

Wechselwirkungen der DNA-Topoisomerase-Hemmstoffe Novobiocin und Nalidixinsäure mit einigen zytotoxischen Agentien.

In-vitro-Untersuchungen an Thymus- und Milzzellen der Ratte

Interactions of the DNA-Topoisomerase Inhibitors Novobiocin and Nalidixic Acid with some Cytotoxic Agents. *In vitro* Investigations in Thymic and Splenic Cells of the Rat

Karlheinz Tempel

Arbeitsgruppe Radiologie am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München, Königinstraße 16, D-8000 München 22, Bundesrepublik Deutschland

Z. Naturforsch. **44c**, 673–679 (1989); received February 13/March 14, 1989

Novobiocin, Nalidixic Acid, Cytotoxic Agents, Rat Thymic Cells, Rat Splenic Cells

Interactions of novobiocin (NB) and/or nalidixic acid (NA) with some cytotoxic agents – UV light (UV), X-rays, methylmethanesulfonate (MMS), bleomycin (BM), adriamycin (AM), *cis*-diaminedichloroplatinum(II) (CDDP), mitomycin C (MIT), ethidiumbromide (EB), and suramin (SA) – have been investigated in thymic (T) and splenic (S) cells of the rat *in vitro* by measuring semiconservative (SDS) and unscheduled (UDS) DNA synthesis as well as sedimentation and viscosity of nucleoids. – Combining NB (900 µg/ml) and/or NA (1800–3600 µg/ml) with UV, MMS, BM, AM, MIT, and SA resulted in additive effects on SDS and UDS. Synergistic actions were observed in T- and S-cells simultaneously treated by NB and CDDP, whereas the effects of NB could be antagonized to some extent by EB and *vice versa*. In X-irradiated (≥ 28 Gy) cells pretreated by NB (NA), UDS was diminished (T-cells) or enhanced (S-cells). – The results are consistent with the following postulates: 1° in S-cells, DNA is much more supercoiled than in T-cells but in the opposite sense (positive superhelicity). 2° DNA supercoiling (DNA compactness) is influenced therefore by DNA-topoisomerase inhibitors and intercalating agents in a highly agent- and cell-specific manner.

Einleitung

Desoxyribonukleinsäure (DNA) – Topoisomerase-Hemmstoffe [1] können die Empfindlichkeit von Säugerzellen gegenüber physikalischen [2–4] und chemischen Noxen [3–6] erhöhen. Versuche, Tumorzellen gegenüber zytostatischen bzw. zytotoxischen Agentien zu sensibilisieren, wurden vor allem mit dem Coumarin-Derivat Novobiocin (NB) und dem Chinolon Nalidixinsäure (NS) durchgeführt [2–6], ohne daß die Fragen nach dem molekularen Wirkungsmechanismus und der zellulären Wirkungsspezifität von Sensibilisierungseffekten eindeutig beantwortet werden konnten. Modelluntersuchungen wurden auch an Thymus(T)- und Milz(M)-Zellen der Ratte durchgeführt [7]. Dabei ergab sich, daß die DNA in T-Zellen unter dem Einfluß von NB und NS für die DNA Polymerase β zugänglicher (engl. „more accessible“) wird, wobei es auch zu Änderungen der DNA-Kompaktierung kommen kann [7]. Unter der Annahme, daß die DNA von T-Zellen bei Einwir-

kung von NB oder NS auch von exogenen Agentien leichter erreicht wird, wäre u. a. zu erwarten, daß NB und NS T-Zellen spezifisch gegenüber DNA-schädigenden bzw. zytostatisch wirksamen Agentien sensibilisieren. Zur Prüfung dieser Hypothese wurde daher die Kombinationswirkung von NB bzw. NS und verschiedenen DNA-Synthese-Hemmstoffen mit unterschiedlichen Wirkungsmechanismen (Röntgenstrahlen, UV-Licht, Adriamycin, Bleomycin, Mitomycin C, *cis*-Diaminodichlorplatin, Ethidiumbromid und Suramin) auf T- und M-Zellen der Ratte *in vitro* untersucht. Schädigungskriterien waren die semikonservative (SDS) und unprogrammierte (hydroxyharnstoffresistente, „unscheduled“) (UDS) DNA-Synthese sowie die Sedimentierbarkeit und Viskosität von Nukleoiden.

