Enzym-Induktion und Nucleinsäure-Stoffwechsel unter dem Einfluß organspezifischer Nitrosamine

H. KRÖGER und H. KESSEL

Biochemisches Institut der Universität Freiburg im Breisgau

(Z. Naturforsch. 23 b, 1240—1244 [1968]; eingegangen am 25. Januar 1968)

Nitrosamine zeigen eine stark organspezifische carcinogene Wirkung. In der vorliegenden Arbeit wird von einigen dieser Substanzen der Einfluß auf die Enzym-Induktion in der Leber und auf den Nucleinsäure-Stoffwechsel verschiedener Organe studiert.

Diäthylnitrosamin, das einen Tumor der Leber hervorruft, hemmt die Substrat-Induktion der Tyrosin- α -Ketoglutarat-Transaminase, hat jedoch keinen Einfluß auf die durch Cortison bewirkte Aktivitäts-Steigerung des Enzyms. Der Effekt des *N*-Nitroso-sarkosin-äthylesters, der spezifisch einen Tumor der Speiseröhre bewirkt, ist nur gering.

Der Einbau von Orotsäure-6- ^{14}C in die RNS der Leber wird unter der Einwirkung von Diäthylnitrosamin erheblich herabgesetzt. *N*-Nitroso-sarkosin-äthylester hat in diesem System keinen Effekt. Es steigert gering den Einbau von Uridin- ^3H in die RNS der Speiseröhre, aber auch in die von Niere, Milz und Herz.

In der Leber tritt unter der Einwirkung von Diäthylnitrosamin eine erhebliche Einlagerung von Glykogen ein. Applikation von *N*-Nitroso-sarkosin-äthylester führt nur zu einer sehr geringen Steigerung des Glykogen-Gehalts.

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, daß nur solche Nitrosamine auf die Induzierbarkeit von Enzymen in der Leber und den Nucleinsäure-Stoffwechsel dieses Organs wirksam sind, die hier auch tumoröse Veränderungen hervorrufen.

Im Jahre 1956 berichteten MAGEE et al.¹ über ihre Untersuchungen mit Dimethylnitrosamin. Sie hatten festgestellt, daß diese Substanz bei Ratten fast ausschließlich Leberkrebs hervorruft. Bei gründlichem Studium zahlreicher Nitrosamine fanden auch DRUCKREY et al.² eine stark organspezifische Wirkung dieser Stoffe.

Wir beschäftigten uns schon früher mit dem *N*-Nitroso-morpholin, das tumoröse Veränderungen in der Rattenleber auslöst. Wir konnten zeigen, daß während der Carcinogenese mit dieser Substanz die Substrat-Induktion der Tryptophan-Pyrrolase und der Tyrosin- α -Ketoglutarat-Transaminase abnimmt³; die Cortison-Induktion blieb unverändert. Außerdem fanden wir unter dem Einfluß von *N*-Nitroso-morpholin die RNS-Synthese in der Leber erhöht⁴.

In dieser Arbeit berichten wir über Untersuchungen, die die Enzym-Induktion in der Leber und den Nucleinsäure-Stoffwechsel in verschiedenen Organen unter der Einwirkung carcinogener Nitrosamine betreffen.

Abkürzungen: DENA = Diäthylnitrosamin, NM = *N*-Nitroso-morpholin, NSÄ = *N*-Nitroso-sarkosin-äthylester.

Methodik

1. Tiermaterial

Es wurden Sprague-Dawley-Ratten verwendet (Firma Ivanovas, Kisslegg, Allgäu), die bei Versuchsbeginn 120–150 g wogen.

2. Carcinogenese

Die Substanzen wurden den Tieren täglich mit dem Trinkwasser verabreicht.

a) Diäthylnitrosamin

4 mg/kg; die Überlebenszeit betrug durchschnittlich 181 Tage; es bildeten sich Leber-Tumoren.

b) *N*-Nitroso-sarkosin-äthylester

80 mg/kg; die Überlebenszeit betrug durchschnittlich 176 Tage; es entstanden Tumoren der Speiseröhre.

c) *N*-Nitroso-morpholin

10 mg/kg; die Überlebenszeit betrug durchschnittlich 218 Tage; es bildeten sich Leber-Tumoren.

3. Enzym-Induktion

Die Induktion der beiden Enzyme, Tyrosin- α -Ketoglutarat-Transaminase und Tryptophan-Pyrrolase, wurde wie berichtet durchgeführt³.

¹ P. N. MAGEE and J. M. BARNES, Brit. J. Cancer 10, 114 [1956].

