

Unprogrammierte DNA-Synthese (DNA-Reparatur) in Milz- und Thymuszellen der Ratte nach Einwirkung von UV-Licht, Röntgenstrahlen oder Methylmethansulfonat *in vitro*

Unscheduled DNA Synthesis (DNA-Repair) within Splenic and Thymic Cells of the Rat under the Influence of UV-Light, X-Irradiation and/or Methyl-methanesulfonate

K. Tempel*

Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München, Abteilung Toxikologie und Radiologie, Königinstraße 16, D-8000 München 22

Z. Naturforsch. **35 c**, 106–111 (1980); eingegangen am 21. September/22. Oktober 1979

DNA-Repair, Splenocytes, Thymocytes, Irradiation, Methyl-Methanesulfonate

Unscheduled DNA synthesis (UDS) of splenic and thymic cells of the rat has been stimulated *in vitro* by UV-light ($8–128 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$), X-rays (120–3480 rd), methyl-methanesulfonate (MMS), and/or a combination of UV-light and X-irradiation. The height of UDS-induced stimulation of incorporation of [³H]thymidine into splenic and thymic cell DNA at saturation doses of UV-light (splenic cells: 8, thymic cells: $96 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$) or X-irradiation (splenic cells: 960, thymic cells: $\sim 3480 \text{ rd}$) suggest that the greater sensitivity of T-cells (represented by thymic cells) towards UV-light and the greater sensitivity of B-cells (represented by splenic cells) towards X-rays can be explained – at least partly – in terms of less efficient excision repair systems.

Lymphozyten gehören zu den strahlenempfindlichsten Zellen des Säugetierorganismus [1]. Ihrer Herkunft im Immunsystem nach wird zwischen thymusäquivalenten T- und bursaäquivalenten B-Zellen unterschieden. Beide Zellarten sind unterschiedlich strahlenempfindlich. *In vitro* waren B-Zellen im allgemeinen gegenüber ionisierenden Strahlen [2–6] und T-Zellen gegenüber UV-Licht [7] empfindlicher. Innerhalb jeder Lymphozytenreihe lassen sich allerdings Subpopulationen mit unterschiedlicher Strahlenresistenz unterscheiden [8–10]. Zelluläre Empfindlichkeitsunterschiede können Ausdruck unterschiedlicher DNA-Reparatur-Kapazität sein, wie dies Yew und Johnson für UV-bestrahlte T- und B-Lymphozyten des Menschen wahrscheinlich machen konnten [7]. Als weiterer Beitrag zur Frage einer Korrelation zwischen Strahlenempfindlichkeit und DNA-Reparatur wurde vorliegend die unprogrammierte DNA-Synthese („unscheduled DNA-synthesis“, UDS) von Thymuszellen (überwiegend T-Zellen) und Milzzellen (größerer Anteil von B-Zellen) der Ratte untersucht. Zur Stimulierung von UDS dienten Röntgenstrahlen, UV-Licht und Methansulfonsäuremethyl-ester (MMS).

* Für die gewissenhafte Durchführung der Analysen bin ich Frau M. Wulffius-Kock zu großem Dank verpflichtet.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. K. Tempel.

