

Wirkung von Lithium- und Rhodanidionen auf den Nukleinsäure-Stoffwechsel von *Tetrahymena pyriformis*, normalen und neoplastischen Säugerzellen

Effect of Lithium and Thiocyanate Ions on the Metabolism of Nucleic Acids of *Tetrahymena pyriformis*, Normal and Neoplastic Mammalian Cells

Klaus Wayss und Manfred Volm

Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, Institut für experimentelle Pathologie

(Z. Naturforsch. 28 c, 457–460 [1973]; eingegangen am 22. Februar 1973)

Lithium, thiocyanate, *Tetrahymena*, mammalian cells

An antagonistic influence of lithium and thiocyanate ions on the metabolism of nucleic acids has been demonstrated in *Tetrahymena pyriformis*. This effect corresponds to morphogenetic observations on other ciliates. Similar investigations on mammalian cells (L-cells, CV I-cells, Chang-liver-cells, HeLa-cells, and ascites tumor cells of Walker-carcinoma 256, Yoshida-sarcoma, Zajdela-hepatoma) showed, in contrast to the results in *Tetrahymena*, no antagonistic influence of lithium and thiocyanate ions: Both ions inhibit the DNA-synthesis, in tumor cells as well as in normal cells.

An Seeigelkeimen ist die gegensätzliche Wirkung (Vegetativisierung und Animalisierung) von Lithium- und Rhodanidionen auf die Keimesentwicklung sehr ausführlich untersucht worden^{1–6}. Auch bei einer Reihe anderer Metazoen (Mollusken, Polychaeten, Cheliceraten, Ascidien, Fische und Amphibien; Lit. siehe^{7–10}) wird durch die beiden Ionen das Differenzierungsgeschehen antagonistisch beeinflusst. Selbst bei Protozoen (heterotriche Ciliaten) konnte dieser Antagonismus mit morphologischen Methoden festgestellt werden^{7, 11, 12}.

Verschiedene Autoren konnten außerdem zeigen, daß als Angriffspunkte der Lithium- und Rhodanidionen sowohl die Nukleinsäuren als auch die Mitose in Betracht kommen^{9, 13–15}. Daher sollte in dieser Arbeit geklärt werden, ob die antagonistische Wirkung der beiden Ionen schon beim Nukleinsäurestoffwechsel sichtbar wird.

Material und Methoden

a. Testsysteme

Tetrahymena pyriformis GL (holotricher Ciliat), L-Zellen (Fibroblasten der C3H-Maus), CV I-Zellen (Affennierenzellen), Chang-Zellen (menschlich, adulte Leberzellen, Flow), HeLa-Zellen (menschliches Portiocarcinom) und Ascites-Tumorzellen des Walker-Carcinosarkoms 256, des Yoshida-Sarkoms und des Zajdela-Hepatoms. Die Kultivierung der

einzelnen Zellarten ist an anderen Stellen ausführlich beschrieben^{9, 16, 17}.

b. Versuchsanordnung (Abb. 1)

1. *Tetrahymena*: Gleich dichte Kulturen (photometrische Bestimmung) in logarithmischer Wachstumsphase werden in Versuchsröhrchen mit je 2 ml Zellkultur im Wasserbad bei 28 °C inkubiert. Nach 2-stdg. Vorinkubation erfolgt die Zugabe der Salzlösungen (LiCl und NaSCN, Merck Darmstadt).

2. Zellkulturen: Die Zellen (300 000 Zellen/ml, Zählkammer nach Neubauer) werden in Aliquots von 0,9 ml auf Versuchsröhrchen verteilt und über Nacht (15 Stdn.) im langsamen Roller (12 U/Stde.) bei 37 °C inkubiert, danach die Nährmedien durch TCM-199 ersetzt. Nach weiteren 2 Stdn. werden die Salzlösungen zugegeben.

