Alkylierung von DNS durch in vivo gebildetes Dimethylnitrosamin = Alkylation of DNA by dimethylnitrosamine formed in vivo

Autor(en): **Meier-Bratschi, Annelis / Schlatter, Ch.**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **72 (1981)**

Heft 1

PDF erstellt am: **25.05.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-984603

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.
Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.
Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

http://www.e-periodica.ch

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **72**, 71–77 (1981)

Annelis Meier-Bratschi und *Ch. Schlatter,* Institut für Toxikologie der ETH und Universität Zürich, Schwerzenbach

Alkylierung von DNS durch in vivo gebildetes Dimethylnitrosamin

Alkylation of DNA by Dimethylnitrosamine Formed in vivo

Bildung von Nitrosaminen

Dimethylnitrosamin (DMNA) ist ein bekanntes Karzinogen, das in kleinsten Mengen in verschiedenen Nahrungsmitteln vorhanden ist. Darüber hinaus kann es auch durch Nitrosierung von Dimethylamin in vivo gebildet werden (Abb. 1).

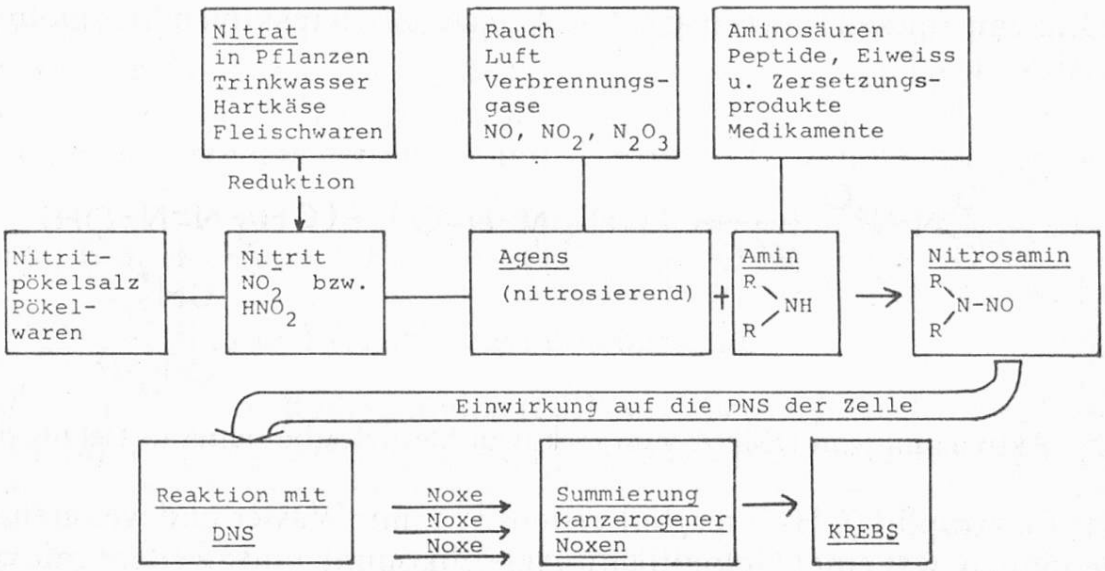


Abb. 1. Schema zur Bildung und Wirkung von Nitrosaminen (K. Hofmann, Fleischwirtschaft **59**, 823 (1979)

Nitrat, das in vielen Gemüsen in großen Mengen vorhanden ist, wird nach Absorption aus dem Magen-Darmtrakt zum Teil im Speichel wieder ausgeschieden und von Bakterien zu Nitrit reduziert. Das gebildete Nitrit gelangt hierauf aus dem Speichel in den Magen und kann dort mit vorhandenen Aminen zu Nitrosaminen reagieren. Das saure Milieu des Magens begünstigt die Bildung von Nitrosaminen.

Die endogene (d. h. im Körper gebildete) und exogene (d. h. von außen herrührende) Belastung durch flüchtige und mit den heutigen Methoden feststellbare

Nitrosamine dürfte im Bereich von ca. 0,05 μg pro kg Körpergewicht und Tag liegen. Die Kenntnisse der wahrscheinlich sehr bedeutungsvollen endogenen Belastung sind allerdings noch äußerst lückenhaft. Da aber keine ausreichenden epidemiologischen Daten über Nitrosaminexposition und Krebsinzidenz vorhanden sind, können keine genauen Aussagen über das Ausmaß der karzinogenen Wirkung der Nitrosamine für den Menschen gemacht werden.

