

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**MODIFIKACE DNA NOVÝMI PROTINÁDOROVĚ
ÚČINNÝMI DVOJJADERNÝMI KOMPLEXY PLATINY
A TERMODYNAMICKÁ ANALÝZA TĚCHTO
MODIFIKACÍ**

AUTOR PRÁCE: Bc. JANA VYBÍHALOVÁ

STUDIJNÍ OBOR: BIOFYZIKA

VEDOUCÍ PRÁCE: prof. RNDr. VIKTOR BRABEC, DrSc.

KONZULTANTKA PRÁCE: prof. RNDr. JANA KAŠPÁRKOVÁ, PhD.

OLOMOUC 2011

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucímu diplomové práce prof. RNDr. Viktoru Brabcovi, DrSc. za odbornou pomoc a za cenné rady při zpracování mé diplomové práce. Dále děkuji konzultantce prof. RNDr. Janě Kašpárkové, PhD. za ochotu a čas, který mi věnovala při modifikaci DNA komplexu platiny a při dalším měření. Zvláštní poděkování také patří Mgr. Jaroslavu Malinovi, Ph.D. za odborné vedení práce s diferenční skenovací kalorimetrií a Vojtěchu Novohradskému za pomoc při tvorbě grafů. Dále můj dík patří příteli a rodině za duševní podporu.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci vypracovala samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů. Souhlasím se zapůjčováním práce a jejím zveřejňováním.

V Olomouci dne

Jana Vybíhalová

ABSTRAKT

Cílem této práce je ověřit hypotézu, zda nové protinádorově účinné dvojjaderné komplexy platiny s azolátovým můstkem termodynamicky destabilizují DNA méně než cisplatinu.

Cisplatinu je nejdéle používaným cytostatikem na bázi platiny využívaným v klinické praxi na léčbu rakoviny. Její klinické využití však má řadu omezení. K zásadním nedostatkům léčby cisplatinou patří snižování citlivosti nádoru vůči cisplatině při opakovaném podávání toho léčiva, omezené spektrum citlivých nádorů vůči tomuto cytostatiku a vedlejší účinky. K důležitým faktorům ovlivňujícím působení těchto látek patří jejich schopnost vytvářet s DNA různé typy vazeb, které výrazně narušují konformaci DNA. Dále důležitou roli v mechanismu protinádorového působení platinových komplexů hrají opravné mechanismy v buňkách. Proteiny, provádějící opravu poškozených míst v buňce, rozpoznávají distortovanou DNA.

S cílem překonat některá omezení související s klinickou aplikací konvenční cisplatinu byly připraveny nové protinádorově účinné dvojjaderné komplexy platiny s azolátovým můstkem s předpokladem, že po jejich navázání na DNA ji budou mnohem méně distortovat a destabilizovat. Z tohoto důvodu nebudou tyto komplexy rozpoznávány opravnými mechanismy, které negativně ovlivňují protinádorové efekty komplexů platiny a budou tak účinné i v buňkách rezistentních ke konvenční cisplatině.

V této diplomové práci byly krátké fragmenty DNA modifikovány jednak těmito novými dvojjadernými protinádorově účinnými komplexy platiny, jednak konvenční cisplatinou tak, že obsahovaly jeden, centrální můstek uvnitř jednoho řetězce vytvořený mezi sousedními zbytky guaninu. Tento můstek patří k hlavním poškozením DNA při její interakci s komplexy platiny testovanými v této práci. Takto připravené fragmenty byly dále analyzovány pomocí diferenční skenovací kalorimetrie a získané termodynamické parametry byly navzájem porovnány.

Bylo zjištěno, že vnitřetězcové můstky vytvořené v DNA komplexem obsahujícím pyrazolátový můstek vyvolává výrazně menší termodynamickou destabilizaci DNA ve srovnání s destabilizací způsobenou můstkem cisplatinu. Podobnou analýzu aduktů vytvořených v DNA komplexem s 1,2,3-triazolátovým můstkem však nebylo možné provést, neboť modifikace duplexu DNA tímto komplexem vedla ke vzniku dvou různých produktů, které nebylo možné chromatograficky oddělit.

KLÍČOVÁ SLOVA

Cisplatinu, komplex 1 AMPZ, komplex 2 AMTA, DNA, termodynamická stabilita, diferenční skenovací kalorimetrie.

ABSTRACT

The aim of this study is to verify the hypothesis that new effective antitumor azolato-bridged dinuclear platinum complexes thermodynamically destabilize DNA less than cisplatin.

Cisplatin is the longest-used platinum-based cytostatic exploited in clinical practice to treat cancer. However, its clinical use has several limitations. The main problem is the reduction of tumor sensitivity to cisplatin during repeated administration of drugs, limited spectrum of tumors sensitive to the chemotherapy and side effects. Among the important factors influencing the action of these agents is their ability to create different types of DNA binding, which significantly distorts the shape of DNA. Furthermore, repair mechanisms in cells play an important role in the mechanism of antitumor action of platinum complexes. Proteins, carrying out repair of damaged sites in the cell, recognize distorted DNA.

In order to overcome some limitations associated with conventional clinical application of cisplatin, new antitumor azolato-bridged dinuclear platinum complexes were prepared, supposing that after binding to the DNA they will be much less distorting and destabilizing DNA. For this reason, these complexes will be not recognized by DNA repair mechanisms, which negatively affect antitumor effects of platinum complexes and will be effective even in cells resistant to conventional cisplatin.

In this thesis, the short fragments of DNA were modified by both new dinuclear anticancer platinum complexes and conventional cisplatin. They contained a single, central intrastrand cross-link formed between adjacent guanine residues. This cross-link belongs to major damages of DNA when it interacts with platinum complexes tested in this work. The fragments prepared in this way were further analyzed by differential scanning calorimetry and the thermodynamic parameters obtained were compared.

It was found that the intrastrand cross-links formed in DNA by the pyrazole-bridged complex thermodynamically destabilizes DNA considerably less than the cross-links of cisplatin. It was impossible to perform a similar analysis of DNA cross-link of 1,2,3-triazolate-bridged complex since modification of DNA duplex by this complex resulted in two different products which were impossible to separate.

KEYWORDS

Cisplatin, complex 1 AMPZ, complex 2 AMTA, DNA, thermodynamic stability, differential scanning calorimetry.

OBSAH

SEZNAM DŮLEŽITÝCH ZKRATEK	8
ÚVOD	9
TEORIE	
1 PROTINÁDOROVĚ ÚČINNÉ KOMPLEXY PLATINY	11
1.1 Vývoj komplexů na bázi platiny	11
1.2 Cisplatina.....	11
1.3 Karboplatina.....	13
1.4 Oxaliplatina	14
1.5 Nedaplatina	14
1.6 Vícejaderné platinové komplexy.....	15
2 MECHANISMUS PŮSOBENÍ CISPLATINY	16
2.1 Reaktivita platnatých komplexů.....	16
2.2 Distribuce cisplatiny v buňkách	18
2.3 Struktura DNA	19
2.4 Vazba cisplatiny na DNA.....	20
2.5 Aduky tvořené cisplatinou na DNA.....	21
2.6 Strukturní změny indukované vazbou cisplatiny na DNA.....	22
2.7 Termodynamické vlastnosti DNA modifikované cisplatinou.....	24
2.8 Vliv cisplatiny na replikaci a transkripci DNA, apoptóza	25
2.9 Proteiny se specifickou vazbou na DNA modifikovanou cisplatinou	25
2.10 Oprava DNA	26
2.11 Buněčná rezistence na cisplatinu	27
3 TERMODYNAMICKÉ ZÁKONY A DEFINICE.....	28
3.1 První věta termodynamiky	28
3.2 Druhá věta termodynamiky.....	28
3.3 Entalpie	29
3.4 Volná energie (Gibbsova)	30
3.5 Tepelná kapacita.....	31
4 TERMODYNAMICKÁ STABILITA DNA	32
4.1 Síly stabilizující DNA	32
4.2 Denaturace krátkých fragmentů DNA	33
4.3 Diferenční skenovací kalorimetrie	34

EXPERIMENT

CÍL PRÁCE	39
5 NOVÉ DVOJJADERNÉ KOMPLEXY PLATINY.....	40
6 MATERIÁLY A METODY.....	44
6.1 Použité materiály.....	44
6.2 Metody	45
6.2.1 Modifikace DNA komplexu platiny.....	45
6.2.2 Separace oligonukleotidů pomocí HPLC	45
6.2.3 Odsolení přečištěných oligonukleotidů pomocí dialýzy	46
6.2.4 Kontrola čistoty modifikovaných oligonukleotidů a charakterizace vzniklých aduktů	47
6.2.4.1 Polynukleotid kinázová reakce	47
6.2.4.2 Separace značených oligonukleotidů gelovou filtrací	47
6.2.4.3 Reakce s dimethylsulfátem	48
6.2.4.4 Štěpení piperidinem	49
6.2.4.5 Odstranění navázané platiny	49
6.2.4.6 Gelová elektroforéza v denaturačním polyakrylamidovém gelu	49
6.2.4.7 Atomová absorpční spektrometrie (AAS)	50
6.2.4.8 Elektronová absorpční spektrometrie (EAS)	50
6.2.5 Diferenční skenovací kalorimetrie (DSC)	53
7 VÝSLEDKY A DISKUZE	54
7.1 Čištění a izolace aduktu cisplatiny, AMPZ a AMTA pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie.....	54
7.2 Ověření modifikace atomů N7 guaninových zbytků	57
7.3 Charakterizace vlivu vnitřetězcové vazby cisplatiny a nových dvojjaderných komplexů platiny AMPZ a AMTA na termodynamické vlastnosti DNA	59
8 ZÁVĚR	67
POUŽITÁ LITERATURA.....	69

SEZNAM DŮLEŽITÝCH ZKRATEK

Komplex 1 – AMPZ = $[(\text{cis-}\{\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\})_2(\mu\text{-OH})(\mu\text{-pz})](\text{NO}_3)_2$

Komplex 2 – AMTA = $[(\text{cis-}\{\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\})_2(\mu\text{-OH})(\mu\text{-tz})](\text{NO}_3)_2$

Cisplatina – cis-diammin-dichloroplatnatý komplex = $(\text{cis-}[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2])$

DNA – deoxyribonukleová kyselina

bot – spodní řetězec

top – horní řetězec

K – kontrola

IAC – vnitřetězcový můstek (intrastrand cross-link)

IEC – meziřetězcový můstek (interstrand cross-link)

NER – nukleotidová excizní oprava (nucleotide excision repair)

HMG – „high mobility group“ proteiny

stacking – vrstvení bází

T_m – teplota, při níž došlo k denuraci 50 % dvoušroubovicových molekul DNA

IC_{50} – inhibiční koncentrace látky, která vyvolá 50 % úmrtnost buněk

ATP* – adenosintrifosfát s radioaktivním fosforem ^{32}P

DMS – dimethylsulfát

EDTA – ethylendiamin tetraoctová kyselina

Tris – 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol

FAAS – bezplamenná atomová absorpční spektrometrie

EtOH – etanol

HPLC – vysokotlaká kapalinová chromatografie

AAS – atomová absorpční spektrometrie

DSC – diferenční skenovací kalorimetrie

ÚVOD

Nádorová onemocnění jsou v současnosti jednou z nejčastějších příčin úmrtí. Společným znakem těchto onemocnění je nekontrolovatelný růst a šíření abnormálních nádorových buněk.

Mezi úspěšné léčebné postupy užívané v klinické praxi patří chemoterapie, tedy podávání léků potlačujících růst zhoubných nádorů. Účinnou látkou těchto léků může být komplex těžkého kovu, který se po vniknutí do buňky váže na nukleové kyseliny. Tato vazba pak způsobí změny takového rozsahu, že zabrání dalšímu dělení této buňky. Při chemoterapii chemickými cytostatiky však dochází nejen k ničení rychle se množících buněk nádorových, ale i k ničení přirozených rychle se množících buněk, jako jsou buňky jaterní tkáně, bílé krvinky, červené krvinky, spermie, vajíčka.

Sledování změn nukleových kyselin po vazbě protinádorových účinných komplexů vedoucích k zastavení růstu nádorů je důležité pro pochopení primární příčiny úspěchu daného léku. Tyto poznatky pak mohou být využity pro navrhování nových typů léčiv, které by mohly účinkovat proti jiným typům nádorů, než stávající používaná cytostatika, nebo snižovat komplikace provázející léčbu pacientů trpících rakovinou.

V současném výzkumu jsou hledány způsoby ke zvýšení terapeutického účinku protinádorových léčiv na bázi kovů. Dosud jsou málo známe mechanismy, kterými buňka na tyto látky reaguje. Bylo však prokázáno, že poškození DNA vyvolaná cisplatinou mohou být v některých typech nádorů rozeznávána reparačními mechanismy, které ve svém důsledku vedou ke snížení terapeutického účinku. Z těchto důvodů je věnována velká pozornost nejen přípravě nových látek, ale také studiu možností adresného potlačení reparačních pochodů v nádorových buňkách na základě hlubšího poznání molekulárního základu úlohy buněčných mechanismů, reagujících na chemický podnět.

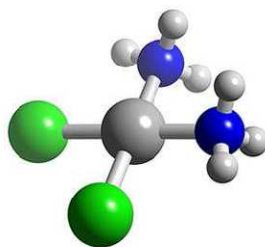
V dnešní době je možné zakoupit DNA, která je vhodná pro daný experiment. Snadná dostupnost DNA oligonukleotidů umožnila pokrok ve studiu termodynamických vlastností DNA, kterým se budeme věnovat dále v této práci. DNA byla modifikována novými protinádorově účinnými komplexy platiny. Ke stanovení termodynamické stability DNA byla použita metoda diferenční skenování kalorimetrie.

TEORIE

1 PROTINÁDOROVĚ ÚČINNÉ KOMPLEXY PLATINY

1.1 Vývoj komplexů na bázi platiny

Nejznámější dosud používané cytostatikum na bázi platiny je cis-diammin-dichloroplatinatý komplex neboli cisplatina (obrázek 1). Tento komplex byl poprvé syntetizován již v roce 1844 Peyronem [1], ale schopnost platinových komplexů zastavovat buněčný růst byla objevena náhodně až v roce 1965 Barnettem Rosenbergem [2]. Tento americký biofyzik studoval vliv elektrického pole na růst bakterií *Escherichia coli*, přičemž k měření používal platinové elektrody ponořené do roztoku s chloridem amonným. Po jisté době došlo k zastavení buněčného dělení bakterií a k jejich filamentóznímu růstu. Zpočátku to považoval za důsledek působení elektrického pole a teprve později, při podrobnějším zkoumání, vyšlo najevo, že příčinou bylo uvolnění platiny z použitých elektrod. Reakcí s chloridem amonným poté vznikl komplex, který vyvolal pozorovaný efekt. Rosenberg pokračoval v syntéze jednoduchých sloučenin platiny a jejich testování na experimentálních nádorových modelech. Po aplikaci cisplatiny a dalších platinových komplexů opravdu došlo k redukci velikosti nádorů a prodloužení doby života u pokusných zvířat [3]. Na základě toho úspěchu došlo v této oblasti k intenzivnímu výzkumu, který vyústil v první klinické testy s cisplatinou v roce 1971. V roce 1978 byla cisplatina zavedena do klinické praxe a v současnosti patří k nejrozšířenějším protinádorovým farmakům.

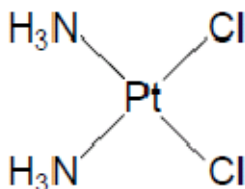


Obrázek 1: Strukturální vzorec cisplatiny

1.2 Cisplatina

Centrálním atomem tohoto komplexu je vzácný kov platina. Na ní jsou v poloze *cis* navázány dvě molekuly amoniaku a dvě chloridové skupiny (obrázek 2). Amoniová

skupina je pevně vázána k platině, zatímco chloridové ligandy jsou snadno nahraditelné nukleofily. Ve vodném roztoku chloridové ionty snadno disociují a jsou nahrazeny molekulami vody za vzniku kladně nabitého komplexu.



Obrázek 2: Strukturní vzorec cisplatiny

Cisplatinu neboli cis-[PtCl₂(NH₃)₂] je nejúspěšnější protinádorové cytostatikum na bázi platiny, které je v chemoterapii nejvíce využíváno. Léková forma cisplatiny se úspěšně používá zejména k léčbě nádorů varlat (vyléčeno 95 % zavčas diagnostikovaných případů), vaječníků a močového měchýře. V kombinaci s radioterapií dosahuje uspokojivých výsledků při aplikaci proti nádorům kostí, plic, tenkého střeva, mozku a nádorům hlavy a krku. Bohužel přibližně 30 % všech pacientů umírajících na rakovinu má však nádory prsu, konečníku nebo tlustého střeva, kde je terapie cisplatinou neúspěšná [4]. K hlavním nedostatkům léčby cisplatinou patří vznik rezistence, tedy snižování citlivosti nádoru vůči cisplatině při opakovaném podávání tohoto léčiva. Při vlastní léčbě cisplatinou se bohužel objevují vedlejší průvodní účinky. Do toxických účinků patří zejména nefrotoxicita (narušení funkce ledvin), myelotoxicita (porušení nervových drah v míše), ototoxicita (ztráta vnímání zvuků o vysokých frekvencích), poškození krvetvorby, zažívacího traktu a alergické reakce (kožní zahnědnutí, nevolnost, zvracení) [5].

Právě kvůli výše zmíněným komplikacím při chemoterapii je velká snaha vyvinout léčivo, které by se vyznačovalo nižší toxicitou a širším spektrem léčitelných nádorů.

Některé komplexy odvozené od cisplatiny se vyznačují sníženou toxicitou. Objev karboplatiny, oxaliplatin, nedaplatiny (využívána v Japonsku) a vícejaderných komplexů platiny rozšířil spektrum účinků této třídy cytostatik i na nádory rezistentní vůči cisplatině.

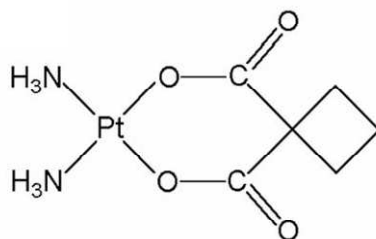
Díky stálému ověřování předpokladu, že terčem působení platinových léčiv v buňce je DNA, se zdá, že rozdílná chemická struktura nově vyvíjených platinových komplexů může podstatně ovlivnit právě jejich vazbu na DNA [6]. Vlastnosti odstupujících skupin

sloučeniny totiž ovlivňují průběh distribuce léčiva ve tkáních a buňkách. Na druhou stranu charakter neodstupujících skupin má vliv na konformační změny DNA [7].

Tato práce je zaměřena na nové protinádorově účinné dvojjaderné komplexy platiny.

1.3 Karboplatina

Jedním z běžně užívaných analogů cisplatiny v klinické praxi je karboplatina neboli cis-diaminocyklobutyldikarboxylát-platnatý komplex (obrázek 3). Vzniká substitucí dvou odstupujících atomů chlóru v molekule cisplatiny za stabilnější cyklobutyldikarboxylátovou skupinu [8]. Do klinické praxe byla zavedena v roce 1986 [9].

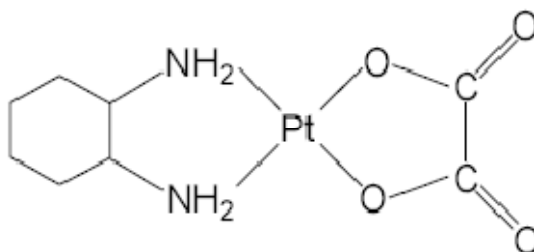


Obrázek 3: Strukturní vzorec karboplatiny

Hlavní překážky při léčbě cisplatiny však nevyřešila. Je sice méně toxická, ale účinkuje u stejného spektra nádorů jako cisplatina. Navíc oproti cisplatině je k dosažení stejného protinádorového účinku potřeba přibližně dvojnásobného množství tohoto léčiva. Menší toxicita je způsobena pomalejší hydrolyzou v krevním řečišti. V současnosti je karboplatina druhým nejpoužívanějším platinovým cytostatikem na světě. V praxi je používána především k léčbě nádorů vaječníků, ale v léčbě nádorů varlat, hlavy a krku převládá cisplatina [10].

