

Internationales Symposium

Saalfelden

30. 8. bis 2. 9. 1981

AT8300003

INIS-mf--7892

DNA-Reparatur und Chromatin

Herausgeber:

Hans Altmann

Gert Klein

Seibersdorf 1982

Die Manuskripte wurden in der von den Autoren eingesandten Form wiedergegeben. Für den Inhalt verantwortlich zeichnet der jeweilige Autor.

DNA-REPARATUR UND CHROMATIN

Internationales Symposium in
Saalfelden, 30.8. bis 2.9.1981

Herausgeber:

Hans ALTMANN, Institut für Biologie, Forschungszentrum
Seibersdorf und

Gert KLEIN, L. Boltzmann-Institut für Rehabilitation
Interner Erkrankungen und Rehabilitationszentrum West der
Pensionsversicherungsanstalt für Arbeiter Saalfelden

Veranstalter:

Internationale Gesellschaft zur Erforschung von Grenzgebieten
der Medizin (IGEGM), Arbeitsgruppe DNA-Reparatur und Spät-
schäden;

Institut für Biologie, Forschungszentrum Seibersdorf;

Ludwig Boltzmann-Institut für Rehabilitation Interner Er-
krankungen;

Rehabilitationszentrum West der Pensionsversicherungsanstalt
für Arbeiter;

BMfWuF, Abkommen über wissenschaftlich-technische Zusammenar-
beit zwischen Österreich und Ungarn.

INHALT

Vorwort: H. ALTMANN	1
Chromatin und Poly(ADP-Ribose): H. ALTMANN	3
The influence of insulin on poly(ADP-ribose)-synthesis and the phases of the cell cycle: O. TÖRÖK	15
Lymphocyte chromatin activation by allergens: J.M. BALO-BANGA	21
Untersuchungen über die Poly(ADP-Ribose) Polymerase- Aktivität in Lymphozyten von Patienten mit chron- ischer Polyarthritits: Chr. KORP	35
DNA-repair in lymphocytes of personnel and patients ex- posed to a radon-222 containing atmosphere: J. KOVACS	41
Some new results concerning DNA-repair in eukaryotic cells: I. VINCZE	47
UDS in Lymphozyten beruflich strahlenexponierter Personen: H. TUSCHL	49
Angaben zur Wirkung von Pflanzenhormon-Analogen auf menschliche Zellen: I. RACZ	55
UV-light induced DNA damage and repair in Photoderma- toses: I. HORKAY	61
Phagocytic functions of PMN granulocytes in different skin diseases of immuno-allergological origin: L. MOLNAR	73
Die Bedeutung der DNA-Reparatur bei Mutagenitätsunter- suchungen: A. WOTTAWA	83
Liquid holding experiments with human peripheral lymphocytes: G. OBE	93
Influence of inhibition of repair enzymes on the in- duction of chromosomal aberrations by physical and chemical agents: A.T. NATARAJAN	95
The effect of caffeine on the X-ray killing in Chinese hamster cells and on the X-ray induced chromosome segregation in interspecific hybrids: I. RASKO ..	97
Rauchen und Schwesterchromatidaustausche in Lympho- zyten: K. TURANITZ	99

II

Einfluss von Antirheumatika auf den Schwesterchromatid- austausch in menschlichen Lymphozyten: M. KECK ..	103
Zytogenetische Untersuchungen an Lymphozyten von Patienten mit Morbus Bechterew während eines Reha- bilitationsverfahrens: G. KLEIN	109
Spontaneous formation of interstrand crosslinks in cellular DNA by free oxygen radicals: E. WUNDER ..	117
The effect of pharmaceutical additives on the DNA- synthesis and on repair mechanisms: E. SATORY ..	119
Altersabhängigkeit der DNA-Reparatur bei der Ratte nach DNA-Schädigung durch kanzerogene Substanzen: H. NIEDERMÜLLER	125
Danksagung	137
Teilnehmerliste	139

VORWORT

Entgegen unseres ursprünglichen Konzepts haben wir uns doch entschlossen die Vorträge des Symposiums "DNA-Reparatur und Chromatin" zu veröffentlichen.

Als wir die Einladung von Prof. Klein erhielten, eine Tagung in dem neu eröffneten Rehabilitationszentrum West in Saalfelden zu veranstalten, waren wir zuerst unschlüssig ob wir ein informelles Jahrestreffen mit unseren ungarischen Freunden im Rahmen des Wissenschaftsabkommens zwischen der Republik Österreich und der Volksrepublik Ungarn abhalten sollten, oder aber ein Symposium in der traditionellen Reihe "DNA-Repair and Late Effects" zu veranstalten. Es ist schließlich eine Mischung aus beiden geworden. Die begrenzte Zahl von 50 Wissenschaftlern hat auch dazu beigetragen, daß jeder Teilnehmer etwas zu sagen hatte, sei es im Vortrag oder in den Diskussionsbemerkungen. Die DNA-Reparatur wurde als interdisziplinäres Thema behandelt und sowohl unter dem Aspekt der Strukturbeeinflussung des Chromatins, als auch auf enzymatischer Ebene betrachtet. Als Folgeerscheinung defekter oder fehlerhafter Reparaturprozesse wurden Punkt- und Chromosomenmutationen besonders betont.

Es war sicher auch ein Verdienst der Chairmen, daß Biologen, Biochemiker, Genetiker, Biophysiker und Mediziner eine weitgehend gemeinsame Sprache verwendeten.

Besonderen Dank möchte ich dem Rehabilitationszentrum West, an der Spitze Herrn Prof. Klein und seinen Mitarbeitern, dem Österreichischen Forschungszentrum Seibersdorf, der Internationalen Gesellschaft zur Erforschung von Grenzgebieten der Medizin und vor allem auch meinen Mitarbeitern bei der Organisation des Symposiums aussprechen.

Durch den Austausch wissenschaftlicher Ergebnisse, der Auf-
stellung neuer Arbeitshypothesen und nicht zuletzt durch das
persönliche Kennenlernen von Wissenschaftlern aus West und Ost,
glauben wir das Ziel dieses kleinen internationalen Symposiums
erreicht zu haben.

Wien-Seibersdorf 1982

Hans Altmann

CHROMATIN UND POLY(ADP-RIBOSE)

H. ALTMANN

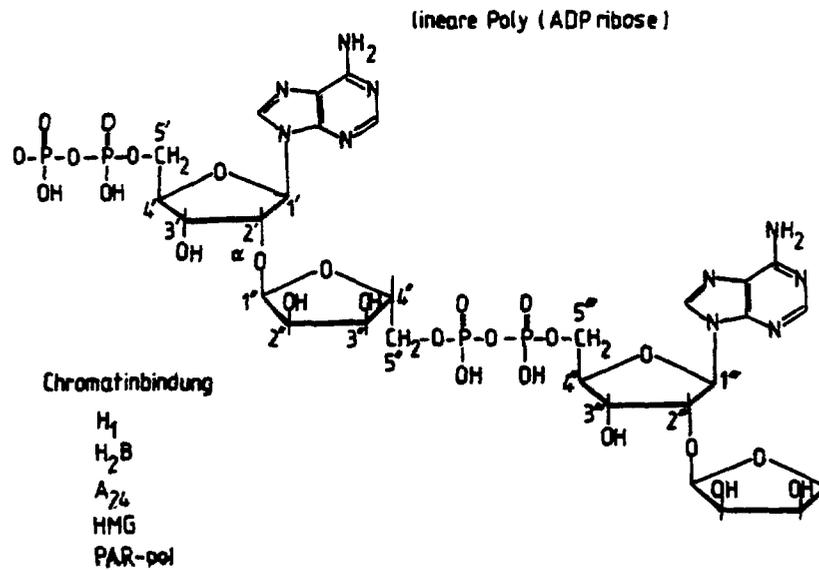
Institut für Biologie, Forschungszentrum Seibersdorf
A-2444 Seibersdorf

1. Struktur der PAR

Obwohl Poly(ADP-Ribose) (PAR) als Molekül bereits vor 15 Jahren beschrieben wurde, ist über den Wirkungsmechanismus dieses Polyanions noch relativ wenig bekannt. ADP-Ribosylierung scheint aber den Zellmetabolismus wesentlich beeinflussen zu können. Es gibt Hinweise, daß sowohl strukturelle als auch enzymatische Parameter von PAR in Zellen gesteuert werden können. Das Nikotinamidadeninnukleotid (NAD^+) das aus Nikotinamidmononukleotid (NMN) und Adenosintriphosphat (ATP) durch die Pyrcphosphorylase (E.C.2.7.7.1.) aufgebaut wird, stellt die Vorstufe für PAR dar. Die PAR-Synthese wird von einer PAR-Polymerase katalysiert, wobei DNA und Histone als Kofaktoren notwendig sind. Eine kovalente Bindung zwischen PAR und DNA wurde jedoch nicht nachgewiesen. Durch eine Fragmentierung der DNA wird die PAR-Polymerase aktiviert, wobei aber Einstrang-DNA unwirksam ist. Überlappende DNA-Brüche wie sie z.B. von verschiedenen Restriktionsenzymen erzeugt werden, aktivieren deutlich besser als alle anderen DNA-Schädigungen; besonders dann, wenn terminale 5'-Phosphatgruppen entfernt wurden (1).

Das isolierte Enzym ist ein basisches Protein von 112.000 daltons (5,2 S), das die Eigenschaft hat eine Automodifikation durch Bindung von PAR durchzuführen (2). Das Enzym benötigt außer Mg^{++} als Stabilisator des Enzym-DNA-Komplexes keine anderen Metallionen. SH-Gruppen enthaltende Moleküle können die Aktivität der PAR-Polymerase ebenfalls steigern (3). PAR ist im Gegensatz zu DNA über Ribose-Ribosebindun-

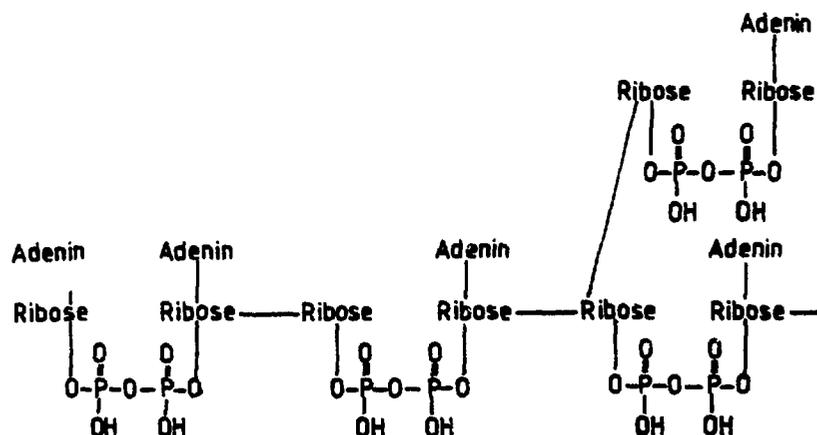
gen (1'' → 2') aufgebaut.



Nach DNA-Schädigung wird bevorzugt PAR einer Kettenlänge von etwa 22-28 Untereinheiten aufgebaut und an Corehistone gebunden (4).

Insbesondere bei höhermolekularen PAR-Strukturen treten auch verzweigte Formen auf (5), wie man sie auch bei gewissen Polysacchariden findet.

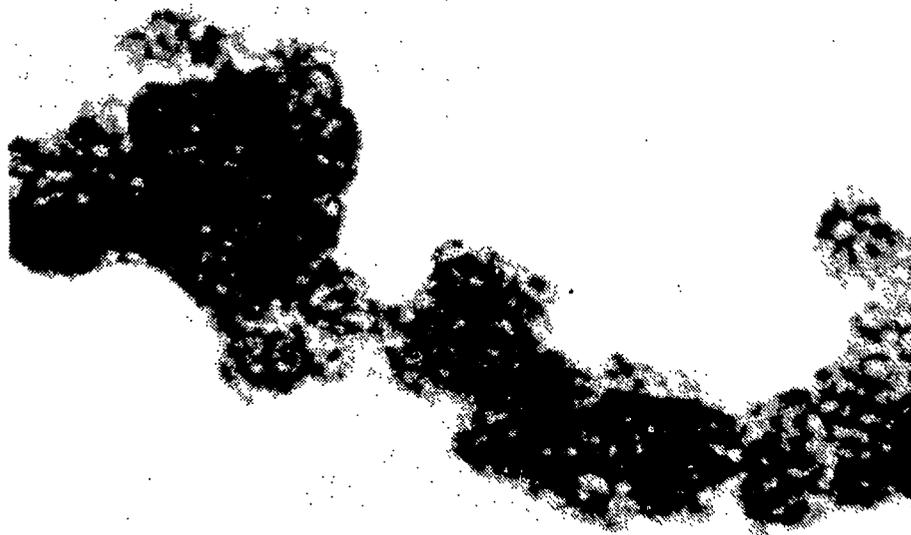
querverzweigte Poly (ADP ribose)



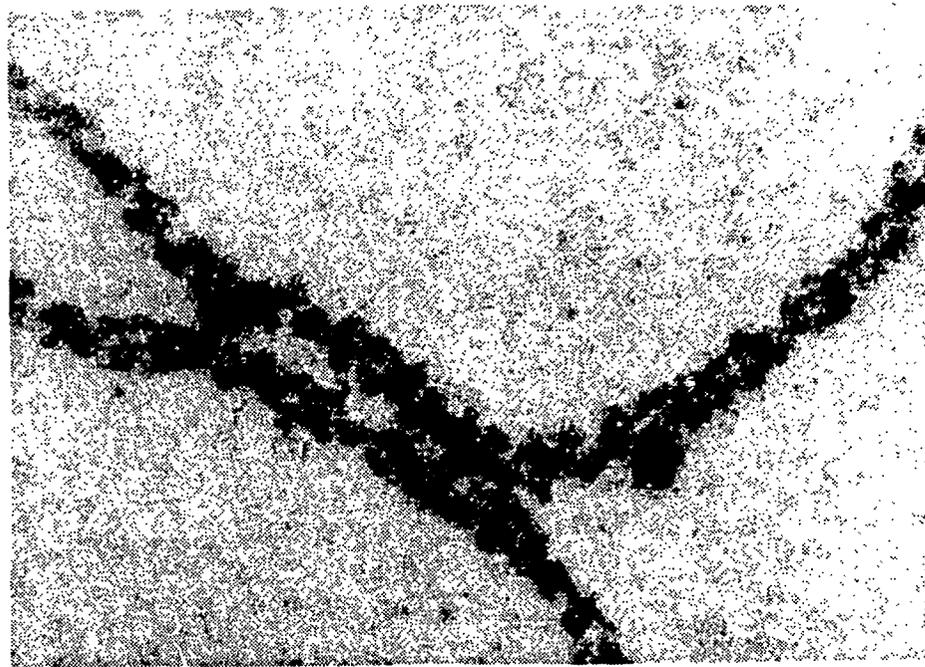
Die Quervernetzung scheint über die 3-OH-Gruppe einer Ribose zur 1-OH-Gruppe der Seitenstrangribose zu verlaufen. Im Gegensatz zu Polysacchariden wird sowohl die Verlängerung der PAR-Kette als auch die Quervernetzung von der gleichen ADP-Ribosyl-Transferase durchgeführt. Die Glykohydrolase welche spezifisch die Ribose-Ribose-Bindung spaltet, hydrolysiert auch die Quervernetzung. Die Pyrophosphatbindungen der PAR werden dagegen von Phosphodiesterasen gespalten.

2. Chromatinstruktur

Das Interphasenchromatin wird elektronenoptisch oft als Kugeln an einer Schnur dargestellt. Die Kugeln sind die Nukleosomcores die mit der Spacer-Region (auch Linker-Region genannt) ein komplettes Nukleosom bilden. Die DNA ist in $1 \frac{3}{4}$ Windungen um die Cores, die 2 mal H_2A , H_2B , H_3 und H_4 -Histone enthalten, herumgewunden (6). In der Spacer-Region sind nahe dem Core 1, selten auch 2 Moleküle des H_1 -Histons lokalisiert. Die DNA der Core-Region besteht aus ca. 140 Basenpaaren, die Spacer-Region ist in ihrer Länge variabel und ist etwa 40-80 Basenpaare lang. Im Elektronenmikroskop schauen die Core-Partikel wie Scheiben in der Dimension von $110 \times 110 \times 57 \text{ \AA}$ aus. Derartige Aufnahmen von Chromatin zeigen Filamente mit einem Durchmesser von 10-30 nm aber auch noch andere Überstrukturen.



Insbesondere nach ADP-Ribosylierung, wahrscheinlich von Nichthistonproteinen in der Linker-Region die dadurch entfernt werden können, sieht man manchmal einen Doppelstrang von aneinandergereihten Nukleosomen.



Wenn man die Ionenstärke erhöht, scheinen die Überstrukturen 6-7 Nukleosomen pro 10 nm zu enthalten. Das H_1 -Histon hat neben seiner stabilisierenden Wirkung der DNA-Supercoils ($1 \frac{3}{4}$ Windungen um die Nukleosomen-Cores) auch noch andere Funktionen. Durch PAR-Brücken zwischen 2 H_1 -Histonen scheinen Überstrukturen aufrecht erhalten zu werden. Diese Brücken können vermehrt im Euchromatinanteil auftreten.

Das Chromatin hat nicht nur statische Strukturen, sondern besitzt dynamischen Charakter. Viele Enzyme sind in Chromatin lokalisiert. In vitro-Experimente haben gezeigt, daß abhängig von der jeweiligen Salzkonzentration die Nukleosome geänderte Konformationen aufweisen (7). Eine Modifikation der Histone innerhalb des Chromatins kann ebenfalls zu Konformationsänderungen führen. Die wichtigsten Modifikationen von Chromatinproteinen sind die Methylierung, Acetylierung, Phosphorylierung und ADP-Ribosylierung. Die Methylierungen erfolgen oft an den freien Carboxylgruppen von Nichthiston-

proteinen, die in der Spacer-Region angelagert sind und in der Regulation der Genexpression eine Rolle spielen (8). Von den Nichthistonproteinen wurden 4 als Myosin, Aktin, Tubulin und Tropomyosin identifiziert.

Mit Na-Butyrat kann man eine Hyperazetylierung von Histonen erzielen (insbesondere H_3 und H_4). Dieser Effekt kommt durch Hemmung der Histondeazetylase zustande. Als Folge wurde eine Reihe von morphologischen und biochemischen Veränderungen in den Zellen festgestellt. Auch in diesem Fall scheint die Induktion der Genexpression aktiviert zu werden. In Fried's Erythrolenhämischen Zellen wurden nach Butyratbehandlung 3800 neue Genprodukte nachgewiesen (9).

Die ADP-Ribosylierung und PAR-Bindung an Proteine stellt eine wichtige Regulationsfunktion der Zelle dar. Sowohl durch die Hemmwirkung der ADP-Ribosylierung bei den verschiedensten Enzymen als auch durch Strukturveränderungen von Chromatin durch Bindung von PAR kann es bei Störung des ADP-Ribosestoffwechsels zu schwerwiegenden Veränderungen in der Zelle kommen.

Es wurde auch die Beteiligung der ADP-Ribosylierung bei der replikativen DNA-Synthese, dem DNA-Repair, der Differenzierung, bei Altersprozessen, bei verschiedenen Erkrankungen und auch bei der malignen Transformation in Betracht gezogen.

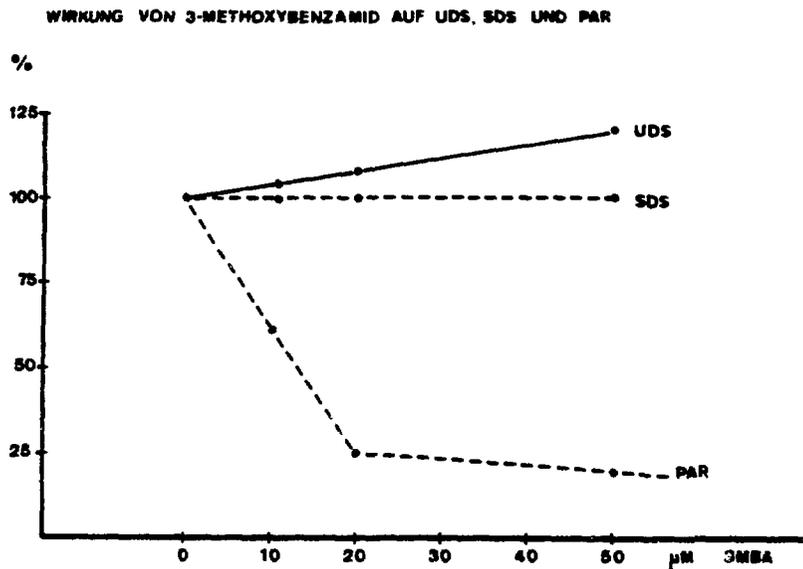
3. Inhibitoren der PAR-Synthese

Untersuchungen mit Inhibitoren der PAR-Synthese haben besondere Bedeutung gewonnen. Wir haben in diesem Zusammenhang Benzamid, 3-Aminobenzamid, 3-Methoxybenzamid, Theophyllin, Koffein und Spermin untersucht (10).

Benzamid unterdrückte stark die PAR-Synthese, war aber im Bereich zwischen 4 und 8 mM Konzentrationen bereits etwas toxisch und hemmte ebenfalls die replikative DNA-Synthese und die Reparatur nach UV-Bestrahlung etwas. Koffein steigerte die replikative DNA-Synthese bei gleichbleibender

Reparatur und Unterdrückung der PAR-Synthese in 1-8 nM Konzentration. Theophyllin verhielt sich ähnlich. 3-Amino- und 3-Methoxybenzamid steigerte etwas die UDS bei gleichbleibender replikativer DNA-Synthese und starker Unterdrückung der PAR-Synthese zwischen 10 und 10 μ M Konzentration dieser Substanzen. Spermin zeigte in diesen Konzentrationsbereichen unterschiedliche Resultate.

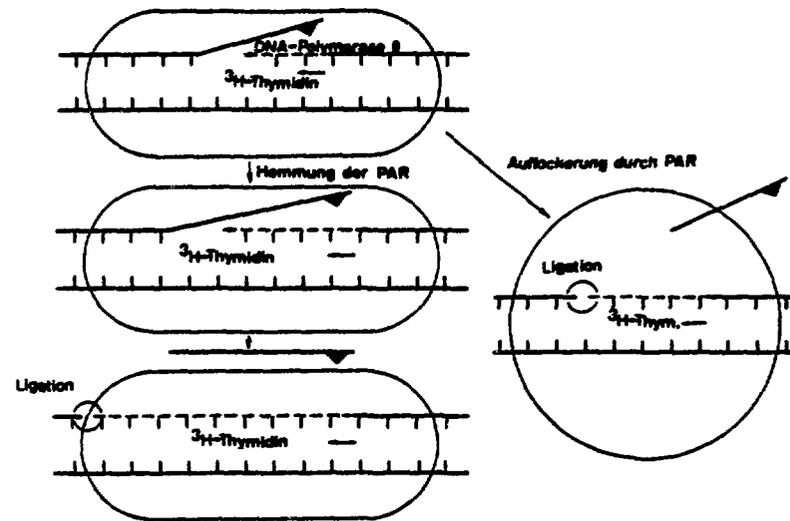
In der folgenden Abbildung 5 ist die Hemmwirkung von 3-Methoxybenzamid wiedergegeben. Diese Substanz erwies sich auch im *in vivo*-Versuch bei Tumoren als Strahlensensibilisator (Arbeit in Vorbereitung).



In den beschriebenen Versuchen wurde markiertes NAD als Vorstufe für die PAR-Synthese bei semipermeabel gemachten CHO-Zellen eingesetzt. Die semikonservative DNA-Synthese (SDS) und die unprogrammierte DNA-Synthese (UDS) wurde durch H^3 -Thymidineinbau bestimmt.

Wichtig scheint die gleichzeitige Hemmung der letzten Reparaturschritte (Exonuklease und Ligase) bei inhibierter PAR-Synthese zu sein (11). Die erhöhte UDS, in Gegenwart von PAR-Inhibitoren, kann man sich auf folgende Weise vorstellen (Abb. 6).

Excisionsreparatur mit und ohne Hemmung der PAR-Synthese

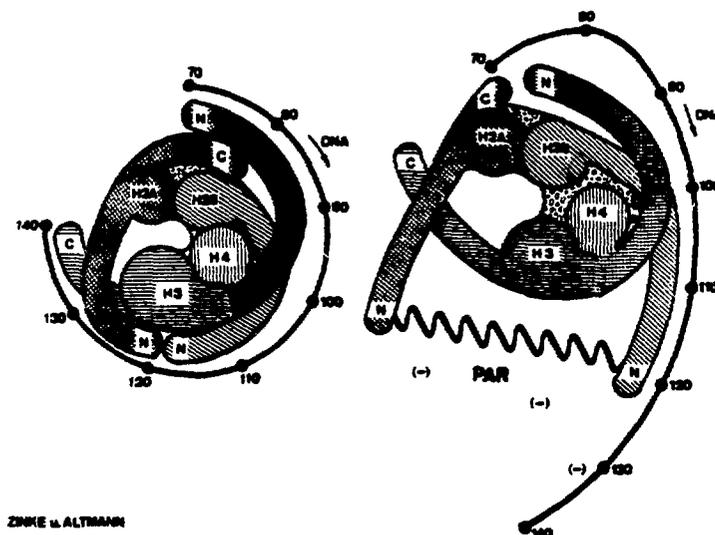


4. Rolle der PAR bei der DNA-Reparatur

PAR bindet an das H_2B -Histon und lockert das Nukleosom auf, indem die $1\frac{3}{4}$ Windungen der DNA um das Nukleosom-Core aufgelöst werden (Abb. 7).

Abbildung 7:

Modell von Nukleosomencores vor und nach PAR-Bindung



Dies kann ähnlich wie bei höheren Salzkonzentrationen durch die elektrostatischen Abstoßungen der stark negativ geladenen DNA und PAR erfolgen. Der Endonuklease- und Polymeraseschritt der Excisionsreparatur kann auch ohne PAR-Bindung an H_2B durchgeführt werden, nicht aber die Exonuklease- und Ligasereaktion. Kann die Exonuklease den Strang,

der den DNA-Schaden trägt, nicht abschneiden, dann verlängert sich das "Gap" und resultiert in einem erhöhten H^3 -Thymidin-einbau, weil auch die Ligase nicht "rejoinen" kann. Erst wenn das "Gap" so groß ist, daß es das Nukleosomen-Core verläßt, können die beiden letzten Schritte der DNA-Reparatur erfolgen. Möglicherweise spielt auch die Entfernung von Nichthistonproteinen aus dem Chromatin nach ADP-Ribosylierung bei der möglichen Gap-Vergrößerung eine Rolle.

Nicht völlig geklärt ist derzeit, ob in eukaryotischen Zellen ein induzierbarer "SOS-Repair" existiert und ob bei der Induktion PAR eine Rolle spielt. Am Beispiel der Phageninduktion hat man die Rolle der SOS-Funktion eingehend studiert, und nur dann eine "Funktion" festgestellt, wenn die Wirts-DNA geschädigt wurde und die semikonservative DNA-Synthese gehemmt war. Unter diesen Umständen spaltet eine Protease den λ -Repressor (12). Poly(ADP-Ribose) kann zwar die DNA-Polymerase α , die für die semikonservative DNA-Synthese verantwortlich ist, hemmen, die DNA Polymerase β bleibt dagegen voll aktiv, so daß die entsprechenden DNA-Reparaturprozesse ungehemmt ablaufen können (13). Chronische DNA-Schädigungen, wie sie in Lymphozyten von SLE auftreten (14), oder auch chronische Behandlungen mit ionisierender Bestrahlung (15), verändern den PAR-Stoffwechsel durch die DNA-Schäden bedingte permanente Aktivierung der PAR-Polymerase. PAR ist jedoch auch ein guter Inhibitor für Proteasen, die im Chromatin lokalisiert sind (16, 17). Bei Wegfall der Inhibitorwirkung der PAR könnten diese Proteasen SOS-Funktion auslösen und eventuell Virusrepressoren spalten.

5. PAR-bedingte Transformation und Differenzierung

Virustransformierte Zellen zeigen jedenfalls auch eine gesteigerte PAR-Polymeraseaktivität (18). Onkogene Transformation wird häufig an Maus C3H 10T 1/2 Zellen studiert. Proteaseinhibitoren hatten die Fähigkeit strahlenbedingte Transformationen zu unterdrücken, selbst wenn co-carcinogene Substanzen zugegen waren (19).

Es gibt verschiedene Befunde, daß PAR auch bei Zelldifferenzierungen mitbeteiligt ist. Durch Inkubation von Mausmyeloma-Zellen mit PAR gelang es, verschiedene Marker der Differenzierung aufzufinden. Die Zellen zeigten Phagozytose, Fc-Rezeptoren, Lysozymproduktion sowie morphologische Veränderungen zu Makrophagen und Granulozyten (20). So wie man derzeit über T-Zellenrezeptoren wenig weiß, so wenig weiß man auch über PAR-Bindung an Zellmembranproteine, und wie Umwelteinflüsse die T-Zellen dazu bringen zu differenzieren. Bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen wurde eine verminderte Suppressorzellaktivität nachgewiesen, die in guter Korrelation zur Pathogenese der Erkrankungen stand. Beim SLE, der diese Eigenschaft auch zeigt, wurden außerdem Imbalancen im PAR-Stoffwechsel festgestellt (21).

Ruhende Zellen synthetisieren wenig PAR; stimuliert man dagegen Lymphozyten mit PHA, dann haben die Zellen die Fähigkeit, deutlich mehr PAR zu synthetisieren als vorher. Auch für den ungehinderten Ablauf des Zellzyklus ist eine vorprogrammierte PAR-Synthese Voraussetzung (22).

Organdegeneration und Regeneration ist ebenfalls mit einer Aktivierung des PAR-Stoffwechsels gekoppelt (23). Kurz bevor der Regenerationsprozess einsetzt steigt auch die PAR-Polymeraseaktivität an.

Auch bei Alterungsprozessen hat PAR eine Regulatorrolle. Unabhängig von der DNA-Länge ist die PAR-Synthese in Zellen von neugeborenen Ratten etwa 10x höher als in Zellen von alten Ratten. Auch die Glykohydrolaseaktivität war bei den Neugeborenen etwa 30% höher. Detaillierte Untersuchungen müssen aber noch den näheren Zusammenhang mit Alterungsprozessen untermauern (24). Auch über die Rolle der PAR bei verschiedenen DNA-Reparaturdefizienten Erkrankungen müssen noch weitere Versuche durchgeführt werden. Man weiß, daß bei Ataxia telangiectasia eine Reduktion der PAR-Synthese vorliegt, so daß die replikative DNA-Synthese auch nach DNA-Schädigung nicht gehemmt wird (25). Es wurde bei dieser

Erkrankung auch eine Verzögerung der PAR-Bindung an Core-Proteine nach γ -Bestrahlung festgestellt (14). Bei Xeroderma pigmentosum wurde eine DNA-Strangbruch-abhängige reduzierte PAR-Synthese nachgewiesen (14, 26, 27). Beim Bloom-Syndrom kann man die PAR-Polymerase nur ungenügend stimulieren und die Histonbindung ist stark reduziert (H. Altmann, in Vorbereitung). Bei einigen infektiösen Erkrankungen ist PAR auch mitbeteiligt (28). Zusammenfassend kann gesagt werden, daß PAR lange Zeit im Dornröschenschlaf gelegen hatte, voll erwacht ist, und weiter erforscht werden muß.

LITERATUR

1. BENJAMIN, R.C. and D.M. GILL: Poly(ADP-ribose)synthesis in vitro programmed by damaged DNA. J.Biol.Chem. 255 (1980) 10502-10508.
2. JUMP, D.B. and M. SMULSON: Purification and characterization of the major nonhiston acceptor for Poly(ADP-ribose) in HeLa cell nuclei. Biochem. 19 (1980) 1024-1030.
3. ALTMANN, H., L. HOFFER, N. THUMB und G. KLEIN: Über den Einfluß von d-Penicillamin auf den DNA-Stoffwechsel. In "D-Penicillamin 1970-1980", Ed.: K. Chlud. Wr.Med.Akademie 1980, pp 63-66.
4. ALTMANN, H., I. DOLEJS, A. TOPALOGLOU und A. SOOKI-TOTH: Faktoren die die DNA-Reparatur in "Spacer- and Core-DNA" von Chromatin in menschlichen Zellen beeinflussen. stud. biophys. 76 (1979) 159-203.
5. MIWA, M., M. ISHIHARA, S. TAKISHIMA, N. TAKASUKA, M. MAEDA, Z. YAMAIZUMI, T. SUGIMURA, S. YOKOYAMA and T. MIYAZAWA: The branching and linear portions of Poly(ADP-ribose) have the same α (1 \rightarrow 2)ribose-ribose linkage. J.Biol.Chem. 256 (1981) 2916-2921.
6. FELSENFELD, G.: Chromatin. Nature 271 (1978) 115-122.
7. WILHELM, M.L. and F.X. WILHELM: Conformation of nucleosome core particles and chromatin in high salt concentration. Biochemistry 19 (1980) 4327-4331.
8. QUICK, D.P., P.J. ORCHARD and J.A. DUERRE: Carboxyl methylation of ninhistone chromosomal proteins. Biochemistry 20 (1981) 4724-4729.
9. EGAN, P.A. and B. LEVY-WILSON: Structure of transcriptionally active and inactive nucleosomes from butyrate-treated and control HeLa cells. Biochemistry 20 (1981) 3695-3702.
10. DOLEJS, I., G. STEHLIK and H. ALTMANN: Correlation between Poly(ADP-ribose)-synthesis and DNA-synthesis. OEFZS Ber. No. A0286, BL-376/1982.

11. DURKACZ, B.W., O. OMODIJI, A.G. DOUGLAS and S. SHALL: (ADP-ribose)_n participates in DNA-excision repair. *Nature* 283 (1980) 593-596.
12. COHEN, S., B.J. KNOLL, J.W. LITTLE and D.W. MOUNT: Preferential cleavage of phage repressor monomers by rec A-protease. *Nature* 294 (1981) 182-183.
13. SHIMADA, T., M. YAMADA, M. MIWA, H. NAGANO and Y. MANO: Differential susceptibilities of DNA-polymerase- and - to polyanions. *Nucl.Acids Res.* 5 (1978) 3427-3438.
14. ALTMANN, H. and I. DOLEJS: Poly(ADP-ribose)synthesis, chromatin-structure and DNA repair in cells of patients with different diseases. In: *Progress in mutation research*. Ed.: A. Natarajan. Elsevier Publ. (in press).
15. ALTMANN, H.: ie Wirkung niederer Strahlendosen auf DNA-Reparaturprozesse in menschlichen Lymphozyten. *Z.f.Phys. Med.* 6 (1980) 314-323.
16. INAGAKI, T., K. MIURA and T. MURACHI: Identifikation of a protease inhibitor from tar peritoneal macrophages as poly(ADP-ribose). *J.Biol.Chem.* 255 (1980) 7746-7750.
17. RICHTER, O., M. BALO-BANGA und H. ALTMANN: Über die Aktivierung von Proteasen in Chromatin von Polymorphkernigen Leukozyten durch Benzamid (in Vorbereitung).
18. MIWA, M. K. ODA, K. SEGAWA, M. TANAKA, S. IRIE, N. YAMAGUCHI, T. KUCHINO, K. SHIROKI, H. SHIMAJI, H. SAKURA, M. MATSUSHIMA and T. SUGIMURA: Cell density-dependent increase in chromatin-associated ADP-ribose transferase activity in Simian virus 40-transformed cells. *Arch.Biochem.Biophys.* 181 (1977) 313-321.
19. KENNEDY A.R. and J.B. LITTLE: Effects of protease inhibitors on radiation transformation in vitro. *Cancer Res.* 41 (1981) 2103-2108.
20. YAMADA, M., T. SHIMADA, M. NAKAYASU, H. OKADA and T. SUGIMURA: Induction of differentiation of mouse myeloid leukemia cells by poly(ADP-ribose). *Biochem.Biophys.Res. Comm.* 83 (1978) 1325-1332.
21. ALTMANN, H., O. SCHERAK und A. TOPALOGLOU: Veränderte Poly(ADP-Ribose)Synthese und unterschiedliche Proteinbindung in Chromatin aus Lymphocyten von Patienten mit systemischen Lupus Erythematodes. *Verh.Dtsch.Ges.Rheumatol.* 7 (1981) 561-564.
22. ALTMANN, H.: Faktoren, die DNA-Reparaturprozesse innerhalb des Zellzyklus beeinflussen. *Acta histochem.* (in press).
23. SAVARD, P., R. AUBIN, W.J.D. WHISH, A. LORD and G.G. POIRIER: Poly(ADP-ribose)-polymerase activity and adenosine diphosphate-ribosylation of proteins during pancreatic degeneration and regeneration. *Cancer Res.* 41 (1981) 1417-1421.
24. JACKOWSKI, G. and E. KUN: Age dependent variation of rates of poly(ADP-ribose)synthesis by cardiocyte nuclei and

- the lack of correlation of enzymatic activity with macromolecular size distribution of DNA. *J.Biol.Chem.* 256 (1981) 3667-3670.
25. EDWARDS, M.J. and A.M.R. TAYLOR: Unusual levels of (ADP-ribose)_n and DNA-synthesis in ataxia telangiectasia cells following γ -ray irradiation. *Nature* 287 (1980) 745-747.
 26. BERGER, N.A., G.W. SIHORSKI, S.J. PETZOLD and K.K. KUROHARA: Defective poly(ADP-ribose)-synthesis in XP. *Biochemistry* 19 (1980) 289-293.
 27. SALTER McCURRY, L. and M.K. JACOBSON: Poly(ADP-ribose) synthesis following DNA damage in cells heterozygous or homozygous for XP genotype. *J.Biol.Chem.* 256 (1981) 551-553.
 28. PAPPENHEIMER, A.M.: Diphtheria: molecular biology of an infectious process. *TIBS*, October 1978, pp. N 220-223.

