

Die Flächenverhältnisse der identifizierten Banden in den hochsiedenden Anteilen sind in Tab. 5 b zusammengestellt.

Bei der Umsetzung der *Diphenylalkane* befand sich kurz vor dem Entladungsrohr ein mit Heißluft beheizter Kolben mit der Substanz. Die Zusammensetzung der entstandenen Destillate ist in Tab. 6 a wiedergegeben.

Höhsiedende Produkte schieden sich zusammen mit nichtumgesetztem Material am Ende des Entladungs-

rohres ab. In Tab. 6 b sind die in den höhsiedenden Anteilen nachgewiesenen Produkte zusammengestellt.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie danke ich für die finanzielle Unterstützung der Arbeit, Herrn Dr. W. KÖNIG für die Aufnahme der Massenspektren, Herrn Dr. K. SCHEFFLER für die Überlassung einer Mikrowellenapparatur.

Zum Wirkungsmechanismus von 1-Nitroso-3-nitro-1-methyl-guanidin bei der Mutationsauslösung

II. Produkte der Reaktion von 1-Nitroso-3-nitro-1-methyl-guanidin mit Nucleobasen, Nucleosiden, Nucleosidphosphaten und Homopolyribonucleinsäuren

F. LINGENS, J. RAU und R. SÜSSMUTH

Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie der Universität Hohenheim (Stuttgart-Hohenheim)

(Z. Naturforsch. 23 b, 1565—1570 [1968]; eingegangen am 26. Juli 1968)

1-Nitroso-3-nitro-1-methyl-guanidine (NNMG) (at pH 5,5 resp. 6,0) methylates and deaminates the bases of nucleic acids. We treated nucleic bases, nucleosides, nucleoside phosphates and homopolyribonucleic acids with NNMG and we found the following methyl derivatives of adenine: 1-methyladenine, 3-methyladenine and *N*⁶-methyladenine; of guanine: 7-methylguanine and of cytosine: 1-methylcytosine and 3-methylcytosine. Moreover bases of the nucleic acids were deaminated: adenine to hypoxanthine and guanine to xanthine.

In der ersten Mitteilung¹ haben wir über die Wirkung von 1-Nitroso-3-nitro-1-methyl-guanidin (NNMG) auf die Matrizenaktivität der Polynucleotide bei der zellfreien Proteinsynthese berichtet.

Für die Mutationsauslösung durch NNMG²⁻⁸ kommen vor allem 3 Reaktionen mit den Nucleobasen in Frage: die Methylierung^{1, 9, 10}, die Desaminierung^{1, 11} und die Nitroguanylierung. Wir haben Methylierung und Desaminierung hauptsächlich unter ähnlichen Bedingungen (bei 37° oder Zimmertemperatur und pH 5,5 bzw. 6,0) untersucht, wie sie bei der Mutationsauslösung vorliegen.

Material und Methoden

Citronensäure-Phosphat-Puffer nach McIlvaine: Gemisch von 0,2-*m.* Na₂HPO₄ und 0,1-*m.* Citronensäure.

Zur Dünnschichtchromatographie verwendete Laufmittel:

S1: *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (4/1/1), S2: Methanol/konz. Salzsäure/Wasser (7/2/1), S3: 3% NH₄Cl/H₂O, S4: Isopropanol/Wasser/Ammoniak (8/1/1), S5: *n*-Butanol/Wasser (1/11), S6: Isopropanol/konz. Salzsäure/Wasser (65/16/19), S7: Isopropanol/Wasser (6/4), S8: *n*-Butanol/Äthanol/Wasser (5/2/3), S9: *n*-Butanol (wassergesättigt)/Ammoniak (100/1), S10: Äthanol/Wasser/Ammoniak (80/8/2).

¹ P. CHANDRA, A. WACKER, R. SÜSSMUTH u. F. LINGENS, Z. Naturforsch. 22 b, 512 [1967].

² J. D. MANDELL u. J. GREENBERG, Biochem. biophysic. Res. Commun. 3, 575 [1960].

