

Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène
Band: 72 (1981)
Heft: 1

Artikel: Alkylierung von DNS durch in vivo gebildetes Dimethylnitrosamin = Alkylation of DNA by dimethylnitrosamine formed in vivo
Autor: Meier-Bratschi, Annelis / Schlatter, Ch.
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-984603>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 15.10.2024

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

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).

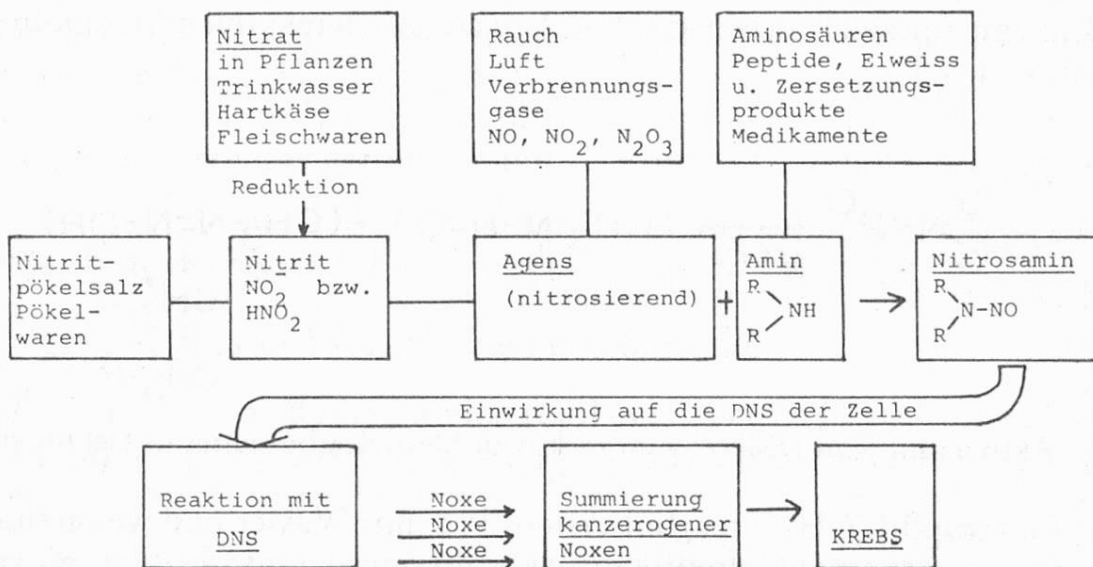


Abb. 1. Schema zur Bildung und Wirkung von Nitrosaminen (K. Hofmann, Fleischwirtschaft 59, 823 (1979))

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:

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

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).

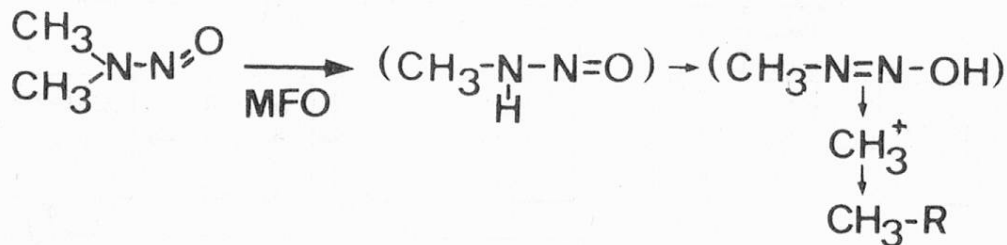


Abb. 2. Aktivierung von DMNA zum reaktiven Methylcarboniumion (Details siehe (2))

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

Die Methylierung der DNS (Desoxyribonucleinsäure) 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

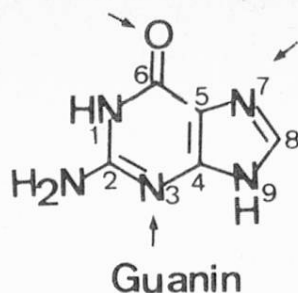


Abb. 3. Häufigste Orte der Methylierung von Guanin (Pfeile)

