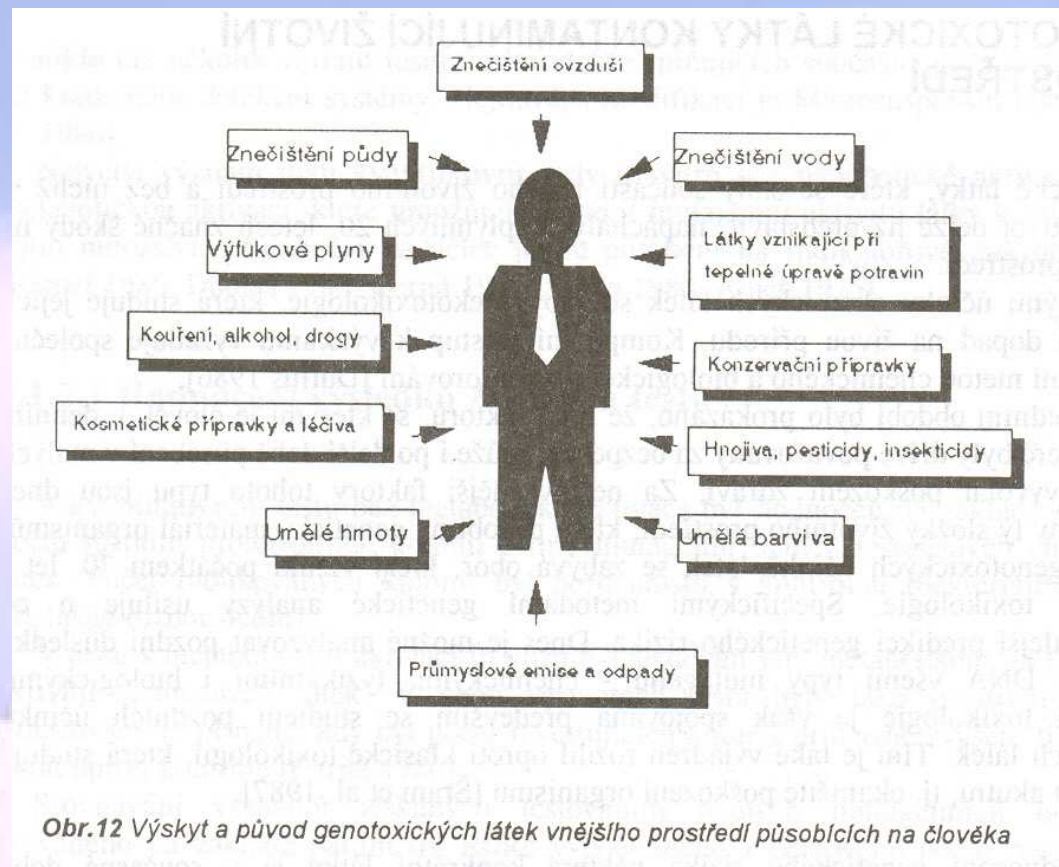


Chemické mutageny

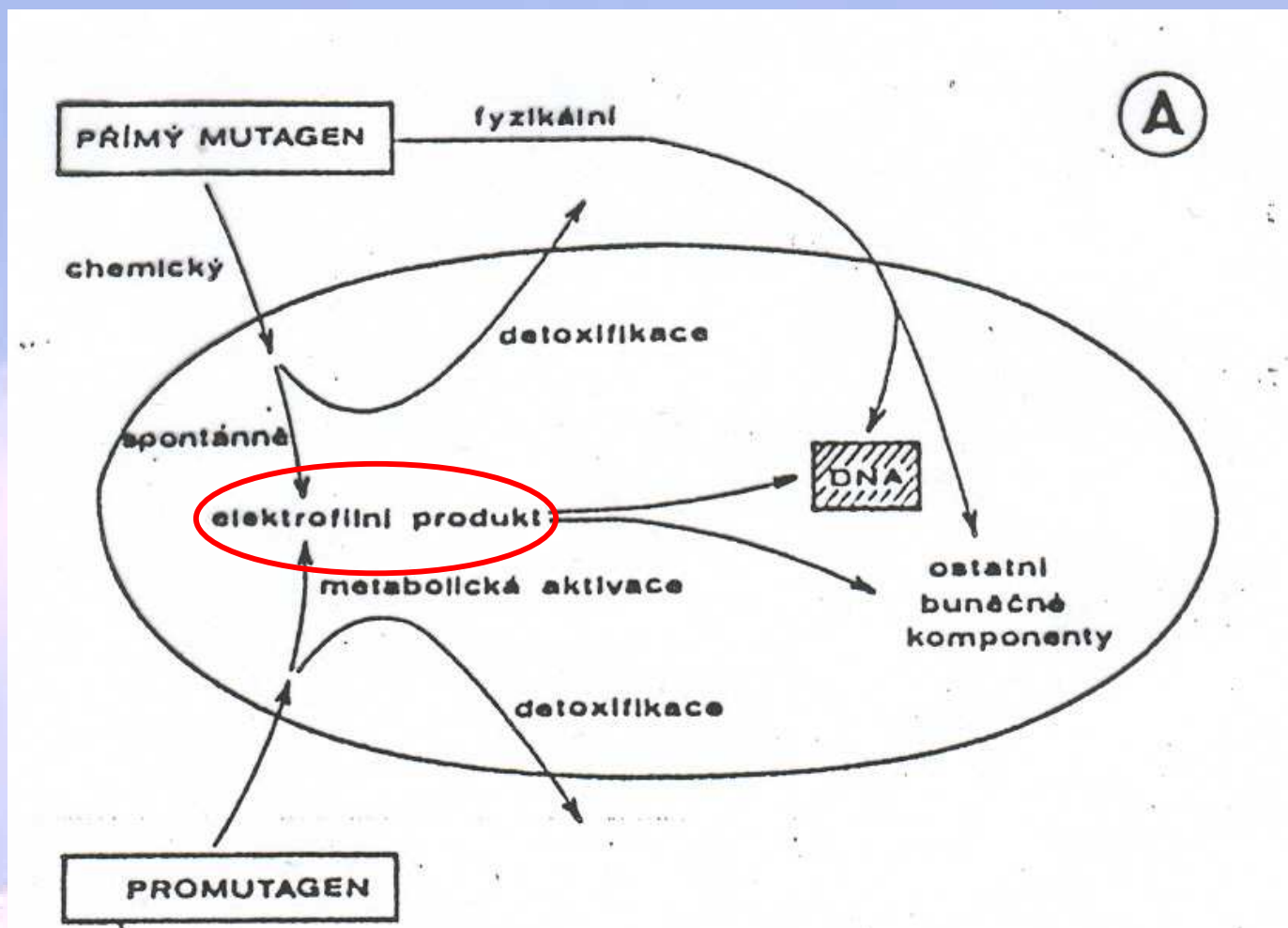
„Různé **chemické látky**, které lze rozdělit na přirozené a umělé, endogenní a exogenní, univerzální nebo druhově specifické“