0341-0382/80/0100-0106 \$ 01.00/0

Material und Methodik

Die Untersuchungen wurden an Präparaten von 250–300 g schweren männl. Wistar-Ratten aus institutseigener konventioneller Zucht durchgeführt. Die Milzzellen wurden nach der an anderer Stelle näher beschriebenen Methode [11] isoliert. Zur Gewinnung von Thymuszellen wurde das Organ unmittelbar nach Entbluten der Tiere entnommen, in Hank's Lösung gewaschen und mit der Schere so weit wie möglich zerkleinert. Zur Hemmung der semikonservativen DNA-Synthese wurde die Gewebemasse anschließend 30 min in 10 ml einer Lösung von 10^{-2} mol/l Hydroxyharnstoff (HH) in Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freier Hank's-Lösung aerob bei 37°C inkubiert. Der weitere Gewebeaufschluß erfolgte in einem 30 ml-Potter-Gefäß durch einmaliges vorsichtiges Auf- und Abbewegen des passenden, aber locker eingeschliffenen Teflon-Stempels (Vermeiden von Unter- oder Überdruck, keine Drehbewegungen des Stempels). Die erhaltene Zellsuspension wurde nunmehr 2 min bei 2250 U min^{-1} (Laborzentrifuge Junior 2 der Fa. Christ) in der Kälte zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das zelluläre Sediment erneut in 10^{-2} mol/l HH enthaltender Hank's Lösung aufgenommen und durch Strumpf-Nylon filtriert.

Zur Charakterisierung der Zellen dienten das mikroskopische Bild, Farbstoffausschluß sowie RNA-



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 digitized 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.

und Protein-Synthese. Eine gewisse Erythrozyten-Beimengung der Milzzellen wurde toleriert, da ein Einfluß von Erythrozyten auf die gemessenen Parameter nicht nachweisbar war. Sowohl Milz- als auch Thymuszellen erwiesen sich gegenüber mechanischen Einflüssen (wie Einfrieren und Aufstauen, Scherkräfte) als verhältnismäßig unempfindlich.

Suspensionen von jeweils 4×10^7 Zellen (Milz) bzw. 2×10^8 Zellen (Thymus) pro 1,0 ml wurden entweder 30 min mit MMS (Art. Nr. 820775 der Fa. Merck-Schuchardt, 10^{-8} – 10^{-2} mol/l) oder UV-Licht (Bestrahlung der auf eisgekühlten Petrischalen in sehr dünner Schicht ausgebreiteten Zellen mit der UV-Lampe Philips TUV 30 W, Maximalemission 254 nm, Fluenz $4 \text{ J} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$) bzw. Röntgenstrahlen (Kristalloflex 4 der Fa. Siemens und Halske, 60 kV, 30 mA, HWS 0,16 mm Cu, Filterung mit 0,16 mm Cu, FOA 15 cm, Dosisleistung $340 \text{ R} \times \text{min}^{-1}$) ausgesetzt. Die Strahlendosen betrugen 8 bis $128 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$ bzw. 0,120–3,480 Gy (120–3480 rd). In einigen Versuchen wurden die Zellen zuerst röntgen- und dann UV-bestrahlten.

Die UDS wurde als Einbau von [^3H]Methylthymidin ([^3H]TdR, 40–60 Ci/mmol, Radiochemical Center, Amersham, 5 $\mu\text{Ci}/1,0 \text{ ml}$ Zellsuspension, 1-stündige Inkubation bei 37°C in Hank's Lösung unter HH-Zusatz) in das säurefällbare Sediment der Zellen bestimmt [11]. Jeder Meßwert wurde drei- bis sechsfach belegt.

Ergebnisse und Diskussion

Die Messung von UDS gilt als verlässliche Routinemethode zum Nachweis von DNA-Reparatur [12 u. a.]. Zu den Voraussetzungen des Tests gehört

die vollständige und spezifische Hemmung semikonservativer DNA-Synthese. Sowohl replikative Restaktivität als auch Hemmung des reparaturinduzierten [^3H]TdR-Einbaus durch HH [13] können zur Unterschätzung des jeweils gegebenen Reparaturumfanges führen. Vorliegend wurde daher zunächst der Einfluß von HH auf den replikativen Einbau von [^3H]TdR in die DNA von Milz- und Thymuszellen sowie die UV-stimulierte UDS der Präparationen untersucht: Der semikonservative *in vitro*-Einbau von [^3H]TdR in die DNA von Milz- bzw. Thymuszellen betrug unter den gewählten Bedingungen im Mittel 294×10^3 bzw. $4617 \times 10^3 \text{ Imp.} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg DNA}^{-1}$. Durch 10^{-2} mol/l HH wurden diese Werte um 84,4 bzw. 90,5% gehemmt. – Aus dem in Tab. I dargestellten Versuchsbeispiel ergibt sich erwartungsgemäß, daß der als UDS nachweisbare Tritium-Anteil bei konstanter UV-Dosis mit zunehmender Hemmung der semikonservativen DNA-Synthese ansteigt.

