

Ryszard Wiaderkiewicz, Zofia Walter

CHEMICZNA ALKILACJA KWASÓW NUKLEINOWYCH

1. WSTĘP

Metylacja fizjologiczna kwasów nukleinowych jest wysoce specyficzną reakcją wpływającą w istotny sposób na wiele podstawowych funkcji komórki. Sugeruje się, że metylacja DNA przebiegająca wskutek działania specyficznych systemów enzymatycznych, wymagających na ogół do swej aktywności S-adenozylometioniny, może odgrywać kluczową rolę w takich procesach, jak replikacja DNA, rekombinacja czy ekspresja genów podczas różnicowania się komórek w trakcie rozwoju osobniczego. W przypadku RNA specyficzna metylacja ma także istotny udział w tworzeniu i stabilizowaniu charakterystycznej III-rzędowej struktury (tRNA), w rozpoznawaniu i wiązaniu specyficznych miejsc w rybosomach (mRNA), a poza tym stanowi prawdopodobnie cały system zapewniający prawidłową transkrypcję i translację informacji genetycznej.

Chemiczna alkilacja kwasów nukleinowych powoduje wprowadzenie do ich struktury nowych pochodnych zasad, co wywołuje szereg efektów negatywnych i zaburza większość podstawowych funkcji komórki.

Istnieje określona liczba związków chemicznych posiadających zdolność alkilacji kwasów nukleinowych. Typowe przykłady omawianych w pracy związków są przedstawione w tab. 1. Związki te albo same są bezpośrednio czynnikami alkilującymi (np. MNU, DMS), albo są w nie przekształcane przez metaboliczną aktywację (np. DMN). Niektóre ze związków przedstawionych w tab. 1 są silnymi kancerogenami, większość z nich wykazuje także działanie mutagenne.

Wszystkie proste czynniki alkilujące atakują te same miejsca w kwasach nukleinowych. Istnieją jednak między nimi istotne różnice co do stopnia reakcji w danym specyficznym miejscu. Te różnice oraz różna mutagenność i kancerogenność poszczególnych zwią-

T a b e l a 1

Chemiczne związki alkylujące omawiane w pracy

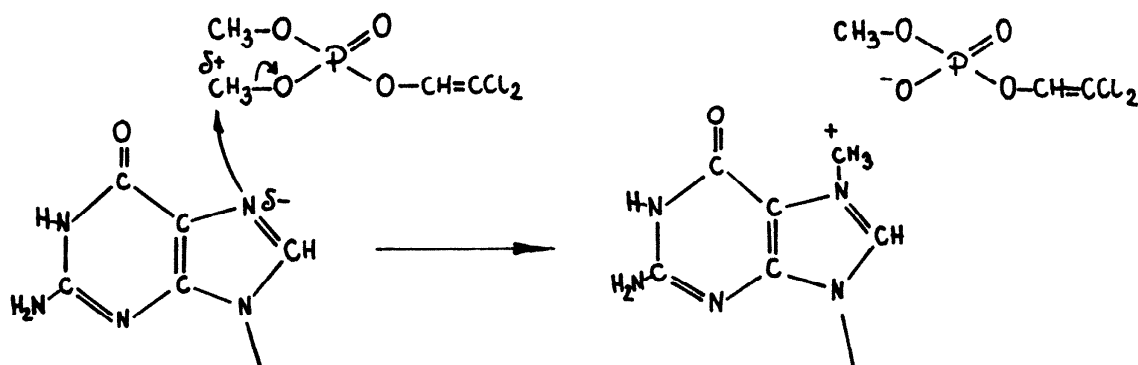
Nazwa	Wzór	Przykłady
Siarczany alkilowe	$\text{R}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{S}}-\text{O}-\text{R}$	DMS (siarczan dwumetylu)
Alkilowe pochodne sulfonianów	$\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{S}}-\text{O}-\text{R}$	MMS (metylometasulfonian)
Alkilo nitrozoaminy	$\text{O}=\text{N}-\text{N} \begin{matrix} / \text{R} \\ \backslash \text{R} \end{matrix}$	DMN (dwumetylonitrozoamina) DEN (dwuetylonitrozoamina)
N-alkilo N-nitrozomocznik	$\text{O}=\text{N}-\text{N} \begin{matrix} / \text{R} \\ \backslash \text{C}-\text{NH}_2 \\ \parallel \\ \text{O} \end{matrix}$	MNU (metylonitrozomocznik) ENU (etylonitrozomocznik)
N-alkilo N'nitro N nitrozo-guanidyna	$\text{O}=\text{N}-\text{N} \begin{matrix} / \text{R} \\ \backslash \text{C}-\text{N} \begin{matrix} / \text{H} \\ \backslash \text{NO}_2 \end{matrix} \\ \parallel \\ \text{NH} \end{matrix}$	MNNG (N metylo N'nitro N nitrozo-guanidyna)
Związki fosforo-organiczne	$\begin{matrix} \text{R}-\text{O} & & \text{O}(\text{S}) \\ & \diagdown & / \\ & \text{P} & \\ & / & \backslash \\ \text{R}-\text{O} & & \text{O}-\text{X} \end{matrix}$	DDVP (X = -CH=CCl ₂) malation (X = $\begin{matrix} -\text{CH}-\text{COOC}_2\text{H}_5 \\ \\ \text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5 \end{matrix}$)
	R = CH ₃ lub C ₂ H ₅	

zków pozwalają na próby określenia, które miejsca ataku są krytyczne dla mutagenyzy i kancerogenyzy. Wiele danych wskazuje, że także ostra toksyczność szeregu związków jest związana z alkilacją ważnych makrocząsteczek komórkowych. W warunkach *in vivo* wskutek działania związków chemicznych, alkilacji w komórce ulegają zarówno DNA, RNA jak i białka przy czym wydaje się, że skutki biologiczne spowodowane alkilacją są skorelowane głównie z po-

ziomem alkilacji DNA. Alkilacja innych makrocząsteczek jest zwykle zbyt mała, by zinaktywować wszystkie rodzaje RNA występujące w wielu kopiach jak również spowodować inhibicję aktywności białek enzymatycznych. Ponadto w komórkach ulegających podziałowi bezpośrednią konsekwencją alkilacji DNA są zaburzenia syntezy DNA spowodowane zaburzeniami matrycowych właściwości DNA.

