

Fyziologie působení farmak a toxických látek

Interakce xenobiotik s DNA a proteiny



DNA adukty

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



Příklad: Adukty DNA vznikající v důsledku expozice tabákovému kouři

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

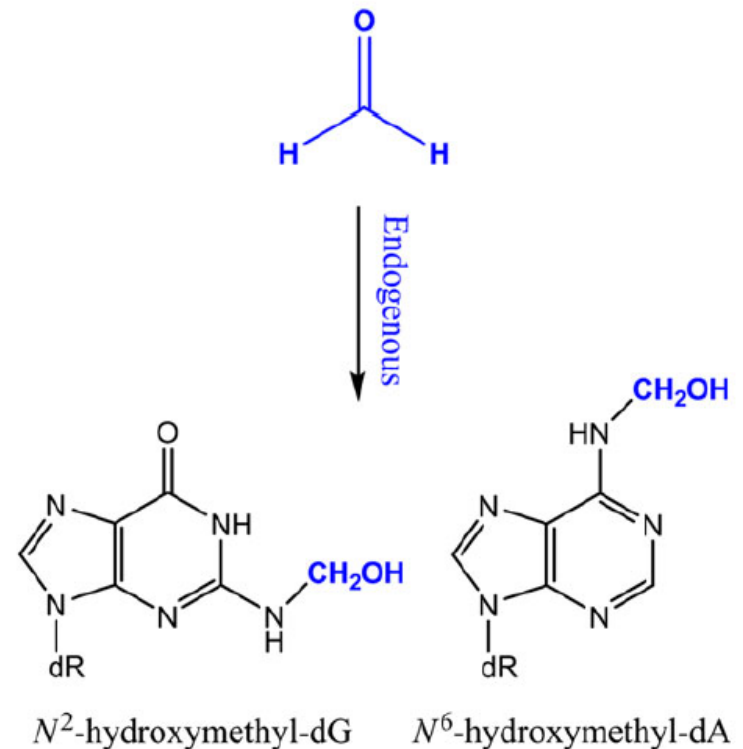


Příklad: Endogenní DNA poškození

TABLE 1

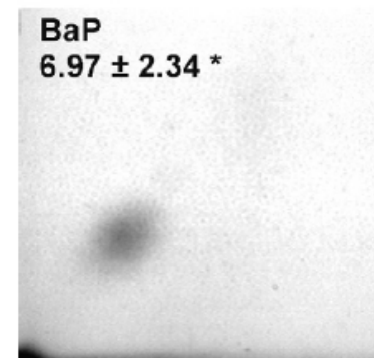
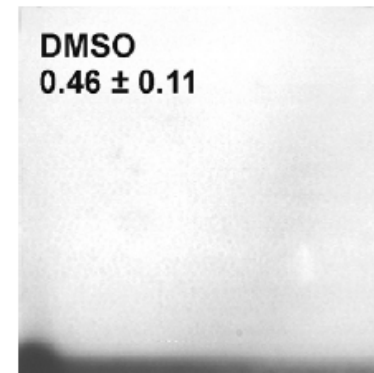
Steady-State Amounts of Selected endogenous DNA Damage

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



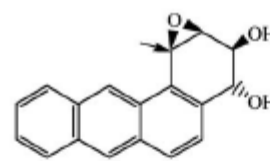
Metodika studia DNA aduktů

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

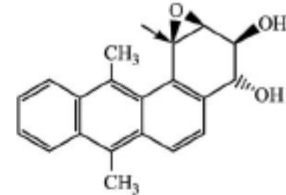


1) Polycyklické aromatické uhlovodíky

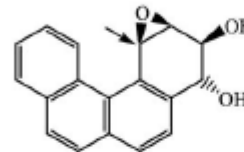
- **Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU)** – významná skupina environmentálních polutantů – produkty spalovacích procesů; musí být bioaktivovány – metabolicky aktivovány prostřednictvím enzymů – tvorba ultimátních karcinogenů – dihydrodiolepoxydy;
- tvorba těchto aktivních mutagenů/karcinogenů je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



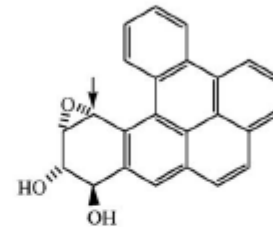
3S,4R,1R,2S-BaA-diol epoxide



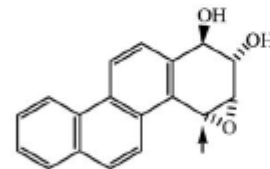
3S,4R,1R,2S-DMBA-diol epoxide



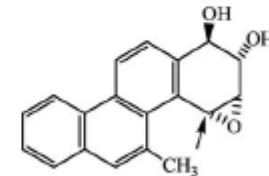
3S,4R,1R,2S-BcPh-diol epoxide



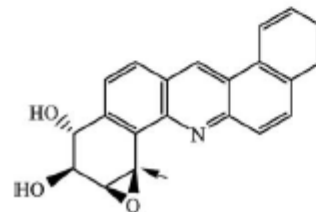
11R,12S,13S,14R-DB[a,l]P-diol epoxide



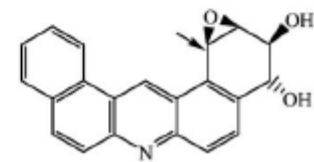
1R,2S,3S,4R-CHR-diol epoxide



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



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

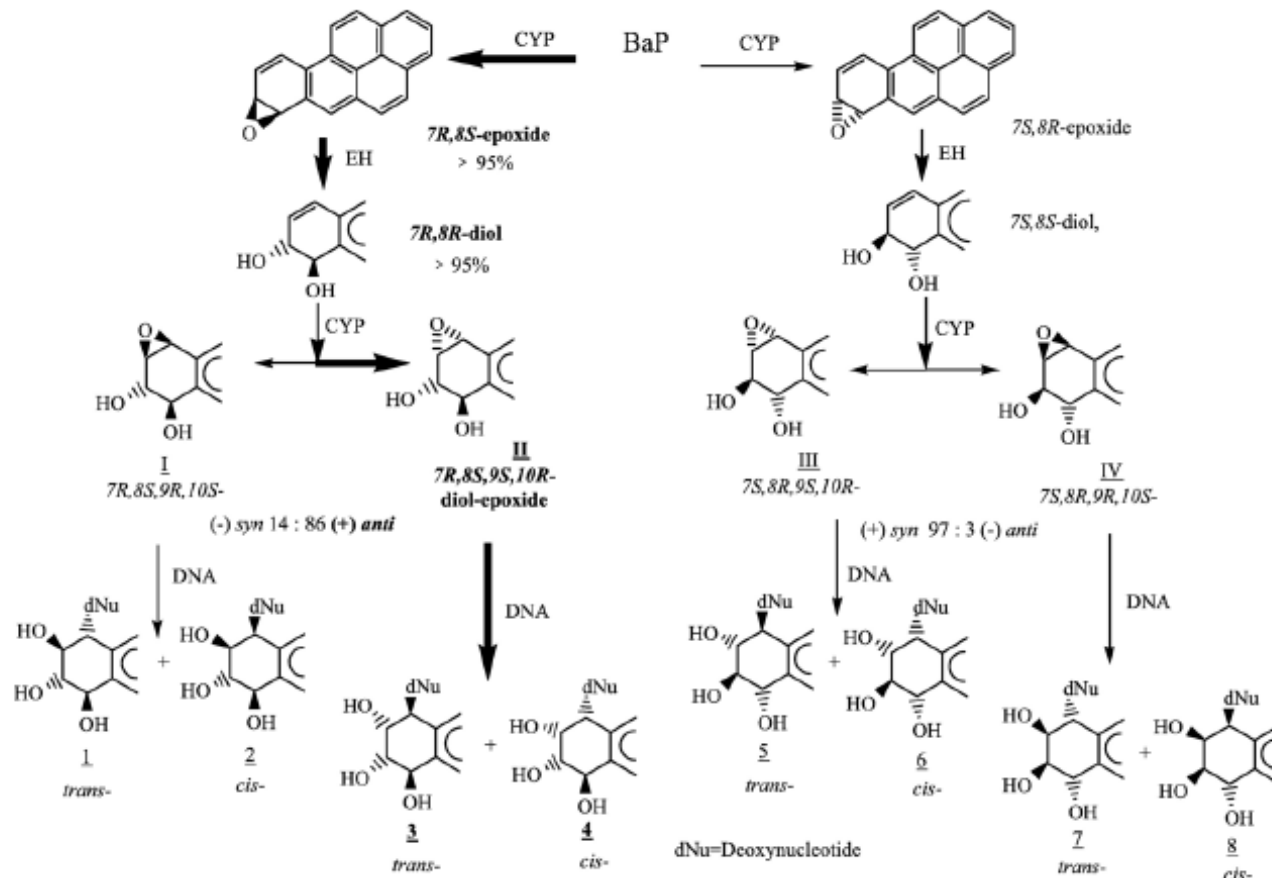


3S,4R,1R,2S-DB[a,j]A-diol epoxide



1) Polycyklické aromatické uhlovodíky

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



BaP není karcinogenní v

AhR KO myších:

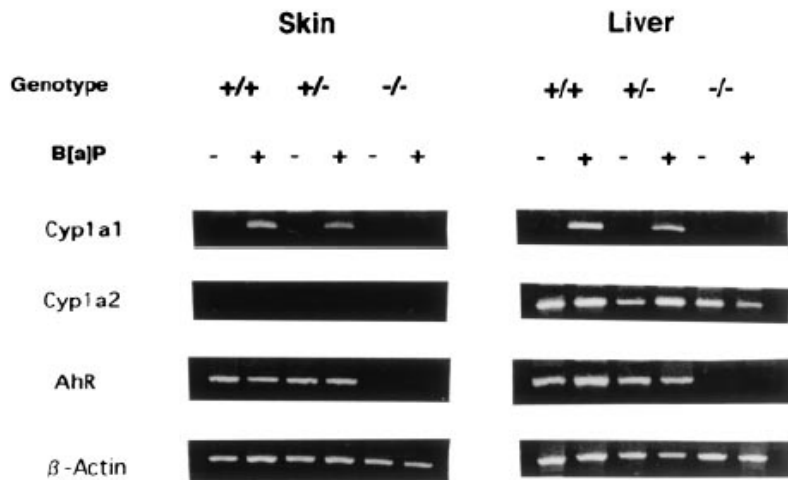


Fig. 1. *Cyp1a1*, *Cyp1a2*, and AhR gene expression in the skin and liver of AhR(+/+), AhR(+/-), and AhR(-/-) mice, with and without B[a]P treatment. One-microgram aliquots of RNA extracted from skin and liver of control and B[a]P-treated mice of the three genotypes were reverse-transcribed and analyzed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

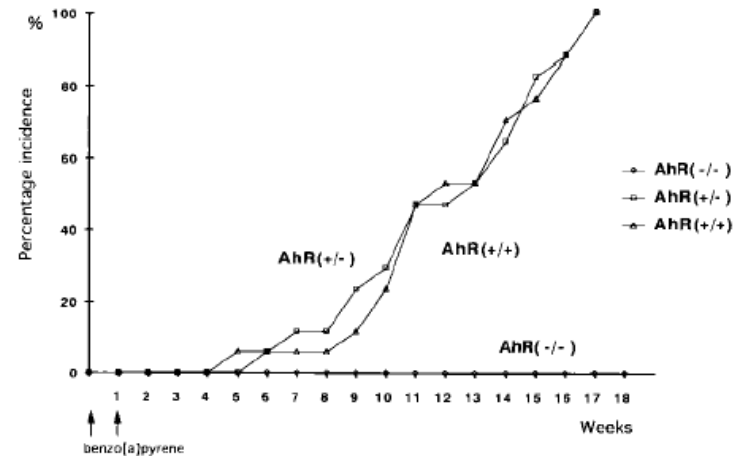


Fig. 2. Subcutaneous tumor induction in wild-type (Δ) and AhR-deficient male mice (+/-, □; -/-, ○) injected with B[a]P.