² H. DRUCKREY, R. PREUSSMANN, S. IVANOVIC u. D. SCHMÄHL, Z. Krebsforsch. 69, 103 [1967].

³ H. KRÖGER u. B. GREUER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 342, 148 [1965].

⁴ H. KRÖGER u. T. LÜCKING, Z. Naturforsch. 22 b, 967 [1967].

4. Isolierung der Nucleinsäuren

a) Gesamt-RNS

Die Tiere erhielten intravenös 100 $\mu\text{Ci/kg}$ Uridin- ^3H . Zu den angegebenen Zeiten wurde das entsprechende Organ entnommen und daraus nach der Methode von DAVIDSON und SMELLIE⁵ die Gesamt-RNS isoliert.

Um die RNS aus der Speiseröhre zu gewinnen, wurden diese (von 3–5 Tieren) zerkleinert und mit 10-fachem Volumen 7-proz. Trichloressigsäure im Potter-Elvehjem homogenisiert. Die weitere Isolierung wurde nach oben benanntem Verfahren durchgeführt.

b) RNS-Fractionen

Versuche mit Uridin- ^3H

40 Min. nach intravenöser Injektion von 250 $\mu\text{Ci/kg}$ Uridin- ^3H wurde den Ratten, die 24 Stdn. zuvor gehungert hatten, das entsprechende Organ entnommen. Zunächst wurde bei 4 °C die Cytoplasma-RNS in der folgenden Weise isoliert: nach der Zerkleinerung des Organs wurde mit dem 8–10-fachen Volumen 0,14 M NaCl im Potter-Elvehjem homogenisiert. Man gab die gleiche Menge Phenol (75-proz., pH 6,0) zu, schüttelte 15 Min. und zentrifugierte (20 Min.; 1500 g). Die wäßrige Phase wurde abgehoben und die Zwischenphase noch 2-mal bei 4 °C mit der gleichen Volumina Phenol und 0,14 M NaCl wie zuvor extrahiert. Zur Gewinnung der 65°-RNS fügte man der Zwischenphase erneut Phenol und NaCl zu und zwar von beiden das 3-fache Volumen des Organgewichtes und erwärmte 20 Min. bei 65 °C. Die weitere Aufarbeitung wurde bereits beschrieben⁴. — Bei den Versuchen mit der Speiseröhre wurde nicht bei 4 °C, sondern nur bei 65 °C extrahiert.

Versuche mit Orotsäure-6- ^{14}C

15 Min. nach intravenöser Injektion von 20 $\mu\text{Ci/kg}$ Orotsäure-6- ^{14}C wurde den Ratten die Leber entnommen. Die RNS-Fractionen wurden nach einem früher beschriebenen Verfahren bei 4°, 50° und 65 °C isoliert⁴.

5. Bestimmung des Glykogen-Gehalts

Diese führten wir durch nach CARROLL et al.⁶ und ROE et al.⁷.

Bei allen Versuchen ist der mittlere Fehler des Mittelwertes angegeben.

6. Präparate

Wir danken Herrn Dr. R. PREUSSMANN, Freiburg i. Br., für die Substanzen Diäthylnitrosamin, *N*-Nitrosomorpholin und *N*-Nitroso-sarkosin-äthylester. Orotsäure-6- ^{14}C (Spez. Aktivität: 5 mCi/mMol) bezogen wir von New England Nuclear Corp., Boston, Mass., USA, Uridin- ^3H (Spez. Aktivität: 5,0 Ci/mMol) von The Radiochemical Centre, Amersham, England.

Ergebnisse

A. Induktion von Enzymen

1. Einfluß von Diäthylnitrosamin

Tyrosin- α -Ketoglutarat-Transaminase: Verabreicht man normal ernährten Ratten 600 mg/kg L-Tyrosin, so steigt die Aktivität der Tyrosin- α -Ketoglutarat-Transaminase in der Leber auf den 5-fachen Wert an (s. Tab. 1). Füttert man die Tiere mit DENA, dann wird die Induzierbarkeit des Enzyms erheblich eingeschränkt; dies ist bereits nach 66 Tagen DENA-Gabe wahrnehmbar.

	$\mu\text{Mol } p\text{-Hydroxyphenyl-}$ $\text{brenztraubensäure/mg}$ Protein/Stde.
Kontrolle	1,10 (2)
Induktion, normal	5,68 $\pm$ 0,48 (3)
Induktion, 66 Tage DENA	3,62 $\pm$ 0,09 (3)
Induktion, 106 Tage DENA	3,39 $\pm$ 0,26 (4)

Tab. 1. Einfluß von Diäthylnitrosamin auf die Substrat-Induktion der Tyrosin- α -Ketoglutarat-Transaminase in der Rattenleber. Die Tiere erhielten intraperitoneal 600 mg/kg L-Tyrosin; 4 Stdn. danach wurde die Aktivität des Enzyms ermittelt. Anzahl der Tiere in Klammern.

