

Induktion von Einzel- und Doppelstrangbrüchen in linearer und superzirkularer DNA durch Phleomycin

Induction of Single- and Double-Strand Breaks in Linear and Superhelical DNA by Phleomycin

Franz Schmülling und Wolfgang Köhnlein

Institut für Strahlenbiologie der Universität Münster, Hittorfstraße 17, D-4400 Münster

Z. Naturforsch. 37 c, 1228–1233 (1982); received June 15, 1982

Phleomycin-DNA Interaction, DNA-Strand Break, Electrophoretic Mobility, Mutagenicity

Phleomycin induced DNA breakage was investigated with superhelical Col. E1 DNA and linear T2 DNA as well. In both DNA-forms besides single-strand breaks direct double-strand breaks were produced by the drug. The double-strand breakage rate obtained after treatment with phleomycin, however, was considerably smaller than that found after bleomycin treatment. Whereas the single- and double-strand breakage rate in Col. E1 DNA showed a linear and nearly quadratic dependence on the phleomycin concentration, respectively, in T2 DNA the breakage rates increased faster than the first or second power of the concentration. This indicates various modes of drug-DNA interaction. Under nondegrading conditions a strong retardation of electrophoretic mobility was observed for all three topological isomers of Col. E1 DNA whereas the sedimentation behaviour remained unchanged.

The *in vitro* effects (strand breakage) of phleomycin and bleomycin are compared with induction of chromosomal aberrations in human lymphocytes and oocytes of *Drosophila melanogaster*.

Einleitung

Bleomycin und Phleomycin sind nahe verwandte Gruppen von basischen Antitumor-Glykopeptiden, deren Molekulargewicht zwischen 1450 und 1500 liegt. Phleomycin (PLM) wurde 1956 von Maeda *et al.* [1] und Bleomycin (BLM) 1966 von Umezawa *et al.* entdeckt [2]. Wegen der hohen Nierentoxizität und anderer unerwünschter Nebenwirkungen [3] des Phleomycins wurde dessen molekularer Wirkungsmechanismus bisher nur wenig untersucht [4–6]. Das Interesse richtete sich stärker auf Bleomycin, das geringere Nebenwirkungen zeigt und mit dem daher gegenwärtig verschiedene Tumorformen behandelt werden [7, 8]. Die chemischen Strukturen der beiden Substanzen sind sehr ähnlich [9]. Während BLM eine Bithiazolgruppe besitzt, weist PLM ein Thiazolin auf (Abb. 1).

Wie Povirk *et al.* [10] zeigten, kann BLM über den koplanaren Bithiazolring in die DNA interkalieren. Diese Wechselwirkung DNA-Antibiotikum hat Strangbrüche in der DNA zur Folge, die bevorzugt

an bestimmten Basensequenzen auftreten [11]. Somit scheint für die Induktion von DSB die Interkalation von BLM in die DNA eine wichtige Vorbedingung zu sein. Das beim PLM anstelle von Bithiazol vorhandene Thiazolin (Abb. 1) verhindert ein Interkalieren dieses Moleküls in die DNA [10]. Dennoch entstehen nach Phleomycineinwirkung Einzelstrangbrüche und auch Doppelstrangbrüche in der DNA [12]. Die große strukturelle Ähnlichkeit der beiden Zytostatika hat vergleichende Untersuchungen über ihre molekulare Wechselwirkungen mit der DNA gerade in neuester Zeit stimuliert [12–15].

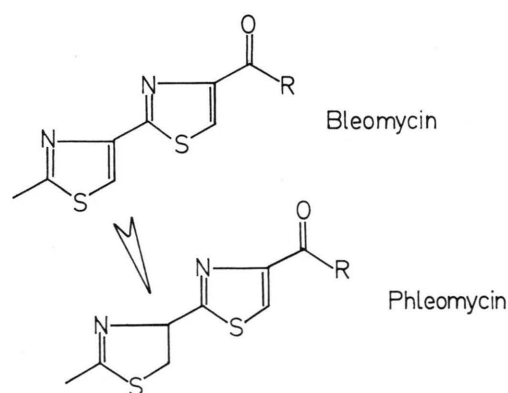


Abb. 1. Darstellung der Unterschiede in den Strukturformeln von Bleomycin (Thiazolring) und Phleomycin (Thiazolinring).