3. Ascites-Tumorzellen: Die Zellen werden auf dem Höhepunkt der Proliferation den Ratten entnommen, 2-mal gewaschen (Hanks-Salzlösung), in TCM-199 aufgenommen und die Dichte auf 500 000 Zellen/ml eingestellt. Aliquots von 1,8 ml werden auf Versuchsröhrchen verteilt und im schnellen Roller (120 U/Stde.) bei 37 °C inkubiert. Die Testsubstanzen werden nach 2 Stdn. zupipettiert.

c. Bestimmung der Nukleinsäure- und Proteinsynthese

Eine Stunde vor Versuchsende werden die radioaktiven Vorläufer der Synthesen (³H-Thymidin für die DNS-Synthese, 2,5 µCi/ml, spez. Akt. 5 Ci/mMol; ³H-Uridin für die RNS-Synthese, 2,5 µCi/ml, spez. Akt. 1,25 Ci/mMol und ³H-Leucin für die Proteinsynthese, 5 µCi/ml, spez. Akt. 19,0 Ci/mMol; Radiochemical Centre Amersham) zugegeben. Die Bestimmung der nicht extrahierbaren Radioaktivität

Sonderdruckanforderung an Dr. Klaus Wayss, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, Institut für experimentelle Pathologie, D-6900 Heidelberg 1, Kirschnerstraße 6.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

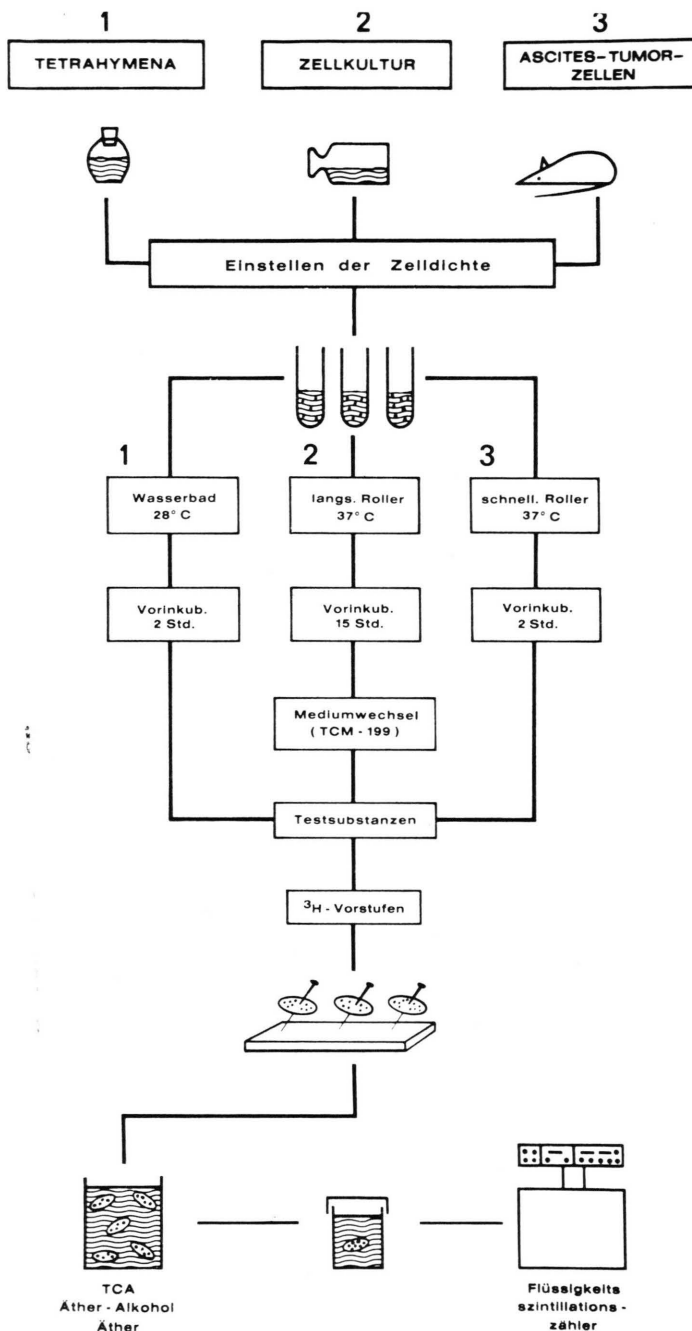


Abb. 1. Schematische Darstellung der Versuchsanordnung. Erläuterungen im Text.

der Zellen ist an anderer Stelle ausführlich beschrieben worden^{9, 17-19}. Dabei werden die Zellen auf Papierrundfilter pipettiert, diese in eiskalter Trichloressigsäure (TCA) extrahiert und in Äther-Alkohol und Äther getrocknet. Die nicht extrahierbare

radioaktive Substanz der Filter wird in Toluolszintillator im Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt.