DNA-REPARATUR UND CHROMATIN (Proc. Symposium Saalfelden 1981).
Hrsg.: H. Altmann und G. Klein. Seibersdorf 1982, 15-20.

THE INFLUENCE OF INSULIN ON POLY(ADP-RIBOSE)-SYNTHESIS
AND THE PHASES OF THE CELL CYCLE

O. TÖRÖK¹ and H. ALTMANN²

¹ Department of Biology, Semmelweis University of Medicine,
Budapest

² Institut für Biologie, Forschungszentrum Seibersdorf,
A-2444 Seibersdorf

INTRODUCTION

Insulin is absolutely necessary for normal growth in immature animals and humans (1). The ability of insulin to act as a growth factor has been investigated in many different cell types. It is generally agreed that cell surface protein receptors bind the hormone and initiate its action. The involvement of Ca^{2+} , cAMP or cGMP in the interaction of insulin with cell metabolism was also discussed, and insulin might act by altering intracellular levels of cyclic nucleotides. The stimulating property of insulin involves possible activation or induction of enzyme systems responsible for DNA synthesis (2). Insulin becomes internalized after binding to receptors which are diffusely distributed and mobile in the cell surface (3, 4). This insulin receptor regulation is mediated via an endocytotic internalization pathway in human fibroblasts and when intracellular hormone degradation is inhibited, insulin accumulates intracellularly (5). Insulin was found to be capable of stimulating arrested cells to reenter the cell cycle. It was suggested that the S and G_2+M phases were longer in the presence of insulin in medium. An important regulation factor within the cell cycle is the polyanion poly(ADP-ribose) (PAR) (6).

PAR takes part in the arrangement of chromatin structure and the PAR-polymerase and the PAR-glycohydrolase as a dynamic regulation system may be involved in semiconservative DNA-

synthesis, DNA-repair, differentiation and transformation (7). DNA-strandbreaks activate the PAR-polymerase located in the spacer region of nucleosomes, and because we cannot exclude a direct interaction of insulin with chromatin, it was also suggested that insulin may cause single strand breaks in DNA possibly by activating specific endonucleases located in chromatin (8). A stimulation of ADP-ribosylation was observed after long term insulin treatment of 18 hours and it appeared to be correlated with the cell's entry into DNA-synthesis (8).

METHODS AND RESULTS

Monolayer cultures of CHO-K₁ cells were used in these experiments. For studies on the influence of insulin on PAR-synthesis in crude chromatin additional Chang liver cells were used. The preparation of chromatin was done according to an earlier publication (9) by lysis of cells with a solution containing 0.5% Triton X100 0.1 M EDTA, 2 mM Tris HCl pH 7.8. Crude chromatin was precipitated by centrifugation at 3000 x g for 10 min at 4°C. After washing with cold PBS crude chromatin was incubated with insulin for 30 min. 0.5µCi H³-NAD (NEN) was added to 0.3 ml medium und incubated 10 min at 24°C. The reaction was finished by adding 0.3 ml 12% PCA. After 2 times washing the precipitate with 6% PCA, PAR was hydrolysed with 0.5 ml 6% PCA at 90°C for 20 min. The radioactivity was measured in a liquid scintillationcounter. For the determination of PAR-glycohydrolyase activity, chromatin was centrifuged after the 10 min incubation with H³-NAD and further incubated with the same buffer but without NAD for 30 min at 37°C.

For the in vivo experiments CHO cells were treated with different concentrations of insulin* for 1 hour. To enable NAD incorporation, cells were made semipermeable by hypoosmotic cold shock at 4°C for 5 min using the following incubation buffer: 0.3 ml 0.01 M Tris, 0.25 M sucrose, 0.001 ml EDTA, 0.03 M DTE and 0.004 M MgCl₂ pH 7.8. 1µCi ³H-NAD in 0.2 ml 0.1 M Tris, 0.12 M MgCl₂ pH 7.8 was added and incubated for further 20 min at 24°C. Cells were lysed as described above and PAR determined.

*) Insulin 1 ml = 40 I.U. Semilenter DeNovo Copenhagen; und Sigma, 15500; 24 I.U./mg

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows the inhibition of PAR-synthesis by insulin. But also the glycohydrolase seems to be a little inhibited possibly due to equilibrium mechanisms with PAR-synthesis. It is interesting that at high insulin concentrations (10^{-4} M) there was even a small stimulation in PAR-synthesis compared to controls, but after lowering the insulin concentration a strong inhibition effect is visible. This effect needs further investigations whether there is a direct influence on PAR-polymerase either on activation of endogenous endonucleases, or directly to chromatin structure.

Figure 1

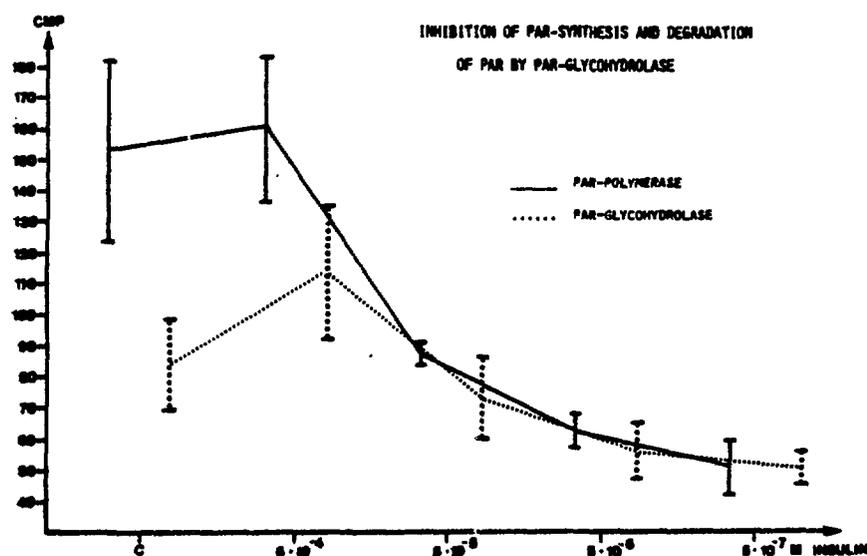


Figure 2 and 3 show the influence of insulin on intact CHO-cells. Inhibition curves were similar to those obtained in the in vitro experiments, indicating a penetration by endocytosis or similar mechanisms into the cells.

In another experiment we irradiated the CHO-cells with UV₂₆₀ 10 J/m² and started with the experiment only 2 hours after the UV-irradiation. In this case inhibition of PAR-synthesis was not pronounced, especially in the low level activity of free PAR no differences can be found in comparison with controls.

Figure 2:
Influence of insulin on PAR-synthesis in CHO-cells

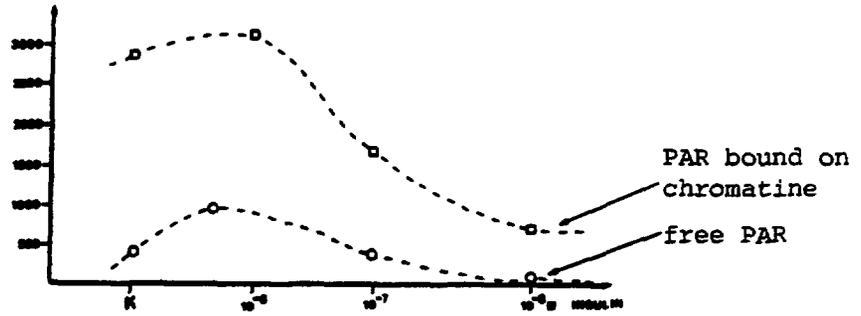
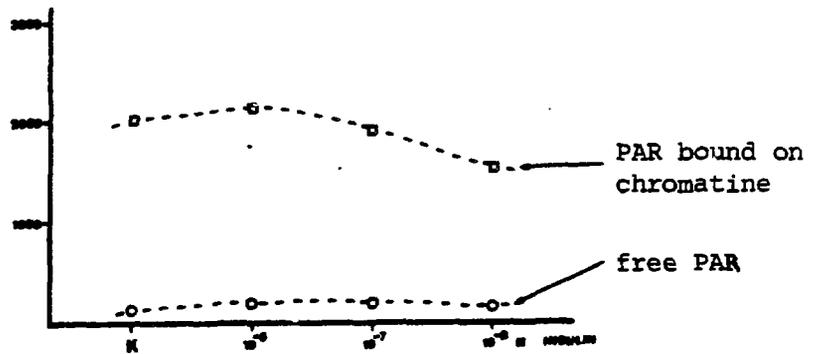
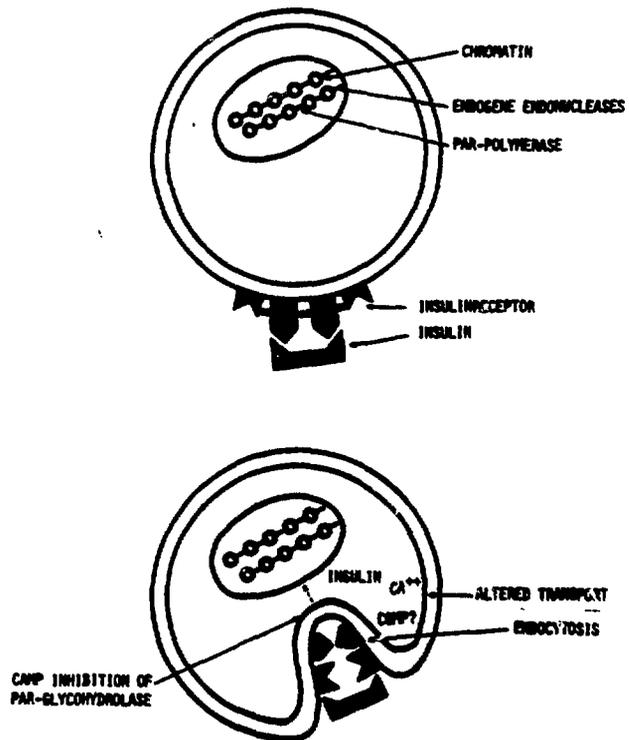


Figure 3:
Influence of insulin on PAR-synthesis after a 10 J/m² UV₂₆₀ irradiation

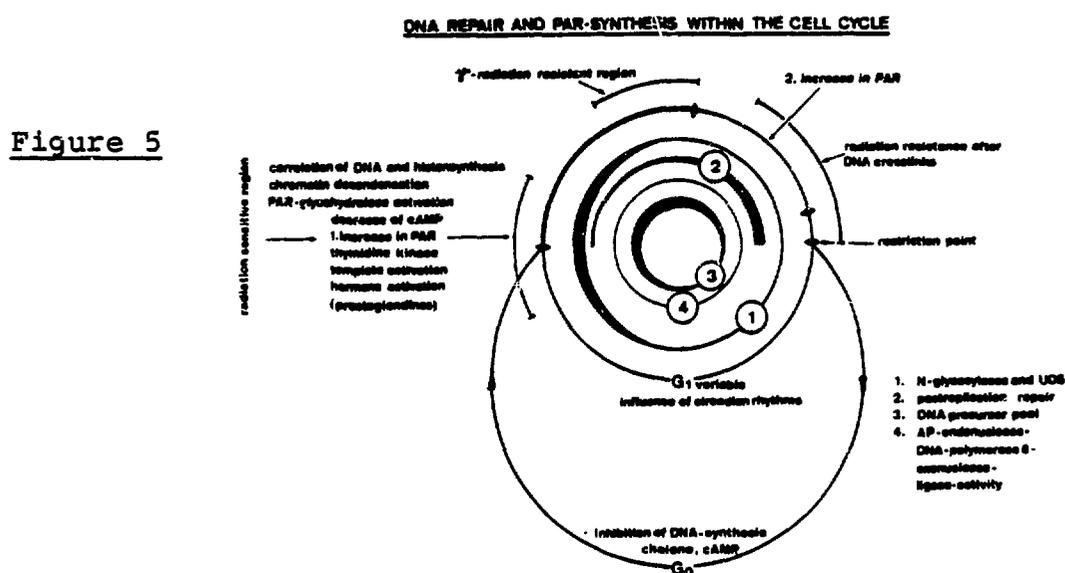


POSSIBLE INTERACTION OF INSULIN WITH CHROMATIN

Figure 4



Shimizu (8) found a stimulation of PAR after long-term insulin treatment (18 hours) but not after short-term treatment and he correlates these results with the early start of DNA-synthesis. In a preliminary experiment with long-term incubation of insulin with CHO-cells we found a small increase in PAR-synthesis 6 hours after start of incubation, followed again by an inhibition. Figure 5 explains the cell cycle regulated by short PAR-synthesis pulses and the DNA-repair capacity in different phases.



Further experiments should give more information on the regulatory role of PAR and DNA-repair within the cell cycle.

REFERENCES

1. CZECH, M.P.: Molecular basis of insulin action. *Ann.Rev. Biochem.* 46 (1977) 359-384.
2. HENSON, J.C., N. LEGROS: Effect of insulin on DNA-synthesis and DNA-polymerase activity in organ culture of rat mammary carcinoma and the influence of insulin pretreatment and of alloxan diabetes. *Cancer Res.* 31 (1971) 59-65.
3. GORDEN, P., J.L. CARPENTIER, P. FREYCHET, A. LeCAM, L. ORCI: Intracellular translocation of iodine-125-labeled insulin: Direct demonstration in isolated hepatocytes. *Science* 200 (1978) 782-785.
4. SCHLESSINGER, J., E. van OBERGHERN, R. KAHN: Insulin and antibodies against insulin receptor cap on the membrane of cultured human lymphocytes. *Nature (London)* 286 (1980) 729-731.

5. BALDWIN, D.jr., M. PRICE, St. MARSHALL, P. DAVIS, J.M. OLEFSKY: Regulation of insulin receptors: Evidence for involvement of an endocytotic internalization pathway. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77 (1980) 5975-5978.
 6. ALTMANN, H., I. DOLEJS: Poly(ADP-ribose)-synthesis, chromatin structure and DNA-repair in cell of patients with different diseases. Progress in Mutation Research Vol. IV (1982) in press.
 7. HAYAISHI, O., K. UEDA: Poly(ADP-ribose) and ADP-ribosylation of proteins. Ann.Rev.Biochem. 46 (1977) 95-116.
 8. SHIMIZU, Y., N. SHIMIZU: Insulin and epidermal growth factor stimulate poly ADP-ribosylation. Biochem.Biophys. Res.Comm. 99 (1981) 536-542.
 9. ALTMANN, H., I. DOLEJS, A. TOPALOGLOU, A. SOOKI-TOTH: Faktoren, die die DNA-Reparatur in "spacer and core DNA" von Chromatin menschlicher Zellen beeinflussen. stud. biophys. 76 (1979) 105-203.
-

DNA-REPARATUR UND CHROMATIN (Proc. Symposium Saalfelden 1981).
Hrsg.: H. Altmann und G. Klein. Seibersdorf 1982, 21-34.

LYMPHOCYTE CHROMATIN ACTIVATION BY ALLERGENS

J.M. BALO-BANGA and L. MOLNAR

Department of Dermatology, Semmelweis University Medical School,
Budapest

INTRODUCTION

Allergy-connected severe clinical cases become increasingly frequent. Apart from season-related occurrence of allergy to honey-bee bites and other insect bites these are to our experience throughout all seasons mainly elicited by drugs. The search in each individual case for the pathognomic drug(s) is important because each accidental re-exposure would worsen the symptoms.

In 1975, we described the way, how rapid changes in the lymphocytes chromatin due to phytohaemagglutinin (PHA), 2,4 dinitrochlor-benzene (DNCB) and 2,4,5 trichlor-phenoxy-acetic acid (TPAA) were made visible by an altered uptake of the dye, neutral red, measured in the polarization microscope (2). Later we were able to show that this reaction depended on the accessibility of DNA within chromatin (3) and published the first results on its applicability in detecting drug allergy (4). Further investigations were done in collaboration with the Research Centre Seibersdorf, to elucidate the molecular biological background of this unique reaction (5).

In this paper we are going to summarize some of our results suggesting a certain molecular basis for a biphasic chromatin activation process triggered by allergenic drugs in the sensitive patients lymphocytes and its clinical applications and correlations.

METHODS

The methods are listed in Table 1. Drug allergy was suspected according to equivocal history and proven in vivo also by oral challenge tests. All controls free from allergy were tested orally. Negative chromatin activation results were confirmed by nonresponsiveness due to oral challenge. Many positive test results were also confirmed, especially if the clinical reaction was mild. In more severe clinical cases intracutaneous tests were preferred which had in our hands a reliability of 60%. In the remaining cases both false negativity and false positivity occurred. The reliability of equivocal history and of oral challenge tests exceeds 85%.

RESULTS

1. The quality of lymphocyte chromatin birefringence.

The chromatin of lymphocytes reacts with neutral red only after proper fixation with 70% ethanol containing 100-150 mmol/l of NaCl (3). This fixative prepares chromatin for a topo-optical reaction with neutral red and abolishes cytoplasmic reaction which occurs in unfixed preparations. By the help of this "fixation artifact" induced under strictly controlled conditions, in vivo elicited changes of chromatin can be magnified and, by the help of the polarization microscope, visualized. Lymphocyte chromatin birefringence resembles that of sphaerolithes (7). Its direction is both positive and negative. Fig. 1 shows the difference seen at 90° crossed polarisator and analisator plates (1A) against that supplemented with a standard compensator (n/λ). In this latter case from a slightly red background (first order red, gray in figure) negatively birefringent areas appear as yellow (light in the figure) spots and positive birefringent ones as bluish-green (black in the figure) spots (Fig. 1B).

Table I: Methods

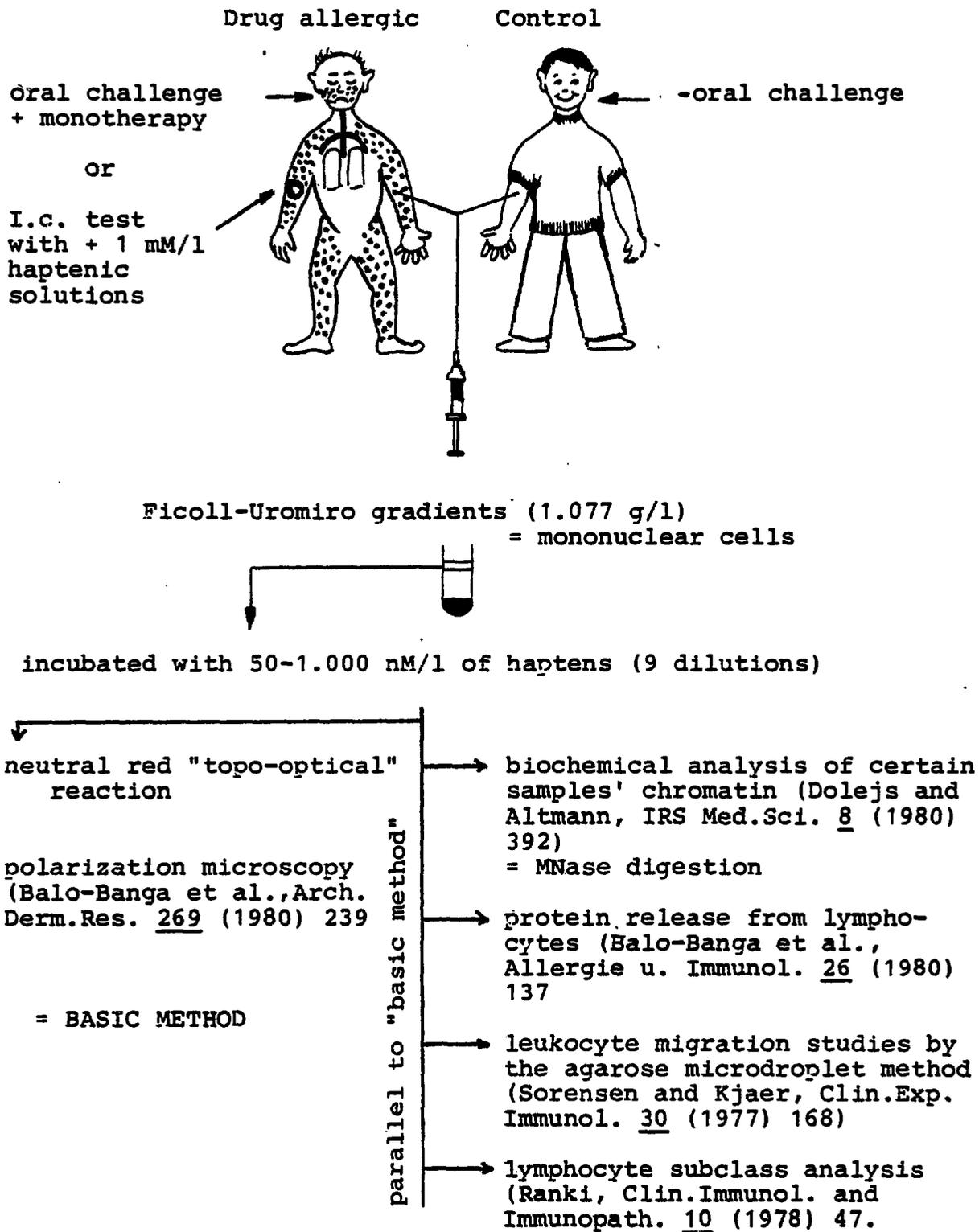




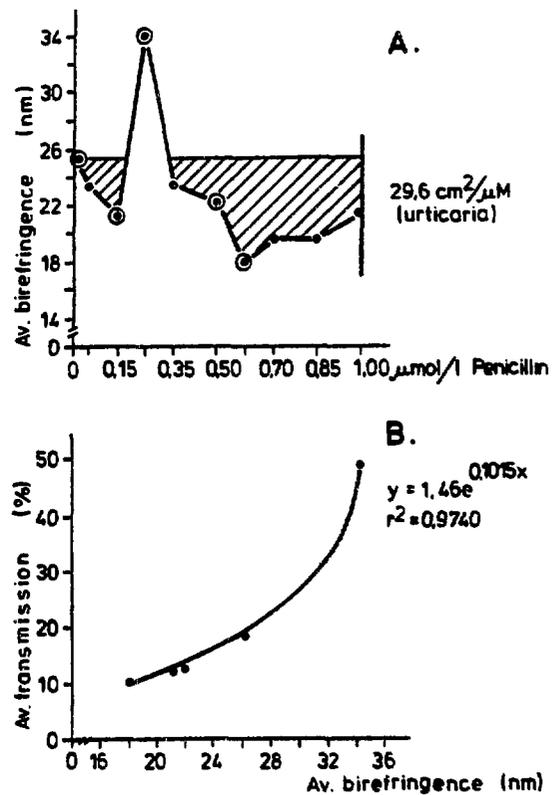
Figure 1 (magnification x 1500)

A Lymphocyte chromatin neutral red topo-optical reaction through crossed polars

B the same as A but supplemented by a first order red compensator plate

Figure 2

The marked points (⊙) of the upper diagram (A) were subjected to both, measurements of birefringence by compensation and to transmission readings. Lower diagramme (B) shows the results.



Quantitative compensation (2) of both types of birefringence gives an average which correlates closely with the average transmission values measured in the same preparations by an appropriate Amplival (Zeiss, GDR) microscope photometer at the 90° crossed position of analyser and polarisator (Fig. 2).

2. Mono- and biphasic reactions of lymphocyte chromatin. Time dependence.

Monophasic reactions may either increase or decrease the birefringence of chromatin. Biphasic reaction show increase and then decrease of birefringence in a sequential order. Butyrate, a known inhibitor of histone deacetylation (10) increased chromatin birefringence within 45-90 min. of incubation (Fig. 3).

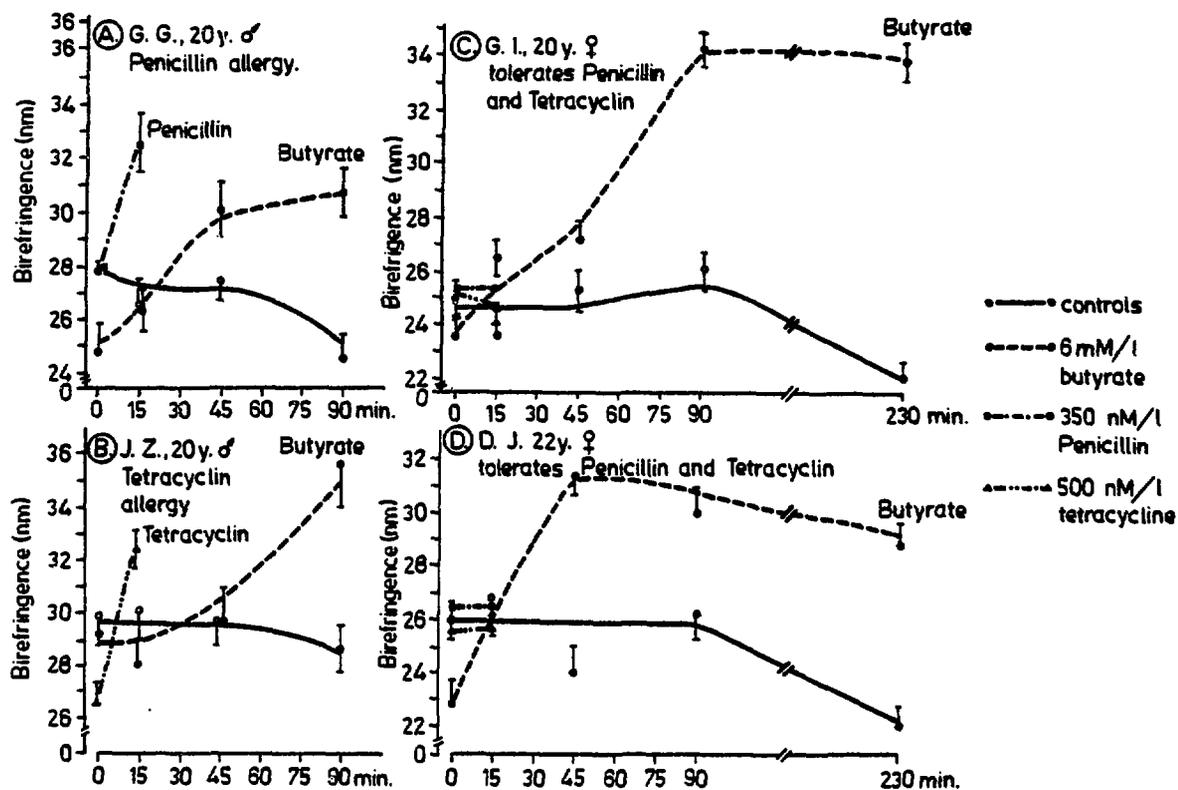


Figure 3

A, B = drug allergics; C, D = control subjects

From Fig. 3 it appears also that drugs to which a person is allergic increased very rapidly chromatin birefringence as compared to butyrate. In contrary to butyrate which exerted a monophasic reaction, allergens caused a biphasic one which was individually dose dependent (not shown in Fig. 3). Five mmol/l benzamide, an inhibitor of PAR polymerase (1) decreased chromatin birefringence also in a monophasic reaction (results not shown in detail) within 60 min. of incubation at 37°C.

3. Molecular bases for birefringence increase and decrease.

The increase of birefringence was studied in isolated chromatin of drug allergic and of controls by the MNase digestion technique (Table II). At certain drug concentrations within the range of 0.05 μ mol/l to 1.00 μ mol/l increased the chromatin birefringence. This increase was found to coincide with a marked drop on core:spacer ratios. No such change was found in the controls.

The decrease of spacer:core ratios might indicate a chromatin alteration that could be connected to the formation of transcription active loops. This phase involves probably nucleosomal sliding and the active participation of PAR. More MNase sensitive "free" DNA is present in the chromatin.

Table III. shows that nucleoid sedimentation followed closely birefringence changes in 3 drug allergics. Higher values of average chromatin birefringence coincided with increased nucleoid sedimentation rates and low values with decreased ones.

The changes that we observed in nucleoid sedimentation rates (11) and in the chromatin birefringence are probably sequentially ordered phases of allergen-induced chromatin activation. Decreased birefringence which is characterized by decreased nucleoid sedimentation might reflect the start and activity of transcription. Strong non-histone binding would

Table II: The correlation between average chromatin birefringence and core to spacer ratios in drug allergic and in control subjects.

Drug allergic patients				Control subjects			
No.	treatment	Birefringence (nm)	core spacer	No.	treatment	Birefringence (nm)	core spacer
1	none	27.3	10.9	1	none	27.1	5.4
	0.75 μ mol/1 P	36.4	7.5		0.75 μ mol/1 P	25.1	5.3
	1.00 μ mol/1 P	29.5	10.7		1.00 μ mol/1 P	28.1	5.1
2	none	28.0	5.7	2	none	25.9	6.5
	0.50 μ mol/1 A	34.8	3.8		0.05 μ mol/1 S	25.4	6.7
	0.75 μ mol/1 A	30.4	4.8		0.75 μ mol/1 S	28.2	7.4
3	none	29.1	7.3				
	0.50 μ mol/1 P	32.0	4.7				
	1.00 μ mol/1 P	28.0	6.8				

P = penicillin, A = aminopyrin, S = sulfadimidine

Table III: The correlation between average lymphocyte chromatin birefringence and the sedimentation profiles of nucleoids in drug allergics (n = 3).

Sample	average birefringence (nm)	sedimentation distance from the top of the gradient (mm)	sedimentation rate (%)
Diluent controls	23.7 \pm 2.0	34	44
Increased	30.0 \pm 0.9	51	66
Decreased	21.0 \pm 3.0	29	39

prevent dye molecules to attach to "free" DNA and the complex from sedimenting deeper into gradients. This phase can be abolished by pre-incubation of cells with actinomycin D, a known inhibitor of RNA polymerases (unpublished results).

4. The biphasic activation pattern of chromatin in drug allergics produced by an empirical dilution series of different drugs.

Different drugs diluted on the molar basis elicit a characteristic biphasic activation pattern in the chromatin of drug allergics. No such pattern is developing in non-allergics or in allergics tested with non-allergenic drug(s). In Fig. 4 the method of quantitative evaluation of the extent of drug allergy is given, too. Therefore, among allergics quantitative differences can be made.

QUANTITATION OF THE EXTENT OF DRUG ALLERGY BY
CHROMATIN ACTIVATION ANALYSIS

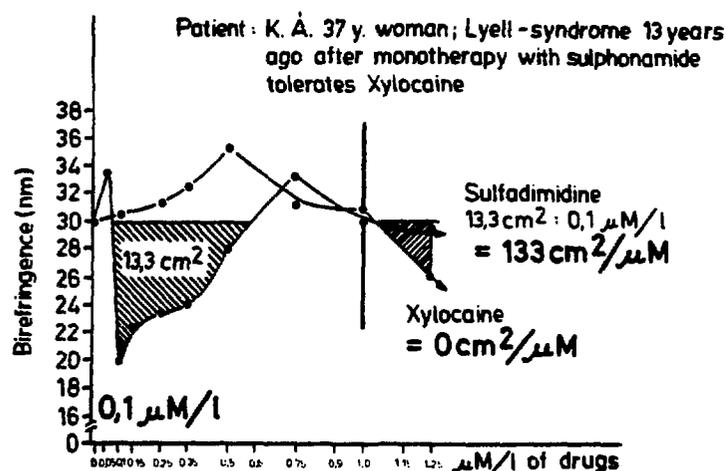


Figure 4

In Figure 5 the chromatin birefringence readings are compared in an allergic (A) and in a drug tolerating (B) person with the results of biochemical analysis. The latter was performed by liberating chromatin from lymphocytes by means of a lysis mixture (6). Chromatin was then stained by neutral red and subjected to DNase I treatment. This enzyme

recognized the stained chromatin as substrate and liberated DNA bound dye linearly (unpublished results). Liberated dye was measured from the supernatant of chromatin and expressed as μg per $100\mu\text{g}$ total cellular protein determined during lysis step by Lowry's method (12).

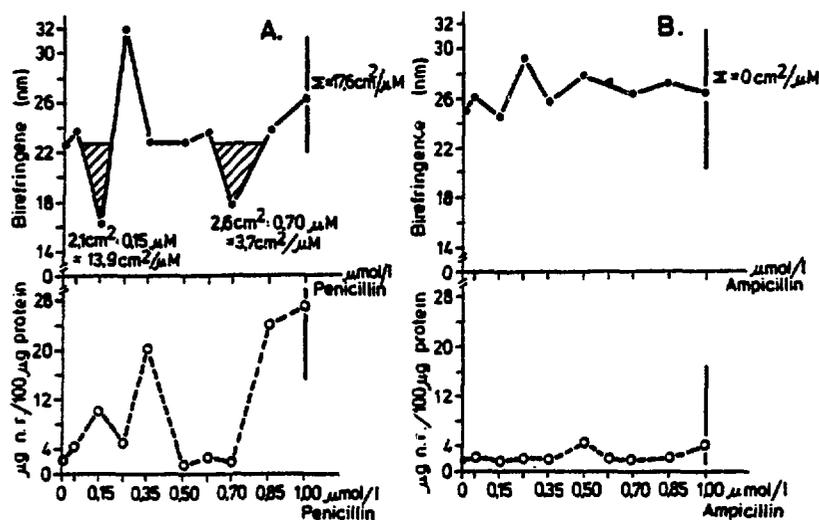


Figure 5: A = drug allergic, B = control,
 upper diagrams: results obtained by polarization
 microscopy,
 lower diagrams: results obtained by spectrophotometry at 575 nm.

5. Chromatin activation and immunological reactivity.

Immunological activation was measured a.) by T-lymphocyte histochemistry using the ANAE method and b.) by leukocyte migration analysis using the agarose microdroplet technique. Fig. 6 summarizes the results of lymphocyte subclass analysis and polarization microscopy.

In Fig. 6A the decrease of chromatin birefringence and of single-dot positive T-cells coincided in all three cases of drug allergy. The drop of single-dot positive lymphocyte counts was accompanied by an elevation of double-dot and diffuse positive lymphocyte counts. No such changes were noticed in the drug-tolerating controls (Fig. 6B).

