

Metabolizm pochodnych 8-oksyguaniny

Karol Białkowski

Praca doktorska z zakresu biochemii
wykonana w Katedrze i Zakładzie Biochemii Klinicznej
Akademii Medycznej im. L. Rydygiera w Bydgoszczy

promotor:

Prof. dr hab. Ryszard Oliński

recenzenci:

Prof. dr hab. Grzegorz Bartosz

Prof. dr hab. Jan Barciszewski

Bydgoszcz 1997

*Coraz to z ciebie, jako z drzazgi smolnej,
Wokoło lecą szmaty zapalone;
Gorejąc, nie wiesz, czy stawasz się wolny,
Czy to, co twoje, ma być zatracone.
Czy popiół tylko zostanie i zamęt,
Co idzie w przepaść z burzą? Czy zostanie
Na dnie popiołu gwiaździsty dyjament,
Wiekuistego zwycięstwa zaranie?...*

Cyprian Kamil Norwid

Dziękuję Panu Profesorowi Ryszardowi Olińskiemu za stworzenie mi „cieplarnianych” warunków do pracy, owocne dyskusje na tematy merytoryczne oraz rozmowy o wartościach.

Dr Tomaszowi Zastawnemu dziękuję za linie fibroblastów ludzkich, ich naświetlenie promieniowaniem X oraz za gruntowną krytykę rzeczywistości przeprowadzaną wspólnie podczas śniadań.

Wszystkim moim współpracownikom z Zakładu Biochemii Klinicznej Akademii Medycznej w Bydgoszczy dziękuję za nieoceniony skarb, jakim jest bardzo miła, rodzinna atmosfera panująca w miejscu pracy.

Wszystkim pracownikom Zakładu Chemii Bioorganicznej Uniwersytetu Josepha Fouriera w Grenoble dziękuję za ciepłe przyjęcie i umożliwienie mi wykonania syntezy 8-oksy-2'-deoksyguanozyny w ich Zakładzie. Szczególnie dziękuję dr Mitsu Kotera za nadanie mi pierwszych szlifów w zakresie syntezy organicznej.

Mojej wspaniałej żonie - Anecie, chciałbym gorąco podziękować za wsparcie moralne w chwilach zwątpienia i dzielne znoszenie losu żony asystenta opłacanego z budżetu III-ej Rzeczypospolitej.

Szczególne podziękowania chciałbym złożyć na ręce mojego nauczyciela z okresu studiów uniwersyteckich - dr Antoniego Leźnickiego. Bez jego pracy włożonej w moją edukację, zaszczerpionego we mnie entuzjazmu dla zagadnień enzymologicznych oraz wszechstronnej pomocy udzielanej do dnia dzisiejszego, praca ta nie mogłaby osiągnąć obecnego kształtu.

Moim rodzicom, bratu i całej mojej rodzinie dziękuję za to, że istnieją i że dzięki temu istnieję także ja, nie tylko w sensie czysto biologicznym.

Wszystkim moim przyjaciołom dziękuję za misterne odbudowywanie mojej wiary w człowieka.

Cyprianowi Kamilowi Norwidowi za to, że umiał wyrazić piękno i sens ludzkiego borykania się z własnym losem nie używając nadmiaru niepotrzebnych słów. Keith'owi Jarrett'owi i Janowi Garbarkowi za to, że potrafią tworzyć piękno nie używając słów w ogóle.

Wyniki badań eksperymentalnych prezentowane w tej pracy zostały częściowo opublikowane:

Białkowski K, Kowara R, Windorbska W, Oliński R (1996) 8-Oxo-2'-deoxyguanosine level in lymphocytes DNA of cancer patients undergoing radiotherapy. *Cancer Letters* 99, 93-97.

Białkowski K, Cysewski P, Oliński R (1996) Effect of 2'-deoxyguanosine oxidation at C8 position on N-glycosidic bond stability. *Zeitschrift für Naturforschung* 51c, 119-122.

WYKAZ WAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW UŻYWANYCH W PRACY.

dA, dC, dG, dT	deoksyadenozyna, deoksycytydyna, deoksyguanozyna, tymidyna
8-Br-dG	8-bromo-2'-deoksyguanozyna
8-Bn-O-dG	8-benzylloksy-2'-deoksyguanozyna
DEAE-celuloza	dietyloaminoetylo-celuloza
dG	2'-deoksyguanozyna
dGMP	2'-deoksyguanozyno-5'-monofosforan
dGDP	2'-deoksyguanozyno-5'-difosforan
dGTP	2'-deoksyguanozyno-5'-trifosforan
DMSO	dimetylosulfotlenek
EC	detekcja elektrochemiczna w HPLC
EDTA	kwasy etylenodiaminotetraoctowy
8-oxodG	8-oksy-2'-deoksyguanozyna
8-oxodGMP	8-oksy-2'-deoksyguanozyno-5'-monofosforan
8-oxodGDP	8-oksy-2'-deoksyguanozyno-5'-difosforan
8-oxodGTP	8-oksy-2'-deoksyguanozyno-5'-trifosforan
8-oxoGua	8-oksyguanina
Fapy-guanina	2,6-diamino-4-oksy-5-formamidopirymidyna
Gua	guanina
HPLC	wysokosprawna, kolumnowa chromatografia cieczowa
MeOH	metanol
NADH	zredukowana forma dinukleotydu nikotynamidoadenionowego
NBS	N-bromobursztynimid
NMR	spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego
PNP-aza	fosforylaza nukleozydów purynowych
RFT	reaktywne formy tlenu
SDS	sól sodowa siarczanu dodecyłu
Tris	tris(hydroksymetylo)aminometan
UV	promieniowanie ultrafioletowe

SPIS TREŚCI

1.	WSTĘP	9
1.1	Wolne rodniki tlenowe.....	10
1.2	Powstawanie endogennych reaktywnych form tlenu w warunkach fizjologicznych.....	10
1.3	Generowanie reaktywnych form tlenu pod wpływem czynników egzogennych.....	15
1.4	Strategia obrony przed działaniem i skutkami działania reaktywnych form tlenu.....	17
1.5	Uszkodzenia DNA spowodowane atakiem wolnych rodników tlenowych.....	18
1.6	8-oksyguanina jako produkt modyfikacji guaniny przez RFT.....	21
1.7	Metody oznaczania śladowych ilości 8-oksyguaniny w DNA.....	23
1.8	Generowanie 8-oksyo-2'-deoksygwanozyny w układach <i>in vitro</i>	24
1.9	Mutagenne właściwości 8-oksyguaniny.....	26
1.10	Związek 8-oxodG z procesem karcynogenezy.....	28
1.11	Naprawa DNA zawierającego 8-oksyguaninę.....	34
1.12	8-Oksyo-2'-deoksygwanozyno-5'-trifosforan - mutageny substrat dla syntezy DNA.....	35
1.13	System obrony organizmów przed mutagennym wpływem oksydacji dGTP w pozycji C8 - pirofosfohydrolaza 8-oxodGTP.....	37
1.14	Rodzina genów mutT.....	42
1.15	Metaboliczne losy 8-oksypo pochodnych nukleotydów deoksygwanozynowych.....	43
1.16	8-Oksyo-2'-deoksygwanozyna i 8-oksyguanina jako wydalone z moczem markery uszkodzeń oksydacyjnych DNA <i>in vivo</i>	45
2	CELE PRACY	46
3	MATERIAŁY I METODY	47
3.1	Odczynniki.....	47
3.2	Syntezy pochodnych 8-oksyguaniny	47
3.2.1	Synteza 8-oksyo-2'-deoksygwanozyny.....	47
3.2.1.1	Synteza 8-bromo-2'-deoksygwanozyny (8-Br-dG).....	48
3.2.1.2	Synteza 8-benzylksyo-2'-deoksygwanozyny (8-Bn-O-dG).....	49
3.2.1.3	Synteza 8-oksyo-2'-deoksygwanozyny (8-oxodG).....	50
3.2.2	Jakościowa analiza chromatograficzna preparatów 8-Br-dG, 8-Bn-O-dG i 8-oxodG na kolumnie Supelcosil LC-18-S.....	50
3.2.3	Pomiary spektroskopowe jądrowego rezonansu magnetycznego (¹ H NMR) preparatów 8-Br-dG, 8-Bn-O-dG i 8-oxodG.....	51
3.2.4	Synteza 8-oksyo-2'-deoksygwanozyno-5'-monofosforanu (8-oxodGMP).....	51
3.2.5	Chromatografia jonowymienna preparatów fosforanowych pochodnych 8-oksyo-2'-deoksygwanozyny na DEAE-celulozie.....	52
3.2.6	Synteza 8-oksyo-2'-deoksygwanozyno-5'-trifosforanu (8-oxodGTP).....	52
3.2.7	Chromatograficzna analiza czystości preparatów 8-oxodGMP i 8-oxodGTP.....	53
3.3	Oznaczenia poziomu 8-oksyo-2'-deoksygwanozyny w limfocytarnym DNA pacjentów poddawanych radioterapii	53

3.3.1	Materiał do badań.....	53
3.3.2	Izolacja limfocytów krwi obwodowej.....	53
3.3.3	Izolacja limfocytarnego DNA.....	54
3.3.4	Enzymatyczna hydroliza DNA do nukleozydów.....	54
3.3.5	Oznaczenia 8-oksy-2'-deoksyguanozyny i 2'-deoksyguanozyny w hydrolizatach DNA.....	55
3.4	Badania stabilności wiązań N-glikozydowych nukleozydów.....	55
3.4.1	Hydroliza wiązań N-glikozydowych nukleozydów.....	55
3.4.2	Analiza chromatograficzna hydrolizatów dG i 8-oxodG.....	56
3.5	8-Oksy-2'-deoksyguanozyna i 8-oksyguanina a klasyczny szlak katabolizmu nukleozydów purynowych.....	56
3.5.1	Oznaczenia aktywności fosforylasy nukleozydów purynowych wobec 2'-deoksyguanozyny i 8-oksy-2'-deoksyguanozyny.....	56
3.5.2	Oznaczenia aktywności guanazy (aminohydrolazy guaninowej) wobec guaniny i 8-oksyguaniny.....	57
3.5.3	Oznaczenia aktywności oksydazy ksantynowej wobec ksantyny i guaniny.....	58
3.6	Badania kinetyczne nad ludzką pirofosfatą 8-oxodGTP oraz nad wpływem promieniowania jonizującego na jej aktywność w fibroblastach ludzkich.....	59
3.6.1	Hodowla ludzkich fibroblastów.....	59
3.6.2	Ekspozycja ludzkich fibroblastów na promieniowanie rentgenowskie.....	59
3.6.3	Przygotowanie ekstraktów białek rozpuszczalnych z fibroblastów ludzkich.....	59
3.6.4	Oznaczenia białka w ekstraktach białkowych z fibroblastów ludzkich.....	60
3.6.5	Optymalizacja warunków oznaczania aktywności pirofosfatazy 8-oxodGTP.....	60
3.6.6	Oznaczenia aktywności pirofosfatazy 8-oxodGTP (białka hMTH1).....	61
3.6.7	Wyznaczanie stałej Michaelisa dla reakcji hydrolizy 8-oxodGTP oraz dGTP przez ludzką pirofosfatę 8-oxodGTP.....	62
3.7	Spektroskopia absorpcyjna w zakresie promieniowania ultrafioletowego i widzialnego.....	63
4	WYNIKI.....	64
4.1	Synteza 8-oksy-2'-deoksyguanozyny oraz jej pochodnych fosforanowych.....	64
4.2	Poziom 8-oxodG w limfocytarnym DNA chorych na raka, poddanych radioterapii.....	78
4.3	Wpływ oksydacji 2'-deoksyguanozyny w pozycji C8 na stabilność wiązania N-likozydowego.....	81
4.3.1	Kinetyka hydrolizy dG i 8-oxodG w temperaturze 100°C i pH 7.4.....	81
4.3.2	Kinetyka hydrolizy dG i 8-oxodG w temperaturze 100°C i pH 5.1.....	82
4.3.3	Stabilność dG i 8-oxodG w pH 2.0.....	82
4.4	8-Oksy-2'-deoksyguanozyna i 8-oksyguanina a klasyczny szlak katabolizmu nukleozydów purynowych.....	85
4.4.1	8-Oksy-2'-deoksyguanozyna jako potencjalny substrat dla fosforylasy nukleozydów purynowych.....	85
4.4.2	8-Oksyguanina jako potencjalny substrat dla guanazy.....	89
4.4.3	8-Oksyguanina jako potencjalny produkt reakcji oksydacji guaniny w pozycji C8 katalizowanej przez oksydazę ksantynową.....	93

4.5	Badania nad ludzką pirofosfatazą 8-oxodGTP, antymutagennym enzymem usuwającym niebezpieczny substrat dla syntezy DNA.....	97
4.5.1	Opracowanie metody oznaczania aktywności pirofosfatazy 8-oxodGTP oraz badania kinetyczne.....	97
4.5.2	Wpływ promieniowania jonizującego na aktywność pirofosfatazy 8-oxodGTP w fibroblastach ludzkich.....	106
5	DYSKUSJA.....	109
6	WNIOSKI.....	124
7	STRESZCZENIE.....	125
8	PIŚMIENNICTWO.....	127

1 WSTĘP

Większość organizmów żyjących na Ziemi jest całkowicie zależna od obecności tlenu w atmosferze. Produkty uboczne metabolizmu tlenowego okazały się jednak toksyczne dla żywych organizmów. Są to przede wszystkim wolne rodniki tlenowe: anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\bullet-}$), rodnik hydroksylowy ($\bullet OH$), tlen singletowy (1O_2), a także nadtlenek wodoru (H_2O_2) i kwas podchlorawy ($HClO$), które mogą być przekształcone w formy wolnorodnikowe. Reaktywne formy tlenu (**RFT**) powstają zarówno w trakcie fizjologicznych procesów zachodzących w komórce (endogenne RFT), jak i pod wpływem działania na organizm zewnętrznych czynników środowiskowych wywołujących ich formowanie (promieniowanie jonizujące, UV, formy wolnorodnikowe związków stanowiących zanieczyszczenia środowiskowe oraz związki powodujące tworzenie wolnych rodników po aktywacji metabolicznej w organizmie) (Bartosz, 1995).

Organizmy żyjące na naszej planecie zabezpieczyły się przed szkodliwym działaniem wolnych rodników tlenowych przez wytworzenie systemów enzymatycznych, które wraz z drobnocząsteczkowymi antyoksydantami i białkami chelatującymi (sekwestr metali) chronią je przed uszkodzeniami oksydacyjnymi (Bartosz, 1995; Liczmański 1988; Sies, 1993).

Równowaga między tworzeniem reaktywnych form tlenu i obroną antyoksydacyjną łatwo ulega przesunięciu na stronę wzmożonego generowania RFT (Halliwell i Aruoma, 1993). Stwarza to sytuację stresu oksydacyjnego, który prowadzi do peroksydacji lipidów błonowych, oksydacji białek, spadku zawartości nukleotydów nikotynamidoadeninowych w komórce, zwiększenia wewnątrzkomórkowej puli jonów Ca^{2+} oraz bardzo niebezpiecznych dla życia komórki - uszkodzeń oksydacyjnych kwasów nukleinowych, które są obiektem prezentowanej pracy.

Wiele obserwacji wskazuje, że wolne rodniki tlenowe odgrywają istotną rolę w etiologii wielu chorób (Oliński i Jurgowiak, 1996).- w tym nowotworowych (Oliński, 1993, Ames i wsp., 1993; Loft i Poulsen, 1996), jak również w powstawaniu zmian towarzyszących starzeniu się organizmów (Sohal, 1993; Jurgowiak i Oliński 1995) i związanych z wiekiem chorób degeneracyjnych (Knight, 1995).

1.1 Wolne rodniki tlenowe

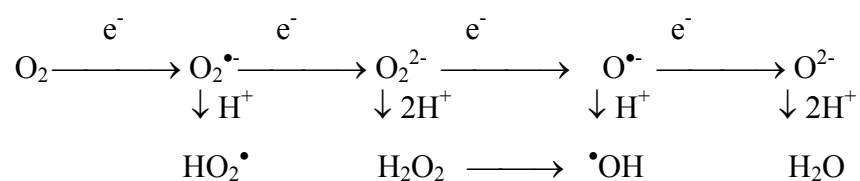
Wolne rodniki tlenowe są to atomy lub cząsteczki zawierające atom tlenu i posiadające na powłoce walencyjnej co najmniej jeden niesparowany elektron. Cecha ta decyduje o ich dużej reaktywności chemicznej oraz nietrwałości. Powstają one w procesach homolitycznego rozrywania wiązań w cząsteczkach związków chemicznych (reakcja 1) lub w wyniku przenoszenia elektronów (reakcja 2).



Procesy te mogą być skutkiem absorpcji promieniowania (jonizującego, UV, widzialnego) bądź reakcji red-oks (Liczmański, 1988).

1.2 Powstawanie endogennych reaktywnych form tlenu w warunkach fizjologicznych

W komórce zachodzi wiele reakcji prowadzących do tworzenia RFT. Chemicznym podłożem tych procesów jest zwykle częściowa redukcja cząsteczki tlenu. W wyniku stopniowej, jednoelektronowej redukcji cząsteczki tlenu powstaje kilka reaktywnych form tlenu:



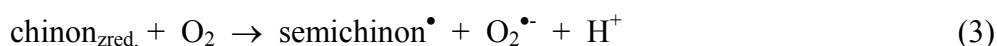
Pierwszym produktem redukcji cząsteczki tlenu jest anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\bullet-}$), który może ulec protonacji i w warunkach fizjologicznego pH tworzyć dość reaktywny rodnik hydroksyponadtlenkowy (HO_2^{\bullet}). Przyłączenie kolejnego elektronu prowadzi do powstania jonu nadtlenkowego (O_2^{2-}), który nie jest wolnym rodnikiem, gdyż nie posiada niesparowanego elektronu. Jego protonowana forma to nadtlenek wodoru (H_2O_2). Redukcja jonu nadtlenkowego prowadzi do powstania rodnika $O^{\bullet-}$, który występuje w postaci rodnika

hydroksylowego ($\bullet\text{OH}$) po przyłączeniu protonu (Halliwell, 1987; Farber, 1994; Davies, 1994).

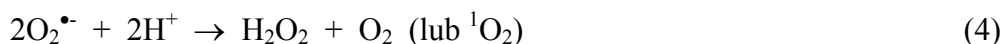
W łańcuchu oddechowym, związanym z błoną wewnętrzną mitochondriów, cząsteczka tlenu ulega czteroelektronowej redukcji z wytworzeniem dwóch cząsteczek wody. W warunkach fizjologicznych w trakcie funkcjonowania łańcucha oddechowego elektrony przenoszone są na kolejne akceptory łańcucha, którego ostatnim ogniwem jest oksydaza cytochromowa ($a+a_3$), katalizująca redukcję tlenu z wytworzeniem cząsteczki wody. Jednak na skutek „nieszczelności” tego łańcucha, w sprawnych czynnościowo mitochondriach ok. 1-2% tlenu cząsteczkowego ulega redukcji niekompletnej z wytworzeniem wolnych rodników tlenowych (Bartosz, 1995). Z elementów łańcucha oddechowego, takich jak dehydrogenaza NADH i ubichinon, może dochodzić do „przecieku” elektronów na cząsteczki tlenu, w wyniku czego powstają anionorodniki nadadtlenkowe oraz wolne rodniki semichinonowe. Uważa się, że w warunkach fizjologicznych mitochondrialny łańcuch oddechowy jest najwydajniejszym źródłem RFT w komórce.

Redukcja cząsteczki tlenu poza mitochondriami również może prowadzić do powstania RFT, zaburzających prawidłową czynność komórki. Anionorodnik nadadtlenkowy powstaje również w takich organellach komórkowych jak retikulum endoplazmatyczne roślin i zwierząt, peroksysomach, chloroplastach oraz w błonach cytoplazmatycznych. Źródłem $\text{O}_2^{\bullet-}$ jest samoutlenianie się zredukowanych związków występujących w komórkach (adrenalina, ferredoksyna, flawiny) (Liczmański, 1988), a także reakcje katalizowane przy udziale takich enzymów jak dioksygenaza tryptofanowa, oksydaza ksantynowa, dehydrogenazy flawinowe, oksydaza aldehydowa (Poli, 1993).

$\text{O}_2^{\bullet-}$ oraz wolne rodniki semichinonowe powstają także we frakcji mikrosomalnej komórek, podczas cyklu red-oks związków endogennych (np. estrogenów). W czasie takiego cyklu związek zostaje przekształcony w chinon przez cytochrom P-450, a następnie przez reduktazę cytochromu P-450 w hydrochinon. Anionorodnik nadadtlenkowy i semichinon mogą być produktami pośrednim tej redukcji (reakcja 3) (Sato i wsp., 1992; Koymans i wsp., 1993).



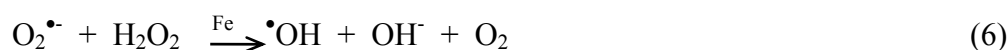
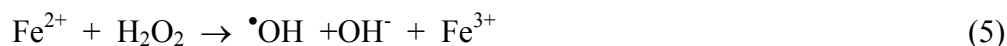
Anionorodniki nadadtlenkowe mogą podlegać dysmutacji spontanicznej lub katalizowanej przez enzym - dysmutazę nadadtlenkową (SOD). W wyniku tej reakcji powstaje nadtlenek wodoru (reakcja 4) (Kwiatowski, 1988).



W badaniach *in vivo* stwierdzono powstawanie H_2O_2 w mitochondriach, retikulum endoplazmatycznym, chloroplastach roślin wyższych oraz peroksysomach. W dużych stężeniach nadtlenek wodoru występuje także w aktywowanych komórkach fagocytarnych, plemnikach, wielu szczepach bakteryjnych, a nawet w wydychanym przez człowieka powietrzu (Halliwell i Gutteridge, 1989). Niewielkie ilości H_2O_2 są tworzone podczas biosyntezy hormonów tarczycy. Nadtlenek wodoru jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania peroksydazy tyrozynowej, katalizującej jodowanie tyreoglobulin. Powstaje także w trakcie działania innych enzymów, takich jak: oksydaza monoaminowa, oksydaza galaktozowa, cyklooksigenaza, lipooksigenaza, oksydaza ksantynowa (Frenkel, 1992).

Nadtlenek wodoru jest prekursorem rodnika hydroksylowego, podchlorynu i tlenu singletowego.

Rodniki hydroksylowe mogą powstawać w tzw. reakcji Fentona. W reakcji tej jony metali grup przejściowych znajdujące się na niższym stopniu utlenienia (np. jony żelaza II) reagują z nadtlenkiem wodoru, w wyniku czego powstaje rodnik hydroksylowy, anion wodorotlenowy i utleniony jon metalu (reakcja 5) (Sies, 1993). Anionorodnik ponadtlenkowy może redukować jony metali grup przejściowych dostarczając substratu do reakcji Fentona. Sumaryczny bilans tych dwu procesów, znany pod nazwą reakcji Habera-Weissa opisuje wzór 6, gdzie jony metali traktowane są jako katalizatory, z uwagi na cykliczne zmiany stopnia utlenienia.

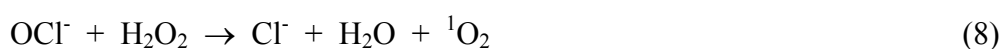


Rodnik $\bullet\text{OH}$, najbardziej reaktywna z form tlenu, jest odpowiedzialny za uszkodzenia DNA, białek oraz inicjację peroksydacji lipidów.

W wyniku reakcji nadtlenu wodoru z jonami Cl^- powstaje podchloryn. Reakcję tę katalizuje mieloperoksydaza (MPO), uwalniana w dużych ilościach przez granulocyty obojętnochłonne podczas eksplozji oddechowej (reakcja 7) (Babior, 1991).



Obecność nadmiaru H_2O_2 powoduje odwrócenie reakcji i nadtlenek wodoru redukuje wtedy OCl^- do Cl^- , z wytworzeniem tlenu singletowego (reakcja 8).

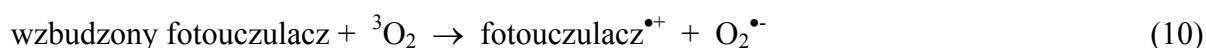


Tlen singletowy (${}^1\text{O}_2$) jest reaktywną formą tlenu, która powstaje w wyniku wzbudzenia elektronowego cząsteczki tlenu w stanie podstawowym (tripletowym- ${}^3\text{O}_2$) (Halliwell i Aruoma, 1993). Zjawisko to jest możliwe dzięki obecności w organizmach zwierzęcych i roślinnych fotouczulaczy (np. porfiryn, flawin, retinalu, chlorofili), które mogą absorbować promieniowanie widzialne lub UV, w wyniku czego ulegają wzbudzeniu.

Mogą one następnie przekazać energię cząsteczce tlenu, co prowadzi do powstania tlenu singletowego w reakcji fotouczulania typu II (reakcja 9).



Wzbudzony fotouczulacz może przekazać cząsteczce tlenu nie energię, lecz jeden ze swoich elektronów (transfer elektronu), dzięki czemu powstaje anionorodnik ponadtlenkowy i kationorodnik fotouczulacza w reakcji fotouczulania typu I (reakcja 10).



Tworzenie tlenu singletowego *in vivo* udokumentowano w naświetlanych chloroplastach, siatkówce i soczewce oka ssaków (Liczmański, 1988). Może też powstawać w wyniku reakcji anionorodnika ponadtlenkowego z wodoronadtlenkami lipidowymi tworzonymi w procesie peroksydacji lipidów (reakcja 11).



Proces peroksydacji lipidów polega na serii łańcuchowych reakcji wolnorodnikowych, prowadzących do rozpadu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, składników błon

komórkowych (Bartosz, 1995) i może być zapoczątkowany przez rodnik hydroksylowy, tlen singletowy, rodnik hydroksyponadtlenkowy lub rodnik ferrytowy. W procesie tym można wyróżnić trzy etapy: inicjację, propagację i terminację.

Etap inicjacji polega na ataku wolnego rodnika na cząsteczkę nienasyconego kwasu tłuszczowego (LH), w wyniku czego od cząsteczki tego kwasu zostaje oderwany atom wodoru, pozostawiając w obrębie atomu węgla niesparowany elektron i powstaje pierwotny rodnik lipidowy (L^\bullet). L^\bullet w etapie propagacji przyłącza cząsteczkę tlenu tworząc rodnik nadtlenkowy (LOO^\bullet), który odszczepiając atom wodoru z kolejnej cząsteczki LH przyczynia się do powstania nowego rodnika L^\bullet i wodoronadtlenku lipidowego (LOOH). LOOH pod wpływem Fe^{2+} może ulec przekształceniu do rodnika alkoksykowego (LO^\bullet), ten zaś do rodników alkilowych, dających w etapie terminacji dużą liczbę nierodnikowych produktów, takich jak: alkany, alkeny, aldehydy, ketony, hydroksykwasy (Vaca i wsp., 1988).

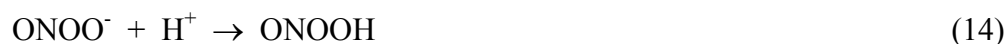
Udowodniono, że reaktywne formy tlenu mogą także powstawać w trakcie syntezy tlenku azotu (Pou i wsp., 1992) oraz w wyniku przemian kwasu arachidonowego (Porter, 1980).

Tlenek azotu (NO) pełni u człowieka funkcje śródbłonkowego czynnika rozluźniającego mięśnie gładkie naczyń krwionośnych (EDRF), neuroprzekaźnika, ale jest również związkiem bakteriobójczym wytwarzanym przez aktywowane makrofagi. NO powstaje z argininy w reakcji katalizowanej przez syntazę tlenku azotu (NOS) (reakcja 12).



NOS może też redukować tlen cząsteczkowy do rodnika hydroksyponadtlenkowego lub anionorodnika ponadtlenkowego, który na drodze dysmutacji zostaje przekształcony w nadtlenek wodoru (Pou i wsp., 1992).

Tlenek azotu, który sam jest wolnym rodnikiem, może też reagować z anionorodnikiem ponadtlenkowym, tworząc nadtlenoazotyn (reakcja 13), który po uprotonowaniu (reakcja 14) może się rozpaść dając rodnik hydroksylowy (reakcja 15) (Freeman, 1994).



1.3 Generowanie reaktywnych form tlenu pod wpływem czynników egzogennych

Ważnymi źródłami znacznej ilości wolnych rodników czyniących szkody żywym organizmom są szeroko rozumiane zanieczyszczenia środowiskowe. Szereg związków chemicznych stanowiących zanieczyszczenia środowiskowe może dostawać się do organizmu w postaci form wolnorodnikowych. Spalaniu większości związków pochodzenia organicznego towarzyszy tworzenie się wielu stabilnych rodników związków organicznych i nieorganicznych (np. tlenków azotu). Mogą być one wprowadzane do organizmu w trakcie palenia tytoniu, czy po prostu poprzez oddychanie atmosferą zanieczyszczoną spalinami paliw organicznych. Największe jednak zagrożenie stwarzają nie wolnorodnikowe formy, ale czynniki fizyczne i chemiczne prowadzące do powstawania wolnych rodników w organizmach. Do tych pierwszych zaliczyć należy przede wszystkim promieniowanie jonizujące oraz promieniowanie ultrafioletowe.

Promieniowanie jonizujące oddziałując z żywą materią wywołuje reakcje radiolizy cząsteczek na nią się składających, głównie cząsteczek wody (Von Sonntag, 1987), z których materia żywna zbudowana jest przecież w ok. 70-80%.

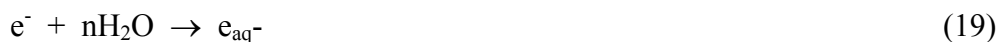
W trakcie radiolizy wody dochodzi do powstania rodnika hydroksylowego ($\bullet\text{OH}$), atomu wodoru ($\bullet\text{H}$), i elektronu uwodnionego (e_{aq}^-), które odznaczają się ogromną reaktywnością. Proces ten może być zainicjowany przez jonizację cząsteczki wody (reakcja 16) lub wzbudzenie elektronu (reakcja 17).



Powstający w wyniku reakcji 16 kationowy rodnik wody jest silnym kwasem i łatwo oddaje proton otaczającym go cząsteczkom wody, ulegając przy tym przekształceniu w rodnik hydroksylowy (reakcja 18).



W reakcję z cząsteczkami wody wchodzi także uwolniony elektron i powstaje aktywna cząsteczka e_{aq}^- (elektron uwodniony) (reakcja 19).



Wzbudzona cząsteczka wody (H_2O^*) może z kolei ulec rozbiciu na atom wodoru i rodnik hydroksylowy (reakcja 20).



Wśród czynników chemicznych przyczyniających się do tworzenia wolnych rodników w komórkach wyróżnić można kilka podstawowych klas związków. Największą grupą czynników tego rodzaju są związki organiczne, najczęściej pierścieniowe, które po aktywacji metabolicznej w komórkach podlegają reakcjom redoks z wytworzeniem wolnych rodników tlenowych. Klasycznym przykładem związku należącego do tej grupy jest parakwat (PQ), który działa fitotoksycznie, co spowodowane jest możliwością utleniania go przez elementy fotosystemu I roślin. Powstające kationorodniki $PQ^{\bullet+}$ gwałtownie reagując z O_2 ulegają utlenianiu do dwuwartościowego kationu, a cząsteczka tlenu redukcji do $O_2^{\bullet-}$ (reakcja 21).



Powstały anionorodnik ponadtlenkowy podlegać może dysmutacji do H_2O_2 , a ten w reakcji Fentona może być przekształcany do rodnika hydroksylowego.

Do generowania reaktywnych form tlenu według tego modelu prowadzić mogą także związki nieorganiczne, jak np. dwutlenek siarki. Wprawdzie SO_2 jest przekształcany do siarczanów przez enzymy utleniające, jednak powstające przejściowo jony wodorosiarczynowe (HSO_3^-) mogą indukować reakcje wolnorodnikowe, prowadzące między innymi do peroksydacji lipidów (Oliński, 1993).

Bardzo poważna część zanieczyszczeń środowiskowych to jony metali. Szczególnie niebezpieczne są jony metali, które katalizują reakcję Habera-Weissa. W reakcji z endogennie powstającym nadtlakiem wodoru przyczyniają się do formowania rodników hydroksylowych. Do jonów o takich należą np. jony niklu, chromu, żelaza, miedzi, kobaltu, kadmu (Kasprzak, 1995). Analogiczne działanie wykazują pewne minerały (np. azbest), które w postaci pyłów mogą dostawać się do dróg oddechowych.

1.4 Strategia obrony przed działaniem i skutkami działania reaktywnych form tlenu

Organizmy wyposażone są w złożony układ antyoksydacyjny, który zabezpiecza je przed powstawaniem i skutkami działania reaktywnych form tlenu.

Najogólniej, obrona przed destrukcyjnym wpływem RFT realizowana jest na trzech poziomach:

Pierwszą linię obrony stanowi układ zapobiegający powstawaniu nadmiernych ilości RFT. Elementami tego układu są białka wiążące jony metali grup przejściowych (sekwestr metali), które tym sposobem odsunięte są od możliwości katalizowania reakcji Fentona, w której powstaje najgroźniejsze indywiduum pośród RFT - rodnik hydroksylowy. Do białek takich zaliczyć należy (Sato i Bremner, 1993): ferrytynę, transferynę i laktoferynę, wiążące jony żelaza; ceruloplazminę - wiążącą jony miedzi; grupę metalotionein, wiążących szereg różnych jonów metali oraz w pewnym sensie także albuminy, które choć niespecyficznie, to jednak zdolne są do wiązania jonów wielu metali.

Jeżeli już dojdzie do pojawienia się reaktywnych form tlenu w ustroju, do akcji wchodzi druga linia obrony, której elementy mają za zadanie „neutralizację” RFT. W skład tego układu wchodzi enzymy antyoksydacyjne oraz drobnocząsteczkowe antyoksydanty. Do głównych enzymów o takim działaniu należą (Sies, 1993):

- dysmutazy ponadtlenkowe, katalizujące reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego do nadtlenu wodoru
- katalazy, rozkładające głównie nadtlenek wodoru do wody i tlenu cząsteczkowego
- peroksydazy glutationowe i askorbinianowe, rozkładające nadtlenek wodoru i wodoronadtlenki związków lipidowych z użyciem zredukowanych form glutationu i askorbinianu
- (S)-transferazy glutationowe, sprzęgające cząsteczkę glutationu ze związkami endogennymi (np. wodoronadtlenki lipidowe) jak i egzogennymi ksenobiotykami, uniemożliwiając w ten sposób ich dalszą aktywację metaboliczną prowadzącą do tworzenia RFT.

W „zmiataniu” RFT dopomagają enzymom antyoksydacyjnym tzw. drobnocząsteczkowe antyoksydanty, które przyjmują na siebie atak wolnych rodników. Za fizjologicznie najistotniejsze cząsteczki o takim działaniu uważa się: glutation, kwas askorbinowy, cysteinę, tokoferole (witamina E), retinoidy (analogi witaminy A), kwas moczowy, karotenoidy, bilirubinę, ubichinol, a nawet glukozę i pirogronian (Sies, 1991; Briviba i Sies, 1994).

Trzecią linią obrony jest likwidowanie niebezpiecznych skutków reakcji wolnych rodników tlenowych z najważniejszą ze strategicznego punktu widzenia makromolekułą komórkową - DNA. Uszkodzenia oksydacyjne DNA jako nośnika informacji, koordynującego cały metabolizm komórkowy, podlegają intensywnej naprawie przez szereg enzymów naprawczych, o których będzie jeszcze mowa w dalszej części pracy.

1.5 Uszkodzenia DNA spowodowane atakiem wolnych rodników tlenowych

Mimo że zarówno H_2O_2 jak i $\text{O}_2^{\bullet-}$ w warunkach fizjologicznych nie reagują bezpośrednio ze składnikami DNA, zakłada się istnienie dwóch dróg umożliwiających uszkodzenie DNA w wyniku oddziaływania tych cząstek.

Pierwsza z nich przewiduje powstawanie rodnika $\bullet\text{OH}$ w jądrze komórkowym, z łatwo przenikającego przez błony komórkowe H_2O_2 , w wyniku reakcji Fentona z jonami Cu^{1+} lub Fe^{2+} (Halliwell i Gutteridge, 1989). Ze względu na niezwykle wysoką reaktywność rodnika hydroksylowego, ograniczającą możliwość jego dyfuzji, oddziaływanie $\bullet\text{OH}$ z DNA jest możliwe tylko w przypadku, gdy wspomniane jony metali występują w kompleksie z chromatyną (Halliwell i Gutteridge, 1989).

Niektóre obserwacje wskazują na obecność Cu w chromosomach (Apelgot i wsp., 1984). Możliwe, że Cu^{1+} i Fe^{2+} są uwalniane w komórce z innych struktur komórkowych w wyniku stresu tlenowego i dopiero wtedy łączą się z DNA (Halliwell, 1987).

Udowodniono, że także swobodnie dyfundujący tlen singletowy może wchodzić w reakcję z komponentami DNA (Feig i wsp., 1994).

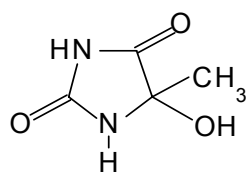
Inne wyjaśnienie powstawania uszkodzeń DNA w wyniku ataku RFT na komórki zakłada serię przemian metabolicznych w komórce, prowadzących do aktywacji nukleaz, odpowiedzialnych za degradację DNA. Uważa się, że wynikiem zaistnienia stanu stresu oksydacyjnego jest wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wolnych jonów Ca^{2+} , co prowadzi do aktywacji endonukleaz Ca^{2+} -zależnych (Halliwell i Aruoma, 1993). Prawdopodobnie w komórce występują oba wspomniane mechanizmy powstawania uszkodzeń DNA (w wyniku ataku rodnika $\bullet\text{OH}$ i $^1\text{O}_2$ oraz aktywacji nukleaz).

Najbardziej reaktywna forma tlenu w układach biologicznych - rodnik hydroksylowy - może reagować zarówno z cząsteczką deoksyrybozy jak i zasadami azotowymi, wchodzącymi w skład DNA (Von Sonntag, 1987).

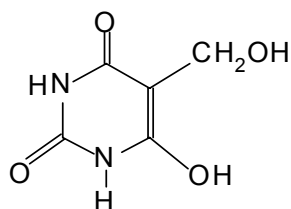
Reakcja $\bullet\text{OH}$ z cząsteczką deoksyrybozy prowadzi do powstania pojedynczych i podwójnych pęknięć DNA oraz miejsc wrażliwych na alkalia (Halliwell i Aruoma, 1993; Von Sonntag, 1987). Pojedyncze i podwójne pęknięcia łańcucha DNA są odpowiedzialne za blok replikacyjny i mogą być przyczyną śmierci komórki, rzadziej zmian mutacyjnych. Te ostatnie natomiast mogą być rezultatem obecności zmodyfikowanych zasad azotowych, powstających w wyniku reakcji DNA z wolnymi rodnikami tlenowymi.

Rodnik $\bullet\text{OH}$ łączy się najczęściej w pozycji C5 lub C6 z pirymidynami oraz w pozycjach C8, C4 i C5 z purynami (Hutchinson, 1985), dając różnorodne produkty modyfikacji. Obecnie poznano około trzydziestu takich oksydacyjnych modyfikacji zasad azotowych (Dizdaroglu i Aruoma, 1993), niektóre z nich przedstawiono na rys. 1. Poza indukowaniem uszkodzeń zasad azotowych i cukrów rodnik hydroksylowy powoduje też powstawanie wiązań poprzecznych DNA-białko w nukleoproteinach (Oliński, 1992; Nackerdien, 1991), których przykładem może być połączenie kowalencyjne tyminy z tyrozyną.

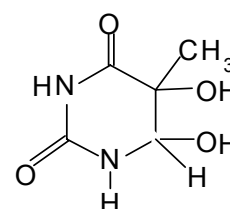
Oksydacyjnym uszkodzeniom ulega zarówno DNA jądrowy jak i DNA mitochondrialny czy chloroplastowy, przy czym ilość oksydacyjnych uszkodzeń wykrywanych w DNA mitochondrialnym i chloroplastowym jest znacznie większa (Richter i wsp., 1988; Floyd i wsp., 1989), najprawdopodobniej z powodu szczególnie dużych ilości RFT produkowanych w tych organellach, braku białek histonowych (pełniących rolę osłonową) oraz być może z powodu mniej wydajnych mechanizmów naprawy uszkodzeń.



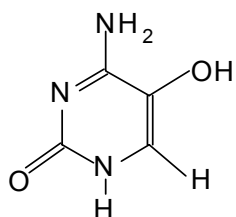
5-hydroksy-5-metylohydantonina



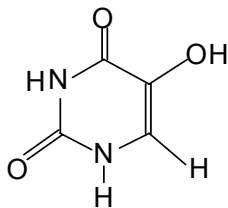
5-(hydroksymetylo)uracyl



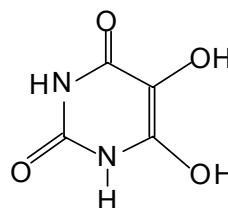
glikol tyminowy



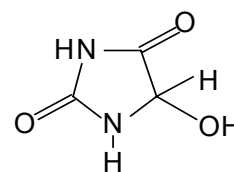
5 - hydroksycytozyna



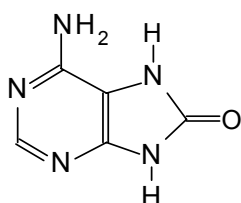
5 - hydroksyuracyl



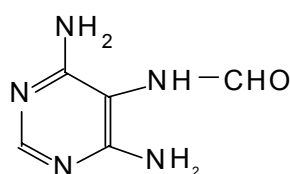
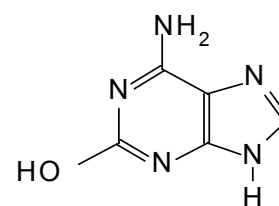
5,6-dihydroksyuracyl



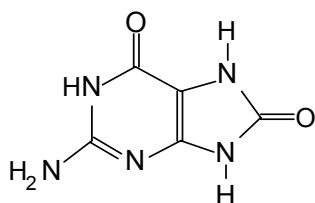
5 - hydroksyhydantoina



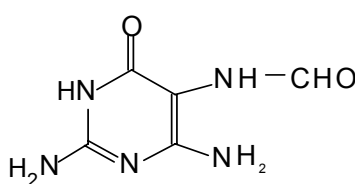
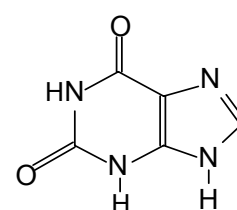
8 - oksyadenina

4,6 - diamino - 5 - formamidopirymidyna
(Fapy adenina)

2 -hydroksyadenina



8-oksygwanina

2,6 - diamino-4-hydroksy-5-formamido-
pirymidyna (Fapy gwanina)

ksantyna

Rys. 1

Niektóre produkty reakcji rodnika hydroksylowego i tlenu singletowego z zasadami azotowymi DNA.

1.6 8-Oksyguanina jako produkt modyfikacji guaniny przez RFT

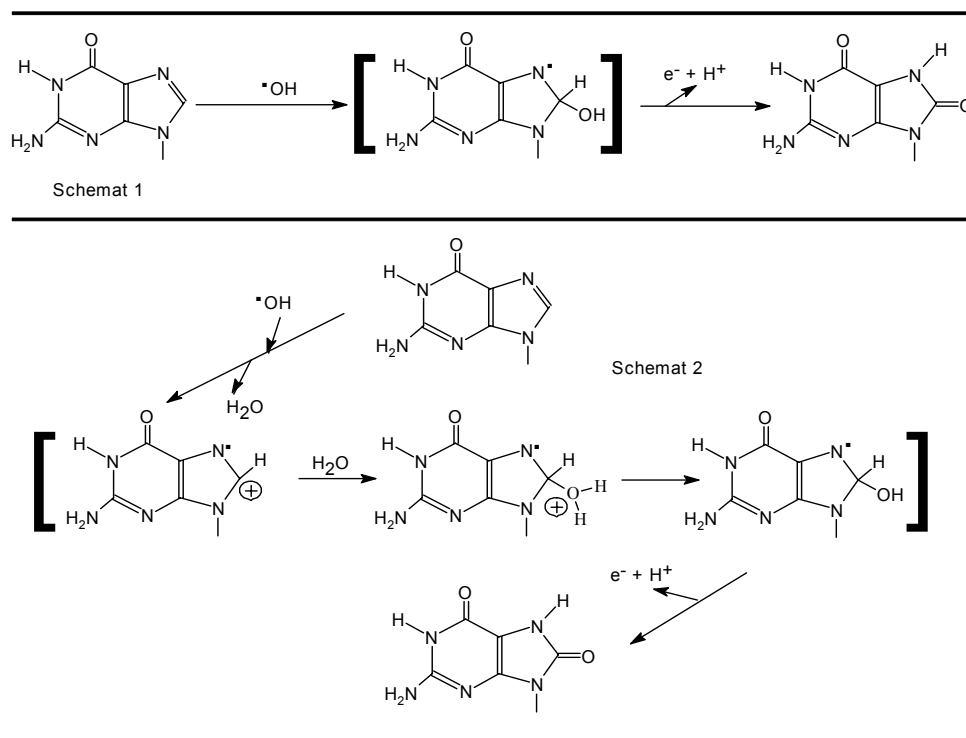
Guanina w stanie wolnym, bądź jako składnik nukleozydu, nukleotydu lub polinukleotydu (DNA, RNA) szczególnie podatna jest na utlenienie w pozycji C8 (rys. 1), co powoduje powstanie zmodyfikowanej zasady zwanej 8-oksyguaniną (8-oxoGua).

Pochodna deoksyguanozyny, powstająca pod wpływem układów generujących rodnik hydroksylowy, zidentyfikowana została początkowo jako 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyna i taka nazwa silnie zakorzeniła się w literaturze naukowej następnych dziesięciu lat (Kasai i Nishimura, 1983). W ostatnich latach dało się zauważyć pewien chaos nomenklaturowy związany z nazewnictwem zasady i nukleozydów będących efektem takiej modyfikacji. Jeszcze do dziś obok siebie egzystują w literaturze różne nazwy tego samego związku; dla utlenionej w pozycji C8 guaniny: 8-hydroksyguanina, 7,8-dihydro-8-oksyguanina, 8-oksyguanina, 7-hydro-8-oksyguanina, a dla deoksynukleozydu analogicznie: 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyna, 7,8-dihydro-8-oksi-2'-deoksyguanozyna, 7-hydro-8-oksi-2'-deoksyguanozyna i 8-oksi-2'-deoksyguanozyna. Zamieszanie to wynikało zrazu z braku wiadomości na temat tautomeryzacji związku, a po przedstawieniu licznych dowodów na to, że zdecydowanie przeważającym tautomerem w warunkach zbliżonych do fizjologicznych jest forma 6,8-diketonowa - z pewnej inercji nomenklaturowej panującej w środowisku naukowym. Przewagę formy tautomerycznej 6,8-diketo (rys. 1) potwierdzono z użyciem wielu technik eksperymentalnych i za pomocą teoretycznych metod z zakresu chemii kwantowej (Culp i wsp., 1989; Oda i wsp., 1991; Kouchakdjian i wsp., 1991; Gannett i Sura, 1993). Z uwagi na to, najpowszechniej używaną obecnie nazwą zasady i deoksynukleozydu są odpowiednio: 8-oksyguanina i 8-oksi-2'-deoksyguanozyna.

Najlepiej rozpoznany czynnik powodujący przekształcenie guaniny do 8-oksyguaniny jest rodnik hydroksylowy. Dotychczas opisano bardzo wiele układów generujących rodnik hydroksylowy, które powodują konwersję guaniny do 8-oksyguaniny (przeгляд w następnych rozdziałach).

Potencjalne mechanizmy tej reakcji przedstawiono na rys. 2. Pierwszy z tych mechanizmów zakłada bezpośrednie formowanie adduktu rodnika hydroksylowego z guaniną w pozycji C8, drugi zaś, jako etap początkowy zakłada abstrakcję elektronu z cząsteczki guaniny pod wpływem rodnika hydroksylowego. Należy zaznaczyć, iż do początkowej abstrakcji elektronu z cząsteczki guaniny (schemat 2) może potencjalnie dochodzić nie tylko pod

wpływem rodnika hydroksylowego, ale także na skutek jonizacji spowodowanej oddziaływaniem kwantu promieniowania jonizującego lub na skutek kontaktu z równie silnym jak rodnik hydroksylowy utleniaczem, np. rodnikiem ferrylowym lub nadferrylowym (Von Sonntag, 1987; Floyd, 1990). Pojawiły się także dane przemawiające za tym, iż taka abstrakcja elektronu z cząsteczki Gua może zachodzić pod wpływem fotouczulaczy w reakcji fotouczulania typu I (Kasai i wsp., 1992; Ito i wsp., 1993; Nicotera, 1994).

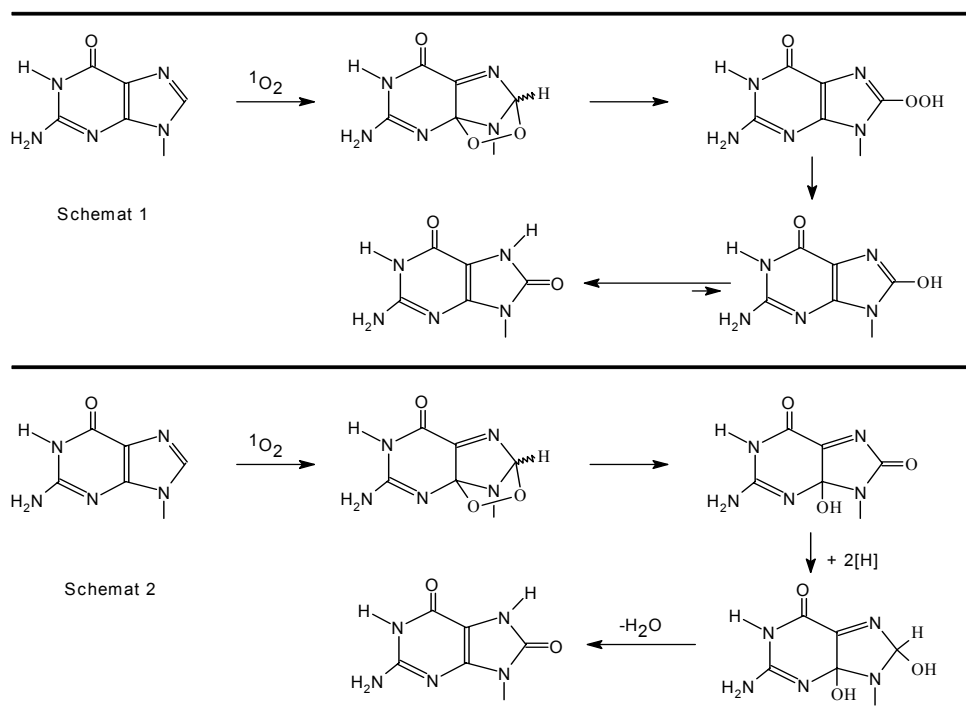


Rys. 2

Potencjalne mechanizmy powstawania 8-oksoguaniny pod wpływem rodnika hydroksylowego.

Kolejnym czynnikiem zdolnym do wprowadzenia oksydacyjnej modyfikacji guaniny w pozycji C8 jest tlen singletowy (Floyd i wsp., 1990; Schneider i wsp., 1990 i 1993; Sies, 1993; Ravanat i Cadet, 1995; Sheu i Foote, 1995). Najprawdopodobniej reakcja reszty guaniny z tlenem singletowym zachodzi z wytworzeniem przejściowego 4,8-endonadtlenku, który ulega natychmiast rozpadowi. Dwa potencjalne szlaki prowadzące do powstania 8-oksoguaniny w reakcji z $^1\text{O}_2$ przedstawiono na rys. 3. Niektórzy autorzy sugerują również możliwość abstrakcji elektronu z reszty guaniny przez tlen singletowy z wytworzeniem kationowego rodnika guaniny i anionorodnika ponadtlenkowego ($\text{Gua} + ^1\text{O}_2 \rightarrow \text{Gua}^{\bullet+} + \text{O}_2^{\bullet-}$)

(Boiteux i wsp., 1992). W takiej sytuacji oksydacja do 8-oksyguaniny zachodziłaby według schematu 2 przedstawionego na rys. 2.



Rys. 3

Proponowane mechanizmy modyfikacji guaniny przez tlen singletowy, prowadzącej do powstania 8-oksyguaniny.

1.7 Metody oznaczania śladowych ilości 8-oksyguaniny w DNA

Do oznaczania śladowych ilości 8-oksyguaniny w preparatach DNA używa się obecnie dwu zasadniczych technik (Halliwell i Dizdaroglu, 1991; Ravanat i wsp., 1995). Pierwsza z nich to technika wysokosprawnej, kolumnowej chromatografii cieczowej (HPLC), połączona z detekcją elektrochemiczną. W trybie tej chromatografii oznacza się najczęściej obecność 8-oksyguaniny w DNA w formie deoksynukleozydu (po uprzedniej, enzymatycznej degradacji DNA do nukleozydów), stąd też większość prac dotyczących biologicznego znaczenia tej modyfikacji traktuje o 8-oksi-2'-deoksyguanozynie. Alternatywnie stosuje się metodę chromatografii gazowej, połączoną ze spektrometrią masową w trybie selektywnego monitorowania jonów (GC/MS-SIM), za pomocą której oznacza się 8-oksyguaninę w kwaśnych hydrolizatach DNA. Użycie tej techniki wymaga termicznej, kwaśnej hydrolizy DNA do wolnych zasad azotowych oraz ich późniejszej derywatywacji w celu przeprowadzenia ich w lotne pochodne. Rzadziej do detekcji 8-oksyguaniny w DNA stosuje

się techniki immunologiczne, z użyciem monoklonalnych przeciwciał skierowanych przeciwko reszcie 8-oksyguaniny (Yarborough i wsp., 1996). Opisano również pośrednie metody szacowania ilości 8-oxoGua w DNA z użyciem Fapy-DNA glikozylazy, wycinającej 8-oxoGua z DNA (Epe i wsp., 1993; Czene i Harms-Ringdahl 1995; Hartwig i Schlepegrell, 1995).