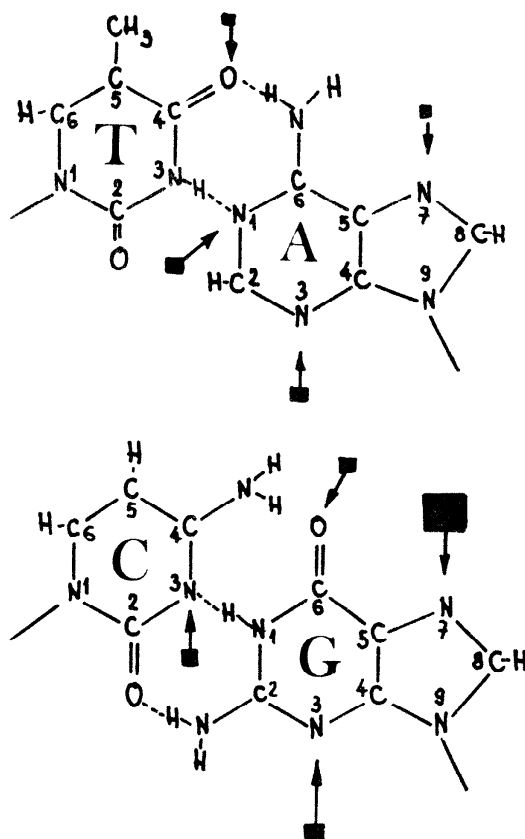
2. MIEJSCA ALKILACJI KWASÓW NUKLEINOWYCH

Alkilacja kwasów nukleinowych *in vitro* jest możliwa przez związki, które w obojętnym pH są bezpośrednimi czynnikami alkilującymi, tzn. nie wymagają do swego działania metabolicznej aktywacji. Do związków tych należą m.in. DMS, MMS, MNU, MNNG i ich odpowiednie etylowe pochodne. Badania alkilacji składników kwasów nukleinowych na poziomie nukleozydów, nukleotydów, jedno- i dwuniciowych syntetycznych polinukleotydów, czy też RNA i DNA wykazały, że w każdym przypadku ulegają alkilacji te same miejsca w strukturze kwasów nukleinowych [78]. Istotne różnice w ilości otrzymanych produktów są spowodowane najprawdopodobniej zmianą struktury II-rzędowej i dostępnością danych miejsc do alkilacji.



Rys. 1. Reakcja nukleofilowego podstawienia azotu N7 guaniny (w DNA lub RNA) podczas reakcji z DDVP *in vitro*

Wszystkie chemiczne związki alkilujące z dużą łatwością reagują z atomami azotu np. trójmetyloaminy [5] czy 4-nitrobenzylpirydyny [26]. Atomy azotu są także głównym akceptorem grup alkilowych podczas reakcji tych związków z kwasami nukleinowymi. Zdecydowanie najłatwiej ulega alkilacji azot N7 guaniny. Odpowiednia reakcja na przykładzie metylacji DDVP przebiega wg schematu (rys. 1).



Rys. 2. Główne miejsca chemicznej alkilacji zasad w DNA

Jednakże zarówno ten, jak i inne atomy w pierścieniu zasad azotowych są jedynie słabo spolaryzowane w związku z czym szybkość reakcji alkilacji jest stosunkowo niewielka. Spośród najłatwiej alkilowanych miejsc obok azotu N7 guaniny należy wymienić atomy azotu N3 guaniny, pozycje N3, N1 i N7 adeniny oraz N3 cytozyny (rys. 2). Ponadto alkilacji mogą ulegać atomy tlenu w pozycji O⁶ guaniny, O⁴ tyminy lub uracylu i O² cytozyny [34-36, 79]. Poszczególne zasady mogą być alkilowane także w innych miejscach cząsteczki, lecz poziom reakcji w tych miejscach jest tak niewielki, że wątpliwe aby mogły one odgrywać jakąś istotną biologiczną rolę. W tabeli 2 przedstawiono wszystkie stwierdzone dotąd produkty chemicznej alkilacji zasad.

Podobne produkty alkilacji stwierdza się w kwasach nukleinowych po podaniu zwierzętom doświadczalnym chemicznych czynników alkilujących [16, 31, 51, 52, 83]. W doświadczeniach *in vivo* nie udaje się jednak oznaczyć szeregu produktów powstających wskutek

T a b e l a 2

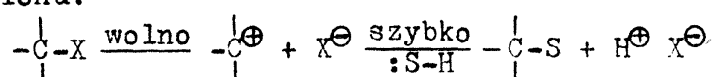
Miejsca chemicznej alkilacji zasad w kwasach nukleinowych

Zasada	Stwierdzone produkty alkilacji							
A	1	3	7	N ⁶	1, N ⁶	N ⁶ , 7	N ⁶ , N ⁶	
U(T)	O ²	O ⁴	3					
C	3	N ⁴	O ²	3, N ⁴	N ⁴ , N ⁴			
G	1	3	O ⁶	7	N ²	1, N ⁷	N ² , N ²	N ² , O ⁶

niemożności stosowania czynników alkilujących o odpowiednio dużej radioaktywności, jak również wskutek usuwania szeregu zalkilowanych zasad przez enzymy reperujące [37, 68]. Oprócz zasad mogą w kwasach nukleinowych ulegać także alkilacji grupy fosforanowe powodujące powstanie fosfotrójestrów [4, 73, 74, 76]. W RNA alkirowana jest ponadto grupa O2' rybozy [80]. Rodzaj otrzymanych alkilowych pochodnych różni się istotnie zależnie od rodzaju czynnika alkilującego. Na przykład podczas reakcji DNA z MNU 60% produktów metylacji stanowi 7 metG, 8% 3 metA, 6% O⁶ metG, 3% 3 metC, 2% 1 metA, 2% 7 metA i ok. 15% stanowią fosfotrójestry. Pozostałe produkty alkilacji stanowią łącznie mniej niż 1% wszystkich alkilowanych miejsc [78]. Jeżeli alkilacji przez MNU poddany jest RNA odpowiednie ilości 3 metA i O⁶ metG są nieco mniejsze, natomiast ilość 1 metA jest większa.

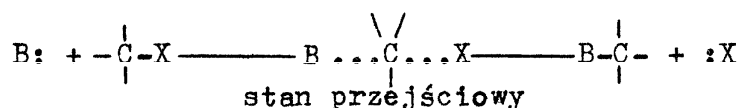
W przypadku, gdy czynnikiem alkilującym jest np. DMS czy MMS obserwuje się natomiast znaczne zmniejszenie poziomu alkilacji atomów tlenu w cząsteczce kwasów nukleinowych (O⁶ metG, fosfotrójestry) [80]. Jest to spowodowane prawdopodobnie odmiennym mechanizmem reakcji tych związków z kwasami nukleinowymi.

Wszystkie chemiczne związki alkilujące reagują wg jednego z dwóch podstawowych mechanizmów reakcji określanych jako nukleofilowe podstawienie jednocząsteczkowe S_N1 lub dwucząsteczkowe S_N2 [45, 72]. W pierwszym przypadku przyjmuje się, że reakcja zachodzi w dwóch etapach, z których pierwszy polega na powolnej i odwracalnej reakcji dysocjacji, a drugi na szybkim przyłączeniu cząsteczki nukleofilowej do powstałego w wyniku dysocjacji karbokationu:



Szybkość reakcji jest determinowana szybkością jej najwolniejszego etapu - dysocjacją, a więc jest zależna jedynie od stężenia cząsteczek elektrofilowych.

W przypadku mechanizmu S_N2 w pierwszym etapie następuje atak cząsteczki nukleofilowej na centrum z grupą odszczepialną, a następnie ostateczne zerwanie wiązania i odejście grupy odszczepialnej:



Prędkość reakcji w tym przypadku jest zależna od stężenia obu substratów (cząsteczek nukleofilowych i elektrofilowych) i dlatego proces tego typu nazywany jest reakcją dwucząsteczkowego podstawienia nukleofilowego.

