Aufnahme von Nucleinsäuren in intakte Säugetierzellen

P. L. SCHELL

Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Chemische Abteilung, Göttingen

(Z. Naturforschg. **22 b**, 529—532 [1967]; eingegangen am 14. Oktober 1966)

Die experimentelle Steuerung von Zellfunktionen in tierischen Zellen durch Einwirkung von RNA und DNA wurde verschiedentlich beschrieben und als Wirkung der eingedrungenen Nucleinsäure interpretiert¹⁻⁵. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob das Eindringen von RNA in „viable“ Zellen direkt gemessen werden kann. Dabei zeigt sich, daß radioaktiv markierte Nucleinsäuren in solche Zellen penetrieren können; Kontrollexperimente können ausschließen, daß die Aufnahme des polymeren Materials im Sinne einer Fragmentierung und Resynthese abläuft und daß an Stelle der postulierten Inkorporation eine Adsorption an der Zelloberfläche stattfindet.

Gewinnung von markierter Ascites-RNA: NMRI-Mäuse mit Ehrlich-Ascites-Tumor wurden mit anorganischem Phosphat P-32 (250 mC/Maus) intraperitoneal injiziert und nach 8 Stdn. RNA aus den Tumorzellen isoliert⁶. Die Anwesenheit von geringen Mengen DNA

kann bei diesem Verfahren nicht ausgeschlossen werden. Das gewonnene Polymere wurde zwei Mal mit Äthanol umgefällt und anschließend 40 Stdn. bei +4° gegen 0,05 M Phosphatpuffer pH 7 dialysiert.

Spalte	1	2	3	4	5	6	7	
	Präparation und spez. Aktivität der eingesetzten RNS	Rezipient	Eingesetzte Radioaktivität pro Volumen der eingesetzten Zellen ^b [cpm]	Inkubationszeit [Min.]	0°-Wert [cpm]	37°-Wert [cpm]	% Bruchstücke des Polymeren im Überstand bezogen auf Gesamt-radioaktivität = 100%	Oligomere Monomere + P _i
	Ascites-P-32 50 µg/ml 6040 cpm/µg	Ascites Maus I	4000 4000 4000 4000 4000	30 30 — — 10 10	— — 268 279 —	568 645 — — 478 483	15 6 3 3 0,5	3,6 2 1 1 0,4 0,4
		Ascites Maus II	4000 4000 4000 4000	30 30 — —	— — 278 287	678 500 — —	1 1,4 0,3 0,3	0,5 0,7 0 0
	Ascites-P-32 ^a 23 µg/ml 4000 cpm/µg	Ascites Maus III	3000 3000	60 —	— 200	414 —	9,4 2	2,5 0,5
	Ascites-P-32 ^a 33 µg/ml 4300 cpm/µg	Milz Maus IV	2300 2300 2300 2300	30 30 — —	— — 332 311	280 303 — —	32,5 31 8,3 8,2	21 19 3,3 3

Tab. 1. Inkorporation von Polynucleotiden in Asciteszellen bei gleichzeitiger Messung der Exonuclease-Aktivität: Reinigung der RNS durch Fällung mit 80-proz. Äthanol aus 0,04 M-Acetatpuffer pH 4,7^a. Die Aktivität der Ausgangspolymeren ist angegeben durch cpm/µg der verwendeten Lösung. Die Zellen (20—50 mg Naßgewicht) wurden bei 37° in Hank'scher Lösung (0,3 ml) mit den Polymeren inkubiert und dann bei 0° innerhalb von 3—4 Stdn. zunächst zweimal zentrifugiert und dann 10-mal auf Whatman Glasfaser-Filter mit je 2 ml 0,9-proz. Kochsalzlösung gewaschen. Die Zählung erfolgte in einem Packard-Tricarb-Scintillationszähler in Toluol. Die Prüfung auf Bruchstücke im Überstand wurde durch absteigende Chromatographie auf Whatman Nr. 3 MM in einem Gemisch von gleichen Teilen 0,01 M Ammonacetat pH 5,5 und Äthanol durchgeführt. Die Zonen für Mononucleotide und Phosphat, Oligonucleotide und unverändertes Polymeres wurden ausgeschnitten und in Toluol im Packard-Tricarb gezählt. ^a Hier wurde eine Säure-Äthanol-Fällung (0,24 N HCl, 20% Äthanol, -1°) angeschlossen. ^b Das Zellvolumen wurde aus den Naßgewichten bestimmt, die Werte sind angenähert, die Radioaktivität ist die der entsprechenden Volumina der Inkubationsmedien.