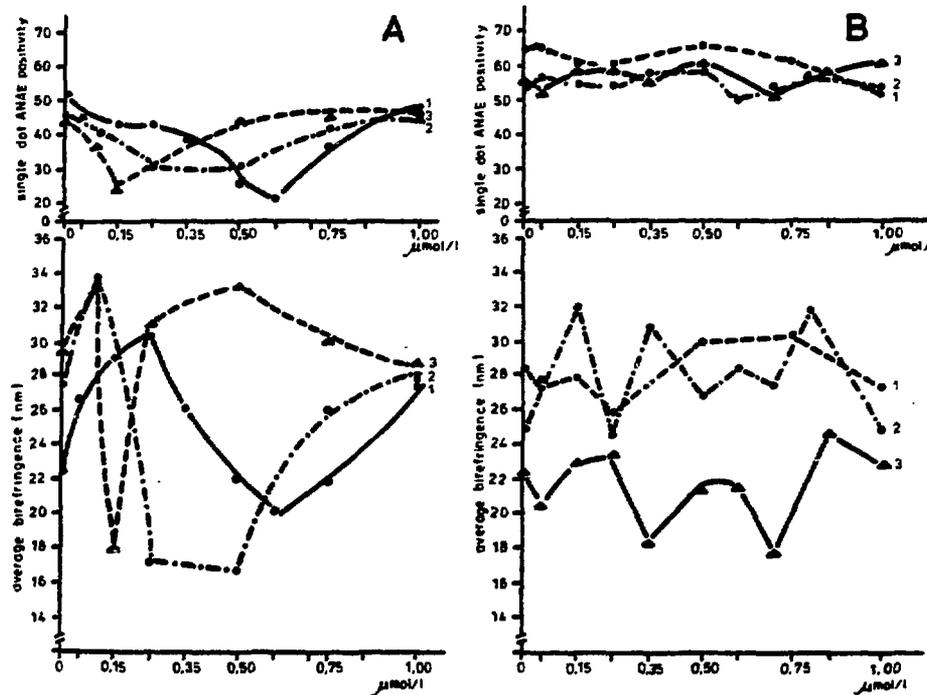


Figure 6: A = drug allergics; 1, 3 = sulfadimidine,
2 = aminopyrine;
B = drug tolerating controls; 1 = aminopyrine,
2 = penicillin,
3 = sulfadimidine.

The conclusion that the decrease of lymphocyte chromatin birefringence is the phase and sign of immunological activation was further supported by the fact that upon the same sequential drug dilution series most MSF activity was connected to the same active drug concentrations measured after 18 hours of incubation of lymphocytes and granulocytes together with the allergens (Fig. 7).

Under certain conditions (25-40% lymphocytes within the microdroplet, chromatin activation score: 14-30 $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$) the decrease of chromatin birefringence was inversely proportional to the increase of MSF production (Fig. 8).

MSF PRODUCTION AND CHROMATIN BIREFRINGENCE IN A PENICILLIN ALLERGIC

Figure 7

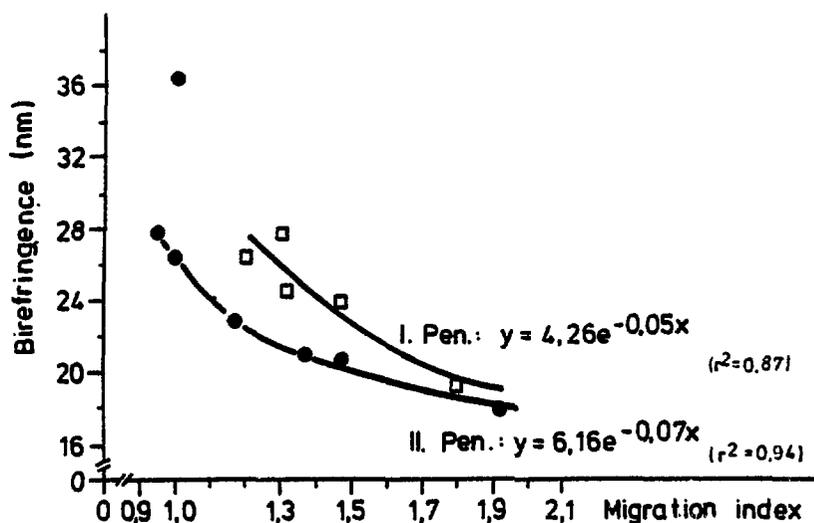
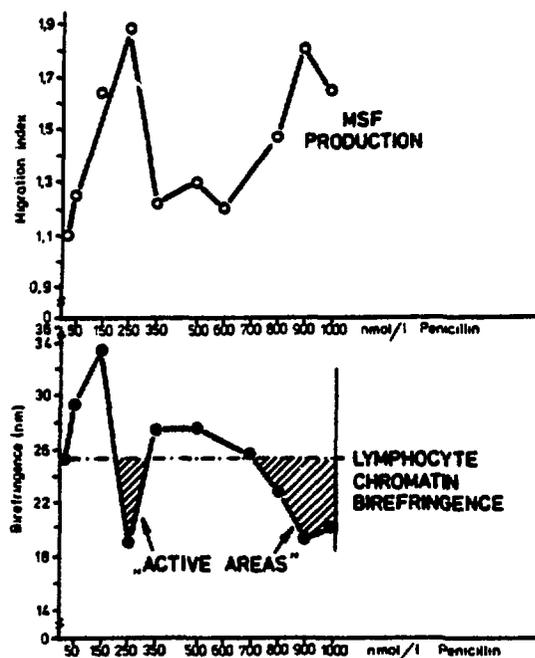


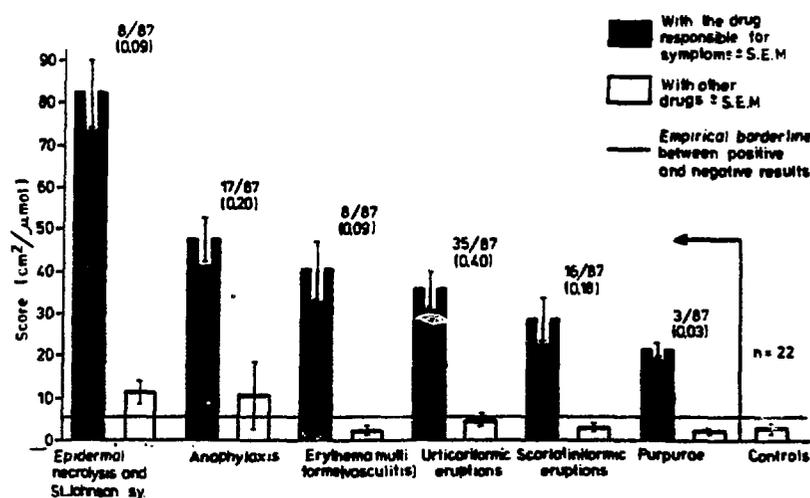
Figure 8: The measured values of birefringence from the "active areas" are plotted against migration indices determined in the same experiment as migration of sample: migration of the diluent control. Each point represents the average of 6 individual readings.

6. Chromatin activation as a reflection of the severity of allergy.

Some clinically well defined disease forms are listed ac-

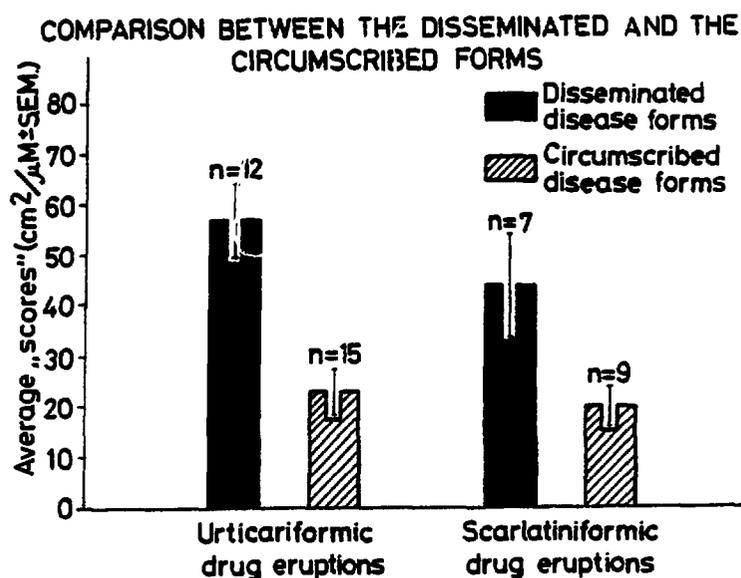
ording to their decreasing severity on the abscissa of Fig. 9. The corresponding average "scores" derived from chromatin activation analyses are plotted on the ordinate. Each rate over column pairs is related to the proportion of the given clinical diagnose group within the total body of investigated cases.

Figure 9



The average number of tests with different drugs was 2.3 in the patient's group and 1.14 within the controls' group. The relative frequency of the different tested drugs was about the same in both groups. A good correlation of the "scores" with the severity of clinical picture is evident. Within two distinct clinical groups a clear distribution of average "scores" could be made of the differentiation of patients according to the "spreading" of the allergic manifestation over the skin surface was performed. The values were significantly lower if less than 40% of the skin surface was involved and significantly higher if more than 41% was affected in both the urticariformic and the scarlatiformic disease groups (10).

Figure 10

**CONCLUSIONS**

The conclusions and correlations are summed up in Table IV. Chromatin activation in lymphocytes can be measured by applying different detecting systems. This reaction involves the majority of the mononuclear cell population challenging with haptens in remarkably short time. Allergen induced chromatin activation has a biphasic reaction pattern in contrast to chromatin changes induced enzymatically. It provides a clinically useful tool in detecting in vitro allergy and comparing it with other allergies.

Table IV: Immunological and biochemical parameters and drug dependent chromatin birefringence of lymphocytes.

Aver. chromatin birefringence	Alteration
27-40 nm	The relative amount of "spacer" DNA within the chromatin increases. The sedimentation of nucleoid increases.
24-27 nm	No change (control samples).
24-18 nm	1. The sedimentation of nucleoid decreases. 2. Decrease in the single-dot ANAE positive T-cells. Increase of big-granular and diffuse ANAE positive lymphocytes. = Change in the membrane-bound enzyme distribution. 3. Extractibel protein-like substance appears (not discussed in this paper). 4. Leukocyte migration-index changes.
18-8 nm	The same as under 1.-4. plus increasing degrees of cytotoxicity.

LITERATURE

1. ALTMANN, H. and I. DOLEJS: in press.
2. BALO-BANGA, J.M. and L. MOLNAR: In: DNA-Repair and Late Effects. Ed. H. Altmann. Roetzer Druck Eisenstadt, 1976, p. 51.
3. BALO-BANGA, J.M. et al.: Arch.Derm.Res. 269 (1980) 339.
4. BALO-BANGA, J.M. et al.: Allergie u. Immunol. 26 (1980) 137.
5. BALO-BANGA, J.M. et al.: studia biophysica (Berlin) in press.
6. DOLEJS, I. and H. ALTMANN: IRCS Med.Sci. 8 (1980) 392.
7. KAUFMANN, S.: Chemische Mikroskopie (Jena) 3 (1980) 46.
8. SORENSEN, T.B. and M. KJAER: Clin.exp.Immunol. 30 (1977) 168.
9. RANKI, A.: Clin.Immunol. & Immunopathol. 10 (1978) 47.
10. VIDALI, G. et al.: Proc.Natl.Acad.Sci.(USA) 75 (1978) 2239.
11. WENIGER, P.: Int.J.Radiat.Biol. 16 (1979) 197.
12. LOWRY, O.H. et al.: J.Biol.Chem. 193 (1951) 265.

ACKNOWLEDGEMENTS

The most valuable theoretical and practical help throughout all phases of this work by Dr. Hans Altmann and his colleagues in the Reserach Centre Seibersdorf is greatly acknowledged. Thanks are due for valuable suggestions or practical help to Drs. A. Jeney, I. Vincez, A. Sooki-Toth and K. Farago. Miss Monika Novaki did the finest technical work.

DNA-REPARATUR UND CHROMATIN (Proc. Symposium Saalfelden 1981).
Hrsg.: H. Altmann und G. Klein. Seibersdorf 1982, 35-39.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE POLY(ADP-RIBOSE)-POLYMERASE-
AKTIVITÄT IN LYMPHOZYTEN VON PATIENTEN MIT CHRONISCHER
POLYARTHRITIS

Chr. KORP und G. KLEIN

L. Boltzmann-Institut für Rehabilitation interner Erkrankun-
gen, Rehabilitationszentrum West der PVarb. Saalfelden

EINLEITUNG

Es ist bekannt, daß es bei entzündlich-rheumatischen Erkrankun-
gen zu einer erhöhten Prostaglandinbiosynthese und in der Folge
zu einer vermehrten Freisetzung von Radikalen, insbesondere von
 O_2^- -Radikalen kommt.

O_2^- -Radikale können die Ursache für eine erhöhte Anzahl von DNA-
Strangbrüchen sein, die, wenn sie nicht ausrepariert werden, An-
laß für weitere Zellschädigung sein können. Derartige DNA-Ver-
änderungen können Fehler im Aufbau körpereigener Makromoleküle
bewirken, die ihrerseits eine gegen sie gerichtete Antikörper-
produktion auslösen und phagozytierende Zellsysteme aktivieren.

Da aber die Phagozytose als typisches Beispiel der biologischen
 O_2^- -Radikalenproduktion beschrieben wird, schließt sich der
circulus vitiosus und führt zu einer meßbaren Erhöhung der DNA-
Strangbruchrate.

Die Poly(ADP-Ribose) ist ein wichtiges Regulatormolekül des Zell-
zyklus und erfüllt folgende Funktionen:

1. Die Inaktivierung von Enzymen (Endo- und Exonukleasen, Poly-
merase einer RNA-Polymerase und Proteasen).
2. Sie trägt zur Chromatinkondensation bei.
3. Sie führt zu einer Auflockerung der Chromosomencores.

Im regulären Zellsystem stehen PAR-Polymerase und PAR-Glykohydro-
lase im Gleichgewicht. Kommt es nun zu DNA-Strangbrüchen, so er-

hört sich die PAR-Polymeraseaktivität, die nach der Behebung der Schäden an der DNA auf einen Normalwert zurückfällt. Die PAR-Glykohydrolase verhält sich in Bezug auf die DNA-Reparatur gegenläufig dazu.

Für uns stellt sich nun die Frage, ob ein Unterschied in der PAR-Polymeraseaktivität zwischen den Kontrollpersonen und den Polyarthritikern festzustellen ist. Wir nahmen an, daß es bei den cP-Patienten zu einer schnelleren Aktivierung der PAR-Polymerase kommen würde, da bei den Polyarthritikern, wie bereits erwähnt, eine erhöhte DNA-Strangbruchrate vorliegt und unter Umständen das Gleichgewicht zwischen Polymerase und PAR-Glykohydrolase gestört ist.

PATIENTENGUT UND METHODE

3 weibliche Patienten mit seropositiver chronischer Polyarthrititis (Stadien II und III nach Steinbroker) wurden für die Untersuchung herangezogen. Als Kontrollpersonen fungierten 3 weibliche Probanden, welche lediglich eine leichte Arthrose aufwiesen. Das Durchschnittsalter aller Probanden lag bei 42 Jahren. Allen zu untersuchenden Personen wurden 30 ml Blut entnommen und aus diesem die Lymphozyten nach der Ficoll-Urografin-Methode isoliert. Jede Probe enthielt zwischen 700.000 und 800.000 Lymphozyten. Untersucht wurde, ob sich die PAR-Polymerase durch Zusatz von unbehandelter DNA bzw. durch eine Bestrahlung der Probe mit 10.000 rad änderte. Verglichen wurden dann die Werte, die sich bei 5 Minuten und 20 Minuten Inkubationszeit ergaben, verglichen wurden die beiden Gruppen untereinander und die Kontrolle gegen die Patienten.

Die Bestimmung der Poly(ADP-Ribose) wurde wie folgt durchgeführt: Jeder Probe wurden 0,75 ml PBS und 0,25 ml Lysierflüssigkeit zugesetzt und das Ganze bei 3.000 UpM und 4°C 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, 0,5 ml Inkubationsmedium und 20µl tritium-markiertes NAD zugesetzt und die Proben bei 25° 5 min oder 20 min im Wasserbad gehalten. Danach wurden jeder Probe 0,5 ml kalte 12% Perchlorsäure

beigefügt und wiederum bei 3000 Umdrehungen und 4°C zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde kalte 6% Perchlorsäure zugesetzt und wieder zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt, bevor die Proben eine halbe Stunde bei 80° im Wasserbad gehalten wurden. Danach erfolgten die Messungen.

ERGEBNISSE

Wie bereits erwartet, zeigte sich bei der Auswertung und dem Vergleich der Ergebnisse Unterschiede zwischen den Kontrollpersonen und den Patienten (Tab. 1).

	Minuten	Zusatz von un- behandelter DNA	Probe bestrahlt
Kontrolle	5	577 [±] 4,5	697 [±] 425
	20	358 [±] 61,1	221 [±] 56
Patienten	5	626 [±] 259	968 [±] 357
	20	608 [±] 290	590 [±] 210

Tabelle 1: Mittelwerte und Standardabweichungen von Kontrollpersonen und Patienten bei Zusatz von unbehandelter DNA und bestrahlter Probe.

Aus den Verlaufskurven der Poly(ADP-Ribose)-Polymeraseaktivitäten sind die Unterschiede zwischen den einzelnen Kontrollpersonen und den Patienten ersichtlich (Abb. 1 und 2).

Zusatz von unbehandelter DNA

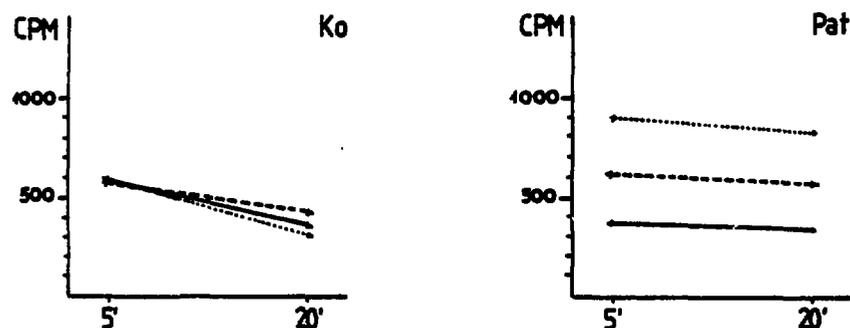


Abbildung 1: Verlauf der 5-Minuten und 20-Minuten-Werte bei Kontrollpersonen und Patienten bei Zusatz von unbehandelter DNA.

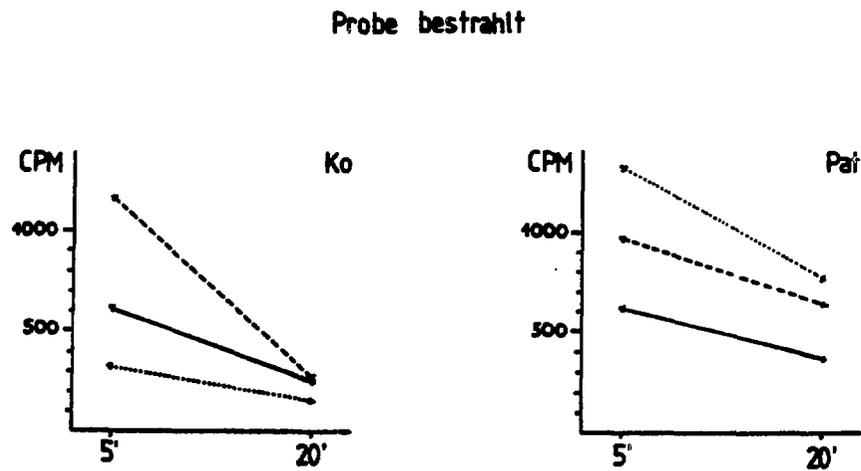


Abbildung 2: Verlauf der 5-Minuten und 20-Minuten-Werte bei Kontrollpersonen und Patienten bei bestrahlter Probe.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Poly(ADP-Ribose)-Polymeraseaktivität bei Patienten mit chronischer Polyarthrititis höher liegt, als bei den Kontrollpersonen, bei denen sowohl bei Zusatz von unbehandelter DNA als auch bei der bestrahlten Probe die 20-Minuten-Werte gegenüber den 5-Minuten-Werten signifikant abgefallen waren (Abb. 3).

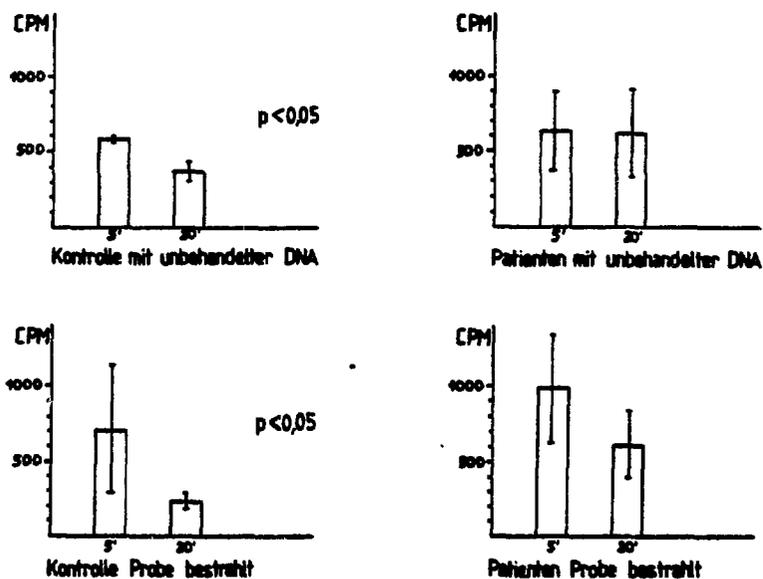


Abbildung 3: Blockdiagramm der 5-Minuten und 20-Minuten-Werte bei Kontrollpersonen und Patienten bei Zusatz von unbehandelter DNA und bestrahlter Probe.

Vergleiche der 5-Minuten und 20-Minuten-Werte von Kontrollpersonen und Patienten ergaben, daß die Werte der Patienten mit chronischer Polyarthrititis immer höher liegen als diejenigen der Kontrollpersonen, die 20-Minuten-Werte bei bestrahlten Proben zeigten sogar einen statistisch signifikanten Unterschied.

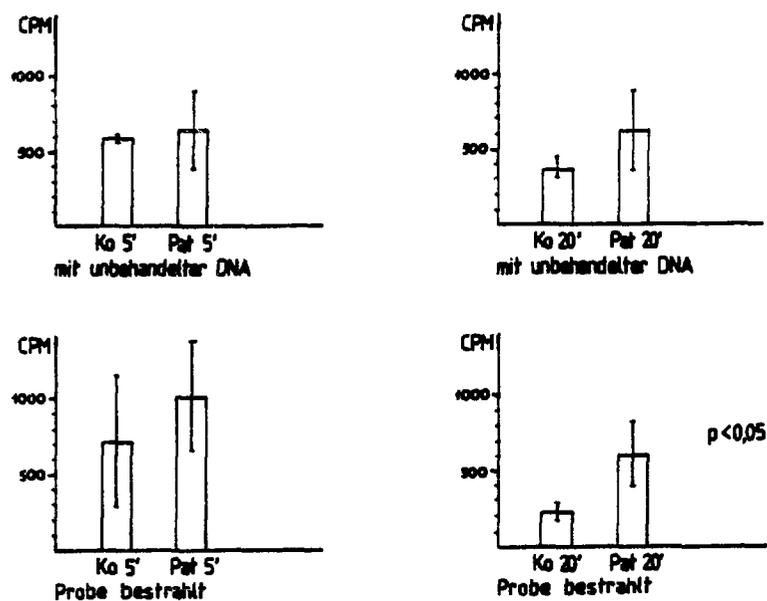


Abbildung 4: Vergleiche von 5-Minuten-Werten Kontrollpersonen und Patienten und 20-Minuten-Werten von Kontrollpersonen und Patienten bei Zusatz von unbehandelter DNA und bestrahlter Probe.

Durch unsere Ergebnisse konnte gezeigt werden, daß es bei Patienten mit chronischer Polyarthrititis zu einer schnelleren Aktivierung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase kommt, die auch länger anhält als bei den Kontrollpersonen, was für eine Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen Poly(ADP-Ribose)-Polymerase und Poly(ADP-Ribose)-Glykohydrolase spricht.

LITERATUR

beim Verfasser

DNA-REPARATUR UND CHROMATIN (Proc. Symposium Saalfelden 1981).
Hrsg.: H. Altmann und G. Klein. Seibersdorf 1982, 41-46.

DNA-REPAIR IN LYMPHOCYTES OF PERSONNEL AND PATIENTS
EXPOSED TO A RADON-222 CONTAINING ATMOSPHERE

J. KOVACS¹, A. SOOKI-TOTH², H. ALTMANN³, A. TOPALOGLOU³,
I. SZIRAKI⁴, F. SCHILLING⁵

- ¹ International Atomic Energy Agency, Wien, Österreich.
- ² 1.Biochemisches Institut, Semmelweis Universität Budapest, Ungarn,
- ³ Institut für Biologie Forschungszentrum Seibersdorf, Österreich,
- ⁴ Szot Szanatorium, Bad Heviz, Ungarn,
- ⁵ Rheuma Klinik und Ambulanz, Bad Kreuznach, BRD.

Direct risk information does not exist for environmental levels of radon-222 and its decay products. But generally the basis of dose limitation in radiological protection is risk limitation (1). The most data are obtained on uranium miners who have long been exposed to high levels of radon in mine atmospheres and they show an increased incidence of lung cancer (2). But there exists several factors that may increase the risk for radon exposure. The smallcell anaplastic type lung cancer may be caused by radon and tobacco smoke in combination (3). In the mines combinations of radon exposure with inhaled metalions, temperature, diesel exhausts, aflatoxins from molds on the wooden parts and other factors may contribute to lung cancer risk and produces possibly synergistic effects (4). The shape of a dose-effect curve is of critical importance in connection with radiation health effects. We now know that cells can repair damage to DNA. Therefore irradiation at low dose rate might produce little if any killing because of repair during exposure (5). But not only the killing effect, also the mutagenic effects of low level radiation are often estimated from extrapolation of higher doses on the bases of a linear dose response curve. But DNA repair processes can

produce deviations from linearity at low doses in both directions. It was found first in microorganisms exposed to sublethal doses of DNA damaging agents an apparently error free repair system can be induced that confers increased resistance to mutagenic and lethal effects after an additional treatment with a higher dose (6). DNA-polymerase α is involved in DNA replication and DNA-polymerase β in DNA-repair. The β -enzyme can be induced by chronic DNA-damage (7). But also other enzymes involved in DNA metabolism can be increased during chronic irradiation (8). It is interesting to note that low doses of γ -rays produce more chromosomal aberrations in human lymphocytes than expected, if one extrapolates dose effect curves from higher doses (9). This can be due to an stimulated repair level at the high dose range. Also postreplication repair can be enhanced by given fractionated doses of DNA-damaging agents (10). In earlier experiments we investigated DNA-excision repair in lymphocytes of persons occupationally exposed to low-dose radiation from radon-222, in Badgastein, a spa resort with hydrothermal radioactive springs and a former gold mine with higher radon level, higher air temperature and humidity used for treatment of patients with different rheumatic diseases. The springs produces approximately 5 million liters of hot water containing 200 mCi radon-222 daily. The "gold mine" atmosphere contains radon-222 in a mean concentration of 2-4 μ Ci/l. The personnel working at the gold mine have a higher DNA-repair capacity in the peripheral lymphocytes (11). A certain group of workers showed a decreased two event chromosome aberrations, with increasing λ -burdens (12). In the present experiments we investigated people from Badgastein, but also from other spa resorts with an elevated radon-222 level: Bad Heviz in Hungary and Bad Kreuznach in the Federal Republik of Germany. Bad Heviz has a lake with warm water of 1-5 μ Ci/l radon-222 (13) and Bad Kreuznach has also a mine with high radon-222 content comparable to Badgastein, but with normal room temperature.

Blood was taken from these personnel, lymphocytes isolated, the DNA damaged by UV₂₅₄ and DNA-repair incorporation as well in

native DNA as in single strand containing DNA determined. The DNA separation was done using BND-cellulose according to Scudiero et al. (14).

Additional to the DNA-repair studies also poly(ADP-ribose) was determined, which is responsible for structural changes in chromatin, increasing the possibility of penetration of repair enzymes to the damaged parts of DNA within chromatin (15).

Table 1 shows the values for patients treated in Bad Heviz, before and after a cure of 21 days.

Table 1: Replicative DNA-synthesis in lymphocytes in % of radioactivity.

before a cure		after a cure	
nDNA	ssDNA	nDNA	ssDNA
$\bar{x} = 39,8$	60,2	$\bar{x} = 28,0$	72,0
s = 6,6	6,6	s = 2,9	2,9
n = 6	6	n = 6	6
P = 0,05		P = 0,05	

In the next tables the DNA-repair incorporation of H³-thymidin is shown in lymphocytes of patients before and after a cure treatment in Bad Heviz and Bad Kreuznach to controls (Table 2).

Table 2: DNA-repair incorporation after in vitro UV-irradiation in % of H³-thymidin incorporation.

before		after	
nDNA	ssDNA	n-DNA	ssDNA
$\bar{x} = 36,7$	63,0	$\bar{x} = 47,0$	53,0
s = 5,99	5,44	s = 2,97	2,97
n = 6	6	s = . 6	6
P = 0,05		P = 0,05	

Table 3 shows the PAR-synthesis of mine workers compared to controls.

Table 3: Poly(ADP-ribose)synthesis in lymphocytes of mine workers in Badgastein and Bad Kreuznach (in cpm/ 1 mill.cells).

mine workers	controls
\bar{x} = 794	\bar{x} = 1.149
s = 258	s = 524
n = 6	n = 6

The obtained results from radon-222 exposed people in Bad Heviz and Bad Kreuznach in respect to DNA-synthesis and DNA-repair confirm earlier data from mine workers in Badgastein. Poly(ADP-ribose)synthesis was 30 min after NAD incorporation lower compared to controls, possible due to the poly(ADP-ribose)-glycohydrolase activity acting on nucleosomal cores and H₁-PAR-H₁ bridges especially in heterochromatin. This reaction occurs in exposed people earlier as in controls.

Further experiments should clarify if the obtained higher DNA-repair incorporation results from error free or error prone DNA-repair.

REFERENCES

1. EVANS, R.D., J.H. HARLEY, W. JACOBI, A.S. McLEAN, W.A. MILLS, C.G. STEWART: Nature 290 (1981) 98-100.
2. ARCHER, V.E., J.K. WAGONER, F.E. LUNDIN: Health Phys. 25 (1973) 351.
3. STRANDEN, E.: Health Phys. 38 (1980) 301-306.
4. CLIFF, K.D.: Phys.Med.Biol. 23 (1978) 696.
5. ELKUND, M.M.: Rad.Res. 71 (1977) 9-23.
6. SAMON, L., J. CAIRUS: Nature (London) 267 (1977) 281.
7. CRADDOCK, V.M., C.M. ANSLEY: Biochem.Biophys.Acta 564 (1979) 15-22.
8. ELKINA, N.I.: Radiobiologica 18 (1978) 418-420.
9. LUCHNIK, N.V., A.V. SEVANKAEV: Mut.Res. 36 (1976) 363-378.
10. D'AMBROSIO, St.M., R.B. SETLOW: Proc.Natl.Acad.Sci.USA 73 (1976) 2396-2400.
11. TUSCHL, H., H. ALTMANN, R. KOVAC, A. TOPALOGLOU, D. EGG, R. GÜNTHER: Rad.Res. 81 (1980) 1-9.

12. POHL-RÜLING, J., P. FISCHER: Rad.Res. 80 (1979) 61-81.
13. KURCZ-CSIKY, I., L.B. SZTANYIK, I. PAVLICSEK: ÖSRAD
1980, p. 159-168.
14. SCUDIERO, D., A. HENDERSON, A. NORIN, B. STRAUSS: Mut.
Res. 29 (1975) 473-488.
15. ALTMANN, H., I. DOLEJS, A. TOPALOGLOU, A. SOOKI-TOTH:
stud.biophys. 76 (1979) 195-203.

DNA-REPARATUR UND CHROMATIN (Proc. Symposium Saalfelden 1981).
Hrsg.: H. Altmann und G. Klein. Seibersdorf 1982, 47.

SOME NEW RESULTS CONCERNING DNA-REPAIR IN
EUKARYOTIC CELLS

I. VINCZE

Országos Közegészségügyi Intézet, Budapest, Ungarn

Manuskript nicht rechtzeitig eingelangt.

DNA-REPARATUR UND CHROMATIN (Proc. Symposium Saalfelden 1981).
Hrsg.: H. Altmann und G. Klein. Seibersdorf 1982, 49-54.

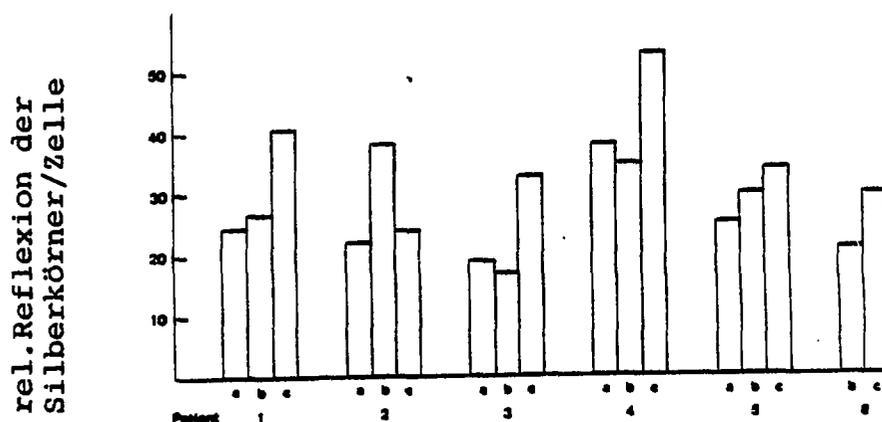
UDS IN LYMPHOZYTEN BERUFLICH STRAHLENEXPONIERTER PERSONEN

H. TUSCHL und R. KOVAC

Institut für Biologie, Forschungszentrum Seibersdorf,
A-2444 Seibersdorf

Vor einigen Jahren begannen wir in Zusammenarbeit mit der Strahlentherapeutischen Klinik der Universität Wien (Vorstand Prof.Dr. K.-H. Kärcher) Untersuchungen über die Wirkung verschiedener Formen der Krebstherapie auf die DNA-Reparatur. Krebspatienten, die einer Ganzkörperbestrahlung von 1 bzw. 10 rad/d am Gammatron unterzogen wurden, wurde vor Beginn der Bestrahlungen, nach 5 bzw. 10 Bestrahlungen Blut abgenommen, die Lymphozyten isoliert und die UV-induzierte unprogrammierte DNA-Synthese (= UDS) autoradiographisch bestimmt. Wie Abbildung 1 zeigt, stieg die UDS im Verlaufe der Bestrahlungen bei allen Patienten mit einer Tagesdosis von 10 rad deutlich an.

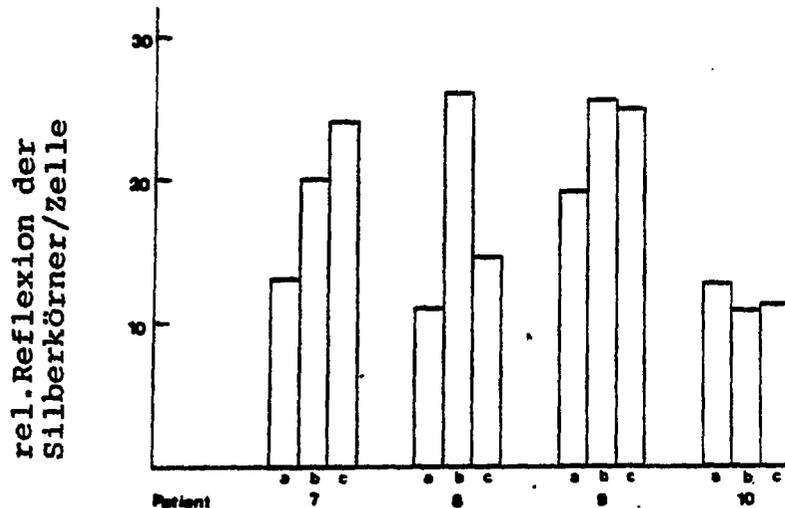
Abbildung 1: UDS in Lymphozyten von Tumorpatienten.
a = UDS vor Beginn der Bestrahlungen,
b = UDS nach 5 Bestrahlungen von je 10 rad,
c = UDS nach 10 Bestrahlungen von je 10 rad.



