

# UV-Inaktivierung

## Kombinierte Wirkung von UV-Strahlung und Xenobiotika bei zwei *Saccharomyces*-Stämmen\*

Ernst-Randolf Lochmann, Gesine Lochmann

Institut für Biochemie und Molekularbiologie (WE 5), Fachbereich Biologie, Freie Universität Berlin, Ehrenbergstr. 26–28, D-14195 Berlin

Korrespondenzautor: Prof. Dr. Ernst-Randolf Lochmann

### Zusammenfassung

Mit zwei haploiden Stämmen des Hefepilzes *Saccharomyces cerevisiae* – eine in der Excisions-Reparatur defekte Mutante und ein Wildtyp-Stamm – wurde die mögliche gegenseitige Beeinflussung von UV-Strahlung und acht verbreiteten Chemikalien bei der Inaktivierung dieser Zellen getestet. Während bei sechs Verbindungen (Methoxychlor, 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, Pentachlorphenol, Tetrachlorhydrochinon, Acrylnitril, 2,3-Dichlor-1-propen) keine oder nur eine geringe Beeinflussung der UV-Inaktivierung gefunden wurde, konnte mit Trichlorethylen eine signifikante, jedoch nicht sehr intensive Sensibilisierung gegen UV-Strahlung nachgewiesen werden. Mit Paraquat wurde dagegen nach Vorbehandlung der Zellen mit dieser Verbindung eine sehr starke Schutzwirkung gegen UV-Strahlung festgestellt. Diese Schutzwirkung war bereits bei einer Konzentration wirksam, bei der Paraquat in den Zellen keine toxische Wirkung zeigt. Die Ergebnisse waren bei beiden verwendeten Stämmen sehr ähnlich.

**Schlagwörter:** 2,4-D; Fungizide; Hefepilze als Testorganismen; Herbizide; Insektizide; Kombinationswirkung; Pentachlorphenol; Methoxychlor; *Saccharomyces cerevisiae*; Sensibilisierung; Testorganismen; UV-Schutzwirkung; UV-Strahlung; Xenobiotika

### Abstract

**UV Inactivation:**  
Combined Effects of UV Radiation and Xenobiotics in two Strains of *Saccharomyces*

The effects of eight chemicals on the inactivation rate of ultraviolet radiation on the colony building capabilities of two strains of *Saccharomyces cerevisiae* – a wild type strain and a mutant deficient in excision repair – were studied. The insecticide methoxychlor, the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, the fungicide pentachlorophenol and its metabolite tetrachloroquinone, as well as the chemicals acrylonitrile and 2,3-dichloro-1-propene have no significant impact on the effects of UV radiation in *Saccharomyces cerevisiae*. Depending on the concentration, trichloroethylene increases the sensitivity to UV radiation. The herbicide paraquat provides efficient protection against UV radiation at concentrations where a toxic effect cannot be observed even without UV. The results were rather similar for both strains.

**Keywords:** Combined effect of radiation and chemicals; environmental chemicals; fungicides; herbicides; insecticides; methoxychlor; pentachlorophenol; *Saccharomyces cerevisiae*; UV protection; UV radiation; xenobiotics

## 1 Problemstellung

Mit der Zunahme erhöhter UV-Einstrahlung auf die Erdoberfläche durch Verringerung der Ozon-Schutzschicht – die auch eine Erhöhung im mittleren UV-Wellenlängenbereich zwischen 260 und 280 nm bewirkt – wird zunehmend die Frage interessant, ob eine Kombinationswirkung von UV-Strahlung und Chemikalien nachweisbar ist, d.h. ob die Wirkung von UV sich durch die Gegenwart von chemischen Verbindungen verstärkt oder abschwächt, oder ob eine additive Wirkung ohne gegenseitige Beeinflussung vorliegt.

Untersuchungen zu dieser Frage wurden mit Schwermetallen bereits durchgeführt. Dabei wurde eine Hemmung von DNA-Reparaturprozessen (speziell der Excisions-Reparatur) von UV-Schäden nach Einwirkung verschiedener Schwermetalle festgestellt [1, 2].