Die jüngst von Yew und Johnson [13] an menschlichen Lymphozyten nachgewiesene Inhibierung der DNA-Reparatur durch HH wurde unter den gewählten Bedingungen an Milzzellen erst bei Hemmstoff-Konzentrationen von $> 2 \times 10^{-2}$ und an Thymuszellen bei solchen von $> 4 \times 10^{-2}$ mol/l deutlich. – Anstieg der UDS-Aktivität trotz gleichbleibender Hemmung der semikonservativen DNA-Synthese (Tab. I, HH-Konzentrationsbereich von 5×10^{-3} bis 2×10^{-2} mol/l) verweist auf die Möglichkeit zusätzlicher Stimulierung von UDS durch HH. Eine solche Aktivierung der DNA-Reparatur durch HH wurde u. a. an Ovarzellen des Chinesischen Hamsters nachgewiesen [14]. Unter Bedingungen metabolischer Aktivierung postulieren Andrae und

Tab. I. Semikonservative und unprogrammierte DNA-Synthese in Milz- und Thymuszellen der Ratte unter dem Einfluß von Hydroxyharnstoff.

Zeile I: Hydroxyharnstoffkonzentration in mol/l

Zeile II: Hemmung des semikonservativen Einbaus von [^3H]-TdR in die DNA von Milzzellen in Prozent (Bezug: Werte ohne HH-Zusatz)

Zeile III: Stimulierung des unprogrammierten [^3H]-TdR-Einbaus in die DNA von Milzzellen durch UV-Bestrahlung ($16 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$) in Prozent (Bezug: Werte ohne UV-Bestrahlung)

Zeile IV: Hemmung des semikonservativen Einbaus von [^3H]-TdR in die DNA von Thymuszellen in Prozent (Bezug: Werte ohne HH-Zusatz)

Zeile V: Stimulierung des unprogrammierten [^3H]-TdR-Einbaus in die DNA von Thymuszellen durch UV-Bestrahlung ($96 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$) in Prozent (Bezug: Werte ohne UV-Bestrahlung).

I	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	5×10^{-3}	10^{-2}	2×10^{-2}	4×10^{-2}	8×10^{-2}
II	10,9	37,5	77,3	84,6	84,4	85,1	82,9	85,0
III	15,8	45,4	97,4	119,1	133,7	147,4	76,8	56,0
IV	12,0	38,0	81,4	88,0	90,5	91,8	92,8	92,1
V	32,2	43,8	47,1	50,9	54,0	50,7	51,3	19,0

Greim [15] u. a. die Bildung von H_2O_2 aus HH mit entsprechender Schädigung der DNA.

Die DNA-Reparatur in Säugetierzellen ist sättigbar [16], wie sich – mit deutlichen Unterschieden zwischen Milz- und Thymuszellen – auch aus den vorliegenden Untersuchungen ergab (Abb. 1): Bereits eine UV-Dosis von $8 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$ führte in Milzellen zur Sättigung des stimulierbaren [^3H]TdR-Einbaus, während die Markierung der ThymozytendNA ihren Sättigungswert erst im Bereich von $96 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$ erreichte. Im jeweiligen Maximum lagen die stimulierbaren [^3H]TdR-Einbauraten der Milzellen maximal 200% über jenen der Thymozyten. Analog zu den Befunden von Yew und Johnson [7] folgt somit, daß sich in T (hier: Thymuszellen) bei Bestrahlung mit hohen UV-Dosen ($> 2 \text{ J} \times \text{m}^{-2}$) ein Reparaturmechanismus manifestiert, der dosisabhängig langsamer einsetzt und seinem Umfang

nach geringer ausfällt als der entsprechende Reaktionsablauf in Milzellen (mit größerem B-Zellen-Anteil) (Abb. 1).