1.8 Generowanie 8-oksy-2'-deoksyguanozyny w układach *in vitro*

8-oxodG można uzyskać *in vitro* inkubując 2'-deoksyguanozynę z systemami generującymi rodnik hydroksylowy, inne bardzo reaktywne utleniacze, tlen singletowy lub wzbudzone fotouczulacze. Wydajność tworzenia 8-oxodG pod wpływem tych systemów w eksperymentach *in vitro* nigdy nie przekraczała kilku procent. Niektóre z takich systemów (zawierających tlen cząsteczkowy w wodnym środowisku reakcyjnym) powodujących oksydację dG w pozycji C8, w eksperymentach *in vitro* przedstawiono poniżej:

- kwas askorbinowy / bufor fosforanowy / jony Fe (Kasai i Nishimura, 1984)
 - kwas askorbinowy / Fe (II) / EDTA (układ Udenfrienda, Udenfriend, 1954) (Kasai i Nishimura, 1984)
 - kwas askorbinowy / H₂O₂ (Kasai i Nishimura, 1984)
 - katechol / Fe (III) / H₂O₂ (Kasai i Nishimura, 1984)
 - ADP / Fe (II) / H₂O₂ (Floyd i wsp., 1985)
 - Fe (II) / bufor dwuwęglanowy (Floyd i wsp., 1985)
 - czynniki redukujące: hydroksylamina, hydrazyna, kwas dihydromaleinowy, dwusiarczek sodowy, aceton w obecności Fe-EDTA (Kasai i Nishimura, 1983)
 - kompleksy metali: Fe(II), Sn(II), Ti(III), Cu(I) z EDTA (Kasai i Nishimura, 1984)
- Dodanie H₂O₂ znacznie zwiększa generację 8-oxodG (Marnett i Burcham, 1993).
- jony siarczynowe / Cr(VI) - układ generujący anionorodnik trójtlenku siarki (Shi i Mao, 1994)
 - zawiesiny minerałów zawierających żelazo, w buforze fosforanowym (Berger i wsp., 1993)
 - Co(II) w obecności różnych chelatorów i H₂O₂ (Mao i wsp., 1996)
 - Cr(VI) / kwas askorbinowy / H₂O₂ (Shi i wsp., 1994)
 - Ni(II) / H₂O₂ / białka heterochromatyny (Huang i wsp., 1995)
 - Ni(II) / H₂O₂ / histydyna (Datta i wsp., 1992)

- błękit metylenowy / światło widzialne (system produkujący $^1\text{O}_2$) (Ravanat i Cadet, 1995)

Przeprowadzono również wiele badań poświęconych formowaniu 8-oxodG w wyizolowanym DNA (lub chromatynie) eksponowanym na działanie podobnych systemów *in vitro*. Niektóre z systemów generujących 8-oxodG w DNA lub chromatynie przedstawiono w tabeli 1, podając literaturę, w której można znaleźć bliższe dane na ten temat.

Tabela 1. Czynniki indukujące powstawanie 8-oxodG w DNA/chromatynie *in vitro*.

Czynniki ekspozycyjne	Badany materiał	Literatura
Cr(VI), Fe(II)-NTA, Co(II), Ni(II)/ H ₂ O ₂	DNA	Halliwell i Aruoma 1993
Cr(VI) / askorbinian / H ₂ O ₂	DNA	Shi i wsp., 1994
Cr(VI) / GSH lub H ₂ O ₂	DNA	Aiyar i wsp., 1990 i 1991
Fe - NTA / H ₂ O ₂	chromatyna	Inoue i wsp., 1987 Aruoma i wsp., 1989
Cu ⁺ / 1-10-fenantrolina	chromatyna	Halliwell i Aruoma 1993
Fe(II) / oksydaza:hipoksantyna - ksantyna	chromatyna	Halliwell i Aruoma 1993
minerały zawierające żelazo (hematyt, piryt)	DNA	Berger, 1993
azbest / H ₂ O ₂	DNA	Kasai i Nishimura, 1984
bleomycyna / Fe(II)	DNA	Kasamatsu i wsp., 1994
kwas 5-aminolewulinowy / Fe(II)	DNA	Fraga i wsp., 1994
doksorubicyna / dehydrogenaza NADH / Fe(III) lub Cu(II)	chromatyna	Halliwell i Aruoma 1993
4HAQO / Cu (II); NH ₂ OH (hydroksylamina) / Cu(II)	DNA	Yamamoto i wsp., 1993
4HAQO / serylo-AMP-seryna	DNA	Kohda i wsp., 1987
NiCl ₂ / H ₂ O ₂ / L-histydyna	DNA	Datta i wsp., 1992
azydotymidyna / NADH / KCN H ₂ O ₂ / cytochrom c	mtDNA	Hayakawa i wsp., 1992
mitomycyna C / NaBH ₄	DNA	Maccubbin i wsp., 1994
rifamycyna / Cu ⁺	DNA	Muniz i wsp., 1995
tetrachlorohydrochinon / Cu ²⁺	DNA	Naito i wsp., 1994
KBrO ₃	chromatyna	Sai i wsp., 1994
mikrosomy / NADPH / dietylstilbestrolo-4', 4''-chinon (estrogeny) / FeCl ₃	DNA	Roy i wsp. 1991 Han i Liehr, 1995
AA lub LA/lipoksydaza lub syntaza prostagl. H	DNA	de Kok i wsp., 1994
promieniowanie jonizujące	DNA	Fischer-Nielsen i wsp., 1994
promieniowanie UVA w obecności ryboflawiny lub hematoporfiryny	DNA	Ito i wsp., 1993
błękit metylenowy (róż bengalski)/światło białe	RNA	Schneider i wsp., 1993
wodoronadtlenki furokumaryny / UVA	DNA	Adam i wsp., 1995

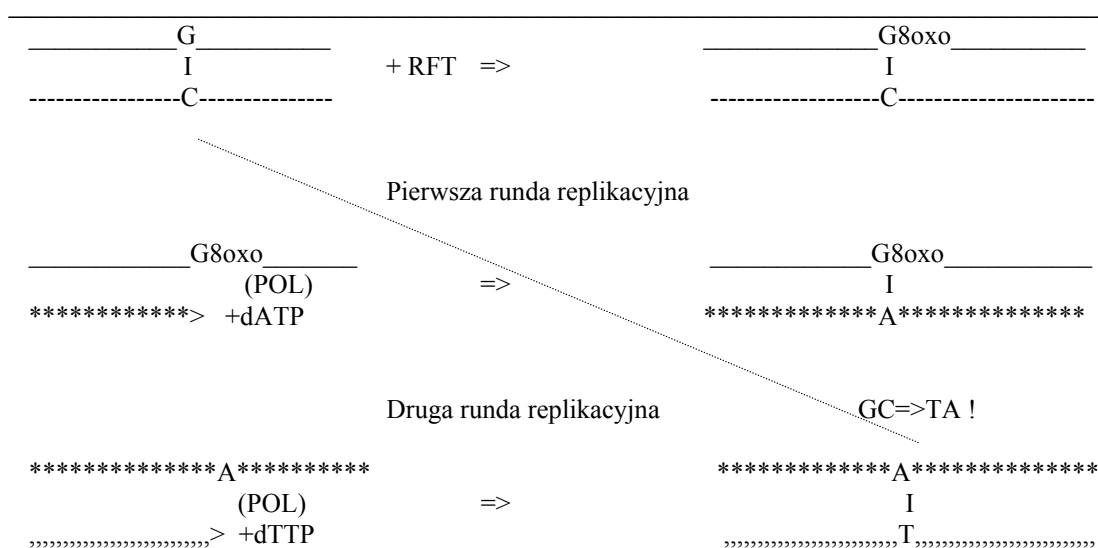
NTA - nitrylotrójocjan; 4HAQO - 1-tlenek 4-hydroksylaminochinoliny;

AA - kwas arachidonowy, LA - kwas linolowy;

1.9 Mutagenne właściwości 8-oksoguaniny

Mutagenne właściwości 8-oksoguaniny zlokalizowanej w matrycy DNA wynikają z jej potencjału błędnego parowania w trakcie procesu replikacji DNA. Po raz pierwszy zjawisko to zaobserwowali Kuchino i wsp., (1986 i 1987). Używając syntetycznego oligonukleotydu posiadającego resztę 8-oksoguaniny w zdefiniowanej pozycji udowodnili oni, że obecność tej modyfikacji nie hamuje procesu replikacji, a polimeraza DNA I z *E. coli* błędnie wprowadza naprzeciwko 8-oksoguaniny wszystkie 4 deoksynukleozydomonofosforany. Shibutani i wsp. (1991) używając różnych polimeraz DNA dowiedli, iż wprowadzają one selektywnie dCMP i dAMP naprzeciw 8-oksoguaniny obecnej w matrycy, a stosunek ilości dCMP/dAMP wprowadzonych w to miejsce różni się w zależności od zastosowanej polimerazy. Użycie fragmentu Klenowa polimerazy DNA I lub polimerazy β prowadziło do przewagi par 8-oxodG:dC, kiedy stosowano polimerazę α lub δ , naprzeciw uszkodzenia częściej włączany był dAMP, dając przewagę parom 8-oxodG:dA.

Uszkodzona oksydacyjnie guanina obecna w DNA może więc utworzyć błędną parę z adeniną podczas replikacji DNA. Jeżeli błąd ten nie zostanie skorygowany (aktywność egz nukleolityczna polimerazy DNA I nie koryguje tego błędu - Shibutani i wsp., 1991), to podczas kolejnej rundy replikacyjnej dochodzi do mutacji punktowej, transwersji typu G=>T. Mechanizm kreowania takiej mutacji pod wpływem 8-oksoguaniny przedstawiono na rys. 4.



Rys. 4

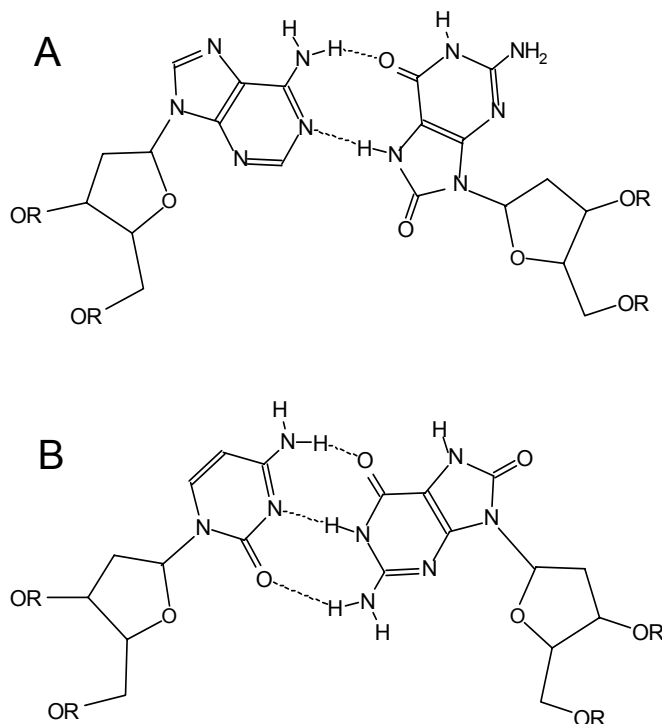
Mechanizm kreowania transwersji GT=>TA pod wpływem 8-oksoguaniny powstałej na skutek oksydacyjnej modyfikacji DNA.

Doświadczenia z zakresu mutagenyzy kierowanej pozwoliły określić częstość realizacji takiego scenariusza zdarzeń *in vivo*. Obecność pojedynczej reszty 8-oxoGua w jednoniciowym wektorze fagowym indukowała transwersje G=>T w komórkach *E. coli* z częstotliwością ok. 1% (Wood i wsp., 1990). Moriya i wsp. (1991) badając to zjawisko używali dwuniciowego plazmidu, posiadającego lukę oligonukleotydową w obrębie jednej z nici i resztę 8-oksoguaniny w obrębie tego jednoniciowego odcinka plazmidu. Transformowali nim komórki *E. coli*, namnażali je, by indywidualnych klonach badać sekwencję nukleotydów w obrębie odcinka posiadającego oryginalnie 8-oxoGua. Stwierdzili, że w miejscu uszkodzenia 99% stanowią pary GC, a 1%, to efekty transwersji G=>T, czyli pary TA. Aż 4 %-ową częstość mutacji powodowaną 8-oksoguaniną opisali Page i wsp. (1995), zdecydowana większość z nich to oczywiście transwersje G=>T.

O doniosłości przedstawionego tu mechanizmu powstawania zmian mutacyjnych pod wpływem RFT świadczyć mogą pośrednio wyniki badań nad mutagenną specyficznością poszczególnych reaktywnych form tlenu w doświadczeniach *in vivo*. Ekspozycja DNA na działanie tlenu singletowego powodowała prawie wyłącznie transwersje typu G=>T, a bardzo znaczny procent stanowił ten rodzaj mutacji po ekspozycji DNA na generujące rodnik hydroksylowy promieniowanie jonizujące (Retel i wsp., 1993). Wielką specyficzność wywoływania mutacji G=>T przez tlen singletowy potwierdził Ribeiro i wsp., (1994). Ekspozycja DNA na Fe³⁺-EDTA prowadziła aż w ok. 48% do transwersji G=>T, a ogólna częstość pojawiania się mutacji punktowych korelowała z poziomem 8-oxodG w ekspanowanym DNA (Akasaka i Yamamoto, 1994).

Mutagenne własności 8-oxodG w DNA mają swoje strukturalne podstawy (Culp i wsp., 1989; Brown i Kennard, 1992; Barciszewski i wsp., 1995). Przeprowadzono szereg badań dotyczących struktury i termodynamiki dupleksów DNA zawierających resztę 8-oksoguaniny sparowaną z cytozyną i adeniną, głównie technikami jądrowego rezonansu magnetycznego i za pomocą krystalografii rentgenowskiej (Oda i wsp., 1991; Kouchakdjian i wsp., 1991; Gannett i Sura, 1993; McAuley-Hecht i wsp., 1994; Plum i wsp., 1995). Badania te dowodzą, że w przypadku pary 8-oxodG:dA, 8-oxodG występuje w konformacji *syn*, dA w konformacji *anti*. Obie zasady połączone są dwoma wiązaniami wodorowymi występującymi pomiędzy krawędzią Hoogsteena 8-oksoguaniny i krawędzią Watsona-Cricka adeniny (rys. 5a). W przypadku pary 8-oxodG:dC oba nukleozydy przyjmują konformację *anti* i połączone są trzema wiązaniami wodorowymi pomiędzy krawędziami Watsona-Cricka 8-oksoguaniny i

cytozyny (rys. 5b). W przypadku obu par 8-oksyguanina występuje w postaci tautomeru 6,8-diketo.



Rys. 5

Struktura par A) 8-oxodG:dA i B) 8-oxodG:dC występujących w dwuniciowym B-DNA.

1.10 Związek 8-oxodG z procesem karcynogenezy

Choroby nowotworowe to choroby genetyczne, których podłożem są różnego rodzaju mutacje zachodzące w strategicznie ważnych dla życia komórki genach, zwanych często protoonkogenami. W tym sensie proces transformacji nowotworowej komórki związany jest z działaniem czynników wywołujących mutacje, w tym mutacje punktowe. 8-Oksydeoksygwanozyna powstająca w DNA pod wpływem czynników oksydacyjnych jest jedną z bezpośrednich przyczyn powstawania mutacji punktowych, co narzuca przypuszczenie, iż podwyższanie jej ilości w DNA powinno zwiększać ryzyko transformacji nowotworowej komórki. Badania dotyczące 8-oxodG koncentrują się w ostatnich latach na poszukiwaniu związku przyczynowo-skutkowego pomiędzy obecnością tej modyfikacji w DNA a procesem transformacji nowotworowej.

Jeden z kierunków tych badań, to badania poświęcone ilości 8-oxodG w DNA tkanek nowotworowych w relacji do ilości tej modyfikacji w odpowiadających im tkankach nie

zmienionych nowotworowo. Szereg doniesień opisuje podwyższony poziom 8-oxodG w DNA różnych tkanek nowotworowych (Oliński i wsp., 1992 i 1995; Malins, 1993; Malins i wsp., 1993; Takeuchi i Morimoto, 1993; Okamoto i wsp., 1994; Jaruga i wsp., 1994). Zasugerowano więc, że 8-oxodG może być odbiciem wczesnych zmian w procesie karcynogenezy, jednakże badania tego typu nie mogą odpowiedzieć na podstawowe pytanie: czy podwyższony poziom 8-oxodG w DNA komórek nowotworowych to przyczyna, czy skutek procesów transformacji nowotworowej ?

Drugi kierunek badań nad związkiem przyczynowo-skutkowym pomiędzy transformacją nowotworową komórki a zawartością 8-oxodG w jej DNA opiera się na oznaczeniach poziomu 8-oxodG w DNA tkanek zwierząt laboratoryjnych, poddanych działaniu różnych karcynogenów. Tego typu badania *in vivo* dowiodły, iż szereg dobrze udokumentowanych karcynogenów podwyższa poziom 8-oxodG w DNA organizmów podanych ich działaniu. Szczególnie cenne z wnioskotwórczego punktu widzenia są te obserwacje, które dowodzą, że dany karcynogen podwyższa selektywnie (bądź w największym stopniu) poziom 8-oxodG w docelowym dla tego karcynogenu narządzie.

Do chwili obecnej przebadano już znaczną ilość karcynogenów pod kątem ich zdolności do indukowania 8-oxodG w DNA zwierząt laboratoryjnych. Większość z tych karcynogenów, to związki organiczne, podlegające aktywacji metabolicznej w komórkach z wytworzeniem reaktywnych form tlenu (np. związki chinonowe lub przekształcane do pochodnych chinonowych przez układy enzymatyczne komórki) lub kompleksy karcynogennych metali grup przejściowych, które jak wiadomo mogą brać udział w reakcji Fentona, dostarczającej rodników hydroksylowych. Niektóre z przebadanych w tym kierunku karcynogenów wyliczono poniżej:

Drugorzędowe nitroalkany (np. 2-nitropropan, 2-nitrobutan) i niektóre oksymy (acetooksym, oksym cyklopentanu) są karcynogenami indukującymi raka wątroby, powodują też wzrost poziomu 8-oxodG w DNA wątrobowym szczurów. Pierwszo- i trzeciorzędowe nitroalkany nie powodują zmian poziomu 8-oxodG w DNA. Dysocjacja protonu z nitroalkanu powoduje powstanie anionu nitroalkanu. Aniony te biorą udział w tworzeniu $O_2^{\bullet-}$ i H_2O_2 . Tempo reprotonacji anionów nitroalkanowych drugorzędowych nitroalkanów jest ponad 20-krotnie wolniejsze niż pierwszo- lub trzeciorzędowych. Niektóre oksymy (np. acetooksym) są *in vivo* przekształcane do drugorzędowych nitroalkanów.

Kwas 5-aminolewulinowy (ALA) może powodować pierwotnego raka wątroby. ALA jest prekursorem hemu, akumulowanym we wrodzonych porfiriach. W obecności tlenu i jonów metali grup przejściowych ulega jednoelektronowej oksydacji z wytworzeniem anionorodnika ponadtlenkowego.

Proliferatory peroksysomów: WL-14.643; di(2-etyloheksylo)ftalan (DEHP); kwas 2-[4-(2,2-dichlorocyklopropylo)fenoksy]-2-metylopropanowy (ang. ciprofibrate);

kwas α -(p-chlorofenoksy)izobutanowy (ang. clofibric acid); fenobarbital

Są karcynogenami wątrobowymi. Po stymulacji peroksysomów przez proliferatory obserwuje się podwyższoną produkcję H_2O_2 w komórce.

Cu(II) i Cu-NTA (kompleks jonów Cu i nitrylotrójoctanu) są karcynogenami indukującymi raka wątroby i nerek. Biorą udział w reakcji Fentona.

Bromian potasowy (KBrO₃) jest karcynogenem odpowiedzialnym za powstawanie złośliwych guzów nerek. KBrO₃ powoduje generację reaktywnych form tlenu ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $\bullet OH$, 1O_2) oraz uszkodzeń DNA. NaClO i NaClO₂ posiadające podobne do KBrO₃ własności utleniające nie powodują zmian w poziomie 8-oxodG.

Adriamycyna, antybiotyk zawierający grupę chinonową jest kolejnym karcynogenem nerkowym. Może ona interkalować DNA i prowadzić do zahamowania syntezy DNA oraz pęknięć jego łańcucha. Adriamycyna ma zdolność generowania reaktywnych form tlenu ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $\bullet OH$, 1O_2). Daunomycyna, zbliżona w budowie do adriamycyny także może indukować guzy nerek u szczurów.

Kompleks Fe-nitrylotrójoctan (Fe-NTA) również może wywoływać raka nerki. Związek ten indukuje produkcję rodników hydroksylowych z H_2O_2 . Al-NTA, Na₂NTA nie są reagentami Fentona i nie są karcynogenami.

Ni(II) i Ni(II)-NTA indukują guza kory nerki. Generują rodnik hydroksylowy w obecności H_2O_2 . Transformacja nowotworowa zainicjowana przez Ni(II) rozwija się pod wpływem promotora - barbitalu sodowego - w modelu eksperymentalnym.

Dietylostilbestrol (DES) indukuje nowotwory nerek chomików. DES przechodzi cykl red-oks w mikrosomach, gdzie jest przekształcany w DESQ (pochodna chinonowa) przez cytochrom P-450, a następnie w hydrochinon przez reduktazę cytochromu P-450. W czasie tego cyklu red-oks dochodzi do powstawania wolnych rodników. $O_2^{\bullet-}$ są tworzone przez reduktazę cytochromu P-450 zależną od NADPH, katalizującą redukcję DESQ w reakcji tlenu cząsteczkowego z DES-semichinonem, produktem pośrednim tej redukcji.

Cr(VI) jest karcynogenem wywołującym głównie guzy płuc. Reaguje z H_2O_2 , produkując $\bullet OH$ lub 1O_2 .

Benzen sam nie jest karcynogenem, ale ulega w wątrobie przemianie metabolicznej do fenolu, który jest następnie hydroksylowany do katecholu, hydrochinonu i 1,2,4-benzotriolu. Wszystkie te metabolity są karcynogenami.

1,2,4-Benzotriol (BT) może indukować białaczki mielocytarne u ludzi i guzy różnych narządów u szczurów. Związek ten silnie wiąże jony metali grup przejściowych i szybko ulega autooksydacji do odpowiedniego chinonu przez pośredni rodnik semichinonowy. Podczas autooksydacji powstają $O_2^{\bullet -}$, H_2O_2 , $\bullet OH$, być może 1O_2 .

1-tlenek 4-nitrochinoliny (4NQO) oraz jego metabolity: **1-tlenek 4-hydroksylaminochinoliny (4HAQO)** i **hydroksylamina (NH₂OH)** są uważane za karcynogeny. 4NQO oraz 4HAQO tworzą addukty z DNA. 4HAQO jest łatwo oksydowany do form wolnorodnikowych co powoduje dalej powstawanie H_2O_2 .

Pentachlorofenol jest metabolizowany przez enzymy mikrosomalne do tetrachloro-p-hydrochinonu, podlegającego spontanicznej autooksydacji do rodnika semichinonowego i anionorodnika ponadtlenkowego. Powoduje raka wątroby u myszy.

Dimetylohydrazyna powoduje raka jelita i wątroby u szczurów.

Nadtlenek benzoilowy (BzPO) jest promotorem raka skóry u myszy. BzPO również powoduje generację wolnych rodników tlenowych (głównie $\bullet OH$).

Estry forbolu - 12-o-tetradekanoiloforbolo-13-octan (TPA), mezeryna (MEZ), 12-o-retinoilo-forbolo-13-octan (RPA) są promotorami raka skóry myszy. Estry forbolu stymulują makrofagi oraz komórki niefagocytujące do produkcji reaktywnych form tlenu (H_2O_2 , $O_2^{\bullet -}$, 1O_2). TPA, MEZ, RPA znacznie indukują aktywność mieloperoksydazy w makrofagach (ok. 100-krotnie), generującej podchloryn.

Aflatoksyna B₁ jest karcynogenną (guzy wątroby) toksyną grzybową.

Promieniowanie UV, czynnik karcynogeny powodujący raka skóry.

Wyróżnia się trzy rodzaje promieniowania UV: UVC (220-290 nm), UVB (290-320 nm) i UVA (320-400 nm). Organizmy żywe są ekspozowane na UVB i UVA, promieniowanie UVC jest bowiem absorbowane przez warstwę ozonową powietrza. Promienie UVB stanowią największe zagrożenie dla organizmu i są uważane za główną przyczynę karcynogenego efektu promieni słonecznych. Promieniowanie UV generuje powstawanie reaktywnych form tlenu poprzez zdolność do wzbudzania fotouczulaczy.

Promieniowanie jonizujące (X i γ) generuje powstawanie wolnych rodników wszystkich cząsteczek, z którymi oddziałuje, w tym rodników tlenowych w procesie radiolizy cząsteczek wody.

Duże bogactwo danych jakie pojawiły się w ostatnich latach na temat indukcji 8-oxodG w DNA (*in vivo*) przez różne karcynogeny nie pozwala na ich kompletną prezentację w tej pracy. W tabeli 2 zaprezentowano przykłady eksperymentów (i ich rezultaty) przeprowadzonych w tym zakresie.

Tabela 2.

Przykłady przeprowadzonych eksperymentów dotyczących tworzenia 8-oxodG w DNA przez czynniki karcynogenne *in vivo*.

Karcynogen	Przebieg eksperymentu	Poziom 8-oxodG	Literatura
Drugorzędowe nitroalkany oraz oksymy	Traktowanie szczurów drugorzędowymi nitroalkanami oraz oksymami	Okolo 2-krotny wzrost poziomu 8-oxodG w DNA wątrobowym szczurów.	Conaway i wsp., 1991
	Podawanie szczurom przez kilka tygodni pożywienia pozbawionego Cu i Mn lub Fe. Następnie podanie im jednorazowej dawki 2-NP.	Wzrost poziomu 8-oxodG w DNA wątrobowym w grupie szczurów pozbawionych Fe, spadek poziomu w grupie, której pożywienie nie zawierało Cu i Mn	Adachi i wsp., 1993
Kwas 5-aminolewulinowy (ALA)	Chroniczne traktowanie szczurów ALA.	4.5-krotny wzrost poziomu 8-oxodG w DNA wątroby szczura w porównaniu z kontrolą.	Fraga i wsp., 1994
Proliferatory peroksysomów (PP)	Podawanie szczurom doustnie PP.	Brak wzrostu poziomu 8-oxodG w DNA po 3 i 11 tygodniach, 2-3-krotny wzrost ilości 8-oxodG po 22 tyg. ekspozycji szczurów na WY-14.643 lub kwas α -(p-chlorofenoksy)izobutanowy ale nie na DEHP lub fenobarbital. Wzrost poziomu 8-oxodG zanotowano po 40 tyg. ekspozycji na "ciprofibrate".	Cattley i wsp., 1993
Cu(II)	Kilkudniowe ciągle podawanie (dożylnie) szczurom CuCl ₂ lub Cu-NTA.	2.5-krotny wzrost poziomu 8-oxodG w DNA wątrobowym, w nerkowym 1.5-krotny.	Toyokuni i Sagripanti, 1994
Bromian potasowy (KBrO ₃)	Podawanie szczurom KBrO ₃ .	2-4-krotny wzrost poziomu 8-oxodG w DNA nerkowym szczurów.	Cho i wsp., 1993
KBrO ₃	Jednorazowe wstrzyknięcie KBrO ₃ szczurom (400mg/kg)	4-krotny wzrost poziomu 8-oxodG w DNA nerek; brak zmian w DNA wątroby	Umemura i wsp., 1995

Karcynogen	Przebieg eksperymentu	Poziom 8-oxodG	Literatura
Adriamycyna	Traktowanie szczurów adriamycyną.	2-krotny wzrost poziomu 8-oxodG w DNA nerkowym szczurów.	Cho i wsp., 1993
Fe-NTA	Wstrzyknięcie szczurom Fe-NTA.	2-krotny wzrost poziomu 8-oxodG w DNA nerkowym.	Umemura i wsp., 1990
Ni(II)	Wstrzyknięcie szczurom octanu niklu.	wzrost poziomu 8-oxodG 16-18h od wstrzyknięcia.	Kasprzak i wsp., 1990
Dietylostilbestrol (DES)	Traktowanie chomików DES przez kilka dni lub traktowanie chroniczne.	1.5-krotny wzrost poziomu 8-oxodG w DNA wątroby chomików po kilku dniach ekspozycji, ponad 2-krotny wzrost w DNA nerkowym (ale nie wątrobowym) przy traktowaniu chronicznym.	Roy i wsp., 1991
Tetrachloro-p-hydrochinon (TCHC) (metabolit pentachlorofenolu)	Iniekcje TCHC (300mg/kg) codziennie przez 2 tygodnie	1.5-krotny wzrost poziomu 8-oxodG w DNA wątrobowym.	Dahlhaus i wsp., 1994
Dimetylohydrazyna (DMH)	Podskórne wstrzyknięcie DMH (25mg/kg)	1.5-krotny wzrost poziomu 8-oxodG w DNA wątroby i nabłonka jelitowego	Inagake i wsp., 1995
1,2,4-benzotriol (BT)	Ekspozycja ludzkich limfocytów i komórek HL60 na BT, w obecności Cu(II) lub bez.	wzrost poziomu 8-oxodG w DNA, dodanie Cu(II) zwiększa ten efekt.	Cattley i Glover, 1993
Azbest	Inkubowanie linii komórek ludzkich HL60 z włóknami azbestu. Komórki HL60 były uprzednio zróżnicowane na neutrofile i makrofagi lub nie.	wzrost poziomu 8-oxodG w DNA zróżnicowanych komórek HL60, ale nie w DNA komórek niezróżnicowanych, które nie fagocytują włókien azbestu.	Takeuchi i Morimoto, 1994
1-tlenek 4-nitrochinyliny (4NQO)	Jednorazowe wstrzyknięcie 4NQO szczurom	20-krotny wzrost poziomu 8-oxodG w DNA trzustki	Nakae i wsp., 1994
estradiol	Jednorazowe wstrzyknięcie estradiolu szczurom w dawce 50mg/kg	wzrost poziomu 8-oxodG w wątrobie (4-krotny) i nerce (2-krotny)	Han i Liehr, 1994
Estry forbolu: TPA, MEZ, RPA	Traktowanie skóry myszy Sencar estrami forbolu.	6-krotny wzrost poziomu 8-oxodG w DNA skóry po traktowaniu TPA, 4-krotny po traktowaniu MEZ i 3.6-krotny po ekspozycji na RPA.	Wei i Frenkel, 1993
	Traktowanie skóry myszy Sencar TPA.	2-5-krotny wzrost poziomu 8-oxodG w DNA naskórka po jednorazowym podaniu TPA, po ponownej dawce po 20h: 3.8-krotny.	Wei i Frenkel, 1991

Karcynogen	Przebieg eksperymentu	Poziom 8-oxodG	Literatura
	Traktowanie ludzkich granulocytów TPA.	ponad 40-krotny wzrost poziomu 8-oxodG w DNA granulocytów.	Floyd i wsp., 1986
Aflatoksyna B ₁	Aflatoksynę podawano dożylnie, jednorazowo szczurom (25µg/100g)	4-krotny wzrost poziomu 8-oxodG już po 1 h.	Shen i wsp., 1995
Promieniowanie UV	Ekspozycja myszy na bliski UV (>270 nm).	znaczny wzrost poziomu 8-oxodG w DNA komórek naskórki w zależności od dawki. Po ekspozycji na prom. o natęż. 335 kJ/m ² zaobserwowano 3.5-krotny wzrost poziomu 8-oxodG.	Hattori-Nakakuki i wsp., 1994
	Ekspozycja kultur mysich keratynocytów na UVB w obecności H ₂ O ₂ lub bez.	wzrost poziomu 8-oxodG z dawką promieniowania. Przy zastosowaniu natęż. 630 mJ/cm ² zaobserwowano 2-krotny wzrost poziomu 8-oxodG w DNA, przy jednoczesnym stosowaniu H ₂ O ₂ : ponad 3.8-krotny wzrost.	Beehler i wsp., 1992
Promieniowanie γ	Hodowane, ludzkie komórki linii K562 naświetlono dawką 42Gy	ok. 2-krotny wzrost poziomu 8-oksyguaniny w DNA komórek.	Nackerdien i wsp., 1992

O roli 8-oxoGua w procieście karcynogenezy świadczyć może także fakt, iż w przypadku tkanek nowotworowych transwersje G=>T są najczęściej spotykaną mutacją punktową w obrębie supresorowego genu p53 (Hollstein i wsp., 1991).

1.11 Naprawa DNA zawierającego 8-oksyguaninę

Najlepiej poznanym enzymem wycinającym 8-oksyguaninę z DNA jest białko **MutM** z *E. coli*. Jest to globularne białko o masie 30.2 kDa składające się ze 269 aminokwasów (Boiteux i wsp., 1990), posiadające charakterystyczną domenę palca cynkowego, odpowiadającą za wiązanie się z cząsteczką DNA (O'Connor i wsp., 1993). Enzym ten został odkryty jako N-glikozylaza usuwająca z DNA Fapy-guaninę, stąd też nosi on alternatywną nazwę: białko FPG (formamidopirymidyno-DNA glikozylaza) (Chetsanga i Lindahl, 1979). Białko to posiada dwie aktywności, a mianowicie: N-glikozylazy, uwalniającej 8-oksyguaninę z DNA w postaci wolnej zasady oraz aktywność AP-liazy, usuwającej deoksyrybozę z powstałego miejsca apurynowego pod postacią 4-oxo-2-pentalu na drodze β-eliminacji, pozostawiając reszty fosforanowe na 3'- i 5'-końcu sąsiadujących nukleozydów (Nash i wsp., 1996). Najlepszym substratem dla tego enzymu jest 8-oxodG sparowana z dC w

dwuniciowym DNA. MutM nie jest jednak w stanie efektywnie wycinać 8-oksyguaniny, kiedy jest ona sparowana z adeniną (Tchou i wsp., 1991).

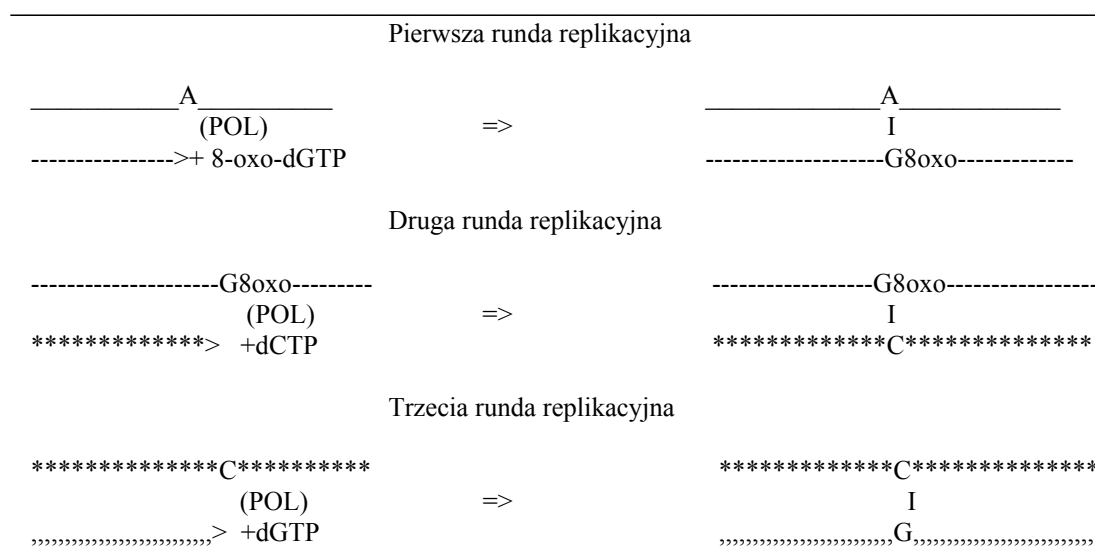
Pozostawienie w genomie wielu nie skorygowanych, błędnych par 8-oxodG:dA prowadziłoby do znacznego podwyższenia częstości mutacji G=>T. *E. coli* (i inne organizmy prokariotyczne) posiada jednak N-glikozylazę nazwaną **MutY**, która specyficznie wycina adeninę sparowaną w DNA z 8-oksyguaniną (Michaels i wsp., 1992). Zarówno mutanty mutM jak i mutY, a szczególnie podwójny mutant mutM,muY wykazują zdecydowane podwyższenie częstości występowania mutacji typu G=>T. Przemawia to za tym, iż oba enzymy kooperują w zapobieganiu powstawania tego typu mutacji spowodowanej przez obecność 8-oksyguaniny.

Enzymy o podobnych funkcjach odnaleziono także w organizmach eukariotycznych. W ludzkich komórkach zidentyfikowano dotychczas 3 białka zdolne do usuwania 8-oxoGua z DNA. Bessho i wsp. (1993) donieśli o istnieniu dwu enzymów. Jeden z nich posiada aktywność jedynie N-glikozylazy i uwalnia 8-oxoGua pozostawiając miejsce apurynowe, drugi zaś oprócz aktywności N-glikozylazowej przejawia także aktywność endonukleolityczną (analogicznie do MutM). Także Bessho i wsp. (1993) poinformowali, iż ludzka N-metylopuryno-DNA glikozylaza, posiada zdolność usuwania 8-oksyguaniny z DNA. Zidentyfikowano również ssacze (ludzki i wołowy) homologi MutY wycinające adeninę błędnie sparowaną w DNA z 8-oksyguaniną, guaniną oraz cytozyną (McGoldrick i wsp., 1995).

1.12 8-Oksy-2'-deoksyguanozyno-5'-trifosforan - mutagenny substrat dla syntezy DNA

Oksydacyjna modyfikacja guaniny w pozycji C8 może zachodzić nie tylko w obrębie kwasów nukleinowych, ale równie dobrze może dotyczyć reszt guaniny wchodzących w skład wolnych nukleozydów i nukleotydów komórkowych. Udowodniono, że produkt modyfikacji dGTP - 8-oxodGTP jest substratem dla polimeraz DNA, inkorporując 8-oxodGMP do nowo syntetyzowanych nici DNA (Cheng i wsp., 1992; Maki i Sekiguchi, 1992). Taka inkorporacja zmodyfikowanego nukleotydu do DNA jest źródłem późniejszych mutacji, z uwagi na zdolność parowania 8-oksyguaniny nie tylko z cytozyną, ale i z adeniną. Niezwykle sugestywny eksperyment demonstrujący tę groźną właściwość 8-oxodGTP został przeprowadzony przez Chenga i wsp. (1992). W eksperymencie tym użyto dwuniciowego, kolistego DNA, posiadającego polinukleotydową lukę w jednej z nici. Lukę tę wypełniono

używając *exo*⁻ polimerazy DNA I z *E. coli* oraz dTTP, dCTP, dATP i 8-oxodGTP zamiast dGTP. Tak przygotowanym kolistym, dwuniciowym plazmidem transformowano komórki *E. coli*, gdzie ulegał on replikacji w trakcie proliferacji komórek bakteryjnych. Po pewnym czasie analizowano ilość powstałych mutacji w obrębie uzupełnionej luki wprowadzonego plazmidu. Aż 16% procent zanalizowanych przypadków wykazywało obecność mutacji punktowych w obrębie tego fragmentu plazmidu. Transwersje typu AT => CG stanowiły 97% tych mutacji, a 3% transwersje typu GC=>TA. Najbardziej prawdopodobnym wytłumaczeniem zaobserwowanych transwersji AT=> CG jest inkorporacja 8-oxodGMP na przeciw adeniny zlokalizowanej w nici matrycowej. Proponowany mechanizm powstawania tej transwersji pod wpływem 8-oxodGTP przedstawiono na rys. 6. Drugi rodzaj transwersji obserwowanych w tym eksperymencie (GC=>TA), to taka sama mutacja, jaką powoduje obecność 8-oksoguaniny w matrycy DNA. Potencjalny mechanizm prowadzący do powstawania tego typu mutacji pod wpływem 8-oxodGTP jako substratu dla polimerazy został przedstawiony na rys. 7.

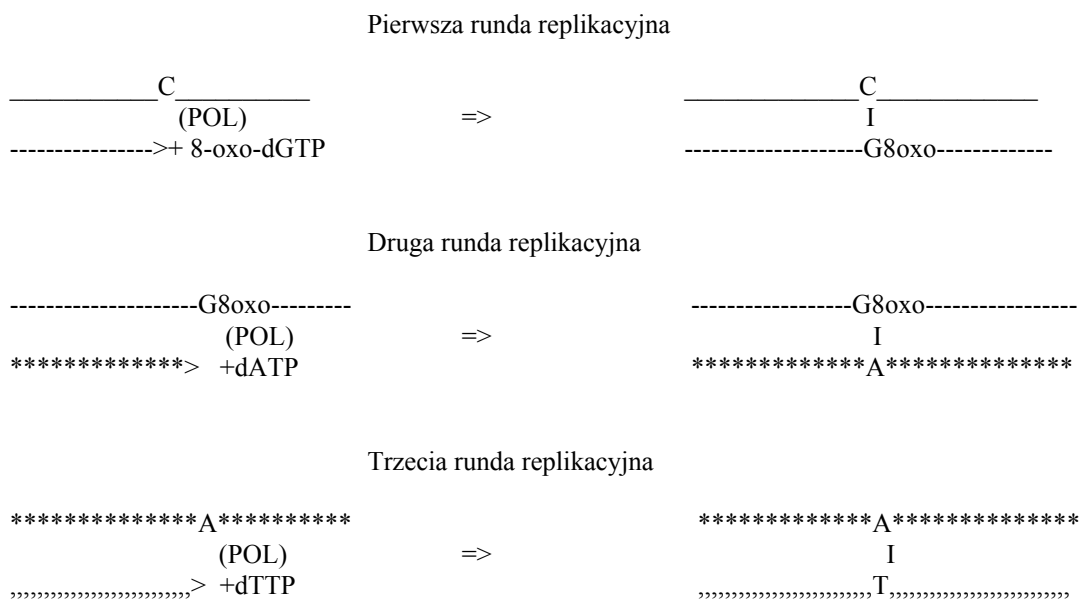


Rys. 6

Prawdopodobny mechanizm powstawania transwersji AT=>CG pod wpływem 8-oxodGTP włączanego do DNA w procesie replikacji DNA. (POL) oznacza polimerazę DNA.

Pavlov i wsp. (1994) wykazali, iż 8-oxodGTP jest substratem także dla innych polimeraz DNA. Przeprowadzając eksperymenty według koncepcji opisanej przez Chenga i wsp. (lecz stosując jako substraty do syntezy równomolowe stężenia dTTP, dCTP, dATP, dGTP i 8-oxodGTP) dowiedli oni, że następujące polimerazy DNA wprowadzają 8-oxodGMP (z 8-oxodGTP) na przeciwko adeniny wywołując transwersje typu AT=>CG: polimeraza DNA I

(*E. coli*), termostabilna polimeraza DNA z *Thermus thermophilus*, polimeraza DNA faga T4, polimeraza DNA γ (mitochondrialna) z embrionów kurzych.



Rys. 7

Prawdopodobny mechanizm powstawania transwersji GC=>TA pod wpływem 8-oxodGTP włączanego do DNA w procesie replikacji DNA. (POL) oznacza polimerazę DNA.

1.13 System obrony organizmów przed mutagennym wpływem oksydacji dGTP w pozycji C8. Pirofosfohydrolaza 8-oxodGTP

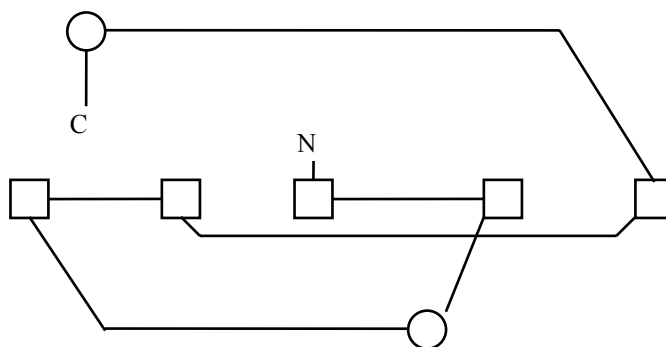
W 1954 roku Treffers i wsp. otrzymali linię zmutowanych komórek *E. coli*, charakteryzującą się wysoką częstością mutacji spontanicznych w porównaniu do komórek dzikiej linii i postulowali istnienie genu odpowiedzialnego za tę cechę, nazwanego przez nich mutT. W ten sposób odkryto pierwszy tzw. gen mutatorowy u *E. coli*. Dwanaście lat później Yanovsky i wsp. (1966) dowiedli, iż ta wysoka niestabilność genetyczna linii mutT związana jest z podwyższeniem częstości występowania tylko jednego rodzaju mutacji punktowych, a mianowicie transwersji typu AT=>CG. W celu zidentyfikowania biologicznych funkcji produktu genu mutT dzikiej linii, po wielu latach gen ten sklonowano, jego produkt białkowy nazwany białkiem MutT (129 reszt aminokwasowych, 14.9 kDa) poddano ekspresji w dużych ilościach, oczyszczono do stanu homogenności i zidentyfikowano jako fosfohydrolazę ośmiu podstawowych trifosfonukleozydów występujących w komórkach (dGTP, GTP, dTTP, UTP, dCTP, CTP, dATP, ATP), wykazującą bardzo wyraźną preferencję wobec dGTP (Bhatnagar i

Bessman, 1988). Porównanie sekwencji zmutowanego i dzikiego genu *mutT* wykazało, iż mutacja tego genu polega na insercji tzw. elementu IS1 (Bhatnagar i wsp., 1990). Okazało się, że białko MutT (produkt genu dzikiego) katalizuje reakcję hydrolizy trifosfonukleozydów do monofosfonukleozydów i pirofosforanu (Bhatnagar i wsp., 1991). Niedługo potem pirofosfataza ta została wykrystalizowana (Bessman i wsp., 1991), co dało początek dalszym wnikliwym badaniom na temat struktury enzymu. Rok 1991 dostarczył wielu danych na temat właściwości katalitycznych odkrytej pirofosfatazy (Bhatnagar i wsp., 1991). Wyznaczono optimum pH (pH 9.0) dla katalizowanej reakcji, i dowiedziono jego całkowitej zależności od jonów magnezu (w obecności innych dwuwartościowych jonów metali, jak Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , aktywność nie przekraczała 15% aktywności uzyskiwanej z jonami Mg^{2+}). Gruntowna analiza specyficzności substratowej z użyciem wszystkich ośmiu kanonicznych trifosfonukleozydów oraz ich pochodnych wykazała, że najlepszymi substratami dla MutT są kolejno dGTP ($K_m=1.5mM$) \gg GTP > dUTP > dCTP (2.2mM). Badania te dowiodły, że szczególnie istotnymi cechami dobrego substratu dla MutT są obecność grupy 6-keto i 2-amino w pierścieniu purynowym. Drugim obiektem preferencji enzymu jest deoksyryboza występująca w nukleotydzie. Dowiedziono ponadto, że wszystkie 8-bromopochodne trifosfonukleozydów purynowych (8-Br-dGTP, 8-Br-GTP, 8-Br-dATP, 8-Br-ATP) są zdecydowanie lepszymi substratami dla MutT niż odpowiednie związki wyjściowe. Na tym etapie badań sformułowano również pierwsze hipotezy dotyczące antymutagennego działania MutT. Istniały już pewne przesłanki na temat mechanizmu transwersji AT \Rightarrow CG zachodzących z dużą częstością w mutantach *mutT⁻ E. coli*. Proponowano, że transwersje te są efektem pomyłkowego parowania (ang. mismatch) adeniny nici matrycowej, z dGTP jako elementem inkorporowanym do nici syntetyzowanej (A:T \rightarrow A~G \rightarrow C:G). Wcześniejsze doniesienia sugerowały, że guanina sparowana z adeniną w obrębie dwuniciowego fragmentu polinukleotydowego przyjmuje raczej konformację *syn* względem deoksyrybozy. Postulowano więc, że rolą MutT jest hydroliza tych cząsteczek dGTP, które przybrały konformację *syn*, by uniemożliwić ich wprowadzanie do DNA na przeciwko adeniny. Hipotezę tę wspierał mocno wspomniany wcześniej fakt, iż bromowanie purynowych trifosfonukleozydów w pozycji C8 czyni je lepszymi substratami dla MutT, a jak wiadomo było, bromowanie takie wymusza konformację *syn* w obrębie modyfikowanego nukleotydu. Rok 1992 nieoczekiwanie dostarcza rewelacyjnych odkryć w tym zakresie. Maki i Sekiguchi (1992) donoszą o swoich badaniach nad antymutagennym działaniem MutT. Badali oni inkorporację znakowanego dGTP do matrycy poli(dA)/oligo(dT) pod wpływem polimerazy

III *E. coli* i potwierdzili wcześniejsze spostrzeżenia, że niewielkie ilości znakowanego dGMP są wprowadzane do nici syntetyzowanej na matrycy poli(dA). Enzym MutT dodany do medium, w którym zachodziła replikacja hamował jednak całkowicie tę inkorporację. Wykonano analizę chromatograficzną nukleotydów wchodzących w skład zsyntetyzowanej nici i okazało się, że radioaktywność niesiona przez nią nie należy wcale do dGMP, a do związku zidentyfikowanego jako 8-oxodGMP. Otworzyło to nowy etap w badaniach nad MutT i przyciągnęło wielką uwagę wielu badaczy zajmujących się stresem oksydacyjnym, a szczególnie oksydacyjnymi uszkodzeniami DNA. Jak dowiedli Maki i Sekiguchi, MutT posiada bardzo wysokie powinowactwo do 8-oxodGTP ($K_m = 0.4 \mu\text{M}$!) co pozwala sądzić, że jego rola polega na hydrolizowaniu tego nukleotydu w celu uchronienia komórki przed mutagennymi skutkami jego wprowadzenia do DNA. Dla porównania, oznaczone przez nich wartości K_m dla innych nukleotydów wynosiły: dla dGTP - 1.2 mM, dTTP - 1.8 mM, dCTP - 1.7 mM, GTP 1.2 mM. 8-OxodGTP jako substrat posiada wszystkie preferowane przez MutT cechy: grupę 6-keto i 2-amino pierścienia purynowego, deoksyrybozę, i konformację *syn* wokół wiązania N-glikozydowego, wymuszoną przez atom tlenu w pozycji C8. Badania ostatnich 3 lat prowadzone technikami krystalograficznymi, a przede wszystkim metodami wielowymiarowego jądrowego rezonansu magnetycznego doprowadziły do szczegółowego rozpoznania struktury drugo- (rys. 8) i trzeciorzędowej MutT (Abeygunawardana i wsp., 1993; Weber i wsp., 1993; Abeygunawardana i wsp., 1995) oraz konstrukcji centrum aktywnego enzymu i jego oddziaływań z substratem (Frick i wsp., 1994; Frick i wsp., 1995).

W ślad za badaniami nad pirofosfatazą 8-oxodGTP (MutT) z *E. coli* rozpoczęły się badania nad homologicznymi enzymami innych gatunków. W 1992 r Mo i wsp. wyizolowali z komórek ludzkich enzym o masie cząsteczkowej 18 kDa, specyficznie hydrolizujący 8-oxodGTP do 8-oxodGMP ($K_m=8.5 \mu\text{M}$), a słabiej dGTP ($K_m=870 \mu\text{M}$) i dATP. Podobnie jak MutT, pirofosfataza ta jest zależna od jonów magnezu. Rok później ustalono częściowo jej sekwencję aminokwasową, co pozwoliło na sklonowanie i ekspresję genu kodującego to białko w komórkach *E. coli* (Sakumi i wsp., 1993). Gen ludzkiej pirofosfatazy 8-oxodGTP, ulokowany w chromosomie 7p22 (Furuichi i wsp., 1994), koduje białko składające się ze 156 aminokwasów (masa cząsteczkowa 17.9 kDa), a jego sekwencja nukleotydowa wykazała duże podobieństwo do bakteryjnego genu *mutT* w centralnej części otwartej ramki odczytu. W języku aminokwasów oznaczało to 15 identycznych aminokwasów w odcinku A37-A61

MutT i A36-A60 pirofosfatazy ludzkiej. Enzym ludzki uznano za homolog białka MutT i nazwano z tej przyczyny hMTH1 (**H**uman **M**utT **H**omolog).



Rys. 8

Zarys struktury drugorzędowej białka MutT z *E. coli*. Odcinki oznaczają pętle, kółka - odcinki α -helikalne, a kwadraciki - pasma struktury β .

W ostatnim czasie sklonowano homologi genu *mutT* z innych źródeł. Tzw. białko MutX ze *Streptococcus pneumoniae* wykazuje analogiczne aktywności enzymatyczne w porównaniu z MutT, jest jednak homotrimerem o masie 54 kDa (masa cząsteczkowa monomeru - 18 kDa). Gen kodujący to białko wykazuje duże podobieństwo do genu *mutT* w odcinku kodującym aminokwasy A37-A60 (Bullions i wsp., 1994; Mejean i wsp., 1994). Podobną homologię struktury genu i funkcji biologicznych kodowanego białka wykazano dla genu i białka MutT z *Proteus vulgaris* (112 aminokwasów, 12.8 kDa) (Kamath i Yanovsky, 1993) i MutT z *Haemophilus influenzae* (136 aminokwasów, 15.6 kDa) (Fleischmann i wsp., 1995). Sklonowano również homologiczne z *mutT* geny dwu gryzoni i scharakteryzowano ich produkty białkowe jako pirofosfatazy 8-oxodGTP. Mysia pirofosfataza 8-oxodGTP, to białko o masie cząsteczkowej 17.9 kDa (156 aminokwasów) wykazująca 83% homologii sekwencji aminokwasowej z ludzką pirofosfatazą, a homologia sekwencji nukleotydowej mysiego i ludzkiego genu sięga 81% (Kakuma i wsp., 1995). Szczurza pirofosfataza 8-oxodGTP (masa cząsteczkowa 18 kDa) posiada 131 identycznych aminokwasów z enzymem ludzkim z ogólnej liczby 156 aminokwasów (Cai i wsp., 1995).