Da Herbizide, Insektizide und Fungizide weiterhin in die Umwelt gelangen, ist die Untersuchung der Kombinationswirkung dieser Chemikalien mit anderen Umweltfaktoren wichtig. In dieser Arbeit wurde deshalb bei acht in größeren Mengen produzierten organischen Verbindungen die kombinierte Wirkung mit UV-Strahlung getestet. Um bei diesen Untersuchungen gleichzeitig Abschätzungen über den Einfluß auf die DNA-Reparatur machen zu können, wurden zwei *Saccharomyces*-Stämme ausgewählt: Eine haploide Wildtyp-Form (W) und eine daraus abgeleitete DNA-Reparatur-geschädigte Mutante (S<sub>1</sub>) dienten bereits früher als Untersuchungsobjekte [3]. Mit dieser Arbeit werden die Untersuchungen unseres Instituts über die toxische Wirkung von Chemikalien [vgl. u.a. 4–7] fortgesetzt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Hefepilzstämme

Die Untersuchungen wurden mit zwei haploiden Stämmen des Hefepilzes *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt:

W = G 948-1D = RAD<sup>+</sup> (entspricht G 896-4Ba), siehe ROTH et al. [8] und  
S<sub>1</sub> = G 948-2C = rad-1-1 (excision repair deficient, entspricht G 896-D<sub>1</sub> [8])

### 2.2 Chemikalien

Verwendet wurden die Herbizide Paraquat (1,1'-Dimethyl-4,4'-dipyridyliumchlorid), CAS-Nr. 1910-42-5, 2,4-Di-

\* Anm. d. Red.: Xenobiotika wird anstelle des Begriffes „Umweltchemikalien“ verwendet

chlorphenoxyessigsäure (2,4-D), CAS-Nr. 94-75-7, das Fungizid Pentachlorphenol (PCP), CAS-Nr. 87-86-5, und sein Metabolit in Säugerzellen Tetrachlorhydrochinon (TCH), CAS-Nr. 87-87-6, das Insektizid Methoxychlor (Dimethyldiphenyltrichlorethan, MOC), CAS-Nr. 72-43-5; die industriellen Syntheseprodukte Acrylnitril (ACN), CAS-Nr. 107-13-1, und 2,3-Dichlor-1-propen (DCP), CAS-Nr. 78-88-6, sowie das vielseitig verwendete Lösungsmittel Trichlorethylen (TCE), CAS-Nr. 79-01-06.

### 2.3 Untersuchung der Koloniebildungsfähigkeit

Stationäre Kulturen der Zellen wurden mit 0,05 m  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer gewaschen und im gleichen Puffer auf eine Zellzahl von ca.  $5 \cdot 10^5$  Zellen/ml verdünnt. Diese Suspensionen wurden mit verschiedenen Konzentrationen der untersuchten Verbindungen versetzt und 2 h bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wurden die behandelten Zellen und eine nicht-behandelte Kontrolle mit den angegebenen UV-Dosen (s.u.) bestrahlt, 1:100 mit Pufferlösung nachverdünnt, und je 0,1 ml auf Agar-Platten mit Vollmedium (2 % Glukose, 1 % Hefeextrakt, 0,5 % Pepton, 2 % Agar) ausgestrichen.

### 2.4 Bestrahlungsbedingungen

Benutzt wurde eine Camag-Universal-UV-Lampe (Maximum bei 254 nm), Abstand 40 cm, Schichtdicke der bestrahlten Zellsuspension ca. 2 mm (entspricht einem Energiefluß von 0,3 Joule/m<sup>2</sup> bei einer Bestrahlungsdauer von  $t = 1$  s). Nach 48 Stunden Bebrütung bei 30 °C wurden die makroskopisch sichtbaren Kolonien ausgezählt und die Dosis-Wirkung-Beziehung bestimmt. Die verwendeten Konzentrationen der Verbindungen wurden so ausgewählt, daß bei der höchsten verwendeten Konzentration in der Regel eine Inaktivierung durch die Verbindung ohne UV-Bestrahlung von 20–80 % (d.h. 80–20 % Überlebende) vorlag. Eine Ausnahme bildete das Paraquat, das bei den höchsten hier verwendeten Konzentrationen ohne UV-Strahlung noch keine inaktivierende Wirkung auf Hefezellen aufwies.