1.4 Oxaliplatina

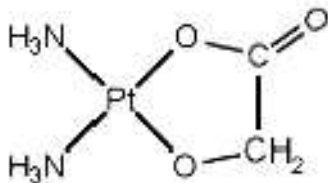
Další analog cisplatinu používaný v klinické praxi je oxaliplatina neboli cis-diammincyklohexyl-platnatý komplex (trans-1 diamincyklohexan oxalátplatnatý komplex) (obrázek 4). Poprvé byla syntetizována ve Francii [11]. Oxaliplatina je první platinové cytostatikum, které má účinnost u nádorů tlustého střeva [12], a to v kombinaci s 5-fluorouracilem a leucovorinem [13]. Při jejím podávání lze pozorovat menší neurotoxické účinky, avšak léčba bývá doprovázena nauseou. Oxaliplatina se hydrolyzuje pomaleji než cisplatina a je méně ochotná vázat se na DNA [14].



Obrázek 4: Strukturní vzorec oxaliplatiny

1.5 Nedaplatina

Nedaplatina neboli cis-diamminglykolátplatnatý komplex (obrázek 5) je registrována pro použití při léčbě rakoviny hlavy a krku, varlat, plic, jícnu, vaječníků a děložního krčku v Japonsku. Má podobné léčebné účinky jako cisplatina a karboplatina [14]. Nedaplatina nemá značné výhody nad cisplatinou nebo karboplatinou, avšak přesto má potenciál pro využití léčby některých nádorů, které jsou rezistentní k cisplatině a je podávána v kombinaci s 5-fluorouracilem [15].



Obrázek 5: Strukturní vzorec nedaplatiny

1.6 Vícejaderné platinové komplexy

Vícejaderné platinové sloučeniny zahrnují skupinu protinádorových látek s různými chemickými a biologickými vlastnostmi naprosto odlišnými od vlastností jednojaderných platinových léčiv [16]. Obsahují ve své struktuře 2 až 4 atomy platiny (spojené diaminovými alifatickými řetězci variabilní délky).

Bifunkční dvojjaderné komplexy vytváří meziřetězcové a vnitřetězcové můstky mezi guaninovými zbytky v sousedních párech bází podobně jako cisplatina, ale také tzv. můstky „dlouhého dosahu“, ve kterých jsou modifikované zbytky guaninu separované jedním nebo více páry bází [17].

Dvojjaderné komplexy mají vyšší kladný náboj než cisplatina a vzhledem ke vzdálenosti mezi vazebnými místy vytváří adukty sekvenčně i strukturně odlišné od cisplatiny. Vytvářejí můstky, jejichž strukturní parametry jsou ovlivněny délkou spojovacího řetězce [18, 19].

Nové protinádorově účinné dvojjaderné komplexy platiny, které byly použity v této diplomové práci, byly syntetizovány Janem Reedijkem. O těchto dvojjaderných komplexech na bázi platiny je pojednáno dále podrobněji v experimentální části.

2 MECHANISMUS PŮSOBENÍ CISPLATINY

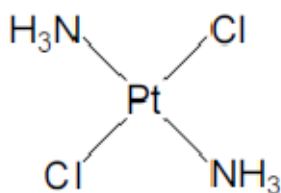
Přestože se cisplatina váže na různé buněčné komponenty (DNA, RNA, proteiny, membránové fosfolipidy, mikrofilamenta), za klíčovou se považuje vazba na DNA. DNA je tedy hlavní cílové místo protinádorového působení cisplatiny a výzkum modifikací DNA tímto cytostatikem či novými protinádorově účinnými komplexy platiny je velmi aktuální.

2.1 Reaktivita platnatých komplexů

Platina je centrální atom cisplatiny. Na tento centrální atom jsou navázány dva typy ligandů, a to neodstupující NH_3 skupiny a odstupující chloridové ionty. Chemická stabilita mezi centrálním atomem platiny a ligandem závisí na jeho schopnosti poskytovat elektrony na uskutečnění vazby, tedy závisí na jeho elektrodonorním charakteru. Síla vazby roste se zvyšující se polarizovatelností elektronového obalu ligandu [20, 21]. Podle klesající afinity k vazbě s platinou řadíme ligandy následujícím způsobem [22]:

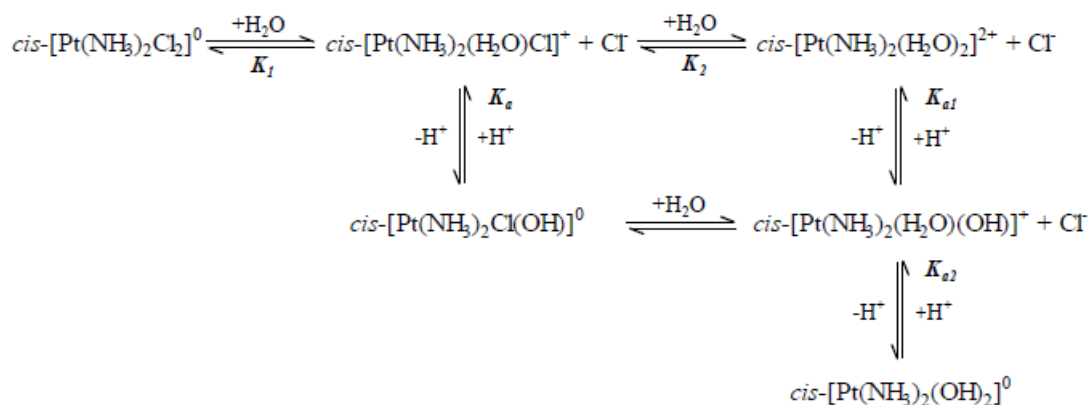


Dalším faktorem, který ovlivňuje termodynamickou stabilitu vazby mezi platinou a ligandem je takzvaný trans-efekt. Je to schopnost ligandu usnadňovat substituci ligandů, které jsou vůči němu v poloze trans [23]. U cisplatiny jsou na centrální platinový atom navázány v poloze trans vždy chloridový iont a NH_3 skupina, z nichž chloridový atom vykazuje větší trans-efekt než NH_3 a vazba mezi platinou a chloridovým iontem je destabilizována. Příkladem změn vlastností pouhou záměnou polohy ligandů je trans izomer cisplatiny – transplatina (obrázek 6) [24]. Jak cisplatina, tak její trans izomer patří do skupin komplexů s centrálním atomem platiny v oxidačním stupni II a oba komplexy mají čtvercově planární symetrii.



Obrázek 6: Strukturální vzorec transplatiny

Pro vlastní protinádorovou účinnost komplexu nejsou důležité pouze samotné ligandy navázané na centrální atom cisplatiny, ale také jejich uspořádání. Transplatina je protinádorově neaktivní a je méně cytotoxická ve srovnání s cisplatinou [25]. U transplatiny jsou v poloze trans vždy dva stejné ligandy, dochází tedy ke vzájemnému vyrušení trans-efektů a ligandy odstupují méně ochotně, než je tomu u cisplatiny. Chloridové anionty u cisplatiny tedy ve vodném prostředí odstupují podstatně rychleji než u transplatiny. A tedy ve vodném prostředí probíhá hydrolyza (výměna chloridových iontů za molekuly vody), která je předpokladem pro reakci cisplatiny s DNA, snáze u cisplatiny než u jejího trans izomeru. Aminoligandy jsou k výměně za vodu relativně inertní a k jejich odstupování tedy nedochází.



Obrázek 7: Rovnice hydrolyzy a deprotonace cisplatiny ve vodném prostředí

Cisplatina získá během hydrolyzy kladný náboj a stává se elektrofilní (obrázek 7). Hydrolyzovaný komplex přechází ve slabě kyselém nebo neutrálním prostředí do deprotonované formy, která je stabilní. Z navázané vody vzniká hydroxy skupina. Hydroxylová skupina tvoří s centrálním atomem vazbu mnohem stabilnější než chloridové anionty a voda, jak plyne z výše zmiňované afinitní řady.

Pro reaktivitu cisplatiny jsou velice významné první dva kroky hydrolyzy, a to záměna chloridových iontů za molekuly vody. Rovnovážné konstanty K_1 a K_2 pro tyto dva kroky můžeme vyjádřit dle následujících vztahů (obrázek 8):

$$K_1 = \frac{[Cl^-][cis - (Pt(NH_3)_2(H_2O)Cl)^+]}{[cis - (Pt(NH_3)_2Cl_2)^0]}$$

$$K_2 = \frac{[Cl^-][cis - (Pt(NH_3)_2(H_2O)_2)^{2+}]}{[cis - (Pt(NH_3)_2(H_2O)Cl)^+]}$$

Obrázek 8: Rovnice pro rovnovážné konstanty pro první dva kroky hydrolyzy cisplatiny

Z rovnic pro rovnovážné konstanty vyplývá, že není lhostejné, v jakém prostředí k hydrolyze dochází, protože poměr hydrolyzované formy v roztoku závisí na koncentraci chloridových iontů. Množství hydrolyzované formy v roztoku klesá s rostoucí koncentrací chloridových iontů. V roztoku s vysokou koncentrací chloridových iontů se cisplatina nachází výhradně v nehydrolyzované dichloroformě.

2.2 Distribuce cisplatiny v buňkách

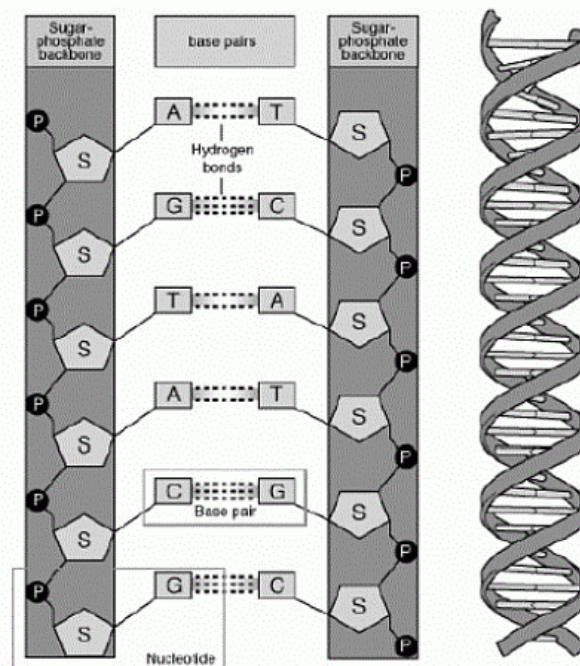
Ve fyziologických podmínkách krevní plazmy, což odpovídá hodnotě 104 mM koncentraci chloridových iontů (pH 7,4), tvoří dichloro a chlorohydroxo forma asi 93 % všech přítomných forem. Jiná situace je v cytoplazmě buněk, kde je koncentrace chloridových iontů významně nižší, a to 4mM a hydrolyzované formy cisplatiny tvoří asi 33 % [26]. Tato skutečnost umožňuje podání cisplatiny intravenózně, protože v krevním řečišti cisplatina zůstává v neaktivním neutrálním stavu, který umožňuje pasivní transport přes plazmatickou membránu do buňky, kde dochází k hydrolyze a cisplatina se stává reaktivní kladně nabitou molekulou.

Cisplatina reaguje neselektivně s různými částmi buňky, membránami, proteiny, nukleovými kyselinami. Cisplatina také ochotně reaguje s malými, ale důležitými molekulami, jako jsou některé aminokyseliny (cystein, metionin, histidin) a glutation. Bylo zjištěno, že po vazbě platnatých komplexů na glutation pravděpodobně dochází k jejich aktivnímu transportu z buňky. Cisplatina reaguje s glutationem 360 krát rychleji, což může částečně vysvětlit její nižší cytotoxicitu. Vazba cisplatiny na proteiny

inhibuje jejich enzymovou aktivitu, ale nebyla prokázána žádná významná korelace mezi touto vazbou a inhibicí buněčného růstu či cytotoxicitou cisplatinu [27]. Oproti tomu mnoho experimentů dokázalo, že rozhodujícím činitelem pro cytostatickou účinnost je vazba cisplatinu na DNA.

2.3 Struktura DNA

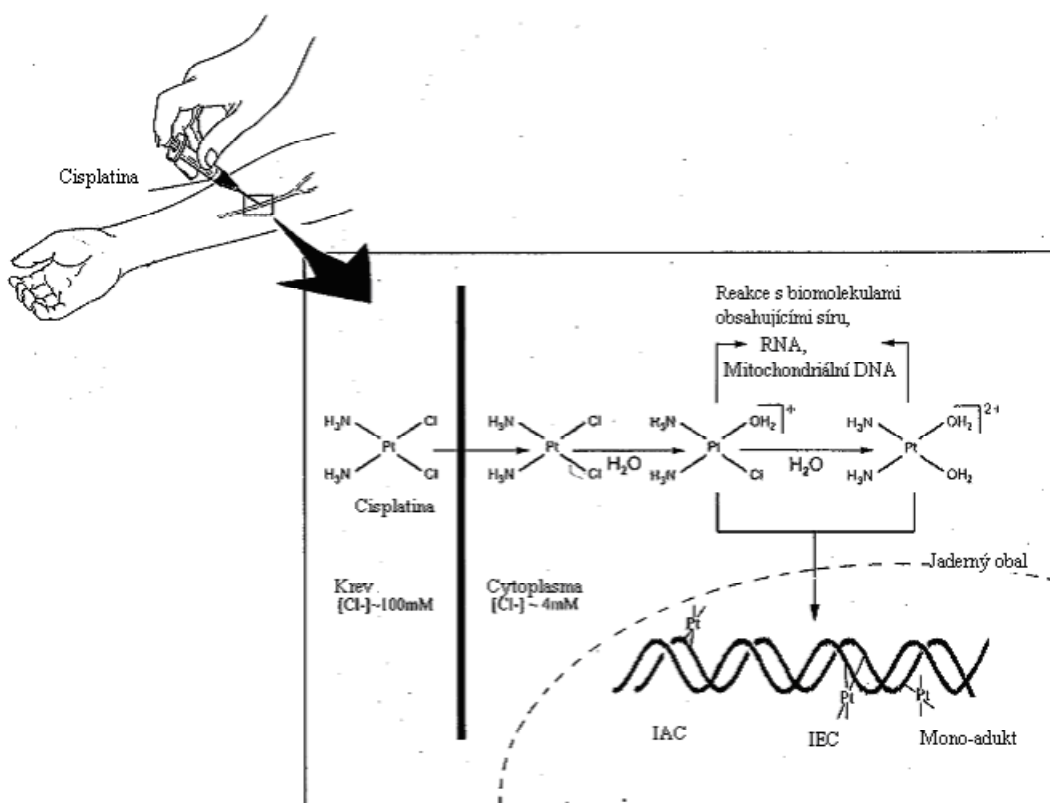
Molekula DNA se skládá z nukleotidů, které jsou vytvořeny z pětiuhlíkového monosacharidu (2-deoxy- β -D-riboza), z kyseliny trihydrogenfosforečné (H_3PO_4) a z purinových – adenin, guanin, nebo pyrimidinových bází – cytosin, thymin. Spojením purinové nebo pyrimidinové báze N-glykozidovou vazbou s deoxyribózou vznikne deoxyribonukleotid. Strukturními částmi polynukleotidového řetězce jsou zbytky deoxyribózy, spojené fosfodiesterovými vazbami. Tato struktura je označována jako pentózofosfátová kostra. DNA se nejčastěji vyskytuje v podobě tzv. dvoušroubovice, která se skládá ze dvou polydeoxyribonukleotidových řetězců, které jsou navzájem komplementární a uspořádány antiparalelně. Uplatňuje se zde tzv. Watson-Crickovo párování bází (obrázek 9), podle něhož se prostřednictvím vodíkových vazeb páruje guanin s cytosinem a adenin s thyminem.



Obrázek 9: Struktura DNA

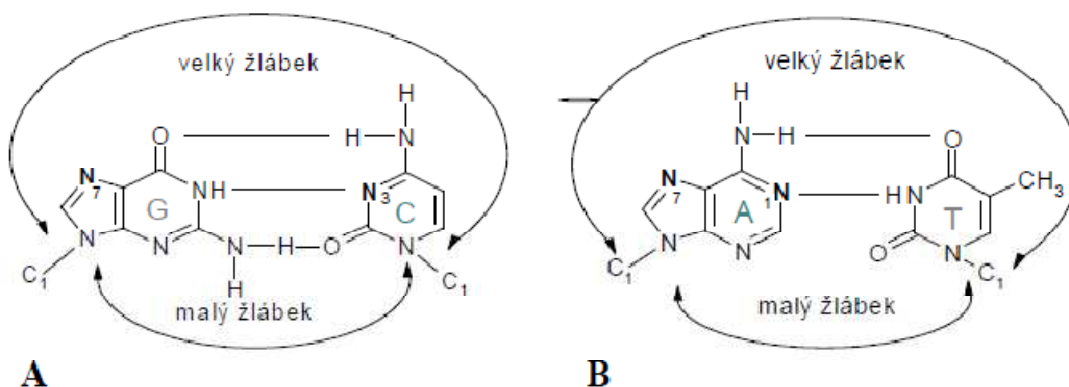
2.4 Vazba cisplatiny na DNA

Cisplatina se váže na DNA. Tato skutečnost souvisí s protinádorovým působením cisplatiny. Jak již bylo zmíněno, cisplatina se při chemoterapii aplikuje intravenózně a během hydrolyzy získá kladný náboj. V neutrálním prostředí je DNA díky záporně nabitým fosfátovým zbytkům v její cukrfosfátové kostře polyaniontem. Dochází tedy k elektrostatickému přitahování mezi cisplatinou a DNA. Vazba cisplatiny na DNA probíhá ve dvou krocích – v prvním kroku vznikne z cisplatiny kladně nabitý monoaquastav, a to díky odstoupení jednoho Cl⁻ ligandu a jeho výměně za vodu. Tento komplex je elektrostaticky přitahován k DNA. Voda je nahrazena nukleofilnějším atomem báze (zpravidla N7 guanin), čímž vznikne monofunkční adukt. Ve druhém kroku je hydrolyzován také druhý Cl⁻ ligand (pokud je v blízkosti další vhodné reakční místo) a poté taktéž nahrazen atomem báze, vznikne tak bifunkční vazba s DNA (obrázek 10) [28].



Obrázek 10: Schematický proces vstupu cisplatiny do buňky po intravenózní aplikaci a reakce cisplatiny s DNA

Vazebná místa na DNA můžeme seřadit podle reaktivity s cisplatinou následovně: guanin-N7 >> adenin-N7 > cytosin-N3 > adenin-N1 [29]. Ze sterických důvodů jsou přístupnější heterocyklické dusíkové atomy v poloze 7 guaninu a adeninu, které jsou orientovány do velkého žlábků. Vazba na N3 cytosinu a N1 adeninu je znesnadněna párováním bází (obrázek 11) [30].