Bei der Cortison-Induktion der Tyrosin- α -Ketoglutarat-Transaminase erhält man andere Ergebnisse. 40 mg/kg Cortisonacetat bewirken bei gesunden Ratten, daß die Enzym-Aktivität in der Leber auf das Doppelte zunimmt (s. Tab. 2). Nach der Fütterung mit DENA liegt die Induzierbarkeit des Enzyms durch Cortison sogar noch höher — im Gegensatz zur Substrat-Induktion.

Tryptophan-Pyrrolase: Aus Abb. 1 ist zu ersehen, daß die Aktivität der Tryptophan-Pyrrolase in der Rattenleber nach Injektion von 500 mg/kg L-Tryptophan beträchtlich ansteigt. Diese Substrat-Induktion bleibt in annähernd gleicher Höhe auch dann noch erhalten, wenn den Tieren DENA verabreicht wird. — Mit der Cortison-Induktion der Tryptophan-Pyrrolase verhält es sich ebenso: kein Einfluß durch DENA.

⁵ D. N. DAVIDSON and R. M. S. SMELLIE, *Biochem. J.* **52**, 599 [1956].

⁶ N. V. CARROLL, R. W. LONGLEY, and J. H. ROE, *J. biol. Chemistry* **220**, 583 [1956].

⁷ J. H. ROE, J. M. BAILEY, R. R. GRAY, and J. N. ROBINSON, *J. biol. Chemistry* **236**, 1244 [1961].

	$\mu\text{Mol } p\text{-Hydroxyphenyl-}$ $\text{brenztraubensäure/mg}$ Protein/Stde.
Kontrolle	1,42 (2)
Induktion, normal	2,78 $\pm$ 0,19 (4)
Induktion, 110 Tage DENA	3,07 (2)
Induktion, 142 Tage DENA	4,27 $\pm$ 0,18 (8)

Tab. 2. Einfluß von Diäthylnitrosamin auf die Cortison-Induktion der Tyrosin- α -Ketoglutarat-Transaminase in der Rattenleber. Die Tiere erhielten intraperitoneal 40 mg/kg Cortisonacetat; 4 Stdn. danach wurde die Aktivität des Enzyms ermittelt. Anzahl der Tiere in Klammern.

Abb. 1. Einfluß von Diäthylnitrosamin auf die Substrat-Induktion der Tryptophan-Pyrrolase in der Rattenleber. Die Tiere erhielten intraperitoneal 500 mg/kg L-Tryptophan; 3 Stdn. danach wurde die Aktivität des Enzyms ermittelt. Anzahl der Tiere in Klammern.

2. Einfluß von *N*-Nitroso-sarkosin-äthylester

Dieses Nitrosamin vermindert die Induzierbarkeit der Tyrosin- α -Ketoglutarat-Transaminase durch L-Tyrosin nur wenig (s. Tab. 3). — Die Cortison-Induktion der Tryptophan-Pyrrolase bleibt völlig unbeeinflusst von der Substanz.

B. Nucleinsäure-Stoffwechsel

1. Einfluß von Diäthylnitrosamin

Durch Injektion von Orotsäure-6- ^{14}C und nachfolgende Isolierung verschiedener RNS-Fractionen aus der Rattenleber stellten wir fest, daß die RNS-Synthese im Kern unter der Einwirkung von DENA (26 Tage) merklich herabgesetzt ist (s. Tab. 4). Dies betrifft vorwiegend die bei 65° gewonnene RNS-Fraktion, die sich durch DNS-Ähnlichkeit auszeichnet.

	$\mu\text{Mol } p\text{-Hydroxyphenyl-}$ $\text{brenztraubensäure/mg}$ Protein/Stde.
Kontrolle	1,23 $\pm$ 0,29 (3)
Induktion, normal	5,60 $\pm$ 0,42 (5)
Induktion, 114 Tage NSÄ	4,86 $\pm$ 0,30 (8)

Tab. 3. Einfluß von *N*-Nitroso-sarkosin-äthylester auf die Substrat-Induktion der Tyrosin- α -Ketoglutarat-Transaminase in der Rattenleber. Die Tiere erhielten intraperitoneal 600 mg/kg L-Tyrosin; 4 Stdn. danach wurde die Aktivität des Enzyms ermittelt. Anzahl der Tiere in Klammern.