Chemické mutageny a jejich genetické riziko

- 20. století – století chemie
- 1990 – Chemical Abstract Services – 10 miliónů chemických látek



Chemické mutageny a jejich rozdělení



Chemické mutageny a jejich rozdělení

1) Látky schopné modifikovat klidovou nereplikující se DNA, replikace může být nutná pro vznik mutací.

a) Modifikátory bazí DNA - jejich účinkem neprobíhá odstranění bazí, ale tyto se mění na jiný typ báze. Takový účinek má např. *kyselina dusitá, hydroxylamin*.

b) Chemické látky schopné nejen modifikovat báze, ale i odštěpit báze DNA a rozrušit polynukleotidový řetězec. Sem patří *monofunkční alkylační látky a volné radikály*.

c) Chemické látky, které mají vedle stejných účinků jako předchozí skupina ještě schopnost vytvářet kovalentní vazby mezi bazemi a spojovat řetězce DNA. Takto působí *bifunkční alkylační látky, aldehydy* a látky typu *mitomycinu C, cisplatiny*.

d) Radiomimetika působící obdobně jako ionizující záření. Příkladem může být *bleomycin*.

2) Látky působící pouze při replikaci DNA.

a) Analogy purínových a pyrimidinových bazí DNA (*5-bromuracil, 2-aminopurin*), které řadíme k významným antimetabolitům.

b) Látky vyvolávající při replikaci inzerci nebo delecí párů bazí. Jsou to *bazická barviva*, zejména *akridinová* např. *proflavin, akridinová oranž*.

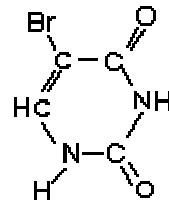
3) Látky působící na systémy replikace a reparace DNA. Jedná se o sloučeniny zvyšující frekvenci spontánních a indukovaných mutací. K těmto látkám patří např. *hydroxymočovina, FdUr, araC, 3 AB* aj.

4) Ostatní chemické látky - např. těžké kovy (kadmium, chrom)

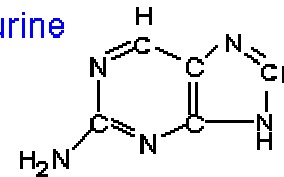
Přímé chemické mutageny a jejich příklady

I. Base analogs

5-Bromouracil

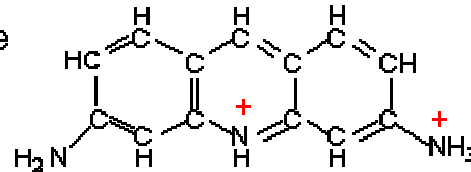


2-Aminopurine



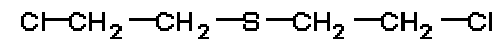
II. Acridines

2,8,-Diamino acridine
(Proflavin)

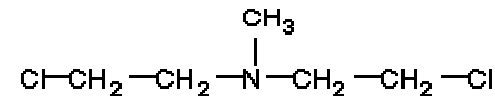


III. Alkylating agents

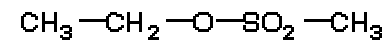
Di-(2-chloroethyl)sulfide (Sulfur mustard)



Di-(2-chloroethyl)methylamine
(Nitrogen mustard)



Ethylmethane sulfonate (EMS)



IV. Deaminating agents

Nitrous acid HNO_2

V. Miscellaneous

Hydroxylamine NH_2OH

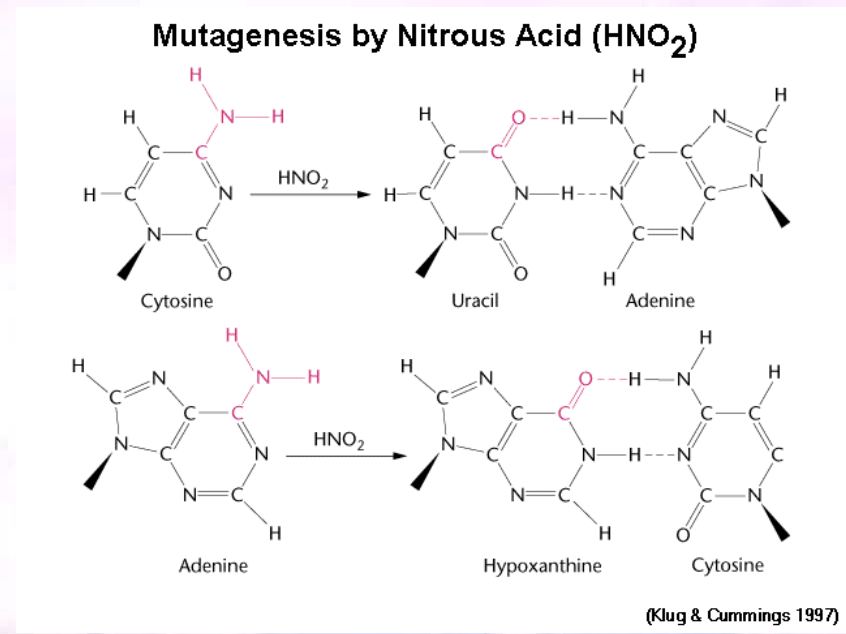
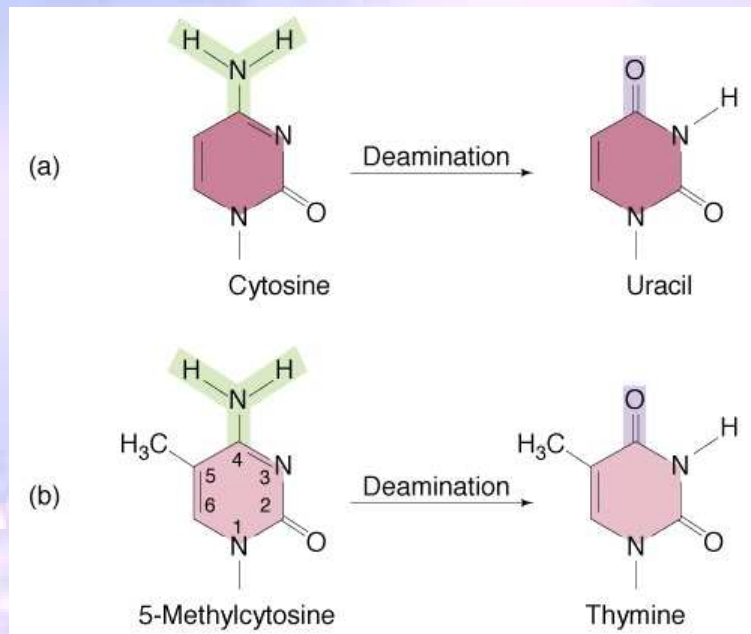
Free radicals