Pojawiły się także pierwsze dane na temat poziomu ekspresji pirofosfatazy 8-oxodGTP w różnych narządach wewnętrznych ssaków. Uzyskanie przeciwciał poliklonalnych do konserwatywnego ewolucyjnie fragmentu pirofosfatazy 8-oxodGTP umożliwiło ilościową analizę poziomu ekspresji tego enzymu w tkankach mysich (Kakuma i wsp., 1995). Relatywnie najwyższy poziom białka pirofosfatazy wykazały wątroba i grasica, niższy

poziom odnotowano w innych narządach: jelicie grubym > jądrach > nerkach > śledzionie > żołądku > płucach > sercu > i mózgu. Zdecydowanie najwyższy poziom białka pirofosfatazy 8-oxodGTP stwierdzono jednak w mysich embrionalnych komórkach pnia, przewyższając on sześciokrotnie poziom zanotowany w wątrobie. Potwierdziło to wcześniejszą tezę, że poziom ekspresji tego białka jest najwyższy w komórkach o charakterze embrionalnym (m.in. nowotworowych, z których po raz pierwszy wyizolowano ssaczy homolog MutT). Skonstruowanie znakowanej sondy opartej na antysensownym RNA pozwoliło na kolorymetryczną ocenę ilości mRNA ludzkiej pirofosfatazy na histologicznych skrawkach ludzkiej skóry i sutka (Wani i D'Ambrosio, 1995). Stwierdzono duże zróżnicowanie poziomu mRNA *hMTH1* w zależności od rodzaju komórek, spośród których największą jego ilość wykazywały komórki charakteryzujące się dużym tempem podziałów mitotycznych. Z kolei w tkankach szczurzych badano ilość transkryptu genu pirofosfatazy 8-oxodGTP (mRNA) i wykazano jego największą produkcję w tkance serca, śledziony, nerki i jąder (Cai i wsp., 1995).

Przeprowadzono również pierwsze badania dotyczące subkomórkowej lokalizacji ludzkiej pirofosfatazy 8-oxodGTP (Kang i wsp., 1995). Ustalono, że enzym zlokalizowany jest w cytoplazmie i mitochondriach. Z całkowitej aktywności komórkowej pirofosfatazy 8-oxodGTP 4% zlokalizowano w mitochondriach. Aktywności specyficzne enzymu w przeliczeniu na mg białka są jednak identyczne w obu tych kompartmentach komórkowych. Jednocześnie nie stwierdzono jakichkolwiek różnic dotyczących cech fizyko-chemicznych enzymu mitochondrialnego i cytozolowego, a kwestia transportu enzymu do mitochondrium pozostaje owiana tajemnicą.

Groźne skutki mutacji w obrębie genów z rodziny mutT zaczęły już przyciągać uwagę badaczy procesów karcynogenezy. Warunkiem zajścia transformacji nowotworowej komórki jest zaistnienie mutacji w wielu genach. Inicjalna mutacja genu - homologu mutT, prowadząca do braku w komórce aktywności pirofosfatazy 8-oxodGTP, mogłaby w sposób bardzo istotny przyspieszyć tempo powstawania mutacji w kolejnych genach, z uwagi na drastyczny skok częstości transwersji typu AT=>CG.

Wu i wsp. (1995) w poszukiwaniu mutacji badali sekwencję nukleotydową genu *hMTH1* (homologu mutT) w genomie ludzkich komórek nowotworowych raka odbytu i porównywali je z sekwencjami nukleotydowymi tego genu w zdrowych komórkach tej samej tkanki. Przebadano 32 przypadki, lecz nie stwierdzono różnic pomiędzy sekwencjami nukleotydowymi genu komórek nowotworowych i odpowiadających im komórek zdrowych.

Przy okazji dowiedziono jednak istnienia polimorfizmu genu hMTH1 w populacji ludzkiej. W dziewięciu przypadkach stwierdzono tranzycję G=>A w obrębie kodonu 83, która prowadzi do zmiany waliny na metioninę w pirofosfatazie 8-oxodGTP (tranzycję taką odnotowali autorzy także w genach hMTH1 ludzi zdrowych). Rzadziej obserwowano tranzycję C=>T w obrębie kodonu 119, która jednak nie prowadzi do zmiany aminokwasu w białkowym produkcie genu.

Okamoto i wsp. (1996) porównywali poziom mRNA *hMTH1* w ludzkiej tkance raka nerki i otaczającej ją tkance, nie zmienionej nowotworowo. Stwierdzono zdecydowanie wyższy poziom transkrypcji genu hMTH1 w komórkach nowotworowych.

W kontekście znaczenia genów - homologów *mutT* dla procesów mutagenyzy i karcynogenezy rozpoczęto również poszukiwania potencjalnych inhibitorów pirofosfatazy 8-oxodGTP wśród znanych czynników karcynogennych. Porter i wsp. (1996; 1996-w druku) donoszą, iż jony niklu (II) - dobrze udokumentowany karcynogen - są niekompetycyjnym inhibitorem bakteryjnej pirofosfatazy 8-oxodGTP z *E. coli* w doświadczeniach przeprowadzonych *in vitro*.

1.14 Rodzina genów *mutT*

Oprócz przedstawionych powyżej genów kodujących pirofosfohydrolazy o dużej specyficzności wobec 8-oxodGTP, do tzw. rodziny genów i białek *mutT*/*MutT* zakwalifikowano również odkryte ostatnio geny kodujące enzymy o nieco innej specyficzności substratowej. Należy do tej rodziny pirofosfataza dinukleotydomowa z *E. coli* (Frick i Bessman, 1995) zależna od dwuwartościowych jonów metali i wykazująca wysoką specyficzność substratową wobec NADH (257 aminokwasów, 29.8 kDa, natywnie - homodimer). Katalizuje ona hydrolizę NADH do AMP i zredukowanego mononukleotydu nikotynamidoadeninowego. Do rodziny *MutT* zakwalifikowano również pirofosfohydrolazę diadenozyno-5',5''-P¹,P⁴-tetrafosforanu (16.8 kDa, 147 aminokwasów), hydrolizującą ten związek do AMP i ATP (Thorne i wsp., 1995). Zidentyfikowano także produkt genu *orf1.9 E. coli*, w którym doszukano się charakterystycznej dla rodziny *MutT* sekwencji aminokwasów (Frick i wsp., 1995). Białko to posiada aktywność specyficznej hydrolazy GDP-mannozy (guanozyno-5'-difosfo- α -D-mannozy) i GDP-glukozy (guanozyno-5'-difosfo- α -D-glukozy). Produktami reakcji przezeń katalizowanej jest GDP oraz wolny cukier. Aktywność jej jest całkowicie zależna od obecności dwuwartościowych jonów metali.

Wszystkie opisane dotychczas geny szeroko pojmowanej rodziny mutT kodują białka posiadające charakterystyczny motyw w sekwencji aminokwasów (Koonin, 1993, Frick i Bessman, 1995):



gdzie G oznacza glicynę, E - kwas glutaminowy, T - treoninę, R - argininę, U oznacza leucynę lub izoleucynę, lub walinę, a X - dowolny aminokwas.

Uważa się, że konserwatywne aminokwasy tego unikalnego motywu odpowiadają za wiązanie nukleotydowego substratu w centrum aktywnym i katalizę reakcji hydrolitycznej wobec pochodnych nukleotydowych. Funkcja konserwatywnego kwasu glutaminowego w pozycji 57 MutT z *E. coli* (oznaczona gwiazdką we wzorze konserwatywnej sekwencji), została zidentyfikowana. Ten ujemnie naładowany aminokwas jest ligandem wiążącym niezbędny jon magnezu w centrum aktywnym enzymu (Lin i wsp., 1996). Aktywność enzymatyczna zmutowanego enzymu, posiadającego w pozycji 57 glutaminę zamiast kwasu glutaminowego jest 100 tys. razy niższa w porównaniu z aktywnością nie zmutowanej wersji białka.

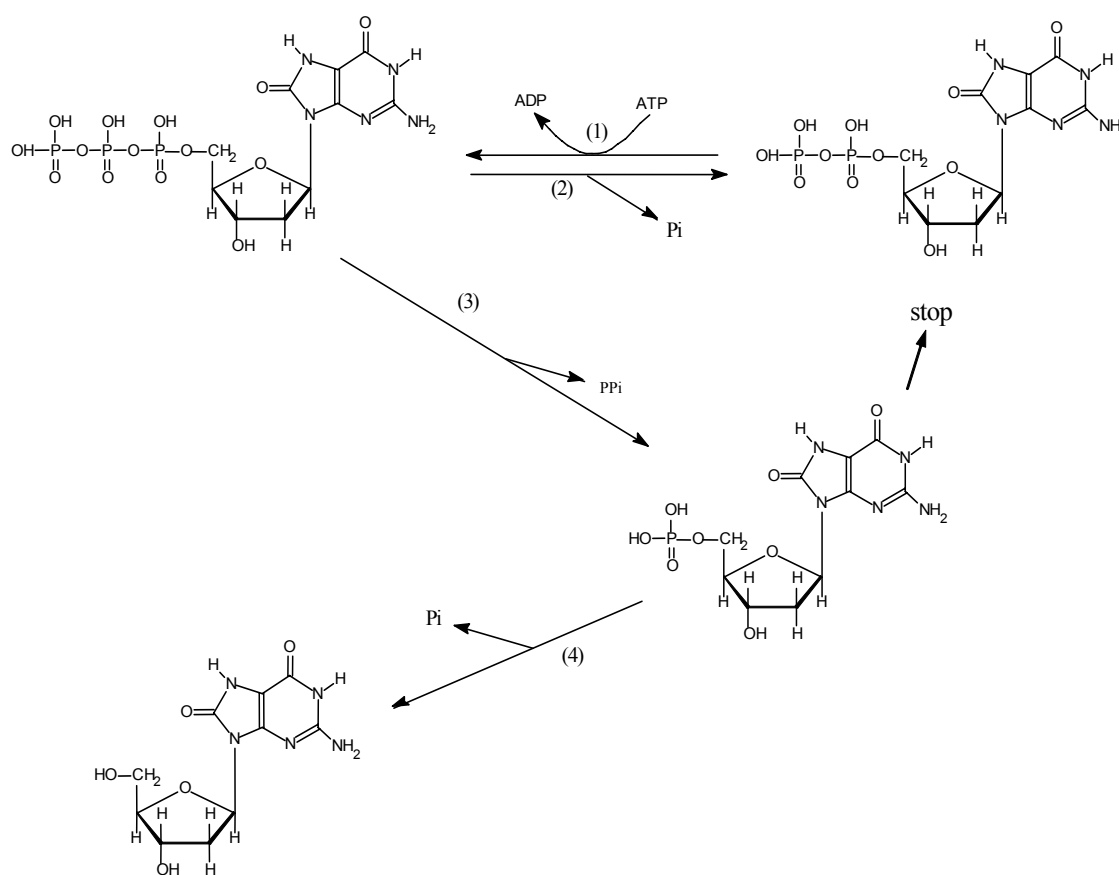
1.15 Metaboliczne losy 8-oksypochodnych nukleotydów deoksyguanozynowych

Scharakteryzowana powyżej pirofosfataza 8-oxodGTP nie jest jedynym enzymem zdolnym do hydrolizowania wiązań fosfodiesterowych tego zmodyfikowanego nukleotydu. We wszystkich dotychczas badanych organizmach, aktywności pirofosfatazy 8-oxodGTP towarzyszy aktywność fosfatazy 8-oxodGTP, która hydrolizuje ten substrat do 8-oxodGDP i ortofosforanu (Mo i wsp., 1992; Maki i Sekiguchi, 1992, Kakuma i wsp., 1995; Cai i wsp., 1995; nie prezentowane obserwacje własne). Ponieważ jednak udowodniono, że enzym ten hydrolizuje z większą wydajnością dGTP niż 8-oxodGTP (Mo. i wsp., 1992), dotychczas nie przyciągnął on uwagi badaczy i pozostaje w cieniu bardzo popularnej pirofosfatazy. Wydaje się jednak, że znaczenie metaboliczne tej aktywności jest jednak niesłusznie bagatelizowane. Poddanie bowiem 8-oxodGTP działaniu homogenatu szczurzej tkanki wątrobowej w pH 8.0 prowadzi do gwałtownej hydrolizy tego związku właśnie do 8-oxodGDP, a ilość powstałego w tym czasie 8-oxodGMP jest bardzo nieznaczna (nie prezentowane obserwacje własne).

Hayakawa i wsp. (1995) udowodnili, że 8-oxodGDP jest substratem dla ludzkiej kinazy difosfonukleozydowej, enzymu o szerokiej specyficzności substratowej, który oprócz klasycznych difosforanów nukleozydów fosforyluje wydajnie 8-oxodGDP z użyciem ATP (8-

oxodGDP + ATP \rightarrow 8-oxodGTP + ADP). Również ci sami autorzy podczyścili i wstępnie scharakteryzowali ludzką fosfatazę degradującą 8-oxodGMP do wolnego nukleozydu - 8-oxodG (Hayakawa i wsp., 1995). Enzym ten wydaje się być wysoce specyficzny dla 8-oxodGMP, ponieważ wydajność hydrolizy 8-oxodGMP jest daleko większa niż w przypadku dGMP > dTMP > dAMP \gg dCMP i GMP. Donoszą oni także, iż ludzka kinaza guanylanowa, która katalizuje zależną od ATP fosforylację dGMP do dGDP oraz GMP do GDP, nie wykazuje żadnej aktywności wobec 8-oxodGMP.

Zawiłości losów metabolicznych 8-oksypochodnych nukleotydów deoksyguanozynowych naszkicowano na rys. 9.



Rys. 9

Szlak przemian metabolicznych 8-oksyo-2'-deoksyguanozyno-5'-trifosforanu.

Pi - ortofosforan, Ppi - pirofosforan, ATP - adenozy-no-5'-trifosforan, ADP - adenozy-no-5'-difosforan,

(1) - kinaza difosfonukleozydowa, (2) - fosfataza 8-oksyo-2'-deoksyguanozyno-5'-trifosforanowa,

(3) - pirofosfataza 8-oksyo-2'-deoksyguanozyno-5'-trifosforanowa (białko hMTH1, homolog MutT),

(4) - fosfataza 8-oksyo-2'-deoksyguanozyno-5'-monofosforanowa

1.16 8-Oksy-2'-deoksyguanozyna i 8-oksyguanina jako wydalane z moczem markery uszkodzeń oksydacyjnych DNA in vivo

Produkty oksydacyjnej modyfikacji guaniny w pozycji C8 są wydalane z moczem zarówno pod postacią wolnej zasady - 8-oksyguaniny jak i w formie deoksynukleozydu 8-oxodG oraz rybonukleozydu 8-oxoG (Shigenaga i wsp., 1994). Opracowanie metody oznaczania 8-oxodG w moczu metodą HPLC z detekcją elektrochemiczną (Shigenaga i wsp., 1989) stało się początkiem kariery 8-oxodG jako, nieinwazyjnego markera naprawy oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Uważa się powszechnie, że obecność 8-oxodG w moczu jest doskonałym odzwierciedleniem procesów naprawy DNA uszkodzanego przez reaktywne formy tlenu. Tymczasem nie zidentyfikowano jeszcze ani jednego enzymu naprawy DNA, który usuwałby 8-oxoGua z DNA w postaci oligonukleotydu, nukleotydu lub nukleozydu, a jedynym pewnym produktem tejże naprawy jest wolna 8-oksyguanina. Wydalana z moczem 8-oxodG mogłaby potencjalnie pochodzić jedynie z procesów degradacji DNA umierających komórek. Ponieważ jednak dostrzeżono, iż ilość wydalanej 8-oxodG zmienia się podczas ekspozycji organizmów na czynniki prooksydacyjne, uznano ją za produkt naprawy DNA.

W ostatnich latach przeprowadzono szereg badań, które dowodzą korelacji pomiędzy podwyższoną ilością 8-oxodG w moczu a ekspozycją organizmu na takie czynniki jak: promieniowanie jonizujące (Bergtold i wsp., 1990; Blount i wsp., 1991), 2-nitropropan, hydrochinon, parakwat (Suzuki i wsp., 1995), benzen (Lagorio i wsp., 1994), dym tytoniowy (Loft i wsp., 1992). Ilość 8-oxodG wydalanej przez przeciętnego człowieka oszacowano na 130-300 pmoli na kilogram masy ciała dziennie. Oznacza to, że komórka ludzkiego organizmu wydala ok. 168 cząsteczek 8-oxodG w ciągu dnia (Park i wsp., 1992).

Zaobserwowano również wyraźną korelację pomiędzy ilością wydalanej z moczem 8-oxodG a tempem metabolizmu w organizmie. Czym wyższe tempo metabolizmu, tym większa ilość wydalanej 8-oxodG. Korelacja ta dotyczy międzygatunkowych różnic w tempie metabolizmu (Shigenaga i wsp., 1989; Loft i wsp., 1993) jak i różnic wewnątrzgatunkowych (Loft i wsp., 1992).

2. CELE PRACY

Celami prezentowanej pracy były:

- synteza 8-oksy-2'-deoksyguanozyny i jej pochodnych fosforanowych: 8-oksy-2'-deoksyguanozyno-5'-monofosforanu i 8-oksy-2'-deoksyguanozyno-5'-trifosforanu.
- określenie wpływu terapeutycznych dawek promieniowania rentgenowskiego na ilość 8-oksy-2'-deoksyguanozyny w limfocytarnym DNA, pochodzącym od pacjentów poddanych radioterapii w przebiegu leczenia schorzeń nowotworowych.
- analiza wpływu oksydacji 2'-deoksyguanozyny w pozycji C8 na stabilność wiązania N-glikozydowego tego nukleozydu.
- zbadanie potencjalnych możliwości degradacji 8-oksy-2'-deoksyguanozyny i 8-oksyguaniny przez enzymy katabolizmu klasycznych nukleozydów i zasad purynowych.
- opracowanie opartej na HPLC metody oznaczania aktywności pirofosfatazy 8-oksy-2'-deoksyguanozyno-5'-trifosforanowej (hMTH1, homologu bakteryjnego białka MutT) oraz przeprowadzenie badań kinetycznych tego enzymu pochodzącego z ludzkich fibroblastów.
- zbadanie wpływu promieniowania jonizującego na aktywność pirofosfatazy 8-oxodGTP hodowanych fibroblastów ludzkich.

3. MATERIAŁY I METODY

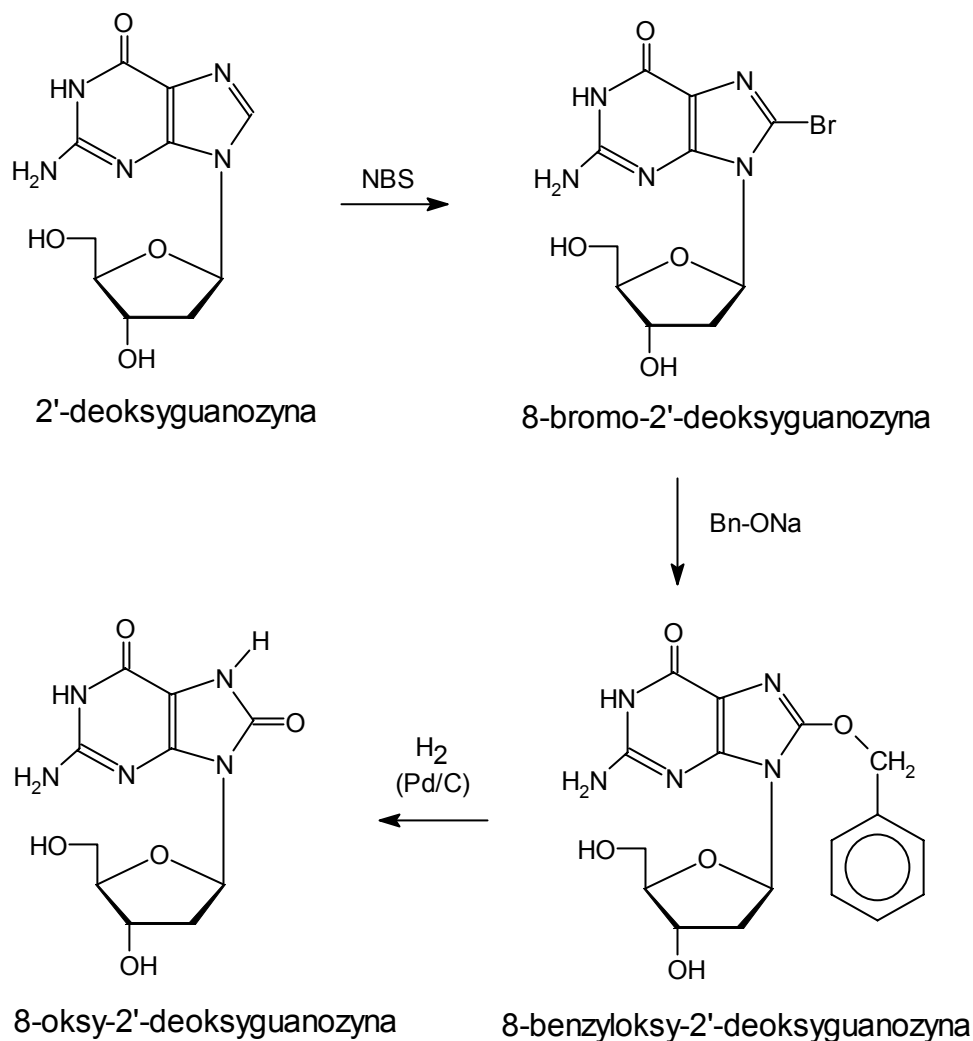
3.1 Odczynniki

Eter etylowy, dimetylosulfotlenek (DMSO), deuterowany dimetylosulfotlenek (d_6 -DMSO), alkohol benzylowy, tris-(hydroksymetylo)aminometan, metanol wysokiej czystości, aceton, kwas solny, octan amonowy oraz 10% pallad na węglu aktywowanym (10%Pd/C) zakupiono w firmie Aldrich (USA). N-Bromobursztynimid, chlorek cynku, 1M wodorowęglan trietyloamoniowy otrzymano z firmy Fluka (Szwajcaria). Katalaza z wątroby wołowej, kwas octowy, kwas askorbinowy, diwodorofosforan sodu, DEAE-celuloza, 2'-deoksyguanozyna, 2'-deoksyguanozyno-5'-monofosforan, 2'-deoksyguanozyno-5'-trifosforan, fosfataza alkaliczna z *Escherichia coli*, fosforan dwusodowy, fosforylaza nukleozydów purynowych z krwi ludzkiej, guanaza z wątroby królika, guanina, ksantyna, kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA), nukleaza P1 z *Penicillium citrinum*, octan sodu, oksydaza ksantynowa z mleka krowiego, proteinaza K z *Tritirachium album* i sól sodowa siarczanu dodecyłu (SDS) pochodziły z firmy Sigma Chemical Co. (USA). 8-Oksyguanina pochodziła z pracowni dr Mirala Dizdaroglu (Chemical Science and Technology Laboratory, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, USA). Wodę o najwyższej klasie czystości pozyskiwano przy użyciu systemu oczyszczania wody EasyPure RF firmy Barnstead/Thermolyne (USA). Nadtlenek wodoru, wodorotlenek sodu oraz pozostałe odczynniki o możliwie najwyższym stopniu czystości pochodziły z P.O.Ch. (Gliwice).

3.2 SYNTEZY POCHODNYCH 8-OKSYGUANINY

3.2.1 Synteza 8-oksy-2'-deoksyguanozyny

Syntezę chemiczną 8-oksy-2'-deoksyguanozyny z 2'-deoksyguanozyny przeprowadzono w trzech etapach według zamieszczonego poniżej schematu (rys. 3.2.1).



Rys. 3.2.1

Etapy syntezy 8-oksyo-2'-deoksyguanozyny z 2'-deoksyguanozyny. NBS - N-bromobursztynimid, Bn-ONa - sól sodowa alkoholu benzylowego, (Pd/C) - 10% pallad na węglu aktywowanym.

3.2.1.1 Synteza 8-bromo-2'-deoksyguanozyny (8-Br-dG)

Bromowanie deoksyguanozyny w pozycji C8 przeprowadzono modyfikując metodę Gannett i Sura (1993). Reakcję prowadzono w szklanej probówce wirowniczej o pojemności 70ml. Do zawiesiny 1 g deoksyguanozyny w 37 ml wody wprowadzono 933 mg N-bromobursztynimidu (NBS) intensywnie mieszając (mieszadło magnetyczne). Po 10 min. prowadzenia reakcji w temperaturze pokojowej (uwaga: temperatura nie powinna przekraczać 24°C) do mieszaniny reakcyjnej dodano 1M wodorowęglanu sodu (ok. 4ml), aż do zobojętnienia zawiesiny (pH 7) pod kontrolą papierka wskaźnikowego. Następnie zawiesinę inkubowano w temperaturze 4°C przez 4 h i wirowano przez 10 min. przy 4000 g, w temp. 4°C. Supernatant odrzucono. Uzyskany osad 8-Br-dG przemyto 5 ml zimnej wody poprzez

zawieszenie w niej osadu, odwirowanie jak wyżej i zdekantowanie supernatantu. W ten sam sposób osad przemyto ostatecznie 5 ml acetonu schłodzonego do -20°C i po odwirowaniu suszono pod próżnią przez kilkanaście godzin. Uzyskano 650 mg preparatu 8-Br-dG.

3.2.1.2 Synteza 8-benzylloksy-2'-deoksyguanozyny (8-Bn-O-dG)

Syntezy 8-Bn-O-dG dokonano zgodnie z metodą Lin i wsp. (1985) z pewnymi modyfikacjami. Reakcję prowadzono w okrągłodennej kolbie trójszyjnej o pojemności 100 ml. Pierwsza szyja służyła jako wlot argonu. Drugą podawano kolejne reagenty, a w czasie prowadzenia reakcji zamknięta była ona gumową septą, przebitą cienką igłą iniekcyjną (ujście dla podawanego argonu). Trzecią szyją wprowadzono do mieszaniny reakcyjnej termometr (kontrola temperatury). Odpowiednią temperaturę zapewniono poprzez umieszczenie kolby w łaźni olejowej. Do kolby wprowadzono 6 ml alkoholu benzylowego oraz 180 mg metalicznego sodu (w postaci małych skrawków uprzednio przemytych pentanem) i utrzymywano temperaturę 60°C ciągle mieszając (mieszadło magnetyczne), aż do rozpuszczenia metalu. Następnie wypełniono kolbę argonem i dodano 16 ml dimetylosulfotlenku (DMSO). Reakcję zainicjowano przez dodanie 800 mg 8-Br-dG rozpuszczonej w 6.4 ml gorącego DMSO i prowadzono przez 22 h w atmosferze argonu, w temperaturze 65°C ciągle mieszając. Po schłodzeniu, mieszaninę reakcyjną zobojętniono (pH 7) lodowatym kwasem octowym i wkroplono do 480 ml eteru etylowego, intensywnie mieszanego za pomocą mieszadła magnetycznego. Powstały, łatwo sedymentujący osad odłączyło od eteru poprzez dekantację, przemyto dwukrotnie 70 ml eteru etylowego i wysuszono, używając wstępnie wyparki z pompką wodną, a następnie komory próżniowej połączonej z pompą olejową. Wysuszony produkt reakcji został rozdzielony do 6 probówek Eppendorfa i przemyty 4-krotnie wodą (pierwszy raz - 300 μl wody na probówkę, kolejne przemycia - 100 μl wody na probówkę). Po każdorazowym zawieszeniu osadu, wodę odłączyło poprzez wirowanie w mikrowirówce przy 7000 g, przez 15 min. w temperaturze pokojowej. Przemyty osad produktu wysuszono pod próżnią, uzyskując 480 mg preparatu 8-Bn-O-dG.

3.2.1.3 Synteza 8-oksy-2'-deoksyguanozyny (8-oxodG)

8-oksy-2'-deoksyguanozynę otrzymano poprzez hydrogenolizę 8-Bn-O-dG stosując standardową metodę redukcji wodorem cząsteczkowym w obecności katalizatora (10% palladu na węglu aktywowanym - 10%Pd/C), według własnej procedury. 200 mg 8-Bn-O-dG rozpuszczono w mieszaninie metanolu (10 ml) i wody (5 ml) w kolbie okrągłodennej o pojemności 50 ml i dodano 100 mg 10%Pd/C. Kolbę zamknięto szczelnie gumową septą i trzykrotnie odpompowano z niej gaz za pomocą pompki wodnej, zastępując powietrze argonem (przebijające septę igły iniekcyjne połączone z węzłem pompki wodnej oraz balonem zawierającym argon). Następnie w ten sam sposób trzykrotnie odpompowano z kolby gaz, zastępując go wodorem podawanym z potrójnego balonu zakończonego igłą. Po ostatnim z tych zabiegów balon z wodorem pozostał połączony z kolbą aż do zakończenia reakcji, którą prowadzono w temperaturze pokojowej przez 24 h burzliwie mieszając zawartość kolby za pomocą mieszadła magnetycznego. Katalizator usunięto poprzez filtrację na sączku z waty szklanej. Filtrat zliofilizowano uzyskując 96 mg preparatu 8-oxodG. Końcowe oczyszczenie preparatu 8-oxodG do stanu pełnej homogenności chromatograficznej uzyskano w trybie chromatografii wysokociśnieniowej na semipreparatywnej kolumnie Supelcosil LC-18-S (10 x 250 mm), stosując elucję izokratyczną 10% MeOH w H₂O przy szybkości przepływu 3 ml/min. Jednorazowo nastrzykiwano na kolumnę 1 mg preparatu 8-oxodG w 200 µl 50% metanolu. Skład zestawu HPLC był identyczny jak w przypadku opisanej poniżej metody jakościowej analizy produktów poszczególnych etapów syntezy.

3.2.2 *Jakościowa analiza chromatograficzna preparatów 8-Br-dG, 8-Bn-O-dG i 8-oxodG na kolumnie Supelcosil LC-18-S*

Przebieg reakcji na poszczególnych etapach syntezy kontrolowano rozdzielając mieszaniny reakcyjne w trybie wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconymi fazami na kolumnie Supelcosil LC-18-S o wymiarach 4.6mm x 250mm, wyposażonej w prekolumnę o długości 20mm. System HPLC firmy Gynkotek składał się z pompy gradientowej typu M180, próżniowego degazera eluentów, autosamplera Gina50 oraz detektora spektralnego z matrycą diodową typu UV-VIS 320S. Stosowano elucję gradientową (gradient liniowy), gdzie eluent A stanowił 5%MeOH w H₂O, a eluent B - 5%H₂O w MeOH:

Czas [min.]	Stężenie % (v/v) eluentu B
0'	0%
15'	100%
20'	100%
21'	0%

Kolejne rozdziały poprzedzało dziesięciominutowe równoważenie kolumny eluentem A. Szybkość przepływu wynosiła 1ml/min. Typowa objętość nastrzyku wynosiła 5-20 μ l. Produkty poszczególnych etapów syntezy rozpuszczano do odpowiedniego stężenia 50% MeOH w H₂O.

3.2.3 Pomiary spektroskopowe jądrowego rezonansu magnetycznego (¹H NMR) preparatów 8-Br-dG, 8-Bn-O-dG i 8-oxodG

Widma jądrowego rezonansu magnetycznego protonów (¹H) wykonano spektroskopem firmy Bükler przy częstotliwości promieniowania elektromagnetycznego 200 MHz w środowisku deuterowanego dimetylosulfotlenku (d₆-DMSO).

3.2.4 Synteza 8-oksy-2'-deoksyguanozyno-5'-monofosforanu (8-oxodGMP)

Do 70 ml wody o oporności 18.3 M Ω / cm dodano 100 mg 2'-deoksyguanozyno-5'-monofosforanu i 172 mg kwasu askorbinowego. Reakcję inicjowano przez dodanie 320 μ l 30%-owego nadtlenku wodoru. Mieszaninę reakcyjną inkubowano w ciemności przy 37°C przez 1h, a następnie reakcję przerywano przez dodanie 0.2 mg katalazy. Po kilku minutach mieszaninę odgazowywano przy pomocy myjki ultradźwiękowej i poddawano niezwłocznie chromatografii na DEAE-celulozie w celu izolacji 8-oxodGMP według poniżej opisanej procedury. Frakcje wykazujące charakterystyczne widmo 8-oxodGMP połączono i odparowano w wyparce (50°C). Większość wodorowęglanu trietyloamoniowego usunięto z preparatu przez kilkakrotne dodanie wody i ponowne odparowanie w wyparce. Uzyskano 1.15 mg 8-oxodGMP.

3.2.5 Chromatografia jonowymienna preparatów fosforanowych pochodnych 8-oksy-2'-deoksyguanozyny na DEAE-celulozie

Mieszaninę reakcyjną o objętości 70 ml filtrowano przy użyciu sącza strzykawkowego o porach 0.22 μm i наносzono na kolumnę DEAE-celulozy o wymiarach 2.5 x 15 cm zrównoważoną buforem startowym (20 mM wodorowęglan trietyloamoniowy, pH 7.4). Kolumnę przemywano 130 ml buforu startowego, a następnie prowadzono elucję gradientową liniowo wzrastającym stężeniem wodorowęglanu trietyloamoniowego od 20 - 110 mM (sumaryczna objętość eluentu użytego do elucji gradientowej wynosiła 2 l, a szybkość przepływu 2.5 ml/min.). Od momentu rozpoczęcia elucji gradientowej zbierano frakcje po 240 kropli, w których dokonywano pomiarów widma absorpcyjnego w zakresie 200 - 320 nm.

3.2.6 Synteza 8-oksy-2'-deoksyguanozyno-5'-trifosforanu (8-oxodGTP)

Do 70 ml wody o oporności 18.3 $\text{M}\Omega / \text{cm}$ dodano 80 mg 2'-deoksyguanozyno-5'-trifosforanu i 172 mg kwasu askorbinowego. Reakcję inicjowano przez dodanie 320 μl 30%-owego nadtlenu wodoru. Mieszaninę reakcyjną inkubowano w ciemności przy 37°C przez 1h, a następnie reakcję przerywano przez dodanie 0.2 mg katalazy. Po kilku minutach mieszaninę odgazowywano przy pomocy myjki ultradźwiękowej i poddawano niezwłocznie chromatografii na DEAE-celulozie w celu izolacji 8-oxodGTP. Rozdziału dokonano jak w przypadku izolacji 8-oxodGMP, ale po naniesieniu preparatu kolumnę przemyto 240 ml buforu startowego, a elucję gradientową prowadzono podnosząc liniowo stężenie wodorowęglanu trietyloamoniowego od 20 do 140 mM w 2 litrach eluentu. Frakcje wykazujące widmo charakterystyczne dla pochodnych 8-oxodG, eluujące się po dGTP - połączono i odparowywano kilkakrotnie w wyparce (45°C) każdorazowo dodając niewielką ilość wody. Ostatecznie roztwór 8-oxodGTP zagęszczono do obj. 3.5 ml i zamrożono w -80°C. Uzyskano 1 mg 8-oxodGTP.

3.2.7 Chromatograficzna analiza czystości preparatów 8-oxodGMP i 8-oxodGTP

Jakościowej analizy chromatograficznej preparatów zawierających fosforanowe pochodne 8-oksydeoksyguanozyny dokonywano w trybie chromatografii wysokociśnieniowej

na kolumnie Supelcosil LC-18-T o wymiarach 4.6 x 250 mm, wyposażonej w prekolumnę 20mm długości. System HPLC firmy Gynkotek składał się z pompy gradientowej typu M180, próżniowego degazera eluentów, autosamplera Gina50 oraz detektora spektralnego z matrycą diodową typu UV-VIS 320S. Integracji chromatogramów dokonywano przy długości fali 293 nm. Stosowano elucję izokratyczną 50mM KH₂PO₄, pH 5.5 / MeOH (93 : 7 v/v), a szybkość przepływu wynosiła 1 ml/min.

3.3 OZNACZENIA POZIOMU 8-OKSY-2'-DEOKSYGUANOZYN W LIMFOCYTARNYM DNA PACJENTÓW PODDAWANYCH RADIOTERAPII

3.3.1 *Material do badań*

Próbki krwi, pobierane przy okazji rutynowych badań przeprowadzanych przed i po zakończeniu radioterapii, pochodziły od czterech mężczyzn (wiek od 55 do 63 lat) chorych na raka. Pacjenci (A, B, C - rak płuc, D -rak odbytu) byli naświetlani promieniowaniem X o energii 300 keV i otrzymali sumaryczną dawkę 3000 cGy podczas piętnastu ekspozycji (jednorazowa dawka 200 cGy).

3.3.2 *Izolacja limfocytów krwi obwodowej*

Krew z żyły łokciowej (10 ml) pobierano bezpośrednio przed rozpoczęciem radioterapii i zaraz po ostatniej ekspozycji na promieniowanie X, do próbek zawierających EDTA. Krew po dwukrotnym rozcieńczeniu roztworem soli fizjologicznej nawarstwiano na 2.5 ml Gradisolu L (Polfa, Kutno) w próbkach wirowniczych, w celu wyizolowania limfocytów poprzez wirowanie przy 230 x g, przez 15 min. w temperaturze 4°C. Limfocyty zbierające się na granicy faz o różnej gęstości odsysano za pomocą pipety pasteurowskiej i po przepłukaniu roztworem soli fizjologicznej poddawano procedurze izolacji DNA. Ocena mikroskopowa potwierdziła, iż 95% komórek izolowanych w ten sposób to limfocyty.

3.3.3 *Izolacja limfocytarnego DNA*

Izolacji DNA dokonywano przy użyciu metody opisanej przez Millera i wsp. (1988) z niewielkimi modyfikacjami. Wyizolowane limfocyty zawieszano w 3 ml buforu lizującego

(10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8.2) i trawiono przez 4 h w 37°C (w ciemności) po dodaniu 0.2 ml 10% SDS i 0.5 ml roztworu 1% SDS, 2 mM EDTA zawierającego 1 mg proteinazy K. Następnie wytrącano białko przez dodanie 1.5 ml nasyconego roztworu NaCl i odwirowanie przez 15 min. przy 2000 x g, w 4°C. Supernatant zawierający kwasy nukleinowe traktowano 2 objętościami schłodzonego (-20°C) alkoholu etylowego w celu wytrącenia wysokopolimeryzowanego DNA. Żelowy osad DNA izolowano za pomocą bagietki, przemywano 70%-owym metanolem i rozpuszczano w 220 µl H₂O. Stężenie DNA w tak otrzymanych preparatach oznaczano spektrofotometrycznie przyjmując, iż jedna jednostka absorbancji przy 260 nm odpowiada stężeniu DNA 50 µg/ml. Następnie preparaty DNA zamrażano w -70°C.

3.3.4 Enzymatyczna hydroliza DNA do nukleozydów

Enzymatyczną hydrolizę DNA przeprowadzono wzorując się na oryginalnej metodzie opisanej przez Kasai i wsp. (1986). Do preparatów DNA o objętości 200 µl, zawierających od 100 do 300 µg DNA, dodawano 100 µl 40 mM buforu octan sodu - kwas octowy, 0.1 mM ZnCl₂, pH 5.1 i 20 µl roztworu nukleazy P1 (20 µg białka). Próby inkubowano przez 1 h w 37°C (etap hydrolizy do 3'-monofosfonukleozydów). Następnie do każdej próby dodawano 30 µl 1 M buforu Tris-HCl, pH 7.4, 5 µl roztworu alkalicznej fosfatazy (1.3 jednostki) i inkubowano przez 1 h w 37°C (hydroliza monofosfonukleozydów do nukleozydów). Wszystkie hydrolizaty DNA zostały przefiltrowane przez membrany o odcięciu 5 kDa (filtry wirówkowe Ultrafree MC, Millipore, USA) i tak uzyskane preparaty nukleozydów poddawane były analizie chromatograficznej w celu ilościowego oznaczenia 8-oksyo-2'-deoksyguanozyny i 2'-deoksyguanozyny.

3.3.5 Oznaczenia 8-oksyo-2'-deoksyguanozyny i 2'-deoksyguanozyny w hydrolizatach DNA.

8-oxodG i dG w hydrolizatach DNA oznaczono w dwu powtórzeniach przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detekcją UV i elektrochemiczną, w trybie chromatografii z odwróconymi fazami. System HPLC składał się z pompy firmy LKB (Szwecja) typu 2150, dozownika prób typu Rheodyne 7125 (pętla 20 µl), kolumny Spherisorb ODS-2 o wymiarach 4.6 x 250 mm (ziarno 5 µm) wyposażonej w 10 mm prekolumnę oraz

dwu detektorów pracujących w układzie szeregowym: spektralnego detektora UV z matrycą diodową (LKB, typ 2140) oraz elektrochemicznego detektora kulometrycznego Coulochem II 5200A firmy ESA Inc. (USA). Nukleozydy hydrolizatów DNA (ekwiwalent 30 μg DNA w 20 μl) rozdzielano stosując elucję izokratyczną 20 mM octanem amonowym, pH 5.3 / MeOH (85:15 v/v). Detekcji dG dokonywano przy użyciu detektora UV, przy długości fali 290 nm, a detekcji 8-oxodG przy użyciu detektora elektrochemicznego pracującego przy następujących parametrach: potencjał elektrody osłonowej - 450 mV, potencjał pierwszej elektrody roboczej, pracującej jako elektroda ekranująca - 130 mV, potencjał drugiej elektrody roboczej, z której zbierano właściwy sygnał - 400 mV; czułość 50 nA/V. Akwizycji chromatogramów oraz ich integracji dokonywano za pomocą programu „Knauer HPLC software 2.21”. Kalibracji dokonano za pomocą roztworów wzorców dG i 8-oxodG o znanych stężeniach, wyznaczonych spektrofotometrycznie w oparciu o współczynniki absorbancji molowej (patrz rozdz. 3.3.1) dla obu związków. Ilość 8-oxodG w DNA wyrażono poprzez liczbę cząsteczek 8-oxodG przypadającą na 100 000 cząsteczek dG.

3.4 BADANIA STABILNOŚCI WIĄZAŃ N-GLIKOZYDOWYCH NUKLEOZYDÓW

3.4.1 Hydroliza wiązań N-glikozydowych nukleozydów

Przygotowano wodne roztwory 2'-deoksyguanozyny i 8-oksy-2'-deoksyguanozyny o stężeniu 1mg/ml. Dokładne stężenia molowe obu związków w roztworach wzorcowych oznaczono spektrofotometrycznie używając współczynników absorbancji molowej, dla 2'-deoksyguanozyny $\epsilon=13700$ przy długości fali 252nm, dla 8-oksy-2'-deoksyguanozyny $\epsilon=12300$ przy długości fali 245nm. Mierzono absorbancję trzech niezależnych rozcieńczeń roztworów wzorcowych, a otrzymane wyniki uśredniono.

Jeden mililitr mieszaniny zawierającej odpowiedni bufor lub kwas solny, 0.75 mM dG i 0.75mM 8-oxodG inkubowano we wrzącej łaźni wodnej w szczelnie zamkniętych probówkach polipropylenowych. Po każdej godzinie inkubacji próbówki gwałtownie ochładzano i pobierano 20 μl mieszaniny inkubacyjnej, którą natychmiast poddawano rozdziałowi chromatograficznemu w celu oznaczenia ubytku stężenia obu nukleozydów spowodowanego ich hydrolizą do wolnej zasady i deoksyrybozy.

3.4.2 *Analiza chromatograficzna hydrolizatów dG i 8-oxodG*

Do analizy jakościowej i ilościowej mieszanin inkubacyjnych użyto systemu wysokosprawnej chromatografii cieczowej firmy LKB (Szwecja). System HPLC składał się z dwóch pomp typu 2150, spektralnego detektora UV typu 2140, dozownika prób typu 7125 firmy Rheodyne wyposażonego w pętlę o pojemności 20 µl. Rozdziałów dokonywano stosując chromatografię z odwróconymi fazami na kolumnie Spherisorb ODS-2 o długości 250 mm i średnicy 4.6 mm, wypełnionej złożem o średniej wielkości ziarna 5 µm. Zastosowano prekolumnę o długości 10 mm wypełnioną takim samym złożem chromatograficznym. Elucję prowadzono izokratycznie roztworem o następującym składzie: 20 mM octan amonowy o pH 5.1 / metanol (9:1). Szybkość przepływu wynosiła 1 ml/min. Krzywą zależności pomiędzy polem powierzchni pików a ilością związku naniesionego na kolumnę wykonano na podstawie nastrzyków kalibracyjnych 15, 7.5, i 3.75 nmola obu z analizowanych nukleozydów. Rejestracji i integracji chromatogramów dokonywano przy użyciu programu LKB Wavescan EG 1.08 oraz programu Knauer HPLC, wersja 2.21.

3.5 8-OKSY-2'-DEOKSYGUANOZYNA I 8-OKSYGUANINA A KLASYCZNY SZLAK KATABOLIZMU NUKLEOZYDÓW PURYNOWYCH

3.5.1 *Oznaczenia aktywności fosforylasy nukleozydów purynowych wobec 2'-deoksyguanozyny i 8-oksy-2'-deoksyguanozyny*

Mieszaniny reakcyjne o całkowitej objętości 220 µl zawierały dG lub 8-oxodG w stężeniu 0.32 mM, 50 mM bufor Tris-HCl + 2.5 mM Na₂HPO₄, pH 7.4 i 10 µg ludzkiej fosforylasy nukleozydów purynowych. Reakcję inicjowano poprzez dodanie enzymu i prowadzono w szczelnie zamkniętych fiolkach, w temperaturze 25°C, z których w ściśle określonym czasie pobierano po 20 µl mieszaniny reakcyjnej i bezzwłocznie chromatografowano (przerwanie reakcji w pobranej części mieszaniny następowało natychmiast po jej nastrzyknięciu na kolumnę HPLC, poprzez rozdzielenie substratu od enzymu). W przypadku reakcji fosforylasy z dG, ilościowej i jakościowej analizy składu mieszaniny reakcyjnej dokonano po 2, 18, 33, 47, 61, 75, 89 i 103 minutach od zainicjowania reakcji. Próbę zerową stanowiła identyczna mieszanina dG i buforu inkubowana przez 103 min. w 25°C, do której zamiast roztworu fosforylasy dodano wodę. W przypadku reakcji

fosforylasy z 8-oxodG skład mieszaniny reakcyjnej analizowano po 2, 4, 6, 8, 10, 12 i 14 godzinach inkubacji, a próbę zerową przygotowano analogicznie jak dla reakcji fosforylasy z dG.

W celu jakościowej i ilościowej analizy substratów i produktów reakcji użyto systemu wysokosprawnej chromatografii cieczowej złożonego z pompy gradientowej typu M180, próżniowego degazera eluentów, autosamplera Gina50, detektora spektralnego z matrycą diodową typu UV-VIS 320S oraz komputerowej stacji naboru i obróbki danych. Chromatografię z odwróconymi fazami prowadzono na kolumnie Supelcosil LC-18-S o wymiarach 250 x 4.6 mm wyposażonej w prekolumnę (20 mm), stosując elucję izokratyczną 10%-owym metanolem / H₂O, przy szybkości przepływu 1 ml/min.

3.5.2 Oznaczenia aktywności guanazy (aminohydrolazy guaninowej) wobec guaniny i 8-oksoguaniny

Mieszaniny reakcyjne o całkowitej objętości 110 µl zawierały 20 µM guaninę (Gua) lub 8-oksoguaninę (8-oxoGua), 100 mM bufor Tris-HCl, pH 7.4 i 15 µg guanazy. Reakcję inicjowano poprzez dodanie enzymu i prowadzono w szczelnie zamkniętych fiolkach, w temperaturze 25°C, z których w ściśle określonym czasie pobierano po 20 µl mieszaniny reakcyjnej i bezzwłocznie chromatografowano (przerwanie reakcji w pobranej części mieszaniny następowało natychmiast po jej nastrzyknięciu na kolumnę HPLC, poprzez rozdzielenie substratu od enzymu). W przypadku pomiarów aktywności guanazy wobec guaniny, jakościowej i ilościowej analizy mieszaniny reakcyjnej dokonano po 5, 25 i 45 minutach od zainicjowania reakcji. Próbę zerową stanowiła identyczna mieszanina guaniny i buforu inkubowana przez 45 min. w 25°C, do której zamiast roztworu guanazy dodano wodę. W przypadku badania potencjalnej aktywności guanazy wobec 8-oxoGua skład mieszaniny reakcyjnej analizowano po 5, 65, 125, 185 i 245 minutach inkubacji, a próbę zerową przygotowano analogicznie jak dla reakcji guanazy z guaniną.

Do celu jakościowej i ilościowej analizy substratów i produktów reakcji użyto systemu wysokosprawnej chromatografii cieczowej (konfiguracja systemu jak opisano w rozdz. 3.2.2) Chromatografię z odwróconymi fazami prowadzono na kolumnie Supelcosil LC-18-S o wymiarach 250 x 4.6 mm wyposażonej w prekolumnę (20 mm), stosując elucję izokratyczną 50 mM buforem fosforanowym o pH 5.5, zawierającym 5% metanol. Szybkość przepływu wynosiła 1 ml/min.

3.5.3 Oznaczenia aktywności oksydazy ksantynowej wobec ksantyny i guaniny

Mieszaniny reakcyjne o całkowitej objętości 115 μ l zawierały 25 μ M ksantynę lub guaninę, 100 mM bufor Tris-HCl, pH 7.5 i 7 μ g oksydazy ksantynowej. Reakcję inicjowano poprzez dodanie enzymu i prowadzono w szczelnie zamkniętych fiolkach, w temperaturze 25°C, z których w ściśle określonym czasie pobierano po 20 μ l mieszaniny reakcyjnej i bezzwłocznie chromatografowano (przerwanie reakcji w pobranej części mieszaniny następowało natychmiast po jej nastrzyknięciu na kolumnę HPLC, poprzez rozdzielenie substratu od enzymu). W przypadku pomiarów aktywności oksydazy ksantynowej wobec ksantyny, jakościowej i ilościowej analizy składu mieszaniny reakcyjnej dokonano po 5, 35, 65, 95 i 125 minutach od zainicjowania reakcji. Próbę zerową stanowiła identyczna mieszanina ksantyny i buforu, inkubowana przez 125 min. w 25°C, do której zamiast roztworu oksydazy ksantynowej dodano wodę. W przypadku badania potencjalnej aktywności oksydazy ksantynowej wobec guaniny mieszaninę reakcyjną chromatografowano po 2, 4, 6, 8 i 10 godzinach inkubacji, a próbę zerową przygotowano analogicznie jak dla reakcji oksydazy ksantynowej z ksantyną.

Do celu jakościowej i ilościowej analizy substratów i produktów reakcji użyto systemu wysokosprawnej chromatografii cieczowej (konfiguracja systemu jak opisano w rozdz. 3.2.2) Chromatografię z odwróconymi fazami prowadzono na kolumnie Supelcosil LC-18-S o wymiarach 250 x 4.6 mm wyposażonej w prekolumnę (20 mm), stosując elucję gradientową (gradient liniowy) według poniższej tabeli, gdzie eluent A stanowił 50 mM bufor fosforanowy, pH 5.5, a eluent B - metanol:

Czas [min.]	Udział procentowy eluentu B
0	0%
10	5%
20	5%
21	0%

Szybkość przepływu wynosiła 1 ml/min, a kolejne rozdziały poprzedzone były 10-cio minutowym równoważeniem kolumny buforem startowym.

3.6 BADANIA KINETYCZNE NAD LUDZKĄ PIROFOSFATAZĄ 8-oxodGTP ORAZ NAD WPLYWEM PROMIENIOWANIA JONIZUJĄCEGO NA JEJ AKTYWNOŚĆ W LUDZKICH FIBROBLASTACH

3.6.1 Hodowla ludzkich fibroblastów

Komórki wszystkich linii ludzkich fibroblastów (VH16, VH25 i VH25A) hodowano w dwu oddzielnych kulturach według procedury opisanej przez Ikushima (1989). Jedną z nich stanowiła kulturę komórek kontrolnych, druga została poddana działaniu promieniowania rentgenowskiego.

3.6.2 Ekspozycja ludzkich fibroblastów na promieniowanie rentgenowskie

Fibroblasty każdej z linii zostały naświetlone w środowisku hodowlanym dawką 5 cGy (20 cGy/min). Po dziesięciu godzinach od pierwszej ekspozycji fibroblasty poddano kolejnemu naświetleniu dawką 10 cGy.

3.6.3 Przygotowanie ekstraktów białek rozpuszczalnych fibroblastów ludzkich

Wszystkie poniższe etapy preparatyki przeprowadzono w temperaturze 4°C. Komórki poszczególnych preparatów fibroblastów (10^7 - 10^8 komórek) naświetlanych i nie naświetlanych prom. X izolowano poprzez wirowanie przez 10 min. przy 2000 x g. Do osadu komórek dodawano 4 ml buforu homogenizacyjnego (20mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM ditiotretitol, 5 % glicerol, 0.5 mM PMSF, 0.5 µg/ml leupeptyna) i homogenizowano w homogenizatorze Dounce'a z użyciem tłoka typu „B”. Homogenaty poddano ultrawiroванию przez 3h, 150000 x g. Uzyskane supernatanty zostały odizolowane od osadu przez ich ostrożne odciągnięcie bez naruszenia warstwy granicznej pomiędzy osadem a supernatantem. Tak przygotowane ekstrakty, zawierające frakcję białek rozpuszczalnych, a pozbawione pozostałości komórkowych i struktur subkomórkowych poddawano trzykrotnej dializie wobec 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.5 mM PMSF, 0.5 µg/ml leupeptyna, w celu usunięcia związków drobnocząsteczkowych. Ekstrakty przechowywano w ciekłym azocie. W ekstraktach tych oznaczono białko, a następnie połowę z objętości każdego ekstraktu poddano ultrafiltracji na membranie o odcięciu 30kDa, wykonanej z regenerowanej celulozy,

charakteryzującej się bardzo słabym wiązaniem białka (Microcentrifuge filters, cut-off 30kDa, Sigma Chemical Co., USA), uzyskując jako przesącz preparaty makromolekuł komórkowych o masie cząsteczkowej zawierającej się pomiędzy 5kDa (dializa) a 30kDa (ultrafiltracja). W tak przygotowanych ultrafiltratach oznaczono w trzech powtórzeniach aktywność pirofosfatazy 8-oxodGTP, którą przeliczono na mg białka ekstraktu białkowego z fibroblastów, (według metody opisanej w rozdziale 3.6.6; uwaga! aktywność przeliczano na ilość białka w ekstrakcie białkowym po dializie, a nie na ilość białka obecnego w ultrafiltracie tegoż ekstraktu).

Ultrafiltraty przygotowywano tuż przed dokonywaniem oznaczeń aktywności enzymatycznej.

3.6.4 Oznaczenia białka w ekstraktach białkowych z fibroblastów ludzkich

Białko oznaczano w trzech powtórzeniach metodą z kwasem bis-cynchoninowym (BCA) według metody opisanej przez Smitha i wsp. (1985), stosując jako białko wzorcowe albuminę surowicy wołowej.