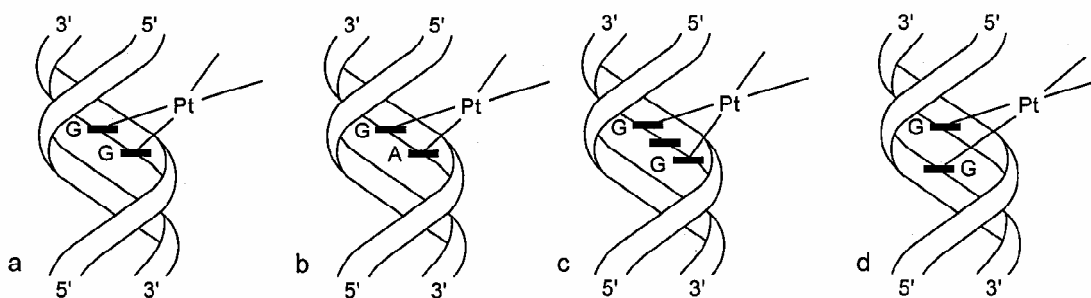
Obrázek 11: Schematické znázornění Watson-Crickova párování bází a umístění vazebných míst pro platinové komplexy
 A) guanin (G) – cytosin (C)
 B) adenin (A) – thymin (T)

2.5 Aduky tvořené cisplatinou na DNA

Nejčastějším aduktem cisplatinou na DNA je vnitřetězcová vazba tohoto komplexu ke dvěma sousedním guaninovým zbytkům v jednom řetězci. Takto vzniklý adukt se označuje jako 1,2-GG-IAC (obrázek 12 a) a tvoří až 60 % všech aduktů cisplatinou. Cisplatinou se může dále vázat na sousední deoxyadenosin a deoxyguanosin, kde adeninový zbytek se nachází vždy na 5' konci. Tento typ aduktu se označuje jako 1,2-AG-IAC (obrázek 12 b) a tvoří přibližně 20 % navázané cisplatinou. Další typem aduktu je vnitřetězcová vazba cisplatinou na dva guaninové zbytky oddělené od sebe jedním nukleotidem, označuje se jako 1,3-GG-IAC (obrázek 12 c), tvoří asi 10 % navázané cisplatinou. Dále může cisplatinou vytvářet vazbu meziřetězcovou, a to mezi dvěma guaninovými zbytky v komplementárních řetězcích v sekvenci 5'-GC-3'. Tento adukt se označuje jako 1,2-GG-IEC (obrázek 12 d) a tvoří společně s monofunkčně (v N7 pozici guaninových zbytků) navázanou cisplatinou 5–10 % navázané cisplatinou

na lineární DNA. Uvedené hodnoty platí však pouze pro lineární DNA. Poměr zastoupení se liší v závislosti na topologii DNA.

Z hlediska protinádorové aktivity se považují za významné bifunkční adukty. Platnaté komplexy tvoří zřejmě i adukty mezi DNA a proteiny [31].



Obrázek 12: Grafické znázornění aduktů cisplatiny

- a) 1,2-GG-IAC
- b) 1,2-AG-IAC
- c) 1,3-GG-IAC
- d) 1,2-GG-IEC

2.6 Strukturální změny indukované vazbou cisplatiny na DNA

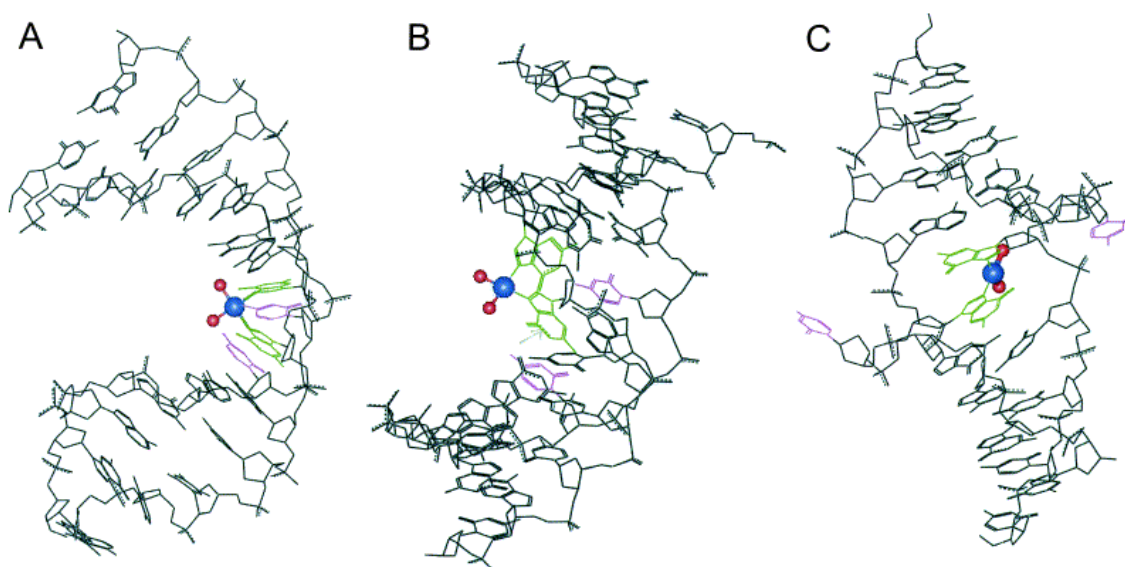
Vazba cisplatiny na DNA způsobuje změnu její konformace v okolí vzaby. Rozsah a typ distorze závisí na typu aduktu (obrázek 12, 13) [32].

Globální projevy, které jsou pozorované po vazbě cisplatiny zahrnují ohyb, rozvíjení dvoušroubovice a zkrácení řetězce DNA [33]. Nejčastější adukt cisplatiny 1,2-GG-IAC vyvolá ohyb DNA o 34° směrem do velkého žlábků a rozvinutí dvoušroubovice o 13° . Po vytvoření tohoto aduktu dojde k zúžení velkého žlábků a rozšíření žlábků malého. Vnitrořetězcový můstek 1,2-AG-IAC způsobí podobný ohyb i rozvinutí DNA. Další vnitrořetězcový můstek 1,3-GG-IAC způsobí podobný úhel ohybu, a to 35° , ale rozvíjí DNA o 23° . Mnohem výraznější změny vyvolá meziřetězcový můstek 1,2-GG-IEC, který ohne DNA o 45° směrem do malého žlábků a rozvine ji o 79° (tabulka 1). Cytosinové zbytky, které by se za normálních okolností párovaly s guaninovými zbytky, na nichž je navázána cisplatina, jsou vysunuty mimo duplex a neinteragují s ostatními bázemi [32].

Tyto strukturální změny zahrnují charakteristické rozšíření malého žlábků, což je velice důležité pro rozpoznání a vazbu buněčných proteinů.

Typ můstku	Rozvinutí	Ohyb
1,2-GG-IAC	12–13°	34° do velkého žlábků
1,2-AG-IAC	12–13°	32–35° do velkého žlábků
1,3-GG-IAC	23°	32–35° do velkého žlábků
1,2-GG-IEC	79°	45° do malého žlábků

Tabulka 1: Přehled konformačních změn DNA způsobených vazbou cisplatiny



Obrázek 13: Strukturální změny DNA indukované adukty cisplatiny

- A) 1,2-GG-IAC
- B) 1,3-GG-IAC
- C) IEC můstek

2.7 Termodynamické vlastnosti DNA modifikované cisplatinou

Kovalentní vazba komplexů platiny na DNA indukuje strukturní změny (narušení párování bází, rozvinutí, ohyb dvoušroubovice), které se promítnou i do termodynamických změn DNA. Vazba kladně nabitých komplexů platiny způsobí uvolnění kladných iontů z místa vazby a svým vlastním kladným nábojem odstiňuje záporný náboj cukrfofátové kostry. Takto vazba platinových komplexů přispívá ke změně termodynamických vlastností DNA.

Pro studium termodynamických parametrů modifikované DNA se používají krátké fragmenty DNA o známé sekvenci s přesně definovaným aduktem komplexu. Srovnáním s hodnotami naměřenými i pro nemodifikovanou DNA můžeme určit z jejich rozdílu změnu teploty tání a také rozdíl změn entalpie, entropie a volné energie po navázání komplexu na DNA.

Nejčastější vnitrořetězcový můstek 1,2-GG-IAC cisplatinu snižuje termodynamickou stabilitu DNA. Destabilizace DNA je původu entalpického a je částečně kompenzována entropickou stabilizací [34, 35, 36]. Předpokládá se, že ohyb osy dvoušroubovice indukovaný můstkem 1,2-GG-IAC cisplatinu částečně kompenzuje destabilizaci DNA způsobenou vytvořením tohoto aduktu [34, 37]. Bylo také prokázáno, že rozpoznání aduktů cisplatinu buněčnými proteiny závisí na míře termodynamické destabilizace indukované vytvořením aduktu. Nárůst termodynamické destabilizace způsobuje sníženou vazbu proteinu HMGB1 na DNA obsahující 1,2-GG-IAC můstek cisplatinu [35, 38].

Termodynamické parametry, které charakterizují vliv cisplatinu a jiných protinádorově účinných komplexů na energetické vlastnosti DNA mohou být využity pro určení faktorů ovlivňujících rozpoznání a vazbu modifikované DNA specifickými proteiny, které výrazně ovlivňují protinádorový účinek platinových cytostatik.

Experimenty za použití diferenční skenovací kalorimetrie prokázaly, že vazba cisplatinu na DNA usnadňuje denaturaci DNA a snižuje její teplotu tání.

2.8 Vliv cisplatiny na replikaci a transkripci DNA, apoptóza

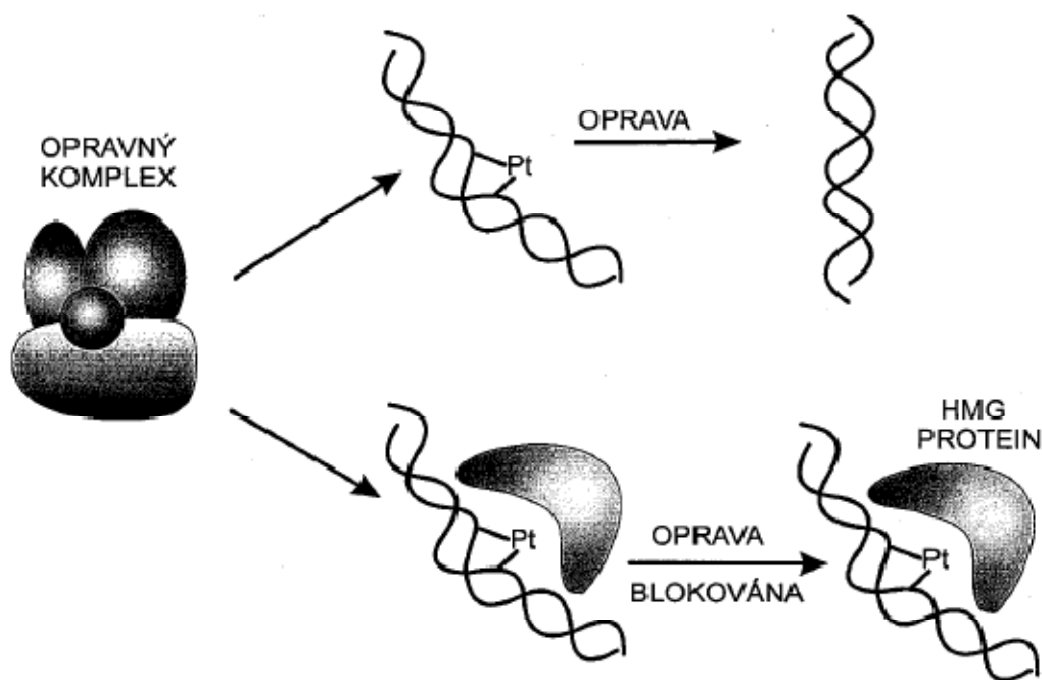
Poškození DNA po modifikaci cisplatinou má nesporně vliv na její funkci. Zásah do procesů replikace a transkripce může mít pro buňky vážné následky [39].

Bylo prokázáno, že cisplatinu zastavuje replikace DNA *in vitro* [40]. Váže se na DNA a blokuje DNA polymerázu [41]. Experimenty, které se zabývaly posouzením vztahu mezi inhibicí replikace, cytotoxicitou a buněčným cyklem iniciovaly vznik hypotézy, podle které může být podstata protinádorových účinků cisplatiny i inhibice transkripce [42]. Bylo následně zjištěno, že buňky vystavené působením cisplatiny prošly S fází (ve které probíhá replikace DNA), ale byly zablokovány v G₂ fázi. Při nízké koncentraci cisplatiny byly buňky zablokovány v G₂ fázi pouze dočasně, a to díky buněčnému opravnému systému. Oproti tomu při vysoké koncentraci cisplatiny byly buňky blokovány v G₂ fázi až do spuštění apoptózy. Buňky zůstávají v G₂ fázi v důsledku blokování transkripce genů nezbytných k proběhnutí mitózy [43]. Cisplatinu tedy inhibuje také transkripci a spouští programovanou smrt buňky (apoptóza).

2.9 Proteiny se specifickou vazbou na DNA modifikovanou cisplatinou

Přestože cisplatinu dokáže inhibovat replikaci i transkripci, je patrné, že na procesech vedoucích až k apoptóze buňky se podílejí ještě další faktory, a to buněčné proteiny, které se specificky vážou na adukty cisplatiny [44]. Je známo mnoho takových proteinů, například proteiny zúčastňující se excizní nukleotidové opravy – XPE, XPA, RPA [45], dále ERCC1 [46], nebo proteiny zúčastňující se opravy nesprávného párování bází „mismatch repair“, a to např. MutSα [47]. Další skupinou proteinů, které se také vyznačují specifickou vazbou na DNA modifikovanou cisplatinou jsou tzv. HMG proteiny (HMG = high mobility group). Tyto proteiny jsou nehistonové chromozomální proteiny, hrající velice důležitou úlohu při vytváření vysoce organizovaných struktur DNA v chromatinu. Tyto proteiny obsahují konzervativní doménu (80 aminokyselin), umožňující vazbu na DNA (tzv. HMG box). Bylo objeveno, že HMGB1 protein se váže selektivně k 1,2-GG-IAC, 1,2-AG-IAC a 1,2-GG-IEC aduktům cisplatiny, ale neváže se k monofunkčním aduktům a k 1,3-GG-IAC aduktům. Po objevení těchto vazeb HMGB1 proteinů na DNA modifikovanou cisplatinou byl vysloven názor, který vysvětluje úlohu

HMG proteinů v protinádorové účinnosti cisplatin [48]. HMG proteiny se pevně váží k aduktům cisplatin a brání tak jejich odstranění opravnými mechanismy buňky. Přetrvávající adukt poté vyvolá změny DNA, které brání její replikaci i transkripci, a v konečné fázi indukují apoptózu (nebo i nekrózu) buňky (obrázek 14) [49].



Obrázek 14: Schematické znázornění účinku HMG proteinů

2.10 Oprava DNA

Buňka je vybavena reparačními mechanismy, díky kterým jsou odstraňovány poškození vzniklá na DNA, ať už působením nežádoucích látek z okolí, nebo vlivem UV záření, ale taktéž působením protinádorových terapeutik na bázi platiny. Právě aktivace opravných mechanismů v nádorových buňkách bohužel značně snižuje efekt cisplatin. Na odstraňování aduktů cisplatin se podílí hlavně nukleotidová excizní oprava (NER = nucleotide excision repair), která je využívána k opravám mnoha poškození DNA [50]. Postižené místo je vystřiženo z DNA ve formě fragmentu [51]. Kromě tohoto excizního mechanismu existují další typy reparačních mechanismů, které mají také vliv na cytotoxicitu aduktů cisplatin.

Opravné mechanismy hrají velice významnou roli v buněčné odezvě na působení cisplatin [52].

2.11 Buněčná rezistence na cisplatinu

Hlavní příčina selhání chemoterapie při léčbě rakoviny je rezistence nádorové tkáně k podávané látce. Rezistence buněk je jejich schopnost tolerovat dávky podávaných látek, které by byly pro normální buňku toxické. Některé nádory jsou rezistentní už od počátku, některé získají rezistenci teprve v průběhu léčby. Rezistence k cisplatině může zahrnovat mechanismus, který limituje tvorbu aduktů nebo zahrnuje zvýšenou opravu vzniklých aduktů či zvýšenou toleranci k výslednému poškození DNA. Tvorba aduktů může být také limitována sníženou akumulací cisplatinu a inaktivací cisplatinu glutationem a proteiny, které obsahují thiol, jejichž koncentrace se může zvýšit po zahájení léčby [53].

Je patrné, že na rezistenci vůči cisplatině se podílí více faktorů, což velice znesnadňuje studium těchto procesů.

3 TERMODYNAMICKÉ ZÁKONY A DEFINICE

Jak již bylo uvedeno výše, platinové komplexy se váží na DNA kovalentně a touto vazbou indukují strukturní změny DNA. Tyto změny mají značný vliv na termodynamické vlastnosti DNA, které jsou hlavním tématem této diplomové práce. Abychom mohli termodynamické vlastnosti DNA studovat, je třeba znát jejich význam a definice. Termodynamika se zabývá vnitřní energií systémů, tedy tepelnou energií. Každý termodynamický systém je definován soustavou veličin, které se nazývají stavové funkce. Stavová funkce je taková veličina, jejíž změna není závislá na cestě, kterou byla tato změna uskutečněna. Závisí tedy jen na počátečním a konečném stavu, ale nezávisí na způsobu, jakým se systém dostal z počátečního stavu do stavu konečného.

V následujícím textu jsou definovány základní stavové veličiny, které charakterizují termodynamickou stabilitu DNA a věty termodynamiky, kterými se tyto veličiny řídí.

3.1 První věta termodynamiky

Je to v základním principu zákon zachování energie pro termodynamické děje. Tato první termodynamická věta popisuje vztah mezi vnitřní energií U definované soustavy, vykonanou prací W a teplem Q , vyměněným s okolím:

$$\Delta U = U_{kon} - U_{poč} = Q + W$$

Změna vnitřní energie systému při přechodu z počátečního stavu do konečného stavu je dána součtem tepla Q a práce W při tomto přechodu soustavou přijatých. Změnu vnitřní energie termodynamické soustavy je možné způsobit přidáním nebo odebráním tepla nebo mechanické energie, tzn. vykonáním práce.

3.2 Druhá věta termodynamiky

Je to velmi důležitý termodynamický zákon určující přirozený směr, kterým přírodní procesy probíhají. Stavová veličina, která charakterizuje směr vývoje systému, se

nazývá entropie S . Změna entropie soustavy při reverzibilním ději je rovna podílu tepla Q_{rev} přijatého soustavou a teploty soustavy T , při které k ději došlo:

$$\Delta S = \frac{Q_{rev}}{T}$$

Entropie adiabaticky izolované soustavy (nedochází k tepelné výměně s okolím) se během reverzibilního přechodu nemění ($\Delta S = 0$), v případě přechodu nereverzibilního roste ($\Delta S > 0$). Tedy entropie izolované soustavy nikdy neklesá.

Pokud se na entropii budeme dívat z mikroskopického hlediska, může být zjednodušeně pojmenována jako míra neuspořádanosti soustavy. Jednotka entropie je $J \cdot K^{-1}$ nebo $cal \cdot K^{-1}$.

Pro reverzibilní proces za konstantního tlaku platí:

$$\Delta S = \frac{\Delta H}{T}$$

3.3 Entalpie

Stavová veličina entalpie H je formulována na základě stavových veličin vnitřní energie soustavy U , tlaku p a objemu soustavy V :

$$H = U + pV$$

Pokud uvažujeme izobarickou stavovou změnu (tedy tlak v soustavě je během přechodu konstantní), pak práci W vykonanou soustavou vyjádříme následujícím vztahem:

$$W = -\Delta(pV)$$

Když za W dosadíme dle předešlého vztahu do první věty termodynamiky, dostaneme:

$$\Delta U = Q - \Delta(pV)$$

a změnu entalpie ΔH vyjádříme vztahem:

$$\Delta H = \Delta U + \Delta(pV)$$

Spojením dvou posledních rovnic dostaneme vztah pro změnu entalpie:

$$\Delta H = Q$$

což znamená, že změna entalpie soustavy při jejím přechodu je rovna teplotě, které bylo vyměněno s okolím. To však platí pouze za předpokladu, že přechod byl uskutečněn za konstantního tlaku a bez výměny neobjemové práce (např. elektrické) s okolím. Jednotkou entalpie je J nebo cal (1 cal = 4,184 J).

3.4 Volná energie (Gibbsova)

Volná neboli Gibbsova energie G je definována vztahem:

$$G = H - TS$$

Pro změnu volné energie za konstantního tlaku a teploty platí:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Za konstantního tlaku a teploty je změna volné energie soustavy při samovolném ději záporná ($\Delta G < 0$), při rovnovážném ději probíhajícím vratně je nulová ($\Delta G = 0$) a děj, který nemůže za daných podmínek samovolně proběhnout, je charakterizován kladnou změnou volné energie ($\Delta G > 0$).

Změna volné energie je svázána s rovnovážnou konstantou K dle vztahu:

$$\Delta G^0 = -nRT \ln K$$

kde n je látkové množství, R je molární plynová konstanta a T je teplota.

