



Amalgam führt zu Erbschäden

Über den Einfluß akuter Quecksilber-Belastung auf den DNA-Metabolismus in vitro

Von Prof. Dr. T. Till, Dr. W. Klein, Dr. F. Koscis

Sonderdruck aus „Biologische Medizin“ Heft 4/1980, Seiten 143 bis 146
Österreichische Studiengesellschaft für Atomenergie Ges. m. b. H.
Forschungszentrum Seibersdorf, Institut für Biologie Vorstand: Dr. H. Altmann

Zusammenfassung

Sowohl Quecksilberazetat als auch Methylquecksilberchlorid hemmen ab einer Konzentration von 10^{-6} M die semikonservative DNA-Synthese und ab einer Konzentration von 10^{-5} M die DNA-Exzisionsreparatur. 10^{-5} M und 10^{-4} M Quecksilber-Konzentrationen beeinflussen das Sedimentationsverhalten der Nukleole von in „supercoiled“ Konfiguration vorliegender DNA deutlich.

Summary

Mercuryacetate and methylmercurychloride inhibit semiconservative DNA synthesis and DNA repair in concentrations of 10^{-6} m and 10^{-5} m, respectively. Mercury concentrations of 10^{-5} m and 10^{-4} m enhance Sedimentation velocity of the nucleoides of supercoiled DNA.

Einleitung

Quecksilber ist vermutlich das stärkste metallische Gift in unserer Umwelt. Eine unmittelbare Gefährdung ergibt sich aus der Anreicherung über die biologische Nahrungskette. Dabei nimmt besonders der Anteil von Methylquecksilber zu, das aus organischen Quecksilberverbindungen durch Mikroorganismen oder chemischen Methylgruppenspendern entsteht (1,2, 3).

S.190

Methylquecksilber kann Wasserstoffbrücken doppelsträngiger DNA brechen, mit der Bindung der argininreichen Histone H3 und H4 mit DNA im Chromatin interferieren und deutliche Chromosomenschäden hervorrufen (4, 5, 6, 7, 8, 9). Durch freiliegende Amalgam-Zahnfüllungen werden in der Mundhöhle zum Teil erhebliche Mengen Quecksilber lokal freigesetzt. Diese Freisetzung kann mechanisch, thermisch, elektrolytisch, aber auch mikrobiell provoziert und gefördert sein (10, 11, 12, 13). Zusätzlich erhöht Gold in Nachbarschaft von Amalgam aufgrund des Redoxpotentials ein lokales Freiwerden des Hg's. Diese Tatsachen sind für die Lebensfähigkeit vor allem der umhiegenden Zellen von Bedeutung, im weiteren allerdings aufgrund des Speicherungsvermögens des Körpers gegenüber Schwermetallionen auch ein Problem des Gesamtorganismus. Wir haben nun versucht, über die Synthese, Reparatur und Struktur der Desoxyribonukleinsäure den Einfluß von Quecksilberazetat und Methylquecksilberchlorid auf diese wichtigen Parameter der Zelle zu beobachten.

Material und Methoden

1. Zellmaterial

Die Milzen weißer Mäuse (Stamm Swiss) wurden in einem Potter Homogenisator von Hand schonend homogenisiert und mit Hanks-Medium gewaschen. Nach einer Trypanblaufärbung wurde die Zellzahl bestimmt und mit Hanks-Medium die gewünschte Zellzahl der Suspension eingestellt.

2. Semikonservative DNA-Synthese



Der Zellsuspension wurden Quecksilberazetat bzw. Methylquecksilberchlorid zugesetzt und bei 37° C vorinkubiert. Nach 30 Minuten wurden 2,5 µ Ci ³H-Thymidin (NEN, spez. Aktivität 50 Ci/mMoll) pro Milliliter Zellsuspension zugesetzt. Der Einbau der markierten DNA-Vorstufe in die DNA der Zellen bei 37° C wurde nach 120 Minuten mit eiskalter Perchlorsäure (PCS) gestoppt, das Zellsediment dreimal mit 6%iger PCS gewaschen und in PCS 30 Minuten bei 90° C hydrolysiert. Nach der Hydrolyse wurde in aliquoten Teilen des Überstandes die DNA-Menge und die Radioaktivität bestimmt (7,8). Die Auswertung erfolgte durch Errechnung der spezifischen Aktivitäten (Imp./min/µg DNA). Die spezifische Aktivität der vorbehandelten Proben wurde in prozentuelle Relation zu unbehandelten Kontrollproben gesetzt.

