

## **Interakce xenobiotik s DNA a proteiny**

J. Vondráček

## DNA adukty

- kovalentní adukty zprostředkovávají toxické účinky řady karcinogenů a cytotoxických látek; v případě DNA vedou její modifikace (tvorba aduktů, zlomů a ztráta bází) vést ke vzniku tzv. **premutagenních lézí vedoucích ke vzniku mutací**;
- **kovalentní modifikace biologických makromolekul karcinogeny** byly poprvé pozorovány již v 50. letech; následně byly zkoumány mechanismy zodpovědné za reakce chemických sloučenin a jejich metabolitů s DNA a byly vyvinuty **techniky umožňující citlivé stanovení specifických aduktů** – využívány jak při studiu **mechanismů toxicity, tak v molekulární epidemiologii**;
- vedle kovalentních modifikací dochází i k dalším typům poškození DNA – přímé účinky záření (UV, ionizující záření), nepřímé účinky zprostředkované tvorbou volných kyslíkových radikálů (ROS);
- daná toxická látka může způsobovat více typů poškození DNA – typ poškození DNA může za určitých okolností sloužit k identifikaci zdroje poškození a identifikace zodpovědného toxikantu; směsi polutantů často způsobují velmi komplexní změny v DNA – příklad – expozice kuřáků;

# Příklad: Aduky DNA vznikající v důsledku expozice tabákovému kouři

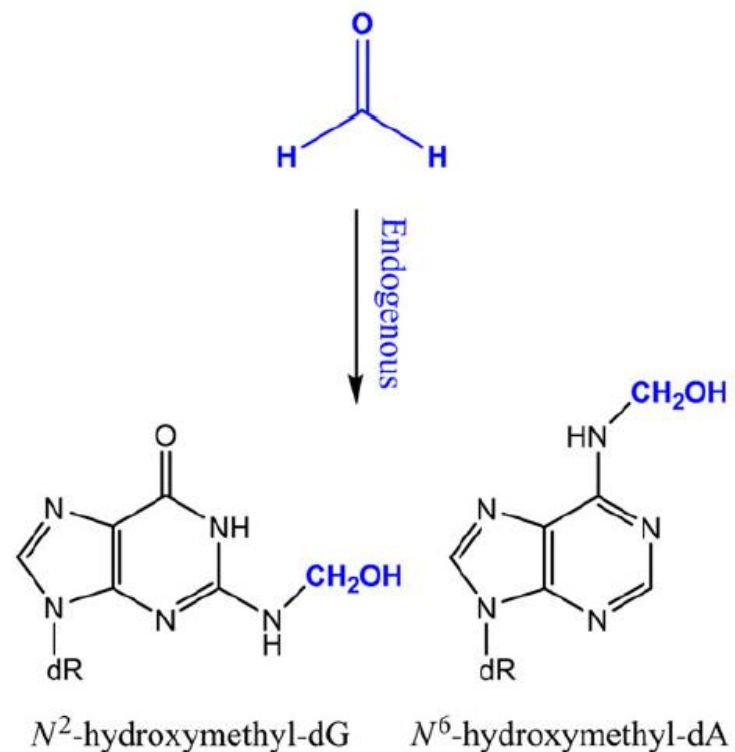
Adduct	Source	Methods of detection
<b>DNA adducts</b>		
Bulky adducts (also referred to as aromatic/hydrophobic adducts)	Nonspecific: PAHs (?), other bulky carcinogens (?), oxidative damage (?)—see text	<sup>32</sup> P-postlabelling
Benzo[a]pyrene diol-epoxide (BPDE)-DNA	Benzo[a]pyrene	HPLC-fluorescence; LC-MS
BPDE-DNA	Benzo[a]pyrene, PAHs	ELISA
4-Aminobiphenyl-dGuo (4-ABP-dGuo)	4-Aminobiphenyl	LC-MS; GC-MS; immunological
8-Oxo-dG	ROS	LC-MS/MS SRM
1,N <sup>6</sup> -ethenoadenine (εAde) and 3,N <sup>4</sup> -ethenocytosine (εCyt)	ROS	Immunoenriched <sup>32</sup> P-postlabelling
Malondialdehyde (MDA)-DNA (M <sub>1</sub> dG)	Products of lipid peroxidation	Immunohistochemistry with specific MDA-DNA adduct monoclonal antibody; <sup>32</sup> P-postlabelling
N <sup>6</sup> -hydroxymethyl-dAdo (N <sup>6</sup> -HOMe-dAdo)	Formaldehyde	LC-MS/MS
N <sup>2</sup> -ethylidene-dGuo	Acetaldehyde	LC-ESI-MS/MS-SRM
1,N <sup>2</sup> -propanodeoxyguanosine (Acr-dGuo)	Acrolein	<sup>32</sup> P-postlabelling; LC-ESI-MS
O <sup>4</sup> -ethylthymidine	Unknown ethylating agent	Immunoenriched <sup>32</sup> P-postlabelling
7-Ethylguanine	Unknown ethylating agent	LC-NSI-HRMS/MS-SRM
HPB-releasing adducts	NNK, NNN	GC-NICI-MS

# Příklad: Endogenní DNA poškození

TABLE 1

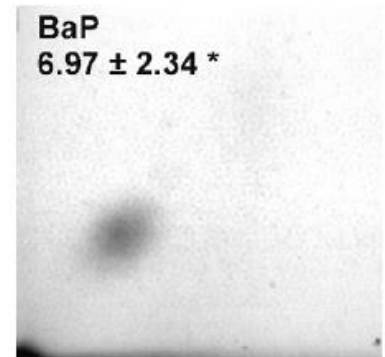
Steady-State Amounts of Selected endogenous DNA Damage

Endogenous DNA lesions	Number per cell
Abasic sites	30,000
N7-(2-Hydroxyethyl)guanine (7HEG)	3000
8-Hydroxyguanine	2400
7-(2-Oxoethyl)guanine	1500
Formaldehyde adducts	960
Acrolein-deoxyguanosine	120
Malondialdehyde-deoxyguanosine	60
<i>N</i> <sup>2</sup> ,3-Ethenoguanine (εG)	36
1, <i>N</i> <sup>2</sup> -Ethenodeoxyguanosine (1, <i>N</i> <sup>2</sup> -εdG)	30
1, <i>N</i> <sup>6</sup> -Ethenodeoxyadenosine (1, <i>N</i> <sup>6</sup> -εdA)	12
Total	38,118



## Metodika studia DNA aduktů

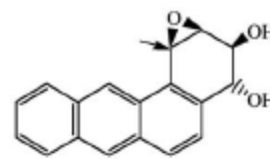
- **izolace DNA a její hydrolýza** (nejčastěji enzymatická) – endonukleáza (štěpí DNA na oligonukleotidy) + exonukleáza (štěpí na jednotlivé deoxynukleotidy); nejčastěji se používá DNáza I a fosfodiesteráza – vznikají jednotlivé deoxynukleosid- 5'-monofosfáty; následně jsou působením alkalické fosfatázy připraveny nucleosidy; pro <sup>32</sup>P-postlabeling se využívá kombinace mikrokórní nukleázy a slinivkové fosfodiesterázy - deoxynukleosid-3'-monofosfáty (metoda vyžaduje 5'-OH);
- analýza, nejčastěji dvoukroková – nejprve jsou odděleny normální deoxynukleosidy od aduktů (odlišná hydrofobicita – C-18 RP kolona, Sephadex LH-20; extrakce 1-butanolem apod.); separace jednotlivých aduktů - HPLC, TLC;
- detekce – radioaktivní značení, UV, fluorimetrie;



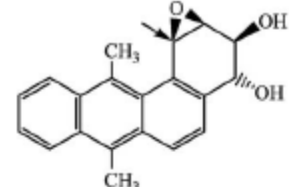
# Fyziologie působení farmak a toxických látek

## 1) Polycyklické aromatické uhlovodíky

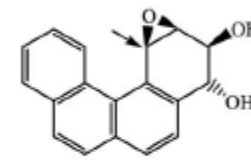
- **Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU)** – významná skupina environmentálních polutantů – produkty spalovacích procesů; musí být bioaktivovány – metabolicky aktivovány prostřednictvím enzymů – tvorba ultimátních karcinogenů – dihydrodiolepoxidy;
- tvorba těchto aktivních mutagenů/karcinogenů je stereospecifická a vyžaduje indukci/expresi CYP1 enzymů;



