

Verteilung von [³H]Thiopyronin in Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*)

Distribution of [³H]Thiopyronine in Yeast Cells
(*Saccharomyces cerevisiae*)

Ernst-Randolf Lochmann, Cornelia Herrmann,
Ingrid Pietsch und Astrid Micheler

Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik, Arbeitsgruppe
Molekularbiologie, Freie Universität Berlin

(Z. Naturforsch. 31 c, 481—483 [1976]; eingegangen
am 5. April 1976)

Thiopyronine, Distribution, Photodynamic Effect,
Nucleus, Cytoplasm

After incubation of *Saccharomyces* cells in [³H]thiopyronine solution the photodynamically high effective dye was detected only to about 1% in the nucleus of the cell. 99% of the dye is distributed in the cytoplasm.

Erste Versuche, Hautkrankheiten mit Hilfe des photodynamischen Effekts zu behandeln, wurden bereits vor 70 Jahren unternommen¹. Neuere Therapieversuche konzentrieren sich besonders auf die Anwendung von Furocumarinen als Sensibilisatoren². Auf der Grundlage molekularbiologischer Erkenntnisse zum Wirkungsmechanismus des photodynamischen Effekts mit dem hochwirksamen Thioxanthin-Farbstoff Thiopyronin (TP)^{3,4} erscheint dessen therapeutische Applikation als Sensibilisator insofern als sinnvoll, da aufgrund verschiedener Untersuchungen angenommen werden kann, daß der von ihm induzierte photodynamische Effekt genetisches Material in Eukaryoten nicht verändert. Die TP-beeinflußte photodynamische Wirkung führt in Hefezellen offensichtlich über die Veränderung plasmatischer Strukturen zur Abtötung der Zellen^{5,6}. Bei Bakterien konnten dagegen DNA-Veränderungen *in vivo* nach Einwirkung von TP und Licht festgestellt werden⁷. Das Fehlen genetischer Schäden bei Hefezellen nach photodynamischer Behandlung könnte darauf zurückzuführen sein, daß eine Bindung von TP an die DNA unter den verwendeten Versuchsbedingungen (z.B. der angewendeten TP-Konzentration) nicht erfolgt. Da die Kern-DNA in Eukaryoten stärker gegen den Angriff von Agenzien geschützt ist als die Bakterien-DNA, ist eine unterschiedliche Empfindlichkeit des genetischen Materials in beiden Zellarten zu erwarten.

Um weitere Aussagen über den Angriffsort des photodynamischen Effekts in Hefezellen machen zu

können, wurde die Verteilung von [³H]-markiertem TP gemessen. Solche Untersuchungen wurden schon früher durchgeführt⁶; die Ergebnisse waren aber nicht sehr genau, da bei den angewendeten Isolierungsmethoden gebundenes [³H]TP teilweise wieder von den Zellkomponenten abgelöst wurde.

In neuen Experimenten wurden verschiedene Kontrollversuche durchgeführt, um das Ausmaß der Ablösung von gebundenem TP von den Zellkomponenten unter den angewendeten Isolierungsbedingungen festzustellen. Mit diesen Ergebnissen wurden die Markierungswerte korrigiert. Da bei diesen Untersuchungen besonders das Verhältnis von Kern- zu Plasmamarkierung bestimmt werden sollte, wurde die Verteilung von [³H]TP im Kern und im Cytoplasma in getrennten Isolierungsgängen untersucht.

Die Ergebnisse (Mittelwerte aus 4 Versuchen), die in Tab. I zusammengefaßt sind, zeigen, daß nur eine sehr geringe Menge TP in den Kern der Zelle

Tab. I. Prozentuale Verteilung des aufgenommenen Thiopyronins in der *Saccharomyces*-Zelle.

Zellkomponente	Verteilung [%]
Zellkern	1
Kernmembran-Fraktion	0,46
Nukleinsäure-Protein-Fraktion	0,18
freies TP	0,36
Cytoplasma	99
Zelltrümmer (Zellwände, Membranen, Mitochondrien etc.)	66
Ribosomen	12
Ribosomenfreier Überstand (lösliche Proteine, tRNA etc.)	15
freies TP (oder an niedermolekulare Bestandteile gebunden)	6