Material und Methodik

Die Zellen stammten von weiblichen Sprague-Dawley-Ratten aus institutseigener, konventioneller Zucht. Die Tiere unterlagen einem 12stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus und erhielten handelsübliches Versuchstierfutter (Alma-Standard-Diät

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. K. Tempel.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0341–0382/89/0700–0673 \$ 01.30/0

H 1003, F. Botzenhardt KG, Kempten) und Leitungswasser *ad libitum*. Bei den Reagentien handelte es sich um Präparate der Firmen Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma (München) und EGA-Chemie (Steinheim am Albuch). Für die Überlassung von Bleomycin (BM), Doxorubicinhydrochlorid (Adriamycin, AM), Suramin (SA) bzw. *cis*-Diaminodichlorplatin (Cisplatin) danke ich den Firmen Mack (Illertissen), Farmitalia Carlo Erba (Freiburg), Bayer (Leverkusen) bzw. Rhone-Poulenc (Norderstedt). Zur Markierung der DNA diente [Methyl- ^3H] Thymidin (dT- ^3H , sterile wäßrige Lösung, 1,85–2,96 TBq/mmol, Präparat NET 027 Z, New England Nuclear). Als Szintillatormischung wurde Quickszint 402 der Firma Zinsser (Frankfurt) verwendet.

Die Zellgewinnung folgte der laborüblichen Methode [7]. Die DNA-Synthese wurde über den Einbau von dT- ^3H in die säurefällbare (Perchlorsäure-Endkonzentration 1 mol/l) Zellfraktion ermittelt (*ibid.*). Als Bezugswerte der Radioaktivität dienten die Zellzahl bzw. die DNA-Konzentration der Hydrolysate. Sie wurde spektrophotometrisch bei 260 nm ermittelt. Zur Bestimmung der UDS wurde der dT- ^3H -Einbau in Gegenwart von 10^{-2} mol Hydroxyharnstoff (HU)/l gemessen. Um Hinweise auf den Relaxationsgrad bzw. die superhelikale Struktur der DNA zu erhalten, wurden die Nukleoid-Sedimentation [8] und die Nukleoid-Viskosität [9] von entsprechenden T- und M-Zellaufschlüssen gemessen. Zur Testung der Wechselwirkung von NB bzw. NS und den DNA-synthesehemmenden Agentien wurden T- und/oder M-Zellsuspensionen zunächst 30 min bei 37 °C mit NB oder NS vorinkubiert (1 ml Zellsuspension + 100 µl NB- bzw. NS-Stammlösung), dann dreimal mit Hanks-Lösung gewaschen und unmittelbar vor (UV-Licht, Röntgenbestrahlung) bzw. zu Beginn der sich an die Vorinkubation anschließenden dT- ^3H -Markierungsphase mit den gleichfalls in Hanks-Lösung aufgenommenen Testsubstanzen inkubiert. Als Vergleichsproben dienten die ohne NB oder NS bzw. die DNA-Synthese-Hemmstoffe, aber mit entsprechenden Lösungsmittelzusätzen vorinkubierten bzw. der 90minütigen Markierungsphase unterworfenen Ansätze. NB und NS sowie die Testsubstanzen wurden vor jeder Tagesversuchsreihe frisch gelöst. Die Konzentrationen ihrer Stammlösungen entsprachen den bei Zusatz zur Vorinkubation bzw. zum Markierungsansatz gegebenen Verdünnungsfaktoren.

Zur UV-Licht- oder Röntgenbestrahlung der Zellen dienten die laborüblichen Methoden [7].

Alle angegebenen Werte stellen arithmetische Mittel von je 2–4 Dreifachbestimmungen dar.

Ergebnisse

Allgemeine Feststellungen

Durch NB wird die SDS von T- und M-Zellen konzentrationsabhängig gehemmt. Die DE_{50} -Werte (Konzentrationen 50%iger Wirkung) liegen im Bereich von 1000 bzw. 1400 µg NB/ml [7]. Prinzipielle zellspezifische Besonderheiten zeigte dagegen die UDS bei Vorinkubation der Zellen mit NB-Konzentrationen > 450 µg/ml: Während sich der dT- ^3H -Einbau in die DNA von M-Zellen konzentrationsabhängig bis auf Werte unter den HU-resistenten dT- ^3H -Einbau vermindert (DE_{50} -Werte im Bereich von 900 µg/ml), wird die UDS von T-Zellen bei NB-Konzentrationen > 450 µg/ml um mehr als 100% aktiviert ([7], jetzt keine eigene Darstellung). Durch NS (450–1800 µg/ml) wurden SDS und UDS in T-Zellen um maximal 100, in M-Zellen um maximal 30% erhöht [7]. In den vorliegenden Untersuchungen wurden zunächst die SDS und UDS von T-Zellen unter der kombinierten Einwirkung von NB (900 µg/ml) und verschiedenen zytotoxischen Agentien in 3–4 aufgrund von Vorversuchen ausgewählten Dosierungen untersucht. Bei signifikanten Abweichungen von additiven Effekten wurden auch Milzzellen sowie NS in die Versuche einbezogen.

UV-Licht, Methylmethansulfonat, Adriamycin und Suramin ergaben keine Unterschiede zwischen Kontroll- und NB-Ansätzen. Die Stimulierung der SDS durch Bleomycin und der UDS durch Mitomycin lag an der Signifikanzgrenze (Tab. I). Hochsignifikante Unterschiede zwischen den Vergleichsansätzen wurden demgegenüber bei Kombination von NB mit Röntgenbestrahlung (Abb. 1), Ethidiumbromid (Abb. 2) und Cisplatin (Abb. 3) deutlich.