³ J. D. MANDELL, P. L. WOODY u. J. GREENBERG, J. Bacteriol. 81, 149 [1961].

⁴ A. J. MÜLLER u. T. GICHNER, Nature [London] 201, 1149 [1964].

⁵ R. SCHWAIER, Z. Vererbungslehre 97, 55 [1965].

⁶ F. LINGENS u. O. OLTMANN, Z. Naturforsch. 21 b, 660 [1966].

⁷ D. R. MCCALLA, Science [Washington] 148, 497 [1965].

⁸ H. B. SINGER u. H. FRAENKEL-CONRAT, Proc. nat. Akad. Sci. USA 58, 234 [1967].

⁹ J. RAU u. F. LINGENS, Naturwissenschaften 54, 517 [1967].

¹⁰ F. LINGENS, R. SÜSSMUTH, A. WACKER u. P. CHANDRA, Naturwissenschaften 54, 492 [1967].

¹¹ F. K. ZIMMERMANN, R. SCHWAIER u. U. V. LAER, Z. Vererbungslehre 97, 68 [1965].

Umsetzungen von NNMG mit Nucleobasen und ihren Derivaten

Adenin: 20,7 mg (0,15 mMol) Adenin wurden in 4,4 ml Puffergemisch vom pH 5,5 bei 80 °C gelöst und dazu 218 mg (1,5 mMol) NNMG gegeben. Nach 34 Stdn. ist das Reaktionsgemisch an Dowex 1X8 (100 bis 200 mesh, Cl[⊖]/H₂O, 1,5·20 cm) getrennt worden: je 150 Tropfen (10 ml) NH₃-Lösung von pH 10, wodurch Adenin zurückgehalten wird. Fraktionen 1–20 wurden an Dowex 50 WX12 (200–400 mesh, H[⊖]/H₂O, 27·7 cm) wiederholt getrennt. Je 150 Tr. H₂O Fr. 101 bis 120 (die Guanidine laufen durch, Nucleobasen werden zurückgehalten), 2-n. HCl Fr. 121 ff.

Dünnschichtchromatographie an MN 400

Substanz	R _f -Wert in S1	S2
Fr. 125 ff.	0,26	0,27
Hypoxanthin	0,15	0,20

Fr. 150–168 3-Methyladenin [λ max = 273 nm (155)].
Fr. 180–240 Adenin und oder 1-Methyladenin [λ max = 261 nm (200)].

20 mg (0,15 mMol) Adenin und 220 mg (1,5 mMol) NNMG wurden in 8 ml Pufferlösung von pH 5,5 bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach 6 Tagen Auftrennung von 4 ml an Dowex (wie oben), je 150 Tr. H₂O. Nach wiederholter Trennung an Dowex 50 (wie oben), je 150 Tr. H₂O Fr. 101–120, 2-n. HCl Fr. 121–130, 3-n. HCl Fr. 131–180.

Fr. 137–143 3-Methyladenin [λ max = 273 nm (140)].

Fr. 145–170 1-Methyladenin + Adenin [λ max = 261 nm (150)].

Adenosin: 20,0 mg (0,07 mMol) Adenosin wurden in 5,5 ml Puffergemisch von pH 5,5 gelöst, mit 110 mg (0,75 mMol) NNMG versetzt und bei Zimmertemperatur stehengelassen. Die fast farblose Reaktionslösung wurde mit Methanol versetzt, bis sie davon ungefähr 60% enthielt, und der Trennung unterworfen an Dowex 1X8 (100–200 mesh), OH[⊖]/60-proz. Methanol, 1,5·20 cm).

Fr. 26–46 1-Methyladenosin: λ max = 259 nm (H₂O),
 λ max = 257 nm (n/10 HCl).

Dünnschichtchromatographie

Substanz	R _f -Wert an MN 400/S4	DEAE/S5
Fr. 26–46	0,60	0,70
Adenosin	0,33	0,38

Massenspektrum von Fr. 26–47: m/e = 168 (3,5%), 167 (34%), 150 (8%), 149 (100%), 113 (13%), 112 (11%), 104 (8%), 84 (5%), 83 (11%), 71 (27%), 70 (33%), 69 (9%).

