

0EFZS--4438

Februar 1988

BL--695/88

AT 88 00.132



Österreichisches Forschungszentrum
Seibersdorf

Über den neutronenaktivierungsanalytischen
Nachweis von Antimon in Chromatin und
Nukleoiden von HeLa Zellen

Hoda A. Ashry
Alexander Topaloglou
Hans Altmann

0EFZS--4438
BL-- 695/88

Februar 1988

ÜBER DEN NEUTRONENAKTIVIERUNGSANALYTISCHEN NACHWEIS
VON ANTIMON IN CHROMATIN UND NUKLEOIDEN
VON HeLa ZELLEN

Hoda A. ASHRY*
Alexander TOPALOGLOU
Hans ALTMANN

Arbeitsbericht
Proj.Nr. 600016

österreichisches
Forschungszentrum Seibersdorf
Ges.m.b.H.
A-2444 Seibersdorf

INSTITUT FÜR BIOLOGIE
Forschungszentrum Seibersdorf

* National Centre for Radiation Research and Technology,
Kairo, Egypt

OEFZS--4438
BL--695/88

Februar 1988

ÜBER DEN NEUTRONENAKTIVIERUNGSANALYTISCHEN NACHWEIS VON ANTIMON
IN CHROMATIN UND NUKLEOIDEN VON HeLa ZELLEN

ZUSAMMENFASSUNG

Antimon steht im Verdacht beim Menschen kanzerogen zu wirken. In der vorliegenden Arbeit sollte nachgewiesen werden, ob Sb^{+++} in die Zellen eindringen kann. HeLa Zellen wurden mit Antimonchlorid inkubiert und anschließend im Rohchromatin deutlich erhöhte Antimonkonzentrationen neutronenaktivierungsanalytisch bestimmt. Zusätzlich wurden Nukleoide aus diesen Zellen durch Ultrazentrifugation isoliert und das an diese Strukturen gebundene Antimon gemessen.

SCHLÜSSELWORTE

Antimon, Chromatin, Nukleoide, Neutronenaktivierungsanalyse.

NEUTRONACTIVATIONANALYSIS OF ANTIMONY IN CHROMATIN AND NUCLEOIDS
OF HeLa CELLS

SUMMARY

Antimony seems to be cancerogen in men. In the present investigations we tried to find out if Sb^{+++} are also bound to the cell nucleus. HeLa cells were incubated with $SbCl_3$ and after a 18 h incubation time cells were lysed and crude chromatin isolated. In this preparation Sb was determined by neutronactivationanalysis. From the same cell culture nucleoids were prepared by ultracentrifugation and also Sb detected in these structures.

KEY WORDS

Antimony, chromatin, nucleoids, neutronactivationanalysis.

ÜBER DEN NEUTRONENAKTIVIERUNGSANALYTISCHEN NACHWEIS VON
ANTIMON IN CHROMATIN UND NUKLEOIDEN AUS HeLa ZELLEN

Metallionen können direkt DNA gebunden vorliegen (1) oder auch innerhalb von Chromatin proteingebunden eine Rolle bei enzymatischen Reaktionen spielen (2). Die Wirkung verschiedener Kationen auf eine fehlerfreie oder fehlerhafte DNA-Replikation wurde in der Fachliteratur beschrieben. Berillium, ein carcinogenes Metall, steigert den Basensubstitutionsanteil während der Polynukleotidreplikation (3). Eine ganze Reihe von Metallionen und Metallionenverbindungen, wie Nickel, Chrom, Cadmium und Arsen, zeigen wie Beryllium einen mutagenen und cancerogenen Effekt. Andererseits können Spurenelemente in DNA einen stabilisierenden Einfluß besitzen (4, 5) und die Strahlenresistenz beeinflussen (6). Sie können aber leicht durch genotoxische Schädigungen abgespalten werden (7). Die meisten dieser Untersuchungen wurden mit Hilfe der Neutronenaktivierungsanalyse durchgeführt (8). Antimon kann ebenfalls am sensitivsten mit Hilfe dieser Analysenmethode bestimmt werden. Sb steht im Verdacht sowohl bei Rauchern als auch bei Arbeitern in Antimonschmelzen karzinogen zu wirken (9).