S.191

3. Einbau von ³H-Thymidin in die DNA nach UV-Bestrahlung

Zur Differenzierung zwischensemikonservativer DNA-Synthese und DNA-Exzisionsreparatur wurde die Zellsuspension zusätzlich mit Hydroxyharnstoff (Endkonzentration 10⁻² M) vorinkubiert. Danach wurde durch UV-Strahlung ein gezielter Schaden an der DNA der Zellen gesetzt (254 nm, 40 J/m²], dessen Reparatur über 90 Minuten bei 37° C durch den Einbau von ³H-Thymidin verfolgt wurde. Nach Abbruch der Reaktion durch PCS wurde weiter wie unter 2. beschrieben verfahren.

4. Nukleoidsedimentation — Gradientenzentrifugation der supercoiled Form der DNA

Die Zellsuspensionen wurden nach einer Vorinkubation mit der entsprechenden Hg-Verbindung mit 100 rad ⁶⁰Co bestrahlt und nachher 0, 30, 60, 120 und 180 Minuten bei 37° C inkubiert, um die Reparatur des gesetzten Schadens bzw. die Wiederherstellung der „supercoiled“ Form der DNA zu ermöglichen. Die durch Zentrifugation gewonnenen Zellen wurden auf einen 15—30%igen Saccharosegradienten (1,95 M NaCl, 0,001 M EDTA, 0,01 M Tris, pH 8,0) aufgebracht und in einer Mischung von 1,95 M NaCl, 0,1 M EDTA, 2mM Tris und 0,5% Triton X-100 20 Minuten lysiert. Nach einer Ultrazentrifugation bei 30 000 Upm (Beckman L5 Ultrazentrifuge, SW 40 Ti Rotor) und 20° C wurde die Sedimentation der DNA durch die Messung der Extinktion bei 254 nm in einem Durchflußphotometer manifestiert (9, 14).

5. Bindung von Methylquecksilberchlorid (Hg 203) an die DNA bzw. an das Protein

5.1. Die Zellsuspension wurde mit Methylquecksilberchlorid 60 Minuten vorinkubiert. Danach wurde die Zellsuspension dreimal mit Hanks-Medium gewaschen und wie unter 4. beschrieben weiter verfahren. Die DNA-Peaks wurden gesammelt, DNA-Gehalt und Radioaktivität bestimmt und das pro µg DNA gebundene Hg gemessen.

5.2. Die Milzzellen wurden 60 Minuten bei 37° C mit Methylquecksilberchlorid (Hg 203) inkubiert und nachher dreimal mit Hanks-Medium gewaschen. Die weitere Aufarbeitung wurde folgendermaßen durchgeführt:

A. Es wurde mit PCS (Endkonzentration 6%) gefällt, das Sediment dreimal mit PCS gewaschen und dann bei 90° C 30 Minuten hydrolysiert.

S.192

Im Überstand wurde die DNA-Menge und die Radioaktivität, im Rückstand die Protein-Menge und die Radioaktivität bestimmt.

B. Die Zellen wurden 20 Minuten lysiert (Lysismischung: 0,1 M EDTA, 0,01 M Tris, 0,5% Triton X-100, pH 8,0), das Rohchromatin mit PCS gefällt und weiter wie unter

A. beschrieben verfahren (15).



C. Die Zellen wurden wie unter B. beschrieben lysiert. Dann wurde über Nacht mit 0,4 n Schwefelsäure extrahiert (Histone) und im Rückstand der DNA-Gehalt und die Radioaktivität gemessen. Im Überstand wurde mit Äthanol gefällt und der Protein-Gehalt und die Radioaktivität bestimmt (16).

Ergebnisse

Die semikonservative DNA-Synthese wird sowohl durch Quecksilberazetat als auch durch Methylquecksilberchlorid

ab einer Konzentration von 10^{-6} M signifikant unterdrückt (Tab. 1).

Tab. 1: Semikonservative DNA-Synthese der Milzzellen in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von Quecksilber, Kontrolle = 100%. signifikant nach dem t-Test bei einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 0,05 = 5%.

M	Azetat	Methyl
10^{-8}	106	95
10^{-7}	110	96
10^{-6}	64*	82*
10^{-5}	4*	44*
10^{-4}	3*	3*
10^{-3}	4*	1*

Die DNA-Exzisionsreparatur nach UV-Bestrahlung wird durch beide Quecksilberverbindungen ab einer Konzentration von 10^{-5} M signifikant gehemmt (Tab. 2).

Tab. 2: Einbau von ^3H -Thymidin in die DNA der Milzzellen in Gegenwart von Quecksilber nach UV-Bestrahlung. Kontrolle = 100%. * signifikant nach dem t-Test bei einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 0,05 = 5%.