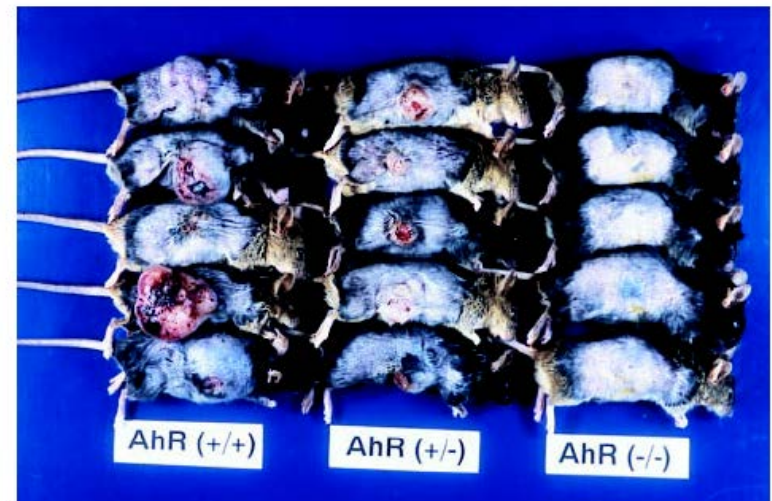
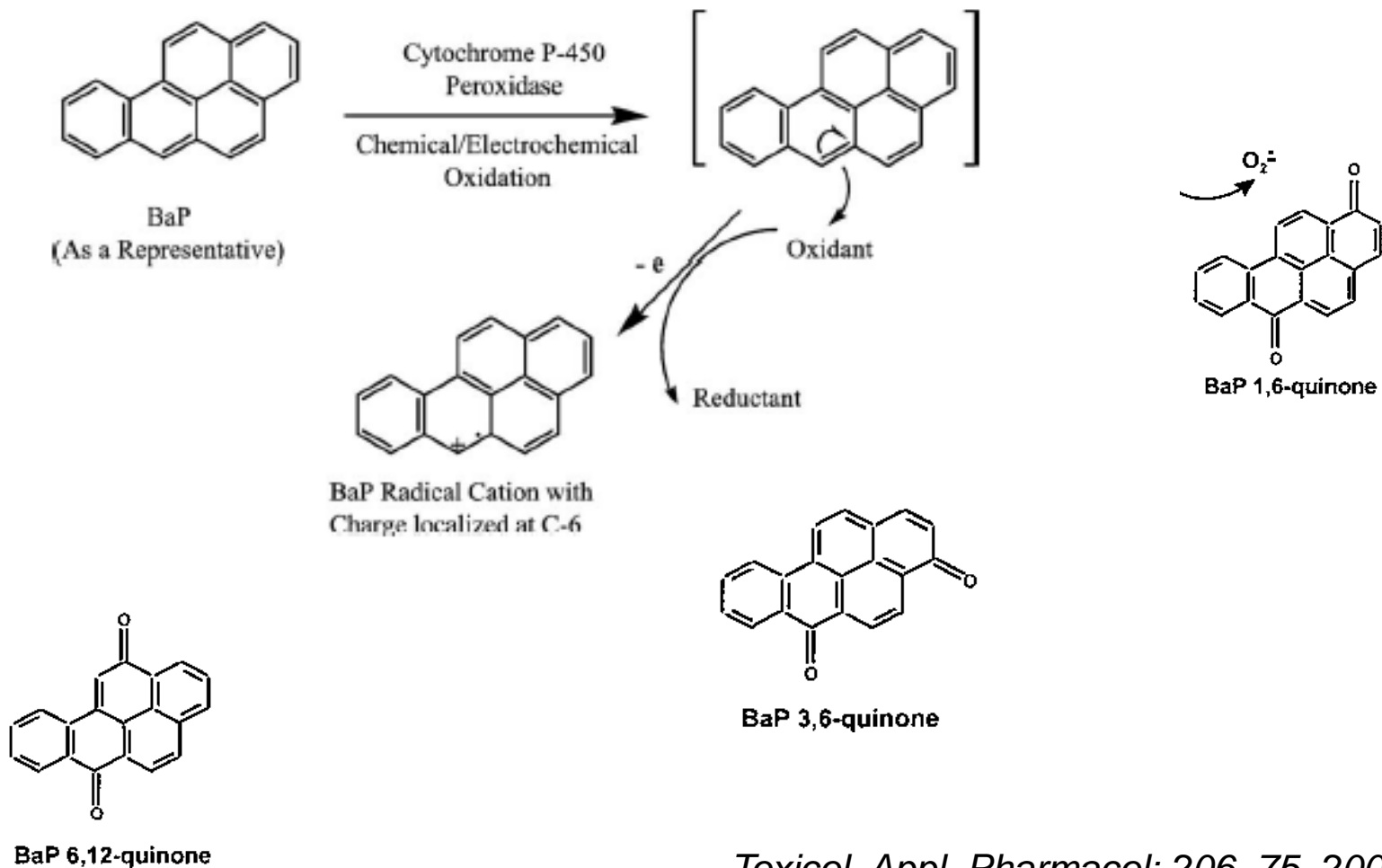


Fig. 3. Gross appearance of flank skins in AhR-wild-type mice (+/+), AhR-heterozygous mice (+/-), and AhR-deficient mice (-/-) injected subcutaneously with B[a]P.