3.6.5 Optymalizacja warunków oznaczania aktywności pirofosfatazy 8-oxodGTP

W celu oznaczenia optymalnego pH dla aktywności pirofosfatazy 8-oxodGTP, analizowano za pomocą HPLC (opis warunków chromatograficznych w rozdziale 3.6.6) ilość powstałego 8-oxodGMP w mieszaninach reakcyjnych o objętości 30 μ l zawierających 40 μ M 8-oxodGTP, 5 mM $MgCl_2$, 70 mM bufor o pH 5.5 - 10.0 oraz ultrafiltrat (30kDa) ekstraktu białka fibroblastów pochodzący z przefiltrowania takiej ilości ekstraktu, która zawierała 2.9 μ g białka. Reakcję inicjowano przez dodanie ultrafiltratu ekstraktu białkowego (inkubacja przez 60 min. w temp. 37°C) i przerywano poprzez dodanie 10 μ l 50mM EDTA. Aktywność enzymu oznaczono w pH 5.5, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5 i 10.0, stosując bufor Tris-octan dla zakresu 5.5 - 6.5, a bufor Tris-HCl dla zakresu 7.0 - 10.0.

W celu ustalenia odpowiedniego czasu prowadzenia reakcji enzymatycznej, tak aby stężenie produktu (8-oxodGMP lub dGMP w zależności od użytego substratu) wzrastało liniowo w obranym czasie, zbadano kinetykę przyrostu produktu w czasie od 0 do 120 min., stosując tę samą proporcję ilości enzymu do stężenia substratu, jak w powyżej opisanym eksperymencie. W temperaturze 37°C inkubowano mieszaninę (150 μ l) zawierającą 40 μ M 8-oxodGTP (lub dGTP), 5 mM $MgCl_2$, 70 mM Tris-HCl, pH 8.5 oraz ultrafiltrat (30kDa)

ekstraktu białka fibroblastów pochodzący z przefiltrowania takiej ilości ekstraktu, która zawierała 14.5 μg białka. W odstępach 20 minutowych pobierano 20 μl mieszaniny reakcyjnej i bezzwłocznie chromatografowano (opis warunków chromatograficznych w rozdziale 3.6.6) w celu oznaczenia ilości powstałego produktu reakcji.

3.6.6 Oznaczenia aktywności pirofosfatazy 8-oxodGTP (białka hMTH1)

Reakcje prowadzono w probówkach Eppendorfa. Standardowo mieszaniny reakcyjne o całkowitej objętości 30 μl zawierały 40 μM 8-oxodGTP, 70 mM Tris-HCl, pH 8.5, 5 mM MgCl_2 oraz ultrafiltrat (odcięcie - 30kDa) ekstraktu białkowego z fibroblastów (5 μl w ogólnej objętości 30 μl ; uwaga! stężenie białka w ekstraktach białkowych poddawanych następnie ultrafiltracji wahało się od 230 do 580 $\mu\text{g/ml}$). Reakcję inicjowano poprzez dodanie ultrafiltratu ekstraktu białkowego z fibroblastów, następnie próby inkubowano przez 120 min. w temperaturze 37°C. Reakcję przerywano przez dodanie do mieszanin reakcyjnych 10 μl 50 mM EDTA (uwaga! po przerwaniu reakcji, próby należy poddać wirowaniu w mikrowirówce w celu ponownego włączenia do roztworu niewielkich ilości wody skraplającej się na ściankach probówek). W przypadku prób zerowych, EDTA dodawano do mieszanin reakcyjnych przed wprowadzeniem enzymu do próby.

Następnie 20 μl mieszaniny reakcyjnej analizowano za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), w celu oznaczenia ilości powstałego w próbie 8-oxodGMP (produkt reakcji). Zestaw HPLC składał się z elementów opisanych w rozdziale 3.2.2. Rozdziału mieszanin reakcyjnych dokonywano na kolumnie Supelcosil LC-18-T (4.6 x 250 mm) firmy Supelco (Szwajcaria) wyposażonej w prekolumnę (20 mm). Elucję prowadzono 100 mM NaH_2PO_4 - NaOH, pH 5.5 / metanol (95:5 v/v) przy szybkości przepływu 1 ml/ min. Detekcję prowadzono w zakresie 200-350 nm z użyciem spektralnego detektora diodowego, dającego możliwość wykreślenia chromatogramu przy każdej długości fali z zakresu 200-350 nm oraz widma w tym zakresie dla dowolnego punktu czasowego rejestracji chromatograficznej. Oznaczeń ilościowych produktu reakcji (8-oxodGMP) dokonano na podstawie nastrożków kalibracyjnych znanych ilości czystego, zsyntetyzowanego 8-oxodGMP (dla oznaczeń ilościowych integrowano chromatogramy rejestrowane przy długości fali 293 nm - lokalne maksimum pochłaniania pochodnych 8-oksoguaniny). Aktywność enzymatyczną wyliczano jako ilość pikomoli 8-oxodGMP powstającej w próbie w ciągu 1 min., w warunkach reakcji. Jednostkę aktywności enzymu zdefiniowano jako ilość

enzymu hydrolizującą 1 pikomol substratu w czasie 1 min., w opracowanych warunkach reakcji.

Oznaczenia aktywności pirofosfatazowej wobec dGTP przeprowadzono w identyczny sposób, stosując jako substrat handlowy preparat dGTP (również w stężeniu 40 μM), a jako wzorzec produktu reakcji handlowy preparat dGMP. Rozdziały chromatograficzne mieszanin reakcyjnych wykonywano w takich samych warunkach chromatograficznych jak opisano powyżej. Oznaczenia ilościowe produktu wykonano poprzez integrację chromatogramów zarejestrowanych przy długości fali 252 nm.

3.6.7 Wyznaczanie stałej Michaelisa dla reakcji hydrolizy 8-oxodGTP oraz dGTP przez ludzką pirofosfatazę 8-oxodGTP

W celu wyznaczenia zależności między aktywnością enzymu a stężeniem substratu, aktywność pirofosfatazową oznaczono według opisanej powyżej metody dla następujących stężeń 8-oxodGTP lub dGTP: 10, 20, 40, 80, 120 μM . Jako źródła enzymu użyto ultrafiltratu (odcięcie - 30kDa) ekstraktu białkowego z fibroblastów. Stałą Michaelisa obliczono według metody Lineweavera-Burka.

3.7. SPEKTROSKOPIA ABSORPCYJNA W ZAKRESIE PROMIENIOWANIA ULTRAFIOLETOWEGO I WIDZIALNEGO

Wszystkie klasyczne pomiary spektroskopowe w zakresie promieniowania ultrafioletowego i widzialnego wykonano przy pomocy spektrofotometru firmy Beckman typu DU-65.

4. WYNIKI

4.1 SYNTEZA 8-OKSY-2'-DEOKSYGUANOZYNY ORAZ JEJ POCHODNYCH FOSFORANOWYCH

Najczęściej stosowaną metodą syntezy 8-oksy-2'-deoksyguanozyny do celów analitycznych (oznaczenia 8-oxodG w DNA i moczu) jest bezpośrednia oksydacja deoksyguanozyny (dG) w pozycji C8 przez układy generujące rodnik hydroksylowy. Największą popularnością cieszy się dotychczas oryginalna metoda opisana przez odkrywców 8-oxodG (Kasai i Nishimura, 1984), polegająca na oksydacji dG przez tzw. system Udenfrienda (nasycony tlenem, buforowany - pH 6.8 - roztwór kwasu askorbinowego, EDTA i FeSO₄) i izolacji produktu przy pomocy HPLC. Nieco rzadziej stosowano układy złożone z nadtlenu wodoru i kwasu askorbinowego, a sporadycznie używano w tym celu naświetlania promieniowaniem jonizującym wodnych roztworów dG nasyconych tlenem lub naświetlania światłem białym w obecności fotouczulaczy (system generujący tlen singletowy). Wszystkie te metody posiadają wspólne wady, jakimi są ich niska wydajność i specyficzność.

Zaprezentowana w niniejszej pracy procedura **syntezy 8-oksy-2'-deoksyguanozyny** jest efektem połączenia kilku opisanych dotychczas procedur oraz własnej inwencji. Wszelkie wprowadzone modyfikacje miały na celu maksymalne uproszczenie syntezy i skrócenie czasu potrzebnego na jej przeprowadzenie (np. wyeliminowanie pracochłonnego oczyszczania produktów poszczególnych etapów syntezy).

Zastosowana metoda bromowania dG w pozycji C8 przy użyciu N-bromobursztynimidu prowadzi do niemal ilościowego przekształcenia dG w 8-Br-dG (rys. 4.1). Należy jednak ściśle kontrolować czas reakcji, temperaturę mieszaniny reakcyjnej i - co najważniejsze - w odpowiednim momencie zneutralizować mieszaninę reakcyjną. W przypadku nie przestrzegania opracowanych warunków dochodzi do intensywnej depurynacji 8-Br-dG spowodowanej obniżaniem się pH mieszaniny reakcyjnej. Niezbyt wysoka wydajność reakcji (50%) jest spowodowana utratą części osadu 8-Br-dG w trakcie jego przemywania wodą i acetonem, mającego na celu usunięcie bursztynimidu oraz nie przereagowanego N-bromobursztynimidu. Dzięki temu uniknięto jednak czasochłonnej rekrytalizacji produktu reakcji. Widmo ¹H NMR potwierdza tożsamość zsyntetyzowanej 8-Br-dG, zidentyfikowano wszystkie protony 8-Br-dG oraz wykazano brak protonu

aromatycznego w pozycji C8 (rys. 4.2). Wartości przesunięcia chemicznego dla poszczególnych protonów są zgodne z literaturowymi (Bodepudi i wsp., 1992).

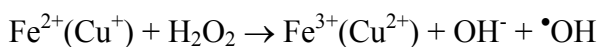
Reakcja benzyloksylacji 8-Br-dG do 8-benzyloksy-2'-deoksyguanozyny (Bn-O-dG) według procedury opisanej przez Wooda i wsp. (1985) prowadzi do ponad 95%-owej konwersji 8-Br-dG do 8-Bn-O-dG (rys. 4.3). Etap rekrystalizacji produktu zastąpiono kilkakrotną ekstrakcją osadu wodą, wykorzystując słabą rozpuszczalność 8-Bn-O-dG w wodzie w porównaniu do rozpuszczalności związków zanieczyszczających (DMSO, octan sodu, alkohol benzylowy). Analiza chromatograficzna otrzymanego preparatu wykazuje dominujący pik 8-Bn-O-dG oraz niewielkie piki pochodzące od 8-Br-dG oraz dG (rys. 4.3). Widmo ^1H NMR potwierdza tożsamość zsyntetyzowanego związku (rys. 4.4), a wartości przesunięcia chemicznego dla poszczególnych protonów 8-Bn-O-dG są zgodne z cytowanymi w literaturze (Bodepudi i wsp., 1992). Wydajność wynosiła 56%.

Ostatni etap syntezy, czyli hydrogenolizę 8-Bn-O-dG za pomocą wodoru cząsteczkowego przeprowadzono zgodnie z opisanymi wcześniej procedurami (Bodepudi i wsp., 1992; Lin i wsp., 1985). Zmodyfikowano jednak procedurę tak, aby uniknąć podawania wodoru pod ciśnieniem 50-60 psi (co czyniło ten etap syntezy kłopotliwym oraz stawiało daleko większe wymagania aparaturowe). Stwierdzono, iż uprzednie usunięcie powietrza ze środowiska reakcyjnego pozwala na wydajne prowadzenie hydrogenolizy przy ciśnieniu wodoru zbliżonym do atmosferycznego. Chromatografia uzyskanego preparatu 8-oksyo-2'-deoksyguanozyny wykazuje, iż ponad 95% 8-Bn-O-dG uległo hydrogenolizie do 8-oxodG (rys. 4.5), jednakże w preparacie obecne są niewielkie ilości związków zanieczyszczających. Wydajność tego etapu obliczona z ilości uzyskanej 8-oxodG przed ostatecznym oczyszczeniem wynosiła 63%. Preparat 8-oxodG oczyszczono do stanu homogenności stosując chromatografię wysokociśnieniową na semipreparatywnej kolumnie z odwróconymi fazami (rys. 4.6). Widmo ^1H NMR uzyskanego preparatu 8-oxodG potwierdza identyfikację powstałego produktu (rys. 4.7).

Przedstawiona procedura syntezy 8-oxodG z dG pozwala uzyskać duże ilości 8-oxodG w stosunkowo krótkim czasie (w dobrze zorganizowanym laboratorium, jedna osoba jest w stanie przeprowadzić taką syntezę w ciągu 7 dni), jej główną zaletą jest to, iż nie zawiera w sobie ani jednego etapu rekrystalizacji i wymaga tylko jednego etapu chromatograficznego oczyszczania finalnego produktu syntezy.

Zastosowana metoda **syntezy 8-oxodGMP oraz 8-oxodGTP** polegająca na bezpośredniej oksydacji w pozycji C8 odpowiednio dGMP i dGTP jest oparta na systemie

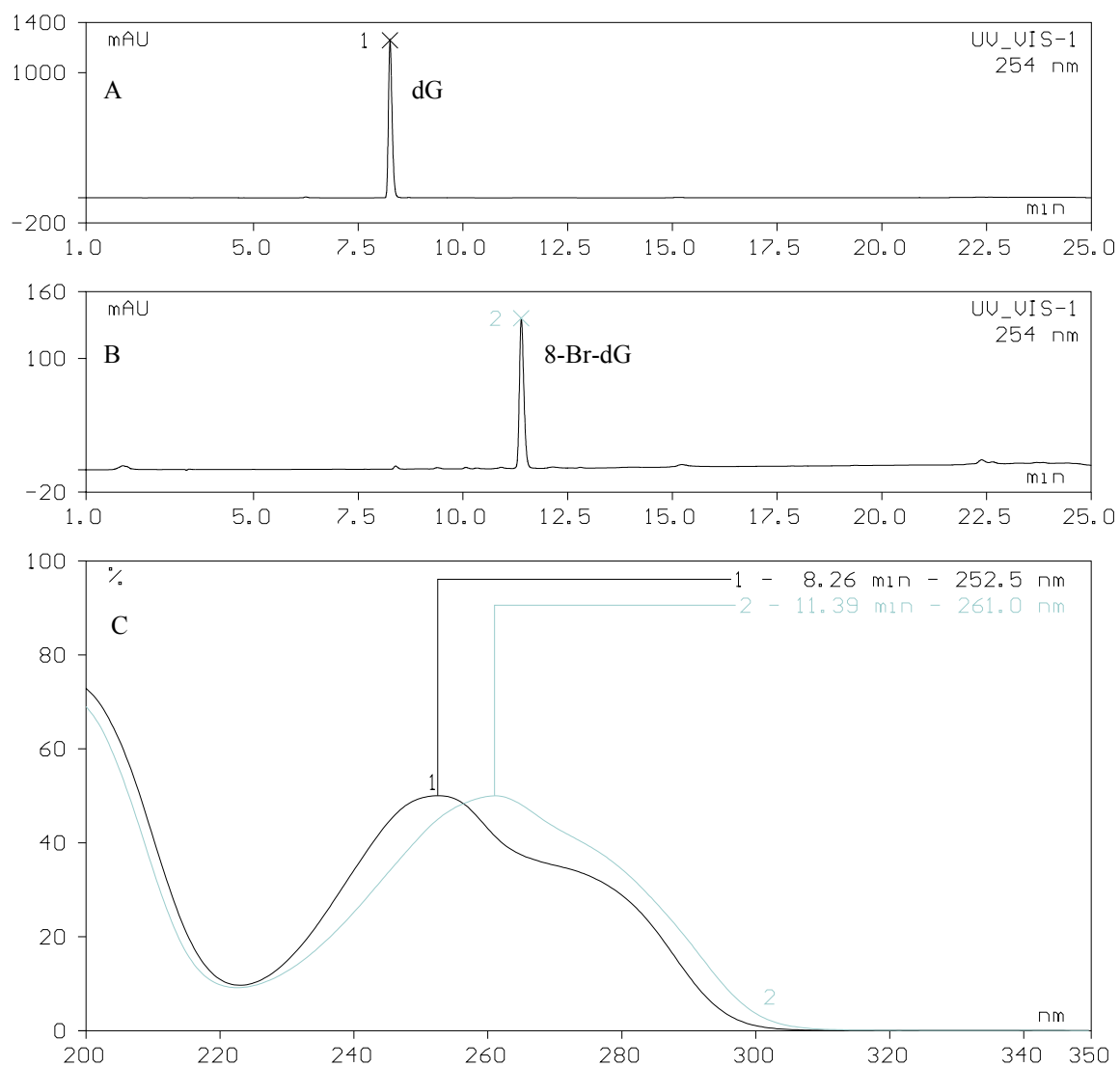
generującym wysoce reaktywny rodnik hydroksylowy powstający w tzw. reakcji Fentona. Śladowe ilości jonów metali grup przejściowych zawarte w mieszaninie reakcyjnej reagują z nadtlenkiem wodoru według reakcji:



Użyty w reakcji kwas askorbinowy redukuje jony metali do niższych stopni utlenienia, umożliwiając im powtórny reakcję z nadtlenkiem wodoru:

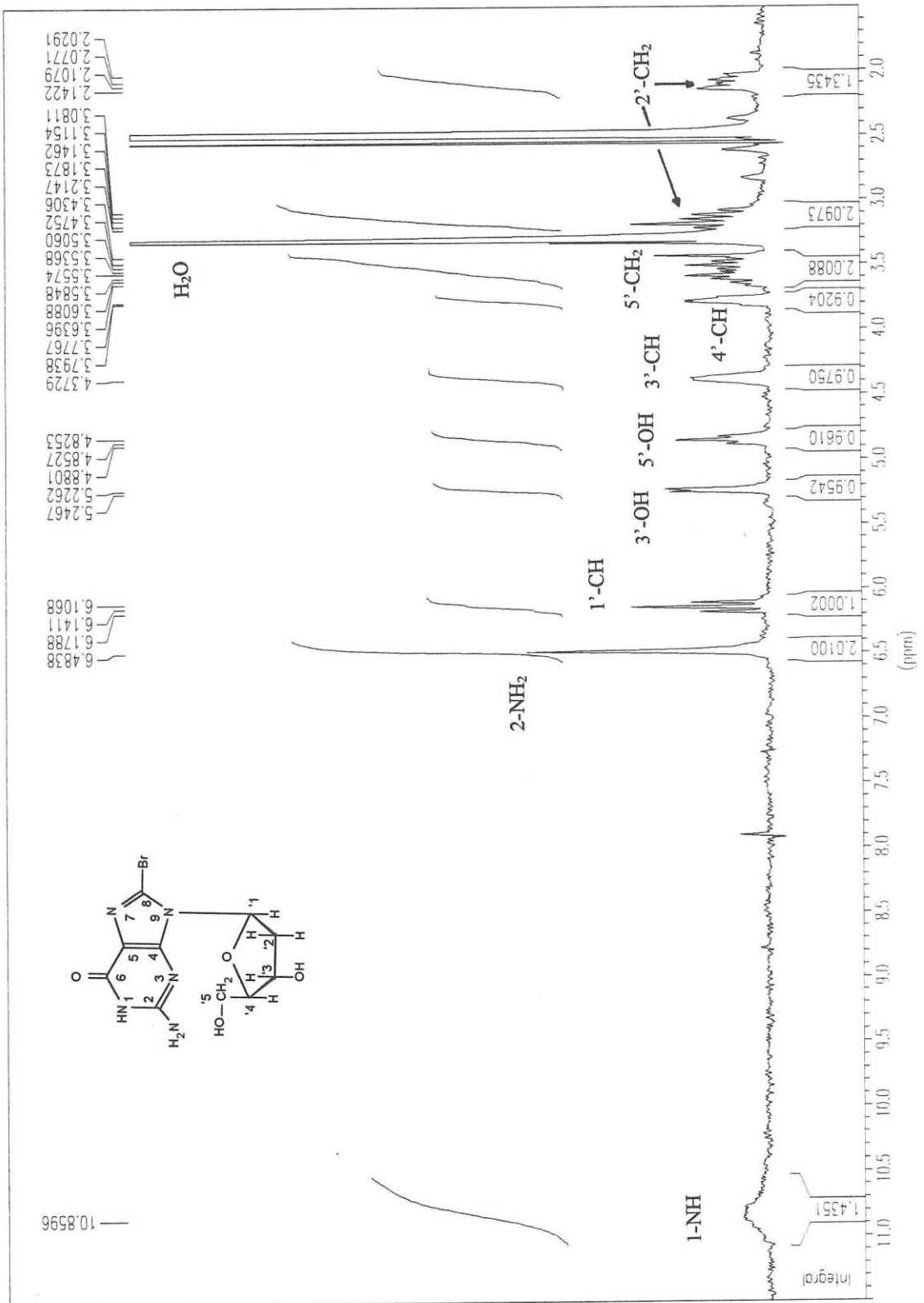


Wadą takiego sposobu syntezy 8-oksypochodnych fosforanów deoksyguanozyny jest niska wydajność (wydajności uzyskane w tej pracy to 1.13 % w przypadku syntezy 8-oxodGMP i 1.3 % dla syntezy 8-oxodGTP). Próby podwyższania tempa tworzenia rodnika hydroksylowego przez układ (poprzez zwiększanie stężenia jonów Fe/Cu) prowadzą niestety do pojawienia się wielu dodatkowych związków, co uniemożliwia właściwe oczyszczenie pożądanego produktu reakcji w trybie chromatografii jonowymiennej na DEAE-celulozie. Metoda pomimo swoich wad pozwala jednak na uzyskanie analitycznych ilości 8-oxodGMP lub 8-oxodGTP w czasie 2 dni. Preparatywna chromatografia jonowymienna na DEAE-celulozie umożliwia całkowity rozdział dGMP od produktu jego oksydacji - 8-oxodGMP, który eluuje się znacznie później (rys. 4.8). Chromatografia uzyskanego preparatu 8-oxodGMP w trybie chromatografii wysokociśnieniowej na kolumnie Supelcosil LC-18-T dowodzi jego czystości (rys. 4.9). Zdecydowanie trudniej jest uzyskać czysty preparat 8-oxodGTP rozdziałając mieszaninę reakcyjną na kolumnie DEAE-celulozy (rys. 4.10), przez co finalny preparat tego związku zawiera nieznaczną ilość dGTP, jak wykazuje analityczna chromatografia wysokociśnieniowa na kolumnie Supelcosil LC-18-T (rys. 4.11).



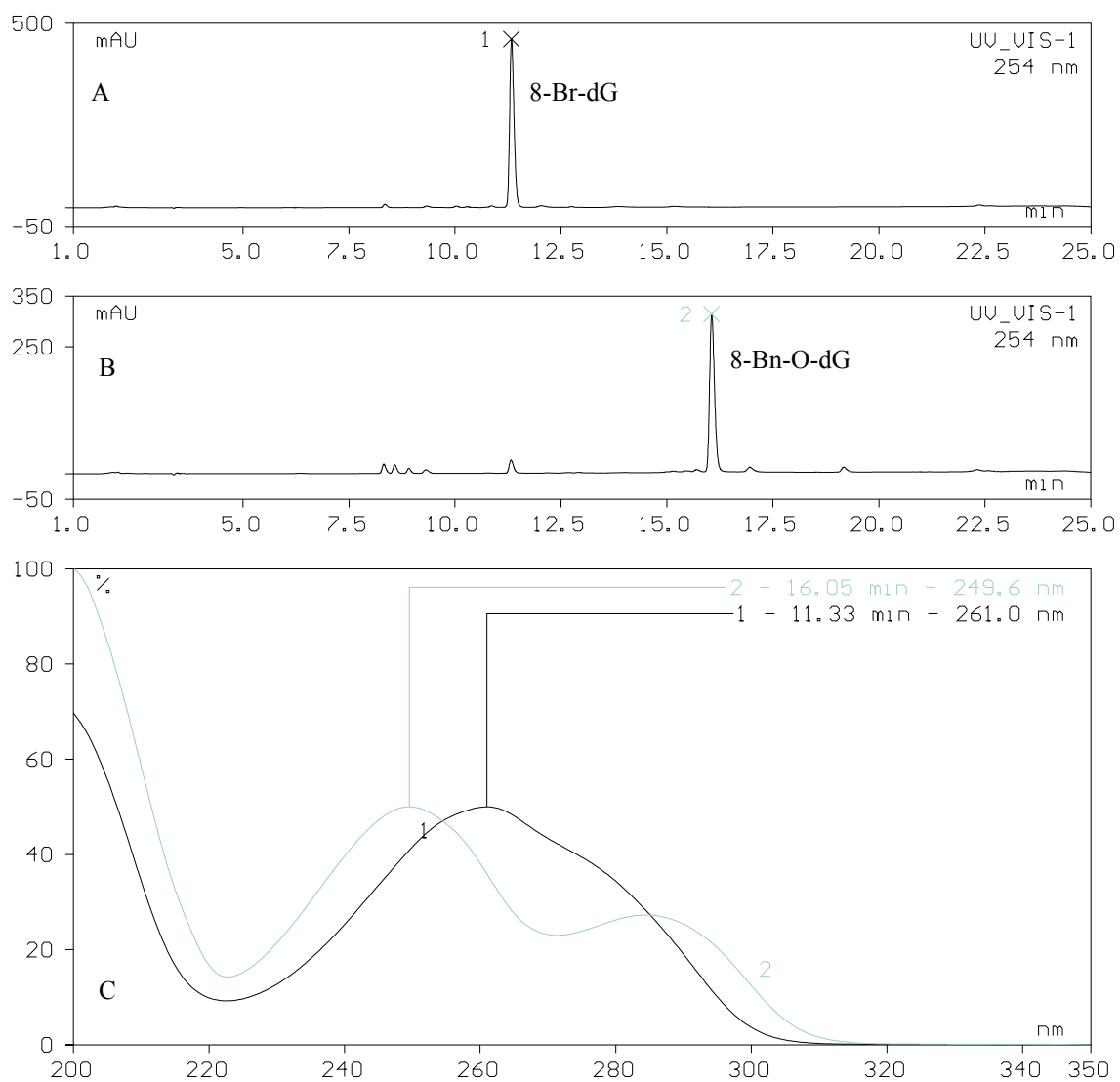
Rys. 4.1

Wysokosprawna chromatografia cieczowa na kolumnie Supelcosil LC-18-S A) handlowego preparatu deoksyguanozyny (dG) jako materiału wyjściowego do syntezy oraz B) preparatu 8-bromo-deoksyguanozyny uzyskanego w reakcji bromowania dG N-bromobursztynimidem. C) Widmo UV dla dG i 8-Br-dG zarejestrowane przez detektor z matrycą diodową w chwili elucji obu związków.



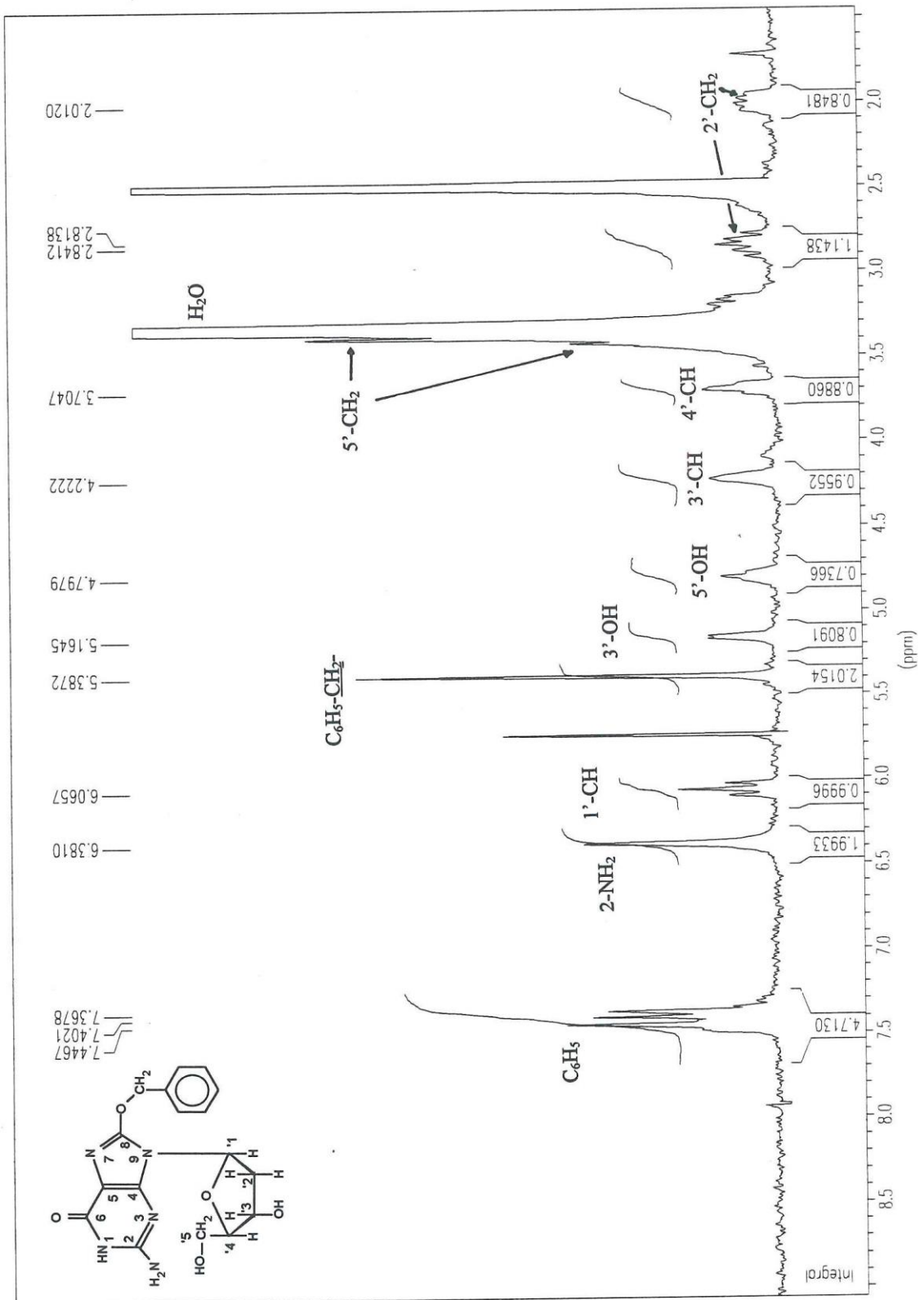
Rys. 4.2

Widmo ^1H NMR preparatu 8-bromo-2'-deoksyguanozyny



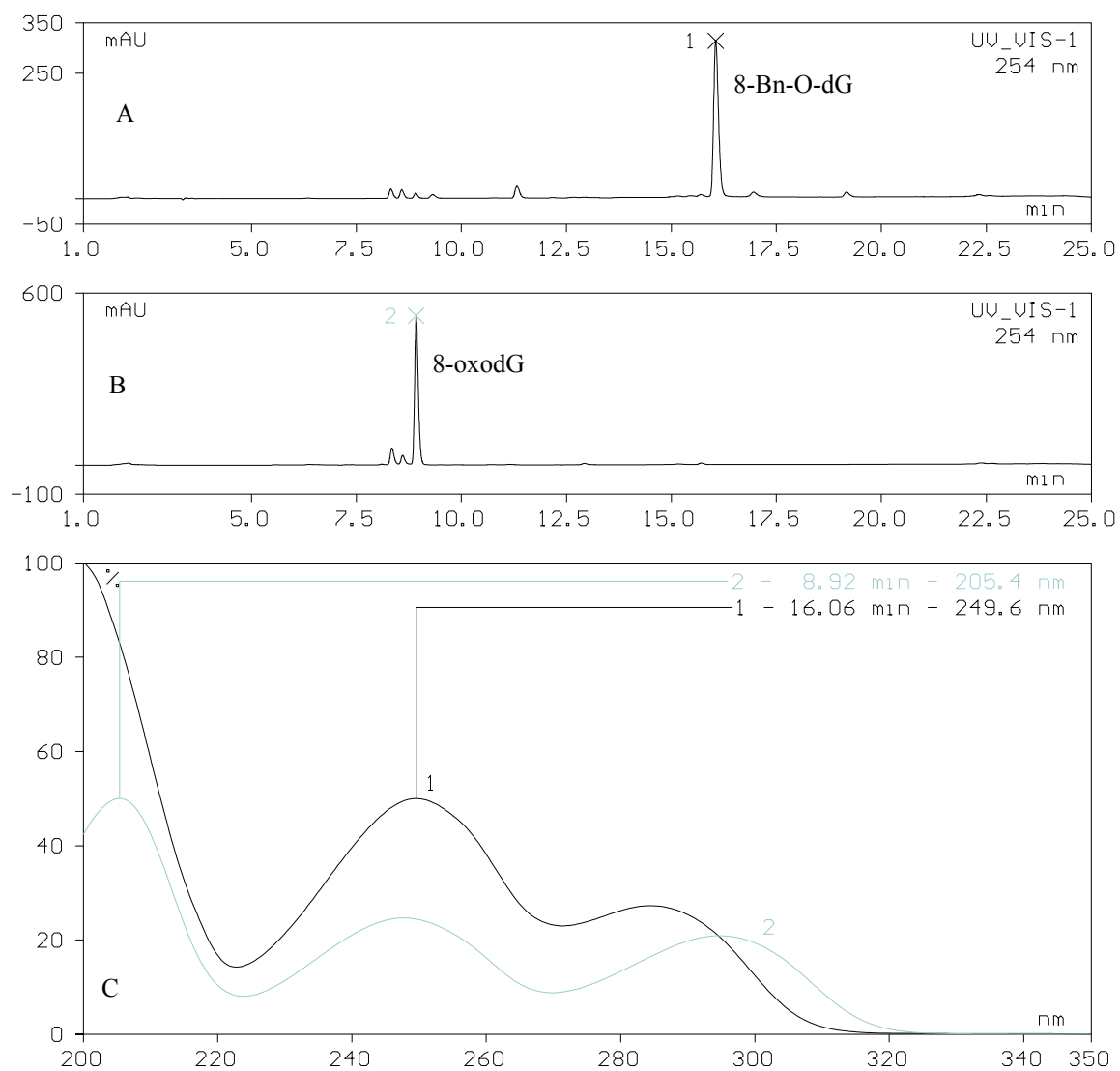
Rys. 4.3

Wysokosprawna chromatografia cieczowa na kolumnie Supelcosil LC-18-S A) preparatu 8-Br-dG użytego do syntezy 8-Bn-O-dG oraz B) uzyskanego w reakcji z solą sodową alkoholu benzyłowego preparatu 8-Bn-O-dG. C) Widma UV obu związków zarejestrowane przez detektor UV-VIS z matrycą diodową w chwili ich elucji.



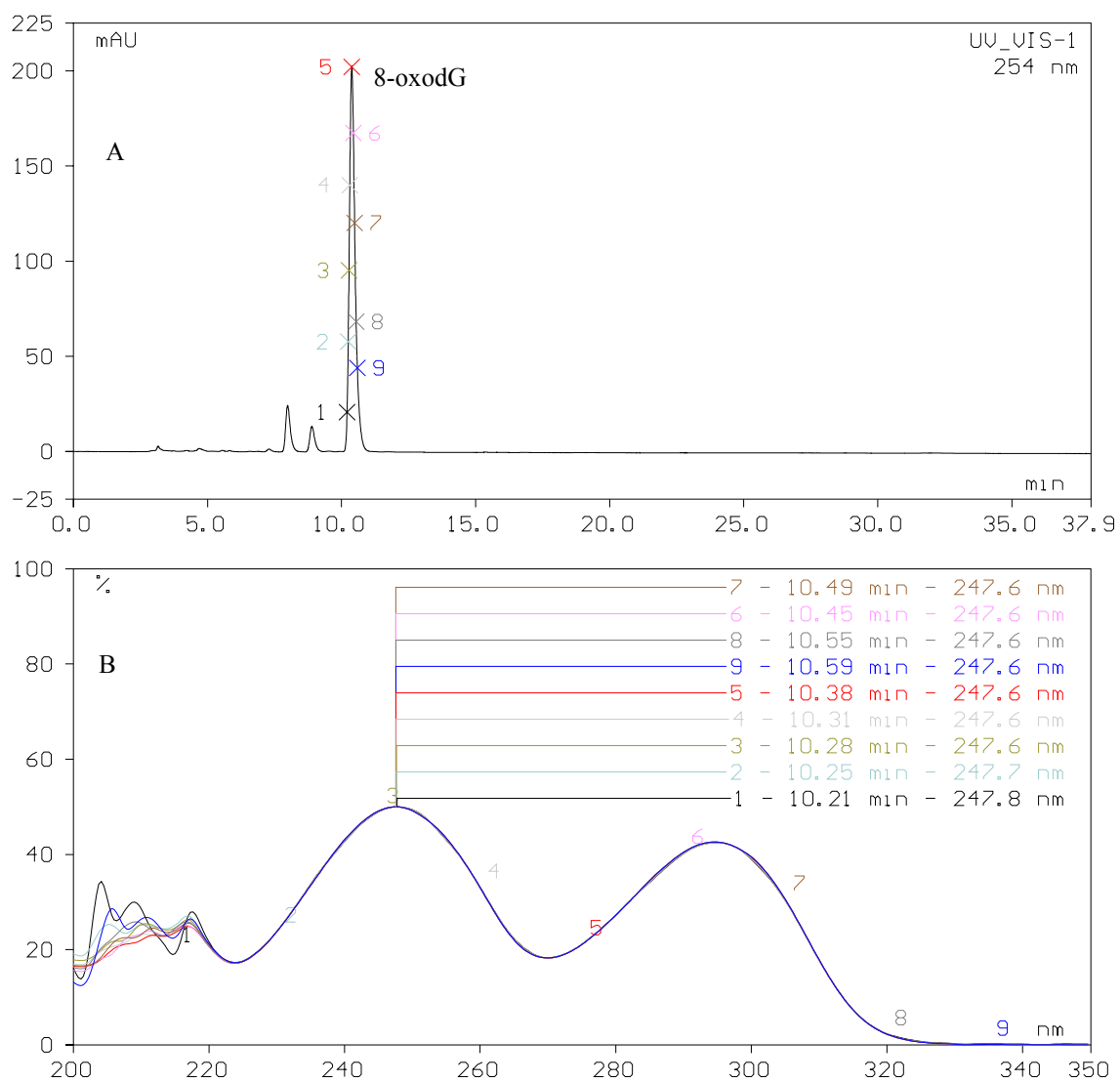
Rys. 4.4

Widmo ¹H NMR preparatu 8-benzoyloksy-2'-deoksyguanozyny



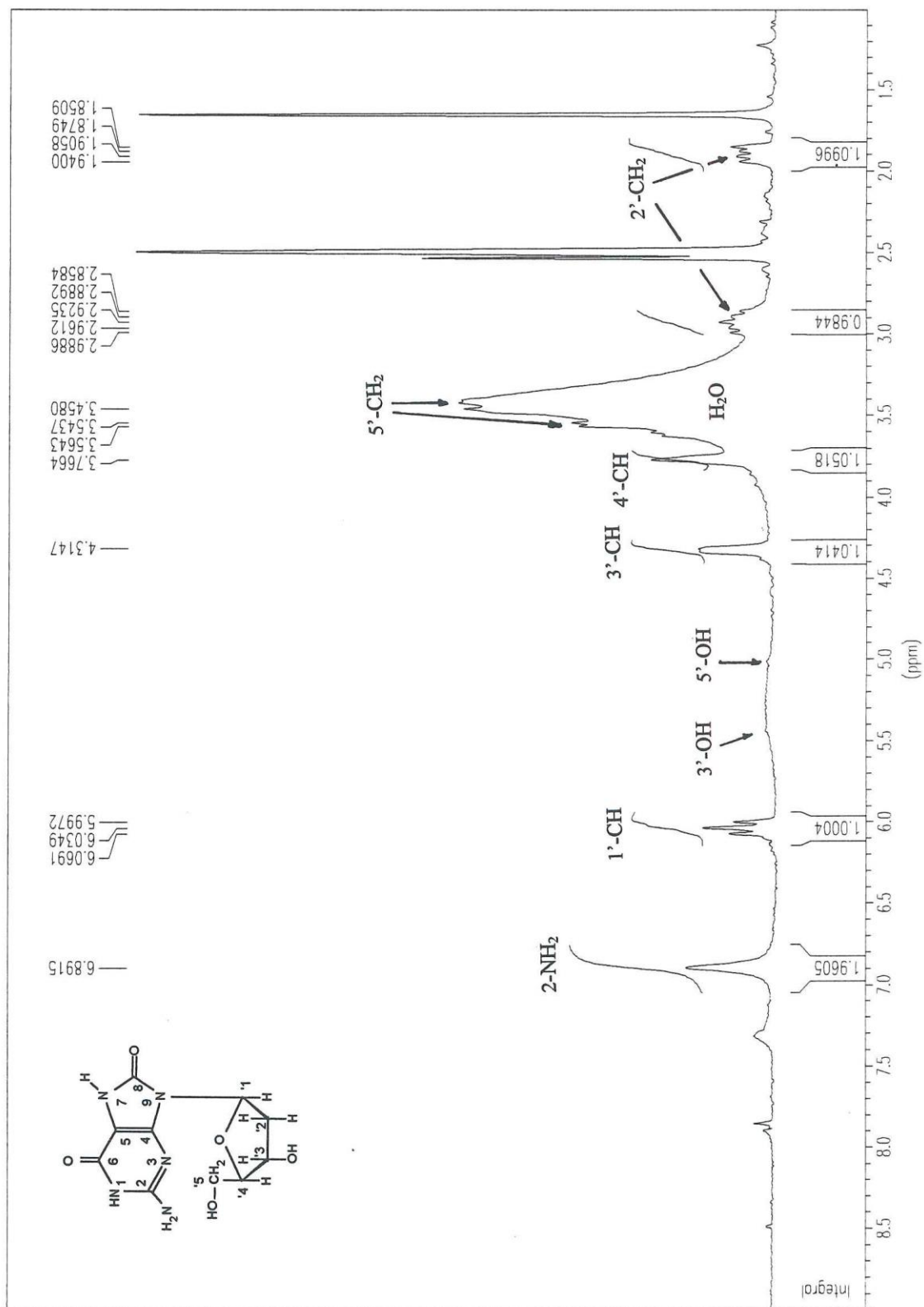
Rys. 4.5

Wysokosprawna chromatografia cieczowa na kolumnie Supelcosil LC-18-S A) preparatu 8-Bn-O-dG użytego do syntezy 8-oxodG oraz B) uzyskanego w reakcji hydrogenolizy preparatu 8-oxodG. C) Widma UV obu związków zarejestrowane przez detektor UV-VIS z matrycą diodową w chwili ich elucji.

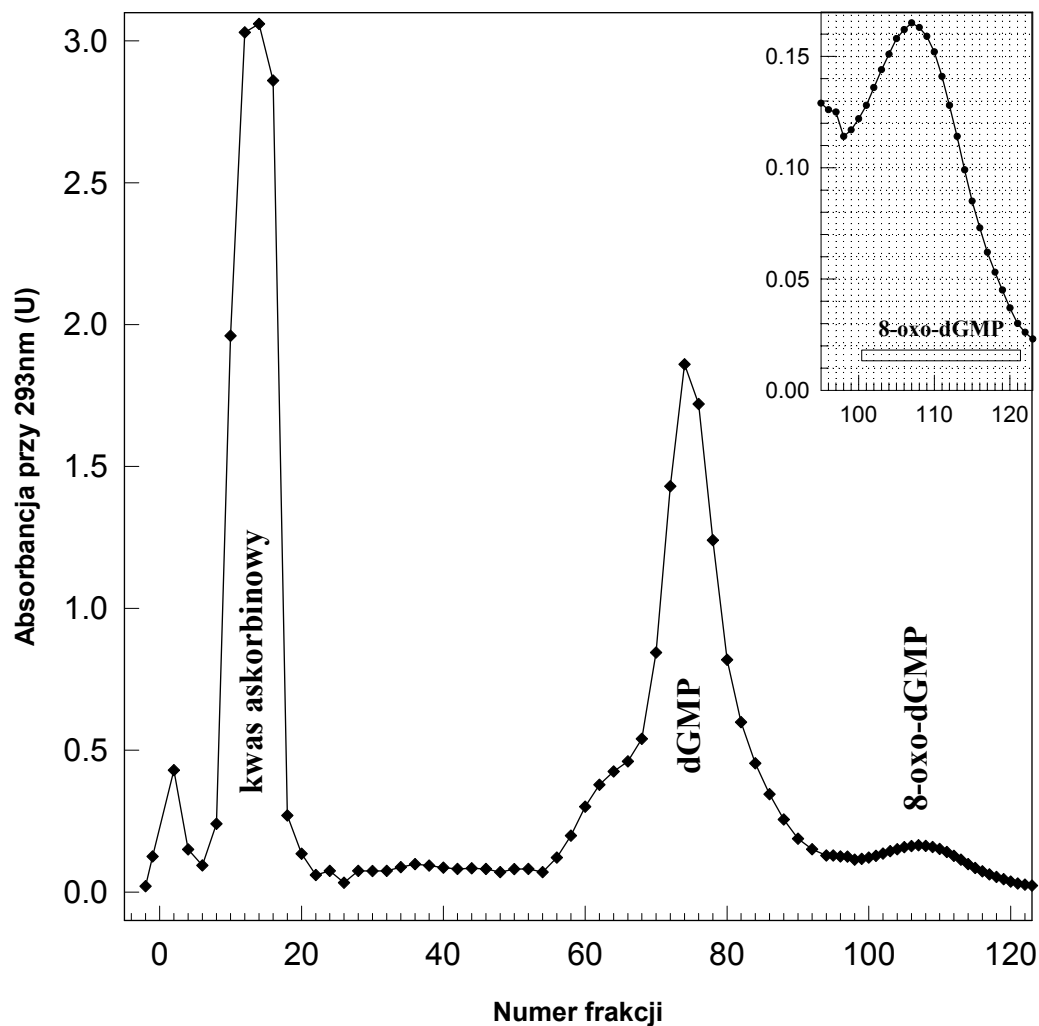


Rys. 4.6

Proces finalnego oczyszczenia preparatu 8-oxodG w trybie wysokosprawnej chromatografii cieczowej na semipreparatywnej kolumnie Supelcosil LC-18-S (10 x 250 mm). Przedstawiony chromatogram (A) zarejestrowano przy długości fali 254 nm. B) Dla zademonstrowania homogenności piku 8-oxodG poniżej wykreślono kilka widm z zakresu UV, zarejestrowanych w różnych momentach elucji piku 8-oxodG oznaczonych na chromatogramie numerami 1 - 9.

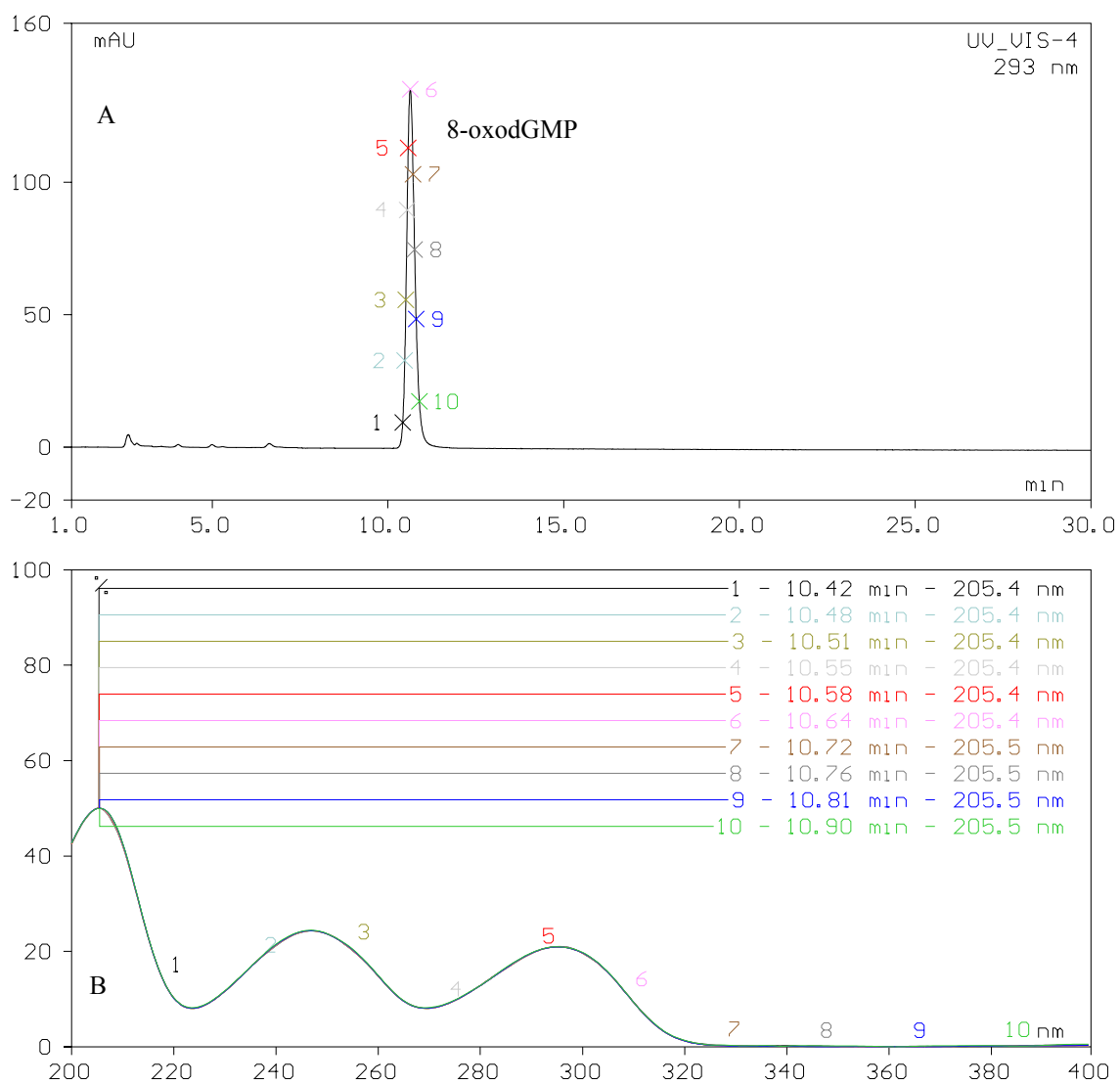


Rys. 4.7
Widmo ¹H NMR preparatu 8-oksyo-2'-deoksyguanozyny



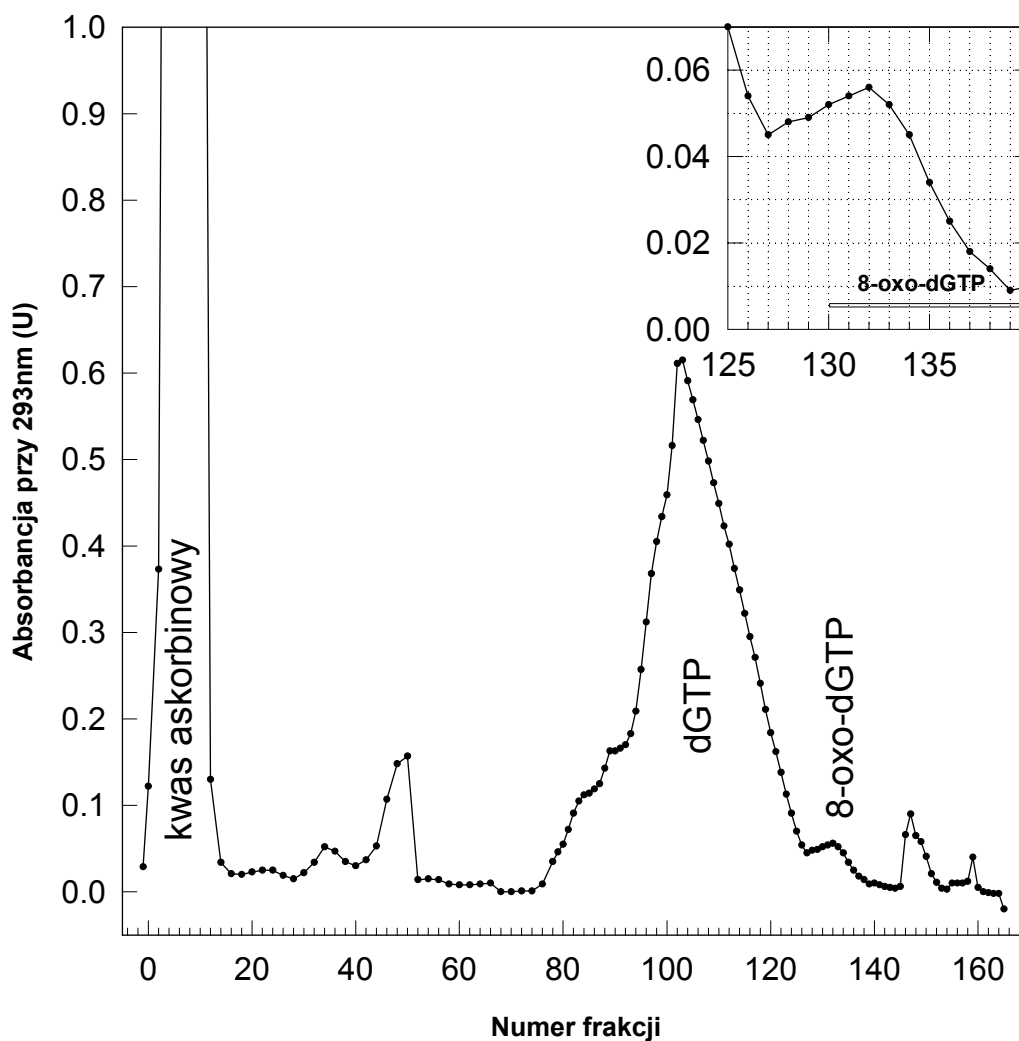
Rys. 4.8

Chromatograficzna izolacja 8-oksyo-2'-deoksyguanozyno-5'-monofosforanu (8-oxodGMP) uzyskanego w reakcji rodnika hydroksylowego z 2'-deoksyguanozyno-5'-monofosforanem (dGMP). Rozdziału dokonano na kolumnie DEAE-celulozy (2.5 x 15 cm) stosując liniowy gradient wodorowęglanu trietyloamoniowego. Rysunek w prawym górnym rogu przedstawia powiększenie piku 8-oxodGMP, pod którym wskazano frakcje połączone w preparat 8-oxodGMP.