## 3 Ergebnisse und Diskussion

Nach zweistündiger Vorbehandlung der Zellen mit der jeweiligen Verbindung konnten bei drei Stoffen (PCP, TCH und MOC) keine signifikanten Abweichungen der UV-Dosis-Effekt-Kurven von den unbehandelten Kontrollen festgestellt werden. Die Ergebnisse mit MOC sind allerdings nur eingeschränkt bewertbar, da die in Wasser sehr schwer lösliche Verbindung nach Zugabe der alkoholischen Substanzlösung in den Inkubationspuffern teilweise nicht mehr vollständig gelöst vorlag.

Bei drei weiteren Verbindungen (DCP, ACN, 2,4-D) wurde bei Substanzkonzentrationen, die unter den Versuchsbedingungen (2stündige Inkubation der Zellen) eine maximal 50prozentige Inaktivierung der Zellen ohne UV erzielen, eine nur geringe Sensibilisierung der Zellen gegen UV nachgewiesen.

Eine deutliche, von der Konzentration der Substanz abhängige Sensibilisierung der Zellen gegen UV-Strahlung wurde nur mit TCE nachgewiesen ( $\rightarrow$  Abb. 1). Beim Koloniebildungsvermögen und Wachstum sowie der Stoffwechselprozesse bei Hefe- und Säugerzellen wurde bei den applizierten TCE-Konzentrationen eine 50- bis 80prozentige Inaktivierung nachgewiesen [4, 6, 9]. Da die Dosiswirkung der UV-Strahlung immer auf die jeweiligen Kontrollen der TCE-Wirkung bezogen wurden, handelt es sich hier nicht um einen additiven Effekt, sondern um eine wirkliche Sensibilisierung.

Auffallend und sehr interessant ist die Wirkung des Paraquat: Mit steigenden Konzentrationen dieser Verbindung konnte ein sehr starker Anstieg des Schutzes gegen die UV-Strahlung festgestellt werden. Der unter den vorliegenden Bestrahlungsbedingungen erzeugte Totalschutz der Zellen lag bei einer Paraquat-Konzentration, wo noch keine toxische Wirkung dieser Verbindung ohne UV-Behandlung feststellbar war [4].

In den Abbildungen 1 bis 3 sind die Dosis-Effektkurven nach Einwirkung von TCE, PCP bzw. Paraquat als Beispiel für eine Sensibilisierung, eine Nichtbeeinflussung und einen Schutzeffekt dargestellt. In diesen wie auch in anderen untersuchten Fällen zeigten die Stämme W und S<sub>1</sub> einen ähnlichen Effekt, ausgenommen natürlich die generell erhöhte Strahlensensibilität des S-Stammes im Vergleich zum W-Stamm. (Bei den Werten aller drei Abbildungen handelt es sich um Mittelwerte aus mindestens drei Experimenten.)

Wie bereits erwähnt, konnte mit Schwermetallen, die als wichtige Umweltsubstanzen in Frage kommen, eine Sensibilisierung durch Hemmung der DNA-Reparatur nachgewiesen werden [1, 2]. In dem hier vorliegenden Fall der Sensibilisierung durch TCE scheint zumindest die Excisions-Reparatur keine Rolle zu spielen, da dann deutliche Unterschiede zwischen den Stämmen W und S<sub>1</sub> vorliegen müßten.

Der deutliche und von uns überprüfte Schutzeffekt von Paraquat gegen die UV-Wirkung ist derzeit noch nicht erklärbar. Wenn auch die Verwendung von Paraquat als UV-Schutzmittel sich wegen seiner toxischen Wirkung bei vielen Organismen und beim Menschen verbietet [10], ist die Wirkung doch sehr interessant und fordert zu eingehenden Untersuchungen heraus. Die einfachste Erklärung der Schutzwirkung durch Absorption der UV-Energie im Lösungsmittel kann nach weiteren Untersuchungen mit Verbindungen, die in gleichem Ausmaß und im gleichen UV-Bereich wie Paraquat absorbieren, ausgeschlossen werden [11]. Auch die Beeinflussung von Reparatureffekten an der DNA stehen nicht zur Diskussion, da reparaturdefiziente Stämme (sowohl der hier verwendete in der Excision-Reparatur defekte Stamm als auch andere von uns geprüfte reparaturdefekte Stämme) gleich reagieren wie der Wildstamm [11]. Ob die bekannte Tatsache der Radialbildung bei Paraquat nach Einwirkung von Licht [12] in irgendeiner Beziehung zu der hier beobachteten Schutzwirkung steht, kann aus den vorliegenden Versuchen noch nicht geschlossen werden. Weitere Untersuchungen zur Aufklärung des Mechanismus der Schutzwirkung sind im Gange [11].

