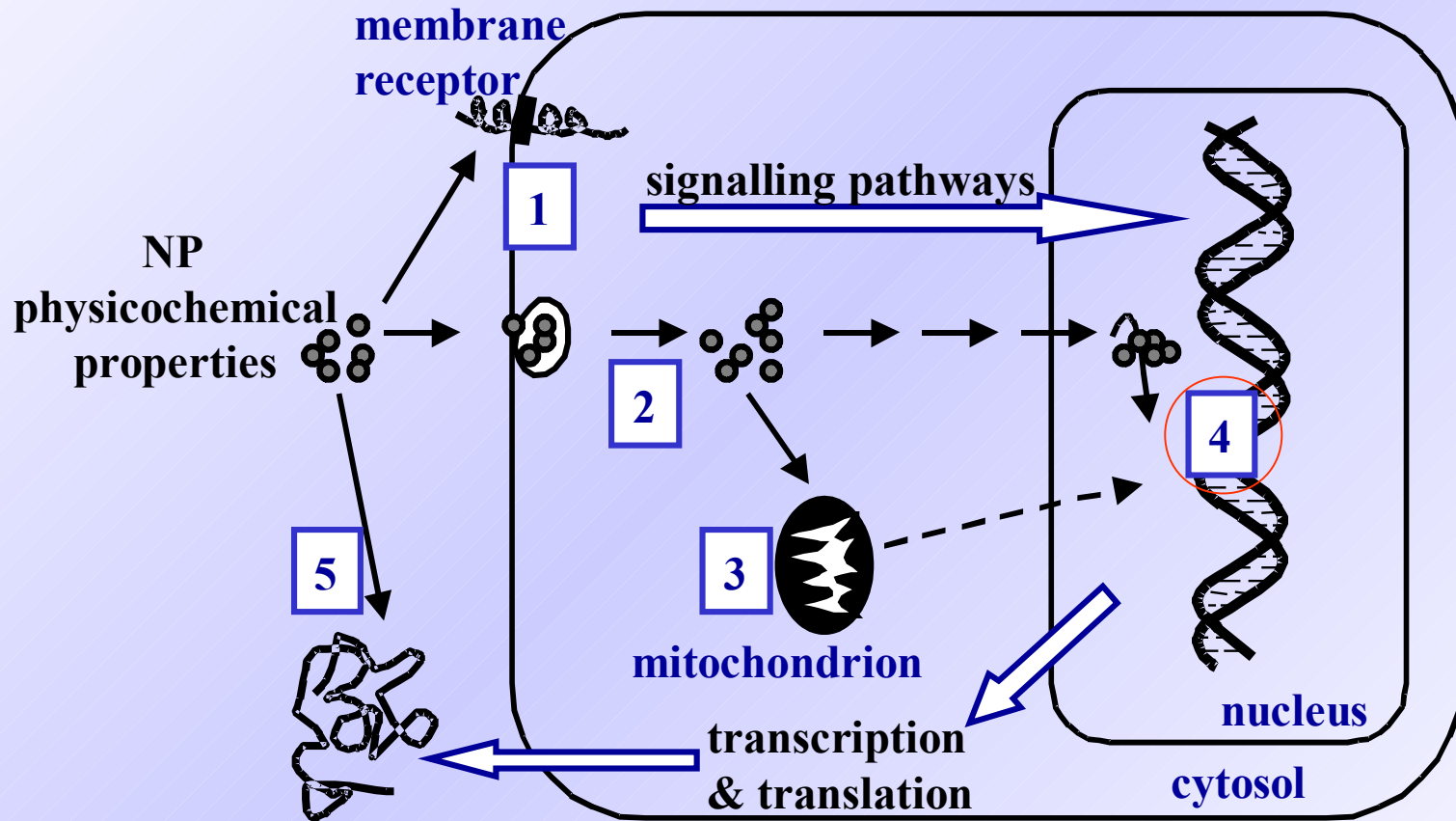
- Bildung freier Radikale



Cytotoxizität

Änderungen des intrazellulären Calciumspiegels

Interactions of Xenobiotics with Cellular Components



1. Interaction with cell membranes
3. Interaction with mitochondria
5. Interaction with cell product

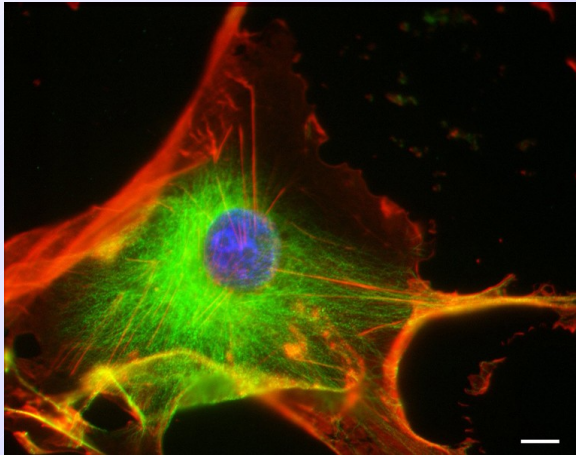
2. Uptake/translocation
4. Interaction with nucleus

1.

Toxikologische Testsysteme

- **Cytotoxizität:**

MTT-Test (Aktivität der Mitochondrien)



basiert auf der Umwandlung von Tetrazoliumsalzen durch Oxidoreduktasen innerhalb der Mitochondrien und der Peroxisomen in ein unlösliches blaues Produkt, das photometrisch bestimmt und quantifiziert werden kann.

Alternativ: **Trypan-blau** (Membranpermeabilität)

LDH (Laktat-Dehydrogenase)-Test

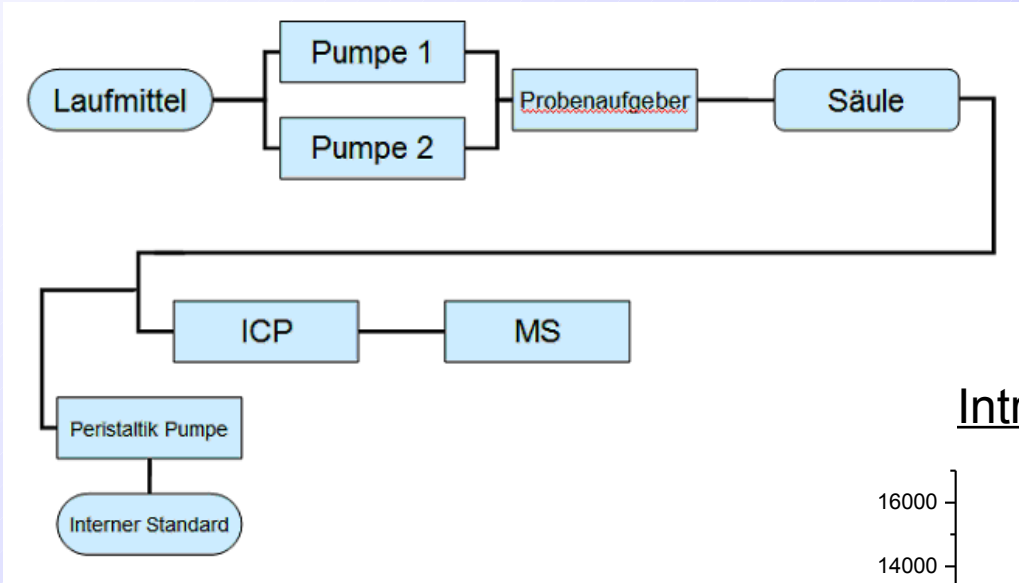
basiert auf der Enzymaktivität von LDH im Zytoplasma, das aus geschädigten Zellen freigesetzt wird und photometrisch gemessen werden kann

⇒ Grundlage aller toxikologischen Untersuchungen, um nicht-toxische Konzentrationsbereiche zu ermitteln

2.

Zelluläre Aufnahme

HPLC-ICP/MS

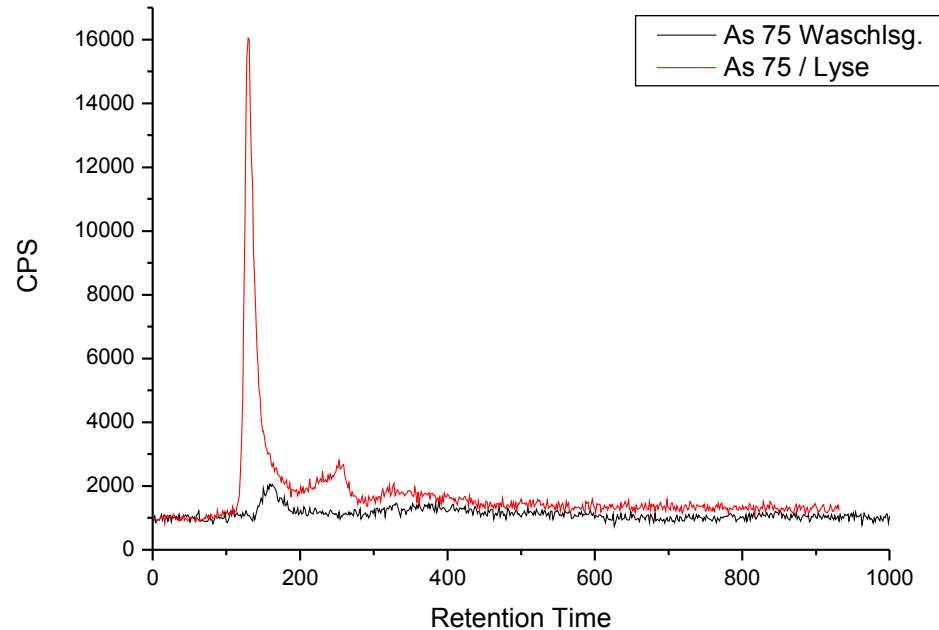


Kooperation mit der Analytischen Chemie

- Prof. A. V. Hirner
- J. Hippler

(Tel.: 0201 1833295)

Intrazelluläre Speziesbestimmung



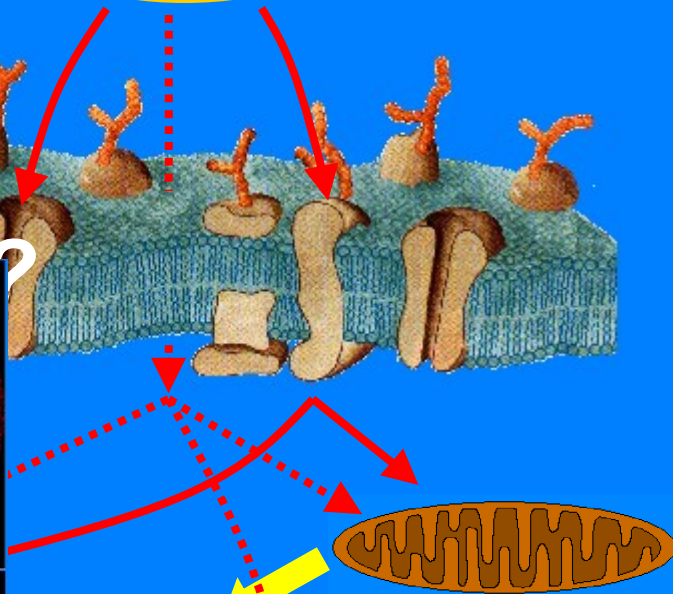
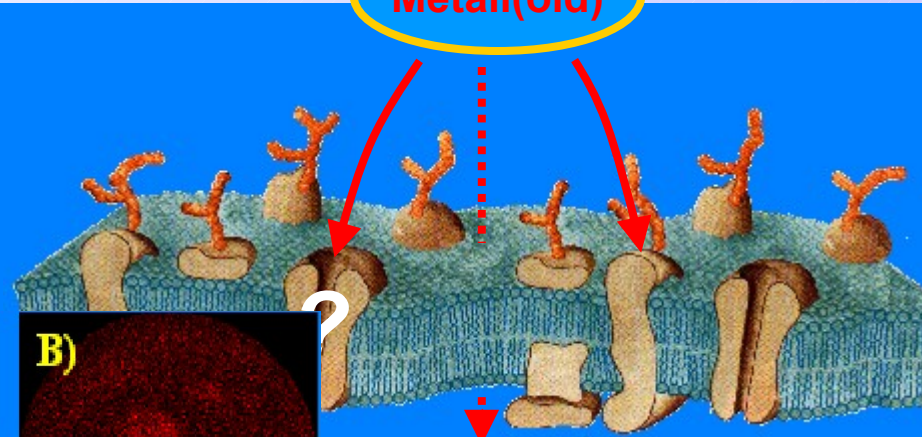
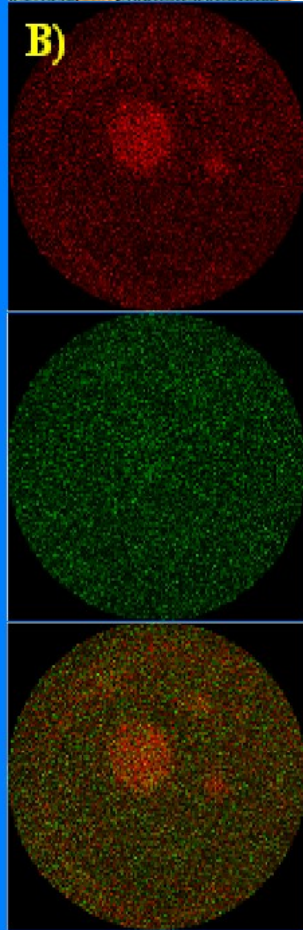
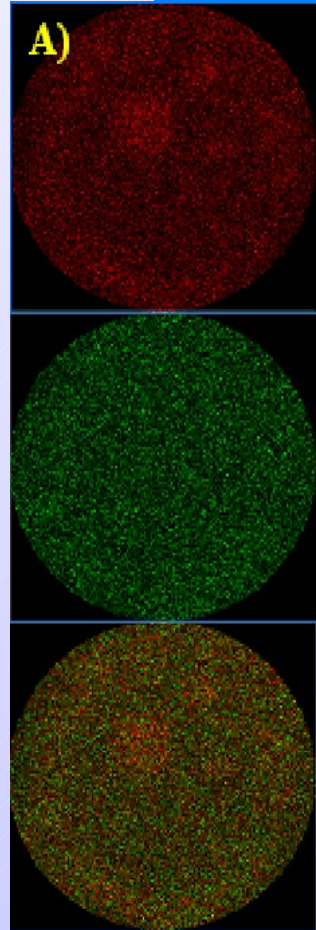
HPLC-Parameter	Ausführung/Parameter
Trennsäule	Prodegy ODS 3 4,6 mm x 150 mm x 3µm
Flussgeschwindigkeit	1 ml/min
pH-Wert	pH 5,95
Konzentration TBAH	4,7 mM
Malonsäure	2 mM
Methanolgehalt	5 %
Säulentemperatur	30 °C

3.