Ponadto Swain i Scott [86] badając ilościowe zależności szybkości reakcji dla różnych związków alkilujących i różnych nukleofili oznaczyli dwa istotne parametry charakteryzujące wszystkie związki alkilujące. Wyprowadzone przez nich równanie w najwięszym skrócie ma postać:

$$\log (k/k_0) = sn$$

gdzie: k_0 - stała szybkości reakcji z wodą.

k - stała szybkości reakcji z danym nukleofilem,

s - (stała substratowa) charakterystyczna dla danego substratu i oznaczona dla bromku metylu w wodzie jako równa 1,0,

n - (stała nukleofilowa) charakterystyczna dla danej cząsteczki nukleofilowej i dla wody równa 0,00.

Generalnie związki alkilujące charakteryzujące się stosunkowo wysokim faktorem s Swain-Scotta i działające wg mechanizmu S_N2 podczas reakcji z kwasami nukleinowymi reagują przede wszystkim w głównym nukleofilowym centrum na azocie N7 guaniny i są mało aktywne w kierunku ataku na słabo nukleofilowe atomy tlenu. W ten sposób reagują np. MMS czy DMS. W przeciwieństwie związki alkilujące reagujące głównie wg mechanizmu S_N1 i posiadające niski współczynnik s Swain-Scotta są zdolne reagować także ze znacznie słabszymi miejscami nukleofilowymi w tym głównie z atomami tlenu. Należą tutaj przede wszystkim związki działające poprzez silny metyldwuazoniowy jon $CH_3N_2^+$,

a więc, takie jak MNU, DMN czy MNNG. Dlatego też stosunek O^6 metG/7 metG w DNA metylowanym przez MMS wynosi ok. 0,004, podczas gdy w DNA alkilowanym przez MNU ten sam stosunek wynosi 0,12 [30, 31, 57]. Podobnie MNU, MNNG i DMN dają stosunkowo wysoki poziom metylofosfotrójestrów i O^4 metT w porównaniu z DMS czy MMS [31, 81]. Różnice te są jeszcze większe w przypadku, gdy grupą alkilującą jest reszta etylowa. EMS jest pośrednim czynnikiem S_N1/S_N2 i produkuje podczas reakcji z DNA zauważalne ilości O^6 metG dając stosunek O^6 metG/7 metG równy 0,03. Jednakże ENU i DEN działają poprzez jon $CH_3CH_2N_2^+$, który posiada bardzo niski współczynnik $s = 0,26$, co powoduje, że stosunek O^6 metG/7 metG wynosi w ich przypadku co najmniej 0,55, a fosfotrójestry stanowią do 70% wszystkich produktów alkilacji [19, 20]. Ogólny poziom alkilacji przez czynniki etylujące jest z kolei jednak znacznie mniejszy niż przez związki z reaktywną grupą metylową co powoduje, że oznaczenie produktów alkilacji innych niż pochodne guaniny i 3-eta jest jednak bardzo trudne. Obliczenia opierające się na porównaniu współczynników S w a i n a-S c o t t a dla różnych związków alkilujących zgadzają się dobrze z danymi eksperymentalnymi odnośnie do alkilacji w pozycji N7 guaniny i na zewnętrznych atomach tlenu, jednakże reaktywność innych miejsc alkilacji w cząsteczkach zasad nie zawsze daje się wytłumaczyć w ten sposób. Podczas reakcji DNA z MMS czy DMS powstaje np. stosunkowo więcej 1 metA, 3 metA, 3 metG i odpowiednio mniej 7 metA i 3 metG niż w przypadku reakcji z MNU lub MNNG [30, 34]. Jak wspomniano wcześniej, kwasy nukleinowe in vivo, mimo iż w warunkach fizjologicznych w komórce są skompleksowane z białkami, dają na ogół produkty reakcji w stosunku analogicznym do otrzymanego in vitro. Ciekawym wyjątkiem jest w tym względzie wirus TMV, którego natywna forma w wyniku reakcji z MNNG daje wśród produktów reakcji 35% 3 metC i 48% 7 metG, podczas gdy RNA wyizolowany z TMV i poddany alkilacji in vitro daje odpowiednio 7% i 76% odpowiednich metylowanych pochodnych [78]. Fakt ten trudno wytłumaczyć zwłaszcza, że inne wirusy zawierające RNA, jak bakteriofagi $\mu 2$ i R17 podczas alkilacji różnymi czynnikami (w tym MNNG) dają produkty reakcji spodziewane i zgodne z produktami ich metylacji w warunkach in vitro [75].

3. RÓŻNICE W STOPNIU ALKILACJI KWASÓW NUKLEINOWYCH IN VIVO

Rozmieszczenie alkilowych pochodnych zasad po reakcji kwasów nukleinowych *in vivo* z różnymi chemicznymi związkami alkilującymi można rozpatrywać na trzech poziomach: tkankowym, komórkowym i molekularnym. W pierwszym przypadku należy przypuszczać, że czynniki alkilujące działające bezpośrednio, takie jak DMS, MMS, EMS, MNU czy ENU, które nie wymagają do swego działania metabolicznej aktywacji alkilują kwasy nukleinowe we wszystkich tkankach, do których związki te są zdolne penetrować. Badania autoradiograficzne wskazują, że praktycznie są one w stanie dotrzeć do wszystkich organów zwierząt [27, 28]. Szczególnie MNU i ENU, które wskutek alkalicznie katalizowanego przekształcenia, przebiegającego dość szybko nawet w pH obojętnym, powodują powstanie jonów CH_3N_2^+ i $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}_2^+$ są zdolne alkilować poszczególne składniki komórkowe w wielu tkankach. W przypadku MNNG hydrolyza cząsteczki i powstanie jonu CH_3N_2^+ jest znacznie wolniejsze w pH obojętnym, jednakże jest ono silnie stymulowane przez związki zawierające grupy sulfhydrylowe np. przez cysteinę [30, 32]. Brak metylacji DNA szpiku kostnego i grasicy w porównaniu z wysokim poziomem metylacji DNA w komórkach wątroby, żołądka i jelit po działaniu MNNG może być odzwierciedleniem rozmieszczenia odpowiednich katalizatorów w poszczególnych tkankach [15, 31]. W przypadku związków typu nitrozoamin wymagających do przejścia w reaktywną formę metabolicznej aktywacji, możliwość alkilacji kwasów nukleinowych w poszczególnych tkankach jest związana z występowaniem w nich specyficznych układów enzymatycznych. Alkilujące formy tych związków są z kolei tak reaktywne, że nie są w stanie osiągnąć innych organów w znacznych ilościach. U szczurów metabolizm DMN ograniczony jest do wątroby, nerek i płuc i jedynie w tych organach stwierdza się znaczną alkilację kwasów nukleinowych [1, 38, 43, 44].