Kyselina dusitá (modifikátor bazí)

Kyselina dusitá (dusitany v kyselém prostředí) – reaguje s primárními aminoskupinami – deaminace C-U, A-hypoxantin, G-xantin

Podobně reaguje hydrogensířičitan HSO_3^- !!!

Hydroxylamin (reaguje s C) – nahrazuje aminoskupinu hydroxyaminoskupinou - NHOH - změna párování (s A)



Alkylační látky

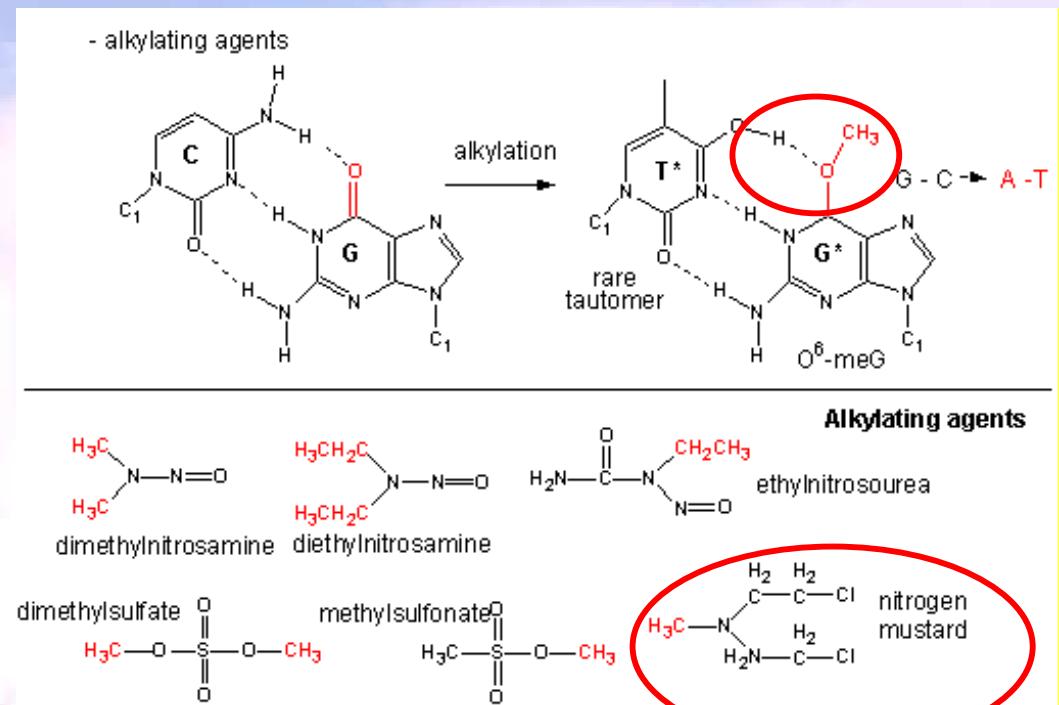
Alkylační látky - rozdělení:

a) **alkysulfáty** (reagují hlavně s dusíkem bází)

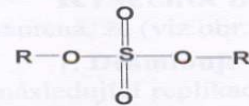
b) **N-nitrososloučeniny** (reagují hlavně s kyslíkem)

1. monofunkční AL

2. bifunkční či polyfunkční AL

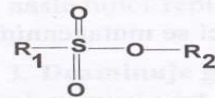


Alkylační látky - příklady



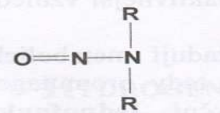
dialkylsulfát

Příklad: dimetylsulfát
 $\text{R} = -\text{CH}_3$



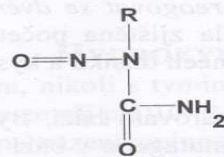
alkyl-alkan-sulfonát

Příklady: metylmetansulfonát
 $\text{R}_1 = \text{R}_2 = -\text{CH}_3$
etylmetsulfonát
 $\text{R}_1 = -\text{CH}_3 \quad \text{R}_2 = -\text{C}_2\text{H}_5$



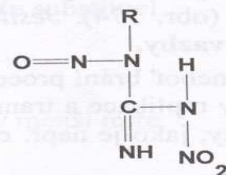
dialkylnitrozamin

Příklad: dimetylnitrozamin
 $\text{R} = -\text{CH}_3$



N-alkyl-nitrozomočovina

Příklad: N-metyl-N-nitrozomočovina
 $\text{R} = -\text{CH}_3$

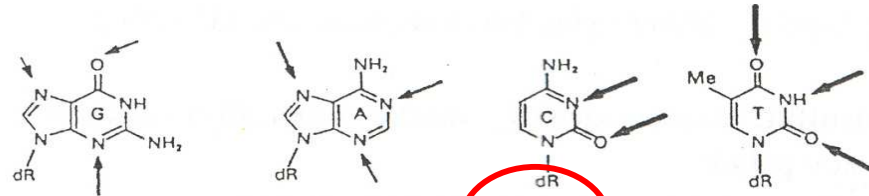


N-alkyl-N'-nitro-N-nitrozoguanidin

Příklad: N-metyl-N'-nitro-N-nitrozoguanidin
 $\text{R} = -\text{CH}_3$

BIOLOGICKÉ DŮSLEDKY ALKYLACE DNA

alkylační místa („tvrdými“ činidly“):



N-alkylované báze: hlavní místo je **G-N7**

metylace v tomto místě nemění párování a protože N7-metylguanin snadno depurinuje, je „poškozené“ místo snadno reparováno
bifunkční modifikace (S/N „mustard“ - kroslink mezi sousedními G) má cytotoxický efekt