Interaktion mit

Zellorganellen

Metall(oid)



Ca²⁺

Signaltransduktion

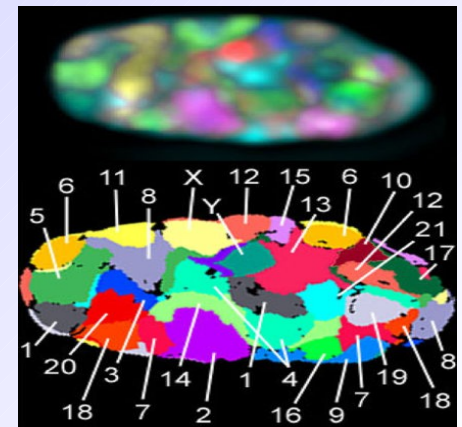
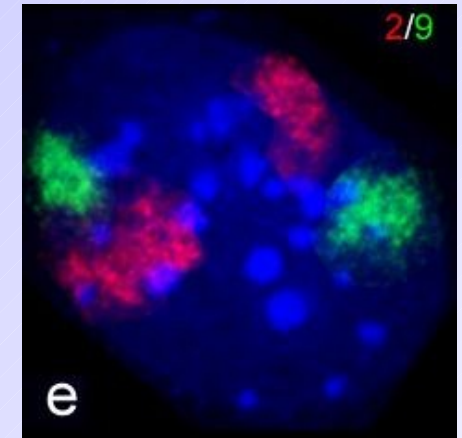
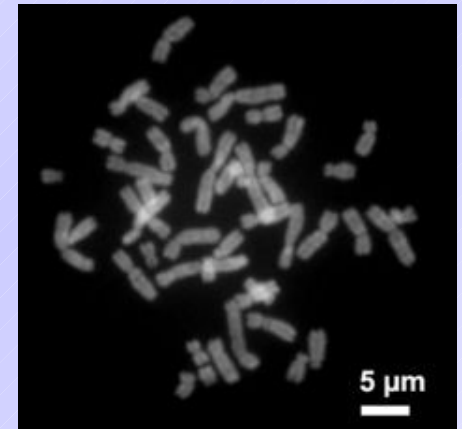
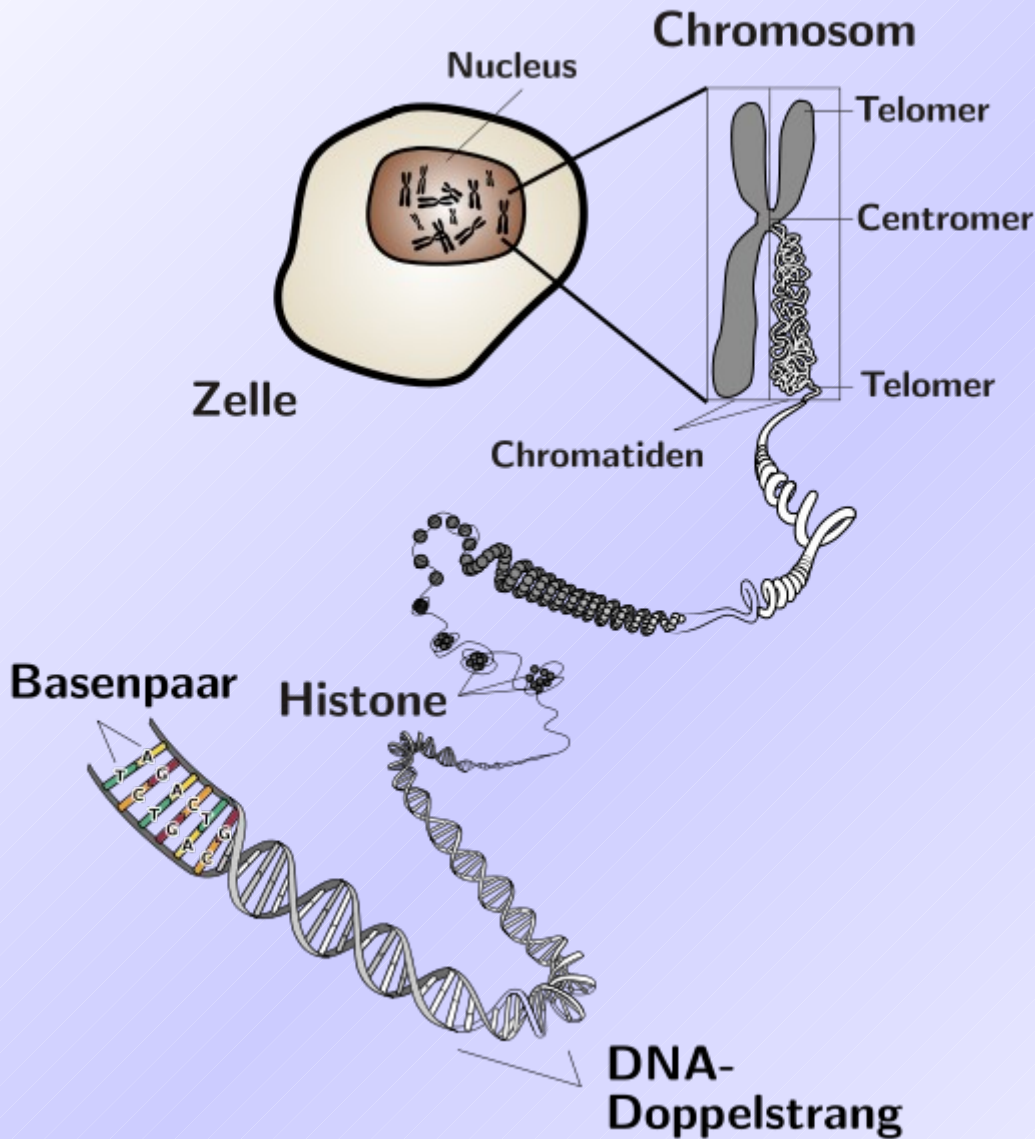
Genexpression

Apoptose



4.

Interaktion mit dem Zellkern



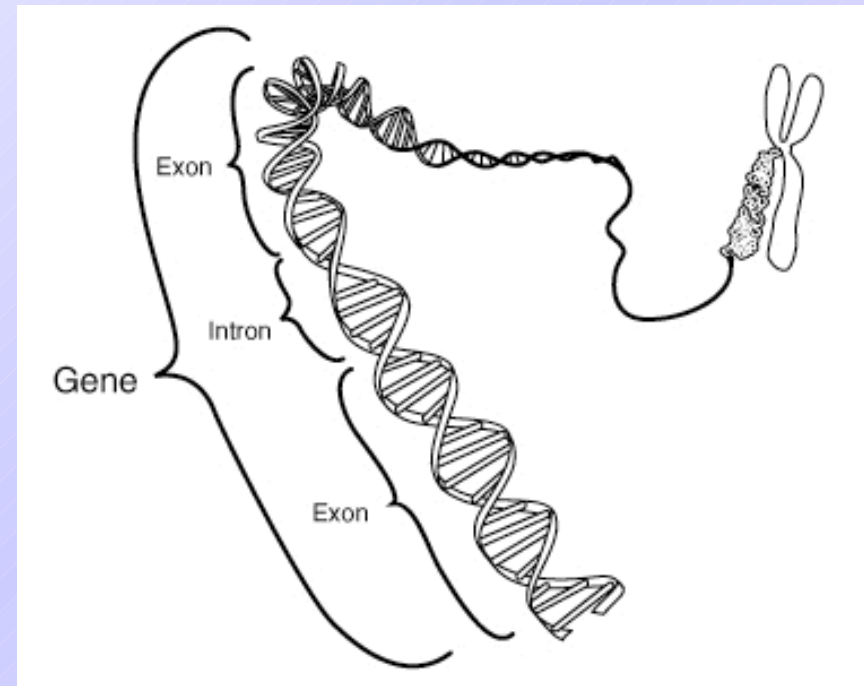
Gene / Sequenz

Gen = Abschnitt auf der DNA

- wird in RNA umgeschrieben
(Transkription)

Gen hat 2 Bereiche:

- 1.) kopierter DNA-Abschnitt (mRNA)
- 2.) zusätzliche DNA-Abschnitte, die an der Regulation des Kopiervorgangs beteiligt sind

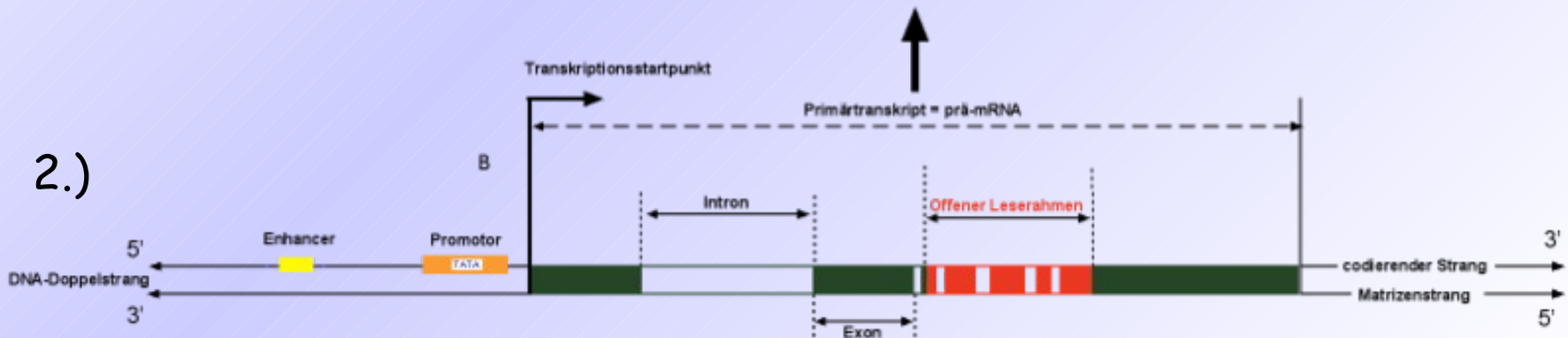


1.)

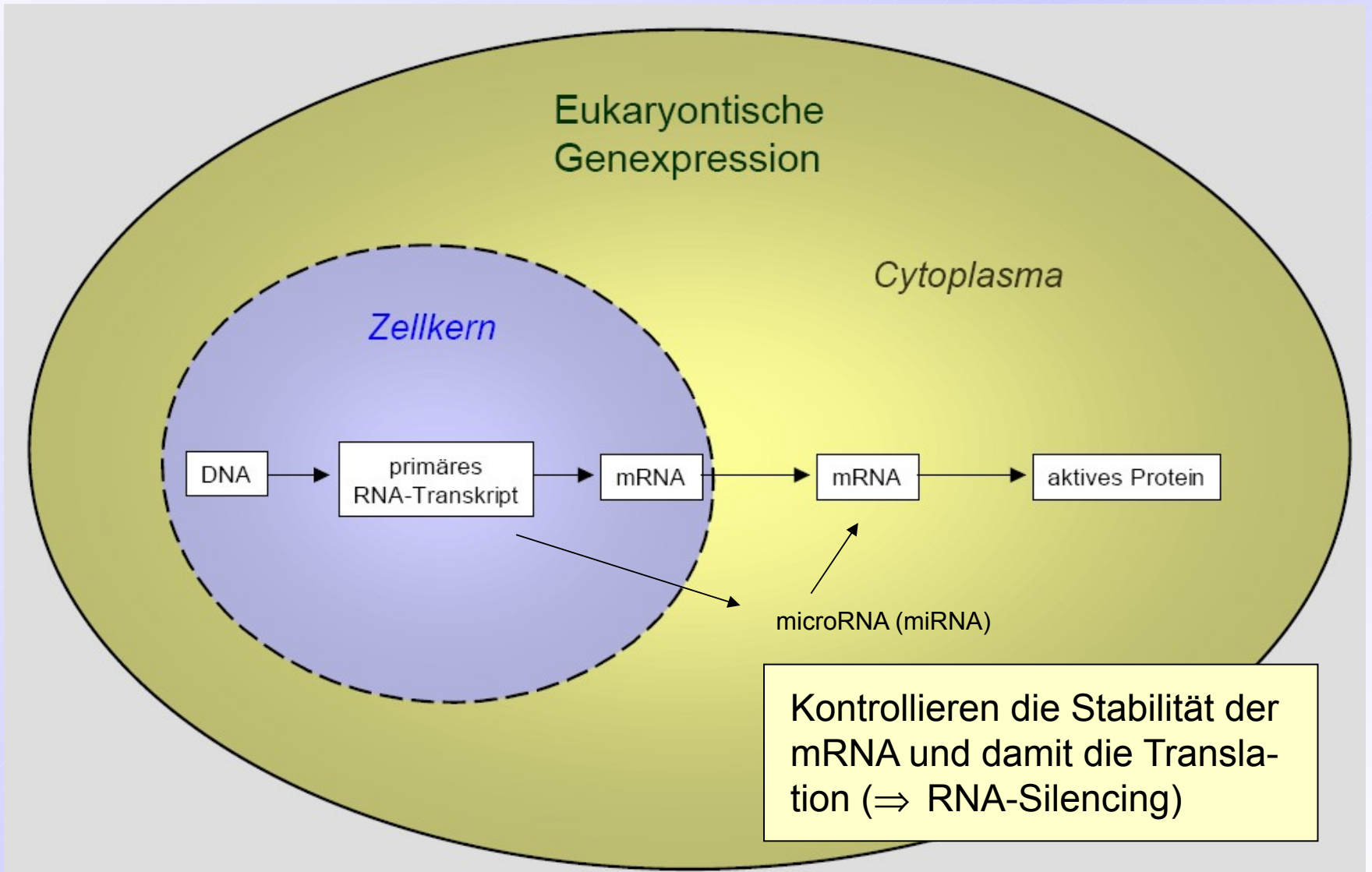
Transkript = mRNA
(Einzelstrang)