NB bzw. NS und Röntgenbestrahlung

Nach Röntgenbestrahlung von T- und M-Zellen *in vitro* nahm die SDS dosisabhängig um maximal 25–30% ab. Signifikante Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen waren nicht gegeben (Abb. 1). Unter den gleichen Bedingungen erhöhte sich die UDS ohne NB-Vorbehandlung bei T-Zellen um maximal 30%, bei M-Zellen nur um maximal 8%.

Tab. I. Semikonservativer (SDS) und unprogrammierter (UDS) dT-³H-Einbau in die säurefällbare Fraktion von Thymuszellen *in vitro* unter dem Einfluß von UV-Licht (UV), Methylmethansulfonat (MMS), Adriamycin (Doxorubicin, AM), Bleomycin (BM), Mitomycin C (MIT) oder Suramin (SA). Angaben in Prozent, bezogen auf die parallel inkubierten und aufgearbeiteten Kontrollansätze. Soweit die ohne und mit NB (900 mg/ml) vorinkubierten Ansätze keine Unterschiede aufwiesen, sind nur die Werte der NB-frei inkubierten Proben angegeben. Bei Unterschieden zwischen den Vergleichsproben (BM, MIT) finden sich die Werte der NB-Ansätze in der zweiten BM- bzw. MIT-Zeile. Alle Werte stellen arithmetische Mittel von mindestens 2 Dreifachbestimmungen mit Standardabweichung dar. – Dosierungen in der Reihenfolge der Spalten I, II, III und IV: UV: 32, 64, 96, 128 J m⁻², MMS: 11, 55, 110, 550 mg/ml (11 mg/ml = 10⁻⁴ mol/l), AM: 10, 20, 40, 80 mg/ml, BM: 40, 80, 120, 160 mg/ml, MIT: 0,334, 3,34, 33,4 mg/ml (0,334 mg/ml = 1 mmol/l), SA: 1, 10, 100 mg/ml. – Zur Größenordnung des dT-³H-Einbaus unter Kontrollbedingungen in 8 voneinander unabhängigen Versuchsreihen: T-Zellen: SDS bzw. UDS: (6,5 ± 2,5) × 10⁶ bzw. (1,4 ± 0,6) × 10⁵ dpm/mg DNA, M-Zellen: SDS bzw. UDS: (1,5 ± 0,8) × 10⁶ bzw. (2,5 ± 0,6) × 10⁵ dpm/mg DNA.

	SDS				UDS			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
UV	98,5 6,0	96,7 2,3	64,2 13,9	64,8 13,4	132,3 0,8	121,0 4,5	130,0 4,0	126,5 6,0
MMS	95,5 5,8	98,1 3,7	58,0 3,0	6,4 0,8	98,4 1,6	94,0 0,2	86,9 4,9	53,8 6,9
AM	95,0 3,6	65,0 3,3	33,0 3,5	17,0 1,2	80,0 1,2	69,4 2,6	59,8 2,2	47,0 1,9
BM	96,1 4,3 101,5 1,2	90,0 2,8 107,8 6,4	92,8 2,0 111,9 8,6	88,7 3,8 111,3 3,2	94,0 14,8 103,0 4,6	102,0 25,0 109,0 6,6	114,0 10,2 124,0 5,4	119,0 13,0 122,0 5,4
MIT	98,0 8,0 92,0 7,0	97,0 5,0 94,0 6,0	96,0 5,0 93,0 4,0	– – – –	87,1 11,7 99,6 12,8	87,8 8,0 97,2 11,3	87,8 12,3 96,9 11,6	– – – –
SA	116,6 1,7	120,5 0,5	84,7 3,8	– –	91,2 3,5	80,9 3,5	74,0 10,8	– –

Der auffälligste Kombinationseffekt von NB und hochdosierter (≥28 Gy) Bestrahlung bestand demgegenüber bei T-Zellen in einer dosisabhängig fortschreitenden Hemmung und bei M-Zellen in einer Aktivierung der UDS. Bei der höchsten Strahlendosis (70 Gy) lagen die dT-³H-Einbauraten von T-Zellen somit 30% unter, jene von M-Zellen rund 50% über den UDS-Werten der nicht mit NB vorinkubierten Zellen. Ersatz von NB durch NS (1800–3600 µg/ml) führte zu analogen Ergebnissen (keine eigene Darstellung).