	Cytoplasma- RNS	50°-RNS	65°-RNS
Kontrolle	209 $\pm$ 16 (5)	11 573 $\pm$ 744 (7)	58 783 $\pm$ 778 (6)
26 Tage DENA	237 $\pm$ 13 (6)	8985 $\pm$ 1308 (6)	38 917 $\pm$ 159 (6)

Tab. 4. Einbau von Orotsäure-6- ^{14}C in RNS-Fractionen aus Leber normaler und Diäthylnitrosamin-behandelter Ratten. Angegeben sind IpM/mg RNS. Die Tiere erhielten intraperitoneal 40 $\mu\text{Ci/kg}$ Orotsäure-6- ^{14}C ; 15 Min. danach wurde die RNS isoliert. Anzahl der Versuche in Klammern; pro Versuch 2 Tiere.

2. Einfluß von *N*-Nitroso-sarkosin-äthylester

Tab. 5 läßt erkennen, daß dieses Nitrosamin sich auf den Einbau von Orotsäure-6- ^{14}C in die RNS-Fractionen der Rattenleber anders auswirkt als Diäthylnitrosamin. Nach 100 Tagen NSÄ-Fütterung weichen die Werte nur wenig von denen der Kontrollen ab.

Um den RNS-Stoffwechsel unter NSÄ-Einfluß in Niere, Milz, Herz und Speiseröhre studieren zu kön-

	Cytoplasma- RNS	50°-RNS	65°-RNS
Kontrolle	295 $\pm$ 10 (3)	6770 $\pm$ 455 (3)	26 042 $\pm$ 3040 (3)
100 Tage NSÄ	278 $\pm$ 31 (3)	7877 $\pm$ 866 (3)	23 850 $\pm$ 3910 (3)

Tab. 5. Einbau von Orotsäure-6- ^{14}C in RNS-Fractionen aus Leber normaler und *N*-Nitroso-sarkosin-äthylester-behandelter Ratten. Angegeben sind IpM/mg RNS. Die Tiere erhielten intraperitoneal 20 $\mu\text{Ci/kg}$ Orotsäure-6- ^{14}C ; 15 Min. danach wurde die RNS isoliert. Anzahl der Versuche in Klammern; pro Versuch 2 Tiere.

nen, bestimmten wir zunächst bei normal ernährten Ratten den Zeitpunkt, zu dem der Einbau von Uridin- ^3H das Maximum erreicht. Wir isolierten die Gesamt-RNS aus den Organen und stellten fest, daß

das Maximum des Uridin-Einbaus bei 60 Min. liegt (s. Abb. 2 a – d). Bei den weiteren Versuchen, bei denen Tiere verwandt wurden, die 80 Tage NSÄ erhalten hatten, injizierten wir das Uridin- ^3H 40 Min. vor der RNS-Isolierung. Wie Tab. 6 zeigt, ist die Einwirkung des NSÄ offenbar gering; es führt zu einer leichten Steigerung der RNS-Synthese in allen untersuchten Organen, nicht nur in der Speiseröhre, die das Carcinom trägt.

C. Bestimmung des Glykogen-Gehaltes

Läßt man normal ernährte Ratten 24 Stdn. hungern, findet man den Glykogengehalt in der Leber erheblich abgesunken (s. Tab. 7). Dies ist nicht der Fall, wenn es sich um Tiere handelt, die mit den Nitrosaminen DENA oder NM gefüttert wurden; der Glykogen-Gehalt liegt hier – auch nach 24 Stdn. Hunger – noch beachtlich hoch.

Abb. 2 a

Abb. 2 c

Abb. 2 b

Abb. 2 d

Abb. 2. Einbau von Uridin- ^3H in die RNS verschiedener Rattenorgane in Abhängigkeit von der Zeit. a) Niere, b) Milz, c) Herz, d) Speiseröhre. Die Tiere erhielten intravenös $100 \mu\text{Ci/kg}$ Uridin- ^3H ; zu den angegebenen Zeiten wurde die Gesamt-RNS isoliert. Anzahl der Tiere in Klammern.

	Kontrolle Cytoplasma- RNS	65°-RNS	80 Tage NSÄ Cytoplasma- RNS	65°-RNS
Niere	993 (3)	6005 (3)	1267 (2)	6850 (2)
Milz	232 (2)	4073 (3)	178 (2)	4905 (2)
Herz	1082 (4)	5710 (2)	1582 (2)	7240 (2)
Speiseröhre		1732 (2)		2180 (2)

Tab. 6. Einbau von Uridin-³H in RNS Fraktionen aus verschiedenen Organen normaler und *N*-Nitroso-sarkosin-äthylester-behandelter Ratten. Angegeben sind IpM/mg RNS. Die Tiere erhielten intravenös 250 μ Ci/kg Uridin-³H; 40 Min. danach wurde die RNS isoliert. Anzahl der Versuche in Klammern; pro Versuch 3–5 Tiere.