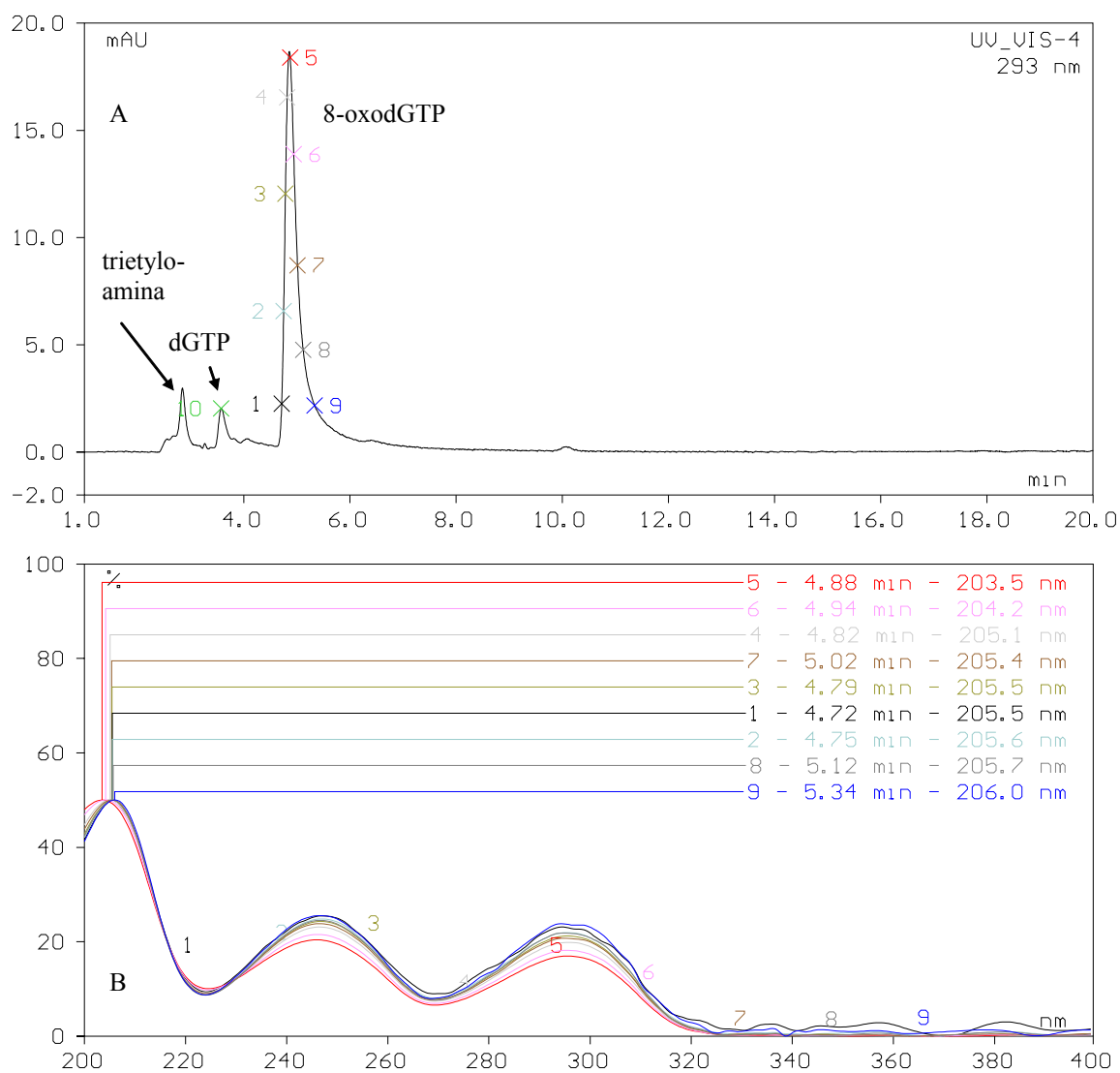
Rys. 4.9

A) Analityczny rozdział chromatograficzny preparatu 8-oxodGMP przeprowadzony w trybie wysokosprawnej chromatografii cieczowej na kolumnie Supelcosil LC-18-T. B) Dla zademonstrowania homogenności piku 8-oxodGMP przedstawiono widma w zakresie UV zarejestrowane w różnych momentach elucji piku 8-oxodGMP oznaczonych na chromatogramie numerami 1-10.



Rys. 4.10

Chromatograficzna izolacja 8-oksyo-2'-deoksyguanozyno-5'-trifosforanu (8-oxodGTP) uzyskanego w reakcji rodnika hydroksylowego z 2'-deoksyguanozyno-5'-trifosforanem (dGTP). Rozdziału dokonano na kolumnie DEAE-celulozy (2.5 x 15 cm) stosując liniowy gradient wodorowęglanu trietyloamoniowego. Rysunek w prawym górnym rogu przedstawia powiększenie piku 8-oxodGTP, pod którym wskazano frakcje połączone w preparat 8-oxodGTP.

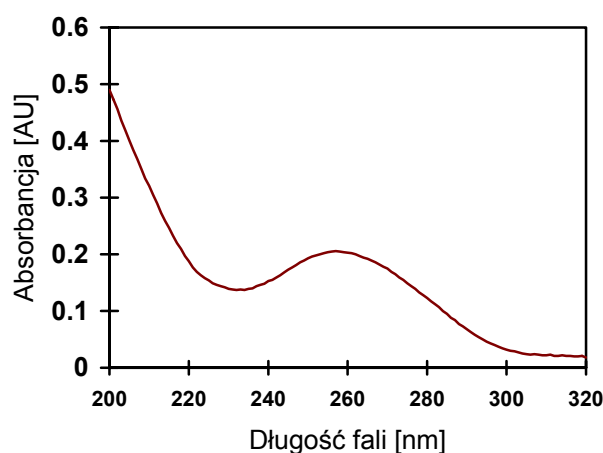


Rys. 4.11

A) Analityczny rozdział chromatograficzny preparatu 8-oxodGTP przeprowadzony w trybie wysokosprawnej chromatografii cieczowej na kolumnie Supelcosil LC-18-T. B) Dla zademonstrowania homogenności piku 8-oxodGTP przedstawiono widma w zakresie UV zarejestrowane w różnych momentach elucji piku 8-oxodGTP oznaczonych na chromatogramie numerami 1-9.

4.2. POZIOM 8-OKSY-2'-DEOKSYGUANOZYNY W LIMFOCYTARNYM DNA CHORYCH NA RAKA PODDANYCH RADIOTERAPII

Zastosowana metoda izolacji DNA z limfocytów dostarcza dobrze odbiałczonych preparatów o indeksie $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$ zawierającym się pomiędzy 1.7 a 1.9. Przykładowe widmo w zakresie 200-320 nm preparatu DNA otrzymanego w ten sposób zaprezentowano na rys. 4.2.1

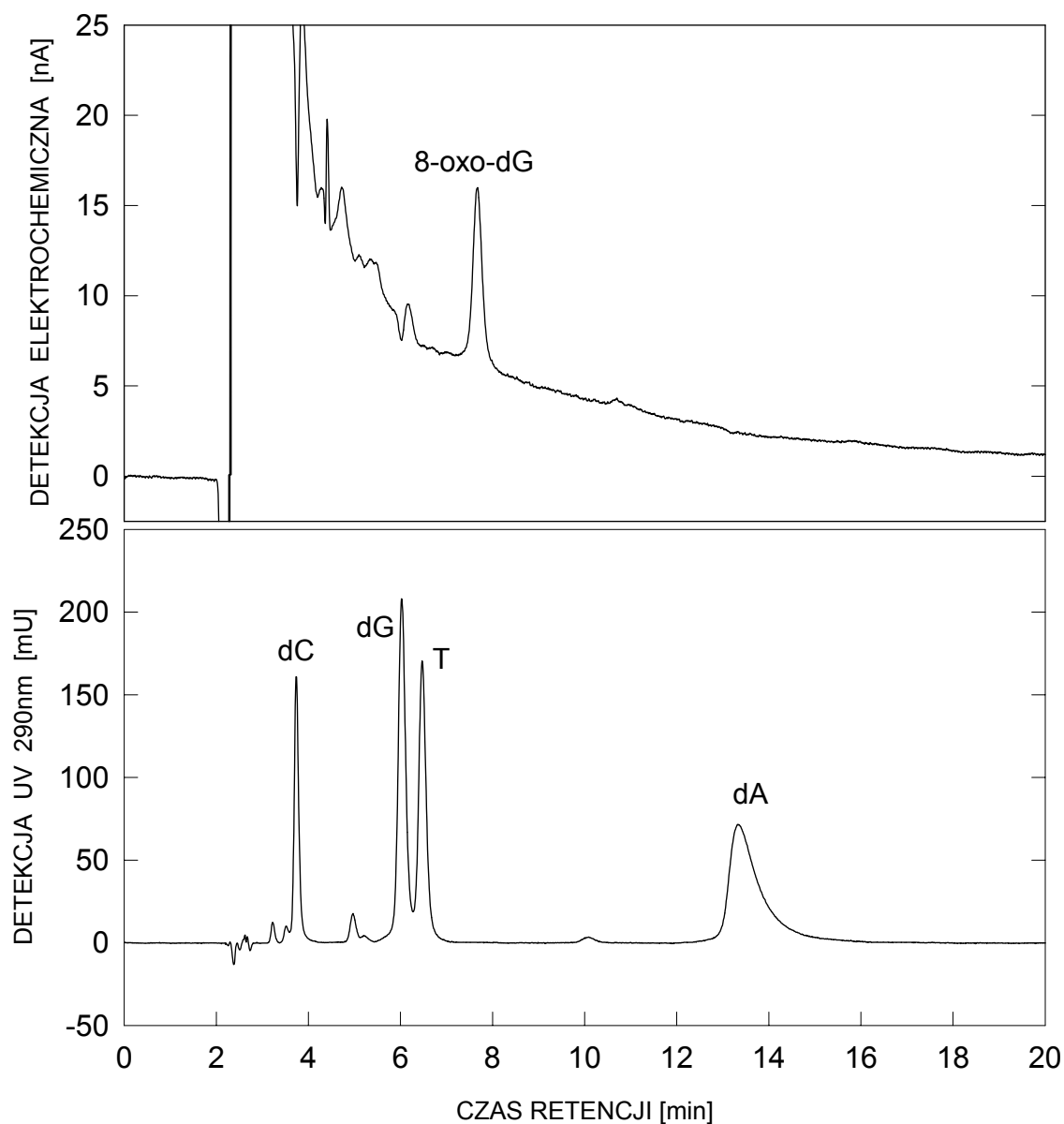


Rys. 4.2.1

Przykładowe widmo UV preparatu DNA limfocytarnego uzyskanego za pomocą metody opisanej przez Millera i wsp. (1988).

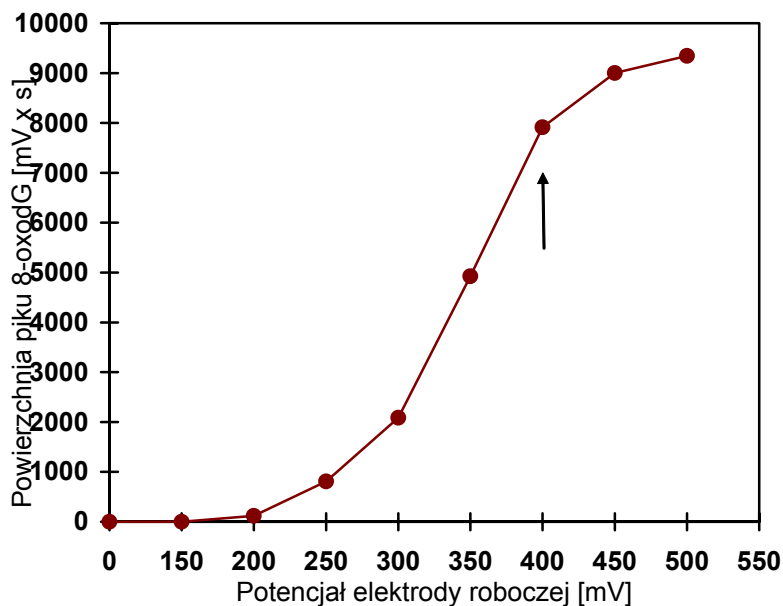
Oznaczenia 8-oxodG i dG w enzymatycznych hydrolizatach limfocytarnego DNA przeprowadzone za pomocą HPLC/UV/EC (wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją UV i elektrochemiczną) charakteryzowały się wysoką powtarzalnością i czułością. Różnice w wartościach 8-oxodG / 10^5 dG uzyskiwane dla powtórnych nastrzyków tych samych preparatów nie przekraczały nigdy 3%. Typowe chromatogramy zarejestrowane przez pracujące szeregowo detektory - UV i elektrochemiczny - w trakcie rozdziału jednego z hydrolizatów DNA przedstawiono na rys. 4.2.2.

Optymalny potencjał elektrody roboczej detektora elektrochemicznego dla detekcji 8-oxodG (400 mV) wyznaczono eksperymentalnie wykonując woltamogram hydrodynamiczny dla 8-oxodG (rys. 4.2.3). Obrane napięcie - 400 mV jest kompromisem pomiędzy czułością detekcji (czym wyższe napięcie tym większa czułość), a selektywnością detekcji (czym wyższe napięcie tym większe prawdopodobieństwo utleniania związków innych niż 8-oxodG).



Rys. 4.2.2

Typowe chromatogramy zarejestrowane przez detektor elektrochemiczny (A) i detektor UV (B) w czasie rozdzielania nukleozydów pochodzących z enzymatycznej hydrolizy limfocytarnego DNA. Na chromatogramie zarejestrowanym przez detektor elektrochemiczny widoczny jest wyraźny pik 8-oksy-2'-deoksyguanozyny (8-oxodG), a na chromatogramie zarejestrowanym przez detektor UV (290nm) widoczne są cztery dominujące piki deoksynukleozydów: deoksytydyny (dC), deoksyguanozyny (dG), tymidyny (T) oraz deoksyadenozyny (dA).



Rys. 4.2.3

Woltamogram hydrodynamiczny dla 8-oxidG wykonany za pomocą HPLC/EC. Na kolumnę Spherisorb ODS-2 nastrzykiwano wielokrotnie 1 pmol wzorca 8-oksyo-2'-deoksyguanozyny(8-oxidG), każdorazowo podwyższając potencjał elektrody roboczej względem palladowej elektrody odniesienia. 8-oxidG zaczyna utleniać się przy napięciu 200 mV, a sygnał osiąga maksimum przy napięciu rzędu 600 mV.

Wyniki oznaczeń poziomu 8-oxidG w limfocytarnym DNA pacjentów poddanych radioterapii zebrano w tabeli 4.2.1

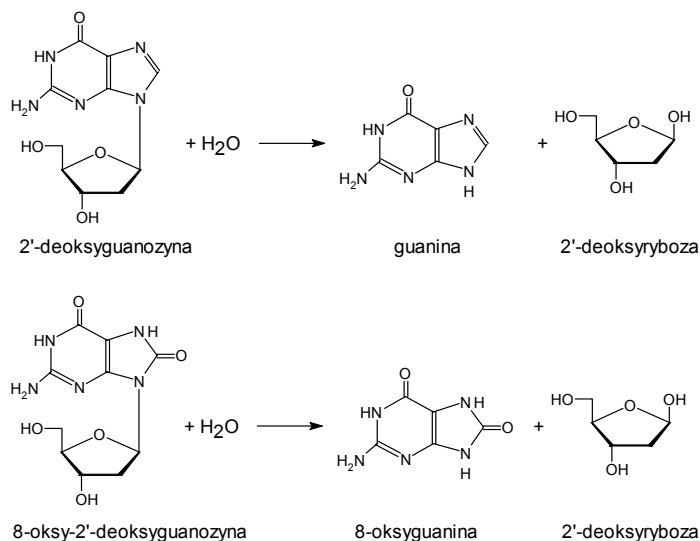
Tabela 4.2.1

Zawartość 8-oksyo-2'-deoksyguanozyny w limfocytarnym DNA pacjentów naświetlanych terapeutycznymi dawkami promieni rentgenowskich o energii 300 keV. Poziom 8-oxidG badano bezpośrednio przed pierwszą ekspozycją i bezpośrednio po ostatniej z serii ekspozycji. W przypadku pacjenta D wykonano także oznaczenie 24 h po ostatniej ekspozycji ^a.

Pacjent (wiek)	Rak	Pole naświetlane	Całkowita dawka pochłonięta prom. X [cGy]	8-oxidG / 10 ⁵ dG (odchylenie standardowe)	
				przed pierwszym naświetlaniem	po ostatnim naświetlaniu
A (58)	odbytu	miednica	3000	8.0 (0.14)	18.7 (0.13)
B (63)	płuca	klatka piersiowa	3000	11.8 (0.17)	18.2 (0.12)
C (55)	płuca	klatka piersiowa	3000	8.0 (0.11)	19.0 (0.33)
D (56)	płuca	klatka piersiowa	3000	14.0 (0.17)	28.9 (0.2) 11.6 (0.16) ^a

4.3 WPŁYW OKSYDACJI 2'-DEOKSYGUANOZYNY W POZYCJI C8 NA STABILNOŚĆ WIĄZANIA N-GLIKOZYDOWEGO.

Porównano stabilność wiązania N-glikozydowego 2'-deoksyguanozyny (dG) i 8-oksyo-2'-deoksyguanozyny (8-oxodG) inkubowanych w roztworach o różnym pH, w podwyższonej temperaturze. Badano kinetykę hydrolizy obu nukleozydów zachodzącą według poniższych reakcji:



4.3.1 Kinetyka hydrolizy dG i 8-oxodG w temperaturze 100 °C i pH 7.4

Mieszanina inkubacyjna zawierała 0.75mM dG i 0.75mM 8-oxodG w 20mM buforze Tris-octan o pH 7.4. Analizę chromatograficzną mieszaniny wykonano przed i po każdej godzinie inkubacji we wrzącej łaźni wodnej. Pięciogodzinna inkubacja w 100°C spowodowała 23.5% ubytek stężenia dG w odniesieniu do stężenia wyjściowego (rys. 4.3.1). Jednocześnie w miarę trwania inkubacji w mieszaninie pojawia się związek, którego ilość jest proporcjonalna do ubytku ilości dG. Związek ten został zidentyfikowany na podstawie charakterystycznego czasu retencji oraz analizy widma absorpcyjnego w zakresie ultrafioletu jako guanina. W zastosowanych warunkach guanina jest jedynym produktem dekompozycji dG i powstaje na skutek hydrolitycznego rozerwania wiązania N-glikozydowego. Uwolniona deoksyryboza jest związkiem bardzo słabo pochłaniającym w zakresie ultrafioletu i dlatego jej obecność nie mogła być rejestrowana.

Pięciogodzinna inkubacja w powyższych warunkach nie powoduje ubytku stężenia 8-oxodG (rys. 4.3.1). Dodatkowo przeprowadzono eksperyment mający na celu sprawdzenie, czy brak

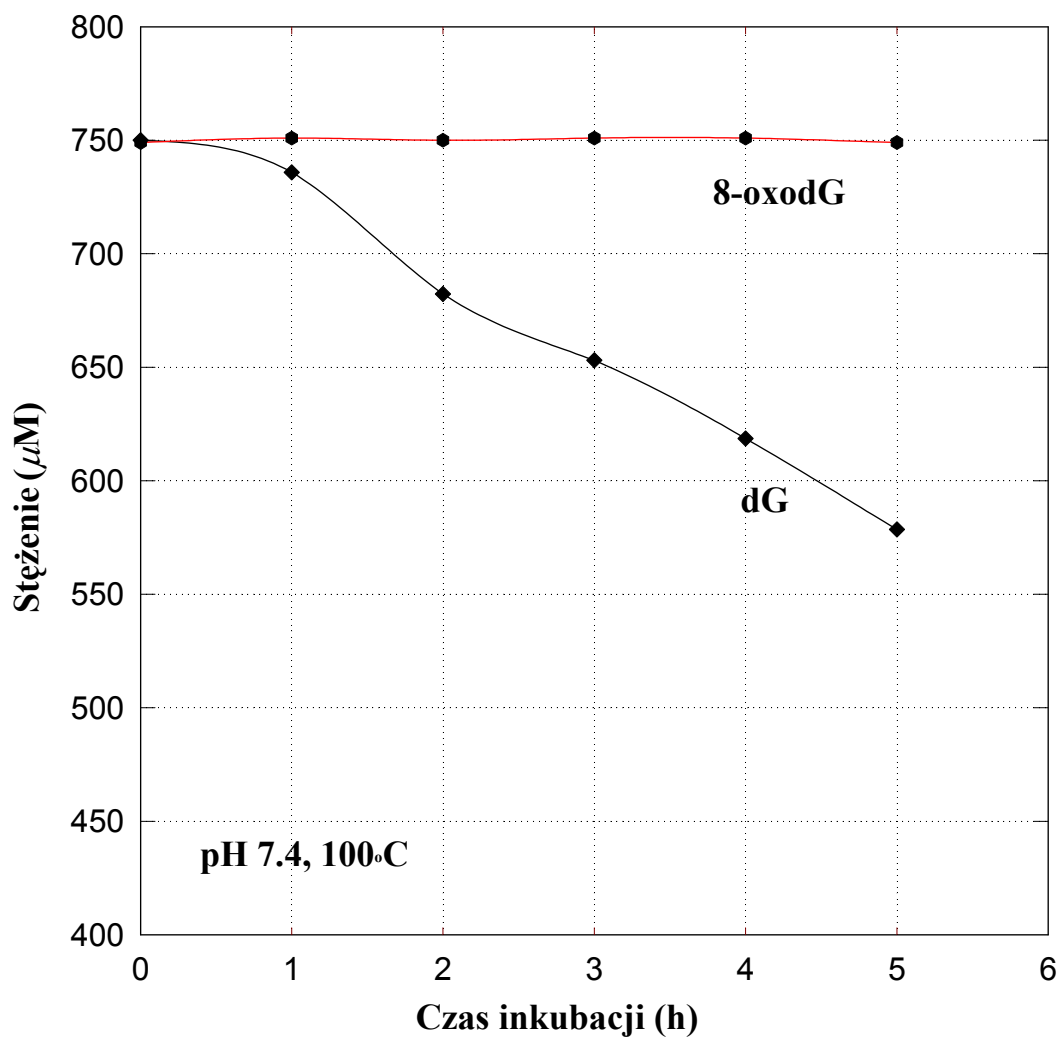
spadku stężenia 8-oxodG nie jest spowodowany powstawaniem tego związku z dG w zastosowanych warunkach. Trzygodzinna inkubacja samej deoksyguanozyny w powyższych warunkach nie powoduje powstawania 8-oxodG ani żadnego innego produktu poza guaniną.

4.3.2 Kinetyka hydrolizy dG i 8-oxodG w temperaturze 100 °C i pH 5.1

We wrzącej łaźni wodnej inkubowano mieszaninę 0.75 mM dG i 0.75 mM 8-oxodG w 10 mM buforze octan amonowy / kwas octowy, pH 5.1. Analizy chromatograficzne wykonano bezpośrednio przed rozpoczęciem inkubacji i po każdej z pięciu godzin inkubacji. W wyniku hydrolizy obu związków w mieszaninie pojawiają się guanina i 8-oksoguanina, przy czym przyrost piku 8-oksoguaniny nie był proporcjonalny do ubytku 8-oxodG ze względu na bardzo słabą rozpuszczalność 8-oksoguaniny w roztworach wodnych. Po pięciu godzinach stwierdzono spadek stężenia dG z 0.75 mM do 0.26 mM, tj. o 64.1% (rys. 4.3.2). W zastosowanych warunkach obserwuje się również ubytek stężenia 8-oxodG z 0.75 mM do 0.58 mM po 5 godzinach reakcji, co oznacza hydrolizę 22.5% 8-oxodG (rys. 4.3.2). W celu ilościowego porównania szybkości hydrolizy dG i 8-oxodG w powyższych warunkach jako modelu użyto równania kinetyki reakcji pierwszego rzędu. Wyliczona stała szybkości reakcji dla hydrolizy 8-oxodG wynosi $k_{s-1} = 1.25 \times 10^{-5}$ [1/s], a dla dG $k_{s-1} = 5.64 \times 10^{-5}$ [1/s]. Tempo hydrolizy 8-oxodG jest więc w tych warunkach o 4.5 razy wolniejsze niż w przypadku dG.

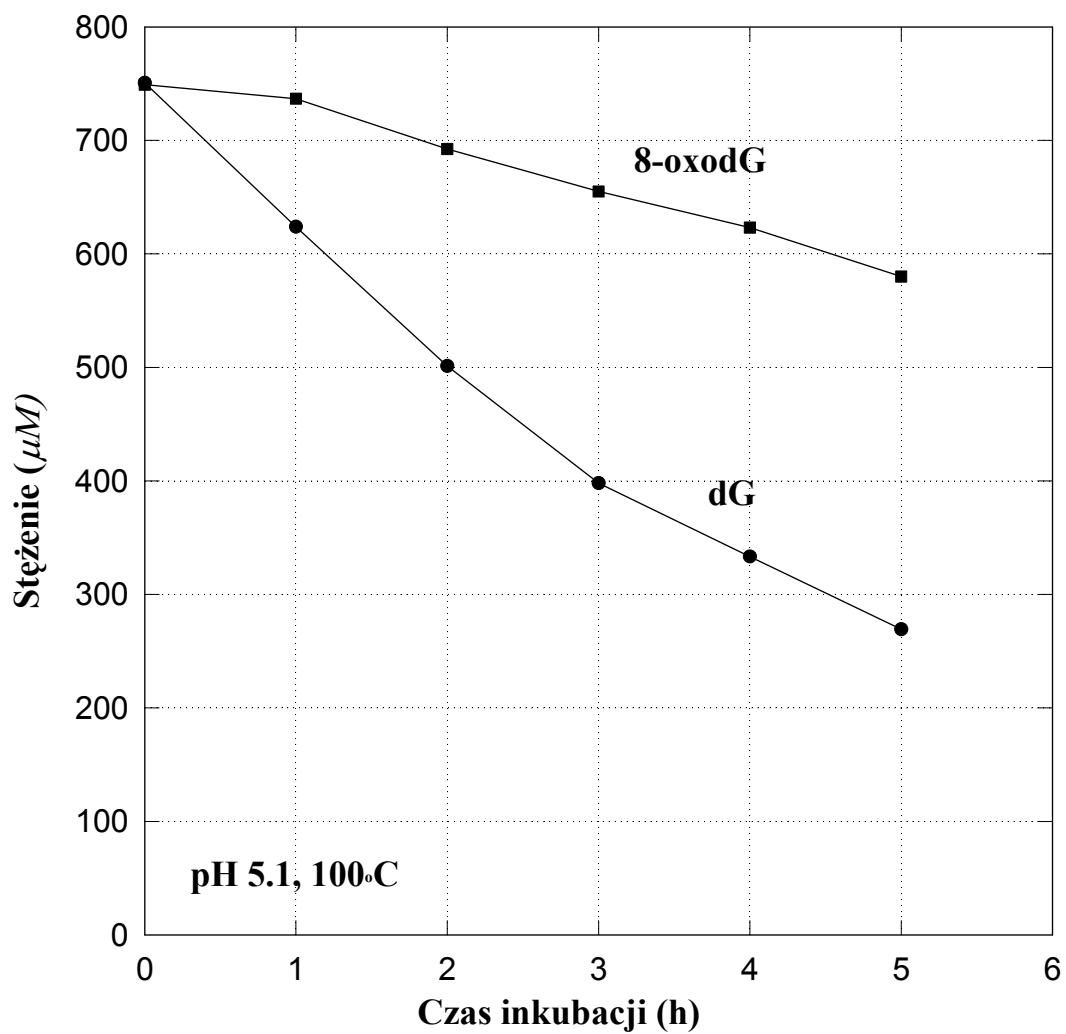
4.3.3 Stabilność dG i 8-oxodG w pH 2.0

W celu porównania stabilności wiązań N-glikozydowych dG i 8-oxodG w silnie kwaśnym środowisku inkubowano oba związki w stężeniu 0.375 mM w wodnym roztworze kwasu solnego o pH 2.0. Zastosowano trzygodzinny czas inkubacji w temperaturze 100°C. Chromatografia mieszaniny inkubacyjnej wykazała całkowitą konwersję dG do guaniny. Ilość 8-oxodG w tych warunkach zmniejszyła się jedynie o 11%.



Rys. 4.3.1

Kinetyka hydrolizy 2'-deoksyguanozyny (dG) i 8-oksy-2'-deoksyguanozyny (8-oxodG) w temperaturze 100°C i pH 7.4. Postęp reakcji depurynacji przedstawiono jako ubytek stężenia substratów.



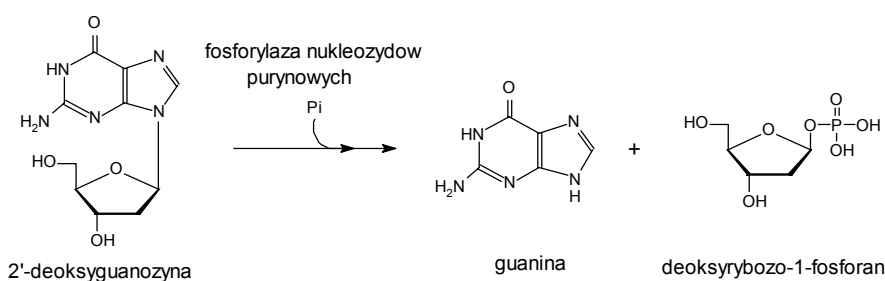
Rys. 4.3.2

Kinetyka hydrolizy 2'-deoksyguanozyny (dG) i 8-oksy-2'-deoksyguanozyny (8-oxodG) w temperaturze 100°C i pH 5.1. Postęp reakcji depurynacji przedstawiono jako ubytek stężenia substratów.

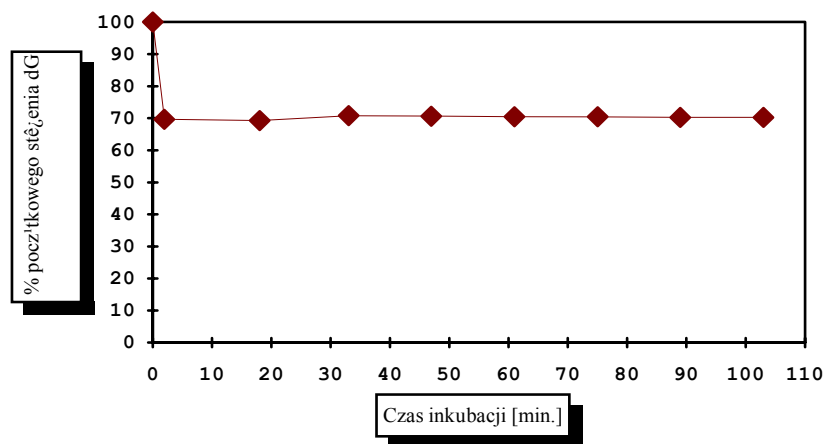
4.4 8-OKSY-2'-DEOKSYGUANOZYNA I 8-OKSYGUANINA A KLASYCZNY SZLAK KATABOLIZMU NUKLEOZYDÓW PURYNOWYCH

4.4.1 8-Oksy-2'-deoksyguanozyna jako potencjalny substrat dla fosforylasy nukleozydów purynowych

W zastosowanych warunkach reakcji (0.32 mM stężenie substratu, 2.5 mM fosforan, pH = 7.4, 25°C), użyte w eksperymencie stężenie ludzkiej fosforylasy nukleozydów purynowych prowadzi do bardzo szybkiej fosforolizy wiązania N-glikozydowego 2'-deoksyguanozyny (reakcja poniżej), która jest naturalnym substratem tego enzymu.

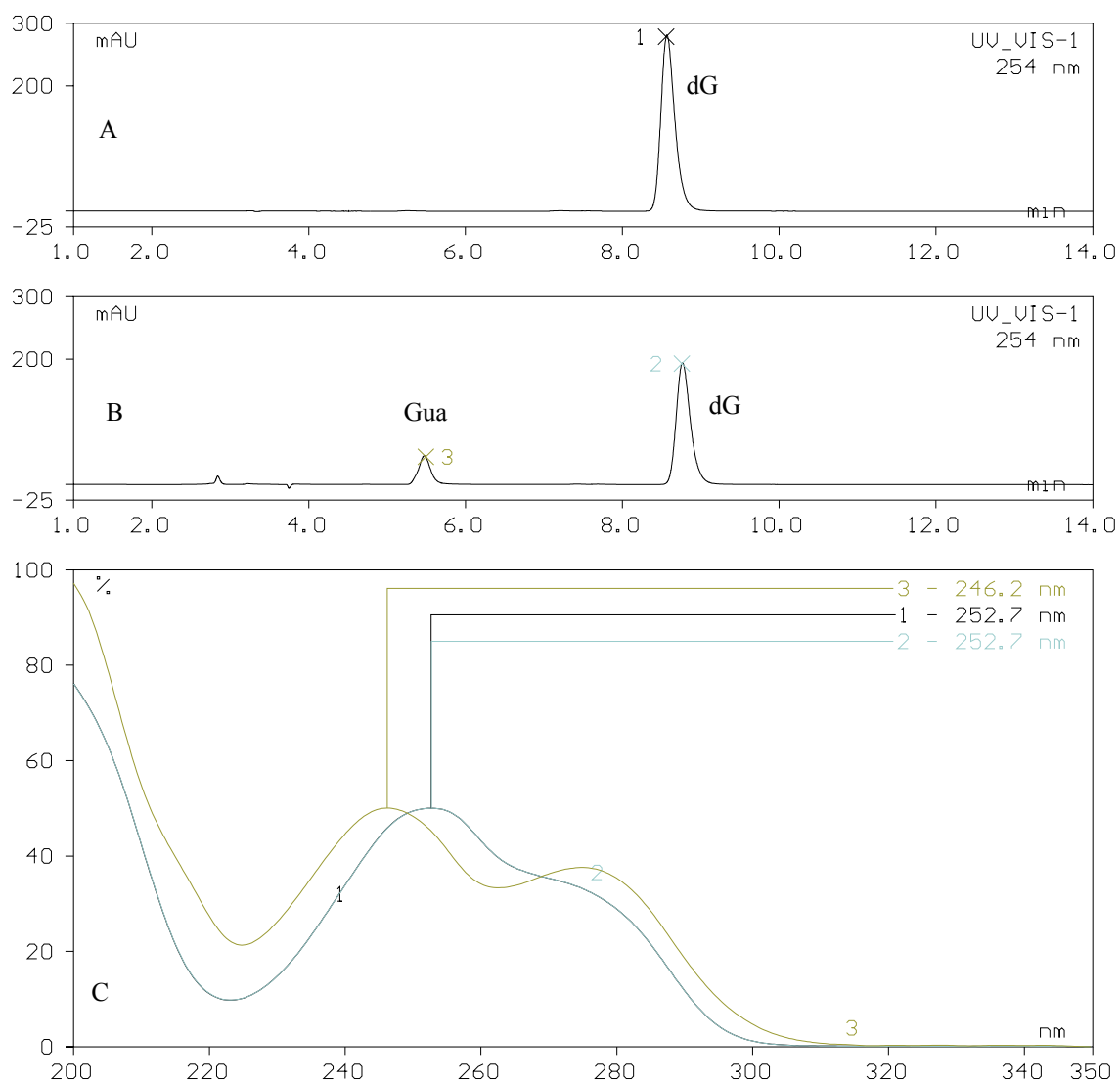


Jak wykazuje analiza chromatograficzna, w reakcji katalizowanej przez preparat fosforylasy powstaje tylko jeden produkt reakcji pochłaniający w zakresie ultrafioletu (rys. 4.4.1.2 B). Jest nim guanina, którą zidentyfikowano na podstawie czasu retencji oraz charakterystycznego widma w zakresie UV (rys. 4.4.1.2 C). Już po dwu minutach od zainicjowania reakcji początkowe stężenie dG spada o 30% i nie podlega ono dalszemu istotnemu obniżeniu aż do 103 minuty trwania reakcji (rys. 4.4.1.1), co świadczy o ustaleniu się stanu równowagi.



Rys. 4.4.1.1

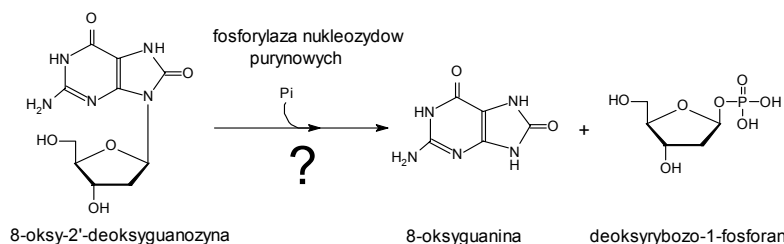
Postęp reakcji fosforolizy 2'-deoksyguanozyny (dG) pod wpływem ludzkiej fosforylasy nukleozydów purynowych przedstawiony jako ubytek substratu w czasie.



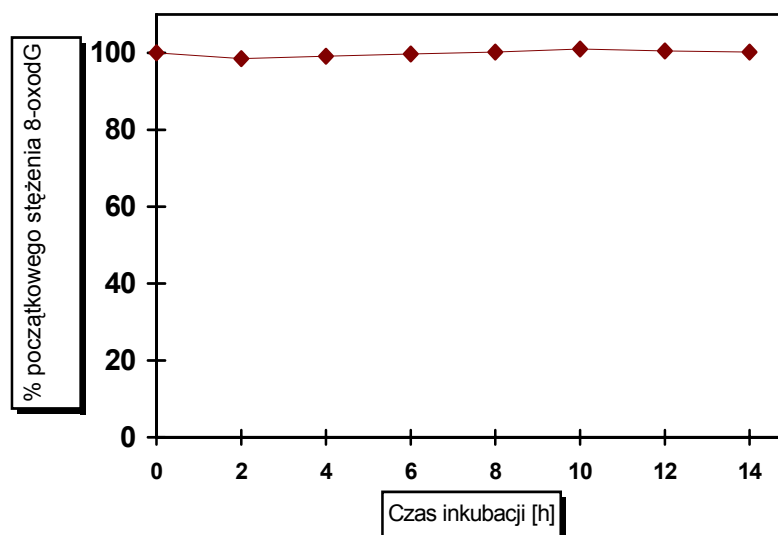
Rys. 4.4.1.2

Rozdziły chromatograficzne mieszanin inkubacyjnych w trybie wysokosprawnej chromatografii cieczowej na kolumnie Supelcosil LC-18-S: A) 2'-deoksyguanozyna (dG) bez fosforylasy nukleozydów purynowych inkubowana w warunkach reakcji (Materiały i metody) przez 103 min. B) dG inkubowana w warunkach reakcji z fosforylaza nukleozydów purynowych przez 2 min. C) Widma absorpcyjne w zakresie UV zarejestrowane przez detektor spektralny w momencie elucji substratu (dG, piki 1,2) oraz jedyne go produktu reakcji enzymatycznej - guaniny (Gua, pik 3).

Inkubacja 8-oksy-2'-deoksyguanozyny (8-oxodG) z fosforylazą nukleozydów purynowych daje odpowiedź na pytanie, czy enzym ten jest w zdolny katalizować reakcję fosforolizy 8-oxodG według poniższego wzoru:



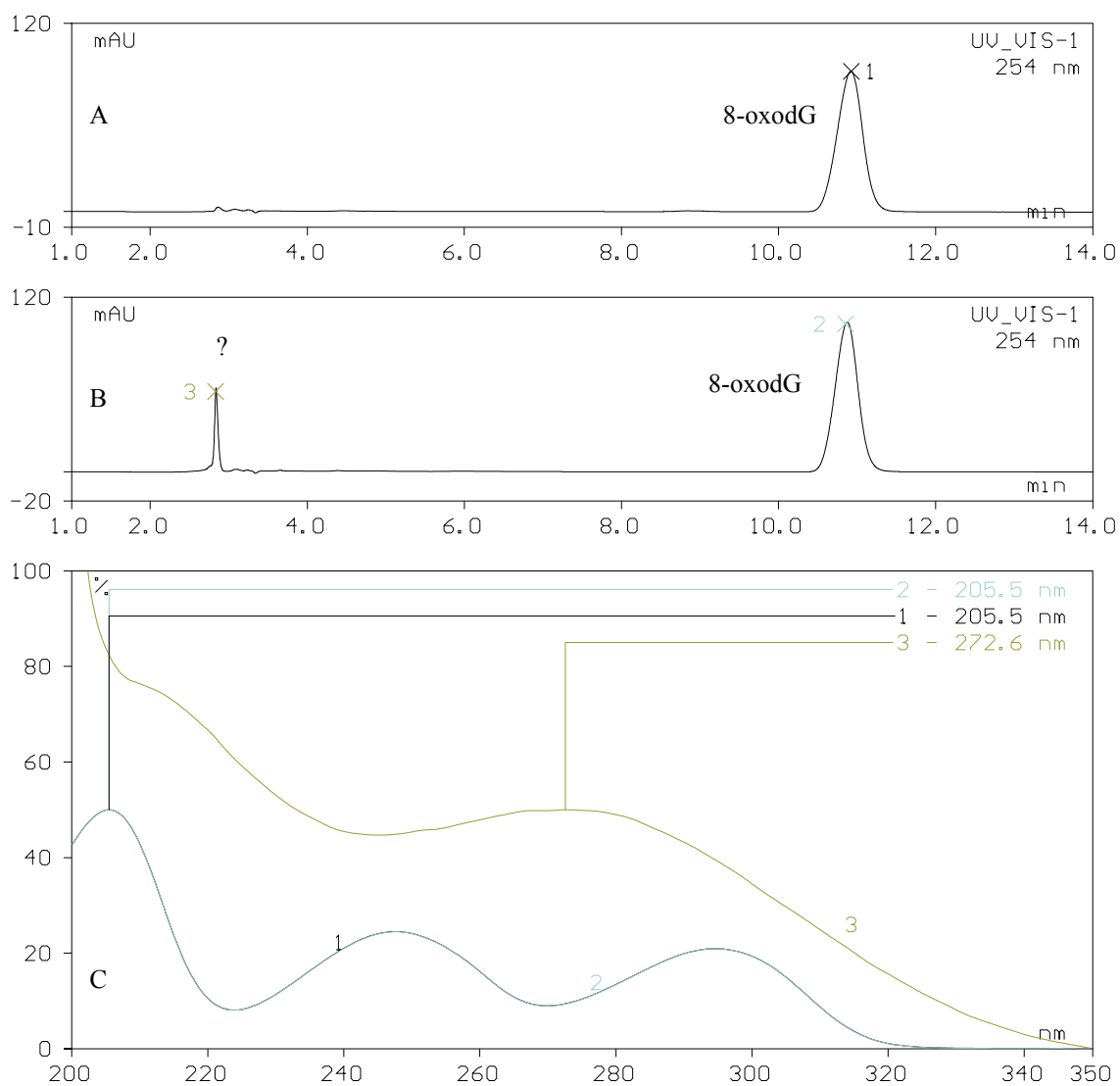
W warunkach identycznych z zastosowanymi w przypadku deoksyguanozyny, fosforylaza nukleozydów purynowych nie powoduje ubytku stężenia 8-oxodG nawet po 14 godzinach od dodania preparatu enzymu (rys. 4.4.1.3)



Rys. 4.4.1.3

Stężenie 8-oxodG w kolejnych godzinach inkubacji z ludzką fosforylazą nukleozydów purynowych, przedstawione jako procent stężenia początkowego.

Analiza chromatograficzna mieszaniny inkubacyjnej nawet po 14 h nie wykazuje obecności w niej wolnej 8-oksyguaniny (rys. 4.4.1.4). Po 6 h inkubacji w mieszaninie pojawia się widoczny na chromatogramie (rys. 4.4.1.4 B) pik związku pochłaniającego w ultrafiolecie, oznaczony jako „?”. Jednakże jego czas retencji i widmo w zakresie UV wykluczają możliwość, iż jest to 8-oksyguanina. Z uwagi na brak jednoczesnego ubytku powierzchni pików 8-oxodG sądzić można, iż jest to najprawdopodobniej fragment pochodzący z proteolizy fosforylazy, za czym przemawia widmo związku w zakresie UV z charakterystycznym maksimum w okolicach 220 nm (wiązania peptydowe) i 280 nm (aminokwasy aromatyczne) (rys. 4.4.1.4 C).



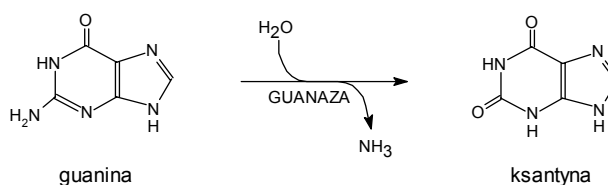
Rys. 4.4.1.4

Rozdziály chromatograficzne mieszanin inkubacyjnych w trybie wysokosprawnej chromatografii cieczowej na kolumnie Supelcosil LC-18-S: A) 8-oksyo-2'-deoksyguanozyna (8-oxodG) inkubowana przez 14 h bez fosforylasy nukleozydów purynowych w warunkach reakcji (Materiały i metody), B) 8-oxodG inkubowana w warunkach reakcji z fosforylą nukleozydów purynowych przez 14 h. C) Widma absorpcyjne w zakresie UV zarejestrowane przez detektor spektralny w momencie elucji 8-oxodG (piki 1 i 2) oraz niezidentyfikowanego związku (pik 3) powstałego w trakcie przedłużonej inkubacji 8-oxodG z fosforylą.

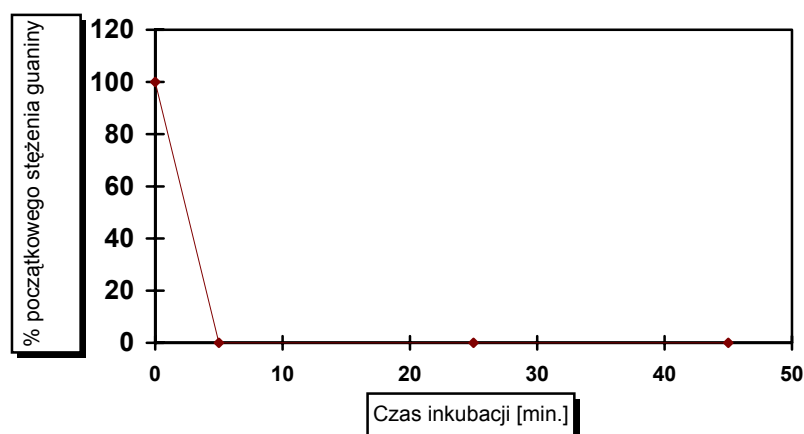
Należy zaznaczyć, iż zastosowane warunki reakcji (wysokie stężenie enzymu) nie zostały dobrane w celu badania kinetyki reakcji katalizowanej przez fosforylaze w odniesieniu do naturalnego substratu (dG), a służyły jedynie sugestywnemu zademonstrowaniu braku aktywności tego enzymu wobec 8-oxodG. Uwaga ta dotyczy także warunków reakcji enzymatycznych opisanych w dwu kolejnych podrozdziałach.

4.4.2 8-Oksyguanina jako potencjalny substrat dla guanazy (aminohydrolazy guaninowej)

W zastosowanych warunkach reakcji (20 μ M stężenie substratu, pH 7.4, 25°C), użyte w eksperymencie stężenie guanazy z wątroby królika prowadzi do bardzo szybkiej dezaminacji guaniny (reakcja poniżej), która jest naturalnym substratem tego enzymu.

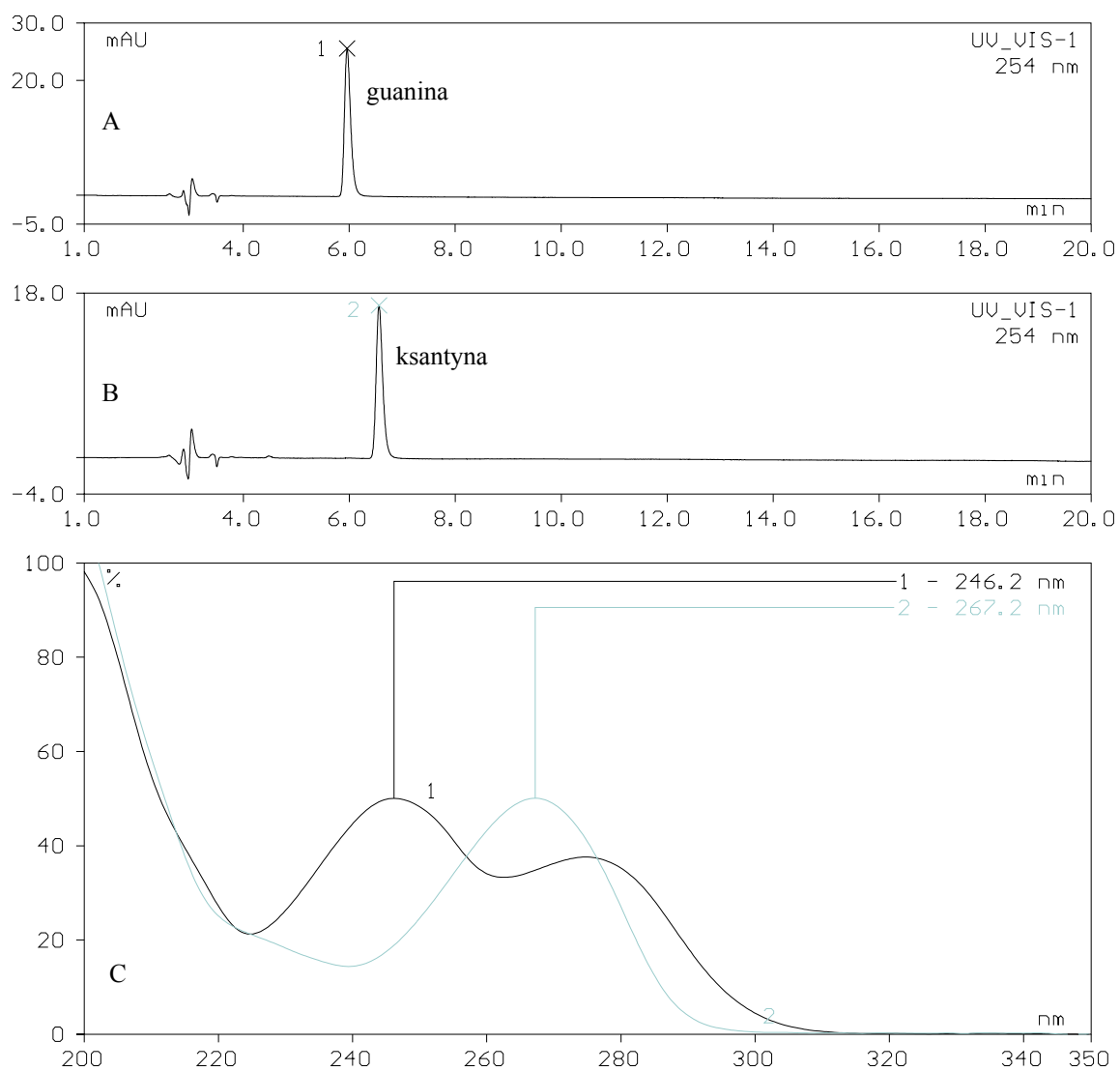


Jak wykazuje analiza chromatograficzna, w reakcji katalizowanej przez preparat guanazy powstaje tylko jeden produkt reakcji pochłaniający w zakresie ultrafioletu (rys. 4.4.2.2 B). Jest nim ksantyna, którą zidentyfikowano na podstawie czasu retencji oraz charakterystycznego widma w zakresie UV (rys. 4.4.2.2 C). Już po pięciu minutach od zainicjowania reakcji cała guanina zawarta w mieszaninie reakcyjnej podległa dezaminacji do ksantyny (rys. 4.4.2.1).



Rys. 4.4.2.1

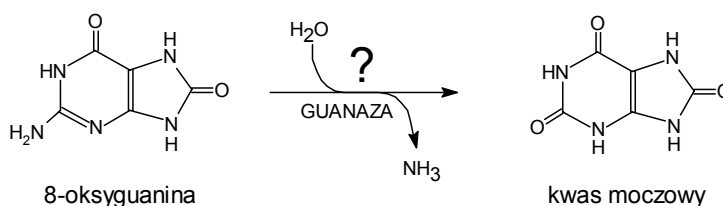
Postęp reakcji dezaminacji guaniny pod wpływem guanazy z wątroby królika przedstawiony jako ubytek stężenia substratu w czasie.



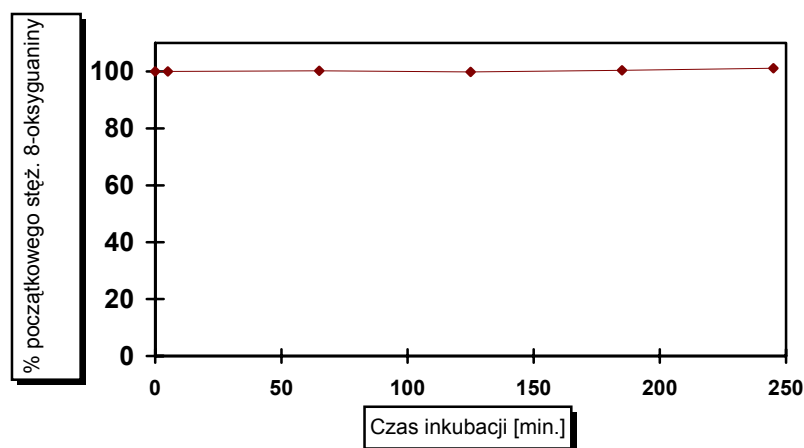
Rys. 4.4.2.2

Rozdziła chromatograficzne mieszanin inkubacyjnych w trybie wysokosprawnej chromatografii cieczowej na kolumnie Supelcosil LC-18-S: A) guanina inkubowana w warunkach reakcji (Materiały i metody) przez 45 min. bez guanazy. B) Guanina inkubowana z guanazą przez 5 min. w warunkach reakcji. C) Widma absorpcyjne w zakresie UV zarejestrowane przez detektor spektralny w momencie elucji substratu (pik 1) oraz jednego produktu reakcji enzymatycznej - ksantyny (pik 2).