Hingegen wurde die Bildung von Nitrosaminen in vitro, aber auch in vivo am Tier intensiv untersucht. Sie folgt folgender Abhängigkeit:

$$\text{Bildungsrate} = k\,[\text{Amin}][\text{salpetrige Säure}]^2 \qquad (1)$$

k = Konstante, die von der chemischen Struktur des Amins abhängig ist.

In vivo werden meist größere Mengen Nitrosamin gebildet als in vitro wegen vorhandener Katalysatoren, wie z. B. Rhodanid- oder Chloridionen (2). Gewisse Stoffe, wie z. B. Ascorbinsäure oder Phenole, können die Nitrosaminbildung allerdings auch hemmen (1).

Aktivierung und Wirkung von Nitrosaminen

Das gebildete Dimethylnitrosamin wird im Körper verteilt und durch oxidierende Enzyme (mixed function oxidases) zu chemisch reaktiven Metaboliten aktiviert (Abb. 2).

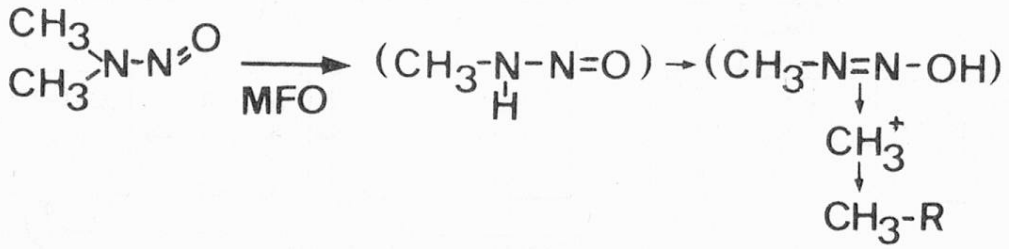
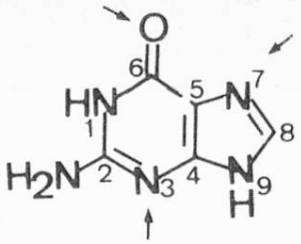


Abb. 2. Aktivierung von DMNA zum reaktiven Methylcarboniumion (Details siehe (2))

Das Elektrophil (CH_3^+) reagiert erstens v. a. mit Wasser und weiteren kleinen Nukleophilen, was einer Detoxifikation gleichkommt, und zweitens mit verschiedenen nukleophilen Zentren von Makromolekülen wie Proteinen oder Nukleinsäuren. Nukleinsäuren werden an vielen Stellen methyliert. Als Beispiel werden in Abbildung 3 die häufigsten Methylierungsstellen der Nukleinsäurebase Guanin gezeigt. 70—80% der totalen Metylierung von Nukleinsäuren erfolgt in Stellung 7, dagegen nur wenige Prozent am 6-Carbonylsauerstoff (2).

Die Methylierung der DNS (Desoxyribonukleinsäure) durch DMNA kann bei der zur Zellteilung notwendigen Replikation der DNS zu Mutationen führen und ist deshalb ein wesentlicher Schritt für die Induktion eines Tumors (O^6-Methylguanin mehr als 7-Methylguanin). Je höher die Methylierungsrate an den verschiedenen Stellen, desto höher ist die Karzinogenität einer Substanz. Aus diesem Grund



Guanin

Abb. 3. Häufigste Orte der Methylierung von Guanin (Pfeile)

wurde als Maß für die Bildung von DMNA in vivo unter Umgehen schwieriger Analytik von Nitrosaminkonzentrationen in verschiedenen Kompartimenten die Methylierung der DNS genommen.

Bestimmung der Bindung von DMNA an DNS

Je zwei männliche Ratten (200—250 g) wurden peroral mit 1 mg/kg [^{14}C]Dimethylamin (DMA), 0,5 mg/kg [^{14}C]DMA + 50 mg/kg Nitrit oder mit 0,5 mg/kg [^{14}C]DMNA als positive Kontrolle behandelt. 6 Stunden nach der Applikation wurden die Tiere getötet, die DNS aus verschiedenen Organen isoliert und die Radioaktivität der DNS gemessen. Die Bindung des Karzinogens an die DNS wurde zuerst in der Leber bestimmt, da DMNA ein Leberkarzinogen ist, später ebenso in Magen- und Darmschleimhaut, da auch Magenkrebs und Nitrosamine oft in Zusammenhang gebracht werden. Um die verschiedenen Experimente miteinander vergleichen zu können, wurde die spezifische Aktivität der DNS pro applizierte Radioaktivität berechnet und als kovalenter Bindungsindex bezeichnet (3):

$$\text{Kovalenter Bindungsindex CBI} = \frac{\mu\text{Mol Substanz gebunden / Mol DNA-P}}{\text{mMol Substanz/kg Körpergewicht}}$$

Die Resultate sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1. Bindung von Radioaktivität (CBI) an Leber-DNS nach oraler Gabe von [^{14}C] DMNA, [^{14}C] DMA + Nitrit, [^{14}C] DMA (für Einheiten siehe Text).