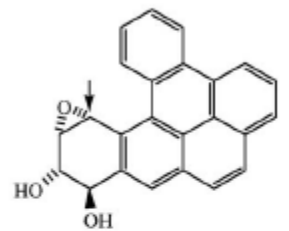
3S,4R,1R,2S-BaA-diol epoxide



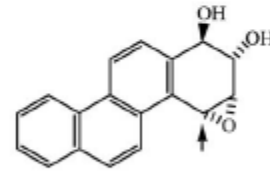
3S,4R,1R,2S-DMBA-diol epoxide



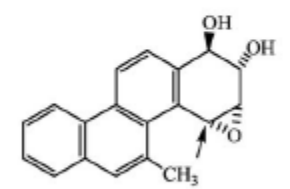
3S,4R,1R,2S-BcPh-diol epoxide



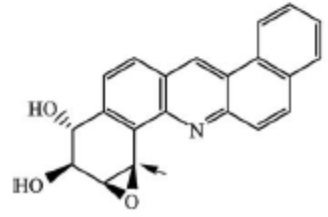
11R,12S,13S,14R-DB[a,j]P-diol epoxide



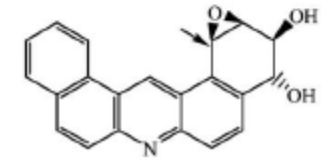
1R,2S,3S,4R-CHR-diol epoxide



1R,2S,3S,4R-5MC-diol epoxide



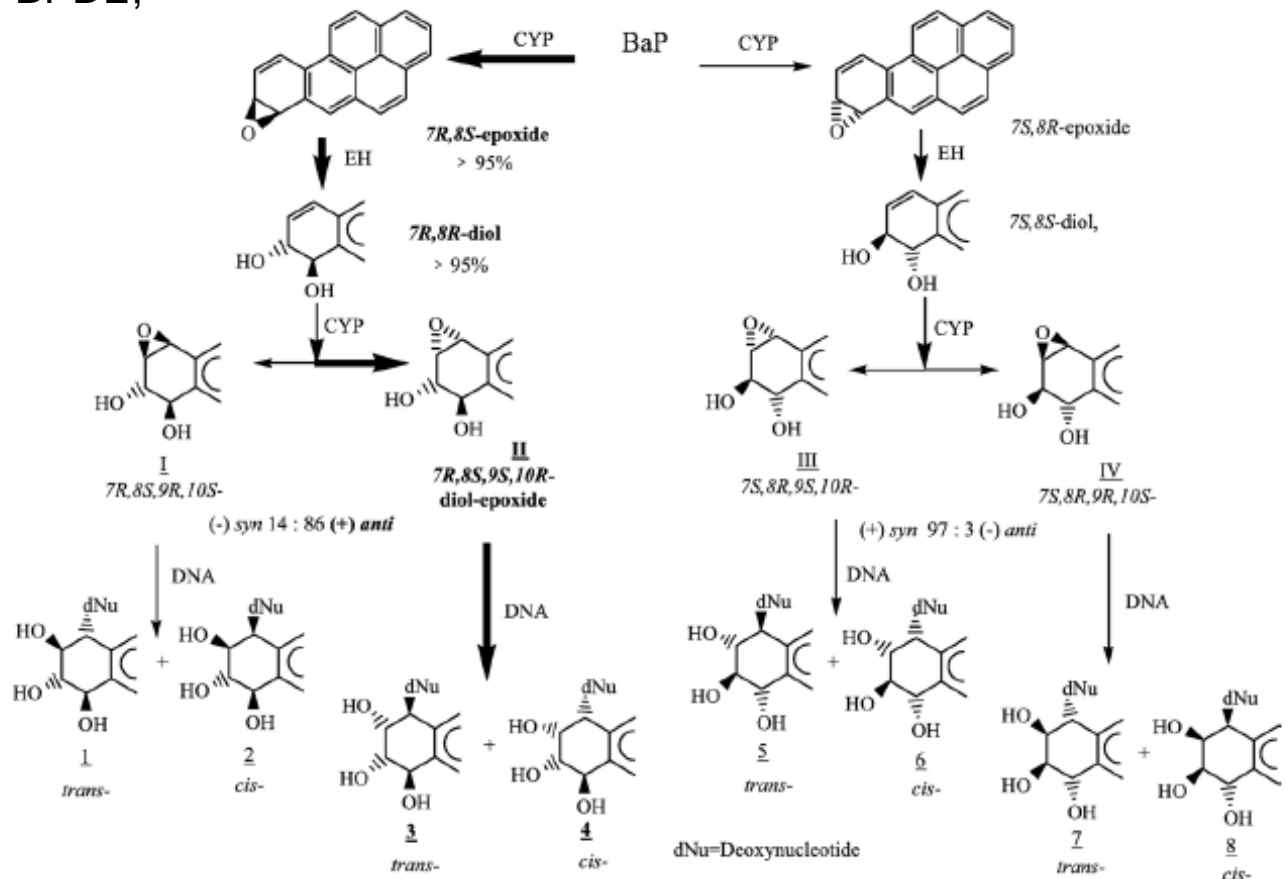
10S,11R,8R,9S-DB[a,h]A-diol epoxide



3S,4R,1R,2S-DB[a,j]A-diol epoxide

# 1) Polycyklické aromatické uhlovodíky

- **benzo[a]pyren (BaP)** – významný polutant, složka tabákového kouře; aktivován působením CYP1 enzymů a mikrozomální epoxidhydrólázy; ultimátní karcinogen vytvářející DNA adukty (primárně s deoxyguanosem) – BPDE;



# BaP není karcinogenní v AhR KO

myších:

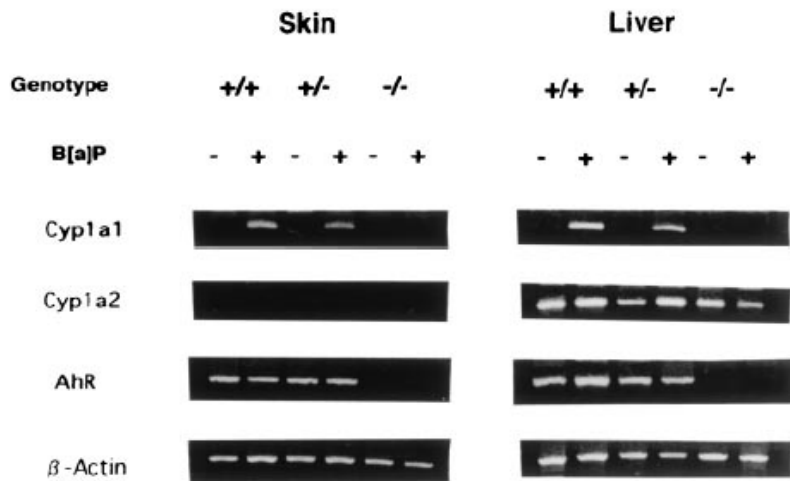


Fig. 1. *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, and AhR gene expression in the skin and liver of AhR(+/+), AhR(+/-), and AhR(-/-) mice, with and without B[a]P treatment. One-microgram aliquots of RNA extracted from skin and liver of control and B[a]P-treated mice of the three genotypes were reverse-transcribed and analyzed by PCR using specific primers for the *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, and AhR and  $\beta$ -actin genes.

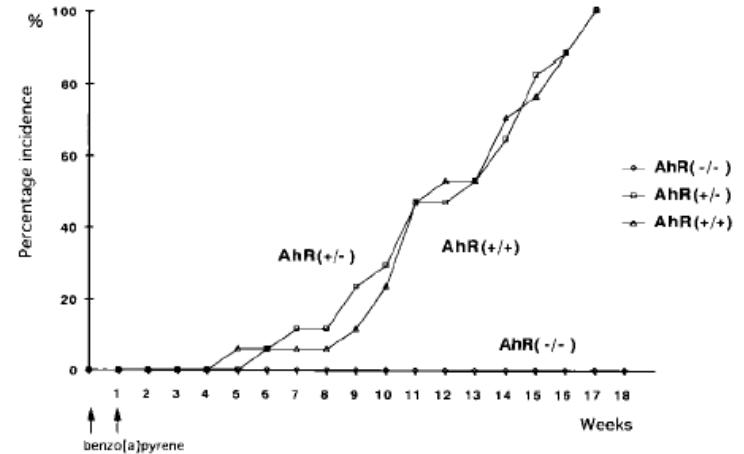


Fig. 2. Subcutaneous tumor induction in wild-type ( $\Delta$ ) and AhR-deficient male mice (+/-,  $\square$ ; -/-,  $\circ$ ) injected with B[a]P.

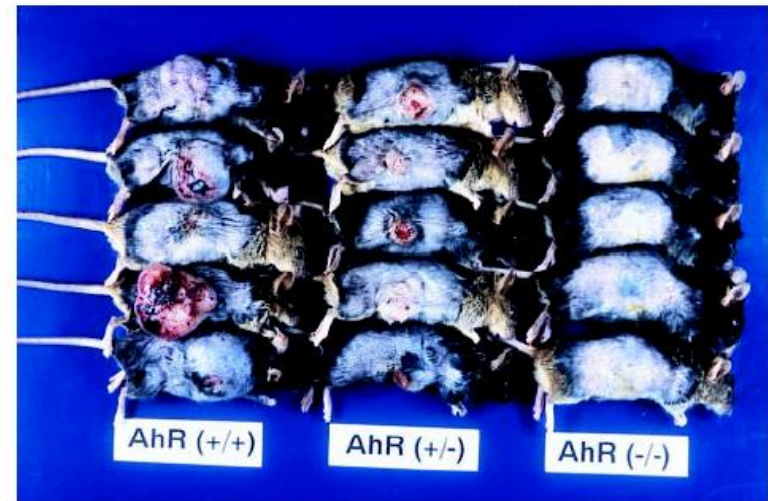
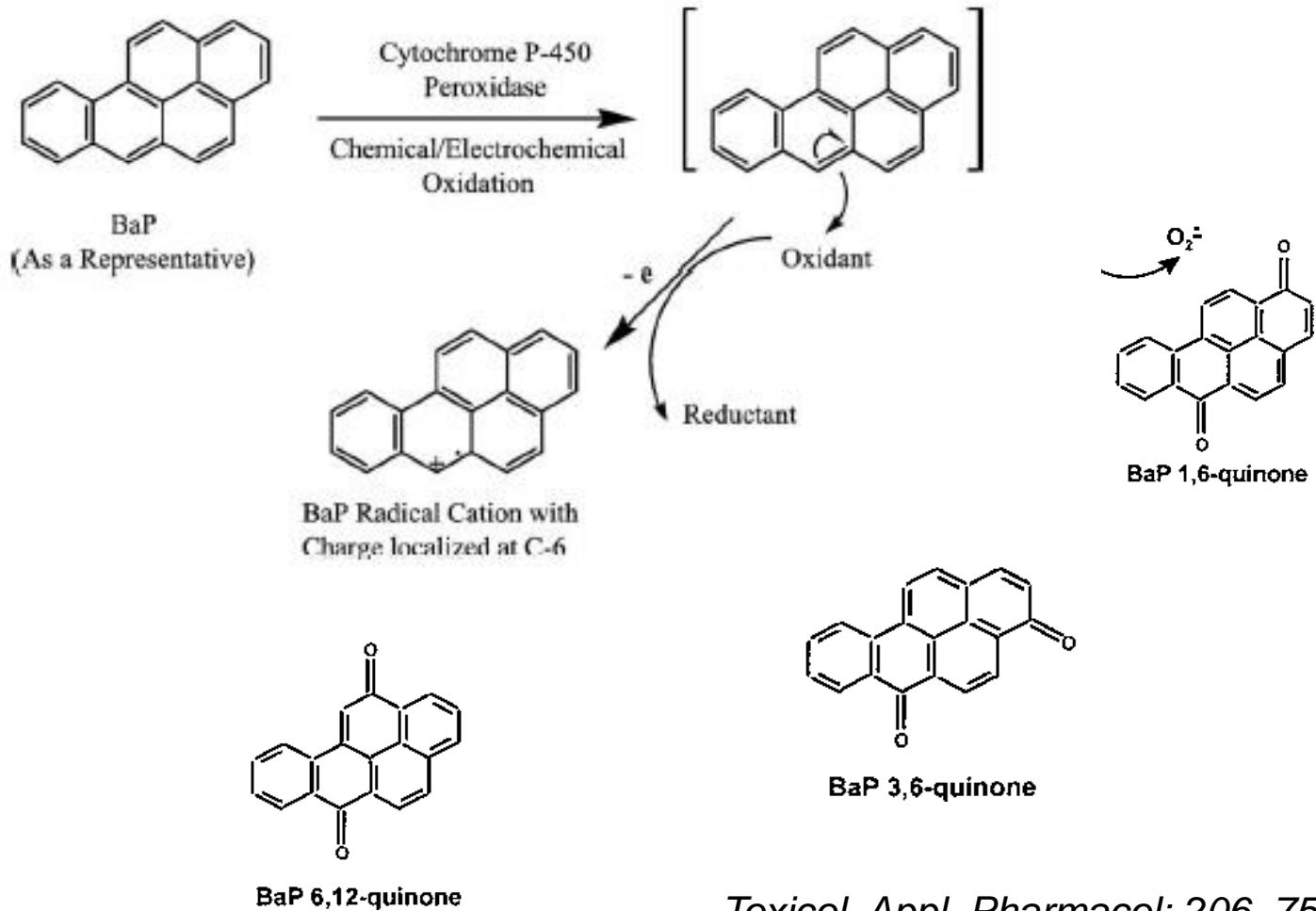