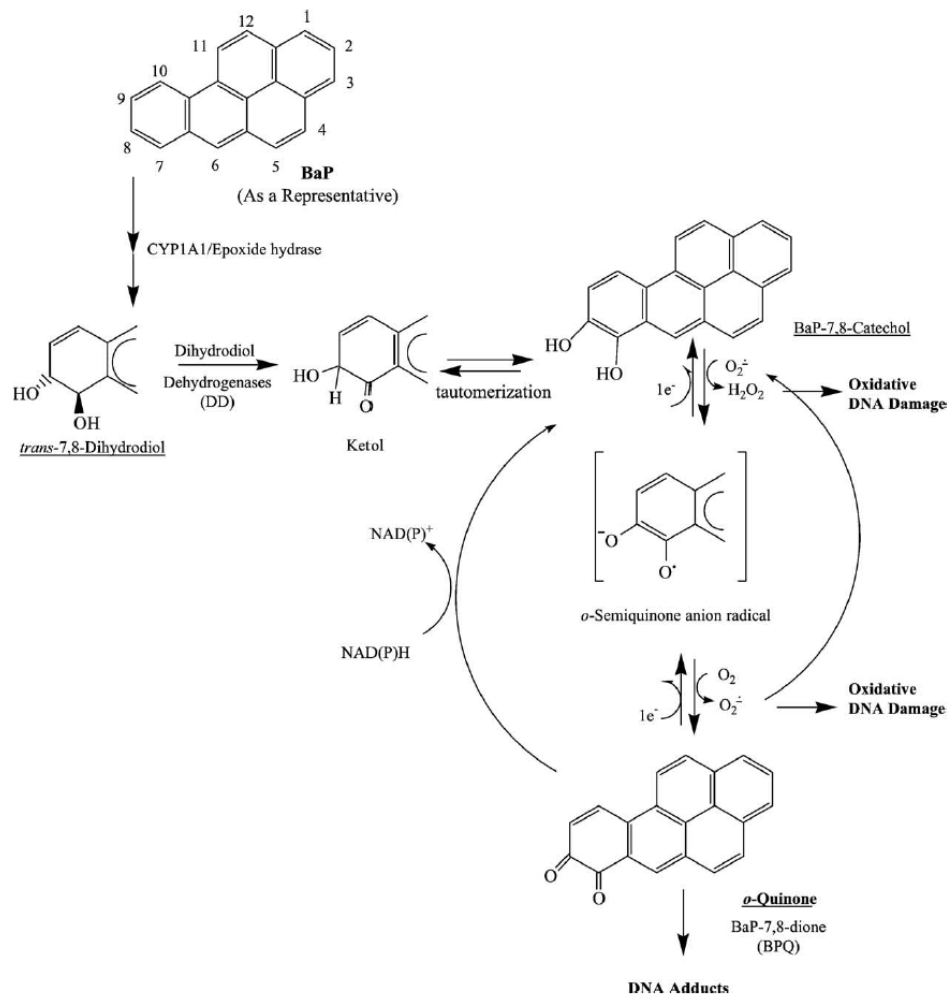
1) Polycyklické aromatické uhlovodíky

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



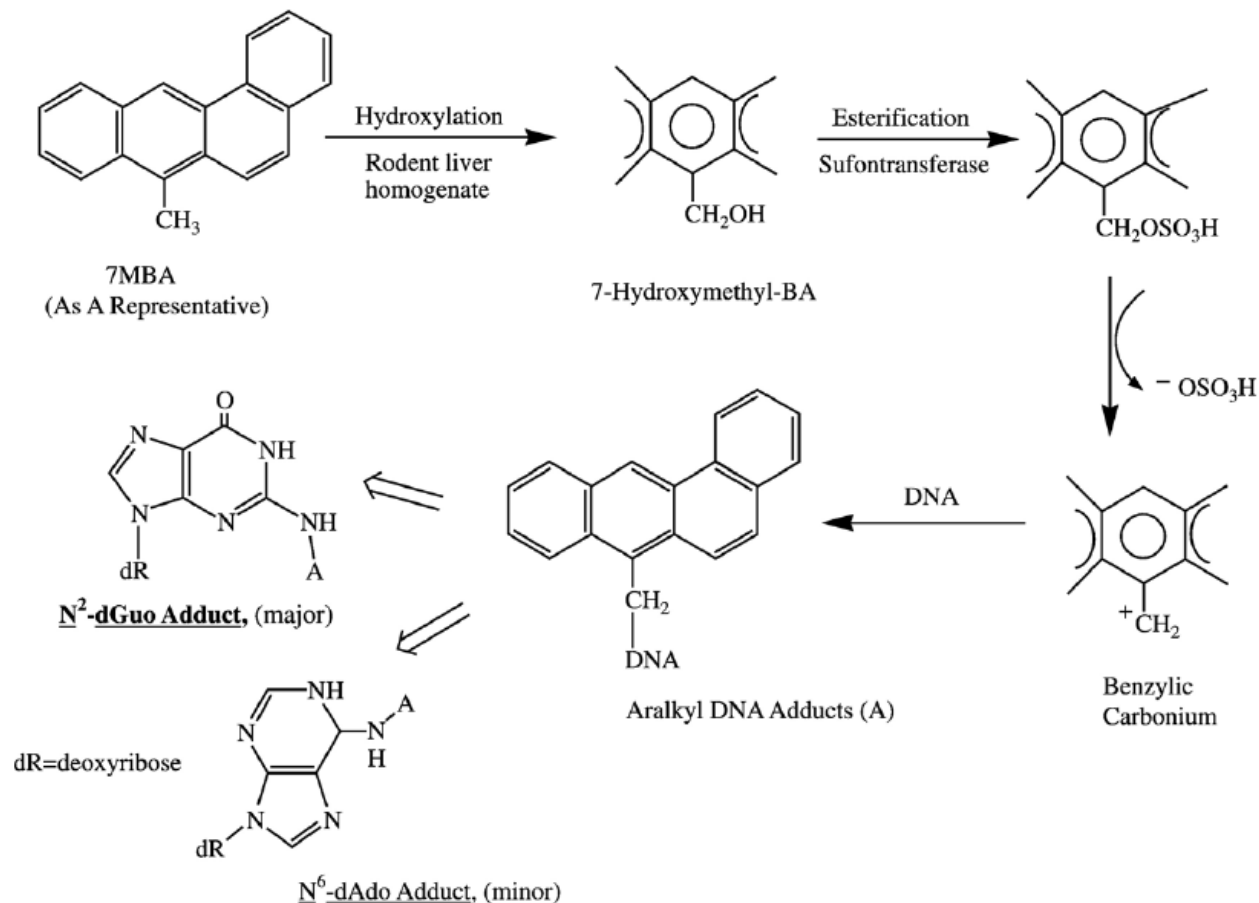
1) Polycyklické aromatické uhlovodíky

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



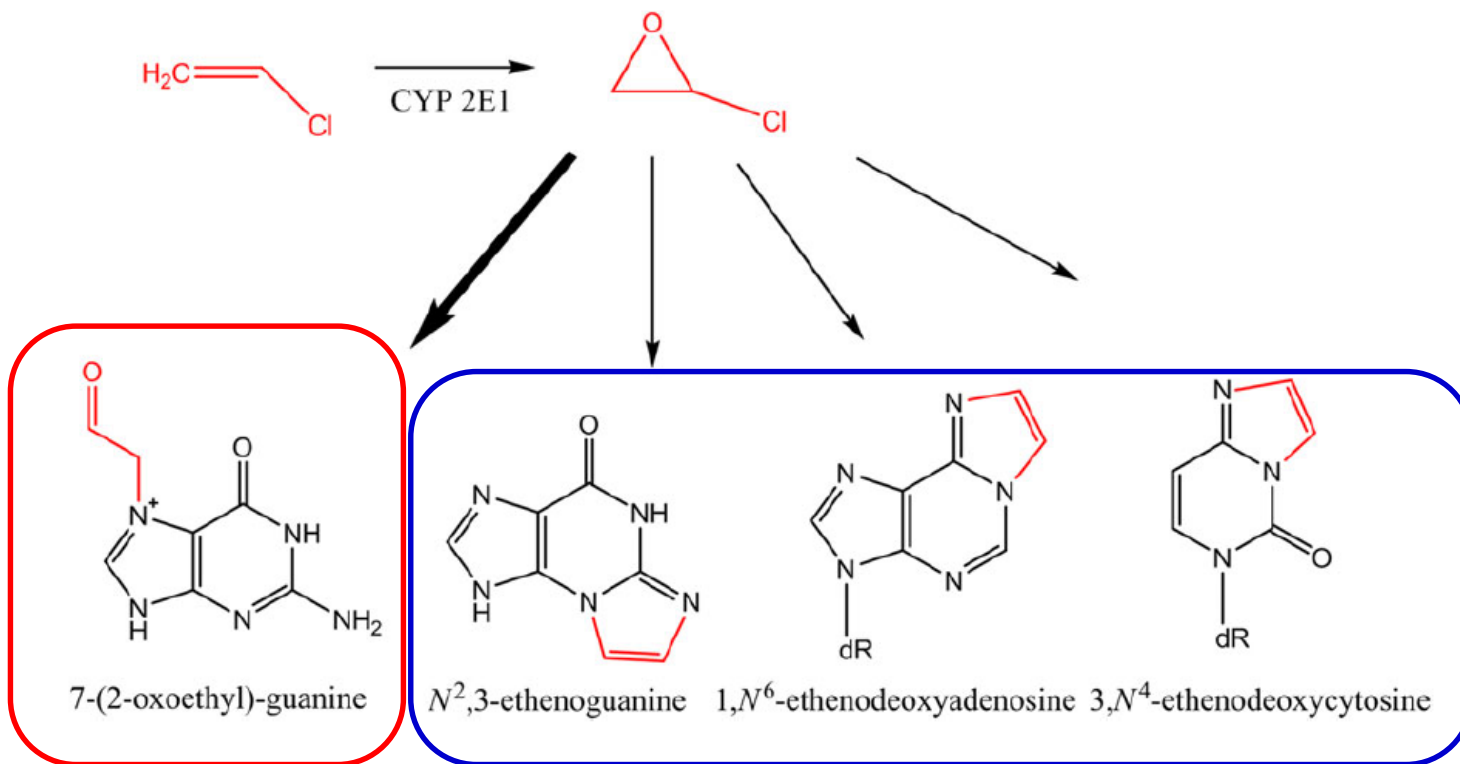
1) Polycyklické aromatické uhlovodíky

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



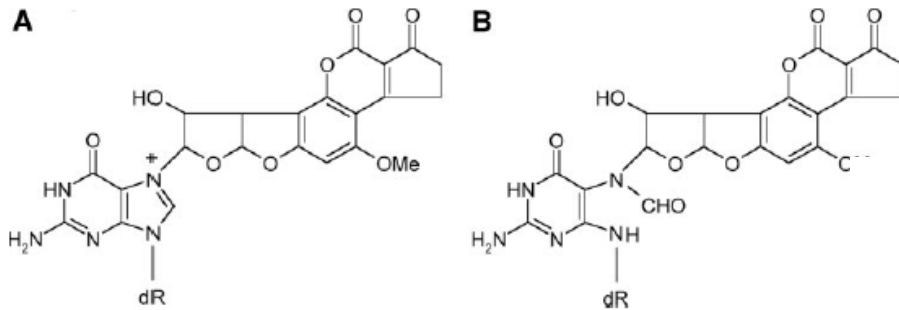
2) Vinyl chlorid

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

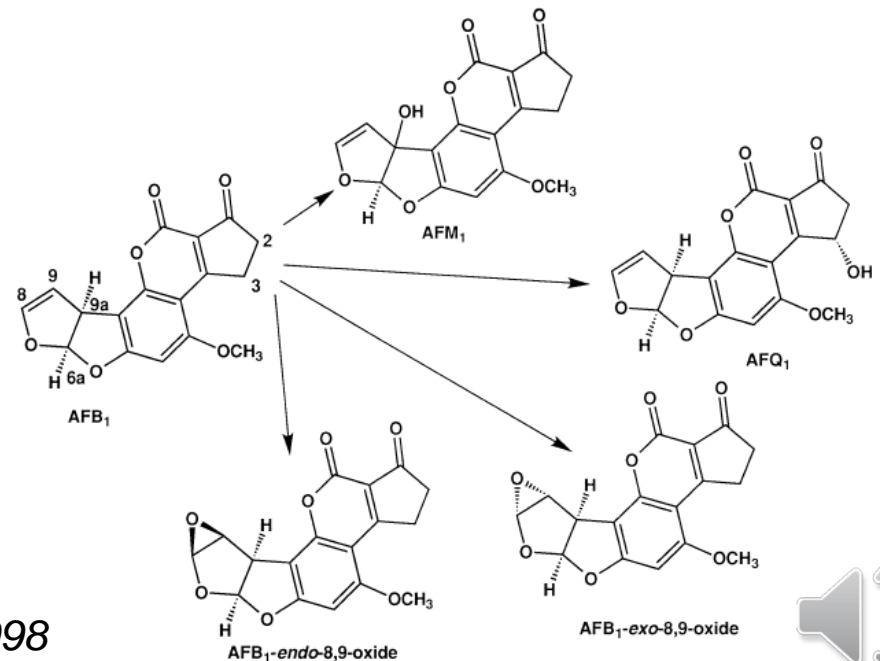


3) Aflatoxin B1

- aflatoxin B1** je významný lidský hepatokarcinogen, mykotoxin produkovaný plísněmi rodu *Aspergillus*; vytváří dva hlavní typy aduktů 8,9-dihydro-8-(N7-guanyl)-9-hydroxy-aflatoxin B1 (A), u kterého za fyziologických podmínek může dojít rozštěpení kruhu za vzniku 8,9-dihydro-8-(N5-formyl-2,5,6-triamino-4-oxypyrimidin N5-yl)-9-hydroxy-aflatoxinu B1 (B). Tyto dva adukty byly identifikovány in vivo a tvoří cca 95% identifikovaných aduktů aflatoxinu B1; hlavní roli v jeho bioaktivaci hraje **CYP3A4**;



