

ENTWICKLUNG EINES SOMATISCHEN MUTATIONSASSAYS BEIM SÄUGER AN ZWEI
AUSGEWÄHLTEN LOCI: ISOLATION VON MUTAGEN-INDUZIERTEN PROTEINVARIANTEN
DES CYTOCHROM b_5 UND DES METALLOTHIONEINS

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von
ARTHUR JAKOB JAUCH
Dipl. Natw. ETH Zürich
geboren am 2. Oktober 1953
von Isenthal (UR) und Zürich

angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. Ch. Schlatter, Referent
PD Dr. W. K. Lutz, Korreferent
Prof. Dr. F. E. Würigler, Korreferent

Diskussion / Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit präsentiert einen in vivo Mutationstest beim Säugetier. Der Test berücksichtigt Aufnahme, Absorption aus Magen-Darm-Trakt, Aktivierung und Entgiftung der zu untersuchenden Substanz, aber auch die durch diese verursachten Schäden auf der DNS qualitativ und quantitativ in Bezug auf Konsequenzen bei der Expression der beiden untersuchten Loci. Der Test sollte aber auch auf nicht mutagene Schäden auf der mRNA und tRNA ansprechen, welche aber gemäss Wissensstand nicht isoliert, sondern immer parallel zu den DNS-Schäden auftreten und deshalb eine bessere Empfindlichkeit des Tests bewirken müssten. Getestet wird das Auftreten einer in bestimmten Proteinen normalerweise nicht codierten Aminosäure, welches nach enormer Reinigung des Proteins anhand von in vivo inkorporierter Radioaktivität dieser Aminosäure im untersuchten Protein (Cytochrom b_5 oder Metallothionein) erfasst wird, und welches mit dem entsprechenden Auftreten der interessanten Aminosäure bei Proben von Kontrolltieren verglichen wird.

Bei der vorliegenden Arbeit wurde mit bekannten Standardmutagenen (N-Nitrosomorpholin und Diäthylnitrosamin) die Durchführbarkeit und Empfindlichkeit dieses Testsystems abgeklärt.

Die Empfindlichkeit des Tests, so werden die Resultate der beiden Versuche am Cytochrom b_5 -Locus interpretiert, ist von der Reinheit des isolierten Proteins abhängig, welche grösser als 99.98 % sein sollte, damit die fehlcodierenden Ereignisse nach Behandlung mit toxischen Dosen des Mutagens sichtbar werden. Bei einer erreichten Reinheit von "nur 99.94 % konnten die entsprechenden mutagenen Ereignisse nach einer Behandlung im subtoxischen Bereich nicht entdeckt werden.

Die Empfindlichkeit des Tests beim Metallothionein-Locus ist in Übereinstimmung mit theoretischen Modellrechnungen infolge günstigen Rahmenbedingungen wie: mehr Möglichkeiten durch Einschrittpunktmutationen die normalerweise fehlenden AS zu codieren und grössere Syntheserate des Metallothioneins grösser als beim Cytochrom b_5 -Locus. Der Test an diesem Locus brachte bei einer geschätzten Reinheit des Metallothioneins von "nur" 99.72 % nach einer Behandlung mit mässig toxischer Dosierung des Mutagens eine knappe Signifikanz für den höheren Gehalt der falschcodierten Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin; nämlich bei den behandelten Tieren 92 % und 85 % Sicherheit gemäss t-Test. Zu berücksichtigen ist allerdings, dass die eindeutige grössere Streuung der Mutationsindices bei den behandelten Tieren die Signifikanz des t-Tests mit einem Malus behaf-

tet. Die grössere Streuung der Mutationsindices bei den behandelten Tieren ist gemäss F-Test beim 1. Experiment am Cytochrom b_5 -Locus und beim Test am Metallothionein-Locus signifikant bis stark signifikant. Dieser Befund könnte die individuelle Reaktionsweise der Tiere auf den Stress gegenüber den Nucleinsäuren widerspiegeln. Einen Stress, den die Behandlung mit dem Mutagen auf den Proteinmetabolismus der Leber der Tiere ausübte, ist anhand der Daten zum Zeitpunkt der in vivo Proteinmarkierung nirgends festzustellen. Im speziellen sind die Inkorporationswerte von natürlicherweise vorkommenden Aminosäuren in den beiden untersuchten Proteinen bei Kontrolltieren und behandelten Tieren gleich. Der Einsatz von [^{14}C]Cys als interner Marker der Metallothionein-Syntheserate bringt es aber mit sich, dass als weiteren Stressindikator die cytosolische, niedermolekulare Sulfhydrylretention in der Leber beobachtet werden kann. Bei den Diäthylnitrosamin behandelten Tieren ist diese niedermolekulare, sich wie Glutathion verhaltende [^{14}C] Aktivität im postmikrosomalen Ueberstand des Leberhomogenats eindeutig gegenüber den Kontrolltierwerten erhöht, was mit der Anwesenheit von reaktiven Metaboliten zusammenhängen könnte.