A-N3: hlavní toxické místo po monofunkční alkylaci - alkylované místo je v malém žlábků a blokuje polymeraci DNA (podobně G-N3, ale vzniká 10x méně často)

A-N1: interferuje s A:T párováním

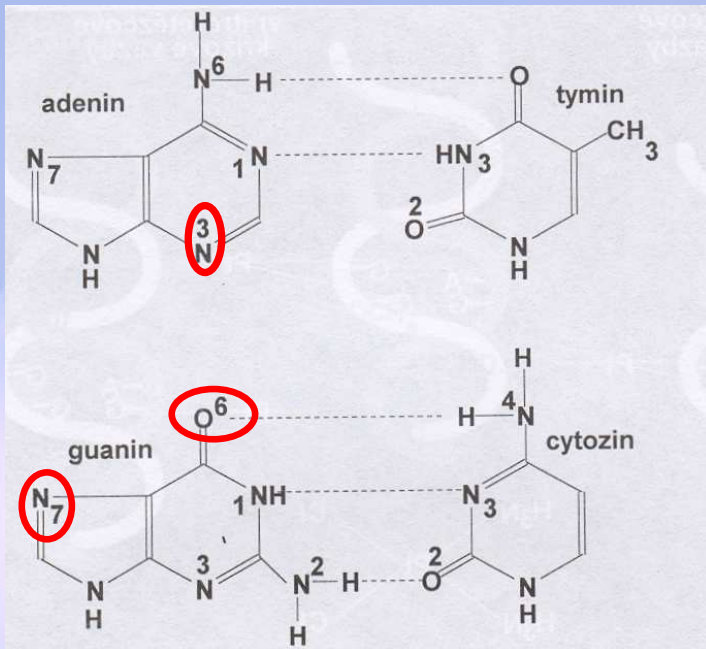
O-alkylované báze

G-O6 - je „uzamčen“ v enol-formě (G je normálně keto-),
=> páruje se s T spíše než s C => mutace CG->AT (běžné v buňkách vystavených tvrdým alkylačním činidlům)

T-O6 - minoritní produkt

- rovněž enol- => párování s G => TA->CG

O-alkylace fosfátů - fosfotriestery, snadno reparovatelné, nejsou toxické



Atomy, na kterých probíhá alkylace, jsou očíslovány.

Důsledky alkylace DNA.

1. Modifikace, které neovlivňují ani replikační, transkripční či translační procesy.

Tyto změny jsou považovány za biologicky inertní, tzn. že nemají na fenotyp ani letální ani mutagenní účinky. Do této skupiny patří např. 7-alkG, 7-alkA, vznik alkylfosfotriesterů po alkylaci O.

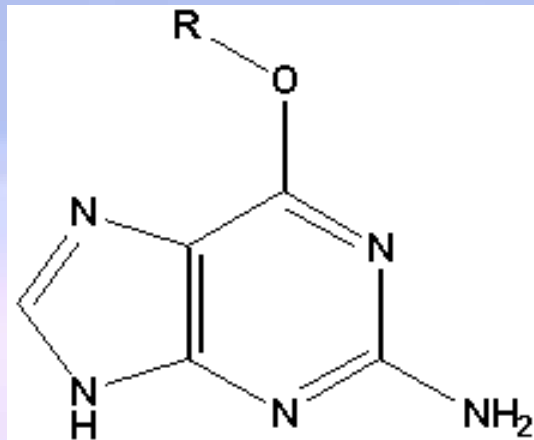
2. Modifikace, které inhibují replikaci, popř. transkripci a translaci.

Tyto modifikace mohou být pro buňku letální, pokud nejsou reparovány. Příkladem jsou 3-alkA, 3-alkG.

3. Modifikace měnící párovací schopnosti původních bází, aniž změní konformaci DNA a naruší replikaci či transkripci.

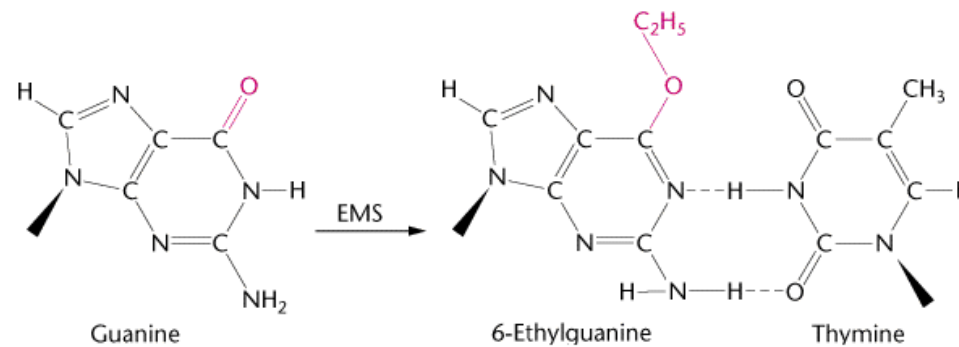
Sem zařazujeme např. O⁶-alkG (pravděpodobně všechny O-alkylové deriváty).

Molekulární mechanismus vzniku mutací po účinku EMS – vnik O⁶-alkylguaninu - změna párování