100,5 mg (0,36 mMol) Adenosin wurden mit 549,7 mg (3,7 mMol) NNMG in 11 ml Pufferlösung von pH 5,5 bei Zimmertemperatur und Lichtabschluß gehalten. Nach spätestens 14 Tagen war alles NNMG verbraucht. Trennung an Dowex 1X8 (100–200 mesh, OH[⊖]/H₂O,

1,5·14 cm), Fraktionen ca. 10 ml; wäßrige Lösung wurde aufgezogen und mit steilem Gradienten (70 ml) auf 60-proz. Methanol gebracht. Ab Fr. 71 wurde mit 50 ml H₂O äquilibriert und die Elution mit 0,2-m. NH₄HCO₃ fortgesetzt. Fr. 99–106 Inosin.

Dünnschichtchromatographie an MN 400

Substanz	R _f -Wert in S1	S6
Fr. 99–106	0,08	0,28
Inosin	0,09	0,25

80 mg (0,03 mMol) Adenosin wurden in 10 ml Pufferlösung pH 5,5 mit 40 mg (0,27 mMol) NNMG bei 37° gehalten. Nach 5 Tagen Trennung an Dowex 1X8 (100–200 mesh, Cl[⊖]/H₂O, 1,5·11,3 cm) mit NH₃-Lösung von pH 10. Fraktionen zu 10 ml. Fraktionen 9 bis 46, Rechromatographie an Dowex 50 WX12 (200 bis 400 mesh, H[⊖]/2-n. HCl, 2·7 cm), Fraktionen zu 10 ml:

Fr. 6–8 Nitroguanidin (λ max 264 nm),
Fr. 9–11 Hypoxanthin (λ max 248 nm),
Fr. 60–140 1-Methyladenin (λ max 260 nm).

Adenosinmonophosphat: 10 mg (0,03 mMol) Adenosinmonophosphat wurden bei 37° in 4 ml Puffergemisch vom pH 5,5 mit 50 mg (0,34 mMol) NNMG umgesetzt. Nach Vortrennung an Dowex 1X8 (100–200 mesh, OH[⊖]/H₂O, 1,5·20 cm) Trennung an Dowex 50 WX12 (200–400 mesh, H[⊖]/H₂O, 2·7 cm), Fraktionen zu 10 ml: Fr. 16–19 Desaminierungsprodukt (λ max = 246–252 nm).

Guanin: 20,6 mg (0,14 mMol) Guanin wurden mit 202 mg (1,37 mMol) NNMG in 4 ml Pufferlösung vom pH 5,5 drei Stdn. lang auf 80 °C erhitzt.

Dünnschichtchromatographie

Substanz	R _f -Wert an MN 400/S1	S4 DEAE/S5
Lösung	0,20	0,30 0,02
Xanthin	0,20	0,30 0,02

UV-Spektrum von R_f 0,30 (MN 400/S4): λ max = 267 nm (H₂O), λ max = 261 nm (n/10 HCl).

Guanosin: 50 mg (0,18 mMol) wurden in 10 ml Pufferlösung von pH 5,5 mit 260 mg (1,77 mMol) NNMG 4 Tage auf 37° gehalten.

Dünnschichtchromatographie an MN 400

Substanz	R _f -Wert in S4	S7
Nitroguanidin	0,65	0,76
1-Methyl-3-nitroguanidin	0,80	0,85
Guanosin	0,30	0,60
Substanz mit heller Fluoreszenz im UV-Licht (254 nm)	0,13	0,40

Säulenchromatographie der hydrolysierten Probe an Dowex 50 WX12 (200–400 mesh, H[⊖] 12-n. HCl, 2·7 cm) Fraktionen zu 10 ml: Fr. 4–10 enthalten Nitroguanidin und 1-Nitro-3-methyl-guanidin, 23–40 Guanin, 46–62 7-Methyl-guanin.

