

Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego

mgr Kinga Westphal

Radio- i fotoliza znakowanego DNA

Od syntezy modyfikowanych oligonukleotydów do zależności sekwencyjnej fotouszkodzeń

Jedną z powszechnie stosowanych metod leczenia chorób nowotworowych jest radioterapia, która może wywoływać szereg powikłań, jak również indukować powstawanie wtórnych nowotworów. Aby zniwelować negatywne następstwa ekspozycji na promieniowanie jonizujące, poszukuje się efektywnych sensybilizatorów DNA, umożliwiających zastąpienie szkodliwych dla pacjentów fotonów wysokoenergetycznych, fotonami o znacznie mniejszej energii i toksyczności. Jednym ze sposobów sensybilizacji biopolimeru jest jego modyfikacja, polegająca na zastąpieniu natywnych zasad nukleinowych ich halogenowanymi odpowiednikami.

Pomimo, iż sam pomysł wykorzystania halogenopochodnych zasad nukleinowych jako czynników uwrażliwiających DNA nie jest nowy, to związki te nie znalazły praktycznego zastosowania (w zastosowaniach klinicznych), co prawdopodobnie wynika z niekompletnej wiedzy dotyczącej mechanizmów decydujących o wydajności powstawania foto- czy też radiouszkodzeń DNA.

W ramach niniejszej pracy doktorskiej podjęto się wyjaśnienia specyficznych zagadnień związanych z mechanizmami radio- i fotosensybilizacji modyfikowanego DNA a także

zaprojektowano narzędzie molekularne umożliwiające łatwe i szybkie przygotowanie materiału do testowania skuteczności modyfikowanych nukleozydów, potencjalnych sensybilizatorów DNA.

Jak dotąd, niewyjaśnioną kwestią pozostawał wpływ na wydajność powstawania fotouszkodzeń nukleotydów sąsiadujących bezpośrednio z donorem elektronu (D; guanina) bądź jego akceptorem (A; modyfikowana zasada nukleinowa). W celu zbadania wpływu sąsiedztwa na proces fotoindukowanego transferu elektronu z D do A, poddano ekspozycji na promieniowanie UV 7 dupleksów zawierających motyw 5'-XCAABrUY-3', gdzie X i Y to A, T, G lub C. W wyniku analizy jakościowej i ilościowej poszczególne motywy uszeregowano pod względem ich wrażliwości na uszkodzenie. W efekcie zidentyfikowano motyw 5'-CCAABrUT-3', który charakteryzuje się największą podatnością na fotodegradację DNA.

W ramach kolejnego projektu przetestowano i usystematyzowano radiosensybilizujący potencjał jodopochodnych zasad azotowych. W tym celu poddano ekspozycji na promieniowanie gamma krótkie, jednoniciowe fragmenty DNA (5'-TYT-3'), znakowane 5-jodo-2'-deoksyurydyną (TIUT) i 5-jodo-2'-deoksycytydyną (TICT). Na podstawie wyników analizy chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS), zidentyfikowano i oznaczono ilościowo powstałe produkty radiolizy. Zaobserwowano szereg fragmentów świadczących o przerwaniu ciągłości nici modyfikowanego trinukleotydu (produkty typu dimer: HO₁TX₂OH/HO₁XT₂OH, P₁XT₂OH, O=XT₂OH czy monomer: dT=O, P₁T₂OH, HO₁T₂OH, HO₁T₂P, dTI). Ponadto wykazano, że trinukleotydy znakowane jodopochodnymi zasad azotowych gwarantują większą wydajność radiolizy niż te znakowane bromopochodnymi. Zebrane wyniki prowadzą do wniosku, że lepszym radiosensybilizatorem DNA jest 5-jodo-2'-deoksyurydyna, a nie powszechnie stosowana w badaniach eksperymentalnych 5-bromo-2'-deoksyurydyna.

W końcu w oparciu o opisany w literaturze protokół zaproponowano łatwą i szybką metodę syntezy fotowrażliwego, dwuniciowego DNA, znakowanego wybranym sensybilizatorem. Ekspozycja tak uzyskanego materiału na promieniowanie UV prowadzi do przerwania ciągłości nici biopolimeru, co tym samym potwierdza jego fotowrażliwość. Należy zaznaczyć, że zaproponowany protokół stanowi bardzo użyteczne narzędzie do testowania potencjalnych sensybilizatorów, zwłaszcza tych, które nie są dostępne komercyjnie.

Realizacja trzech opisanych wyżej projektów uzupełniła wiedzę dotyczącą nie tylko radio-ale i fotosensybilizacji DNA. Ponadto, zaprojektowanie uniwersalnego narzędzia do testowania właściwości nowych, modyfikowanych nukleozydów poszerza możliwości określania nie tylko ich potencjału sensybilizującego, ale także procesów jakim mogą one ulec w roztworze - podczas znakowania, czy już po wprowadzeniu do łańcucha – w wyniku ekspozycji na promieniowanie.