Inkubacja 8-oksyguaniny z guanazą daje odpowiedź na pytanie, czy enzym ten jest zdolny katalizować reakcję dezaminacji 8-oksyguaniny do kwasu moczowego według poniższego wzoru:



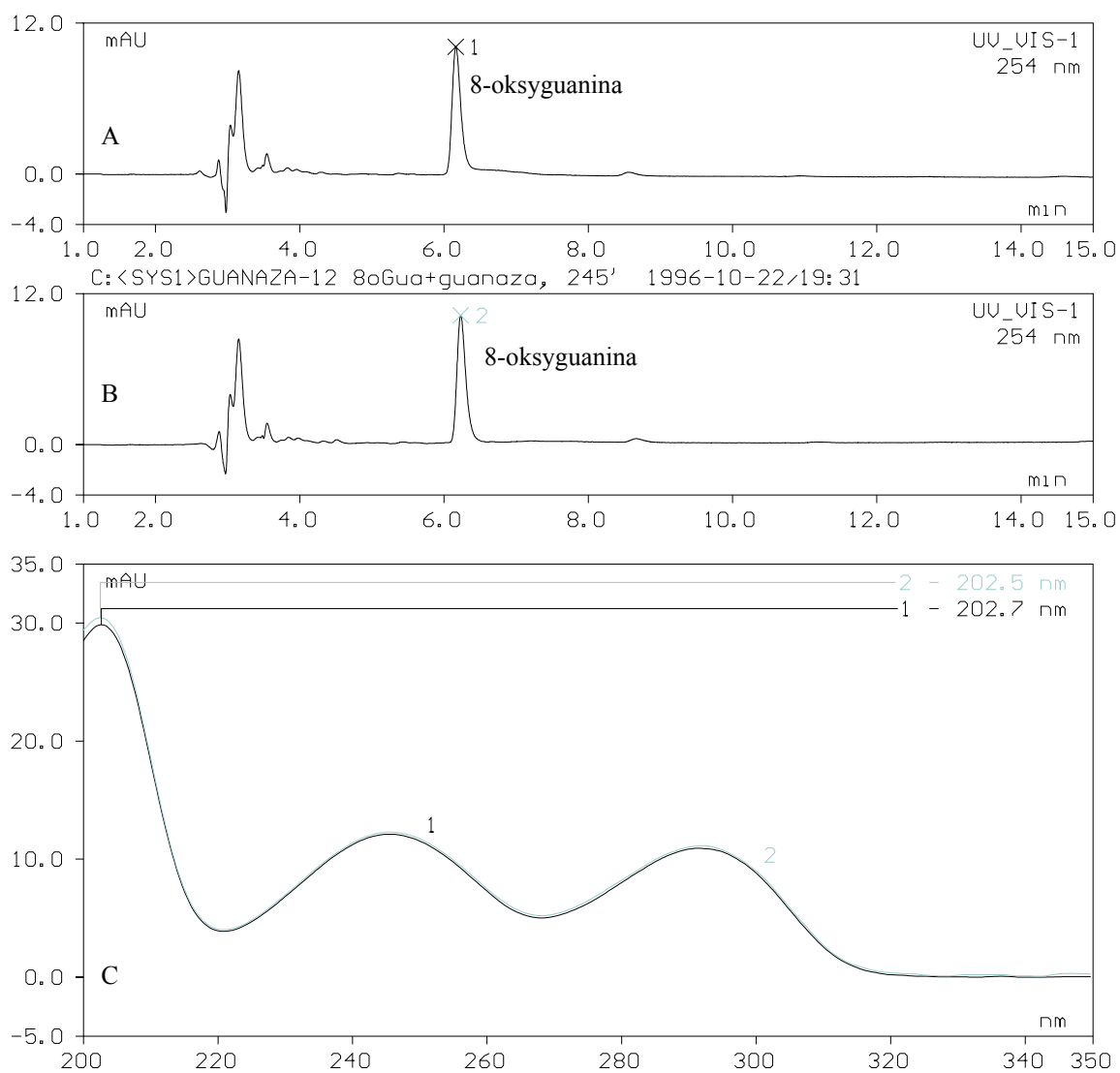
W warunkach identycznych z zastosowanymi w przypadku guaniny, guanaza nie powoduje ubytku stężenia 8-oksyguaniny nawet po 245 minutach od chwili dodania preparatu enzymu (rys. 4.4.2.3)



Rys. 4.4.2.3

Stężenie 8-oksyguaniny w kolejnych minutach inkubacji z guanazą z wątroby królika, przedstawione jako procent stężenia początkowego.

Analiza chromatograficzna mieszaniny reakcyjnej wykonana po 245 min. inkubacji nie wykazuje obecności kwasu moczowego w mieszaninie ani jakiegokolwiek dodatkowego piku, który pojawiłby się pod wpływem inkubacji z guanazą (rys. 4.4.2.4 B). Piki eluujące się między trzecią a piątą minutą, a także niewielki pik eluujący się między ósmą a dziewiątą minutą rozdzału, pochodzą od związków zanieczyszczających preparat 8-oksyguaniny (są one widoczne zarówno w próbie zawierającej 8-oksyguaninę + enzym jak i w próbie kontrolnej nie zawierającej guanazy, rys. 4.4.2.4 A,B). Analiza spektralna piku 8-oksyguaniny po inkubacji z guanazą dowodzi, iż pik ten jest homogeny i tym samym nie koeluują z nim jakiegokolwiek potencjalne produkty reakcji enzymatycznej (rys. 4.4.2.4 C).

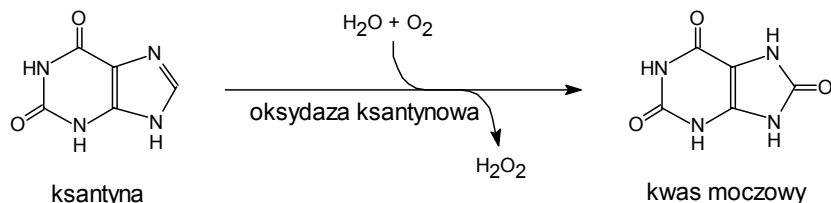


Rys. 4.4.2.4

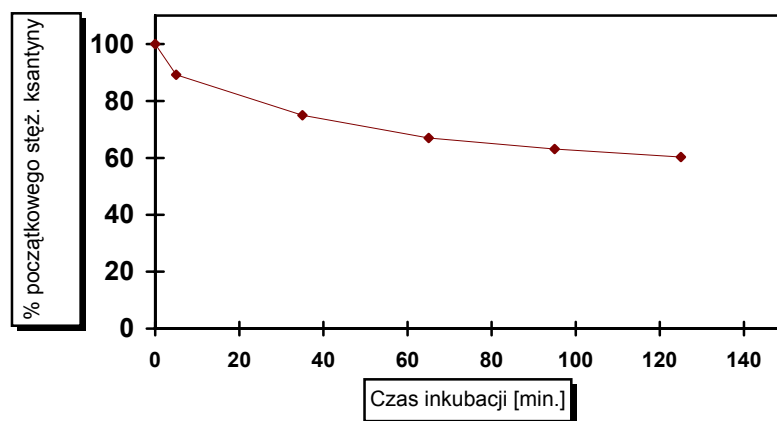
Rozdziály chromatograficzne mieszanin inkubacyjnych w trybie wysokosprawnej chromatografii cieczowej na kolumnie Supelcosil LC-18-S: A) 8-oksoguanina inkubowana w warunkach reakcji (Materiały i metody) przez 245 min. bez guanazy. B) 8-oksoguanina inkubowana z guanazą przez 245 min. w warunkach reakcji. C) Widma absorpcyjne w zakresie UV zarejestrowane przez detektor spektralny w momencie elucji 8-oksoguaniny (pik 1 i 2).

4.4.3 8-Oksyguanina jako potencjalny produkt reakcji oksydacji guaniny w pozycji C8 katalizowanej przez oksydazę ksantynową

W zastosowanych warunkach reakcji (25 μ M stężenie substratu, pH 7.5, 25°C), użyte w eksperymencie stężenie oksydazy ksantynowej z mleka krowiego prowadzi do wyraźnej oksydacji ksantyny w pozycji C8 (reakcja poniżej), która jest naturalnym substratem tego enzymu.

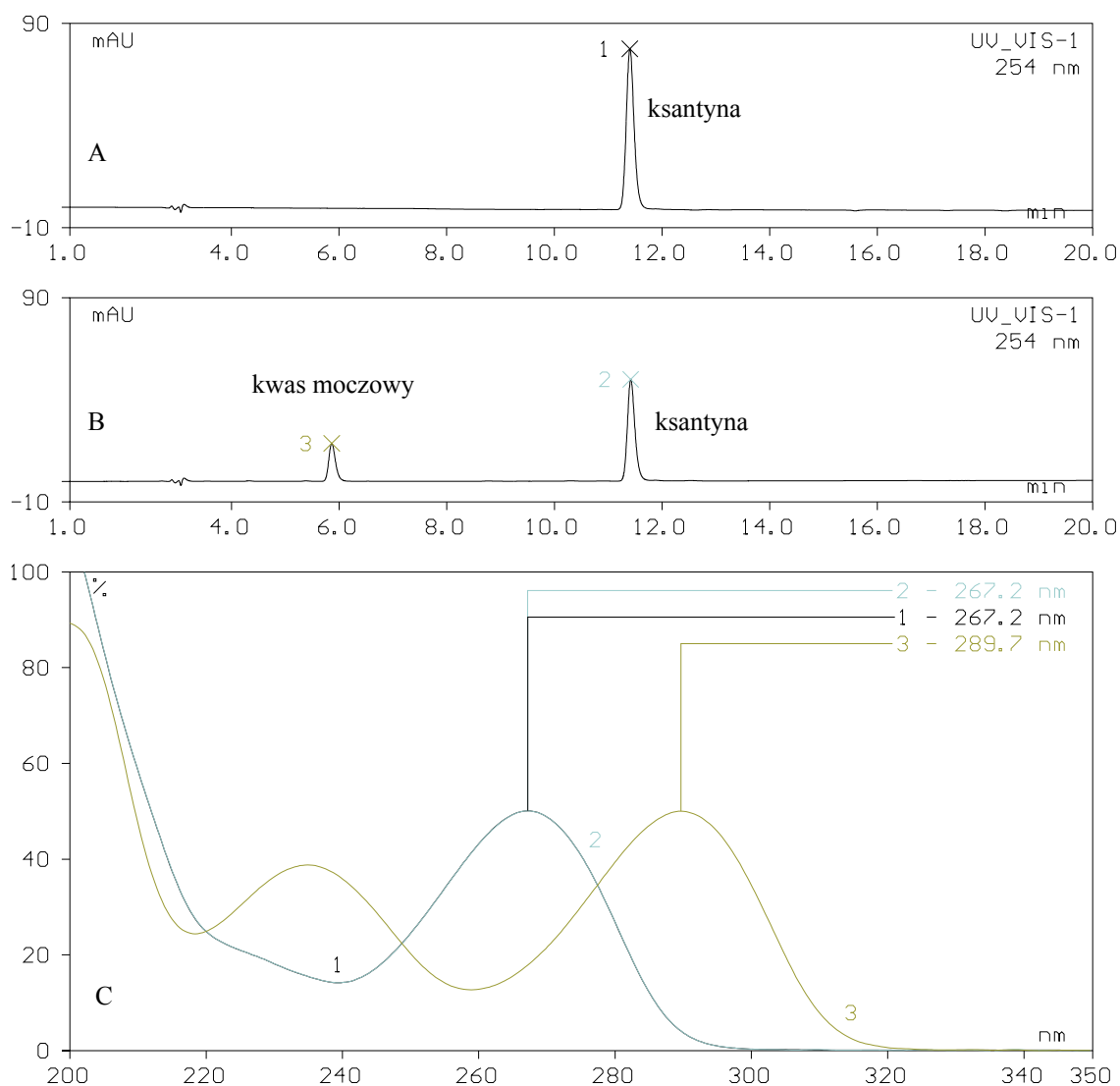


Jak wykazuje analiza chromatograficzna, w reakcji katalizowanej przez preparat oksydazy ksantynowej powstaje tylko jeden produkt reakcji pochłaniający w zakresie ultrafioletu (rys. 4.4.3.2 B). Jest nim kwas moczowy, który zidentyfikowano na podstawie czasu retencji i widma w zakresie UV (rys. 4.4.3.2 C). Po pięciu minutach od zainicjowania reakcji początkowe stężenie ksantyny spada do 89% wartości początkowej, by osiągnąć 60% po 125 minutach inkubacji (rys. 4.4.3.1).



Rys. 4.4.3.1

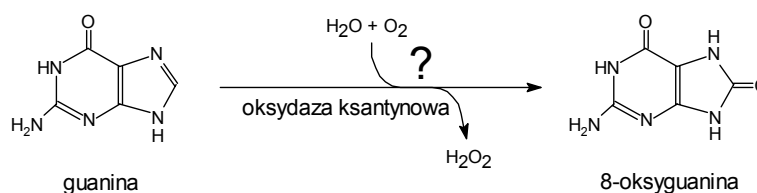
Postęp reakcji oksydacji ksantyny do kwasu moczowego pod wpływem oksydazy ksantynowej z mleka krowiego, przedstawiony jako ubytek stężenia substratu w czasie.



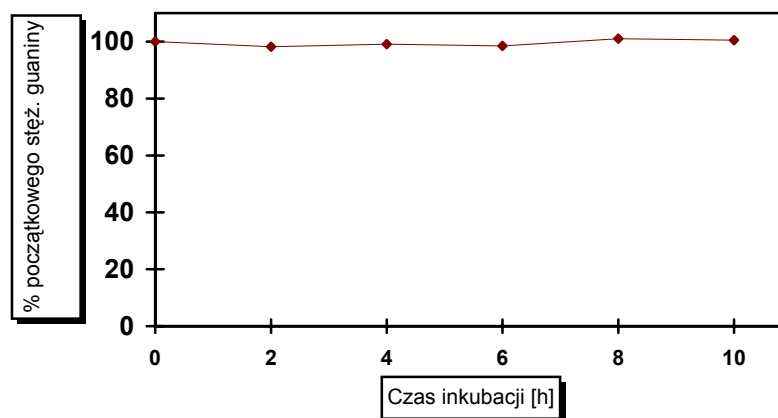
Rys. 4.4.3.2

Rozdzieli chromatograficzne mieszanin inkubacyjnych w trybie wysokosprawnej chromatografii cieczowej na kolumnie Supelcosil LC-18-S: A) ksantyna inkubowana w warunkach reakcji (Materiały i metody) przez 125 min. bez oksydazy ksantynowej, B) ksantyna inkubowana z oksydazą ksantynową przez 125 min. w warunkach reakcji. C) Widma absorpcyjne w zakresie UV zarejestrowane przez detektor spektralny w momencie elucji substratu (ksantyna, pik 1 i 2) oraz jednego produktu reakcji enzymatycznej - kwasu moczowego (pik 3).

Przedłużona inkubacja guaniny z oksydazą ksantynową miała na celu wyjaśnienie, czy enzym ten jest zdolny katalizować reakcję oksydacji guaniny w pozycji C8 z wytworzeniem 8-oksyguaniny według poniższego wzoru:



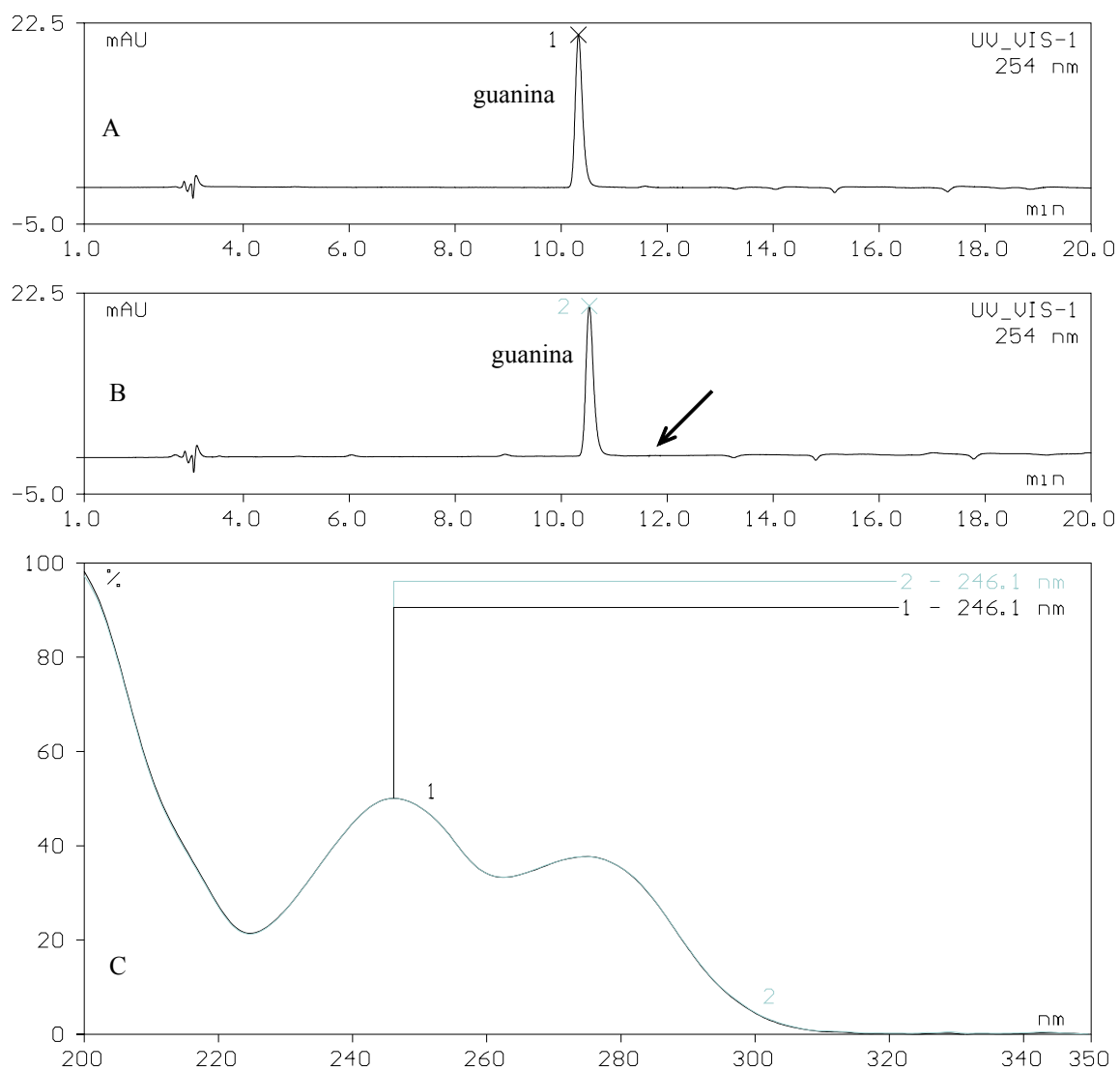
W warunkach identycznych z zastosowanymi w przypadku ksantyny, oksydaza ksantynowa nie powoduje ubytku stężenia guaniny nawet po 10 godzinach od chwili dodania preparatu enzymu (rys. 4.4.3.3).



Rys. 4.4.3.3

Stężenie guaniny w kolejnych godzinach inkubacji z oksydazą ksantynową z mleka krowiego przedstawione jako procent stężenia początkowego.

Analiza chromatograficzna wykonana po 10 godzinach inkubacji nie wykazuje obecności 8-oksyguaniny w mieszaninie inkubacyjnej (rys. 4.4.3.4 B, miejsce, w którym mógłby się pojawić pik 8-oksyguaniny oznaczono na chromatogramie strzałką), a analiza spektralna (UV) piku guaniny wykazuje jego homogenność, wykluczając możliwość koelucji guaniny z potencjalnymi produktami reakcji enzymatycznej (4.4.3.4 C). Należy podkreślić, że spektralny detektor UV-VIS stosowany w zestawie HPLC charakteryzuje się szczególnie wysoką czułością (poziom szumów przy $254 \text{ nm} \pm 0.4 \times 10^{-5} \text{ AU}$), co pozwoliłoby na wykrycie 8-oksyguaniny w stężeniu nawet 200 nM. Oznacza to, że przy zastosowanym stężeniu guaniny ($25 \mu\text{M}$) jako substratu można by zarejestrować jej przekształcenie do 8-oksyguaniny przy wydajności mniejszej niż 1%.



Rys. 4.4.3.4

Rozdziály chromatograficzne mieszanin inkubacyjnych w trybie wysokosprawnej chromatografii cieczowej na kolumnie Supelcosil LC-18-S: A) guanina inkubowana w warunkach reakcji (Materiały i metody) przez 10 h bez oksydazy ksantynowej, B) guanina inkubowana z oksydazą ksantynową przez 10 h w warunkach reakcji (miejsce, w którym mógłby się pojawić pik 8-oksyguaniny oznaczono na chromatogramie strzałką). C) Widma absorpcyjne w zakresie UV zarejestrowane przez detektor spektralny w momencie elucji guaniny (pik 1 i 2).

4.5 BADANIA NAD LUDZKĄ PIROFOSFATAZĄ 8-OXODGTP, ANTYMUAGENNYM ENZYMEM USUWAJĄCYM NIEBEZPIECZNY SUBSTRAT DLA SYNTEZY DNA

Przeprowadzona synteza 8-oksy-2'-deoksyguanozyno-5'-trifosforanu i 5'-monofosforanu dała możliwość podjęcia badań nad pirofosfatazą 8-oxodGTP, dla której związki te są odpowiednio substratem i produktem reakcji enzymatycznej.

4.5.1 Opracowanie metody oznaczania aktywności pirofosfatazy 8-oxodGTP oraz badania kinetyczne

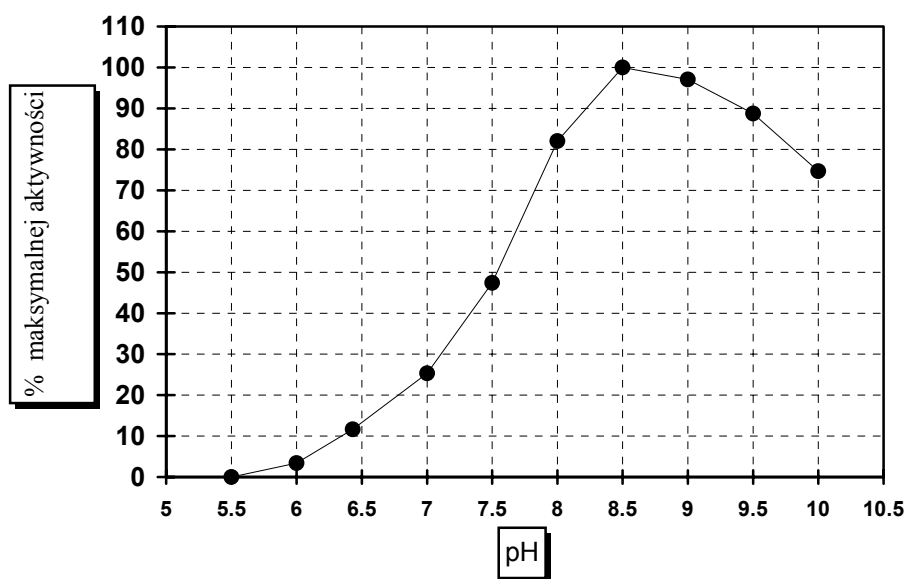
W komórkach ludzkich funkcjonują co najmniej dwa enzymy zdolne do hydrolizy 8-oxodGTP (Mo i wsp., 1992; Hayakawa i wsp., 1995). Jeden z nich to fosfataza hydrolizująca 8-oxodGTP do 8-oxodGDP z wydzieleniem ortofosforanu, która wykazuje wyższą specyficzność substratową wobec dGTP niż 8-oxodGTP. Drugi enzym, będący obiektem prezentowanych badań, to pirofosfataza 8-oxodGTP (katalizująca reakcję hydrolizy 8-oxodGTP do 8-oxodGMP z wydzieleniem pirofosforanu), wykazująca bardzo wysoką specyficzność substratową wobec 8-oxodGTP. Oprócz tych dwu hydrolitycznych aktywności wobec fosforanowych pochodnych 8-oxodG, w komórkach ludzkich funkcjonuje także enzym hydrolizujący 8-oxodGMP do 8-oxodG i ortofosforanu. Poddanie zatem 8-oxodGTP działaniu homogenatu komórek ludzkich w pH 7.4 powoduje powstawanie w mieszaninie reakcyjnej dwu fosforanowych pochodnych związku -8-oxodGDP i 8-oxodGMP, jak i nukleozydu - 8-oxodG (optimum pH dla fosfatazy 8-oxodGMP wynosi 6, ale enzym ten zachowuje do 45% maksymalnej aktywności nawet w pH 8.0 - obserwacje własne, dane nie prezentowane w tej pracy). W tej sytuacji nie jest możliwe oznaczenie aktywności pirofosfatazy 8-oxodGTP z użyciem prostego homogenatu komórkowego lub dializowanego izolatu wszystkich białek komórkowych jako źródłami enzymu. W pracy tej zaprezentowano prosty sposób na szybką izolację aktywności pirofosfatazowej wobec 8-oxodGTP z homogenatów lub dializowanych ekstraktów białek komórkowych (rozdział 3.6.3). Polega ona na ultrafiltracji ekstraktu białkowego, zawierającego wszystkie wymienione aktywności, przez membranę o odcięciu 30 kDa i użyciu ultrafiltratu do oznaczeń aktywności pirofosfatazy 8-oxodGTP. Wykorzystano tutaj różnicę w masach cząsteczkowych enzymów katabolizujących fosforanowe pochodne 8-oxodG. Ludzka pirofosfataza 8-oxodGTP jest małym białkiem o

masie cząsteczkowej 18 kDa. Pozostałe dwa enzymy interferujące w oznaczeniu aktywności pirofosfatazowej charakteryzują się masami cząsteczkowymi powyżej 30 kDa [fosfohydrolaza 8-oxodGMP - 40 kDa (Hayakawa i wsp., 1995), masa fosfohydrolazy 8-oxodGTP nie jest znana]. W efekcie, poddanie 8-oxodGTP działaniu takiego ultrafiltratu powoduje powstawanie jednego produktu reakcji - 8-oxodGMP (rys. 4.5.3 B), będącego efektem aktywności pirofosfatazowej. Także dGTP jest hydrolizowany przez tego rodzaju ultrafiltrat do jedyne go produktu - dGMP (rys. 4.5.6 B). Powyższy zabieg stworzył możliwości

- a) przeprowadzenia badań kinetyki hydrolizy 8-oxodGTP i dGTP przez pirofosfatazę 8-oxodGTP bez potrzeby uprzedniej izolacji enzymu metodami chromatograficznymi
- b) wykonania oznaczeń poziomu aktywności tego enzymu w komórkach ludzkich.

Wszystkie poniżej prezentowane badania kinetyczne przeprowadzono z użyciem ultrafiltratów ekstraktów białkowych z ludzkich fibroblastów, jako źródłem pirofosfatazy 8-oxodGTP.

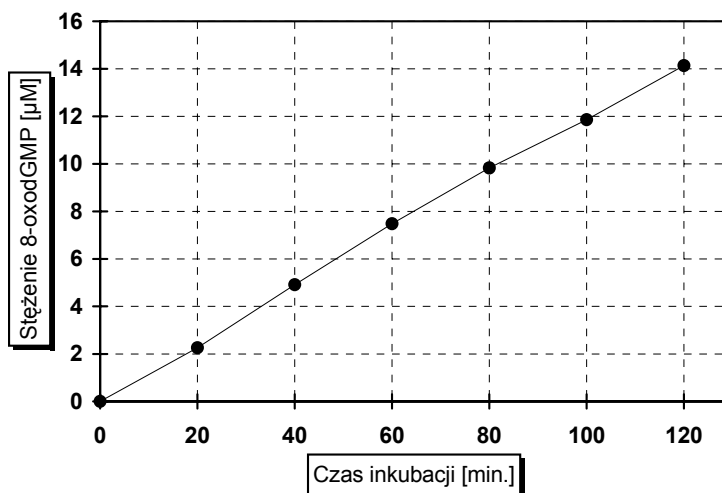
Wyznaczono optimum pH dla hydrolizy 8-oxodGTP przez pirofosfatazę 8-oxodGTP, które wynosi 8.5 (rys. 4.5.1).



Rys. 4.5.1
Zależność aktywności pirofosfatazy 8-oxodGTP wobec 8-oxodGTP od pH medium reakcyjnego

Aktywność enzymu jest całkowicie zależna od jonów Mg^{2+} , co daje możliwość przerywania reakcji enzymatycznej poprzez dodanie roztworu EDTA do mieszaniny reakcyjnej (rys 4.5.3a). W opracowanych warunkach reakcji ($40 \mu M$ 8-oxodGTP, pH 8.5, $5 mM Mg^{2+}$, $37^{\circ}C$,

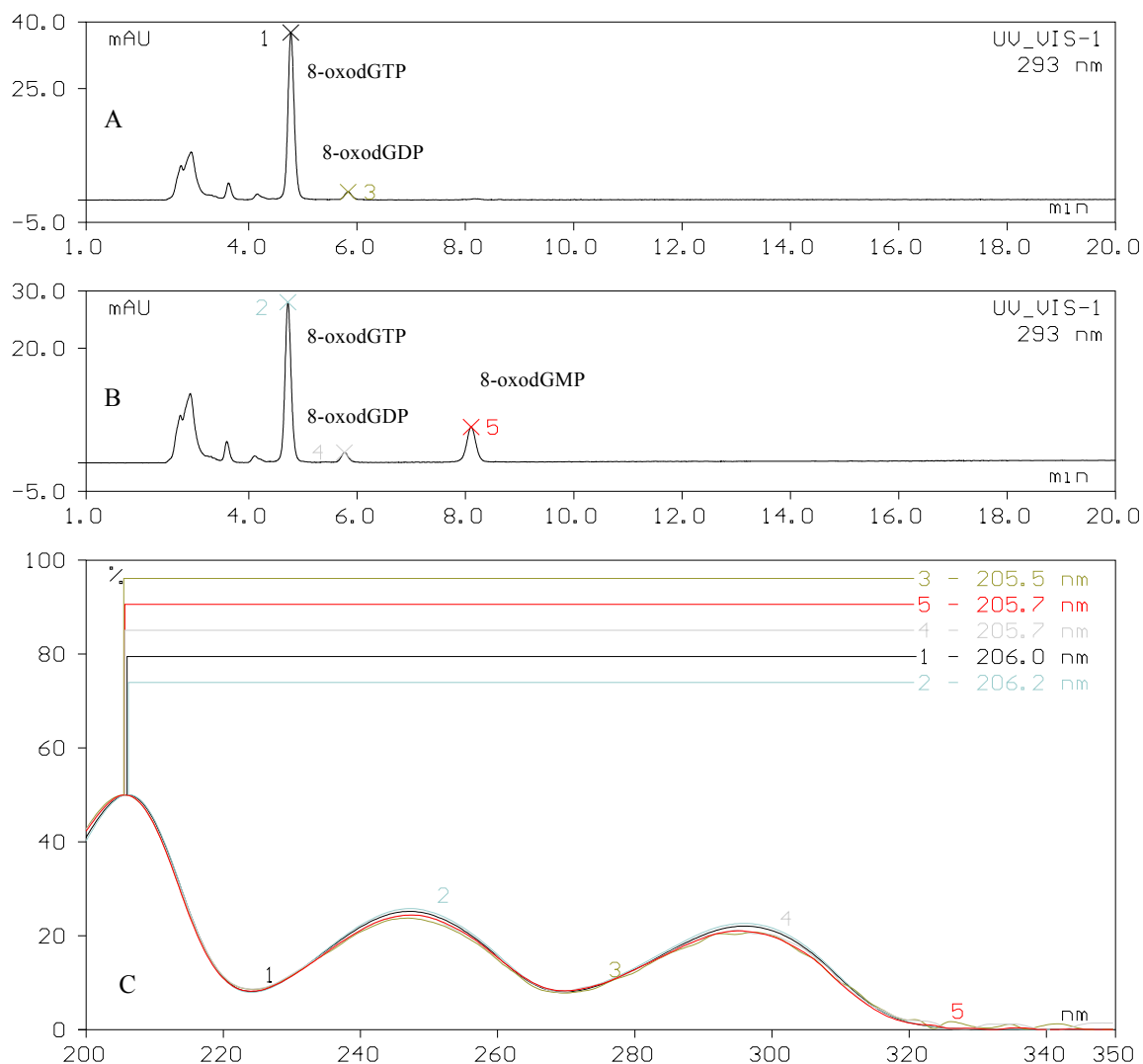
obj. całkowita mieszaniny reakcyjnej 30 μ l) obserwuje się liniowy przyrost stężenia produktu (8-oxodGMP) w czasie do 120 min., przy zastosowaniu do 4 U pirofosfatazy na próbę. Liniowość ta zachowana jest do momentu zhydrolizowania 35% początkowej ilości substratu (8-oxodGTP) (rys. 4.5.2).



Rys. 4.5.2

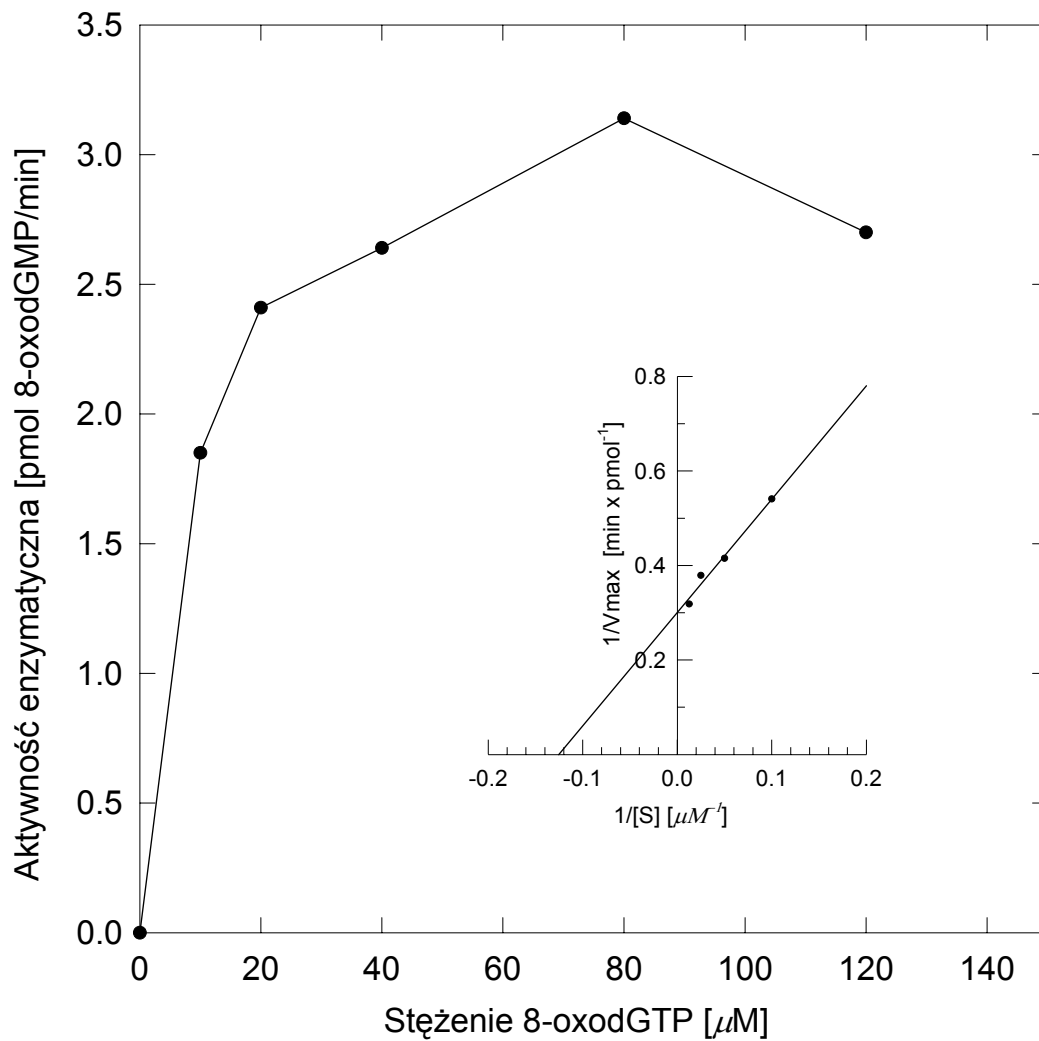
Przebieg reakcji hydrolizy 8-oxodGTP pod wpływem pirofosfatazy 8-oxodGTP wyrażony jako przyrost stężenia produktu (8-oxodGMP) w czasie. Reakcję prowadzono w opracowanych warunkach: 40 μ M 8-oxodGTP, 70 mM Tris-HCl, pH 8.5, 5 mM $MgCl_2$ + ultrafiltrat ekstraktu białkowego z fibroblastów ludzkich, temp. 37°C (szczegóły w rozdziale 3.6.5).

Począwszy od stężenia substratu rzędu 120 μ M zaobserwowano jego hamujący wpływ na aktywność enzymu (rys. 4.5.4). Wyznaczono wartość stałej Michaelisa (K_m) dla pirofosfatazy 8-oxodGTP w reakcji z 8-oxodGTP, która wynosi 8.5 μ M w pH 8.5, przy 5 mM stężeniu jonów magnezu (rys. 4.5.4). Wyznaczona wartość K_m świadczy o bardzo wysokim powinowactwie tego enzymu do 8-oxodGTP.



Rys. 4.5.3

Rozdział chromatograficzny produktów enzymatycznej hydrolizy 8-oxodGTP w trybie wysokosprawnej chromatografii cieczowej na kolumnie Supelcosil LC-18-T. A) Próba kontrolna: mieszanina zawierająca 8-oxodGTP, Tris-HCl, pH 8.5, MgCl₂, EDTA inkubowana przez 2h w 37°C z preparatem białka z fibroblastów ludzkich, przesączonym przez membranę o odcięciu 30kDa (EDTA dodano do mieszaniny przed dodaniem preparatu białkowego). B) Mieszanina o tym samym składzie, do której EDTA dodano po 2h inkubacji w celu przzerwania reakcji enzymatycznej (szczegóły na temat warunków oznaczenia w rozdz. 3.6.6). C) Widma fosforanowych pochodnych 8-oxodG zarejestrowane przez detektor spektralny w chwili ich elucji. Uwaga! Widoczny na obu chromatogramach 8-oxodGDP stanowi niewielkie zanieczyszczenie preparatu 8-oxodGTP pochodzące ze spontanicznej dekompozycji tego nietrwałego związku.

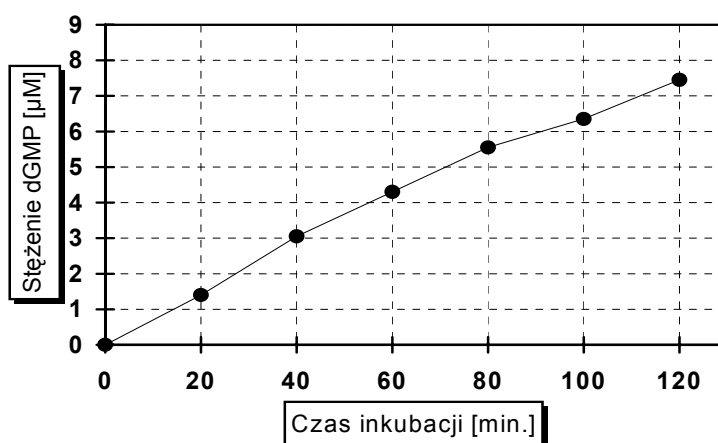


Rys. 4.5.4

Krzywa zależności aktywności pirofosfatazy 8-oxodGTP od stężenia substratu (8-oxodGTP). Oznaczenia wykonano inkubując przez 120 min. 2.6 U pirofosfatazy 8-oxodGTP ze wzrastającymi stężeniami substratu (pH 8.5). Aktywność wyliczano na podstawie oznaczenia ilości powstającego 8-oxodGMP za pomocą HPLC (szczegóły w rozdz. 3.6.6 i 3.6.7). Na wstawionym rysunku przedstawiono zależność odwrotności aktywności enzymatycznej (=szybkości maksymalnej reakcji przy danym stężeniu substratu) od odwrotności ze stężenia substratu wg. Lineweavera-Burka. Wartość K_m wyznaczona wg. metody Lineweavera-Burka wynosi $8.5 \mu\text{M}$ (uwaga na krzywej wg. Lineweavera-Burka nie umieszczono punktu odpowiadającego $120 \mu\text{M}$ stężeniu substratu, ponieważ przy tym stężeniu dochodzi już do wyraźnego hamowania aktywności enzymu przez substrat).

Chociaż ludzka pirofosfataza 8-oxodGTP jest enzymem szczególnie specyficznym dla 8-oxodGTP, to jednak jak wykazał Mo i wsp. (1992), ma ona również zdolność hydrolizowania dGTP do dGMP (szerzej to zagadnienie przedstawiono we wstępie). Powinowactwo tego enzymu do niezmodyfikowanego dGTP jest jednak o wiele niższe, jak informuje porównanie stałych K_m dla obu substratów (wg. Mo i wsp.: K_m 8-oxodGTP = 12.5 μ M, a K_m dGTP = 870 μ M).

Aktywność i właściwości kinetyczne pirofosfatazy 8-oxodGTP oznaczano w tej pracy w ultrafiltratach ekstraktów białkowych z ludzkich fibroblastów, a nie w oczyszczonych preparatach pirofosfatazy. W celu upewnienia się, iż oznaczana w ultrafiltratach aktywność pirofosfatazowa należy do tego samego enzymu, który oczyścił i scharakteryzował Mo i wsp., zbadano także kinetykę hydrolizy dGTP pod wpływem tychże ultrafiltratów białek fibroblastów. Prezentowane poniżej wyniki świadczą o tym, iż ultrafiltraty ekstraktów białkowych z fibroblastów wykazują jedynie pirofosfatazową aktywność wobec dGTP i jedyną obserwowaną pochodną dG pojawiającą się w mieszaninach reakcyjnych jest dGMP (rys. 4.5.6 b). Owa aktywność pirofosfatazowa wobec dGTP jest również całkowicie zależna od jonów magnezu (rys. 4.5.6 a). Wszystkie oznaczenia aktywności pirofosfatazy wobec dGTP oraz badania kinetyczne przeprowadzono według metod opracowanych dla badań nad aktywnością pirofosfatazy wobec 8-oxodGTP, zamieniając jedynie zastosowany substrat (dGTP zamiast 8-oxodGTP). W zastosowanych warunkach reakcja hydrolizy dGTP zachodząca pod wpływem ultrafiltratu białek fibroblastów zachowuje liniowość do momentu zhydrolizowania 25% początkowej ilości dGTP (rys. 4.5.5).



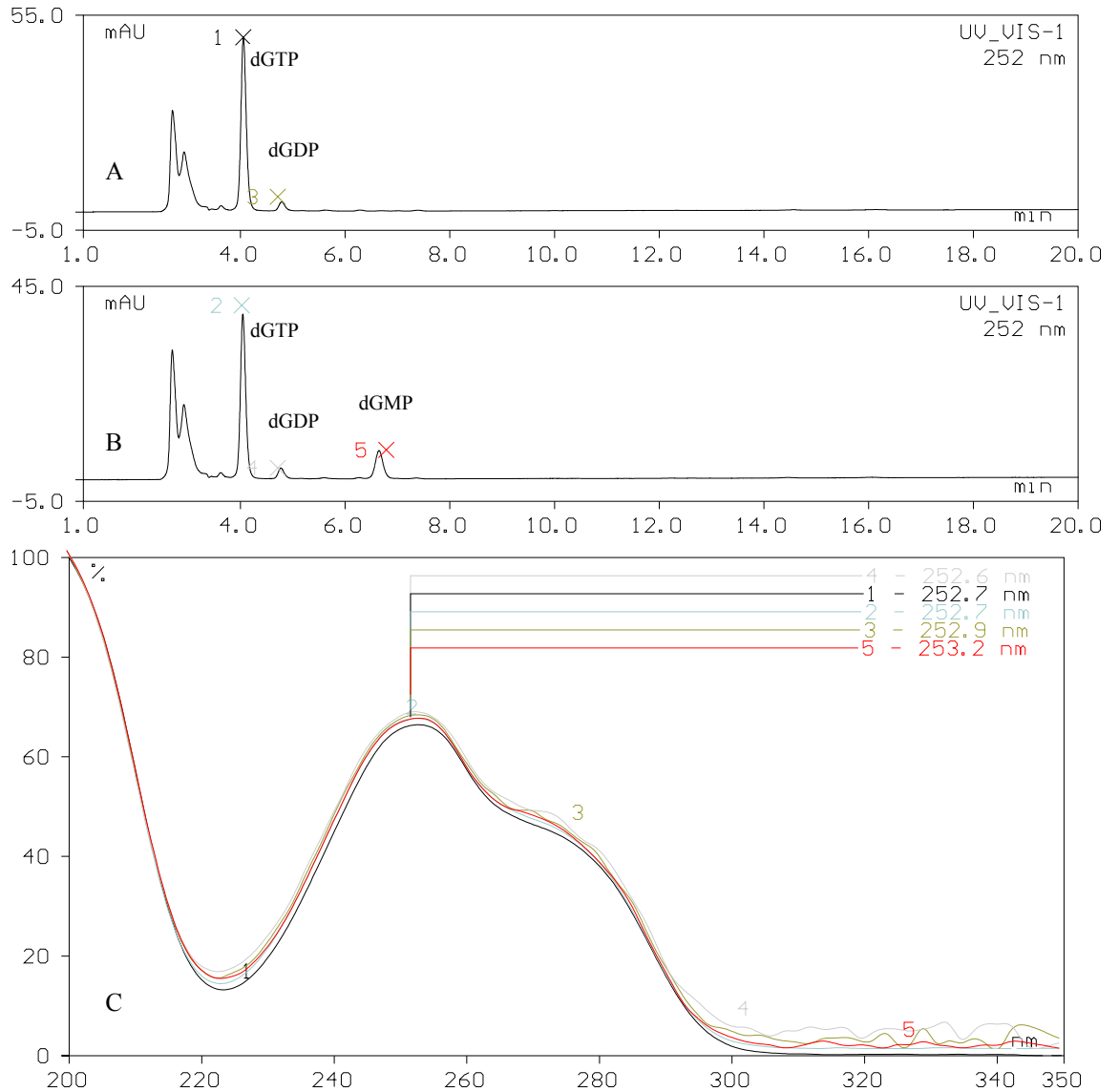
Rys. 4.5.5

Przebieg reakcji hydrolizy dGTP pod wpływem pirofosfatazy 8-oxodGTP wyrażony jako przyrost stężenia produktu (dGMP) w czasie. Reakcję prowadzono w opracowanych warunkach: 40 μ M dGTP, 70 mM Tris-HCl, pH 8.5, 5 mM $MgCl_2$ + ultrafiltrat ekstraktu białkowego z fibroblastów ludzkich, temp. 37°C (szczegóły w rozdziale 3.6.5).

Nie zaobserwowano natomiast hamowania aktywności enzymu przez substrat (dGTP) w stężeniu 120 μM , jak to miało miejsce w przypadku 8-oxodGTP jako substratu (rys. 4.5.7). Wyznaczono wartość stałej Michaelisa (K_m) dla reakcji hydrolizy dGTP przez pirofosfatazową aktywność zawartą w ultrafiltracie ekstraktu białkowego z ludzkich fibroblastów. Wynosi ona 167 μM , jak obliczono stosując metodę Lineweavera-Burka (rys. 4.5.7). Tym samym dowiedziono, iż obserwowana w ultrafiltratach aktywność pirofosfatazowa jest specyficzna wobec 8-oxodGTP, ponieważ wartość stałej K_m dla hydrolizy 8-oxodGTP jest 20 razy niższa od wartości K_m dla reakcji hydrolizy dGTP.

Zaprezentowane dane eksperymentalne, dotyczące charakterystyki aktywności pirofosfatazy deoksynukleozydotrifosforanowej w ultrafiltratach białkowych z ludzkich fibroblastów pozwalają sądzić, że aktywność ta pochodzi od enzymu oczyszczonego i scharakteryzowanego przez Mo i wsp. - pirofosfohydrolazy 8-oxodGTP (homologu bakteryjnego białka MutT). W poniższej tabeli porównano cechy charakterystyczne pirofosfatazy 8-oxodGTP wyizolowanej przez Mo i wsp. (1992) z zaobserwowanymi cechami enzymu będącego obiektem tej rozprawy:

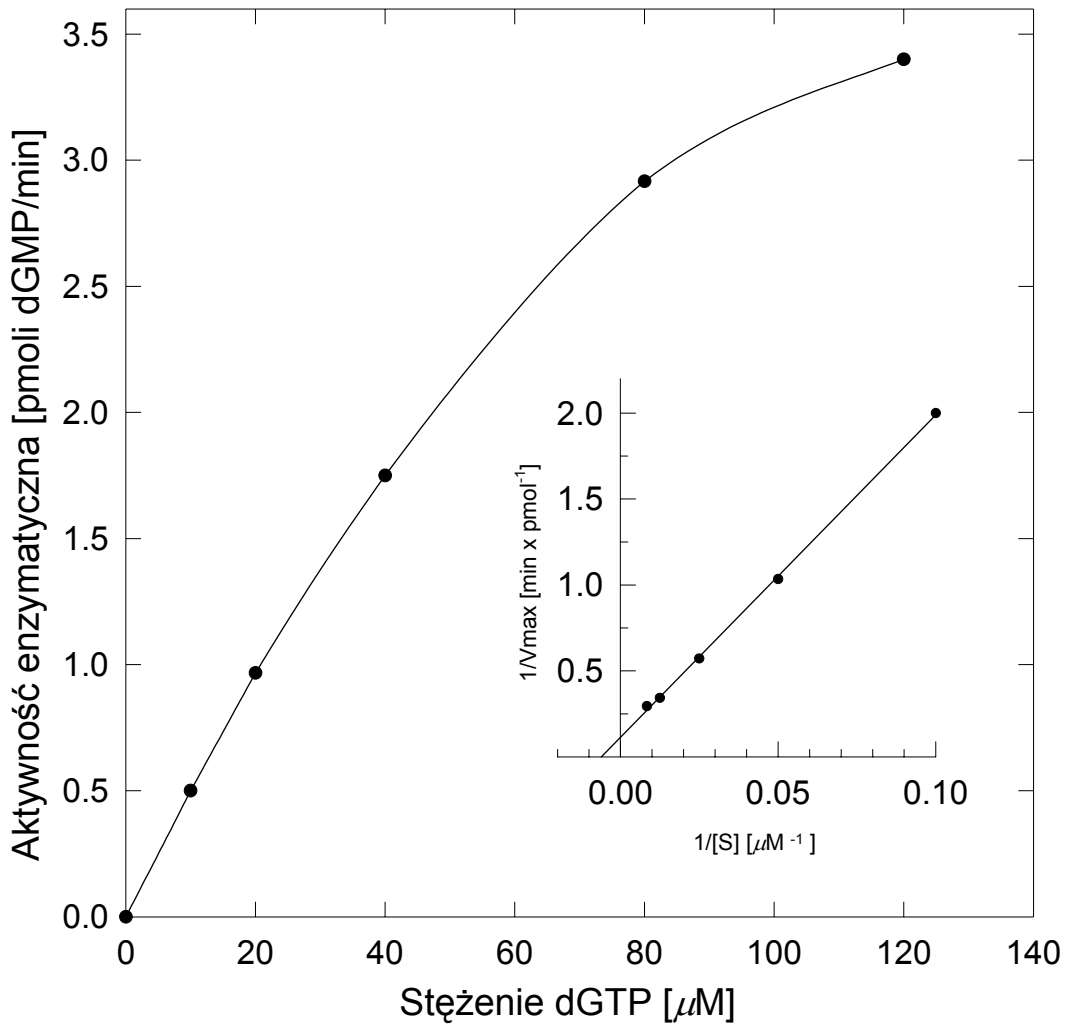
Cecha enzymu	Mo i wsp. 1992	Badania własne
Masa cząsteczkowa	18 kDa	< 30 kDa
Optimum pH dla reakcji hydrolizy 8-oxodGTP	8	8.5
Zależność od jonów Mg^{2+}	+	+
K_m dla reakcji hydrolizy 8-oxodGTP	12.5 μM	8.5 μM
K_m dla reakcji hydrolizy dGTP	870 μM	167 μM



Rys. 4.5.6

Rozdział chromatograficzny produktów enzymatycznej hydrolizy dGTP w trybie HPLC na kolumnie Supelcosil LC-18-T. A) Próba kontrolna: mieszanina zawierająca dGTP, Tris-HCl, pH 8.5, MgCl₂, EDTA inkubowana przez 2h w 37°C z preparatem białka z fibroblastów ludzkich, przesączonym przez membranę o odcięciu 30kDa (EDTA dodano do mieszaniny przed dodaniem preparatu białkowego). B) Mieszanina o tym samym składzie, do której EDTA dodano po 2h inkubacji w celu przerywania reakcji enzymatycznej (szczegóły na temat warunków oznaczenia w rozdz. 3.6.6). C) Widma fosforanowych pochodnych dG zarejestrowane przez detektor spektralny w chwili ich elucji.

Uwaga! Widoczny na obu chromatogramach pik dGDP jest wynikiem zanieczyszczenia handlowego wzorca dGTP przez produkt jego spontanicznej defosforylacji. Trifosforany nukleozydów są związkami bardzo nietrwałymi.



Rys. 4.5.7

Krzywa zależności aktywności pirofosfatazy od stężenia alternatywnego substratu - dGTP. Oznaczenia wykonano inkubując przez 120 min. ultrafiltrat ekstraktu białkowego z fibroblastów (odpowiadający 2.6 U pirofosfatazy 8-oxidGTP) ze wzrastającymi stężeniami substratu (pH 8.5). Aktywność wyliczano na podstawie ilości powstającego dGMP, oznaczonego za pomocą HPLC (szczegóły w rozdz. 3.6.6 i 3.6.7). Na wstawionym rysunku przedstawiono zależność odwrotności aktywności enzymatycznej (=szybkości maksymalnej reakcji przy danym stężeniu substratu) od odwrotności ze stężenia substratu wg. Lineweavera-Burka. Wartość K_m wyznaczona wg. metody Lineweavera-Burka wynosi 167 μM .