Bei jener Gruppe, die nur 1 rad/d erhielt, war dieser Anstieg an 3 von 4 untersuchten Probanden zu beobachten (Abb. 2).

Abbildung 2: UDS in Lymphozyten von Tumorpatienten.

a = UDS vor Beginn der Bestrahlungen,
b = UDS nach 5 Bestrahlungen von je 1 rad,
c = UDS nach 10 Bestrahlungen von je 1 rad.



Da alle Patienten ausschließlich Radiotherapie und keine weitere medikamentöse Behandlung erhielten, schien die beobachtete Veränderung der DNA-Reparaturkapazität durch die chronische Bestrahlung ausgelöst zu sein.

Ergebnisse, die an Tumorpatienten ermittelt wurden, lassen sich aber nicht uneingeschränkt auf den gesunden Organismus übertragen. Wir waren daher interessiert, die Wirkung niedriger, chronisch applizierter Strahlendosen auch an gesunden Personen zu überprüfen. Die für unsere Versuchsanordnung geeigneten Testpersonen waren Angehörige des Personals des sogenannten "Gasteiner Heilstollens" (Böckstein, Badgastein), einer ursprünglichen Goldmine. Der Stollen stellt einen Inhalationsraum mit einer Lufttemperatur von 41°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit um 95% dar. Er wird heute für therapeutische Zwecke genutzt, im speziellen zur Behandlung rheumatischer Leiden, Gefäßkrankheiten und endokriner Störungen. Die Radio-

aktivität des Stollens resultiert aus dem ^{222}Rn und seinen Zerfallsprodukten und erreicht 3 n Ci/l Luft. Angestellte, die den Stollen inspizieren, Zugführer, die Patienten in den Stollen fahren, und begleitendes medizinisches Personal halten sich 2-4 h pro Tag in diesem auf. Ihre mittlere Blutdosis, berechnet aus der α -Strahlung und der externen γ -Strahlung, beträgt zwischen 400 und 800 mrad pro Halbjahr (1). Wir bestimmten die UV-induzierte UDS in den Lymphozyten exponierter Personen und Kontrollpersonen aus Wien und Innsbruck. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, lag in den Lymphozyten strahlenexponierter Personen die UDS hoch signifikant über jener der Kontrollen.

Tabelle 1: Unprogrammierte DNA Synthese in Lymphozyten von exponierten Personen und Kontrollen: ^3H -Thymidineinbau.

Exponierte Personen				Kontrollen			
No.	Alter	Beruf	rel. Reflexion der Silberkörner/Zelle	No.	Alter	Beruf	rel. Reflexion der Silberkörner/Zelle
1	♂, 57	Inspektor	32,0	1	♂, 49	wiss. Ang.	25,3
2	♀, 52	Inspektor	42,9	2	♂, 50	Arzt	18,3
3	♂, 45	Zugführer	44,9	3	♀, 31	techn. Assist.	23,6
4	♂, 37	Zugführer	35,2	4	♂, 56	Arbeiter	21,4
5	♂, 76	Inspektor	28,5	5	♂, 52	Arbeiter	21,0
6	♀, 62	Arzt	34,9	6	♂, 55	Fabriksang.	21,0
7	♂, 36	Zugführer	39,5				
8	♂, 46	Zugführer	31,1				
9	♂, 35	Zugführer	46,1				
10	♂, 55	Arzt	30,3				
11	♂, 53	Arzt	28,5				
Mittelwert = 35,8 Standardabweichung = \pm 6,5				Mittelwert = 21,8 Standardabweichung = \pm 2,4			
				t-Test: Irrtumswahrscheinlichkeit < 0,1%			

Auch der prozentuelle Anteil jener Zellen, die eine DNA-Reparatur durchführten, war bei den Stollenangestellten signifikant höher als bei den Kontrollen (Tabelle 2).

Tabelle 2: UDS in exponierten Personen und Kontrollen: Prozent markierter Zellen.

No.	Exponierte Personen	No.	Kontrollen
1	81,5	1	60,7
2	82,0	2	54,3
3	89,0	3	57,7
4	82,5	4	56,3
5	81,3	5	58,5
6	74,7	6	56,3
7	70,6		
8	76,3		
9	75,0		
10	60,0		
Mittelwert = 76,5 Standardabweichung = \pm 8,0		Mittelwert = 57,3 Standardabweichung = \pm 2,2	
t-Test: Irrtumswahrscheinlichkeit < 0,1%			

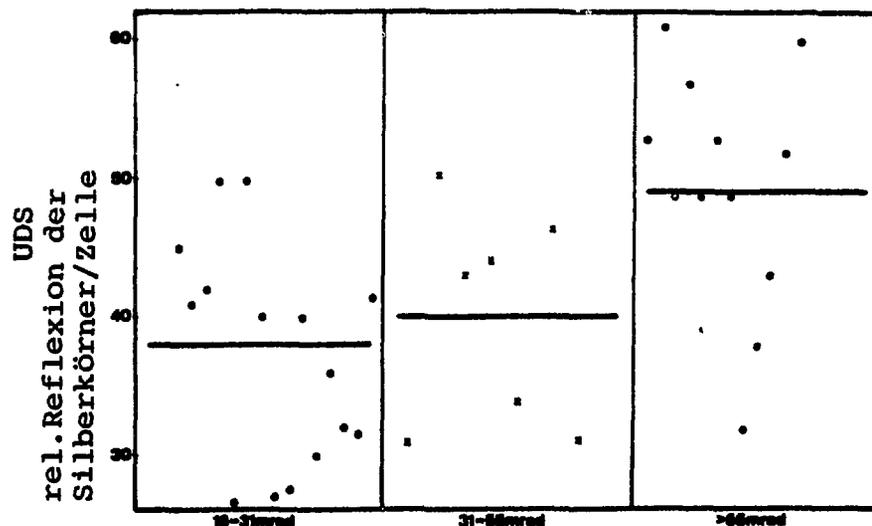
Da verschiedene Entwicklungsstadien von Lymphozyten unterschiedliche Reparaturkapazität aufweisen, könnte der Anstieg der UDS auf eine Verschiebung innerhalb der Lymphozytenpopulation zurückzuführen sein. Es ist bekannt, daß juvenile Zellen höhere Reparaturraten aufweisen als voll ausdifferenzierte Zellen, und Endstadien von Zellen, z.B. Granulozyten, keinerlei funktionelle Reparatursysteme besitzen (2) oder die UDS nur in sehr vermindertem Ausmaß durchführen. Den höchsten Reparaturreinbau findet man in Blastzellen (3) - aber die Autoradiogramme zeigten in den vorliegenden Untersuchungen um 0,3% Lymphoblasten, sowohl in Rn-exponierten als auch Kontrollpersonen. Eine Verschiebung zugunsten juveniler Zellen erscheint auch deshalb nicht wahrscheinlich, weil die semikonservative DNA-Synthese in den Lymphozyten Rn-exponierter Personen vermindert war (4).

Der Anstieg der UV-induzierten Reparaturreplikation nach wiederholten Rn-Expositionen könnte auch durch eine echte Induktion der de novo Synthese von Enzymen bedingt sein. Eine solche In-

duktion ist im Zusammenhang mit SOS-Repair von Mikroorganismen bekannt (5). Sie wurde auch in Zusammenhang mit dem lebensverlängerndem Effekt ionisierender Strahlung bei Insekten (7) und einer Kombination von UV- und Röntgenbestrahlung menschlicher Haut diskutiert (8). Von besonderem Interesse scheint es, daß niedere Dosen ionisierender Strahlung die UV-Reparaturkapazität beeinflussen können. Aber zumindest bei Bakterien konnte man feststellen, daß die Induzierbarkeit der Strahlenresistenz ein allgemeines Phänomen ist. So kann Röntgenbestrahlung die Resistenz der Zellen gegenüber einer nachfolgenden neuerlichen Röntgenbestrahlung als auch einer UV-Strahlung erhöhen (9). Neben ionisierender Strahlung können auch UV und Naphthyloxyessigsäure als induzierende Agentien wirken (10).

Der Heilstollen von Bockstein zeichnet sich neben seiner hohen Rn-Aktivität aber auch durch hohe Temperatur und Luftfeuchtigkeit aus. Untersuchungen an Saunabesuchern (11) erbrachten zwar ein anderes Bild der UDS nach Hyperthermie, trotzdem läßt sich eine mögliche Beeinflussung des DNA-Metabolismus durch das Stollenklima nicht ausschließen. In einer neuen Studie untersuchten wir daher Mitarbeiter des ÖFZS, die verschiedenen Strahlenexpositionen ausgesetzt sind (Abb. 3).

Abbildung 3



Trifft man eine willkürliche Gruppierung in Expositionen von 16-31, 31-55 und ≥ 55 mrad/Quartal, so findet sich zwischen der höchst exponierten Gruppe und den beiden niederen, sowie beiden hoch exponierten und der niedrigsten Gruppe, ein statistisch signifikanter Unterschied in der UV-induzierten UDS.

Untersuchungen über die Anzahl von Chromosomenaberrationen (12) an Gasteiner Stollenarbeitern zeigen, daß diese deutlich unter den für die Gasteiner Bevölkerung ermittelten Werten liegen. In eigenen Untersuchungen soll nun an Hand von Schwesterchromatidaustauschen ein weiterer Hinweis erbracht werden, ob es sich bei der beobachteten Erhöhung des Thymidineinbaus tatsächlich um vermehrte DNA-Reparatur handelt.

LITERATUR

1. POHL, E., J. POHL-RÜLING: Health Phys. 32 (1977) 552-555.
2. FRY-WETTSTEIN et al.: J.Lab.Clin.Med. 74 (1969) 109-118.
3. SPIEGLER, P., A. NORMAN: Radiat.Tes. 39 (1969) 400-412.
4. TUSCHL, H. et al.: Radiat.Res. 81 (1980) 1-9.
5. BRIDGES, B.A.: Mol.Gen.Genet. 151 (1977) 115-120.
6. SAMSON, L., J. CAIRNS: Nature (London) 267 (1977) 281-283.
7. BAXTER, K.C., H.A. BLAIR: Radiat.Res. 39 (1969) 345-360.
8. CALKINS, J.M., R.H. GREENLOW: Radiology 100 (1971) 389-395.
9. SMITH, K.C., K. MARTIGNONI: Photochem.Photobiol. 24 (1976) 515-523.
10. MARTIGNONI, K.D.: Int.J.Radiat.Biol. 33 (1978) 577-585.
11. TUSCHL, H. et al.: J.Molec.Med. 4 (1981) 307-315.
12. POHL-RÜLING, J., P. FISCHER: Radiat.Res. 80 (1979) 61-81.

DNA-REPARATUR UND CHROMATIN (Proc. Symposium Saalfelden 1981).
Hrsg.: H. Altmann und G. Klein. Seibersdorf 1982, 55-60.

ANGABEN ZUR WIRKUNG VON PFLANZENHORMON-ANALOGEN AUF
MENSCHLICHE ZELLEN

I. RACZ, J.M. BALO, J. LEIBINGER und L. MOLNAR
Simmelweis Medical School, Clinic of Dermatology,
Budapest

Bei dem Wiener Symposium "DNA-repair and late effects" 1973 berichteten Balo und Mitarbeiter (1) über einen Fall bullöser Dermatitis nach dem Kontakt mit dem Herbizid 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D). Die Hauterscheinungen bestanden aus intraepidermalen, akantholytischen Blasen, die histologisch von den Blasen in Pemphigus vulgaris kaum zu trennen waren (Abb. 1).



Abb. 1

Die Hautsymptome waren sehr hartnäckig, verschwanden erst 5 Wochen nach dem Kontakt mit dem chemischen Mittel und auch dann nur nach Steroidbehandlung. Der Ablauf der Krankheit sprach gegen eine kontaktallergische Pathogenese, nach Untersuchungen von Hautproben wurde diese jedoch nicht ausgeschlossen. Um den Mechanismus der Blasenbildung zu erklären, untersuchte Balo die Wirkung des 2,4-D auf die semikonservative DNA-Synthese und auf die DNA-Reparatur von Mausmilzzellen.

^3H -Thymidin-Einbau in die DNA wurde schon von einer 10^{-4}M Lösung des 2,4-D gehemmt und bei einer Konzentration von $5 \times 10^{-4}\text{M}$ war diese Hemmung noch stärker. Zur Bestimmung der DNA-Reparatur wurden sowohl Gamma- als auch UV-Strahlen verwendet. Beide Konzentrationen des 2,4-D bewirkten eine Hemmung beider Synthesarten. Die Wirkung eines verwandten Herbizids, 2,4,5-Trichlorphenoxy-Essigsäure auf die ^3H -Thymidin-Inkorporation in Tonsillenlymphozyten-DNA wurde auch untersucht. Hier bewirkte die niedrigere Konzentration anfangs eine Stimulierung der DNA-Synthese, wogegen die höhere Konzentration immer nur hemmte. Diese Erscheinung entspricht der Wirkung der selektiven Herbizide in der Pflanzenwelt. In ganz hohen Verdünnungen wirken sie als wachstumsstimulierende Auxin-Analoga, in höheren Konzentrationen dagegen hemmen sie den Metabolismus und führen zur Vernichtung der Pflanzen. Pflanzenhormonanaloga Herbizide wirken aber nicht nur auf Pflanzen, sondern auch auf Zellen von Säugetieren und sie können eventuell auch in der Blasenbildung der Menschenhaut eine Rolle spielen. Dermatitisen mit Blasenbildung nach dem Kontakt mit selektiven Herbiziden wurden bisher nur in kleiner Zahl beschrieben und die Autoren betrachteten sie als allergische Kontaktenzyme, obwohl der allergische Pathomechanismus objektiv nie bewiesen wurde. Die Diskrepanz zwischen dem sehr verbreiteten Gebrauch dieser Substanzen und zwischen der relativ seltenen bullösen Nebenwirkungen an der Haut wiesen auf die Rolle gewisser wahrscheinlich endogener disponierender Faktoren hin. Die Frage schien uns eine weitere Untersuchung wert zu sein.

Für diese Untersuchungen wählten wir als Modell die Hautkrankheit Pemphigus vulgaris aus zwei Gründen aus. Erstens sind die durch 2,4-D verursachten Blasen histologisch den Pemphigus-Blasen sehr ähnliche, zweitens berichteten Pels und Macht (3) schon 1931 über eine phytotoxische Eigenschaft des Pemphigus-serums. Während Kontrollsera die Keimung der Samen der Pflanze *Lupinus albus* stimulierten, verursachte das Serum von Pemphigus Kranken und auch der Blaseninhalt eine ausgesprochene Hemmung der Keime. Bisher haben wir die Untersuchungen in zwei Richtungen geführt:

1. Wir beobachteten die von der Dosis abhängende Wirkung eines auch in der Therapie als Psychostimulator gebrauchten Herbizid-Analogs, Meclophenoxat (2-Dimethylaminoäthylester der p-Chlorphenoxyessigsäure) auf die Hauterscheinungen in *Pemphigus vulgaris*.
2. Wir bestimmten die Tagesausscheidung der 5-Hydroxy-Indol-essigsäure im Harn von Gesunden und von *Pemphigus* Kranken. Diese Substanz ist als Endprodukt des Tryptophanabbaues wohl bekannt, ihre Analogie mit dem Pflanzengewebshormon Heteroauxin (Indolessigsäure) würde aber bisher kaum in Betracht gezogen. Die Bestimmung wurde im 24 Stunden gesammelten Harn spektrometrisch nach der Methode von Tracy und Mitarbeiter (4) durchgeführt.

ERGEBNISSE

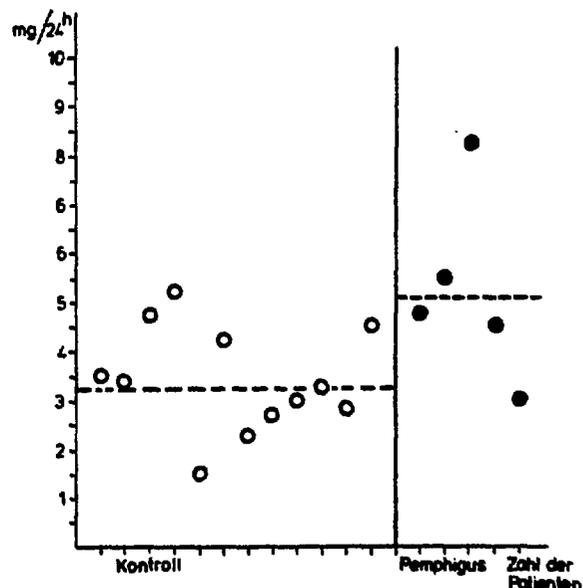
Mit Meclophenoxat wurden 7 an *Pemphigus vulgaris* leidende Patienten behandelt. Alle waren im aktiven Stadium mit starker Akantholyse, aber alle wurden schon früher mit Kortikosteroiden behandelt. Es waren also alle Rückfälle bei ungenügender Steroid-Aufenthaltssdosis. Die Therapie bestand aus täglich 3x100 mg Meclophenoxat per os in 6 Fällen und aus 3x200 mg in einem Fall. In 2 weiteren Fällen wurde die höhere Dosierung erst nach zweiwöchiger Behandlung mit 2x100 mg begonnen. Die Aufenthaltstherapie mit Prednisolon wurde bei den Patienten während der Behandlung nicht unterbrochen. Die Behandlung dauerte mindestens 3 Wochen und die Hauterscheinungen der Patienten wurden gründlich registriert (Auftreten neuer Blasen, Nikolsky-Phänomen, Epithelisierung der Erosionen, Abheilung der Blasen). Der Effekt war auffallend dosisabhängig. Aus den 6 Fällen, die täglich 300 mg Meclophenoxat erhielten, wiesen 4 eine ausgesprochene klinische Besserung auf. Neue Blasen sind nicht entstanden und die Erosionen zeigten eine schnelle Epithelisierung. Besonders auffällig war die schnelle Heilung der Mundschleimhautdefekte. Die Aufenthaltstherapie mit Prednisolon konnte jedoch nicht ausgelassen werden. Zwei Fälle blieben unverändert und deshalb wurde die Dosis nach 2 Wochen auf täglich 600 mg angehoben. Beide haben sich schon in 2 Tagen verschlechtert, viele neue

Blasen sind entstanden, die Akantholyse verstärkte sich und bei einem Patienten bildeten sich auch Fieberanfälle aus. Ein dritter Patient, bei dem die Behandlung von Anfang an mit 600 mg eingeführt wurde wies auch eine schnelle Verschlechterung auf. Meclophenoxat, ein Herbizidanalogue beeinflusst also die Epidermis der Pemphiguskranken, in kleineren Dosis stimuliert es die Epithelisation, d.h. die Keratinozyten, in dreifacher Dosis dagegen verursacht es Blasenbildung, Akantholyse. Dieser biphasische Effekt scheint mit der biphasischen Beeinflussung der DNA-Synthese durch Herbizide in Analogie zu sein.

Bei 12 gesunden Kontrollpersonen und bei 5 Pemphigus Kranken haben wir die 24-stündige 5-Hydroxy-Indolessigsäure-Ausscheidung im Harn bestimmt. Die Durchschnittswerte waren 3,37 beziehungsweise 5,01 mg pro Tag. Die Differenz ist statistisch, mit der Studentischen T-Probe, signifikant ($p = 0.0511$). In Pemphigus ist also die Ausscheidung der mit dem Heteroauxin der Pflanzenwelt analogen 5-Hydroxy-Indolessigsäure erhöht, obwohl sie nur in einem Fall die oberste Grenze (6,0 mg pro Tag) der Normalwerte übertraf (Abb. 2).

Abbildung 2

5-Hydroxy-Indolessigsäure-Ausscheidung von Kontrollpersonen und von Pemphigus-Kranken.



DISKUSSION

Selektive Herbizide sind Analoge des Pflanzenhormons Indol-essigsäure (Heteroauxin) und sie wirken biphasisch: in sehr niedrigen Konzentrationen stimulieren sie das Wachstum der Pflanzen, in hohen Konzentrationen wirken sie hemmend. Ihre Wirkung wird über die Beeinflussung der DNA-Synthese ausgeübt. Eine ähnliche biphasische Wirkung konnte auch auf die DNA Synthese von Maus- und Menschenlymphozyten bewiesen werden. Herbizide der Phenoxyessigsäure-Gruppe können Pemphigus ähnliche Veränderungen an Keratinozyten der Menschenhaut verursachen. Nach unseren Erfahrungen kann ein Phenoxyessigsäure-Derivat in Pemphigua auch biphasisch wirken: in niedriger Dosis stimuliert es die Epithelisation, d.h. die Keratinozyten, in hoher Dosis fördert es die Blasenbildung. In Pemphigus ist die Ausscheidung des Analoges des natürlichen Pflanzenhormons Indolelessigsäure erhöht. Wir wissen wohl, daß die Bildung der 5-Hydroxy-Indol-essigsäure im Organismus von sehr vielen Faktoren abhängig ist (Tryptophangehalt der Nahrung, Bakterienflora des Darmes, Absorptionsdifferenzen usw.) aber wir wissen nicht, welcher Faktor die erhöhte Ausscheidung verursacht. Es ist jedoch interessant, daß erhöhte Indolelessigsäure-Ausscheidung bisher bei anderen mit Blasenbildung einhergehenden Hautkrankheiten (Porphyria cutanea tarda, Arzneimittlexantheme) beschrieben wurde (Ippen und Haeling (2)). Indolelessigsäure und Blasenbildung d.h. Keratinozyten scheinen also in irgendeiner Verbindung zu sein. Die Frage benötigt eine sehr ausgebreitete und vielseitige weitere Forschungsarbeit, die bisherigen Ergebnisse ermöglichen nur die Erstellung einer Hypothese: Pflanzenhormone können auch auf Keratinozyten des Menschen wirken, d.h. Keratinozyten besitzen auch Pflanzenhormon-Rezeptoren.

LITERATUR

1. BALO-BANGA, J.M., F. ANTONI, H. ALTMANN, I. VINCZE and F. KOCISIS: Effect of 2,4-D on semiconservative and DNA-repair synthesis. IN: DNA-repair and late effects. Ed. H. Altmann. Rötzer-Druck, Eisenstadt 1974, 183-190.
2. IPPEN, K., G.V. HAELING: Ausscheidung von 5-Hydroxyindolen mit dem Urin. Arch.klin.exp.Derm. 214 (1962) 513-516.

3. PELS, I.R., D.I. MACHT: Phytopharmacology of pemphigus and other dermatoses. Arch.of Derm. 23 (1931) 601-613.
4. TRACY, R.F., L.E. WOLD, J.D. JONES and M.F. BURRITT: Colorimetric vs liquid-chromatographic determination of urinary 5-hydroxyindole-3-acetic acid. Clin.Chem. 27 (1981). 160-162.

DNA-REPARATUR UND CHROMATIN (Proc. Symposium Saalfelden 1981).
Hrsg.: H. Altmann und G. Klein. Seibersdorf 1982, 61-72.

UV-LIGHT INDUCED DNA DAMAGE AND REPAIR IN PHOTO- DERMATOSES

Irene HORKAY*, L. VARGA**, Judit KRAJCZAR*

* Department of Dermatology, University Medical
School, 4012 Debrecen

** "Frederic-Joliot Curie" National Research Institute
for Radiobiology and Radiohygiene, Budapest 22

In this lecture some medical, first of all dermatological aspects of UV-light induced DNA repair will be discussed. In the surrounding of our Dermatological Department in Debrecen sunlight is of great intensity and rather rich in UV-radiation. That is why a lot of skin disorders provoked by UV-light occur in our patient material compared with other parts of Hungary. In addition, the number of photodermatoses is even increasing.

At the present state of knowledge. the pathomechanism of these diseases is not clarified in each case, for example in polymorphical light eruption (PLE). It is a clinical entity characterized by pleomorphic skin changes (Fig. 1, 2) confined first of all to sun-exposed areas, provoked by sunburn range and considered to be a manifestation of photoallergy, mostly of delayed type. However, no endogenous or exogenous photosensitizer or antigen responsible for initiating the photosensitive reaction could be detected so far. Further on there are no data whether DNA photoproducts brought about by UV-light can function as antigen in PLE. It is an interesting question because there are some literary data concerning DNA photoproducts functioning as antigen in other diseases (e.g. in Xeroderma pigmentosum). In addition the UV-induced repair processes have not been studied in PLE for the time being.

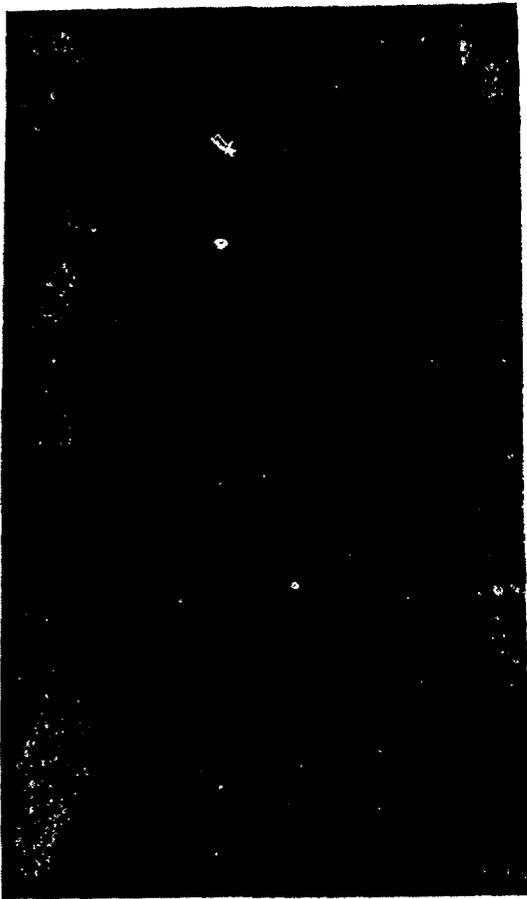


Figure 1

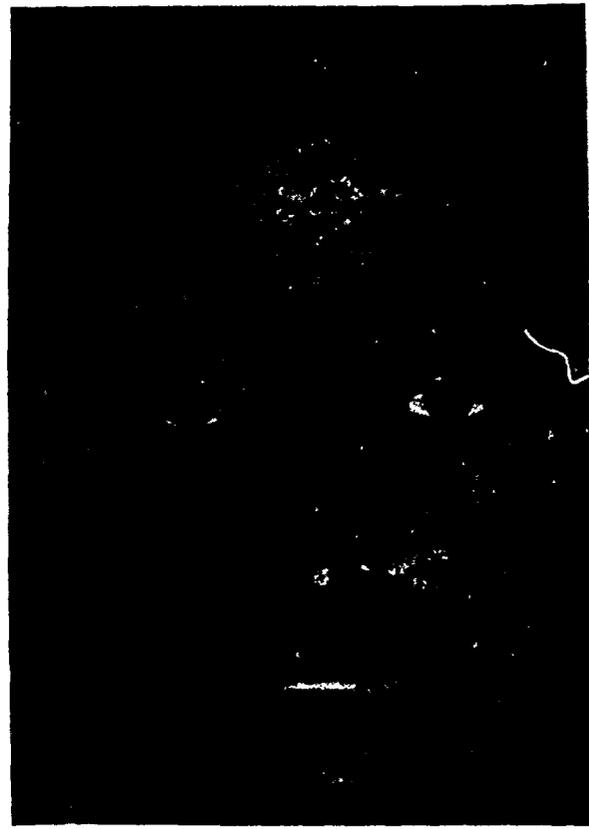


Figure 2

That is why the aim of our work was to study the UV-light induced DNA damage and its repair in PLE with a view to whether they can give a basis for producing photoantigen or their possible defect can explain the extreme photosensitivity characteristic of this disease. The results were compared to those obtained in other lightsensitive dermatoses: cutaneous porphyrias (Fig. 3) caused by a hereditary or acquired enzymatic disturbance in the porphyrin-metabolism and provoked phototoxically by long-wave UV-light; then discoid Lupus erythematosus (DLE) (Fig. 4) of autoimmune pathogenesis and finally Xeroderma pigmentosum (XP) (Fig. 5. 6), characterized by a congenital defect in the DNA repair processes.

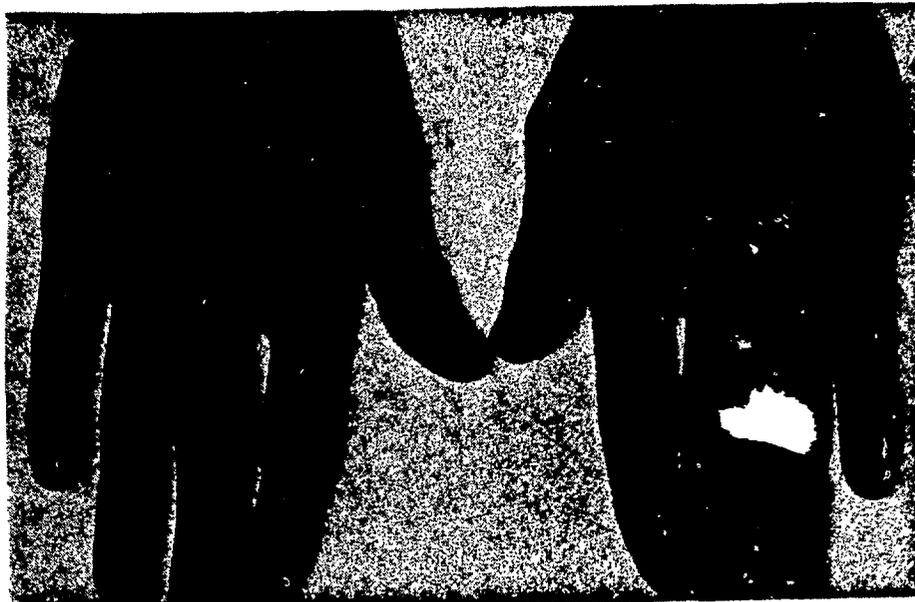


Figure 3



Figure 4



Figure 5



Figure 6

Our study was performed both in the skin and the peripheral lymphocytes of the patients. As for the skin, persons investigated were tested for minimal dose (MED)-reaction on the symptom-free skin of the upper back of the trunk by means of a 250 watt germicidal lamp. Then in all subjects one skin area was irradiated with a single dose of 3xMED suitable for inducing changes in the DNA synthesis, and a second skin area with 5xMED daily for four consecutive days. This procedure is known as the repeated phototest for reproduction of the skin symptoms in PLE. In Fig. 7 and 8 the skin lesions and the positive photoreaction similar to the original eruptions are shown.

Punch biopsy specimens were secured as follows: from the skin exposed to 3xMED 2 and 48 hours after UV-irradiation, from the repeated phototest sites on the fifth day. In addition biopsies were taken from the unirradiated control sites as well as from the florid skin eruptions of the patients. All biopsy specimens were prepared for autoradiography using

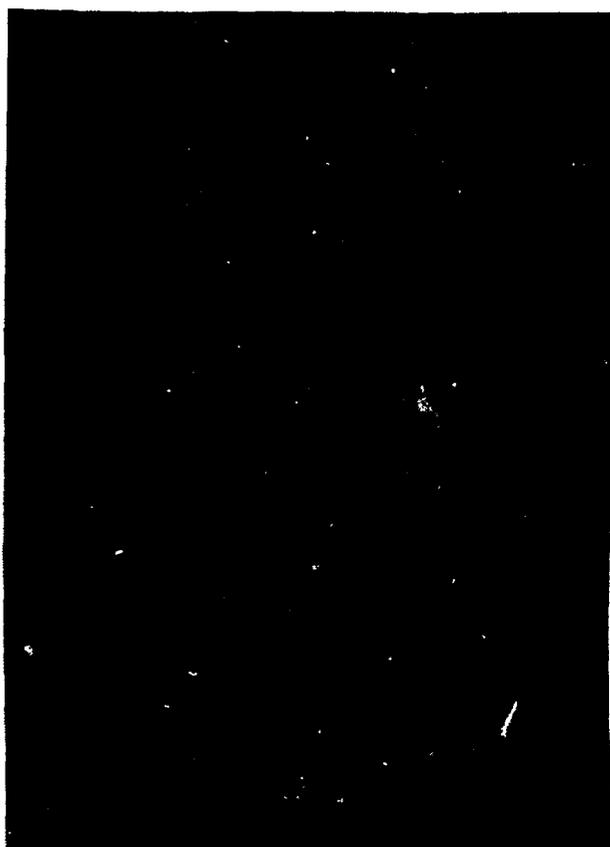


Figure 7



Figure 8



Figure 9

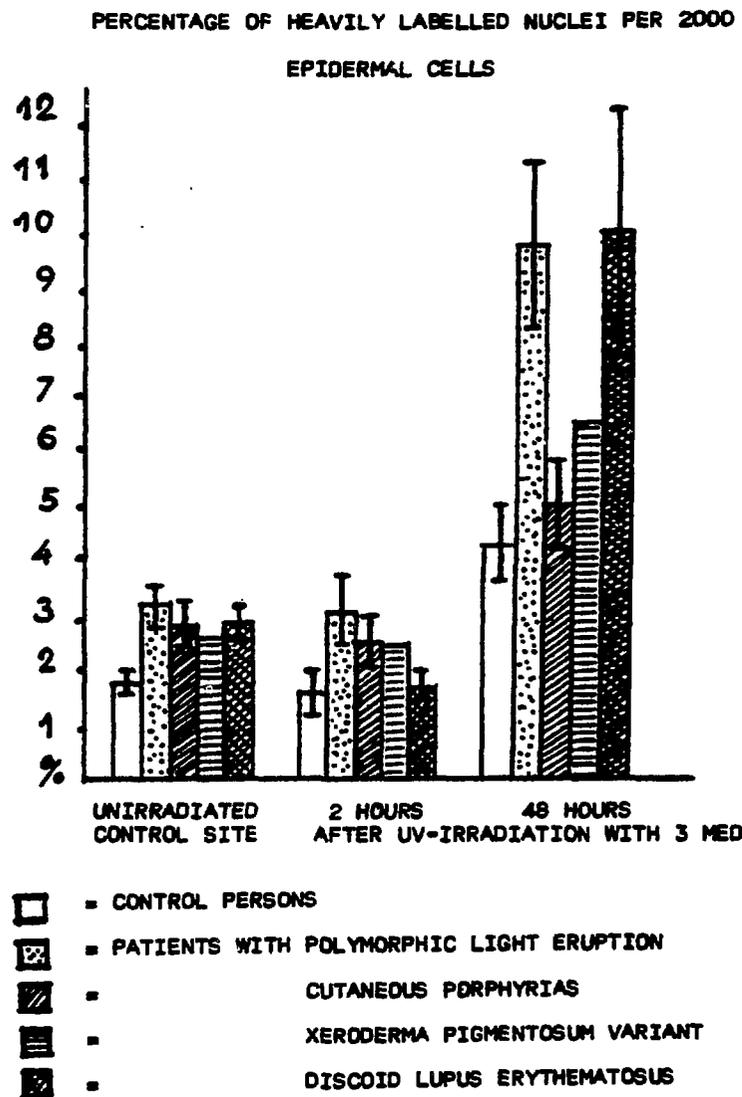


Figure 10

tritiated thymidine. Two types of nuclear labelling were observed: heavily labelling (more than 15 grains/cell) representing basal and epibasal cells in semiconservative DNA-synthesis (Fig. 9) and sparse labelling (3-15 grains/cell) representing cells of the basal, malpighian and granular layers in excision repair DNA synthesis (Fig. 10).