Clin. Cancer. Res. 10, 4901, 2004

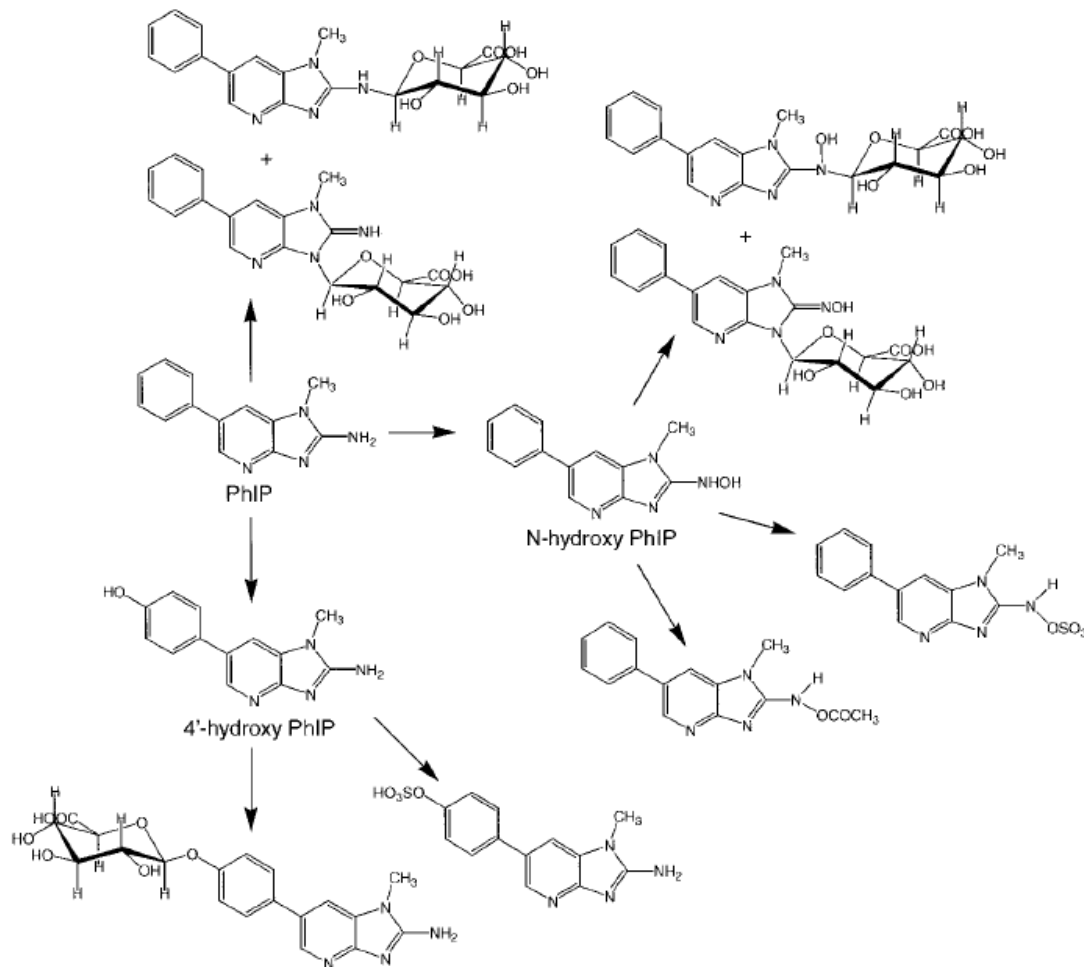


Mutat. Res. 402, 121, 1998



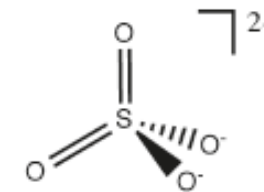
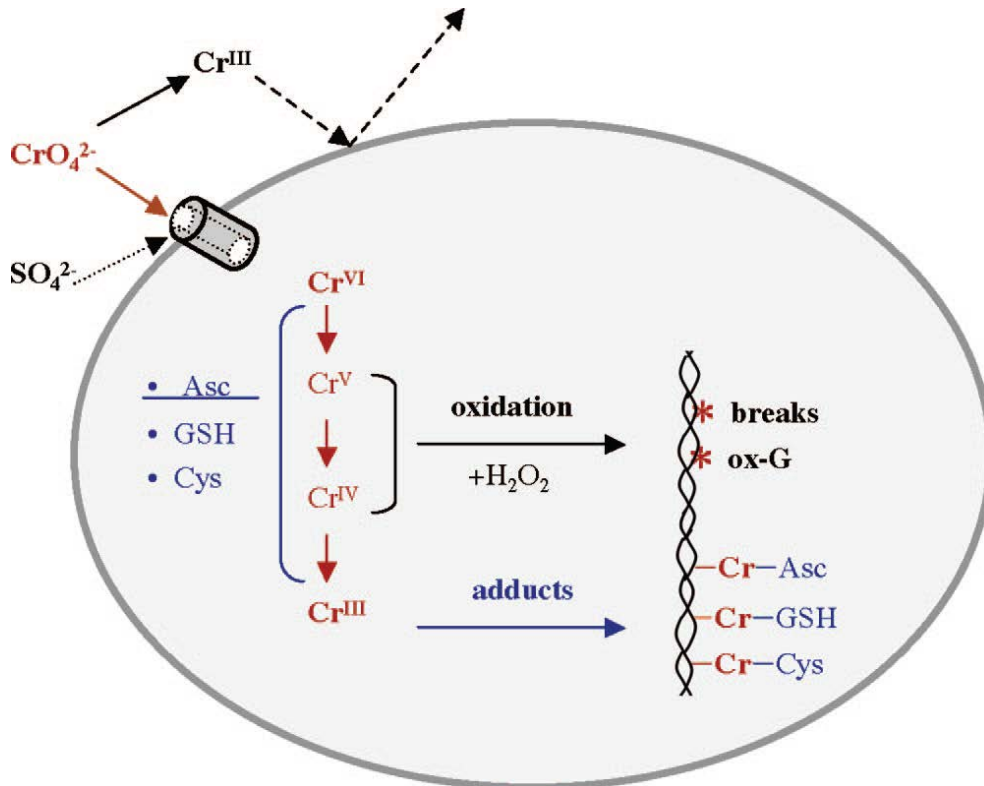
4) PhIP a heterocyklické aminy

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

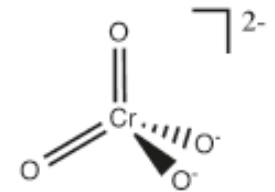


5) Chróm

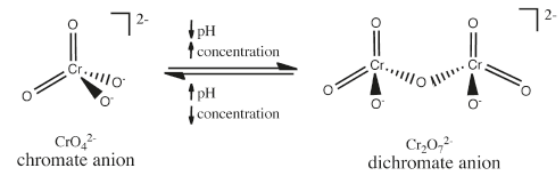
- **sloučeniny Cr^(VI)** zvyšují riziko vzniku nádorů plic, mohou však také přispívat k rozvoji dalších typů nádorů, především v ústní dutině a v tenkém střevě;
- primárním mechanismem přispívajícím ke karcinogenitě sloučenin Cr přímé poškození DNA prostřednictvím **tvorby DNA aduktů** nebo prostřednictvím tvorby ROS;
- převládající formou jsou tzv. ternární L-Cr-DNA adukty, ve kterých atom Cr(III) spojuje DNA a malou molekulu, např. askorbát; adukty vznikají převážně vazbou na fosfátový zbytek, ale předpokládá se, že nejvíce mutagenní jsou komplexy do kterých se zapojuje vedle fosfátu také N7 na dG;