Istnieje wiele, często rozbieżnych, danych odnośnie do różnic w poziomie alkilacji różnych rodzajów kwasów nukleinowych w komórce, w zależności od stosowanego czynnika alkilującego. Po traktowaniu szczurów DMN czy MNU DNA komórek wątroby jest znacznie silniej alkilowany niż RNA; podczas alkilacji przez MMS sytuacja jest odwrotna [87]. tRNA ulega alkilacji wyraźnie efektywniej niż mikrosomalny RNA [88], zaś poziom alkilacji mRNA jest

znacznie wyższy niż rRNA, gdy czynnikiem alkilującym jest DMN [56]. Nie stwierdzono natomiast różnic w poziomie alkilacji wymienionych kwasów nukleinowych, gdy jako czynnik alkilujący stosowano MMS. Podobnie wykazano, że DMN alkiluje jądrowy RNA w mniejszym stopniu niż rRNA, podczas gdy w przypadku MMS jądrowy RNA jest alkilowany znacznie intensywniej [56]. Powyższe dane sugerują, że istotną rolę podczas alkilacji kwasów nukleinowych przez różne związki może odgrywać środowisko komórkowe, w którym występują oraz, że jon CH_3^+ generowany przez DMN reaguje bardziej efektywnie poza jądrem, podczas gdy MMS jest zdolny alkilować równie skutecznie jądrowe kwasy nukleinowe. Należy jednak zaznaczyć, że obserwowane różnice są stosunkowo niewielkie. Znacznie wyraźniejsze różnice wykazano przy porównaniu stopnia alkilacji mitochondrialnego i jądrowego DNA przez MNU, DMN i MMS. Mitochondrialny DNA jest alkilowany 2-4,5 razy bardziej intensywnie niż jądrowy DNA przez DMN i 3-7 razy intensywniej, gdy działającym czynnikiem jest MNU [57]. W przypadku MMS oba rodzaje DNA są alkilowane w tym samym stopniu. Wytłumaczenie tych różnic nie jest proste choć wydaje się, że DNA znajdujący się w mitochondrialnej matrix, nie zasocjowany z histonami jest łatwiej dostępny dla rozpuszczalnych w lipidach związków nitrozowych i ich alkilujących form pośrednich.

Na poziomie molekularnym sprawą najistotniejszą wydaje się zagadnienie, czy alkilacja kwasów nukleinowych jest przypadkowa i zalkilowane zasady są rozmieszczone równomiernie w sekwencji nukleotydów, czy też istnieje w tym względzie jakaś preferencja odnośnie do określonych odcinków genomu. Reakcja MNU i ENU *in vitro* z tRNA o znanej sekwencji (tRNA metioninowy z *E. coli* i tRNA fenyloalaninowy z drożdży) w warunkach zapewniających zachowanie ich charakterystycznej II-rzędowej struktury wykazała, że alkilowane są równomiernie wszystkie reszty guaniny obecne w cząsteczce tRNA [55]. Wyniki te świadczą, że III-rzędowa struktura kwasów nukleinowych nie gwarantuje specyficznej reakcji z małym, wysoce reaktywnym jonem metyldwuzazoniowym. W przeciwieństwie szereg innych związków chemicznych charakteryzujących się dużą cząsteczką, jak np. N-acetoksyacetylaminofluoren czy 7-bromoetylo(a)benzantracen, podczas reakcji z tRNA oddziałuje głównie z resztami guaniny eksponowanymi w antykodonie lub ramieniu dwuhydrourydynowym [17].

Wyniki wielu badań wskazują, że skompleksowanie DNA z białka-

mi w zwartej strukturze chromatyny wpływa istotnie nie tylko na poziom alkilacji, lecz także powoduje nierównomierne rozmieszczenie produktów alkilacji w pewnych regionach chromatynowego DNA. Degradując selektywnie chromatynę za pomocą DNazy I wykazano, że metylacja DNA przez DMN zachodzi znacznie efektywniej w regionach chromatyny wrażliwych na DNazę. Ponadto szybkość usuwania zmetylowanych produktów z regionów chromatyny, chronionych przed działaniem enzymu, była dużo wolniejsza niż z odcinków wrażliwych na degradację [68, 69]. Stwierdzono także, że odcinki chromatynowego DNA wykazujące zwiększone powinowactwo do polilizyny, a także sperminy i distamycyny są alkiłowane w znacznie mniejszym stopniu [9, 64]. Fakt, że silne związanie białek z DNA chroni go w znacznym stopniu przed alkilacją potwierdzono badając metylację DNA przez DMS w obecności różnych ligandów wiążących się z dużym lub małym rowkiem α helisy [29]. Na przykład, gdy represor lac jest związany z laktozowym operonem DNA chroni skutecznie cztery reszty guaniny w dużym rowku (przed alkilacją w pozycji N7) i trzy reszty adeniny w małym rowku (przed alkilacją w pozycji N3), natomiast gdy jest on związany bardziej swobodnie z nie-operatorowym regionem DNA chroni jedynie przed alkilacją mały rowek α helisy.

Istnieją także doniesienia, że niektóre związki alkiłujące reagują preferencyjnie w punkcie wzrostu łańcucha DNA [50, 73]. Także badania syntezy naprawczej indukowanej przez szereg związków alkiłujących w komórkach Xeroderma pigmentosum wskazują na nierównomierne rozmieszczenie alkiłowanych zasad w chromatynowym DNA [3, 6, 20, 22, 65].

4. KONSEKWENCJE ALKILACJI KWASÓW NUKLEINOWYCH

4. 1. MUTAGENEZA I KANCEROGENEZA

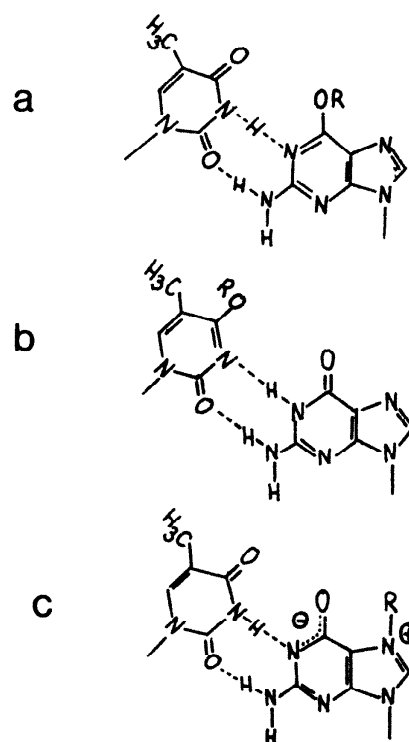
Większość spośród znanych związków alkiłujących ma działanie mutagenne, a niektóre z nich znane są jako silne kancerogeny. Chemiczne podstawy tych biologicznych efektów nie są jak dotąd ściśle ustalone, chociaż jest na ten temat wiele prac eksperymentalnych i przeglądowych. Wydaje się, że decydującą rolę odgrywa tutaj chemiczna modyfikacja komórkowego DNA i RNA. Ogólny poziom alkilacji kwasów nukleinowych w komórce nie okazał się jednak najistotniejszym czynnikiem w tym względzie. Także wbrew