Obecně lze volnou energii vazby na DNA vyjádřit jako součet pěti základních příspěvků:

$$\Delta G_{cel} = \Delta G_{konf} + \Delta G_{t+r} + \Delta G_{hyd} + \Delta G_{ion} + \Delta G_{mol}$$

Kde ΔG_{cel} je celková energie, která se dá experimentálně sledovat. ΔG_{konf} je příspěvek volné energie, který vznikne v důsledku konformačních změn DNA a molekuly, která se váže po vytvoření duktu. ΔG_{t+r} vyjadřuje ztrátu translační a rotační energie po vzniku vazby. ΔG_{hyd} je energie hydrofobního transportu molekuly z roztoku do místa vazby na DNA. ΔG_{ion} je změna volné energie po uvolnění iontů navázaných v místě vazby před vytvořením duktu. A ΔG_{mol} je energie, která se uvolní při vzniku vazby mezi DNA a druhou molekulou.

3.5 Tepelná kapacita

Tepelná kapacita za konstantního tlaku C_p je definována vztahem:

$$C_p = \left(\frac{\partial H}{\partial T} \right)_{p=konst}$$

Tepelná kapacita je veličina udávající teplo, které je potřeba dodat za konstantního tlaku soustavě, aby se ohřála o jeden Kelvin teploty. Udává se v $J \cdot K^{-1}$ nebo $cal \cdot K^{-1}$. Změna entalpie při izobarickém ději může být pak vyjádřena pomocí tepelné kapacity:

$$\Delta H = \int_{T_{poč}}^{T_{kon}} C_p dT$$

Kde $T_{poč}$ a T_{kon} jsou teploty soustavy na počátku a na konci děje.

Všechny uvedené termodynamické veličiny bývají vztaženy na molární množství látky.

Souhrn základních termodynamických vět a termodynamických veličin byl vypracován na základě podkladů z literatury [54, 55].

4 TERMODYNAMICKÁ STABILITA DNA

4.1 Síly stabilizující DNA

Dvoušroubovicová DNA je v rovině bází (horizontální směr) stabilizována vodíkovými můstky, které vznikají mezi bázemi v rámci Watson-Crickova párování bází. Adenin se páruje s thyminem a guanin s cytosinem, přitom mezi adeninem a thyminem se vytváří dvě vodíkové vazby a mezi guaninem a cytosinem tři vodíkové vazby (obrázek 9). Tyto vazby jsou elektrostatického typu, jejich velikost je nepřímo úměrná kvadrátu vzdálenosti a přímo úměrná velikosti parciálního náboje na atomech, které se podílejí na vodíkové vazbě (atomy N, H, O). Vodíkové vazby jsou přibližně třicetkrát slabší než kovalentní vazba ($H_0 = -10$ kJ/mol).

Síly, které stabilizují dvoušroubovicovou DNA v kolmém směru na rovinu bází (vertikální směr) jsou dipól-dipólové interakce, Londonovy disperzní síly a hydrofobní interakce. Každá báze nukleové kyseliny má permanentní dipólový moment, který ovlivňuje její elektrostatické vlastnosti. Londonovy disperzní síly jsou důsledkem nerovnoměrného rozložení elektrického náboje způsobeného fluktuací elektronové hustoty. Dochází ke vzniku tzv. indukovaných dipólů, které mohou polarizovat elektronové hustoty okolních atomů. Touto polarizací vzniknou indukované paralelní dipóly, které se vzájemně přitahují [56]. Londonovy síly a dipól-dipólové interakce vedou k přitahování bází, které jsou umístěny nad sebou. Při hydrofobních interakcích dochází k minimalizaci kontaktu nepolárních skupin DNA s molekulami vody. Nepolární skupiny DNA jsou báze, které jsou umístěny uvnitř dvoušroubovice DNA. Báze se vrství nad sebou, kvůli minimalizaci kontaktu nepolárních bází s molekulami vody. Tyto interakce se označují jako „stacking“ interakce. Zjistilo se, že se „stacking“ interakce projevují výrazněji u purinových bází než u pyrimidinových bází. Tedy stabilizace „stacking“ interakcemi je závislá na sekvencích DNA. Všechny předešlé tři interakce tedy vedou k uspořádání bází nad sebou.

Molekula DNA je jako celek hydratována. Molekuly vody jsou vodíkovými můstky navázány do velkého žlábků a vytvářejí tak hydratační obal molekuly, který stabilizuje strukturu dvoušroubovice. Již je uvedeno výše, že samotná molekula DNA je polyaniont díky záporně nabitým fosfátovým skupinám v cukr-fosfátové kostře DNA. Tyto záporné náboje však také způsobují destabilizaci duplexu DNA v důsledku elektrostatického

odpuzování záporně nabitých cukrfosfátových koster jednotlivých řetězců. Tyto odpudivé síly jsou odstraněny, pokud se v roztoku nacházejí kationty, které vytvářejí kolem DNA iontovou atmosféru, která odpudivé síly odstiňuje a tím zvyšuje termodynamickou stabilitu DNA. Příspěvky jednotlivých interakcí jsou velmi malé, ale díky jejich množství a kooperativně vzniká stabilní dvoušroubovicová molekula DNA [57].

4.2 Denaturace krátkých fragmentů DNA

Denaturace neboli tání DNA je děj, kdy dochází k přerušení vazeb mezi řetězci DNA a k následnému oddělení těchto řetězců. Denuraci DNA můžeme realizovat následujícími způsoby – zvýšením teploty, extrémním snížením koncentrace iontů v roztoku nebo extrémním snížením či zvýšením pH. Při denuraci DNA dochází k rozpadu jejího hydratačního obalu v důsledku tepelného pohybu molekul vody, dochází také k přerušení vodíkových vazeb mezi bázemi a k výraznému narušení „stacking“ interakcí. Přechod dvouřetězcové DNA na dva samostatné a oddělené řetězce je charakterizován teplotou tání, která se označuje jako T_m . Je to teplota, při které je zdenaturovaná právě jedna polovina molekul DNA [58]. Tato veličina je závislá na sekvencích DNA a koncentraci DNA v roztoku. Ke vzniku dvoušroubovice dochází snáze při vyšší koncentraci. Dále teplota tání závisí na koncentraci kladných iontů v roztoku. Ta roste s logaritmem koncentrace kationtů. Aby DNA zdenaturovala, je třeba do systému dodat teplo. Jedná se o děj endotermický a entalpie je kladná. Oddělením řetězců se systém dostane do stavu s nižší uspořádaností, celková entropie roste a systém přejde do entropicky stabilnějšího stavu. Tání DNA je charakterizováno termodynamickými veličinami ΔS , ΔH a ΔG , které popisují stabilitu DNA. Hodnoty těchto stavových veličin odpovídají veličinám příslušným vzniku dvoušroubovicové DNA z jednotlivých řetězců. Liší se jen znaménkem [59].

Když ΔH roste, roste i stabilita molekuly. Když ΔH klesá, dojde k destabilizaci. Pokud roste míra neuspořádanosti systému, klesá ΔS . A pokud klesá míra neuspořádanosti systému, roste ΔS . V případě zdenaturovaného stavu DNA je větší míra neuspořádanosti systému než u dvoušroubovicové DNA [59].

Teplotu tání krátkých fragmentů DNA vypočítáme ze známých termodynamických veličin, za předpokladu dvoustavového přechodu, což je u krátkých fragmentů přijatelná aproximace:

$$T_m = \frac{\Delta H}{\Delta S - R \cdot \ln\left(\frac{C_{cel}}{\alpha}\right)}$$

kde ΔH je změna entalpie, ΔS změna entropie, která doprovází denaturaci DNA, T_m je teplota tání, R je molární plynová konstanta ($8,3145 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\text{mol}^{-1}$), C_{cel} je celková koncentrace jednotlivých řetězců, parametr α nabývá hodnoty 4 pro dva odlišné komplementární řetězce a 1 pro selfkomplementární řetězec.

Závislost teploty tání na koncentraci kationtů zahrneme do rovnice přidáním logaritmického členu:

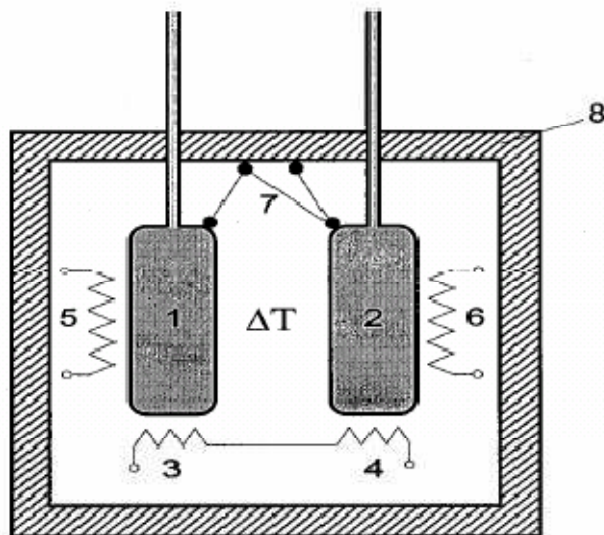
$$T_m = \frac{\Delta H}{\Delta S - R \cdot \ln\left(\frac{C_{cel}}{\alpha}\right)} + 16,6 \log[Na^+]$$

Teploty tání krátkých fragmentů DNA, vypočítané dle uvedeného vzorce, jsou zpravidla velice blízko experimentálním údajům [60].

4.3 Diferenční skenovací kalorimetrie

Diferenční skenovací kalorimetrie je metoda, která nám umožňuje měřit termodynamické vlastnosti DNA přímo. Je to metoda kalorimetrická, tedy metoda, při níž měříme teplo. Slovo diferenční v názvu metody znamená, že je zaznamenáván rozdíl mezi teplem přijatým vzorkem a teplem přijatým referentním roztokem (pufr). Slovo skenovací znamená, že během měření se mění kontinuálně teplota, tedy vzorek skenujeme v určitém teplotním intervalu. Diferenční skenovací kalorimetr (DSC) je zařízení, které nám umožňuje kontinuálně měřit tepelnou kapacitu v závislosti na teplotě. DSC přístroj obsahuje dvě cely na kapalné vzorky o objemu asi 0,75 ml. Tyto cely jsou plnitelné kapilárami a spojené termočlánkem. Cely jsou umístěny v adiabatickém plášti [61]. Teplota je kontinuálně měněna (zvyšována nebo snižována)

elektrickými topnými tělesy v rozsahu od $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ochlazování je zabezpečeno Peltierovými články (obrázek 15).

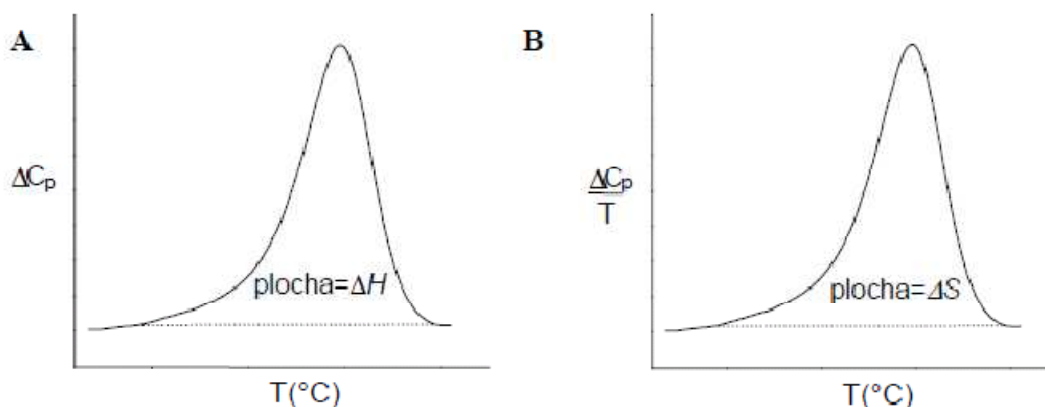


Obrázek 15: Schéma DSC

- 1 – cela se vzorkem
- 2 – cela s referentním roztokem
- 3, 4, 5, 6 – elektrická topná tělesa
- 7 – čidlo zaznamenávající rozdíl teplot mezi celami
- 8 – adiabatický plášť

Když v cele se vzorkem dochází k denaturaci DNA (endotermický děj), je část tepla spotřebována na průběh této reakce. Při dodání stejné energie do obou cel je teplota cely se vzorkem nižší než teplota cely referentní v důsledku toho, že část energie nebyla spotřebována na zvýšení teploty cely, ale na probíhající endotermickou reakci. Teplotní čidla zaznamenávají rozdíl teplot mezi celami a na celu se vzorkem je přivedeno dodatečné teplo, které uvedený rozdíl vyrovná. Následně dodaná elektrická energie do elektrických topných těles, které ohřívají celu se vzorkem je zaznamenána. Uvedené teplo, které je dodané do cely se vzorkem navíc (zaznamenaná elektrická energie), je přímo úměrné změně entalpie spojené s endotermickým dějem uvnitř cely. Díky známé koncentraci vzorku uvnitř cely a naměřeným datům se převede závislost elektrické energie na teplotě na závislost tepelné kapacity ΔC_p na teplotě. Výsledek měření je pak závislost rozdílů tepelných kapacit cely se vzorkem a cely referentní v závislosti

na teplotě. Je to tzv. termogram. Z termogramu vypočítáme změnu entalpie příslušnou dané reakci a to jako obsah plochy pod křivkou. Podobným způsobem vypočítáme i entropii, jestliže do grafu pomocí známých dat vyneseme závislost $\Delta C_p/T$ na teplotě. Změně entropie pak odpovídá zase obsah plochy pod křivkou (graf 1).



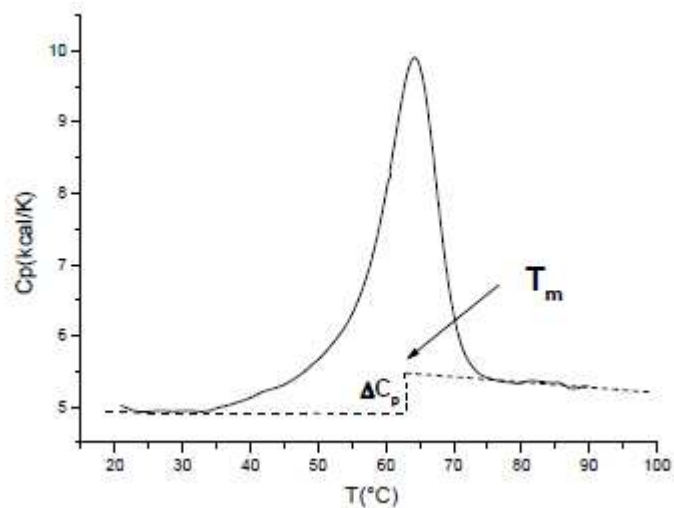
Graf 1: Záznam denaturace krátkého fragmentu DNA

A – obsah plochy pod křivkou závislosti ΔC_p na teplotě je roven změně entalpie

B – obsah plochy pod křivkou závislosti $\Delta C_p/T$ na teplotě je roven změně entropie

Poté můžeme vypočítat dle výše uvedených rovnic změnu volné energie či teplotu tání. Z jednoho měření díky DSC obdržíme všechny základní termodynamické parametry, které charakterizují endotermický děj v cele [62].

Ze záznamu závislosti tepelné kapacity ΔC_p na teplotě, který získáme díky DSC můžeme také najít hodnotu změny tepelné kapacity mezi počátečním a konečným stavem, a to extrapolací úseků termogramu před a po denaturaci DNA na teplotu tání, jejich rozdíl je pak ΔC_p (graf 2).



Graf 2: Určení T_m a ΔC_p z termogramu

Diferenční skenovací kalorimetrie se hojně a s úspěchem využívá ke studiu termodynamických vlastností DNA a ke studiu vlivu vazby ligandů na termodynamickou stabilitu DNA.

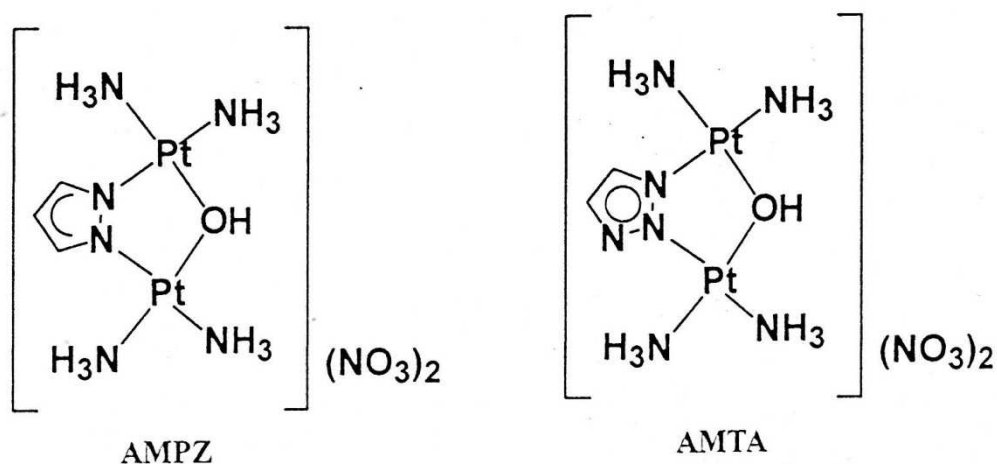
EXPERIMENT

CÍL PRÁCE

- ✓ Modifikovat krátké deoxyribonukleotidové duplexy (14 párů bází) cisplatinou a novými dvojjadernými komplexy platiny tak, aby obsahovaly jeden vnitřetězcový můstek mezi sousedními zbytky guaninu.
- ✓ Izolovat vzniklé adukty metodou vysokotlaké kapalinové chromatografie a ověřit správnost modifikace.
- ✓ Stanovit vliv vnitřetězcové vazby cisplatiny a nových dvojjaderných komplexů platiny na termodynamickou stabilitu DNA pomocí diferenční skenovací kalorimetrie.
- ✓ Ověřit hypotézu, zda nové dvojjaderné komplexy platiny termodynamicky destabilizují DNA méně než cisplatina.

5 NOVÉ DVOJJADERNÉ KOMPLEXY PLATINY

Nové protinádorově účinné dvojjaderné komplexy platiny (obrázek 16), které byly použity v této diplomové práci, byly syntetizovány Janem Reedijkem z Leidské univerzity v Nizozemí.