Substanz	R_f -Werte und Aktivität in IpM			
	S1	S3	S8	S9
Adenin	0,50	0,26	0,50	0,48
1-Methyladenin	0,15 3112	0,68 308	0,27 $51,9 \pm 1,1$	0,32 236
3-Methyladenin	0,36 356	0,61 $36,6 \pm 1,1$	0,40 198	0,15 347
N ⁶ -Methyladenin	0,68 164	0,35 $21,9 \pm 1,1$ $6,0 \pm 0,9^*$	0,73 $13,9 \pm 1,0$	0,70 101
1-Nitro-3-methylguanidin	0,63 52470	0,81 2136	0,66 2650	0,64 36263

Tab. 1. Methylierungsprodukte nach Behandlung von Adenin mit ¹⁴C-Methyl-NNMG bei pH 6 und 37° in Citronensäure-Phosphat-Puffer.

Substanz	R_f -Werte und Aktivität in IpM			
	S1	S3	S8	S9
Adenin	0,45	0,26	0,45	0,48
1-Methyladenin	0,14 72	0,62 $10,9 \pm 0,9$	0,21 $15,5 \pm 1,0$	0,34 $10,1 \pm 0,9$
3-Methyladenin	0,38 $4,0 \pm 0,8^*$	0,62 $10,9 \pm 0,9$	0,35 $11,5 \pm 1,3$	0,15 $10,6 \pm 0,9$
N ⁶ -Methyladenin	0,68 $7,9 \pm 1,2$	0,34 $3,6 \pm 0,7$	0,63 $3,9 \pm 0,6$	0,70 $8,8 \pm 0,9$

Tab. 2. Methylierungsprodukte nach Behandlung von Poly-A (Bedingungen wie Tab. 1). * Durch Rechromatographie erhaltene Werte.

10 mg (0,035 mMol) Guanosin und 52 mg (0,35 mMol) NNMG wurden in 10 ml Pufferlösung von pH 5,5 5 Tage bei 37° gehalten. Die Trennung des Reaktionsgemischs erfolgte an Dowex 50 (wie oben), Fraktionen zu 10 ml, H₂O 1–20, 2-n. HCl 21 ff.: Fr. 2–13 Nitroguanidin und 1-Nitro-3-methylguanidin, 23–33 Guanosin und Xanthin, 35–55 Guanin.

20 mg (0,07 mMol) Guanosin in 5,2 ml Pufferlösung von pH 5,5 wurden bei Zimmertemperatur der wäßrigen Lösung von 104 mg (0,70 mMol) NNMG ausgesetzt.

Dünnschichtchromatographie

Substanz	R_f -Wert an MN 400/S1	S4	DEAE/S5
Reaktionslösung	0,03	0,17	0,01
Xanthosin	0,03	0,17	0,01

Guanosinmonophosphat: 8 mg (0,022 mMol) Guanosinmonophosphat wurden in 10 ml Puffergemisch vom pH 5,5 mit 40 mg (0,27 mMol) NNMG umgesetzt und 5 Tage a) bei Zimmertemperatur, b) bei 37° C gehalten. Auftrag der Reaktionsprodukte an einer Säule von Dowex 50 WX12 (200–400 mesh, H⁺/2-n. HCl, 2·7 cm) und Prüfung bei 260 nm: a) Fr. 48–58 flacher und b) Fr. 44–59 deutlicher Absorptionspeak von 7-Methylguanin.