SO_4^{2-}
sulfate anion

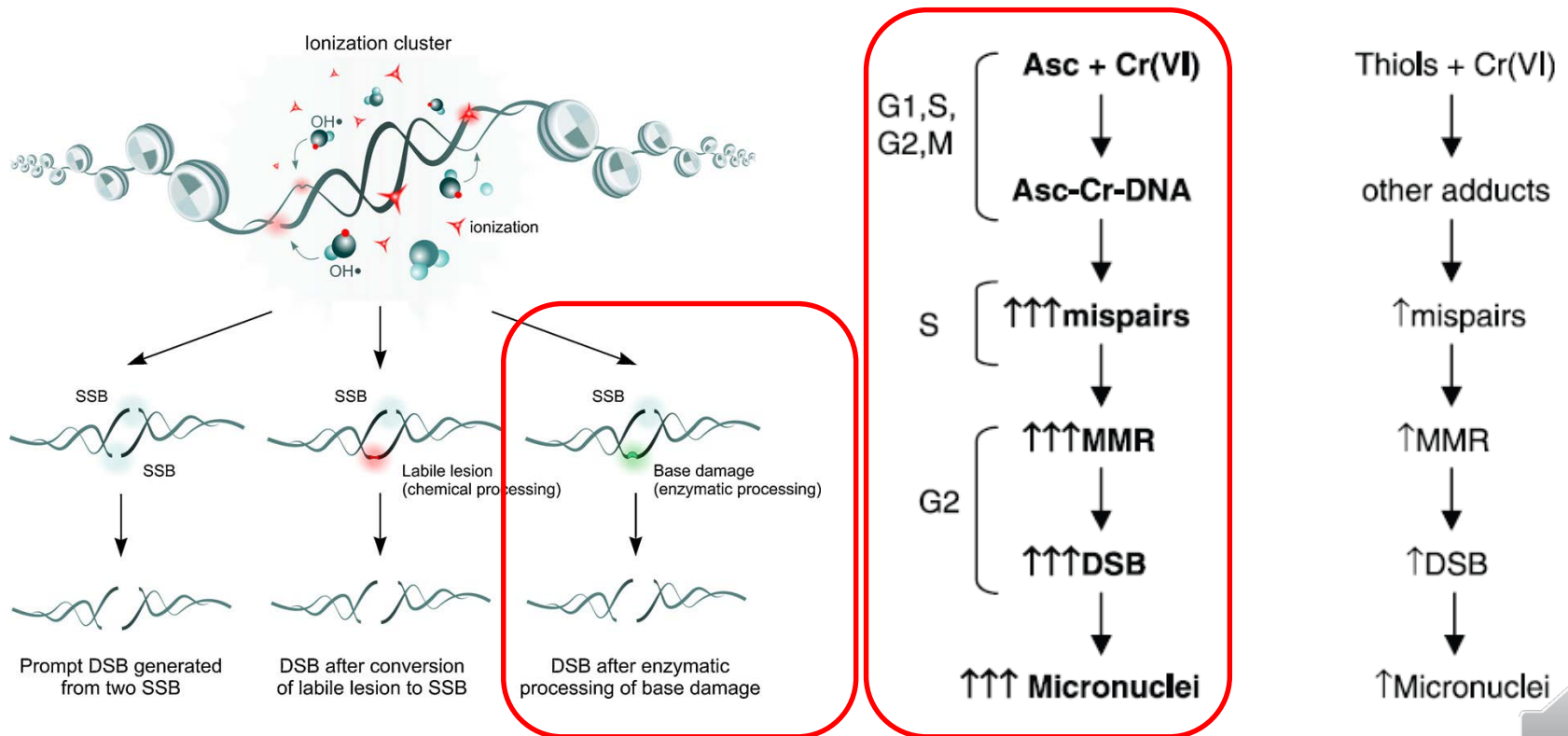


CrO_4^{2-}
chromate anion

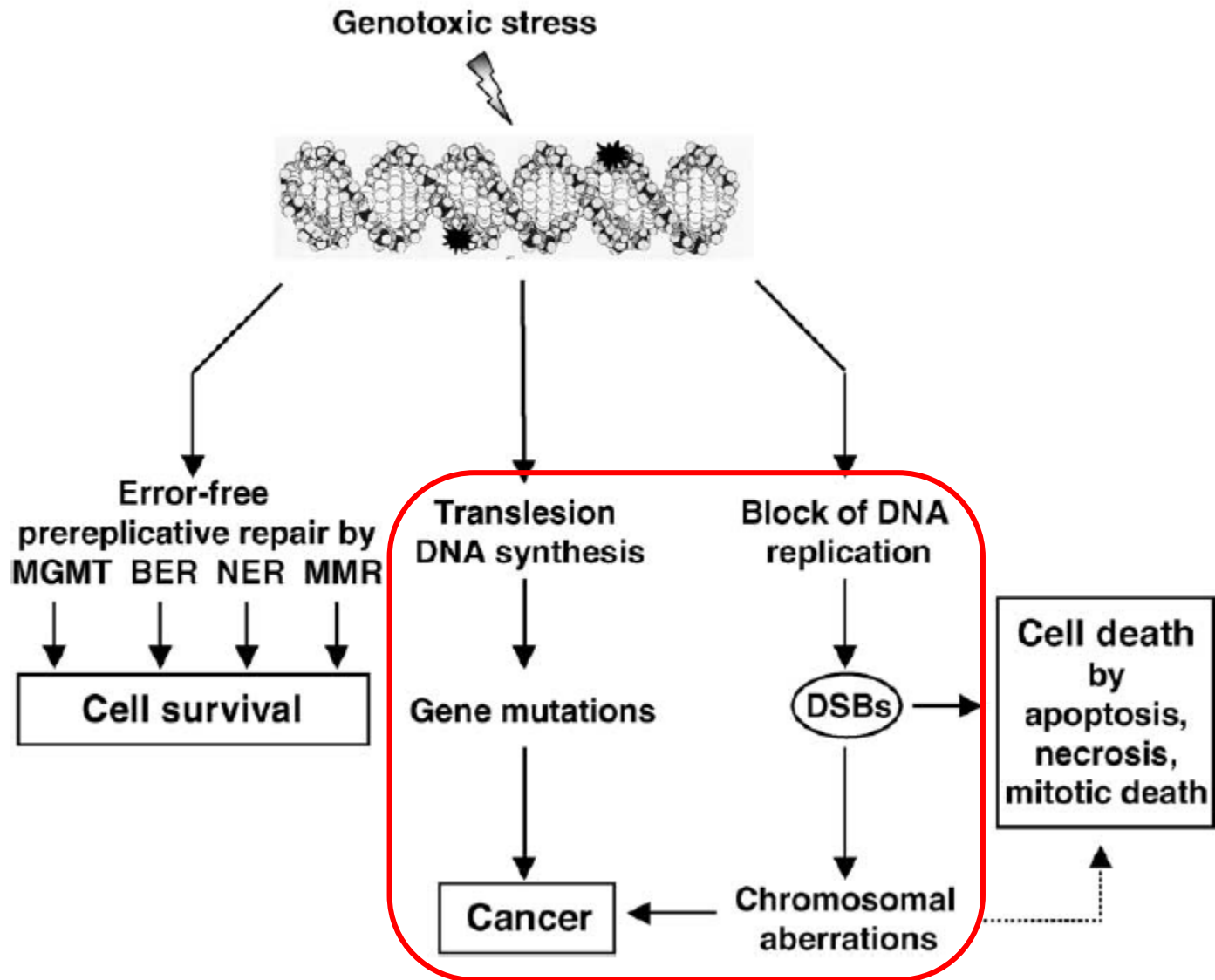


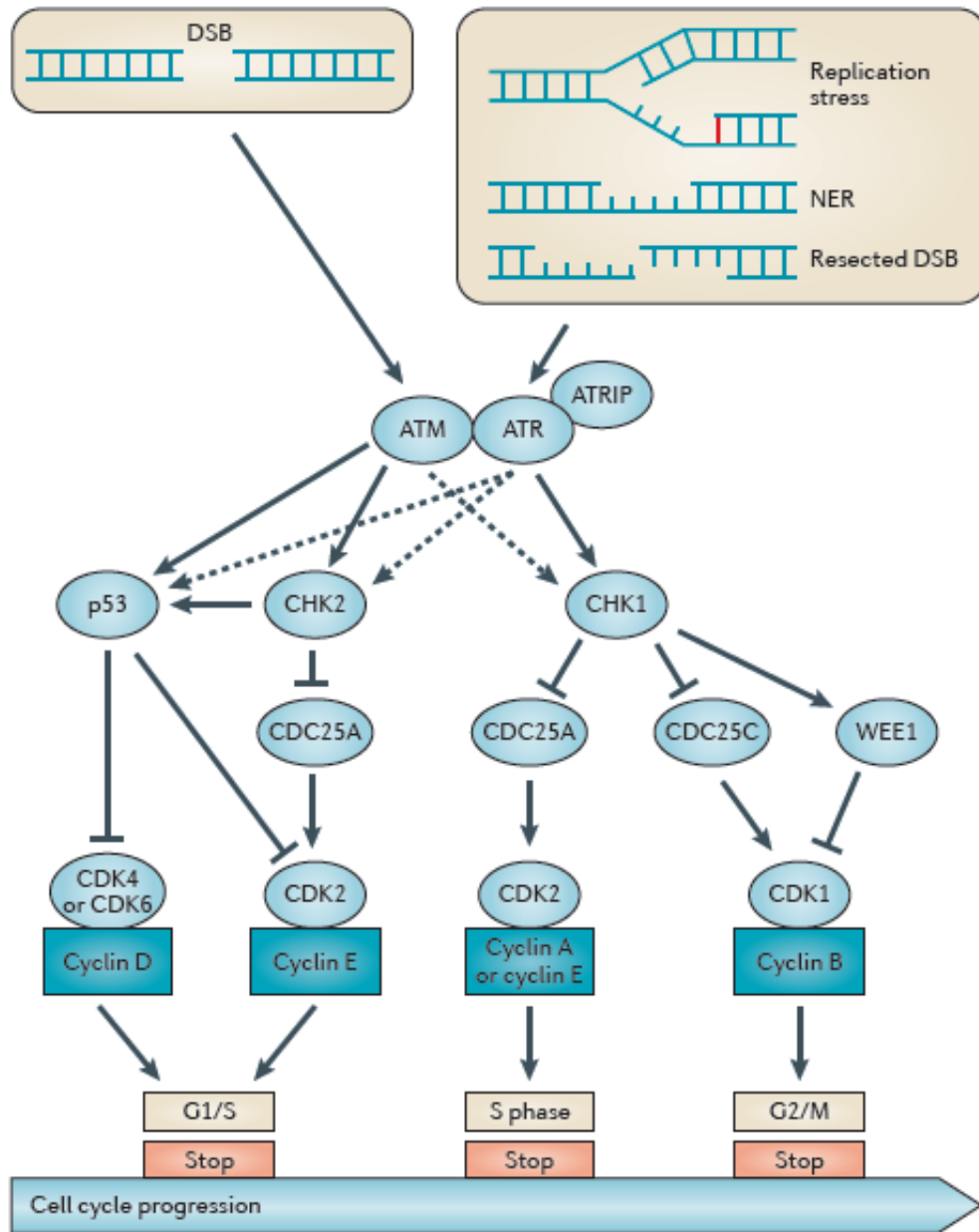
5) Chróm

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



DNA adukty a mutageneze

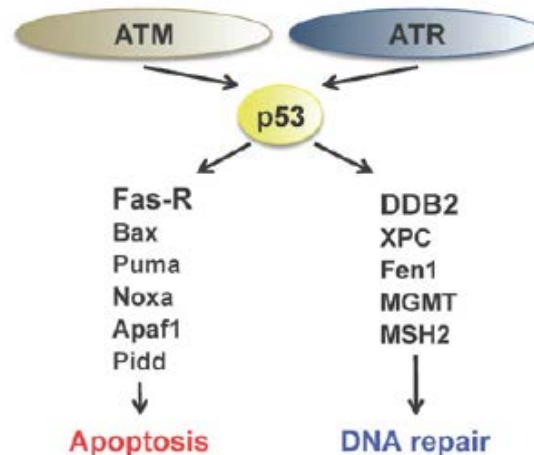
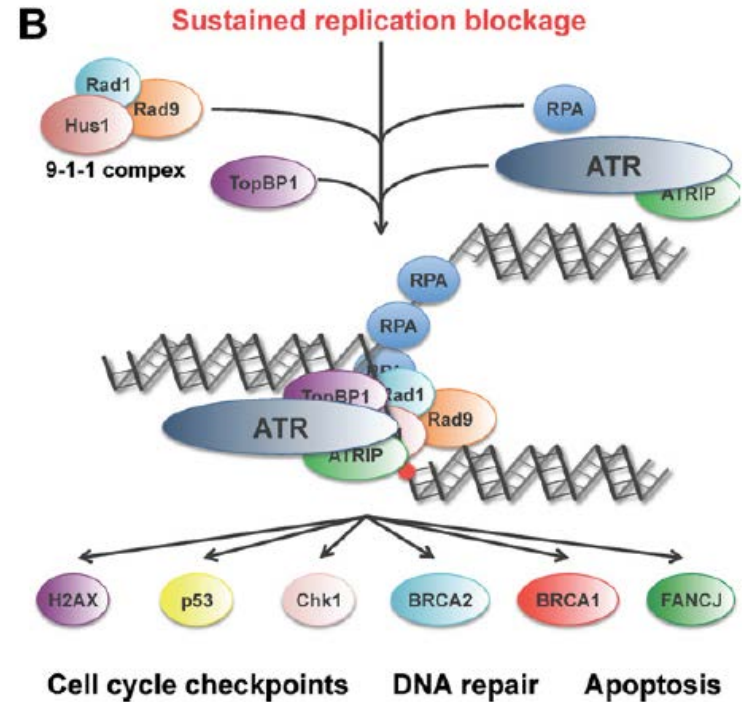
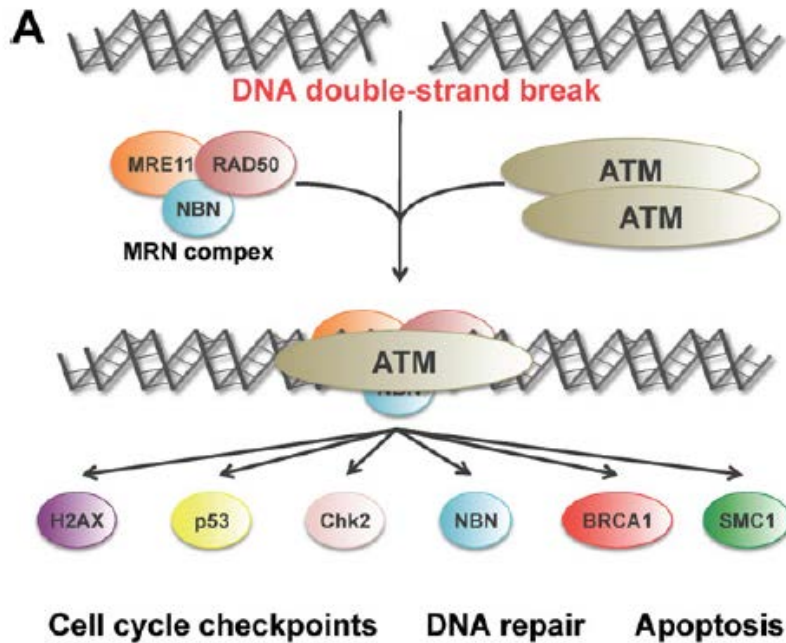