NB bzw. NS und Ethidiumbromid (EB)

Durch EB in Konzentrationen von 10–80 µg/ml wurde die SDS von T- und M-Zellen konzentrationsabhängig um maximal 90 bzw. 50% gehemmt. Vorbehandlung der Zellen mit NB und NS schwächte

den EB-Effekt – besonders ausgeprägt bei M-Zellen – ab (Abb. 2). Ähnlich wie die SDS wurde die UDS von T-Zellen durch EB konzentrationsabhängig vermindert. EB-vorbehandelte M-Zellen zeigten hier eine etwa 10%ige Aktivierung. NS wirkte gleichsinnig aber schwächer (Abb. 2). Die durch NB bei M-Zellen ausgelöste ca. 50%ige Hemmung der UDS wurde durch EB konzentrationsabhängig abgeschwächt und schließlich aufgehoben, so daß die dT-³H-Einbauraten im Kombinationsversuch mit NB und 80 µg EB pro ml Ansatz mehr als 100% über den Werten der nichtkombiniert exponierten Zellen (und somit im Kontrollbereich) lagen. NS hatte hier keinen nachweisbaren Effekt (Abb. 2).

NB bzw. NS und Cisplatin

Nach Vorbehandlung der Zellen mit Cisplatin verminderte sich die SDS beider Zellarten konzentra-

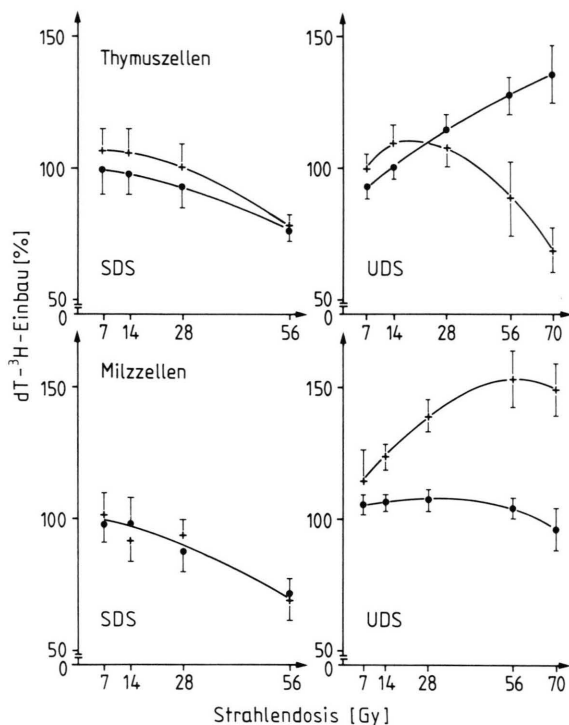


Abb. 1. SDS und UDS von Thymus- und Milzzellen *in vitro* nach Röntgenbestrahlung. Angaben in Prozent, bezogen auf die ohne bzw. mit NB vorinkubierten Kontrollansätze. ●—●: ohne Vorbehandlung mit NB; +—+: nach 30 min Vorinkubation der Zellen mit 900 µg NB/ml.

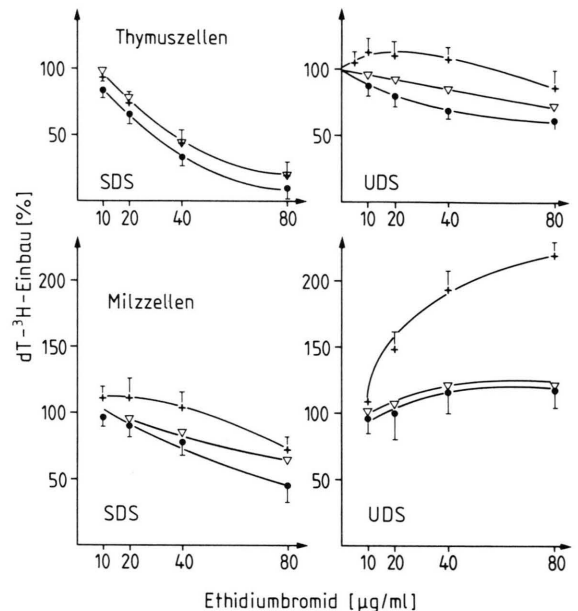


Abb. 2. SDS und UDS von Thymus- und Milzzellen *in vitro* unter dem Einfluß von Ethidiumbromid. Angaben in Prozent, bezogen auf die ohne bzw. mit NB vorinkubierten Kontrollansätze. ●—●: ohne Vorbehandlung mit NB; +—+: nach 30 min Vorinkubation der Zellen mit 900 µg NB/ml; ▽—▽: nach 30 min Vorinkubation der Zellen mit 1800 µg NS/ml.

tionsabhängig um maximal 10–20%, während die UDS bis zum 1,7- bzw. 1,5fachen der Kontrollansätze zunahm (Abb. 3). Die Kombination von NB und Cisplatin hatte so lange keinen wesentlichen Einfluß auf diese Ergebnisse, als beide Substanzen nacheinander (Cisplatin-Zusatz nach Auswaschen von NB) auf die Zellen einwirkten. Bei gleichzeitigem Zusatz beider Verbindungen wurden dagegen die Hemmung des semikonservativen dT-³H-Einbaus durch Cisplatin hochgradig verstärkt und die – bei alleiniger Gabe von Cisplatin stimulierte – UDS in Abhängigkeit von der Konzentration der Platinverbindung um maximal 90% (T-Zellen) bzw. 50% (M-Zellen) gehemmt (Abb. 3).