Ergebnisse

In Abb. 2 sind die Wirkungen von Lithium- und Rhodanidionen auf den Nukleinsäure- und Proteinstoffwechsel von *Tetrahymena pyriformis* zusammen-

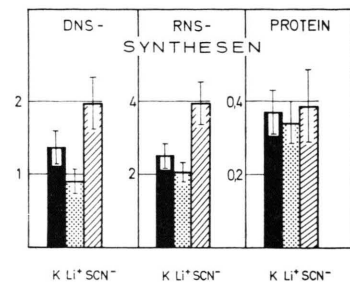


Abb. 2. Wirkung von Lithium (Li^+)- und Rhodanidionen (SCN^-) auf die DNS-, RNS- und Proteinsynthese bei *Tetrahymena pyriformis*. Die Endkonzentration der beiden Ionen war 0,01 M, die Einwirkungszeit betrug 4 Stdn. Ordinaten: 10^3 Imp/min 0,1 ml Zellkultur.

gefaßt: Lithium (Li^+) hemmt die DNS-Synthese (^3H -Thymidineinbau) ebenso wie die RNS-Synthese (^3H -Urididineinbau). Rhodanidionen (SCN^-) dagegen steigern beide Synthesen. Die Proteinsynthese (^3H -Leucidineinbau) zeigt keine Wirkung der beiden Ionen. Die Einwirkungszeit der Ionen betrug 4 Stdn. Die Endkonzentration der Ionen war jeweils 0,1 M. Die morphologisch sichtbare antagonistische Wirkung der beiden Ionen auf Ciliaten läßt sich also auch bei den Nukleinsäuresynthesen nachweisen.

Nun sollte geklärt werden, ob auch bei Säugerzellen diese entgegengesetzte Wirkung der beiden Ionen zu finden ist. Am Beispiel der Chang-Leberzellen (Abb. 3) sind die Wirkungen von Lithium- und Rhodanidionen auf die DNS-Synthese dargestellt. Da sich bei *Tetrahymena* zwischen DNS- und RNS-Synthese kein Unterschied zeigte, haben wir in diesem, wie auch in den folgenden Experimenten lediglich die DNS-Synthese bestimmt. Verschiedene Konzentrationen (0,05; 0,01 und 0,005 M) und unterschiedliche Einwirkungszeit beider Ionen (Abb. 3: oben 4 Stdn., unten 8 Stdn.) bewirken jeweils eine Hemmung der DNS-Synthese. Die Hemmwirkung beider Ionen verstärkt sich deutlich mit zunehmender Konzentration und Versuchsdauer. Ein antagonistischer Einfluß von Lithium- und

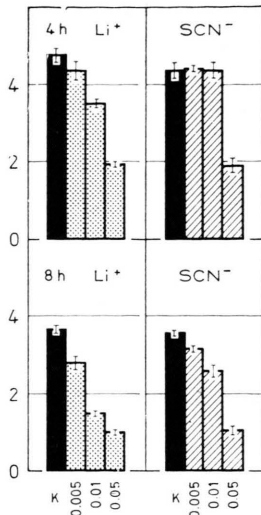


Abb. 3. Einfluß von Lithium (Li⁺)- und Rhodanidionen (SCN⁻) auf den ³H-Thymidineinbau von Chang-Leberzellen nach 4- und 8-stdg. Einwirkungsdauer. Abszisse: Molare Endkonzentrationen der Ionen. Ordinate: 10³ Impulse/min/ml Zellkultur.

Rhodanidionen auf die DNS-Synthese läßt sich damit bei Chang-Zellen nicht nachweisen.

In gleicher Versuchsanordnung wie in Abb. 3 wurden 2 weitere Zellarten aus normalen (L-Zellen und CVI-Zellen) und 4 Zellarten aus Tumorgewebe (HeLa-Zellen, Ascites-Tumorzellen des Walker-Carcinosarkoms 256, des Yoshida-Sarkoms und des Zajdela-Hepatoms) untersucht. In Tab. I sind jeweils nur eine Konzentration (0,01 M) und ein Zeitpunkt

Tab. I. Wirkung von Lithium- und Rhodanidionen auf den ³H-Thymidineinbau von sechs Zellstämmen nach 8-stdg. Einwirkungsdauer. Die Werte sind Impulse/min/0,1 ml Zellkultur, aufgetragen sind die Mittelwerte von je 4 Kulturröhrchen mit ihrer Streuung (±s). Unter den Impulszahlen sind die Abweichungen der Versuchsgruppen von der Kontrollgruppe in Prozent dargestellt.