wcześniejszym sugestiom, że 7 metG (w formie zjonizowanej) może być błędnie parowana z tyminą (rys. 3c) wykazano ostatecznie, że reakcja w pozycji N7 guaniny nie jest mutagenna. Stosując poli(U, 7 metG) jako matrycę dla polimerazy RNA zależnej od DNA wykazano, że alkilacja guanozyny w pozycji N7 nie jest mutagenna na poziomie transkrypcji [40]. Ten sam polimer użyty jako mRNA również nie powodował powstawania błędów w systemie włączającym aminokwasy. Ponadto 7 metdGTP może zastępować dGTP dla DNA polimerazy przy użyciu grasicowego DNA jako matrycy [23]. Na koniec w TMV-RNA poziom alkilacji w pozycji N7 guaniny jest odwrotnie proporcjonalny do częstości mutacji [84]. Powyższe dane zwróciły uwagę na fakt, że istotną rolę w mutagenezie może odgrywać alkilacja zasad w miejscach innych niż N7 guaniny mimo, iż poziom alkilacji w tych miejscach jest na ogół znacznie niższy. Spośród produktów alkilacji powstałych wskutek nukleofilowego podstawienia atomu azotu wykazano, że alkilacja cytozyny w pozycji N3 może mieć konsekwencje mutagenne. W przypadku TMV-RNA po działaniu MNNG mutagenność jest skorelowana z ilością powstałej 3 metC [84]. Badania aktywności matrycowej kopolimerów 3 metC i C potwierdziły, że zdarza się błędne parowanie zasad (zamiast GTP włączany był UTP, a także ATP i CTP [41]). Podobne wyniki otrzymano z zastosowaniem poli(C, 3 metC), poli(C, 3 etC) oraz poli(dC, 3 metdC) (włączane były błędnie ATP i UTP) [42]. Alkilacja cytozyny w pozycji N3 nie wyjaśnia jednak w sposób zadowalający istotnych różnic pomiędzy związkami produkującymi 3 metC w porównywalnym stopniu, a krańcowo niejednokrotnie odmiennymi jeśli chodzi o ich zdolność do indukowania mutacji czy zmian neoplastycznych (np. MMS i MNNU). Lovelless [39] porównując zdolność czterech różnych czynników alkilujących (MMS, EMS, MNNU, ENU) do inaktywacji i mutacji bakteriofaga T2 wykazał, że z wyjątkiem MMS wszystkie pozostałe powodowały powstawanie mutacji. Badając następnie produkty wyżej wspomnianych związków z dezoksyguanozyną stwierdził, że oprócz MMS są one zdolne reagować w pozycji O⁶ guaniny. W efekcie postawił hipotezę, że właśnie obecność O⁶ alkG w alkilowanym DNA decyduje o możliwości zaistnienia mutacji. Badania matrycowych właściwości poli(O⁶ metG, G) potwierdziły, że O⁶ metG podobnie jak 3 metC jest błędnie parowana, gdy używa się jej jako matrycy dla RNA polimerazy (włączane są dodatkowo UTP i ATP) [8, 18]. Ponadto badania rewersji faga 4rII AP72 po działaniu EMS wykazały, że alkilacja guaniny w pozycji O⁶ powoduje mutacje

w badanym miejscu z częstością 0,35 mutacji na jedną cząsteczkę O^6 etG co wskazuje, że także *in vivo* prawdopodobieństwo błędnego parowania O^6 etG jest stosunkowo duże [33]. Zgodnie ze schematem parowania zasad Watsona-Cricka O^6 alkilo guanina może parować z tyminą (rys. 3a), co z kolei prowadzi do mutacji poprzez tranzycje typu GC \rightarrow AT [8]. Związki alkilujące mogą także indukować tranzycje typu AT \rightarrow GC [50] wskutek błędnego parowania zasad pomiędzy O^4 alkilo tyminą i guaniną (rys. 3b). Ilość O^4 alkT wśród produktów reakcji alkilacji jest jednak na ogół niewielka np. stosunek O^4 metT/ O^6 metG wynosi ok. 0,05 w przypadku, gdy czynnikiem alkilującym jest MNU i 0,3 w przypadku ENU [82]. Obecnie zakłada się, że mutagenność i kancerogenność związków alkilujących jest skorelowana z rodzajem mechanizmu, w jaki poszczególne związki reagują z DNA. Związki reagujące wg mechanizmu S_N1 są na ogół silniejszymi mutagenami i kancerogenami. Ich cechą charakterystyczną jest zdolność do reagowania z atomami tlenu poszczególnych składników kwasów nukleinowych. Zostało to potwierdzone także *in vivo* podczas alkilacji DNA u różnych gatunków ssaków (myszy, szczury, chomiki) [11, 19, 20, 56]. Fakt, że EMS indukuje zmiany nowotworowe w nerce szczura można wyjaśnić tym, że jako pośredni związek S_N1/S_N2 produkuje podczas reakcji z DNA zauważalne ilości O^6 etG. W podobny sposób można tłumaczyć powstawanie guzów w układzie nerwowym szczurów po podawaniu EMS [47].

Mimo że ogólny poziom alkilacji w pozycji O^6 guaniny dobrze tłumaczy różnice między zdolnością do wywoływania mutacji przez poszczególne związki, to jednak nie wyjaśnia w sposób zadowalający tkankowej specyficzności w kierunku indukowania zmian neoplastycznych przez niektóre ze związków alkilujących. Wydaje się, że istotną rolę odgrywa tutaj trwałość alkilowych pochodnych zasad, a szczególnie O^6 alkG, w odpowiednich tkankach. Szereg związków (ENU, MNU, MNNG) indukuje zmiany nowotworowe w centralnym i obwodowym układzie nerwowym szczurów, który okazał się szczególnie czuły na kancerogenezę indukowaną związkami alkilującymi. Badanie szybkości usuwania alkilowanych produktów z poszczególnych tkanek wykazało, że o ile 7 alkG i 3 alkA są usuwane z równą szybkością ze wszystkich badanych tkanek, to O^6 alkG jest usuwana z mózgu szczurów znacznie wolniej niż np. z wątroby czy nerek [19, 65]. Wyjątkową trwałość O^6 alkG (w porównaniu do O^2 alkT, O^4 alkT, O^2 alkC, 3 alkA i 7 alkG) stwierdzono także w alkilowanych komór-

kach Xeroderma pigmentosum [3, 6, 20]. Komórki te nie posiadają efektywnych systemów naprawy uszkodzeń DNA wywołanych przez UV lub związki chemiczne i charakteryzują się wysoką wrażliwością na zmiany nowotworowe. Z drugiej jednak strony istnieją dane, że np. chroniczne podawanie szczurom DMN powoduje akumulację O^6 metG w DNA płuc i nerek, gdzie nie stwierdza się zmian neoplastycznych, natomiast nie obserwuje się zwiększonych ilości O^6 metG w wątrobie reagującej na podanie DMN powstawaniem nowotworów [48, 60]. Z tych częściowo sprzecznych ze sobą danych wynika, że zarówno ilość O^6 alkilo guaniny, jak i szybkość jej usuwania z poszczególnych tkanek nie są jedynym i podstawowym czynnikiem decydującym o cancerogennych właściwościach danego związku. Fizjologiczny stan tkanki decydujący o jej wrażliwości na podziały komórkowe jest określany zapewne nie tylko przez prawdopodobną ilość błędów powstałych wskutek błędnego parowania zasad (mutacji), lecz także przez inne uszkodzenia DNA powodujące zaburzenia lub wręcz blokowanie procesu replikacji. Związki reagujące wg mechanizmu S_N2 nie produkują istotnych ilości tlenowych pochodnych zasad ani większej ilości fosfotrójestrów. Produkty ich reakcji mogą jednak powodować istotne efekty cytotoksyczne. W części jest to zapewne spowodowane letalną depurynacją 3 i 7 alkilo puryn. Badania prowadzone na fagowym RNA wykazały, że obok alkilacji zasad także pęknięcia powodowane hydrolizą fosfotrójestrów mają konsekwencje letalne [77]. Hydroliza fosfotrójestrów może zachodzić dwiema drogami: albo następuje pęknięcie łańcucha, albo po prostu utrata grupy alkilowej przy czym łańcuch pozostaje nietknięty. Niektórzy autorzy sugerują, że jest możliwe także przenoszenie grupy alkilowej z fosfotrójestrów