Sedimentation und Viskosität der Nukleotide

Nukleotide von T- bzw. M-Zellen, die mit NB (≥ 900 µg/ml) inkubiert werden, durchlaufen bei Se-

dimentation im neutralen Saccharosegradienten eine etwa 50% bzw. 100% längere Sedimentationsstrecke als die Kontrollen. Auch in extrem hohen Konzentrationen (z.B. von 3600 µg/ml) erhöhte NS demgegenüber die Nukleoidsedimentation beider Zellarten nur unwesentlich [7]. Die Viskosität von T- und M-Zellaufschlüssen unter dem Einfluß der beiden Antibiotika zeigt Abb. 4: Während sich die Viskosität von M-Zell-Nukleoiden – nach Einwirkung von NB rascher als nach NS – konzentrationsabhängig verminderte, zeigte die Viskosität der T-Zell-Nukleotide einen ausgeprägten (NB) oder andeutenden (NS) Anstieg mit Maximum bei 900 µg/ml. Auf diesen Anstieg folgte bei NB ein Abfall auf den Ausgangswert, nach Vorbehandlung der T-Zellen mit NS ein solcher auf Werte, die 30% unter den Vergleichsansätzen lagen (Abb. 4). In Gegenwart von EB (80 µg/ml) nahm die Viskosität der Nukleotide beider Zellarten ohne NB-Behandlung um etwa 30% ab. Dieser Ef-

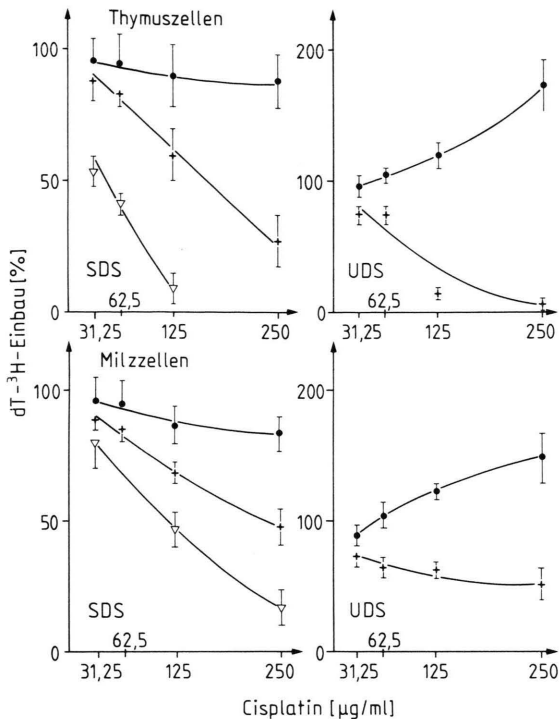


Abb. 3. SDS und UDS von Thymus- und Milzzellen *in vitro* nach Einwirkung von Cisplatin. Angaben in Prozent, bezogen auf die ohne bzw. mit NB vorinkubierten Kontrollansätze. ●—●: ohne Vorbehandlung mit NB; +—+: T- bzw. M-Zellen nach NB-Behandlung, ○—○ bzw. ▽—▽: nach gleichzeitiger Einwirkung von Cisplatin und 450, 675 bzw. 900 µg NB/ml.

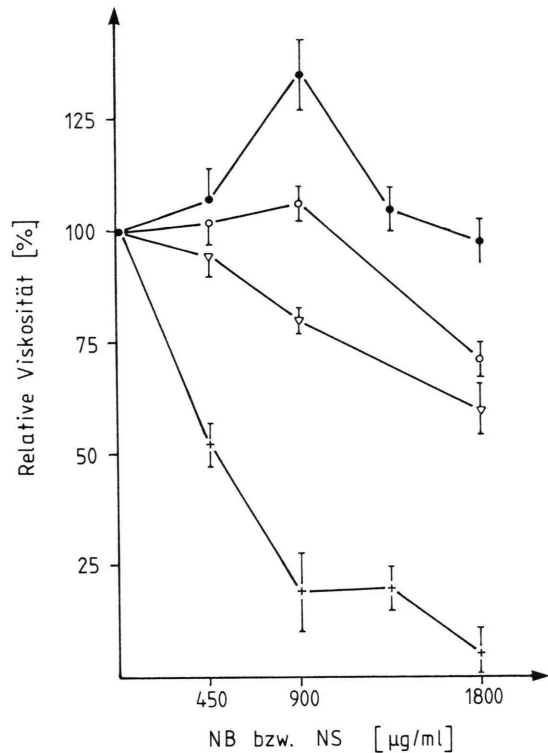
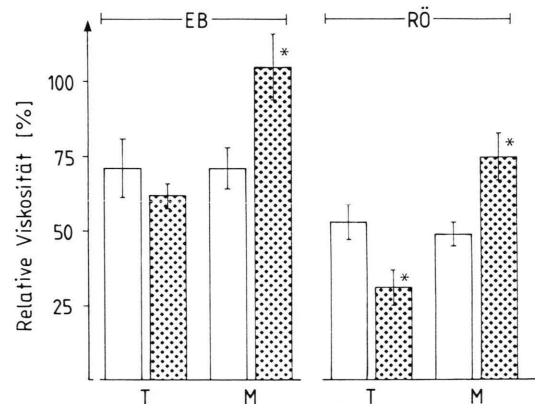