¹ F. ROSENBLATT, J. T. FARROW u. S. RHINE, Proc. nat. Acad. Sci. USA **55**, 787 [1966].

² H. FRIEDMANN, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **17** (No. 3), 272 [1964].

³ M. C. NIU, C. C. CORDOVA, L. C. NIU u. C. L. RADBILL, Proc. nat. Acad. Sci. USA **48**, 1964 [1962].

⁴ A. L. JACOBSON, C. FRIED u. S. D. HOROWITZ, Nature [London] **209**, 599 [1966].

⁵ E. P. COHEN, personal communication.

⁶ K. S. KIRBY, Biochem. J. **64**, 405 [1956].

Aufnahme von RNA in „viable“ Ascites-Zellen: Ascites-Zellen und Milzzellen wurden aus männlichen 8 Wochen alten Mäusen (NMRI) in viablem Zustand gewonnen und mit den RNA-Lösungen in Hanks Medium suspendiert. Inkubation bei 37°, 10 bis 60 Min., und anschließendes Waschen der Zellen mit physiologischer Kochsalzlösung durch Sedimentation und Filtration ergab eine Aufnahme von Polynucleotid in die Zellen. Die Aufnahme beträgt etwa 200% einer identischen Probe, die kurze Zeit (1 Min.) bei 0° gehalten und dann analog gewaschen wurde (Tab. 1, Vergleich von Spalte 5 und 6).

Einbau in Trichloressigsäure-fällbares Nucleotidmaterial: Um zu prüfen, ob die aufgenommene Nucleinsäure noch polymer in der Zelle vorliegt, wurden die Zellen zerstört und das Trichloressigsäure-fällbare Material isoliert. Die Ergebnisse sind

in Tab. 1 dargestellt. Auch hier beträgt der Einbau etwa 200% gegenüber den 0° Proben.

Nucleolytische Enzyme im Inkubationsmedium: In das Medium während der Inkubation eventuell ausgeschiedene nucleolytische Enzyme hätten zur Folge, daß durch den Einbau von entstandenen Monomeren in die Zelle die Aufnahme von polymerem Nucleotidmaterial vorgetäuscht würde. Deshalb wurde nach erfolgter Inkubation und anschließendem Abzentrifugieren der Zellen im Überstand ein Nucleasetest durch Papierchromatographie in Anlehnung an die Technik von THACH et al.⁷ sowie MATTHAEI et al.⁸ durchgeführt. Es wurde hierbei unterschieden zwischen (i) unverändertem Material und höheren Kettenbruchstücken, (ii) Oligonucleotiden, und (iii) Mononucleotiden zusammen mit PO₄-Ionen. In Tab. 1, Spalte 7, sind die Resultate dargestellt. Der Gehalt an monomerem Material ist

	Präparation Menge und spez. Akt. der RNS	Eingesetzte Radioakti- vität pro Volumen der Zellen [cpm] ^b	Inkubations- zeit [Min.]	Inkubations- temperatur [°C]	Inkorpora- tion Zelle [cpm]	Inkorpora- tion-Trichloressig- säurepräzi- pitat [cpm]	Actinomycin [γ/ml]	RNAse [mg/ml]
Spalte	1	2	3	4	5	6	7	8
Maus VI	Ascites	2000	—	0	82	59	—	—
	-P-32 ^a	2000	60	37	197	138	—	—
	33 μg/ml	2000	—	0	85	52	20	—
	2200 cpm/μg	2000	60	—	175	168	20	—
Maus VII	Ascites	3000	—	0	57	65	20	—
	-P-32 ^a	3000	60	37	170	235	20	—
	200 μg/ml							
	1000 cpm/μg							
Maus VIII	Ascites	2000	—	0	35	21	20	2
	-P-32	2000	30	—	72	66	20	2
	200 μg/ml	2000	60	—	105	110	20	2
	1000 cpm/μg	2000	—	0	37	24	20	0,1
		2000	30	—	80	78	20	0,1
		2000	60	—	90	97	20	0,1

