

Zur Wirkung von Zn^{++} auf die Nukleinsäurebiosynthese von Aszites-Tumorzellen

Die Biochemie des Zinks wurde bislang hauptsächlich in solchen biologischen Systemen untersucht, bei denen Proteine oder deren monomere Bausteine beteiligt waren. Zinkionen können dort die Tertiärstruktur von Enzymen stabilisieren, Metallbrückenbindungen zu den Substraten bilden oder direkt als Koenzyme in die Reaktion eingreifen. In den letzten Jahren sind die Kenntnisse über die Biochemie der Nukleinsäurebiosynthese immer umfassender geworden. Erstaunlich jedoch ist, dass der Einfluss von Spurenelementen hierbei nur wenig berücksichtigt wurde¹⁻⁵. In dieser Arbeit wird daher die Wirkungsweise von Zn^{++} auf die Nukleinsäurebiosynthese von Aszitestumorzellen untersucht.

Im einzelnen wird an intakten Asziteszellen geprüft, wie die DNA-, RNA- und Proteinbiosynthese in Gegenwart von Zn^{++} verläuft. In zellfreien Systemen wird jeweils die Aktivität der DNA-Polymerase beziehungsweise der DNA-abhängigen RNA-Polymerase in Anwesenheit unterschiedlicher Zinkionenkonzentrationen bestimmt. Anschliessend wird die Wirkung des Zn^{++} auf die Biosynthese einiger Nukleosidtriphosphate untersucht.

Methodik. Der Einbau von [^{14}C]-Thymidin, -Uridin und -Leuzin in ganze Aszitestumorzellen erfolgte nach WEITZEL et al.⁶. Die jeweilige Aktivität der DNA-Polymerase und DNA-abhängigen RNA-Polymerase im 10^6 -g-Überstand wurde nach WEITZEL et al.⁷ bestimmt. Die Biosyntheserate für Nukleosidtriphosphate wurde dünn-schichtchromatographisch nach WEITZEL et al.⁸ ermittelt.

Ergebnisse. Werden Ehrlich-Aszites-Karzinomzellen zusammen mit unterschiedlichen Zn^{++} -Konzentrationen inkubiert und zusätzlich mit jeweils $0.1 \mu C$ [^{14}C]-Thymidin, -Uridin sowie -Leuzin versetzt, so werden die in Figur 1 gezeigten Einbauraten erhalten. $10^{-7} M$ und $10^{-6} M$ Zn^{++} bewirken keine Änderung der Einbauraten der [^{14}C]-markierten Vorstufen. Mit zunehmendem Zn^{++} -Gehalt wird jedoch immer weniger [^{14}C]-Thymidin aufgenommen. Die stärkste Hemmung ist bei einer Zn^{++} -Konzentration von $10^{-4} M$ zu beobachten. Überraschend war, dass unter den gleichen Versuchsbedingungen weder der Einbau von [^{14}C]-Leuzin noch von [^{14}C]-Uridin eine Änderung zeigte. Aus den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass selektiv die DNA-Biosynthese durch Zn^{++} gehemmt wird.

Zur Bestimmung der Aktivität der DNA-Polymerase wurde die $10^6 \times g$ -Fraktion verwendet. Die jeweiligen Zn^{++} -Dosierungen wurden direkt zugegeben. Vorinkubationen ergaben keine abweichenden Ergebnisse. In der Figur 2 ist die Aktivität der DNA-Polymerase gegen

unterschiedliche Zn^{++} -Konzentrationen aufgetragen. 1.6 ml des Inkubationsgemisches enthalten jeweils: 20 nM d -AMP, d -CMP und d -GMP; $0.1 \mu C$ [^{14}C]-Thymidin; $3.3 \mu M$ ATP; $7.7 \mu M$ Kreatinphosphat; $200 \mu g$ Kreatinphosphokinase; $12 \mu M$ $MgCl_2$; $Tris$ $6.5 \mu M$; 0.3 ml der Enzymfraktion (entsprechend 1.2 mg Protein); 0.1 mg Kalbsthymus-DNA; 16 – 160 nM $ZnCl_2$; pH 7.3.

Die DNA-Polymeraseaktivität nimmt mit steigendem Zn^{++} -Gehalt ab. $10^{-4} M$ Zn^{++} senkt den [^{14}C]-Thymidineinbau auf etwa 15% der Kontrolle. Inwieweit Zn^{++} -Ionen in der Lage sind, eine Aktivitätsänderung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase zu verursachen, wurde im folgenden Versuch bestimmt. Als Enzymfraktion diente wieder die zellfreie $10^5 \times g$ -Fraktion. Die Figur 3 zeigt die Abhängigkeit der RNA-Polymerase-

¹ U. WESER, Structure Bond. 5, 41 (1968).

² U. WESER, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 126, 669 (1967).

³ U. WESER, Z. physiol. Chem. 349, 989 (1968).

⁴ U. WESER, P. WARNECKE und S. SEEGER, Z. physiol. Chem. 349, 1264 (1968).