Rys. 3. Możliwości błędnego parowania alkilowych pochodnych zasad
 a) tymina : O^6 alkilo guanina, b) guanina : O^4 alkilo tymina, c) tymina : 7 alkilo guanina

na niepodstawione zasady [53]. Badając udział układów fosfotróje-
strowych w uszkodzeniu molekuly kwasu nukleinowego wykazano, że
choć podczas metylacji faga R17 stanowią one zaledwie 3% wszy-
stkich produktów alkilacji, to ich udział w inaktywacji cząstecz-
ki faga wynosi 18% [77]. Ponadto alkilofosfotrójesty mogą istot-
nie wpływać na strukturę chromatyny poprzez neutralizację ujem-
nych ładunków wiązań fosfodwuestrowych, co prowadzi w konsekwen-
cji do labilizacji wiązań z białkami [75, 76].

Istnieją także dane, że obecność w łańcuchu 3 alkA i 3 alkG
może prowadzić do mutacji [65]. U bakterii mutageneza może być
ponadto skutkiem błędów wprowadzonych do DNA w wyniku procesów
naprawczych [7, 37, 70, 74]. U ssaków błędy mogą zostać także
wprowadzone w wyniku naprawy postreplikacyjnej. Taki mechanizm
mutagenezy nie zależy w istocie od natury stosowanego czynnika,
a jedynie od ilości uszkodzeń wprowadzonych do DNA. Wydaje się,
że mutacje powstałe wskutek błędnego parowania zasad odgrywają
główną rolę podczas alkilacji DNA stosunkowo niewielkimi dawkami.
W miarę wzrostu dawki istotną rolę zaczynają odgrywać także inne
mechanizmy, włączając w to błędną naprawę uszkodzeń i być może
także delecje materiału genetycznego.

4. 2. ZABURZENIA PODSTAWOWYCH FUNKCJI KOMÓRKI SPOWODOWANE ALKILACJĄ

Synteza DNA

Związki alkilujące powodują inhibicję syntezy DNA zarówno
w tkankach zwierząt *in vivo*, w kulturach komórek ssaków jak rów-
nież podczas badań z użyciem izolowanych organeli komórkowych
czy DNA *in vitro* [13, 49, 54, 61, 62]. Zaburzenia procesu syntezy
DNA obserwuje się przy tym zarówno po działaniu silnych związków
alkilujących jak MNU czy DMN, jak również np. po inkubacji hodow-
li limfocytów ludzkich ze związkami fosforoorganicznymi (np. ma-
lationem) [12, 90]. U zwierząt po podaniu kancerogennych związków
alkilujących obserwuje się początkowo znaczną inhibicję syntezy
DNA utrzymującą się do kilku dni, a następnie wzrost stopnia syn-
tezy związany ponadto często ze wzrostem mitotycznej aktywności
komórek, zwłaszcza w tkankach szczególnie podatnych na transfor-
mację nowotworową [21]. Mechanizmy powodujące inhibicję syntezy
DNA po działaniu związków alkilujących w dalszym ciągu są dalekie
od wyjaśnienia. Najczęściej sugeruje się, że podstawowym uszko-

dzeniem decydującym o zahamowaniu syntezy jest obecność w DNA alkiłowanych pochodnych zasad. Może to być przyczyną zakłóceń w przesuwaniu się widełek replikacyjnych [13, 73], bądź powodować zaburzenia syntezy na poziomie inicjacji replikacji [13, 54]. Wzmoczona synteza DNA w komórkach wątroby szczurów po częściowej hepatektomii jest blokowana po podaniu DMN czy DEN. Ponieważ w powyższych warunkach także MMS powoduje inhibicję syntezy DNA istnieje sugestia, że blokowanie replikacji może być spowodowane obecnością 7 metG [11, 69]. Byłoby to związane z powstawaniem apurynowych miejsc wskutek spontanicznej czy katalizowanej enzymatycznie depurynacji i możliwością powstawania pojedynczych pęknięć w DNA. Obecność jednoniciowych pęknięć po działaniu związków alkiłujących obserwowano w DNA jądrowym i mitochondrialnym komórek wątroby szczura [10, 14]. Uszkodzenia te mogą być usuwane z DNA w wyniku naprawy przez wycinanie. Wyliczono jednak, że średnia ilość nukleotydów wprowadzonych do DNA komórek ludzkich (w wyniku syntezy naprawczej) na jedną grupę metylową wprowadzoną wskutek alkiłacji przez MMS wynosi 0.1, co wskazuje, że wiele uszkodzeń pozostaje niezreperowanych. W niektórych komórkach DNA może być syntetyzowany na matrycy zawierającej uszkodzenia wprowadzone wskutek alkiłacji. DNA w komórkach wątroby szczura jest kopiowany nawet jeśli zawiera jednoniciowe pęknięcia [2] lub alkiłowane zasady czy fosfotrójestry [63]. Warunkiem jednakże udziału takiego DNA w dalszej syntezie jest zaistnienie naprawy postreplikacyjnej [69]. W tym przypadku spadek szybkości syntezy DNA może być zależny od czasu niezbędnego do wypełnienia przerw powstałych w nowo syntetyzowanym łańcuchu DNA naprzeciw uszkodzeń występujących w nici macierzystej.

Wykazano, że naprawa uszkodzeń w obrębie widełek replikacyjnych powstałych po działaniu promieniowania UV u bakterii i w komórkach ssaków [89] oraz czynników alkiłujących w komórkach chomika chińskiego [68] jest naprawą skłoną do błędów "error prone" i jako taka może mieć konsekwencje mutagenne. W badaniach na kulturach komórek ssaków stwierdzono, że elongacja nowo syntetyzowanego łańcucha jest zatrzymywana wskutek alkiłacji macierzystej nici DNA i dopiero synteza naprawcza w rejonie punktu wzrostu łańcucha pozwala na dalszą replikację [74]. Badanie kinetyki tych procesów wykazało ponadto, że spontaniczna depurynacja nie może być główną przyczyną zaistniałych uszkodzeń i jednoniciowych pęknięć.

Na jakość kopiowania alkilowanego DNA, oprócz uszkodzeń występujących w samym łańcuchu, może mieć też wpływ modyfikujące działanie czynników alkilujących bezpośrednio na DNA polimerazę, podobnie jak to wykazano w przypadku polimerazy RNA [57].

