



Doctoral Thesis

Nachweis von cis-Thymidinglykol mittels ^{32}P -Postlabeling als Marker für oxidative DNS-Schäden

Author(s):

Hegi, Monika Eva

Publication Date:

1989

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000508848> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 8846

**NACHWEIS VON CIS-THYMIDINGLYKOL MITTELS
32P-POSTLABELING ALS MARKER FUER
OXIDATIVE DNS-SCHAEDEN**

ABHANDLUNG

Zur Erlangung des Titels
Doktorin der Naturwissenschaften
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von
MONIKA EVA HEGI
dipl. Natw. ETH
geboren am 10. September 1962
von Pfaffnau LU

Ch. Schlatter

Angenommen auf Antrag von: 20.6.89
Prof. Dr. Ch. Schlatter, Referent
Prof. Dr. W.K. Lutz, Korreferent
PD Dr. Ch. Richter Korreferent

Zürich 1989

ZUSAMMENFASSUNG

Nachweis von cis-Thymidinglykol mittels ^{32}P -Postlabeling als Marker für oxidative DNS-Schäden

Einführung. Sauerstoffradikale wie das sehr reaktive Hydroxylradikal sind dafür bekannt, dass sie DNS zu schädigen vermögen. Es wurde postuliert, dass sie teilweise für die kanzerogene Wirkung von ionisierenden Strahlen verantwortlich sind. Für eine Anzahl chemischer Kanzerogene wurde eine "indirekte" Genotoxizität über dasselbe reaktive Agens vorgeschlagen. Um nachzuprüfen, ob chemisch induzierter oxidativer Stress auch *in vivo*, in intrazellulärer DNS Schäden induziert, wurde eine sensitive und spezifische Methode zum Nachweis von cis-Thymidinglykol entwickelt (5,6-Dihydroxy-5,6-dihydrothymidin), einem bekannten Oxidationsprodukt von DNS mit Hydroxylradikalen. Die entwickelte Methode besteht aus einer modifizierten ^{32}P -Postlabeling-Technik mit vorgängiger Reinigung und Anreicherung des cis-Thymidinglykol-3'-phosphates (cis-dTGp) durch eine Affinitätschromatographie.

Entwicklung der Methode. Die DNS wurde isoliert und enzymatisch zu den Desoxribonucleosid-3'-phosphaten (dNp) abgebaut. Das cis-dTGp wurde durch eine Phenylboronsäure-Affinitätschromatographie (bindet selektiv cis-Glykolstrukturen) aus den natürlichen Nucleotiden (dNp) isoliert, gereinigt und mit der T4 Polynucleotidkinase (T4 PNK) und [γ - ^{32}P]ATP 5'-phosphoryliert (Thymidinglykol-3',5'-bis-[5'- ^{32}P]phosphat, cis- $^*\text{pdTGp}$). Da cis-dTGp sich als schlechtes Substrat herausstellte, wurde die Spezifität der T4 PNK durch Zugabe des "mutagenen" divalenten Kations von Beryllium verändert. Die Phosphorylierungsausbeute konnte dadurch von 1% bis auf 20% erhöht werden. Die Reaktionsprodukte wurden mit einer 2-dimensionalen Dünnschichtchromatographie (2D-DC) auf Polyethylenimin-Cellulose (Anionentauscher) aufgetrennt, wobei die phosphorylierten natürlichen Nucleotide ($^*\text{pdNp}$) auf eine Diagonale zu liegen kamen. Cis- $^*\text{pdTGp}$ hingegen wurde durch die Zugabe von Borsäure in der 2. Dimension selektiv retiniert. Kontaminierende natürliche Nucleotide, die auch 5'-phosphoryliert worden waren ($^*\text{pdNp}$), wurden aber unter den gewählten Phosphorylierungsbedingungen (pH 7.5, 1 mM BeCl_2) durch die Phosphataseaktivität der T4 PNK meist 3'-dephosphoryliert ($^*\text{pdN}$) und eluierten mit dem anorganischen Phosphat ($^*\text{p}_i$).

Cis-Thymidinglykol wurde durch eine Autoradiographie lokalisiert und durch Messen der Cerenkov-Strahlung quantifiziert.

Anwendungen. Die Methode wurde an Proben von mit ionisierender Strahlung behandelte Kalbsthymus-DNS getestet. Im Dosisbereich von 14 bis 1000 Gray wurden Werte von 134 bis 810 cis-Thymidinglykol pro 10^6 Nucleotide gemessen. Die Resultate sind in guter Übereinstimmung mit Daten aus radiochemischen und immunologischen Methoden. Die entwickelte Methode erwies sich als gute Alternative zum Nachweis eines Markerschadens in oxidativ geschädigter DNS.

Die Methode wurde daraufhin auf *in vivo* Experimente angewandt, bei welchen Ratten mit "Agentien" behandelt wurden, die in der Diskussion stehen, in der Leber zu oxidativem Stress zu führen und über diesen Mechanismus Lebertumore zu induzieren.