Abkürzungen: BLM, Bleomycinsulfat; PLM, Phleomycin; DSB, Doppelstrangbruch; ESB, Einzelstrangbruch; EB, Ethidiumbromid.

Reprint requests to Prof. Dr. W. Köhnlein.

0341-0382/82/1100-1228 \$ 01.30/0



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.

Unser Interesse konzentrierte sich auf folgende Fragen:

1. Erzeugt PLM ähnlich wie BLM auch neben den DSB, die durch zufälliges Aufeinandertreffen von ESB in komplementären Strängen entstehen, direkte DSB?
2. Worin besteht die Wechselwirkung PLM – DNA, da Interkalation ausgeschlossen ist?
3. Kann aus den Strangbruchraten *in vitro* auf die PLM-Effekte in Prokaryonten und Eukaryonten geschlossen werden?

Material and Methoden

Col. E1 DNA wurde, wie bereits beschrieben, aus *E. coli* JC 411^{thy-} Zellen isoliert und gereinigt [16, 17]. T2-Phagen wurden in *E. coli* C 321^{thy-} vermehrt und die DNA phenolextrahiert. Zur radioaktiven Markierung diente [Methyl-3H]Thymin (spezif. Aktivität 26 Ci/mmol). Bei der Behandlung der DNA mit Phleomycin enthalten die Reaktionsmischungen 120 µmol/l DNA; zwischen 1 und 200 µmol/l Phleomycin und 30 mmol/l Merkaptoäthanol, falls nicht anders angegeben.

Agarose-Gel-Elektrophorese und EB-Fluorochromierung dienten zur Auftrennung und Lokalisation der Col. E1 DNA-Formen. Zur quantitativen Analyse wurde die Radioaktivität der DNA enthaltenden Gelstücke ermittelt.

Zur Bestimmung der Strangbruchrate in linearer T2 DNA wurde die Saccharose-Gradientenzentrifugation benutzt [16]. Die Sedimentationsprofile wurden mit der von Litwin [18] angegebenen Methode ausgewertet.

Das hier verwendete Phleomycin war von Dr. W. T. Bradner, Bristol-Myers, Syracuse NY, USA, zur Verfügung gestellt worden. Bleomycin erhielten wir von der Fa. Mack Nachf., Illertissen. Beiden Firmen danken wir für ihre freundliche Unterstützung.

Resultate und Diskussion

Erzeugung von Strangbrüchen in superzirkularer DNA

Kovalent geschlossene superzirkulare DNA (Form I) wird durch einen Einzelstrangbruch in relaxierte zirkulare DNA (Form II) und durch einen Doppelstrangbruch in lineare DNA (Form III) überführt. Diese drei topologischen Formen können

durch Elektrophorese getrennt werden. Aus der Abnahme von Form I und der Zunahme von Form III ergibt sich die ESB- und die DSB-Rate [16].

In Abb. 2 sind die Ergebnisse mehrerer Degradationsexperimente mit Phleomycin für Col. E1 DNA ($4,2 \times 10^6$ Dalton) dargestellt. Die ESB-Rate zeigt eine lineare Abhängigkeit von der PLM-Konzentration, während die DSB-Rate angenähert quadratisch mit der PLM-Konzentration zunimmt.

Nach der von Freifelder und Trumbo [19] angegebenen Formel läßt sich die Anzahl der DSB, die durch zufällige Koinzidenz von ESB in komplementären Strängen entstehen, berechnen. Dabei muß man berücksichtigen, daß diese Formel für lineare DNA-Moleküle abgeleitet wurde und die ESB (N_1) pro Einzelstrang angegeben werden. Bei superzirkul-