Röntgenbestrahlung führte zu einer deutlich andersartigen Dosis-Wirkungs-Beziehung als UV-Licht (Abb. 2). In Milzellen durchlief der stimulierbare [^3H]TdR-Einbau (mit + 50% über dem Vergleichsdurchschnitt) ein Maximum im Dosisbereich von 0,960 Gy und verminderte sich anschließend wieder. Die Thymuszellpräparation zeigte dagegen unter den gleichen Bedingungen erst bei Dosen $> 0,960 \text{ Gy}$ signifikante Erhöhung der UDS-bedingten Tritiumaufnahme in die DNA. Nach Dosen von 3,480 Gy wurden schließlich Einbauraten erreicht, die deutlich über den gemessenen Maximalwerten der Milzellen lagen. Röntgenbestrahlung wurde somit – ähnlich wie UV-Licht – von Milzellen empfindlicher beantwortet als von Thymozyten. Der Reparaturvorgang

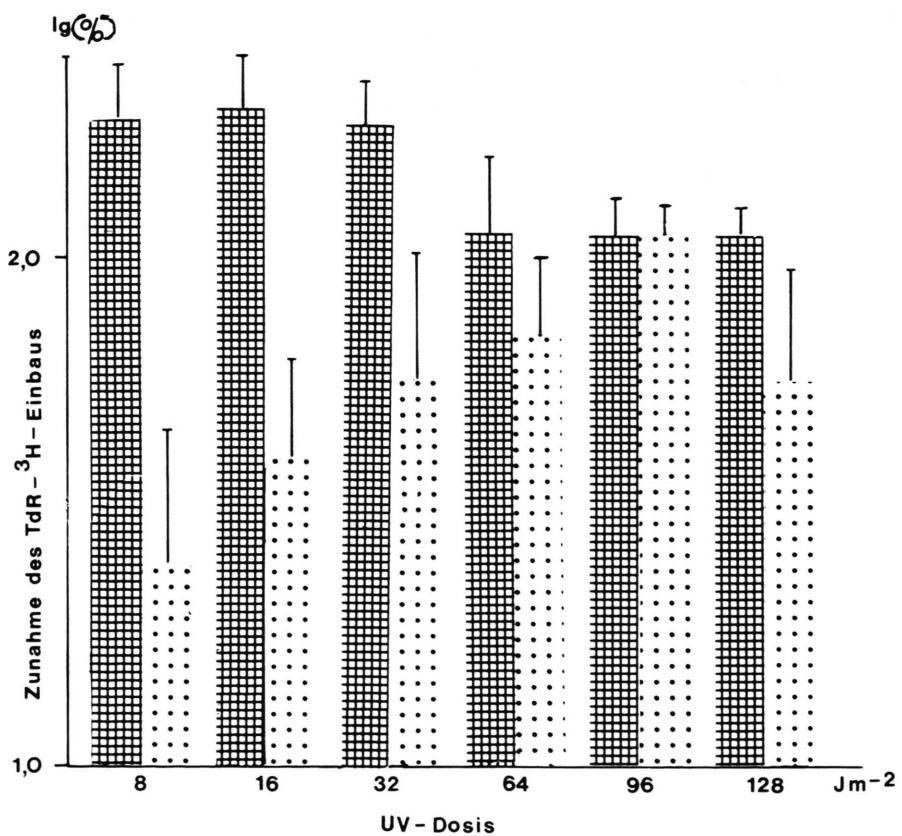


Abb. 1. Zunahme des *in vitro*-Einbaus von [^3H]TdR in die DNA von Milzellen (karierte Fläche) bzw. Thymuszellen (punktuierte Fläche) der Ratte in Gegenwart von 10^{-2} mol/l HH unmittelbar nach UV-Bestrahlung dosisabhängig. Ordinate im logarithmischen Maßstab.