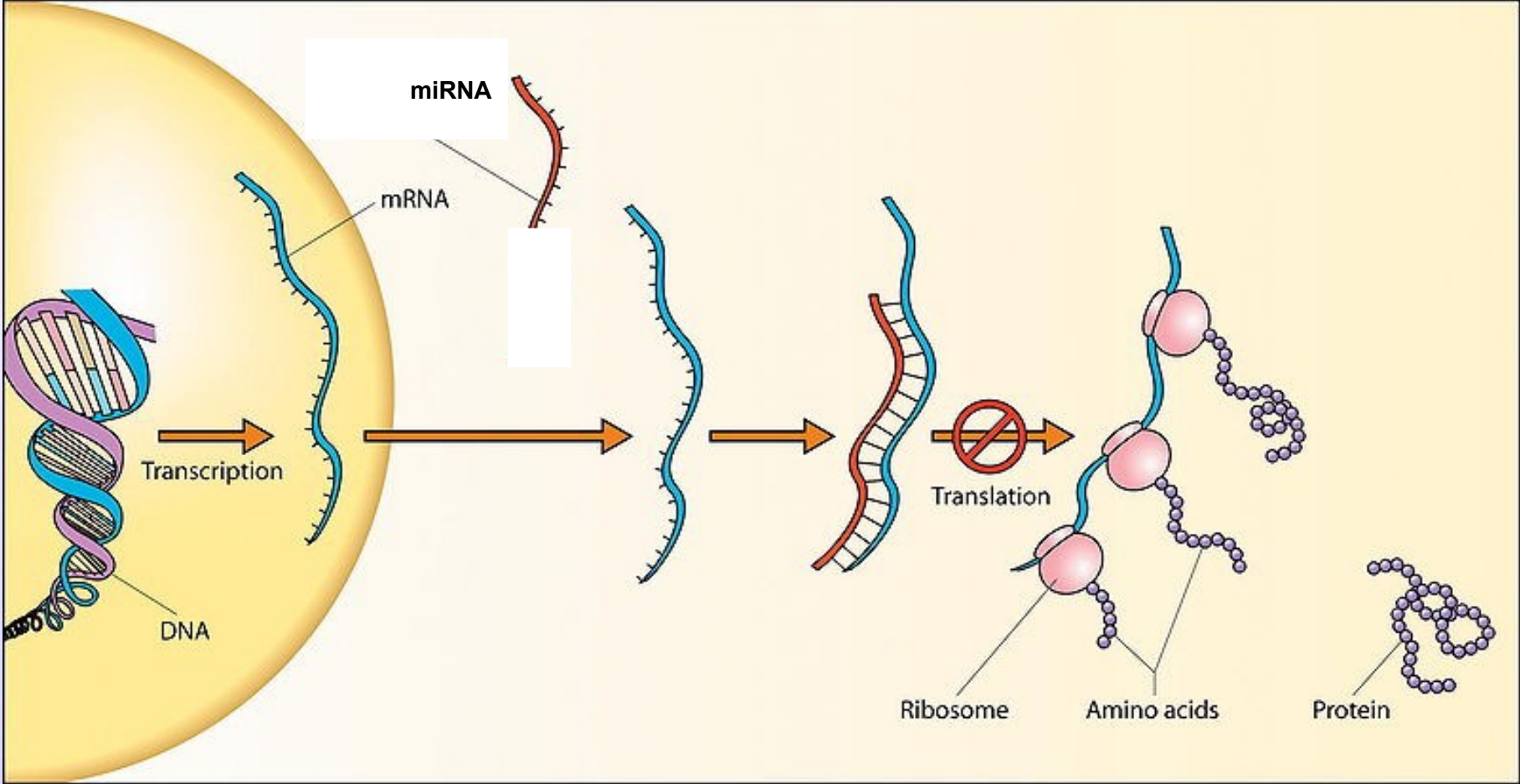
2.)



Genexpression und -regulation



Genexpression und -regulation



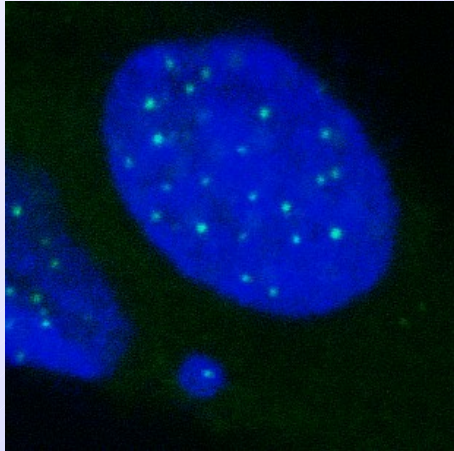
Antisense-RNA

RNA-Interferenz

4.

Toxikologische Testsysteme

- **Gentoxizität:**

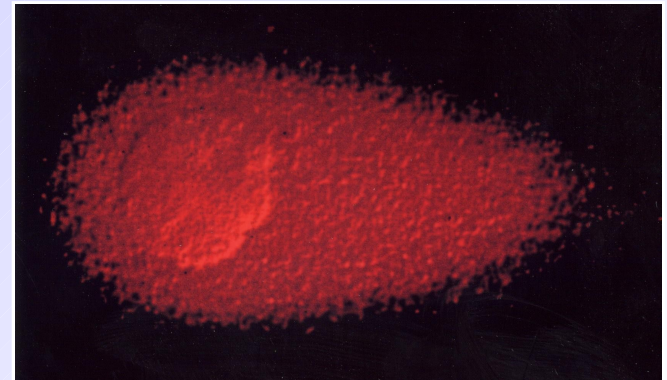


Mikrokern-Test/Kinetochore

Mikrokerne sind DNA-haltige Abspaltprodukte des Zellkerns und Indikator für eine DNA-Schädigung. Die Anzahl gebildeter Mikrokerne kann nach DNA-Färbung quantifiziert werden.

Comet-Assay

Detektierung von DNA-Strang-Brüchen mit hoher Sensitivität
-mikroskopische Auswertung
-Ermittlung des „Olive tail moments“



4.

Toxikologische Testsysteme

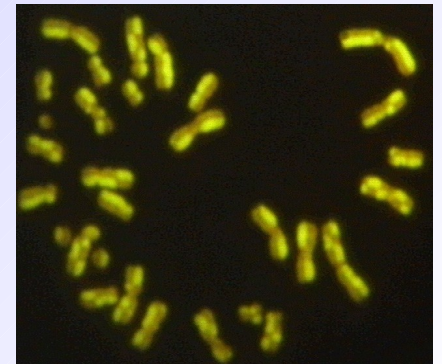
- **Gentoxizität: Chromosomenaberrationen (CA)**



Nachweis von chromosomalen Schädigungen an Metaphasechromosomen (strukturelle Aberrationen) sowie von Polyploidie (numerische Aberrationen)

Schwesterchromatidenaustausch (SCE)

Reziproke Austausche von Chromatidenabschnitten eines Chromosomens, wird gefärbt und mikroskopisch ausgewertet

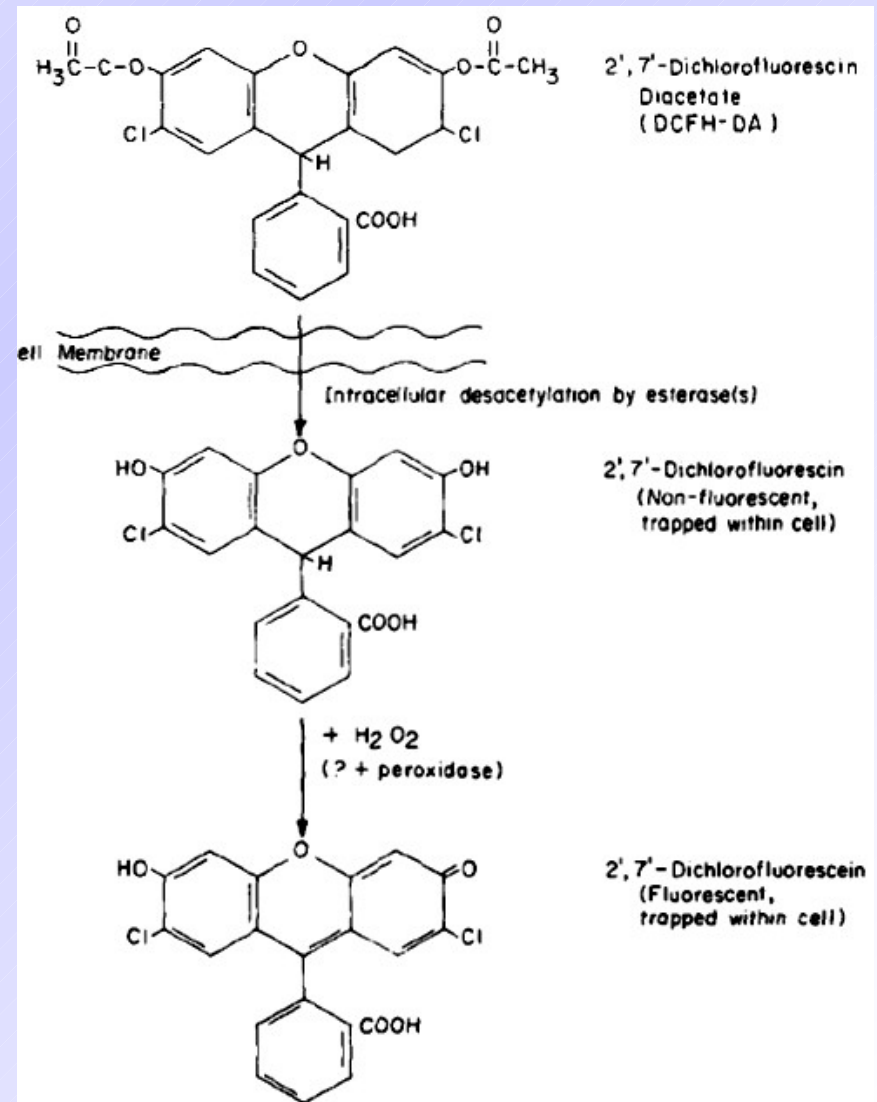


Intrazellulärer ROS-Nachweis

H₂DCFDA-Färbung

2',7'-Dichlordihydrofluorescein-diacetat wird deazetyliert durch zelluläre Esterasen. H₂DCF wird gebildet und reagiert mit ROS zu H₂DCFDA.

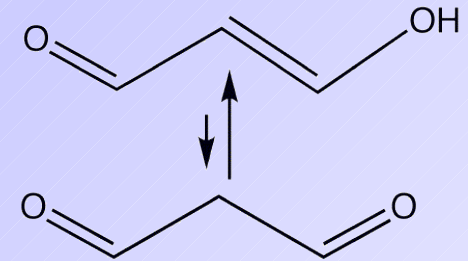
Fluoreszenz-Messung mit ELISA



Intrazellulärer ROS-Nachweis

TBARS-Färbung

Malondialdehyd (MDA) ist eine Thiobarbitur-säure-reaktive Substanz (TBARS), die spektrometrisch gemessen werden kann



Malondialdehyd, $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$

⇒ Marker für oxidativen Stress

- erhöhte TBARS-Konzentrationen sind ein Marker für Lipidperoxidation und oxidativen Stress
- Fluoreszenz-Messung mit ELISA

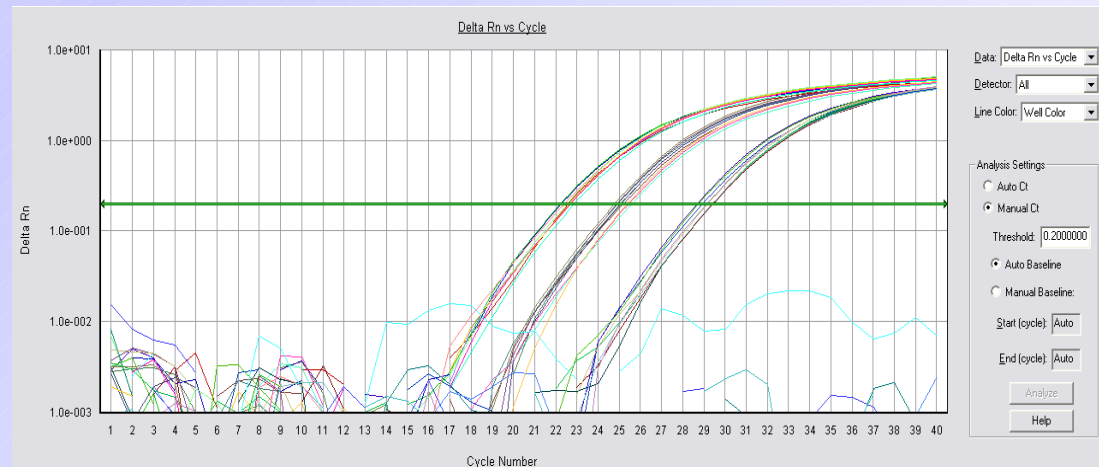
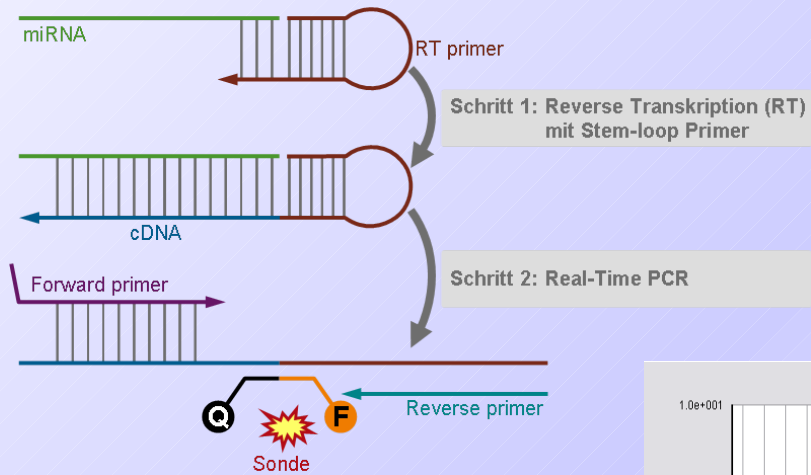
Lipidperoxidation: oxidative Degradation von Lipiden in der Zellmembran durch freie Radikale ⇒ führt zur Zellschädigung

Toxikologische Testsysteme

• **Genanalyse:**

TaqMan-Assay

miRNA-Nachweis
COX-2 Expression



*Kooperation mit dem
BGfA Bochum
Dr. Johnen/Dr. Weber*

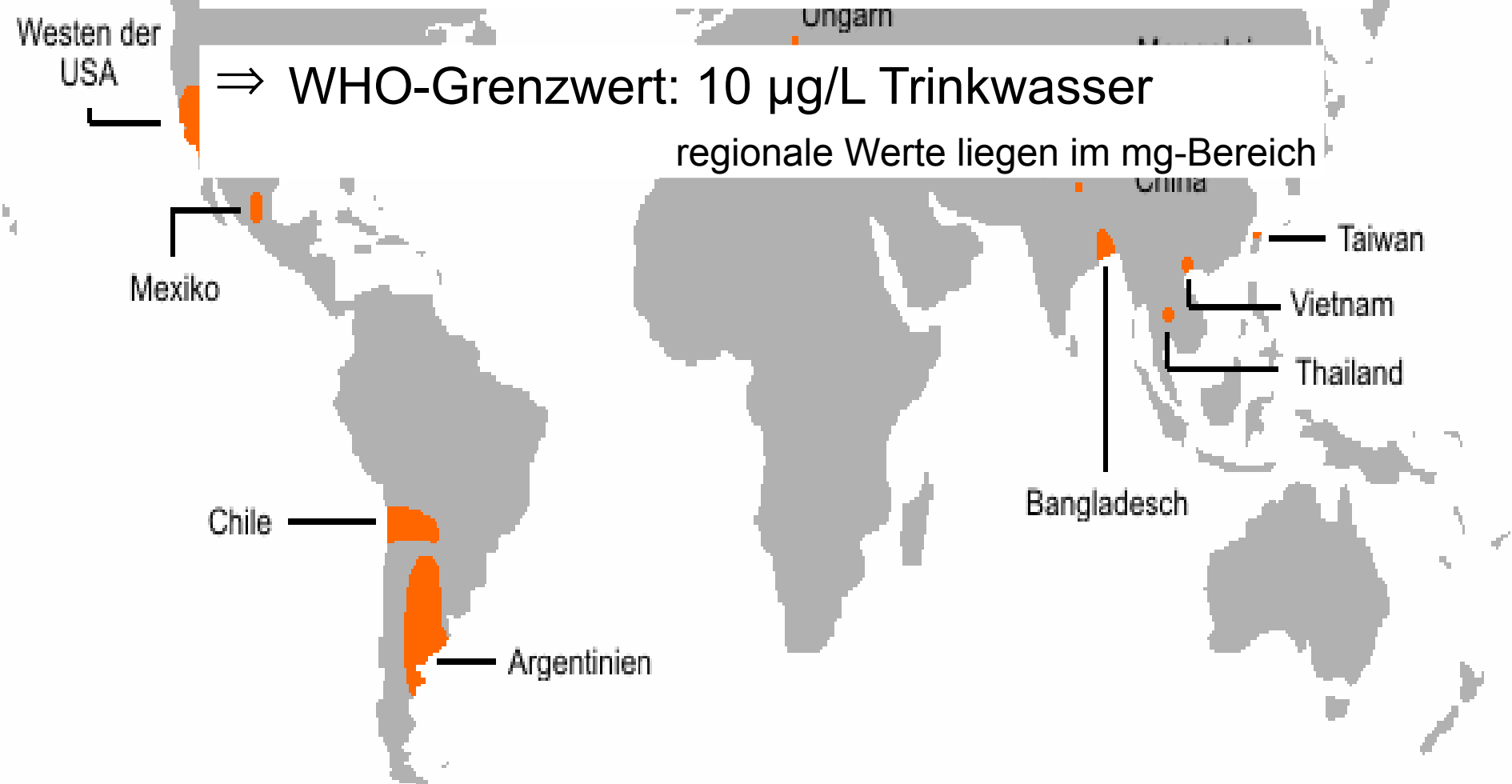
- Fixed threshold = 0.2
- Expression fold value: $2^{-\Delta\Delta Ct}$
- Significant change: < 0.5 und > 2.0