Zellart	Kontrolle	Lithium 0,01 M	Rhodanid 0,01 M
L-Zellen	4685 ± 330 100	4167 ± 288 89	3980 ± 228 81
CVI	640 ± 29 100	368 ± 50 58	456 ± 42 71
HeLa	5198 ± 645 100	5132 ± 251 99	4864 ± 437 94
Walker-Carcino-sarkom 256	6347 ± 333 100	5147 ± 163 81	4623 ± 134 73
Yoshida-Sarkom	3074 ± 58 100	2029 ± 363 66	2220 ± 230 72
Zajdela-Hepatom	3268 ± 198 100	3041 ± 68 93	2806 ± 86 86

(8 Stdn.) wiedergegeben. Alle 6 Zellarten werden wie Chang-Zellen durch beide Ionen gehemmt. Eine Stimulierung konnte nie gefunden werden. HeLa-Zellen zeigen bei einer 0,01 M Konzentration keine Beeinflussung, werden jedoch bei einer Konzentration von 0,05 M durch beide Ionen deutlich gehemmt (ähnliches gilt auch für das Zajdela-Hepatom).

Somit ist der bei *Tetrahymena pyriformis* verwirklichte Antagonismus bei den hier untersuchten Säugerzellen nicht vorhanden. Dabei unterscheiden sich Zellen aus normalen und neoplastischen Geweben nicht.

Diskussion

Die Brauchbarkeit unserer Methode haben wir an allen Zellen überprüft. Es wurde jeweils die Einbau-kinetik ohne und mit spezifischen Synthesehemmern (Hydroxyharnstoff, Actinomycin D, Actidion) verglichen. Dabei bauen die Kontrollen ohne Hemmsubstanzen die markierten Synthesevorläufer über 3 Stdn. kontinuierlich ein, während die behandelten Zellen im Versuchszeitraum keinen Einbau erkennen lassen. Daraus ergibt sich, daß tatsächlich die radioaktiv markierten Substanzen eingebaut werden.

Auf eine statistische Analyse der Versuchsergebnisse wurde verzichtet, da die geringe biologische Variabilität bei lange in Kultur gehaltenen Zellstämmen dies wenig sinnvoll erscheinen läßt. Jeder Versuch wurde jedoch dreimal wiederholt.

Lithium- und Rhodanidionen haben auf den Nukleinsäurestoffwechsel von *Tetrahymena pyriformis* einen antagonistischen Einfluß (Hemmung – Stimulierung). Dabei handelt es sich um ein direkte Wirkung auf die Nukleinsäuren bei gleicher Zellzahl⁹. Die von uns untersuchte DNS-Synthese von Säugerzellen (normale und neoplastische Zellen) wird sowohl durch Lithium- als auch durch Rhodanidionen gehemmt. Das unterschiedliche Verhalten von *Tetrahymena* und von Säugerzellen läßt sich erklären: *Tetrahymena* vollbringt als Einzelzelle alle Leistungen eines selbständigen Organismus. Die in der Kultur gehaltenen Säugerzellen stammen dagegen aus differenzierten, teilweise maligne entarteten Einzelorganen eines Gesamtorganismus.

Bei Ciliaten wird aber nicht nur die Nukleinsäuresynthese durch Lithium- und Rhodanidionen antagonistisch beeinflusst. Beide Ionen haben auch eine gegensätzliche Wirkung auf morphogenetische Regulationsvorgänge in der Zelle. So wird z. B. bei *Stentor coeruleus* Ehrbg. der Basalpol durch Lithium

verstärkt und durch Rhodanid abgeschwächt^{7, 12}. Weiter wird bei regenerierenden Tieren von *Spirostomum ambiguum* der Abstand des Cytostoms vom Hinterende der Zelle bei Lithiumbehandlung vergrößert und bei Rhodanidbehandlung verkleinert¹¹. Wir meinen, daß die antagonistische Beeinflussung von morphogenetischen und molekularbiologischen Vorgängen bei den Ciliaten durch eine einheitliche Wirkung der entsprechenden Ionen erklärbar ist.

Säugerzellen zeigen im Bereich der DNS-Synthese keine antagonistische Reaktion auf die Behandlung mit Lithium- und Rhodanidionen. Nach unserem Wissen fehlen Untersuchungen über den Einfluß der beiden Ionen auf das morphologische Differenzierungsgeschehen bei Säugerkeimen. Damit muß die Frage offen bleiben, ob eine Kopplung von morphogenetischen und molekularbiologischen Vorgängen fehlt, oder ob Säuger allgemein auf die beiden Ionen nicht antagonistisch reagieren.