	Std. Hunger	mg Glykogen/g Leber
Kontrolle		33,5 $\pm$ 2,4 (4)
Kontrolle	24	0,58 $\pm$ 0,07 (4)
55 Tage DENA	24	40,7 $\pm$ 7,3 (4)
77 Tage DENA	24	15,3 $\pm$ 3,6 (3)
48 Tage NM	24	18,3 $\pm$ 6,8 (4)
162 Tage NM	24	13,4 $\pm$ 3,4 (4)

Tab. 7. Einfluß von Diäthylnitrosamin und *N*-Nitroso-morpholin auf den Glykogengehalt der Rattenleber. Anzahl der Tiere in Klammern.

Nach der Verabreichung von NSÄ (173 Tage) beobachteten wir in der Leber nur eine sehr geringe Steigerung des Glykogen-Gehaltes, wenn die Tiere 24 Std. gehungert hatten.

Diskussion

Von DRUCKREY et al.² konnte gezeigt werden, daß zahlreiche carcinogene Nitrosamine eine stark organspezifische Wirkung entfalten. Die Ursache dieser Reaktion ist noch weitgehend unbekannt. Man weiß lediglich, daß die Nitrosamine, um wirksam zu werden, einer Aktivierung bedürfen. Nach den Untersuchungen von BROUWERS and EMMELOT⁸ beginnt diese mit einer enzymatischen Hydroxylierung.

⁸ J. A. BROUWERS and P. EMMELOT, Exp. Cell Res. **19**, 467 [1960].

⁹ M. F. RAJEWSKY, persönliche Mitteilung.

Unser Interesse an diesem Problem lag in der Frage, ob die Nitrosamine in den Organen, deren tumoröse Entartung sie bewirken, auch nachweisbare Stoffwechsel-Veränderungen hervorrufen. Wir betrachteten die Induktion von Enzymen und den Nucleinsäure-Stoffwechsel.

Beim Studium der Enzym-Induktion stellten wir fest, daß die Tyrosin- α -Ketoglutarat-Transaminase unter dem Einfluß von Diäthylnitrosamin wesentlich schwächer durch ihr Substrat induziert wird. Die gleiche Wirkung auf das Enzym fanden wir früher schon nach Verabreichung von *N*-Nitroso-morpholin³. Die Cortison-Induktion dieser Transaminase bleibt von beiden Substanzen unbeeinflusst. Bei der Behandlung mit *N*-Nitroso-sarkosin-äthylester, das spezifisch ein Plattenepithel-Carcinom im Oesophagus hervorruft, konnten wir in der Leber keine nennenswerte Veränderung bei der Substrat-Induktion der Tyrosin- α -Ketoglutarat-Transaminase nachweisen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß nur solche Nitrosamine die Induzierbarkeit des Enzyms in der Leber einschränken, die im gleichen Organ auch carcinogen wirksam werden.

Der Einfluß der Nitrosamine auf den RNS-Stoffwechsel der Rattenleber ist weniger einheitlich als der auf die Enzym-Induktion. Verabreicht man den Tieren Diäthylnitrosamin, so nimmt die RNS-Synthese in der Leber deutlich ab. Mit Hilfe von Autoradiographie wurde dieses auch von RAJEWSKY⁹ festgestellt. Das *N*-Nitroso-morpholin aber, das gleich dem Diäthylnitrosamin tumoröse Veränderungen der Leber hervorruft, übt auf die RNS-Synthese dieses Organs einen entgegengesetzten Einfluß aus: der Einbau von Orotsäure-6-¹⁴C in die Leber-RNS ist gesteigert⁴. Die Wirkung des *N*-Nitroso-sarkosin-äthylesters auf den RNS-Stoffwechsel der Leber ist unbedeutend. Dieses Ergebnis wäre verständlich, wenn es zuträfe, daß die Nitrosamine in dem Organ, in dem sie Krebs auslösen, auch die RNS-Synthese veränderten. Aus den bisher vorliegenden Untersuchungen lassen sich allerdings noch keine endgültigen Schlüsse ziehen. Dazu müssen noch die Verhältnisse bei weiteren carcinogenen Nitrosaminen studiert werden.

Die Untersuchungen wurden unterstützt aus Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft, des Ministeriums für Wissenschaftliche Forschung und der Stiftung Volkswagenwerk.