Einwirkung von ¹⁴C-Methyl-NNMG auf Nucleobasen bzw. Nucleinsäuren

Darstellung von ¹⁴C-Methyl-NNMG (in Anlehnung an die Vorschrift von McKay¹²): 2 mc ¹⁴C-Methylaminhydrochlorid (spez. Aktivität ca. 30 mc/mMol) gelöst in Äthanol, wurden unter Eiskühlung mit einigen Tropfen konz. NNMG-Lösung versetzt. 40 mg (1,3 mMol) Methylamin wurden als 40-proz. methanolische Lösung zugegeben und dazu soviel festes NNMG zugegeben, daß sich insgesamt 250 mg (1,7 mMol) davon im Reaktionsgefäß befanden. Nach Beendigung der Gasentwicklung sind die Kristalle von 1-Nitro-3-methylguanidin abfiltriert worden. Die Substanz wurde in einem kleinen Erlenmeyer-Kolben in 0,18 ml HNO₃ ($d = 1,42$) aufgelöst. Die Lösung ist dann mit 0,8 ml H₂O verdünnt worden. Unter ständigem Rühren wurden 80 mg (1,16 mMol) NaNO₂, gelöst in 0,12 ml H₂O, in 5 Min. zugegeben. Nach 20 Min. langem Rühren sind die gelben Kristalle des ¹⁴C-Methyl-NNMG abfiltriert worden (spez. Aktivität 2 mc/mMol).

Umsetzung der Nucleobasen bzw. der Nucleinsäuren mit ¹⁴C-Methyl-NNMG: Als Reaktionslösung diente Phosphat-Citrat-Puffer von pH 6. 1 mg Base (Adenin oder Cytosin) bzw. 1 mg Nucleinsäure (Poly-A, Poly-C, Poly-UG) und 0,3–1,0 mg ¹⁴C-Methyl-NNMG in 1 ml

¹² A. F. MCKAY, J. Amer. chem. Soc. 71, 1967 [1949].

Pufferlösung wurden 24–48 Stdn. bei 37 °C geschüttelt. Die Nucleinsäuren wurden ungefähr 10 Stdn. lang durch Dialyse gegen deion. Wasser gereinigt. Darauf wurden Poly-A und Poly-UG mit 1-n. HCl bei 100 ° 2 Stdn., Poly-C mit 20-proz. HCl im zugeschmolzenen Rohr bei 120 ° 2 Stdn. hydrolysiert.

Identifizierung der Methylierungsprodukte: Die Identifizierung auf den Dünnschichtplatten wurde durch Co-Chromatographie mit Vergleichssubstanzen verschiedener Herkunft an MN 400 in mehreren Laufmitteln vorgenommen. Die bei 254 nm löschenden Substanzflecken wurden ausgekratzt und nach Rechromatographie in einem anderen Laufmittel die Radioaktivität mit 7 ml Dioxan-Szintillator in einem Packard-Scintillation-Spektrometer gemessen.

Substanz	<i>R_f</i> -Werte und Aktivität in IpM		
	S2	S3	S10
Guanin	0,14	0,46	0,09
7-Methylguanin	0,19 9,1 ± 0,8	0,64 9,6 ± 0,9	0,17 7,3 ± 0,8

Tab. 3. Methylierungsprodukt nach Behandlung von Poly-UG (Bedingungen wie Tab. 1).

Substanz	<i>R_f</i> -Werte und Aktivität in IpM			
	S1	S2	S3*	S10
Cytosin	0,20	0,39	0,70	0,24
3-Methylcytosin	0,26 382 47,4 ± 1,2	0,55 36,1 ± 1,2	0,77	0,42 29,5 ± 1,1
1-Methylcytosin	0,15 644 7,3 ± 0,6	0,64 8,3 ± 0,9	0,84	0,50 43,2 ± 1,2
1-Nitro-3-methylguanidin	0,60	0,78	0,70	0,58

* System S 3 diente zur Vortrennung, Rechromatographie in den übrigen Systemen.

Tab. 4. Methylierungsprodukte nach Behandlung von Cytosin (Bedingungen wie Tab. 1).

Substanz	<i>R_f</i> -Werte und Aktivität in IpM			
	S1	S2	S3	S10
Cytosin	0,20	0,38	0,70	0,24
1-Methylcytosin	0,15 19,8 ± 1,0	0,64 27,8 ± 0,4	0,84 92,7 ± 0,8	0,49 53,4 ± 0,8

Tab. 5. Methylierungsprodukt nach Behandlung von Poly-C (Bedingungen wie Tab. 1).