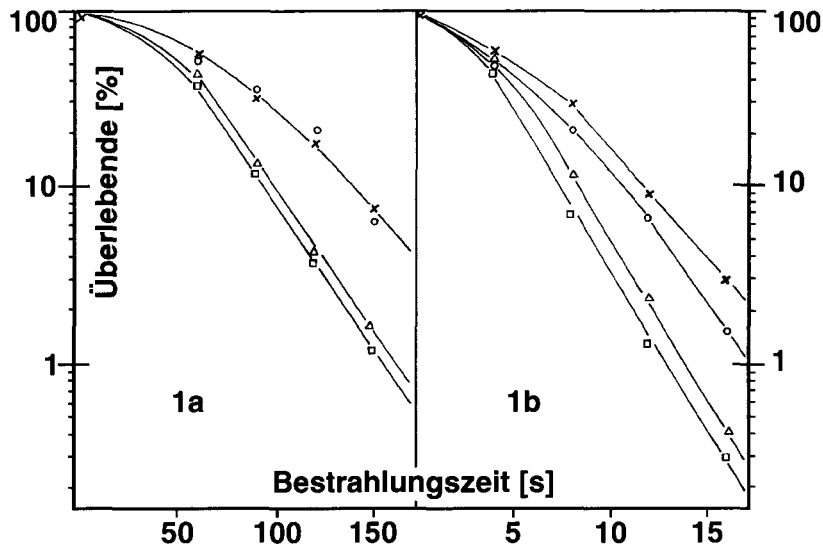


Abb. 1: Kombinierte Wirkung von Trichlorethylen mit UV-Strahlung als Beispiel für einen Sensibilisierungseffekt mit dem *Saccharomyces*-Wildtyp W (a) und der strahlensensiblen Mutante  $S_1$  (b). TCE-Konzentration [in mg/ml]: 0 (x); 1000 (o); 2000 (Δ); 4000 (□)

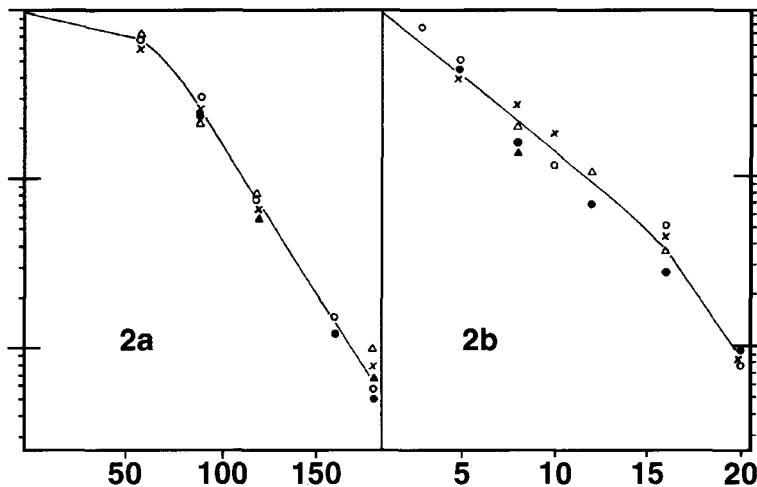


Abb. 2: Kombinierte Wirkung von Pentachlorphenol mit UV-Strahlung als Beispiel für eine gegenseitige Nichtbeeinflussung der Effekte mit dem *Saccharomyces*-Wildtyp W (a) und der strahlensensiblen Mutante  $S_1$  (b). PCP-Konzentration [in mg/ml]: 0 (x); 2 (o); 5 (Δ); 8 (▲); 10 (●)