Fig. 3. Gross appearance of flank skins in AhR-wild-type mice (+/+), AhR-heterozygous mice (+/-), and AhR-deficient mice (-/-) injected subcutaneously with B[a]P.



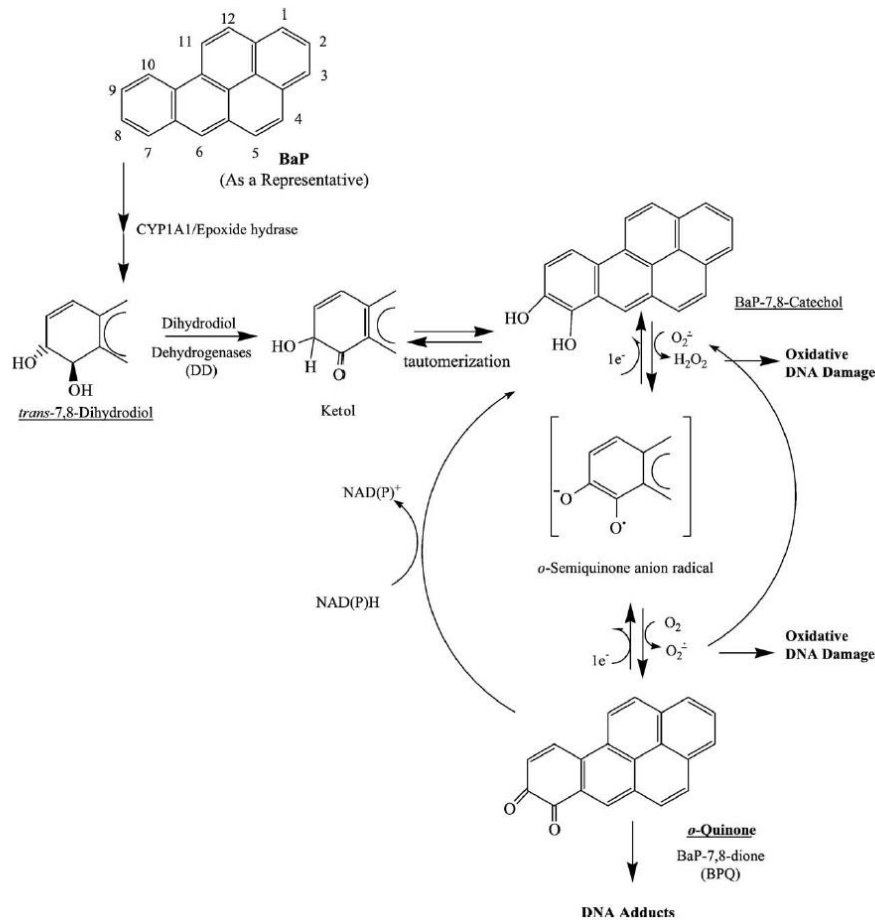
# 1) Polycyklické aromatické uhlovodíky

- **dráha radikálového kationu** – alternativní dráha metabolické aktivace; tvorba BaP-chinonů – reaktivní toxické metabolity, oxidativní stres;



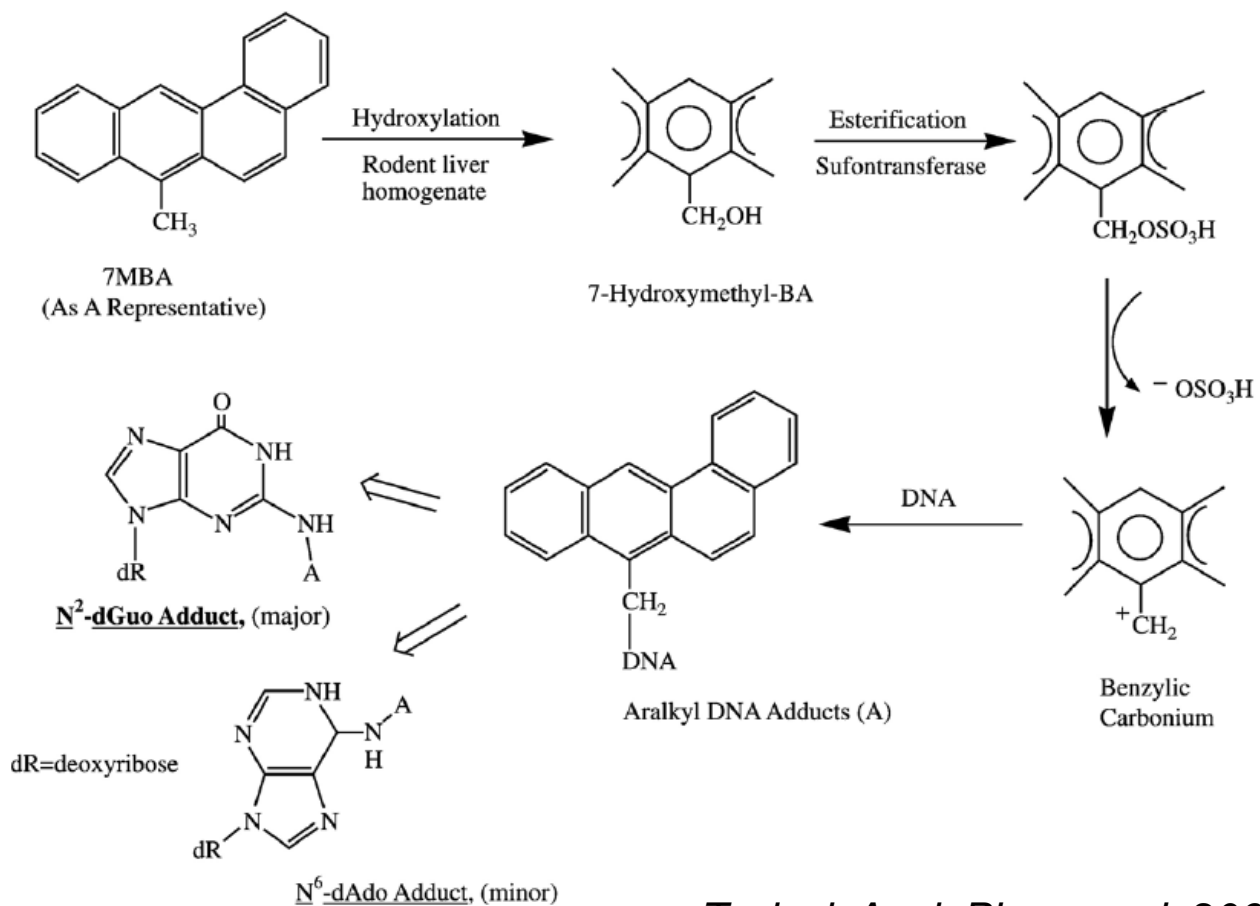
# 1) Polycyklické aromatické uhlovodíky

- tvorba *o*-chinonů – působení aldo-keto reduktáz (např. AKR1C3) – alternativní dráha metabolické aktivace; tvorba DNA aduktů vs. oxidativní stres?



