

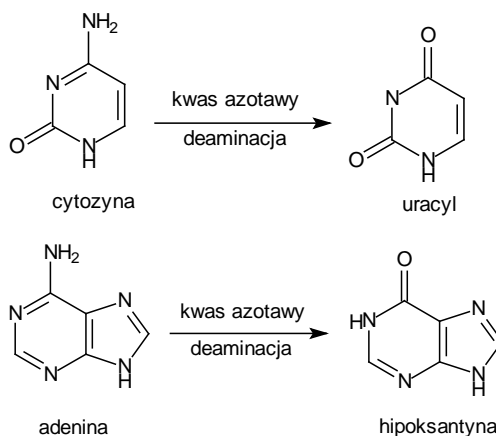
20. CZYNNIKI MODYFIKUJĄCE STRUKTURĘ DNA

Iwona Żak, Paweł Niemiec

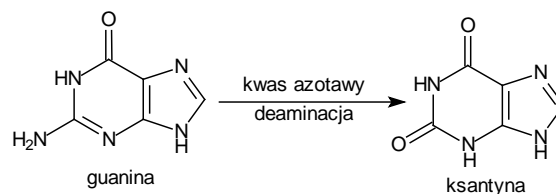
Czynniki chemiczne lub fizyczne o charakterze mutagennym są niejednorodną grupą. Wszystkie reagują bezpośrednio z DNA, wprowadzając modyfikacje w strukturze nukleotydów, leżące u podstaw zmian sekwencji zasad azotowych. Chemicznymi czynnikami modyfikującymi strukturę DNA są: kwas azotawy, hydroksylamina, związki alkilujące, analogi zasad azotowych, barwniki akrydynowe, policykliczne węglowodory aromatyczne oraz reaktywne formy tlenu. Charakter mutagenny wykazują niektóre leki, np.: pewne klasy cytostatyków, antybiotyków oraz leków psychotropowych. Do fizycznych czynników mutagennych zalicza się promienie X, promienie α , β , γ , UV oraz hipertermię.

Chemiczne czynniki modyfikujące DNA

Kwas azotawy jest związkiem, który deaminuje cytozynę, adeninę i guaninę w DNA. Deaminacja cytozyny przekształca ją w uracyl. Deaminacja kwasem azotawym adeniny przekształca ją w hipoksantynę.

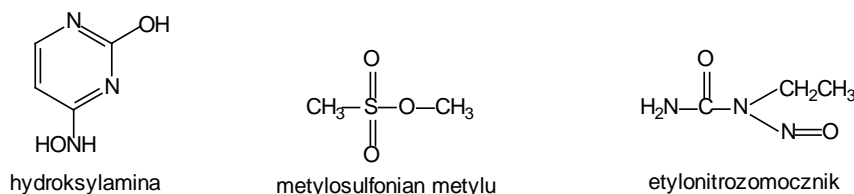


Deaminacja kwasem azotawym guaniny przekształca ją w ksantynę.

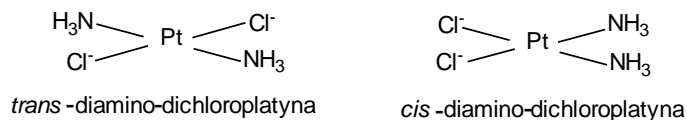


Jeśli modyfikacje te zostaną utrwalone podczas replikacji, wówczas w DNA ma miejsce zamiana zasad azotowych GC na AT, gdy nastąpiła deaminacja typu cytozyna→uracyl lub zamiana zasad azotowych AT na GC, gdy miała miejsce deaminacja typu adenina→hipoksantyna, lub zasad azotowych GC na AT, gdy zaszła deaminacja typu guanina→ksantyna w DNA.

Hydroksylamina jest związkiem, który w układzie *in vitro* reaguje z cytozyną w DNA, przekształcając ją w związek podobny do uracylu, w konsekwencji może prowadzić to do tranzykcji C→T.