Synteza RNA

Działanie na komórkę związkami alkilującymi prowadzi w większości przypadków do istotnego zmniejszenia tempa syntezy RNA. Stosowanie alkilowanych polirybonukleotydów jako matrycy dla RNA polimerazy prowadzi zarówno do błędnego włączania nukleotydów, jak i do ogólnego obniżenia poziomu syntezy RNA [18, 23]. Wykazano jednakże, że o ile chromatyna z wątroby szczurów traktowanych DMN była równie efektywną matrycą dla syntezy RNA przez egzogenną polimerazę RNA jak chromatyna z grupy kontrolnej, to polimerazy RNA izolowane z tkanek zwierząt traktowanych DMN były znacznie mniej aktywne [24]. Wydaje się więc, że inhibicja syntezy RNA w wątrobie szczurów po podaniu DMN jest w znacznym stopniu spowodowana bezpośrednim wpływem na aktywność RNA polimerazy. Obniżenie aktywności RNA polimerazy obserwowano także w systemie izolowanych jąder komórkowych po podaniu MMS, co potwierdzałoby hipotezę, że inaktywacja RNA polimerazy jest spowodowana jej alkilacją. Nie zostało to jednak jak dotąd jednoznacznie udowodnione.

Synteza białka

Podawanie zwierzętom doświadczalnym związków alkilujących, jak DMN czy MNU powoduje w komórkach wątroby inhibicję syntezy białka i rozpad polirybosomów [57]. Mechanizm tych reakcji jest jak dotąd ciągle niejasny. Inhibicja syntezy białka nie wydaje się być bezpośrednio skorelowana z syntezą RNA ponieważ inhibicja syntezy RNA jest procesem znacznie wolniejszym niż w przypadku syntezy białka, a ponadto czynniki specyficznie blokujące syntezę RNA nie powodują tak znacznego spadku szybkości syntezy białka jak w przypadku związków alkilujących. Przyczyną może być tutaj zarówno alkilacja mRNA, jak i rRNA. W przypadku mRNA obecność alkilowanych nukleotydów może prowadzić do przedwczesnej terminacji w momencie osiągnięcia alkilowanego miejsca przez rybosom. Ilościowe pomiary stopnia alkilacji mRNA wykazały, że dawka DMN powodująca 50% inhibicję syntezy białka alkiluje zaledwie nieco powyżej 1% wszystkich reszt guaniny w mRNA [56]. W porównaniu

w bakteryjnym systemie syntetyzującym białka alkilacja 20% reszt guaniny w polimerze poli(UG) powoduje jedynie 40% spadek szybkości syntezy [59]. W przypadku organizmów eukariotycznych alkilacja guaniny w pozycji N7 w mRNA może mieć dodatkowe negatywne konsekwencje wskutek interferencji ze zdolnością rozpoznawania przez faktory inicjacji syntezy białka lub rybosom 5' terminalnej sekwencji zawierającej 7 metG w mRNA (sekwencja „cap”). Ponadto dodatkowa obecność reszt 7 metG w mRNA może prowadzić do przyłączenia mRNA w miejscu zbyt odległym od sekwencji inicjującej, aby zapoczątkować translację. Wykazano bezspornie, że 7 metylo-guanozyno 5' monofosforan (a także szereg analogów łącznie z trójfosforanem i krótkimi oligonukleotydami zawierającymi w końcu 5' 7 metylo-guanozynę) jest silnym kompetycyjnym inhibitorem syntezy białka u eukariontów [25, 71, 79].

Maszynopis wpłynął do Redakcji 14 VII 1982

LITERATURA

- [1] Abanobi S. E., Columbano A., Mulivor R. A., Rajalakshmi S., Sarma D. S. R., *Biochem.*, 19, 1382 (1980).
- [2] Abanobi S. E., Mulivor R. A., Rajalakshmi S., Sarma D. S. R., *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 17, 103 (1976).
- [3] Altamirano-Dimas M., Sklar R., Strauss B., *Mut. Res.*, 60, 197 (1979).
- [4] Banon P., Verly W., *Eur. J. Biochem.*, 31, 103 (1972).
- [5] Bedford C. T., Robinson J., *Xenobiotica*, 2, 307 (1972).
- [6] Bodeell W. J., Singer B., Thomas G. H., Cleaver J. E., *Nucl. Acid. Res.*, 6, 2819 (1979).
- [7] Carins J., Robins P., Sedgwick B., Talmud P., *Progr. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.*, 26, 237 (1981).
- [8] Colouandre C., Miller J. H., *J. Mol. Biol.*, 117, 577 (1977).
- [9] Cooper H. K., Itzhaki R. F., *Bioch. Bioph. Acta*, 407, 263 (1975).
- [10] Cox R., Damianov I., Abanobi S. E., Sarma D. S. R., *Cancer Res.*, 33, 2114 (1973).
- [11] Craddock V. M., *Chem-biol. Interact.*, 10, 323 (1975).
- [12] Czajkowska A., Walter Z., *Hum. Genet.*, 56, 189 (1980).
- [13] Dahle D. B., Griffiths T. D., Carpenter J. G., *Molec. Pharmacol.*, 14, 278 (1978).
- [14] Damianov I., Cox R., Sarma D. S. R., Farber E., *Cancer Res.*, 33, 2122 (1973).
- [15] Frei J. V., Lawley P. D., *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 17, 27 (1976).

- [16] Frei J. V., Svensson D. H., Warren W., Lawley P. D., *Biochem. J.*, 174, 1031 (1978).
- [17] Fujimura S., Grunberger D., Carvajal G., Weinstein I. B., *Biochem.*, 11, 3629 (1972).
- [18] Gerschman L. L., Ludlum D. B., *Bioch. Bioph. Acta*, 272, 672 (1973).
- [19] Goth R., Rajewsky M. F., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 71, 639 (1974).
- [20] Goth-Goldstein R., *Nature*, 267, 31 (1977).
- [21] Hard G. C., *Cancer Res.*, 35, 3762 (1975).
- [22] Harris C. C., Connor R. J., Jackson F. E., Liberman M. W., *Cancer Res.*, 34, 3461 (1974).
- [23] Hendler S., Furer E., Srinivasan R. P., *Biochem.*, 8, 3266 (1970).
- [24] Herzog J., Farber J. L., *Cancer Res.*, 36, 1761 (1976).
- [25] Hickey E. D., Weber L. A., Baglioni C., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 73, 19 (1976).
- [26] Hutson D. H., Hoadley E. C., Pichering B. A., *Xenobiotica*, 1, 593 (1971).
- [27] Kleihues P., Patzschke K., *Z. Krebsforsch.*, 75, 193 (1971).
- [28] Kleihues P., Patzschke K., Margison G. P., Wegner L. A., Mende C., *Z. Krebsforsch.*, 81, 273 (1974).
- [29] Kolchinsky A. M., Mirzabekov A. D., Gilbert W., Li L., *Nucl. Acid. Res.*, 3, 11 (1976).
- [30] Lawley P. D., *Mut. Res.*, 23, 283 (1974).
- [31] Lawley P. D., *Screening Tests Chem. Carcin., Proc. Symp., (IARC Sci. Publ. No. 12)*, 181 (1976).
- [32] Lawley P. D., Thatcher C. J., *Biochem. J.*, 116, 693 (1970).
- [33] Lawley P. D., Martin C. N., *Biochem. J.*, 145, 85 (1975).
- [34] Lawley P. D., Shah S. A., *Biochem. J.*, 128, 117 (1972).
- [35] Lawley P. D., Orr D. J., Jarman M., *Biochem. J.*, 145, 73 (1975).
- [36] Lawley P. D., Orr D. J., Shah S. A., Farmer P. B., Jarman M., *Biochem. J.*, 128, 117 (1972).
- [37] Laval J., Laval F., *Molecular and Cellular Aspects of Carcinogen Screening Tests, (IARC Sci. Publ., No. 27)*, 55 (1980).
- [38] Ledda G. M., Columbano A., Rao R. M., Rajalakshmi S., Sarma D. S. R., *Biochem.*, 19, 1382 (1980).
- [39] Loveless A., *Nature*, 123, 206 (1969).
- [40] Ludlum D. B., *J. Biol. Chem.*, 245, 477 (1970).
- [41] Ludlum D. B., *Bioch. Bioph. Acta.*, 247, 412 (1971).
- [42] Ludlum D. B., Magee P. N., *Biochem. J.*, 128, 729 (1972).
- [43] Magee P. N., Pegg A. E., Swann P. F., *Hancb. Alg. Pathol.*, 6, 329 (1975).
- [44] Magee P. N., Montesano R., Preussmann R., *ACS Monogr.*, 173 (1976).
- [45] Mathe G., *Exp. Franc. Paris*, 9, 234 (1966).
- [46] Margison G. P., Margison J. M., Montesano R., *Bioch. J.*, 157, 627 (1976).
- [47] Montesano R., Bartsch H., *Mut. Res.*, 32, 179 (1976).