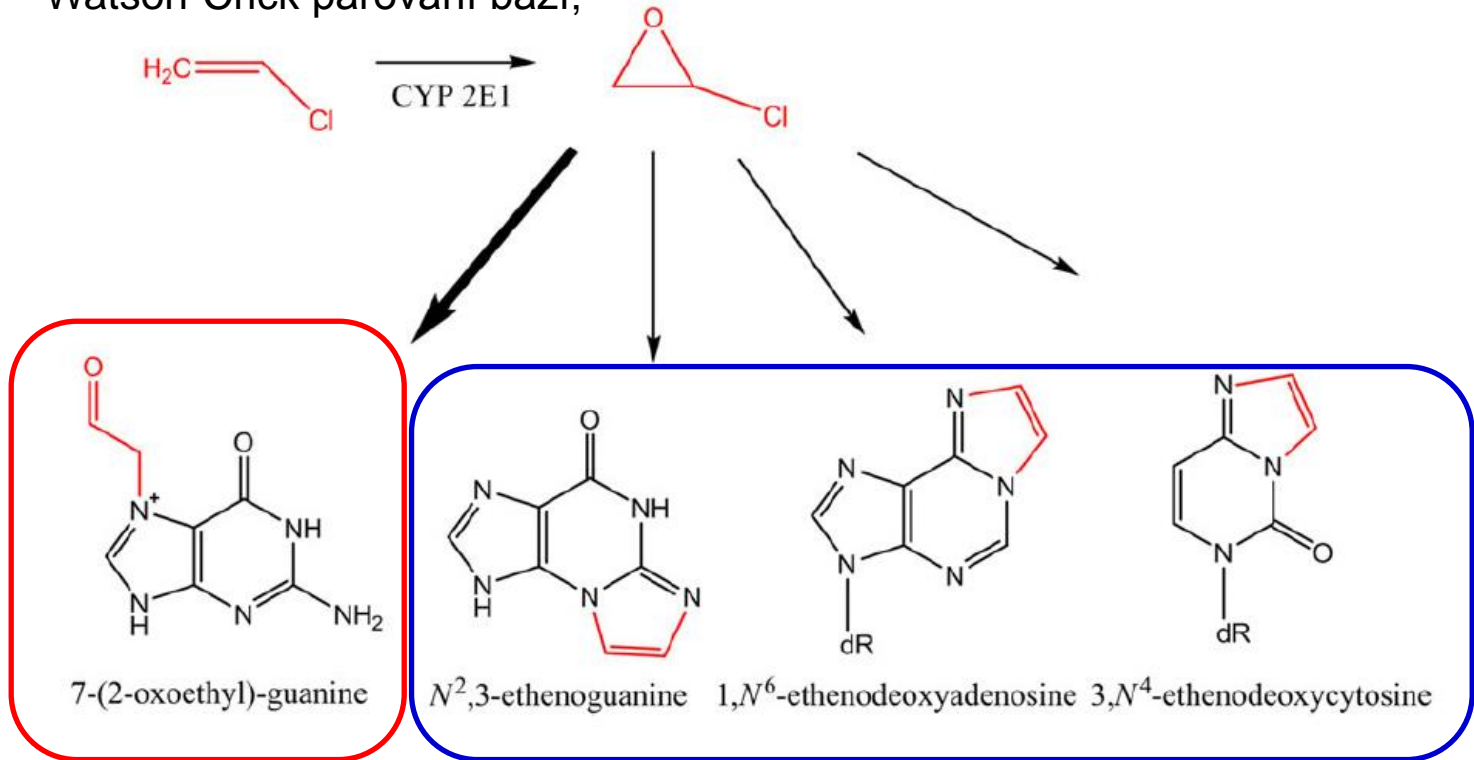
# 1) Polycyklické aromatické uhlovodíky

- **substituované** PAU nebo heterocyklické PAU mohou být metabolizovány alternativními dráhami – příklad – bioaktivace methylovaných PAU přes ester kyseliny sírové;



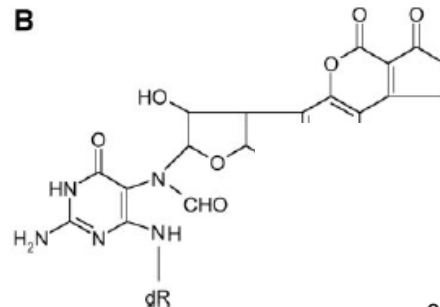
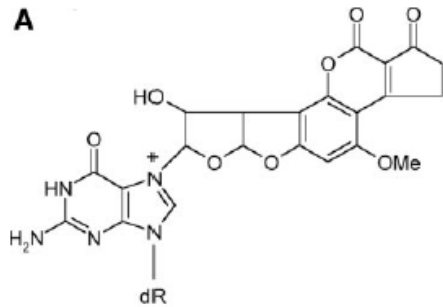
## 2) Vinyl chlorid

- vinyl chlorid** je lidský karcinogen, který způsobuje jaterní angiosarkomy (expozice z povolání); je aktivován **CYP2E1** na chlórethylen oxid, který tvoří 4 typy DNA aduktů, z nichž jen 3 (tzv. exocyklické adukty) jsou mutagenní; dochází k aktivaci *K-ras* genu i inaktivaci p53; silná mutagenita vychází z toho, že tyto exocyklické adukty blokuji normální Watson-Crick párování bází;

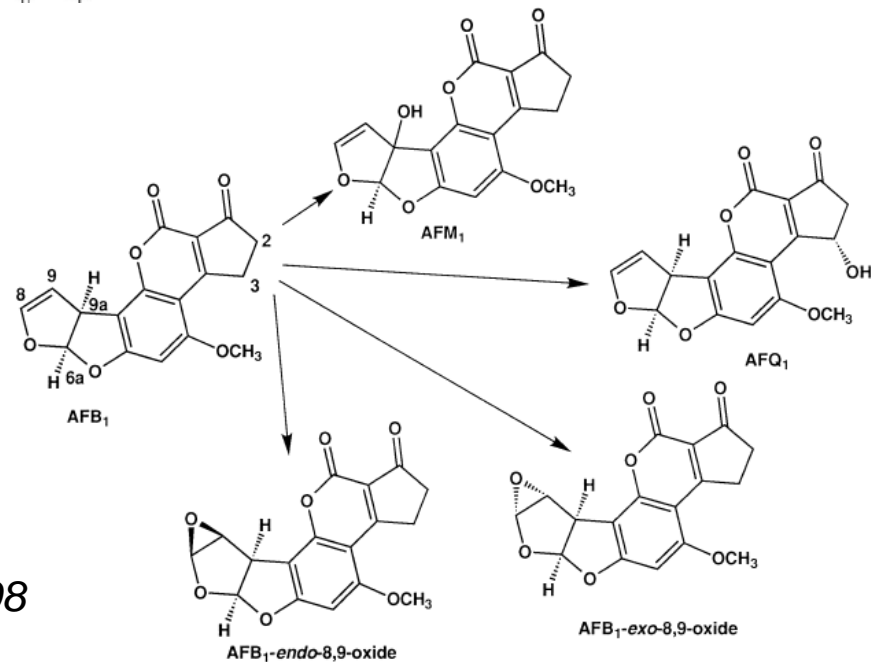


### 3) Aflatoxin B1

- aflatoxin B1** je významný lidský hepatokarcinogen, mykotoxin produkovaný plísněmi rodu *Aspergillus*; vytváří dva hlavní typy aduktů 8,9-dihydro-8-(*N*7-guanyl)-9-hydroxy-aflatoxin B1 (A), u kterého za fyziologických podmínek může dojít rozštěpení kruhu za vzniku 8,9-dihydro-8-(*N*5-formyl-2,5,6-triamino-4-oxypyrimidin *N*5-yl)-9-hydroxy-aflatoxinu B1 (B). Tyto dva adukty byly identifikovány in vivo a tvoří cca 95% identifikovaných aduktů aflatoxinu B1; hlavní roli v jeho bioaktivaci hraje **CYP3A4**;