Substanz	CBI Leber
^{14}C-Dimetylnitrosamin	2000
^{14}C-Dimethylamin + Nitrit	54
	40
^{14}C-Dimethylamin	15
	7

Es zeigte sich, daß die gleichzeitige Verabreichung von Nitrit und DMA zu einer Erhöhung der Radioaktivität der Leber DNS geführt hat. Allerdings wurde auch nach Gabe von Dimethylamin allein ein CBI von 7 bzw. 15 erhalten. Dies könnte bereits vorhandenes Nitrit, das eine Nitrosierung des Amins ermöglichte,

verursachen. Es ist aber auch denkbar, daß die Radioaktivität durch biosynthetischen Einbau von markierten C_1-Fragmenten zustandegekommen ist. Die Purinbasen Adenin und Guanin werden u. a. aus 3 C_1-Fragmenten aufgebaut. beim Metabolismus von DMA und DMNA werden C_1-Gruppen abgespalten, die in neu gebildete Purinbasen eingebaut werden können und auf diese Weise Radioaktivität auf der DNS erzeugen, die nichts mit Methylierung zu tun hat. Diese Einbaumöglichkeit sollte noch größer sein für DNS der Magen- und Darmschleimhaut, wo die Neusynthese von DNS bedeutend schneller vor sich geht als in der Leber. Diese Vermutung wurde durch experimentelle Ergebnisse (Tabelle 2) bestätigt.

Tabelle 2. Bindung von Radioaktivität (CBI) an Magen- und Darmschleimhaut

Substanz	CBI Magenschleimhaut	CBI Darmschleimhaut
^{14}C-Dimethylnitrosamin	734	987
^{14}C-Dimethyl + Nitrit	120	278
	60	148
^{14}C-Dimethylamin	26	189
	94	364

Analytik der Basen

Es scheint also, daß die gemessene Radioaktivität aus zwei verschiedenen Prozessen stammt, erstens von methylierter DNS, die im Zusammenhang steht mit Karzinogenese, und zweitens aus der Biosynthese, die nichts mit Karzinogenese zu tun hat. Zur Differenzierung dieser beiden Quellen wurde eine Trennung von methylierten und natürlichen Basen auf «Reverse phase» HPLC durchgeführt.

Die Trennbedingungen und die erhaltene Trennung von Adenin, Guanin, 1-Methyladenin, 7-Methylguanin ond O^6-Methylguanin sind in Abbildung 4 wiedergegeben.

Für die Analyse der Basen wurde die DNS zuerst mit 0,1n HCl hydrolysiert, wobei die Purine abgespalten werden (4). Das auf 0,01n HCl verdünnte Hydrolysat (Konzentration ca. 0,5 mg/ml) wurde zusammen mit inaktivem 7-Methylguanin und 1-Methyladenin injiziert. Injizierte Menge: 50 μg hydrolisierte DNS und je 2,5 μg 7-Methylguanin und 1-Methyladenin. Die Peaks wurden in Szintillationsgläschen aufgefangen und nach Zugabe von 10 ml Instagel im Szintillationszähler gezählt. Die Radiochromatogramme der hydrolysierten DNS aus Leber und Darm nach Applikation von DMNA (= positive Kontrolle) sind in Abbildung 5 dargestellt.

DNS aus Versuch DMNA in Leber zeigt die Hauptaktivität in Fraktion 6, entsprechend dem Peak von 7-Methylguanin (= Methylierung).

Die DNS der Darmschleimhaut zeigt die Hauptaktivitätsmenge in den Fraktionen 3 (Adenin) und 5 (Guanin) (= Biosynthese).