Arsen in der Umwelt

⇒ Weltweit > 100 Mill. Menschen Arsen-exponiert

⇒ WHO-Grenzwert: 10 µg/L Trinkwasser

regionale Werte liegen im mg-Bereich



Weitere Vorkommen von Arsenverbindungen in der Umwelt

- **Anorganische Verbindungen**

Gestein (Arsenerze, Steinkohle), Trinkwasser,
Nahrungskette (Reis, Fisch)

Arsentoxizität durch Biomethylierung von anorganischem
Arsen in der Leber

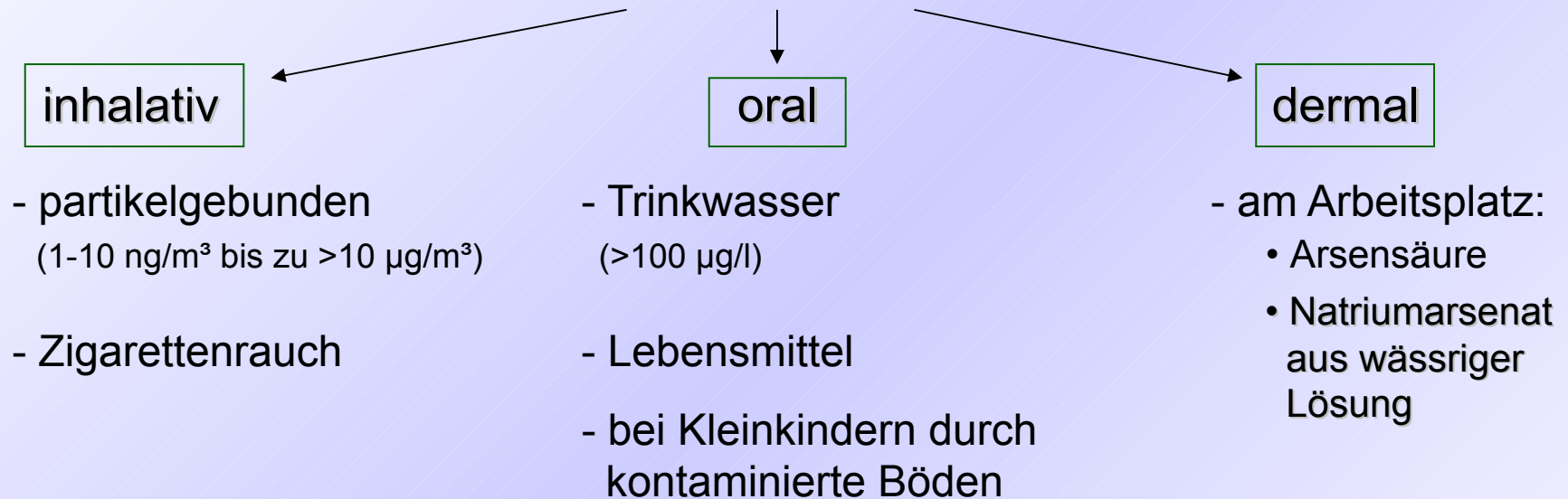
- **Organische Verbindungen**

biogene Quellen: anorganisches Arsen wird durch
methanogene und sulfatreduzierende Mikroorganismen
biomethyliert: Feuchtgebiete, Tierhaltung

anthropogene Quellen: Mülldeponie, Altlasten, Abwasser,
Klärschlamm, Industrie

Expositionswege

Arsenaufnahme



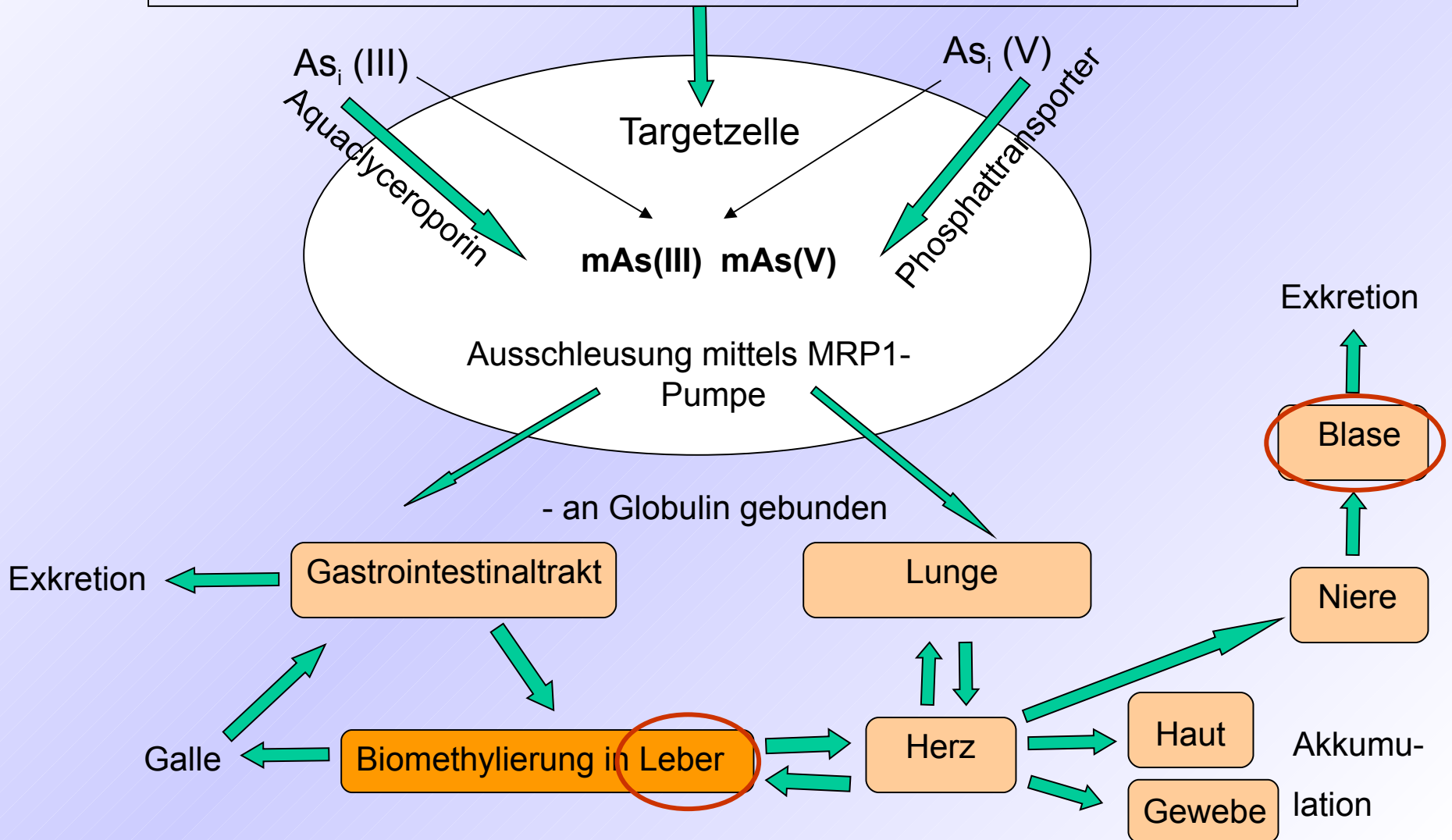
Anreicherung in Leber, Niere, Gallenblase, Haut, Haare, Nägel

Ausscheidung hauptsächlich als DMA(V) über die Niere

Arsenverbindungen sind humankanzerogen und können Blasen-, Nieren-, Leber-, Haut- und Lungenkrebs hervorrufen.

Aufnahme und Deposition von Arsen

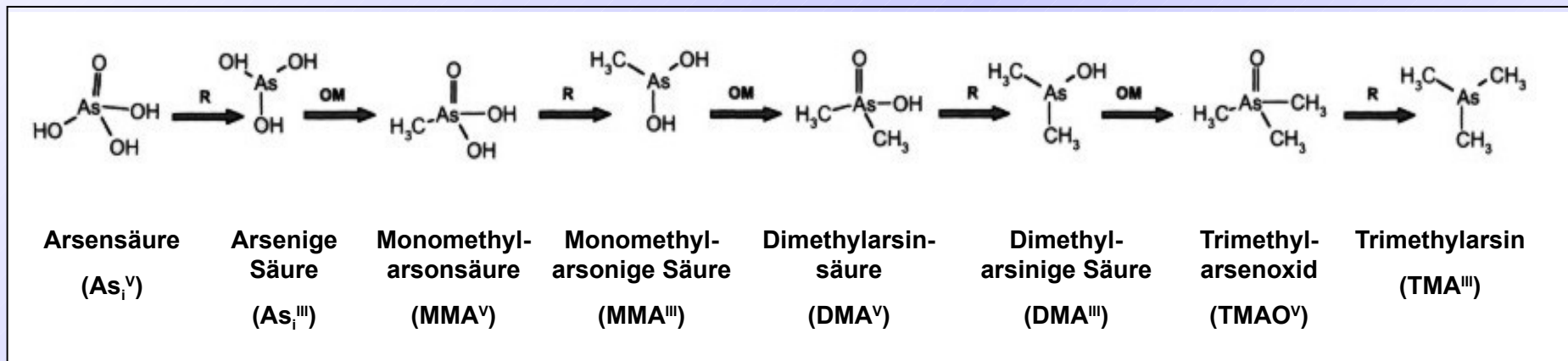
Orale Aufnahme (Trinkwasser, Nahrung, Tabak)
Inhalation (Atmosphäre, Boden)



Biomethylierung von anorganischem Arsen (I)

Challenger-Mechanismus

(Challenger, Chem. Rev. (1945) 36: 315)



R = Reduktion, OM = oxidative Methylierung

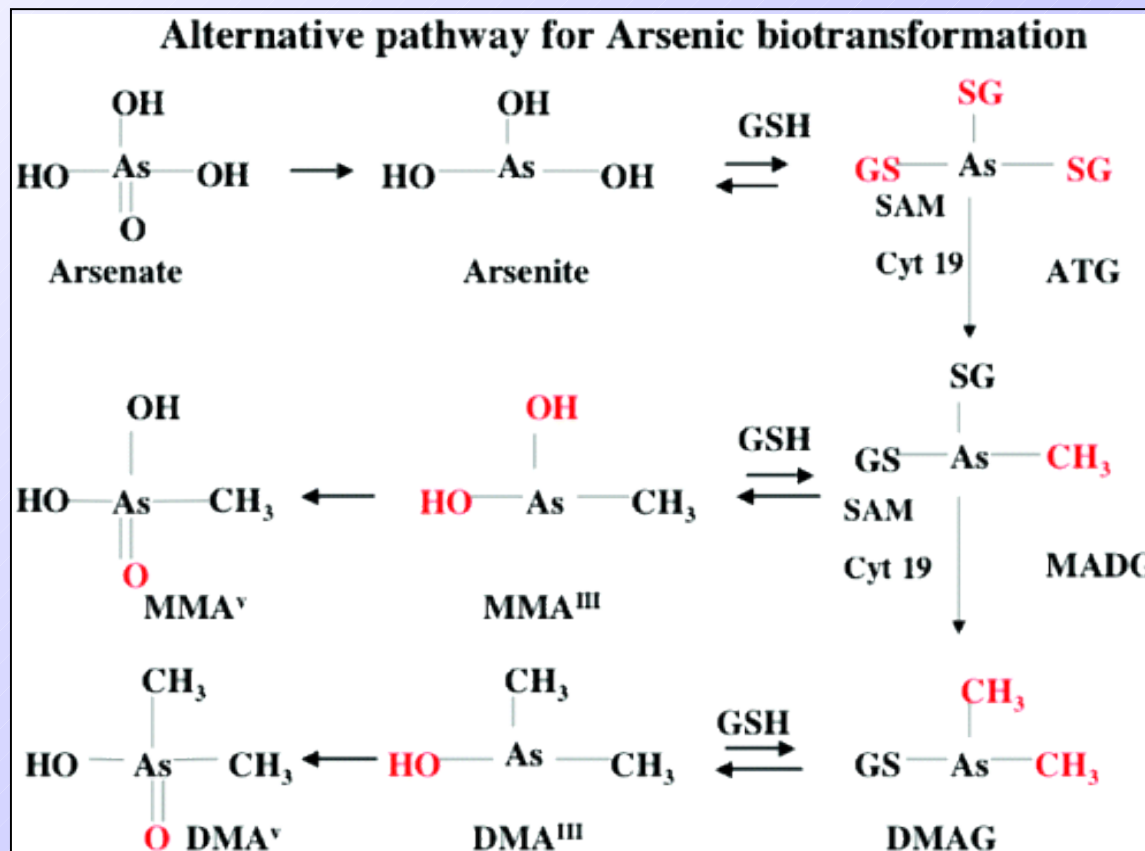
- Die Methylierung findet hauptsächlich in der Leber unter Beteiligung von Methylendonoren (SAM, GSH) statt.
- Methyliertes Arsen(III) weist eine höhere Toxizität auf als anorganisches Arsen

Biomethylierung ist keine Detoxifizierung !