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 [¹⁴C]Dimethylamin (DMA), 0,5 mg/kg [¹⁴C]DMA + 50 mg/kg Nitrit oder mit 0,5 mg/kg [¹⁴C]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):

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

Die Resultate sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

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

Substanz	CBI Leber
¹⁴ C-Dimethylnitrosamin	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 C₁-Fragmenten zustande gekommen ist. Die Purinbasen Adenin und Guanin werden u. a. aus 3 C₁-Fragmenten aufgebaut. beim Metabolismus von DMA und DMNA werden C₁-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 und O⁶-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 hydrolysierte DNS und je 2,5 µg 7-Methylguanin und 1-Methyladenin. Die Peaks wurden in Szintillationsgläsern 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).

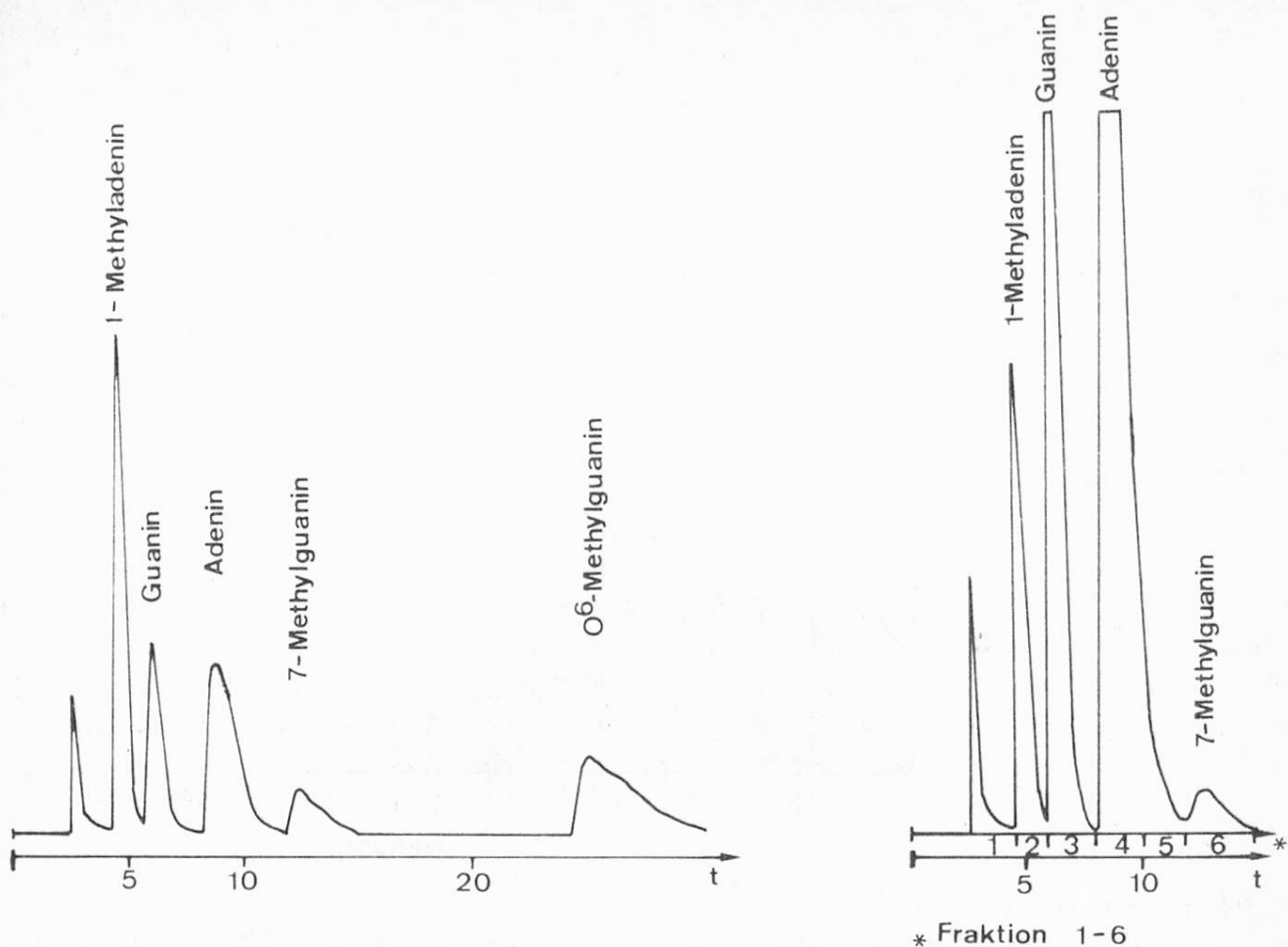