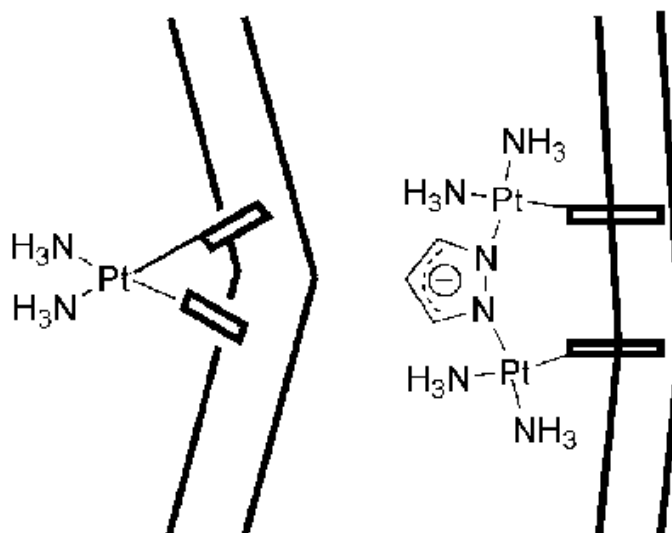
Obrázek 16:

Komplex 1 (AMPZ): $[(\text{cis-}\{\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\})_2(\mu\text{-OH})(\mu\text{-pz})](\text{NO}_3)_2$ (pz = pyrazol)

Komplex 2 (AMTA): $[(\text{cis-}\{\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\})_2(\mu\text{-OH})(\mu\text{-tz})](\text{NO}_3)_2$ (tz = triazol)

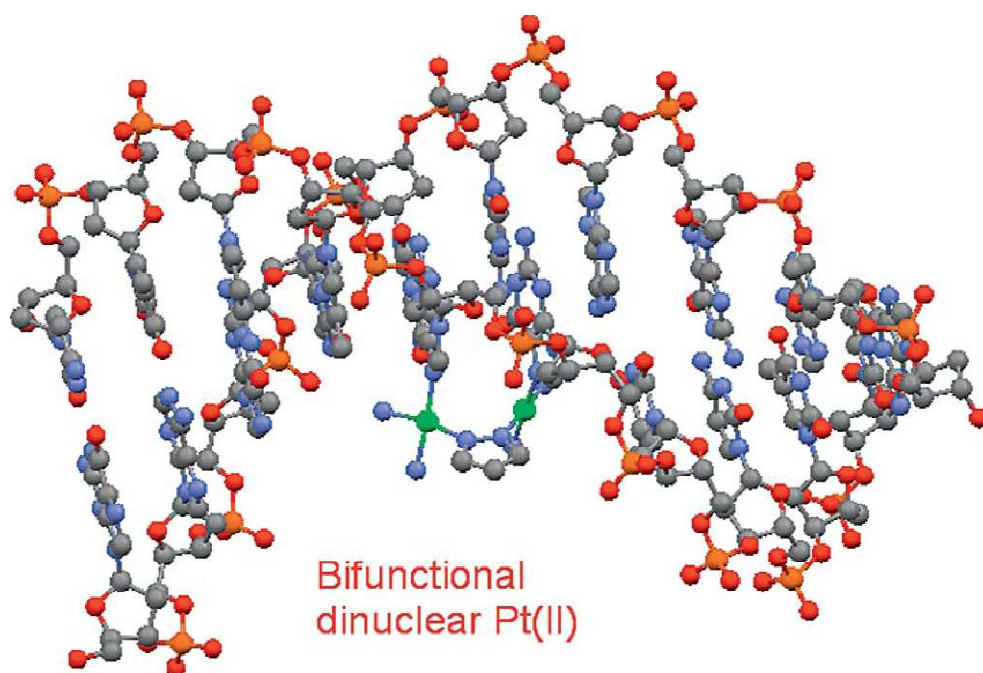
Předpokládal, že tyto komplexy destabilizují DNA v menší míře, a to jak z hlediska termodynamického tak i strukturálního [63]. Z tohoto důvodu se reparační systémy v místě poškození neaktivují a nezmaří tak protinádorovou aktivitu těchto komplexů.

Tyto bifunkční komplexy vytváří zejména vnitřetězcové vazby mezi sousedními guaninovými zbytky (1,2-GG-IAC), což je zároveň také nejvíce zastoupený adukt cisplatinu. Hlavním úkolem této diplomové práce je srovnat termodynamické parametry krátkého fragmentu DNA, který obsahuje vnitřetězcový můstek mezi sousedními zbytky guaninu vytvořený na jedné straně cisplatinou a komplexem AMPZ nebo AMTA na straně druhé.



Obrázek 17: Schematické znázornění 1,2-GG-IAC aduktu po navázání cisplatiny a dvojjaderného komplexu AMPZ vytvořeného na DNA (obdobně AMTA)

Ohyb podélné osy dvojité šroubovice DNA, způsobený navázáním cisplatiny na dva sousední guaniny, je relativně velký (32–34°). Proto byly vyvinuty nové sloučeniny na bázi platiny s azolátovým můstkem. Výše uvedené dvojjaderné komplexy platiny obsahují dva atomy platiny spojené tímto rigidním můstkem. Odstupující ligand je hydroxylová skupina. Jednoduché geometrické úvahy vedly k předpovědi, že po ztrátě OH skupiny se atomy platiny naváží na dva sousední guaniny (N7), což má za následek velmi malé zakřivení dvoušroubovice DNA (obrázek 17, 18) [63].



Obrázek 18: Strukturální změny DNA indukované aduktem dvojjaderného komplexu platiny s rigidním můstkem [63]

Můstky dvojjaderných komplexů platiny na DNA ji rozvíjí asi o 15° , což je velice podobné jako u cisplatin. Podstatný rozdíl je však v tom, že dvojjaderné komplexy indukují minimální úhel ohybu DNA [64].

Také bylo zjištěno, že protinádorová aktivita těchto sloučenin v několika nádorových buněčných liniích je řádově lepší, než je tomu u cisplatin (tabulka 2). Buněčné linie se získávají přímo z nádorových buněk. Buněčná linie MCF7 pochází z buněk nádoru prsu, WIDR z buněk nádoru tlustého střeva, IGROV z nádoru vaječníku, M19 z melanomu, A498 z buněk nádoru ledviny a H226 z buněk nádoru plíce [63].

Hodnota IC_{50} (koncentrace komplexu platiny vyvolávající padesátiprocentní inhibici růstu buněk) je měřítkem toho, jak je dané léčivo efektivní. Tedy kolik je zapotřebí určitého léčiva k inhibici daného biologického procesu o polovinu.

	MCF7	WIDR	IGROV	M19	A498	H226
Cisplatina	2,33	3,22	0,56	1,86	7,51	10,9
Pt-pyrazol	0,06	0,12	0,59	0,05	0,53	0,68
Pt-triazol	0,09	0,40	0,13	0,19	1,24	2,72

Tabulka 2: IC₅₀ hodnoty sloučenin na bázi platiny u některých buněčných linií [63]

Z tabulky 2 je patrné, že pro téměř všechny uvedené buněčné linie jsou hodnoty IC₅₀ asi desetkrát nižší než u cisplatiny. Následující a pokročilejší studie těchto sloučenin by měly vyjasnit, zda budou uvedené látky vhodné pro klinické testy.

6 MATERIÁLY A METODY

6.1 Použité materiály

Sekvence oligonukleotidů O1 a O2:

O1: 14-mer horní řetězec (top): 5'-CTC TCT **GGT** CTC TC-3'

(Koncentrace: 383,5 pmol/μl)

O2: 14-mer dolní řetězec (bot): 5'-GAG AGA CCA GAG AG-3'

(Koncentrace: 273,6 pmol/μl)

Oligonukleotidy byly zakoupeny od firmy VBC-biotech z Vídně (Rakousko).

Nové dvojjaderné komplexy platiny:

Komplex 1 (AMPZ): [(cis-{Pt(NH₃)₂})₂(μ-OH)(μ-pz)](NO₃)₂

Komplex 2 (AMTA): [(cis-{Pt(NH₃)₂})₂(μ-OH)(μ-tz)](NO₃)₂

Komplexy 1 a 2 byly laskavě poskytnuty prof. Janem Reedijkem z Leidenské univerzity v Nizozemsku.

Chemikálie:

Cisplatina (zakoupena od firmy Sigma Praha)

Deionizovaná MillyQ H₂O

Roztoky pro čištění oligonukleotidů se specifickými adukty na HPLC:

Roztok A: 50 mM NaCl, 10 mM Tris·Cl (pH 7,4)

(Pozn.: Na 500 ml: 6,25 ml 4 M NaCl, 5 ml 1 M Tris·Cl)

Roztok B: 1 M NaCl, 10 mM Tris·Cl (pH 7,4)

(Pozn.: Na 500 ml: 125 ml 4 M NaCl, 5 ml 1 M Tris·Cl)

Roztoky pro polyakrylamidovou gelovou elektroforézu:

1x TBE: 0,1 M Tris, 0,1 M H₃BO₃, 2 mM EDTA (pH 8,0)

Zásobní roztok akrylamidu 40 %: 38 % (w/v) akrylamidu, 2 % (w/v) N, N'-metylen bisakrylamidu

Nanášecí pufr: 80 % neionizovaný formamid, 50 mM Tris-borát (pH 8,3), 1 mM EDTA, 0,1 % (w/v) bromfenolová modř, 0,1 % (w/v) xylencyanolová zeleň

Roztoky pro reakci s dimethylsulfátem (DMS):

DMS-pufr: 50 mM kakodylát sodný, 1 mM EDTA (pH 8,0)

DMS-stop: 1,5 M octan sodný, 0,1 mM EDTA (pH 5,2), 25 µg t-RNA

Roztoky pro diferenční skenovací kalorimetrii (DSC):

Fosfodiesteráza I (SVP = snake venom phosphodiesterase od firmy USB Corp, Cleveland, OH, USA)

Pufr pro reakci s fosfodiesterázou I: 0,1 M Tris (pH 8,9), 0,1 M NaCl, 0,015 M MgCl₂

DSC-pufr: 10 mM fosfátový pufr (pH 7), 150 mM NaCl

Všechny použité chemikálie byly čistoty p. a., při všech experimentech byla použita ultračistá voda (rezistivita 18 MΩ.cm).

6.2 Metody

Experiment probíhal na dvou místech, v Olomouci na Přírodovědecké fakultě Univerzity Palackého a v Brně v Biofyzikálním ústavu Akademie věd České republiky. Na Přírodovědecké fakultě byla provedena modifikace DNA komplexu platiny a separace oligonukleotidů pomocí HPLC. Ostatní práce byla realizována v Biofyzikálním ústavu.

6.2.1 Modifikace DNA komplexu platiny

Horní řetězce oligonukleotidů byly inkubovány cisplatinou (po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C) a komplexy AMPZ a AMTA (po dobu 72 hodin při teplotě 37 °C).

6.2.2 Separace oligonukleotidů nesoucích místně specifický adukt (1,2-GG-IAC můstek) pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC)

Bifunkční adukty byly purifikovány pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie na přístroji HPLC WATERS 1525, s detektorem WATERS 2489 UV/visible Detector

s ionto-výměnnou kolonou MonoQ HR5/5 od firmy GE-Healthcare. A to gradientem koncentrace NaCl, gradientu bylo dosaženo mícháním roztoků A a B (tabulka 3). Detekce byla prováděna při vlnové délce 260 nm v 0,2–0,8 M gradientu chloridu sodného. Průtok byl nastaven na 1ml/min.

Nejdříve byly zaznamenány chromatogramy nemodifikovaných oligonukleotidů. Poté byly postupně zaznamenány analytické chromatogramy oligonukleotidu O1 s navázanou cisplatinou, komplexem AMPZ a komplexem AMTA.

Po 10 minutách promývání kolony neutrálním roztokem byly provedeny postupně nástřiky oligonukleotidů s platinovými komplexy.

Podle rostoucích hodnot absorbance byly postupně odebírány zreagované vzorky DNA s komplexy platiny a byly získány preparativní chromatogramy.

Čas [min]	Roztok A [%]	Roztok B [%]
0	80	20
5	80	20
35	20	80
36	0	100
40	0	100
41	80	20
45	80	20

Tabulka 3: Nastavení gradientu pro vymývání modifikovaných oligonukleotidů

6.2.3 Odsolení přečištěných oligonukleotidů pomocí dialýzy

Dialýza neboli odsolení oligonukleotidů získaných z HPLC byla provedena pomocí dialyzační membrány (MWCO 3500) za účelem odstranění iontů solí přítomných v mobilní fázi. Dialyzační membrána byla před vlastní dialýzou třikrát převařena v destilované vodě kvůli odstranění konzervačních činidel (zhruba 8 minut). Vzorek

oligonukleotidu byl uzavřen v dialyzační membráně pomocí svorek a dialyzován oproti destilované vodě po dobu nejméně 3 hodin. Destilovaná voda byla během této doby vždy po 1 hodině měněna.

6.2.4 Kontrola čistoty modifikovaných oligonukleotidů a charakterizace vzniklých aduktů

6.2.4.1 Polynukleotid kinázová reakce – radioaktivní značení oligonukleotidů

Pro detekci a vizualizaci oligonukleotidů bylo využito radioaktivního záření izotopu fosforu ^{32}P . ^{32}P je radioaktivní s poločasem rozpadu 14,28 dní. Jeho maximální energie je 1,709 MeV a dosah v prostředí vzduchu je 6,1 m.

Při polynukleotid kinázové reakci bylo použito enzymu T4 PNK (T4 polynukleotid kináza), ve výchozí koncentraci 10 jednotek/ μl . Jedna jednotka enzymu měla katalytickou schopnost pro přenos jednoho nanomolu fosfátu z $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ATP* na 5'-OH konec DNA při teplotě 37 °C za dobu 60 minut.

Reakční směs při polynukleotid kinázové reakci o celkovém objemu 10 μl obsahovala 1 μl oligonukleotidu, 1 μl 10x pufru pro polynukleotid kinázu (komerčně dodávaný s enzymem), 3 μl ATP o koncentraci $6 \cdot 10^{-4}$ M, 1 μl radioaktivního ATP*, 1 μl T4 PNK a destilovanou vodu na doplnění objemu do 10 μl . Po smíchání byla reakční směs inkubována 30 minut při 37 °C, poté byla reakce ukončena přidáním vody do konečného objemu 100 μl .

Volné ATP* ve směsi bylo po reakci odstraněno na kolonce se Sephadexem G50-Fine.

6.2.4.2 Separace značených oligonukleotidů gelovou filtrací

Při gelové filtraci se dělí látky podle velikosti. Při průchodu přes kolonu jsou nízkomolekulární látky (volné ATP) zadržovány v porézním gelu náplně a oddělí se tak od vysokomolekulárních látek (oligonukleotid), které projdou volně bez zachycení.

Příprava kolonky: Sephadex G50 necháme nabobtnat v přiměřeném množství destilované vody a naplníme jím kolonku (obal z vhodně upravené kalibrované injekční stříkačky) na objem 1 ml (pomocí centrifugace 4 minuty při 2500 g a opětovném doplnění). Tyto kolonky ekvilibrujeme napipetováním definovaného objemu (100 μl)

vodou a opětovnou centrifugací. Kolonka je ekvilibrována v okamžiku, kdy z ní vyteče stejný objem roztoku, jaký byl na ni nanesen. Poté byla na kolonku nanesena reakční směs po reakci s polynukleotid kinázou a radioaktivně naznačený oligonukleotid byl odseparován od volného, nezreagovaného ATP opětovnou centrifugací za výše uvedených podmínek. Aktivita získaných vzorků byla změřena pomocí Geiger-Müllerova počítače.

6.2.4.3 Reakce s dimethylsulfátem – ověření modifikace atomů N7 guaninových zbytků

Dimethylsulfát (DMS) vyvolává v DNA metylaci těch dusíkatých atomů, které se neúčastní vodíkových vazeb Watson-Crickova systému párování bází. Jedná se zejména o N7 guaninu a v mnohem menší míře i N3 adeninu. Pro svoji vazebnou specifitu je využíván k ověření vazby platinových komplexů na atom N7 guaninu. Působením DMS dojde k alkylaci purinové báze a k labilizaci N-glykosidické vazby cukr-báze. Po přidání horkého piperidinu pak dojde v tomto místě k rozštěpení řetězce. Jsou-li však na N7 kovalentně navázány atomy platiny, nemůže dojít v těchto místech k metylaci a následnému rozštěpení řetězce. Nepřítomnost krátkých fragmentů, vzniklých štěpením původního řetězce v místě guaninových zbytků je tedy důkazem, že tyto guaniny byly kovalentně modifikovány (v našem případě platinovými komplexy) v poloze N7.

Reakční směs sestávající z 1 μ l radioaktivně značeného vzorku oligonukleotidu, 4 μ l DNA z telecího thymu a 200 μ l DMS pufru byla zchlazena na 0 °C, poté přidán 1 μ l DMS. Směs byla po 6 minut inkubována při 25 °C. Reakce byla poté ukončena přidáním 50 μ l DMS stop roztoku. Poté byla DNA přesrážena přidáním 750 μ l EtOH vymraženého na -20 °C a směs byla vymražena (-20 °C, 30 minut). Poté byla provedena centrifugace vymraženého vzorku při 15 000 otáčkách, supernatant byl odstraněn a sediment DNA promyt v 80 % EtOH, vysušen a rozpuštěn v 10 μ l H₂O. Následně byl vzorek naštěpen pomocí horkého piperidinu.

6.2.4.4 Štěpení piperidinem

Podstatou štěpení DNA za použití horkého piperidinu je destabilizace cukerného cyklu v důsledku interakcí bází s chemickými sondami a následné vyštěpení z cukrfosfátové kostry DNA.

Ke vzorku DNA (90 μ l) po reakci s DMS a přesrážení (za účelem odstranění nezreagovaného DMS a složek pufru) bylo přidáno 10 μ l 10 M piperidinu, výsledná koncentrace piperidinu v reakční směsi byla 1 M. Směs byla poté po dobu 30 minut udržována při 90 °C. Poté byl vzorek vysušen vakuovým vymražením (lyofilizací) a dvakrát promyt destilovanou vodou (20 μ l) a vždy znovu vysušen.

6.2.4.5 Odstranění navázané platiny

Aby přítomnost navázaného komplexu platiny neovlivňovala migraci oligonukleotidů nebo jejich případných fragmentů, je třeba po reakci s DMS a piperidinem navázaný komplex platiny odstranit. K odstranění navázané platiny z molekuly DNA bylo využito 0,5 M NaCN. Doba reakce byla 12 hodin při 55 °C. Poté byl NaCN odstraněn ze vzorku srážením pomocí EtOH. Získané vzorky byly analyzovány pomocí elektroforézy v 24 % polyakrylamidovém gelu za denaturačních podmínek.

6.2.4.6 Gelová elektroforéza v denaturačním polyakrylamidovém gelu

Ke kontrole čistoty oligonukleotidů nesoucích místně specifický adukt komplexů platiny i k analýze výsledků experimentů s DMS byla použita vertikální gelová elektroforéza v denaturačním polyakrylamidovém gelu.

K elektroforetickému experimentu bylo použito vysokonapěťového zdroje EC 3000-90 a stojanu pro vertikální elektroforézu vyrobeného v dílnách BFÚ v Brně.

Na přípravu 24 % denaturačního polyakrylamidového gelu byl použit 40 % zásobní roztok akrylamidu (v poměru 38 % akrylamid : 2 % bisakrylamid) s obsahem močoviny 50g/100ml (8 M močovina), dále peroxosíran amonný (APS, 25 % roztok) a N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED). Jako elektrolyt byl použit pufr 1x TBE. Vzorky byly nanášeny na gel po preelektroforéze (30 minut), vlastní elektroforetické dělení probíhalo při napětí 35 W a proudu 16 mA. Vzorky byly na gel nanášeny v nanášecím

denaturačním pufru, který se skládal z 96 % formamidu, 1x TBE, bromfenolové modři (0,1 %) a xylencyanolové zeleně (0,1 %). Elektroforéza probíhala dobu potřebnou k tomu, aby bromfenolová modř uputovala 20 cm od startu, tj. přibližně 2 hodiny.

6.2.4.7 Atomová absorpční spektrometrie (AAS)

Koncentrace platiny ve vzorcích oligonukleotidů modifikovaných studovanými komplexy platiny byla stanovena pomocí bezplamenové atomové absorpční spektrometrii (FAAS) s grafitovou kyvetou.

Princip této metody spočívá v tom, že monochromatické záření Pt lampy s dutou katodou je absorbováno volnými atomy stanovovaného prvku (Pt) v základním stavu. Neabsorbované záření dopadá na detekční zařízení a je převedeno na signál, který je registrován jako absorpce.

Vzorek (20 μ l) je automaticky injikován do grafitové kyvety, která je elektricky žhavena a proplachována inertním plynem. Dojde zde v teplotním gradientu k vysušení, rozložení a atomizaci vzorku. Při tomto procesu je měřen signál odpovídající absorbanci. Součástí tohoto přístroje je Grafit Tube Atomizer 120 a Atomic Absorption AA240Z. Měření bylo provedeno na přístroji Varian AA240Z s grafitovou celou Grafit Tube Atomizer 120 a se Zeemanovou korekcí pozadí.

6.2.4.8 Elektronová absorpční spektrometrie (EAS)

Jde o optickou analytickou metodu využívající interakci elektromagnetického záření se zkoumanou látkou, kdy dochází k přechodům elektronů mezi jednotlivými energetickými hladinami v molekule. V absorpční spektroskopii se měří, jaké množství světla vzorek absorbuje při určité vlnové délce.