In der Leber-DNS von Ratten, welche 2 Wochen oder 2 Monate mit 1000 ppm Nafenopin (ein Peroxisomenproliferator) im Futter behandelt wurden, konnte kein cis-dTGp nachgewiesen werden. Auch in der Leber-DNS von 3 oder 7 Tage cholin- / methionindefizient gefütterten Ratten war der cis-dTGp-Nachweis negativ. Die Nachweisgrenze lag in diesen Experimenten bei 1 cis-dTGp / 10^6 dNp.

Die negativen Resultate der beiden *in vivo* Experimente können nicht abschliessend beurteilt werden, da aufgrund der schnellen Reparatur nicht ausgeschlossen werden kann, dass zusätzliche oxidative DNS-Schäden entstanden waren. Steady-state-DNS-Adduktwerte bekannter Kanzerogene liegen nach TD_{50} -Dosierungen im Bereich von 1 Addukt pro 10^6 bis 10^8 dNp. Würde man davon ausgehen, dass für eine markante Krebsinzidenz induziert durch cis-dTGp (bzw. die gesetzten oxidativen DNS-Schäden) ähnliche Adduktwerte erreicht werden müssten, reichte die bestehende Nachweisgrenze von 1 cis-dTGp pro 10^6 dNp nicht aus. Die Methode ist noch nicht sensitiv genug, um oxidative DNS-Schädigung als Wirkungsmechanismus in der Kanzerogenese auszuschliessen.

SUMMARY

Detection of cis-thymidine glycol by ^{32}P -postlabeling as a marker of oxidative DNA damage

Introduction. Oxygen radicals such as the highly reactive hydroxyl radical are known to cause DNA damage. They are postulated to be partly responsible for the carcinogenic action of ionizing radiation. For a number of chemical carcinogens, an 'indirect' genotoxicity via the same ultimate reactive agent has been proposed. In order to investigate whether intracellular DNA *in vivo* is also damaged under conditions of chemically induced oxygen stress, a sensitive and specific method was developed to detect cis-thymidine glycol (5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymidine), a known reaction product of DNA oxidation by hydroxyl radicals. The method developed applies a modified ^{32}P -postlabeling technique with prior affinity chromatography enrichment of cis-thymidine glycol.

Development of the method. DNA was hydrolyzed to deoxyribonucleoside-3'-phosphates (dNp). Cis-thymidine glycol (cis-dTGp) was isolated and purified from natural nucleotides (dNp) by phenylboronate affinity chromatography (selective binding of cis-glycols) and was then 5'-phosphorylated by T4 polynucleotide kinase and [γ - ^{32}P]ATP to give cis-thymidine glycol-3',5'-bis-[5'- ^{32}P]phosphate (cis- $^*\text{pdTGp}$). As thymidine glycol turned out to be a bad substrate, the specificity of the T4 polynucleotide kinase had to be changed by addition of the 'mutagenic' divalent cation beryllium to increase the labeling efficiency from 1% to up to 20%. The reaction products were separated by anion exchange on 2-dimensional polyethylenimine cellulose t.l.c., where labeled nucleotides ($^*\text{pdNp}$) lined up on a diagonal line with the exception of cis- $^*\text{pdTGp}$ which was selectively retarded by the addition of borate in the second dimension. Residual contaminating natural nucleotides, which were 5'-labeled ($^*\text{pdNp}$) were mostly 3'-dephosphorylated ($^*\text{pdN}$) by phosphatase activity of T4 polynucleotide kinase under the phosphorylation conditions used (pH 7.5, 1 mM BeCl_2) and moved with $^*\text{p}_i$ as $^*\text{pdN}$. Cis-thymidine glycol was quantified by Cerenkov counting after localization by autoradiography.

Application. The method was tested on samples of irradiated calf thymus DNA. In the dose range of 14 to 1000 Gy 134 to 810 thymidine glycol moieties were detected per 10^6 nucleotides. These results are in good agreement with methods using radiochemical and immunological techniques. It therefore seemed that the new method represented a valid alternative for determination of a marker damage of oxidized DNA.

The method was then applied on *in vivo* experiments. Rats were treated with 'agents' which are proposed to induce oxygen stress in the liver.

Neither in liver DNA of rats treated 2 weeks or 2 months with Nafenopin (a peroxisome proliferator) nor in liver DNA of rats fed 3 or 7 days a choline-devoid / low methionine diet, any cis-dTGp could be detected. The limit of detection in these experiments was at 1 cis-dTGp per 10^6 dNp.

It is not sure whether oxidative DNA damage is not responsible for liver cancer induced by these two approaches or whether repair of cis-dTGp is too fast to be detected with this limit of detection. Steady-state DNA-adduct levels of known chemical carcinogens after TD_{50} treatments are in the range of 1 adduct in 10^6 to 10^8 dNp. If cis-dTGp (induced oxidative DNA-damage) steady-state levels are supposed to be in the same range to induce cancer, the limit of detection of 1 cis-dTGp per 10^6 dNp is not low enough. The method is not sensitive enough to exclude oxidative DNA damage as a mechanistic possibility in carcinogenesis.