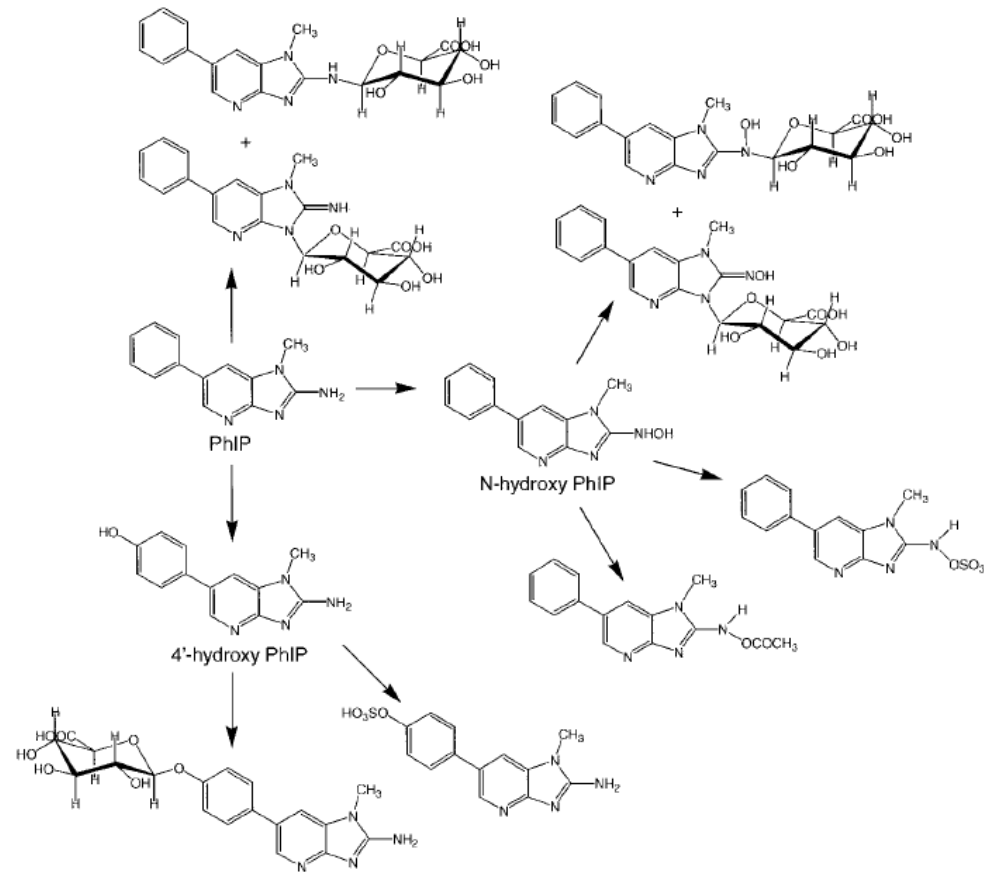
*Clin. Cancer. Res.* 10, 4901, 2004



*Mutat. Res.* 402, 121, 1998

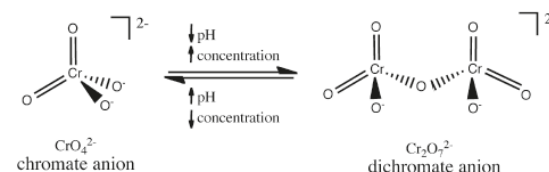
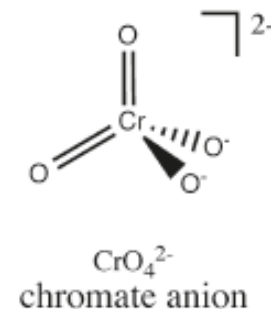
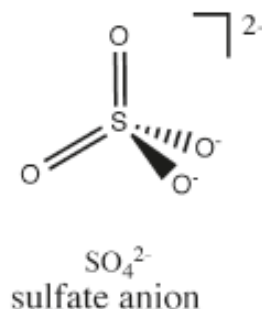
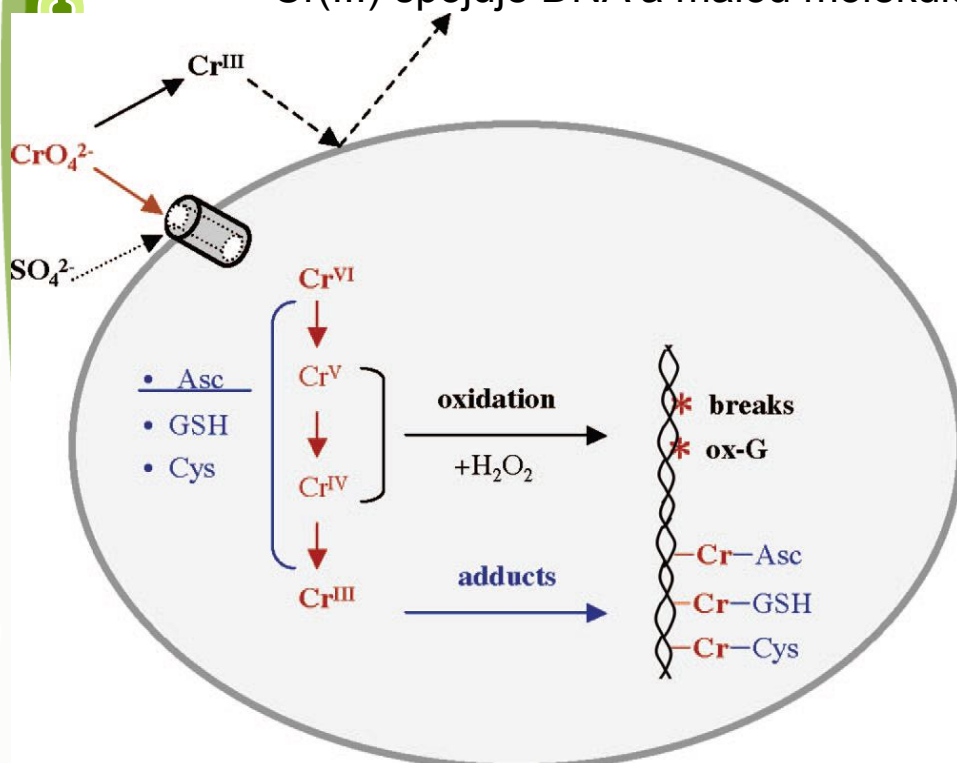
## 4) PhIP a heterocyklické aminy

- tepelné zpracování masa vede k tvorbě řady účinných mutagenů – heterocyklický aminů. Významným zástupcem této skupiny je **2-amino-1-methyl-6-fenylimidazo[4,5-b]pyridin (PhIP)**.
- metabolická aktivace – N-hydroxylace, především působením **CYP1A2** (v menší míře ostatní CYP1 enzymy CYP3A4);
- některé N-hydroxy metabolity jsou sice málo mutagenní, mohou být dále metabolizovány na vysoce mutagenní metabolity prostřednictvím esterifikačních reakcí;
- karcinogenní v modelech nádorů kolonu a prostaty, mj. Apc mutace;



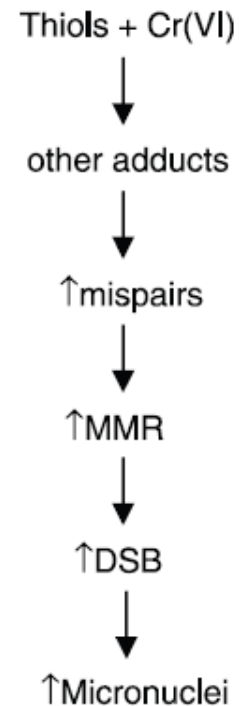
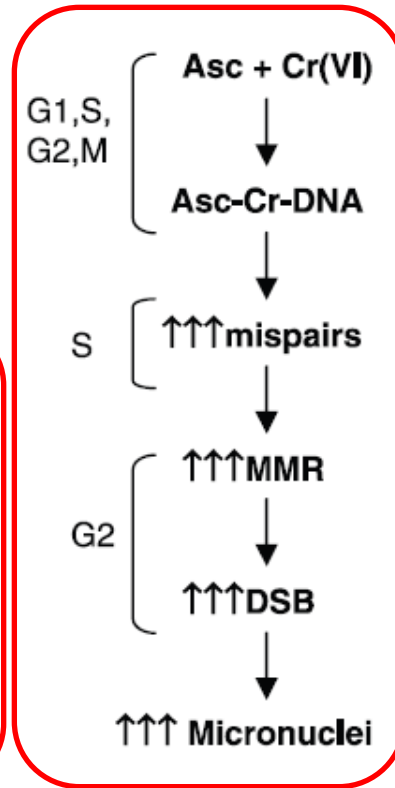
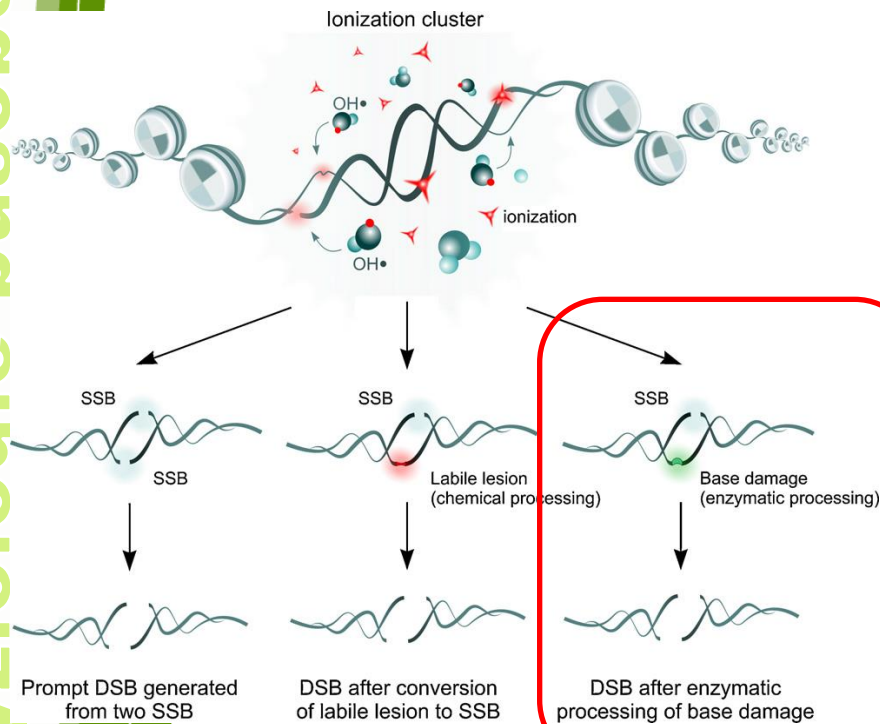
## 5) Chróm

- **sloučeniny Cr(VI)** zvyšují riziko vzniku nádorů plic, mohou však také přispívat k rozvoji dalších typů nádorů, především v ústní dutině a v tenkém střevě;
- primárním mechanismem přispívajícím ke karcinogenitě sloučenin Cr přímé poškození DNA prostřednictvím **tvorby DNA aduktů** nebo prostřednictvím tvorby ROS;
- převládající formou jsou tzv. ternární L-Cr-DNA adukty, ve kterých atom Cr(III) spojuje DNA a malou molekulu, např. askorbát;