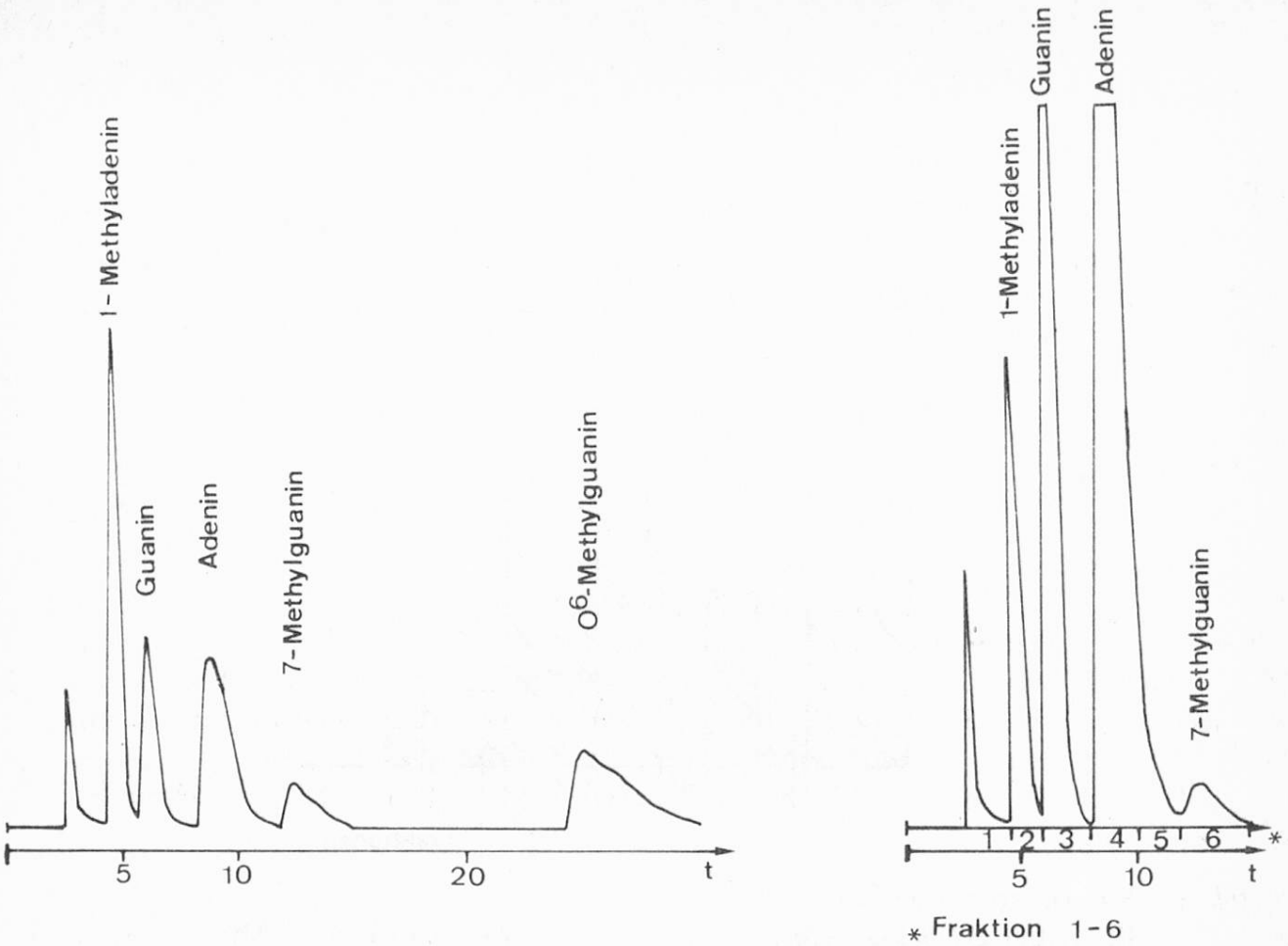


Abb. 4. Chromatogramme und Trennbedingungen: Standardbasen und Hydrolysat
Trennbedingungen:
Säule: Reverse phase μ-Bondapak C_{18}
Eluens: Ammoniumphosphatpuffer 0,01M pH 4 mit 1% Methanol
Fluß: 1,2 ml/min
Detektion: UV 254 nm

Auf die gleiche Weise wurde Leber-DNS aus dem Versuch Dimethylamin plus Nitrit analysiert. Die Hauptaktivität befand sich im 7-Methylguanin (= Methylierung).

Schlußfolgerungen

1. In vivo wurde in der Ratte nach gleichzeitiger oraler Gabe von [^{14}C] DMA und Nitrit Leber-DNS methyliert. Folglich bildete sich aus den beiden Reaktionspartnern in vivo [^{14}C] DMNA. Aus dem CBI von 2000 für DMNA kann berechnet werden, daß 1 bis 3% des Amins durch Nitrit nitrosiert wurde.

2. Magen- und Darmschleimhaut wiesen eine hohe spezifische Aktivität auf, die aber aufgrund der Basenanalytik zum größten Teil aus biosynthetischem Einbau von C_1-Fragmenten in die natürlichen Basen enstand.