- ¹ C. Herbst, Z. wiss. Zool. **55**, 446 [1892].
- ² S. Hörstadius, Roux' Arch. Entwicklungsmechan. Organismen **135**, 40 [1937].
- ³ R. Lallier, Adv. Morphog. **3**, 147 [1964].
- ⁴ P. E. Lindahl, Roux' Arch. Entwicklungsmechan. Organismen **128**, 661 [1933].
- ⁵ J. Runnström, Acta zool. [Stockholm] **9**, 365 [1928].
- ⁶ J. Runnström u. J. Immers, Roux' Arch. Entwicklungsmechan. Organismen **167**, 222 [1971].
- ⁷ K. König, Arch. Protistenk. **110**, 179 [1967].
- ⁸ A. G. Johnen, Roux' Arch. Entwicklungsmechan. Organismen **165**, 150 [1970].
- ⁹ M. Volm, K. Wayss u. V. Schwartz, Roux' Arch. Entwicklungsmechan. Organismen **165**, 125 [1970].
- ¹⁰ H. Emanuelsson, Roux' Arch. Entwicklungsmechan. Organismen **168**, 10 [1971].
- ¹¹ V. Schwarz, Roux' Arch. Entwicklungsmechan. Organismen **158**, 89 [1967].
- ¹² F. Schweikhardt, Roux' Arch. Entwicklungsmechan. Organismen **157**, 21 [1966].
- ¹³ F. Dubini u. A. Bolloli, Arch. ital. Patol. Clin. Tum. **12**, 79 [1969].
- ¹⁴ J. Huot, Gl. Nosal u. C. Radouco-Thomas, Experientia [Basel] **28**, 456 [1972].
- ¹⁵ P. Genest u. A. Villeneuve, Lancet **1**, 1132 [1971].
- ¹⁶ H. Hinderer, M. Volm u. K. Wayss, Exp. Cell Res. **59**, 464 [1970].
- ¹⁷ M. Volm, J. Mattern u. K. Wayss, Exp. Path. **7**, 84 [1972].
- ¹⁸ R. Süß u. M. Volm, Naturwissenschaften **55**, 134 [1968].
- ¹⁹ M. Volm u. R. Süß, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. Pharmacol. **261**, 353 [1968].

Methylation of Deoxyribonucleic Acid in Regenerating Rat Liver

Dieter Lutz *, Helga Grahn, and Hans Kröger

Robert Koch-Institut, Berlin-West, Nordufer 20

(Z. Naturforsch. **28 c**, 460—462 [1973] ; received February 14, 1973)

Hepatectomy, DNA-methylation, DNA-synthesis, 5-Methylcytosine, Endoxan

In double label pulse experiments DNA methylation was compared to DNA synthesis after partial hepatectomy. 24 hours after the operation the highest ¹⁴C-thymidine incorporation rates were found as well as the highest 5-methylcytosine labelling derived from (³H-methyl)-methionine. However, synthesis was much more elevated than DNA methylation. Applying Endoxan DNA methylation is reduced to a significantly higher extent than DNA synthesis. Our results indicate that DNA methylation occurs not only combined with DNA synthesis.

Introduction

Since it has been known that DNA methylation occurs at the polymeric level several experiments on bacteria and tissue cultures have demonstrated the dependence of DNA methylation on DNA synthesis¹⁻¹⁰. Recently we reported analogous results with mammals *in vivo*. We found that organs

having a high DNA synthesis also showed a high DNA methylation¹¹. The present paper deals with the question whether the same could be found for regenerating rat liver too. Regenerating liver is used as more or less synchronized system, in which molecular mechanisms within the cell cycle can be separated from each other.

Requests for reprints should be sent to Prof. Dr. H. Kröger, Robert Koch-Institut d. Bundesgesundheitsamtes, D-1000 Berlin 65, Nordufer 20.

* Present Address: Dr. Dieter Lutz, Ludwig Boltzmann-Institut für Leukämieforschung und Hämatologie im

Hanusch-Krankenhaus, A-1140 Wien, Heinrich Collinstraße.

Abbreviations: 5 MC, 5-methylcytosine; DNA, deoxyribonucleic; dUMP, deoxyuridinmonophosphat; TMP, thymidinmonophosphat; T, thymine.