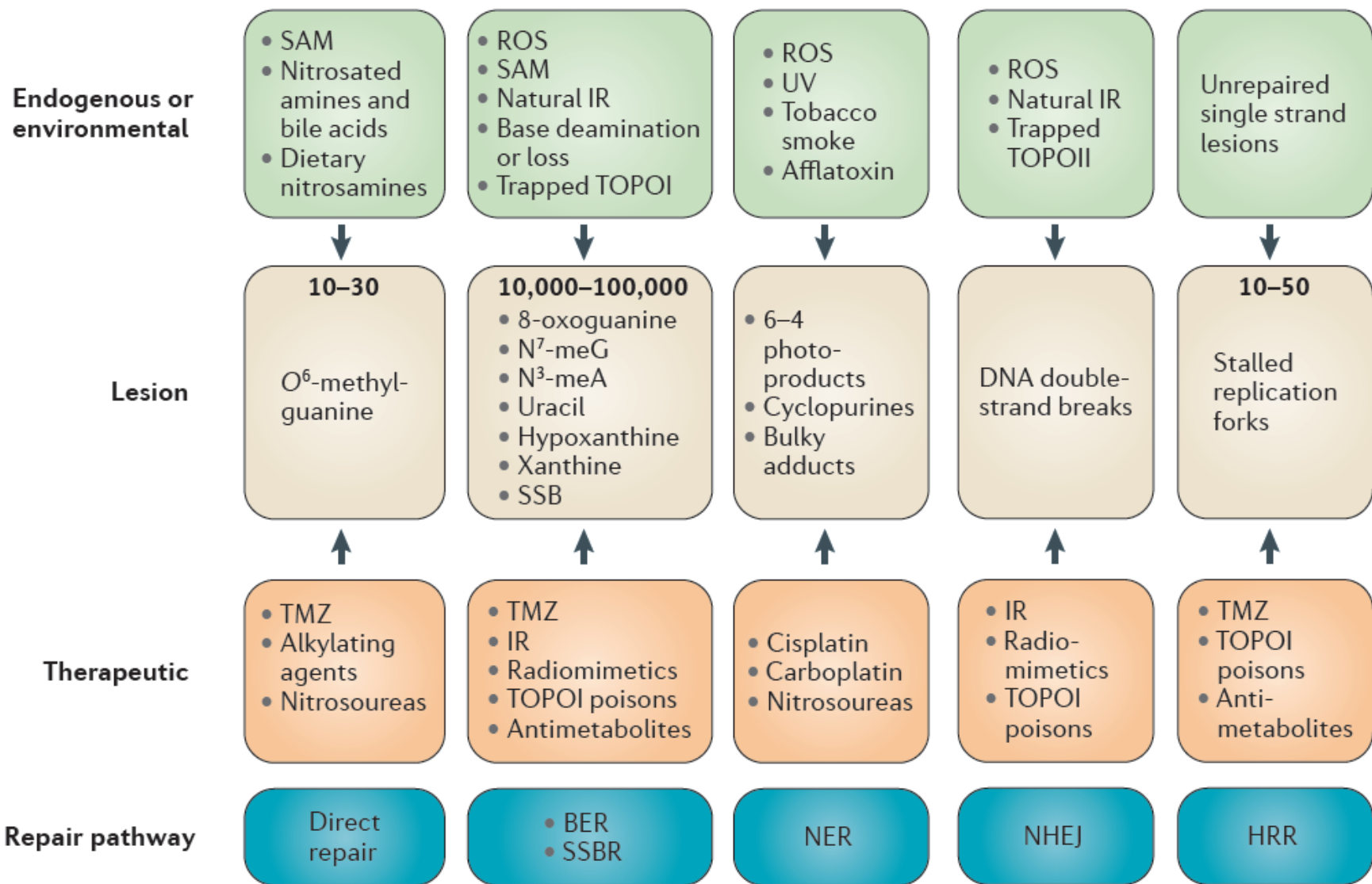


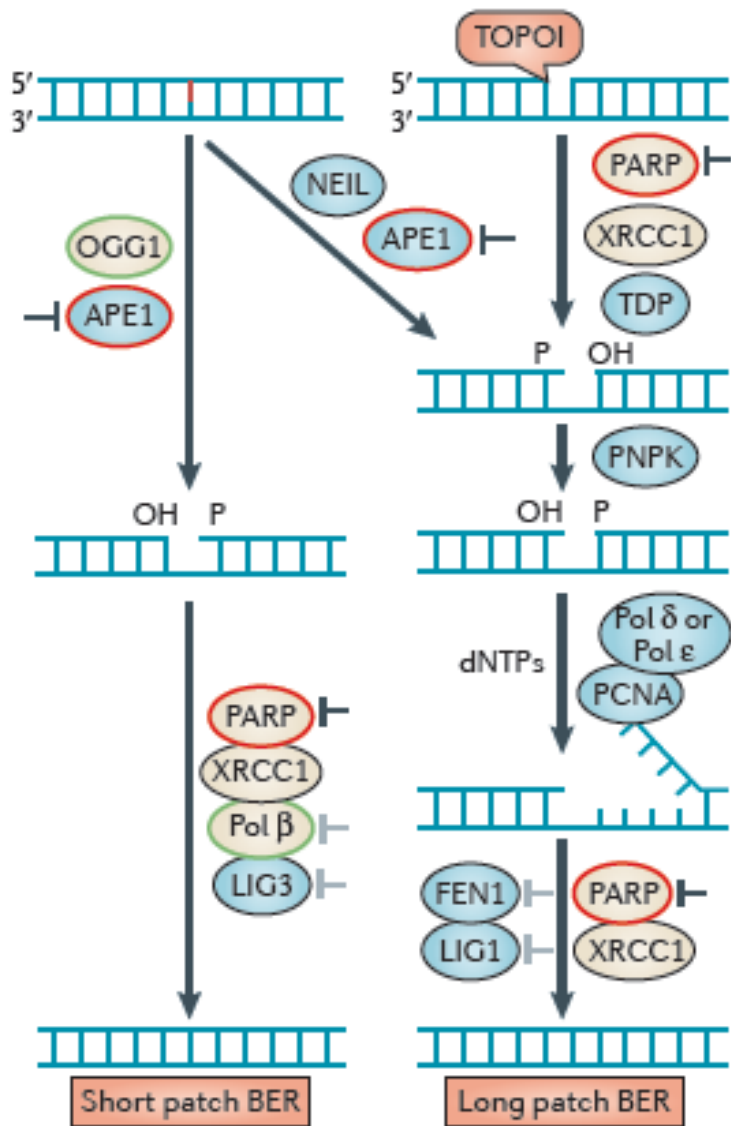
Signalling DNA damage to cell cycle checkpoints. Ataxia-telangiectasia mutated (ATM) is activated by DNA double-strand breaks (DSBs) and triggers the G1 checkpoint, by phosphorylating — and hence activating — CHK2 and p53. Ataxia-telangiectasia and Rad3-related (ATR) is primarily activated by junctions of single-stranded DNA and double-stranded DNA, which arise at stalled replication forks and resected DSBs and are nucleotide excision repair (NER) intermediates. This triggers the intra-S phase and the G2 checkpoints via phosphorylation of CHK1, which in turn phosphorylates WEE1 (which activates this kinase) and cell division cycle 25 (CDC25) phosphatases (which inhibits it) to inhibit cell cycle progression through the coordinate suppression of cyclin-dependent kinase (CDK) activity. It is important to note that there is crosstalk between the ATM–CHK2 and ATR–CHK1 pathways and that they share many substrates.



DNA adukty a mutageneze







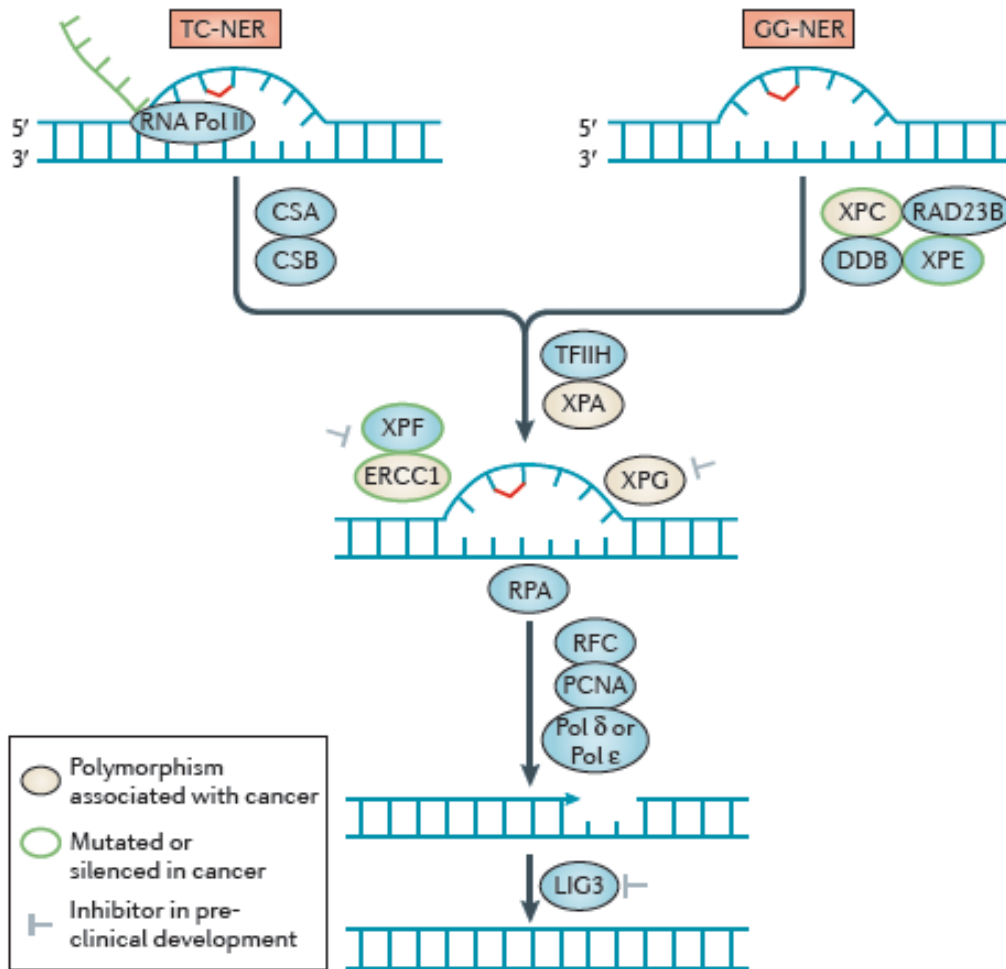
Base excision repair.