gelangt. Der weitaus größte Teil ist im Cytoplasma gebunden. Von dem im Kern lokalisierten TP ist wiederum nur ein Bruchteil im nukleinsäurehaltigen Material zu finden. Der größte Teil ist an der Kernmembranfraktion gebunden oder liegt frei im Cytoplasma vor. An der Kern-DNA konnte bisher noch keine Radioaktivität festgestellt werden. Im Cytoplasma ist der größte Teil des TP an Membranen, Zellwänden und an membranhaltigen Organellen angelagert. Aber auch an anderen Zellkomponenten — z.B. an Ribosomen — ist TP gebunden. Nur ein kleiner Teil des Farbstoffs liegt bei den angewendeten Inkubationsbedingungen frei oder evtl. an niedermolekulare Bestandteile gebunden vor. Die Konzentration an freiem TP entspricht etwa der Außenkonzentration nach Inkubation der Zellen.

Sonderdruckanforderungen an Dr. Astrid Micheler, Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik, Freie Universität Berlin, Ehrenbergstr. 26—28, D-1000 Berlin 33.



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.

Wird die gemessene Radioaktivität auf die jeweilige Trockenmasse der Komponenten bezogen, so ergeben sich Werte der spezifischen Radioaktivität, die nicht sehr unterschiedlich für die einzelnen Komponenten sind. Lediglich membrangebundene Ribosomen zeigen eine 2- bis 3-fach größere spezifische Markierung als freie Ribosomen. Dieser Markierungsunterschied kann von uns noch nicht erklärt werden.

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die früheren Hinweise, daß Hefezellen photodynamisch nicht durch genetische Schäden inaktiviert werden, da unter den Inkubationsbedingungen, die bei photodynamischen Inaktivierungsversuchen angewendet werden, der Farbstoff offensichtlich nicht an DNA gebunden wird.

Experimentelles

Stationäre Zellen des tetraploiden *Saccharomyces*-Stammes 2200⁸, kultiviert in 600 ml Vollmedium (2% Glucose, 1% Hefe-Extrakt, 0,5% Pepton), wurden vom Medium abzentrifugiert, 2-mal gewaschen und in 100 ml einer [³H]Thiopyronin-Lösung (Thiopyronin von Merck, Darmstadt, tritiert von der Fa. NEN Chemicals, Dreieichenhain, über Kieselgel DC gereinigt, 50 µg/ml, 5×10^{-3} µCi/µg) für 30 min bei 22 °C unter Rühren inkubiert. Anschließend wurden die markierten Zellen mit Puffer (0,05 M KH₂PO₄) gewaschen, 40 min in Puffer stehen gelassen und nochmals zentrifugiert. Dann wurde wieder in Puffer aufgenommen, die Zellzahl in der Suspension durch Auszählen unter dem Mikroskop bestimmt und die Radioaktivität der Suspension gemessen. Die Aufnahme von [³H]TP in die Zelle betrug 3×10^{-5} cpm/Zelle ($0,31 \times 10^{-7}$ µg TP/Zelle oder $4,25 \times 10^7$ TP-Moleküle/Zelle). Diese Werte sind mit früher publizierten Werten in guter Übereinstimmung^{6,9}.

Die eine Hälfte der Zellsuspension wurde zur Kernisolierung verwendet, die nach einer von Herrmann¹⁰ variierten Methode von Bhargava und Halvorson¹¹ durchgeführt wurde. Nach Bestimmung der spezifischen Radioaktivität der Zellkerne wurden diese in destilliertem Wasser lysiert, 15 min in 0,14 M NaCl mit 1% SDS bei 50 °C behandelt und 10 min bei $30000 \times g$ zentrifugiert. Vom gewaschenen Niederschlag wurde die Radioaktivität bestimmt. Der Überstand wurde mit dem doppelten Volumen kalten Äthanol versetzt. Nach Zentrifugation wurde im Überstand, der im wesentlichen nur niedermolekulare Anteile enthält, und im gewaschenen Niederschlag die Radioaktivität gemessen.