Abb. 4. Chromatogramme und Trennbedingungen: Standardbasen und Hydrolysat
Trennbedingungen:
Säule: Reverse phase μ -Bondapak C₁₈
Eluens: Ammoniumphosphatpuffer 0,01M pH 4 mit 1% Methanol
Fluß: 1,2 ml/min
Detektion: UV 254 nm

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 [¹⁴C] DMA und Nitrit Leber-DNS methyliert. Folglich bildete sich aus den beiden Reaktionspartnern in vivo [¹⁴C] 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 C₁-Fragmenten in die natürlichen Basen entstand.

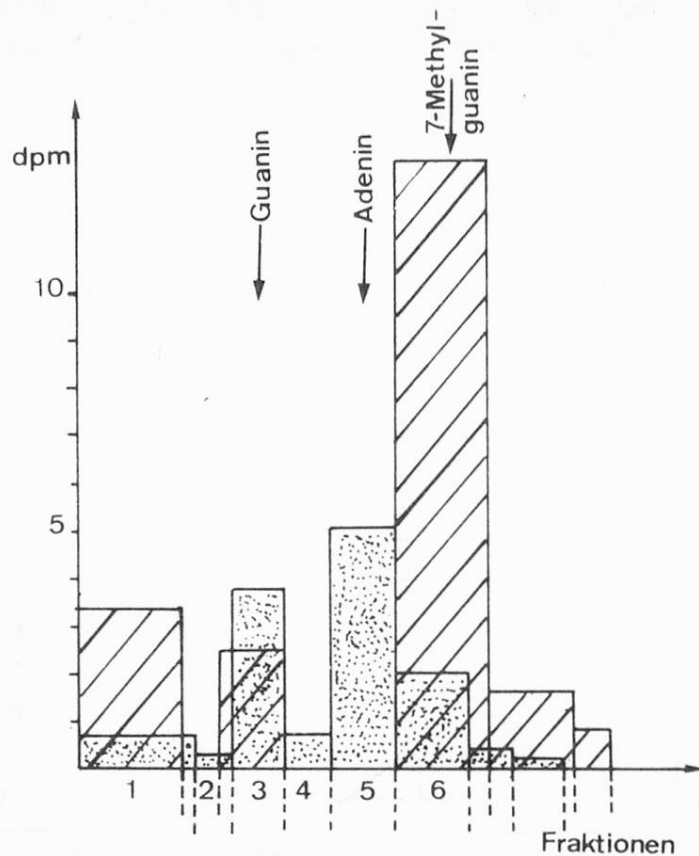


Abb. 5. Radiochromatogramme
 ▨ Leber DNS DMNA

▩ 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 [¹⁴C] Dimethylnitrosamin oder [¹⁴C] 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 [¹⁴C] diméthylnitrosamine ou de la [¹⁴C] 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 déterminée par séparation des bases et leurs dérivés 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. Toxicologically 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