Biomethylierung von anorganischem Arsen (II)

Hayakawa-Mechanismus

(Hayakawa et al., Arch. Toxicol. (2005) 79: 183)



- Pentavalente Arsenverbindungen sind Endprodukte des Stoffwechsels
- Oxidative Methylierungsreaktionen fehlen
- Trimethylarsen fehlt ganz

Ergebnisse eigener Versuche

- 1.) Zelluläre Aufnahme von Arsenverbindungen
- 2.) Subzelluläre Verteilung der Arsenverbindungen
- 3.) Toxizität der Arsenverbindungen
 - Cytotoxizität
 - Genotoxizität
 - Intrazelluläre Radikalbildung
- 4.) Änderung des intrazellulären Calciumspiegels
- 5.) Genanalysen (COX-2)

Verwendete Arsenverbindungen

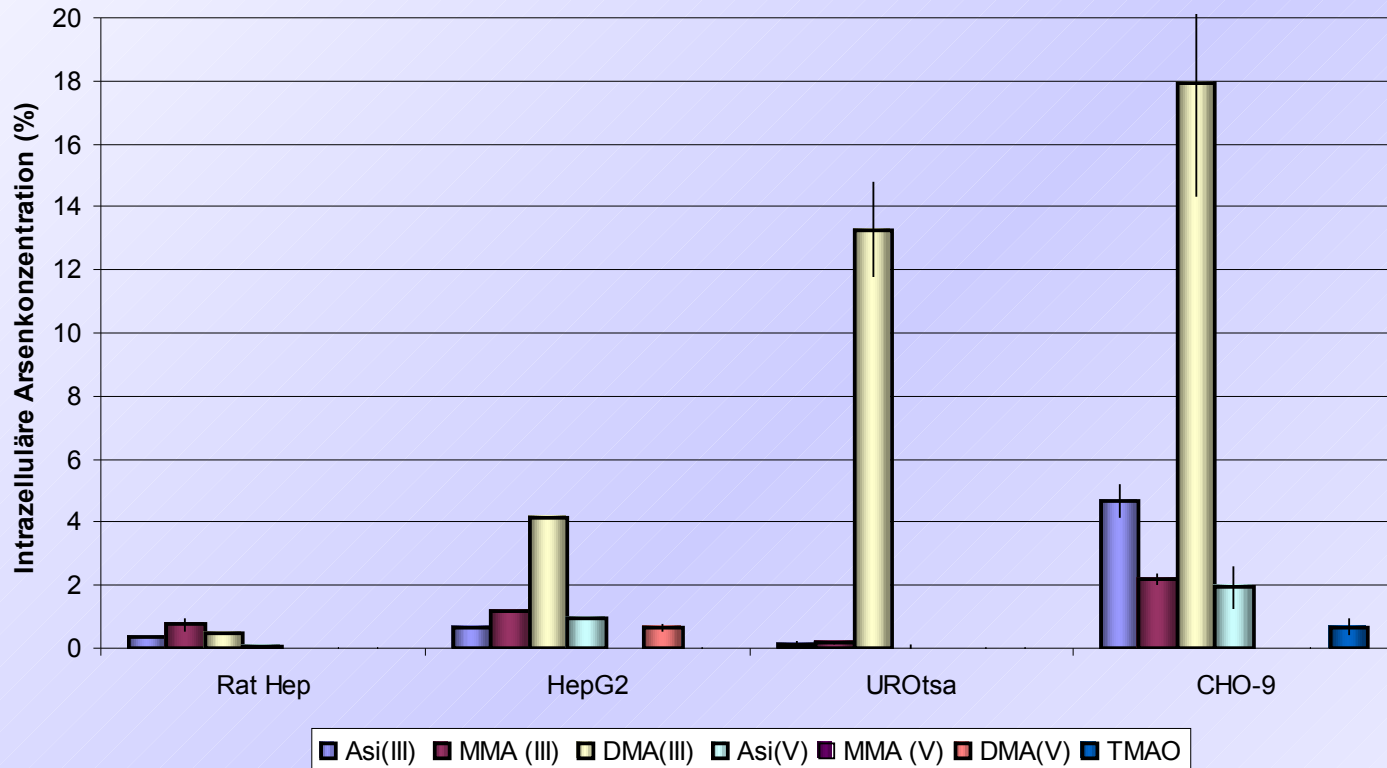
- AsNaO_2 Natriumarsenit [$\text{As}_i(\text{III})$]
- AsHNa_2O_4 Natriumarsenat [$\text{As}_i(\text{V})$]

- $\text{MeAs}(\text{OH})_2$ Monomethylarsonige Säure [MMA(III)]
- $\text{MeAsO}(\text{OH})_2$ Monomethylarsonsäure [MMA(V)]

- Me_2AsOH Dimethyarsinige Säure [DMA(III)]
- Me_2AsOOH Dimethylarsinsäure [DMA(V)]

- Me_3AsO Trimethylarsinoxid [TMAO(V)]

1.) Intrazelluläre Arsenkonzentrationen



Rat Hep: primäre Hepatozyten (Ratte)

HepG2: humane Hepatomazellen

UROtsa: humane Harnblasenzellen (virustransformiert)

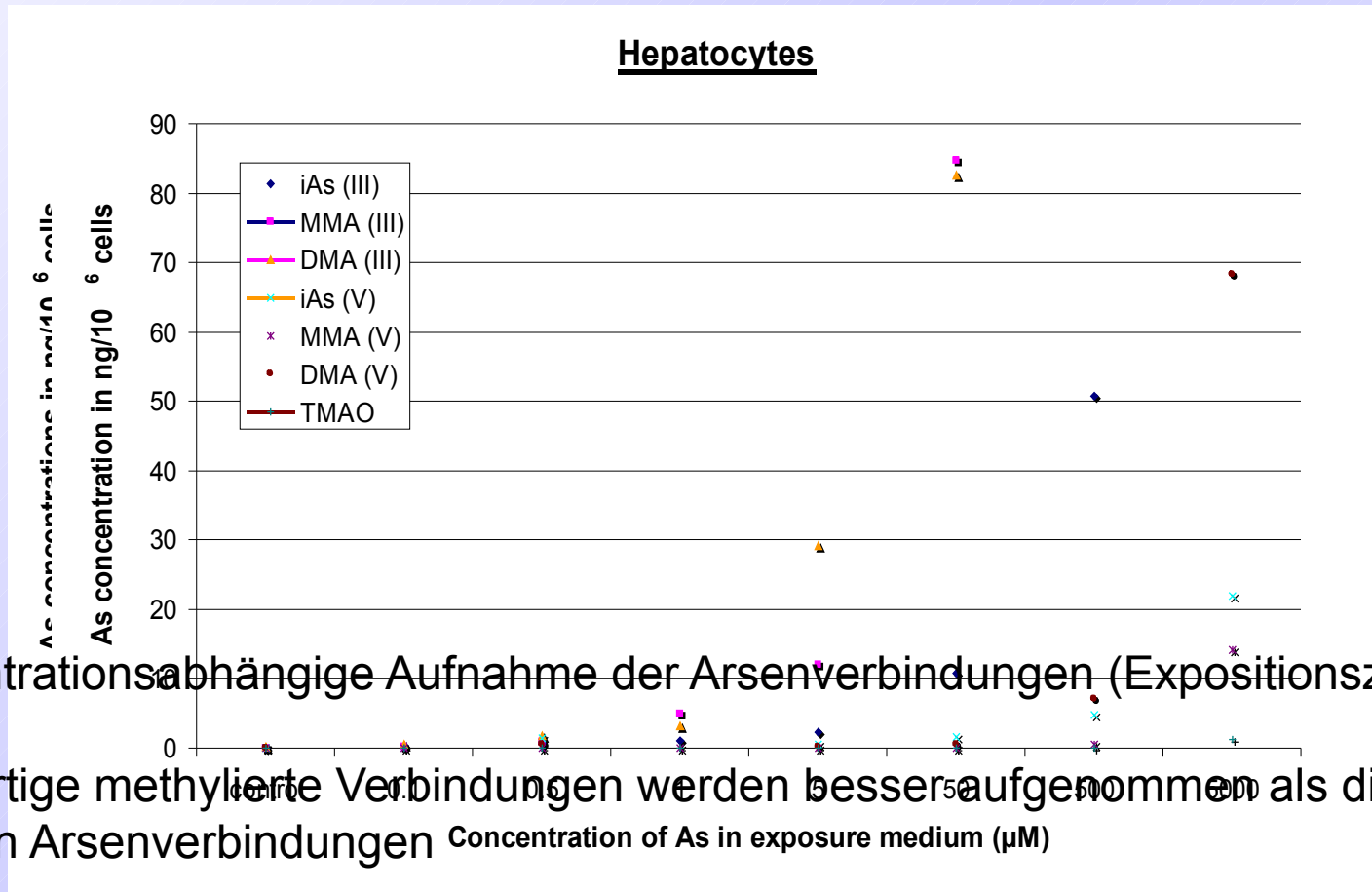
CHO-9: Fibroblasten (Hamster)

methylierende Zellen

nichtmethylierende Zellen

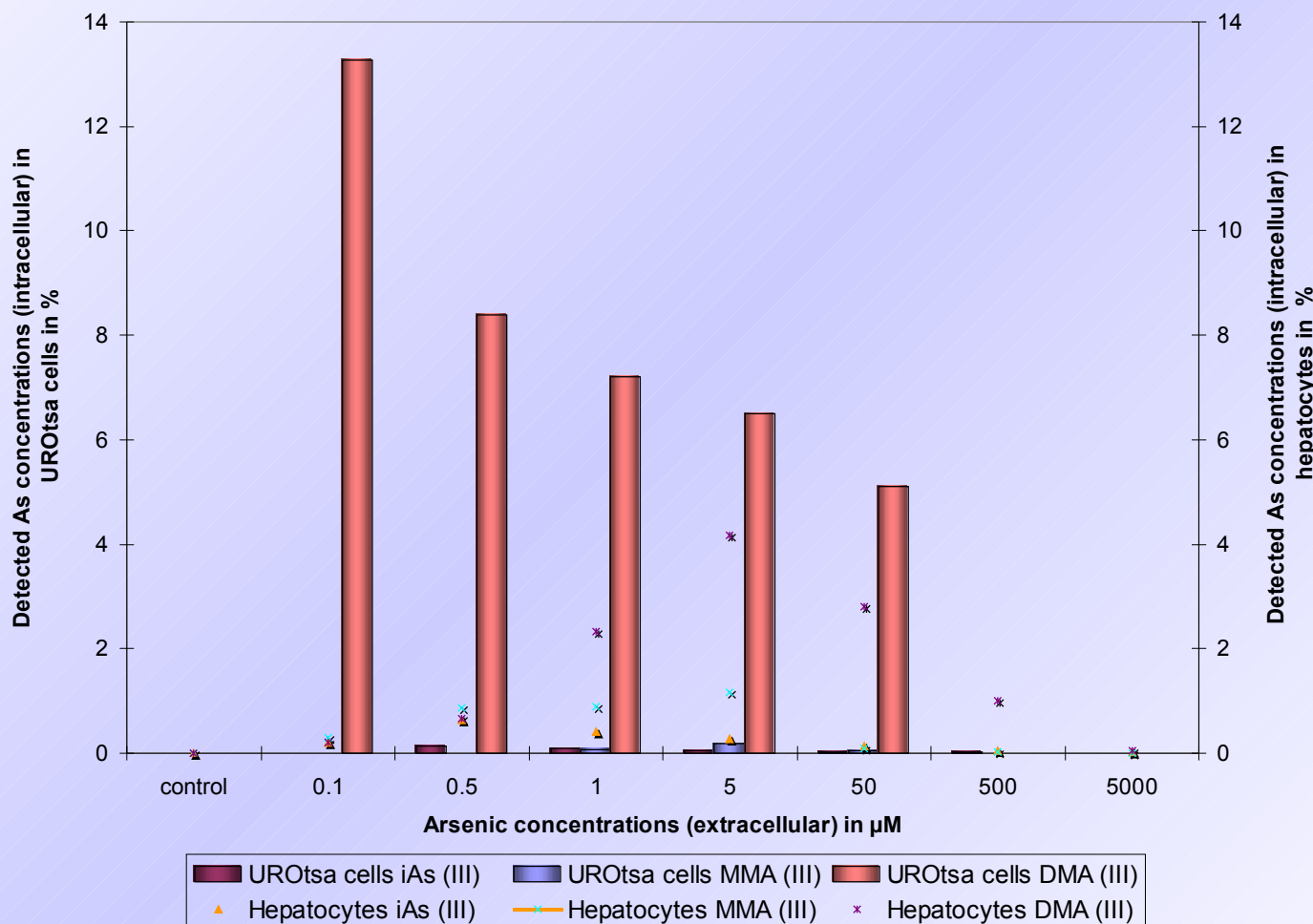
• nichtmethylierende Zellen sind in der Lage, größere Arsenmengen aufzunehmen / zu speichern als methylierende Zellen (verstärkte aktive Ausschleusung)

Zelluläre Aufnahme (absolut)



- Konzentrationsabhängige Aufnahme der Arsenverbindungen (Expositionszeit: 1 h)
- Dreiwertige methylierte Verbindungen werden besser aufgenommen als die fünfwertigen Arsenverbindungen
- Berechnung der relativen Arsenaufnahme in Abhängigkeit von der extrazellulär applizierten Arsenkonzentration

Zelluläre Aufnahme (relativ)



• höchste Aufnahme bei relativ niedrigen Konzentrationen (UROtsa: DMA(III), 0.1 μM)

Zelluläre Aufnahme (relativ)

CHO cells

Concentration of arsenic in treatment solution (μM)	Intracellular concentration of arsenic expressed as % of dosed arsenic concentration						
	As _i (III)	As _i (V)	MMA(III)	MMA(V)	DMA(III)	DMA(V)	TMAO
0.1	-	-	-	-	0.80	-	-
0.5	1.20	1.17	0.37	-	9.98	n.d.	-
1	0.48	1.58	0.38	0.02	7.30	-	n.d.
5	-	-	-	-	6.67	-	-
10	0.78	0.41	1.10	n.d.	6.14	n.d.	0.13
25	-	-	2.19	-	-	-	-
50	-	-	1.58	-	-	-	-
100	0.41	0.28	-	0.03	-	0.01	0.01
500	0.19	0.14	-	0.01	-	0.02	0.01
1000	-	0.05	-	-	-	0.02	n.d.
10000	0.10	0.03	-	-	-	-	-

- ist abhängig vom Zelltyp (der Membranpermeabilität) und der Arsenspezies

2.) Subzelluläre Verteilung

Differentialzentrifugation zur Zellfraktionierung (5 Fraktionen)

Sample P:

- endoplasmic reticulum
- large polyribosomes
- microsomal fraction
- plasma membrane

(P)

plasma cell membrane

(P)

endoplasmic reticulum

(N)

nucleus

(R)

ribosome

Sample R:

- ribosomal subunits
- small polyribosomes

Samples

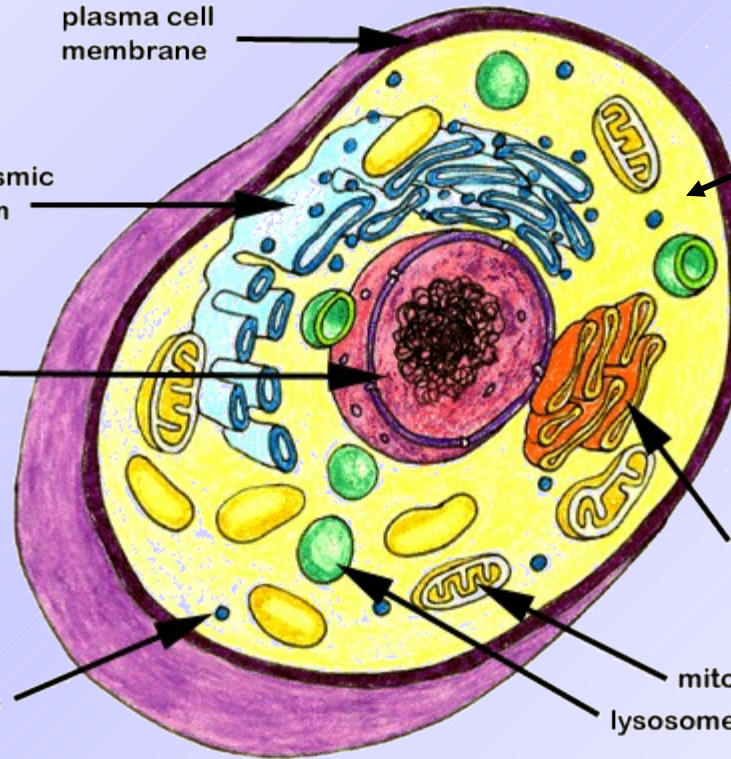
cytoplasm (C)

Sample M:

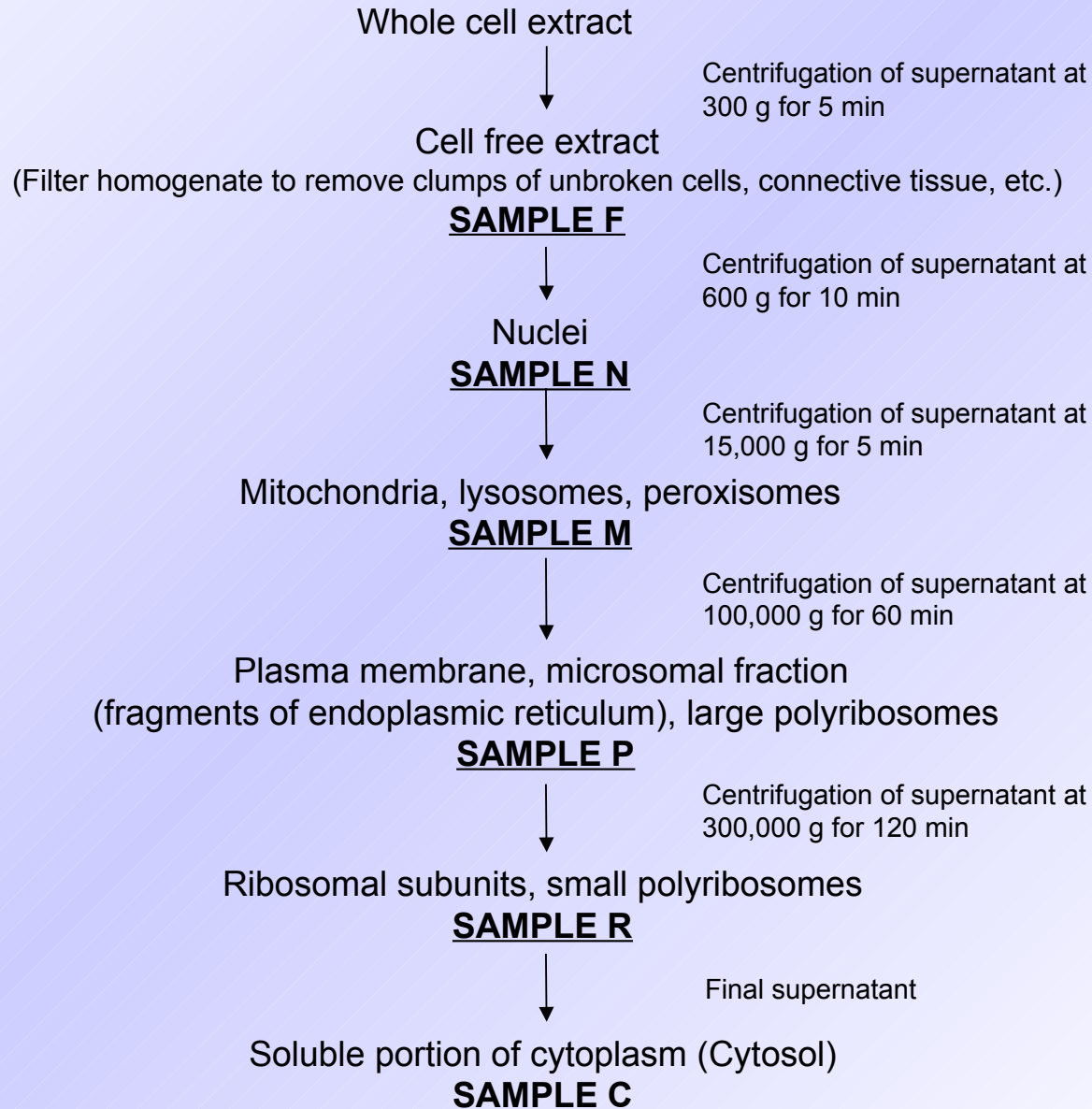
- mitochondria
- lysosomes
- peroxisomes

(M)

(M)



Differentialcentrifugation

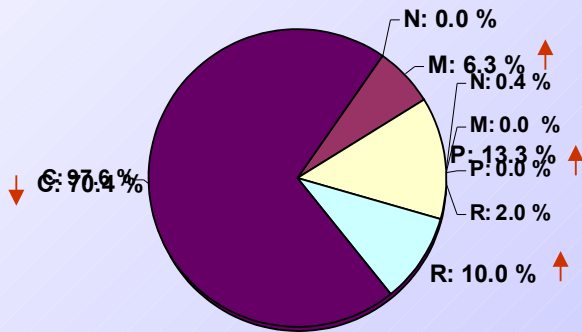


Subzelluläre Verteilung [iAs]

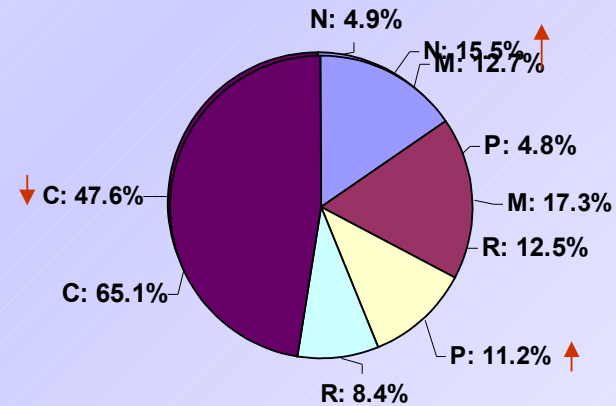
Urothelial cells

Hepatocytes

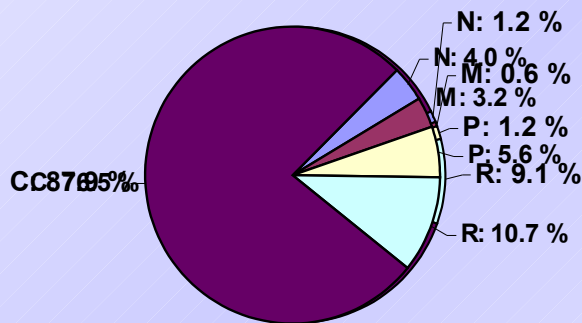
iAs(V) 24h



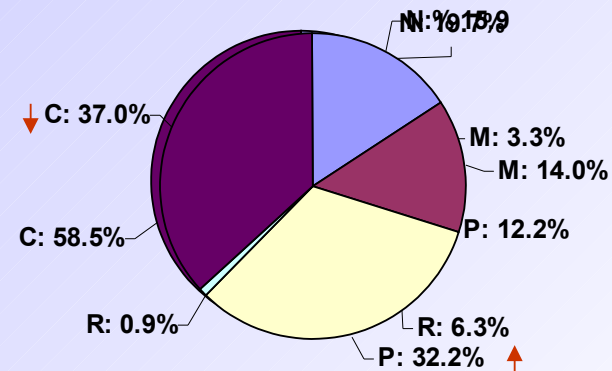
iAs(V) % 24h



iAs(III) 24h



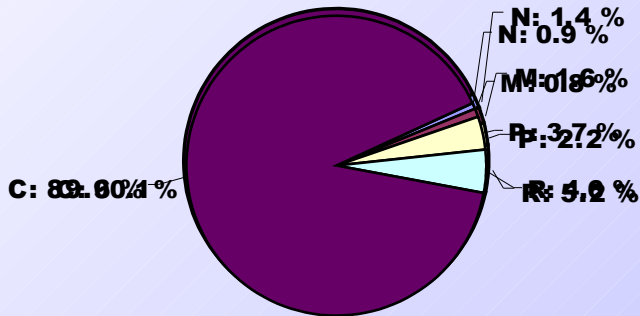
iAs(III) % 24 h



Subzelluläre Verteilung [MMA]

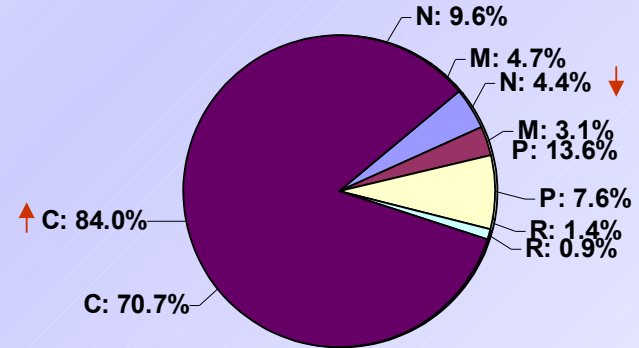
Urothelial cells

MMA(V) 24h

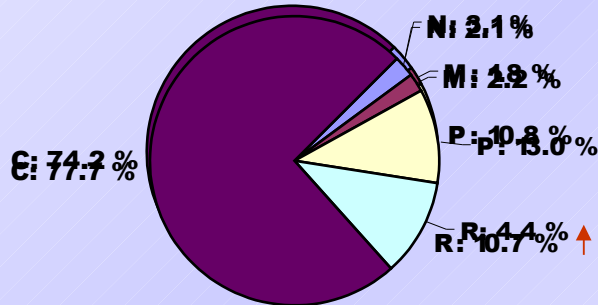


Hepatocytes

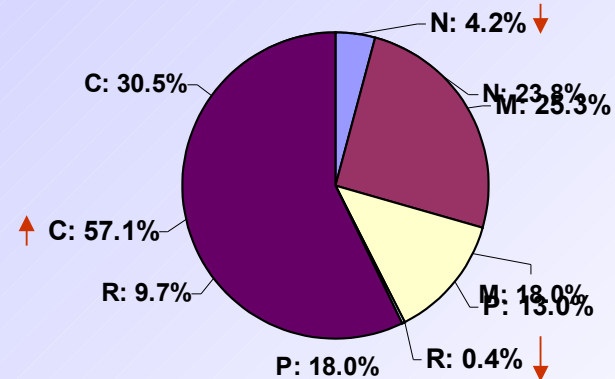
MMA(V) 24h



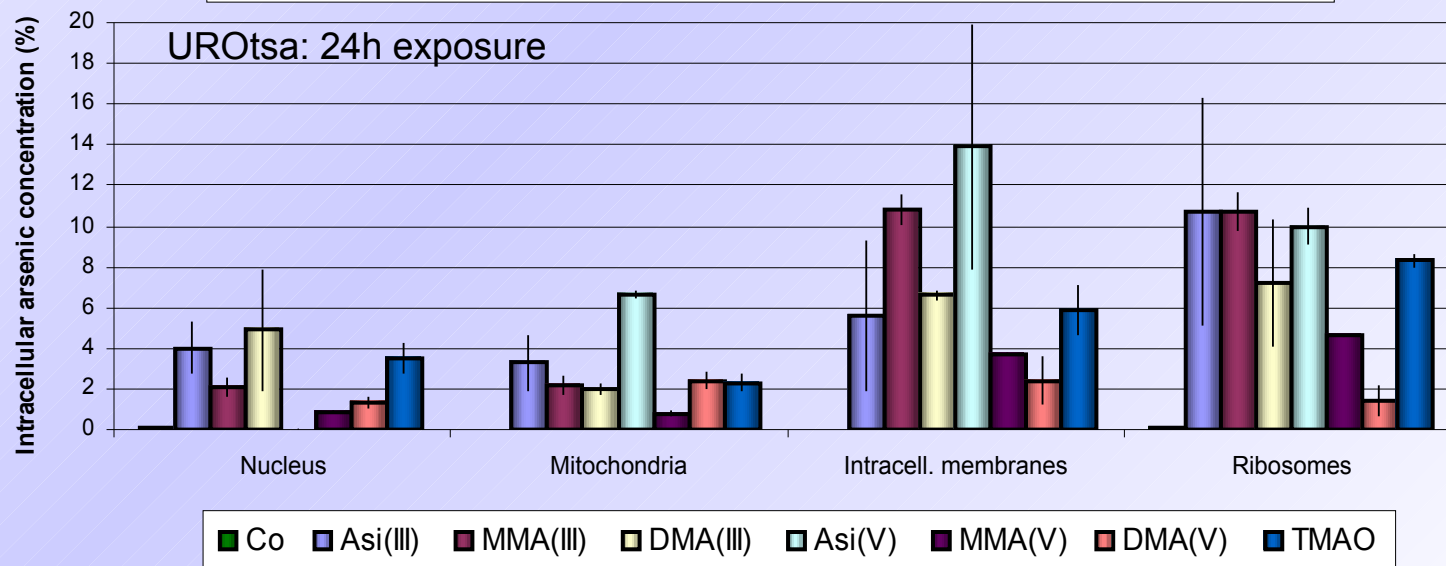
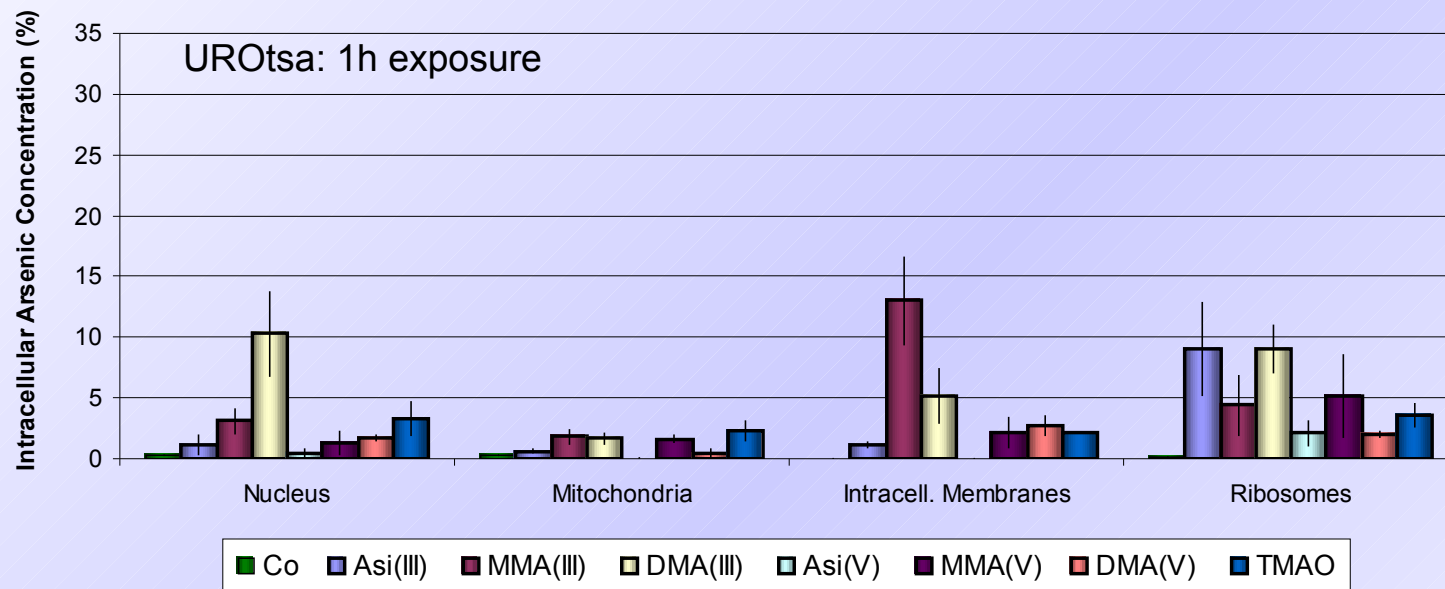
MMA(III) 1h
MMA(III) 24h



MMA(III) 24h



Subzelluläre Arsen-Verteilung in UROtsa-Zellen



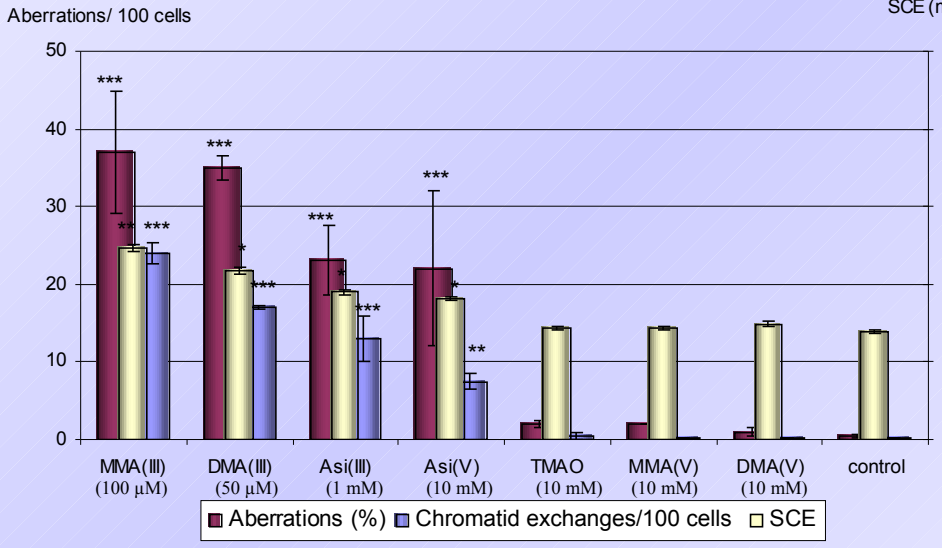
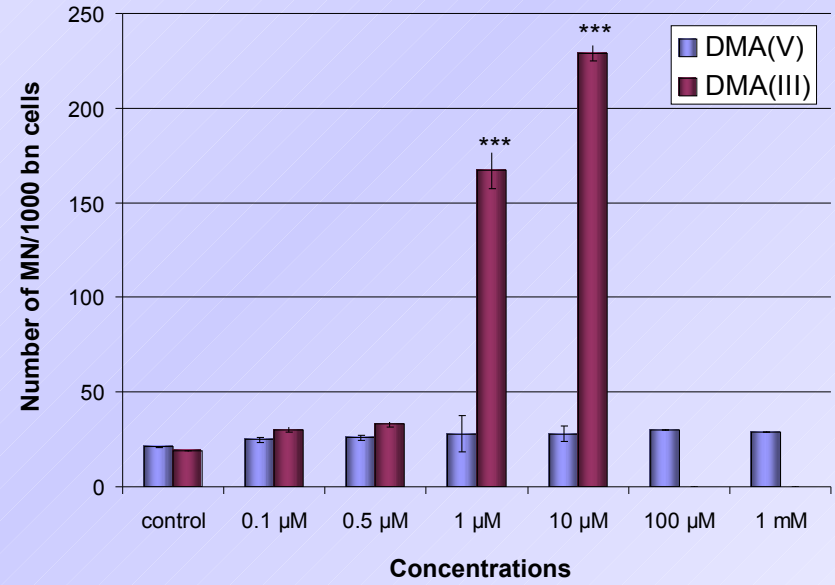
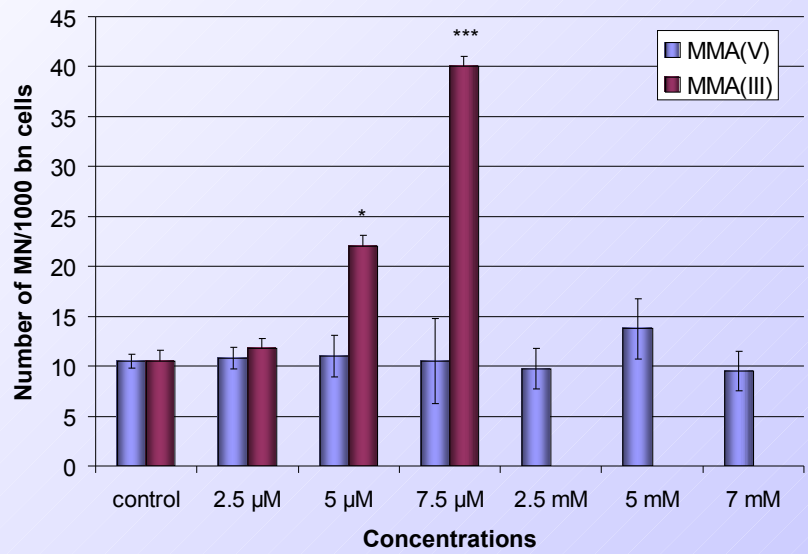
3.) Cytotoxizität

LC₅₀ values: Induktion von 50% Zelltod

LC ₅₀ values in µM				
UROtsa				
	As _i (III)	As _i (V)	MMA(III)	DMA(III)
1 h	5000	n.ct.	83	15
24 h	170	1530	18	12
Hepatocytes				
1 h	n.ct.	n.ct.	20	13
24 h	130	500	12.4	8.6

- die pentavalenten Arsenspezies MMA(V), DMA(V) and TMAO(V) waren nicht cytotoxisch (n.ct.) bis zu einer getesteten Konzentration von 5 mM
- cytotoxische Effekte waren in Hepatozyten ausgeprägter als in Urothelzellen

Gentoxische Effekte in Fibroblasten (CHO-Zellen)

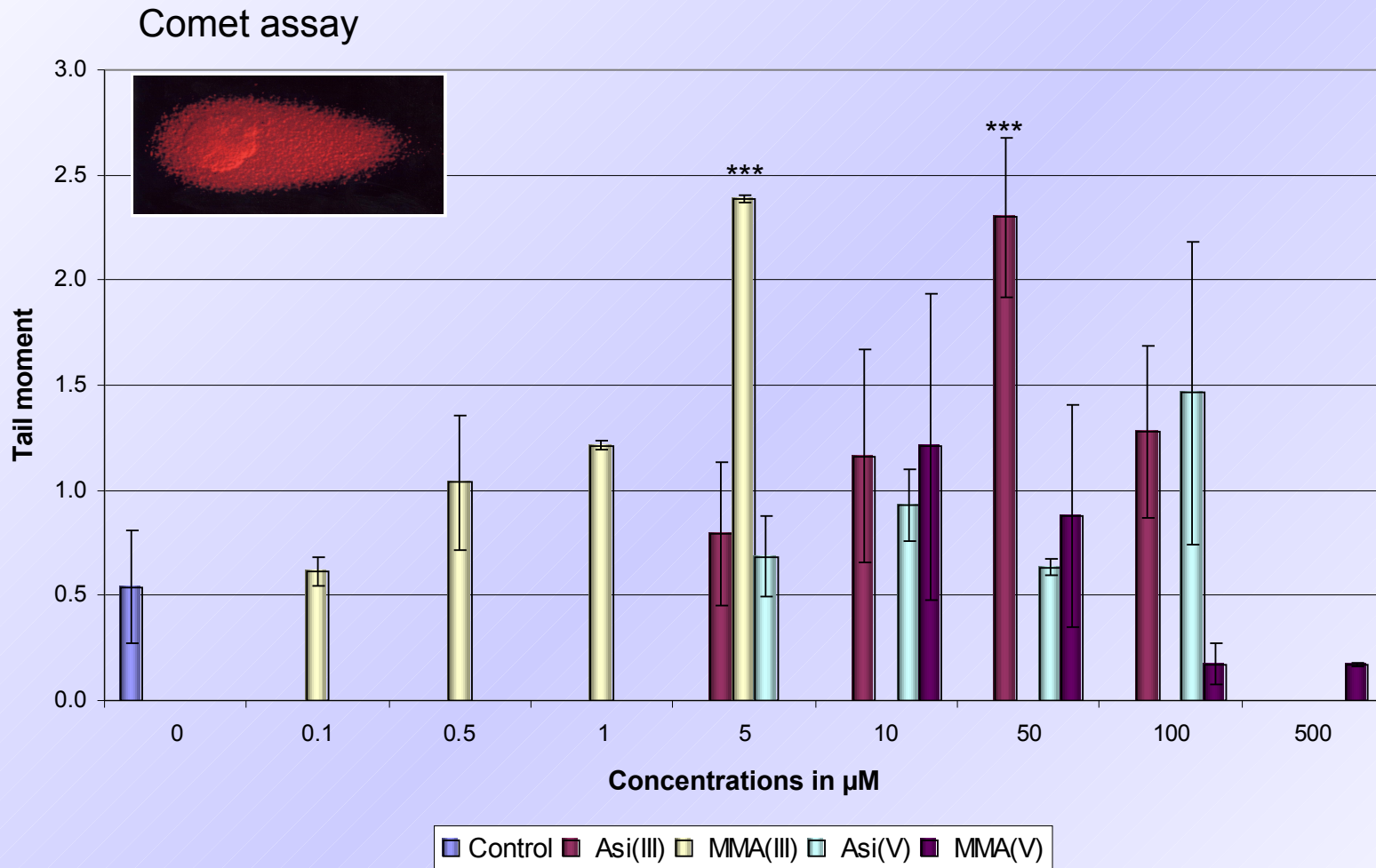


SCE (mean)



Chromatiden-Translokation nach Exposition von CHO-Zellen gegenüber MMA(III) (50 μM, 30 min)

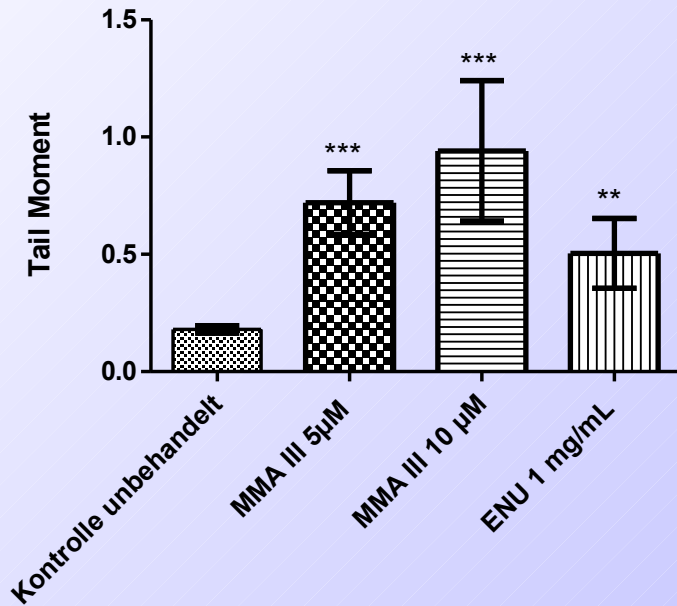
Gentoxische Effekte in humanen Hepatozyten



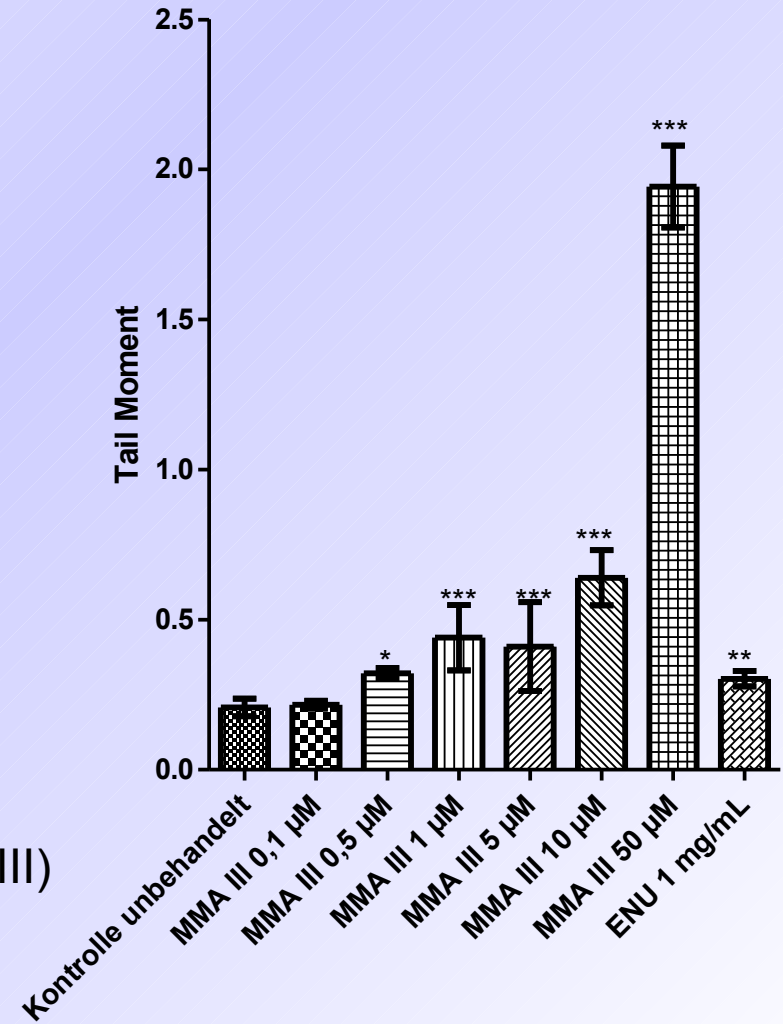
- signifikante Induktion von gentoxischen Effekten durch dreiwertige Arsenverbindungen

Gentoxische Effekte in humanen Urothelzellen

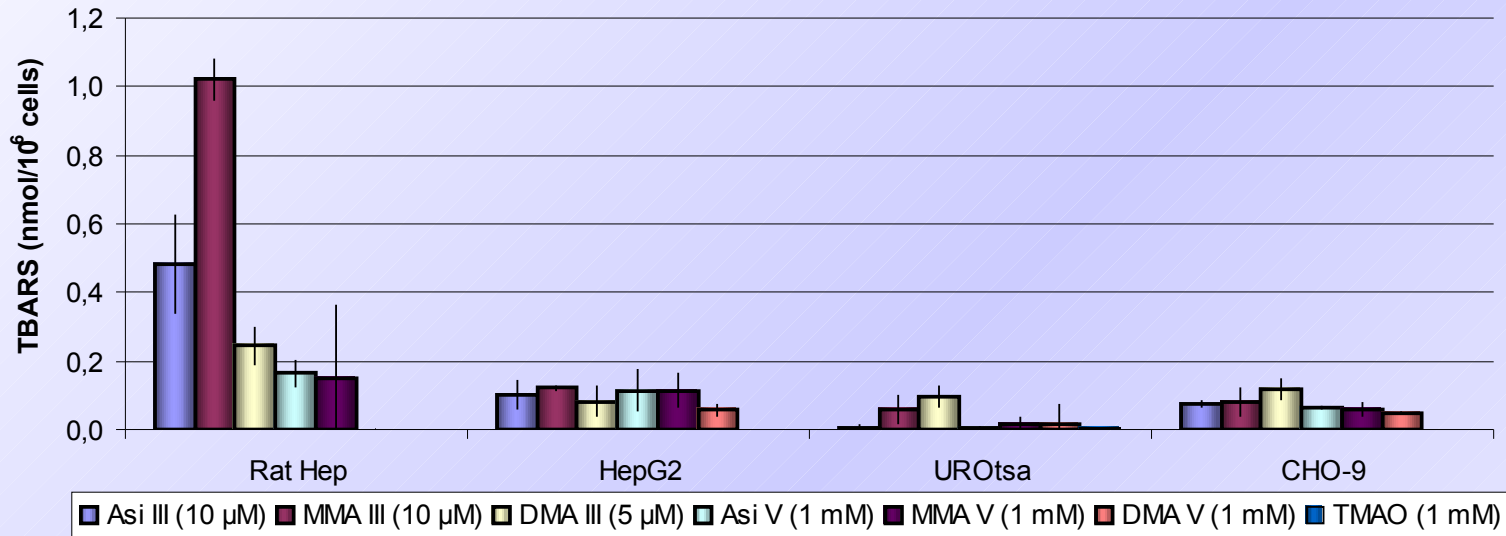
Comet-Assay



- Konzentrationsabhängigkeit
- ausgeprägtere Effekte in Hepatozyten
(TM: 2,3 zu 0,8 in UROtsa bei 5 µM MMA III)



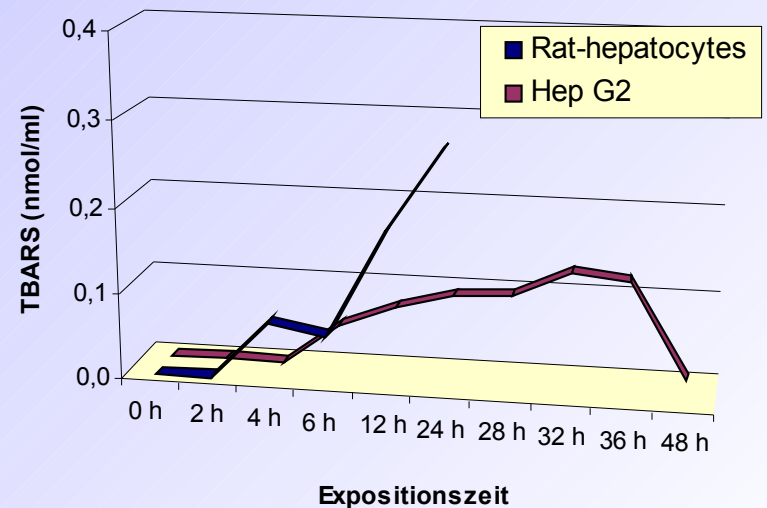
Lipidperoxidation



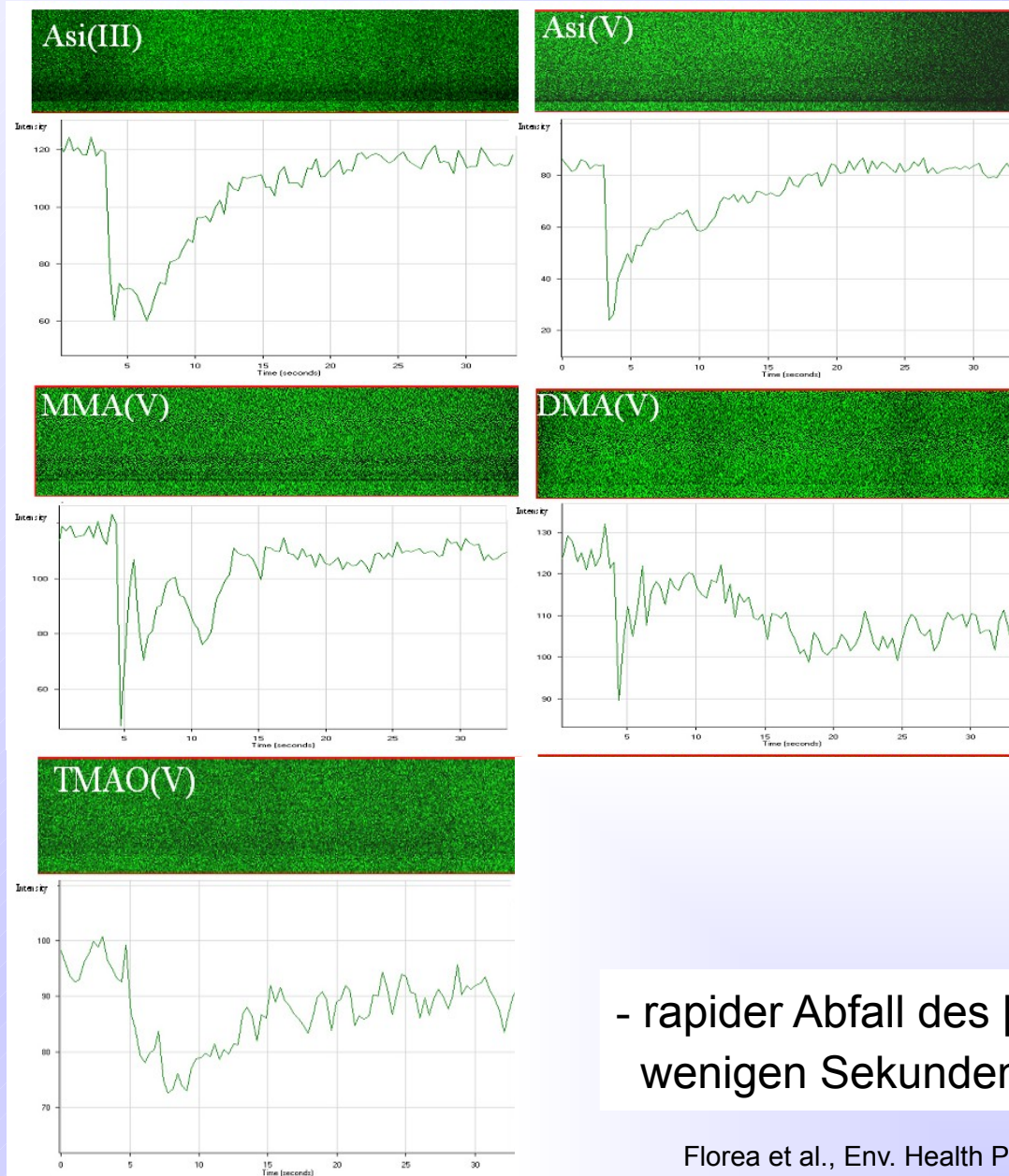
⇒ große zellartspezifische Unterschiede hinsichtlich MDA-Freisetzung

⇒ höhere Radikalbildung in primären Hepatozyten als in transformierten Zellen

⇒ zeitabhängige MDA-Bildung [MMA(III)]



4.) Änderungen des $[Ca^{2+}]_i$ durch Arsenverbindungen



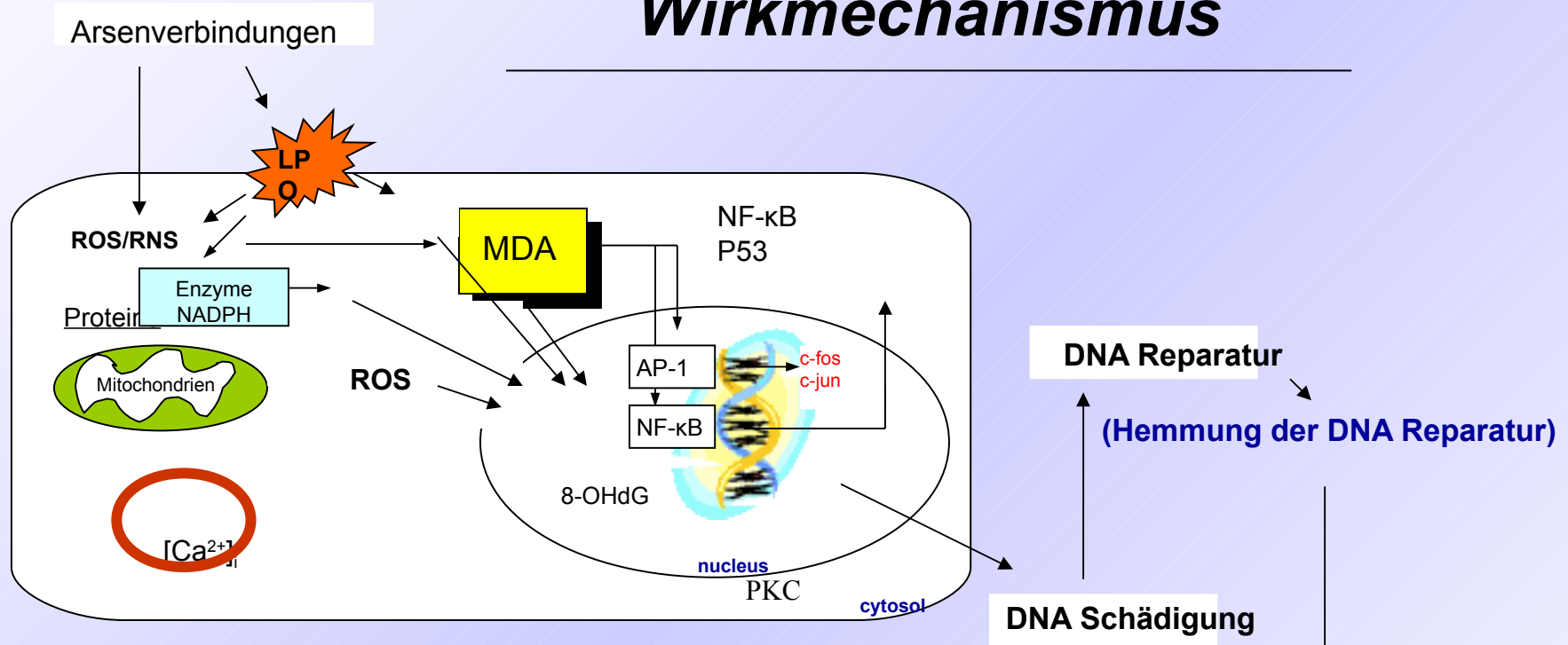
- rapider Abfall des $[Ca^{2+}]_i$ nach wenigen Sekunden

5.) Genanalyse COX-2

UROtsa-Zellen, 10 μ M			
	MMA(III) $\Delta\Delta$ Ct	Expression fold value	significant
miRNA-26a	3,98 change	8,75	↑
miRNA-101	-1,59	3,01	↑
miRNA-143	-2,60	6,06	↑
COX-2	3,13	0,11	↓

⇒ Verminderte COX-2 Expression

Wirkmechanismus



Hypothese:

- oxidative Schädigung von Lipiden, Proteinen, DNA
- Aktivierung von Transkriptionsfaktoren
- Beeinflussung der DNA Methylierung

Zusammenfassung

- ⇒ Zelltyp-spezifische Unterschiede hinsichtlich Aufnahme, Verbleib und intrazellulärer Verteilung von Arsenverbindungen sowie cytotoxischen und radikalbildenden Eigenschaften
- ⇒ Genotoxische Effekte waren in allen untersuchten Zellarten detektierbar
- ⇒ Die höchsten Arsenkonzentrationen wurden im Cytosol von humanen Blaszellen gefunden. Hepatozyten scheinen Arsen schneller wieder auszuschleusen.
- ⇒ Dreiwertige methylierte Verbindungen sind gut membrangängig und induzieren die stärksten zellulären Effekte
- ⇒ Zellkern, Mitochondrien und Ribosomen weisen ebenfalls erhöhte Arsenkonzentrationen auf
- ⇒ **Mögliche Konsequenzen: Störungen der mitochondrialen Aktivität und der Proteinsynthese**

Institut für Hygiene und Arbeitsmedizin, Universitätsklinikum Essen

Prof. Albert W. Rettenmeier
Dr. U. v. Recklinghausen
Behnaz Shokouhi, MSc
Ilona Pollock, BSc
Inga Stueckradt
Gabrielle Zimmer
Ute Zimmermann

Institut für Umweltanalyse, Universität Duisburg-Essen

Prof. Dr. Alfred Hirner
Dr. Louise Hartmann
Dr. Sasan Rabieh
Jörg Hippler

University of California, Davis, USA

Prof. Dr. E.N. Yamoah und Team

Institut für Genetik, Universität Duisburg-Essen

Prof. Dr. Günter Obe und Team

Institut für Physiologie, Universitätsklinikum Essen

Prof. Dr. D. Büsselberg und Team

Institut für Physiologische Chemie, Universitätsklinikum Essen

Prof. Dr. de Groot
Priv.-Doz. Dr. Ursula Rauen und Team

University of North Dakota, USA

Prof. Dr. S. Garrett
Dr. D. Sens