

## Ein Screening System zur Bestimmung einer Hemmung spezifischer Enzyme der DNS-Synthese und DNS-Reparatur

A Screening System to Determine Inhibition of Specific Enzymes of the Semiconservative DNA-synthesis and DNA-repair Replication

F. KOCSIS, W. KLEIN und H. ALTMANN

Institut für Biologie, Forschungszentrum Seibersdorf, Österreich

(Z. Naturforsch. 28 e, 131-135 [1973]; eingegangen am 15. November 1972/8. Januar 1973)

Screening, lymphocytes, DNA-repair, semiconservative DNA-synthesis, inhibitors

To observe the influence of substances on specific enzymes of the semiconservative DNA-synthesis and DNA-repair replication a screening system was developed, which represents an extensive modification of known papers. Optimal conditions were found after comprehensive investigations. The detergents Tween 80 and the antileukemic drug *cis*-platinum(II)diamminodichloride were used as test substances.

### Einleitung

In letzter Zeit nimmt der Einsatz chemischer Substanzen bzw. Verbindungen, deren biologische Auswirkungen nicht restlos geklärt sind, stetig zu. So finden unter anderem Pharmaka in der klinischen Therapie, hauptsächlich als Zytostatika bei der Krebsbehandlung, oder Steroide z. B. zur Behandlung rheumatischer Erkrankungen, Herbizide und Insektizide in der Landwirtschaft und Detergentien in der pharmazeutischen Industrie verbreitete Anwendung. Es sind bereits Arbeiten erschienen, die sich mit einer Beeinflussung der DNS-Reparatur und einer Kokarzinogenen Wirkung dieser Substanzen beschäftigen<sup>1-4</sup>. Auch von unserer Arbeitsgruppe wurden eine ganze Reihe von Verbindungen der oben erwähnten Stoffgruppen getestet und bei einzelnen Substanzen eine gezielte Hemmung der DNS-Reparatur ohne Beeinflussung der semikonservativen DNS-Synthese, bei anderen Verbindungen eine Hemmung der semikonservativen DNS-Synthese ohne Beeinflussung der DNS-Reparatur, sowie eine Reihe von Substanzen, die beide Synthesemechanismen hemmen bzw. gar nicht beeinflussen, gefunden<sup>5-10</sup>. In der vorliegenden Arbeit soll vor allem die Methode der Testungen genauer beschrieben werden. Als Testsubstanzen wurden 2 Verbindungen ausgewählt, die durch ihre verschiedenen Wirkungen auf das untersuchte System gekennzeichnet sind.

Sonderdruckanforderungen an Dr. H. ALTMANN, Österreichische Studiengesellschaft für Atomenergie GmbH, Forschungszentrum Seibersdorf, Institut für Biologie, Seibersdorf (Österreich).

Bekanntlich sind normale Zellen in der Lage, Schäden, die in ihrer DNS durch ionisierende Strahlen, UV-Licht oder alkylierende Agentien erzeugt worden waren, zu reparieren<sup>5,6</sup>. Bestimmte Veränderungen in der Struktur der DNS werden von Enzymen erkannt, worauf es zum Aufbrechen der Phosphodiesterbindungen und anschließendem Herausschneiden des beschädigten DNS-Teiles kommt.

Der Einsatz des fehlenden DNS-Stückes erfolgt mit Hilfe des intakten Stranges als Matritze für den Einbau der korrekten Basensequenz. Schließlich werden die freien 5'-P und 3'-OH-Enden durch eine DNS-Ligase miteinander verestert<sup>11</sup>. Insbesonders die Untersuchungen von CLEAVER und PAINTER<sup>7,8</sup> untermauerten den Mechanismus der Reparaturvorgänge in normalen Zellen. Dabei konnte auch die Pathogenese einer Erbkrankheit aufgeklärt werden. Zellen von an *Xeroderma pigmentosum* erkrankten Personen können UV-Schäden, die in der DNS dieser Zellen gesetzt worden waren, nur zu einem geringen Teil ausbessern. Es konnte nachgewiesen werden, daß das Fehlen oder die Blockierung einer Endonuclease dafür verantwortlich ist<sup>9,10</sup>.