Warunkiem przeprowadzenia oznaczeń aktywności pirofosfatazy 8-oxodGTP z użyciem 8-oxodGTP lub dGTP jako substratów było opracowanie metody dokładnego, ilościowego oznaczania substratu i właściwego produktu reakcji. Opracowano więc metodę chromatograficznego rozdziału 8-oxodGTP od 8-oxodGMP i dGTP od dGMP, w trybie wysokosprawnej chromatografii cieczowej na kolumnie Supelcosil LC-18-T. Jest to kolumna o złożu mieszanym, na której rozdział związków odbywa się jednocześnie w oparciu o dwa rodzaje oddziaływań chromatograficznych: oddziaływania jonowymienne oraz oddziaływania hydrofobowe, charakterystyczne dla chromatografii z odwróconymi fazami. Zastosowanie takiej kolumny dało możliwość opracowania warunków szybkiego izokratycznego rozdziału tri-, di- i monofosforanów deoksynukleozydów. Wyraźną zaletą tego typu kolumny jest fakt uzyskiwania symetrycznych i ostrych pików związków ujemnie naładowanych jakimi są nukleotydy (w opracowanych warunkach rozdziału, czasy retencji dla 8-oxodGTP, 8-oxodGMP, dGTP i dGMP wynoszą odpowiednio: 4.7 , 8.0 , 4.1 , 6.6 min.; rys. 4.5.3 i 4.5.7). Zarówno tak znacznej retencji tych związków jak i symetrycznych, ostrych pików nie udaje się uzyskać stosując najpopularniejsze w HPLC kolumny z odwróconymi fazami (C18). Ma to niebagatelne znaczenie dla wysokiej czułości detekcji oznaczanych nukleotydów, która jest konieczna dla udanego przeprowadzania oznaczeń w warunkach bardzo niskiego stężenia substratów (40 μ M), a zwłaszcza produktów reakcji (należy podkreślić, że konieczne jest także posiadanie bardzo czułego detektora UV w zestawie HPLC).

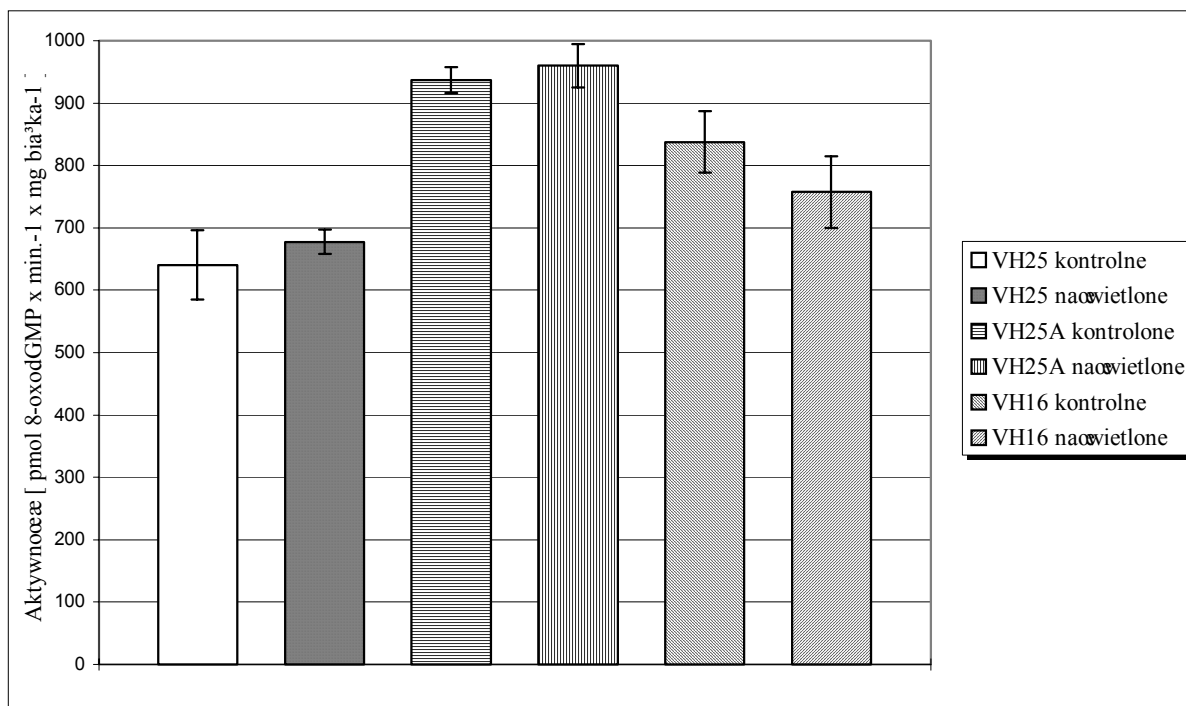
4.5.2 Wpływ promieniowania jonizującego na aktywność pirofosfatazy 8-oxodGTP w fibroblastach ludzkich.

Aktywność pirofosfatazy 8-oxodGTP według opracowanej metody oznaczono w trzech różnych liniach komórkowych hodowanych fibroblastów ludzkich: VH 25, VH 25A i VH 16. Kultura komórkowa każdej z linii została podzielona przed eksperymentem na dwie części, z których jedna stanowiła kontrolę, a druga została naświetlona promieniowaniem rentgenowskim (5 cGy, 16h przerwy i 10 cGy, w tempie 20 cGy/min). Po zakończeniu eksperymentu (opis doświadczenia w rozdz. „Materiały i metody”) zbadano aktywność pirofosfatazy 8-oxodGTP w preparatach fibroblastów poddanych i nie poddanych napromieniowaniu. Wyniki doświadczenia zebrano w tabeli 4.5.1 i zaprezentowano graficznie na rys. 4.5.8

Tabela 4.5.1

Wyniki badań nad aktywnością pirofosfatazy 8-oxodGTP w liniach fibroblastów ludzkich ekspozowanych i nie ekspozowanych na promieniowanie rentgenowskie.

Linia fibroblastów (traktowanie)	Stęż. białka w ekstrakcie białkowym z fibroblastów [µg/ml]	Aktywność pirofosfatazy 8-oxodGTP w ultrafiltracie (odcięcie 30kDa) ekstraktu białkowego z fibroblastów w milijednostkach aktywności [mU]	Aktywność pirofosfatazy 8-oxodGTP na miligram białka ekstraktu białkowego z fibroblastów [U / mg białka]	Średnia wartość aktywności pirofosfatazy 8-oxodGTP na mg białka ekstraktu białkowego z 3 powtórzeń [U/mg białka] (odchylenie standardowe)
VH 25 prom. X -	239	767 833 700	640 696 584	640 (±45)
VH 25 prom. X +	264	916 900 866	694 681 656	677 (±16)
VH 25A prom. X -	580	2650 2767 2733	913 954 942	937 (±17)
VH 25A prom. X +	452	2083 2200 2233	920 972 987	960 (±28)
VH 16 prom. X -	550	2383 2383 2150	866 866 781	838 (±40)
VH 16 prom. X +	581	2033 2200 2367	700 757 814	757 (±47)



Rys. 4.5.8

Aktywność pirofosfatazy 8-oxodGTP w liniach fibroblastów ludzkich eksponowanych i nie eksponowanych na promieniowanie rentgenowskie. Na wykres naniesiono wartości odchylenia standardowego obliczonego z 3 niezależnych oznaczeń aktywności.

Analiza uzyskanych wyników przy użyciu testu t-Studenta dla prób niesparowanych wykazuje brak statystycznie istotnych różnic aktywności pirofosfatazy 8-oxodGTP w fibroblastach eksponowanych i nie eksponowanych na promieniowanie rentgenowskie w obrębie poszczególnych linii komórkowych.

5. DYSKUSJA

Badania nad metabolizmem pochodnych 8-oksyguaniny pociągają za sobą konieczność syntezy tychże pochodnych z uwagi na to, iż zarówno 8-oksy-2'-deoksyguanozyna jak i jej fosforanowe pochodne - 5'-monofosforan i 5'-trifosforan - nie są handlowo dostępne.

Jakkolwiek w niniejszej pracy posłużono się opisanymi już metodami syntezy tych związków, to jednak wprowadzono szereg modyfikacji prowadzących do maksymalnego uproszczenia i przyśpieszenia poszczególnych procedur tak, aby mogły być one z powodzeniem przeprowadzone w pracowniach biochemicznych wyposażonych w podstawowy sprzęt laboratoryjny i HPLC. Ponieważ syntezy 8-oksy-2'-deoksyguanozyny, 8-oksy-2'-deoksyguanozyno-5'-monofosforanu i 8-oksy-2'-deoksyguanozyno-5'-trifosforanu, nie były głównym celem tej pracy, a jedynie punktem wyjścia prowadzonych badań, nie będą one tutaj dalej dyskutowane.

Promieniowanie jonizujące jest czynnikiem fizycznym powodującym rozliczne uszkodzenia DNA obserwowane zarówno w eksperymentach *in vitro* jak i *in vivo*, na które składają się aberracje chromosomowe, pojedyncze i podwójne pęknięcia nici DNA oraz szereg modyfikacji chemicznych powstających w obrębie deoksyrybozy, a przede wszystkim w obrębie zasad DNA (Fong i wsp., 1995; Ruiz de Almodovar i wsp., 1994; Buatti i wsp., 1992; Von Sonntag, 1987; Nackerdien i wsp., 1992; Fischer-Nielsen i wsp., 1994). Za najbardziej prawdopodobną drogę powstawania 8-oksydeoksyguanozyny w DNA komórek naświetlanych promieniowaniem rentgenowskim uważa się reakcję reszty guaniny z rodnikiem hydroksylowym powstającym w procesie radiolizy wody, stanowiącej 75-85% masy komórki (zagadnienie to omówiono we wstępie).

Wyniki zaprezentowane w niniejszej pracy wskazują, iż ekspozycja pacjentów na terapeutyczne dawki promieniowania rentgenowskiego powoduje wyraźny wzrost ilości 8-oxodG w DNA limfocytów izolowanych z krwi obwodowej. Podobne zjawisko zaobserwowali Wilson i wsp. (1993). Analizowali oni ilość 8-oxodG w DNA limfocytarnym pacjentów cierpiących na raka sutka, płuc i gruczołu krokowego, ekspozowanych na dawki promieniowania jonizującego rzędu 180-240 cGy. Jednakże porównywali oni poziom tego zmodyfikowanego nukleozydu w DNA naświetlanych pacjentów z poziomem oznaczonym w DNA ludzi nie poddanych radioterapii. Z uwagi na szereg doniesień wykazujących, iż ilość 8-

oxodG w DNA charakteryzuje się dużą zmiennością osobniczą (Oliński i wsp., 1992; Jaruga i wsp., 1994; Oliński i wsp., 1995), w niniejszej pracy porównywano poziom 8-oxodG w DNA tych samych pacjentów, oznaczony przed i bezpośrednio po zakończeniu ekspozycji radioterapeutycznych.

Poziom 8-oxodG w limfocytarnym DNA pacjentów przed rozpoczęciem zabiegów radioterapeutycznych wahał się między 8 a 14 cząsteczek 8-oxodG na 100,000 niezmodyfikowanych cząsteczek dG. Te relatywnie wysokie wartości kontrolne wynikają prawdopodobnie z faktu, iż wszyscy badani pacjenci cierpieli na wysoko zaawansowane stadium rozwoju choroby nowotworowej, czemu może towarzyszyć obniżenie skuteczności funkcjonowania elementów systemu antyoksydacyjnego organizmu i podwyższenie ilości oksydacyjnych pochodnych zasad w DNA (Szatrowski i Nathan, 1991; Feig i wsp., 1994; Toyokuni i wsp., 1995). Ekspozycja pacjentów na terapeutyczne dawki promieniowania rentgenowskiego (3000 cGy, dawka dzienna 200 cGy) spowodowała istotny wzrost poziomu 8-oxodG w limfocytarnym DNA pacjentów. Wzrost ten był różny w zależności od pacjenta i wynosił od 50 do 100% w stosunku do wartości kontrolnej (przed naświetlaniem), pomimo iż wszyscy pacjenci otrzymali identyczną dawkę pochłoniętą promieniowania jonizującego. Ta nierównocенność odpowiedzi wskazywać może na duże różnice międzypersoniczne w zakresie wrażliwości na promieniowanie i/lub wydolności systemu naprawy DNA u poszczególnych chorych, co w konsekwencji może znaleźć swoje odzwierciedlenie w ilości oksydacyjnie zmodyfikowanych zasad w DNA (Setlow, 1983; American Association for Cancer Research Special Conference, Risk assessment in environmental carcinogenesis, Cancer Res. 54, 1994). Dalsze badania w tym kierunku, obejmujące większą grupę pacjentów mogłyby pomóc w znalezieniu odpowiedzi na pytanie, czy obserwowana zmienność w zakresie wzrostu ilości 8-oxodG w DNA naświetlanych chorych może mieć jakąś wartość prognostyczną, innymi słowy, czy pacjenci różniący się w zakresie badanego parametru, wykazują również różny stopień promieniouleczałności zmian nowotworowych ?

W przypadku pacjenta D oznaczono również poziom 8-oxodG w limfocytarnym DNA po 24 godzinach od ostatniej ekspozycji na promieniowanie. Zaobserwowano wyraźny spadek ilości 8-oxodG w porównaniu z wartością zarejestrowaną tuż po zakończeniu ostatniej ekspozycji, co sugeruje istnienie efektywnych mechanizmów usuwających ten rodzaj uszkodzenia z DNA limfocytów pacjenta. Do chwili obecnej dowiedziono istnienia kilku enzymów naprawy DNA spełniających powyższą funkcję (przegląd we wstępie).

Ponad 5% populacji ludzi chorych na raka, to jednostki wykazujące nadwrażliwość na promieniowanie jonizujące na tle genetycznym, związaną najczęściej z brakiem zdolności do efektywnej naprawy różnych typów uszkodzeń DNA (Busch, 1994). Pacjenci tacy często doznają szeregu powikłań popromiennych, z wtórnymi nowotworami włącznie. Obecnie poszukuje się diagnostycznych metod rozpoznawania u pacjentów nadwrażliwości przed przystąpieniem do zabiegów radioterapeutycznych, co pozwoliłoby na optymalizowanie dawki promieniowania jonizującego w przypadku każdego pacjenta, a w razie skrajnej wrażliwości - na odrzucenie radioterapii na rzecz innych metod terapii nowotworów. W przypadku niewydolności systemu naprawy oksydacyjnych uszkodzeń DNA typu 8-oksoguaniny, metodą taką mogłoby być naświetlanie krwi pacjentów w celu zbadania dynamiki powstawania i usuwania 8-oksodeoksyguanozyny z DNA limfocytów.

Inne potencjalne zastosowanie diagnostyczne oznaczeń 8-oksyo-2'-deoksyguanozyny w przebiegu radioterapii związane jest z oceną promienioczułości guzów nowotworowych. Od dawna wiadomo, iż poszczególne rodzaje nowotworów znacznie różnią się promienioczułością, co może być związane z wydolnością procesów naprawy DNA w komórkach nowotworowych. Informacja na temat promienioczułości guza nowotworowego pozwala na dobranie najodpowiedniejszej metody terapeutycznej. Zaproponowane w ostatnich latach metody oceny promienioczułości guzów nowotworowych polegają na pobraniu drogą biopsji komórek guza i badaniu ich przeżywalności po ekspozycji na promieniowanie jonizujące (zdolność do tworzenia kolonii na płytkach agarowych wysyconych odpowiednim medium hodowlanym). Głównym ograniczeniem w szerokim zastosowaniu klinicznym tej metody jest jej czasochłonność (ok. 4 tygodni) i kosztowność. Badania dotyczące korelacji pomiędzy dynamiką powstawania i usuwania 8-oxodG w naświetlonych *in vitro* komórkach guzów a ich charakterystyczną promienioczułością, ujawniającą się w przebiegu radioterapii, mogłyby dać nadzieję na opracowanie o wiele mniej czasochłonnej metody szacowania promienioczułości guzów nowotworowych. Techniczna realizacja takich badań wydaje się być możliwa, ponieważ ostatnio opisano modyfikacje metody oznaczania poziomu 8-oxodG w DNA wyizolowanym z ilości materiału biologicznego odpowiadającej tej pobieranej podczas biopsji (Adachi i wsp., 1995; Nakae i wsp., 1995).

Obserwowane *in vivo* podwyższanie się poziomu oksydacyjnych pochodnych zasad w DNA pod wpływem promieniowania jonizującego (lub czynników chemicznych) oraz jego obniżanie się po pewnym czasie jest zapewne wypadkową kilku procesów, a mianowicie:

- powstawania zmodyfikowanej zasady pod wpływem wymienionych czynników
- usuwania powstałego uszkodzenia przez enzymy naprawy DNA
- samorzutnego (nieenzymatycznego) rozpadu produktu modyfikacji lub jego dalszej modyfikacji

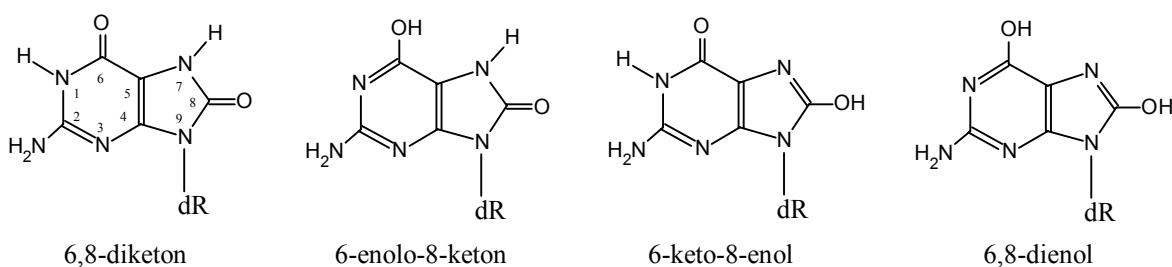
Zarówno procesy prowadzące do powstawania zmodyfikowanych zasad w DNA, jak i procesy ich późniejszej naprawy są obecnie obiektem intensywnych badań. Niewiele uwagi natomiast poświęcano do chwili obecnej zagadnieniom stabilności produktów modyfikacji DNA (zwłaszcza oksydacyjnych), choć parametr ten może mieć kluczowe znaczenie dla efektów biologicznych powodowanych przez poszczególne pochodne zasad.

Stąd też spadek ilości 8-oksyguaniny w DNA trudno jednoznacznie zakwalifikować jako skutek naprawy enzymatycznej, dopóki nie znana jest chemiczna trwałość tego produktu w DNA. W tym kontekście szczególnie istotna jest informacja na temat trwałości wiązania N-glikozydowego łączącego zmodyfikowaną zasadę z resztą deoksyrybozy, ponieważ jak wiadomo, szereg pochodnych guaniny jest szczególnie podatna na spontaniczną depurynację.

Stabilność wiązań N-glikozydowych nukleozydów będących typowymi produktami modyfikacji przez wolne rodniki tlenowe nie była dotąd obiektem badań. Laayoun i wsp. (1994) badali natomiast labilność hydrolityczną deoksynukleozydów purynowych zmodyfikowanych w pozycji C8 takimi podstawnikami jak -Br, -SH, -SCH₃, -S-CH₂-CH₂-CH₃, -SO₂CH₃. W przypadku wszystkich tego typu pochodnych 2'-deoksyguanozyny obserwowali oni drastyczną labilizację wiązania N-glikozydowego w porównaniu do niezmodyfikowanej deoksyguanozyny (w skrajnym przypadku pochodnej metylosulfonowej odnotowano przyśpieszenie szybkości hydrolizy o 29000 razy). Wykazali oni także wyraźną dodatnią korelację pomiędzy elektrofilowością danego podstawnika wyrażoną w postaci wartości stałej Hammeta i Tafta, a labilnością wiązania N-glikozydowego zmodyfikowanej nim deoksyguanozyny w pozycji C8. Wszystkie przebadane przez nich podstawniki charakteryzują się dodatnimi wartościami stałej Hammeta i Tafta, a ich wprowadzenie w pozycję C8 deoksyguanozyny powoduje wyraźną labilizację wiązania N-glikozydowego.

Wyniki prezentowane w niniejszej pracy dowodzą wyraźnej stabilizacji wiązania N-glikozydowego w cząsteczce 8-oxodG w porównaniu z dG. Spostrzeżenie to pozwala na

wyciągnięcie pewnych wniosków dotyczących formy tautomerycznej 8-oxodG. W przeważającej części prac poświęconych 8-oksy-2'-deoksyganozynie (zwłaszcza tych o charakterze klinicznym), cząsteczka ta jest nazywana 8-hydrokso-2'-deoksyganozyną. Ta zwyczajowa nazwa związku pochodzi z okresu, kiedy posiadano bardzo skąpe informacje na temat jego tautomerii. Zakładano wówczas, iż przeważającym tautomerem jest forma 6-keto-8-enol (rys. 5.1). Gdyby tak rzeczywiście było, to uwzględniając wartość stałej Hammeta i Tafta dla grupy -OH równą +0.1, musielibyśmy obserwować znaczną labilizację wiązania N-glikozydowego 8-hydrokso-dG (rys. 5.1) w porównaniu z dG. Tak jednak nie jest, co przemawia za tym, iż dominującą formą tautomeryczną jest forma posiadająca grupę ketonową w pozycji C8 (rys. 5.1). Literatura ostatnich lat dostarcza rozlicznych dowodów na taki stan rzeczy.



Rys. 5.1

Potencjalne formy tautomeryczne 8-oksy-2'-deoksyganozyny. Resztę deoksyrybozy oznaczono jako dR.

Badania struktury 9-etylo-8-hydroksoguaniny metodą krystalografii rentgenowskiej wykazały, że przyjmuje ona formę 6,8-diketo (Kasai i wsp., 1987). Już w 1977 roku Uesugi i Ikehara sugerowali na podstawie badań prowadzonych metodą jądrowego rezonansu magnetycznego, że substytucja atomem tlenu w pozycji C8 guaniny spowoduje powstanie pochodnej o konformacji 6,8-diketo. Aida i Nishimura przeprowadzili w 1987 r. (Aida i Nishimura, 1987) obliczenia kwantowe na poziomie *ab initio*, które wykazały istnienie dwu stabilnych form tautomerycznych 8-hydroksoguaniny, formy 6,8-diketo i 6-enolo-8-keto (rys. 5.1). Tautomer 6,8-diketo charakteryzuje się najniższą energią i dzięki temu uznany został za najbardziej stabilną formę tej zasady. Najpoważniejszy wkład w badania nad strukturą nukleozydu, ówczśnie powszechnie nazywanego 8-hydrokso-2'-deoksyganozyną wnieśli w 1989 r. Culp i wsp. stosując szereg metod eksperymentalnych. Badacze ci zastosowali spektroskopię jądrowego rezonansu magnetycznego, spektroskopię w zakresie promieniowania podczerwonego i ultrafioletowego, a także wyznaczyli stałe równowagi dla przejść tautomerycznych w różnych pH. Dla przejścia tautomerycznego 6,8-diketo \Leftrightarrow 6-

enolo-8-keto pKa wynosi 8, a zatem w pH fizjologicznym oczekiwać można zdecydowanej przewagi formy 6,8-diketo. Natomiast wartość pKa dla przejścia tautomerycznego 6-enolo-8-keto \leftrightarrow 6,8-dienolo wynosi 12. Wszystkie z zastosowanych metod potwierdziły zdecydowaną przewagę tautomeru 6,8-diketo tzw. 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyny w roztworach o pH fizjologicznym, a także w stanie stałym.

Wysoka stabilność 8-oksy-2'-deoksyguanozyny ma zapewne także biologiczne implikacje. Do chwili obecnej opublikowano szereg doniesień dotyczących wyraźnej akumulacji 8-oxodG w DNA starzejących się organizmów (Hayakawa i wsp., 1992; Takasawa i wsp., 1993; Mecocci i wsp., 1993; Homma i wsp., 1994; Sohal i wsp., 1994). Fakt ten wiązany jest z podwyższającym się ryzykiem wystąpienia procesów nowotworowych i chorób degeneracyjnych wieku starczego. Warunkiem koniecznym wystąpienia akumulacji określonej pochodnej zasady w DNA jest oprócz niewydolności procesów naprawczych także stabilność tejże pochodnej, w tym stabilność wiązania N-glikozydowego wiążącego ją ze zrzębem fosfocukrowym DNA długożyjących komórek somatycznych. Uwalnianie niezmodyfikowanych zasad purynowych z DNA jest procesem spontanicznym. Według Lindahla w DNA pojedynczej komórki dochodzi do około dziesięciu tysięcy spontanicznych depurynacji w ciągu jednego dnia (Lindahl, 1993). To oznacza, że w skali roku około 1 na 1000 puryn genomu komórki podlegać może spontanicznemu odszczepieniu. Tempo depurynacji spontanicznej drastycznie zwiększa się w przypadku większości pochodnych guaniny (np. 7-metyloguaniny). 8-Nitroguanina powstająca w DNA pod wpływem nadtlenoazotynu charakteryzuje się szczególnie wysokim tempem depurynacji, jej czas półtrwania w DNA jest rzędu 4 godzin w temperaturze 37°C i pH 7.4 (Yermilov i wsp., 1996).

Biorąc pod uwagę zdecydowanie większą stabilność wiązania N-glikozydowego wiążącego 8-oksyguaninę ze zrzębem fosfocukrowym należy uznać, iż 8-oxoGua jest szczególnie trwałym produktem oksydacyjnego uszkodzenia DNA i niepodatnym na spontaniczną hydrolizę. Zatem za uwalnianie 8-oksyguaniny z DNA komórkowego odpowiedzialne są głównie enzymy naprawcze scharakteryzowane w rozdziale 1.11. Fakt ten może mieć związek z obserwowaną eksperymentalnie wysoką mutagennością tej modyfikacji guaniny *in vivo*. Obserwacja ta została w ostatnim czasie potwierdzona przez Chernikova i wsp. (1996), którzy badali stabilność wiązania N-glikozydowego deoksyguanozyny, guanozyny oraz ich 8-oksy pochodnych w wysokich temperaturach, niskim pH oraz w warunkach ekspozycji na promieniowanie jonizujące.

Choć jak wykazano, 8-oksydeoksyguanozyna jest cząsteczką bardzo stabilną, to jednak w moczu ludzi i innych ssaków obserwuje się obecność zarówno 8-oksydeoksyguanozyny jak i wolnej zasady - 8-oksyguaniny, przy czym ta ostatnia wydalana jest w większych ilościach (Shigenaga i wsp. 1994; Suzuki i wsp. 1995). Zapewne wolna zasada nie jest w tym przypadku produktem spontanicznej depurynacji nukleozydu. Rodzi się więc pytanie o źródło 8-oxodG i 8-oxoGua obserwowanych w moczu ssaków. W świetle obecnego stanu wiedzy pierwszą narzucającą się hipotezą jest pochodzenie obu cząsteczek z procesów naprawy DNA. Do chwili obecnej zidentyfikowano kilka enzymów ludzkich usuwających 8-oxoGua z DNA.

Bessho i wsp. dowiedli istnienia w ekstraktach jądrowych komórek ludzkich dwu enzymów wycinających 8-oksyguaninę z DNA, charakteryzujących się odmiennym mechanizmem działania (Bessho i wsp., 1993 a). Pierwszy z nich to 8-oxoGua N-glikozylaza, wycinająca 8-oksyguaninę z dwuniciowych fragmentów DNA, zawierających 8-oxoGua sparowaną z cytozyną, tyminą lub guaniną. Produktem jej działania jest wolna 8-oxoGua i dwuniciowy DNA zawierający miejsce apurynowe. Drugi z odkrytych enzymów posiada aktywność 8-oxoGua endonukleazy, która wykazuje zarówno aktywność N-glikozylazową (uwalnia wolną 8-oksyguaninę), ale zdolny jest także do katalizowania reakcji hydrolizy wiązań fosfodiesterowych w DNA, prowadząc do wycięcia fragmentu odpowiadającego deoksyrybozo-3',5'-difosforanowi z dwuniciowego DNA w miejscu wcześniejszego wycięcia 8-oxoGua. Udowodniono, iż enzym scharakteryzowany wcześniej jako N-metylopuryno-DNA-glikozylaza, funkcjonujący w tkankach ludzkich i mysich, posiada również aktywność N-glikozylazową wobec 8-oksyguaniny zawartej w dwuniciowym DNA (Bessho i wsp., 1993 b).

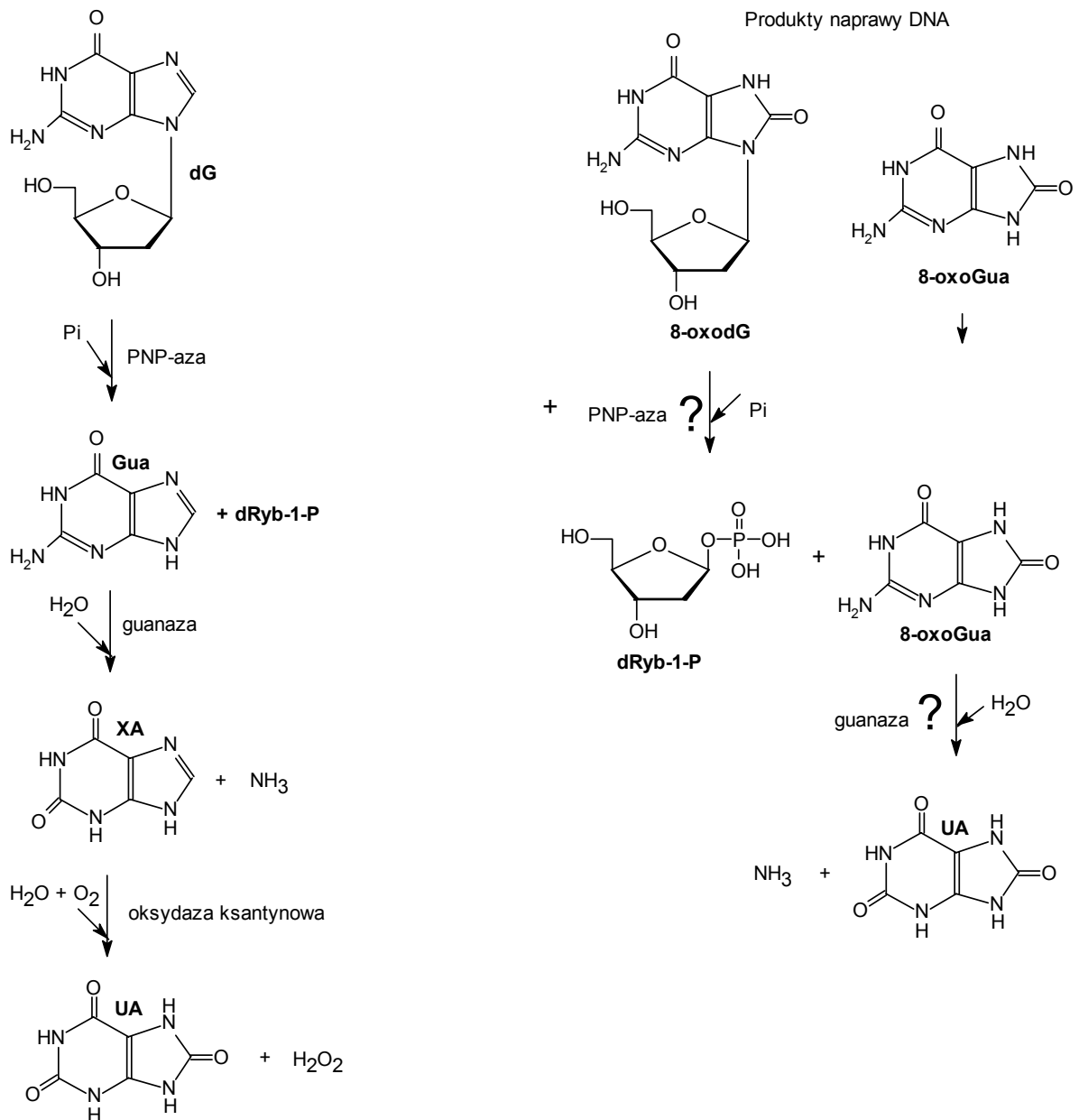
Jak dotąd nie scharakteryzowano ssaczych enzymów naprawy DNA, które odpowiedzialne są za usuwanie 8-oksyguaniny w postaci nukleozydu lub fragmentu oligonukleotydowego zawierającego to uszkodzenie. Pomimo to, większość badaczy uznaje 8-oxodG za charakterystyczny produkt naprawy oksydacyjnie uszkodzonego DNA. Istnieją pewne dowody pośrednie, iż w komórkach bakteryjnych za naprawę DNA zawierającego 8-oksyguaninę odpowiedzialne są także enzymy naprawy przez wycinanie, takie jak kompleks UvrABCD endonukleazy (Shennan i wsp., 1996).

W bieżącej literaturze panuje duża zgodność co do zastosowania oznaczeń 8-oxoGua lub 8-oxodG w moczu jako bardzo dobrego markera uszkodzeń oksydacyjnych DNA *in vivo*. Opinia taka opiera się jednak na następujących założeniach:

1. 8-oksyo-2'-deoksyguanozyna i 8-oksyoquanina obecna w moczu pochodzą w całości z badanego organizmu i nie są pobierane przez przewód pokarmowy wraz z pokarmem.
2. W badanym organizmie nie istnieją żadne systemy enzymatycznej oksydacji guaniny lub jej pochodnych nukleozydowych lub nukleotydowych, zdolne do jej katalitycznej oksydacji w pozycji C8.
3. 8-OxoGua i 8-oxodG obserwowane w moczu pochodzą w zdecydowanej większości z procesów oksydacji DNA, a nie wolnej guaniny, wolnej deoksyguanozyny lub jej pochodnych fosforanowych.
4. 8-OxoGua i 8-oxodG są końcowymi produktami katabolizmu i nie podlegają w organizmie dalszym procesom degradacji enzymatycznej.

Najbardziej kompleksowe badania mające na celu potwierdzenie słuszności powyższych założeń przeprowadzone zostały przez zespół Ames z zastosowaniem modelu zwierzęcego (Shigenaga i wsp., 1989). Dowiedli oni, iż 8-oxodG obecna w moczu szczura nie powstaje na skutek oksydacji deoksyguanozyny (dG) przez składniki moczu. Dożylne podanie szczurom trytowanej dG nie powodowało pojawienia się w moczu znakowanej 8-oxodG. Dziewiętnastodniowa inkubacja moczu zawierającego [H^3]dG w temperaturze 4°C nie prowadziła do powstania zauważalnych ilości [H^3]8-oxodG. W celu zbadania potencjalnej możliwości powstawania 8-oxodG z dG pod wpływem enzymów cytozolowych, inkubowali oni [H^3]dG przez 60 min. (37°C) z frakcją białek rozpuszczalnych wątroby szczurzej. Nie zaobserwowali jednak formowania [H^3]8-oxodG stosując HPLC z bardzo czułą detekcją radiochemiczną. W celu sprawdzenia potencjalnej aktywności hydroksylazowej cytochromu P-450 wobec dG inkubowali oni [H^3]dG z mikrosomami izolowanymi z wątroby myszy, także nie obserwując powstawania [H^3]8-oxodG. Przeprowadzone przez tych autorów eksperymenty dowiodły, że znakowana 8-oxodG jest pobierana do ustroju przez układ pokarmowy szczura i wydalana z moczem w ilości odpowiadającej 2% całkowitej ilości podanej dożołądkowo. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, iż począwszy od drugiego dnia po podaniu [H^3]8-oxodG w moczu obserwowano głównie niezidentyfikowany produkt degradacji [H^3]8-oxodG. Podanie dożylne 4 μ Ci [H^3]8-oxodG prowadziło do wydalania 66% podanej ilości w ciągu pierwszych 24 h, przy czym nie obserwowano w moczu żadnych produktów degradacji [H^3]8-oxodG.

W świetle przeprowadzonych dotychczas badań bardzo ważne wydaje się zbadanie potencjalnych możliwości degradacji 8-oxoGua i 8-oxodG przez klasyczne enzymy katabolizmu nukleozydów purynowych (rys. 5.2).



Rys. 5.2

Szlak katabolizmu deoksyguanozyny (z lewej), z charakterystycznym dla naczelnych, ptaków, gadów i owadów końcowym produktem katabolizmu - kwasem moczowym oraz hipotetyczne drogi katabolizmu 8-oksyo-2'-deoksyguanozyny i 8-oksyo-2'-deoksyguaniny (z prawej). Pi - ortofosforan, PNP-aza - fosforylaza nukleozydów purynowych, dRyb-1-P - deoksyrybozo-1-fosforan, Gua - guanina, 8-oxoGua - 8-oksyo-2'-deoksyguanina, XA - ksantyna, UA - kwas moczowy.

Wyniki badań prezentowane w tej pracy wykazują, iż ludzka fosforylaza nukleozydów purynowych, katalizująca fosforolizę wiązania N-glikozydowego inozyny, deoksyinozyny,

guanozyny i deoksyguanozyny, nie katalizuje fosforolitycznego rozszczepienia 8-oxodG do wolnej 8-oksoguaniny i deoksyrybozo-1-fosforanu. Homogenaty nerek ludzkich nie wykazują obecności żadnej aktywności hydro- lub fosforolitycznej wobec 8-oxodG (obserwacje własne: Białkowski i Oliński, 1995). Wyniki te wskazują, iż ten zmodyfikowany nukleozyd jest najprawdopodobniej końcowym produktem katabolizmu fosforanów 8-oxodG lub/i naprawy DNA. Obserwowane przez zespół Ames produkt degradacji [H^3]8-oxodG w moczu gryzoni są być może efektem działania enzymu(ów) specyficznych dla nabłonka jelitowego. Stadler i wsp. donoszą użyciu fosforylasy nukleozydów purynowych do syntezy 8-oksodeoksyguanozyny (Stadler i wsp., 1994). Autorzy ci sugerują zdolność użytej fosforylasy do katalizowania reakcji tworzenia nukleozydu z wolnej 8-oksoguaniny i deoksyrybozo-1-fosforanu, jednakże warunki w jakich prowadzili oni reakcję odbiegają znacznie od warunków fizjologicznych (np. użycie 20% DMSO w środowisku reakcyjnym). Poza tym nie podają oni z jakiego gatunku pochodziła użyta przez nich fosforylaza (prawdopodobnie był to enzym bakteryjny).

Końcowym produktem katabolizmu puryn w ludzkim organizmie jest kwas moczowy (rys. 5.2), dlatego zbadano również możliwość hydrolitycznej dezaminacji 8-oksoguaniny przez guanazę. Gdyby 8-oksoguanina była substratem tego enzymu, w reakcji powstawałby właśnie kwas moczowy. Wykazano jednak, że guanaza z wątroby królika nie katalizuje dezaminacji 8-oxoGua. Z powodu braku handlowego preparatu ludzkiej guanazy, posłużono się enzymem króliczym. Jednakże wielogodzinna inkubacja 8-oksoguaniny z homogenatem nerki ludzkiej nie prowadzi do przekształcania jej do jakiegokolwiek innego związku (obserwacje własne: Białkowski i Oliński, 1995). O braku aktywności guanazy z wątroby króliczej wobec 8-oksoguaniny donosi również zespół Luneca (Finnegan i wsp., 1995, Herbert i wsp., 1996).

Uznanie obecności 8-oksoguaniny w moczu za charakterystyczny marker uszkodzeń oksydacyjnych DNA zakłada również brak enzymów zdolnych do katalitycznej oksydacji cząsteczki guaniny w pozycji C8 (punkt 2 założeń). Oksydaza ksantynowa jest enzymem katalizującym oksydację ksantyny w pozycji C8 z wytworzeniem kwasu moczowego. Zbadano zatem potencjalną możliwość enzymatycznego tworzenia 8-oksoguaniny z guaniny pod wpływem oksydazy ksantynowej z mleka krowiego (niestety preparaty ludzkiej oksydazy ksantynowej nie są handlowo dostępne). Nawet wielogodzinna inkubacja guaniny z wysokimi stężeniami tego enzymu, prowadzona w warunkach optymalnych dla działania enzymu, nie

proceedzi do powstania zauważalnych ilości 8-oksyguaniny. Należy więc wykluczyć możliwość powstawania 8-oksyguaniny na drodze enzymatycznej tego rodzaju.

Zaprezentowane wyniki dowodzą więc częściowo słuszności założeń związanych z traktowaniem obecnych w moczu 8-oxoGua i 8-oxodG jako charakterystycznych markerów uszkodzeń oksydacyjnych DNA *in vivo*.

Zapewne 8-oxodG i 8-oxoGua wydalone z moczem nie pochodzą jednak jedynie z naprawy, czy degradacji kwasów nukleinowych. Jak dowiedziono w ostatnich latach, źródłem 8-oksyguaniny w DNA nie jest tylko bezpośrednia modyfikacja cząsteczki guaniny obecnej w tej makromolekule, ale może być ona również wprowadzana do nowo syntetyzowanego DNA z puli wolnych nukleotydów. 8-OxodGTP powstający w puli wolnych nukleotydów pod wpływem reaktywnych form tlenu jest bowiem substratem dla polimeraz DNA i może być włączany do syntetyzowanej nici naprzeciw guaniny i adeniny. Zwłaszcza ten drugi sposób inkorporacji wydaje się powodować późniejsze mutacje punktowe, głównie transwersje typu A => C (Cheng i wsp., 1992). Jednym z elementów systemu ochronnego, mającego na celu zabezpieczyć komórkę przed niebezpiecznymi konsekwencjami oksydacji guaniny w pozycji C8, jest system białek degradujących uszkodzony, mutagenny substrat dla syntezy DNA - 8-oxodGTP (Maki i Sekiguchi, 1992; Mo i wsp., 1992; Hayakawa i wsp., 1995). Najważniejszą funkcję pośród białek tego systemu wydaje się pełnić niezwykle konserwatywna ewolucyjnie (Koonin, 1993) fosfohydrolaza hydrolizująca 8-oxodGTP do 8-oxodGMP i pirofosforanu, zwana pirofosfohydrolazą (lub pirofosfatazą) 8-oxodGTP, czasami nieprawidłowo nazywana 8-oxodGTP-azą. Istnienie jej aktywności lub obecność genu kodującego to białko potwierdzono do chwili obecnej u ok. 10 gatunków (głównie bakterii i ssaków). Brak aktywności tego białka, nazwanego w *E. coli* białkiem MutT (produkt genu *mutT*) powoduje zwiększenie częstości mutacji punktowych w komórkach *E. coli* nawet o 10000 razy (Maki i Sekiguchi, 1992).

Biorąc pod uwagę istotną, antymutagenną funkcję tego enzymu można oczekiwać bardzo czułego systemu regulacji jego aktywności. Ponieważ podwyższone stężenie właściwego substratu dla tego enzymu w komórce (8-oxodGTP) związane jest bezwzględnie z podwyższoną ekspozycją komórki na działanie reaktywnych form tlenu (RFT), autor tej pracy postanowił posłużyć się najpowszechniejszym czynnikiem wyzwalającym formowanie RFT - promieniowaniem jonizującym, w celu zbadania ewentualnych zmian poziomu aktywności tego enzymu w liniach hodowlanych ludzkich fibroblastów. Innymi słowy, postanowiono

zbadać, czy komórki plastycznie modelują aktywność pirofosfatazy 8-oxodGTP w warunkach podwyższonego narażenia na mutageny 8-oxodGTP. Wybór promieniowania X jako czynnika wyzwalającego potencjalną odpowiedź adaptacyjną wydaje się być celowy ze względu na fakt, iż promieniowanie jonizujące jest najlepiej rozpoznany czynnikiem wyzwalającym odpowiedź adaptacyjną na stres oksydacyjny. Odpowiedź adaptacyjna polega na tym, iż komórki naświetlone wstępnie niskimi (adaptującymi) dawkami promieniowania jonizującego wykazują zwiększoną odporność na formowanie się różnych objawów uszkodzeń DNA lub podwyższoną zdolność do naprawy tych uszkodzeń po ich ekspozycji na wysokie dawki promieniowania, w porównaniu z komórkami nie traktowanymi wstępnie promieniowaniem jonizującym. Uszkodzenia DNA w przebiegu doświadczeń tego typu obserwowano najczęściej na poziomie cytogenetycznym (pęknięcia chromatyd, dicentryczność i pierścieniowatość chromosomów, tworzenie mikrojąder, indukcja wymiany chromatyd siostrzanych) lub za pomocą testu kometkowego (ang. comet assay). Funkcjonowanie tego typu odpowiedzi adaptacyjnej udowodniono w eksperymentach przeprowadzanych na ludzkich limfocytach (Olivieri i wsp., 1984; Shadley i Wolff, 1987; Sankaranarayanan i wsp., 1989; Shadley i Wiencke, 1989; Cai i Liu, 1990, Wójcik i wsp., 1996) i fibroblastach (Azzam i wsp., 1992).

Limfocyty ludzi eksponowanych na działanie niskich dawek promieniowania jonizującego wykazują większą zdolność do prowadzenia naprawy DNA (Crawford i Davies, 1994). Podobne procesy adaptacyjne obserwowano w przypadku stresu oksydacyjnego powodowanego reaktywnymi formami tlenu. Zjawisko nabywania zwiększonej odporności na wyższe stężenia H_2O_2 po uprzednim potraktowaniu komórek relatywnie niskimi stężeniami H_2O_2 obserwowano najpierw u organizmów prokariotycznych jak *E. coli* i *Salmonella typhimurium* (Demple i Halbrook, 1983; Christman i wsp., 1985), a później także u organizmów eukariotycznych, w komórkach fibroblastów chomika (Spitz i wsp., 1987; Laval, 1988; Wiese i wsp., 1995), wołowych komórkach śródbłona (Lu i wsp., 1993), a także w komórkach drożdży (Davies i wsp., 1995). Co bardzo ciekawe, często obserwowanym zjawiskiem jest tzw. krzyżowość odpowiedzi adaptacyjnej. Oznacza to, że odpowiedź adaptacyjną na działanie jednego czynnika można uzyskać stosując jako bodziec adaptacyjny zupełnie inny czynnik. Poddanie fibroblastów chomiczych i szczurzych komórek wątrobiaka H4 działaniu układu ksantyna / oksydaza ksantynowa, produkującemu zarówno nadtlenek wodoru jak i anionorodnik ponadtlenkowy, wywoływało późniejszą odporność tych komórek na działanie nadtlenu wodoru i promieniowania γ (Laval, 1988). Podobne zjawisko

odporności krzyżowej (adaptacja poprzez H_2O_2) obserwował Gupta i wsp., (1988) w odniesieniu do następnego działania promieniowania γ lub N-metylo-N'-nitro-N-nitrozoguanidyny. Cortes i wsp. (1994) wykazali wyraźny efekt adaptacji ludzkich limfocytów na działanie promieniowania jonizującego po ich wstępnym kondycjonowaniu 250 μ M nadtlakiem wodoru. Ta krzyżowość reakcji oraz spostrzeżenie, iż owa odpowiedź adaptacyjna jest zawsze uzależniona od syntezy białka *de novo* (Liu i wsp., 1987; Cai i Liu, 1990), związana jest z funkcjonowaniem w komórkach pro- i eukariotycznych spójnego systemu indukcji wielu genów pod wpływem specyficznych czynników transkrypcyjnych uaktywnianych przez reaktywne formy tlenu (Jurgowiak, Białkowski, Oliński, 1996). W komórkach *E. coli* do czynników takich należą OxyR i SoxR/S, uaktywniane pod wpływem odpowiednio nadtlaku wodoru i anionorodnika ponadtlakowego. Uaktywniony czynnik OxyR indukuje ekspresję ok. 30 genów regulonu OxyR, kodujących m.in. enzymy antyoksydacyjne, takie jak katalaza i reduktaza wodoronadtlenków allilowych. Z kolei uaktywniany przez anionorodnik ponadtlakowy dwuskładnikowy czynnik SoxR/S indukuje transkrypcję ok. 40 białek, z których część to elementy systemu antyoksydacyjnego, jak zawierająca mangan dysmutaza ponadtlakowa (Mn-SOD), dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa lub enzymy naprawy DNA (np. endonukleaza IV, reperująca wolnorodnikowe uszkodzenia DNA). Analogiczne systemy transkrypcyjne odkryto także u Eukariota. Ludzki czynnik transkrypcyjny - AP-1, jako heterodimer białek kodowanych przez protoonkogeny *c-jun* i *c-fos*, w odpowiedzi na szok tlenowy wiąże się m.in. z promotorowymi sekwencjami genów kodujących NAD(P) reduktazę chinonową, czy podjednostką Ya transferazy S-glutationowej (Sonobe i wsp., 1995). Czynnik transkrypcyjny NF- κ B jest pierwszym poznanym u Eukariota czynnikiem aktywowanym w odpowiedzi na szok tlenowy (Schreck i wsp., 1992). Utlenienie podjednostki inhibitorowej tego czynnika (I- κ B), np. pod wpływem mikromolowych stężeń H_2O_2 , powoduje translokację aktywnego dimeru (p50 i p65) do jądra, gdzie czynnik ten aktywuje transkrypcję genów kodujących cytokiny, białka ostrej fazy, czynniki wzrostowe, białka adhezji komórkowej, receptory cytokin i inne (Pahl, 1994). W ostatnim czasie Kim i wsp. (1996) wykazali w badaniach na *E. coli*, że aktywność innego enzymu należącego do systemu G^O (enzymatycznego systemu usuwania skutków modyfikacji oksydacyjnej guaniny), a mianowicie endonukleazy 8-oksyguaninowej, wzrasta 20-krotnie w czasie hodowania tej bakterii w warunkach dostępności tlenu cząsteczkowego, w porównaniu do komórek rosnących w warunkach anaerobowych. Być może więc należy się spodziewać,

iz enzymy systemu G^0 znajdują się pod kontrolą jakiegoś czynnika(ów) transkrypcyjnego uaktywnianego przez tlen lub jego reaktywne formy ?

Funkcjonowanie w komórkach, zaprezentowanych powyżej w ogromnym skrócie, mechanizmów adaptacji do warunków stresu oksydacyjnego powinno w jakiś sposób obejmować również enzymy takie jak pirofosfataza 8-oxodGTP. Przeprowadzone w tej pracy eksperymenty nie wykazały jednak indukcji aktywności pirofosfatazy 8-oxodGTP pod wpływem dawek promieniowania X, charakterystycznych dla wzbudzenia odpowiedzi adaptacyjnej. Należy jednak pamiętać, że enzym ten przy swojej niezwykle niskiej stałej Michaelisa wobec 8-oxodGTP jest w stanie bardzo skutecznie oczyszczać pulę wolnych nukleotydów z tego zmodyfikowanego trifosforanu. Jak świadczą bardzo jeszcze skromne dane na temat ekspresji enzymu w tkankach, wyższa jego aktywność jest rejestrowana w komórkach aktywnych proliferacyjnie, np. ludzkich komórkach nowotworowych chłoniaka (Mo i wsp., 1992). Okamoto i wsp., (1996) zaobserwowali zdecydowanie wyższy poziom transkryptów mRNA dla pirofosfatazy 8-oxodGTP w komórkach raka nerki, w porównaniu z komórkami otaczającymi guz nowotworowy. Autorzy ci wyciągnęli z tej obserwacji dość karkołomny wniosek, iż jest to dowodem na istnienie nieustającego stanu stresu oksydacyjnego w komórkach nowotworowych. Wani i D'Ambrosio (1995) przeprowadzili metodami immunohistochemicznymi badania poziomu mRNA dla tego enzymu w tkankach sutka i skóry, wskazując wyraźnie na wspomnianą regułę, że poziom aktywności tego enzymu w komórkach jest skorelowany z ich aktywnością proliferacyjną, a tym samym - replikacyjną. Obserwacja ta nasuwa pewne podejrzenie, że enzym ten może posiadać sekwencję regulatorową na podobieństwo odkrytej u drożdży, zwanej elementem MCB (przeгляд: Kunz i wsp., 1994).

Tę sekwencję regulatorową, do której mogą wiązać się co najmniej 3 różne czynniki transkrypcyjne, posiadają w swym składzie wszystkie geny enzymów metabolizujących nukleotydy (np. kinaza dTMP, reduktaza rybonukleozydodifosforanowa, dUTP-aza), których ekspresja zależna jest od fazy cyklu komórkowego. Ich aktywność największa jest w fazie S. Element regulacyjny MCB posiadają również drożdżowe geny kodujące kluczowe białka regulacji cyklu komórkowego jak cyklina B5 i B6, a przede wszystkim czynnik SWI4, regulujący ekspresję cykliny 1 i 2, które mają decydujące znaczenie dla wejścia komórki drożdżowej w fazę podziału mitotycznego. Być może w komórkach ludzkich fibroblastów gen kodujący pirofosfatazę 8-oxodGTP również posiada sekwencję regulatorową pozwalającą na synchronizację ekspresji enzymu z fazą cyklu komórkowego. Tłumaczyłoby to niską

aktywność tego enzymu w tkankach o niskim tempie proliferacji (mała liczba komórek w fazie S).

Niestety na tym etapie nie uda się raczej postawić jakiegokolwiek rzeczowej hipotezy na temat natury korelacji aktywności enzymu z fazą cyklu komórkowego, nie mówiąc już o hipotezach na temat konkretnych mechanizmów regulacji ekspresji pirofosfatazy 8-oxodGTP. Zaobserwowany brak indukcji aktywności tego enzymu w fibroblastach poddanych działaniu promieni X nie powinien jednak budzić wielkiego zdziwienia. Wszak enzym ten hydrolizuje także prawidłowy substrat dla syntezy i naprawy DNA - dGTP. Zbytne podwyższenie jego aktywności mogłoby spowodować zachwianie równowagi pomiędzy stężeniami poszczególnych deoksynukleozydotrifosforanów, co powoduje zdecydowane obniżenie wierności replikacji DNA (Kunz i wsp., 1994). Sugeruje się, że średnio w komórce *E. coli* występuje jedynie ok. 20 cząsteczek tego enzymu (Maki i Sekiguchi, 1992), a w mysich komórkach embrionalnych 165 tys. cząsteczek na komórkę (Kakuma i wsp, 1995). Być może ilość ta jest wystarczająca do wydajnego oczyszczania puli wolnych nukleotydów z 8-oxodGTP.

Opracowana przez autora tej pracy metoda oznaczania aktywności pirofosfatazy 8-oxodGTP, oparta na HPLC-UV (przedyskutowana rozdz. 4.5.1), powinna przyczynić się do upowszechnienia badań nad tym intrygującym enzymem i mechanizmami jego regulacji. Jest to bowiem pierwsza metoda selektywnego oznaczania aktywności pirofosfatazy 8-oxodGTP, którą daje się w prosty sposób zastosować do oznaczeń w homogenatach tkankowych. Dotychczas do celu oznaczania aktywności tego enzymu w podczyszczonych preparatach stosowano najczęściej mało dokładną metodę oznaczania produktu reakcji za pomocą chromatografii cienkowarstwowej. Nierzadko używano do tych celów znakowanego izotopowo 8-oxodGTP, co z uwagi na wymogi dotyczące bezpieczeństwa i higieny pracy, dodatkowo ograniczało liczbę badaczy zdolnych do podjęcia wyzwania.