Abb. 4. Relative Viskosität der Nukleole von Thymus- und Milzzellen nach Einwirkung von NB und NS. Angaben in Prozent, bezogen auf die NB- bzw. NS-frei inkubierten Kontrollansätze. ●—● bzw. +—+: T- bzw. M-Zellen nach NB-Behandlung, ○—○ bzw. ▽—▽: T- bzw. M-Zellen nach NS-Einwirkung. Zellkonzentration in 5,5 ml Lysemedium: T-Zellen $6,25 \times 10^6$, M-Zellen $12,5 \times 10^6$ Zellen entsprechend Durchlaufzeiten (2-cm-Glaskapillare, Ø 0,8 mm, Zimmertemperatur) von 135 ± 20 bzw. 115 ± 18 s/2 ml in 4 voneinander unabhängigen Analysenreihen.

fekt war durch NB-Vorbehandlung bei M-Zellen, nicht dagegen bei T-Zellen aufzuheben (Abb. 5). Röntgenbestrahlung (28 Gy) reduzierte die Nukleoidviskosität beider Zellarten um etwa 50%. Bei NB-vorbehandelten T-Zellen verminderte sich dieser Wert weiter, während die Aufschlüsse NB-vorbehandelter und röntgenbestrahlter M-Zellen in der Nachbestrahlungsphase (Markierungsphase im SDS- bzw. UDS-Versuch) einen signifikanten Viskositätsanstieg erkennen ließen (Abb. 5). In der gewählten Testkonzentration von 125 µg/ml beeinflusste Cispla-

Abb. 5. Relative Viskosität der Nukleole von Thymus(T-) und Milz(M)-Zellen nach Einwirkung von Ethidiumbromid (EB) oder Röntgenbestrahlung (RÖ). Angaben in Prozent, bezogen auf die ohne bzw. mit NB vorinkubierten Kontrollansätze. Leersäulen: nach 90 min Inkubation mit EB (80 µg/ml) bzw. 90 min Inkubation im Anschluß an RÖ (28 Gy); punktierte Säulen: alle Zellen mit 900 µg NB/ml vorinkubiert; * $p < 0,05$.



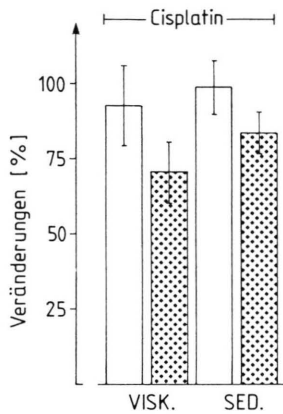


Abb. 6. Viskosität (VISK.) und Sedimentation (SED.) von Thymuszell-Nukleoiden nach Einwirkung von Cisplatin. Veränderungen in Prozent, bezogen auf die ohne bzw. mit NB vorinkubierten Kontrollansätze. Leersäulen: nach alleiniger Cisplatin-Einwirkung; punktierte Säulen: nach gleichzeitiger Einwirkung von NB (900 µg pro ml) und Cisplatin (125 µg/ml).

tin allein weder die Viskosität noch die Sedimentation der Nukleide (Abb. 6). NB-Vorbehandlung hatte – analog zum SDS- und UDS-Versuch – einen sensibilisierenden Effekt, sobald beide Stoffe gleichzeitig auf die Zellen einwirkten.

Diskussion

Allgemeine Feststellungen

Die vorliegenden Untersuchungen gingen von der Annahme aus, daß die DNA von T-Zellen unter dem Einfluß von NB (und NS) für nukleotoxische Agentien zugänglicher wird. Die in Tab. I zusammengefaßten Ergebnisse zeigen demgegenüber, daß die Wirkungen von UV-Licht, Methylmethansulfonat, Adriamycin, Bleomycin, Mitomycin C und Suramin durch NB nicht signifikant oder nur andeutungsweise (Bleomycin, Mitomycin C) beeinflusst werden. Deutliche Interaktionen wurden dagegen mit Röntgenbestrahlung, EB und Cisplatin erzielt (Abb. 1–3, Abb. 5 und 6), als deren Ursache für die Platinverbindung zellspezifisch unterschiedliche Kombinationseffekte auf die DNA-Kompaktierung ausgeschlossen werden konnten (Abb. 6). Die Problemstellung der Arbeit beschränkt daher die Diskussion zunächst auf die Wechselwirkungen von NB (und NS) mit EB bzw. Röntgenbestrahlung.