Koncentrace oligonukleotidů byla stanovena pomocí měření absorbance. Monochromatický paprsek s intenzitou I_0 (původní intenzita vstupujícího záření) po projití vrstvou prostředí (kyveta s měřeným vzorkem) o tloušťce l (1 cm) mající koncentraci c (jednotkou je $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), změní svoji intenzitu podle Lambert-Beerova zákona:

$$I = I_0 \cdot 10^{-c \cdot l \cdot \varepsilon}$$

Změna intenzity je tedy exponenciální funkcí koncentrace, tloušťky prostředí a molárního absorpčního koeficientu ε (extinkční koeficient, jednotkou je $\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Záporný dekadický logaritmus poměru I/I_0 se nazývá absorbance A :

$$A = -\log \frac{I}{I_0}$$

Spojením této rovnice a definice Lambert-Beerova zákona dostaneme vyjádření lineární závislosti absorbance světla na koncentraci látky:

$$A = c \cdot l \cdot \varepsilon$$

Pro jednotlivé sloučeniny jsou tabelizovány jejich charakteristické hodnoty vlnové délky, při které je absorpce maximální, a hodnoty molárního absorpčního koeficientu pro tuto vlnovou délku. Koncentrace oligonukleotidů byly stanoveny měřením absorbance při vlnové délce 260 nm ($\lambda = 260$ nm), naměřená absorbance se přepočítala na koncentraci dle předešlého vztahu a celkové absorpční koeficienty byly získány pomocí vztahu:

$$\varepsilon_{celk} = n_A \cdot \varepsilon_A + n_G \cdot \varepsilon_G + n_C \cdot \varepsilon_C + n_T \cdot \varepsilon_T$$

kde n je počet bází v řetězci, dolní index A odpovídá adeninu, G guaninu, C cytosinu a T thyminu (tabulka 4). ε je extinkční koeficient odpovídající jednotlivým bázím DNA (tabulka 5). Celkové extinkční koeficienty jsou uvedeny v tabulce 6.

Řetězec	n_A	n_G	n_C	n_T
top	0	2	6	6
bot	6	6	2	0

Tabulka 4: Počet adeninů, guaninů, cytosinů a thyminů v horním a spodním řetězci

ϵ_A	ϵ_G	ϵ_C	ϵ_T
15 400	11 500	7 400	8 700

Tabulka 5: Extinkční koeficienty odpovídající jednotlivým bázím

Oligonukleotid	ϵ [$M^{-1}cm^{-1}$]
top	119 600
bot	176 200

Tabulka 6: Extinkční koeficienty horního a spodního řetězce

Absorbance byla měřena na přístroji Beckman DU-7400. K měření byla používána mikrokyveta o objemu 50 μ l a optické délce 1 cm, vzorky byly měřeny při pokojové teplotě.

Extinkční koeficienty oligonukleotidů byly přepočítány po jejich rozštěpení pomocí SVP (snake venom phosphodiesterase) z původní koncentrace (tabulka 7). Reakce se SVP probíhala asi 40 minut (dokud nepřestala stoupat absorbance) při teplotě 25 °C.

Oligonukleotid	ϵ [$M^{-1}cm^{-1}$]
top	110 770
bot	133 200

Tabulka 7: Extinkční koeficienty horního a spodního řetězce po rozštěpení oligonukleotidů pomocí SVP

6.2.5 Diferenční skenovací kalorimetrie (DSC)

Měření bylo realizováno pomocí přístroje Nano DSC od firmy TA Instruments (Utah, USA). Před měřením byly obě cely promyty detergentem DECON 90 (Decon Laboratories, UK), propláchnuty destilovanou vodou a následně pufrem. Pufř, který byl určený do referenční cely, i měřený vzorek byl před měřením zbaven mikroskopických vzduchových bublin ponecháním v exsikátoru spojeném s vodní vývěvou po dobu asi 10 minut. K oligonukleotidům s navázanými platinovými komplexy byl přidán komplementární řetězec a byla provedena hybridizace. Vytvoření duplexu bylo ověřeno pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie. Ke vzorku bylo přidáno 700 μ l fosfátového pufru, poté byl vzorek s pufrem vložen na 30 minut do třepačky, na 15 minut do degazéru a následně napipetován do samotného diferenčního skenovacího kalorimetru – referenční cely byla naplněna samotným pufrem a druhá cely (vzorková) roztokem měřené DNA s navázanými komplexy platiny o koncentraci 10^{-5} M. Poté byl v měřícím prostoru vyvinut přetlak 300 kPa pomocí teflonového uzávěru. Obě cely byly ekvilibrovány na teplotu 10 °C po dobu asi 15 minut. Teplota byla zvyšována s gradientem 1 °C za minutu až na 90 °C. Po dosažení maximální teploty byl roztok ochlazován se stejným gradientem na počáteční teplotu.

Grafy byly zpracovány a poté z naměřených dat vypočítány příslušné termodynamické parametry (změny entalpie, entropie a volné energie).

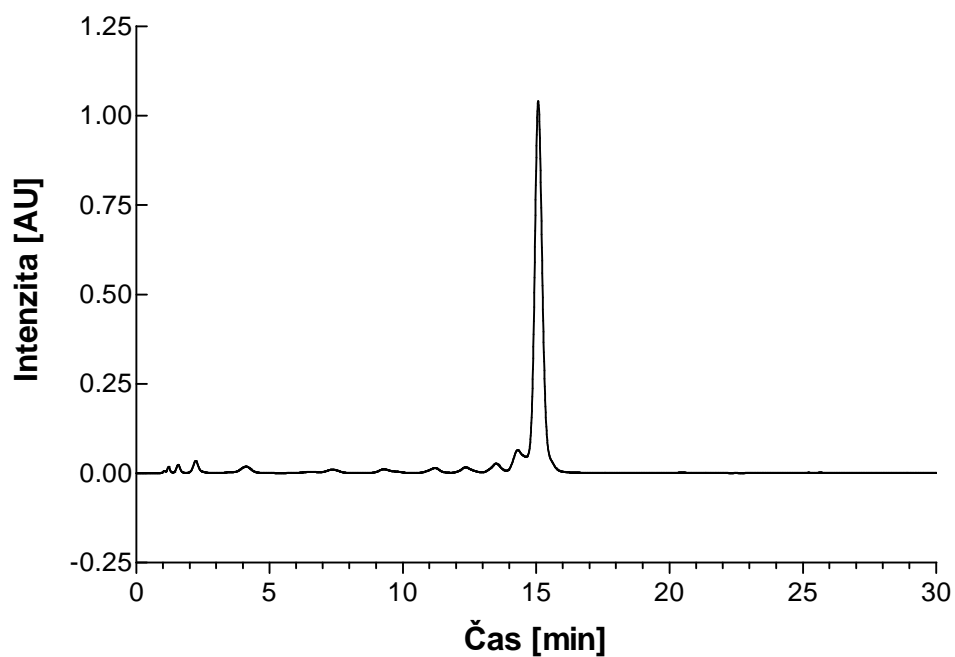
7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Čištění a izolace aduktu cisplatin, AMPZ a AMTA pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie

V případě použití metody HPLC na DNA bylo využito toho, že molekula DNA nese na svojí fosfátové kostře záporný náboj. Na každou bázi připadá jeden záporný náboj, proto různě dlouhé řetězce DNA nesou různě velký záporný náboj. Při průchodu přes kolonu je zachycení molekuly DNA zprostředkováno interakcí vhodné stacionární fáze a nábojů na fosfátové kostře. Použitím mobilní fáze o různé iontové síle lze dosáhnout toho, že je na koloně zachycená DNA uvolňována postupně podle počtu bází a velikosti náboje.

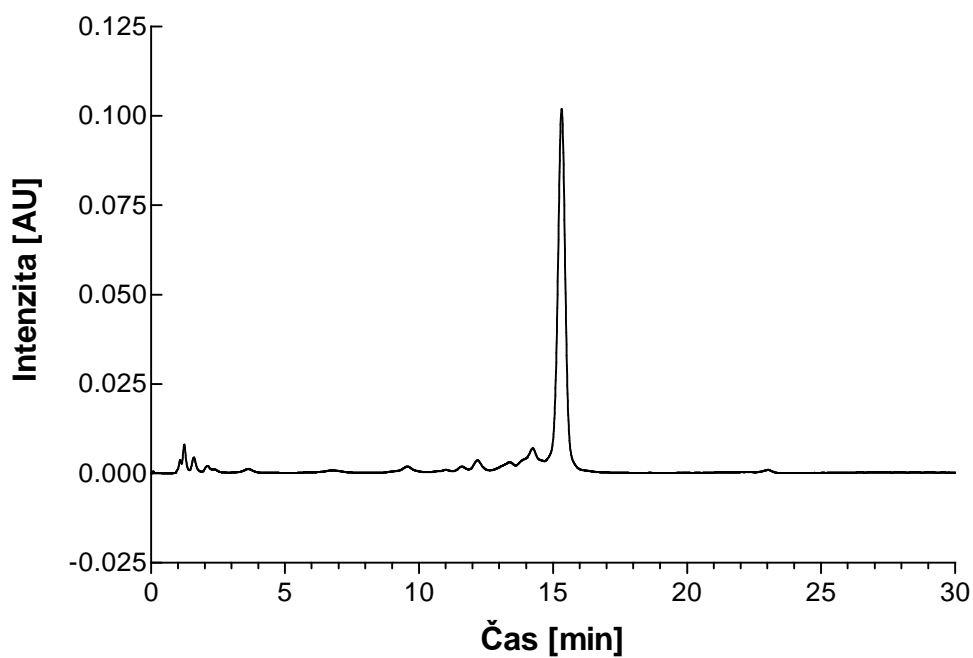
Metoda HPLC byla použita pro izolaci oligonukleotidů obsahujícími můstek vytvořený dvojjadernými komplexy platiny mezi sousedními zbytky guaninu v jednom řetězci. Jednotlivý cyklus trval 45 minut, složky byly separovány při měřené hodnotě absorpce pro 260 nm. Nejdříve byly zaznamenány chromatogramy nemodifikovaných oligonukleotidů (graf 3, 4). Poté byly postupně zaznamenány chromatogramy oligonukleotidu O1 s navázanou cisplatinou (graf 5), navázaným komplexem AMPZ (graf 6) a navázaným komplexem AMTA (graf 7). Poté byly podle rostoucích hodnot absorpance postupně odebírány zreagované vzorky DNA s cisplatinou a s dvojjadernými komplexy platiny AMPZ a AMTA, potřebné pro měření na diferenčním skenovacím kalorimetru.

Oligonukleotid 1



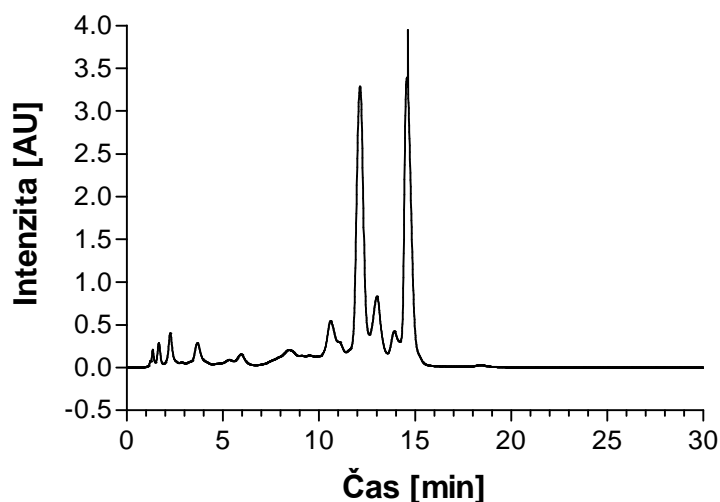
Graf 3: Chromatogram z HPLC – nemodifikovaný oligonukleotid O1
(pík asi v 15. minutě)

Oligonukleotid 2



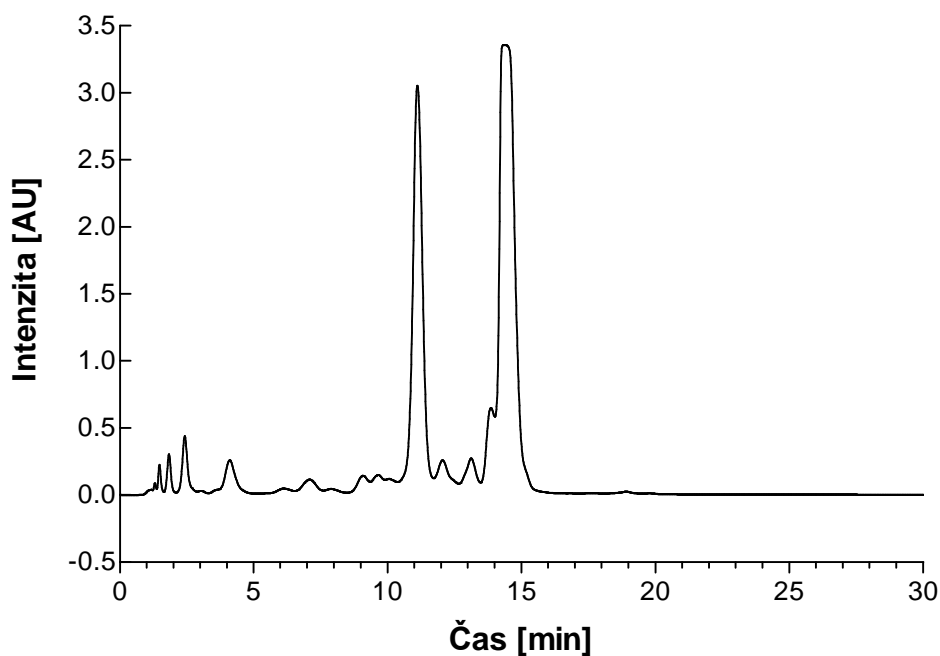
Graf 4: Chromatogram z HPLC – nemodifikovaný oligonukleotid O2
(pík asi v 15. minutě)

Oligonukleotid 1 - cisplatina



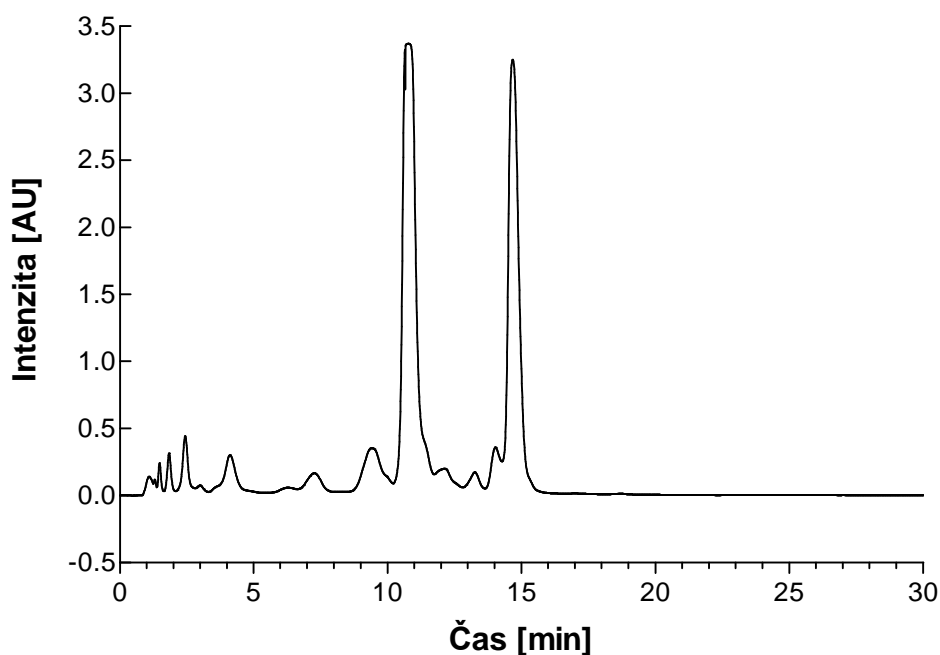
Graf 5: Chromatogram z HPLC – izolace oligonukleotidu O1 s navázaným 1,2-GG-IAC aduktem cisplatiny, cisplatina byla aktivována pomocí AgNO_3 (pík asi ve 12. minutě je modifikovaný oligonukleotid O1 cisplatinou, pík asi v 15. minutě je nemodifikovaný oligonukleotid O1)

Oligonukleotid 1 - AMPZ



Graf 6: Chromatogram z HPLC – izolace oligonukleotidu O1 s navázaným 1,2-GG-IAC aduktem AMPZ (pík asi ve 11. minutě je modifikovaný oligonukleotid O1 komplexem AMPZ, pík asi v 15. minutě je nemodifikovaný oligonukleotid O1)

Oligonukleotid 1 - AMTA

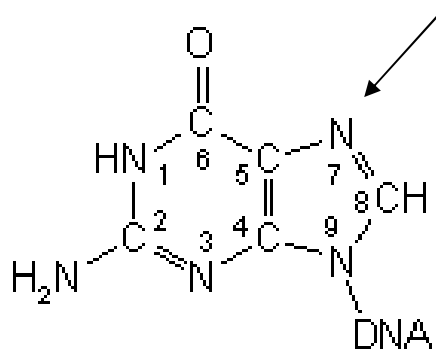


Graf 7: Chromatogram z HPLC – izolace oligonukleotidu O1 s navázáním 1,2-GG-IAC aduktem AMTA

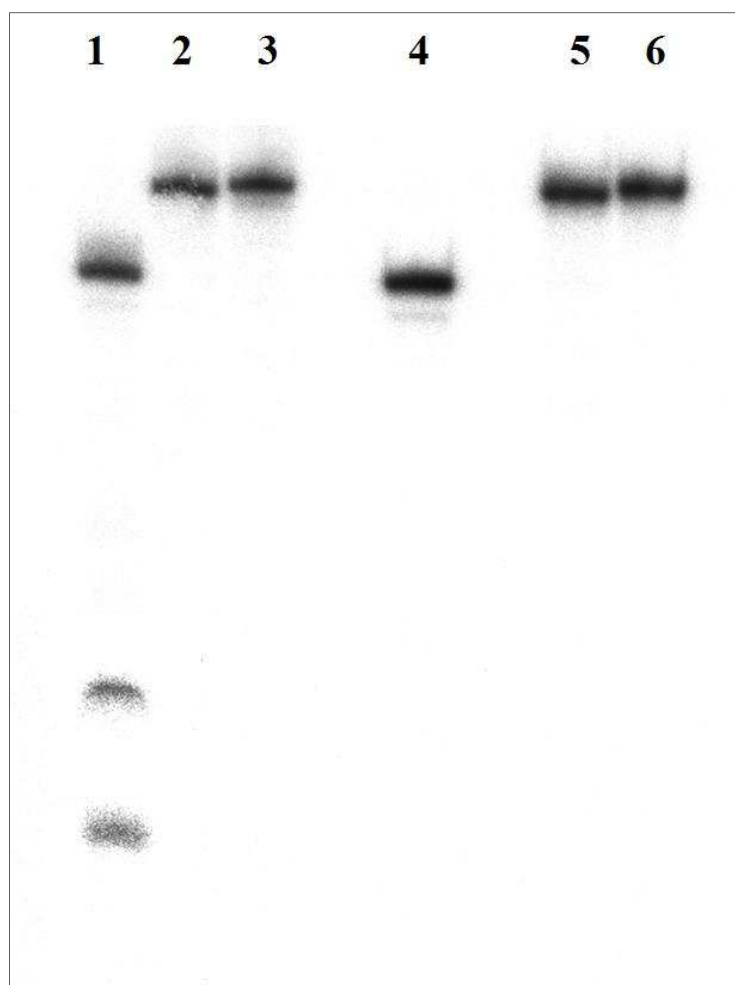
(pík asi ve 11. minutě je modifikovaný oligonukleotid O1 komplexem AMTA, pík asi v 15. minutě je nemodifikovaný oligonukleotid O1)

7.2 Ověření modifikace atomů N7 guaninových zbytků

DMS – dimethylsulfát reaguje s dusíkatými atomy bází. DMS je nejreaktivnější s guaninem na pozici N7 (obrázek 19). Přidáním horkého piperidinu dojde v tomto místě k rozštěpení řetězce oligonukleotidu (obrázek 20, dráha 1). Jestliže jsou však na N7 guaninu navázány komplexy platiny, nedojde k reakci s DMS a k následnému rozštěpení řetězce (obrázek 20, dráha 2 a 3), poté lze snadno odlišit nemodifikované a modifikované vzorky.