Die hier beschriebene Methode soll vor allem als Schnelluntersuchung zur Erkennung der Hemmung der Exonuclease und Polymerasereaktion des Dunkelreparaturvorganges dienen und erfaßt nicht die unabhängig von diesen Reaktionen ablaufenden Rekombinationsreparaturvorgänge. Will man die Endonucleasereaktion des Dunkelreparationsvorganges mit erfassen, dann muß man an Stelle der hier verwendeten ionisierenden Strahlung UV-Licht zur Schaden-

setzung verwenden. Zur Erkennung einer Ligasereaktionshemmung sind Gradientenzentrifugationen in alkalischer Sucrose notwendig<sup>14</sup>.

Durch die Vielzahl der Verbindungen bedingt, die es wertvoll erscheinen lassen, in Hinsicht auf eine Hemmung der DNS-Synthese oder DNS-Reparatur getestet zu werden, war es notwendig, in Anlehnung an bekannte Literaturzitate<sup>12,13</sup> eine modifizierte Methode auszuarbeiten, die eine rasche Aussage über die zu testende Substanz vermittelt.

## Material und Methodik

### 1. Zellmaterial

Für die Untersuchungen wurden sowohl Mausmilz-Zellen als auch DNS-haltige Zellen im Rattenvollblut verwendet.

Weiß Mäuse (Swissmice) — 3 Monate alt, beiderlei Geschlechts — wurden durch Dekapieren getötet, die Milz sofort entfernt, in kaltes Hank's-Medium<sup>15</sup> gegeben, mit der Hand schonend in einem Potter-Homogenisator eine Zellsuspension hergestellt, dann bei 2000 U/min (Christ Junior Kühlzentrifuge) zentrifugiert, 3 mal mit Hank's-Medium gewaschen, für die Weiterverarbeitung im gleichen Medium suspendiert und auf die einzelnen Ansätze verteilt.

Weiß Ratten (Sprague Dawley) — 5 Monate alt, beiderlei Geschlechts — wurden durch Ausbluten getötet, das Blut durch Liquemin (Hoffmann-La Roche) an der Gerinnung gehindert, in sterilem Hank's-Medium (1:1) aufgenommen und auf die einzelnen Ansätze zur Weiterverarbeitung verteilt.

### 2. Testsubstanzen

Als Testsubstanzen wurden das Detergenz Tween 80 und das Anti-Leukämie Mittel *cis*-Dichlordiaminoplatin ausgewählt<sup>16,17,1</sup>. Tween 80 wurde in Konzentrationen von 2 µg, 25 µg, 100 µg und 200 µg/ml Ansatz, *cis*-Dichlordiaminoplatin in Konzentrationen von 50 und 100 µg/ml Ansatz eingesetzt.

### 3. Hydroxyharnstoff

Die normale DNS-Synthese wurde mit Hydroxyharnstoff unterdrückt. Dadurch wurde die Beobachtung der Reparaturvorgänge unabhängig von der semikonservativen DNS-Synthese erleichtert. Einige Autoren arbeiteten mit einer Hydroxyharnstoff-Konzentration von  $2,0 \cdot 10^{-3} M^{18-21}$ . In der vorliegenden Arbeit wurde eine Konzentration von  $5,0 \cdot 10^{-3} M$  bis  $10^{-2} M$  als optimal gefunden (Abb. 1). Dieser Konzentrationsbereich zeigte bei den Voruntersuchungen gleiche Wirkung.

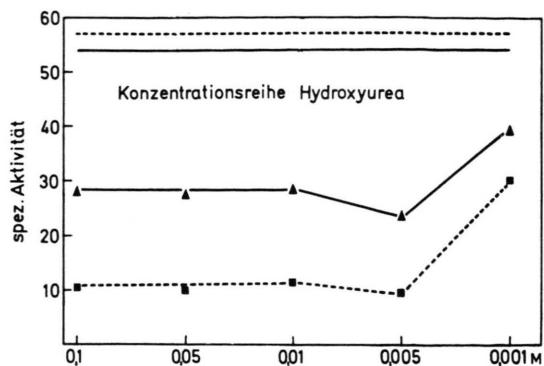


Abb. 1. DNS-Reparatur in Abhängigkeit verschiedener Hydroxyharnstoff-Konzentration.

▲ Ansatz mit Hydroxyharnstoff, bestrahl.  
■ Ansatz mit Hydroxyharnstoff, unbestrahl.  
— Kontrolle bestrahl.  
- - - Kontrolle unbestrahl.

### 4. Die Versuchsansätze

Für jeden Versuch wurden 8 Ansätze mit je 8 ml Zellsuspension vorbereitet (Zellzahl 1,2 bis 1,5 ·  $10^8/ml$ ), um alle Parameter unmittelbar vergleichen zu können. Die Zugabe der Testsubstanzen bzw. von Hydroxyharnstoff erfolgte nach unten angeführter Tabelle.

Tab. Anordnung der Versuchsansätze.

An- satz	Be- strahlt	Hy- droxy- harn- stoff	Test- sub- stan- z	Bemerkung
1	—	—	—	normale semikonservative DNS-Synthese
2	+	—	—	durch Gamma-Strahlen unterdrückte normale DNS-Synthese plus erhöhte Reparatur-Replikation
3	—	—	+	durch Testsubstanz beeinflusste normale DNS-synthese
4	+	—	+	Einfluß der Testsubstanz auf Reparatur-Replikation und normale DNS-Synthese nach Gamma-Bestrahlung
5	—	+	—	unterdrückte DNS-Synthese
6	+	+	—	unterdrückte DNS-Synthese plus erhöhte Reparatur-Replikation
7	—	+	+	Einfluß der Testsubstanz auf die unterdrückte DNS-Synthese
8	+	+	+	Einfluß der Testsubstanz auf die DNS-Reparatur

Die gut durchmischten Ansätze wurden 60 min bei 37 °C vorinkubiert und im gleichen Medium bestrahlten.

### 5. Bestrahlung

Als Strahlenquelle stand eine  $^{60}\text{Co}$ -Anlage mit einer Gesamtaktivität von 12 kCi und einer derzeitigen Dosisleistung von 1,05 Mrad/h zur Verfügung. Die Proben wurden in einem Behälter, der mit Eiswasser gefüllt war, mittels Rohrpost in die zentrale Bestrahlungsposition gebracht. Die Dosisleistung der Zentralposition wurde mit Hilfe der FRICKE<sup>22</sup> und KLAMERTH, KOCSIS<sup>23</sup> Dosimetrie bestimmt. An Hand einer Bestrahlungsreihe wurde für diese Versuche eine Dosis von 60 Krad gewählt (Abbn. 2 und 3).

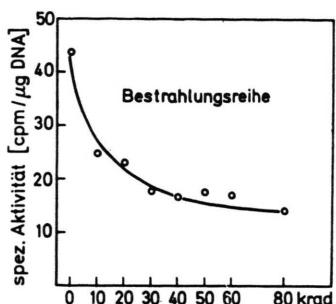


Abb. 2. Einfluß verschiedener hoher Gammastrahlen-Dosen auf die DNS-Synthese bei gleichzeitig durch die Strahlung induzierter Reparatur-Replikation.

○ —— ○ Kontrolle bestrahlt.

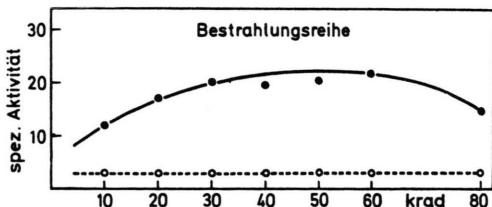


Abb. 3. Einfluß verschiedener hoher Gammastrahlen-Dosen auf die DNS-Reparatur.

○ - - - ○ Ansatz mit Hydroxyharnstoff, unbestrahl.  
● —— ● Ansatz mit Hydroxyharnstoff, bestrahlt.

### 6. Verfahren

Unmittelbar nach der Bestrahlung wurde pro Ansatz 40 µCi  $^3\text{H}$ -(Methyl)-Thymidin (NEN, spez. Aktivität 50 Ci/mMol) zugesetzt, entsprechend einer Konzentration von 5 µCi/ml. Einer guten Durchmischung folgte der Einbau der markierten DNS-Vorstufe bei 37 °C, wobei zu den Zeiten 5, 10, 15 und 30 min Proben zu je 2 ml entnommen wurden. Diese Zellsuspensionen wurden sofort in eiskalte 10-proz. Trichloressigsäure (TCA) — Endkonzentration 5-proz. TCA- bzw. 12-proz. Perchlorsäure (PCA) — Endkonzentration 6-proz. PCA-pipettiert, um die Reaktion exakt zu stoppen. Jede der entnommenen Proben wurde nach Abbruch der Reaktion 30 min bei 0 °C belassen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4000 U/min,

worauf 3 mal mit eiskalter 5-proz. TCA bzw. 6-proz. PCA gewaschen wurde. Das Zellsediment wurde bei minus 25 °C eingefroren und hierauf nach 3 maligem Waschen (5-proz. TCA bzw. 6-proz. PCA) eine heiße Extraktion des DNS durchgeführt<sup>24</sup>. Nach einer Zentrifugation wurde der klare Überstand abpipettiert und zur weiteren Bestimmung verwendet. Bei Anwendung von TCA als Extraktionsmittel wurde eine 4 malige Ätherextraktion angeschlossen, um bessere Ausbeuten bei der Aktivitätsmessung zu erhalten. Außerdem wurden die von TCA befreiten Proben vor der Aktivitätsbestimmung schonend zur Trockene eingedampft. Als Szintillator wurde bei Verwendung von TCA, Toluol/0,03% POPOP/0,4% PPO, bei Verwendung von PCA, Toluol: Triton X-100 (1:1)/0,03% POPOP/0,4% PPO, eingesetzt. Die DNS-Bestimmung erfolgte mit Diphenylamin nach SCHNEIDER bzw. BURTON<sup>25,24</sup>. Die DNS-Menge wurde an Hand einer Eichkurve ermittelt.

### Ergebnisse und Diskussion

Die auf spezifische Aktivität (Impulse/min/µg DNS) bezogenen Ergebnisse in Bezug auf das Deter-

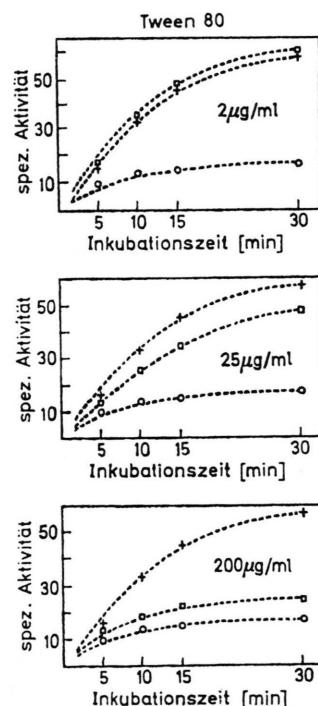


Abb. 4. Einfluß der Tween 80-Konzentration auf die DNS Synthese.

○ - - - ○ Ansatz mit Hydroxyharnstoff, unbestrahl.  
+ - - - + Kontrolle unbestrahl.  
□ - - - □ Ansatz mit Tween 80, unbestrahl.

genz Tween 80, das als Ko-Karzinogen und Reparaturhemmer bekannt ist<sup>1</sup>, ergaben für beide Zellkulturen einen sehr ähnlichen Kurvenverlauf. Der Einfluß der verschiedenen hohen Tween 80 Konzentrationen wird in der Abb. 4 deutlich. Die Unterdrückung der semikonservativen DNS-Synthese ist erst bei den Konzentrationen 100 bzw. 200 µg/ml hoch signifikant, während sich bei 2 µg/ml kein Effekt zeigte und auch bei 25 µg/ml erst eine schwache Unterdrückung bemerkbar ist.

Die Wirksamkeit von Tween 80 auf die untersuchten DNS-Reparaturvorgänge wird durch den Verlauf der aus den Proben der Ansätze 5 bis 8 erhaltenen Kurven klar ersichtlich (Abb. 5). Ist bei der

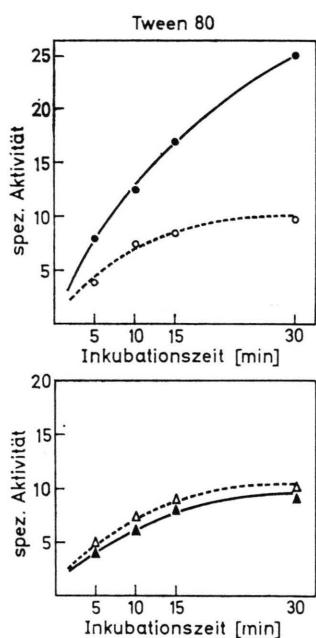


Abb. 5. Einfluß von Tween 80 auf die DNS-Reparatur-Synthese.

- ----- ○ Ansatz mit Hydroxyharnstoff, unbestrahl.
- ----- ● Ansatz mit Hydroxyharnstoff, bestrahl.
- ▲ ----- ▲ Ansatz mit Hydroxyharnstoff und Tween 80, bestrahl.
- △ ----- △ Ansatz mit Hydroxyharnstoff und Tween 80, unbestrahl.

Gegenüberstellung der Ergebnisse aus den Ansätzen 5 und 6 deutlich erhöhte Reparaturreplikation erkennbar, findet also eine Reparatur des gesetzten Strahlenschadens an der DNS statt, so zeigt sich bei den Ansätzen 7 und 8 nach Einsatz einer Tween 80 Konzentration von 200 µg/ml eine 100-proz. Unterdrückung des Reparaturvorganges, das heißt, der gesetzte Strahlenschaden an der DNS bleibt bestehen. Die Konzen-

tration von 25 µg/ml, die GAUDIN und Mitarbeiter<sup>1</sup> bereits untersuchten, bringt in Übereinstimmung mit diesem Zitat eine etwa 50-proz. Unterdrückung der DNS-Reparatur mit sich. Bei dieser Konzentration ist die DNS-Reparatur deutlicher gehemmt als die semi-konservative DNS-Synthese.

Der Anti-Tumoreffekt von seltenen anorganischen Platinverbindungen wurde von ROSENBERG<sup>27</sup> berichtet. Dabei wurde auf die antileukämischen Effekte des Platins hingewiesen. HOWLE und GALE<sup>28</sup> berichten über eine direkte Bindung an die DNS. Es war naheliegend, diese Substanz auf eine eventuelle Reparaturhemmung hin zu untersuchen. Die vorliegenden Versuche haben gezeigt, daß *cis*-Dichlordiaminoplatin die Reparatur nicht hemmt (Abb. 6).

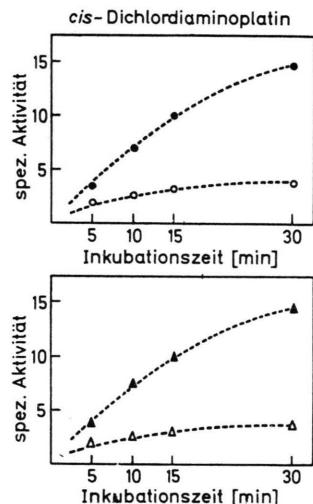


Abb. 6. Einfluß von *cis*-Dichlordiaminoplatin auf die DNS-Reparatur.

- ----- ○ Ansatz mit Hydroxyharnstoff, unbestrahl.
- ----- ● Ansatz mit Hydroxyharnstoff, bestrahl.
- ▲ ----- ▲ Ansatz mit Platinverbindung, bestrahl.
- △ ----- △ Ansatz mit Platinverbindung, unbestrahl.

Eine selektive Hemmung der DNS-Synthese, wie sie bei einer Konzentration von 5 µM bei Amnion AV<sub>3</sub> Zellen<sup>26</sup> gefunden wurde, konnte bei den hier eingesetzten Konzentrationen nicht festgestellt werden. Vielmehr wurde deutlich, daß in den unbestrahlten Proben, denen Platin zugesetzt worden war, ein erhöhter Thymidineinbau stattfand (Abb. 7). Dies würde darauf schließen lassen, daß die durch Platin verursachten Quervernetzungen sofort ausrepariert werden, was auch von ROBERTS<sup>29</sup> bestätigt wurde.

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Forschungs-kontraktes Nr. 1053/RB der IAEA durchgeführt und unterstützt.

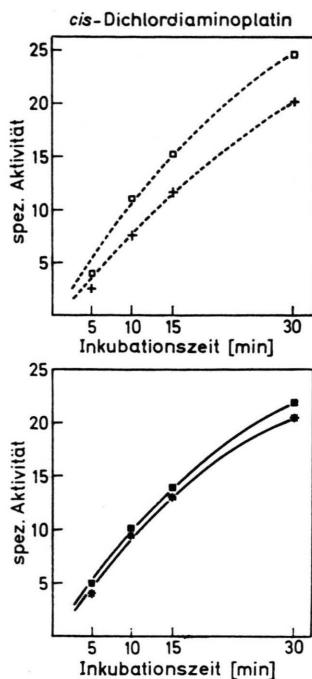


Abb. 7. Einfluß von *cis*-Dichlordiaminoplatin auf die DNS-Synthese.