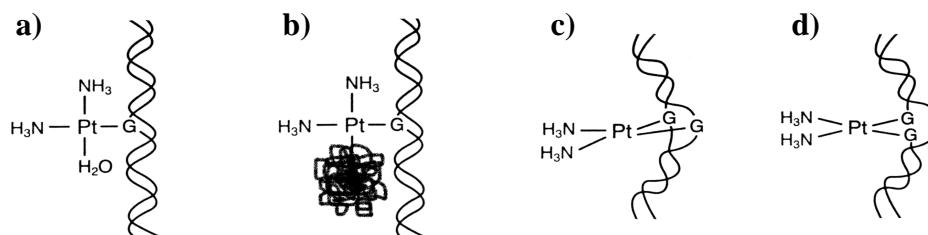


Do **związków alkilujących** należą między innymi sulfonian dietylowy, sulfonian etylometylowy oraz metylosulfonian metylu, etylnitrozomocznik i diepoksybutan. Obecność grup metylowych, etylowych i innych w tych związkach, powoduje alkilację zasad azotowych. Największą wrażliwość na alkilację w α -helisie wykazuje atom azotu (N7) guaniny. W dalszej kolejności mogą ulegać alkilacji atomy azotu guaniny (N1), adeniny (N1 i N3) i cytozyny (N3). Pod wpływem tych związków obserwuje się liczne tranzykcje i transwersje typu: AT→TA, AT→GC, GC→CG, GC→AT, GC→TA. Analogiczny mechanizm działania (z mechanizmem bifunkcyjnych związków alkilujących) wykazują niektóre pochodne platyny (Pt), wykorzystywane w terapii przeciwnowotworowej. Do grupy tej należy między innymi *cis*-diamino-dichloroplatyna (cDDP).



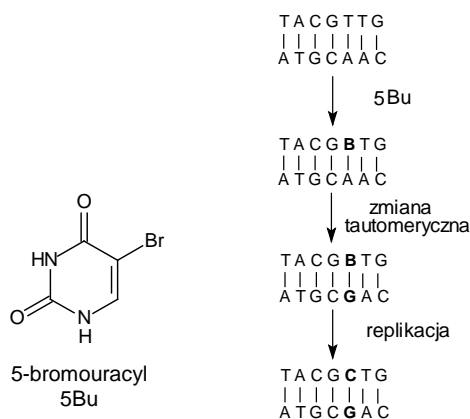
Rezultatem budowy cDDP (centralnie położony atom Pt z dwiema reaktywnymi grupami Cl⁻) jest skłonność do łatwej zamiany ligandów w środowisku wodnym i do formowania kompleksów z grupami funkcyjnymi o ujemnym ładunku, czyli z grupami nukleofilowymi w cząsteczkach substancji biologicznie czynnych.

Można wyróżnić dwa rodzaje oddziaływań tego cytostatyku z DNA. Są to monofunkcyjne oraz bifunkcyjne reakcje związku. Efekt monofunkcyjny dotyczy rzadkich przypadków, kiedy jeden z atomów chloru unieczynniany jest przez np. H₂O (ryc. a) lub białko niehistonowe – ryc. b (około 0,15% wszystkich adduktów cDDP–DNA).



Bifunkcyjne działanie *cis*-platyny jest znacznie częściej spotykane i silniejsze od monofunkcyjnego. Reakcja wymiany obu ligandów może mieć dwojaki charakter: jeden z nich polega na międzyciowym wiązaniu krzyżowym z zasadami należącymi do dwóch różnych nici (ryc. c), stanowi mniej niż 1% całkowitej ilości adduktów cDDP–DNA. Drugi, najważniejszy pod względem terapeutycznym, polega na wewnątrzciowym wiązaniu krzyżowym z zasadami azotowymi należącymi do tej samej nici (ryc. d), stanowi około 98% wszystkich adduktów cDDP–DNA. Odległość między dwoma labilnymi ligandami Cl⁻ w cząsteczce cDDP jest rzędu 0,33 nm, niemal taka sama, jak odległość między dwiema sąsiadującymi zasadami w α -helisie. Stąd w krzyżowych wiązaniach wewnątrzciowych dominują oddziaływania typu 1,2-wiązań wewnątrzciowych. Oddziaływania te nie występują w izomerze *trans*-DDP, u którego odległość między dwoma labilnymi ligandami Cl⁻ równa się 0,45 nm. *Trans*-diamino-dichloroplatyna nie wykazuje więc właściwości genotoksycznych.