As regards the semiconservative DNA synthesis (Fig. 11), the percentage of heavily labelled nuclei in the epidermal cells in the unirradiated and symptom-free skin of the patients and controls did not differ significantly, its value ranged from 1.74-4.75 in agreement with the literary data.

Figure 11



In biopsy specimens taken from the skin irradiated with 3xMED, 2 hours after UV-irradiation a slight depression in the number of S-phase cells could be observed in patients and controls. 48 hours after the irradiation a significant increase occurred in all four groups tested. it was especially remarkable in the skin obtained from PLE and DLE cases whereas in porphyria it was of far less degree. The number of the heavily labelled epidermal cells in the clinical eruptions was significantly higher than in the control sites in PLE and DLE cases again, whereas in porphyria the difference was statistically insignificant (Fig. 12).

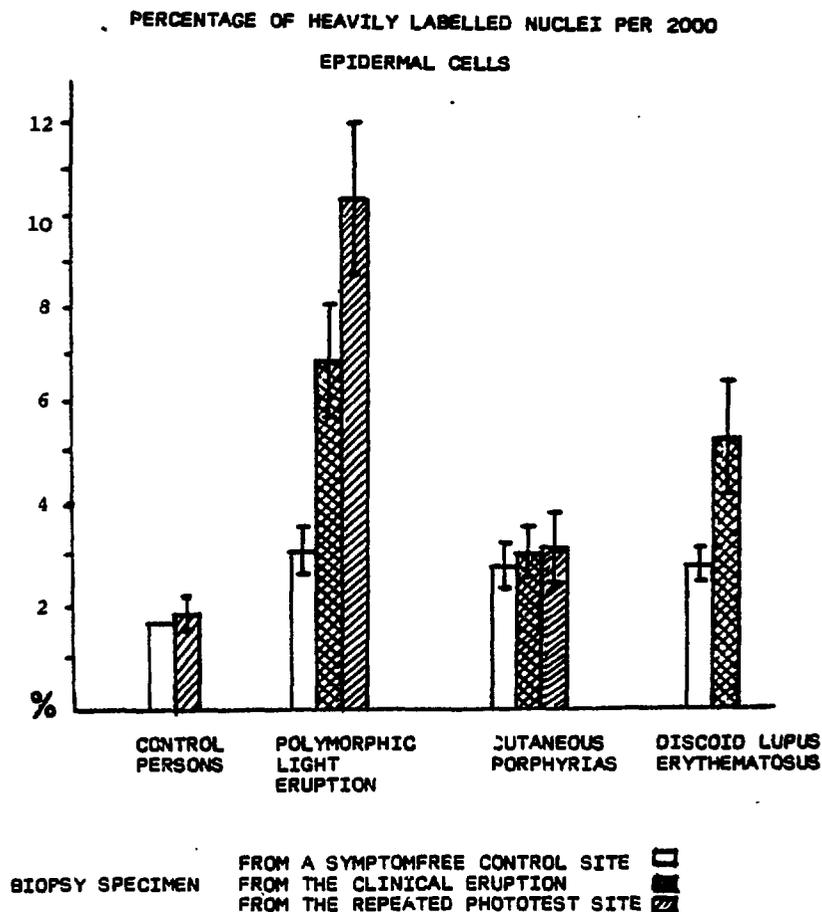


Figure 12

Finally, on the site of the repeated phototest where the original skin symptoms of PLE patients were reproduced, the percentage of the cells in S-phase was significantly higher in PLE cases than in the unirradiated control site.

On the other hand, in porphyria no significant difference could be found.

Our further findings concern the excision repair DNA synthesis. This begins immediately after UV-irradiation and appears to be almost complete after several hours. The average grain-count/cell, that is the intensity of repair synthesis measured two hours after UV-irradiation with 3xMED in PLE, was similar to that of the controls whereas it was somewhat lower in porphyric and DLE cases and especially in XP variants (Fig. 13).

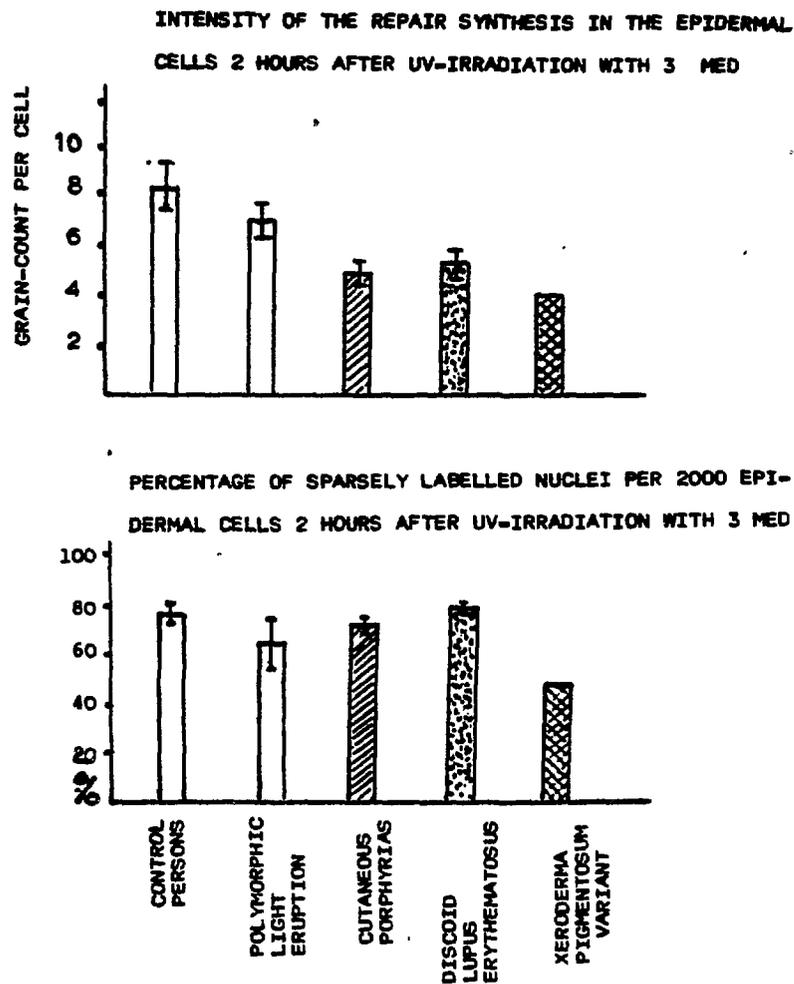


Figure 13

The average percentage of the repairing cells was similar to the controls in each photosensitive disease studied. Repair incorporation could be detected in 70-80% of the cells. In XP cases somewhat low repair capacity was observed nevertheless

this case seemed to be variant type of the disease according to the history and the clinical picture. To determine its complementation group unfortunately there was no possibility. 48 hours after UV-irradiation no tritiated thymidine incorporation indicating repair synthesis could be detected in the biopsy specimens of any group tested. In addition no repair activity could be observed either in the specimens obtained from the repeated phototest sites 24 hours later or in the florid skin eruptions.

As for the peripheral lymphocytes the repair incorporation of the cells was measured by liquid scintillation technique and autoradiography. One part of these experiments was carried out in Seibersdorf. That is why I do not want to describe this method in details.

For UVC and UVB irradiation of the cells we used interference filters. The repair incorporation was expressed with the ratio between dpm in the irradiated and the non-irradiated lymphocyte cultures. In the autoradiograms (Fig. 14) the intensity of the repair incorporation was expressed in grain-count/cell.

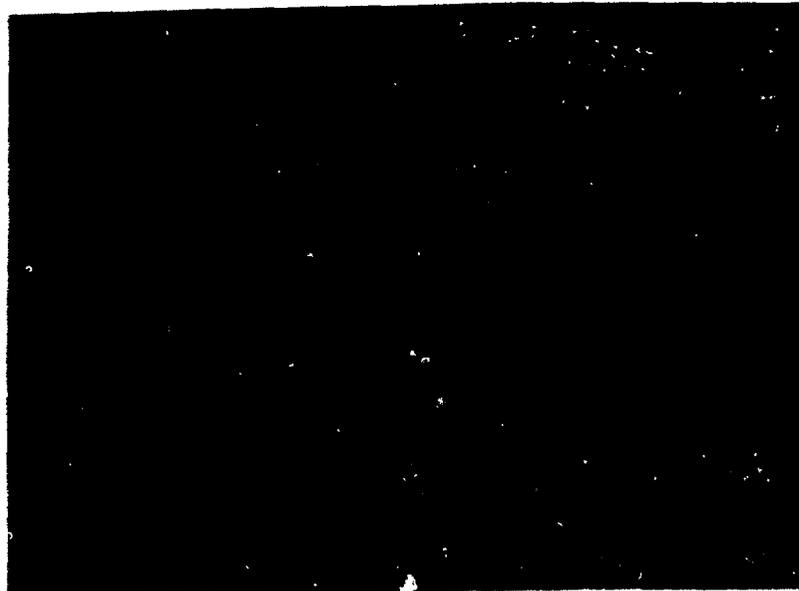


Figure 14

The uptake of tritiated thymidine into the lymphocytes increased parallel with the UV-dose in each group tested but the curve obtained in PLE was much flatter than that of the controls

and other light-sensitive skin disorders (Fig. 15).

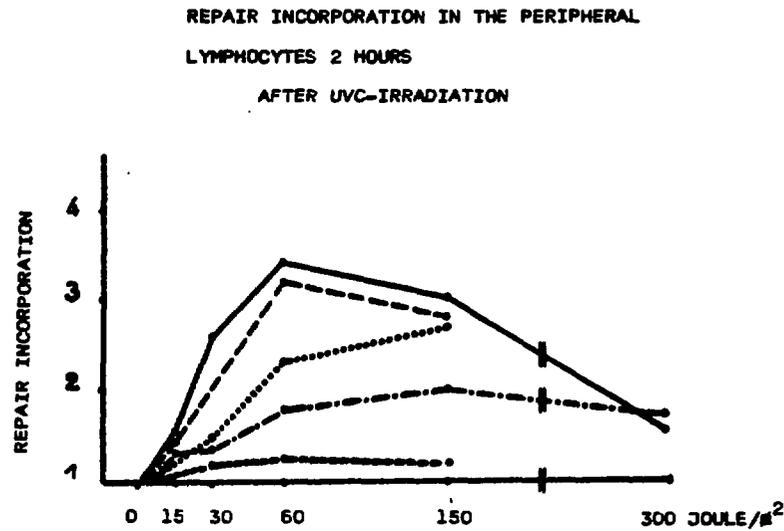
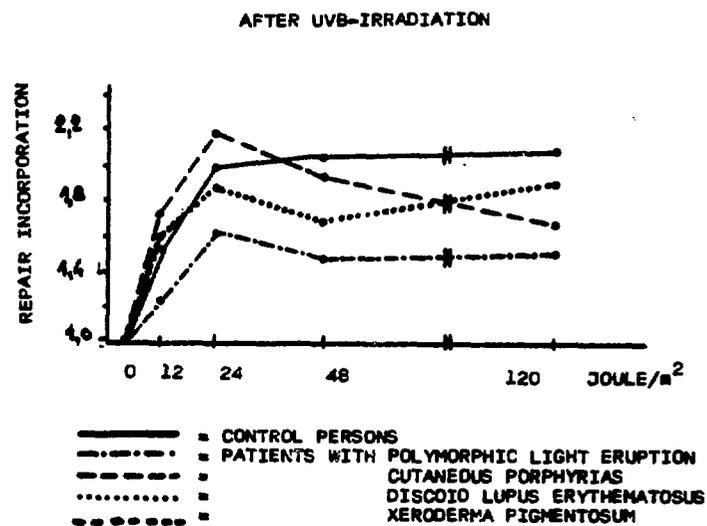


Figure 15



It was interesting that the average incorporation was significantly lower both in the active and symptom-free stages of the disease both after UVC and UVB radiation. Further on - (Fig. 16) - the distribution of the maximal individual repair incorporation displayed a considerable shift in PLE. It means that in the lymphocytes of the majority of the patients a more or less reduced repair incorporation could be detected even if these experiments were performed for years.

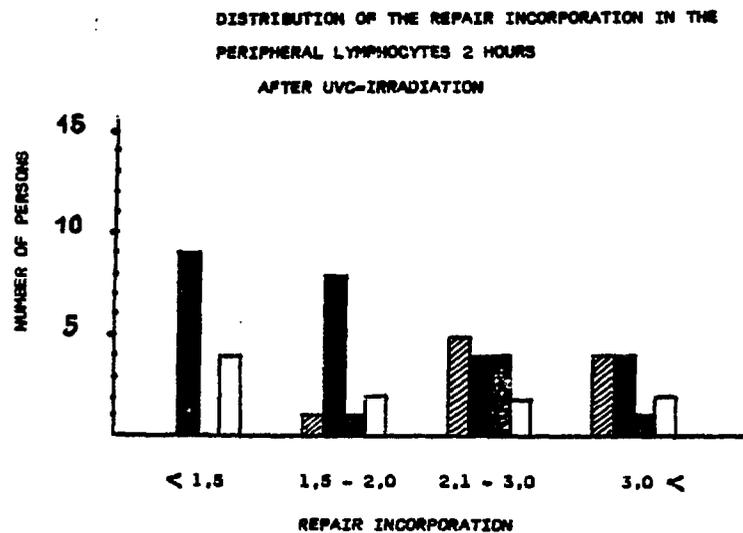
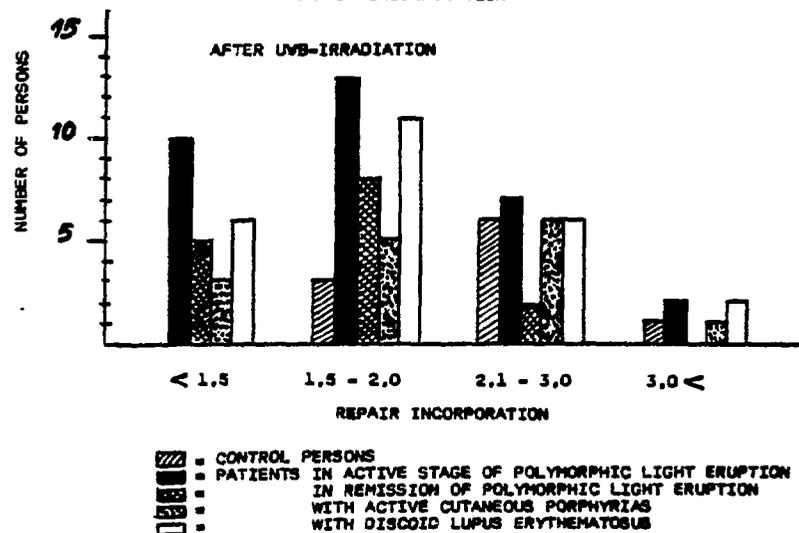


Figure 16



At the same time the degree of the UV-light induced damage of the cells measured with trypan-bleu method did not differ significantly from that of the controls. In the porphyric cases the repair incorporation was similar to the controls. No significant difference could be measured in DLE although in some cases the thymidine uptake was somewhat lower than in the controls. In agreement with the literary data there was an extreme low repair activity in the lymphocytes of our XP patient.

As for the autoradiographic study, the intensity of the repair synthesis was also considerably lower in the PLE lymphocytes whereas in porphyric and DLE it did not differ from the controls.

Summing up our results the following can be suggested: As in PLE, changes after UV-irradiation both in the semiconservative and repair DNA synthesis of the epidermal cells occur in a normal way, the possibility that the original cause of photosensitivity is a defect in the DNA repair processes can be excluded. Presumably the photo-dimers do not exist permanently in the DNA molecules of the epidermal cells so they cannot serve as a basis for initiating an immunological response or - later on - for carcinogenic transformation as it can be usually seen in XP. The so-called minor photoproducts or other metabolites quite independent of DNA may come up as antigens developed in the epidermis.

Our comparative study indicates that in the skin eruptions of the light-sensitive skin diseases there are some differences in the function of systems controlling the renewal of the genetic material.

Further on our results indicate that the peripheral lymphocytes derived from PLE patients display a more or less reduced repair capacity which cannot be explained by UV-light induced damage of the cells. It is independent of the clinical stage of the disease suggesting a constant feature of the cells presumably determined generally. Since we do not know the exact distribution of the cells in the cultures it cannot be decided whether this reduced repair capacity belongs to the whole lymphocyte population or to certain fractions only. Presumably these lymphocytes may serve an antigen stimulus to initiate an immune response of delayed type.

Further investigations are required to solve these problems. One of our plans is to study changes not only in the repair but in the semiconservative DNA synthesis, first of all the signs of activation in the lymphocytes parallel with the activity of the skin symptoms. We also plan to detect possible reasons of the increased semiconservative DNA replication in the florid skin symptoms of PLE.

DNA-REPARATUR UND CHROMATIN (Proc. Symposium Saalfelden 1981).
Hrsg.: H. Altmann und G. Klein. Seibersdorf 1982, 73-81.

PHAGOCYTTIC FUNCTIONS OF PMN GRANULOCYTES IN DIFFERENT
SKIN DISEASES OF IMMUNO-ALLERGOLOGICAL ORIGIN

L. MOLNAR, J. LEIBINGER, J.M. BALO-BANGA, I. RACZ
National Institute of Dermatology and Venerology of
Hungary, Budapest

The studies on cellular immune response gained much interest in the recent years. Our team is engaged in research on the phagocytosis of granulocytes since 1976. In 1978 we reported on the immune complex phagocytosis of polymorphonuclear granulocytes (4). The new method which we published for separating these cells was a developed version of Bøyum's (1) centrifugation technique. The routine measurement of phagocytic function in a high number of clinical cases was presented, however, by the relatively time consuming technique. Since Bøyum's basic studies, the density gradient separation of granulocytes from other blood constituents was introduced in many laboratories. Similarly, it is widely used the dextrane isolation of granulocytes after gradient separation of total white blood cell fraction.

The first aim of these studies was to compare phagocyte indices obtained after our two-step separation technique with those measured in cells after dextrane sedimentation (5). Dextrane sedimentation resulted in the same samples in lower phagocyte values than two-step centrifugation method (Fig. 1). This indicated that dextrane sedimentation deteriorated the functions of granulocytes and, therefore, showed that two-step centrifugation method was preferable. The latter is time-consuming though. The second aim of this work was to elaborate a simple well reproducible method for separation of granulocytes in sufficient quality and quantity.

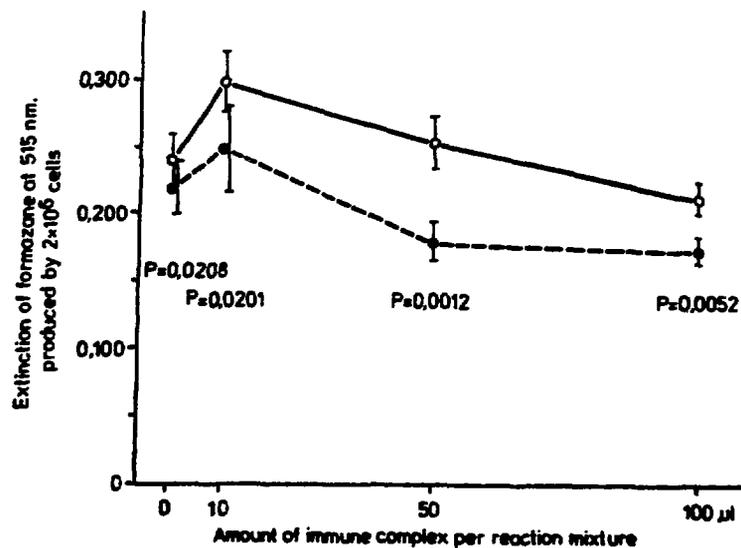


Figure 1: ○—○ two-step centrifugation method
 ○---○ dextrane sedimentation technique
 bars indicate S.E.M.; p values refer to differences between means of at least three independent experiments.

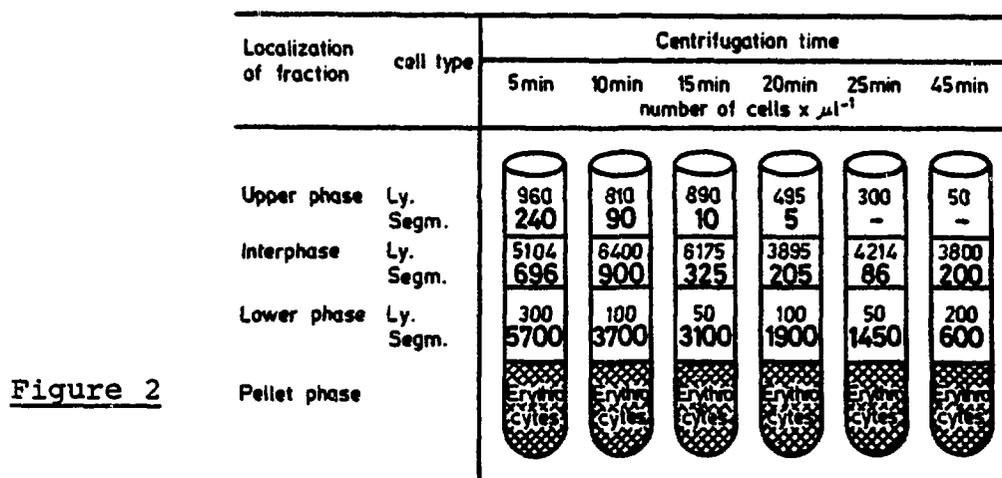
The third aim was to determine routinely in relatively high numbers of patients immune-complex and particle phagocytosis in different dermato-immunological diseases. Our method enabled to obtain within 10 minutes after venipuncture viable granulocytes in high numbers and of good quality.

MATERIALS AND METHODS

Tests were performed on the in-patients of the Department of Dermatology, Budapest. Venous blood was drawn and clotting prevented with 10 mg of heparin substance. Samples were diluted 1:1 with medium TC 199. All procedures were performed within 5 minutes after taking blood.

a. Cell separation:

Three ml of diluted blood were overlaid on 3 ml samples of density solution and centrifuged at 4°C 5-45 minutes at 400 xg. After various length of time the interphase containing lymphocytes was removed and the material between this and the erythrocyte mass was collected and washed twice (Fig. 2) followed by cell counting with a Picoscale (Medicor, Hungary) type counter. Viability was checked by trypan blue exclusion test.



b. Cell separating medium:

21.6 g of Ficoll (Pharmacia, Sweden) was dissolved in 250 ml of distilled water. Then 58.2 ml of 60% Uromiro (Bracco, Italy) was given and distilled water until the final volume of 340 ml was reached. The solution had a specific gravity of 1.0794 g/ml at 25°C.

c. Determination of phagocytic function:

The detailed description of our method was published in 1978 (4). Briefly, washed PMN cellular suspension of known cell-count was incubated with 0.2% NBT, autologous inactivated serum and immune complex or *Candida albicans* suspension at 37°C for 30 minutes. The reaction was stopped by 0.5 mol/l of HCl and after centrifugation for 15 minutes at 1500 xg the formed formazane was dissolved with hot pyridine for 15 minutes. The water-clear supernatant was measured against pyridine blank at 515 nm in a Specol 20 type Spectrophotometer (Zeiss, GDR). The colour intensity was linearly proportional, with formazane amount (1, 6) which was the measure of phagocytosis.

d. Preparation of immune complex and of *Candida albicans* suspension:

Soluble immune complex was obtained after incubation of DNA with high titre ANF positive sera according to Pinkus (7). Immune complex was removed by centrifugation and

stored after liophylisation at -20°C . *Candida albicans* cell suspension was prepared by the Mycology Laboratory of our Institute.

24 h cultures were liophylised after exact adjustment of cell counts. This enabled to use standard preparations throughout all experiments.

e. The following groups of patients have been involved in these studies:

1. Systemic Lupus erythematosus (SLE, 10 patients).
2. Mixed connective tissue disease (MCTD, 8 patients).
3. Oral pemphigus (7 patients).
4. Mercury Contact Sensitivity proven by patch tests (10 patients).

RESULTS

1. Centrifugation method for separation of granulocytes:

Samples were collected at different times from different phages as shown in Fig. 2. Cells were sedimented by the modified technique of Kolar and Zeman (3). It is clearly seen that granulocytes sedimented gradually towards erythrocyte mass. At certain time they left already the lymphocyte-rich interphase but have not reached the bottom of centrifuge-tube yet. Centrifugation interrupted in that position yielded pure granulocyte fraction. Optimal centrifugation time was 7 minutes. The granulocytes were 98% viable and contained not more than 1-2% lymphocyte cross-contamination. Out of 15 ml blood after 7 minutes of centrifugation $20 \times 10^3 / \mu\text{l}$ density of pure granulocytes in a total volume of 1 ml could be obtained.

2. PMN phagocytic function in different dermato-allergic disorders:

- 2.1. SLE: In 10 patients with SLE no difference in *Candida albicans* phagocytosis as compared to normal controls was found (Fig. 3).

PHAGOCYTOSIS IN SYSTEMIC LUPUS
ERYTHEMATOSUS (SLE)

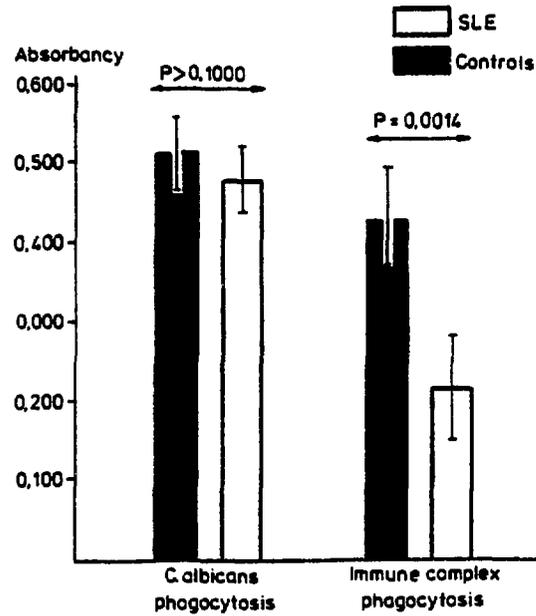


Figure 3

A strong decrease, however, in immune complex ingestion was evident. The difference was strongly significant.

2.2. MCTD: No difference in either *Candida albicans* phagocytosis or immune complex phagocytosis was found (Fig. 4).

PHAGOCYTOSIS IN MIXED CONNECTIVE
TISSUE DISEASE (MCTD)

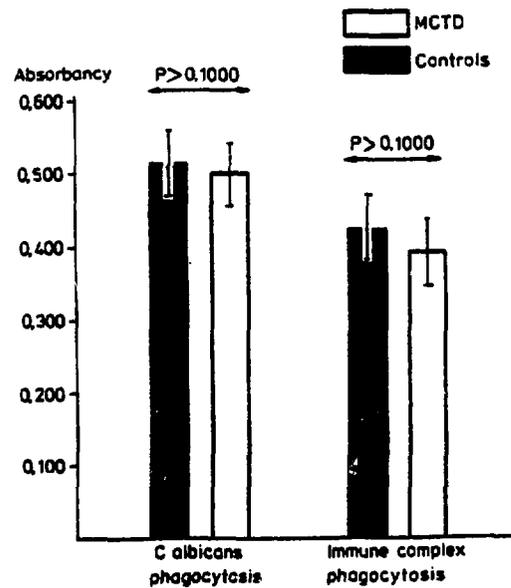


Figure 4

2.3. Oral pemphigus: Patients suffering from oral pemphigus revealed a marked significant depression in both the immune-complex phagocytosis and the *Candida albicans* particle phagocytosis (Fig. 5).

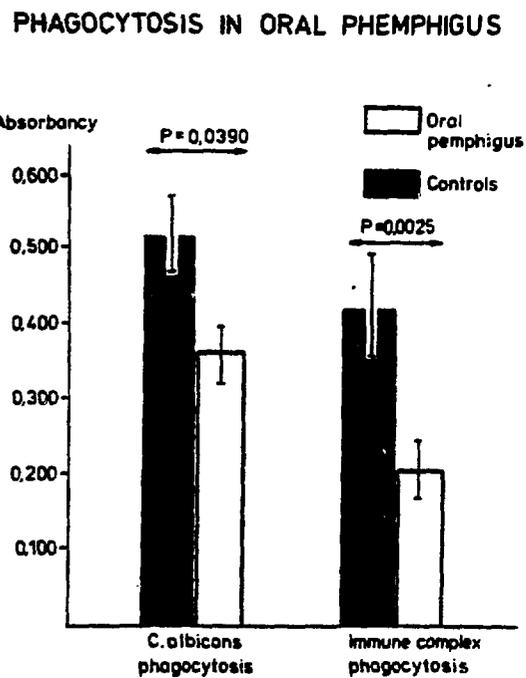
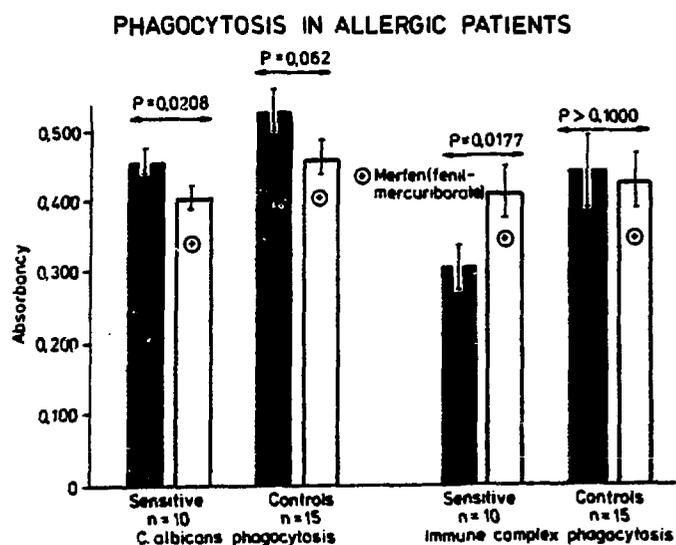


Figure 5

2.4. Patients with contact eczema: It was finally checked how granulocytes from proven mercury (Hg^{++}) sensitive patients engulfed particles or immune-complexes. Merfen was used as antigen in $0.5\mu g/ml$ concentration. From Fig. 6 it is evident that *Candida* phagocytosis was reduced in both the control and the Hg^{++} sensitive group in the presence of this organic mercury compound. In contrary to that immune-complex phagocytosis was stimulated only in the sensitive patients by Hg^{++} .

Figure 6



DISCUSSION

The most important precondition of functional immunological tests is to prepare immunocompetent cells in sufficient quantity free from other cells in full viability. Our studies have shown that the cell separation mixture of 1.0794 specific gravity yielded in 7 minutes at 1200 x rpm high amounts of viable granulocytes.

We studied then phagocytic functions of patients suffering from different immunological disorders. The decrease of immune-complex phagocytosis in SLE at normal rates of Candida phagocytosis might be of primary importance from the point of view of the pathomechanism of this disease. The situation is quite different in MCTD where no alterations in either the particle phagocytosis or the immune complex engulfment could be detected.

This seems to provide a tool of differentiation against SLE based on the phagocytic capacities. It is known that in MCTD antinuclear antibodies may also arise and, clinical picture and course may resemble SLE too. Any test that could reveal differences in laboratory findings is, therefore, of practical importance. Oral pemphigus remains often a localized

form of the disease.

The frequency of yeast infections is, however, high in this group. We found also significantly decreased *Candida* phagocytosis and immune-complex phagocytosis in these patients which is in accordance with the higher infection rates. Corticosteroid treatment alone cannot be made responsible for the phenomenon because SLE patients receiving also continuous treatment of steroids with occasionally high doses were found not to express decreased phagocytic capacity against *Candida albicans* cells.

Contact allergy to mercury was another model system to test phagocytosis. Merfen decreased in both the control and the patient group *Candida* phagocytosis. This might be due to the toxic effect of Hg^{++} which would deteriorate aspecifically the uptake of foreign cells through the phagosome. More specific is its action in the immune-complex phagocytosis of only the sensitive patients' phagocytes. We might assume, the presence of specific receptors on the membrane of granulocytes which are challenged perhaps by the presence of antigen. This in turn increases probably the cellular permeability against soluble proteins. This mechanism could also play a role in elimination of allergen. Summing up these results, we can conclude that rapid one-step granulocyte separation that we worked out together with the quantitative NET test can be used as a routine diagnostic aid and as many as 6 patients can be tested daily for particle and immune-complex phagocytosis.

REFERENCES

1. BAEHNER, R.L., D.G. NATHAN: Leucocyte oxydase: Defective activity in chronic granulomatous disease. *Science* 155 (1967) 835-836.
2. BØYUM, A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand.J.Clin.Lab.Invest.* 21, Suppl.97 (1968) 77-89.
3. KOLAR, O., W. ZEMAN: Spinal fluid cytomorphology: description of apparatus, technique and findings. *Arch.Neurol.* (Chicago) 18 (1968) 44-51.

4. MOLNAR, L., J.M. BALO-BANGA, A. HORVATH, J. LEIBINGER, E. ABLONCZY, M. NOVAKI: Immune-complex phagocytosis by human polymorphonuclear granulocytes. *Acta Physiol. Acad.Sci.Hung.* 52 (1978) 33-39.
5. MOLNAR, L., J. LEIBINGER, J.M. BALO-BANGA, I. RACZ: A new method for obtaining viable pure granulocytes from human blood. *Acta Physiol.Acad.Sci.Hung.* 57 (1982).
6. NYDEGGER, U.E., R.M. ANNER, A. GEREBTZOFF, P.H. LAMBERT, P.A. MIESCHER: Polymorphonuclear leucocyte stimulation by immune complexes: Assessment by nitroblue tetrazolium dye reduction. *Eur.J.Immunol.* 3 (1973) 465-470.
7. PINCUS, T.: Immunochemical conditions affecting the measurement of Γ NA antibodies using ammonium sulfate precipitation. *Arthr.Rheum.* 14 (1971) 623-630.

DNA-REPARATUR UND CHROMATIN (Proc. Symposium Saalfelden 1981).
Hrsg.: H. Altmann und G. Klein. Seibersdorf 1982, 83-91.

DIE BEDEUTUNG DER DNA-REPARATUR BEI MUTAGENI- TÄTSUNTERSUCHUNGEN

A. WOTTAWA

Institut für Biologie, Forschungszentrum Seibersdorf,
A-2444 Seibersdorf, Österreich
und L. Boltzmann-Institut für Rheumatologie und Fokalge-
schehen Baden

Die DNA-Reparatur ist eines der wichtigsten Werkzeuge der Natur zur Konstanthaltung der Erbinformation. Die DNA, der Träger der genetischen Information, ist einer Vielfalt von Einflüssen ausgesetzt, die oft schädigend auf sie einwirken. Werden solche Schäden nicht rechtzeitig erkannt und repariert, führt dies bekanntlich zum Verlust der Lebensfähigkeit der betroffenen Zelle oder zu bleibenden Veränderungen des Erbmaterials - zu Mutationen.

Physikalische und chemische Einflüsse, die die DNA schädigen, sind keine Erfindung der modernen Zivilisation sondern waren bereits seit den ersten Anfängen des Lebens auf der Erde immer vorhanden. Als Beispiele seien hier nur das UV-Licht der Sonne, die radioaktive Strahlung und verschiedene natürlich vorkommende mutagene Substanzen genannt. Eine Entwicklung des Lebens in seiner heutigen Form war daher nur dadurch möglich, daß schon sehr früh in der Evolution DNA-Reparaturprozesse entstanden sind, die die Auswirkung solcher Einflüsse wieder rückgängig machen. Eine gewisse, jedoch sehr kleine Anzahl von Mutationen war allerdings nötig, um durch das Zusammenspiel von Mutation und Selektion die Evolution der Lebewesen zu ermöglichen. Es kann aber leicht rechnerisch gezeigt werden, daß schon ein geringes Ansteigen der natürlichen Mutationsrate die errungenen Selektionsvorteile wieder zunichte macht und die Ausbildung einheitlicher Arten von Lebewesen vollkommen verhindert (1).