Tab. 2. Inkorporation von Polynucleotiden in Asciteszellen und Messung des aufgenommenen radioaktiven Materials in der Trichloressigsäure-fällbaren Nucleotidfraktion: Die Zellen (90–150 mg Naßgewicht) wurden wie in Legende Tab. 1 beschrieben, inkubiert und durch dreimalige Sedimentation durch 0,9-proz. Kochsalzlösung gereinigt. Durch dreimaliges Einfrieren in 0,5 ml dest. Wasser wurden die Zellen zerbrochen. Durch Zusatz von 0,5 ml 20-proz. Trichloressigsäure bei 0° wurde die Fällung durchgeführt und der entstandene Niederschlag auf einem Glasfaserfilter mehrfach mit 10-proz. Trichloressigsäure (0°) gewaschen. Die Meßwerte sind für die Tabelle jeweils um den Faktor 0,33 reduziert. Die Versuche mit Actinomycin wurden unter gleichen Versuchsbedingungen, wie zuvor beschrieben, durchgeführt. Der Polynucleotid-Lösung wurde Actinomycin (20 γ/ml) zugesetzt und die Asciteszellen mit dieser Lösung inkubiert. Nachträgliche Inkubation mit RNAse: Beladene Asciteszellen wurden durch Sedimentation in 0,9-proz. Kochsalzlösung gewaschen und dann in einer Lösung von 2 mg (0,1 mg) Pancreas RNAse (Roth) in Hankscher Lösung inkubiert. Waschen durch Sedimentation in Kochsalzlösung und Filtration auf Glasfaserfilter mit Kochsalzlösung. Jeweils 2 Parallelversuche wurden gemittelt; die Abweichung vom angegebenen Wert beträgt ≤ 30%. ^a, ^b siehe Legende zu Tab. 1.

⁷ R. E. THACH u. P. DOTY, Science [Washington] **148**, 632 [1965].

⁸ H. MATTHAEI, G. HELLER, H. P. VOIGT, R. NETH, G. SCHÖCH u. H. KÜBLER, Genetic Elements, Properties and Function, Acad. Press 1967, p. 237.

Spalte	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Präparation Menge und spez. Akt. der RNS	Einge- setzte Radio- aktivität pro Vo- lumen der Zellen [cpm] ^b	Inkuba- tionszeit [cpm]	Inkuba- tions- tempera- tur [°C]	Inkorpa- ration- Zelle [cpm]	Inkorpo- ration- Trichlor- essig- säure- Präzipi- tat [cpm]	Membran- und Kern- fraktion [cpm]	Über- stand [cpm]	Actino- mycin [γ/ml]	RNase [mg/ml]
Maus IX	Ascites	2000	—	0	88	55	29	26	20	—
	-P-32	2000	30	37	92	132	44	60	20	—
	50 μg/ml									
	5040 μg/ml									
Maus X		2000	30	37	190	—	20	17	—	—
Maus XI	Ascites	3000	—	0	150	—	—	—	—	—
	-P-32 ^a	3000	30	37	350	122	140	153	—	—
	200 μg/ml									
	1000 cpm/μg									
Maus XII	Ascites	2000	—	0	—	23	24	22	20	2
	-P-32	2000	30	37	—	72	58	40	20	2
	50 μg/ml	2000	60	37	—	70	48	27	20	2
	5040 cpm/μg									