Ergebnisse und Diskussion

Derivate des Adenins

Wird Adenin bei pH 5,5 bei Zimmertemperatur und bei 80 ° mit NNMG bis zur Entfärbung des Mutagens umgesetzt, so lassen sich nach säulenchromatographischer Trennung 1-Methyladenin und 3-Methyladenin isolieren. Der Nachweis erfolgte durch die UV-Maxima bei 261 nm bzw. 273 nm und durch Dünnschichtchromatographie in 2 Systemen. Nach einer Umsetzung des Adenosins bei Zimmertemperatur und 37 ° mit NNMG wurde nach Auftrennung nach dem Verfahren von DECKER¹³ 1-Methyladenosin durch das UV-Maximum bei 259 nm und massenspektrometrisch durch die Massenzahl 149 nachgewiesen. Inosin konnte dünnschichtchromatographisch identifiziert werden. Nach Hydrolyse wurden Hypoxanthin und 1-Methyladenin sowohl dünnschichtchromatographisch in zwei Laufmitteln als auch durch die UV-Maxima bei 248 nm bzw. 260 nm nachgewiesen. Aus Adenosinmonophosphat war Hypoxanthin mit ca. 1% Ausbeute zu erhalten. Bei der Umsetzung von Adenin mit ¹⁴C-Methyl-NNMG konnten neben 1-Methyladenin und 3-Methyladenin auch *N*⁶-Methyladenin durch Co-Chromatographie mit Vergleichssubstanzen und Messung der Radioaktivität nachgewiesen werden (Tab. 1). Diese Verbindungen traten unter gleichen Reaktionsbedingungen auch bei einer entsprechenden Umsetzung mit Polyadenylsäure auf (Tab. 2). 3-Methyladenin wurde kürzlich auch von LAWLEY¹⁴ in NNMG-behandelter DNS nachgewiesen.

Derivate des Guanins

Nach der Umsetzung des Guanins mit NNMG sowohl bei 80 ° als auch bei Zimmertemperatur wurde Xanthin dünnschichtchromatographisch und durch das UV-Spektrum identifiziert. Aus Guanosin konnte nach entsprechender Reaktion bei Zimmertemperatur bzw. 37 ° und bei pH 5,5 Xanthosin mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie nachgewiesen werden. 7-Methylguanosin gab sich durch helle Fluoreszenz im UV-Licht bei 254 nm auf der Dünnschichtplatte zu erkennen, und die Fluoreszenz ließ sich im Gegensatz zu der des Guanosins durch Ammoniakdämpfe nicht löschen. Nach Hydrolyse und Trennung an Dowex 50 wurden außerdem Xanthin und 7-Methylguanin gefunden. 7-Methylguanin ließ sich

¹³ C. H. DECKER, J. Amer. chem. Soc. **87**, 4027 [1965].

¹⁴ P. D. LAWLEY, Nature [London] **218**, 580 [1968].

Ausgangssubstanz (Reaktionspartner des NNMG)	Reaktionsprodukte
<i>Derivate des Adenins</i>	
Adenin, Adenosin, Adenosinmonophosphat, Polyadenylsäure	1-Methyladenin
Adenin, Adenosin, Adenosinmonophosphat, Polyadenylsäure	3-Methyladenin
Adenin, Polyadenylsäure	N ⁶ -Methyladenin
Adenin, Adenosin, Adenosinmonophosphat	Hypoxanthin
<i>Derivate des Guanins</i>	
Guanosin, Guanosinmonophosphat, Polyuridylylguaninsäure	7-Methylguanin
Guanin, Guanosin	Xanthin
<i>Derivate des Cytosins</i>	
Cytosin, Polycytidylsäure	1-Methylcytosin
Cytosin	3-Methylcytosin

Tab. 6. Umsetzungsprodukte der Nucleobasen und ihrer Derivate mit NNMG.

auch nach einer Reaktion von Guanosinmonophosphat mit NNMG nach Hydrolyse und Trennung über Dowex 50 erhalten. Mit Hilfe von ¹⁴C-Methyl-NNMG wurde 7-Methylguanin aus Polyuridylylguaninsäure nach Dialyse, Hydrolyse und Chromatographie gefunden (Tab. 3). 7-Methylguanin ist in jüngster Zeit von LAWLEY in der DNS nach Behandlung mit NNMG festgestellt worden¹⁴. Ein Nachweis dieser Verbindung in vivo gelang CRADDOCK¹⁵.