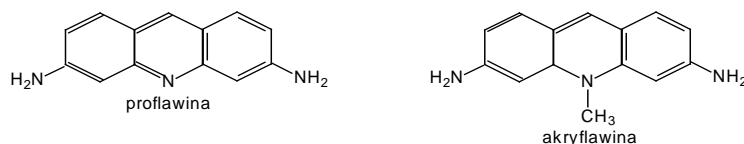
Analogi zasad azotowych są strukturalnie podobne do zasad występujących w cząsteczce DNA, dzięki temu mogą być rozpoznawane i wbudowywane podczas



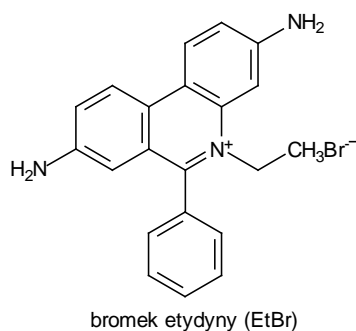
replikacji przez polimerazę DNA. Powodują one mutacje na skutek niewłaściwego parowania zasad. Przykładami tych związków mogą być 2-aminopuryna i 5-bromouracyl. Drugi z tych związków jest analogiem tyminy i normalnie ulega parowaniu z adeniną. 5-bromouracyl może ulec przesunięciu tautomerycznemu, na skutek którego ulega parowaniu z guaniną. Po replikacji wyjściowa para TA zostaje zastąpiona przez GC.

Barwniki akrydynowe wnikają (interkalują) między zasady azotowe w łańcuchu DNA, powodując ich rozsuniecie. Do grupy tej należą między innymi oranż akrydyny, proflawina oraz akryflawina.

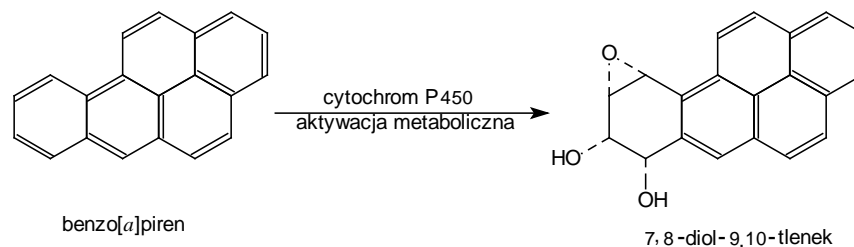
Deformacje matrycy DNA, spowodowane interkalacją barwników akrydynowych, wywołują błędy replikacji, prowadzące w rezultacie do delecji lub insercji pojedynczych par nukleotydów, a w dalszej konsekwencji do mutacji typu zmiany ramki odczytu.



Interkalatorem jest też **bromek etydyny**. Cząsteczka tego związku zawiera cztery pierścienie o rozmiarach zbliżonych do pary zasad puryna-pirymidyna. Mechanizm działania bromku etydyny jest podobny do mechanizmu działania barwników akrydynowych. Związek ten wykorzystuje się powszechnie jako barwnik DNA, stosowany w elektroforezie agarozowej. Pod wpływem UV związany z DNA bromek etydyny emituje światło o zabarwieniu pomarańczowym.