Die zweite Hälfte der Zellsuspension wurde — wie zur Kernisolierung — mit der French press, in einigen Versuchen auch mit dem Braun-Homogenisator, zerstört. Das Homogenat wurde mehrfach mit TKM-Puffer (30 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 6 mM Mercaptoäthanol, 0,25 mM EDTA) gewaschen und bei $17500 \times g$ 20 min zentrifugiert. Die dabei erhaltenen Überstände wurden vereinigt, dann in zwei gleiche Teile geteilt und die eine Hälfte unbehandelt, die andere Hälfte nach 30 min Triton X 100-Behandlung (1%, 22 °C), auf einen Stufengradienten (2 M/0,5 M Sucrose) gegeben und 22 h bei 42000 rpm (Rotor 50 Ti, Beckman, $105000 \times g$) zentrifugiert. Die erhaltenen Ribosomenniederschläge (RF₂ und RF₃) wurden in TKM-Puffer aufgenommen und der Gehalt an Ribosomen optisch und durch RNA-Bestimmung (Orcinolmethode) festgestellt und die Radioaktivität gemessen. Aus der Differenz von RF₂ minus RF₃ konnte der Gehalt an Ribosomen, die an kleinen Membranteilen gebunden ist, festgestellt werden¹². Die Überstände des Stufengradienten wurden mit 5-prozentigem kaltem TCA behandelt, zentrifugiert und von Überständen und Niederschlägen die Masse und die Radioaktivität bestimmt.

Der gewaschene Niederschlag des Homogenats, der hauptsächlich aus Zellwand- und Membranteilen mit anhaftenden Ribosomen und aus Mitochondrien bestand, wurde ebenfalls mit 1% Triton X 100 bei 22 °C 30 min gerührt. Anschließend wurde der von Ribosomen durch Triton-Behandlung, mehrfache Waschung und Zentrifugation befreite Niederschlag getrocknet, ausgewogen und die Radioaktivität gemessen. Die von den groben Membranteilen abgelösten Ribosomen im Überstand wurden ebenfalls auf einen Stufengradienten (2 M/0,5 M Sucrose) gegeben und 22 h bei $105000 \times g$ zentrifugiert. Der Ribosomenniederschlag (RF₁) wurde ebenso behandelt wie die beiden anderen Ribosomenfraktionen (RF₂ und RF₃). RF₁ enthält die ursprünglich an grobe Membranteile gebundenen Ribosomen. Der Überstand der letzten Zentrifugation enthält nur freies TP, das durch die Behandlungsmethoden freigesetzt wurde. Die hier erhaltene Radioaktivität wurde als Kontrollwert zur Korrektur verwendet.

In weiteren Kontrollexperimenten wurde bestimmt, inwieweit von [³H]TP-markierten Komponenten (Membran- und Zellwandteile, Nukleinsäuren, Ribosomen, Proteine) durch Isolierungsprozeduren (TCA- oder Äthanol-fällungen, Triton- oder SDS-Behandlungen, Zentrifugation durch Sucrosekissen) TP abgelöst wird. Diese Werte wurden zur Korrektur der erhaltenen Ergebnisse verwendet.

Wir danken dem Fonds der Chemischen Industrie für eine Sachbeihilfe.

- ¹ H. v. Tappeiner u. A. Jodlbauer, Die sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen. Gesammelte Untersuchungen über die photodynamische Erscheinung, Vogel-Verlag, Leipzig 1907.
- ² Abstracts: Deutsch-Schwedisches Symposium Photomedizin, Oberursel, 23.—25. 4. 1975; III. Jahrestagung der Arbeitsgruppe Dermatol. Forschg., Berlin 21.—23. 11. 1975.
- ³ A. Micheler u. E.-R. Lochmann, Int. J. Radiat. Biology **25**, 245—251 [1974].
- ⁴ E.-R. Lochmann u. A. Micheler, Physicochemical Properties of Nucleic Acids **vol. I**, 223—267 [1973], (J. Duchesne, ed.), Academic Press.
- ⁵ A. Micheler u. E.-R. Lochmann, Pressedienst Wissenschaft, Freie Universität Berlin, **4**, 25—42 [1974].
- ⁶ A. Micheler, Dissertation, Freie Universität Berlin 1972.
- ⁷ H. E. Jacob, E. Sarfert u. H. Friebe, Z. Allg. Mikrobiol. **13**, 207—219 [1973].
- ⁸ U. Reichert, Zentralbl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I Org. **205**, 63—67 [1967].
- ⁹ A. Micheler u. E.-R. Lochmann, Studia Biophysica **26**, 207—214 [1971].
- ¹⁰ C. Herrmann, Diplomarbeit, Freie Universität Berlin 1976.
- ¹¹ M. M. Bhargava u. H. O. Halvorson, J. Cell Biol. **49**, 423—429 [1971].
- ¹² E. Schneider, E.-R. Lochmann u. H. Lother, Biochim. Biophys. Acta **432**, 92—97 [1976].