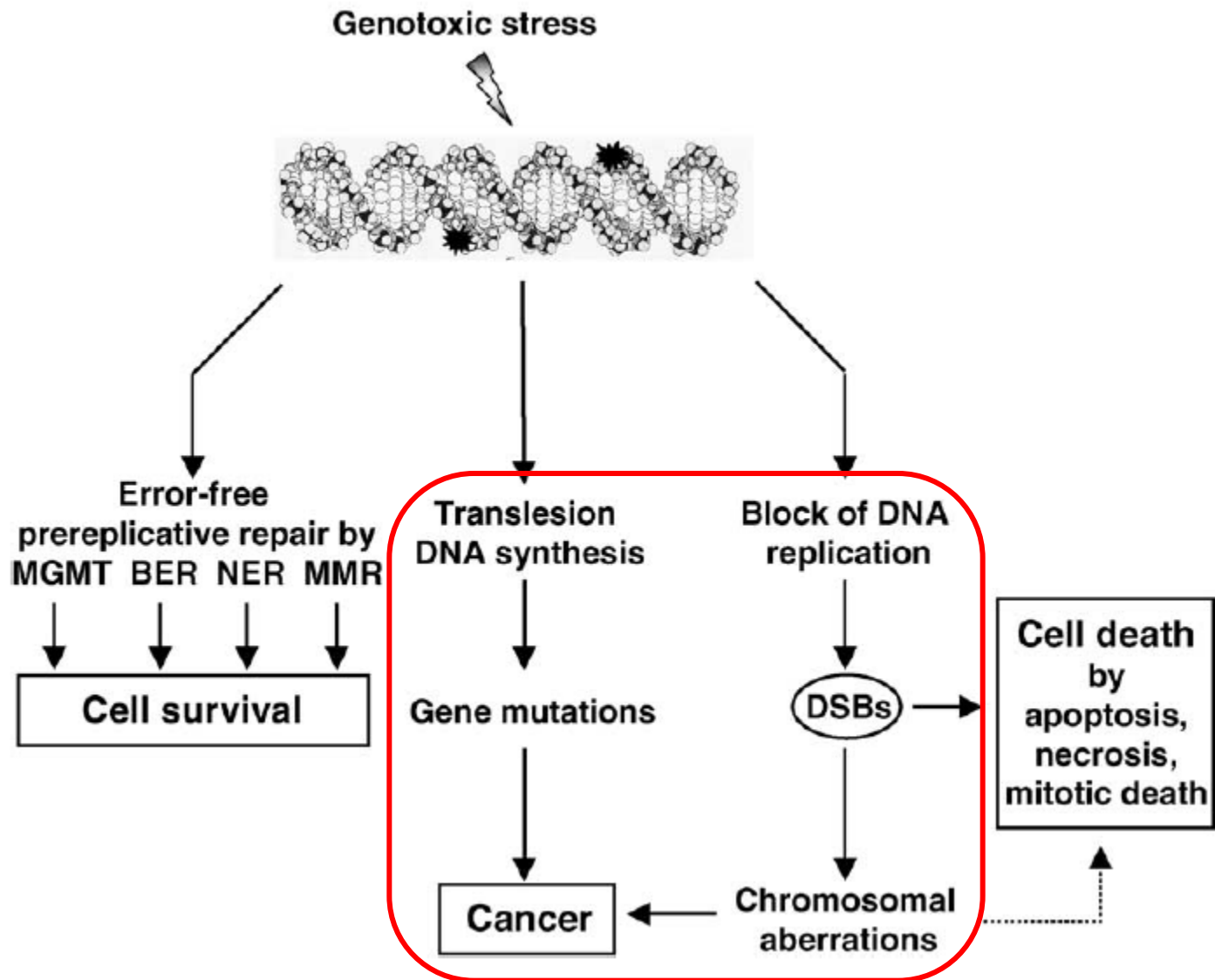
# 5) Chróm

- nejzávažnějším typem poškození DNA ke kterému by mohla přispívat tvorba L-Cr-DNA aduktů jsou **dvouřetězcové zlomy DNA vznikající v důsledku mismatch repair;**



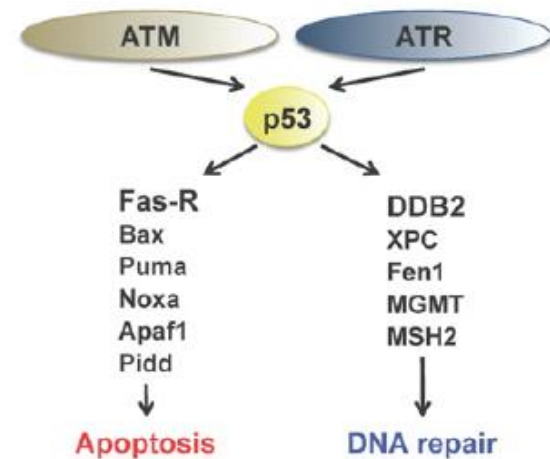
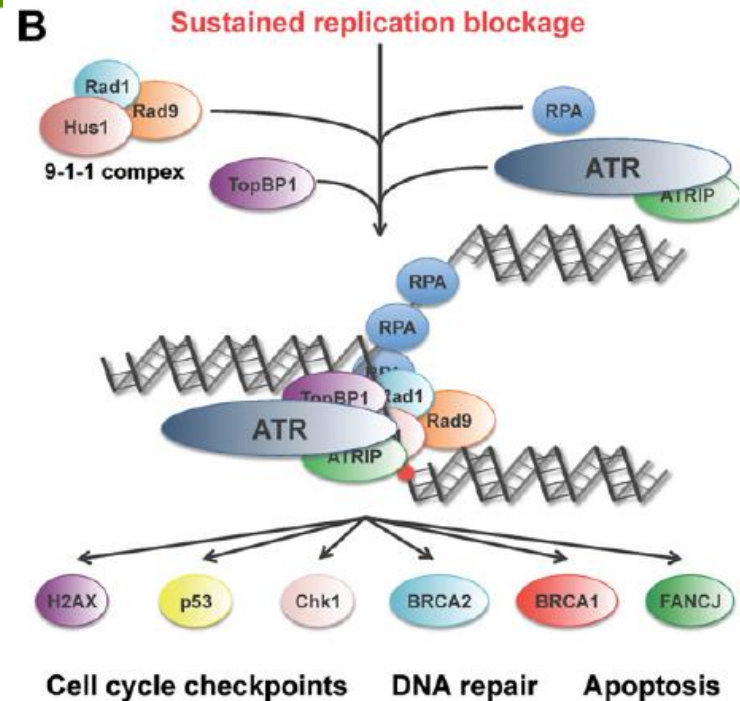
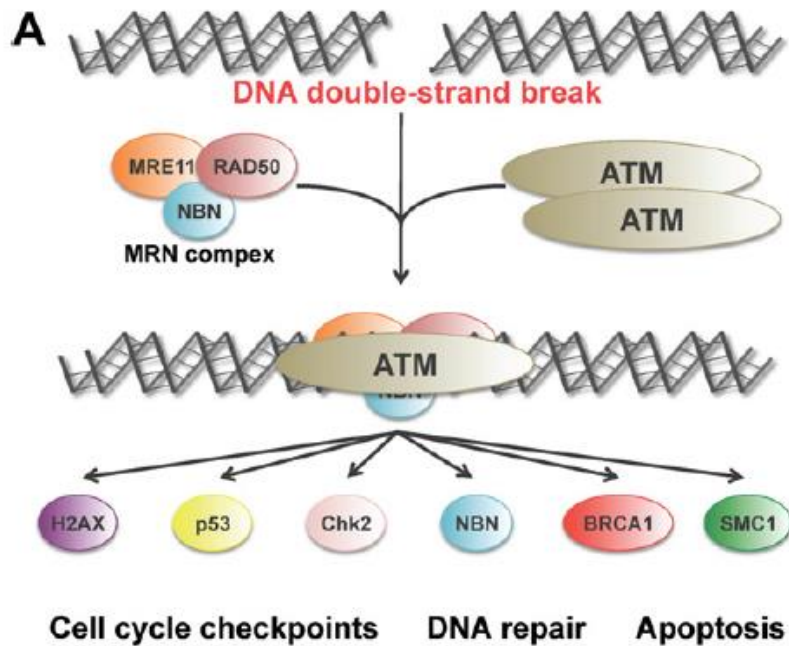


# Fyziologie púsobení farmak DNA adukty a mutageneze



# DNA adukty a mutageneze

Fyziologie púsobení farmak  
a tox



**Endogenous or environmental**

- |   |   |   |   |  |
|---|---|---|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• SAM</li> <li>• Nitrosated amines and bile acids</li> <li>• Dietary nitrosamines</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• ROS</li> <li>• SAM</li> <li>• Natural IR</li> <li>• Base deamination or loss</li> <li>• Trapped TOPOI</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• ROS</li> <li>• UV</li> <li>• Tobacco smoke</li> <li>• Aflatoxin</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• ROS</li> <li>• Natural IR</li> <li>• Trapped TOPOII</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Unrepaired single strand lesions</li> </ul> |
|---|---|---|---|--|

**Lesion**

- |   |  |   |                                 |  |
|---|--|---|---------------------------------|--|
| <p><b>10–30</b></p> <p>O<sup>6</sup>-methyl-guanine</p> | <p><b>10,000–100,000</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 8-oxoguanine</li> <li>• N<sup>7</sup>-meG</li> <li>• N<sup>3</sup>-meA</li> <li>• Uracil</li> <li>• Hypoxanthine</li> <li>• Xanthine</li> <li>• SSB</li> </ul> | <p>6–4 photo-products</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cyclopurines</li> <li>• Bulky adducts</li> </ul> | <p>DNA double-strand breaks</p> | <p><b>10–50</b></p> <p>Stalled replication forks</p> |
|---|--|---|---------------------------------|--|

**Therapeutic**

- |  |  |  |  |   |
|--|--|--|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• TMZ</li> <li>• Alkylating agents</li> <li>• Nitrosoureas</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• TMZ</li> <li>• IR</li> <li>• Radiomimetics</li> <li>• TOPOI poisons</li> <li>• Antimetabolites</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cisplatin</li> <li>• Carboplatin</li> <li>• Nitrosoureas</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• IR</li> <li>• Radiomimetics</li> <li>• TOPOI poisons</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• TMZ</li> <li>• TOPOI poisons</li> <li>• Antimetabolites</li> </ul> |
|--|--|--|--|---|

**Repair pathway**

- |               |   |     |      |     |
|---------------|---|-----|------|-----|
| Direct repair | <ul style="list-style-type: none"> <li>• BER</li> <li>• SSBR</li> </ul> | NER | NHEJ | HRR |
|---------------|---|-----|------|-----|