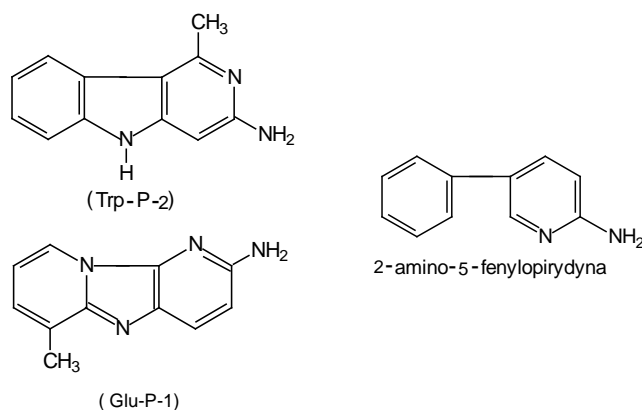


Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, takie jak np. benzo[*a*]piren czy benzo[*a*]antracen tworzą addukty z DNA. Są to produkty reakcji przyłączenia (addycji) atomów lub cząsteczek (w tym przypadku wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych) do cząsteczki innego związku (w tym przypadku DNA).



Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne zaliczane są do promutagenów, czyli związków, które stają się właściwymi mutagenami dopiero po metabolicznym przekształceniu w organizmie. W aktywacji metabolicznej często uczestniczy kompleks cytochromu P450. Podobne związki występują w dymie papierosowym, kawie, herbacie oraz przede wszystkim w pokarmach pochodzenia zwierzęcego. Najwięcej znajduje się ich w tzw. czerwonym mięsie.

Addukty z DNA tworzą także niektóre **heterocykliczne aminy aromatyczne**, powstające również podczas obróbki termicznej białkowych produktów żywnościowych, szczególnie podczas długotrwałego smażenia mięsa w temperaturze powyżej 150°C, skutkiem pirolizy aminokwasów (glicyna, kwas glutaminowy, tryptofan, fenyloalanina). Dzięki łączeniu się z kreatyną i cukrem tworzą mutagenne heterocykliczne aminy aromatyczne, np.: 3-amino-1-metylo-5*H*-pirydo [4,3-*b*]indol (Trp-P-2), 2-amino-6-metylodipirydo [1,2-*a*:3',2'-*d*]indol (Glu-P-1), 2-amino-5-fenylpirydyna.

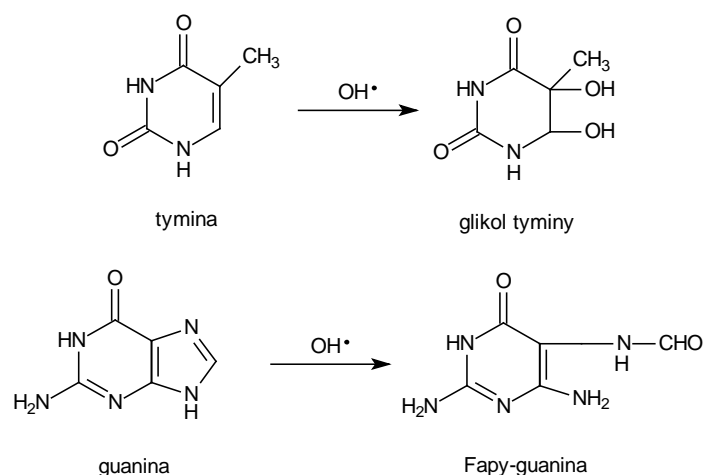


Wolne rodniki reagujące z DNA to rodnik hydroksylowy (OH[•]), jon wodorowy (H[•]) oraz anion ponadtlenkowy (O₂^{-•}). Główną, aktywną formą tlenu, odpowiedzialną za powstanie większości oksydacyjnych uszkodzeń cząsteczki DNA, jest **rodnik hydroksylowy**. Wynika to z jego silnie elektrofilowego charakteru, który warunkuje dwa podstawowe typy przemian składowych cząsteczki DNA:

reakcję addycji z wiązaniami π zasad azotowych oraz dehydratację cząsteczek deoksyrybozy.