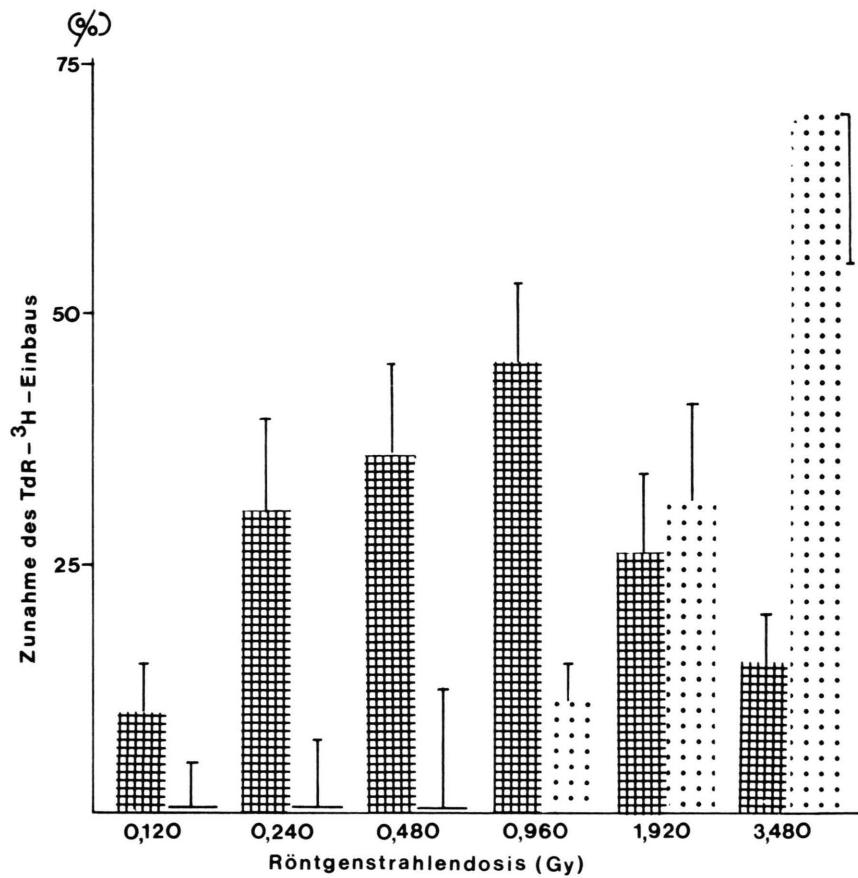


Abb. 2. Zunahme des *in vitro*-Einbaus von $[^3\text{H}]$ TdR in die DNA von Milzellen (karierte Fläche) bzw. Thymuszellen (punktierter Fläche) der Ratte in Gegenwart von 10^{-2} mol/l HH unmittelbar nach Röntgenbestrahlung dosisabhängig. — Anmerkung: Wurden die Zellen 30 bzw. 60 min nach Exposition inkubiert, nahm die UDS um 50 bzw. 100% gegenüber den Werten unmittelbar nach Bestrahlung ab.