Obrázek 19: Guanin s vyznačeným atomem dusíku v poloze 7



Obrázek 20: Autoradiogram polyakrylamidového gelu po elektroforéze

Popis drah:

1 – kontrola s DMS, 2 – AMPZ s DMS, 3 – AMTA s DMS

4 – kontrola bez DMS, 5 – AMPZ bez DMS, 6 – AMTA bez DMS

Touto reakcí s DMS bylo prokázáno, že nové dvojjaderné komplexy platiny AMPZ a AMTA byly navázány na N7 dvou sousedních guaninových zbytků.

Dále byla ověřena úroveň platinace pomocí atomové absorpční spektrometrie, tj. ověření, zda je na jeden oligonukleotidový řetězec (oligo) navázána pouze jedna molekula komplexu platiny. Výsledky byly následující:

AMTA: oligo = 1,89:1

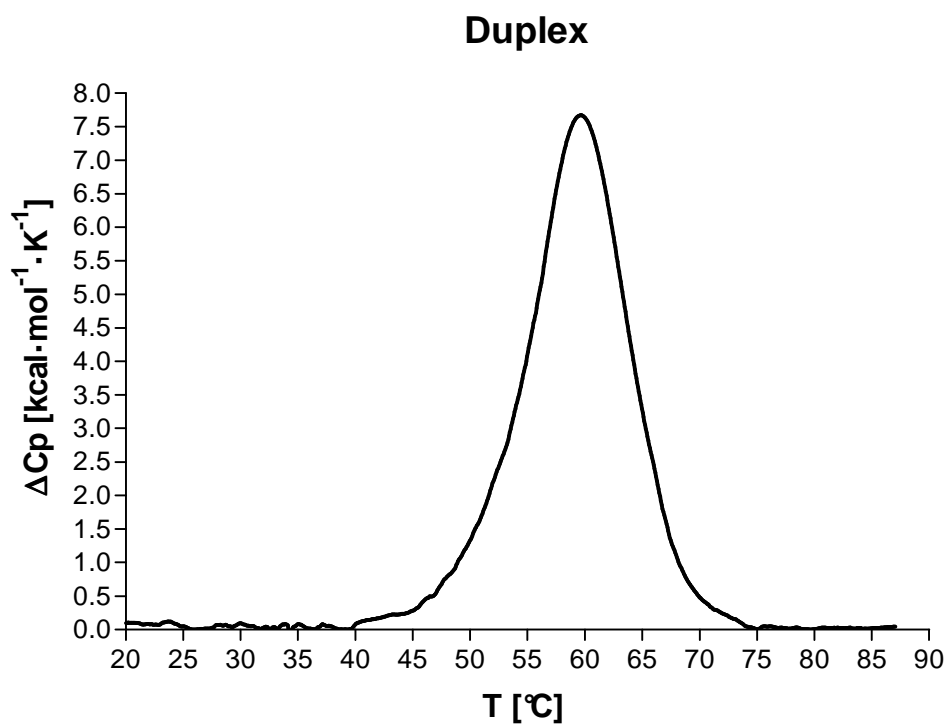
AMPZ: oligo = 1,84:1

Cisplatina: oligo = 1,16:1

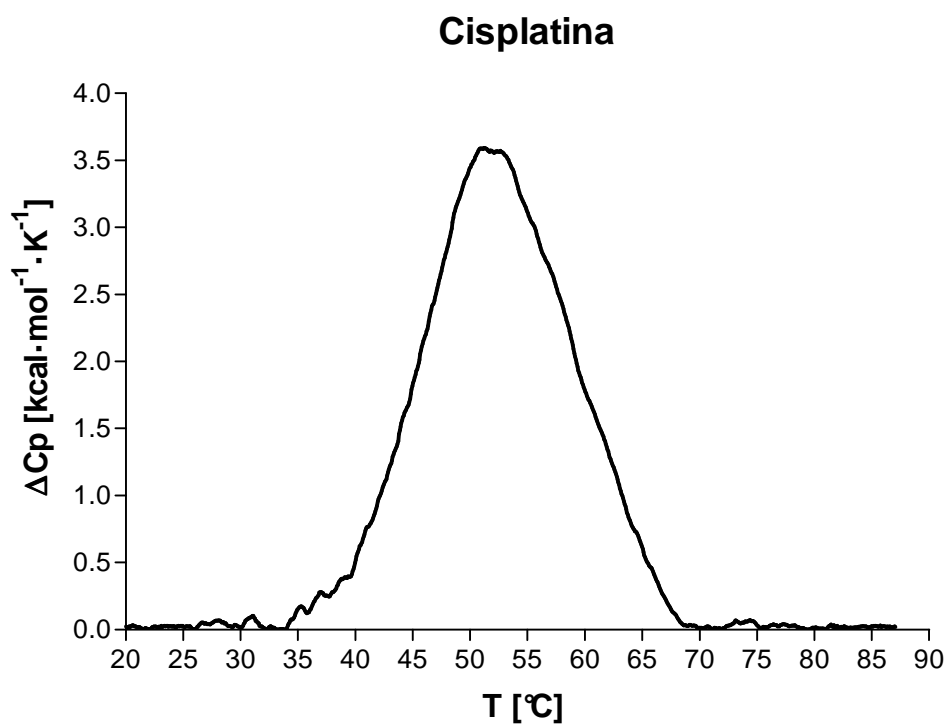
Při stanovení se bral pro určení koncentrace oligonukleotidu teoreticky vypočítaný absorpční koeficient, který nezahrnuje příspěvek navázaného komplexu platiny ani jeho vliv na „stacking“ interakce bází. Z tohoto důvodu hodnoty nejsou přesně 1:1.

7.3 Charakterizace vlivu vnitrořetězcové vazby cisplatiny a nových dvojjaderných komplexů platiny AMPZ a AMTA na termodynamické vlastnosti DNA

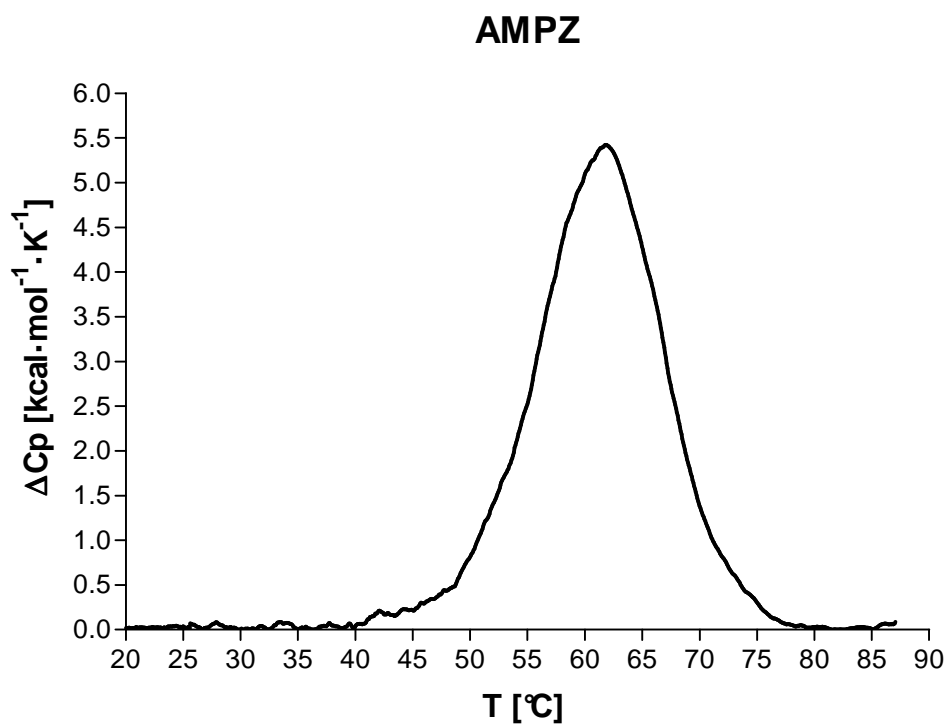
Pomocí diferenční skenovací kalorimetrie byly získány termogramy nemodifikovaného duplexu (graf 8) a duplexu obsahujícího vnitrořetězcový můstek vytvořený mezi sousedními zbytky guaninu cisplatinou (graf 9) a komplexy AMPZ (graf 10) a AMTA (graf 11). Analýzou termogramů byly pak určeny hodnoty termodynamických parametrů, které byly poté navzájem srovnány, což bylo hlavním úkolem této diplomové práce.



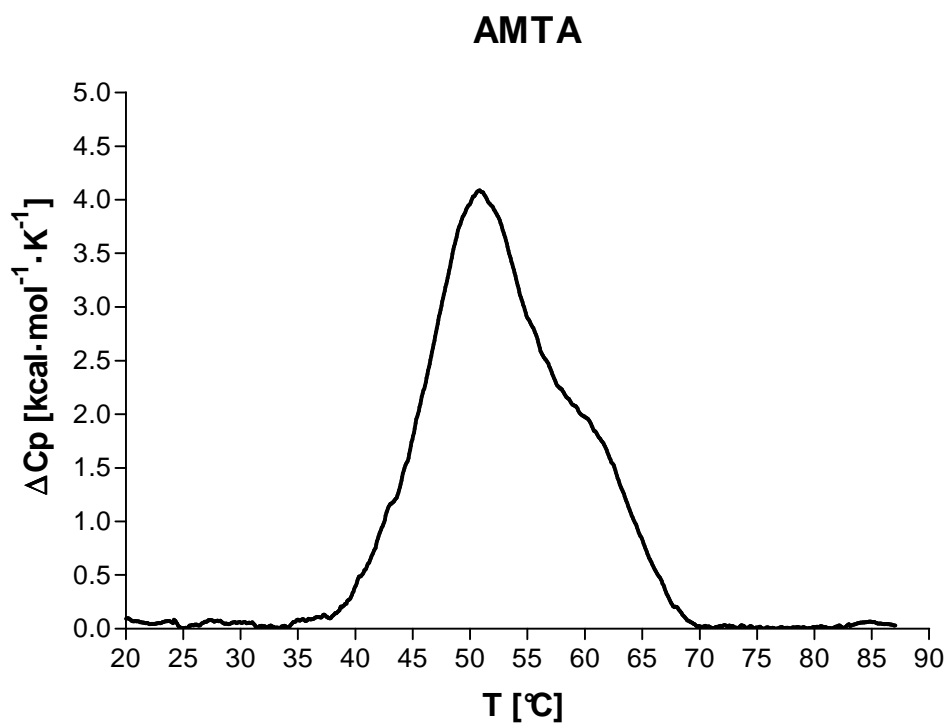
Graf 8: Závislost změny tepelné kapacity na teplotě pro nemodifikovaný duplex



Graf 9: Závislost změny tepelné kapacity na teplotě pro modifikovaný duplex obsahující 1,2-GG-IAC adukt cisplatin



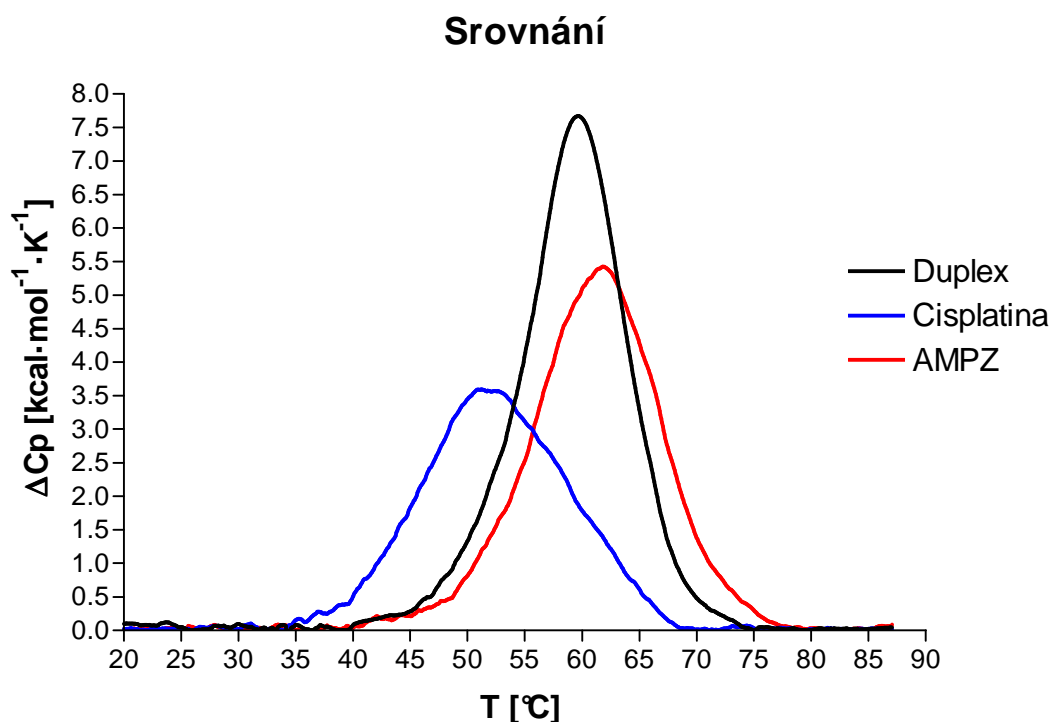
Graf 10: Závislost změny tepelné kapacity na teplotě pro modifikovaný duplex obsahující 1,2-GG-IAC adukt AMPZ



Graf 11: Závislost změny tepelné kapacity na teplotě pro modifikovaný duplex obsahující adukt AMTA

Analýza těchto termogramů umožnila zjistit, jakým způsobem přítomnost můstků platinových komplexů cisplatinu, AMPZ a AMTA ovlivňuje termodynamickou stabilitu duplexu DNA. Můstky těchto komplexů mohou ovlivnit fyzikální vlastnosti DNA v okolí vazby a tím ovlivnit energii potřebnou na oddělení komplementárních řetězců.

Nejprve byly srovnány hodnoty termodynamických parametrů nemodifikovaného duplexu s hodnotami termodynamických parametrů duplexu s navázanou cisplatinou a dvojjaderným komplexem platiny AMPZ (graf 12).

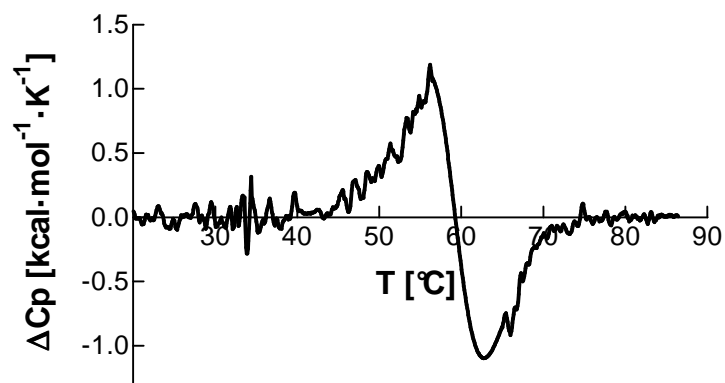


Graf 12: Termogramy naměřené pomocí DSC pro nemodifikovaný duplex DNA a duplex DNA modifikovaný cisplatinou a AMPZ (závislost změny tepelné kapacity na teplotě)

Se zvyšující teplotou dochází k postupnému narušování párování bází v DNA, až při určité teplotě dojde k úplné denaturaci DNA. Teplota, při níž došlo k denaturaci 50 % dvoušroubovicových molekul DNA, se nazývá teplota tání. Podle teploty tání lze určit termodynamickou destabilizaci DNA s navázanými komplexy platiny – cisplatinou a novým dvojjaderným komplexem AMPZ .

Teploty tání T_m (melting temperature) těchto komplexů byly určeny pomocí 1. derivace naměřených křivek v programu GrafPad (graf 13, 14, 15).

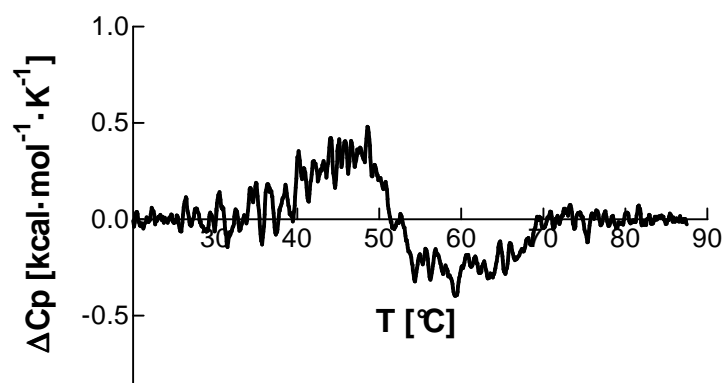
Duplex-derivace



Graf 13: Nemodifikovaný duplex

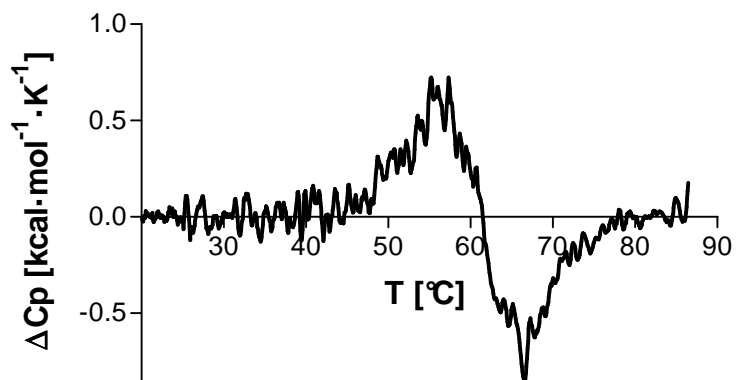
1. derivace křivky z grafu 8 ($T_m = 59,8$ °C)

Cisplatina-derivace



Graf 14: 1. derivace křivky z grafu 9 ($T_m = 52,3$ °C)

AMPZ-derivace



Graf 15: 1. derivace křivky z grafu 10 ($T_m = 61,7$ °C)

Z termogramů získané termodynamické parametry – teploty tání (T_m), změny entalpie (ΔH), entropie (ΔS) a volné energie (ΔG_0^{25}) doprovázející tání jak pro nemodifikovaný duplex tak modifikovaný duplex cisplatinou nebo komplexem AMPZ, jsou uvedeny v následující tabulce 8. V další tabulce 9 jsou uvedeny hodnoty rozdílů teplot tání, změn entalpie, entropie a volné energie. Když hodnota ΔH klesá, dochází k destabilizaci. Pokud roste míra neuspořádanosti systému, klesá ΔS .

Oligonukleotid	T_m [°C]	ΔH [kcal·mol ⁻¹]	ΔS [cal·mol ⁻¹ ·K ⁻¹]	ΔG_0^{25} [kcal·mol ⁻¹]
Nemodifikovaný	59,8	87,7	263,6	9,1
Modifikovaný cisplatinou	52,3	57,4	177,0	4,6
Modifikovaný AMPZ	61,7	74,2	221,6	8,1

Tabulka 8: Hodnoty teplot tání, změn entalpie, entropie a volné energie doprovázející tání pro nemodifikovaný duplex, duplex obsahující vnitrořetězcový můstek s cisplatinou a duplex obsahující tentýž můstek s AMPZ

Hodnoty ΔH a ΔS představují průměry odvozené ze tří nezávislých měření. Relativní chyby měření byly následující: T_m (0,5 °C), ΔH (2 %), ΔS (3 %), ΔG_0^{25} (3 %).