- [48] Montesano R., Bresil H., Margison G. P., *Cancer Res.*, 39, 1798 (1979).
- [49] Mirvish S. S., Chu C., Clayson D. B., *Cancer Res.*, 38, 458 (1978).
- [50] Neale S., *Mut. Res.*, 32, 229 (1976).
- [51] O'Connor P. J., Capps M. J., Craig A. W., Lawley P. D., Shah S. A., *Bioch. J.*, 129, 519 (1972).
- [52] O'Connor P. J., Capps M. J., Craig A. W., *Brit. J. Cancer*, 27, 153 (1973).
- [53] O'Connor P. J., Margison G. P., Craig A. W., *Biochem. J.*, 145, 475 (1975).
- [54] Painter R. B., *Mut. Res.*, 42, 299 (1977).
- [55] Pegg A. E., *Chem.-biol. Interact.*, 6, 393 (1973).
- [56] Pegg A. E., Jackson A., *Chem.-biol. Interact.*, 12, 279 (1976).
- [57] Pegg A. E., Nicoll J. W., *Screening Tests Chem. Carcin.*, Proc. Symp., (IARC Sci. Publ. No. 12), 571 (1976).
- [58] Pegg A. E., Hui G., Rogers J. K., *Bioch. Bioph. Acta*, 520, 671 (1978).
- [59] Pegg A. E., *Adv. Cancer Res.*, 25, 195 (1977).
- [60] Pegg A. E., *Bioph. Bioch. Res. Com.*, 84, 166 (1978).
- [61] Peterson A. R., Altenbach S., Groom D. A., Heidelberger C., *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 20, 60 (1976).
- [62] Peterson A. R., Peterson H., *Mut. Res.*, 39, 131 (1979).
- [63] Rajalakshmi S., Sarma D. S. R., *Chem.-biol. Interact.*, 11, 245 (1975).
- [64] Rajalakshmi S., Rao P. M., Sarma D. S. R., *Biochem.*, 17, 4515 (1978).
- [65] Rajewsky M. F., *Molec. and Cellular Aspects of Carcin. Screening Tests*, (IARC Sci. Publ. No. 27) (1980).
- [66] Ramanathan R., Rajalakshmi S., Sarma D. S. R., Farber E., *Cancer Res.*, 36, 2073 (1976).
- [67] Rao P. M., Rajalakshmi S., Sarma D. S. R., *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 18, 98 (1977).
- [68] Roberts J. J., Sturrock J. E., Ward K. N., *Mut. Res.*, 26, 129 (1974).
- [69] Roberts J. J., *Screening Tests Chem. Carcin.*, Proc. Symp., (IARC Sci. Publ. No. 12), 605 (1976).
- [70] Roberts J. J., *Brit. Med. Bull.*, 36, 1, 25 (1980).
- [71] Roman R., Brooker J. D., Seal S. N., Marcus A., *Nature*, 260, 359 (1976).
- [72] Ross W. O., *Biological Alkylating Agents*, Butterworth, London, 3, 214 (1962).
- [73] Scudiero D., Strauss B., *Mut. Res.*, 35, 311 (1976).
- [74] Setlow R. B., *DNA Repair and Mutagenesis in Eucariotes*, ed. W. M. Generoso, M. D. Shelby, F. J. de Serres, New York 1980.
- [75] Shooter K. V., Slade T. A., O'Connor P. J., *Chem.-biol. Interact.*, 19, 363 (1977).
- [76] Shooter K. V., Slade T. A., *Chem.-biol. Interact.*, 19, 353 (1977).
- [77] Shooter K. V., Howse R., Merrifield K., *Biochem. J.*, 137, 313 (1974).

- [78] Shooter K. V., Merrifield R. K., Chem.-biol. Interact., 13, 223 (1976).
- [79] Shatkin A. J., Both G. W., Cell., 7, 305 (1976).
- [80] Singer B., Progr. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol., 15, 219 (1975).
- [81] Singer B., FEBS Lett., 63, 85 (1976).
- [82] Singer B., Nature, 264, 333 (1976).
- [83] Singer B., Frankel-Conrat H., Biochem., 14, 772 (1975).
- [84] Singer B., Frankel-Conrat H., Virology, 39, 395 (1979).
- [85] Stumpf R., Margison G. P., Montesano R., Pegg A. E., Cancer Res., 39, 50 (1979).
- [86] Swain C. G., Scott C. B., J. Am. Chem. Soc., 75, 141 (1953).
- [87] Swann P. F., Magee P. N., Biochem. J., 110, 39 (1968).
- [88] Swann P. F., Magee P. N., Biochem. J., 125, 841 (1971).
- [89] Walter Z., Czajkowska A., Lipiecka K. Human Genet., 53, 375 (1980).
- [90] Witkin E. M., Bacteriol. Rev., 40, 869 (1976).

Ryszard Wiaderkiewicz, Zofia Walter

CHEMICAL ALKYLATION OF NUCLEIC ACIDS

S u m m a r y

Chemical alkylation of nucleic acids may be caused both by directalkylating compounds or by agents which can be transformed in such a compounds by metabolic activation.

Some of alkylating compounds are well known cancerogens, majority of them show mutagenic activity. All simple alkylating compounds reacted with the same sites in nucleic acids but substantial differences exist upon the level of alkylation in a certain site. The main product of nucleic acids alkylation is N7alkyl guanine but guanine moieties alkylated in O⁶ position might be the essential reason of mutagenesis and cancerogenesis.

mgr RYSZARD WIADERKIEWICZ
doc. dr hab. ZOFIA WALTER
Instytut Biochemii i Biofizyki
Zakład Biochemii
Uniwersytetu Łódzkiego
ul. Banacha 12/16
90-237 Łódź