Tab. 3. Asciteszellen (ca. 200 mg Naßgewicht) wurden beladen, wie in der Legende zu Tab. 1 beschrieben und durch zweimaliges Sedimentieren in 0,9-proz. Kochsalzlösung sowie einmaliges Sedimentieren in 0,25 M Sucroslösung gewaschen. Die Zellen wurden in 2,5 ml Sucroslösung, enthaltend 0,5 mg Ascites RNA suspendiert und bei 0° durch 20 Stöße in einem Potter-Homogenisator homogenisiert und die Zerstörung der Zellen im Mikroskop festgestellt. Dann wurden weitere 5 ml Sucroslösung zugefügt und 10 Min. bei 2000 U/Min. bei -2° zentrifugiert. Der Niederschlag wurde durch weiteres dreimaliges Zentrifugieren mit Sucroslösung gewaschen und in Äthanol aufgeschwemmt auf Glasfaserfilter filtriert. Dem Überstand wurde als Träger 1 mg Hefe-RNA zugesetzt und mit dem gleichen Volumen 20-proz. Trichloressigsäure bei 0° gefällt, der Niederschlag wurde bei 0° bei 18 000 U/Min. abzentrifugiert und auf dem Glasfaserfilter mit Äthanol und Äther gewaschen. Die Meßwerte sind für die Tabelle jeweils um den Faktor 0,2 reduziert. a, b siehe Legende zu Tab. 1.

gering, aber starken Schwankungen unterworfen. Jedoch sind diese Schwankungen ohne Einfluß auf die Inkorporation in die Zellen; somit können diese Substanzen keinen Anteil an der Radioaktivität in den Zellen haben. Auch wenn Ascites-Zellen mit einer entsprechenden Konzentration UMP-P-32 inkubiert werden, findet nur geringfügige Aufnahme von markiertem Material statt. Im Gegensatz zu Ascites-Zellen ist in einer analog behandelten Milzzellensuspension der externe Abbau der Polymeren extrem hoch. Trotz des höheren Angebotes an niedermolekularem Material (32% Oligomere, 20% Monomere) wird dort nicht vermehrt Radioaktivität aufgenommen.

RNA Neusynthese: Wenn die Einschleusung der RNA in die Zelle über eine Fragmentierung während der Aufnahme und anschließende Resynthese erfolgen würde, müßte der Einbau in die zelleigene RNA (Trichloressigsäure-fällbares Material) durch Actinomycin gehemmt werden. Actinomycin (20 γ/ml) hemmt unter den hier angewandten Bedingungen >95% des Einbaues von H-3-Uridin in Ascites

RNA. Eine derartige Konzentration hat aber weder Einfluß auf die Aufnahme von Radioaktivität aus P-32-RNA-Lösungen in ganze Zellen, noch in deren Trichloressigsäure-fällbares Material (Tab. 2). Eine Fragmentierung und Resynthese während der Inkorporation kann also nicht stattfinden.

Adsorption an die Zelloberfläche: Um auszuschließen, daß das radioaktive Material adsorbiert ist, wurde als nächster Schritt die Frage einer evtl. Adsorption an die Zelloberfläche untersucht: Ascites-Zellen wurden, wie geschildert, mit den Polynucleotiden inkubiert (das gleiche Experiment wurde auch in Gegenwart von Actinomycin durchgeführt). Die gewaschenen Zellen wurden anschließend mit Pankreas RNase (2 mg/ml) in Hanks Medium 15 Min. bei 37° inkubiert (Tab. 2). In den ganzen Zellen und auch in der isolierten Nucleotidfraktion (Trichloressigsäure) war kein Aktivitätsverlust gegenüber unbehandelten Kontrollen feststellbar.

Fraktionierung der Zelltrümmer: Eine Möglichkeit zur Lokalisierung der eingebauten Aktivitäten bietet die Fraktionierung der Zelltrümmer. Zu die-

sem Zweck wurden beladene Zellen (auch solche, die mit Actinomycin und RNase behandelt waren) in Sucroselösung suspendiert und in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator zerbrochen. Die Zellwand- und Kernfraktion wurde durch Zentrifugation von den übrigen Bestandteilen (Überstand) getrennt⁹ und die Aktivitätsverteilung gemessen. Ungefähr 50% der Aktivität im Überstand weisen auf das Eindringen der externen Polymeren in das Zellplasma hin. Die am Niederschlag (Kern- und Membranfraktion) hängende RNA läßt sich durch Waschen mit kalter Sucroselösung nicht entfernen.