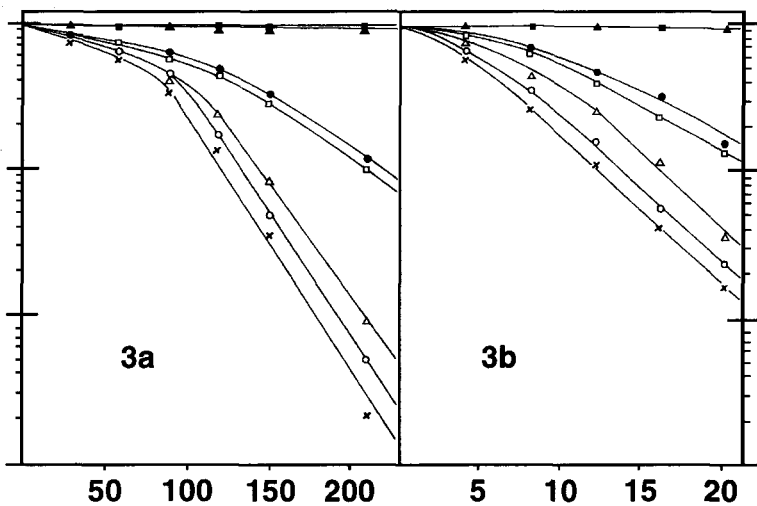


Abb. 3: Antagonistische Wirkung von Paraquat mit UV-Strahlung als Beispiel für eine UV-Schutzwirkung mit dem *Saccharomyces*-Wildtyp W (a) und der strahlensensiblen Mutante  $S_1$  (b). Paraquat-Konzentration [in mg/ml]: 0 (x); 10 (o); 20 (Δ); 50 (□); 70 (●); 100 (▲); 200 (■)

#### 4 Literatur

- [1] HARTWIG, A. (1994): Role of DNA repair in lead and cadmium induced genotoxicity – A review. *Environm. Health Perspect.* 102 (Suppl. 3), 45–50
- [2] HARTWIG, A., L.H.F. MULLENDERS, R. SCHLEPEGRELL, U. KASTEN, D. BEYERSMANN (1994): Nickel (II) interferes with the incision step in nucleotide excision repair in mammalian cells. *Cancer Res.* 54, 4045–4051
- [3] SHOJA, R., W. LASKOWSKI, R. ROTH, E.-R. LOCHMANN (1992): Reparaturdefiziente *Saccharomyces*-Stämme als Testorganismen zum Nachweis der Toxizität von Umweltchemikalien. *UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox.* 4, 261–264
- [4] EHRLICH, W., M. MANGIR, E.-R. LOCHMANN, R. NISCHT, P. BRADISCH (1985): Investigation of a test system for the rapid differentiation of nuclear and cytoplasmic damage in eucaryotes. *Ecotoxicol. Environm. Safety* 9, 71–78
- [5] EHLERS, J., M. TOSCH, I. ALBAZ, E.-R. LOCHMANN (1991): Rapid estimation of chromosomal damage in yeast due to the effects of environmental chemicals using pulsed field gel electrophoresis. *Ecotoxicol. Environm. Safety* 22, 133–138
- [6] MANGIR, M., I. ALBAZ, E.-R. LOCHMANN, W. EHRLICH (1991): A test system for the rapid differentiation of nuclear and cytoplasmic damage in chinese hamster ovary cells. *Chemosphere* 23, 777–784
- [7] CASCORBI, I., R. ROTH, E.-R. LOCHMANN (1995): Effects of a heterogenous set of xenobiotica on RNA synthesis of yeast cells. *Ecotoxicol. Environm. Safety* 30, 252–258
- [8] ROTH, R., J.C. GAME, M.J. PEAK (1987): Sensitivities to monochromatic 254 nm and 365 nm radiation of closely related strains of *Saccharomyces cerevisiae* with differing repair capabilities. *Photochem. Photobiol.* 45, 479–483
- [9] LOCHMANN, E.-R., W. EHRLICH, M. MANGIR (1984): The effect of trichloroethylene and acrylonitrile on RNA and ribosome synthesis and ribosome content in *Saccharomyces* cells. *Ecotoxicol. Environm. Safety* 8, 162–166
- [10] WIRTH, W., C. GLOXHUBER (1985): *Toxikologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, S. 282–283
- [11] BEDDERMANN, C., E.-R. LOCHMANN: unveröffentlichte Ergebnisse
- [12] BAUMANN, G., G. GÜNTHER (1978): Wirkungsprinzipien und Selektivität bei Herbiziden. *Biol. Rdsch.* 16, 274–288