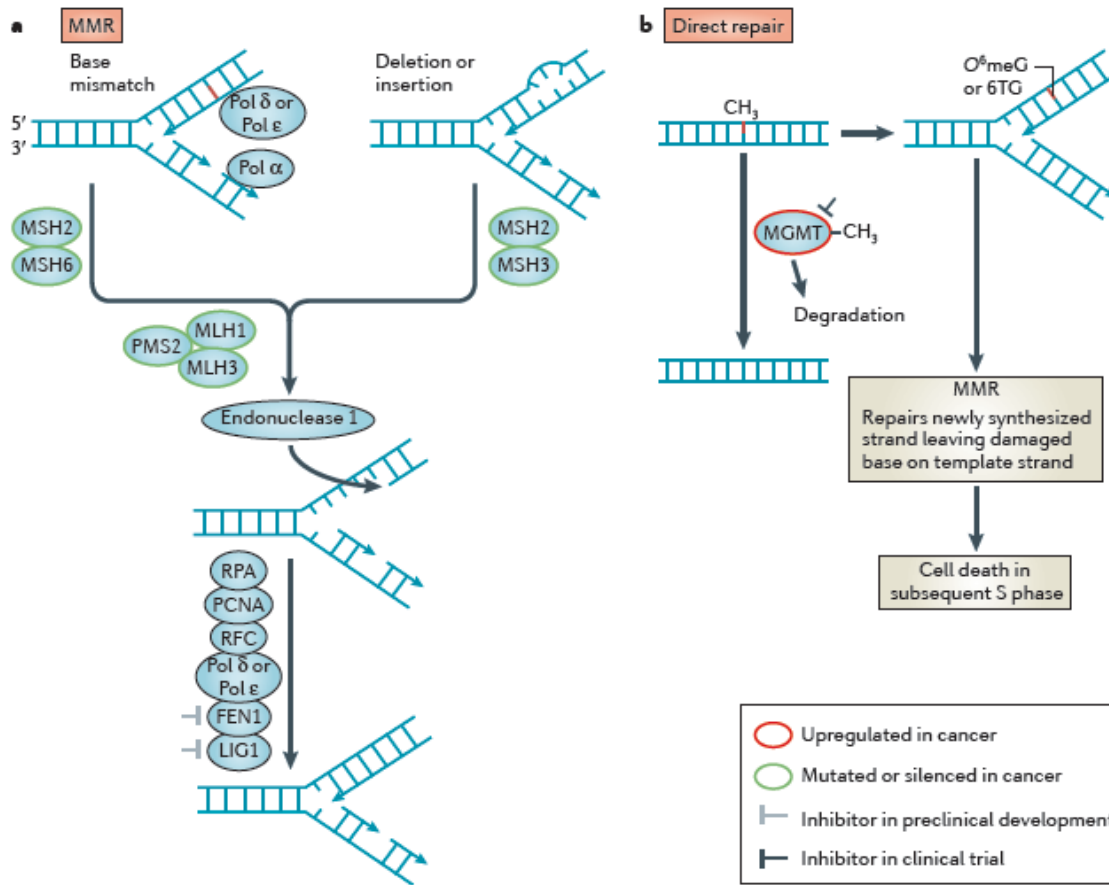
In the first step of base excision repair (BER) the oxidized, deaminated and alkylated bases are removed by specific glycosylases; 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) or members of the Nei-like protein (NEIL) family are examples. The resulting apurinic or apyrimidinic (AP) site is then hydrolysed by an AP endonuclease, such as APE1. The nick in the DNA is then repaired by short patch BER (the predominant mode) or long patch BER, depending on the nature of the 5' and 3' ends and, possibly, ATP availability. Polynucleotide kinase phosphatase (PNKP; a 3' DNA phosphatase and 5' DNA kinase) may be necessary to modify the broken ends for replacement and/or rejoining.



Nucleotide excision repair.

Preferential repair of lesions that stall transcription on the coding strand is by transcription-coupled nucleotide excision repair (TC-NER); the entire genome is repaired by global NER (GG-NER). These pathways differ in their initial steps, TC-NER involves Cockayne syndrome WD repeat protein A (CSA) and CSB, whereas in GG-NER recognition is dependent on Xeroderma pigmentosum group C-complementing protein (XPC)–RAD23B and DNA damage-binding protein (DDB); XPA, replication protein A (RPA) and TFIIH are involved in both pathways. Thereafter the steps are common, with excision of the damaged oligonucleotide by XPG and ERCC1–XPF, then resynthesis of the intact oligonucleotide and ligation are accomplished by DNA polymerase- δ (Pol δ) or Pol ϵ and DNA ligase 3 (LIG3).



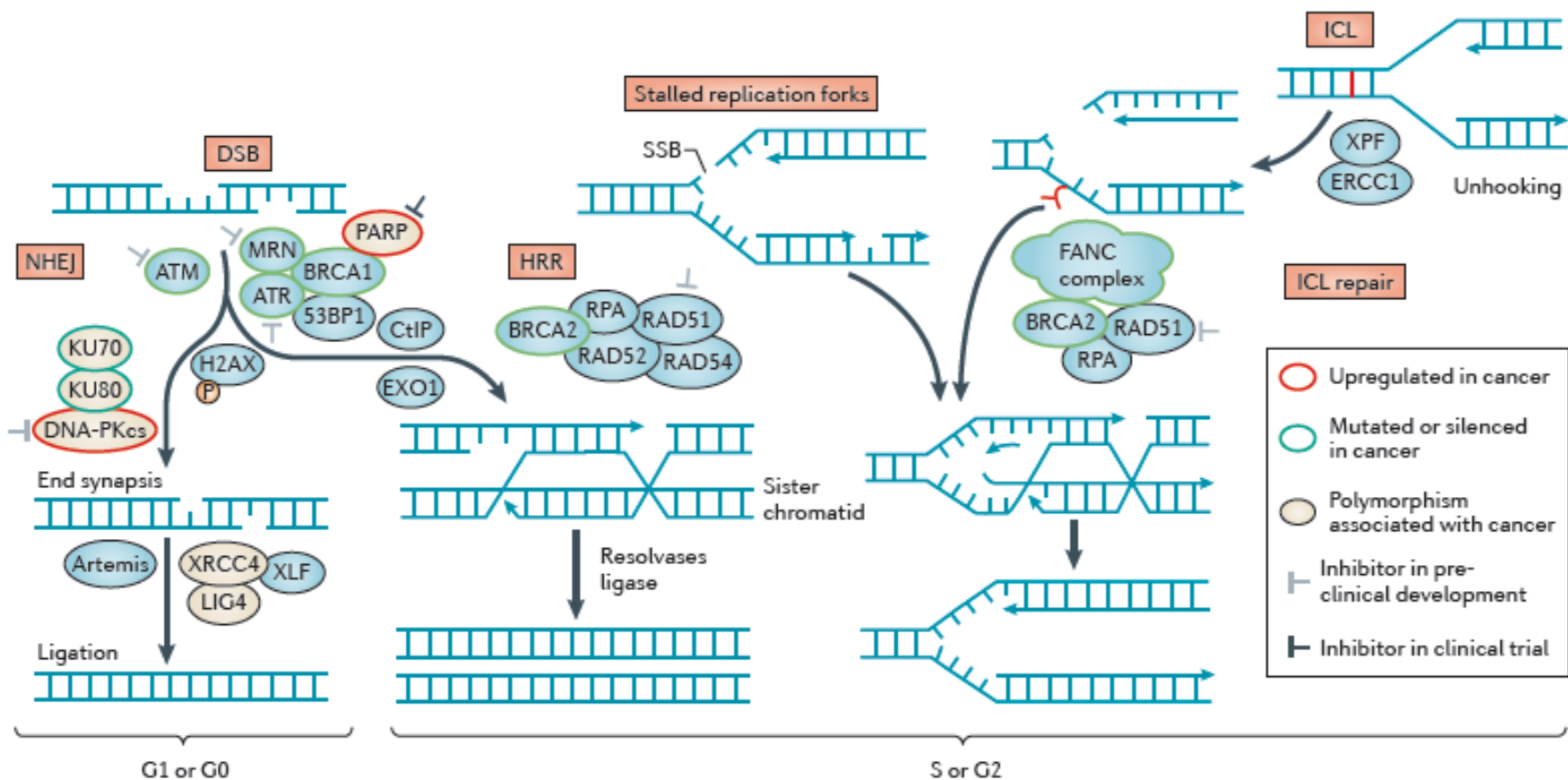


b | However, when damage on the template strand, such as O⁶-methylguanine (O⁶meG) or 6-thioguanine (6TG), causes mispairing at replication the MMR machinery attempts to repair the newly synthesized strand, rather than the damaged one, which results in a DNA double-strand break during the subsequent S phase or causes apoptosis owing to signalling by the MMR machinery to ataxia-telangiectasia and Rad3-related (ATR)–CHK1.

Mismatch repair. **a** | DNA mismatches resulting from the insertion of a mispaired or fraudulent nucleotide are recognized by MSH2–MSH6 heterodimers, whereas deletions and insertions are recognized by MSH2–MSH3 heterodimers. Downstream processing requires PMS2 and MLH1–MLH3 heterodimers. Importantly, mismatch repair (MMR) is strand-specific, correcting the daughter strand. Therefore, this pathway is crucial for the repair of replication errors inserted opposite the correct template strand under normal circumstances.



DNA double-strand break and interstrand crosslink repair.



Interakce xenobiotik s proteiny

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



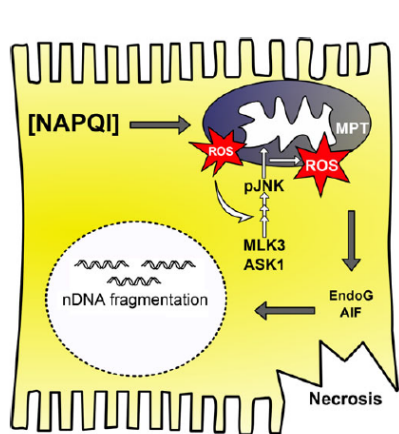
Intrakce xenobiotik s proteiny

- hlavní cíle reaktivních molekul (elektrofilní sloučeniny) – funkční skupiny lokalizované v aminokyselinách: **-SH (Cys)**; **-NH (His)**; **ϵ -NH₂ (Lys)**; **-OH (Tyr)**;
- sterické faktory určují místa poškození proteinů – pouza místa vystavená solventům mohou být atakována elektrofilní sloučeninou;
- detekce specifických aduktů – radioaktivně značená aktivní sloučenina – stanovení specifických proteinů; v posledních letech se však především rozvíjejí metodiky založené na kombinaci HPLC a hmotnostní spektrometrie;

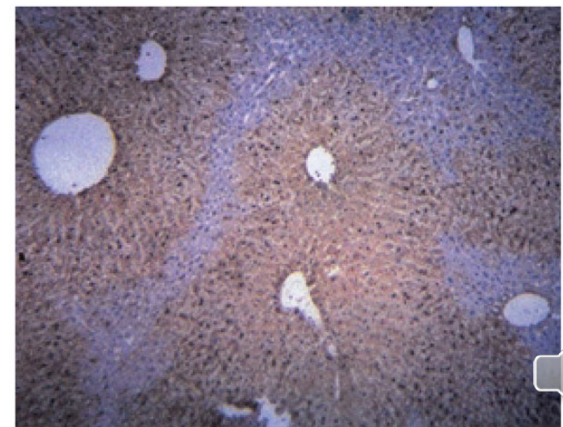
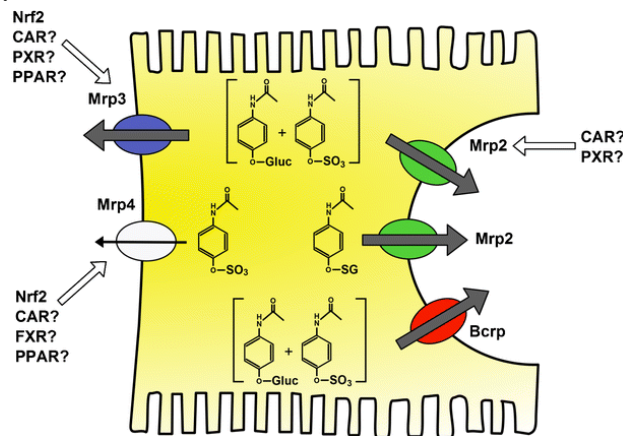