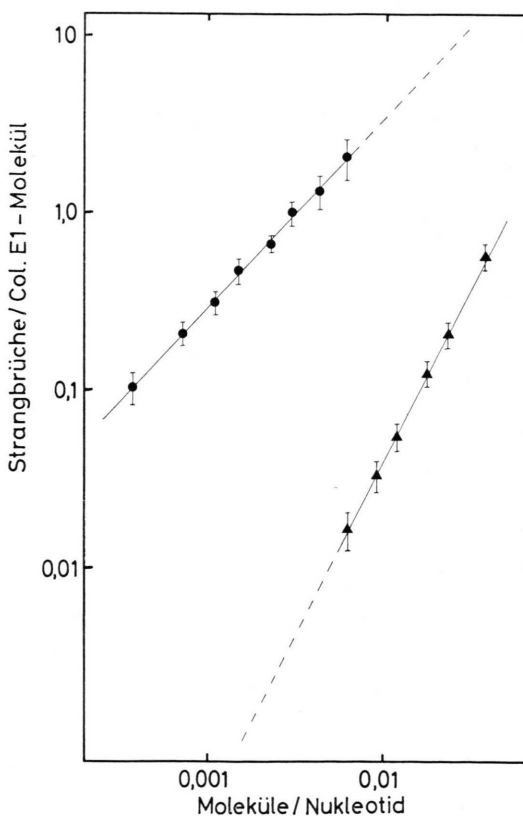


Abb. 2. Strangbrüche in Col. E1 DNA nach Phleomycinbehandlung in 50 mmol/l Tris-HCl (pH 7,5) für 60 min bei 22 °C. Die Degradationsreaktion wird durch Zugabe von EDTA (10 mmol/l Endkonzentration) unterbrochen. Die Proben wurden auf 1% Agarosegel analysiert (4 V/cm; 3–4 h). Einzelstrangbrüche (●), Doppelstrangbrüche (▲). Die mittleren Abweichungen aus mindestens 5 verschiedenen Experimenten sind angegeben.

larer DNA reicht bereits der *erste* ESB pro Molekül aus, um durch Relaxation zu Form II-DNA zu führen. Damit beträgt die mittlere Anzahl der ESB/Einzelstrang nur 0,5. Diesem Sachverhalt muß man Rechnung tragen, wenn man die Anzahl der zufälligen DSB mit Hilfe der Freifelder-Formel ermitteln will:

$$N_2 = \frac{(2h+1)}{L} \left(\frac{N_1}{2} \right)^2$$

Mit dem Abstandsparemeter $h=15$ erhält man für Col. E1 DNA mit $L=6400$ Basenpaaren die in Abb. 3 dargestellte Kurve 1. Aus den experimentellen Werten (Abb. 2) ergibt sich unter Einbeziehung der extrapolierten Bereiche die Kurve 2 in Abb. 3. Damit liegt die DSB-Rate deutlich über der theoretisch ermittelten.

Die von Huang *et al.* [12] mitgeteilten Ergebnisse über die PLM-Degradation von PM2-DNA lassen sich ebenfalls in Abb. 3 darstellen (○) und bestätigen unsere Befunde.

Zum Vergleich ist auch die DSB-Rate gegen die Anzahl der ESB nach Bleomycinbehandlung von Col. E1 DNA in Abb. 3 angegeben [16].

Erzeugung von Strangbrüchen in linearer T2 DNA

Radioaktiv markierte T2 DNA wurde mit Phleomycin degradiert und die Einzel- bzw. Doppel-

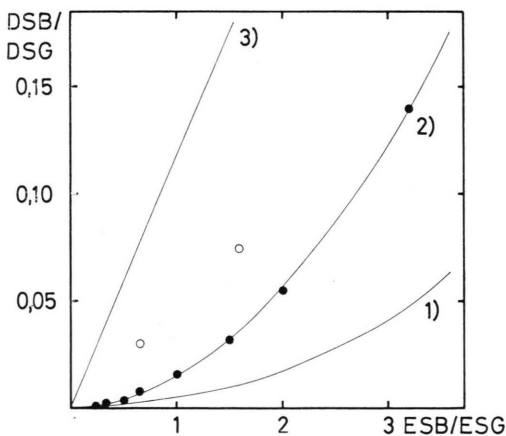


Abb. 3. Die Anzahl der DSB in Col. E1 DNA ist gegen die Anzahl der ESB aufgetragen. 1. Nach der von Freifelder und Trumbo abgeleiteten Beziehung. 2. Nach Phleomycinbehandlung mit den in Abb. 2 erhaltenen experimentellen Werten. 3. Nach Bleomycinbehandlung [16]. Außerdem sind die nach den Angaben von Huang *et al.* [12] nach Phleomycinbehandlung erhaltenen Werte eingetragen (○).