# Interakce xenobiotik s proteiny

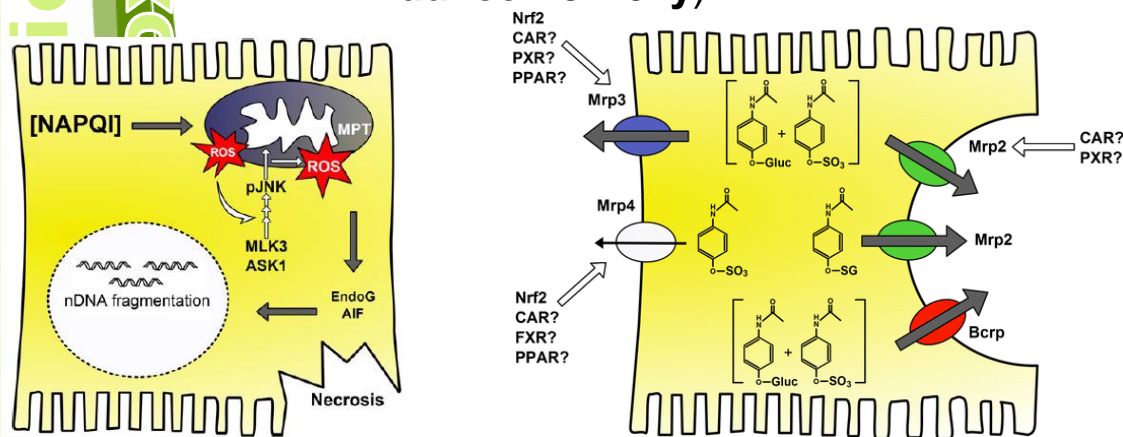
- v porovnání s tvorbou kovalentních aduktů xenobiotik s DNA jsou naše poznatky o interakcích toxikantů s proteiny mnohem limitovanější – několik důvodů – 1) struktura proteinů je mnohem složitější než struktura nukleových kyselin; 2) syntéza a degradace proteinů je mnohem dynamičtější proces než v případě DNA;
- přesto v posledních letech **vzrůstá pozornost věnovaná proteinovým aduktům**, a to z několika důvodů:
- 1) poškození proteinů může přispívat k **cytotoxicitě** – hlavní pozornost je v tomto případě věnována mechanismům toxicity léčiv a drog – **acetaminofen**, tamoxifen, halothan, kokain, **cytostatika**;
- 2) poškození proteinů může přispívat k **imunotoxicitě** – rozvoj autoimunitních reakcí v důsledku kovalentních modifikací proteinů, vůči nimž pak organismus může tvořit protilátky (autoimunitní hepatitida, systémový lupus erythematodes, apod.);
- 3) kovalentní **adukty proteinů** mohou být využívány jako specifické **biomarkery expozice** (např. léková toxicita, kouření, expozice bojovým chemickým látkám nebo insekticidům);
- 4) **specifické adukty** mohou také vznikat v důsledku oxidativního stresu spojeného s **lipidní peroxidací**;

## Interakce xenobiotik s proteiny

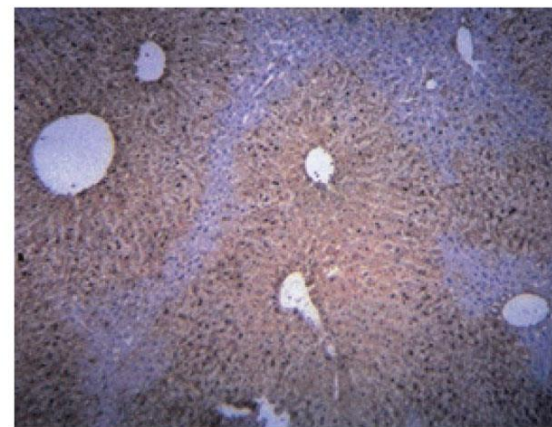
- hlavní cíle reaktivních molekul (elektrofilní sloučeniny) – funkční skupiny lokalizované v aminokyselinách: **-SH (Cys)**; **-NH (His)**;  **$\epsilon$ -NH<sub>2</sub> (Lys)**; **-OH (Tyr)**;
- sterické faktory určují místa poškození proteinů – pouzta místa vystavená solventům mohou být atakována elektrofilní sloučeninou;
- detekce specifických aduktů – radioaktivně značená aktivní sloučenina – stanovení specifických proteinů; v posledních letech se však především rozvíjejí metodiky založené na kombinaci HPLC a hmotnostní spektrometrie;

# 1) Toxické proteinové adukty – příklad - hepatotoxické účinky acetaminofenu

- **acetaminofen** je běžně využívané antipyretikum a analgetikum (paracetamol), tvoří složku řady léčiv;
- hlavním negativním vedlejším účinkem acetaminofenu je **hepatotoxicita, která může mít fatální důsledky, v důsledku masivní nekrózy hepatocytů** lokalizovaných centrilobulárně; vážný problém – např. v USA je ročně hospitalizováno 26.000 pacientů s předávkováním acetaminofenem a je registrováno 500 úmrtí;
- toxicita souvisí s metabolismem acetaminofenu – detoxikace probíhá prostřednictvím konjugačních reakcí – acetaminofen-O-glukuronát, acetaminofen-O-sulfát; **oxidativním metabolismem vznikají látky vytvářející proteinové adukty (zejména v mitochondriích – tvorba ROS – indukce nekrózy)**