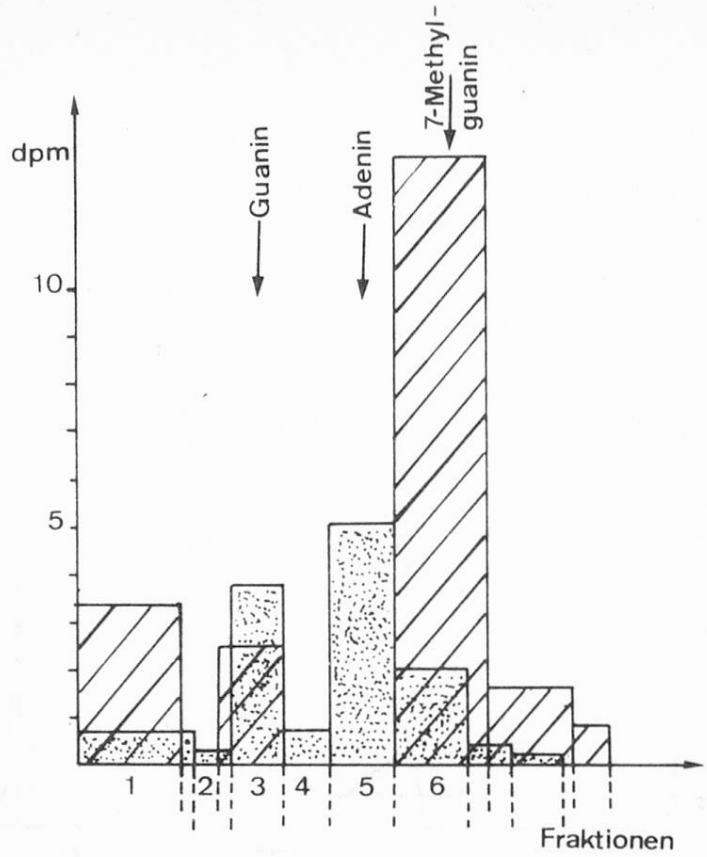


Abb. 5. Radiochromatogramme
▨ Leber DNS DMNA ▩ Darm DNS DMNA

Wir werden mit der beschriebenen Methode weiter untersuchen, ob und in welchem Maße die Bildung von Nitrosaminen aus Aminen und Nitrit oder Nitrat in vivo abläuft, und wie diese Bildung durch weitere Faktoren in der Diät beeinflußt wird.

Zusammenfassung

Nach oraler Gabe von [^{14}C] Dimethylnitrosamin oder [^{14}C] Dimethylamin (mit und ohne Nitrit) wird Radioaktivität einerseits biosynthetisch in DNS inkorporiert, andererseits werden die DNS-Basen methyliert. Toxikologisch relevant ist lediglich die Methylierung. Deren Anteil an der Totalradioaktivität wurde durch chromatographische Trennung der Basen und ihrer Derivate auf «Reverse phase» HPLC bestimmt.

Résumé

Un traitement oral de rats par de la [^{14}C] diméthylnitrosamine ou de la [^{14}C] diméthylamine (accompagnés de nitrite ou non) produit l'incorporation biosynthétique de la radioactivité dans l'ADN d'une part et, d'autre part, une méthylation des bases de l'ADN. Cette méthy-

lation possède un impact toxicologique. Sa part de la radioactivité totale a été determinée par séparation des bases et leurs derivés par «reverse phase» HPLC.

Summary

Treatment of rats with [^{14}C] dimethylnitrosamine or [^{14}C] dimethylamine (with or without nitrite) leads to biosynthetic incorporation of radioactivity in DNA and to methylation of the purine bases. Toxicological relevant is only methylation. The amount of methylated bases was determined by separation of the purine bases by reverse phase HPLC.

Literatur

1. *Mirvish, S.:* Formation of N-nitrosocompounds: Chemistry, kinetics and in vivo occurrence. Toxicol. Appl. Pharmacol. **31**, 325–351 (1975).
2. *Pegg, A. E.:* Metabolism of N-nitrosodimethylamine. JARC Sci. Publ. **27**, 3–22 (1980).
3. *Lutz, W. K.:* In vivo covalent binding of organic chemicals to DNA as a quantitative indicator in the processes of chemical carcinogens. Mut. Research **65**, 289–556 (1979).
4. *Lawley, P. D.:* Methylation of DNA by carcinogens: Some applications of chemical analytical methods. JARC Screening tests Sci. Publ. **12**, 181–208 (1976).

Annelis Meier-Bratschi
Institut für Toxikologie
der Eidg. Technischen Hochschule
und der Universität Zürich
Schorenstraße 16
CH-8603 Schwerzenbach