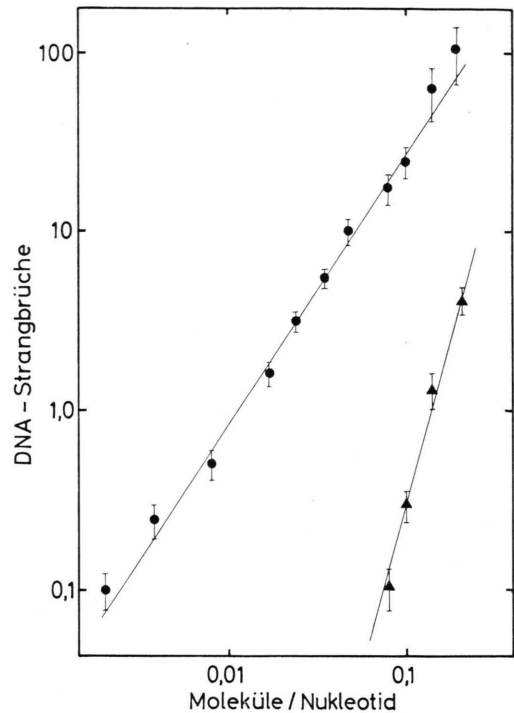


Abb. 4. Strangbrüche in T2 DNA nach Phleomycinbehandlung in Salincitrat (0,05 mol/l), (pH 7,0) für 60 min bei 22 °C. Einzelstrangbrüche pro Einzelstrang (●); Doppelstrangbrüche pro Doppelstrang (▲). Die DNA wurde in neutralen bzw. alkalischen Saccharosegradienten 5–20% sedimentiert (40 000 UpM; 115 min; 18 °C; SW 50,1).

strangbruchrate durch Sedimentation in alkalischen bzw. neutralen Saccharosegradienten bestimmt.

Die Ergebnisse vieler Degradationsexperimente sind in Abb. 4 dargestellt. Interessanterweise nimmt die Anzahl der ESB überproportional mit der PLM-Konzentration und die Anzahl der DSB stärker als quadratisch zu. Dies läßt möglicherweise auf unterschiedliche Wechselwirkung bei linearer und superzirkularer DNA schließen. Auch bei linearer DNA liegt die Häufigkeit der experimentell ermittelten DSB deutlich über der nach Freifelder und Trumbo berechneten Häufigkeit. In linearer wie in superzirkularer DNA werden also durch Phleomycin ebenfalls direkte DSB induziert, wenn auch mit erheblich geringerer Ausbeute als durch Bleomycin. Da bei PLM keine Interkalation möglich ist, muß ein anderer Wechselwirkungsmechanismus existieren, der den nötigen Kontakt zwischen Zytostatikum und DNA herstellt. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse unserer Experimente über die elektrophoretische Mobilität von Col. E1 DNA gestützt.

Änderung der elektrophoretischen Mobilität von Col. E1 DNA durch Phleomycin

Unter Bedingungen, bei denen keine Strangbrüche erzeugt werden, d. h. in Abwesenheit von reduzierenden Agenzien im Reaktionsgemisch, verringern hohe PLM-Dosen die elektrophoretische Mobilität der Col. E1 Moleküle. Abb. 5 zeigt ein Agarosegel, in dem die Abnahme der Mobilität der Form I und Form II DNA mit zunehmender PLM-Konzentration sichtbar ist. Eine vergleichbare Retardierung wurde auch bei linearen Col. E1 Molekülen (Form III) beobachtet. Außerdem werden die DNA-Bänder im Agarosegel mit zunehmender Phleomycinkonzentration unschärfer. Vergleichbare Bleomycinkonzentrationen beeinflussen die elektrophoretische Mobilität der Col. E1 DNA nicht.