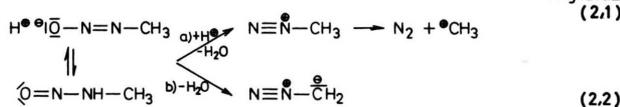
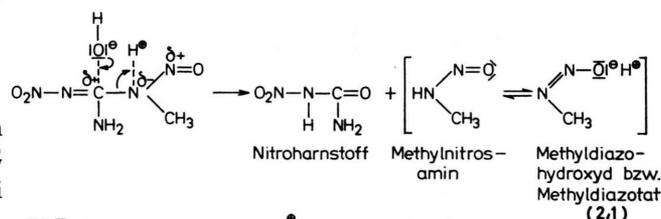
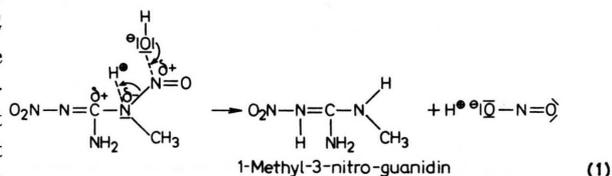
Derivate des Cytosins

Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit Purinbasen ließ sich nach einer Reaktion bei pH 5,5 mit NNMG sowohl bei Cytosin als auch bei Cytidin weder bei Zimmertemperatur noch bei 80° das erwartete Desaminierungsprodukt Uracil nachweisen. Dies stimmt mit Ergebnissen unserer Untersuchungen des Einflusses von NNMG auf die Matrizenaktivität der Homopolyribonucleotide überein¹. 1-Methylcytosin und 3-Methylcytosin ließen sich in einem Reaktionsgemisch von Cytosin mit ¹⁴C-Methyl-NNMG bei pH 6 und 37° durch Co-Chromatographie nachweisen (Tab. 4). Im Hydrolysat der umgesetzten Polycytidylsäure konnte auf die gleiche Weise 1-Methylcytosin identifiziert werden (Tab. 5).

Zum Reaktionsmechanismus

Für die Methylierungs- und Desaminierungsreaktion des NNMG sind hauptsächlich zwei Reaktionen

zu erwägen. Das NNMG-Molekül bietet Hydroxylionen zwei Angriffspunkte, am N-Atom der Nitroso-Gruppe (1) und am Guanidin-C-Atom (2). Die eine Reaktion (1), für die auch ein elektrophiler Angriff eines H⁺ am N¹ in Frage kommt, führt zu 1-Nitro-3-methylguanidin und salpetriger Säure bzw. Nitrit, wie sich beim Stehenlassen in Lösung zeigt. Die zweite Reaktion (2) bedingt die Bildung des methylierenden Agens, das vermutlich über ein Methyl-nitrosamin, Methyl-diazohydroxyd bzw. Methyl-diazotat entsteht. Die Bildung des nicht faßbaren Nitroharnstoffs ist aus dem Nitroguanylrest herzuleiten, der seinerseits Nitroguanylierungen an den Nucleobasen vornehmen könnte. Entstandener Nitroharnstoff kann sich entweder selbst mit NNMG sofort umsetzen, wie in Versuchen festgestellt werden konnte, oder in Form seiner Hydrolyseprodukte. Hierbei entsteht vermutlich das von uns nachgewiesene Nitroguanidin.