M	Azetat	Methyl
10^{-7}	105	107
10^{-6}	107	109
10^{-5}	3*	28*
10^{-4}	2*	12*

S.3

Bei den Ultrazentrifugationen der supercoiled Form der DNA nach Gamma-Bestrahlung zeigt sich eine durch die Quecksilberverbindungen bei einer Konzentration von 10^{-4} M eine erheblich erhöhte Sedimentationsgeschwindigkeit der Nukleotide im Saccharosegradienten. Dieser Effekt kann über die Gesamtdauer des Versuchs beobachtet werden (Tab. 3).

Tab. 3: Sedimentationsverhalten der Nukleotide im Saccharosegradienten nach Quecksilbervorbehandlung und Co-60 Bestrahlung. Die Sedimentation wird im Verhältnis zu unbehandelten Kontrollen ausgedrückt. Ratio der Kontrolle = 1,00.

Azetat Methyl

	10^{-5}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-4}
K	0,54	1,90	0,63	6,67
0'	0,40	2,38	0,38	6,67
30'	1,00	11,00	0,88	21,00
60'	1,45	22,00	1,04	3,38
120'	1,09	30,00	1,09	2,78



180' 0,98 1,22 1,13 2,13

Die zwar vorherbehandelten, aber nicht bestrahlten Milzzellen zeigten ein Sedimentationsverhalten ihrer DNA, das sowohl bei einer Methylquecksilberkonzentration von 10^{-4} als auch teilweise bei 10^{-5} stark von der Kontrolle abweicht (Tab. 4).

Tab. 4: Sedimentationsverhalten der Nukleotide im Saccharosegradienten nach Methylquecksilbervorbehandlung. Das Verhältnis der Sedimentation zu unbehandelten Kontrollen wird ausgedrückt. Ratio der Kontrollen = 1,00.

	10^{-4} M	10^{-5} M
K	6,67	0,63
30'	8,40	2,33
60'	9,50	1,50
120'	6,00	1,27
180'	4,71	1,10

Die über die Nukleotidsedimentation ermittelte Bindung von Methylquecksilberchlorid (Hg 203) an die DNA der Milzzellen zeigte ein S.194

Ansteigen der Radioaktivität innerhalb einer Inkubationszeit von 300 Minuten bei 37° C. Während dieser Anstieg nach 120 Minuten gegenüber dem Beginn (60 Minuten Vorinkubation) relativ gering war, ergab sich nachher ein sprunghaftes Ansteigen der Methylquecksilberbindung (Hg 203) an die DNA (Tab. 5).

Tab. 5: Über die Nukleotidsedimentation ermittelte Radioaktivität des DNA-Peaks bedingt durch die Bindung von Methylquecksilberchlorid (Hg 203) bezogen auf μ g DNA.

Zeit (min)	Impulse/min/ μ g/DNA
0	190,6
30	247,1
60	249,4
120	269,7
180	558,0
300	801,6

Die versuchte Differenzierung der Bindung von Methylquecksilberchlorid (Hg 203) an die DNA bzw. Protein ergab ein deutliches Übergewicht der Quecksilber-Bindung an Protein, das um so größer wird, je gereinigter die DNA vorliegt (Tab. 6).

Tab. 6: Verteilung der Methylquecksilberchloridbindung (Hg 203) auf DNA bzw. Protein und das Verhältnis der gebundenen Menge zwischen DNA bzw. Protein nach den Aufarbeitungskriterien von 5.2. der Methodik.

Aufarbeitung	Imp./min./ μ g/DNA	Imp./min./ μ g/Protein	n
5.2. A	1 107,6	10191,0	1:9
5.2. B	535,5	6 394,5	1:12
5.2. C	168,9	2 763,0	1 : 16



Diskussion

Es ist bekannt, daß Methylquecksilber mit der DNA einen Komplex bildet, wodurch es zu einer deutlich gesteigerten Sedimentationsgeschwindigkeit kommt (17, 18).

Unsere Untersuchungen haben gezeigt,
S.5

daß bei der Nukleoidsedimentation im Saccharosegradienten nach Gamma-Be-strahlung der DNA von Milzzellen 10^{-4} M Methylquecksilberchlorid bzw. 10^{-4} M Quecksilberazetat einen ganz erheblichen Anstieg der Sedimentationsgeschwindigkeit mit sich bringt. Dabei ergibt sich bei Quecksilberazetat nach 180 Minuten bei 37° C und 100 rad Gamma-Be-strahlung der Zellen plötzlich eine verminderte Sedimentation, die etwa jener der Kontroll-DNA entspricht. Dies würde gegenüber der vorher gemessenen Übersedimentierung auf eine „Reparatur“ der Schaden in der DNA hinweisen, scheint aber eher mit einer β -Elimination von an Purinbasen gebundenen Hg-Ionen im Einklang zu stehen. Durch diese rein physikalische Reaktion entstehen allerdings Strangbrüche in der DNA, die über einen Verlust an „supercoils“ zu einer geringeren Sedimentation im Saccharosegradienten führen.