Überträgt man die von McDonell *et al.* [20] gemachten Angaben, nach denen Restriktionsfragmente der T7 DNA mit den Molekulargewichten $2,7 \times 10^6$ bzw. $3,9 \times 10^6$ Dalton Mobilitäten von 0,55 bzw. 0,42 relativ zu Bromphenolblau haben, auf die hier mit Col. E1 DNA ($4,2 \times 10^6$ Dalton) beschriebenen Experimente, so würde die nach Phleomycinbehandlung beobachtete Reduktion der Mobilität aller drei topologischen Formen der Col. E1 DNA auf eine Molekulargewichtsvergrößerung und somit auf einen PLM-DNA-Komplex hinweisen, der auch durch Sedimentation im neutralen Saccharosegradienten

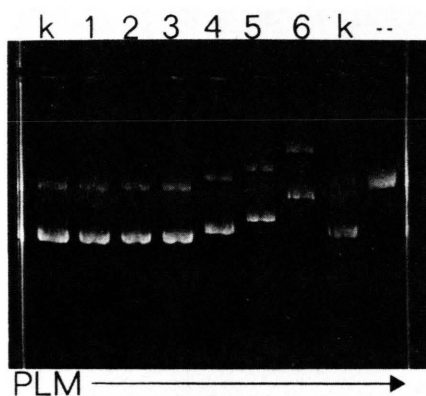


Abb. 5. Änderung der elektrophoretischen Mobilität von Col. E1 DNA Form I und Form II mit zunehmender Phleomycinkonzentration unter nicht degradierenden Bedingungen (in Abwesenheit von reduzierenden Agenzien). Kontrolle (K); in den Kanälen 1 bis 6 nimmt die Phleomycinkonzentration jeweils um den Faktor 2 auf 0,5 Moleküle/Nukleotid (Kanal 6) zu. Unter den gewählten Elektrophoresebedingungen hat Form I DNA (superzirkular) die größere Beweglichkeit und bildet jeweils das untere Band.

nachweisbar sein sollte. Mit geeigneten Sedimentationsexperimenten konnte eine Molekulargewichtserhöhung von nur 10% ausgeschlossen werden. Das bedeutet, daß bei einem Angebot von einem PLM-Molekül pro Basenpaar weniger als ein PLM pro 21 Basenpaare kovalent gebunden sein könnte. Damit ist die im Agarosegel beobachtete Mobilitätsänderung nicht durch Molekulargewichtsveränderungen erklärbar. Auch eine mögliche Änderung der topologischen Konformation kann nicht als Erklärung der Mobilitätsänderung dienen, da die Wechselwirkung mit Phleomycin die Beweglichkeit aller drei DNA-Formen in gleicher Weise beeinflusst.

Die Mobilitätsänderung kann dagegen durch eine Änderung des Masse/Ladungs-Verhältnisses hervorgerufen worden sein. Ähnliche Mobilitätsänderungen in Polyacrylamid-Gelen wurden an linearen DNA-Restriktionsfragmenten nach Behandlung mit einer Reihe von basenspezifischen Antibiotika beobachtet [21]. Dabei wurde besonders die Mobilität der größeren Fragmente durch die Antibiotika reduziert, während die der kleinen unverändert bleibt. Loucks *et al.* [21] vermuten, daß die Antibiotika bei ihrer Wechselwirkung mit der DNA deren Konformation und damit auch den effektiven Radius ändern und versuchen so, die veränderte Mobilität zu erklären. Da, wie oben beschrieben, die gleiche Mobilitätsänderung in den drei DNA-Formen (I, II, III) durch Phleomycin hervorgerufen wird und Interkalationsreaktionen nach Povirk ausgeschlossen sind, muß die phleomycinbedingte Mobilitätsveränderung andere, bisher noch nicht befriedigend erklärbare Ursachen haben.