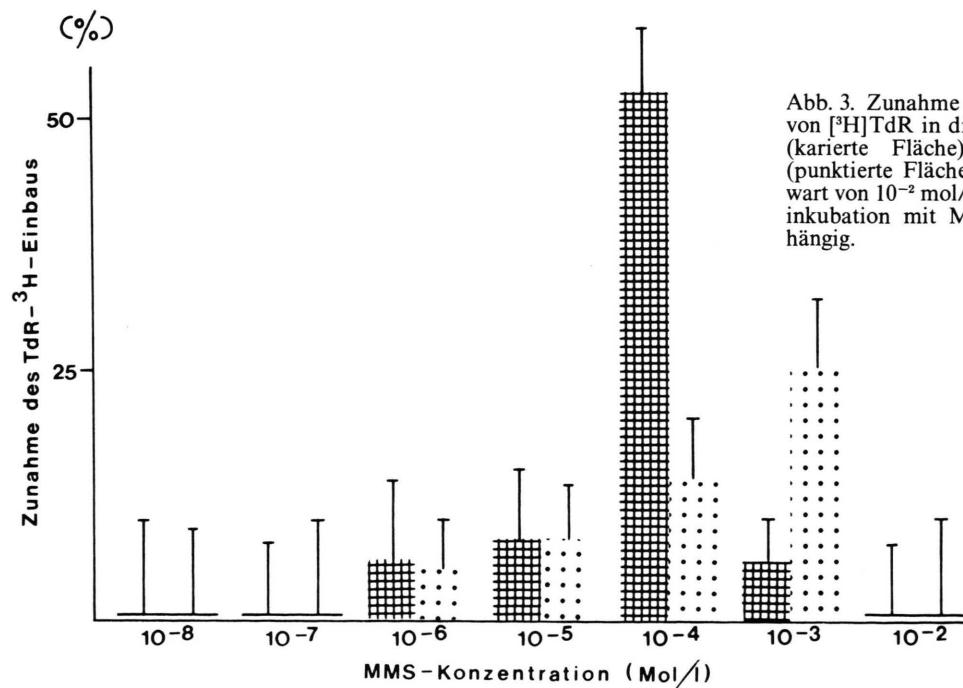


Abb. 3. Zunahme des *in vitro*-Einbaus von $[^3\text{H}]$ TdR in die DNA von Milzellen (karierte Fläche) bzw. Thymuszellen (punktierter Fläche) der Ratte in Gegenwart von 10^{-2} mol/l HH nach 30 min Vorinkubation mit MMS konzentrationsabhängig.