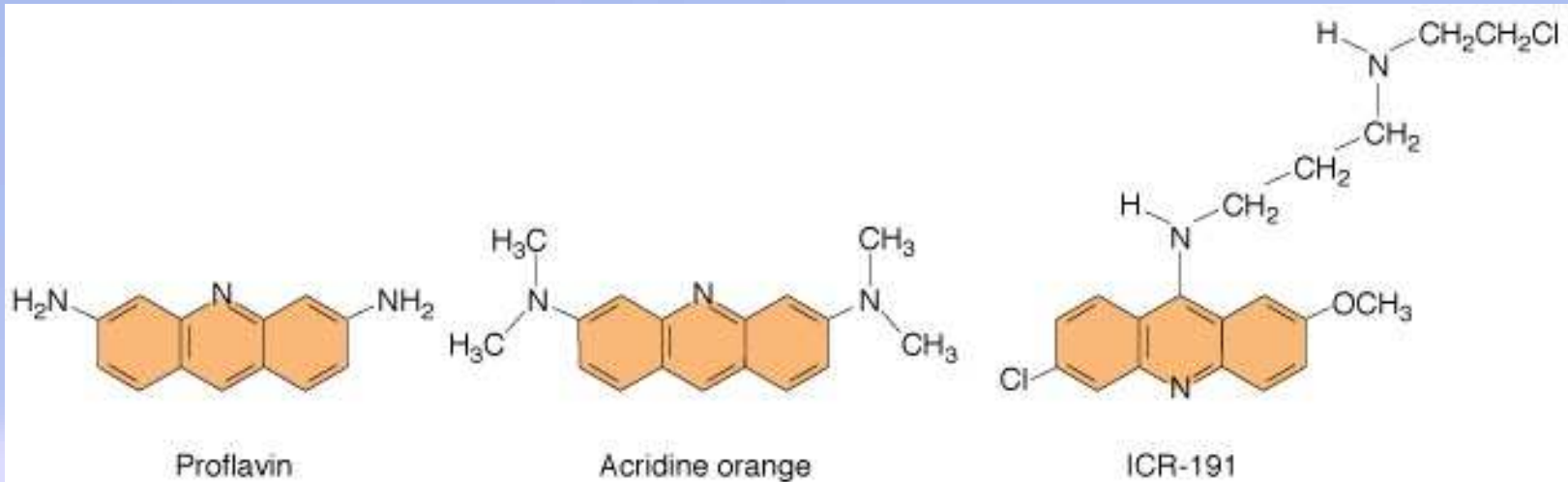
O⁶-alkylguanines

Mutagenesis by Ethyl Methane Sulfonate (EMS)

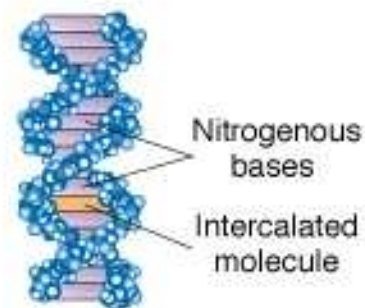


(Klug & Cummings 1997)

Interkalační látky (posunové mutace)

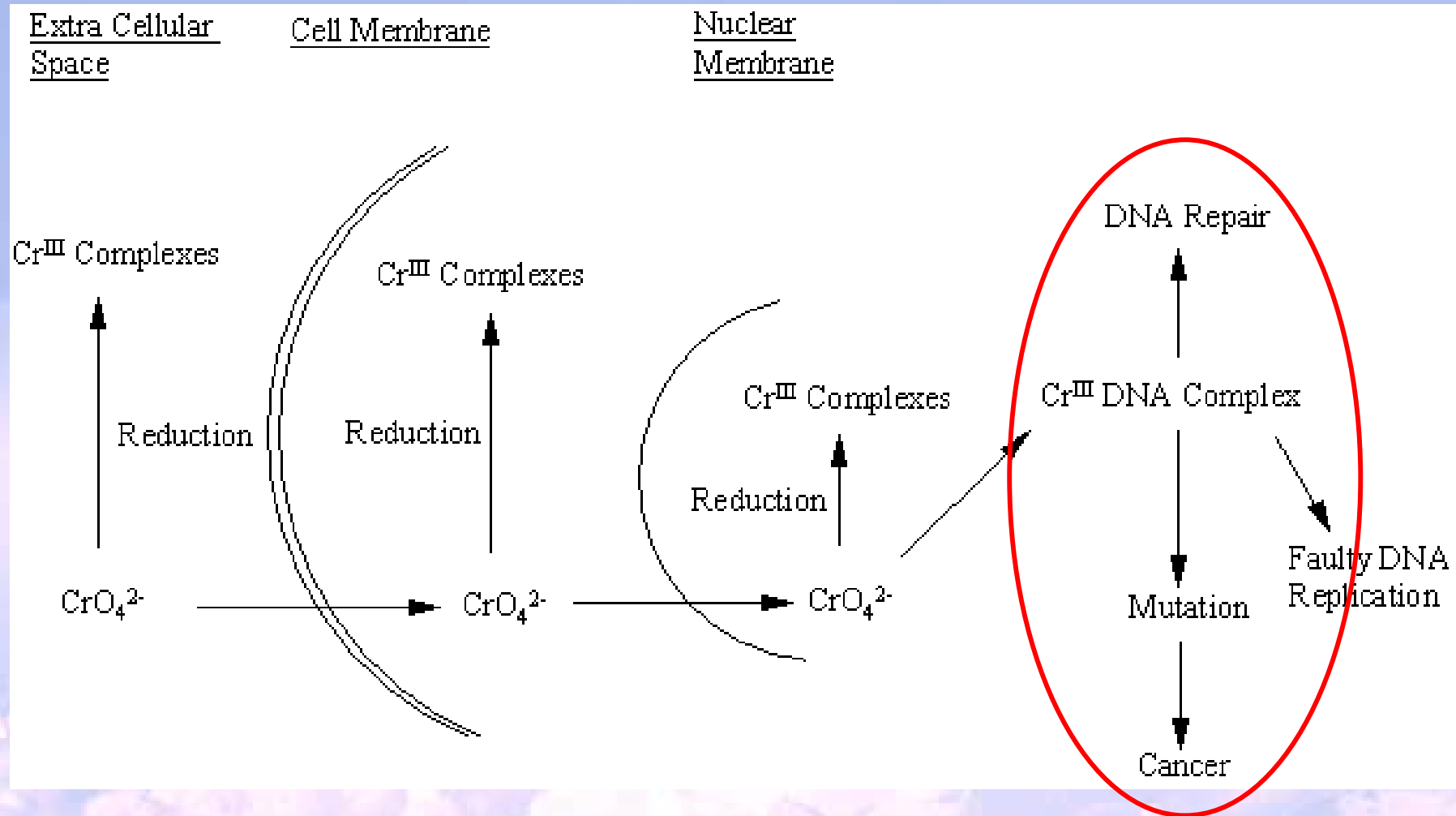


(a)



(b)