Die heutige hochgradige Industrialisierung mit all ihren Abfallprodukten sowie die Erzeugung einer Unzahl von chemischen Substanzen, die bis vor kurzem unbekannt waren und deren Wirkungen wir nicht kennen, bringen jedoch die Gefahr für ein derartiges Ansteigen der Mutationsrate mit sich. Schätzungsweise 0,1 - 1,0% der künstlich erzeugten Verbindungen sind in der Lage nachweisbar mutagen zu wirken. Zur Verhinderung einer Anhäufung von Erbschäden bei unseren Nachkommen ist es daher unumgänglich notwendig, festzustellen, welche Substanzen mutagene Eigenschaften haben und entsprechende Vorkehrungen zum Schutz vor solchen negativen Auswirkungen zu treffen. Mutagenitätsuntersuchungen haben darüberhinaus stark an Bedeutung gewonnen, als empirisch festgestellt werden konnte, daß Mutagenität und Kanzerogenität eng miteinander korrelieren. Es gilt heute als gesichert, daß die meisten mutagen wirksamen Verbindungen auch kanzerogene Eigenschaften haben (2). Dies steht im Einklang mit der Mutationstheorie des Krebses, die besagt, daß eine Anhäufung von Mutationen in einer Zelle zur Initiation eines Karzinoms führen kann.

Aus den oben genannten Gründen wurde in den letzten Jahren eine Reihe von Prüfverfahren entwickelt, die es gestatten, die eventuelle mutagene Wirksamkeit einer Verbindung festzustellen (3). Bei der großen Zahl der zu prüfenden Substanzen kommen dafür nur einfache und relativ billige Schnelltests in Frage. Bisher ist es allerdings noch nicht gelungen einen Test zu entwickeln der allein in der Lage ist, hinreichend Auskunft über das mutagene Potential einer Substanz zu geben. Es werden daher mehrere Prüfverfahren zu sogenannten Testbatterien zusammengefaßt, deren Ergebnisse gemeinsam eine wesentlich bessere Abschätzung des mit der Anwendung einer Substanz verbundenen genetischen Risikos gestatten als die Ergebnisse einzelner Untersuchungen (4).

Trotz der in den letzten Jahren erzielten bedeutenden Fortschritte ist es jedoch auch heute noch nicht möglich, das genetische Risiko zu quantifizieren. Wir sind oft noch nicht

einmal in der Lage anzugeben, welche von zwei Verbindungen das stärkere Mutagen oder Kanzerogen ist. Der Grund für diese Schwierigkeiten liegt einerseits in der Vielzahl von Reaktionswegen, auf denen eine in unseren Körper gelangte Substanz ihre Wirkung entfalten kann und andererseits in der großen Vielfalt von Schutzmechanismen, die die Natur entwickelt hat, um die genetische Information vor Veränderungen zu schützen.

Im einfachsten Fall kommt eine Mutation dadurch zustande, daß ein Schaden an der DNA der Mutterzelle vorliegt, wodurch bei der Reduplikation der DNA und der anschließenden Zellteilung mindestens eine Tochterzelle entsteht, deren genetische Information sich von jener der Mutterzelle unterscheidet. Aber auch Fehlsteuerungen bei der semikonservativen DNA-Synthese und bei der Zellteilung selbst können zu diesem Ergebnis führen. Dementsprechend kann eine Verbindung mutagen wirken, wenn sie mit der DNA in einer Weise reagiert, die deren Codierungseigenschaften verändert, aber auch eine indirekte Wirkungsweise ohne Veränderung der DNA ist möglich, wenn die Substanz störend in den geordneten Ablauf der DNA-Synthese oder der Zellteilung eingreift. Die Lage wird dadurch weiter kompliziert, daß in vielen Fällen der zugeführten Substanz selbst keinerlei mutagene Wirkung zukommt, sondern daß vielmehr erst die in der lebenden Zelle aus der Verbindung gebildeten, oft sehr kurzlebigen Stoffwechselprodukte die eigentlich wirksamen Agentien darstellen.

Im Gegensatz zur toxischen Wirkung einer Verbindung, die erst dann zum Tragen kommt, wenn die Dosis einen gewissen unteren Schwellenwert überschreitet, handelt es sich bei der genetisch-toxischen Wirkung um einen stochastischen Prozeß, das heißt es ist theoretisch prinzipiell denkbar, daß ein einziges Molekül ausreicht, um eine Mutation auszulösen. In der Praxis ist jedoch schon eine Reihe von Barrieren zu überwinden, bevor es einer Substanz überhaupt gelingt an den Wirkort - die DNA - vorzudringen. Es sei in diesem Zusammenhang nur daran erinnert, daß sie bei höheren Lebewesen zuerst in die Blutbahn, dann durch die Zellwand und durch die Kernmembran in das Innere des

Zellkerns vordringen muß und schließlich noch die die DNA schützenden Histone zu überwinden hat, bevor sie mit der DNA in Berührung kommt. Erst wenn sie all diese Schranken überwunden hat, ohne ihre Reaktivität zu verlieren, kann sie das genetische Material schädigen. Aber auch jetzt hat die Zelle noch die Möglichkeit eine Mutation zu verhindern, da sie in der Lage ist, mit Hilfe der sehr effizienten DNA-Reparaturprozesse die Erbinformation in ihrer ursprünglichen Form wieder herzustellen.

Es besteht noch ein weiterer grundlegender Unterschied zwischen der toxischen, also Giftwirkung einer Substanz und genetisch-toxischen Effekten. Ein Gift interferiert mit bestimmten Stoffwechselprozessen und führt daher zum Auftreten definierter Symptome. Eine mutagene Substanz führt letzten Endes zu einer Veränderung der Erbinformation. Es bleibt jedoch dem Zufall überlassen, welcher Teil der genetischen Information von dieser Veränderung betroffen ist und dies führt dazu, daß die gleiche Substanz die verschiedensten Mutationen auslösen kann und eine Voraussage über die Art der auftretenden Veränderungen völlig unmöglich ist.

Um bei der Sicherheitsbewertung von Substanzen hinsichtlich ihrer genetischen Toxizität mit vertretbarem Aufwand zu sinnvollen Aussagen zu gelangen, hat sich in Anbetracht der geschilderten Schwierigkeiten die folgende Strategie bewährt. Man konstruiert Testsysteme, die möglichst empfindlich reagieren und versucht durch Kombination verschiedener Systeme der Vielfalt der geschilderten Mechanismen Rechnung zu tragen. Erstes Ziel der Untersuchungen ist es, festzustellen, ob eine Substanz überhaupt in der Lage ist mutagen zu wirken. Ist dies nicht der Fall, wird die Substanz als sicher betrachtet. Ergeben sich Hinweise auf ein mutagenes Potential der Verbindung muß durch Hinzunahme weiterer, aufwendiger Untersuchungen versucht werden, das durch die Substanz für den Menschen entstehende Risiko abzuschätzen (4). Schließlich ist unter Berücksichtigung des möglicherweise zu erwartenden Nutzens darüber zu entscheiden,

ob auf die Substanz verzichtet werden soll oder welche Maßnahmen zu treffen sind, um bei ihrer Anwendung den Menschen und die Umwelt vor negativen Folgen zu schützen.

Da es sich bei Mutationen um äußerst seltene Ereignisse handelt, ist es wichtig für Mutationsuntersuchungen, eine möglichst große Anzahl von Einzelindividuen zur Verfügung zu haben. Dieses Ziel wird am leichtesten dadurch erreicht, daß Mikroorganismen als Untersuchungsobjekte verwendet werden (5). Es stehen heute Bakterienstämme zur Verfügung, die sich deshalb besonders gut als Indikatoorganismen eignen, da es gelungen ist ihre Empfindlichkeit gegenüber dem jeweiligen Wildtyp um ein Vielfaches zu steigern. Dies wurde vor allem dadurch erreicht, daß bei diesen Organismen die DNA-Excisions-Reparatur ausgeschaltet wurde (6, 7). Normalerweise sorgt die DNA-Excisions-Reparatur rechtzeitig vor der nächsten Zellteilung für eine Behebung des größten Teiles der an der DNA entstandenen Schäden, die dadurch nicht zur Entstehung von Mutationen führen können. Eine Ausschaltung dieser Reparatur erhöht die Chance beträchtlich, daß ein DNA-Schaden in dem betreffenden Testsystem als Mutation wiedergefunden wird. Allerdings darf nicht außer Acht gelassen werden, daß dadurch die Allgemeingültigkeit der Aussagen eingeschränkt wird. Es hat sich nämlich gezeigt, daß es Substanzen, wie z.B. Mitomycin C gibt, die nur bei intakter DNA-Reparatur ihre mutagene Wirksamkeit entfalten. Dies kann darauf zurückzuführen sein, daß eine solche Substanz vor allem Schäden bewirkt, die von der Zelle nicht überlebt werden, oder aber, daß die Mutationen gerade im Zuge der DNA-Reparatur dadurch entstehen, daß durch die Substanz die Exaktheit (Fidelity) der Reparatur vermindert wird.

Im Gegensatz zu der normalerweise äußerst präzise arbeitenden DNA-Excisions-Reparatur gibt es weitere Reparaturprozesse, die selbst Ursache für das Auftreten von Mutationen sein können. Es handelt sich dabei um die normalerweise als SOS-Reparatur bezeichneten Prozesse, deren Hauptaufgabe es zu sein scheint, eine letal geschädigte Zelle am Leben zu erhalten, wobei es

eher von untergeordneter Bedeutung ist, ob bei diesem Prozeß kleine Unexaktheiten vorkommen oder nicht. Solche SOS-Systeme haben sich für die Durchführung von Mutagenitätstests als äußerst nützlich erwiesen. Einerseits ist es möglich, daß durch den Reparaturvorgang, der einen Schaden beheben soll, mehrere weitere Schäden gesetzt werden, wodurch eine Verstärkung der Substanzwirkung zustande kommt, andererseits kann durch die Wirksamkeit dieser Reparatur ein durch die Substanz verursachter Schaden zwar behoben werden, wobei jedoch gleichzeitig an anderen Stellen weitere Schäden entstehen. Solch eine Verschiebung der Schadensstelle längs der DNA kann besonders bei Rückmutations-Experimenten zu einer erheblichen Empfindlichkeitssteigerung und einer Verallgemeinerung der Aussagekraft führen. Rückmutations-Experimente, wie der Salmonella-Test nach Ames (6), beruhen auf der Tatsache, daß durch eine Punktmutation, die meist nur ein einziges Basenpaar betrifft, eine bestimmte Funktion ausfällt. Für die Untersuchung wählt man nun Selektionsbedingungen, die den Keimen nur dann ein Wachstum gestatten, wenn die ausgefallene Funktion wieder hergestellt ist. Da diese Wiederherstellung durch Veränderung eines einzigen Basenpaares erfolgt, kann sie nur dann eintreten, wenn die Substanz mit diesem Basenpaar reagiert hat, wodurch sich aber automatisch eine gewisse Selektion der wirksamen chemischen Reaktionsmechanismen ergibt. Durch die Wirksamkeit fehlerhafter Reparaturprozesse kann aber eine Mutation auch dann eintreten, wenn der ursprüngliche Schaden eine andere Stelle der DNA betroffen hat, wodurch das Wirkungsspektrum eines solchen Testsystems wesentlich ausgeweitet wird. Tatsächlich ist es Ames gelungen durch die zusätzliche Einführung eines Plasmids (R-Faktor), das wahrscheinlich für eine fehlerhafte DNA-Reparatur kodiert, die Empfindlichkeit seines Testsystems wesentlich zu steigern (8).

Neben den genannten Auswirkungen der DNA-Reparatur auf die Empfindlichkeit von Testsystemen, kann die DNA-Reparatur selbst auch als Indikator für das mutagene Potential einer Substanz eingesetzt werden. Wenn eine Substanz in der Lage ist,

die DNA einer Zelle zu erreichen und mit ihren Basen zu reagieren, entstehen Prämutationsschäden, die schließlich zur Fixierung einer Mutation führen können. Gleichzeitig werden jedoch solche Schäden von den Enzymen der DNA-Reparatur erkannt und der Reparaturvorgang wird eingeleitet. Es gibt heute eine Reihe relativ einfacher und für die Routine geeigneter Methoden zur Messung des Ausmaßes der DNA-Reparatur. Es ist daher auch relativ leicht möglich, die durch eine Substanz induzierte DNA-Reparatur zu messen und damit ihr mutagenes Potential nachzuweisen. Ein großer Vorteil dieser Methoden ist es, daß die Untersuchungen nicht nur an Bakterienzellen sondern auch an Säugetier- und menschlichen Zellen durchgeführt werden können. Ähnlich wie bei anderen Testsystemen kann man auch bei solchen Experimenten Präparationen aus Leberenzymen einsetzen um neben der Wirkung der Testsubstanz selbst auch jene von einigen im Säugetierorganismus gebildeten Metaboliten erfassen zu können. Ein besonders elegantes Verfahren zur Erfassung von Metaboliten stellt die Messung der Induktion der DNA-Reparatur in frisch gewonnenen Hepatozyten dar, die noch in der Lage sind, die angebotene Substanz intrazellulär zu metabolisieren (9).

Ein weiterer Nachweis des mutagenen Potentials einer Verbindung ist mit Hilfe der sogenannten differenziellen Reparaturtests möglich. Solche Untersuchungen setzen Paare von Zellsystemen voraus, die sich genetisch nur in ihrer Fähigkeit zur Reparatur der DNA unterscheiden. Das Prinzip der Tests besteht darin, daß man die Überlebensraten der Zellsysteme unter Substanzwirkung bestimmt. Reagiert die Substanz mit der DNA, so werden die zur Reparatur befähigten Zellen einen Großteil des Schadens beheben können und daher überleben. Jene Zellen, die ihre DNA nicht reparieren können, weisen eine wesentlich geringere Überlebensrate auf. Auch diese Untersuchungen lassen sich besonders einfach mit Bakterien durchführen, indem man die zu prüfende Substanz auf Petrischalen aufbringt, die mit den entsprechenden Keimen beimpft sind (10). Eine mutagene Substanzwirkung läßt sich dann dadurch feststellen, daß der reparaturdefiziente Stamm den größeren Hemmhof aufweist. Aber auch Unter-

suchungen mit menschlichen Zellen wurden bereits durchgeführt, wobei einerseits normale menschliche Fibroblasten und andererseits Fibroblasten von Patienten mit Xeroderma pigmentosum verwendet wurden, die nicht in der Lage sind DNA-Schäden vom Typ der UV-Schäden ordnungsgemäß zu reparieren (11).

Wir haben festgestellt, daß die DNA-Excisions-Reparatur einen äußerst effizienten Schutz gegen das Auftreten von Mutationen darstellt. Es ist daher vorteilhaft, sie bei Mutationsexperimenten nach Möglichkeit auszuschalten. Andererseits gibt es Substanzen, die nur bei intakter DNA-Excisions-Reparatur eine mutagene Wirkung entfalten. Die fehlerhaft arbeitenden sogenannten SOS-Reparatur-Funktionen können im Mutationstest zur Steigerung der Empfindlichkeit des Testsystems herangezogen werden. Die Fähigkeit einer Substanz, die DNA-Excisions-Reparatur in einer Zelle zu induzieren, ist ein Beweis für ihr mutagenes Potential. Außerdem ist es möglich die mutagene Wirkung einer Substanz indirekt durch den Vergleich ihres Einflusses auf Paare von Zellsystemen nachzuweisen, die sich nur in ihrer Fähigkeit zur DNA-Reparatur unterscheiden.

LITERATUR

1. EIGEN, M., W. GARDINER, P. SCHUSTER and R. WINKLER-OSWATITSCH: The origin of genetic information. Scientific American, 244 (1981) 78-94.
2. AMES, B.N., W. DURSTON, E. YAMASAKI and F. LEE: Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 70 (1973) 2281-2285.
3. HOLLSTEIN, M., J. McCANN, F.A. ANGELOSANTO and W.W. NICHOLS: Short-term tests for carcinogens and mutagens. Mutat.Res. 65 (1979) 133-226.
4. BRIDGES, B.A.: Use of a three-tier protocol for evaluation of long-term toxic hazards particularly mutagenicity and carcinogenicity. In: Screening Tests in Chemical Carcinogenesis. Eds.: R. Montesano, H. Bartsch, L. Tomatis. IARC Scientific Publ. No. 12 (1976) 549-568.
5. MOHN, G.R. and J. ELLENBERGER: Appreciation of the value of different bacterial test systems for detecting and for ranking chemical mutagens. Arch.Toxicol. 46 (1980) 45-60.
6. AMES, B.N., F. LEE and W. DURSTON: An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 70 (1973) 782-786.
7. MOHN, G.R. and J. ELLENBERGER: The use of Escherichia coli K12/343/113 (λ) as a multi-purpose indicator strain in various mutagenicity testing procedures. In: Handbook of Mutagenicity Test Procedures. Eds.: B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel. Elsevier, Amsterdam 1977, 95-118.
8. McCANN, J., N.E. SPINGARN, F. KOBORI and B.N. AMES: Detection of carcinogens as mutagens: bacterial strains with R factor plasmids. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 72 (1975) 979-983.
9. WILLIAMS, G.: Carcinogen-induced DNA repair in primary rat liver cell cultures: A possible screen for chemical carcinogens. Cancer Lett. 1 (1976) 231-236.
10. SLATER, E.E., M.D. ANDERSON and H.S. ROSENKRANZ: Rapid detection of mutagens and cancerogens. Cancer Res. 31 (1971) 970-973.
11. BURRELL, A., M.A. HOWARD and J.J. ANDERSEN: Metabolic activation of UV-mimetic carcinogens in a differential toxicity test using cultured human cells. 9th Annual Meeting, Environmental Mutagen Society, San Francisco, March 1978, p.38.

DNA-REPARATUR UND CHROMATIN (Proc. Symposium Saalfelden 1981).
Hrsg.: H. Altmann und G. Klein. Seibersdorf 1982, 93.

LIQUID HOLDING EXPERIMENTS WITH HUMAN PERIPHERAL
LYMPHOCYTES

G. OBE

Institut für Genetik, Freie Universität Berlin, BRD

Manuskript nicht rechtzeitig eingelangt.

DNA-REPARATUR UND CHROMATIN (Proc. Symposium Saalfelden 1981).
Hrsg.: H. Altmann und G. Klein. Seibersdorf 1982, 95.

INFLUENCE OF INHIBITION OF REPAIR ENZYMES ON THE
INDUCTION OF CHROMOSOMAL ABERRATIONS BY PHYSICAL
AND CHEMICAL AGENTS

A.T. NATARAJAN

State University Leiden, Sylvius Laboratories, Leiden,
Holland

Manuskript nicht rechtzeitig eingelangt.

DNA-REPARATUR UND CHROMATIN (Proc. Symposium Saalfelden 1981).
Hrsg.: H. Altmann und G. Klein. Seibersdorf 1982, 97.

THE EFFECT OF CAFFEINE ON THE X-RAY KILLING IN CHINESE
HAMSTER CELLS AND ON THE X-RAY INDUCED CHROMOSOME
SEGREGATION IN INTERSPECIFIC HYBRIDS

I. RASKO, K. BURG, G. HADLACZKY

Institut of Genetics, Biological Research Center, Hungarian
Academy of Sciences, Szeged, Ungarn

ABSTRACT

A 16 h postirradiation incubation with caffeine enhances X-ray killing of chinese hamster ovary cells. The effect of caffeine on the X-ray survival curve of this cell was to remove the initial shoulder without significantly altering the mean lethal dose (D_0). This action can be achieved at caffeine concentrations which of themselves cause less than 15% killing. In randomly growing cells the caffeine sensitive process occurs with a half-time of 2-5 h after irradiation.

Hybrids, producing chicken-type hypoxanthine phosphoribosyl-transferase (HPRT) enzyme were selected after fusion of HPRT⁻ chinese hamster cells with chick red blood cells. It was found that the segregation of the chicken specific HPRT phenotype, associated with the loss of a chromosome can be induced by X-rays, besides other mutagens. Caffeine at D_0 concentration decreases the X-ray induced chromosome segregation in these hybrids.

DNA-REPARATUR UND CHROMATIN (Proc. Symposium Saalfelden 1981).
Hrsg.: H. Altmann und G. Klein. Seibersdorf 1982, 99-102.

RAUCHEN UND SCHWESTERCHROMATIDAUSTAUSCHE IN LYMPHOZYTEN

K. TURANITZ

Institut für Biologie, Forschungszentrum Seibersdorf,
A-2444 Seibersdorf, Österreich

Die Methode des Schwesterchromatidaustausches (SCE) wird immer mehr zur Untersuchung möglicher Umweltmutagene herangezogen. Auf Grund der Empfindlichkeit der Methodik konnten wir im Zuge mehrerer Untersuchungen feststellen, daß bereits bei Kontrollpersonen beachtliche Schwankungen in der SCE-Frequenz auftreten, die offensichtlich genetisch und auf Lebensgewohnheiten bzw. Umweltfaktoren zurückzuführen sind. Ein in diesem Zusammenhang leicht zu verfolgender Faktor waren die Rauchgewohnheiten.

1978 fanden Bo Lambert und Mitarbeiter im Rahmen einer SCE-Untersuchungen von Psoriasis Patienten einen SCE-verändernden Effekt durch Zigarettenkonsum. Bei ihrer Versuchsreihe wurde den Probanden nur zu einem einzigen Zeitpunkt Blut abgenommen.

Unsere Arbeit über Raucher bzw. Nichtraucher erfolgte im Rahmen einer sich über ein Jahr erstreckenden Untersuchungsreihe. Zu 8 verschiedenen Terminen wurden von jedem Probanden Vollblutkulturen untersucht. Alle Probanden sind Mitarbeiter des Forschungszentrum Seibersdorf und haben sich freiwillig zur Verfügung gestellt. Von den Probanden wurde zu Versuchsbeginn eine Anamnese bezüglich Medikamentenkonsum, Rauch- und Trinkgewohnheiten erhoben. Während der Versuchsdauer auftretende Krankheiten und der damit zusammenhängende Medikamentenkonsum sowie die monatliche Strahlenbelastung wurden ständig registriert. Die Blutproben wurden bei jedem Termin mit einem neuen Code versehen, sodaß bei der späteren Auswertung es dem Beur-

teiler unmöglich war vom Namen des Probanden beeinflusst zu werden.

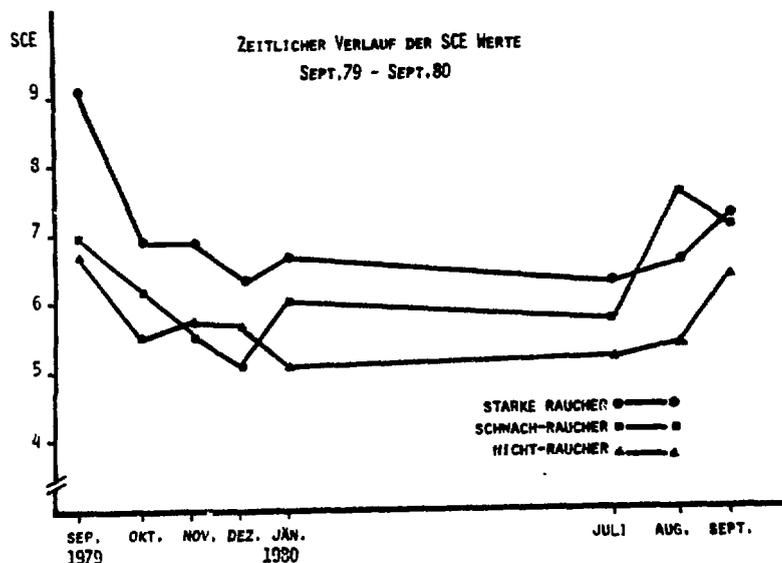
Bild 1

PROBAND	SEX	ALTER	ZIGARETTEN/Tg	SCE	n
1 N	w	40	-	6,10 ± 2,72	378
2 N	w	28	-	5,77 ± 2,65	308
3 N	w	31	-	5,80 ± 2,26	340
4 N	m	40	-	5,35 ± 2,21	371
1 S	w	41	unter 10	5,60 ± 2,23	314
2 S	w	37	unter 10	6,25 ± 2,71	337
3 S	w	34	unter 10	5,92 ± 2,62	399
4 S	m	40	unter 10	5,94 ± 2,97	363
1 R	w	32	über 10	5,86 ± 2,76	284
2 R	w	23	über 20	7,44 ± 2,98	347
3 R	m	41	über 20	9,36 ± 3,50	689
4 R	m	38	über 10	6,41 ± 2,63	335

Die Probanden waren zwischen 23 und 41 Jahre alt. Wir haben die Raucher in zwei Gruppen eingeteilt: starke Raucher, bei denen der tägliche Zigarettenkonsum über 10 lag; schwache Raucher, die täglich weniger als 10 Zigaretten rauchen. In jeder Gruppe befanden sich Frauen und Männer (Bild 1).

Die angegebenen Werte stellen jeweils den Durchschnittswert der bei 8 Blutabnahmen erhaltenen SCE-Frequenzen dar. Pro Termin und pro Proband wurden zwischen 35 und 50 Metaphasen ausgezählt.

Bild 2



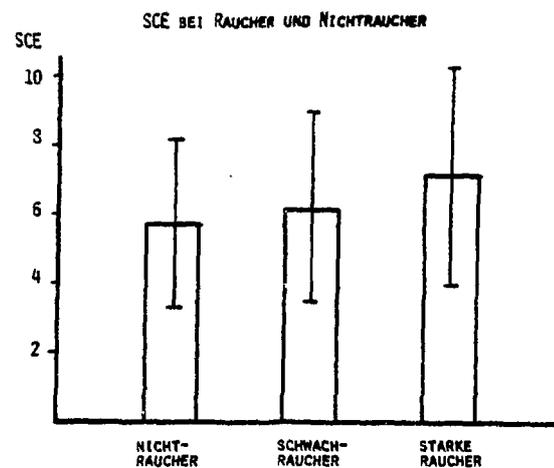
In Bild 2 sind die pro Gruppe und pro Termin erhaltenen SCE-Werte aufgezeichnet. Hier können wir 3 Termine mit Überlappungen feststellen: zwischen schwachen Rauchern und Nichtrauchern, bzw. schwachen und starken Rauchern.

Bild 3

SCE - WERTE BEI VERSCHIEDENEN RAUCHGEWÖHNHEITEN

	\bar{x}	s	N
RAUCHER	7,06	± 3,13	1154
SCHWACH- RAUCHER	6,13	± 2,68	1412
NICHTRAUCHER	5,73	± 2,44	1394

In dieser Tabelle (Bild 3) sehen sie die Durchschnittswerte der einzelnen Gruppen mit den Standardabweichungen und der Anzahl der ausgewerteten Metaphasen.

Bild 4

In Bild 4 sind die selben Werte als Blockdiagramm dargestellt. Man sieht eine Erhöhung der SCE-Werte in Richtung starke Raucher.

Bild 5

DIFFERENZEN DER SCE - WERTE

	DIFFERENZ	IRRTUMSWAHRSCHEINLICHKEIT	SIGNIFIKANZ
NICHTRAUCHER RAUCHER	1.3	< 0.1 %	HOCHSIGNIFIKANT
NICHTRAUCHER SCHWACH-RAUCHER	0.5	< 0.1 %	HOCHSIGNIFIKANT
SCHWACH-RAUCHER RAUCHER	0.9	< 0.1 %	HOCHSIGNIFIKANT

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem zweiseitigen Student Test. Es wurden Nichtraucher - Raucher, Nichtraucher - schwache Raucher und schwache Raucher - Raucher miteinander verglichen. Die Gruppen unterscheiden sich voneinander hoch signifikant.

Außer den individuellen Rauchgewohnheiten wurden zunächst keine anderen Faktoren, wie z.B. Medikamentenkonsum, grippale Erkrankungen berücksichtigt.

Trotz anderer unkontrollierbarer Umweltfaktoren konnten wir in unseren Untersuchungen einen hochsignifikanten Einfluß des Rauchens auf die SCE-Frequenz feststellen. Ich möchte nochmals darauf hinweisen, daß wir nur gesunde Personen untersucht haben, die trotzdem in der Anzahl der SCE-Frequenz individuell große Schwankungen zeigen. Die zeitweise aufgetretenen Überlappungen zeigen, daß Untersuchungen zu einem einzigen Zeitpunkt leicht zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Es ist daher notwendig bei der Auswahl von Kollektiven auf möglichst große Homogenität zu achten, oder entsprechend große Versuchsgruppen über einen längeren Zeitraum zu beobachten.

EINFLUSS VON ANTIRHEUMATIKA AUF DEN SCHWESTERCHROMATID-
AUSTAUSCH IN MENSCHLICHEN LYMPHOZYTEN

M. KECK¹, G. KLEIN²

¹ Institut für Biologie, Forschungszentrum Seibersdorf;
² L. Boltzmann-Institut für Rehabilitation interner Er-
krankungen, Saalfelden

Für die Mutagenitätsprüfung von Antirheumatika sprechen zwei Hauptargumente:

1. Die eventuelle Auslösung genetischer Schäden durch das jeweilige Therapeutikum.
2. Die mögliche Akzentuierung bereits vorhandener DNA-Schäden durch die medikamentöse Therapie.

Inwieweit es zu DNA-Schäden bei entzündlichen rheumatischen Erkrankungen kommen kann, zeigt die in Abbildung 1 dargestellte Übersicht über verschiedene molekularbiologische Reaktionsmechanismen, die bei entzündlich rheumatischen Krankheiten in erhöhtem Maß ablaufen und zu Schädigung des genetischen Materials führen können.

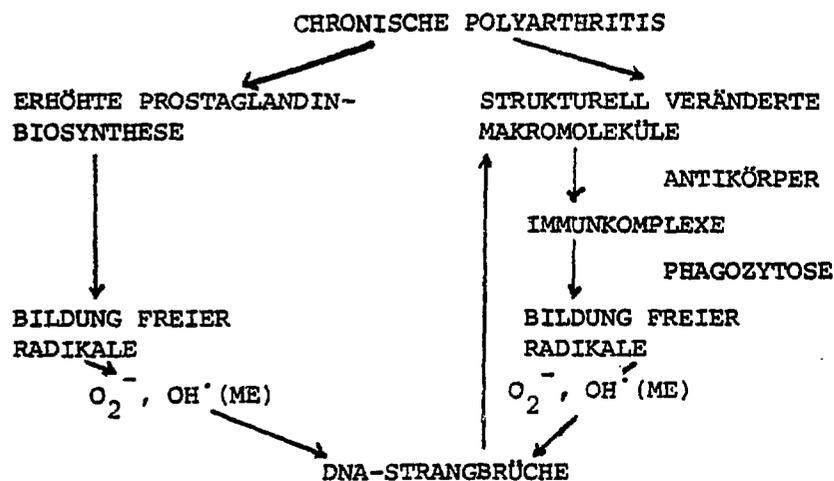


Abb. 1: Schematische Darstellung von Reaktionsmechanismen, die bei entzündlichen Prozessen in erhöhtem Maß ablaufen.

Eine Schlüsselstelle nimmt dabei die Prostaglandinbiosynthese ein (5). Prinzipiell werden Prostaglandine aus polyungesättigten Fettsäuren, insbesondere Arachidonsäure, gebildet. Als Zwischenprodukte treten verschiedene, instabile Prostaglandin-endoperoxide auf, bei deren Reduktion es zur Prostaglandinbildung und zur Freisetzung von Radikalen kommt (7).

Da mit der erhöhten Prostaglandinbildung eine vermehrte Produktion freier Radikale (O_2^- ; OH^\cdot) korreliert ist und letztere Schädigungen des genetischen Materials verursachen, ist mit einem Anstieg der DNA-Strangbruchrate bei entzündlichen rheumatischen Erkrankungen zu rechnen. Diese DNA-Schäden können, so sie nicht ausrepariert werden, Ausgangspunkt weiterer Zellschädigungen sein, insofern, als bestimmte Zellarten, insbesondere Präthymocyten, einen hohen Gehalt an terminalen Nukleotidyltransferasen aufweisen und es an den DNA-Strangbruchstellen zu unspezifischen Nukleotidadditionen kommen kann.

Derartige Punktmutationen können Fehler im Aufbau körpereriger Makromoleküle bewirken, die ihrerseits Ursache von Antikörperproduktion sind und phagozitierende Zellsysteme aktivieren. Mit den bei der Phagozytose freigesetzten O_2^- -Radikalen können ebenfalls DNA-Schäden induziert werden.

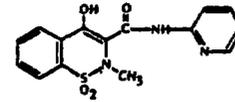
Inwiefern nicht-steroidale Antirheumatika einen Einfluß auf den DNA-Metabolismus gesunder Zellen haben, ist aus in vitro Untersuchungen von Klein et al. bekannt (2, 3). In den mit menschlichen Lymphozyten bzw. Milzzellen verschiedener Kleinnager durchgeführten Versuchen erwiesen sich Oxyphenbutazon, Naproxen und Flufenaminsäure unter bestimmten Bedingungen als DNA-Synthese- und DNA-Reparatur-Hemmstoffe, Indometacin als DNA-Synthese- und Metiazinsäure als DNA-Reparaturhemmstoffe.

An diese Testserien anknüpfend, wurde nun die Mutagenitätsprüfung der Antirheumatika Piroxicam, Diclofenac sowie Indometacin vorgenommen (Abb. 2).

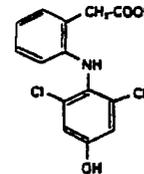
Abbildung 2:

Strukturformeln der getesteten Antirheumatika

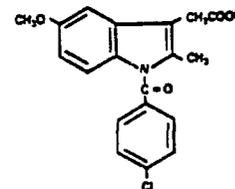
PIROXICAM



DICLOFENAC



INDOMETACIN



Als Testmethode wurde die Untersuchung des Schwesterchromatid-Austausches (SCE) in menschlichen Lymphozyten gewählt. Alle Versuche wurden mit Vollblutkulturen durchgeführt, wobei weitgehend die Methode von Perry und Wolff (6) Einsatz fand. Die umfangreichsten Untersuchungen liegen über das Antirheumatikum Piroxicam vor (4).

Zunächst wurde an sechs freiwilligen Probanden mit degenerativ rheumatischen Erkrankungen die SCE-verändernde Wirkung von Piroxicam nach viertägiger Medikamentengabe geprüft. (Die Tagesdosis betrug 20 mg).

In Tabelle 1 werden Durchschnittswerte und Standardabweichungen der Schwesterchromatid-Austauschrate jedes einzelnen Patienten vor und nach einer viertägigen Piroxicam-Behandlung (20 mg täglich) gezeigt. N = Anzahl der ausgezählten Metaphasen; \bar{x} = Mittelwert; S = Standardabweichung; + = für $P < 0,05$ sind für die SCE-Werte vor und nach der Behandlung signifikant voneinander verschieden.

Tabelle 1

PATIENT	UNBEHANDELT			BEHANDELT		
	N	\bar{X}	S	N	\bar{X}	S
1 ⁺	20	3,04	2,1	20	4,71	2,6
2	20	3,86	1,6	20	5,41	3,0
3	15	4,32	2,2	20	5,13	3,0
4	15	3,71	1,5	20	4,47	2,3
5	20	4,36	1,6	20	4,20	2,3
6	20	3,00	1,7	20	2,32	1,0

Bei Auszählung von 15-20 Metaphasen pro Blutkultur zeigten sich bei den unbehandelten Probanden SCE-Frequenzen von 3,0-4,4. Im Kollektiv der mit Piroxicam behandelten Personen lagen die Werte zwischen 2,3-5,4. Bei vier Probanden konnte eine SCE-Frequenzzunahme festgestellt werden, die für einen Fall nach statistischer Prüfung anhand des Wilcoxon-Rangordnungstests mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von P 0,05 signifikant war. Bei zwei weiteren Probanden konnte jeweils eine geringe Abnahme der SCE-Rate beobachtet werden. Da die individuellen SCE-Veränderungen kein einheitliches Bild zeigen, ist anzunehmen, daß die beobachteten Schwankungen eher nicht durch die Piroxicam-Therapie bedingt sind, zumal derartige Abweichungen, obwohl in einem Fall statistisch signifikant, als im biologischen Normalbereich liegend betrachtet werden.