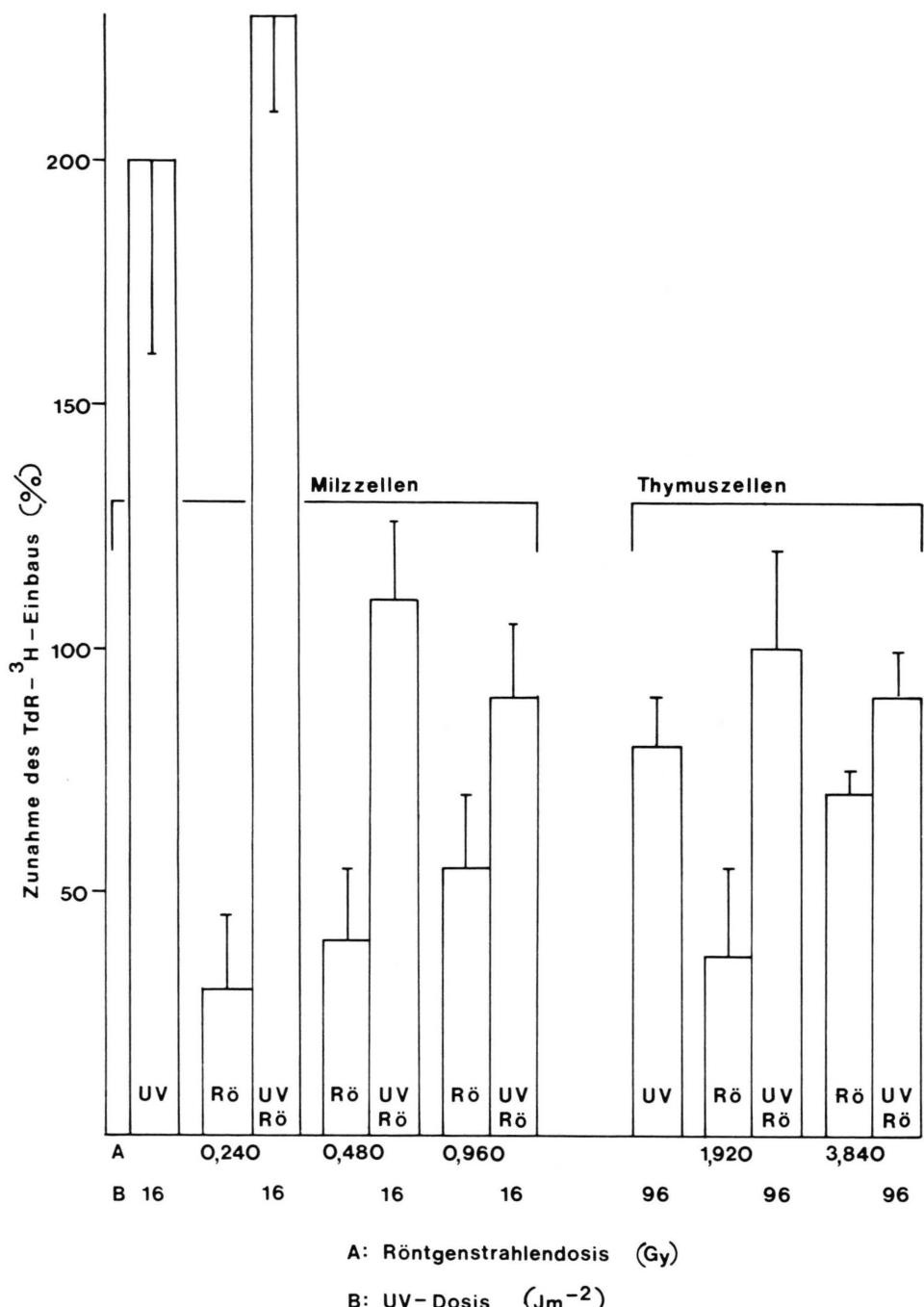


Abb. 4. Zunahme des *in vitro*-Einbaus von $[^3\text{H}]$ TdR in die DNA von Milzzellen bzw. Thymuszellen der Ratte in Gegenwart von 10^{-2} mol/l HH unmittelbar nach alleiniger UV- oder Röntgenbestrahlung sowie nach Röntgen- und UV-Bestrahlung kombiniert. Die kombinierte Exposition (UV; Rö) erfolgte zuerst mit Röntgenstrahlen (Rö) und unmittelbar anschließend mit UV-Licht (UV).

blieb bei ersteren allerdings „unvollständiger“ (Abb. 2).

Verglichen mit dem Verhalten des stimulierbaren [³H]TdR-Einbaus nach Einwirkung von UV-Licht oder Röntgenstrahlen verhielt sich die UDS von Thymus- und Milzzellen nach Zusatz von MMS ähnlich wie nach UV-Bestrahlung: Bei etwa gleichen minimal wirksamen MMS-Konzentrationen zeigte sich das System bei Milzzellen vollständiger aktivierbar als bei Thymuszellen. Jenseits eines Konzentrationsmaximums trat allerdings in beiden Fällen vollständige Hemmung des Tritiumeinbaus ein (Abb. 3).

Der Vergleich von Milz- und Thymuszellen hinsichtlich der DNA-Reparatur nach Einwirkung von UV-Licht bzw. Röntgenstrahlen läßt in dem vorliegend gewählten System den Schluß zu, daß letztere die DNA-Reparaturkapazität von Milzzellen stärker schädigen als die von Thymuszellen. Es war daher zu erwarten, daß auch die DNA-Reparatur nach Einwirkung von UV-Licht durch Röntgenstrahlen bei Milzzellen rascher und in größerem Umfang geschädigt wird als bei Thymozyten. Eine Bestätigung dieser Annahme bieten die in Abb. 4 dargestellten Ergebnisse: Durch vorherige Röntgenbestrahlung von Milzzellen mit Dosen von 0,480 Gy beispielsweise wurde der durch UV-Licht maximal stimulier-

bare [³H]TdR-Einbau um ca. 50% gehemmt. Unter den gleichen Bedingungen waren noch Röntgenstrahlendosen von 1,920 Gy an Thymozyten praktisch wirkungslos (Abb. 4).