In früheren Untersuchungen konnten wir eine Sb^{+++} abhängige Fragmentation der DNA sowie eine DNA-Reparaturhemmung nachweisen (10). In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob die erhaltenen Effekte durch direkte Wirkung des Antimons im Zellkern erfolgen oder ob es sich um Sekundärmechanismen handelt. Wir haben daher Rohchromatin und Nukleoide aus HeLa-Zellen isoliert und in diesen Strukturen n-aktivierungsanalytisch Antimon nachgewiesen. HeLa-Zellen wurden im CO_2 Brutschrank mit Dulbecco Medium + 10% fötalen Rinderserum gezüchtet.

Ein Teil der Zellen wurde für die letzten 18 Stunden mit 100µg SbCl₃/ml Kulturmedium behandelt.

Aliquote Teile von nichtbehandelten und Sb⁺⁺⁺ behandelten Zellen wurden für die Chromatinisolierung und Nukleoidsedimentation verwendet. Für die Chromatinisolierung wurden die Zellen in einer Lösung von 0.1 M EDTA, 2 mM Tris, 0.5% Triton X100 bei pH 7.8 lysiert. Anschließend wurde mit kaltem Äthanol 3 mal gewaschen und durch Zentrifugieren das Rohchromatin gewonnen (11). Diese einfache Methode wurde ausgearbeitet, um artifizielle in vitro Bindungen von Spurenelementen möglichst zu vermeiden. Anschließend wurde der Antimongehalt n-aktivierungsanalytisch wie folgt bestimmt. Die Proben wurden in Polyäthylenampullen im ASTRA-Reaktor bei einem Neutronenfluß von 3-7.10¹³ n/cm².sek und einer Leistung von 8 MW bestrahlt. Nach einer Abklingzeit von 48 Stunden wurde Sb¹²² mit einer Energie von 564 KeV und einer Halbwertszeit von 2.7 Tagen mittels eines "Canberra 4096 Kanal Analysators" und eines "80 cm³ Ge(Li)-Detektors" mit einem Auflösungsvermögen von 1.7 KeV gemessen und mit gleichzeitig bestrahlten Standards verglichen.

In der folgenden Tabelle 1 sind die in unbehandelten Zellen vorhandenen Sb-Konzentrationen in Chromatin, die an der Nachweisgrenze liegen, den Sb-behandelten HeLa-Zellen gegenübergestellt.

Tabelle 1: Sb-Gehalt im Chromatin der HeLa-Zellen in µg/Million Zellen.

Kontrollzellen	Sb-behandelte Zellen
0.000103	0.10549
0.000962	0.08837
0.00103	0.10597
0.00266	0.15857
0.00091	0.14868
0.00077	0.14245
-----	-----
$\bar{x} = 0.00107$ $s_{\pm} 0.00084$	$\bar{x} = 0.12492$ $s_{\pm} 0.02855$
n = 6	n = 6

Man kann sehr deutlich erkennen, daß der chromatingebundene Sb-Anteil relativ hoch ist.

Zur Isolierung der Nukleotide aus HeLa-Zellen wurden diese nach Cook and Brazell durch Ultrazentrifugation nach vorheriger Lysis der Zellen abgetrennt (12). Die Zellen wurden auf einen 15 - 30%igen Saccharosegradienten (pH 8.0) aufgebracht und dort 20 Minuten bei Zimmertemperatur in Gegenwart eines nichtionischen Detergents und hoher Salzkonzentration lysiert (12). Die nach der Lysis resultierenden Nukleotide, die sowohl die Sekundärstruktur der Doppelhelix, als auch die Tertiärstruktur der Superhelix bewahren und RNA und Restproteine enthalten, wurden 60 Minuten bei 132 000 x g bei 20°C zentrifugiert. Die Nukleotide über ein Durchflußphotometer bei 254 nm ermittelt, wurden gesammelt und mit kaltem Äthanol wie bei der Chromatinisolierung gewaschen. Die Antimonkonzentration in diesen Präparaten wurde ebenfalls n-aktivierungsanalytisch bestimmt.