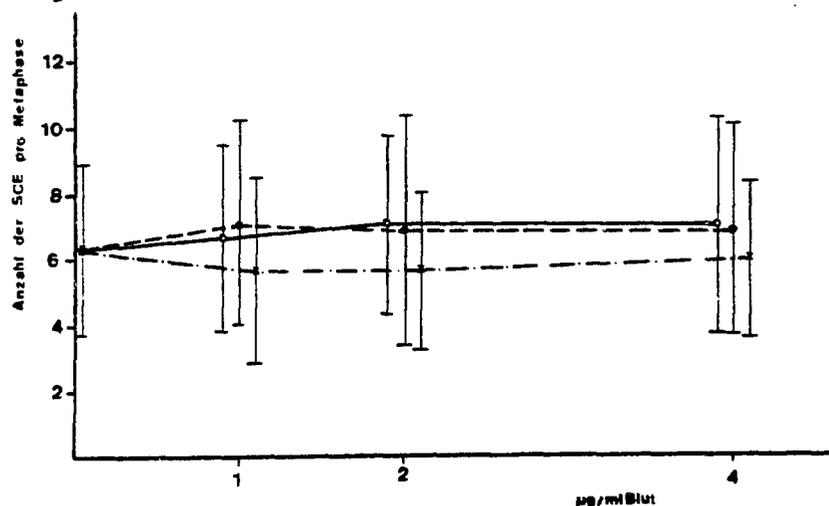


Abbildung 3: Einfluß von Piroxicam auf den Schwesterchromatid-Austausch in menschlichen Lymphozyten (in vitro Versuch).
 - - - - - = 72-stündige Substanzinkubation ohne S9-Mix
 ————— = 2-stündige Substanzinkubation ohne S9-Mix
 ········· = 2-stündige Substanzinkubation mit S9-Mix.

Bei der in vitro Untersuchung von Piroxicam wurde die Substanz 72 bzw. 2 Stunden mit den Zellkulturen inkubiert, wobei die 2-stündige Inkubation mit und ohne Metabolisierungsgemisch erfolgte. Die Ergebnisse der in vitro und in vivo Untersuchungen stimmen grundsätzlich überein; es konnte mit Piroxicam im therapeutischen Konzentrationsbereich keine signifikante Veränderung der SCE-Frequenzen festgestellt werden.

Diclofenac und Indometacin wurden lediglich im in vitro Versuch auf ihre SCE verändernde Wirkung geprüft. Dabei erfolgte eine 72-stündige Inkubation der jeweiligen Substanz mit dem Vollblut eines gesunden Probanden. Wie aus den Tabellen 2 und 3 hervorgeht, bewegen sich alle SCE-Frequenzen um den Kontrollwert von 5,85.

KONZENTRATION/ ML BLUT (μ g)	N	\bar{X}	S
30	20	5,56	2,2
15	20	5,82	2,8
7	20	5,82	2,5
0	20	5,85	1,5

Tabelle 2: Einfluß von Diclofenac auf den Schwesterchromatid-Austausch in menschlichen Lymphozyten (in vitro Versuch, 72-stündige Substanzinkubation).

KONZENTRATION/ ML BLUT (μ g)	N	\bar{X}	S
20	20	5,62	1,9
10	20	5,24	1,6
5	20	5,79	1,9
0	20	5,85	1,5

Tabelle 3: Einfluß von Indometacin auf den Schwesterchromatid-Austausch in menschlichen Lymphozyten (in vitro Versuch, 72-stündige Substanzinkubation).

Die bisher vorliegenden Ergebnisse sind zwar für eindeutige Aussage in ihrem Umfang sicherlich zu gering, sprechen jedoch

eher gegen eine mutagene Wirkung der Antirheumatika Piroxicam, Diclofenac und Indometacin in diesem Testsystem und unter den gewählten Bedingungen, zumal Substanzen, welche als mutagen bekannt sind, zu SCE-Anstiegsraten führen, die ein Vielfaches des Kontrollwertes darstellen (1).

LITERATUR

1. CARRANO, A.V., L.H. THOMPSON, P.A. LINDL, J.L. MINKLER: Sister chromatid exchange as an indicator of mutagenesis. *Nature* 271 (1978) 551-553.
2. KLEIN, G., A. WOTTAWA: Der Einfluß sogenannter Basistherapeutika und symptomatisch wirksamer Antirheumatika auf Enzyme der DNA-Synthese und DNA-Reparatur. *Acta Med. Austriaca* 2 (1975) 153-156.
3. KLEIN, G. und A. WOTTAWA: Die Wirkung von Antirheumatika auf die DNA-Synthese und DNA-Reparatur verschiedener Zellsysteme. *Verh.Dtsch.Ges.Rheumatol.* 4 (1976) 483-488.
4. KLEIN, G., M. KECK, K. TURANITZ: Einfluß von Piroxicam auf den Schwesternchromatid-Austausch in menschlichen Lymphocyten. *Therapiewoche* 31 (1981) 5078-5080.
5. KUKOWTZ, W.R.: Allgemeine Pharmacologie der Antirheumatika und Stellung des Indometacin. Internationales Rheumasymposium Wien, 1978.
6. PERRY, P., S. WOLFF: New Giemsa method for differential staining of sister chromatids. *Nature* 251 (1974) 156-158.
7. SAMUELSSON, B.: Prostaglandin endoperoxides and thromboxanes: short-lived bioregulators. IN: Prostaglandin Research. Ed. P. Crabbe, Academic Press 1977, 17-46.

DNA-REPARATUR UND CHROMATIN (Proc. Symposium Saalfelden 1981).
Hrsg.: H. Altmann und G. Klein. Seibersdorf 1982, 109-115.

ZYTOGENETISCHE UNTERSUCHUNGEN AN LYMPHOZYTEN VON
PATIENTEN MIT MORBUS BECHTEREW WÄHREND EINES
REHABILITATIONSVERFAHRENS

G. KLEIN¹, Chr. KORP¹, M. KECK²

- ¹ L. Boltzmann-Institut für Rehabilitation interner Er-
krankungen, Rehabilitationszentrum West d.PVArb. Saalfelden
² Institut für Biologie, Forschungszentrum Seibersdorf,
Seibersdorf

Die Ätiopathogenese der Spondylitis ankylosans (Morbus Bechterew) -
eine entzündlich rheumatische Erkrankung mit Befall der Wirbel-
säule, aber auch der peripheren Gelenke - ist nach wie vor un-
geklärt.

Die Tendenz zur Heredität weist auf die Bedeutung genetischer
Faktoren hin, doch scheinen für die Entwicklung einer Spondy-
litis ankylosans noch zusätzliche Faktoren eine Rolle zu spielen,
und es wäre denkbar, daß zum Beispiel virale Fehlinformationen
über Generationen weitergegeben werden, die zu einer entsprechen-
den Prädisposition führen.

Günther und Altmann (1978) konnten vor einigen Jahren zeigen,
daß die Unterdrückbarkeit der DNA-Synthese durch Hydroxyharn-
stoff bei Arthrosepatienten auf etwa 15% nur gering über der von
Normalpersonen mit 10%, aber deutlich unter der von Bechterew-
Kranken mit 20% liegt.

Da bekannt ist, daß eine virus- und mykoplasmenabhängige DNA-
Synthese nicht durch Hydroxyharnstoff gehemmt werden kann, läßt
dieses Ergebnis an die Möglichkeit einer Virus- oder Mykoplasmen-
infektion denken.

Über Triggermechanismen und möglicherweise in Kombination mit

einer besonderen Reaktionslage des Körpers könnte schließlich die Manifestation des Morbus Bechterew eintreten.

Die DNA-Synthese erreicht bei Bechterew-Kranken etwa das Dreifache von Normalpersonen oder Arthrosepatienten, während die Reparaturleistung (Unprogrammierte DNA-Synthese) gegenüber Normalpersonen nur unwesentlich verändert, d.h. im Verhältnis zur eigenen Syntheserate erniedrigt ist (Egg et al. 1977). Bei einer verminderten Reparaturkapazität der Zelle kann jedoch eine Schädigung des genetischen Materials eintreten, worauf in der Literatur wiederholt hingewiesen wurde.

Eine verringerte Reparaturleistung muß nicht zu einer erhöhten Schwesternchromatid-Austauschrates (SCE) führen, wie aus Untersuchungen von Sperling et al. (1975) über die Fanconi-Anämie bekannt ist, andererseits wurde aber nachgewiesen, daß beim Bloom's Syndrom sowohl eine Reparaturdefizienz, als auch ein erhöhter Schwesternchromatid-Austausch vorliegen (Chagani 1974).

Da nach Untersuchungen von Kato (1974) und nach jüngsten Mitteilungen von Traupe et al. (1981) der Schwesternchromatid-Austausch als zytogenetischer Ausdruck normaler Reparaturprozesse angesehen wird, stellte sich die Frage, ob in Lymphozyten von Bechterew-Patienten eine erhöhte SCE-Rate vorliegt, und ob das Rehabilitationsverfahren (komplexe Therapie - physikalisch und medikamentös) zu einer Veränderung der SCE-Frequenz führt.

PATIENTENGUT UND METHODIK

7 männliche Patienten mit Spondylitis ankylosans im Alter zwischen 16 und 59 Jahren (Durchschnittsalter 39 Jahre) wurden für die Untersuchungen herangezogen. Die Krankheit war zwischen einigen Monaten und 10 Jahren bekannt. Die erste Blutabnahme erfolgte am Tage nach der stationären Aufnahme im Rehabilitationszentrum, die zweite wurde nach dreiwöchiger Behandlung durchgeführt. Alle Patienten erhielten neben entsprechender physikalischer Therapie auch eine antirheumatische Therapie in Form von nicht-steroidalen Antirheumatika. Die SCE-Untersuchungen

werden weitgehend nach der Methode von Perry und Wolff (1974) durchgeführt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Wie aus der Tabelle 1 ersichtlich, fanden wir bei den 7 unbehandelten Bechterew-Patienten SCE-Frequenzen von 5,1 bis 8,6, wobei der Mittelwert 6,7 betrug. Auffallend ist, daß die Patienten 1, 2 und 3 SCE-Werte über 8 zeigten, wobei die Erklärung darin liegen dürfte, daß diese drei Patienten Raucher sind, während dies für die restlichen Patienten nicht zutrifft.

Patient	SCE						SCE-Differenz	P
	vorher			nachher				
	n	\bar{x}	s	n	\bar{x}	s		
1	20	8,6	$\pm 4,6$	20	6,45	$\pm 2,6$	-1,15	$P < 0,2$
2	20	8,4	$\pm 3,4$	20	6,1	$\pm 3,0$	-2,3	$P < 0,025$
3	20	8,15	$\pm 3,9$	18	4,6	$\pm 1,5$	-3,55	$P < 0,002$
4	20	6,25	$\pm 2,6$	20	6,25	$\pm 2,6$	--	--
5	20	5,4	$\pm 2,0$	20	5,25	$\pm 2,6$	-0,15	--
6	20	5,4	$\pm 2,6$	20	8,85	$\pm 3,5$	+3,45	$P < 0,002$
7	20	5,1	$\pm 1,7$	20	6,0	$\pm 2,8$	+0,9	--
Kontrolle	20	6,75	$\pm 2,75$	20	6,4	$\pm 2,66$	-0,35	--

Tabelle 1: SCE-Frequenzen bei Morbus Bechterew

n = Anzahl der ausgezählten Mitosen

\bar{x} = Mittelwert

s = Standardabweichung

Nach dreiwöchiger kombinierter physikalischer und medikamentöser Therapie zeigte sich folgendes Ergebnis:

Die Patienten 1 bis 3 reagierten mit einer deutlichen Abnahme der SCE-Frequenzen, wobei das Resultat in 2 von 3 Fällen hochsignifikant ausfiel.

Bei Patient 4 fand sich kein Unterschied. Patient 5 zeigte nur eine geringe SCE-Abnahme, während bei Patient 6 und 7 ein Anstieg zu verzeichnen war, welcher bei Patient 6 besonders stark ausfiel, wofür wir keine sichere Erklärung haben; möglicherweise besteht aber ein Zusammenhang mit der antirheumatischen Therapie.

Wir haben die SCE-Frequenzen auch mit klinischen bzw. serologischen Parametern verglichen und nach einer Korrelation mit diesen Daten gesucht (Tabelle 2).

Patienten	SCE		Alter	CRP		HLA-B 27	BSG	
	bei Aufnahme	nach 3 Wochen		vor	nach		vor	nach
1	8,6 \pm 4,6	6,45 \pm 2,6	52	pos.	pos.	pos.	40/75	38/65
2	8,4 \pm 3,4	6,1 \pm 3,4	40	pos.	neg.	neg.	30/62	25/52
3	8,15 \pm 3,99	4,6 \pm 1,5	28	pos.	neg.	pos.	30/75	4/10
4	6,25 \pm 2,6	6,25 \pm 2,6	16	neg.	neg.	neg.	17/35	16/32
5	5,4 \pm 2,0	5,25 \pm 2,6	59	neg.	neg.	pos.	8/17	5/12
6	5,4 \pm 2,6	8,85 \pm 3,5	54	neg.	neg.	neg.	3/8	3/7
7	5,1 \pm 1,7	6,0 \pm 2,8	26	pos.	pos.	neg.	45/85	40/80
Kontrolle	6,75 \pm 2,75	6,4 \pm 2,66	30	neg.	neg.	neg.	2/4	2/4

Tabelle 2: SCE-Frequenzen und klinische Daten bei 7 Patienten mit Morbus Bechterew.

4 Patienten wurden mit einer akuten Exazerbation des Morbus Bechterew aufgenommen, dies spiegelt sich auch in der Erhöhung der Blutsenkung und dem positiven C-reaktiven Protein wieder (Patienten 1, 2, 3 und 7).

Hinsichtlich der SCE-Veränderungen glauben wir folgende Interpretation geben zu können: Ein sicherer Zusammenhang zwischen SCE-Verhalten und Veränderungen der serologischen Parameter während der Therapie scheint nicht zu bestehen, d.h. eine SCE-Abnahme geht offensichtlich nicht parallel mit dem Abklingen der Entzündung. Auch ist kein Zusammenhang mit HLA-B-27 zu erkennen. Bei den Patienten 1 bis 3 besteht auch mit der anti-rheumatischen Therapie offensichtlich kein Zusammenhang, da unter Antirheumatika eher ein Anstieg der SCE-Rate zu erwarten wäre (Klein et al. 1981).

Wir glauben vielmehr, daß die SCE-Frequenzabnahme bei den ersten drei Patienten darauf zurückzuführen ist, daß diese drei Patienten während des Rehabilitationsverfahrens das Rauchen eingestellt haben (Raucher-Mittelwert betrug anfänglich 8,4,

später unter Nikotinkarenz ergab sich ein Durchschnittswert von 5,7). Die Tatsache, daß Raucher eine höhere SCE-Frequenz aufweisen können ist bereits auf früheren Arbeiten von B Lambert (1976) sowie Turanitz und Wottawa (1981) bekannt.

Untersuchungen am Institut für Biologie in Seibersdorf haben gezeigt, daß Raucher keinen niedrigeren Repaireinbau zeigen als Nichtraucher, obwohl in Zigarettenrauch kondensierten Stoffe vorhanden sind, welche die DNA-Reparaturprozesse teilweise inhibieren können. Da z.B. durch Nitrosamine (im Tabakrauch vorhanden) DNA-Schäden auftreten können (Strangbrüche), sind induzierte Reparaturenzymsynthesen möglich, die das Gleichgewicht zwischen DNA-Reparatur und DNA-Reparaturhemmstoffen (aus Zigarettenrauch) wieder ins Gleichgewicht bringen. Daraus resultiert ein Repaireinbau, der nicht unter dem der Kontrollen liegt (Altmann 1981). Bei Rauchentwöhnung fallen die im Zigarettenrauch vorhandenen Reparaturhemmstoffe weg, die erhöhte DNA-Reparaturkapazität bleibt aber noch einige Zeit erhalten, und so scheint ein Zusammenhang mit niedrigeren Werten für die SCE-Rate vorzuliegen.

Auffallend ist, daß Patient 6 nach dreiwöchiger Therapie einen hochsignifikanten Anstieg der SCE-Rate zeigte, wobei dies möglicherweise auf die antirheumatische Therapie mit Ketoprofen zurückzuführen war, zumal sich auch bei Patient 7 eine steigende Tendenz hinsichtlich der SCE-Rate verfolgen ließ.

Wie wir aus eigenen Untersuchungen wissen, ist ein numerischer Anstieg der SCE-Rate unter antirheumatischer Therapie grundsätzlich möglich (Klein et al. 1981). Unsere Ergebnisse mit Piroxikam sprechen allerdings gegen eine mutagene Wirkung dieses Antirheumatikums. Inwieweit Ketoprofen zu SCE-Veränderungen führt, läßt sich auf Grund der geringen Fallzahl derzeit nicht sicher beurteilen, weshalb weitere Untersuchungen unsererseits vorgesehen sind.

Bei Vergleich der Mittelwerte der SCE-Frequenzen vor und nach der komplexen Therapie (Abbildung 3) im Rahmen eines Rehabili-

tationsverfahrens zeigte sich, daß keine signifikanten Unterschiede nachweisbar waren, obwohl sich unter den Probanden drei Patienten befanden, welche zu Nichtrauchern wurden und alle Patienten ein Antirheumatikum erhielten.

Wegen der zum Teil nicht erklärbaren SCE-Veränderungen sind weitere zytogenetische Untersuchungen bei rheumatischen Erkrankungen, wie auch unter der Therapie mit verschiedenen Antirheumatika erforderlich.

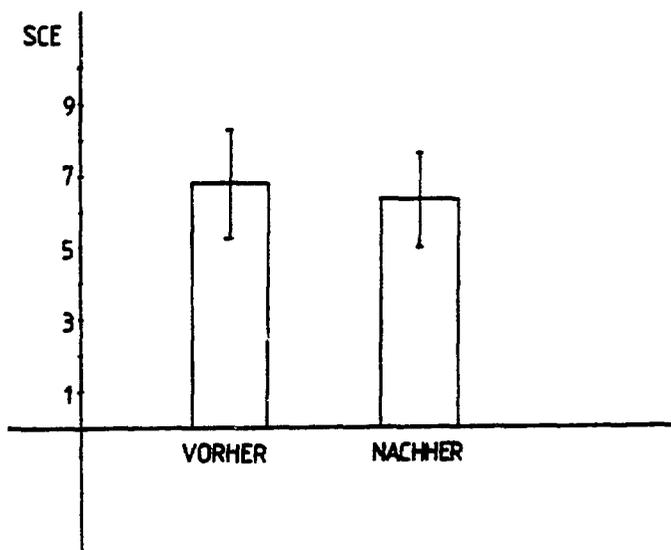


Abbildung 1: Mittelwerte und Standardabweichungen von 7 Patienten mit Morbus Bechterew vor und nach antirheumatischer Therapie

LITERATUR

- ALTMANN, H.: persönliche Mitteilung 1981.
- CARRANO, A.V., L.H. THOMPSON, P.A. LINDL, J.L. MINKLER: Sister chromatid exchange as an indicator of mutagenesis. *Nature* 271 (1978) 551-553.
- CHAGANTI, R.S.K., S. SCHONBERG, J. GERMAN: A manifold increase in sister chromatid exchanges in Bloom's syndrome lymphocytes. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* 71 (1974) 4508-4512.
- EBERL, R., H. TUSCHL, H. ALTMANN: Über die Rolle der DNA-Reparatur bei gewissen rheumatischen Erkrankungen. *Wiener klin.Wochenschr.* 85 (1973) 315-318.
- EGG, D., R. GÜNTHER, A. TOPALOGLOU, H. ALTMANN: DNA-Reparatur und DNA-Synthese bei Spondylitis ankylosans. IN: *DNA-Repair and Late Effects*. Ed.: H. Altmann. Rötzer-Druck Eisenstadt 1977, 63-67.

- GÜNTHER, R., H. ALTMANN: DNA-Synthese und DNA-Repair bei chronischem Rheumatismus unter Einwirkung kleiner Dosen natürlicher Radioaktivität (Radon). Zeitschrift f.Rheumatol. 37 (1978) 17-22.
- GÜNTHER, R., D. EGG, M. HEROLD: DNA-Repair und Kortisolproduktion unter Radontherapie bei Gesunden und Rheumakranken. Zeitschrift f.angewandte Bäder- und Klimaheilkunde Nr. 4 (1979) 336-355.
- KATO, H., H.F. STICH: SCE in ageing and repair-deficient human fibroblasts. Nature 260 (1976) 447-448.
- KATO, H.: Induction of sister chromatid exchanges by chemical mutagens and its possible relevance to DNA-repair. Exp.Cell Research 85 (1974) 239-247.
- KLEIN, G., M. KECK, K. TURANITZ: Einfluß von Piroxikam auf den Schwesternchromatid-Austausch in menschlichen Lymphozyten. Therapiewoche 31 (1981) 5078-5080.
- LAMBERT, B., K. HANSSON, J. LINDSTEN, M. STEN, B. WERELIUS: Bromdeoxyuridine-induced sister chromatid exchanges in human lymphocytes. Hereditas 83 (1976) 163-174.
- PERRY, P., S. WOLFF: New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. Nature 251 (1974) 156-158.
- SPERLING, K., R.D. WEGNER, H. RIEHM, G. OBE: Frequency and distribution of sisterchromatid exchanges in a case of Fanconi's anemia. Humangenetik 27 (1975) 227-230.
- TRAUPE, H., R. HAPPLE, My A. KIM: DNA-Reparatur bei Xeroderma pigmentosum. Fortschr.Med. 99 (1981) 212-214.

DNA-REPARATUR UND CHROMATIN (Proc. Symposium Saalfelden 1981).
Hrsg.: H. Altmann und G. Klein. Seibersdorf 1982, 117-118.

SPONTANEOUS FORMATION OF INTERSTRAND CROSSLINKS IN
CELLULAR DNA BY FREE OXYGEN RADICALS

E. WUNDER

Institut für Anthropologie und Humangenetik, Heidelberg, BRD

ABSTRACT

DNA under cellular conditions is not entirely stable. It is well known, for example, that deamination of bases and formation of apurinic sites occurs at recognizable rates in vivo. It is understandable therefore, that there is a continuously repair action at constitutive low levels, and several of the respective repair enzymes have been characterized already. In general, mutant cells with defects in repair mechanisms for endogenous species of DNA damage can be expected to display spontaneously adverse genetic effects.

Recent results in Fanconi's Anemia, an inherited human disease with spontaneous chromosomal fragility and high rates of malignancies, provide new insight into this field. The number of chromosome breaks in cultured cells decreases, if superoxide dismutase, katalase or free radical scavengers are applied, and it increases, when cells are cultivated at high oxygen level. This demonstrates, that the level of free oxygen radicals is the critical parameter for the so called "spontaneous", or better "endogenous" chromosomal damage.

It has been recognized before, that these same cells are most sensitive, among exogenous mutagens, against bivalent alkylants; these substances produce interstrand crosslinks in the DNA. We have succeeded now, by using specific electrophoretic methods, to demonstrate, that free oxygen radicals likewise generate crosslinks in DNA; this links both phenomena, spontaneous

chromosome fragility and sensitivity towards bivalent alkylants, to the same basic defect in Fanconi's Anemia cells. Both are caused by the same type of primary damage in DNA, which cannot be repaired properly in this mutant.

In contrast with the numerically prevalent lesions, like strand breakage and base damage ("major lesions"), which are repaired fast and efficiently, crosslinks are generated at much lower rates ("minor lesions"); any normal cell seems to repair them with a small but sufficient capacity. If repair is not complete, even low numbers of crosslinks may result in severe genetic damage including carcinogenesis and leucemia.

DNA-REPARATUR UND CHROMATIN (Proc. Symposium Saalfelden 1981).
Hrsg.: H. Altmann und G. Klein. Seibersdorf 1982, 119-124.

THE EFFECT OF PHARMACEUTICAL ADDITIVES ON THE DNA-
SYNTHESIS AND ON REPAIR MECHANISMS

E. SATORY I. RACZ

Pharmaceutical Institute, Semmelweis University,
Budapest

Before marketing a new drug, very careful examination of the effective substances is obligatory, whether they have mutagenic and carcinogenic effects. At the same time there are no rules for the examination of the old pharmaceutical additives. Therefore our aim was to examine first ingredients used in pharmaceutical technology, which get into the organ partly in great doses, partly for a long period of time.

H^3 -thymidine incorporation in the DNA of cells was used for measuring the semiconservative DNA-synthesis, restrained synthesis and UV repair mechanisms (1). Our mouse spleen cell suspension contained about $1.7-1.9 \times 10^7$ cells/ml. 10^{-2} M Hydroxyurea (HU) (Serva) was used. The irradiation was carried out according to Evans (2) with F₃₀T₇C Mercury lamp: output $533 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ at 254 nm. The used doses were $5 \times 10^{-5} \text{J}/10^{-6} \text{m}^2$. $3.7 \times 10^5 \text{Bq}$ thymidine (methyl ^3H) (spec.act. 3.959 TBq/kg) to each tube. The DNA concentration was measured photometrically (3), the incorporation of H^3 -thymidine by means of an Inter-technique liquid scintillation counter.

The lower doses of substances examined were the same as used in the industrial technology, the higher ones were measured for safety.

In the case of Carboxymethyl amyllum (Fig. 1), Carboxymethyl cellulose sodium salt (Fig. 2), Polivinylypyrrolidin (Fig. 3)

and Carbowax (Fig. 4) we could not find any changes in the measured parameters.

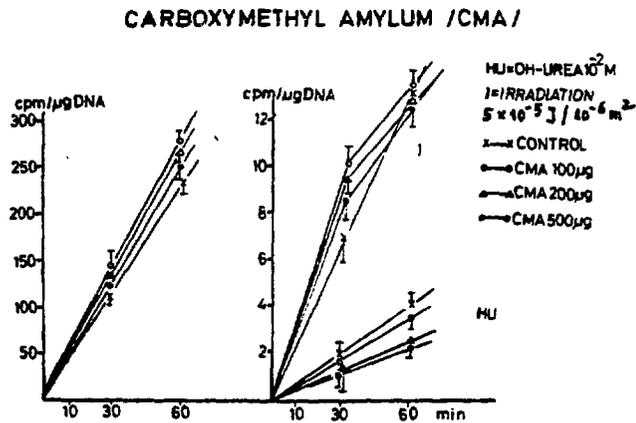


Figure 1

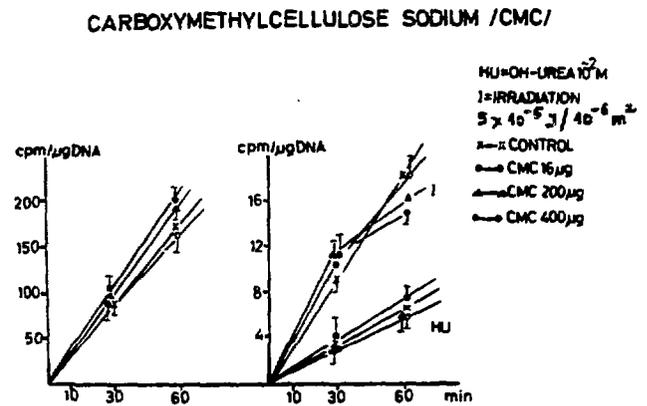


Figure 2

Legend to figures: In all figures on the left side the semi-conservative synthesis, on the right side below the restrained synthesis, above the UV repair mechanism can be found. cpm/ μg DNA is indicated on the ordinate plotted against the incubation period on the abscissa. The 0 time value is deducted.

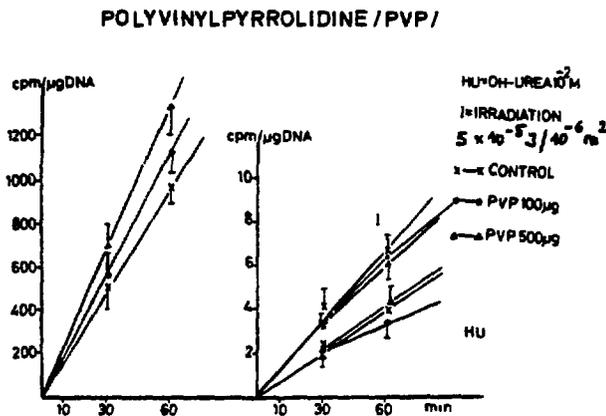


Figure 3

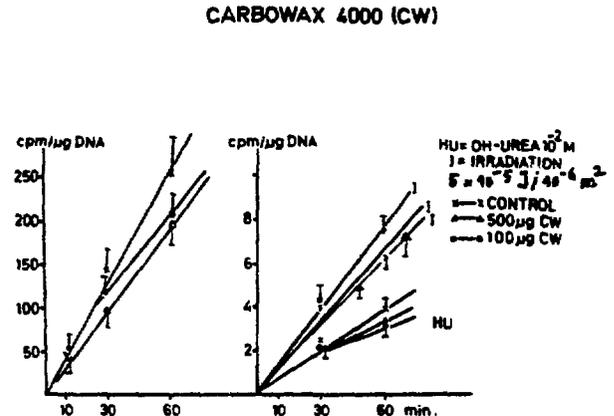


Figure 4

More and more aerosol products are used in medicine and also in everyday life. Therefore one of the more frequently applied propellents was examined, the Freon 14:112 mixture. It is insoluble in water, can not be examined with water, so it was examined in vivo. The abdominal skin surface of mice was depilated and this area was sprayed once or 3 times. Mixture did not cause any changes only when the skin was sprayed for 6 days, the 60 minute repair values showed an inhibition effect (Fig. 5).

At the usage of aerosol products, a big quantity of the propellant goes into the air and will be inhaled. On the other hand a lot of aerosol medicines are on the market. Therefore in the next series of experiments a gauging tube was placed on the aerosol flask and was inserted deep into the mouth of the animal and nearly equal quantities were administered. In animals treated either once or 3 times no significant changes could be found. The UV repair activity was inhibited only after 60 minutes. In these experiments the deviation was much greater because of experimental circumstances (Fig. 6).

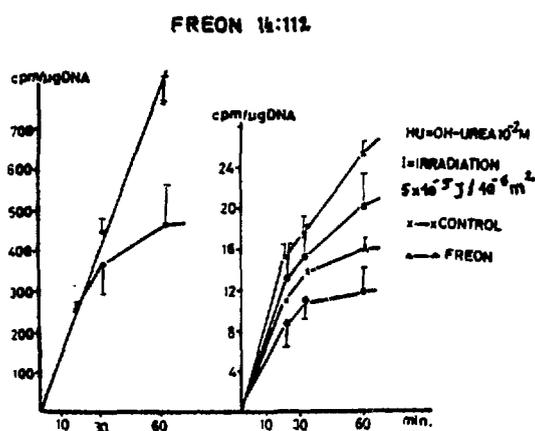


Figure 5

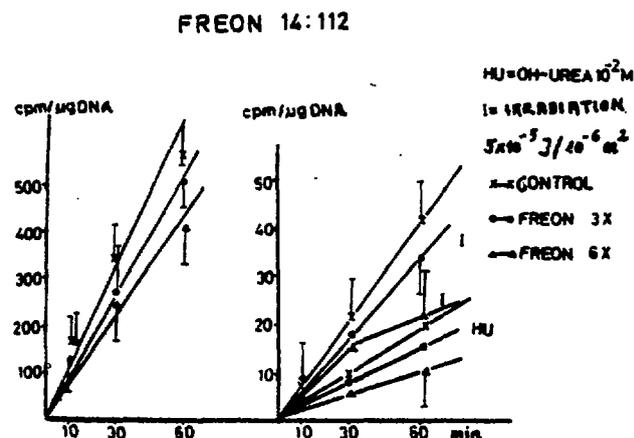


Figure 6

In our following experiments the Eudragit L and Eudragit S products of Röhm Pharma were examined. These are film coating substances utilised principally as coating for orally administered dosage forms, particularly tablets, pills and capsules, which are resistant to gastric juice but soluble in intestinal juice. The distinguishing letters of this acrylic resin basis "L" and "S" mean "leichtlöslich" and "schwerlöslich". To achieve a coating which is resistant to gastric juice it is necessary to apply lacquer containing 3 to 5 mg of dry substance per cm² of the tablet surface. We did not use any organic solvents, only the water suspension of the two materials was applied. The daily dose was 3 mg/mouse orally. In Fig. 7 the following can be seen, - if Eudragit L was administered once, it had no inhibitory effect, only after 3 doses. After 6 days the inhibition is very strong either in synthesis or in repair activities. The same was true with the "S" product, too (Fig. 8).

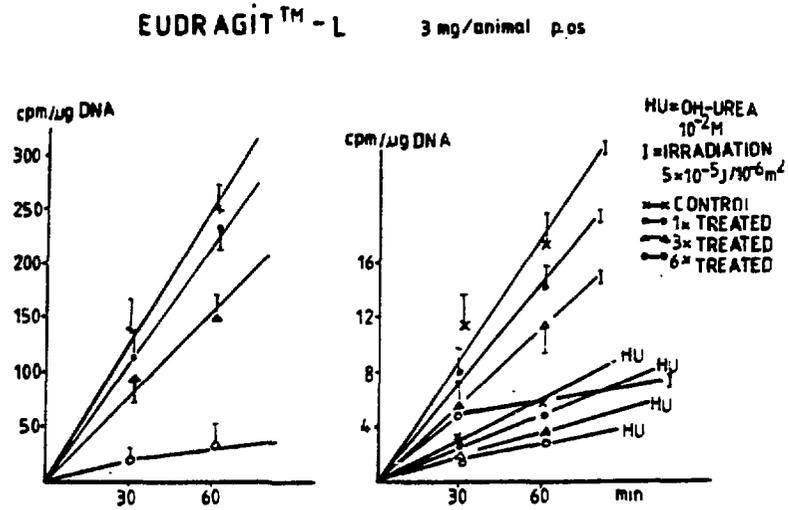


Figure 7

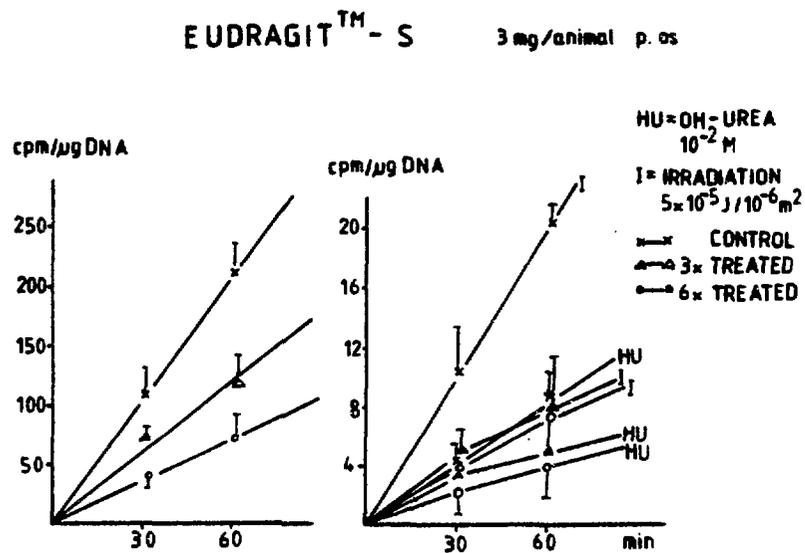


Figure 8

Taking into consideration that these ingredients get into the human organism for long period of time, - it seems to be necessary to further examine the possible mutagenic effect of these materials with one or more other methods.

The next ingredient which is also often used in pharmaceutical

practice as solvent, is the Dimethylacetamide. In the practice 2:1, 1:1 or 1:2 mixture with water is used (that means about 50 μ g/ml or about 10^{-4} mol/ml). In in vitro experiments (Fig.9) at 60 minutes of incubation time we got strong, significant inhibition in each measured parameter. In in vivo experiments, 24 hours after the treatment (Fig. 10) the inhibition is more expressed. The same was found at chronic experiments too, - it means that in animal treated 3 times and 6 times the inhibition was equally strong.