W przypadku zasad pirymidynowych w przeważającej większości reakcje te mają charakter addycji z atomami węgla, połączonymi wiązaniem podwójnym C5 = C6 w pierścieniu, lub oderwania atomu wodoru od grupy metylowej przy atomie węgla C5.

Natomiast w wypadku zasad purynowych reakcja ta dotyczy wiązania przy atomie węgla C4 lub C8. Poza tym, generowanie w bezpośrednim sąsiedztwie chromatyny wysoce reaktywnych rodników tlenowych doprowadzić może do powstania wiązań poprzecznych między DNA a białkami, znajdującymi się w jego otoczeniu.



Rodniki hydroksylowe, poza oddziaływaniem z zasadami azotowymi i białkami, mogą również reagować z pierścieniami deoksyrybozy. Rodnik hydroksylowy może indukować oderwanie każdego atomu wodoru związanego z cząsteczką cukru. Nie wszystkie uszkodzenia pierścienia cukrowego są wynikiem bezpośredniej reakcji rodnika hydroksylowego z cząsteczką cukru. Duża ich część może powstawać także na skutek oderwania atomu wodoru od cząsteczki cukru przez powstały rodnik zasady azotowej.

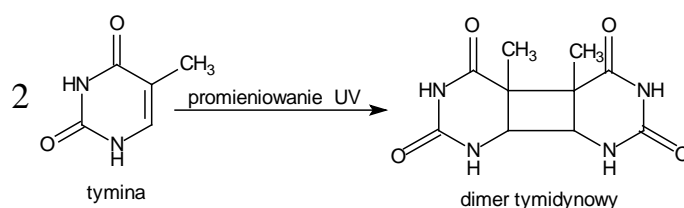
Fizyczne czynniki modyfikujące DNA

Uszkodzenia DNA wywołane **promieniowaniem jonizującym**, czyli promieniowaniem o dużej energii, powodują pękanie cząsteczki DNA, niszczenie cukrów oraz zasad. Promienie jonizujące, przechodząc przez komórki, wybijają elektrony z atomów i cząsteczek, powodując ich jonizację. Powstałe jony mogą inicjować rozmaite reakcje wolnorodnikowe (głównie z udziałem omawianego wcześniej rodnika hydroksylowego), uszkadzające DNA. Najgroźniejsze dla życia

komórki uszkodzenia stanowią przerwy dwuniciowe w DNA, ponieważ mogą być związane są z utratą fragmentu informacji genetycznej. Uszkodzenia te powstają pierwotnie, tj. w momencie, gdy pęknięcia pojedynczych nici zlokalizowane są naprzeciwko siebie w niewielkiej odległości, lub wtórnie, do czego dochodzi w trakcie naprawy uszkodzonej zasady, znajdującej się naprzeciw jednoniciowego pęknięcia DNA. Przyjmuje się, że po zadziaaniu na komórkę promieniowaniem γ w wysokości 1Gy (1Gy to jednostka dawki zaabsorbowanej, odpowiadająca energii 1 dżula, przyjętej przez 1kg masy ciała) dochodzi do powstania 600–1000 pęknięć jednoniciowych DNA, 26–40 przerw dwuniciowych łańcucha DNA i 250 uszkodzeń tyminy.

Promieniowanie ultrafioletowe, ze względu na małą energię i znaczną długość fali, ma mniejszą zdolność przenikania przez tkanki niż promieniowanie jonizujące, jednak promienie UV są intensywnie pochłaniane przez DNA.

Głównym efektem działania promieni UV na DNA jest tworzenie dimerów pirymidynowych C-C, C-T a zwłaszcza dimerów T-T pomiędzy atomami C5 i C6 jednej reszty pirymidyny, a tymi samymi atomami węgla drugiej pirymidyny.



Wynikiem tej reakcji jest powstanie pierścienia cyklobutanowego, który powoduje zbliżenie sąsiadujących pirymidyn, odkształcenia w szkielecie cukrowo-fosforanowym DNA, prowadzące w rezultacie do delekcji takiego dimeru.