Poškození DNA po účinku těžkých kovů – oxidativní poškození DNA

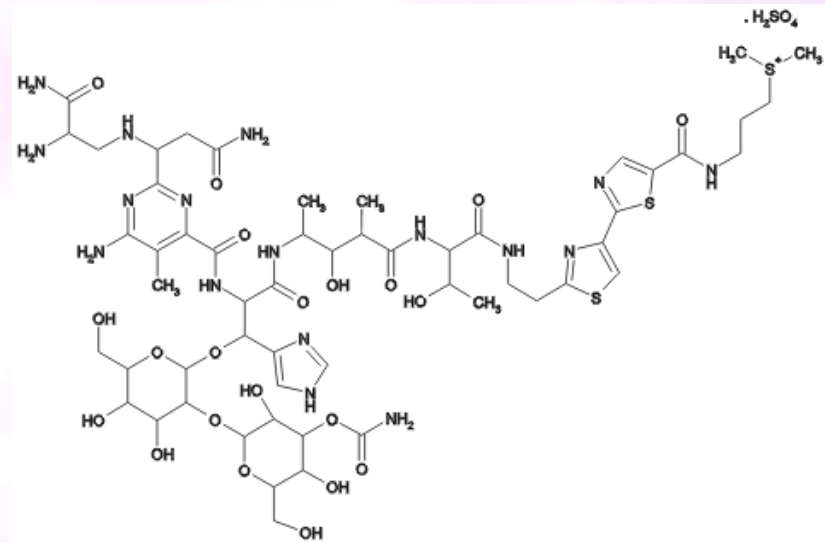


The International Agency for Research on Cancer classified cadmium as a human carcinogen

- The principal mechanisms of **cadmium** genotoxicity, mutagenicity and carcinogenicity are: **(i) generation of reactive oxygen species; (ii) inhibition of DNA repair (iii) depletion of glutathione and (iv) possibly also suppression of apoptosis.** Inhibition of DNA repair, namely nucleotide excision repair ([27–29](#)), base excision repair ([30](#)), DNA-SSB rejoining ([31](#)) and O6-methylguanine-DNA-methyltransferase ([14,17](#)) may be of high relevance for human carcinogenesis, since DNA repair inhibition by cadmium occurs already at very low (for practical exposure scenarios) concentrations.
 - World-wide **15 000 tons of cadmium** are produced per year.
-

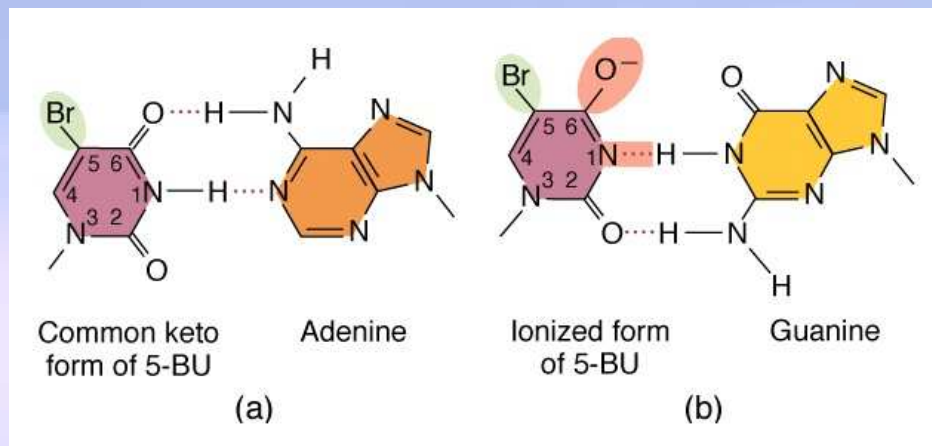
Radiomimetika

- **radiomimetika** – chemické látky napodobující účinek ionizujícího záření (**indukce zlomů DNA**)
- **protinádorová antibiotika** – např. bleomycin

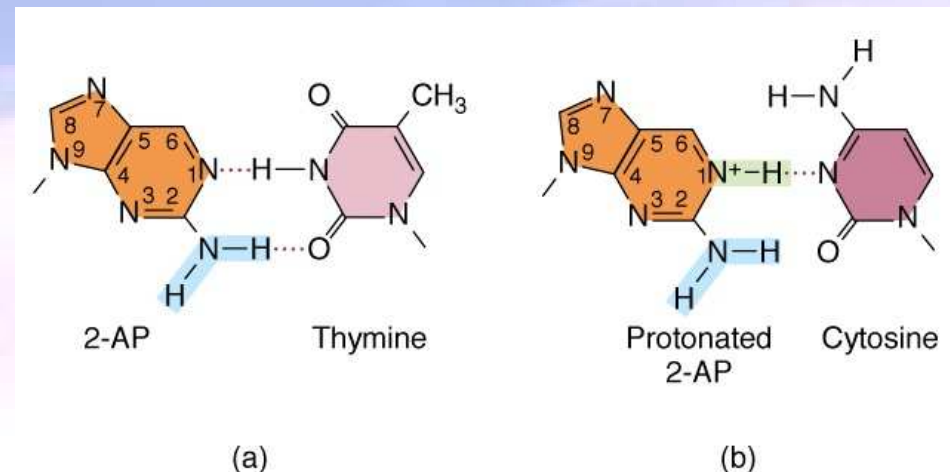


Analogy bází – působí při replikaci

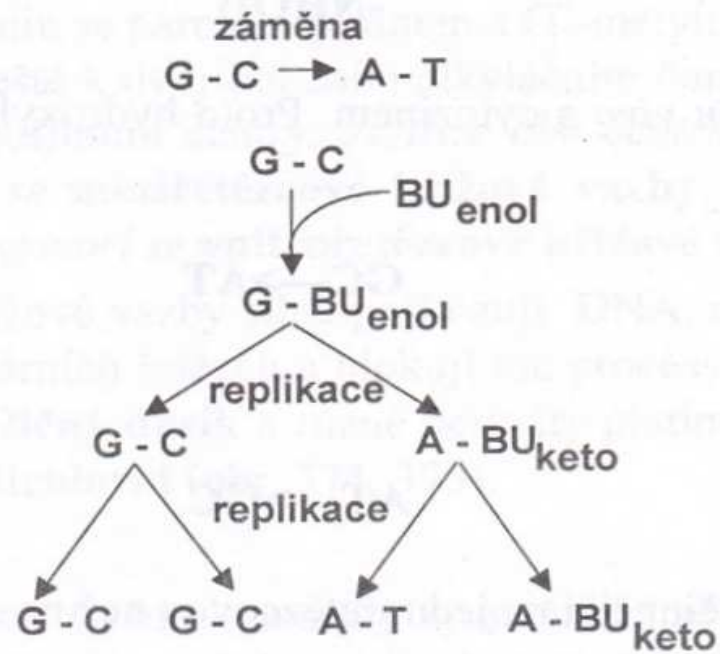
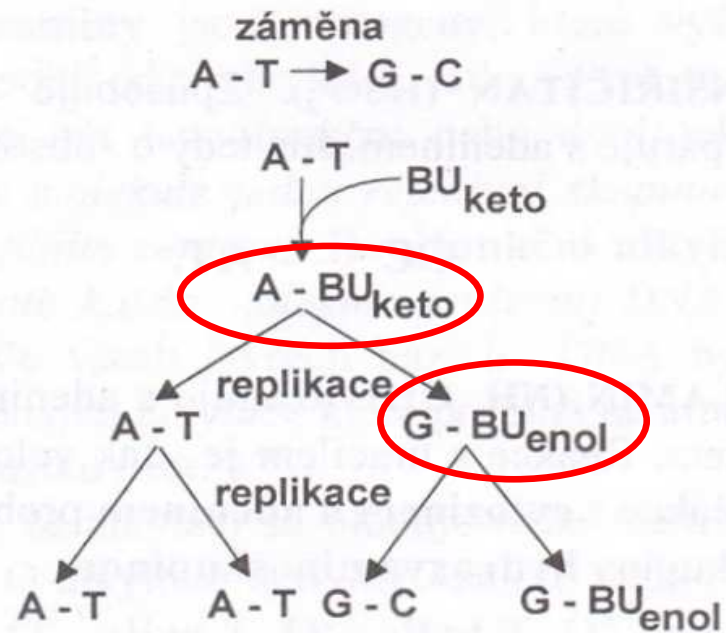
5BU – analog tyminu (A nebo G)