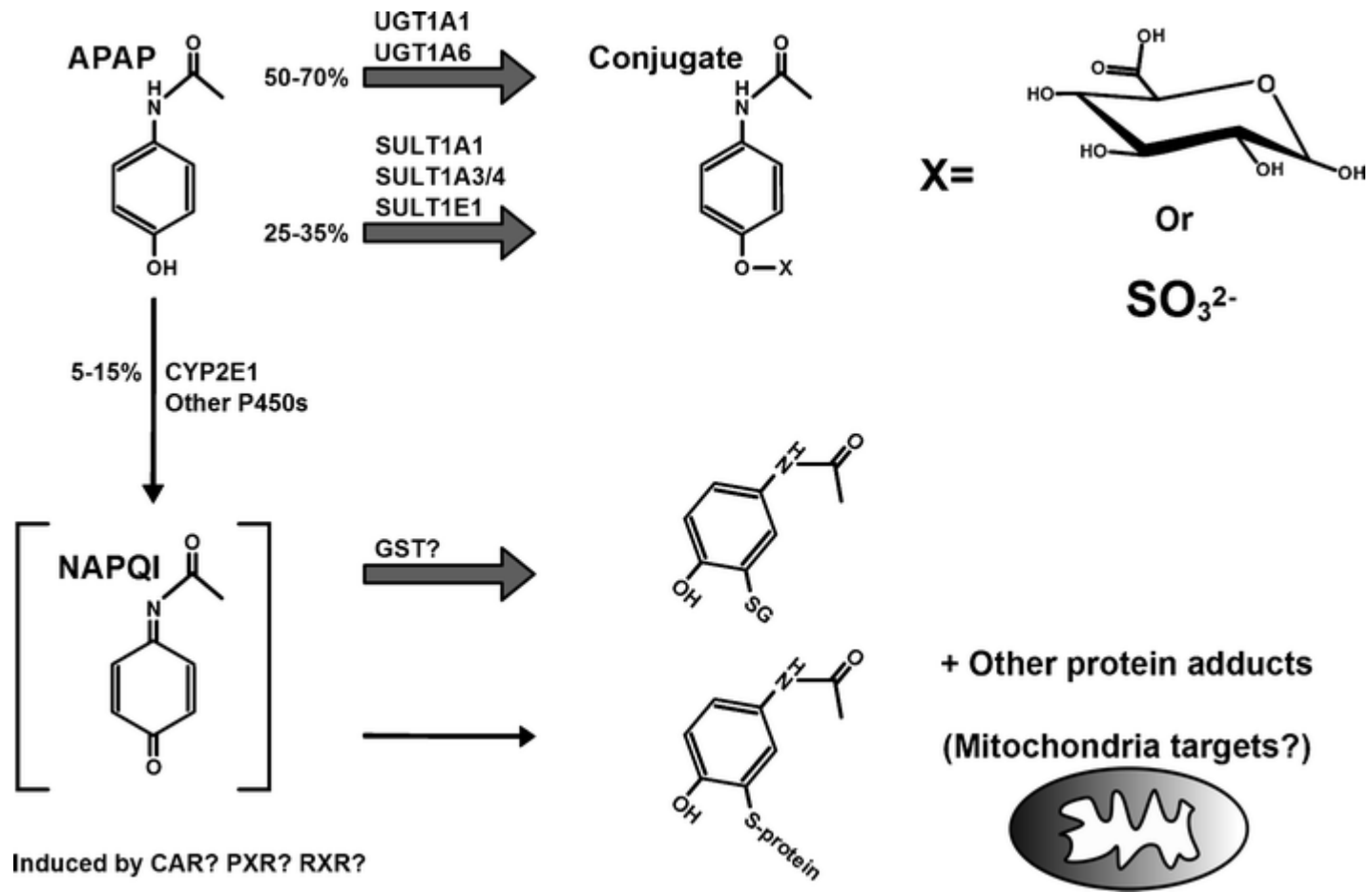


Pharm. Res. 30, 2174, 2013



Molecular Toxicology, 2nd ed., 2006

# 1) Toxické proteinové adukty – příklad - hepatotoxické účinky acetaminofenu



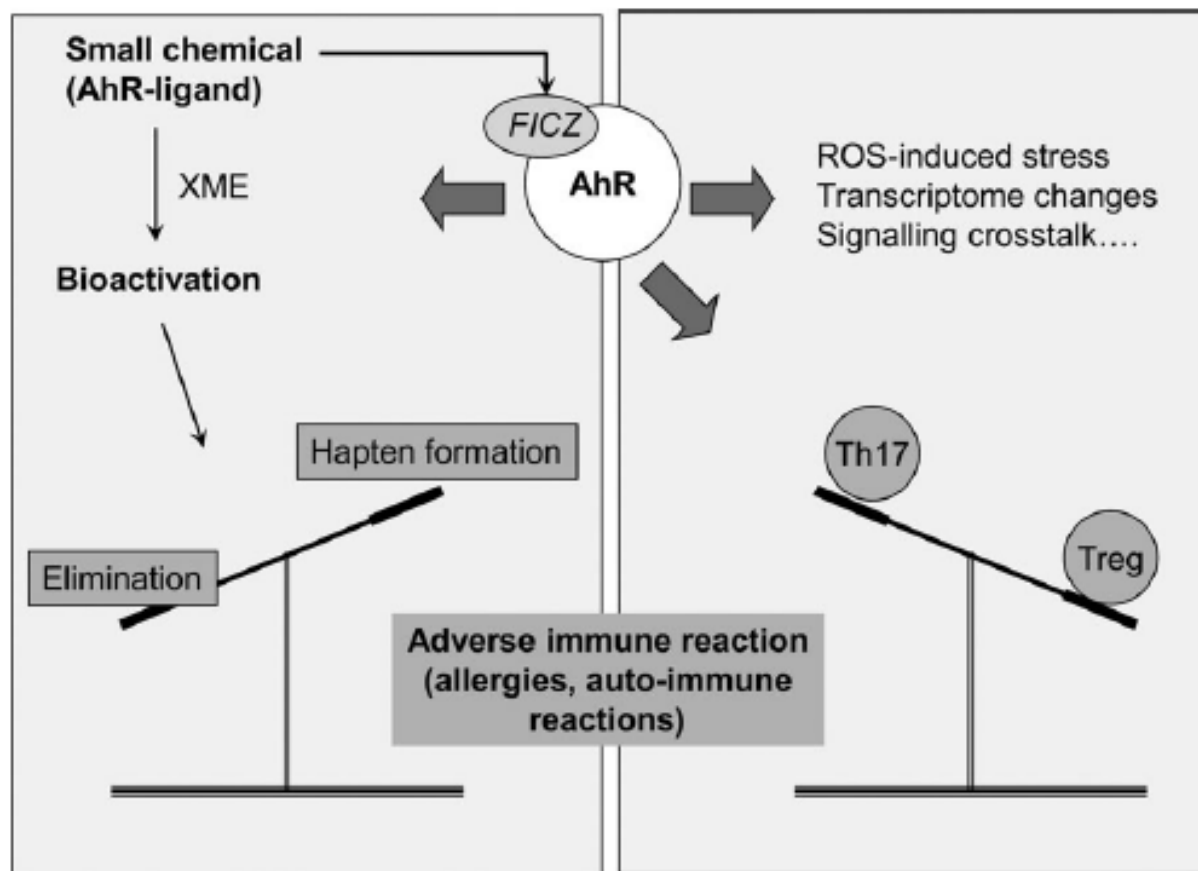
N-acetyl-p-benzoquinonimin

## 2) Tvorba proteinových aduktů a imunotoxicita

- poměrně málo prozkoumaná oblast;
- předpokládá se, že toxikanty (jejich metabolity) vytváří proteinové adukty, které jsou následně štěpeny na peptidy prezentované MHC-I nebo MHC-II – tyto tzv. hapténované antigeny mohou být následně prezentovány T-lymfocytům; další možností je to, že v důsledku tvorby aduktu dojde ke změně proteinového místa dostupného pro proteolýzu – štěpním proteinu pak vznikají neobvyklé, tzv. kryptické peptidy, rozpoznávané jako nové antigeny imunitním systémem;
- důsledkem je buď vznik alergických reakcí nebo autoimunitního onemocnění; příklad – alergické reakce na léčiva – např. penicilin; tyto imunitní reakce jsou reverzibilní – stačí eliminovat látku tvořící adukty;



## 2) Tvorba proteinových aduktů a imunotoxicita



### 3) Proteinové adukty jako biomarkery

Adukty vznikající v důsledku expozice tabákovému kouři

Adduct	Source	Methods of detection
<b>Protein adducts</b>		
Alkylvaline hemoglobin	Various alkylating agents	GC-MS
Methylvaline hemoglobin (MeVal-Hb)	<i>e.g.</i> , NNK	GC-MS
Cyanoethylvaline hemoglobin (CyEtVal-Hb)	Acrylonitrile	GC-MS
Carbamoylvaline hemoglobin (AAVal-Hb)	Acrylamide	GC-MS; LC-MS
2-Hydroxy-2-carbamoylvaline hemoglobin (GAVal-Hb)	Glycidamide	GC-MS; LC-MS
Hydroxyethylvaline hemoglobin (OHETVal-Hb)	Ethylene, ethylene oxide	GC-MS; LC-MS
4-Aminobiphenyl hemoglobin (4-ABP-Hb)	4-Aminobiphenyl	GC-MS
BPDE hemoglobin (BPDE-Hb)	Benzo[a]pyrene	ELISA; GC-MS
BPDE albumin	Benzo[a]pyrene	ELISA; HPLC-fluorescence
HPB hemoglobin (HPB-Hb)	NNK, NNN	GC-MS
<i>p</i> -Benzoquinone albumin	<i>p</i> -Benzosemiquinone	Mass spectrometry (MALDI-TOF-TOF)

### 3) Proteinové adukty jako biomarkery

- **hemoglobinové adukty 4-aminobifenyly (4-ABP-Hb)** jsou významně zvýšené v červených krvinkách kuřáků – jedná se o **vhodný biomarker využívaný ve studiích, kde je nutné odlišit kuřáky vs. nekuřáky** – hladina je částečně závislá na antioxidační kapacitě krve;
- méně vhodný je 4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanon (HPB) hemoglobinový adukt (odvozený od 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanonu (NNK) – nitrosamin specifický pro tabák) – jen marginální zvýšení u kuřáků;
- akrylamid a jeho metabolit glycidamid (mutagenní) jsou důsledkem expozice tabákovému kouři i kontaminovaným potravinám, ale bylo prokázáno, že hemoglobinové adukty akrylamidu (AAHb) a glycidamide (GAHb) vznikají zejména v důsledku kouření;
- **monitoring léčby i vedlejších toxických účinků léčby** – příklad – v poslední době se uvažuje o stanovení aduktů acetaminofenu s cysteinem pro monitoring pacientů se selháním jater po předávkování acetaminofenem;

### 3) Proteinové adukty jako biomarkery

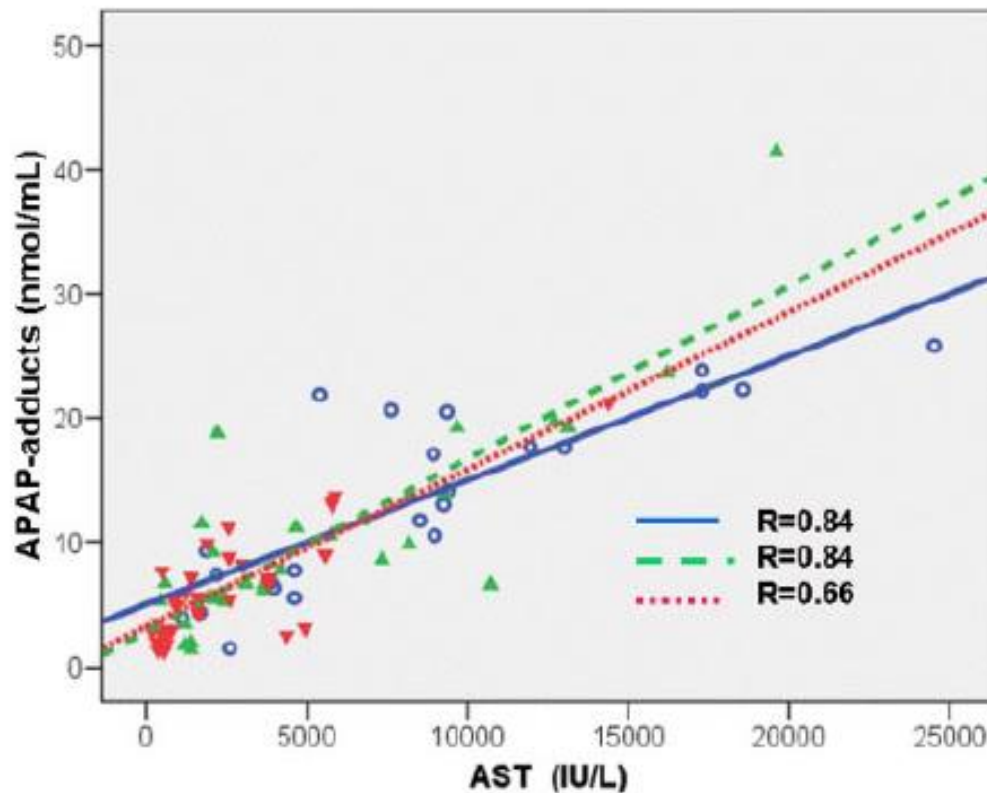
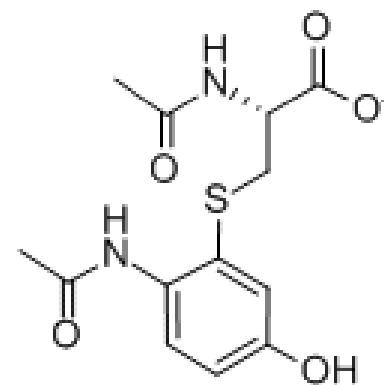


FIG. 3. Correlation of AST (IU/l) with APAP adducts in adults with APAP-related acute liver failure, plotted relative to overdose (—, day 3; - - -, day 4; ···, day 5).



## 4) Proteinové adukty produktů lipidní peroxidace

- toxické látky indukující zvýšenou produkci ROS mohou významně přispívat k peroxidaci lipidů v buněčných membránách;
- reaktivní metabolity v průběhu **lipidní peroxidace** indukují **oxidaci vícenenasycených mastných kyselin v buněčných membránách – tvorba biologicky aktivních reaktivních aldehydů**;
- tyto **elektrofilní sloučeniny mohou snadno tvořit proteinové adukty**; je jim věnována zvýšená pozornost především v souvislosti s **neurodegenerativními onemocněními, aterosklerózou a v poslední době i v autoimunitních onemocněních**;