NB bzw. NS und Ethidiumbromid

NB und NS hemmen in Eukaryonten-Zellen von den DNA-Topoisomerasen bevorzugt den Typ II [1]. Abgesehen von dieser Gemeinsamkeit, unterscheidet sich NB von NS u. a. durch Schädigung mitochondrialer Strukturen mit der Folge einer Verminderung des ATP/ADP-Quotienten [10] und die Fähigkeit zur Histonpräzipitation [11, 12]. Letztere vermag – energieunabhängig – durch Entfernung von Histonen aus dem Zellkernchromatin stärker verdrehte, superhelikale DNA-Abschnitte (Chromatin I) in schwächer verdrehte, „relaxierte“ (Chromatin II) zu überführen [12]. Da die Stimulierung der UDS von T-Zellen [7] – bei NB-Konzentrationen um 900 µg/ml – mit einer Erhöhung der Nukleoidviskosität (Abb. 4) korreliert, kann gefolgert werden, daß während der Chromatinrelaxation – mit Maximum bei einem bestimmten NB/DNA-Konzentrationsverhältnis – eine vom DNA-Relaxationsgrad abhängige, aber zellspezifisch limitierte Anzahl von UDS-Startpunkten gebildet wird. Wird dieser Relaxationsgrad (Chromatin II) bei weiter steigender NB-Konzentration überschritten, kommt es zu neuerlicher DNA-Verdrillung in einem dem Ausgangszustand vor NB-Zusatz (Chromatin I) entgegengesetzten Sinn (Chromatin III). Dies hat zur Folge, daß die DNA von bestimmten Enzymen, wie der DNA-Polymerase β , zunehmend weniger erreicht wird [7]. Hinsichtlich ihres Einflusses auf die superhelikale DNA-Struktur verhalten sich somit NB und EB analog [13]. M-Zellen unterscheiden sich demzufolge von T-Zellen durch einen *a priori* größeren Anteil an Chromatin III, dessen Verdrillung durch NB-Zusatz weiter erhöht wird (Abfall der UDS [7], hochgradiger Viskositätsverlust (Abb. 4)) und – nunmehr allerdings im Unterschied zu NB – durch Interkalation von EB antagonisiert werden kann (Abb. 2 und 4). Die ausgeprägte Stimulierung der UDS von M-Zellen der Ratte durch alleinigen EB-Zusatz (>25 µg/ml) [14] könnte somit über Erhöhung des Anteils an Chromatin II erklärt werden.

NB bzw. NS und Röntgenbestrahlung

Bei T-Zellen hemmte, bei M-Zellen aktivierte NB die UDS nach hochdosierter Röntgenbestrahlung. Zur Erklärung ist auch hier an das prinzipiell unterschiedliche Verhalten beider Zellarten unter dem Einfluß des Antibiotikums zu erinnern [7]. Milzzellen erfahren nach NB-Zusatz (>450 µg/ml) Hyperkom-

paktierung (hochgradige Zunahme der Nukleoid-sedimentation, Viskositätsabfall, Hemmung von SDS und UDS). Die durch ionisierende Strahlen erzeugten DNA-Strangbrüche (zur DNA-Schädigung durch ionisierende Strahlen siehe die jüngst publizierte Übersicht von Ward, *l.c.* [15]) vermindern demgegenüber die DNA-Verdrillung [13], was sich physikalisch in Viskositätszunahme (Abb. 5) und Verkleinerung der durch NB verlängerten Nukleoid-sedimentationsstrecke [7, 13], biochemisch in der neuerlichen Freigabe von UDS-Startpunkten (Abb. 1) äußert. Da die Röntgenbestrahlung bei NB-behandelten (900 µg/ml) T-Zellen bereits auf einen maximal relaxierten Chromatinkomplex (Chromatin II) (Abb. 4, etwa 100%ige Stimulierung der UDS [7]) trifft, könnten die Mechanismen der strahleninduzierten DNA-Synthesehemmung [16] hier mit zunehmender Strahlendosis in den Vordergrund treten (Abb. 1). Eine Hemmung der DNA-Reparatur (Viskositätsabfall der T-Zell-Nukleole, Abb. 5) wäre die Folge.