⁵ H. ALTMANN, F. FETTER und K. KAINDL, Z. Naturforsch. 23b, 395 (1968).

⁶ G. WEITZEL, F. SCHNEIDER, A. M. FRETZDORFF, J. DURST und W.-D. HIRSCHMANN, Z. physiol. Chem. 348, 433 (1967).

⁷ G. WEITZEL, F. SCHNEIDER, D. KUMMER und H. OCHS, Z. Krebsforsch. 70, 354 (1968).

⁸ G. WEITZEL, F. SCHNEIDER, W.-D. HIRSCHMANN, J. DURST, R. THAUER, H. OCHS und D. KUMMER, Z. physiol. Chem. 348, 443 (1967).

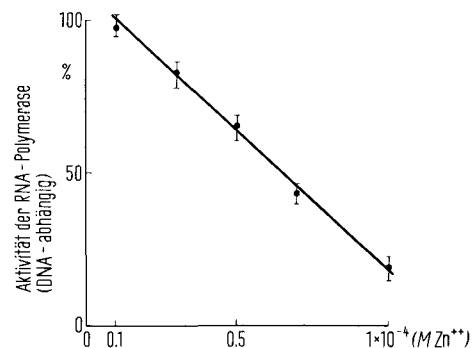


Fig. 2. Aktivität der DNA-Polymerase nach Zugabe unterschiedlicher Zn^{++} -Konzentrationen.

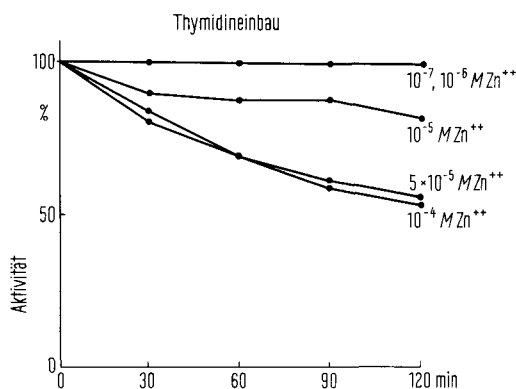


Fig. 1. Thymidin-Einbauraten von Ehrlich-Asziteskarzinomzellen in Gegenwart unterschiedlicher Zn^{++} -Konzentrationen.

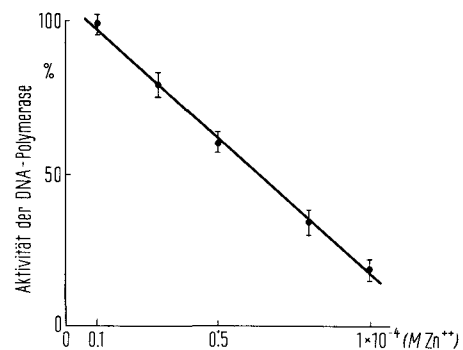


Fig. 3. Änderung der DNA-abhängigen RNA-Polymeraseaktivität durch Zn^{++} .

aktivität gegenüber unterschiedlichen Zn^{++} -Konzentrationen. 1.5 ml enthalten: 80 nM CTP, 80 nM GTP, 3.3 μ M ATP, 0.2 μ C [2- 14 C]-Uridin, 7.7 μ M Kreatinphosphat, 200 μ g Kreatinphosphokinase, 16 μ M $MgCl_2$, 6.2 μ M Tris, 100 μ g Kalbthymus-DNA, 0.5 ml der Enzymfraktion (entsprechend 2 mg Protein), 15–150 nM $ZnCl_2$, pH 7.2. Im Gegensatz zum Versuch mit intakten Asziteszellen wird hier die RNA-Biosynthese beeinflusst. 10^{-4} M Zn^{++} erweist sich als wirksamste Hemmkonzentration.

Zur Klärung der Frage, inwieweit Zn^{++} -Ionen bereits bei niederen Vorstufen der Nukleinsäurebiosynthese eingreifen, wird die Phosphorylierung von [14 C]-markierten Nukleosiden geprüft. In der Tabelle sind die Ergebnisse zusammengestellt.

Die Biosynthese der in der Tabelle beschriebenen Nukleosidtriphosphate wird durch 10^{-4} M Zn^{++} sehr schwach gehemmt. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass Zn^{++} -Ionen aktiv in die Biosynthese monomerer und polymerer Nukleotide eingreifen. Die ausgeprägten Effekte des $ZnCl_2$ auf die einzelnen Parameter der Nukleinsäurebiosynthese könnten der Reaktion des Zn^{++} mit den jeweiligen Polynukleotiden oder den dazu notwendigen Enzymen zugeschrieben werden. Eine Störung der Tertiärstruktur von Polynukleotiden ist durch die