Der Test scheint als Routinetest zum Erkennen und Quantifizieren von Mutagenen und deren Wirkung ungeeignet. Der hohe Einsatz (Tiere, Finanzen und Arbeitsaufwand) steht in einem ungünstigen Verhältnis zur erreichten Empfindlichkeit des Tests. Für spezielle Fragestellungen hingegen könnte der Test von Nutzen sein:

Bei der Abklärung sogenannter spontaner Mutationsraten.

Bei der Differenzierung zwischen DNS und mRNS+tRNS abhängigen Fehlcodierungen (beim Metallothionein-Locus-Test).

Bei Studien über Störanfälligkeiten der Proteinbiosynthese.

Beim Erkennen von indirekten Mutagenen wie z.B. Peroxysomenproliferatoren, welche via Sauerstoff Toxizität die DNS schädigen, trotzdem aber nie mit einem "covalent binding index" erfassbar sind.

Discussion/Summary

This work investigates the potential of a new in vivo mammalian mutation assay. The test measures absorption, activation and detoxification of the examined compound, as well as the quality and quantity of the resulting damage on the nucleic acids, relative to their miscoding consequences in the expression of the two examined gene loci. The test should also be sensitive to nonmutagenic miscoding damage on mRNA and tRNA, which according to present knowledge, never appears separately, but always parallel to damage on DNA, and this therefore should improve the limit of detection.

The assay tests for the appearance of an amino acid normally not coded for in the examined proteins. The in vivo incorporation of this amino acid, which is given as radioactively labeled precursor to the animals, into such a protein, is quantified after the isolation and rigorous purification of the protein. This radioactivity is compared to that present in the protein (due to spontaneous mutations and contamination) of control animals.

The two liver proteins examined are the cytochrome b_5 trypsin fragments which normally lack both methionine and cysteine residues, and the metallothionein isoenzymes (MT) which normally contain no aromatic amino acids.

The feasibility of this assay was tested with two standard mutagens N-nitrosomorpholine (NNM) and N,N-diethylnitrosamine (DENA).

The sensitivity of the test at the cytochrome b_5 locus was strongly dependent on the purity of the isolated protein samples. In the first experiment, where a cytotoxic dose of NNM was used, the isolated cytochrome b_5 samples were more than 99.98 % pure (judged by the radiochemical [^{35}S]Met purity of the control samples). The increase in methionine content in cytochrome b_5 samples from treated animals over the controls was significant. The second experiment with a moderate toxic regimen of DENA did not allow the detection of a rise in methionine content of the cytochrome b_5 samples from treated animals. In this experiment, however, the protein samples could not be purified above 99.94 %, which probably masked the mutational events already.

Theoretical model calculations on the frequency of interesting mutational events on the respective gene loci predicted that the test would be more sensitive for metallothionein than for cytochrome b_5 because:

- there are more possibilities of changing existing triplets by one-step

mutation into triplets coding for phenylalanine and tyrosine

- the rate of metallothionein biosynthesis can be induced in such a manner that present radioactively labeled amino acids are incorporated about ten times more often than this would be the case at the cytochrome b_5 locus with its comparatively low rate of biosynthesis.

A similar experiment at the metallothionein locus using the moderate toxic regimen of DENA resulted in a significantly higher content of [^3H]tyrosine and [^3H]phenylalanine in the MT samples (at the 92 % and 86 % confidence levels, respectively) although a purity of "only" 99.72 % could be attained through a complex series of purification steps. The relatively higher variation of the mutation indices in the treated animals, however, reduces the significance of the t-test (which tests upon the equality of the populations of samples). The scattering of the mutation indices in the treated animals, as judged by the F-test, was significant greater than in the controls, both in the first experiment at the cytochrome b_5 locus and in the experiment at the metallothionein locus. This finding could be due to the individual reaction of the animals towards the cytotoxicity of the ultimate mutagens. On the other hand, there is no indication that the regimen with the mutagenic compounds caused a change in the efficiency with which the radioactive amino acids were incorporated into liver protein during the period where this label was available in the liver (the radioactive amino acids were given to the animals at least four hours after the acute MT dose of mutagen). Moreover, uptake of [^{14}C]cysteine, which was given as internal standard of metallothionein biosynthesis, resulted in proteins with the same specific radioactivity in both control and treated animals. The use of [^{14}C]cysteine as a precursor for the internal label of the newly synthesized metallothionein allows, in addition, to observe cytosolic low molecular [^{14}C] activity the most of which behaved like glutathione. Levels of this compounds were elevated significantly in the DENA-treated animals, probably due to the presence of reactive metabolites.

The presented test seems to be unsuitable for recognizing and assessing the consequences of mutagenic compounds as a routine assay. The large investment (animals, finances, time) stands in an unfavourable relation to the sensitivity of the assay. For certain special questions, on the other hand, this test could be of interest:

- for determining spontaneous mutation rates of specific mutations.

- for distinguishing between DNA and RNA-dependent miscoding damage (Phenylalanine and tyrosine miscoding possibilities at the metallothionein locus are such that Phe can arise only from miscoding at the DNA and Tyr can arise only from miscoding at the RNA).
- for special questions concerning the interference of the translation process.
- for recognizing indirect mutagens, for example peroxisome proliferators, which in turn damage the DNA by toxic oxygen radicals. These mutagens cannot be detected by a covalent DNA binding index assay.