⁹ W. C. SCHNEIDER u. G. H. HAGEBOOM, *J. biol. Chemistry* **183**, 123 [1950].

Diskussion

Nach allen angeführten Kriterien muß also die Einschleusung von polymeren Nucleotidmaterial in die Zellen angenommen werden. Außerdem scheint ein schneller RNA-Einbau schon bei 0° stattzufinden, wie die große Ähnlichkeit der Resultate unserer Kontrollexperimente für RNA-Aufnahme bei 37° und 0° zeigt¹⁰.

Herr Prof. Dr. F. CRAMER trug in vielen anregenden Diskussionen entscheidend zum Gelingen der Arbeit bei. Fräulein BRIGITTE OPTIZ sei für die sachkundige und sorgfältige Hilfe bei der Ausführung der Experimente gedankt.

¹⁰ Tatsächlich ergibt die Verdünnung der 0°-Probe nach 10 msec auf 14 ml (Strömungsapparatur) bei Weiterverarbeitung nach Tab. 1 den Blindwert 25 cpm. Halbstündiges Inkubieren bei 0° bewirkt RNS-Aufnahme entsprechend 650 cpm. Ein Parallelversuch bei 37°, 40 Min. ergibt 720 cpm [Anmerkung bei der Korrektur].

Particular Activity of Naphthacene Derivatives as Inducers of Zoxazolamine Hydroxylase Synthesis in Rats

N. P. BUU-HOI and DO-PHUOC HIEN

Institut de Chimie des Substances Naturelles du C.N.R.S., 91-Gif-sur-Yvette, France

(Z. Naturforschg. **22 b**, 532—534 [1967]; eingegangen am 16. Dezember 1966)

High activity as inducers of microsomal zoxazolamine hydroxylase synthesis in rats has been found to be remarkably frequent in derivatives of the linear tetracyclic hydrocarbon naphthacene and their heterocyclic structural analogues. The relationships between chemical structure and this type of biological activity, which is shown to be independent of carcinogenic properties, are discussed.

It was shown recently¹ that the non-carcinogenic polycyclic hydrocarbon naphthacene (I) is a potent inducer of the synthesis of certain adaptative microsomal enzymes in rats. The possibility of using compounds devoid of other pronounced biological properties, as is naphthacene, for improving the metabolism of drugs, detoxifying carcinogens such as benz[a]pyrene, and even influencing pathological conditions due to enzyme deficiencies², led us to a more detailed investigation of the naphthacene group with reference to their activity as inducers of one typical microsomal oxidative enzyme, zoxazolamine

hydroxylase. This hydroxylase converts zoxazolamine (2-amino-5-chlorobenzoxazole), a paralysing agent in rats, into an inactive compound through ring hydroxylation; stimulation of the synthesis of this enzyme (the levels of which are very low in young rats) can be conveniently and accurately measured in treated animals by the shortening of the duration of paralysis brought about by a standard dose of zoxazolamine³.

Twenty-three naphthacene derivatives or oxygen- or nitrogen-containing polycyclic compounds with four rings disposed in a linear arrangement as in

¹ J. C. ARCOS, A. H. CONNEY, and N. P. BUU-HOI, *J. biol. Chemistry* **36**, 1291 [1961].

² A. H. CONNEY and J. J. BURNS, in: *Advances in Enzyme Regulation*, Vol. 1, Pergamon Press, New York 1963, p. 189; R. KUNTZMAN, R. WELCH, and A. H. CONNEY, *ibid.*,

Vol. IV, in the press; R. KUNTZMAN, M. JACOBSON, K. SCHNEIDMAN, and A. H. CONNEY, *J. Pharmacol. exp. Therapeut.* **146**, 280 [1964].

³ A. H. CONNEY, C. DAVISON, R. GASTEL, and J. J. BURNS, *J. Pharmacol. exp. Therapeut.* **130**, 1 [1960].