8. PIŚMIENICTWO

Abeygunawardana C, Weber DJ, Frick DN, Bessman MJ, Mildvan AS (1993) Sequence-specific assignments of the backbone ¹H, ¹³C, and ¹⁵N resonances of the MutT enzyme by heteronuclear multidimensional NMR. *Biochemistry* 32:13071-13080

Abeygunawardana C, Weber DJ, Gittis AG, Frick DN, Lin J, Miller AF, Bessman MJ, Mildvan AS (1995) Solution structure of the MutT enzyme, a nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase. *Biochemistry* 34:14997-15005

Adachi S, Takemoto K, Hirose T, Hosogai Y (1993) Spontaneous and 2-nitropropane induced levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in liver DNA of rats fed iron-deficient or manganese- and copper-deficient diets. *Carcinogenesis* 14:265-268

Adachi S, Zeisig M, Moller L (1995) Improvements in the analytical method for 8-hydroxydeoxyguanosine in nuclear DNA. *Carcinogenesis* 16:253-258

Adam W, Cadet J, Dall'Acqua F, Epe B, Ramaiah D, Saha-Moller CR (1995) Photosensitized formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in salmon testes DNA by furocoumarin hydroperoxides: A novel, intercalating "Photo-Fenton" reagent for oxidative DNA damage. *Angew Chem Int Ed Engl* 34:107-110

Aida M, Nishimura S (1987) An ab initio molecular orbital study on the characteristics of 8-hydroxyguanine. *Mutat Res* 192:83-89

Aiyar J, Berkovits HJ, Floyd RA, Wetterhahn KE (1990) Reaction of chromium (VI) with hydrogen peroxide in the presence of glutathione: reactive intermediates and resulting DNA damage. *Chem Res Toxicol* 3:595-603

Aiyar J, Berkovits HJ, Floyd RA, Wetterhahn KE (1991) Reaction of chromium(VI) with glutathione or with hydrogen peroxide: identification of reactive intermediates and their role in chromium(VI)-induced DNA damage. *Environ Health Perspect* 92:53-62

Akasaka S, Yamamoto K (1994) Hydrogen peroxide induces G:C to T:A and G:C to C:G transversions in the supF gene of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 243:500-505

Ames BN, Shigenaga MK, Swirsky-Gold L (1993) DNA lesions, inducible DNA repair, and cell division: three key factors in mutagenesis and carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 101:35-44

Apelgot S, Coppey J, Grisvard J, Guille E (1984) Lethal effect of the ⁶⁴Cu and ⁶⁷Cu incorporated into mammalian cells. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences* 298:31-34

Aruoma OI, Halliwell B, Gajewski E, Dizdaroglu M (1989) Damage to the bases in DNA induced by hydrogen peroxide and ferric ion chelates. *J Biol Chem* 264:20509-20512

Azzam EI, Toledo SM, Raaphorst GP, Mitchel REJ (1992) . In: Sugahara T, Sagan LA, Aoyama T (eds) Low dose irradiation and biological defense mechanisms. Elsevier Science Publishers, Amsterdam: 291-294

Babior BM (1991) Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. *Blood* 64:959-966

Barciszewski J, Barciszewska MZ, Rattan SIS, Clark BEC (1995) The structure and properties of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine - a novel biomarker in aging and carcinogenesis studies. *Polish J Chem* 69:841-851

Bartosz G (1995) *Druga twarz tlenu*. PWN, Warszawa:

Berger M, de Hazen M, Nejjari A, Fournier J, Guignard J, Pezerat H, Cadet J (1993) Radical oxidation reactions of the purine moiety of 2'-deoxyribonucleosides and DNA by iron-containing minerals. *Carcinogenesis* 14:41-46

- Bergtold DS, Berg CD, Simic MG (1990) Urinary biomarkers in radiation therapy of cancer. In: Emerit I (ed) Antioxidants in therapy and preventive medicine. Plenum Press, New York: 311-316
- Bessho T, Roy R, Yamamoto K, Kasai H, Nishimura S, Tano K, Mitra S (1993) Repair of 8-hydroxyguanine in DNA by mammalian N-methylpurine-DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8901-8904
- Bessho T, Tano K, Kasai H, Ohtsuka E, Nishimura S (1993) Evidence for two DNA repair enzymes for 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine) in human cells. *J Biol Chem* 268:19416-19421
- Bessman MJ, Bullions LC, Bhatnagar SK, Braden BC, Love WE (1991) Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies on the mutT nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 266:9055-9056
- Bhatnagar SK, Bessman MJ (1988) Studies on the mutator gene, mutT of *Escherichia coli*. Molecular cloning of the gene, purification of the gene product, and identification of a novel nucleoside triphosphatase. *J Biol Chem* 263:8953-8957
- Bhatnagar SK, Bullions LC, Bessman MJ (1991) Characterization of the mutT nucleoside triphosphatase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 266:9050-9054
- Bhatnagar SK, Bullions LC, Lew G, Bessman MJ (1990) Characterization of the defect in the *Escherichia coli* mutT1 mutator gene. *J Bacteriol* 172:2802-2803
- Bialkowski K, Olinski R (1995) Badania nad katabolizmem 8-oksoguaniny i 8-oksy-2'-deoksyguanozyny - produktow naprawy DNA oksydacyjnie uszkodzonego. *Doniesienia Zjazdowe, XXXI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego* 111
- Blount S, Griffiths HR, Lunec J (1991) Reactive oxygen species damage to DNA and its role in systemic lupus erythematosus. *Mol Aspects Med* 12:93-105
- Boiteux S, Gajewski E, Laval J, Dizdaroglu M (1992) Substrate specificity of the *Escherichia coli* Fpg protein (formamidopyrimidine-DNA glycosylase): Excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. *Biochemistry* 31:106-110
- Boiteux S, O'Connor TR, Lederer F, Gouyette A, Laval J (1990) Homogeneous *Escherichia coli* FPG protein. A DNA glycosylase which excises imidazole ring-opened purines and nicks DNA at apurinic/apyrimidinic sites. *J Biol Chem* 265:3916-3922
- Brown T, Kannard O (1992) Structural basis of DNA mutagenesis. *Curr Opin Struct Biol* 2:354-360
- Buatti JM, Rivero LR, Jorgensen TJ (1992) Radiation-induced DNA single-strand breaks in freshly isolated human leukocytes. *Radiat Res* 132:200-206
- Bullions LC, Mejean V, Claverys JP, Bessman MJ (1994) Purification of the MutX protein of *Streptococcus pneumoniae*, a homologue of *Escherichia coli* MutT. Identification of a novel catalytic domain for nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase activity. *J Biol Chem* 269:12339-12344
- Busch D (1994) Genetic susceptibility to radiation and chemotherapy injury: diagnosis and management. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 30:997-1002
- Cai JP, Kakuma T, Tsuzuki T, Sekiguchi M (1995) cDNA and genomic sequences for rat 8-oxo-dGTPase that prevents occurrence of spontaneous mutations due to oxidation of guanine nucleotides. *Carcinogenesis* 16:2343-2350
- Cai L, Liu SZ (1990) Induction of cytogenetic adaptive response of somatic and germ cells in vivo and in vitro by low-dose X-irradiation. *Int J Radiat Biol* 58:187-194
- Cattley RC, Glover SE (1993) Elevated 8-hydroxydeoxyguanosine in hepatic DNA of rats following exposure to peroxisome proliferators: relationship to carcinogenesis and nuclear localization. *Carcinogenesis* 14:2495-2499

- Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA (1992) 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G---T and A---C substitutions. *J Biol Chem* 267:166-172
- Chernikov AV, Usacheva AM, Bruskov VI (1996) Depurination of 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-hydroxyguanine) nucleosides. *Biochemistry (Moscow)* 61:35-38
- Chetsanga CJ, Lindahl T (1979) Release of 7-methylguanine residues whose imidazole rings have been opened from damaged DNA by a DNA glycosylase from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 6:3673-3684
- Cho DH, Hong JT, Chin K, Cho TS, Lee BM (1993) Organotropic formation and disappearance of 8-hydroxydeoxyguanosine in the kidney of Sprague-Dawley rats exposed to adriamycin and KBrO₃. *Cancer Lett* 74:141-145
- Christman MF, Morgan RW, Jacobson FS, Ames BN (1985) Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell* 41:753-762
- Conaway CC, Nie G, Hussain NS, Fiala ES (1991) Comparison of oxidative damage to rat liver DNA and RNA by primary nitroalkanes, secondary nitroalkanes, cyclopentanone oxime, and related compounds. *Cancer Res* 51:3143-3147
- Cortes F, Dominguez I, Flores MJ, Pinero J, Mateos JC (1994) Differences in the adaptive response to radiation damage in G₀ human lymphocytes conditioned with hydrogen peroxide or low-dose X-rays. *Mutat Res* 311:157-163
- Crawford DR, Davies KJA (1994) Adaptive response and oxidative stress. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 10:25-28
- Culp SJ, Cho BP, Kadlubar FF, Evans FE (1989) Structural and conformational analyses of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Chem Res Toxicol* 2:416-422
- Czene S, Harms-Ringdahl M (1995) Detection of single-strand breaks and formamidopyrimidine-DNA glycosylase-sensitive sites in DNA of cultured human fibroblasts. *Mutat Res* 336:235-242
- Dahlhaus M, Almstadt E, Appel KE (1994) The pentachlorophenol metabolite tetrachloro-p-hydroquinone induces the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in liver DNA of male B6C3F₁ mice. *Toxicology Lett* 74:265-274
- Datta AK, Misra M, North SL, Kasprzak KS (1992) Enhancement by nickel(II) and L-histidine of 2'-deoxyguanosine oxidation with hydrogen peroxide. *Carcinogenesis* 13:283-287
- Davies JM, Lowry CV, Davies KJA (1995) Transient adaptation to oxidative stress in yeast. *Arch Biochem Biophys* 317:1-6
- Davies KJA (1994) Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp* 61:1-31
- de Kok TCM, ten Vaarwerk F, Zwingman I, van Maanen JMS, Klijenans JCS (1994) Peroxidation of linoleic, arachidonic and oleic acid in relation to the induction of oxidative DNA damage and cytogenetic effects. *Carcinogenesis* 15:1399-1404
- Demple B, Halbrook J (1983) Inducible repair of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*. *Nature* 304:466-468
- Dizdaroglu M, Aruoma OI (1993) Chemistry of free radicals damage to DNA and nucleoproteins. In: Ellis Horwood New York (ed) *DNA and Free Radicals*. 19-39
- Epe B, Pflaum M, Haring M, Hegler J, Rudiger H (1993) Use of repair endonucleases to characterize DNA damage induced by reactive oxygen species in cellular and cell-free systems. *Toxicology Lett* 67:57-72

- Farber JL (1994) Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Environ Health Perspect* 102:17-24
- Feig DI, Reid TM, Loeb LA (1994) Reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Res* 54:1890s-1894s
- Finnegan MT, Herbert KE, Evans MD, Farooq S, Farmer P, Podmore ID, Lunec J (1996) Development of an assay to measure 8-oxoguanine using HPLC with electrochemical detection. *Biochem Soc Trans* 23:431
- Fischer-Nielsen A, Jeding IB, Loft S (1994) Radiation-induced formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and its prevention by scavengers. *Carcinogenesis* 15:1609-1612
- Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, Bult CJ, Tomb JF, Dougherty BA, Merrick JM, et al (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd [see comments]. *Science* 269:496-512
- Floyd RA (1990) The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis* 11:1447-1450
- Floyd RA, Watson JJ, Harris J, West M, Wong PK (1986) Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine, hydroxyl free radical adduct of DNA in granulocytes exposed to the tumor promoter, tetradecanoylphorbolacetate. *Biochem Biophys Res Commun* 137:841-846
- Floyd RA, West MS, Eneff KL, Schneider JE (1990) Mediation of 8-hydroxy-guanine formation in DNA by thiazin dyes plus light. *Free Radic Biol Med* 8:327-330
- Floyd RA, West MS, Hogsett WE, Tingey DT (1989) Increased 8-hydroxyguanine content of chloroplast DNA from ozone-treated plants. *Plant Physiol* 91:644-647
- Fong L, Chen JY, Ting LL, Lui LT, Wang PM, Chen WL (1995) Chromosome aberrations induced in human lymphocytes after partial-body irradiation. *Radiat Res* 144:97-101
- Fraga CG, Onuki J, Lucesoli F, Bechara EJH, Di Mascio P (1994) Aminolevulinic acid mediates the in vivo and in vitro formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. *Carcinogenesis* 15:2241-2244
- Freeman B (1994) Free radical chemistry of nitric oxide. Looking at the dark side. *Chest* 105:79-84
- Frenkel K (1992) Carcinogen-mediated oxidant formation and oxidative DNA damage. *Pharmacol Ther* 53:127-166
- Frick DN, Bessman MJ (1995) Cloning, purification, and properties of a novel NADH pyrophosphatase. Evidence for a nucleotide pyrophosphatase catalytic domain in MutT-like enzymes. *J Biol Chem* 270:1529-1534
- Frick DN, Townsend BD, Bessman MJ (1995) A novel GDP-mannose mannosyl hydrolase shares homology with the MutT family of enzymes. *J Biol Chem* 270:24086-24091
- Frick DN, Weber DJ, Abeygunawardana C, Gittis AG, Bessman MJ, Mildvan AS (1995) NMR studies of the conformations and location of nucleotides bound to the *Escherichia coli* MutT enzyme. *Biochemistry* 34:5577-5586
- Frick DN, Weber DJ, Gillespie JR, Bessman MJ, Mildvan AS (1994) Dual divalent cation requirement of the MutT dGTPase. Kinetic and magnetic resonance studies of the metal and substrate complexes. *J Biol Chem* 269:1794-1803
- Furuichi M, Yoshida MC, Oda H, Tajiri T, Nakabeppu Y, Tsuzuki T, Sekiguchi M (1994) Genomic structure and chromosome location of the human mutT homologue gene MTH1 encoding 8-oxo-dGTPase for prevention of A:T to C:G transversion. *Genomics* 24:485-490
- Gannett PM, Sura TP (1993) An improved synthesis of 8-bromo-2'-deoxyguanosine. *Synth Comm* 23:1611-1615

- Gannett PM, Sura TP (1993) Base pairing of 8-oxoguanosine and 8-oxo-2'-deoxyguanosine with 2'-deoxycytidine, 2'-deoxyguanosine, and thymidine. *Chem Res Toxicol* 6:690-700
- Gupta SS, Bhattacharjee SB (1988) Induction of repair functions by hydrogen peroxide in Chinese hamster cells. *Int J Radiat Biol* 53:935-942
- Halliwell B (1987) Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J* 1:358-364
- Halliwell B, Aruoma OI (1993) DNA and free radicals. Ellis Horwood, New York:
- Halliwell B, Dizdaroglu M (1992) The measurement of oxidative damage to DNA by HPLC and GC/MS techniques. *Free Radic Res Commun* 16:75-87
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1989) Free radicals in biology and medicine. Second Edition, Clarendon Press, Oxford:
- Han X, Liehr JG (1994) 8-Hydroxylation of guanine bases in kidney and liver DNA of hamsters treated with estradiol: role of free radicals in estrogen-induced carcinogenesis. *Cancer Res* 54:5515-5517
- Han X, Liehr JG (1995) Microsome-mediated 8-hydroxylation of guanine bases of DNA by steroid estrogens: correlation of DNA damage by free radicals with metabolic activation to quinones. *Carcinogenesis* 16:2571-2574
- Hartwig A, Schlepegrell R (1995) Induction of oxidative DNA damage by ferric iron in mammalian cells. *Carcinogenesis* 16:3009-3013
- Hattori-Nakakuki Y, Nishigori C, Okamoto K, Imamura S, Hiai H, Toyokuni S (1994) Formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in epidermis of hairless mice exposed to near-UV. *Biochem Biophys Res Commun* 201:1132-1139
- Hayakawa H, Taketomi A, Sakumi K, Kuwano M, Sekiguchi M (1995) Generation and elimination of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate, a mutagenic substrate for DNA synthesis, in human cells. *Biochemistry* 34:89-95
- Hayakawa M, Hattori K, Sugiyama S, Ozawa T (1992) Age-associated oxygen damage and mutations in mitochondrial DNA in human hearts. *Biochem Biophys Res Commun* 189:979-985
- Hayakawa M, Ogawa T, Sugiyama S, Tanaka M, Ozawa T (1992) Conversion of deoxyguanosine into 8-hydroxydeoxyguanosine in mouse liver mitochondrial DNA by administration of azidothymidine. *Int J Immunotherapy* 8:171-175
- Herbert KE, Evans MD, Finnegan MT, Farooq S, Nalini M, Podmore ID, Farmer P, Lunec J (1996) A novel HPLC procedure for the analysis of 8-oxoguanine in DNA. *Free Radic Biol Med* 20:467-473
- Hollstein M, Sidranski D, Vogelstein B, Harris CC (1991) p53 mutations in human cancers. *Science* 253:49-53
- Homma Y, Tsunoda M, Kasai H (1994) Evidence for the accumulation of oxidative stress during cellular ageing of human diploid fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 203:1063-1068
- Huang X, Kitahara J, Zhitkovich A, Dowjat K, Costa M (1995) Heterochromatic proteins specifically enhance nickel-induced 8-oxo-dG formation. *Carcinogenesis* 16:1753-1759
- Ikushima T (1989) Radio-adaptive response: characterization of a cytogenic repair induced by low-level ionizing radiation in cultured Chinese hamster cells. *Mutat Res* 227:241-246
- Inagake M, Yamane T, Kitao Y, Oya K, Matsumoto H, Kikuoka N, Nakatani H, Takahashi T, Nishimura H, Iwashima A (1995) Inhibition of 1,2-dimethylhydrazine-induced oxidative DNA damage by green tea extract in rat. *Jpn J Cancer Res* 86:1106-1111

- Inoue S, Kawanishi S (1987) Hydroxyl radical production and human DNA damage induced by ferric nitrilotriacetate and hydrogen peroxide. *Cancer Res* 47:6522-6527
- Ito K, Inoue S, Yamamoto K, Kawanishi S (1993) 8-Hydroxydeoxyguanosine formation at the 5' site of 5'-GG-3' sequences in double-stranded DNA by UV radiation with riboflavin. *J Biol Chem* 268:13221-13227
- Jaruga P, Zastawny TH, Skokowski J, Dizdaroglu M, Olinski R (1994) Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme activities in human lung cancer. *FEBS Lett* 341:59-64
- Jurgowiak M, Bialkowski K, Olinski R (1996) Reactive oxygen species and gene expression regulation. *Postepy Biochem* 42:6-13
- Jurgowiak M, Olinski R (1995) Wolne rodniki a starzenie sie. *Kosmos* 44:71-88
- Kakuma T, Nishida J, Tsuzuki T, Sekiguchi M (1995) Mouse MTH1 protein with 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphatase activity that prevents transversion mutation. cDNA cloning and tissue distribution. *J Biol Chem* 270:25942-25948
- Kamath AV, Yanofsky C (1993) Sequence and characterization of mutT from *Proteus vulgaris*. *Gene* 134:99-102
- Kang D, Nishida J, Iyama A, Nakabeppu Y, Furuichi M, Fujiwara T, Sekiguchi M, Takeshige K (1995) Intracellular localization of 8-oxo-dGTPase in human cells, with special reference to the role of the enzyme in mitochondria. *J Biol Chem* 270:14659-14665
- Kasai H, Crain PF, Kuchino Y, Nishimura S, Ootsuyama A, Tanooka H (1986) Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis* 7:1849-1851
- Kasai H, Nishimura S (1983) Hydroxylation of the C-8 position of deoxyguanosine by reducing agents in the presence of oxygen. *Nucleic Acids Symp Ser* 165-167
- Kasai H, Nishimura S (1984) DNA damage induced by asbestos in the presence of hydrogen peroxide. *Gann* 75:841-844
- Kasai H, Nishimura S (1984) Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acids Res* 12:2137-2145
- Kasai H, Nishimura S, Toriumi Y, Itai A, Iitaka Y (1987) The crystal structure of 9-ethyl-8-hydroxyguanine. *Bull Chem Soc Jpn* 60:3799-3800
- Kasai H, Yamaizumi Z, Yamamoto F, Bessho T, Nishimura S, Berger M, Cadet J (1992) Photosensitized formation of 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine) in DNA by riboflavin. *Nucleic Acids Symp Ser* 181-182
- Kasamatsu T, Nakagawa T, Kohda K (1994) Inhibitory effect of fatty acids on 8-hydroxydeoxyguanosine formation in calf thymus DNA treated with Bleomycin-Fe(II). *Biol Pharm Bull* 17:391-394
- Kasprzak KS (1995) Possible role of oxidative damage in metal-induced carcinogenesis. *Cancer Investigation* 13:411-430
- Kasprzak KS, Diwan BA, Konishi N, Misra M, Rice JM (1990) Initiation by nickel acetate and promotion by sodium barbital of renal cortical epithelial tumors in male F344 rats. *Carcinogenesis* 11:647-652
- Kim HS, Park YW, Kasai H, Nishimura S, Park CW, Choi KH, Chung MH (1996) Induction of *E. coli* oh8Gua endonuclease by oxidative stress: its significance in aerobic life. *Mutat Res* 363:115-123
- Knight JA (1995) Diseases related to oxygen-derived free radicals. *Ann Clin Lab Sci* 25:111-121

- Kohda K, Tada M, Hakura A, Kasai H, Kawazoe Y (1987) Formation of 8-hydroxyguanine residues in DNA treated with 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide and its related compounds in the presence of seryl-AMP. *Biochem Biophys Res Commun* 149:1141-1148
- Koonin EV (1993) A highly conserved sequence motif defining the family of MutT-related proteins from eubacteria, eukaryotes and viruses. *Nucleic Acids Res* 21:4847
- Kouchakdjian M, Bodepudi V, Shibutani S, Eisenberg M, Johnson F, Grollman AP, Patel DJ (1991) NMR structural studies of the ionizing radiation adduct 7-hydro-8-oxodeoxyguanosine (8-oxo-7H-dG) opposite deoxyadenosine in DNA duplex. 8-Oxo-7H-dG(syn)*dA(anti) alignment at lesion site. *Biochemistry* 30:1403-1412
- Koymans L, Donne-Op Den Kelder GM, Koppetele JM, Vermeulen NPE (1993) Cytochromes P450: Their active-site structure and mechanism of oxidation. *Drug Metabol Rev* 25:325-387
- Kuchino Y, Mori F, Kasai H, Inoue H, Iwai S, Miura K, Ohtsuka E, Nishimura S (1987) Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues. *Nature* 327:77-79
- Kuchino Y, Mori F, Kasai H, Nishimura S, Inoue H, Iwai S, Ohtsuka E (1986) Misreading of 8-hydroxydeoxyguanosine-containing DNA in in vitro DNA replication. *Nucleic Acids Symp Ser* 157-158
- Kunz BA, Kohalmi SE, Kunkel TA, Mathews CK, McIntosh EM, Reidy JA (1994) International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Deoxyribonucleoside triphosphate levels: a critical factor in the maintenance of genetic stability. *Mutat Res* 318:1-64
- Kwiatowski JM (1988) Dysmutaza ponadtlenkowa - struktura, funkcja i filogeneza. *Post Biochem* 34:311-333
- Laayoun A, Decout J, Lhomme J (1994) Hydrolysis of 2'-deoxypurine nucleosides. The effect of substitution at the C8 position. *Tetrahedron Lett* 35:4989-4990
- Lagorio S, Tagesson C, Forastiere F, Iavarone I, Axelson O, Carere A (1994) Exposure to benzene and urinary concentrations of 8-hydroxydeoxyguanosine, a biological marker of oxidative damage to DNA. *Occup Environ Med* 51:739-743
- Laval F (1988) Pretreatment with oxygen species increases the resistance to hydrogen peroxide in Chinese hamster fibroblasts. *J Cell Physiol* 201:73-79
- Le Page F, Margot A, Grollman AP, Sarasin A, Gentil A (1995) Mutagenicity of a unique 8-oxoguanine in human Ha-ras sequence in mammalian cells. *Carcinogenesis* 16:2779-2784
- Liczanski AE (1988) Toksycznosc tlenu.I.Uszkodzenia zywych komorek. *Post Biochemii* 34:273-291
- Liczanski AE (1988) Toksycznosc tlenu.II.Mechanizmy obronne. *Post Biochemii* 34:293-310
- Lin J, Abeygunawardana C, Frick DN, Bessman MJ, Mildvan AS (1996) The role of Glu 57 in the mechanism of the Escherichia coli MutT enzyme by mutagenesis and heteronuclear NMR. *Biochemistry* 35:6715-6726
- Lin TS, Cheng JC, Ishiguro K, Sartorelli AC (1985) 8-substituted guanosine and 2'-deoxyguanosine derivatives as potential inducers of differentiation of Friend erythroleukemia cells. *J Med Chem* 28:1194-1198
- Lindahl T (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362:709-715
- Liu SZ, Liu WH, Sun JB (1987) Radiation hormesis: its expression in the immune system. *Health Phys* 52:579-583
- Loft S, Fischer-Nielsen A, Jeding IB, Vistisen K, Poulsen HE (1993) 8-Hydroxydeoxyguanosine as a urinary biomarker of oxidative DNA damage. *J Toxicol Envir Health* 40:391-404
- Loft S, Poulsen HE (1996) Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J Mol Med* 74:297-312

- Loft S, Vistisen K, Ewertz M, Tjonneland A, Overvad K, Poulsen HE (1992) Oxidative DNA damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in humans: influence of smoking, gender and body mass index. *Carcinogenesis* 13:2241-2247
- Lu D, Maulik N, Moraru II, Kreutzer DL, Das DK (1993) Molecular adaptation of vascular endothelial cells to oxidative stress. *Am J Physiol* 264:C715-C722
- Maccubbin AE, Ersing N, Budzinski EE, Box HC, Gurtoo HL (1994) Formation of 8-hydroxyguanine in DNA during mitomycin C activation. *Cancer Biochem Biophys* 14:183-191
- Maki H, Sekiguchi M (1992) MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature* 355:273-275
- Malins DC (1993) Identification of hydroxyl radical-induced lesions in DNA base structure: biomarkers with a putative link to cancer development. *J Toxicol Environ Health* 40:247-261
- Malins DC, Holmes EH, Polissar NL, Gunselman SJ (1993) The etiology of breast cancer. Characteristic alteration in hydroxyl radical-induced DNA base lesions during oncogenesis with potential for evaluating incidence risk. *Cancer* 71:3036-3043
- Mao Y, Liu KJ, Jiang JJ, Shi X (1996) Generation of reactive oxygen species by Co(II) from H₂O₂ in the presence of chelators in relation to DNA damage and 2'-deoxyguanosine hydroxylation. *J Toxicol Environ Health* 47:61-75
- Marnett LJ, Burcham PC (1993) Endogenous DNA adducts: potential and paradox. *Chem Res Toxicol* 6:771-785
- McAuley-Hecht KE, Leonard GA, Gibson NJ, Thomson JB, Watson WP, Hunter WN, Brown T (1994) Crystal structure of a DNA duplex containing 8-hydroxydeoxyguanine-adenine base pairs. *Biochemistry (Moscow)* 33:10266-10270
- McGoldrick JP, Yeh YC, Solomon M, Essigman JM, Lu A (1995) Characterization of a mammalian homolog of the Escherichia coli MutY mismatch repair protein. *Mol Cell Biol* 15:989-996
- Mecocci P, MacGarvey U, Haufman AE, Koontz D, Shoffner JM, Wallace DC, Beal MF (1993) Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. *Ann Neurol* 34:609-616
- Mejean V, Salles C, Bullions LC, Bessman MJ, Claverys JP (1994) Characterization of the mutX gene of Streptococcus pneumoniae as a homologue of Escherichia coli mutT, and tentative definition of a catalytic domain of the dGTP pyrophosphohydrolases. *Mol Microbiol* 11:323-330
- Michaels ML, Cruz C, Grollman AP, Miller JH (1992) Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:7022-7025
- Michaels ML, Tchou J, Grollman AP, Miller JH (1992) A repair system for 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanine. *Biochemistry* 31:10964-10968
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1996) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* 16:1215
- Mo JY, Maki H, Sekiguchi M (1992) Hydrolytic elimination of a mutagenic nucleotide, 8-oxodGTP, by human 18-kilodalton protein: Sanitization of nucleotide pool. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11021-11025
- Muniz P, Valls V, Perez-Broseta C, Iradi A, Climent JV, Rosario-Oliva M, Saez GT (1995) The role of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rifamycin-induced DNA damage. *Free Radic Biol Med* 18:747-755
- Nackerdien Z, Olinski R, Dizdaroglu M (1992) DNA base damage in chromatin of gamma-irradiated cultured human cells. *Free Radical Res Commun* 16:259-273

- Nackerdien Z, Rao G, Cacciuttolo MA, Gajewski E, Dizdaroglu M (1991) Chemical nature of DNA-protein cross-links produced in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of iron or copper ions. *Biochemistry* 30:4873-4879
- Naito S, Ono Y, Somiya I, Inoue S, Ito K, Yamamoto K, Kawanishi S (1994) Role of active species in DNA damage by pentachlorophenol metabolites. *Mutat Res* 310:79-88
- Nakae D, Andoh N, Mizumoto Y, Endoh T, Shimoji N, Horiguchi K, Shiraiwa K, Tamura K, Denda A, Konishi Y (1994) Selective 8-hydroxyguanine formation in pancreatic DNA due to a single intravenous administration of 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide in rats. *Cancer Lett* 83:97-103
- Nakae D, Mizumoto Y, Kobayashi E, Noguchi O, Konishi Y (1995) Improved genomic/nuclear DNA extraction for 8-hydroxydeoxyguanosine analysis of small amounts of rat liver tissue. *Cancer Lett* 97:233-239
- Nash HM, Bruner SD, Scharer OD, Kawate T, Addona TA, Spooner E, Lane WS, Verdine GL (1996) Cloning of a yeast 8-oxoguanine DNA glycosylase reveals the existence of a base-excision DNA-repair protein superfamily. *Current Biology* 6:968-980
- Nicotera TM, Munson BR, Fiel RJ (1994) Photodensitized formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and DNA strand breakage by a cationic meso-substituted porphyrin. *Photochem Photobiol* 60:295-300
- O'Connor TR, Graves RJ, de Murcia G, Castaing B, Laval J (1993) Fpg protein of *Escherichia coli* is a zinc finger protein whose cysteine residues have a structural and/or functional role. *J Biol Chem* 268:9063-9070
- Oda Y, Uesugi S, Ikehara M, Nishimura S, Kawase Y, Ishikawa H, Inoue H, Ohtsuka E (1991) NMR studies of DNA containing 8-hydroxydeoxyguanosine. *Nucleic Acids Res* 19:1407-1412
- Okamoto K, Toyokuni S, Kim WJ, Ogawa O, Kakehi Y, Arao S, Hiai H, Yoshida O (1996) Overexpression of human mutT homologue gene messenger RNA in renal-cell carcinoma: evidence of persistent oxidative stress in cancer. *Int J Cancer* 65:437-441
- Okamoto K, Toyokuni S, Uchida K, Ogawa O, Takenawa J, Kakehi Y, Kinoshita H, Hattori-Nakakuki Y, Hiai H, Yoshida O (1994) Formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in human renal-cell carcinoma. *Int J Cancer* 58:825-829
- Olinski R (1993) Molekularne podstawy i srodowiskowe uwarunkowania transformacji nowotworowej komorki. *Bydgoszcz*:
- Olinski R (1993) Uszkodzenia DNA indukowane dzialaniem aktywnych form tlenu i ich rola w procesie karcynogenezy. *Post Hig Med Dosw* 47:463-474
- Olinski R, Jurgowiak M (1996) Reaktywne formy tlenu - uniwersalny czynnik patogeny ? In: *Nowe tendencje w biologii molekularnej i inzynierii genetycznej oraz medycynie*. Sorus, Poznan: 373-400
- Olinski R, Nackerdien Z, Dizdaroglu M (1992) DNA-protein cross-linking between thymine and tyrosine in chromatin of irradiated or H₂O₂-treated cultured human cells. *Archiv Biochem Biophys* 297:139-143
- Olinski R, Zastawny T, Budzbon J, Skokowski J, Zegarski W, Dizdaroglu M (1992) DNA base modifications in chromatin of human cancerous tissues. *FEBS Lett* 309:193-198
- Olinski R, Zastawny TH, Foksinski M, Barecki A, Dizdaroglu M (1995) DNA base modifications and antioxidant enzyme activities in human benign prostatic hyperplasia. *Free Radic Biol Med* 18:807-813
- Olivieri G, Bodycote J, Wolff S (1984) Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. *Science* 223:594-597
- Pahl HL, Baeuerle PA (1994) Oxygen and the control of gene expression. *Bioessays* 16:497-502

- Park EM, Shigenaga MK, Degan P, Korn TS, Kitzler JW, Wehr CM, Kolachana P, Ames BN (1992) Assay of excised oxidative DNA lesions: isolation of 8-oxoguanine and its nucleoside derivatives from biological fluids with a monoclonal antibody column. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3375-3379
- Pavlov YI, Minnick DT, Izuta S, Kunkel TA (1994) DNA replication fidelity with 8-oxodeoxyguanosine triphosphate. *Biochemistry* 33:4695-4701
- Plum GE, Grollman AP, Johnson F, Breslauer KJ (1995) Influence of the oxidatively damaged adduct 8-oxodeoxyguanosine on the conformation, energetics, and thermodynamic stability of a DNA duplex. *Biochemistry* 34:16148-16160
- Poli G (1993) Liver damage due to free radicals. In: *British Medical Bulletin*. The British Council, London: 604-620
- Porter DW, Nelson VC, Fivash MJ, Kasprzak KS (1996) Mechanistic studies of the inhibition of MutT dGTPase by the carcinogenic metal Ni(II). *Chem Res Toxicol* (in press)
- Porter DW, Nelson VC, Fivash MJ, Kasprzak KS (1996) *Metal Ions in Biology and Medicine*. John Libbey Eurotext, Paris: 60-62
- Pou S, Pou WS, Bredt DS, Snyder SH, Rosen GM (1992) Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 267:24173-24176
- Ravanat JL, Cadet J (1995) Reaction of singlet oxygen with 2'-deoxyguanosine and DNA. Isolation and characterisation of the main oxidation products. *Chem Res Toxicol* 8:379-388
- Ravanat JL, Turesky RJ, Gremaud E, Trudel LJ, Stadler RH (1995) Determination of 8-oxoguanine in DNA by gas chromatography-mass spectrometry and HPLC-electrochemical detection: overestimation of the background level of the oxidized base by the gas chromatography-mass spectrometry assay. *Chem Res Toxicol* 8:1039-1045
- Retel J, Hoebee B, Braun JEF, Lutgerink JT, van den Akker E, Wanamarta AH, Joenje H, Lafleur VM (1993) Mutational specificity of oxidative DNA damage. *Mutat Res* 299:165-182
- Ribeiro DT, Costa de Oliveira R, Di Mascio P, Menck CFM (1994) Singlet oxygen induces predominantly G to T transversions on a single-stranded shuttle vector replicated in monkey cells. *Free Rad Res* 21:75-83
- Richter C, Park JW, Ames BN (1988) Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:6465-6467
- Rortter NH (1980) Prostaglandin endoperoxides. In: Pryor (ed) *Free radicals in biology*. Academic Press, New York: 261-294
- Roy D, Floyd RA, Liehr JG (1991) Elevated 8-hydroxydeoxyguanosine levels in DNA of diethylstilbestrol-treated Syrian hamsters: covalent DNA damage by free radicals generated by redox cycling of diethylstilbestrol. *Cancer Res* 51:3882-3885
- Ruiz de Almodovar JM, Bush C, Peacock JH, Steel GG, Whitaker SJ, McMillan TJ (1994) Dose-rate effect for DNA damage induced by ionizing radiation in human tumor cells. *Radiat Res* 138:S93-S96
- Ruiz de Almodovar JM, Nunez MI, McMillan TJ, Olea N, Mort C, Villalobos M, Pedraza V, Steel GG (1994) Initial radiation-induced DNA damage in human tumour cell lines: a correlation with intrinsic cellular radiosensitivity. *Br J Cancer* 69:457-462
- Sai K, Tyson CA, Thomas DW, Dabbs JE, Hasegawa R, Kurokawa Y (1994) Oxidative DNA damage induced by potassium bromate in isolated proximal tubules and renal nuclei. *Cancer Lett* 87:1-7
- Sakumi K, Furuichi M, Tsuzuki T, Kakuma T, Kawabata S, Maki H, Sekiguchi M (1993) Cloning and expression of cDNA for a human enzyme that hydrolyzes 8-oxo-dGTP, a mutagenic substrate for DNA synthesis. *J Biol Chem* 268:23524-23530

- Sankaranarayanan K, Duyn A, Loos MJ, Natarajan AT (1989) Adaptive response of human lymphocytes to low-level radiation from radioisotopes or X-rays. *Mutat Res* 211:7-12
- Sato K, Akaike T, Kojima Y, Ando M, Nagao M, Maeda H (1992) Evidence of direct generation of oxygen free radicals from heterocyclic amines by NADPH/cytochrome P-450 reductase in vitro. *Jpn J Cancer Res* 83:1204-1209
- Sato M, Bremner I (1993) Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radic Biol Med* 14:325-337
- Schneider JE, Price S, Maitt L, Gutteridge JM, Floyd RA (1990) Methylene blue plus light mediates 8-hydroxy 2'-deoxyguanosine formation in DNA preferentially over strand breakage. *Nucleic Acids Res* 18:631-635
- Schneider JEJ, Phillips JR, Pye Q, Maitt ML, Price S, Floyd RA (1993) Methylene blue and rose bengal photoinactivation of RNA bacteriophages: comparative studies of 8-oxoguanine formation in isolated RNA. *Arch Biochem Biophys* 301:91-97
- Schreck R, Meier B, Mannel DN, Droge W, Baeuerle PA (1992) Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells. *J Exp Med* 175:1181-1194
- Setlow RB, Lipman JM, Sokoloff L (1983) DNA repair by articular chondrocytes. II. Direct measurements of repair of ultraviolet and X-ray damage in monolayer cultures. *Mech Ageing Dev* 21:97-103
- Shadley JD, Wiencke JK (1989) Induction of the adaptive response by X-rays is dependent on radiation intensity. *Int J Radiat Biol* 56:107-118
- Shadley JD, Wolff S (1987) Very low doses of X rays can cause human lymphocytes to become less susceptible to ionizing radiation. *Mutagenesis* 2:95-96
- Shen HM, Ong CN, Lee BL, Shi CY (1995) Aflatoxin B1-induced 8-hydroxydeoxyguanosine formation in rat hepatic DNA. *Carcinogenesis* 16:419-422
- Shennan MG, Palmer CM, Schellhorn HE (1996) Role of Fapy glycosylase and UvrABC excinuclease in the repair of UVA (320-400 nm)-mediated DNA damage in *Escherichia coli*. *Photochem Photobiol* 63:68-73
- Sheu C, Foote CS (1995) Reactivity toward singlet oxygen of 7,8-dihydro-8-oxoguanosine ("8-hydroxyguanosine") formed by photooxidation of guanosine derivative. *J Am Chem Soc* 117:6439-6442
- Shi X, Mao Y, Knapton AB, Ding M, Rojanasakul Y, Gannett PM, Dalal N, Liu K (1994) Reaction of Cr(VI) with ascorbate and hydrogen peroxide generates hydroxyl radicals and causes DNA damage: role of a Cr(IV)-mediated Fenton-like reaction. *Carcinogenesis* 15:2475-2478
- Shibutani S, Takeshita M, Grollman AP (1991) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* 349:431-434
- Shigenaga MK, Aboujaoude EN, Chen Q, Ames BN (1994) Assays of oxidative DNA damage biomarkers 8-oxo-2'-deoxyguanosine and 8-oxoguanine in nuclear DNA and biological fluids by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Methods Enzymol* 234:16-33
- Shigenaga MK, Gimeno CJ, Ames BN (1989) Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:9697-9701
- Shith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76-85
- Sies H (1991) *Oxidative stress. Oxidants and Antioxidants*. Academic Press, New York and London:
- Sies H (1993) Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection. *Mutat Res* 299:183-191

- Sies H (1993) Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 215:213-219
- Sohal RS, Agarwal S, Candas M, Forster MJ, Lal H (1994) Effect of age and caloric restriction on DNA oxidative damage in different tissues of C57BL/6 mice. *Mech Ageing Dev* 76:215-224
- Sohal RS, Orr WC (1993) *Biologie prospective*. John Libbey Eurotext, Paris: 513-518
- Sonobe MH, Yoshida T, Murakami M, Kameda T, Iba H (1995) fra-2 promoter can respond to serum-stimulation through AP-1 complexes. *Oncogene* 10:689-696
- Spitz DR, Dewey WC, Li GC (1987) Hydrogen peroxide or heat shock induces resistance to hydrogen peroxide in Chinese hamster fibroblasts. *J Cell Physiol* 131:364-373
- Stadler RH, Staempfli AA, Fay LB, Turesky RJ, Welti DH (1994) Synthesis of multiply-labeled [¹⁵N₃,¹³C₁]-8-oxo-substituted purine bases and their corresponding 2'-deoxynucleosides. *Chem Res Toxicol* 7:784-791
- Strauss B, Hanawalt P, Swenberg J (1994) Risk assessment in environmental carcinogenesis. An American Association for Cancer Research special conference in cancer research cosponsored by the Environmental Mutagen Society. *Cancer Res* 54:5493-5496
- Suzuki J, Inoue Y, Suzuki S (1995) Changes in the urinary excretion level of 8-hydroxyguanine by exposure to reactive oxygen-generating substances. *Free Radic Biol Med* 18:431-436
- Szatrowski TP, Nathan CF (1991) Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res* 51:794-798
- Takasawa M, Hayakawa M, Sugiyama S, Hattori K, Ito T, Ozawa T (1993) Age-associated damage in mitochondrial function in rat hearts. *Exp Gerontol* 28:269-280
- Takeuchi T, Morimoto K (1993) Increased formation of 8-hydroxydeoxyguanosine, an oxidative DNA damage, in lymphoblasts from Fanconi's anemia patients due to possible catalase deficiency. *Carcinogenesis* 14:1115-1120
- Takeuchi T, Morimoto K (1994) Crocidolite asbestos increased 8-hydroxydeoxyguanosine levels in cellular DNA of a human promyelocytic leukemia cell line, HL60. *Carcinogenesis* 15:635-639
- Tchou J, Kasai H, Shibutani S, Chung MH, Laval J, Grollman AP, Nishimura S (1991) 8-oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:4690-4694
- Thorne NM, Hankin S, Wilkinson MC, Nunez C, Barraclough R, McLennan AG (1995) Human diadenosine 5',5'''-P₁,P₄-tetraphosphate pyrophosphohydrolase is a member of the MutT family of nucleotide pyrophosphatases. *Biochem J* 311:717-721
- Toyokuni S, Okamoto K, Yodoi J, Hiai H (1995) Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett* 358:1-3
- Toyokuni S, Sagripanti JL (1994) Increased 8-hydroxydeoxyguanosine in kidney and liver of rats continuously exposed to copper. *Toxicol Appl Pharmacol* 126:91-97
- Treffers HP, Spinelli V, Belser NO (1954) . *Proc Natl Acad Sci U S A* 40:1064-1071
- Uesugi S, Ikehara M (1977) Carbon-13 magnetic resonance spectra of 8-substituted purine nucleosides. Characteristic shifts for the syn conformation. *J Am Chem Soc* 99:3250-3253
- Umemura T, Sai K, Takagi A, Hasegawa R, Kurokawa Y (1990) Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG) in rat kidney DNA after intraperitoneal administration of ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA). *Carcinogenesis* 11:345-347
- Umemura T, Sai K, Takagi A, Hasegawa R, Kurokawa Y (1995) A possible role for oxidative stress in potassium bromate (KBrO₃) carcinogenesis. *Carcinogenesis* 16:593-597

- Vaca CE, Vilhelm J, Harms-Ringdahl M (1988) Interaction of lipid peroxidation products with DNA. *Mutat Res* 195:137-149
- von Sonntag C (1987) *The chemical basis of radiation biology*. Taylor & Francis, New York.:
- Wani G, D'Ambrosio SM (1995) Cell type-specific expression of human 8-oxo-7,8-dihydroguanosine triphosphatase in normal breast and skin tissues in vivo. *Carcinogenesis* 16:277-283
- Weber DJ, Abeygunawardana C, Bessman MJ, Mildvan AS (1993) Secondary structure of the MutT enzyme as determined by NMR. *Biochemistry* 32:13081-13088
- Wei H, Frenkel K (1991) In vivo formation of oxidized DNA bases in tumor promoter-treated mouse skin. *Cancer Res* 51:4443-4449
- Wei H, Frenkel K (1993) Relationship of oxidative events and DNA oxidation in SENCAR mice to in vivo promoting activity of phorbol ester-type tumor promoters. *Carcinogenesis* 14:1195-1201
- Wiese AG, Pacifici RE, Davies KJA (1995) Transient adaptation to oxidative stress in mammalian cells. *Arch Biochem Biophys* 318:231-240
- Wilson VL, Taffe BG, Shields PG, Povey AC, Harris CC (1993) Detection and quantification of 8-hydroxydeoxyguanosine adducts in peripheral blood of people exposed to ionizing radiation. *Environ Health Perspect* 99:261-263
- Wojcik A, Sauer K, Zolzer F, Bauch P, Muller WU (1996) Analysis of DNA damage recovery processes in the adaptive response to ionizing radiation in human lymphocytes. *Mutagenesis* 11:291-297
- Wood ML, Dizdaroglu M, Gajewski E, Essigmann JM (1990) Mechanistic studies of ionizing radiation and oxidative mutagenesis: genetic effects of a single 8-hydroxyguanine (7-hydro-8-oxoguanine) residue inserted at a unique site in a viral genome. *Biochemistry* 29:7024-7032
- Wu C, Nagasaki H, Maruyama K, Nakabeppu Y, Sekiguchi M, Yuasa Y (1995) Polymorphisms and probable lack of mutation in a human mutT homolog, hMTH1, in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 214:1239-1245
- Yamamoto K, Inoue S, Kawanishi S (1993) Site-specific DNA damage and 8-hydroxydeoxyguanosine formation by hydroxylamine and 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide in the presence of Cu(II): role of active oxygen species. *Carcinogenesis* 14:1397-1401
- Yanofsky C, Cox EC, Horn V (1966) The unusual mutagenic specificity of an E. coli mutator gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 55:274-281
- Yarborough A, Zhang YJ, Hsu TM, Santella RM (1996) Immunoperoxidase detection of 8-hydroxydeoxyguanosine in aflatoxin B1-treated rat liver and human oral mucosal cells. *Cancer Res* 56:683-688
- Yermilov V, Rubio J, Ohshima H (1995) Formation of 8-nitroguanine in DNA treated with peroxynitrite in vitro and its rapid removal from DNA by depurination. *FEBS Lett* 376:207-210

7. STRESZCZENIE

Reaktywne formy tlenu, takie jak rodnik hydroksylowy i tlen singletowy, mogą reagować z resztami guaniny stanowiącej składnik nukleozydów, nukleotydów i kwasów nukleinowych (DNA i RNA), przeprowadzając ją w oksydacyjną pochodną - 8-oksyguaninę. 8-Oksyguanina powstająca w DNA jest źródłem mutacji punktowych typu GC=>TA z powodu jej potencjału błędnego parowania z adeniną. Ta zmodyfikowana zasada może być również wprowadzana do DNA w trakcie procesu replikacji z 8-oxodGTP, powstającego na skutek oksydacyjnej modyfikacji normalnego substratu do syntezy DNA - dGTP. 8-oxodGMP wprowadzony tą drogą do cząsteczki DNA powoduje najczęściej transwersje typu AT=>CG.

8-Oksy-2'-deoksyguanozyna (8-oxodG) jest obecnie najpowszechniej używanym markerem uszkodzeń oksydacyjnych DNA, oznaczanym zarówno w DNA jak i w moczu, poprzez który jest wydalana z ustroju jako produkt naprawy DNA.

Obiektem tej pracy było kilka aspektów metabolizmu pochodnych 8-oksyguaniny:

1. Promieniowanie jonizujące jest jednym z najlepiej rozpoznanych czynników powodujących oksydacyjną modyfikację guaniny. Badano wpływ terapeutycznych dawek promieniowania rentgenowskiego na powstawanie 8-oxodG w limfocytarnym DNA ludzi. U czterech chorych na raka, leczonych radioterapeutycznie dawką sumaryczną 3000 cGy stwierdzono około dwukrotny wzrost ilości 8-oxodG w DNA limfocytów. Zjawisko to może mieć związek z wtórnymi nowotworami pojawiającymi się czasem u chorych na raka, leczonych radioterapeutycznie.

2. Mutagenny efekt zmodyfikowanej zasady znajdującej się w matrycy DNA zależny jest nie tylko od jej potencjału błędnego parowania, ale także od stabilności produktu modyfikacji w DNA. W celu określenia względnej stabilności 8-oxodG, zbadano kinetykę hydrolizy dG i jej oksydacyjnej pochodnej - 8-oxodG, w warunkach podwyższonej temperatury i przy różnym pH. Dowiedziono zdecydowanie wyższej stabilności 8-oxodG w porównaniu z niezmodyfikowaną dG. Świadczy to o tym, że 8-oksyguanina może być usuwana z DNA tylko na drodze enzymatycznej naprawy. W warunkach obniżonej efektywności systemów naprawy DNA wysoka stabilność 8-oxodG umożliwia jej kumulowanie się w DNA, co prowadzić może do podwyższenia tempa powstawania mutacji punktowych w obrębie genomu komórki.

3. 8-Oksy-2'-deoksyguanozyna oraz 8-oksyguanina obecne w moczu ssaków uważane są za specyficzne markery uszkodzeń oksydacyjnych DNA zachodzących *in vivo*. Aby związek mógł być traktowany jako specyficzny marker uszkodzeń oksydacyjnych DNA nie może on powstawać w żadnych procesach enzymatycznych i musi być absolutnie końcowym produktem naprawy DNA, który nie jest dalej degradowany. W związku z tym, w pracy tej badano potencjalne możliwości degradacji i powstawania 8-oxoGua i 8-oxodG pod wpływem enzymów szlaku katabolicznego klasycznych nukleozydów purynowych. Wykazano, iż 8-oxodG nie jest substratem dla fosforylasy nukleozydów purynowych i nie może być degradowana przez ten enzym do wolnej 8-oxoGua i deoksyrybozo-1-fosforanu. Dowiedziono również, że guanaza (enzym katalizujący hydrolityczną dezaminację guaniny do ksantyny) nie katalizuje dezaminacji 8-oksyguaniny do kwasu moczowego. Przebadano również potencjalną możliwość powstawania 8-oxoGua w procesie enzymatycznej oksydacji guaniny przez oksydazę ksantynową. Wykazano, iż guanina nie jest przekształcana do 8-oksyguaniny pod wpływem tego enzymu. Wyniki te potwierdzają słuszność założenia, iż 8-oxodG i 8-oxoGua mogą być traktowane jako specyficzne markery uszkodzeń oksydacyjnych DNA.

4. Dzięki opracowaniu metody selektywnego oznaczania aktywności pirofosfatazy 8-oxodGTP (hMTH1, ludzkiego homologu bakteryjnego białka MutT) w ekstraktach białkowych z tkanek, zbadano wpływ promieniowania jonizującego na aktywność pirofosfatazy 8-oxodGTP w hodowanych fibroblastach ludzkich linii VH16, VH25 i VH25A. Stwierdzono, że naświetlenie fibroblastów dawką promieniowania X, która wywołuje w typowych eksperymentach odpowiedź adaptacyjną komórek, nie wpływa na poziom ekspresji tego enzymu. Mogłoby to świadczyć o tym, że gen kodujący pirofosfatazę 8-oxodGTP nie znajduje się pod kontrolą czynników transkrypcyjnych aktywowanych przez reaktywne formy tlenu.

5. Wszystkie powyższe badania mogły zostać przeprowadzone dzięki wykonanym w ramach tej pracy syntezom: 8-oksy-2'-deoksyguanozyny oraz jej dwu fosforanowych pochodnych 5'-monofosforanu oraz 5'-trifosforanu.

6. WNIOSKI

1. Terapeutyczne dawki promieniowania rentgenowskiego aplikowane pacjentom chorym na raka wywołują powstawanie w DNA limfocytów krwi obwodowej mutagennej, oksydacyjnej pochodnej guaniny (8-oksyguaniny), co może częściowo wiązać się z występowaniem wtórnych procesów nowotworowych u tych chorych (np. białaczek).
2. Wykazana wysoka stabilność wiązania N-glikozydowego 8-oksy-2'-deoksyguanozyny może mieć związek z akumulacją tej pochodnej w DNA starzejących się komórek i jej biologicznym mutagennym działaniem.
3. 8-Oksy-2'-deoksyguanozyna jest najwyraźniej końcowym produktem naprawy i katabolizmu oksydacyjnie uszkodzonego DNA, jak również oksydacyjnie zmodyfikowanych deoksynukleo(zydu)tydów guaninowych. W tym sensie spełnia ona podstawowe warunki odnośnie użycia jej jako specyficznego, oznaczanego przyżyciowo w moczu markera narażenia organizmu na działanie czynników prooksydacyjnych. 8-oksyguanina wydalana z moczem jest najprawdopodobniej produktem działania grupy enzymów naprawy DNA o aktywności N-glikozylazowej wobec tej modyfikacji. Dlatego też jej użycie jako oznaczanego w moczu markera oksydacyjnych uszkodzeń DNA jest również zasadne. Warunkiem jednak dowiedzenia słuszności tej tezy będzie udowodnienie braku w układach biologicznych aktywności enzymatycznych wobec 8-oksyguanozyny (produktu oksydacyjnej modyfikacji RNA), co będzie oznaczać, iż 8-oxoGua wydalana z moczem nie jest produktem katabolizmu uszkodzonego oksydacyjnie RNA.
4. Brak wzrostu aktywności pirofosfatazy 8-oxodGTP w komórkach ludzkich fibroblastów, poddanych działaniu adaptacyjnej dawki promieniowania jonizującego, sugeruje efektywność funkcjonowania tego enzymu w tych komórkach w odpowiedzi na niezbyt wysokie dawki promieniowania jonizującego. Brak zmian poziomu ekspresji pirofosfatazy 8-oxodGTP po działaniu promieniowania jonizującego może sugerować, iż enzym ten nie znajduje się pod kontrolą czynników transkrypcyjnych aktywowanych przez reaktywne formy tlenu.