Die Bildung eines Methyl-diazohydroxyds nehmen EMMELT et al.¹⁶ als Zwischenprodukt bei der Methylierung durch *N*-Nitroso-*N*-methylurethan an (2,2). Monomethylnitrosamin könnte dabei intermediär auftreten. Ein Reaktionsmechanismus für NNMG über Diazomethan ist nach unseren Versuchen bei pH 5,5–6,0 wenig wahrscheinlich, da sich Diazomethan lediglich bei pH 13 und 14 nachweisen läßt. Es ist allerdings von MEERWEIN¹⁷ eine alkoholytische Spaltung von *N*-Nitroso-*N*-methylurethan bekannt, bei der unter neutralen Bedingungen „naszie-

¹⁵ V. M. CRADDOCK, *Biochem. J.* **106**, 921 [1968].

¹⁶ P. EMMELT, I. J. MIZRAHI u. E. KRIEK, *Nature* [London] **193**, 1158 [1962].

¹⁷ Patent der Schering-Kahlbaum AG, Erfinder H. MEERWEIN, C. 1933 II 1758 [1933].

rendes Diazomethan“ mit Aldehyden und Ketonen reagieren soll. HENRY¹⁸ wies aber daraufhin, daß bei NNMG unter den von MCKAY gewählten Versuchsbedingungen, einer Umsetzung in wäßriger Kalilauge¹⁹, die Bildung von *N*-Methyl-anilin über einen Diazomethanmechanismus nicht erklärt werden könne. Nach Versuchen von KRIEK und EMMELOT²⁰ werden Nucleinsäuren auch durch ein Gemisch von Methylamin und salpetriger Säure bei pH 4,0 methyliert. In diesem Reaktionsgemisch wird nach AUSTIN²¹ über das Methyl-diazoniumion ein Methylierung freigesetzt, das die Nucleobasen methyliert. Vermutlich trifft daher vor allem im sauren und neutralen Bereich für NNMG Reaktion 2,2a zu. Hier entsteht das Methyl-diazoniumion, das unter Stickstoffabspaltung die elektrophile Methylierung freisetzen könnte. Durch jüngste Untersuchungen von LIJINSKY, Loo und Ross²² mit C²H₅-Dimethylnitrosamin an Ratten scheint diese Hypothese gestützt zu werden. Sie zeigten, daß eine Methylierung zu 7-Methylguanin über Diazomethan für dieses Nitrosamin nicht in Frage kommt.

¹⁸ R. A. HENRY, J. Amer. chem. Soc. **72**, 3287 [1950].

¹⁹ A. F. MCKAY, J. Amer. chem. Soc. **70**, 1974 [1948].

²⁰ E. KRIEK u. P. EMMELOT, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **91**, 59 [1964].

²¹ A. T. AUSTIN, Nature [London] **188**, 1086 [1960].

²² W. LIJINSKY, J. Loo u. A. E. Ross, Nature [London] **218**, 1174 [1968].

Nach unseren Ergebnissen scheint für die Mutationsauslösung durch NNMG eine Methylierung in der Zelle nicht allein auf Grund einer einfachen Reaktion von NNMG mit den Nucleobasen vorzuliegen. Offensichtlich sind am Mechanismus der Methylierung Sulfhydryl-Verbindungen beteiligt, da in Gegenwart von SH-Verbindungen eine erhebliche Beschleunigung der Methylierungsreaktion beobachtet werden konnte^{23, 24}.

Die Nitroguanylierung spielt wahrscheinlich bei der Mutationsauslösung auch eine gewisse Rolle.

In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, daß wir bei der Umsetzung von Phenol mit NNMG *O*-Phenylisonitroharnstoff und entsprechend aus *p*-Kresol *O-p*-Kresyl-isonitroharnstoff erhalten haben²⁵.

Dem Fonds der Chemischen Industrie und der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für Unterstützung der Arbeit, Herrn Dr. J. HEISS und Herrn K. P. ZELLER (Tübingen) danken wir für Aufnahme und Interpretation von Massenspektren.

²³ R. SÜSSMUTH u. F. LINGENS, Naturwissenschaften **55**, 85 [1968].

²⁴ R. SÜSSMUTH u. F. LINGENS, Veröffentlichung in Vorbereitung.

²⁵ F. LINGENS u. J. RAU, unveröffentlicht.