Spaltung der H-Brückenbindungen zwischen den Basenpaaren nach vorausgegangener Komplexbildung mit Zn^{++} denkbar. Ausführliche Messungen darüber wurden unlängst durchgeführt^{9–13}. Zwangsläufig würde durch diese Komplexbildung die Matrizenablesbarkeit geändert. Gleichfalls besteht die Möglichkeit, dass die monomeren Nukleotid-Zink-Komplexe die Nukleotidpolymerisation beeinflussen. Andererseits ist eine Inaktivierung der verschiedenen Polymerasen durch Zn^{++} -Ionen analog der hemmenden Wirkung dieser Metallionen auf die Enzymsysteme von Atmung und Glykolyse möglich¹⁴. Die selektive Hemmung der DNA-Biosynthese von intakten Asziteszellen könnte unter anderem auf eine Reaktion des Zinks mit SH-Gruppen des Thioedoxinsystems deuten. In diese Richtung weisen auch die Ergebnisse von MOORE et al.⁹, die bei Novikoff-Hepatom-Aszites-Zellfraktionen eine vollständige Hemmung der Desoxyzytidinnukleotid-Synthese durch Zn^{++} beobachteten¹⁵.

Summary. Ascites tumour cells have been employed to study the reactivity of Zn^{++} on nucleic acid biosynthesis. 10^{-4} M Zn^{++} caused a selective inhibition of DNA synthesis of intact cells. The rate of RNA- and protein-biosynthesis, however, remained unchanged. The activity of DNA polymerase as well as DNA dependent RNA polymerase was strongly affected by Zn^{++} in vitro.

U. WESER, S. SEEGER und P. WARNECKE

Physiologisch-chemisches Institut der Universität Tübingen (Deutschland), 4. November 1968.

Prozentualer Anteil der Nukleosidtriphosphate an der Gesamtaktivität der säurelöslichen Fraktion nach Markierung mit [14 C]-Nukleosiden und dünnstschichtchromatographischer Auftrennung der Nukleosidmono-, di- und -triphosphate % NPT-Biosynthese.

	ATP	UTP	CTP	d-ATP	TTP	d-CTP
Kontrolle	80	63	62	72	87	36
10^{-4} M Zn^{++}	71	51	60	62	80	23

Asziteszellsuspension 1:10 verdünnt. Je 2 ml enthalten 0.2 μ C [14 C]-Nukleosid oder [14 C]-Desoxynukleosid und 200 nM $ZnCl_2$. Inkubation bei 37°C für 20 min. Weitere Aufarbeitung nach WEITZEL et al.⁹

⁹ E. C. MOORE und R. B. HURLBERT, *Biochim. biophys. Acta* 55, 651 (1962).

¹⁰ J. J. BUTZOW und G. L. EICHORN, *Biopolymers* 3, 97 (1965).

¹¹ Y. A. SHIN und G. L. EICHORN, *Biochemistry* 7, 1026 (1968).

¹² G. L. EICHORN, *Nature* 194, 474 (1962).

¹³ R. H. JENSEN und N. DAVIDSON, *Biopolymers* 4, 17 (1966).

¹⁴ G. WEITZEL und E. BUDDECKE, *Z. physiol. Chem.* 323, 14 (1961).

¹⁵ Der Deutschen Forschungsgemeinschaft möchten wir für eine Sachbeihilfe danken.

Investigations on Unknown Ninhydrin-Reacting Substances in Human Blood Serum. I. Attempts at Identification of Three such Substances

In spite of numerous works on the aminoacidemia problem there are some communications about unknown ninhydrin-reacting substances in blood serum^{1–4}. In recent studies, 3 ninhydrin-reacting substances were found in our laboratory⁵. The present experiments have been carried out in order to identify these substances.

Material and methods. Blood serum taken from 10 young healthy individuals (5 men, 5 women) was prepared according to the previous work⁶. The analysis of amino acids and other ninhydrin-reacting substances was carried out by using thin layer and paper chromatography.

Thin layer chromatography. The glass plates (18 × 25 cm) were covered with a slurry of Kieselgel G-Merck in water (1:2) at thickness of 0.25 mm. The samples of serum in quantity of 0.150–0.350 ml were applied, forming strips 20 mm in length. The plates were developed twice in the *n*-butanol-glacial acetic acid-water (4:1:1) solvent

system. Spots were detected after spraying with a 0.2% ninhydrin solution in acetone.

Paper chromatography. Ascending paper chromatography on Whatman No. 3 paper was employed by using 2 solvents: (1) *n*-butanol-glacial acetic acid-water (4:1:1) and (2) methyl ethyl ketone-pyridine-water-glacial acetic acid (70:15:15:2) as previously⁶. The exact identification

¹ C. E. DENT, *Biochem. J.* 43, 169 (1948).

² L. HEILMEYER, R. CLOTTEN, J. SANO, A. STURM JR. and A. LIPP, *Klin. Wschr.* 32, 831 (1954).

³ V. JIRGL, *Experientia* 15, 235 (1959).

⁴ G. D. LUBASH, K. H. STENZEL and A. L. RUBIN, *Circulation* 30, 848 (1964).

⁵ I. KRZECZKOWSKA, Z. CZERNIAK and S. BURZYŃSKI, *Annls Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Sec. D* 27, 313 (1966).

⁶ Z. CZERNIAK and S. BURZYŃSKI, *Chemia analit.*, in press.