Vergleich der DNA-Strangbruchraten mit den Effekten von Phleomycin und Bleomycin in Prokaryonten und Eukaryonten

Bei vergleichbaren Zytostatikakonzentrationen ist unter optimierten Bedingungen wie Inkubationszeit, Temperatur und Merkaptoäthanolkonzentration die Zahl der durch BLM und PLM induzierten ESB etwa gleich, während durch Bleomycin mehr DSB erzeugt werden als durch Phleomycin (Abb. 3). Da ein DSB im DNA-Molekül im Gegensatz zum ESB als ein gravierender und oft nur schwer oder gar nicht zu reparierender Schaden angesehen werden kann, sollte man aufgrund der *in vitro* erhaltenen Ergebnisse erwarten, daß die biologische Wirksamkeit von Bleomycin in Prokaryonten und Eukaryonten größer ist als die von Phleomycin.

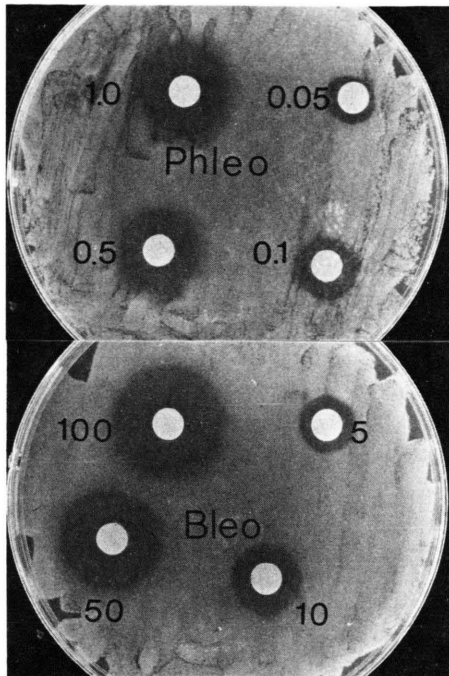


Abb. 6. Vergleich der bakteriziden Wirkung von Phleomycin und Bleomycin bei *B. subtilis* UV-SS₁₉₋₈ *her*⁻, *rec*⁻. Die aufgetragenen Dosen sind in µg angegeben.

Hemmhoftests mit *B. subtilis* UV-SS₁₉₋₈ *her*⁻, *rec*⁻ [22] ergeben aber, daß Phleomycin rund 50–100 mal stärker bakterizid wirkt als Bleomycin (Abb. 6).

In menschlichen Lymphozytenkulturen ist die Anzahl der strukturellen Aberrationen (dizentrische Chromosomen) nach BLM- bzw. PLM-Behandlung *in vitro* (300 µg/ml) jedoch etwa gleich. Auch bei *Drosophila* werden Punktmutationen (rezessive Letalfaktoren) mit etwa gleich großer Häufigkeit durch BLM und PLM induziert [24, 25]. Untersucht man

dagegen bei *Drosophila* in Oozyten induzierte numerische Chromosomenaberrationen (Aneuploidie) mit konventionellen Kreuzungsanalysen, so erweist sich BLM als ein starkes Mutagen, während PLM völlig unwirksam ist [25]. Erst durch die Entwicklung einer neuen überaus empfindlichen Methode, der „Aneuploidiemuster-Technik“ [26], konnte gezeigt werden, daß auch PLM – obgleich nur schwach – mutagen ist. Auch mit dieser Methode erwies sich BLM als sehr wirksam und erzeugt ein „Aneuploidiemuster“, das dem durch Röntgenstrahlung induzierten sehr ähnlich ist [25, 26]. Diese Resultate zeigen, daß die mit einem einfachen Testsystem (ESB, DSB in T2 DNA und Col. E1 DNA) *in vitro* gefundenen Ergebnisse sich nicht ohne weiteres auf menschliche Zellkulturen und lebende Organismen (*Drosophila*) übertragen lassen, da hier stets auch die Transportwege (Überwindung von Zellmembranen beim Hemmhoftest und Lymphozyten; Aufnahme der Zytostatika über den Verdauungstrakt bei *Drosophila*) zu berücksichtigen sind. Lediglich die für numerische Chromosomenaberrationen bei *Drosophila* gefundenen Unterschiede zwischen BLM und PLM entsprechen unseren *in vitro* erhaltenen Ergebnissen zur Induktion von DSB, denn in beiden Systemen erwies sich BLM als das wirksamere Agens.

Somit zeigen diese Vergleiche, daß DNA-Strangbruchuntersuchungen zwar Hinweise auf die Mutagenität einer Substanz liefern können. Mutagenitätsprüfungen mit möglichst verschiedenartigen eukaryontischen Testsystemen können aber durch solche Untersuchungen nicht ersetzt werden.

Danksagung

Die Autoren danken Herrn Prof. Dr. H. Traut für zahlreiche Diskussionen und zur Verfügungstellung neuester Ergebnisse.

- [1] K. Maeda, H. Kosaka, K. Yagishita, und H. Umezawa, *J. Antibiot.* **9A**, 82 (1956).
- [2] H. Umezawa, K. Maeda, T. Takeuchi, und Y. Okami, *J. Antibiot. Ser. A* **19**, 200 (1966).
- [3] M. Ishizuka, H. Takayama, H. Hiranaka, und H. Umezawa, *J. Antibiot. Ser. A* **19**, 260 (1966).
- [4] R. Stern, J. A. Rose, und R. M. Friedman, *Biochemistry* **13**, 307 (1974).
- [5] M. J. Sleigh, *Nucl. Acids Res.* **3**, 891 (1975).
- [6] M. J. Sleigh und G. W. Grigg, *Mutation Res.* **42**, 181 (1977).
- [7] R. H. Blum, S. K. Carter, und K. A. Agre, *Cancer* **31**, 903 (1973).
- [8] S. T. Crooke und W. T. Bradner, *J. Med.* **7**, 333 (1976).
- [9] H. Umezawa, *Bleomycin: Chemical, Biochemical und Biological Aspects*, p. 24, Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin 1979.
- [10] L. F. Povirk, M. Hogan, und N. Dattagupta, *Biochemistry* **18**, 96 (1979).
- [11] A. D. D'Andrea und W. A. Haseltine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 3608 (1978).
- [12] C.-H. Huang, C. K. Mirabelli, Y. Jan, und S. T. Crooke, *Biochemistry* **20**, 233 (1981).
- [13] M. Takeshita, L. S. Kappen, A. P. Grollman, M. Eisenberg, und I. H. Goldberg, *Biochemistry* **20**, 7599 (1981).
- [14] H. Okubo, Y. Abe, M. Hori, H. Asakura, und H. Umezawa, *J. Antibiot.* **34**, 1213 (1981).
- [15] L. F. Povirk, M. Hogan, N. Dattagupta, und M. Buechner, *Biochemistry* **20**, 665 (1981).
- [16] L. F. Povirk, W. Wübker, W. Köhnlein, und F. Hutchinson, *Nucl. Acids Res.* **4**, 3573 (1977).
- [17] D. G. Blair, D. J. Sheratt, D. B. Clewell, und D. R. Helinski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 2518 (1972).
- [18] S. Litwin, *J. Appl. Prob.* **6**, 275 (1969).
- [19] D. Freifelder und B. Trumbo, *Biopolymers* **7**, 681 (1969).
- [20] M. W. McDonell, M. N. Simon, und F. W. Studier, *J. Mol. Biol.* **110**, 119 (1976).
- [21] E. Loucks, G. Chaconas, R. W. Blakesly, R. D. Wells, und J. V. van de Sande, *Nucl. Acids Res.* **6**, 1869 (1979).
- [22] W. Köhnlein und F. Hutchinson, *Molec. Gen. Genet.* **144**, 323 (1976).
- [23] W. Scheid und H. Traut, Vortrag gehalten beim Symposium „Molekulare und zelluläre Mechanismen der Wirkung ionisierender Strahlen“, 17.–19. 3. 1982, GSF, München-Neuherberg.
- [24] H. Traut, *Environmental Mutagenesis* **2**, 89 (1980).
- [25] H. Traut, persönliche Mitteilung.
- [26] H. Traut, *Environmental Mutagenesis* **3**, 275 (1981).