2AP – analog adeninu (T nebo C)



**Indukce mutací – záměna bází –
nutná replikace !!!**

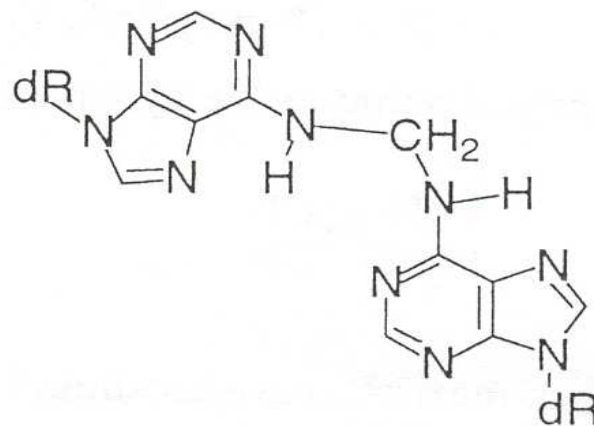
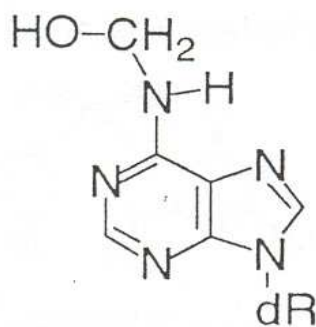
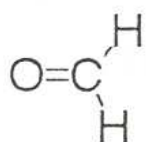


Obr. 371

Záměny párů bází v DNA pod mutagenním účinkem brómuracilu

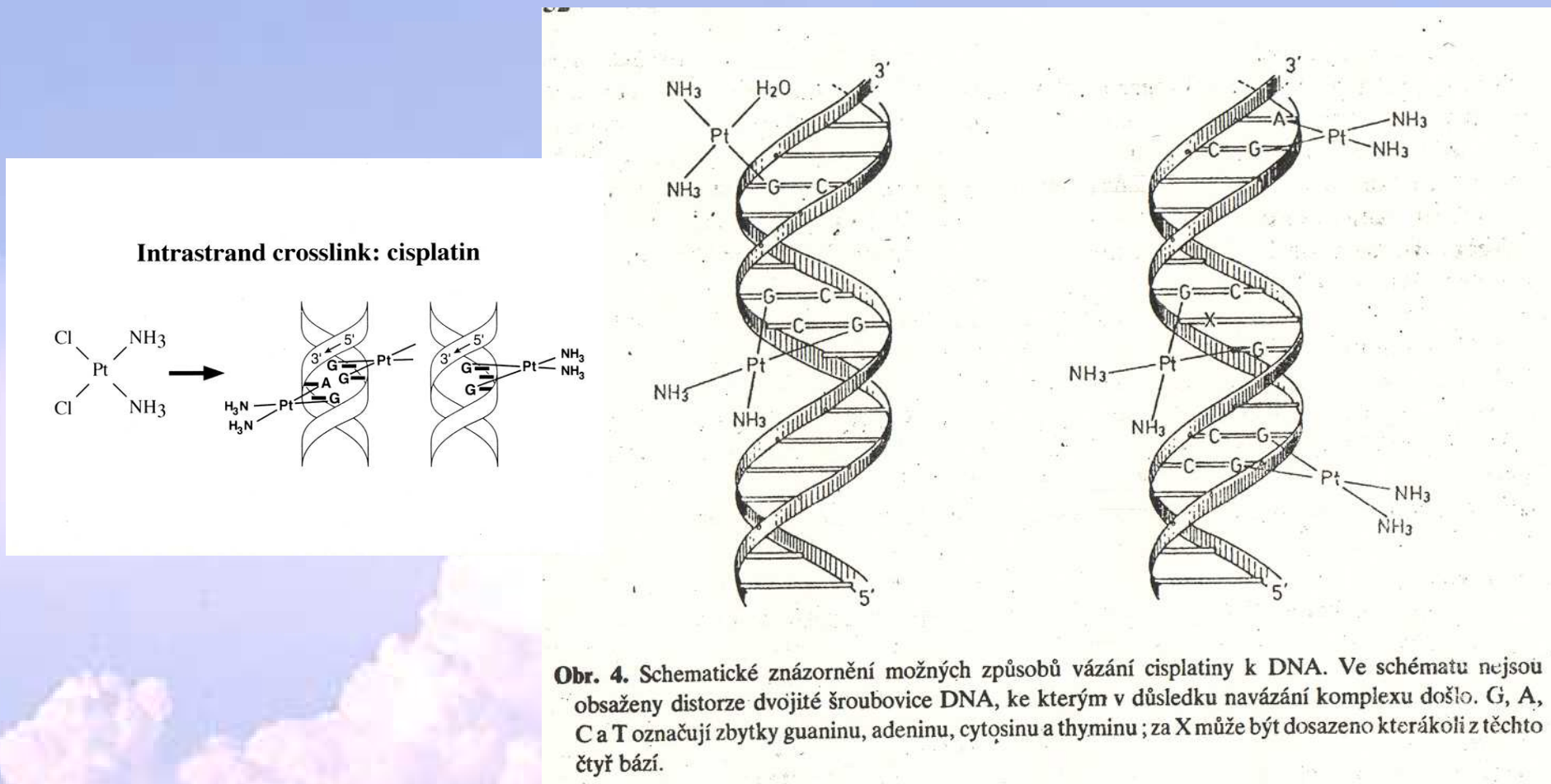
Formaldehyd - karcinogen

formaldehyd reaguje s aminoskupinami (ažují se na něj)
nejprve s N6 adeninu (N2 guaninu) - reverzibilní reakce;
produkt pomalu reaguje s další aminoskupinou (A nebo G) za tvorby
stabilního metylenového můstku



Chemické mutageny tvořící v DNA křížové vazby

Cisplatina – cytotoxický efekt – léčba nádorů



Platinové deriváty v léčbě nádorových onemocnění.