Bei Einsatz von Methylquecksilber kommt es scheinbar aufgrund der großen Masse und geringen spezifischen Volumen des Methylquecksilberkations zu einer noch rascheren Steigerung der Sedimentationsgeschwindigkeit. Das bereits nach 60 Minuten bei 37° C und Gamma-Be-strahlung der Zellen beobachtbare Absinken der Sedimentationsgeschwindigkeit kann an der Sättigung der Bindungsstellen nach 30 Minuten liegen. Wahrscheinlicher ist aber das Einsetzen der Wirkung der DNA-Reparaturenzyme, da die ebenfalls durch Methylquecksilber verursachte Methylierung der DNA Reparaturenzyme induziert, die diesen Schaden an der DNA im Verlauf der DNA-Exzisionsreparatur zu eliminieren trachten. Auch hier ist allerdings in der überprüften Zeit keine Annäherung an die Kontrollen gegeben, d.h. eine ausreichende Reparatur des Schadens in Relation zur Kontrolle findet nicht statt. Es werden allerdings sowohl die gezielt an der DNA der Milzzellen gesetzten Schäden der Gamma-Be-strahlung in Gegenwart von 10^{-4} M Quecksilber, als auch die während der Vorinkubation durch die Quecksilberverbindungen bewirkten Schäden an der DNA der Zellen in der vorgegebenen Zeit nicht repariert. Die Bindung von Methylquecksilber an die DNA nimmt, gemessen nach einer Vorinkubation der Zellen mit Methylquecksilberchlorid über die Nukleoidsedimentation, nach 120 Minuten bei 37° C sprunghaft zu. Dies könnte in einer Denaturierung der DNA und darauffolgender Komplexbildung von DNA mit dem Methylquecksilberkation seinen Grund haben. Die Affinität zur Bindung des Quecksilbers ist gegenüber Protein wesentlich größer als gegenüber DNA. Daraus erklärbar dürfte auch die schon bei 10^{-5} M Quecksilber nachgewiesene Hemmung des Einbaus des

S.196

DNA-Vorstufe Thymidin im Verlauf der DNA-Exzisionsreparatur sein.

Quecksilberionen binden an die SH-Gruppen der DNA-Polymerase β , die für die Neusynthesierung des fehlerhaften Strangteiles verantwortlich ist, und blockieren damit die DNA-Exzisionsreparatur. Außerdem ist die DNA-Polymerase β ein Zn abhängiges Enzym. Ein Verdrängen des Zinks zugunsten von Quecksilber würde ebenfalls die Enzymaktivität hemmen. Gleiches gilt sicher für die DNA-Polymerase α , die bei der semikonservativen DNA-Synthese beteiligt ist, und erklärt die signifikante Hemmung der DNA-Synthese.



Abschließend kann gesagt werden, daß die hier untersuchten Quecksilberverbindungen den DNA-Metabolismus von Milzzellen zum Teil schon ab einer Konzentration von 10^{-6} M signifikant beeinflussen und über eine Blockierung der DNA-Reparaturvorgänge (10^{-5} M bis 10^{-4} M) die Integrität des genetischen Materials der Zellen in Frage stellen.

Literatur

- (1) Benveniste, R. E., Lieber, M. M., Livingstone, D. M., Sherr, C. J., Todaro, G. J., Kalter, S. S., Nature 248, 17 (1974).
- (2) Goldberg, R.J., Scolnick, E. M., Parks, W. P., Yakobleta, L. A., Lakin, B. A., Int. J. Cancer 14, 722 (1974).
- (3) Todaro, G. J., Sherr, C. J., Benveniste, R. E., Lieber, M. M., Melnick, L. J., Cell 2, 55 (1974).
- (4) Stephenson, J. R., Aronson, S. A., Nature 266, 469 (1977).
- (5) Todaro, G. J., Sherr, C. J., Benveniste, R. E., Virology 72, 278 (1976).
- (6) Gallagher, R. E., Gallo, R. C., Science 187, 350 (1975).
- (7) Burton, K., Biochem. J. 62, 315 (1956).
- (8) Kocsis, F., Klein, W., Altmann, H., Z. Naturforsch. 280, 131 (1973)-
- (9) Cock, P. R., Brazell, I. A., Nature 263, 679 (1976).
- (10) Till, T., Österr. Ärztezg. 1422, 29/24 (1974).
- (11) Till, T., Zahnärztl. Welt 22, 1076 (1978). |12) Till, T., Wagner, G., ZWR 19, 945 (1973).
- (13) Wagner, G., Till, T., ZWR 20, 1004 (1973).
- (14) Cock, P. R., Brazell, I. A., J. Cell Sci. 19, 261 (1975).
S.197