- - - - □ Ansatz mit Platinverbindung, unbestrahl.
  - + - - + Kontrolle unbestrahl.
  - — ■ Ansatz mit Platinverbindung, bestrahl.
  - \* — \* Kontrolle bestrahl.
- \* Die Reproduzierbarkeit der Einzelergebnisse ist außerordentlich gut. Die mittlere Fehlerbreite der Meßwerte beträgt nach einer Einbauzeit von 5 min 6%, nach 10 min 3%, sowie nach 15 und 30 min 2%.

- 1 D. GAUDIN, R. S. GREGG u. K. L. YIELDING, Biochem. Biophys. Res. Commun. **45**, 630 [1972].
- 2 D. GAUDIN, K. L. YIELDING, A. STABLER u. J. BROWN, P. S. E. B. M., **137**, 202 [1971].
- 3 D. K. MYERS, Int. J. Radiat. Biol., **19**, 293 [1971].
- 4 Z. FUKS u. K. C. SMITH, Radiat. Res., **48**, 63 [1971].
- 5 H. ALTMANN, Ärztliche Praxis, **87**, 3989 [1971].
- 6 H. ALTMANN u. R. EBERL, Wiss. Z. Friedrich-Schiller Univ. Jena/Thür., math.-naturwiss. R., **20**, H. 2/3 [1971].

- 7 J. E. CLEAVER u. R. B. PAINTER, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **161**, 552 [1968].
- 8 R. B. PAINTER u. J. E. CLEAVER, Radiat. Res. **37**, 451 [1969].
- 9 J. E. CLEAVER, Nature [London] **218**, 652 [1968].
- 10 J. E. CLEAVER, Int. J. Radiat. Biol. **18**, 557 [1970].
- 11 P. HOWARD-FLANDERS u. R. P. BOYCE, Radiat. Res. Supp. **1**, 156 [1966].
- 12 P. SPIEGLER u. A. NORMAN, Radiat. Res. **39**, 400 [1969].
- 13 R. G. EVANS u. A. NORMAN, Radiat. Res. **36**, 287 [1968].
- 14 H. ALTMANN, IAEA techn. report, Sept. [1972].
- 15 H. J. HANKS u. E. R. WALLACE, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **71**, 196 [1949].
- 16 B. J. LEONARD, E. ECCLESTON, D. JONES, P. TODD u. A. WALPOLE, Nature [London] **234**, 43 [1971].
- 17 J. J. ROBERTS u. J. M. PASCOE, Nature [London] **235**, 282 [1972].
- 18 H. S. ROSENKRANZ, A. J. GARRO, J. A. LEVY u. H. S. CARR, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **114**, 501 [1966].
- 19 H. S. ROSENKRANZ, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **138**, 645 [1967].
- 20 H. S. ROSENKRANZ, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **161**, 428 [1968].
- 21 I. H. KRAKOFF, N. C. BROWN u. P. REICHARD, Cancer Res. **28**, 1559 [1968].
- 22 H. FRICKE u. S. MORSE, Amer. J. Roentgenol. Radium Therapy **18**, 426 [1927].
- 23 O. L. KLAMERT u. F. KOCSIS, Int. J. Radiat. Biol. **14**, 293 [1968].
- 24 C. W. SCHNEIDER, J. biol. Chemistry **161**, 293 [1945].
- 25 K. BURTON, Biochem. J. **62**, 315 [1956].
- 26 C. H. HARDER u. B. ROSENBERG, Int. J. Cancer. **6**, 207 [1970].
- 27 B. ROSENBERG, L. VAN CAMP, E. J. TROSKO u. H. V. MANSOUR, Nature [London] **222**, 385 [1969].
- 28 A. J. HOWLE u. R. G. GALE, Biochem. Pharmacol. **19**, 2757 [1970].
- 29 J. J. ROBERTS, Hoest-Symposium, Vortrag (Oktober 1971).
- 30 W. KLEIN, F. KOCSIS, R. EBERL u. H. ALTMANN, SGAE-Bericht, Preprint BL-51, Nov. 1972.
- 31 R. EBERL, W. KLEIN, F. KOCSIS u. H. ALTMANN, SGAE-Bericht, Preprint BL-53, Dez. 1972.
- 32 H. TUSCHL, W. KLEIN, F. KOCSIS, E. BERNAT u. H. ALTMANN, SGAE-Bericht, Preprint BL-59, März 1973.