Den vorliegenden Ergebnissen zufolge könnten der größeren Empfindlichkeit von T (hier: Thymus-)Zellen gegenüber UV-Licht und jener von B (hier: Milz-)Zellen gegenüber Röntgenstrahlen jeweils unvollständiger aktivierbare Reparatursysteme zugeordnet werden. Aussagen über die Art des unter den jeweiligen Bedingungen limitierend wirkenden Faktors sind vorläufig nicht möglich. Auf die Bedeutung des DNA-Vorstufen-Pools für den Ablauf des Reparaturvorganges haben unlängst Yew und Johnson [13] anhand von Inhibitoruntersuchungen an UV-bestrahlten B- und T-Zellen des Menschen hingewiesen. In die gleiche Richtung weist die unterschiedliche Empfindlichkeit von Milz- und Thymuszellen der Ratte gegenüber HH (Tab. I). Weitere Untersuchungen sollen an isolierten T- und B-Zellen durchgeführt werden. Dabei ist insbesondere zu klären, wie sich der DNA-Vorstufen-Pool unter dem Einfluß von Röntgen- und UV-Strahlen bzw. Alkylyantien verhält, und welche Konsequenzen sich aus eventuellen Änderungen der Poolgrößen für den Ablauf der DNA-Exzisions-Reparatur ergeben.

- [1] K. H. Kärcher u. C. Streffer (Hrsg.), *Die Strahlenwirkung auf das Lymphsystem unter besonderer Berücksichtigung der kleinen Dosen*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1974.
- [2] A. A. Yarilin, E. F. Polushkina u. P. P. Filatov, *Radiobiologiya* **16**, 451–455 (1978).
- [3] J. S. Prosser, *Int. J. Radiat. Biol.* **30**, 459–465 (1976).
- [4] Y. Hori u. R. Nishikawa, *Annu. Rep. Radiat. Cent. Osaka Prefect.* **16**, 87–90 (1976).
- [5] D. K. Kwan u. A. Norman, *Radiat. Res.* **69**, 143–151 (1977).
- [6] S. K. Durum u. N. Gengozian, *Int. J. Radiat. Biol.* **34**, 1–15 (1978).
- [7] F. F.-H. Yew u. R. T. Johnson, *Exp. Cell Res.* **113**, 227–231 (1978).
- [8] T. L. Pazdernik u. T. Nishimura, *Agents Actions* **8**, 229–237 (1978).
- [9] G. Agarossi, L. Pozzi, C. Mancini u. G. Doris, *J. Immunol.* **121**, 2118–2121 (1978).
- [10] J. Wasserman, E. Baral, H. Blomgren u. B. Petrini, *J. Clin. Lab. Immunol.* **1**, 147–150 (1978).
- [11] R. Hollatz u. K. Tempel, *Rad. Environm. Biophys.* **15**, 77–83 (1978).
- [12] G. M. Williams, *Cancer Lett.* **4**, 69–75 (1978).
- [13] F. F.-H. Yew u. R. T. Johnson, *Biochim. Biophys. Acta* **562**, 240–251 (1979).
- [14] J. M. Clarkson, *Mutat. Res.* **52**, 273–284 (1978).
- [15] U. Andrae u. H. Greim, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **87**, 50–58 (1979).
- [16] F. E. Ahmed u. R. B. Setlow, *Photochem. Photobiol.* **29**, 983–989 (1979).