1) Toxické proteinové adukty – příklad - hepatotoxické účinky acetaminofenu

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

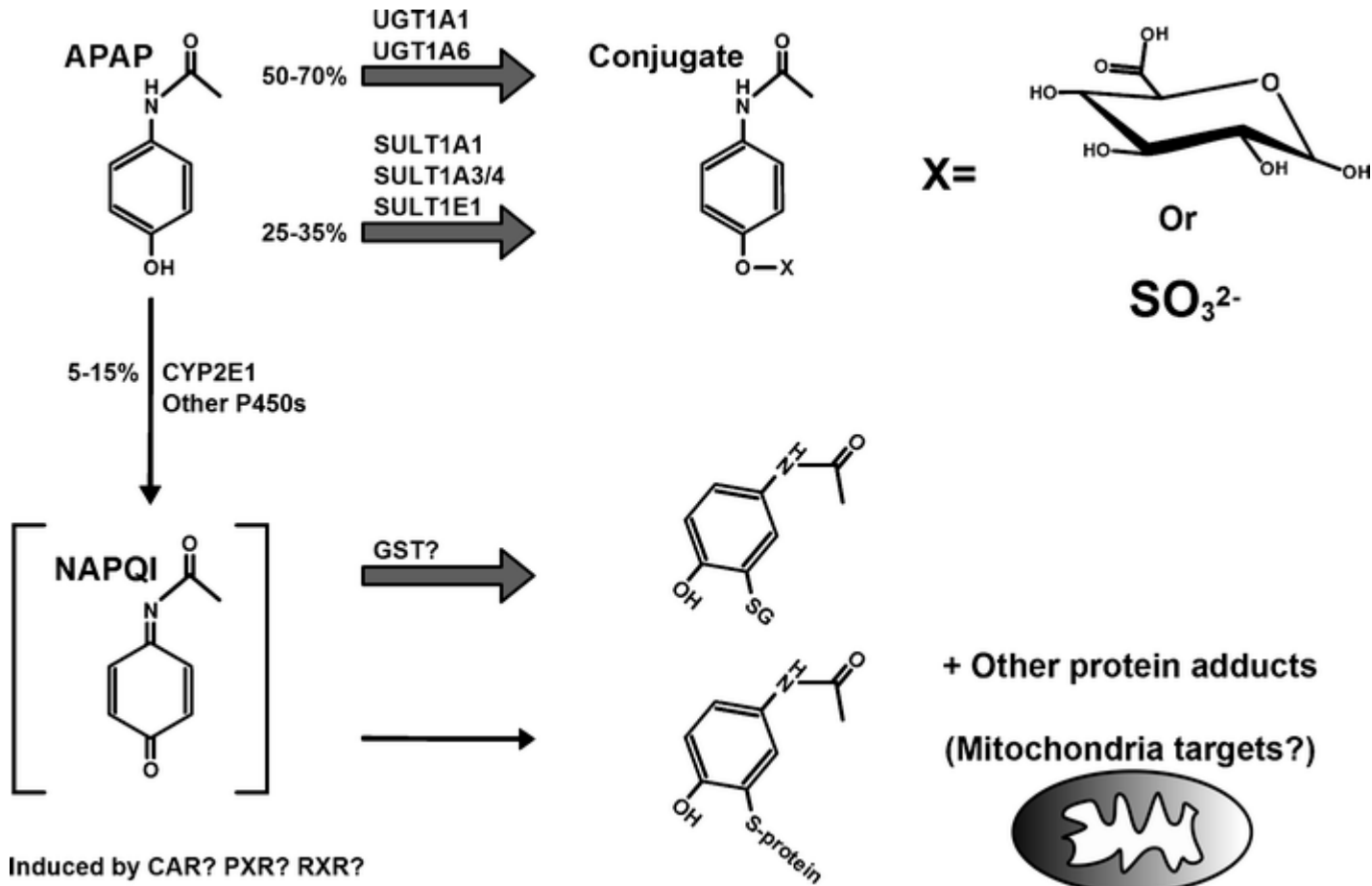


Pharm. Res. 30, 2174, 2013



Molecular Toxicology, 2nd ed., 2006

1) Toxické proteinové adukty – příklad - hepatotoxické účinky acetaminofenu



N-acetyl-*p*-benzoquinonimin

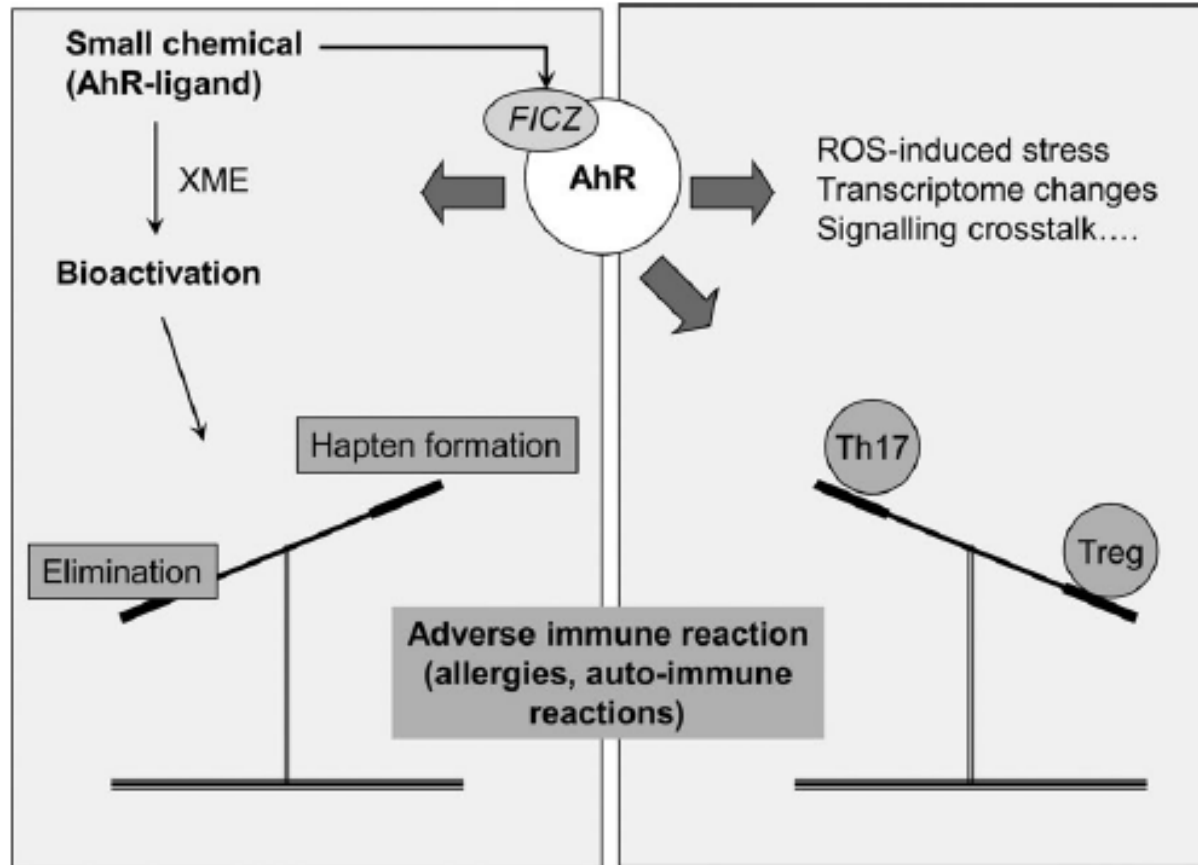


2) Tvorba proteinových aduktů a imunotoxicita

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



2) Tvorba proteinových aduktů a imunotoxicita



3) Proteinové adukty jako biomarkery

Adukty vznikající v důsledku expozice tabákovému kouři

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



3) Proteinové adukty jako biomarkery

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



3) Proteinové adukty jako biomarkery

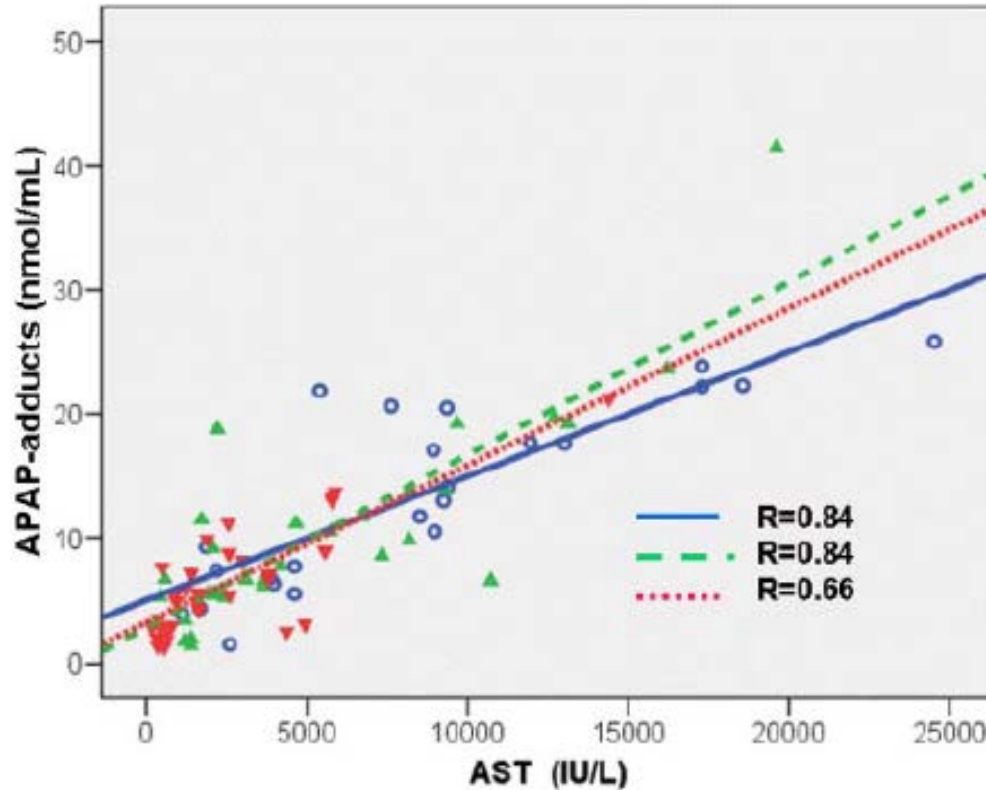
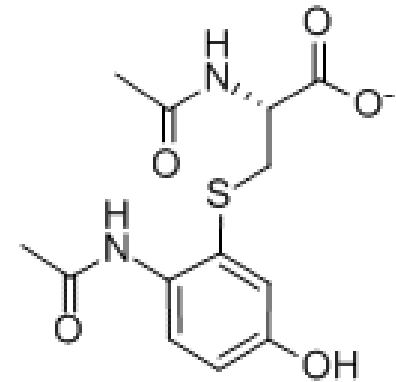


FIG. 3. Correlation of AST (IU/l) with APAP adducts in adults with APAP-related acute liver failure, plotted relative to overdose (—, day 3; - - -, day 4; ···, day 5).



4) Proteinové adukty produktů lipidní peroxidace

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