Oligonukleotid	ΔT_m [°C]	$\Delta\Delta H$ [kcal·mol ⁻¹]	$\Delta\Delta S$ [cal·mol ⁻¹ ·K ⁻¹]	$\Delta\Delta G_0^{25}$ [kcal·mol ⁻¹]
Modifikovaný cisplatinou	-7,5	-30,3	-86,6	-4,5
Modifikovaný AMPZ	1,9	-13,5	-42,0	-1

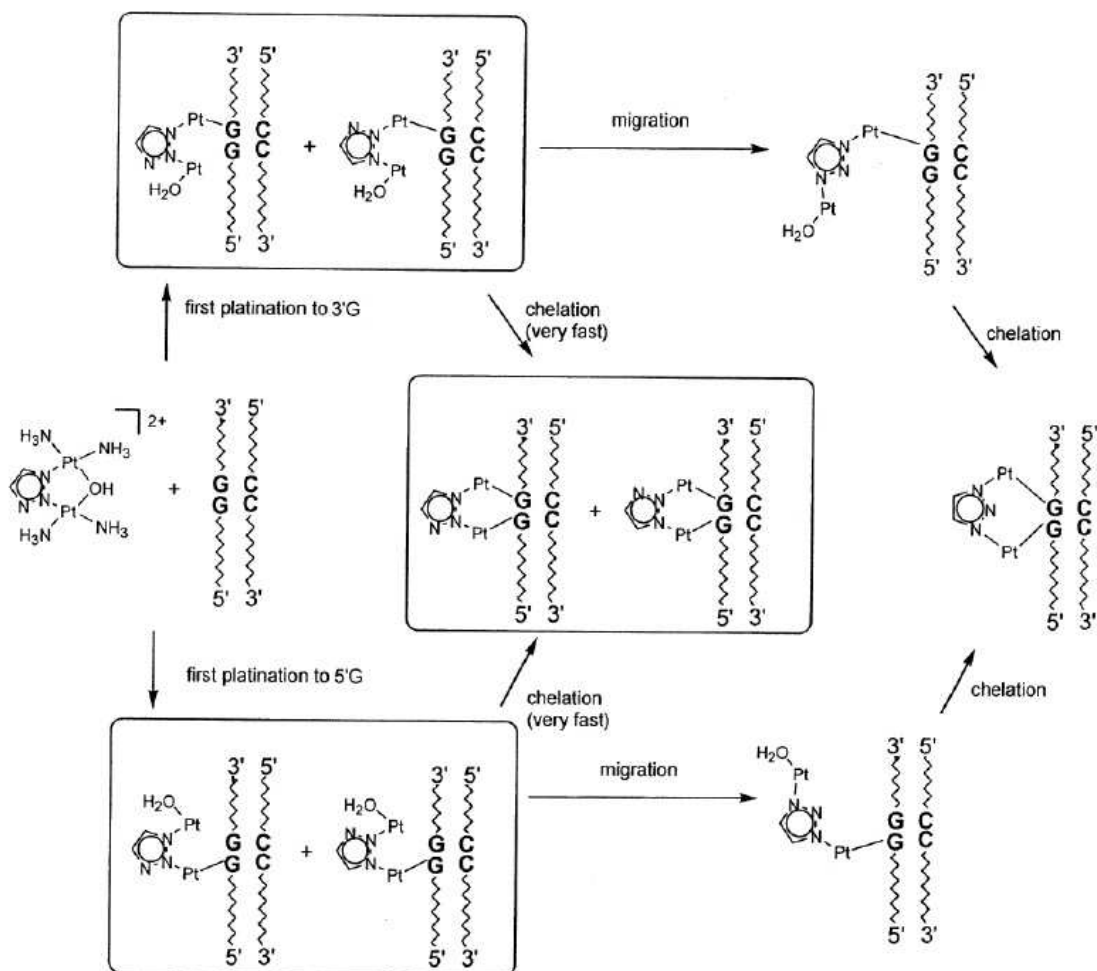
Tabulka 9: Hodnoty rozdílů změn teplot tání, změn entalpie, entropie a volné energie spojené s táním duplexu obsahující vnitrořetězcový můstek s cisplatinou a duplex obsahující tentýž můstek s AMPZ

„ $\Delta\Delta$ “ parametry byly vypočteny odečtením příslušné hodnoty naměřené pro kontrolní, nemodifikovaný duplex od hodnoty naměřené pro duplex obsahující můstek komplexu platiny.

Analýza termodynamických parametrů poskytuje několik zajímavých informací. V první řadě vznik můstku cisplatiny snížil tepelnou stabilitu (teplotu tání) duplexu výrazně (o 7,5 °C), zatímco stejný můstek komplexu AMPZ teplotu tání nepatrně zvýšil (o 1,9 °C). Avšak teplota tání není termodynamický parametr. Diferenční skenovací kalorimetrie je metoda, která může poskytnout kvantitativní, na modelu nezávislé charakteristiky efektů lézí na termodynamiku duplexu. Data získaná pomocí diferenční skenovací kalorimetrie ukazují, že vznik můstku cisplatiny i AMPZ snížil entalpii tání duplexu. Jinými slovy vnitrořetězcové můstky obou komplexů entalpicky destabilizovaly duplex. Dále vznik můstku cisplatiny a komplexu AMPZ vyvolal podstatný pokles entropie tání duplexu. Jinými slovy můstky cisplatiny a komplexu AMPZ zvýšily entropii duplexu. Takto čistý výsledek entalpických a entropických efektů je, že vznik vnitrořetězcových můstků obou komplexů vedl k celkovému poklesu volné energie tání duplexu při 25 °C ($\Delta\Delta G_0^{25}$), přičemž tato destabilizace duplexu byla entalpického původu. V tomto ohledu můstek vytvořený cisplatinou byl výrazně efektivnější, zatímco můstek komplexu AMPZ termodynamicky destabilizoval duplex pouze nepatrně.

Vznik vnitrořetězcového můstku vytvořeného dvojjaderným komplexem platiny AMTA měl však za následek zajímavý jev – z grafu 11 je patrné, že průběh výsledného termogramu duplexu obsahujícího můstek tohoto komplexu nebyl jednoduchý – byl zjevně superpozicí dvou termogramů. Jinými slovy průběh tohoto termogramu by mohl být vysvětlen existencí dvou různých produktů, které vznikly při modifikaci duplexu komplexem AMTA a které nebylo možné chromatograficky oddělit. Tuto hypotézu se nepodařilo dostupnými separačními technikami ověřit, nicméně její oprávněnost je podložena dříve zveřejněnými výsledky [65, 66, 67]. Bylo ukázáno, že jeden typ vnitrořetězcového můstku může obsahovat atomy platiny komplexu AMTA koordinované k atomům N1 a N2 1,2,3-triazolátového kruhu a druhý typ s atomy platiny koordinovanými k atomům N2 a N3 1,2,3-triazolátového kruhu. Bylo také ukázáno, že reakce komplexu AMTA obsahujícího triazolátový ligand s guaninovými zbytky zahrnuje izomerizační reakci. Po první substituci atomem N7 guaninového

zbytku atom platiny původně koordinovaný k atomu N2 1,2,3-triazolátového kruhu může také migrovat z atomu N2 na atom N3. Tato vlastnost komplexu AMTA umožňuje ještě vznik třetího typu vnitřetězcového můstku mezi dvěma sousedními guaninovými zbytky s atomy platiny koordinovaným k atomům N1 a N3 1,2,3-triazolátového kruhu (obrázek 21).



Obrázek 21: Schéma reakce komplexu AMTA s duplexem obsahujícím sekvenci -GG- (pro zjednodušení jsou vynechány amino ligandy)

8 ZÁVĚR

Provedené studie nových dvojjaderných komplexů platiny s azolátovým můstkem, v rámci této diplomové práce, byly realizovány poprvé.

Cílem diplomové práce bylo zjistit, zda modifikace DNA novými protinádorově účinnými dvojjadernými komplexy platiny s pyrazolátovým můstkem (AMPZ) a 1,2,3-triazolátovým můstkem (AMTA) vedoucí ke vzniku vnitrořetězcového můstku mezi sousedními guaninovými zbytky ovlivňuje termodynamickou stabilitu DNA výrazně méně než modifikace DNA stejným můstkem vytvořeným konvenční cisplatinou. Tato informace je důležitá z hlediska ověření hypotézy, podle které hlavní adukty vytvořené na DNA novými dvojjadernými komplexy platiny narušují konformaci DNA a tím také snižují termodynamickou stabilitu DNA výrazně méně než stejné adukty konvenční cisplatinou.

Dvojjaderný komplex platiny AMPZ:

Studium vlivu vazby dvojjaderného komplexu AMPZ na termodynamickou stabilitu DNA pomocí diferenční skenovací kalorimetrie v této diplomové práci prokázalo, že vnitrořetězcové můstky vytvořené v DNA tímto komplexem vyvolává výrazně menší termodynamickou destabilizaci DNA ve srovnání s destabilizací způsobenou můstkou cisplatinou.

Díky minimální deformaci a tedy nižší destabilizaci DNA po navázání komplexu AMPZ na DNA není tato DNA rozpoznávána buněčnými opravnými mechanismy, které mohou negativně ovlivnit protinádorovou aktivitu tohoto dvojjaderného komplexu platiny.

Termodynamické parametry, které charakterizují vliv cisplatinu a dvojjaderného komplexu platiny AMPZ na energetické vlastnosti DNA mohou být využity pro určování faktorů ovlivňujících rozpoznání a vazbu modifikované DNA specifickými proteiny, které výrazně ovlivňují protinádorový účinek platinových cytostatik.

Dvojjaderný komplex platiny AMTA:

Podobnou analýzu však nebylo možné provést v případě můstků vytvořených v DNA dvojjaderným komplexem AMTA, neboť modifikace duplexu DNA tímto komplexem vedla patrně ke vzniku dvou různých produktů, které nebylo možné chromatograficky oddělit.

Vzhledem k potvrzení hypotézy se nové dvojjaderné komplexy platiny jeví jako atraktivní pro další studium jejich vlastností. Proto věřím, že výsledky uvedené v této práci budou sloužit jako první podklad pro další výzkum těchto komplexů platiny, které byly použity v této diplomové práci.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] W.B. Peters, S.P. Edmondson, J.W. Shriver, *Biochemistry* 44 (2005) 4794-4804
- [2] Y. Zhang, Z. Xi, R.S. Hegde, Z. Shakked, D.M. Crothers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004)8337-8341
- [3] Rossenberg, B., Lippert, B. (1999) *Cisplatin-Chemistry and biochemistry of leading anticancer drug*, Wiley-VCH, Zurich, 3-30
- [4] Villani, G., Le Gac, N. T., Hoffmann, J. S., Lippert, B. (ed.) (1999) *Cisplatin – Chemistry and biochemistry of the leading anticancer drug*, Willey – VCH, Weinheim
- [5] Yarema, K. J., Lippard, S. J., Esigmann, J. M. (1995) *Nucleic Acids Res.*, 23, 4066-4072
- [6] Reedijk, J. (1996) *Chem. Commun.*, 801-806
- [7] Brabec, V., Kašparkova, J. (2005) Perez-Martin, J.-M., Fuertes, M. A. and Alonso, C. (eds.), *Metal Compounds in Cancer Chemotherapy. Research Signpost, Trivandrum, Kerala (India)*, pp. 187-218
- [8] Natile, G., Coluccia, M. (1999) *Topics in biological inorganic chemistry*, Springer, 73
- [9] Harrap, K. R. (1985) *Cancer Treat. Rev.*, 12, 21-33
- [10] O'Dwyer, P. J., Stevenson, J. P., Johnson, S. W., Lippert, B. (ed.) (1999) *Cisplatin*
- [11] *Chemistry and biochemistry of leading anticancer drug*, Wiley-VCH, Zurich, 31-72
- Tashiro, T., Kawada, Y., Sakurai, Y., Kidani, Y. (1989) *Biomedical pharmacotherapy*, 43, 251-275
- [12] Lokich, J., *Cancer Invest.*, 2001. 19(7): p. 756-760
- [13] Rixe, O., et al., *Biochemical Pharmacology*, 1996. 52(12): p. 1855-1865
- [14] Woynarowski, J. M., Faivre, S., Herzig, M. C. S., Arnett, B., Chapman, W. G., Travino, A. V., Raymond, E., Chaney, S. G., Vaisman, A., Varchenko, M., Juniewicz, P. E. (2000) *Molecular pharmacology*, 58, 920-935
- [15] André, T., et al., *New England J. Med.*, 2004. 350: p. 2343-2351
- [16] Farrell, N. P., Sigel, A., Sing, H., Dekker, M. (2004) *Metal ions in biological systems*, Basel, 42, 251-254
- [17] Brabec, V. (2002) in *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, ed. Moldave, K. (Academic Press Inc, San Diego/CA), 71, 1-68
- [18] Farrel, N., Appleton, T. G., Qu, Y., Roberts, J. D., Fontes, A. P. S., Skov, K. A., Wu. P. and Zou, Y. (1995) *Biochemistry*, 34, 15480-15486

- [19] Qu, Y., Bloemink, M. J., Reedijk, J., Hambley, T. W., Farrel, N. (1996) *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 9307-9313
- [20] Cotton, F., G. Wilkinson, and P.L. Gaus, *Basic Inorganic chemistry*. 1986, New York: John Wiley&Sons
- [21] Lipard, S.J. and J.M. Berg, *Principles of Bioorganic chemistry*. 1994, Mill Valley CA: University science Books
- [22] Holler, E., *Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*, ed. B.K. Keppler. 1993, Weinheim: VCH. 37
- [23] Eastman, A., et al., *Pharmacol. Ther.*, 1987. 34: p. 155
- [24] Martin, R.B., *Cisplatin-Chemistry and Biochemistry of the Leading Anticancer drug*, ed. B. Lippert. 1999, Weinheim: Willey-WCH
- [25] Eastman, A., The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. *Pharmacol. Ther.*, 1987. 34: p. 155-166
- [26] Ishikawa, T. , et al., *J. Biol. Chem.*, 1993. 268: p. 20116
- [27] Dedon, P.C. , et al., *Biochem.Pharmacol.*, 1987. 36:p. 1955
- [28] Just, G., Holler, E. (1989) *Cancer. Res.*, 47, 388-395
- [29] Rosypal, S., *Úvod do molekulární biologie Díl První*. 1998, Brno: Rosypal, S.
- [30] Malinge, J. , et al., *Biochemistry*, 1992. 31: p. 12397
- [31] Vrana, O., Boudny, V., Brabec, V., (1996) *Nucleic Acids Res.*, 24, 3918-3925
- [32] Malinge, J. M., Perez, C., Leng, M. (1994) *Nucleic Acids Res.*, 22, 3834-3839
- [33] Cohen, G. L., Bauer, W. R., Barton, J. K. & Lippard, S. J. (1979) *Science* 203, 1014-1016
- [34] Poklar, N., Pilch, D. S., Lippard, S. J., Redding, E. A., Dunham, S. U. & Breslauer, K. J. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 7606-7611
- [35] Pilch, D. S., Dunham, S. U., Jamieson, E. R., Lippard, S. J. & Breslauer, K. J. (2000) *J. Mol. Biol.* 296, 803-812
- [36] Kankia, B. I., Soto, A. M., Burns, N., Shikiya, R., Tung, C. S. & Marky, L. A. (2002) *Biopolymers* 65, 218-227
- [37] Malina, J., Hofr, C., Maresca, L., Natile, G. & Brabec, V. (2000) *Biophys J.* 78, 2008-2021
- [38] Hofr, C. & Brabec, V. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 9655-9661
- [39] Farell, N., Qu, Y., Feng, L., Van Houten, B. (1990) *Biochemistry*, 29, 9522-9531
- [40] Prenzler, P. D., McFayden, W. D. (1997) *J. Inorg. Biochem.*, 68, 279-282

- [41] Žaludova, R., Žakovska, A., Kašparkova, J., Balcarova, Z., Kleinwachter, V., Vrana, O., Farrell, N., Brabec, V. (1997) *Eur. J. Biochem.*, 246, 508-517
- [42] Kašparkova, J., Novakova, O., Vrana, O., Farrell, N., Brabec, V. (1999) *Biochemistry*, 38, 10997-11005
- [43] Fichtinger-Schepman, A. M. J., van der Veer, J. L., den Hartly, J. H. J., Lohman, P. H. M., Reedijk, J. (1985) *Biochemistry*, 24, 707-713
- [44] Missura, M., Buterin, T., Hindger, R., Hubscher, U., Kašparkova, J., Brabec, V., Naegeli, H. (2001) *EMBO J.*, 20, 3554-3564
- [45] Turci, J. J., Henkels, M., Hermanson, I. L., Patrick, S. M. (1999) *J. Inorg Biochem.*, 77, 83-87
- [46] Yamada, M., O'Regan, E., Brown, R., Karran, P. (1997) *Nucleic Acids Res.*, 25, 491-495
- [47] Kašparkova, J., Brabec, V. (1995) *Biochemistry*, 34, 12379-12387
- [48] Zamble, D. B., Lippard, S. J. (1999) *Cisplatin-Chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug*, VHCA, Wiley-VCH, Zurich, Weinheim, 73-89
- [49] Tinoco, I. J., Sauer, K., Wang, J. C. (1995) *Physical Chemistry*, Prentice-Hall, New Jersey
- [50] Bellon, S. F., Coleman, J. H., Lippard, S. J. (1991) *Biochemistry* 30, 8026-8035
- [51] Ushay, H. M., Santella, R. M., Caradonna, J., P., Grunberg, D., Lippard, S. J. (1982) *Nucleic Acids Res.* 10, 3573-3588
- [52] Scanlon, K. J., Kashani-Sabet, M., Tone, T., Funato, T. (1991) *Pharmac. Ther.*, 52, 385-410
- [53] Sancar, A. (1995) *Journal of Biological Chemistry* 270, 15915-15918
- [54] Tinoco, I. J., Sauer, K., Wang, J. C. (1995) *Physical Chemistry*, Prentice-Hall, New Jersey
- [55] Halliday, D., Resnick, R., Walker, J. (2000) *Fyzika, Část 2 – Mechanika, Termodynamika*, Prometheus Brno
- [56] Saenger, W. (1983) *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer-Verlag, New York, 117
- [57] Kalous, V., Pavlíček, Z., (1980) *Biofyzikální chemie*, SNTL Praha
- [58] Mrevlishvili, G. M., Razmadze, G. Z., Mdzinarashvili, T. D., Metreveli, N. O., Kakabadze, G.R. (1994) *Thermochimica Acta*, 274, 37-43
- [59] Mrevlishvili, G. M., Metreveli, G. Z., Razmadze, G. Z., Mdzinarashvili, T. D., Kakabadze, G.R., Khvedelidze, M. M. (1998) *Thermochimica Acta*, 308, 41-48

- [60] Owczarzy, R., et al., *Biopolymers*, 1997. 44(3): p. 217
- [61] Plotnikov, V., Brandts, J. M., Lin, L. L., Brandts, J. F. (1997) *Anal. Biochem.*, 250, 237-244
- [62] Cadburz, J. E., Chowdhry, B. Z. (1998) *Biocalorimetry Applications of calorimetry in the Biological Sciences*, John Wiley & Sons
- [63] Reedijk, J., (2009) *Platinum Anticancer Coordination Compounds: Study of DNA Binding Inspires New Drug Design*, *Eur. J. Chem.*, 1303-1312
- [64] Teletchéa, S., Komeda S., et al., (2006) A Pyrazolato-Bridged Dinuclear Platinum(II) Complex Induces Only Minor Distortions upon DNA-Binding, *Chem. Eur. J.*, 3741-3753
- [65] Komeda, S., Yamane, H., Chikuma, M. and Reedijk, J. (2004) A kinetic study on the reactions of azolato-bridged dinuclear platinum(II) complexes with guanosine 5'-monophosphate. *Eur J Inorg Chem*, 4828-4835
- [66] Komeda, S., Lutz, M., Spek, A.L., Yamanaka, Y., Sato, T., Chikuma, M. and Reedijk, J. (2002) A novel isomerization on interaction of antitumor-active azole-bridged dinuclear platinum(II) complexes with 9-ethylguanine. Platinum(II) atom migration from N2 to N3 on 1,2,3-triazole. *J Am Chem Soc*, **124**, 4738-4746
- [67] Komeda, S., Bombard, S., Perrier, S., Reedijk, J. and Kozelka, J.F. (2003) Kinetic study of azole-bridged dinuclear platinum(II) complexes reacting with a hairpin-stabilized double-stranded oligonucleotide. *J Inorg Biochem*, **96**, 357-366