Cisplatina – cis diamin-dichloroplatinatý komplex

Historie:

- 1965 – inhibice růstu – dělení bakterií E. coli v kultuře obsahující chloridové a amoniové ionty kolem platinových elektrod

Mechanismus účinku:

- protinádorový účinek: vazba na DNA za tvorby produktů, které blokují replikaci a zabraňují transkripci:
- křížové vazby (intrastrand cross-linking: 90 %)

Farmakokinetika:

- rychlá distribuce do tkání (játra, ledviny, střevo)
- za 3 hod. je 90 % platiny vázáno v plazmě na bílkoviny
- nehromadí se selektivně v nádorové tkáni
- do CNS proniká jen omezeně

Problémy tolerance:

- sloučeniny těžkých kovů – známá toxicita (nefrotoxicita, nevolnost, zvracení, ototoxicita)

Rezistence:

- prevence vazby na DNA (snížení transportu, zvýšení intracelulární detoxikace, mechanismy zabraňující úmrtí buňky po vazbě na DNA, zvýšená reparace, schopnost tolerovat poškození DNA)

Přínos cisplatiny k léčbě nádorů

Nádory:

1. necitlivé (cervix, měchýř, prostata)
2. rezistentní, odpovídající (ORL)
3. odpovídající, senzitivní (ovarium)
4. senzitivní, kurabilní (testis)

Platinová cytostatika druhé generace (1983):

- karboplatina
- iproplatina
- DACH analogy (diaminocyklohexan)
- oxoplatina

Společný znak: výrazně nižší nefrotoxicita, účinnost i u cisplatin rezistentních nádorů !

Současný stav:

- cisplatina + karboplatina: cytostatika první řady celé skupiny nádorových onemocnění

Cisplatina + radioterapie:

- prokázán radiosezibilizační účinek
Řada klinických studií prokazuje úspěšnost kombinace

Závěr: cisplatina a její analogy mají stále zásadní místo v léčbě četných solidních nádorů

Alkylační látky – supermutageny (využití ve šlechtění)

- **indukovaná chemická mutageneze !!!**
- využívána ve šlechtění nových druhů rostlin např. okrasné rostliny, ječmen, pšenice, rýže, oves, luskoviny, ovocné dřeviny
- působení ve vodném roztoku na semena, promytí, výsev

Použití **epoxidů, etyleniminů, metansulfonátu, alkaloidů, formaldehydu, močoviny**



Příklad

2.6.6 Indukce mutací u *A. thaliana*

Cíl: Seznámení se s metodou indukce mutací a způsoby hodnocení mutačního účinku.

K indukci mutací použijeme známý chemomutagen N-metyl-N-nitrózomocovinu (MNU), kterým budeme působit na semena *A. thaliana*. Tento mutagen se používá jako pozitivní kontrola při hodnocení mutagenity jiných látek.

Připravíme si roztoky MNU v pěti různých koncentracích (2ml každé koncentrace) podle rozpisu:

MNU mmol.l^{-1}	Základní roztok $0,2 \text{ mmol.l}^{-1} \mu\text{l}$	Pufr (pH 5) μl
0,25	2 000	0
0,20	1 600	400
0,15	1 200	800
0,10	800	1 200
0,05	400	1 600
0	0	2 000

Příprava základního roztoku $0,25 \text{ mmol.l}^{-1}$ MNU (m.h.=103):

1 mmol.l^{-1} MNU = 10,3 mg/100 ml pufru

$2,5 \text{ mmol.l}^{-1}$ MNU = 5,15 mg/ 20 ml pufru

1 ml $2,5 \text{ mmol.l}^{-1}$ MNU + 9 ml pufru = 10 ml $0,25 \text{ mmol.l}^{-1}$ MNU

Pufr: $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ citrát-fosfátový pufr: 5,1 g kys. citronové +
18,4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ rozpustíme v 1.000 ml vody.

Pro každou koncentraci použijeme asi 500 semen (12 mg) a namočíme je v 4 až 5 ml zkumavkách do 2 ml (2 000 μl) roztoku na dobu 24 hod. ve tmě při 25°C . Potom roztok se semeny přelejeme přes nálevku s filtračním papírem. Semena na filtračním papíru v nálevce pak 30 min. promýváme vodovodní vodou.

Semena vyséváme do truhlíků se zemínou tak, jak bylo uvedeno výše. Od každé koncentrace vysejeme semena do 120 až 150 jamek.

Před začátkem dozrávání šesulí hodnotíme četnost embryonálních letálních a chlorofylových mutací embryonálním testem. Zároveň hodnotíme stupeň sterility, tj. relativní počet semen v těch třech po sobě následujících šesulích, ve kterých sledujeme případná mutantní embrya. V každé variantě působení hodnotíme celkem 100 rostlin, tj. 300 šesulí.

Při hodnocení zapisujeme u každé šesule, zda se v ní vyskytla některá embryonální nebo chlorofylová mutace. Četnost mutací se vyjádří jako procento šesulí, ve kterých se vyskytly mutace (do hodnocení se nezapočítávají šesule, které mají 3 nebo méně semen).

K vyjádření stupně sterility zařazujeme hodnocené šesule do čtyř tříd podle počtu semen včetně mutantních:

třída 1 0 až 3 semena

třída 2 4 až 16 semen

třída 3 17 až 29 semen

třída 4 30 a více semen.

Spočítáme počet šesulí v každé třídě a vyjádříme je jako procento z celkového počtu šesulí. Toto procento vynásobíme koeficientem. Pro třídu 1 je tento koeficient 1, pro třídu 2 = 0,75, pro třídu 3 = 0,25 a pro třídu 4 = 0. Součet hodnot (% krát koeficient) vyjadřuje stupeň sterility.