In der Tabelle 2 sind die in den Nukleotiden enthaltenen Sb-Werte angegeben.

Tabelle 2: Sb-Gehalt in Nukleotiden in µg/Million Zellen.

Kontrollzellen	Sb-behandelte Zellen
0.0006	0.04755
0.0009	0.05728
n.n.	0.04154
\bar{x} 0.00075 s_{\pm} 0.00021	\bar{x} = 0.04879 s_{\pm} 0.00794
n = 3	n = 3

Auch in dieser Präparation sieht man, daß Sb an diese Strukturen gebunden wird.

Sowohl durch die früher nachgewiesene Fragmentation der DNA als auch durch Interaktion mit den entsprechenden Polymerasen kann Antimon das Krebsrisiko deutlich erhöhen.

LITERATUR

1. STEHLIK, G. und H. ALTMANN: Die Anwendung der Neutronenaktivierungsanalyse auf Spurenelementuntersuchungen in Nukleinsäuren. *Mh.Chem.* 94 (1963) 1163.
2. KARIMIAN-TEHERANI, D., H. ALTMANN, A. TOPALOGLOU, G. TAUSCH und H. BRÖLL: Spurenelemente in Chromatin aus Lymphozyten von Patienten mit chronischer Polyarthritits. *Verh.Dtsch. Ges.Rheumatol.* 7 (1981) 555-558.
3. SIROVER, M.A. and L.A. LOEB: Metal-induced infidelity during DNA synthesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 73 (1976) 2331-2335.
4. SHIN, Y.A.: Interaction of metal ions with polynucleotides and related compounds. *Biopolymers* 12 (1973) 2459-2475.
5. HOFER, H. and H. ALTMANN: Gamma irradiation of α -DNA-Cu⁺⁺ complex. *Int.J.Radiat.Biol.* 19 (1971) 459-465.
6. ALTMANN, H., G. STEHLIK und K. KAINDL: Beeinflussung der Strahlenresistenz durch Metallionen. *Atompraxis* 9 (7) Juli 1963.
7. ALTMANN, H., G. STEHLIK and K. KAINDL: In vivo investigation of the removal of trace elements from nucleic acids of yeast by ionizing radiation. *Nature* 199 (1963) 823-824.
8. ALTMANN, H.: Use of activation analysis in molecular biology. In: *Experimental Methods in Biophysical Chemistry*. Ed.: C. Nicolau. John Wiley & Sons, London 1973, pp. 49-65.
9. GERHARDSON, L., D. BRUNE, G.F. NORDBERG, P.O. WESTER: Antimony in lung, liver and kidney tissue from deceased smelter workers. *Scand.J.Work Environ.Health* 8 (1982) 201-208.
10. ASHRY, H.A., A. TOPALOGLOU, E. ABDELMOATI, D.K. TEHERANI, H. ALTMANN: Genotoxische Wirkungen von Antimonionen. Bericht OEFZS, in Druck.
11. ALTMANN, H., I. DOLEJS: Poly(ADP-ribose)-synthesis, chromatin structure and DNA repair in cells of patients with different diseases. In: *Progress in Mutation Res.* 1982, 167-177.
12. COOK P.R., I.A. BRAZELL: Detection and repair of single strand breaks in nuclear DNA. *Nature* 263 (1976) 679-682.

OEFZS-Berichte

Herausgeber, Verleger, Redaktion und Hersteller:

Österreichisches Forschungszentrum Seibersdorf Ges.m.b.H.

A-2444 Seibersdorf, Tel. (02254) 80, Telex 014-353

Alle Rechte vorbehalten.