NB bzw. NS und Cisplatin

Durch NB wurde die DNA-Synthese von T- und M-Zellen gegenüber Cisplatin sensibilisiert (Abb. 3). Der Effekt betraf beide Zellspezies und ist somit nicht mit einer zellspezifischen Änderung der DNA-Topologie in Verbindung zu bringen (Abb. 6). In Umkehrung einiger zellulärer Resistenzmechanismen [17] besteht die Möglichkeit, daß NB die Aufnahme des Zytostatikums in die Zellen erhöht, seine Bindung an die DNA verstärkt, DNA-Reparaturvorgänge hemmt und zelluläre Entgiftungsmechanismen inaktiviert. Auch an die Hemmung der dT³H-Aufnahme in die Zellen ist zu denken. Eine Entscheidung zwischen den genannten Sensibilisierungsme-

chanismen ist aufgrund der vorliegenden Versuche nicht möglich. Weitere Untersuchungen sind angesichts der im Zusammenhang mit der Chemotherapie von Tumoren diskutierten Kombination von DNA-Topoisomerase-Hemmstoffen und vernetzenden (Cisplatin) bzw. alkylierenden Agentien wünschenswert.

Zusammenfassung und Schlußfolgerungen

Der Kombinationseffekt von NB (und NS) und UV-Licht, Methylmethansulfonat, Adriamycin, Bleomycin, Mitomycin C oder Suramin auf T- und M-Zellen der Ratte *in vitro* ist im wesentlichen additiv. NB (NS) und EB schwächen sich in ihrer Wirkung gegenseitig ab oder heben sich auf. Bezogen auf die Kontrollen ist die durch Röntgenbestrahlung ausgelöste DNA-Reparatursynthese bei NB-vorbehandelten T-Zellen gehemmt, bei NB-vorbehandelten M-Zellen dagegen erhöht. Bei beiden Zellarten potenziert NB den Einfluß von Cisplatin. Die Wechselwirkungen von NB (NS) und Röntgenbestrahlung bzw. EB sind mit der Annahme zellspezifisch unterschiedlicher DNA-Kompaktierung erklärbar und lassen sowohl bei Normal- als auch bei Tumorzellen zelltypspezifisch unterschiedliche Kombinationseffekte von DNA-Topoisomerase-Hemmstoffen und bestimmten Zytostatika erwarten. Ihre Kenntnis ist für den kombinierten Einsatz beider Wirkstoffklassen in der Chemotherapie von Tumoren von grundsätzlicher Bedeutung.

Dank

Für hervorragende technische Assistenz danke ich Frau H. Kortenbeutel und Frau U. Rüberg. Für die graphischen Arbeiten bin ich Frau B. Ferlings zu großem Dank verpflichtet.

- [1] K. Drlica und R. J. Franco, *Biochemistry* **27**, 2253–2259 (1988).
- [2] S. L. Dresler und R. M. Robinson-Hill, *Carcinogenesis* **8**, 813–817 (1987).
- [3] R. Ghosh (Datta) und S. B. Bhattacharjee, *Mutat. Res.* **202**, 71–75 (1988).
- [4] R. L. Waters und L. M. Brizgys, *Cancer Res.* **48**, 3932–3938 (1988).
- [5] J. P. Eder, B. A. Teicher, S. A. Holden, K. N. S. Cathcart und L. E. Schnipper, *J. Clin. Invest.* **79**, 1524–1528 (1987).
- [6] K. B. Tan, M. R. Mattern, R. A. Boyce und P. S. Schein, *Biochem. Pharmacol.* **37**, 4411–4413 (1988).
- [7] K. Tempel und A. Spath, *Arch. Toxicol.* **60**, 287–292 (1987).
- [8] K. Tempel und R. Heinzelmann, *Z. Naturforsch.* **43c**, 126–132 (1988).
- [9] B. Marshall und R. K. Ralph, *Anal. Biochem.* **125**, 91–95 (1982).
- [10] C. S. Downes, M. J. Ord, A. M. Mullinger, A. R. S. Collins und R. T. Johnson, *Carcinogenesis* **6**, 1343–1352 (1985).
- [11] M. Cotten, D. Bresnahan, S. Thompson, L. Sealy und R. Chalkley, *Nucl. Acids Res.* **14**, 3671–3686 (1986).
- [12] L. Sealy, M. Cotten und R. Chalkley, *EMBO J.* **5**, 3305–3311 (1986).
- [13] M. R. Mattern, D. J. Kerrigan und Y. Pommier, *Pharmacol. Ther.* **34**, 303–319 (1987).
- [14] K. Tempel, A. Goette und I. Schmerold, *Z. Naturforsch.* **39c**, 600–605 (1984).
- [15] J. F. Ward, *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **35**, 95–126 (1988).
- [16] R. B. Painter, *Int. J. Radiat. Biol.* **49**, 771–781 (1986).
- [17] A. de Graeff, R. J. C. Slebos und S. Rodenhuis, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **22**, 325–332 (1988).