DIMETHYLACETAMIDE in vitro

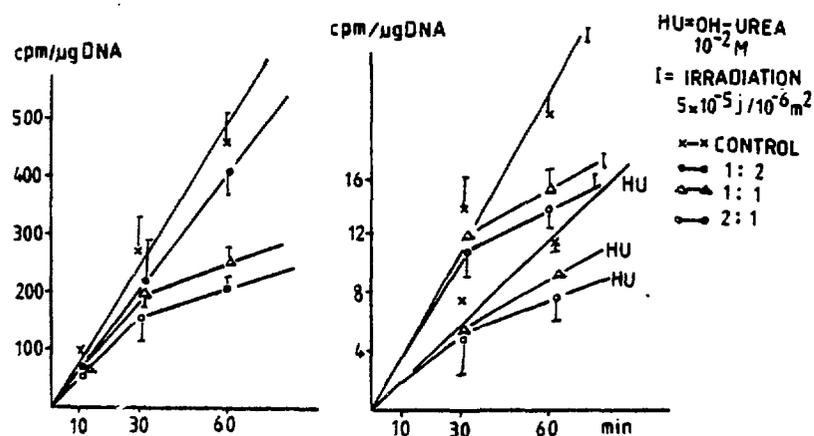


Figure 9

DIMETHYLACETAMIDE in vivo

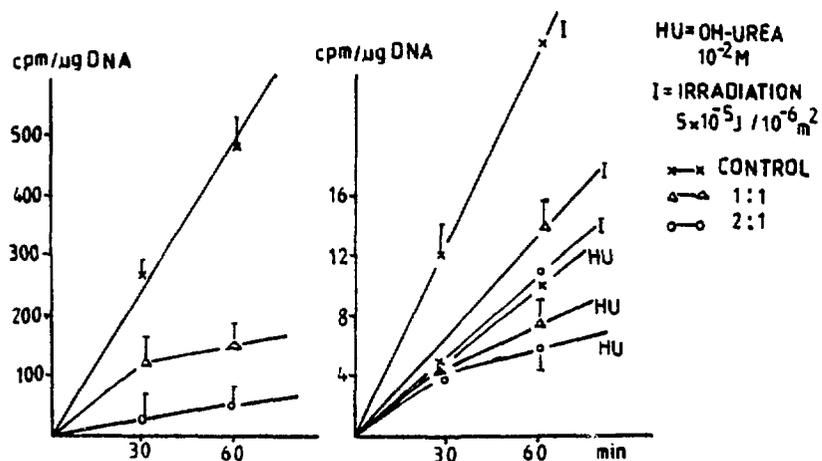


Figure 10

In the future we plan to measure the effect of these ingredients with other methods too, to decide the real possible mutagenic effect.

REFERENCES

1. KOC SIS, F., W. KLEIN, H. ALTMANN: Z.f.Naturforsch. 280, 131 (1973).
2. EVANS, R.G., A. NORMAN: Nature 217, 455 (1968).
3. BURTON, K.: Biochem.J. 62, 315 (1956).

DNA-REPARATUR UND CHROMATIN (Proc. Symposium Saalfelden 1981).
Hrsg.: H. Altmann und G. Klein. Seibersdorf 1982, 125-136.

ALTERSABHÄNGIGKEIT DER DNA-REPARATUR BEI DER RATTE
NACH DNA-SCHÄDIGUNG DURCH KANZEROGENE SUBSTANZEN

H. NIEDERMÜLLER

Institut für Physiologie der Veterinärmedizinischen
Universität Wien

ZUSAMMENFASSUNG

Eine der wichtigsten und vielleicht auch die unmittelbarste Ursache von Krebs scheint die Schädigung der DNA zu sein. Diese dürfte auch eine wichtige Rolle beim Alternsprozeß spielen. Viele dieser Schädigungen sind die Folge der Wirkung chemischer Substanzen aus der Umwelt. Solche Verbindungen ermöglichen es der Forschung, DNA-Reparaturmechanismen zu untersuchen und ein Modell für die Prüfung von Änderungen der DNA-Reparaturkapazität mit dem Altern zu erstellen. Zur Schädigung der DNA von männlichen Sprague-Dawley-Ratten im Alter von 6 und 24 - 26 Monaten wurden zwei karzinogene Substanzen verwendet: N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff (MNH) und N,N-Dimethylnitrosoamin (DMN). Die DNA-Reparatur wurde als unprogrammierte DNA-Synthese (UDS) in 10 verschiedenen Organen gemessen. MNH reagiert mit der DNA ohne vorher metabolisiert werden zu müssen und zeigt höhere UDS in niedriger Konzentration als DMN, welches vor der Reaktion enzymatisch metabolisiert werden muß. Dieses Ergebnis legt eine stärkere Schädigung der DNA durch MNH nahe. Es konnte eine deutliche Induktion der Reparatur in Milz, Lunge, Niere und Herz junger Ratten, wie auch in den Geweben von Niere und Duodenum alter Tiere gefunden werden. Wir bemerkten nach Schädigung durch MNH eine Verminderung der UDS bei alten Ratten in Haut, Gehirn und Herz, nach Schädigung durch DMN in Niere, Duodenum und Leber und nach Schädigung durch beide Mutagene eine solche in Milz, Lunge und Hoden. Diese Resultate bestätigen jene, die durch Schädigung der DNA mittels γ - und UV-Strahlung erhalten wurden.

EINLEITUNG

DNA-Schädigung und darauffolgende DNA-Reparatur-Prozesse sind von großer Wichtigkeit für die Produktion und die Vermeidung von Mutationen. Hierbei ist die DNA-Reparatur ein biologischer Mechanismus, der nicht nur mit vielen zellulären Ereignissen bei menschlichen Krankheiten (über tierische ist heute noch sehr wenig bekannt) korreliert ist, sondern offensichtlich auch beim Altern eines Organismus eine gewisse Bedeutung hat.

Es gibt einige Hinweise auf eine niedrigere DNA-Reparatur-Kapazität in bestimmten Zellen eines Organismus höheren Alters. Neben unseren eigenen Untersuchungen nach γ - und UV-Bestrahlung in vivo (1, 2, 3, 4) wurde eine solche Erniedrigung auch durch andere Autoren festgestellt. Die meisten dieser Untersuchungen wurden an Fibroblasten, aber auch anderen Zelllinien, durchgeführt (5,6,7,8,9). Da es möglich erscheint, daß auch zelluläre Mechanismen in Zellkultur ein anderes Verhalten als im physiologisch integrierten Organismus zeigen, so wird verständlich, daß es für uns interessant geworden ist, die Reparatur-Kapazität auch in vivo zu untersuchen.

Ein weiterer Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Reparatur und Altern waren Untersuchungen, welche eine Korrelation der Anfangsgeschwindigkeit und des maximalen Reparaturniveaus mit der maximalen Lebenserwartung feststellten (10, 11, 12, 13, 14). Obgleich manche Autoren, über die Tice (15) in einer Monographie ausführlich berichtet, einen solchen Zusammenhang nicht feststellen konnten, ist die Zahl der Bestätigungen inzwischen weitaus größer, erst vor kurzem wurde über eine umfangreiche Untersuchung mittels verschiedener Methoden zur Reparaturmessung berichtet (16), wobei an 30 verschiedenen Tierarten des Zoos von San Diego ein solcher Zusammenhang bestätigt werden konnte. Die Verbindung dieser Korrelation mit einer veränderten Reparatur-Kapazität in höherem Alter könnte man vielleicht folgendermaßen konstruieren:

Unter der Annahme, daß Mutations-Frequenzen bei allen Spezies von gleicher Größenordnung sind (17, 18, 19), muß ihre Reparatur-Kapazität, bezogen auf die bei Hart und Setlow (10) ange-

gebenen Werte, dieselbe im gleichen biologischen Alter (20, 21) sein. Denn DNA-Schäden akkumulieren über die gesamte Lebensspanne (17, 19, 22, 23), bliebe aber bei diesem Vorgang die Geschwindigkeit der Beseitigung solcher Schäden, also die Reparatur-Kapazität, konstant hoch, dann wäre es nicht möglich, in höherem Alter mehr Schäden zu beobachten.

Auf Grund dieser Überlegungen haben wir am intakten Organismus, der Sprague-Dawley-Ratte, begonnen, Reparatur-Untersuchungen durchzuführen.

Als Schädigende Agenzien verwendeten wir anfangs γ -Strahlung, 500 rad einer Co^{60} -Quelle als Ganzkörperbestrahlung (2, 3). Die zweite Art der Schädigung setzten wir durch UV-Strahlung in der DNA der Rückenhaut (Niedermüller, in Druck) und schließlich verwendeten wir verschiedene i.p.-applizierte kanzerogene Substanzen.

MATERIAL UND METHODE

Für diese Untersuchungen verwendeten wir 56 männliche weiße Sprague-Dawley-Ratten (Stamm OFA 17), 28 im Alter von 6 Monaten (KG 318 ± 7 g) und 28 im Alter von 24-26 Monaten (KG 492 ± 8 g). Die Tiere wurden in Makrolon^R-IV-Käfigen bei einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 12 h und 25°C gehalten und mit Wasser und Altromin^R-Futter ad libitum versorgt. 12 h vor der Applikation der DNA-schädigenden Verbindungen wurde das Futter von den Käfigen entfernt, um die Konzentrationen der für diese Untersuchung wichtigen Substanzen in den Zellen aller Ratten gleich hoch zu halten. Zur Schädigung der DNA verwendeten wir zwei kanzerogene Substanzen: MNH und DMN. MNH wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO, $5 \cdot 10^{-4}$ mol.ml⁻¹) gelöst und 0.2 ml dieser Lösung pro kg KG wurden einem Viertel jeder Gruppe i.p. appliziert (I). DMN wurde in Ringer-Lösung gelöst ($5 \cdot 15^{-3}$ mol.ml⁻¹), und 2 ml dieser Lösung pro kg KG wurden dem anderen Viertel jeder Altersgruppe i.p. appliziert (II). Der Rest der Tiere diente als ungeschädigte Kontrollen: I erhielten i.p. 0.2 ml DMSO und II 2 ml Ringer-Lösung pro kg KG (24).

Unmittelbar nach der Applikation der Karzinogene erhielten alle Ratten i.p. 1ml pro kg KG einer Lösung, welche auf Ringer-Lösungs-Basis pro ml 3.7 MBq H³-TdR (Methyl-H³-Thymidin, The Radiochemical Centre Amersham, 1.5-2.2 TBq.mmol⁻¹), 4 mg Thymin und 2 mmol Hydroxyharnstoff (HU) (25) enthielt. Diese Injektion wurde 3 h später noch einmal wiederholt. 24 h nach der Applikation der karzinogenen Substanzen wurden die Ratten durch Herzpunktion nach kurzer Äthernarkose getötet und das gesamte Blut zur Bestimmung der H³-TdR-Aktivität gesammelt. Bei UDS durchführenden Ratten liegt diese Aktivität unter der der Kontrollen. Unmittelbar nach der Tötung wurden folgende Organe entfernt, in flüssigem N₂ tiefgefroren und später gewogen: Milz (MI), linke Lunge (LU), Dermis des Rücken (DE), Gesamtgehirn (GH), linker Hoden (HO), Herz (HE), Skelettmuskel (M. quadriceps femoralis, SM), Leber (lob.sin.med., LE), linke Niere (NI) und Duodenum (DU).

Zur Isolierung der DNA wurden die Organe in folgender Lösung homogenisiert: 8 mol Harnstoff, 0.24 mol Natriumphosphat (pH 6.8, Na-P), 10⁻³ mol EDTA und 10 g Natriumdodecylhydrogensulfat (SDS) pro Liter Lösung. Die DNA wurde mittels der leicht modifizierten Methode nach Meinke (26) isoliert: das klare opaleszierende Homogenat wurde auf eine Säule aufgebracht, welche 2 g Trockengewicht Hydroxylapatit Bio-Gel HTP (Bio.Rad Lab.) enthielt (Betthöhe 25 mm, 18 mm Durchmesser). Die Säulen wurden vorher mit 30 ml 8 mol Harnstoff und 0.24 mol Na-P pro Liter äquilibriert. Das Bett wurde dann mit 50 ml einer Lösung von 0.014 mol Na-P pro l gewaschen, um Harnstoff, Proteine und RNAs zu entfernen, danach wurde die DNA mit 0.48 mol Na-P pro l eluiert, wobei die ersten 5 ml verworfen und die nächsten 20 ml gesammelt wurden. In dieser Lösung wurde die Konzentration der DNA bei 260 nm und auch mittels der Dische-Reaktion (1930) bestimmt, die Radioaktivität wurde in einem Flüssigszintillationszähler Packard Tri-Carb 3375 gemessen. Die spezifische Aktivität (sp.A.) der DNA wurde für jede der zwei Proben eines Organs berechnet.

Der Mittelwert der sp.A. jedes Organs eines Tiere mit geschädigter DNA wurde auf den des korrespondierenden Organs des entsprechenden Kontrolltieres bezogen und diese Werte als repräsentativ für das Ausmaß der UDS angenommen (relative Reparatur). Diese Art der Berechnung ist der Grund für den geringen Unterschied, der manchmal zwischen dem Mittelwert der Quotienten der sp.A. und dem Mittelwert der UDS-Werte jeder Gruppe auftritt.

ERGEBNISSE

In Tabelle 1 haben wir die sp.A. ($\bar{x} \pm s_x$) in den einzelnen Organen nach Schädigung durch MNH, und in Tabelle 2 dieselbe nach Schädigung durch DMN dargestellt.

Tabelle 1: Sp.A. ($\text{dpm} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ DNA, $\bar{x} \pm s_x$) nach Schädigung durch MNH (I). J (6 m), A (24-26 m), V (DNA-Schädigung), K (Kontrolle).

	MI	LU	DE	GH	HO	HE	SM	LE	NI	DU
JV	614 94	854 144	23.4 2.4	29.1 10.1	1252 163	24.5 2.1	67.7 8.3	31.7 10.6	1422 207	16.7 1.8
JK	373 113	522 86	18.6 0.9	22.4 4.2	1004 165	15.7 1.1	55.1 9.4	16.9 1.9	904 192	14.2 1.0
AV	377 70	737 60	20.5 2.0	15.9 1.7	949 268	19.9 1.8	42.4 2.8	15.0 1.1	1099 135	15.2 2.6
AK	284 32	715 176	22.1 3.9	17.0 0.8	797 100	17.8 2.1	41.6 2.2	10.9 1.1	677 95	12.0 1.8

Bei jungen Ratten (6 m) zeigen alle Organe eine höhere Inkorporation von H3-TdR in die geschädigte DNA, als in die ungeschädigte. Unterschiede sind mit $p < 0.01$ signifikant in den Organen LU, DE und HE, mit $p < 0.05$ in MI, LE und NI.

Bei alten Ratten (24-26 m) finden wir einen signifikanten Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe nur in LE und NI ($p < 0.01$). DE und GH zeigen im Gegensatz dazu sogar höhere, aber nicht signifikante, Werte bei alten Tieren.

Tabelle 2: Sp.A. ($\text{dpm} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ DNA, $\bar{x} \pm s$) nach Schädigung durch DMN (II). J (6 m), A (24-26 m), V (DNA-Schädigung), K (Kontrolle).

	MI	LU	DE	GH	HO	HE	SM	LE	NI	DU
JV	468 71	988 100	26.0 3.5	29.3 5.0	1368 208	23.1 3.7	84.4 26.6	23.4 1.5	1226 159	14.8 1.5
JK	280 33	683 109	19.0 1.8	23.3 1.8	1062 157	20.2 3.8	77.6 16.6	16.9 2.0	1041 146	12.5 1.3
AV	543 111	685 96	31.4 8.7	28.7 9.0	1239 286	27.4 5.9	77.5 22.6	17.9 3.6	1139 265	13.8 1.2
AK	423 54	839 73	20.4 2.3	23.6 3.0	1068 197	24.8 4.4	75.7 17.3	12.7 1.0	1034 148	13.2 1.9

Signifikante Unterschiede zwischen der sp.A. der Versuchs- und Kontrollgruppe bei jungen Ratten (6 m) waren nur in MI und LU ($p < 0.01$) und LE und DE ($p < 0.05$) zu bemerken. Obwohl die Inkorporation in die geschädigte DNA in allen Organen höher ist, sind die Unterschiede nicht so deutlich wie nach Schädigung durch MNH.

Bei alten Ratten (24-26 m) konnte ein signifikanter Unterschied der Inkorporation nur bei LE ($p < 0.05$) festgestellt werden.

In Abbildung 1 ist die UDS nach Schädigung durch MNH und in Abbildung 2 nach Schädigung durch DMN dargestellt.

Bei den jungen Ratten, verglichen mit den alten, ist die UDS in MI und LU viel höher ($p < 0.01$), während die Erhöhung in HO, HE und SM weniger stark ausgeprägt ist ($p < 0.05$).

Wie in Abb. 2 gezeigt, konnten wir höhere UDS in vielen Organen der jungen Ratten feststellen: MI und LU ($p < 0.001$), NI, HO und DU ($p < 0.01$) und in LE ($p < 0.05$).

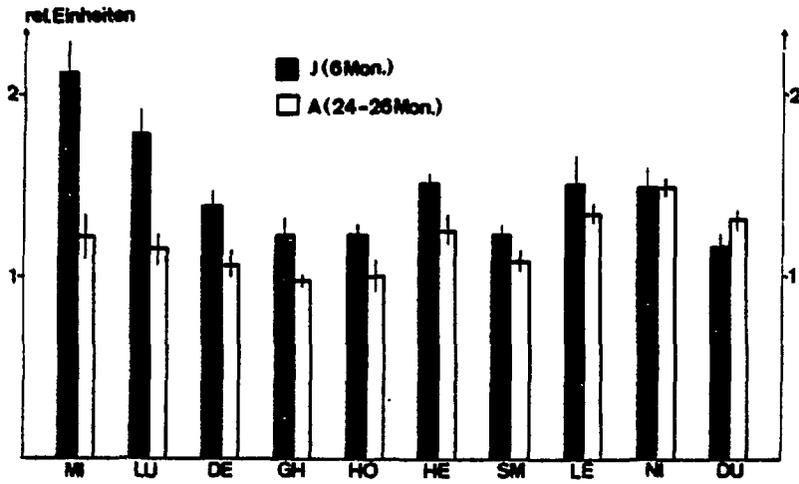


Abb.1

Abbildung 1: UDS (Relative Reparatur) nach Schädigung durch MNH (I).

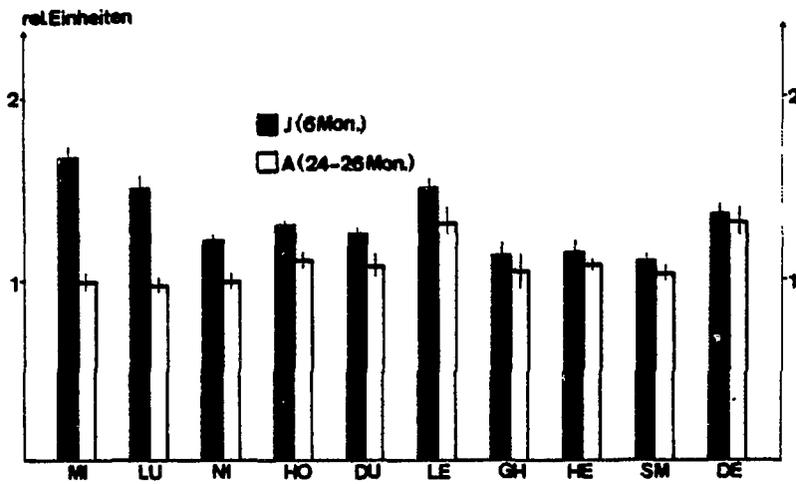


Abb.2

Abbildung 2: UDS (Relative Reparatur) nach Schädigung durch DMN (II).

DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Nach beiden Arten der Schädigung ist die Reparaturkapazität besonders stark in MI und LU, vor allem bei jungen Ratten, ausgeprägt, ein Befund, der auch nach γ -Schädigung erhalten wurde. Dieser Effekt ist vielleicht teilweise auf den hohen Anteil an Lymphozyten in diesen Organen zurückzuführen (Abb. 1 und 2). Auch die sp.A. ist in diesen beiden Organen, neben HO und NI, am höchsten (Tab. 1 und 2).

In allen anderen untersuchten Organen sind die UDS-Werte niedriger und in ihrem Ausmaß sehr ähnlich. Der sehr niedrige Wert im DU junger Tiere (Abb. 1) beruht vielleicht darauf, daß HU in den Epithelzellen schnell ausgeschwemmt wird und dadurch die UDS nach 24 h von der programmierten DNA-Synthese überlagert wird. Dies könnte bei allen sich schnell teilenden Zelltypen der Fall sein, obwohl wir bei den HO der jungen Tiere ein eher hohes Reparatur-Niveau bemerken konnten. HO besteht jedoch andererseits aus mehreren verschiedenen Zelltypen, wovon einige in der G_0 -Phase verbleiben.

Nach Schädigung durch MNH (Abb. 1) konnten wir eine signifikante, aber niedrige Reparaturkapazität bei alten Ratten nur in MI, HE, LE, NI und DU bemerken. LE und NI sind essentiell wichtige Organe und haben daher wahrscheinlich eine hohe Redundanz ihrer Reparatur-Kapazität, die daher auch bei alten Tieren noch nicht vollkommen erschöpft ist. Dasselbe gilt in geringerem Ausmaß auch für MI. Die hohe Leistungsfähigkeit für Resorptionsvorgänge könnte der Grund für die lange Aufrechterhaltung der Reparatur-Kapazität im DU sein, wobei zusätzlich noch die erniedrigte Teilungsrates im Alter (27) zu berücksichtigen ist. Die erhöhte Reparatur-Kapazität könnte deshalb eine annähernd korrekte Proliferation der DU-Epithelien während des ganzen Lebens aufrechterhalten. Daß auch die Leistung des HE bis in das hohe Alter erhalten werden muß könnte die noch vorhandenen Reparatur-Mechanismen erklären (28).

Nach Schädigung durch DMN bei alten Ratten sehen wir Reparatur nur in LE und DE (Abb. 2). Eine mögliche Erklärung für dieses

Ergebnis wäre der langsamere Verlauf der enzymatischen Veränderung des DMN, wodurch nur in der LE noch genügend hohe Konzentrationen an schädigenden Ionen erreicht würden. Zusätzlich ist die geringere Reparatur-Kapazität alter Ratten zu berücksichtigen. In DE (nicht signifikante UDS) könnte bei jungen und alten Tieren das gleiche Replikations-Reparatur-Verhältnis herrschen und es könnten durch die massive Schädigung nach Anwendung von MNH auch Reparatur-Mechanismen bei alten Ratten beeinträchtigt sein, was nach DMN nicht der Fall ist.

Nach Applikation beider Kanzerogene ist die Betrachtung der UDS im GH interessant (Abb. 1 und 2): Die Konzentration an schädigenden Ionen könnte bei jungen Ratten nach MNH höher sein als nach DMN, daher auch der höhere UDS-Wert. Alte Tiere zeigen im GH überhaupt keine Reparatur. Hingegen könnte man erwarten, daß gerade sich nicht mehr erneuernde Zellen eine besonders hohe Reparatur-Kapazität haben müßten, um ihre Funktion über die gesamte Lebensdauer hinweg zu gewährleisten, was beim HE feststellbar war. Aber auch bei jungen Tieren ist die Reparatur-Kapazität nicht sehr hoch: vielleicht ist auch die Schädigung der DNA des GH geringer als die anderer Organe; nach Schädigung durch γ -Bestrahlung konnten wir im GH bei keiner Altersgruppe UDS feststellen (1). Aus anderen Untersuchungen (29) ist eine solche geringe Sensibilität des GH gegenüber Schädigung durch γ -Strahlen bekannt.

In den HO konnten wir bei jungen Ratten im Gegensatz zu alten Reparatur feststellen. Zwar nimmt die Sensibilität der HO gegenüber schädigenden Agenzien mit dem Alter ab (30, 29), trotzdem scheint es uns nicht realistisch, keine Schädigung der alten HO anzunehmen. Daher schließen wir auf einen Verlust der Reparatur-Kapazität mit dem Altern.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß es ohne viele weitere Untersuchungen, z.B. der Kinetik und Zeitabhängigkeit der Reparatur in verschiedenen Organen, oder des Musters der verschiedenen Reparatur-Mechanismen, nicht möglich sein wird, vollständig

alle Aspekte der Reparatur in verschiedenen Organen zu diskutieren. Was wir glauben gezeigt zu haben, ist eine deutliche Veränderung der als UDS gemessenen Reparatur-Kapazität in einigen Organen, d.h. eine Erniedrigung nach dem Zeitpunkt des Vitalitätsmaximums (31). Widersprüchliche Resultate anderer Forschergruppen (15) können einerseits auf verschiedene Ansätze zur Messung der Reparatur, andererseits auf Unterschiede zwischen diesen komplizierten Stoffwechselmechanismen in Zellkulturen und im Gesamtorganismus zurückzuführen sein.

LITERATUR

1. NIEDERMÜLLER, H., G. HOFHECKER, A. KMENT: Untersuchungen zur Altersabhängigkeit der DNA-Reparaturkapazität in verschiedenen Organen der Ratte. In: DNA-Repair and Late Effects. Roetzer-Druck Eisenstadt. Ed.: H. Altmann. 1976, 11.
2. NIEDERMÜLLER, H., G. HOFHECKER, A. KMENT: Untersuchungen der Kinetik von DNA-Reparaturprozessen an sechs Monate alten Ratten. In: DNA-Repair and Late Effects. Ed.: H. Altmann. Roetzer-Druck Eisenstadt, 1977, 109.
3. NIEDERMÜLLER, H., G. HOFHECKER, A. KMENT: Influence of Age on DNA repair in vivo. Nuclear Research Centre, Negev-Israel (1980) 15.
4. NIEDERMÜLLER, H.: Experimentell-Gerontologische Untersuchungen zur DNA-Reparaturkapazität von Ratten. Habil. Schr., Med.Vet.Univ. Wien 1977.
5. HART, R.W., R.B. SETLOW: DNA repair in late-passage human cells. Mech.Age.Dev. 5 (1976) 67.
6. BOWMAN, P.D., R.L. MEEK, C.W. DANIEL: Decreased unscheduled DNA synthesis in nondividing aged WI 38 cells. Mech.Age. Dev. 5 (1976) 251.
7. EPSTEIN, J., J.R. WILLIAMS, J.B. LITTLE: Deficient DNA repair in progeria and senescent human cells. Radiat. Res. 55 (1973) 527.
8. EPSTEIN, J., J.R. WILLIAMS, J.B. LITTLE: Rate of DNA repair in progeric and normal human fibroblasts. Biochem.Biophys.Res.Comm. 59 (1974) 850.
9. LITTLE, J.B., J. EPSTEIN, J.R. WILLIAMS: Repair of DNA strand breaks in progeric fibroblasts and aging human diploid cells. In: Molecular Mechanisms für Repair of DNA. Eds.: P.C. Hanawalt and R.B. Setlwo. B. Plenum Press, New York 1975.
10. HART, R.W., R.B. SETLOW: Correlation between deoxyribonucleic acid excision-repair and lifespan in a number of mammalian species. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 71 (1974) 2169.

11. SACHER, G.A., R.W. HART: Longevity, aging and comparative cellular and molecular biology of the house mouse, *Mus musculus*, and the white-footed mouse, *Peromyscus leucopus*. In: Genetic Effects on Aging. Ed.: D.H. Harrison. Liss, New York 1977, 73.
12. PAFFENHOLZ, V.: Correlation between DNA repair of embryonic fibroblasts and different life span of 3 inbred mouse strains. *akt.gerontol.* 8 (1978) 419.
13. HART, R.W., G.A. SACHER, T.L. HOSKINS: DNA repair in a short- and a long-lived rodent species. *J.Gerontol.* 34 (1979) 808.
14. HALL, K.Y., K.J. BERGMANN, R.L. WALFORD: Evidence for a tri-cornered relationship between DNA repair, the main histocompatibility complex and lifespan determinants in mitogen-stimulated lymphocytes of adult inbred mouse strains. *Abstr.XII.Int.Congr.Gerontol.* 2 (1981) 147.
15. TICE, R.R.: Aging and DNA repair capability. In: The Genetics of Aging. Ed: E.L. Schneider. Plenum Press, New York and London 1979, 53.
16. FRANCIS, A.A., W.H. LEE, J.D. REGAN: The relationship of DNA excision repair of ultraviolet-induced lesions to the maximum life span of mammals. *Mech.Age.Dev.* 18 (1981) 181.
17. CURTIS, H.J.: *Das Altern: Die biologischen Vorgänge.* Fischer, Stuttgart 1968.
18. TROSKO, J.E., R.W. HART: DNA mutation frequencies in mammals. In: Cellular Ageing: Concepts and Mechanisms I. Ed.: R.G. Cutler. Karger, Basel 1976, 168.
19. WILLIAMS, J.R.: Role of DNA repair in cell inactivation, aging, and transformation: A selective review, a speculative model. *Adv.Rad.Biol.* 6 (1976) 161.
20. HOFHECKER, G., M. SKALICKY, A. KMENT, H. NIEDERMÜLLER: Models of the biological age of the rat. I. A factor model of age parameters. *Mech.Age.Dev.* 14 (1980) 345.
21. SKALICKY, M., G. HOFHECKER, A. KMENT, H. NIEDERMÜLLER: Models of the biological age of the rat. II. Multiple regression models in the study on influencing aging. *Mech.Age.Dev.* 14 (1980) 361.
22. SINEX, F.M.: The molecular genetics of aging. In: Handbook of the Biology of Aging. Eds.: C.E. Finch and L. Hayflick. Van Nostrand Reinhold, New York 1977, 37.
23. WITKIN, E.M.: Relationship among repair, mutagenesis, and survival: overview. In: Molecular Mechanisms for Repair of DNA. Eds.: P.C. Hanawalt and R.B. Setlow. A. Plenum Press, New York and London 1975, 347.
24. ROBERTS, J.J.: The repair of DNA modified by cytotoxic, mutagenic, and carcinogenic chemicals. *Adv.Rad.Biol.* 7 (1978) 211.

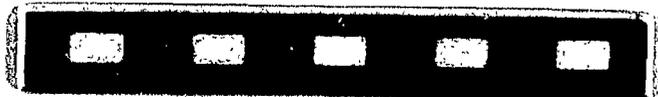
25. TIMSON, J.: Hydroxyurea. *Mutat.Res.* 32 (1975) 115.
26. MEINKE, W., D.A. GOLDSTEIN, M.R. HALL: Rapid isolation of mouse DNA from cells in tissue culture. *Anal.Biochem.* 58 (1974) 82.
27. LESHER, S., R.J.M. FRY, H.I. KOHN: Age and the generation time of the mouse duodenal epithelial cells. *Exptl.Cell Res.* 24 (1961) 334.
28. LAMPIDIS, T.J., G.E. SCHAIBERGER: Age related loss of DNA repair synthesis in isolated rat myocardial cells. *Exptl.Cell Res.* 96 (1975) 412.
29. HERRMANN, T.: *Klinische Strahlenbiologie*. Fischer, Jena (1978).
30. VINCENT, R.A., P.C. HUANG: The porportion of cells labelled with tritiated thymidine as a function of population doubling level in cultures of fetal, adult, mutant, and tumor origin. *Exptl. Cell Res.* 102 (1976) 31.
31. BEIER, W., K.H. BREHME, D. WIEGEL: *Biophysikalische Aspekte des Alterns multizellulärer Systeme*. Thieme, Leipzig 1973.

Die Herausgeber danken der
Österreichischen Forschungszentrum Seibersdorf Ges.m.b.H.
für die Übernahme der Druckkosten.

TEILNEHMERLISTE

- ALTMANN, H.
Institut für Biologie, Forschungszentrum Seibersdorf,
A-2444 Seibersdorf, Österreich
- ANTONI, F.
1st Institute of Biochemistry, Semmelweis University,
Medical School
H-1088 Budapest, Puskin u. 9, Ungarn
- BALO, J.M.
Semmelweis Medical School, Department of Dermatology,
Budapest VIII, Maria str. 41, Ungarn
- GÜNTHER, R.
Medizinische Universitätsklinik Innsbruck,
A-6020 Innsbruck, Anichstraße 35, Österreich
- HORKAY, I.
Department of Dermatology, University Medical School
H-4012 Debrecen, Ungarn
- KECK, M.
Institut für Biologie, Forschungszentrum Seibersdorf,
A-2444 Seibersdorf, Österreich
- KLEIN, G.
Ludwig Boltzmann-Institut für Rehabilitation Interner
Erkrankungen und Rehabilitationszentrum West der PV Arb.,
A-5760 Saalfelden, Thorerstraße 26, Österreich
- KORP, Ch.
Ludwig Boltzmann-Institut für Rehabilitation Interner
Erkrankungen,
A-5760 Saalfelden, Thorerstraße 26, Österreich
- KOVACS, J.
IAEA
A-1400 Wien, Wagramerstraße 5, Österreich
- MOLNAR, L.
Semmelweis Medical School, Department of Dermatology,
Budapest VIII, Maria str. 41, Österreich
- NATARAJAN, A.T.
State University Leide, Sylvius Laboratories,
AL-2333 Leiden, Wassenaarseweg 72, Niederlande
- NIEDERMÜLLER, H.
Institut für Physiologie, Veterinärmedizinische Universität,
A-1030 Wien, Linke Bahngasse 11, Österreich
- OBE, G.
Institut für Genetik, Freie Universität Berlin,
D-1000 Berlin 33, Arnimallee 5-7, BRD
- RACZ, I.
Laboratorium für Pharmazeutische Forschung und Kontrolle,
Pharmazeutisches Institut, Medizinische Universität,
9 Budapest, Högyes E.u. 7, Ungarn

- RACZ, I.
Semmelweis Medical School, Department of Detrmatology,
Budapest VIII, Maria str. 41, Ungarn
- RASKO, I.
Institute for Genetics, Biological Research Center,
Hungarian Academy of Sciences
H-6701 Szeged, POB. 521, Ungarn
- SATORY, E.
Semmelweis Orvostudományi Egyetem, Gyógyszerészeti Intézet
H-1092 Budapest, Högyes Endre ut. 7, Ungarn
- SCHERER, G.
Verband der Cigarettenindustrie, Wissenschaftliche Abteilung,
D-2000 Hamburg 13, Harvestehuder Weg 88, BRD
- SOMOGY, J.
Institute of Biochemistry, Department 1, Semmelweis Uni-
versity Medical School,
H-1088 Budapest, Puskin u. 9, Ungarn
- TÖRÖK, O.
Department of Biology, Semmelweis University of Medicine,
H-1445 Budapest, Nagyvarad ter 4, POB 370, Ungarn
- TURANITZ, K.
Institut für Biologie, Forschungszentrum Seibersdorf,
A-2444 Seibersdorf, Österreich
- TUSCHL, H.
Institut für Biologie, Forschungszentrum Seibersdorf,
A-2444 Seibersdorf, Österreich
- VINCZE, I.
Országos Közegészségügyi Intézet,
H-1094 Budapest, Nagyvárad tér 4, Ungarn
- WOTTAWA, A.
Institut für Biologie, Forschungszentrum Seibersdorf,
A-2444 Seibersdorf, Österreich
- WUNDER, W.
Institut für Anthropologie und Humangenetik,
D-6900 Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 328, BRD
- MOKRAI, Ö.
Ungarische Botschaft Wien,
A-1010 Wien, Bankgasse 4-6, Österreich.



OEZS-Berichte
Eigentümer, Herausgeber, Verleger und Druck:
Österreichisches Forschungszentrum Seibersdorf Ges.m.b.H.
Nach dem Pressegesetz verantwortlich:
Univ. Prof. Dr. Peter KOSS,
alle Lenaugasse 10, 1082 Wien, Tel. (0222) 42 75 11, Telex 7-5400.

Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor.