

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra biofyziky



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studium interakce nového biologicky aktivního komplexu iridia s DNA

Vypracovala: Karolína Vavrdová

Studijní obor: Biofyzika

Vedoucí bakalářské práce: Prof. RNDr. Jana Kašpárková, Ph.D.

Olomouc 2018

Poděkování:

Děkuji vedoucí bakalářské práce Prof. RNDr. Janě Kašpárkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a trpělivost při psaní této bakalářské práce.

Tato práce vznikla s finanční podporou projektu IGA _PrF_2018_022.

Čestné prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Prof. RNDr. Jany Kašpárkové, Ph.D. a za použití literatury uvedené v závěru práce.

V Olomouci dne.....

Karolína Vavrdová

Souhrn

Metalofarmaka jsou jako protinádorová léčiva hojně využívána k léčbě rakoviny, která se řadí k častým příčinám úmrtí na celém světě, a ročně přibývá počet nových případů tohoto onemocnění. V minulosti se začaly jako chemoterapeutika používat komplexy na bázi platiny, ale tyto komplexy vykazují řadu vedlejších účinků. Po delší době léčby se buňky proti nim stávají rezistentní. Vzhledem k těmto faktům je vyvíjena nová generace komplexů na bázi platiny nebo jiných přechodných kovů tak, aby vedlejší účinky byly potlačeny účinky léčebnými.

V této bakalářské práci byl studován biologicky aktivní komplex iridia (GVB27) jako jeden z potenciálně účinných komplexů při léčbě nádorových onemocnění. Pro vývoj dalších protinádorových léčiv je nutné prostudovat a charakterizovat typ interakce s DNA. Pomocí metod molekulární biofyziky bylo zkoumáno vzájemné působení komplexu iridia na DNA. Kromě kovalentní vazby komplexu na DNA je dalším možným způsobem interakce také vazba nekovalentní, která probíhá formou interkalace látky mezi páry báze nebo vazbou do žlábků.

Summary

Metal pharmaceuticals are antitumor drugs used for treating cancer, which is a common cause of death in the whole world and every year there are more new cases of this disease. In the past, platinum-based complexes started to be used as chemotherapeutics, but these complexes have a lot of side effects. After longer period of use the cells become resistant. Because of these facts a new generation of platinum or other transition metal complexes is being developed, so that the side effects can be suppressed by the healing effects.

In these thesis, a biologically active complex of iridium (GVB27) was studied as one of the potentially effective complexes for treating cancer. For development of other antitumor drugs we need to study and characterize a type of interaction with DNA. Using the methods of molecular biophysics a mutual effect of iridium complex on DNA was studied. Apart from covalent bond between complex and DNA an other possible way of interaction is non-covalent bond, which goes in form of intercalation of the substance between the base pair or by groove binding.

Seznam zkratek

A	adenin
C	cytosin
cDDP	cisplatina (cis-diamindichloroplatnatý komplex, cDDP)
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	dvouvláknová DNA (double-stranded)
E. coli	Escherichia coli
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EtBr	ethidium bromid
G	guanin
GVB27	komplex iridia
Ir	iridium
LD	lineární dichroismus
NaClO ₄	chloristan sodný
OC	otevřená kruhová forma (open circle)
r_i	počet molekul komplexu připadajících na jeden nukleotid
RNA	ribonukleová kyselina
SC	nadšroubovicová forma (supercoiling)
T	thymin
Topo I	topoizomeráza I
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	uracil
UV	ultrafialové světlo
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

Obsah

1. ÚVOD.....	1
2. PŘEHLED PROBLEMATIKY.....	2
2.1 Metalofarmaka.....	2
2. 1. 1 Komplexy na bázi platiny.....	3
2. 1. 2 Komplexy jiných kovů.....	4
2. 1. 2. 1 Komplexy ruthenia.....	4
2. 1. 2. 2 Komplexy iridia.....	5
2. 1. 3 Mechanismus účinků.....	6
2. 2 DNA.....	7
2. 2. 1 Chemické složení a primární struktura DNA.....	8
2. 2. 2 Sekundární struktura DNA.....	9
2. 2. 3 Vyšší struktury DNA.....	12
2. 3 Interakce nízkomolekulárních látek.....	14
2. 3. 1 Interkalace.....	15
2. 3. 2 Vazba do žlábků.....	16
3. CÍL PRÁCE.....	18
4. MATERIÁL A METODY.....	19
4. 1 Použité komplexy.....	19
4. 2 Chemikálie a biologický materiál.....	19
4. 3 Přístroje.....	20
4. 4 Metody.....	20
4. 4. 1 Stanovení koncentrace zásobního roztoku.....	20
4. 4. 2 Stanovení interakce komplexu iridia s DNA pomocí měření fluorescence.....	21
4. 4. 3 Určení vazebné preference.....	21
4. 4. 4 Stanovení vazebné konstanty metodou vytěsnění ethidium bromidu.....	22
4. 4. 5 Elektroforéza v agarózovém gelu.....	22
4. 4. 6 Inhibice topoizomerázy I.....	23
4. 4. 7 Měření viskozity DNA.....	24
4. 4. 8 Lineární dichroismus.....	24
4. 4. 9 Stanovení kovalentní vazby komplexu iridia na DNA.....	25
5. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	26
5. 1 Příprava zásobního roztoku a spektrální charakterizace komplexu.....	26
5. 2 Měření fluorescence – stanovení interakce s DNA.....	27
5. 3 Zjištění vazebné preference.....	28
5. 4 Stanovení vazebné konstanty metodou vytěsnění ethidium bromidu.....	29

5. 5 Rozvíjení DNA	30
5. 6 Inhibice topoizomerázy I	31
5. 7 Měření viskozity DNA.....	33
5. 8 Měření lineárního dichroismu.....	33
5. 9 Stanovení kovalentní vazby komplexu iridia na DNA	34
6. ZÁVĚR	36
7. SEZNAM LITERATURY	37

1. ÚVOD

Nádorové onemocnění je jedna z nejčastějších příčin úmrtí na světě. Velkým úsilím vědeckého výzkumu je nalézt účinné léčebné látky, které by toto onemocnění dokázaly vyléčit nebo přinejmenším prodloužily život pacienta. Současná medicína používá v boji s rakovinou tři hlavní metody: chirurgický zákrok, farmakoterapii (zejména chemoterapii) a radioterapii.

V polovině šedesátých let byla náhodou objevena schopnost platinových derivátů zastavit buněčné dělení. Protinádorová aktivita je většinou spojená s interakcí daného komplexu a deoxyribonukleové kyseliny (DNA). Použitím sloučenin přechodných kovů začala moderní historie protinádorové terapie. K nejlépe prozkoumaným metalofarmakům patří v klinické praxi jednoznačně cisplatina. V chemoterapii se podáváním cisplatiny ničí rychle se množící nádorové buňky, ale dochází k poškození i normálních buněk. Vedlejší účinky a vznik rezistence při dlouhodobém opakování léčby jsou dalšími problémy. To vše vede k vývoji nových komplexů přechodných kovů, které by měly co nejmenší negativní vliv na organismus.

Tato bakalářská práce se věnuje v teoretické části problematice metalofarmak a mechanismu jejich účinků na DNA. Podstatné jsou zde zejména způsoby interakce. V rámci experimentální části je poté zkoumán nový biologicky aktivní komplex iridia (GVB27), který byl připraven na Departamento de Química Inorgánica, Universidad de Murcia ve Španělsku a poskytnut Katedře biofyziky Univerzity Palackého s cílem otestovat schopnost komplexu interagovat s DNA v přítomnosti nového ligandu.

2. PŘEHLED PROBLEMATIKY

2.1 Metalofarmaka

Metalofarmaka jsou v dnešní době nejčastěji používané komplexní sloučeniny v protinádorové terapii. Tyto látky obsahují centrální atom, na který se vážou další ligandy. Centrálním atomem je vždy jeden prvek přechodných kovů, například platina, ruthenium, iridium, osmium. Ligand poskytuje centrálnímu atomu jeden nebo více elektronových párů a výrazně tak ovlivňuje stabilitu celého komplexu.

Cílovým místem působení většiny metalofarmak je kyselina deoxyribonukleová (DNA). Každým dnem je DNA ovlivňována nejrůznějšími biologickými, chemickými a fyzikálními faktory, které způsobují její poškození. Ve zdravé buňce je toto narušení opravováno složitými mechanismy a na celkový stav organismu nemá zásadní vliv. Následkem poruchy opravy DNA může být rakovinné bujení, jejímž hlavním charakteristickým rysem je nekontrolovatelné dělení abnormálních buněk a tvorba nádoru. Nádorové buňky se mohou následně šířit krevním nebo lymfatickým oběhem dále do organismu, což může vést až ke vzniku tzv. metastáz. Vznik metastáz je ve většině případů hlavním důvodem smrti. Rakovina je podle Světové zdravotnické organizace (WHO) druhou nejčastější příčinou úmrtí na celém světě s největším počtem výskytu rakoviny plic, jater, tlustého střeva, žaludku a prsu (<http://www.who.int/cancer/en>).

Principem chemoterapie je pravidelné podávání metalofarmak (cytostatik) během léčebných cyklů. Cytostatika působí nespecificky a zasahují tedy i zdravé buňky. Nejznámějším a nejlépe prozkoumaným cytostatikem je cisplatina (cDDP). Používá se hlavně k léčbě nádorů varlat a vaječníků (Zhang a Lippard 2003). CDDP vykazuje v organismu vysokou cytotoxicitu a během léčby se u pacientů objevují nežádoucí vedlejší účinky. Při návratu nemoci a opakovaném podávání stejného léčiva dochází ke vzniku rezistence. Podle dosavadních výzkumů rakoviny i ta neúspěšnější cílená léčba ztrácí časem svůj význam (Mjos a Orvig 2014).

Z tohoto hlediska má vývoj nové generace protinádorově účinných preparátů velký potenciál. Značnou část výzkumu stále tvoří komplexy na bázi platiny, ale probíhá také testování sloučenin s centrálním atomem jiného přechodného kovu. Cílem je vyvinout nová metalofarmaka, které by působila s vyšší efektivitou, ale byly by zároveň zmírněny vedlejší účinky terapie. Každý komplex na bázi přechodných kovů může mít

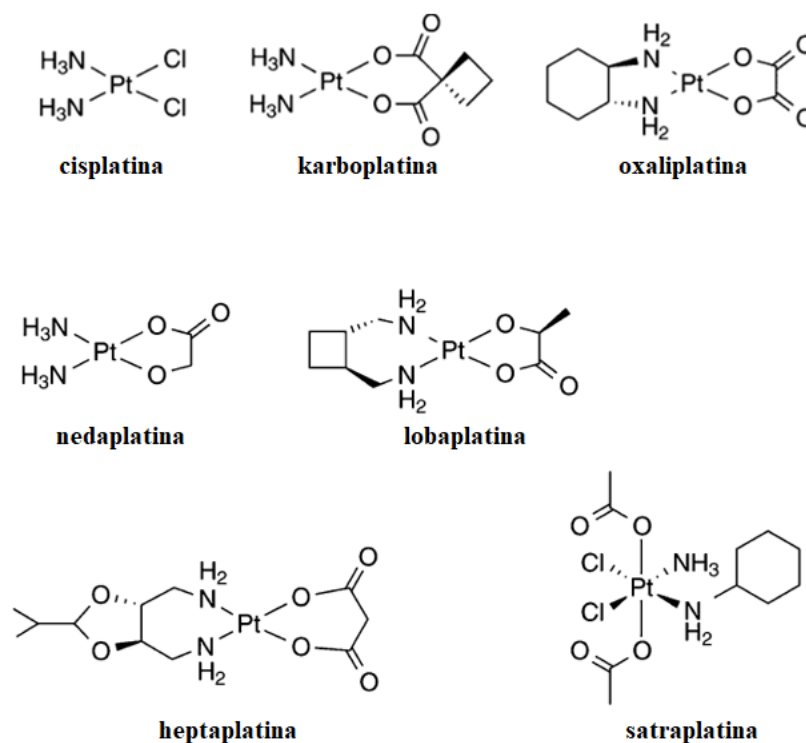
jiný mechanismus a také rozdílné oblasti působení v protinádorové léčbě. V následujících podkapitolách se nachází přehled metalofarmak, která jsou již používána v lékařské praxi nebo na nich probíhají klinické studie.

2. 1. 1 Komplexy na bázi platiny

Nejznámějším komplexem na bázi platiny je cisplatina (cis-diamindichloroplatinatý komplex, cis-[Pt(NH₃)₂(Cl)₂]. Označuje se jako cDDP a byla poprvé syntetizována Michele Peyronem již v roce 1844 (Mjos a Orvig 2014). Nicméně využití sloučenin na bázi těžkých kovů se začalo v klinické praxi testovat až po náhodném objevu profesora Barnetta Rosenberga v roce 1965, kdy s využitím vlastností platinových derivátů zastavil buněčné dělení (Rosenberg *et al.* 1965). Účinek cisplatiny se poté začal zkoumat na různých typech nádorů. Po úspěšných testech se v roce 1978 zařadila cisplatina mezi nejčastěji používaná cytostatika a dodnes k nim rozhodně patří, zejména při léčbě genitourinárních nádorů.

Cytostatika nemají specifické působení pouze na abnormálně se dělící nádorové buňky, ale zasahují v organismu i ty zdravé. Využití cisplatiny v klinické praxi je omezeno značnými vedlejšími účinky, mezi které mimo jiné patří i poškození funkce ledvin a sluchu.

V současné době se testují nové komplexy na bázi platiny, které by měly lepší farmakologické vlastnosti a širší spektrum protinádorové aktivity. Při vývoji nových protinádorových prostředků je brán důraz na začlenění nosných skupin, které by dokázaly zacílit na nádorové buňky s vysokou specifitou (Zhang a Lippard 2003). Dalším kritériem pro nové platinové komplexy je, aby se vázaly jiným způsobem k DNA než cisplatina a došlo by tím k překonání rezistence, jež léčiva eliminuje. Přehled metalofarmak na bázi platiny je uveden na obr. 1.



Obr. 1 Přehled strukturních vzorců komplexů na bázi platiny (Mjos a Orvig 2014, upraveno)

2. 1. 2 Komplexy jiných kovů

Porozumění mechanismu, jak dosahují komplexy přechodných kovů své aktivity v rámci protinádorové terapie, je složité, stejně jako návrh nových schopných sloučenin, které by zlepšily účinnost. Neustále probíhá testování nových biologicky aktivních komplexů hned v několika směrech. Prvním z nich je syntéza nových analogů k cisplatině a komplexů s jiným centrálním atomem (ruthenium, iridium, osmium, rhodium atd.). Dalším směrem je spojování protinádorových léčiv s nosnými skupinami, které by zvyšovaly specifitu pouze na nádorové buňky. Jednou z možností je také spojení protirakovinných prostředků s vhodnými molekulami, jenž by mohlo vést k rozdílnému způsobu vazby k DNA, a tedy jinému mechanismu účinku.

2. 1. 2. 1 Komplexy ruthenia

Již od počátku syntézy rutheniových komplexů bylo očekáváno, že budou mít po navázání na DNA protinádorový efekt podobný platinovým derivátům. Strukturou byly dokonce velmi blízké k cisplatině (obr. 2). U mnoha sloučenin s oxidačním stavem Ru^{II} nebo Ru^{III} byla taková aktivita projevena. Cytotoxicita metalofarmak ruthenia ob-

vykle souvisí se schopností vázat se k DNA (Zhang a Lippard 2003). Po následné demonstraci interakce komplexu ruthenia na DNA byla pozorována slabší vzájemná vazba než v případě platinových analogů. Nedávné studie poukázaly na sérii protinádorově aktivních komplexů ruthenia, u kterých není DNA vždy primárním cílem, a v těchto případech došlo k podstatně silnějšímu navázání na proteiny než k DNA. Tato zjištění vždy závisí na daném typu rutheniového komplexu a přesný mechanismus působení ještě nebyl plně pochopen (Gasser *et al.* 2011).



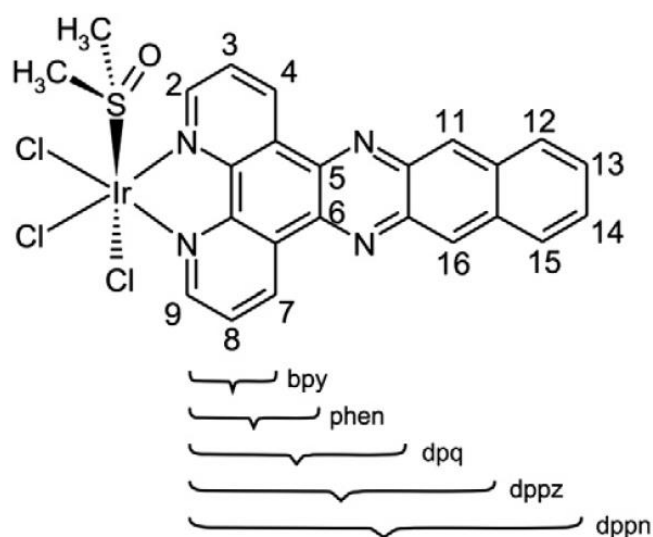
Obr. 2 Struktura komplexů ruthenia, *fac*- $\text{RuCl}_3(\text{NH}_3)_3$ (vlevo), *cis*- $[\text{RuCl}_2(\text{NH}_2)_4]^+$ (vpravo) (Folvarská 2015, upraveno)

2. 1. 2. 2 Komplexy iridia

Prvek iridium byl objeven v roce 1803 v příměsi platiny. Jedná se o poměrně vzácný přechodný kov, je inertní a odolný korozi. Iridium se vyskytuje v různých oxidačních stavech (především Ir^{I} , Ir^{III} , Ir^{IV}), koordinačních číslech (hlavně 4, 6) a geometriích. Až do nedávna bylo nepravděpodobné, že by byly komplexy iridia použity jako prostředky proti rakovině. Nicméně vysoká cytotoxicita v nádorových buňkách a v určitých případech i příznivá relativní tolerance zdravými buňkami může být dosažena vhodným výběrem připojeného ligandu (Geldmacher *et al.* 2012).

Na skupině navázaných ligandů závisí reaktivita centrálních atomů $\text{Ir}(\text{III})$ převážně u nedávno objevených polosendvičových (half-sandwich) iridiových komplexů obsahující diaminové ligandy, které účinně katalyzují hydrogenaci ketonů a aldehydů ve vodě za použití H_2 (Liu a Sadler 2014). Zájem o vývoj organokovových komplexů jako protinádorových preparátů v současné době roste, ale farmaka na bázi iridia jsou v porovnání s již vyvinutými Ir katalyzátory stále ve svých začátcích.

Mnoho studovaných sloučenin zahrnuje polypyridylové ligandy (pp), které vykazují cytotoxicitu a svoji pozornost přitahují jako DNA interkalátory nebo látky s vazbou do žlábků (obr. 3). Komplexy iridia(III) tedy nemusejí pouze stupňovat kinetickou reakci, ale také je u nich možná existence přednostní vazby k různým cílovým molekulám v biologických systémech (Geldmacher *et al.* 2012). Ještě relativně neprozkoumané chemické vlastnosti iridia mohou v budoucím výzkumu přinést neobvyklý návrh diagnostických prostředků a léčiv s novými mechanismy působení (Liu a Sadler 2014).



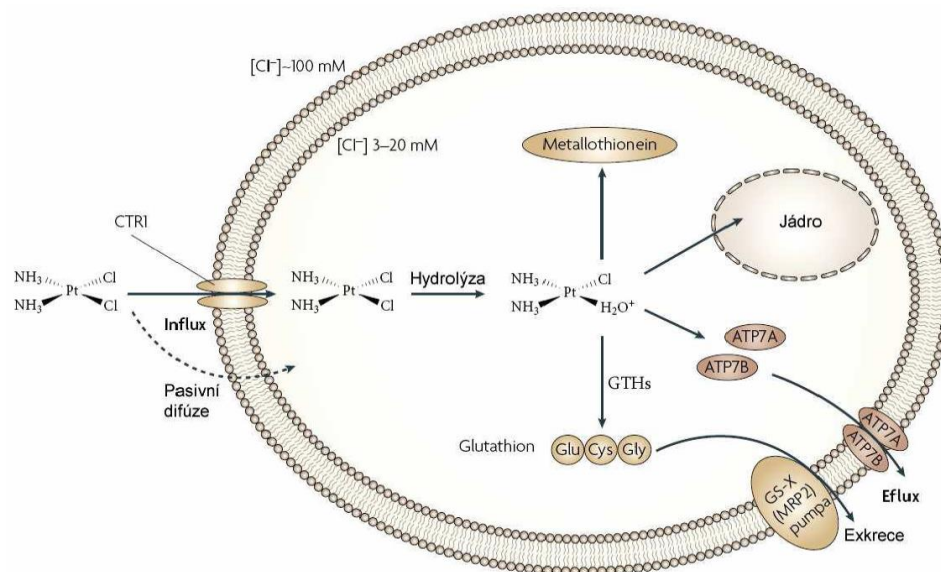
Obr. 3 Struktura Ir(III) komplexu $fac-[IrCl_3(DMSO)(pp)]$ obsahující polypyridylový ligand bpy (2,2'-bipyridyl), phen (1,10-phenanthroline), dpq (dipyrido[3,2-d:2',3'-f]quinoxalin), dppz (dipyrido[3,2-a:2',30'-c]phenazine) a dppn (benzo[i]dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazine) (Geldmacher *et al.* 2012)

2. 1. 3 Mechanismus účinků

Nejlépe prozkoumaný mechanismus účinků mají cisplatin a obecně platinová metalofarmaka. Zásadním úkolem bylo nejprve určit hlavní biologický cíl těchto látek. Na základě celé řady výzkumů bylo zjištěno, že cílovým místem působení je DNA v buněčném jádře (Prachařová 2013). Cisplatin má centrální atom platiny obklopený dvěma atomy chlóru a dvěma koordinačně navázanými skupinami amoniaku v *cis* pozici (obr. 1) a vyskytuje se jako bílý prášek rozpustný ve vodě (Sangeetha *et al.* 2014).

CDDP se pacientům podává přímo do žíly, kde zůstává zachována v celkem stabilní formě. Před průchodem do buňky reaguje s buněčnou membránou a do buňky pak

proniká pasivní difúzí nebo pomocí aktivního transportu (obr. 4). Jakmile se cisplatina nachází v cytoplazmě, kde je nižší koncentrace chloridových iontů, dochází k její hydrolyze. Jeden chloridový ligand je pomalu nahrazen vodou a díky vzniklému útvaru $[\text{PtCl}(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_2]^+$ je komplexu umožněná vazba k bázím DNA, především ke guaninu $[\text{PtCl}(\text{guanine-DNA})(\text{NH}_3)_2]^+$. Vytěsněním druhého chloridu je možné další navázání na guanin u stejné DNA molekuly vytvořením můstku mezi dvěma vlákny. Po kompletní vazbě cisplatiny je molekula DNA ohnuta o 30° , což následně vede k jejímu poškození. U poškozené DNA je vyvolán opravný mechanismus, který vede k apoptóze, k tzv. programované buněčné smrti (Sangeetha *et al.* 2014).



Obr. 4 Mechanismus účinku cisplatiny (Prachařová 2013)

Cílové místo působení může být rozdílné u metalofarmak na bázi jiných přechodných kovů. Jak již bylo zmiňováno pro komplexy na bázi ruthenia, primárním biologickým cílem se mohou stát i proteiny. Nicméně takový mechanismus účinku ještě není příliš prozkoumán a neustále jsou vyvíjeny nové řady protinádorových léčiv, které by vykazovaly jiný princip působení. Proto je u mnohých metalofarmak považována DNA v buněčném jádře jako prvotní cíl těchto látek a je také intenzivně zkoumána interakce potenciálních protinádorových léčiv na DNA určením způsobu vazby pomocí interkalace nebo vazby do žlábků DNA molekuly.

2. 2 DNA

Nukleová kyselina se nachází v každém organismu a obsahuje genetickou informaci naprosto nezbytnou pro život buňky. Podle své struktury a lokalizace v buňce

se rozlišují dva typy nukleových kyselin, deoxyribonukleová kyselina (DNA) a ribonukleová kyselina (RNA). RNA je obvykle jednořetězcová, ale některé viry mohou obsahovat i dvouřetězcovou RNA. DNA tvoří dvoušroubovice, nachází se v jádře buňky a u eukaryotických buněk je součástí také mitochondrií a plastidů.

Cílovým místem většiny doposud známých metalofarmak při léčbě nádorového onemocnění je právě DNA, která je nositelkou dědičné informace u člověka. Kromě způsobu interakce určitého komplexu přechodných kovů je nutné znát také chemické složení a strukturu DNA.

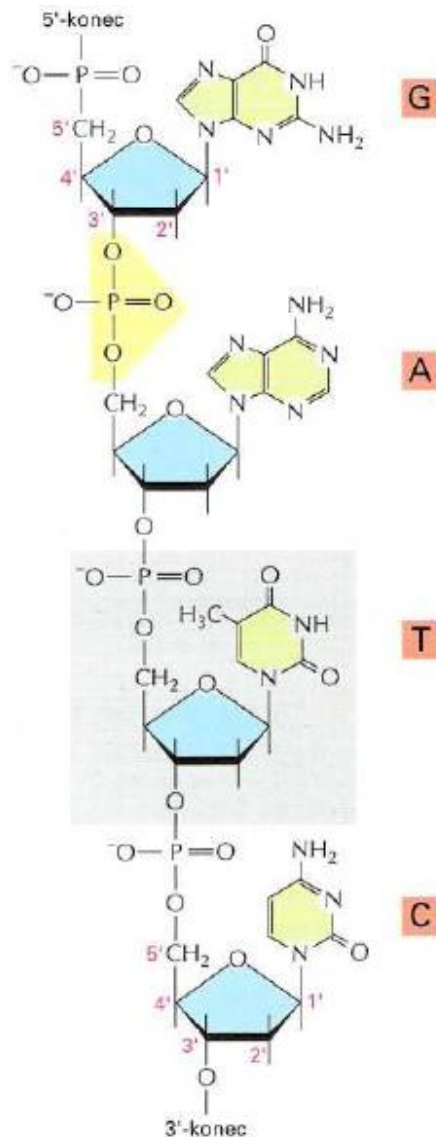
2. 2. 1 Chemické složení a primární struktura DNA

Primární strukturu DNA tvoří lineární řada nukleotidů (sekvence). Mezi hlavní úkoly nukleotidů v buňce patří uchování biologické informace. Nukleotidy jsou základní stavební částí ke konstrukci nukleových kyselin, mohou sloužit také jako přenašeči chemické energie a v případě vazby na další skupiny vytváří koenzymy. Mononukleotid se skládá z dusíkaté báze, pětiuhlíkatého cukru (pentosy) a jednoho zbytku kyseliny fosforečné. Jednotlivé mononukleotidy spojuje kovalentní fosfodiesterová vazba, která je mezi fosfátovou skupinou napojenou na cukr prvního nukleotidu na 5'-konci a hydroxylovou skupinou napojenou na cukr druhého nukleotidu na 3'-konci. Na 1'-konci každého cukru se nachází kovalentně navázaná heterocyklická báze.

Základní báze u DNA jsou čtyři – adenin (A), cytosin (C), guanin (G) a thymin (T), u RNA je thymin nahrazen uracilem (U). Podle odvození od dusíkaté heterocyklické sloučeniny se rozdělují na báze purinové a pyrimidinové. Mezi puriny patří adenin a guanin s jedním šestičlenným a druhým pětičlenným kruhem. Pyrimidiny mají šestičlenný kruh a řadí se k nim cytosin a thymin. Báze je k atomu uhlíku cukru navázána *N*-glykosidovou vazbou.

Nukleotidy, které obsahují deoxyribózu, označujeme názvem deoxyribonukleotidy. Pětiuhlíkatý cukr 2-deoxy-D-ribóza tvoří cukernou složku DNA, D-ribóza zastupuje tuto složku u RNA a má OH skupinu v pozici 2'. Místo hydroxylové skupiny na uhlíkovém atomu C2 má DNA jen vodíkový atom, značí jej předpona 2-deoxy. Spojením báze a cukru vzniká nukleosid (adenosin, cytidin, guanosin a thymidin).

Na deoxyribózu se váže jedna fosfátová skupina. Kovalentní fosfodiesterová vazba mezi sacharidy a fosfáty vytváří vnější cukr-fosfátovou kostru řetězce nukleotidů a udává polaritu DNA. Vazbou fosfátu na nukleosid vzniká již zmíněná základní stavební část struktury DNA nukleotid (obr. 5).



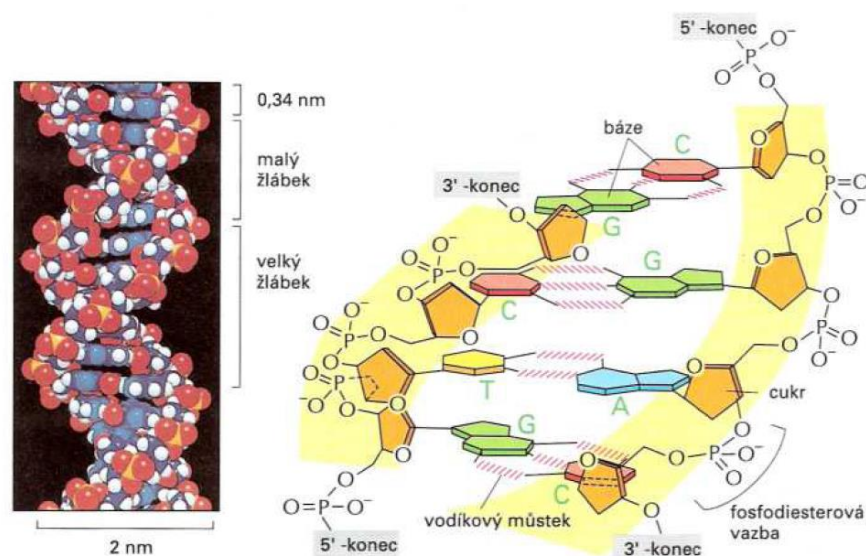
Obr. 5 Krátký úsek molekuly DNA se všemi čtyřmi nukleotidovými zbytky - adenin (A), cytosin (C), guanin (G), thymin (T) (Alberts et al. 2004)

2. 2. 2 Sekundární struktura DNA

Základní sekundární strukturou DNA je dvoušroubovice složená ze dvou komplementárních nukleotidových řetězců stočených do šroubovice. Oba řetězce jsou spojeny vodíkovými můstky mezi komplementárními bázemi – adenin se páruje dvěma vodíkovými vazbami s thyminem (pár A-T) a cytosin třemi vodíkovými vazbami

s guaninem (pár C-G). Aby mohlo dojít k párování bází, musí být oba řetězce vůči sobě antiparalelní, v jednom směru jsou vazby v pořadí 5'–3' a ve druhém směru 3'–5'. Páry bází tak zaujmou energeticky nejvýhodnější konformaci, čímž je dodržena stabilní vzdálenost cukr-fosfátové kostry obou řetězců. Obtočené vnější cukr-fosfátové kostry vytváří danou dvoušroubovici, kde báze jsou kolmé na osu dvoušroubovice. Mezi sousedními bázemi jsou vytvořeny hydrofobní vazby. Vzdálenost dvou bází je 0,34 nm. Jedna celá otáčka dvoušroubovice se skládá z 10 párů bází a měří tedy celkově 3,4 nm (Watson a Crick 1953). Průměr dvoušroubovice se uvádí jako 2 nm.

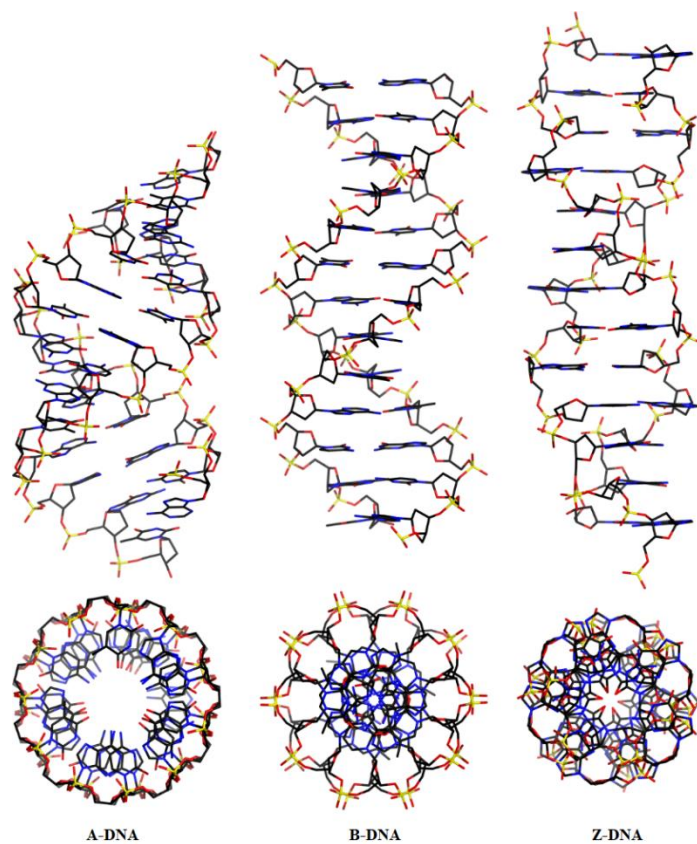
Obtočením dvou řetězců kolem sebe vzniknou na dvoušroubovici střídavě dva žlábký (obr. 6). Hlavní velký žlábek má 12 Å na šířku a je hluboký 8,5 Å. Vedlejší malý žlábek je široký 6 Å a má hloubku o 1 Å menší (King, R. C., *et al.*, 2006). Rozdílnou šířku žlábků způsobuje asymetrické spojení párů bází s cukr-fosfátovou kostrou. Oba žlábký jsou navíc ohraničeny donorem a akceptorem, jež interagují s proteiny rozpoznávající specifické sekvence DNA. Více funkčních skupin je umístěno do velkého žlábký, kam se většinou naváží DNA vazebné proteiny.



Obr. 6 Prostorový model jeden a půl otáčky dvoušroubovice DNA s malým a velkým žlábkem (vlevo), krátký úsek dvoušroubovice při pohledu ze strany (vpravo) (Alberts *et al.* 2004)

Nejčastěji se molekula DNA vyskytuje ve třech různých konformacích. Podmínky pro vytvoření jednotlivých konformací záleží vždy na sekvenci nukleotidů, obsahu

vody a iontové síle (Rozsypal 2006). Za základní konformace se považuje A-DNA, B-DNA a Z-DNA (obr. 7). Parametry jednotlivých konformací jsou uvedené v tab. 1.



Obr. 7 Tři konformace molekuly DNA – A-DNA, B-DNA, Z-DNA, pohled ze strany (nahore) a z vrchu (dole) (převzato z <http://en.wikipedia.org/wiki/A-DNA>)

Tab. 1 Parametry jednotlivých konformací DNA (Rozsypal 2006)

	Konformace A	Konformace B	Konformace Z
Vinutí	pravotočivé	pravotočivé	levotočivé
Celkový tvar	krátká, široká	dlouhá, tenká	podlouhlá, tenká
Umístění osy dvoušroubovice	přes větší žlábek	přes páry bází	přes menší žlábek
Větší žlábek	velmi úzký, hluboký	široký, hluboký	zploštělý na povrchu
Menší žlábek	velmi široký, mělký	úzký, hluboký	velmi úzký, hluboký
Počet párů bází na jeden závit	~11	~10,5	~12
Konformace glykosidové vazby	anti	anti	anti u C syn u G
Konformace deoxyribózy	C3–endo	C2–endo	C2–endo u dC C3–endo u dG

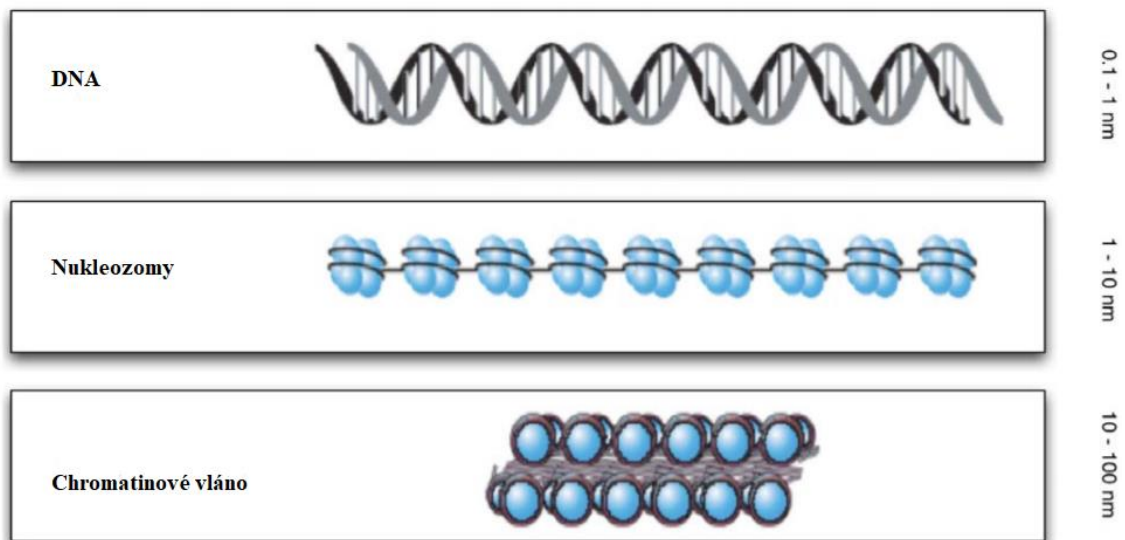
Stavbu dvoušroubovice, kterou v roce 1953 popsali Watson a Crick, je konformace B-DNA. V této konformaci se nachází většina molekul DNA v prokaryotických a eukaryotických buňkách. B-DNA je stabilní i při relativní vlhkosti 95 %, je tenčí a vyšší oproti ostatním formám a osa dvoušroubovice prochází středem vazby páru báze. Při vysoké relativní vlhkosti ji stabilizují molekuly vody, které skoro s každým schopným atomem vytváří vodíkové vazby. V případě snížení relativní vlhkosti prostředí na 75 % (dehydrataci) B-forma přechází na A-formu. Molekula A-DNA je naopak krátká a plochá a osa dvoušroubovice u této formy prochází přes větší žlábek. Konformace Z-DNA má jako jediná vinutí levotočivé, je podlouhlá, tenká a osa dvoušroubovice je umístěna přes menší žlábek (Rozsypal 2006).

2. 2. 3 Vyšší struktury DNA

Terciální struktura DNA je pojmenována jako nadšroubovice a vzniká zavedením dalšího vinutí do sekundární struktury DNA, které je označeno jako nadšroubovicové (supercoiling, SC). Charakteristická dvoušroubovice molekuly DNA (dsDNA) existuje v lineární nebo kružnicové formě. Lineární molekula může být převedena do nadšroubovice jen v případě, že jsou oba konce připevněné. Kružnicová dsDNA je buď kovalentně uzavřená relaxovaná kružnice, která nemá v řetězci žádný zlom, nebo otevřená kružnice, jež má nejméně v jednom ze dvou řetězců zlom. Z dsDNA se může vy-

tvořit nadšroubovice dvěma způsoby. Záporným nadšroubovicovým vinutím vzniká pravotočivá nadšroubovice, kladným nadšroubovicovým vinutím naopak levotočivá nadšroubovice.

V případě, že se nadšroubovice naváže na histonový protein, jedná se o kvartérní strukturu (obr. 8). Vytvořený komplex DNA-protein se nazývá nukleozom a ten je základní stavební jednotkou chromatinového vlákna (Santoni 2013). Celkovou kompaktnost DNA tedy zvětšuje chromatin, z kterého se vytváří chromozom.



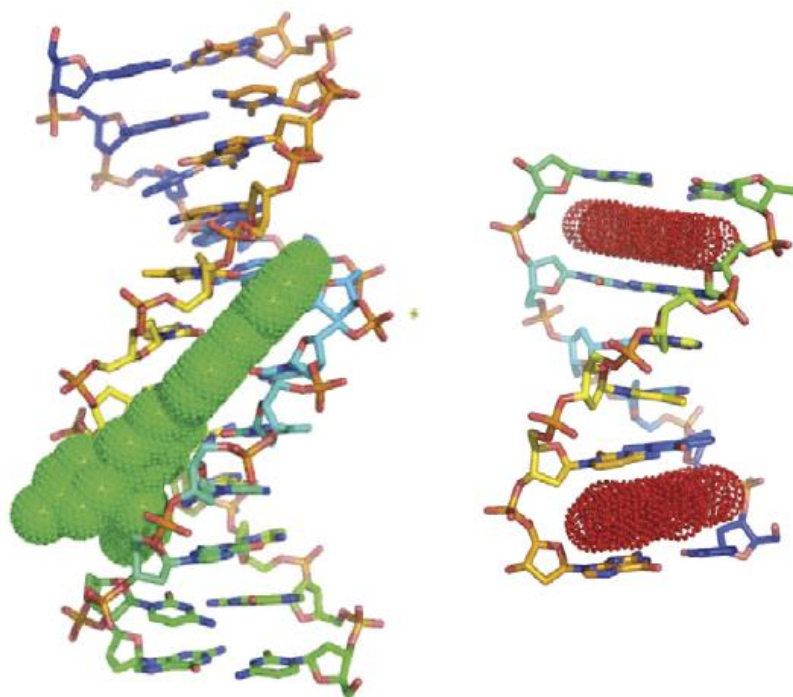
Obr. 8 Dvoušroubovice DNA (nahore), nukleozomy – histony „zabalené“ do DNA (uprostřed), nukleozomy uspořádané do chromatinového vlákna (dole) (Santoni 2013)

2.3 Interakce nízkomolekulárních látek

Malé molekuly vázající se k DNA jsou nesmírně užitečným nástrojem. DNA jako nositelka dědičné informace je prvotním cílem molekul při protinádorové terapii. Vyšetřování interakce DNA s komplexy těžkých kovů se řadí k úspěšné oblasti bádání již od objevení cisplatinu před několika desítkami let a umožňuje případný vývoj nové generace terapeutických prostředků. Tyto preparáty by vykazovaly přímý účinek na DNA uvnitř buňky nebo by zabraňovaly rozvolňování DNA (Palchaudhuri a Hergenrother 2007).

Výchozím krokem při výzkumu nových látek interagujících s DNA je určit způsob vazby na DNA. Pro látky, které se vážou na DNA nekovalentně, jsou nejpravděpodobnější dva typy vazeb, a to interkalace nebo vazba do žlábků. Studium struktury těchto interakcí *in vitro* a uvnitř buněk umožňuje docela přesně určit, o jaký způsob vazby se jedná. Při použití metod s vysokým rozlišením, např. rentgenová difrakční metoda a nukleární magnetická rezonance, je určení velice přesné. V případě absence výsledků těchto metod je možné odvodit způsob vazby z výsledků studií roztoku dané látky. Pro určení způsobu vazby látek se ve velké míře zkoumají určitá kritéria, jež jsou postavena na základních strukturálních rozdílech vycházejících z interkalace a vazby do žlábků (obr. 9).

Interkalace způsobuje podstatnou změnu ve struktuře DNA vložením planární části ligandu mezi sousední páry bází. Po navázání ligandu na DNA dochází k prodloužení, vyztužení a rozmotávání šroubovice DNA. Interkalace tedy vyvolává zásadní změny struktury DNA. Vazbou do žlábků naopak dochází k menším strukturálním změnám a DNA zůstává po navázání ligandu skoro v neporušené formě.



Obr. 9 Interakce molekuly DNA s látkou navázanou do žlábků (vlevo), interakce molekuly DNA s interkalátorem navázaným mezi páry bází DNA (vpravo) (Palchaudhuri a Hergenrother 2007)

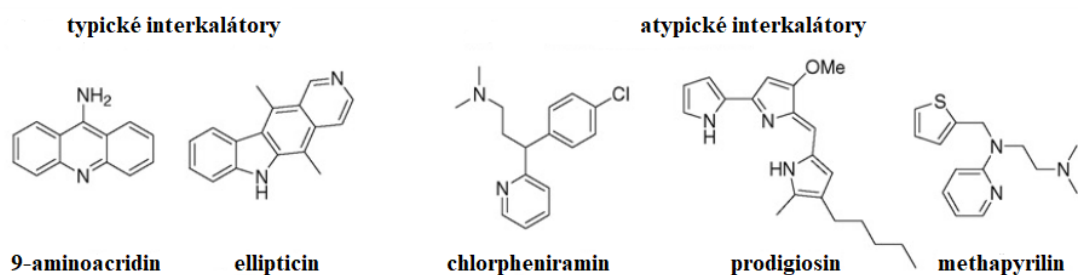
Vhodné fyzikální metody dokážou popsat rozdíl mezi interkalací a vazbou do žlábků. Při experimentech se za standardní interkalátor považuje ethidium bromid a pro porovnání je používán Hoechst 33258 jako látka vázající se do žlábků (Suh a Chaires 1995). U interkalátorů je vazba k DNA stále intenzivně zkoumána prostřednictvím hydrodynamických vlastností DNA po navázání, kdy je planární chromofor v blízkém kontaktu s páry bází DNA. Chromofor je orientován zhruba kolmo k ose šroubovice DNA a dochází zároveň i k prodloužení šroubovice. Na základě těchto předpokladů lze jasně rozlišit způsob vazby látky k DNA pomocí metod jako např. měření lineárního dichroismu nebo měření viskozity. Fluorescenční techniky neposkytují informaci o typu vazby k DNA, nicméně dovolují ověřit, že studovaná látka opravdu interaguje s DNA. Míra interakce může být také ovlivněna teplotou, pH nebo vlastnostmi prostředí, ve kterém k reakci dochází (Palchaudhuri a Hergenrother 2007).

2. 3. 1 Interkalace

Při interkalaci poskytují nukleové kyseliny svůj mezibázový prostor dané sloučenině a dochází tak ke vsunutí planární části molekuly mezi páry báze DNA. Násled-

kem je zmenšení spirálovitého stočení a zároveň prodloužení dvoušroubovice DNA. Interakce DNA-interkalátor je poté stabilizována díky nekovalentní vazbě typu π - π . Jedna molekula navázané sloučeniny může prodloužit dvoušroubovici asi o 3 Å a zároveň způsobit její rozvinutí. Stupeň rozvinutí závisí na uspořádání interkalační sloučeniny a na místě interkalace (Sangeetha *et al.* 2013).

Interkalační sloučeniny jsou ve velké míře používány jako protinádorové, anti-neoplastické, antibakteriální nebo antimykotické prostředky, ale ne všechny jsou genotoxické (Palchaudhuri a Hergenrother 2007). Interkalátory se rozlišují podle svých vlastností na typické a atypické (obr. 10). Typické interkalátory jsou planární aromatické nebo heteroaromatické molekuly, které většinou mají genotoxické účinky. Atypické interkalátory se skládají z částečně aromatických molekul a nejedná se vždy o rovinné molekuly.



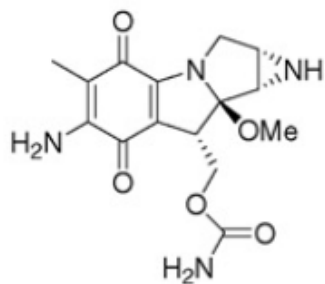
Obr. 10 Příklady typických (vlevo) a atypických interkalátorů (vpravo) (Palchaudhuri a Hergenrother 2007, upraveno)

2. 3. 2 Vazba do žlábků

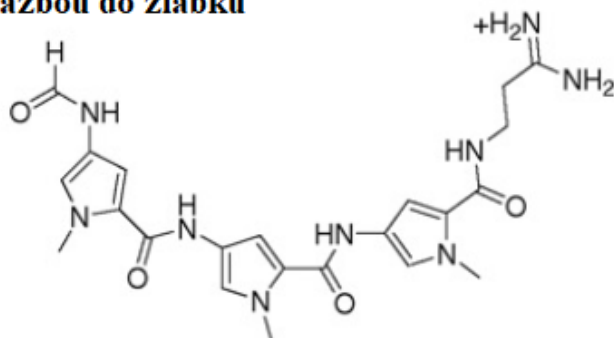
Vazba do žlábků na rozdíl od interkalátorů nezpůsobuje velké konformační změny DNA. Vazba ligandu a makromolekuly může být přirovnávána k modelu zámku a klíče. Touto vazbou ligand přímo interaguje s okrajovými páry báze malého (A-T) nebo vedlejšího (G-C) žlábků DNA, kde je stabilizován intermolekulárními interakcemi a DNA zůstává v podstatě v neporušeném formátu.

Stejně jako u interkalátorů jsou u těchto látek prokázány klinické účinky. Uplatňují se jako protirakovinné a antibakteriální prostředky. Struktura molekuly sloučenin s vazbou do žlábků (obr. 11) umožňuje přesně padnout po vytěsnění vody do velkého nebo malého žlábků. Určité sloučeniny jsou dokonce schopné obou typů nekovalentních reakcí s DNA, interkalace i vazby do žlábků (Palchaudhuri a Hergenrother 2007).

látky s vazbou do žlábků



mitomycin



distamycin

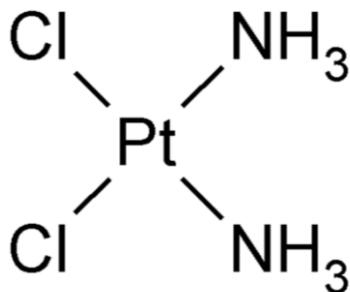
Obr. 11 Příklady látek vázajících se do žlábků (Palchaudhuri a Hergenrother 2007, upraveno)

3. CÍL PRÁCE

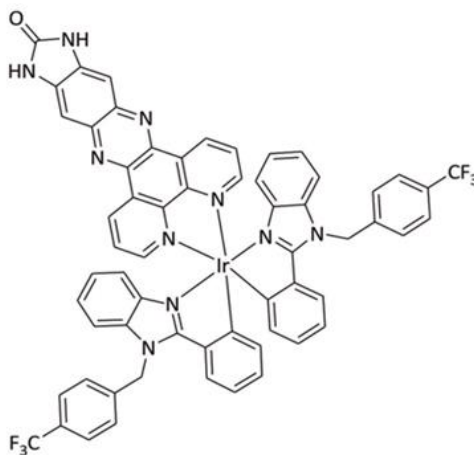
Cílem této bakalářské práce bylo pomocí metod molekulární biofyziky studovat a charakterizovat interakci nového organokovového komplexu iridia s DNA. Tento komplex byl připraven a charakterizován z hlediska chemické struktury a čistoty na Departamento de Química Inorgánica, Universidad de Murcia ve Španělsku na základě výsledků předchozích společných výzkumů s Katedrou biofyziky Univerzity Palackého v Olomouci. U stávajících komplexů byla navržena změna struktury tak, aby obsahovaly jako ligand látky schopné interkalovat se do DNA. Tato nová sloučenina (obr. 13) byla připravena a poskytnuta na Katedru biofyziky Univerzity Palackého s cílem otestovat, zda-li změna ve struktuře komplexu vede ke změně schopnosti komplexu interagovat s DNA, a také jestli přítomnost nového ligandu umožní interkalaci komplexu do DNA. Cílem bylo provést tyto studie a zjistit, zda změna ve struktuře skutečně vede k lepší interakci s DNA, lepší protinádorové účinnosti a získané výsledky interpretovat.

4. MATERIÁL A METODY

4. 1 Použité komplexy



Obr. 12 Strukturní vzorec cisplatiny, molekulová hmotnost $300,01 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



Obr. 13 Strukturní vzorec komplexu iridia (GVB27), molekulová hmotnost $1378,19 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

4. 2 Chemikálie a biologický materiál

- Agaróza (Serva Electrophoresis GmbH)
- Bromfenolová modř (Serva Electrophoresis GmbH)
- Cisplatina (Sigma-Aldrich)
- Deionizovaná voda
- DMSO – dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich)
- DNA plasmidová pBR322 (New England Biolabs)
- DNA z telecího thymu (Sigma-Aldrich)
- EtBr – ethidium bromid (Serva Electrophoresis GmbH)
- NaClO_4 – chloristan sodný (Sigma-Aldrich)

- Pufr TAE 50x: 2M Tris – tris(hydroxymethyl)aminomethan ($C_4H_{11}NO_3$), 1M kyselina octová (CH_3COOH), 50 mM EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina, deionizovaná voda
- Pufr TBE 5x: 0,445M Tris, 0,445M kyselina boritá, 10 mM EDTA, deionizovaná voda
- Roztok TrisCl, pH 7,4 (Roth)
- Syntetické polynukleotidy poly(dA)·poly(dT) a poly(dG)·poly(dC) (Sigma-Aldrich)
- Topoizomeráza I – E. coli (New England Biolabs), komerčně dodávaný reakční pufr: 50 mM octan draselný, 20 mM Tris acetát, 10 mM octan hořečnatý, 100 μ g/ml hovězí sérový albumín

4.3 Přístroje

- Automatický mikroviskozimetr AMVh (Anton Paar)
- Bio Vortex V1 (Biosan)
- Elektroforetická vana (Biorad)
- Fluorescenční spektrofotometr f-4500 (Hitachi)
- Inkubátor Cool-Hotter Dry Bath (Major Science)
- Minicentrifuga Z 100 M (Hermle LaborTechnik)
- pH metr s elektrodou (Boeco)
- Spektropolarimetr J-720 (Jasco)
- Třepačka Universal Orbital OS-20 (Boeco)
- UV transluminátor Gel Logic 112 (Major Science)
- UV/VIS spektrofotometr DU 730 (Beckman Coulter)
- Zdroj pro elektroforézu PowerPac Basic (Biorad)
- Zeemanův atomový absorpční spektrometr AA240Z s grafitovým atomizérem GTA120 (Varian)

4.4 Metody

4.4.1 Stanovení koncentrace zásobního roztoku

Ke zjištění koncentrace zásobního roztoku komplexu s centrálním atomem iridia byl použit UV/VIS Spektrofotometr DU 730. Jako první bylo naměřeno pozadí (blank),

v tomto případě bylo použito DMSO. Poté byl změřen 500x zředěný zásobní roztok komplexu iridia (GVB27). Při vlnové délce 308 nm bylo nalezeno absorpční maximum. Úpravou Lambert-Beerova zákona

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l, \quad (1)$$

kde A je absorbance měřeného vzorku, ε molární absorpční koeficient měřeného vzorku, c koncentrace měřeného vzorku a l délka optické dráhy procházející měřeným vzorkem v cm, byla zjištěna koncentrace zásobního roztoku komplexu iridia v $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (M). Hodnota absorbance byla zjištěna při vlnové délce 308 nm, pro kterou byla poskytnuta hodnota molárního absorpčního koeficientu španělskými kolegy.

4. 4. 2 Stanovení interakce komplexu iridia s DNA pomocí měření fluorescence

Měření fluorescence je metoda, která se používá k určení, zda malé molekuly interagují s nukleovými kyselinami. Mezi výhody této techniky patří zejména vyšší selektivita a citlivost. Je známo, že dochází k potlačení emise fluorescenční sloučeniny (např. ethidium bromid) ve vodném prostředí, ale emise výrazně narůstá s přidávkem DNA, protože interakce s DNA chrání fluorescenční sloučeninu před kontaktem s molekulami vody (Suh a Chaires 1995).

K experimentu byl použit fluorescenční spektrofotometr f-4500. Nejprve byl změřen samotný 100x vodou zředěný zásobní roztok komplexu iridia při excitační vlnové délce 405 nm a emisní vlnové délce v rozmezí 480 až 700 nm, poté byla k roztoku přidávána DNA z telecího thymu. Po inkubační době 10 minut se změří fluorescence. Nárůst maxima fluorescence po každém přidávku DNA dokazuje interakci GVB27 s DNA. Tato metoda je vhodná pro sledování vazebné reakce s DNA, ale neposkytuje informaci, zda-li se jedná o interkalátor nebo o látku s vazbou do žlábků.

4. 4. 3 Určení vazebné preference

V případě, že komplex iridia a DNA spolu interagují, je možné pomocí měření fluorescence také sledovat preferenci pro A-T nebo G-C páry bází. Pro tento experiment byl použit 100x vodou zředěný komplex iridia a fluorescenční spektrofotometr f-4500. Excitační vlnová délka byla zvolena 405 nm a emisní vlnová délka v rozmezí 480 až

700 nm. Fluorescenční maximum se nacházelo okolo 600 nm. Po přidání syntetického polynukleotidu poly(dA)·poly(dT) byl vzorek inkubován 10 minut a byla změřena fluorescence. Totéž bylo opakováno s poly(dG)·poly(dC). Po porovnání hodnot maximální fluorescence u jednotlivých polynukleotidů byla zjištěna vazebná preference komplexu iridia.

4. 4. 4 Stanovení vazebné konstanty metodou vytěsnění ethidium bromidu

Vazebná konstanta studovaného komplexu iridia byla stanovena pomocí metody vytěsnění ethidium bromidu z dvoušroubovice DNA, která dokáže kvantifikovat nekovalentní sílu vazby komplexu iridia k DNA (Malina *et al.* 2014). Nahrazení ethidium bromidu v DNA doprovází pokles intenzity fluorescence. Měření bylo provedeno na fluorescenčním spektrofotometru při excitační vlnové délce 495 nm a emisní vlnové délce v rozsahu 550 až 700 nm. Výsledná vazebná konstanta byla vypočtena ze vztahu

$$K [\text{EtBr}] \cdot c[\text{EtBr}] = K[\text{komplex}] \cdot c[\text{komplex}], \quad (2)$$

kde c [komplex] představuje koncentraci komplexu iridia v případě, kdy je vytěsněna 1/2 molekul ethidium bromidu, hodnota K [EtBr] je známá. Po dosažení do rovnice kalibrační přímky sestavené z naměřených hodnot intenzity fluorescence lze určit výslednou hodnotu vazebné konstanty.

4. 4. 5 Elektroforéza v agarózovém gelu

Na elektroforézu byl připraven 1% agarózový gel rozvařením 1 g agarózy ve 100 ml pufru TAE 1x v Erlenmeyerově baňce po dobu 10 minut. Vzniklý gel byl po zchlazení nalit do elektroforetické vany s hřebínkem pro vytvoření jamek k nanesení vzorků. Po 30 minutách tuhnutí byl gel zalit 500 ml roztokem pufru TAE 1x. Vzorky o celkovém objemu 10 μ l obsahovaly 0,3 μ g plazmidové DNA (pBR322), dále komplex iridia modifikovaný na r_i 0,1 – 0,5. Jeden vzorek obsahoval místo komplexu iridia cisplatinu o $r = 0,1$. Do objemu 10 μ l byly vzorky doplněné TrisCl. Pro porovnání byly vytvořené dvě sady vzorků, z nichž první byla inkubována 2 hodiny a druhá 24 hodin. Po ukončení inkubace byl ke každému vzorku přidán pufr TAE 5x a poté byly vzorky obarveny bromfenolovou modří v množství 1/6 objemu vzorku. Elektroforéza trvala

120 minut při konstantním napětí 40 V. Pro zviditelnění elektroforetické separace jednotlivých vzorků byl gel obarven roztokem EtBr. Po opláchnutí byl gel vložen do UV transluminátoru a vyfotografován v negativním módu.

Při elektroforéze dochází k migraci elektricky nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli, v případě nukleových kyselin jsou nositelem náboje fosfátové skupiny. Rychlost pohybu molekul DNA v agarózovém gelu, tzv. elektroforetická mobilita, ukazuje případné změny v nadšroubovicovém vinutí po interakci s daným komplexem iridia. Pro plazmidovou DNA je typická nadšroubovicová forma (SC, supercoiling), která putuje gelem nejrychleji. Pokud dojde k rozvinutí DNA na její otevřenou kružnicovou formu (OC, open circle) nebo dokonce lineární formu, snižuje se tím elektroforetická mobilita.

Výsledek elektroforetické separace se projeví jako proužky. Intenzita proužků je přímo úměrná koncentraci DNA. Vyhodnocení bylo provedeno porovnáním separace jednotlivých proužků u vzorků obsahující komplex iridia v různých koncentracích s kontrolním vzorkem obsahující cisplatinu.

4. 4. 6 Inhibice topoizomerázy I

Topoizomeráza má široké využití při analýze sloučeniny a její schopnosti interkalace do DNA. Topoizomeráza je enzym, který kontroluje vinutí DNA a odstraňuje uzly a smyčky z DNA. Existují dva typy topoizomeráz, I a II, ale pouze u topoizomerázy I (Topo I) bylo potvrzeno, že se zaměřuje na protinádorová léčiva (Palchaudhuri a Hergenrother 2007). Relaxace DNA v přítomnosti Topo I určuje, zda studovaný komplex iridia dokáže způsobit rozvinutí DNA, jenž je charakteristické pro DNA interkalátory.

Relaxační aktivita Topo I (1 U/ μ l) byla zkoumána pomocí gelové elektroforézy v přítomnosti plazmidové DNA (pBR322) a komplexu iridia (koncentrace 30 – 100 μ mol \cdot l⁻¹). Vzorek obsahující DNA a Topo I byl použit jako negativní kontrola, vzorek obsahující ethidium bromid (koncentrace 10 μ mol \cdot l⁻¹) a Topo I byl pozitivní kontrolou. Vzorky se nechaly 1 hodinu inkubovat. Po přípravě elektroforetické vany s agarózovým gelem a pufrům TBE 5x byly vzorky doplněny v množství 1/6 objemu bromfenolovou modří a nanесeny do jednotlivých jamek v gelu. Elektroforéza trvala 120 minut při stále napětí 60 V. Poté byl gel obarven roztokem EtBr a po opláchnutí vyfotografován

v UV transluminátoru. Vyhodnocení proběhlo na základě porovnání pozitivní kontroly se vzorky obsahující komplex iridia o různé koncentraci.

4. 4. 7 Měření viskozity DNA

Viskozimetrie patří mezi jednoduché hydrodynamické metody, díky kterým lze s velkou citlivostí odhalit změny délky DNA. Pokud se komplex interkaluje mezi páry bází DNA, způsobí tím prodloužení její délky. Z měření viskozity je tedy možné určit u daného komplexu, jestli se jedná o interkalátor.

Principem této metody je měření doby pádu kuličky, jež se pohybuje ve skleněné kapiláře. Kulička a skleněná kapilára mají přesně stanovené parametry již od výrobce viskozimetru. Měření proběhlo při teplotě 37 °C v kapilárním systému pod úhlem 50° o průměru kapiláry 1,6 mm v prostředí 0,01 mol·l⁻¹ Tris o pH 7,4 a DMSO. Viskozita roztoku DNA z telecího thymu (o stálé koncentraci 2,42·10⁻³ mol·l⁻¹) se studovaným komplexem iridia (o r_i 0 – 0,1) byla měřena celkem pětkrát pro každý vzorek a výsledný čas byl poté zprůměrován. Viskozita vzorku DNA bez přítomnosti studovaného komplexu iridia byla vypočtena podle vztahu

$$\eta_0 = \frac{t-t_0}{t_0}, \quad (3)$$

kde t je doba pádu kuličky v roztoku DNA a t_0 je doba pádu kuličky pouze v prostředí bez DNA (Suh a Chaires 1995). K výpočtu viskozity jednotlivých vzorků DNA s přidaným komplexem iridia byl použit vztah

$$\eta = \frac{t_i-t_0}{t_0}, \quad (4)$$

kde t_i je doba pádu kuličky v roztoku DNA v přítomnosti komplexu iridia a t_0 je doba pádu kuličky pouze v prostředí bez DNA. Z těchto vypočítaných hodnot je poté vynesena závislost $\left(\frac{\eta}{\eta_0}\right)^{1/3}$ na r_i studovaného komplexu iridia.

4. 4. 8 Lineární dichroismus

Lineární dichroismus (LD) je užitečnou metodou k detekci interakce a způsobu vazby mezi malými molekulami a biologickými makromolekulami jako je DNA. LD je

definovaný jako rozdíl absorpce lineárně polarizovaného světla rovnoběžného A_{\parallel} a kolmého A_{\perp} k ose orientace.

$$\mathbf{LD} = \mathbf{A}_{\parallel} - \mathbf{A}_{\perp} . \quad (5)$$

LD se používá u takových systémů, které jsou orientované do jednoho směru nebo jsou orientovány až během experimentu (Rodger 1997).

K měření byl použit spektropolarimetr Jasco J-720 přizpůsobený pro měření LD v průtokové cele Couette. Průtoková cela byla složená z upevněného vnějšího válce a rotujícího vnitřního válce (otáčky 1200 – 1300), mezi kterými byla štěrbina o velikosti 0,5 mm a délka optické dráhy činila 1 mm. Experiment byl prováděn v 0,01 M pufru TrisCl (pH 7,4) po celou dobu při teplotě 25 °C a v rozsahu 220 až 700 nm. Pufr TrisCl byl použit jako blank a byl odečten z každého spektra měřeného vzorku. LD spektrum vzorku DNA z telecího thymu ($1 \cdot 10^{-4}$ M) bylo měřeno v přítomnosti komplexu iridia o $r_1 0 - 0,3$.

4. 4. 9 Stanovení kovalentní vazby komplexu iridia na DNA

Všechny předcházející popisované metody byly prováděny za předpokladu, že se komplex iridia neváže kovalentně na DNA. Pro ověření byla použita dialýza vzorku modifikované DNA. Vzorek obsahující DNA z telecího thymu (koncentrace $2,4 \cdot 10^{-3}$ M) modifikovaný komplexem iridia na $r = 0,1$ a chloristan sodný (koncentrace 0,01 M) byl inkubovaný při 37 °C po dobu 48 hodin kvůli případnému vzniku pevné a stabilní kovalentní vazby. Dialýza vzorku byla provedena pomocí dialyzační membrány Spectra/Por MWCO 12 – 14 000 Da, která byla proprána v teplé destilované vodě. Membrána s napipetovaným vzorkem byla umístěna do kádinky s destilovanou vodou na magnetickou míchačku a při pokojové teplotě byl vzorek 1 hodinu dialyzován oproti vodě, tento postup byl celkem 3x opakován. Poté byla změřena absorpce vzorku při 260 nm ($\epsilon_{\text{DNA}} = 6\,401,71 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) a pomocí Lamber-Beerova zákona (1) byla vypočítána koncentrace DNA ve vzorku po dialýze.

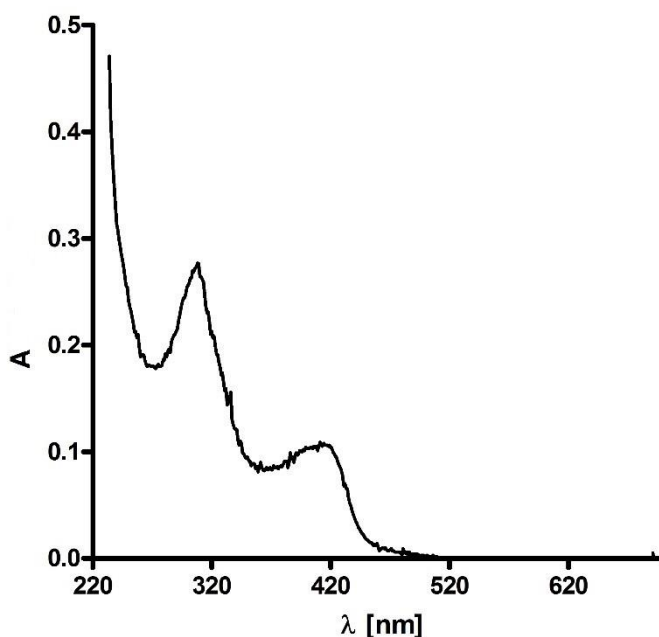
Koncentrace iridia v dialyzovaném vzorku byla stanovena pomocí atomové absorpční spektrofotometrie. Pro ověření byla měřena hodnota koncentrace pro dva stejné vzorky. Na základě porovnání hodnot pro nedialyzovaný a dialyzovaný vzorek bylo

určeno procentuální množství komplexu iridia kovalentně navázaného na DNA, tzn. množství navázané na DNA po dialýze.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Příprava zásobního roztoku a spektrální charakterizace komplexu

Prvním provedeným krokem byla příprava zásobního roztoku komplexu iridia, který se poté využíval pro další experimenty. Malé množství komplexu v pevném stavu (prášek oranžové barvy) bylo rozpuštěno v 200 μl DMSO. Na obr. 14 je uvedeno absorpční spektrum 500x vodou zředěného zásobního roztoku komplexu iridia.

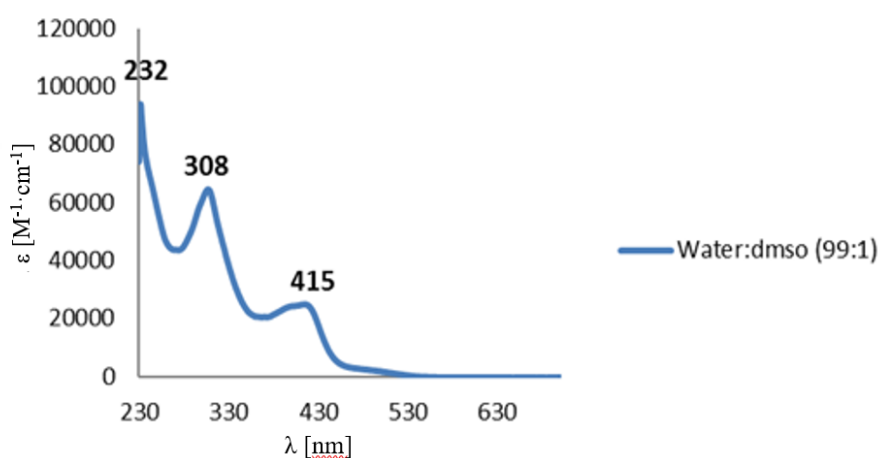


Obr. 14 Absorpční spektrum komplexu iridia v prostředí vody a DMSO v poměru 499:1, patrné absorpční maximum při 308 nm

Hodnota molárního absorpčního koeficientu pro komplex iridia GVB27 byla určena na španělské univerzitě University of Murcia pro vlnovou délku 308 nm jako $\epsilon = 56\,170\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Koncentrace vzniklého roztoku byla stanovena pomocí absorpční spektrofotometrie na základě měření absorbance roztoku s využitím známé hodnoty

molárního absorpčního koeficientu. Zjištěná koncentrace zásobního roztoku komplexu iridia byla $2,5 \cdot 10^{-3}$ M.

Dále jsme provedli srovnání získaného absorpčního spektra se spektrem, které bylo poskytnuto španělskými spolupracovníky (obr. 15). Ze srovnání obou spekter je patrné, že spektra mají totožný tvar s hlavními absorpčními pásy ve stejných oblastech vlnových délek. Při transportu komplexu iridia do České republiky nedošlo k rozkladu ani jiné změně struktury a připravený roztok tak mohl být použit pro další studie.

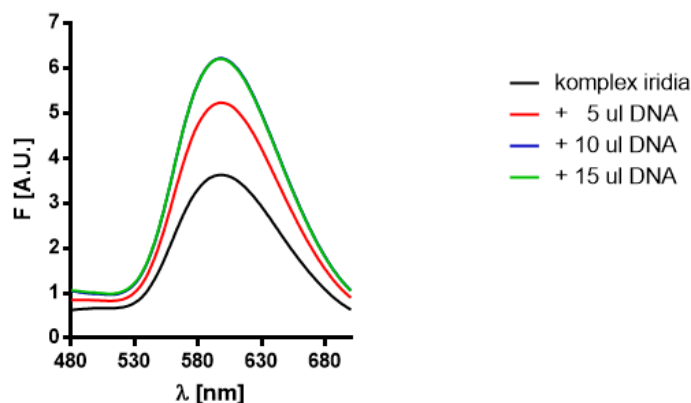


Obr. 15 Absorpční spektrum komplexu iridia naměřené na University of Murcia

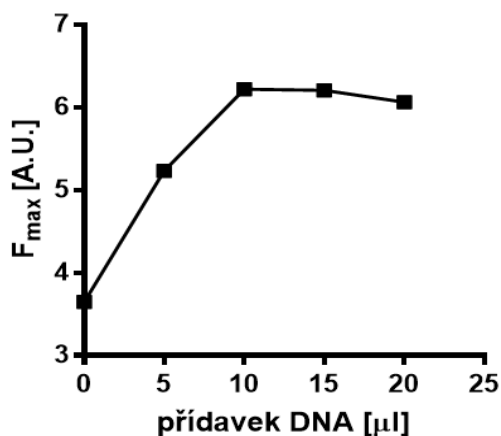
Bylo také ověřeno, že v průběhu času nedocházelo ke změně v absorpčním spektru studovaného komplexu. Z toho bylo vyvozeno, že připravený roztok byl stabilní po celou dobu, po kterou probíhalo měření této bakalářské práce. ϵ [M⁻¹·cm⁻¹]

5.2 Měření fluorescence – stanovení interakce s DNA

Měřením fluorescence bylo zjišťováno, zda dochází k vazebné reakci mezi komplexem iridia a DNA. 20 μ l zásobního roztoku komplexu iridia bylo 100x zředěno vodou a byla změřena jeho fluorescence při excitační vlnové délce 405 nm a emisní vlnové délce v rozmezí 480 až 700 nm. Maximum fluorescenčního spektra bylo určeno okolo 600 nm. K roztoku bylo přidáváno po 5 μ l DNA, poté proběhla inkubace vždy po dobu 10 minut a bylo proměřeno spektrum. Nárůst fluorescence po přidání DNA je patrný z obr. 16 a obr. 17.



Obr. 16 Závislost průběhu fluorescence (F) na vlnové délce pro komplex iridia a komplex iridia s přídávky DNA, pozorovaný shodný průběh spektra pro vyšší množství DNA (přídavek 10 μ l a 15 μ l)

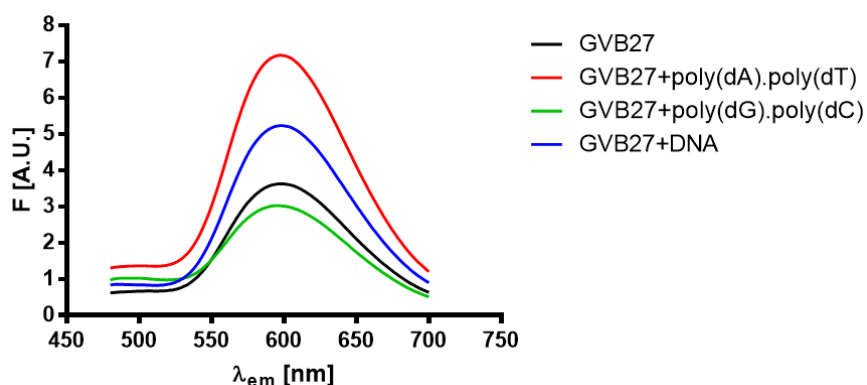


Obr. 17 Závislost maxima fluorescence (F_{max}) na množství přídávků DNA

Zvýšení fluorescence po přidání DNA ke 100x zředěnému komplexu iridia dokazuje, že mezi komplexem iridia a dvoušroubovicí DNA dochází k interakci. Po přidání 15 a více μ l DNA se maximum fluorescence již příliš neměnilo, všechnen komplex iridia byl už zřejmě navázaný na DNA. Tímto experimentem byla ukázána interakce komplexu iridia s DNA, ale nebyla získána informace, o jakou vazbu na DNA se konkrétně jedná. A proto byly použity následující metody k určení této vazby.

5. 3 Zjištění vazebné preference

Pomocí fluorescenční spektroskopie byla také zjišťována sekvenční preference komplexu iridia nebo její případná nezávislost. Z naměřených hodnot (viz obr. 18) bylo prokázáno, že daný komplex iridia vykazuje vyšší sekvenční preferenci k párům A-T než ke G-C párům.

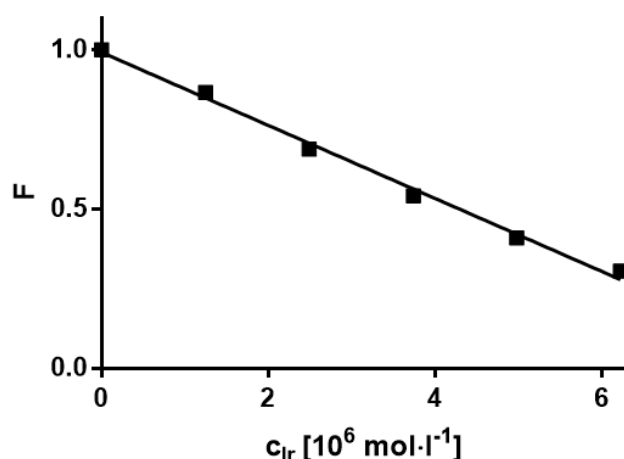


Obr. 18 Závislost fluorescence (F) na vlnové délce pro jednotlivé komponenty

S ohledem na srovnávací studie (Ren a Chaires 1999) bylo zjištěno, že látky vázající se do žlábků vykazují větší preferenci k A-T párům. U interkalátorů nebyla stanovena výrazná preference, případně velmi malá pro G-C páry. Na základě sekvenční preference A-T párů před páry G-C u studovaného komplexu iridia by se mohlo jednat o látku vázající se do žlábků než o interkalátor. K jasnému prokázání způsobu vazby komplexu iridia na DNA byly provedeny další metody.

5. 4 Stanovení vazebné konstanty metodou vytěsnění ethidium bromidu

Metodou vytěsnění ethidium bromidu byla stanovena vazebná konstanta studovaného komplexu iridia. Intenzita fluorescence ethidium bromidu byla měřena v křemenných kyvetách na fluorescenčním spektrofotometru při excitační vlnové délce 495 nm a emisní vlnové délce v rozmezí 550 – 700 nm. Nejprve byla určena hodnota fluorescence roztoku ethidium bromidu (1,3 μM) a TrisCl (0,01 M) jako blank. Přídavkem DNA (3,9 μM) došlo k navázání ethidium bromidu na DNA, a tím k nárůstu intenzity fluorescence. Postupným přidáváním 1 μl zásobního roztoku komplexu iridia ($2,5 \cdot 10^{-3}$ M) byl sledován pokles naměřené intenzity fluorescence (obr. 19).

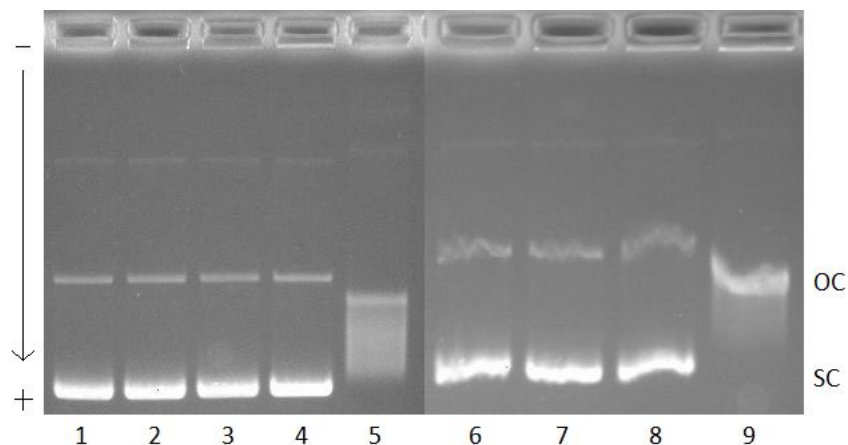


Obr. 19 Očekávaná lineární závislost relativní fluorescence (F) na koncentraci komplexu iridia (c_{Ir}), rovnice kalibrační přímky $y = -0,1147x + 0,9919$

Na základě znalosti vazebné konstanty ethidium bromidu ($1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$) při 50% redukci fluorescence (vytěsnění 1/2 molekul EtBr) byla po dosažení do rovnice kalibrační přímky (viz obr. 19) stanovena hodnota vazebné konstanty komplexu iridia na $4,3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. Pro samostatné ověření, že studovaný komplex iridia nevykazuje žádný signál při měření fluorescence, byl použit roztok komplexu iridia (zředěný 400x) a Tris. Intenzita fluorescence tohoto roztoku byla zanedbatelná a bylo tedy prokázáno, že komplex za těchto podmínek nefluoreskuje.

5. 5 Rozvíjení DNA

Rozvíjení DNA bylo zkoumáno pomocí elektroforézy na 1% agarózovém gelu. Vzorky plazmidové DNA (pBR322) byly modifikovány komplexem iridia o r_i 0,1 – 0,5 nebo cisplatinou ($r = 0,1$). Rychlost migrace jednotlivých molekul v elektrickém poli se projeví po obarvení a vyfotografování gelu jako proužky různé intenzity. Pokud je DNA ve formě nadšroubovicové (SC), putuje v gelu díky své kompaktnosti rychleji než otevřená kružnicová forma (OC). Interagující komplex iridia může změnit elektroforetickou mobilitu DNA. Pro porovnání byl použit vzorek s cisplatinou, která je známá jako interkalátor a je pro ni charakteristické rozvíjení dvoušroubovice DNA (Sangeetha *et al.* 2014). Výsledky elektroforézy jsou zobrazeny na obr. 20.

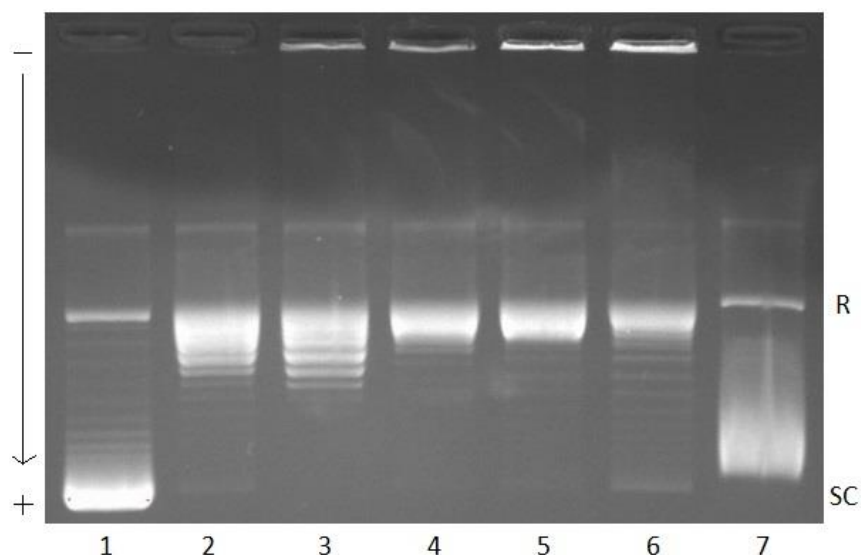


Obr. 20 Rozvíjení plazmidové DNA pomocí elektroforézy a vyznačený směr pohybu k anodě, vzorek: 1. kontrola (plazmidová DNA, bez Ir), 2. a 6. s Ir ($r = 0,1$), 3. a 7. s Ir ($r = 0,3$), 4. a 8. s Ir ($r = 0,5$), 5. a 9. s cisplatinou ($r = 0,1$); vzorky 2 – 5 byly inkubovány 2 hodiny, vzorky 6 – 9 byly inkubovány 24 hodin, OC – otevřená kružnicová forma, SC – nadšroubovicová forma

Z obr. 20 je zřetelné, že komplex iridia neovlivňuje elektroforetickou mobilitu plazmidové DNA ani při nejvyšším stupni modifikace $r = 0,5$. Naopak cisplatinu snižuje mobilitu SC-formy DNA postupným rozvíjením dvoušroubovice. Žádný zjištěný vliv komplexu iridia na rozvíjení DNA by mohl znamenat, že komplex iridia s DNA neinteraguje nebo v případě interakce k rozvíjení DNA nedochází. Z měření fluorescence je patrné, že komplex iridia s DNA interaguje. Výsledek tohoto experimentu můžeme interpretovat tak, že u daného komplexu iridia se nejedná o interkalátor. Pro ověření je vhodné dále testovat vliv komplexu iridia na topoizomerázu I.

5. 6 Inhibice topoizomerázy I

Interakce studovaného komplexu iridia s DNA byla také prošetřena použitím Topo I pomocí gelové elektroforézy v 1% agarózovém gelu. Topoizomerázy jsou enzymy, které dokáží měnit topologii DNA za účelem uvolnění torzního namáhání během různých procesů (Janočková *et al.* 2016). Díky této vlastnosti je možné specifikovat a měřit interkalační způsob vazby sloučenin na DNA. Tato analýza je závislá na schopnosti topoizomerázy přeměnit relaxovanou DNA (R) na nadšroubovici (SC-forma) v přítomnosti interkalačních sloučenin, jež jsou často spojovány s inhibicí nebo otrávením topoizomerázy. Výsledky inhibice topoizomerázy jsou popsány na obr. 21.



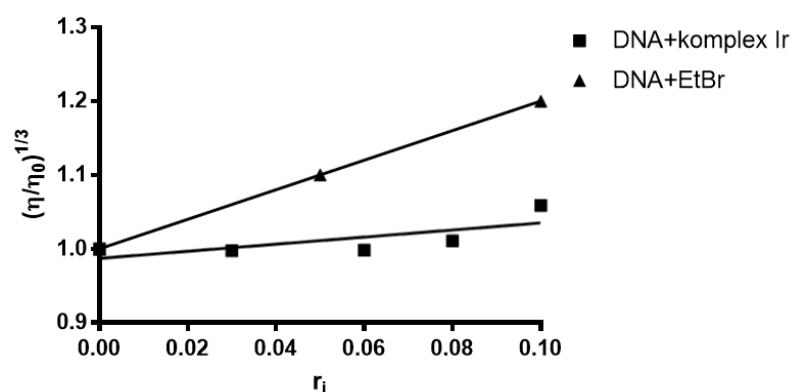
Obr. 21 Vliv komplexu iridia na relaxaci plazmidové DNA (pBR322) pomocí Topo I a vyznačený směr pohybu k anodě, vzorky inkubované 60 minut při teplotě 37 °C; vzorek: 1. pBR322 bez Topo I, 2. negativní kontrola (pBR322, Topo I, bez komplexu iridia), 3. – 6. pBR322 v přítomnosti Topo I a komplexu iridia (30, 50, 70, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), 7. pBR322 v přítomnosti Topo I a EtBr (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)

Samotná plazmidová DNA (pBR322) obsahuje poměrně dost nadšroubovicové SC-formy, která migruje gelem nejrychleji (vzorek 1). V přítomnosti 1 U Topo I vymizela SC-forma a zvětšilo se výrazně množství R-formy (vzorek 2). Po přidání komplexu iridia o koncentracích 30 – 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ došlo podle předpokladu také k relaxaci DNA (vzorek 3 – 6). Topo I byla dále schopná relaxovat DNA. Při vysoké koncentraci komplexu iridia (vzorek 6) lze vidět nepatrné množství SC formy, kde Topo I fungovala pomaleji nebo s menším účinkem. Komplex iridia tedy neinhibuje funkci Topo I.

Tato metoda ukazuje, že studovaný komplex iridia nemá vliv na aktivitu Topo I. Funkce enzymu není inhibována nebo případně ve velmi malé míře. Pro přesnější srovnání by bylo vhodné použití také Hoechst 33258 (standard s vazbou do žlábků), který nebyl k analýze dostupný. Nicméně je známo, že všechny interkalátory inhibují Topo I, stejně jako EtBr (viz vzorek 7). Studovaný komplex iridia tedy nemůže být interkalátorem. Pro ověření byly provedeny další metody.

5. 7 Měření viskozity DNA

Pro studium interakce komplexu iridia s DNA byla využita metoda měření viskozity k určení, zda-li se v případě námi studovaného komplexu jedná o interkalátor. Naměřené hodnoty byly srovnány s hodnotami získanými pro ethidium bromid, který je považován za standardní interkalátor a jeho vazba na DNA byla již intenzivně studována (Suh a Chaires 1995).

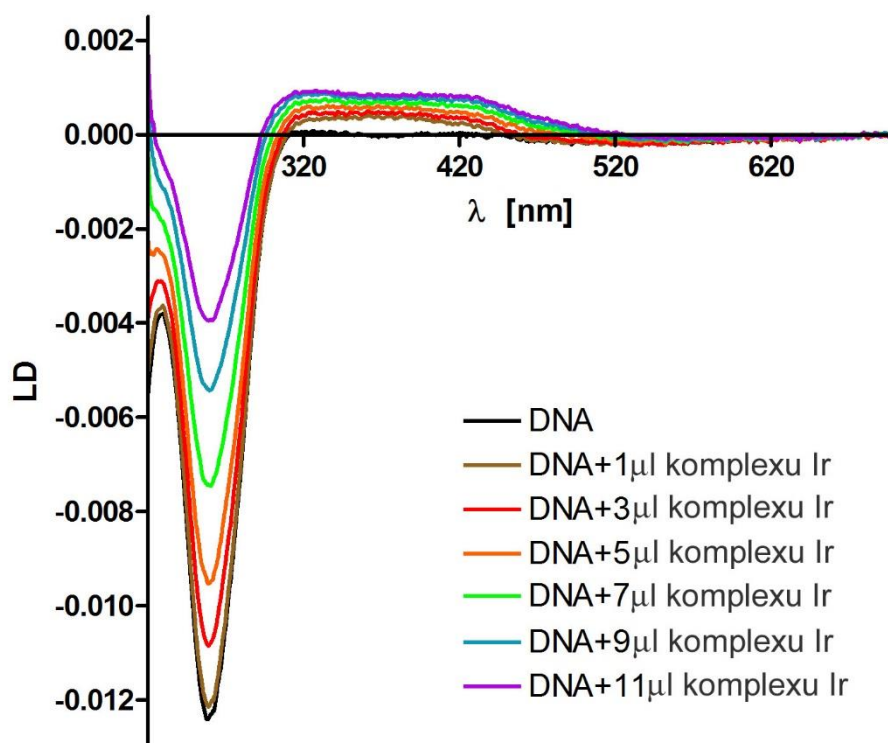


Obr. 22 Závislost viskozity $(\frac{\eta}{\eta_0})^{1/3}$ na stupni modifikace r_i DNA pro ethidium bromid (EtBr) a komplex iridia

Relativní viskozita byla nejprve naměřena pro DNA z telecího thymu bez komplexu iridia a poté v přítomnosti komplexu iridia pro čtyři stupně modifikace r_i (0,03; 0,06; 0,08; 0,1). Z obr. 22 je patrné, že se vzrůstajícím stupněm modifikace DNA roste také relativní viskozita. Nárůst viskozity pro ethidium bromid je se vzrůstajícím r_i lineární. U komplexu iridia se naopak zvyšuje relativní viskozita pouze nepatrně a lze ji v rámci nejistoty považovat za konstantní v porovnání s ethidium bromidem. Studovaný komplex iridia tedy není interkalátorem.

5. 8 Měření lineárního dichroismu

Pro získání dalších informací o způsobu vazby komplexu iridia na DNA bylo také provedeno měření průtokového lineárního dichroismu, které je velmi citlivé k interakcím DNA s ligandy. K měření byl použit vzorek DNA z telecího thymu ($1 \cdot 10^{-4}$ M) v 10 mM TrisCl pufru s postupnými přídávky (1 nebo 2 μ l) komplexu iridia o r_i 0 – 0,3. Naměřené LD spektrum je na obr. 23.



Obr. 23 LD spektrum DNA z telecího thymu v přítomnosti komplexu iridia v závislosti na jednotlivých přídavných zásobních roztoku komplexu iridia, negativní LD signál okolo 260 nm, existence LD signálu 300 – 470 nm

Pokud jsou páry báze orientované kolmo na osu šroubovice DNA, je očekáván negativní LD signál v oblasti okolo 260 nm, kde absorbují báze v DNA (Janočková *et al.* 2016). Stejně orientovaný LD signál navázané sloučeniny v oblasti její absorpce by naznačoval orientaci molekul rovnoběžně s bázemi DNA a kolmou na osu dvoušroubovice. Tato orientace je typická pro interkalátory. Existence LD signálu v přítomnosti komplexu iridia oproti DNA v oblasti větších vlnových délek 300 až 470 nm dokazuje interakci komplexu iridia s DNA. Přítomnost pozitivního signálu v oblasti absorpce komplexu iridia ukazuje, že molekuly komplexu iridia jsou orientovány přibližně rovnoběžně s osou dvoušroubovice DNA. Taková orientace není charakteristická pro interkalátory, a proto tato metoda dokazuje, že studovaný komplex iridia není interkalátorem.

5. 9 Stanovení kovalentní vazby komplexu iridia na DNA

Na základě předchozích výsledků byla prokázána nekovalentní interakce komplexu iridia na DNA. Nicméně je nutné stanovit kovalentní vazbu komplexu iridia na

DNA v případě, že by se komplex iridia s nově navrženým ligandem vázal na DNA také kovalentně.

Vzorek obsahující modifikovanou DNA z telecího thymu ($r = 0,1$) byl dialyzován proti vodě. Dialyzační membránou postupně procházely do vody malé molekuly komplexu iridia, které nebyly na DNA navázané nebo se vázaly k DNA nekovalentní vazbou. Velké molekuly DNA nemohly dialyzační membránou vzhledem ke své velikosti projít, zatímco malé molekuly prostupovaly membránou do té doby, než došlo k ustálenému stavu. Koncentrace DNA ve vzorku po dialýze byla určena pomocí absorpční spektrofotometrie a Lambert-Beerova zákona (1). K určení procentuálního množství kovalentně navázaného komplexu iridia na DNA po dialýze byla použita atomová absorpční spektrometrie, díky které byla získána koncentrace iridia ve dvou stejných vzorcích. Ze znalosti koncentrace DNA ve vzorku po dialýze byl vypočten stupeň modifikace a poté procentuální množství komplexu iridia kovalentně navázaného na DNA.

Pro první vzorek byla získána hodnota 0,77 % kovalentně navázaného komplexu iridia na DNA. U druhého vzorku po dialýze nebyla naměřena žádná koncentrace komplexu iridia. Nenulová hodnota procentuálního množství v případě prvního vzorku by mohla být ovlivněná elektrostatickou vazbou, ale chyba měření je 1 %. Na základě provedení této dialýzy bylo usouzeno, že komplex iridia se neváže k DNA kovalentní vazbou.

6. ZÁVĚR

V této bakalářské práci byly studovány interakce nového biologicky aktivního komplexu iridia (GVB27) s DNA vybranými metodami molekulární biofyziky. Ve struktuře tohoto komplexu se vyskytuje zajímavě navržený ligand, u kterého bylo předpokládáno, že by se mohl eventuálně do DNA interkalovat.

Měřením fluorescence bylo zjištěno, že studovaný komplex iridia interaguje s DNA se sekvenční preferencí A-T párů před G-C páry (viz 5.2 a 5.3). Metodou vytěsnění ethidium bromidu byla stanovena vazebná konstanta komplexu iridia $4,3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ (viz 5.4). Pomocí elektroforézy a inhibice topoizomerázy I byla ověřena interakce mezi komplexem iridia a DNA. Zároveň výsledky těchto metod vedly ke zjištění, že komplex iridia zřejmě není interkalátorem (viz 5.5 a 5.6). Měřením viskozity a lineárního dichroismu bylo potvrzeno, že se komplex iridia neinterkaluje mezi páry bází DNA (viz 5.7 a 5.8), jak bylo ze začátku předpokládáno. Kovalentní vazba komplexu iridia na DNA nebyla prokázána (viz 5.9). Studovaný komplex iridia se váže nekovalentně k DNA a s největší pravděpodobností se jedná o látku s vazbou do žlábků.

7. SEZNAM LITERATURY

Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2005) *Základy buněčné biologie*. Espero Publishing, Praha

Folvarská L (2015) *Interakce DNA s novým protinádorově účinným komplexem ruthenia s flavonolovým ligandem*. Diplomová práce, UP Olomouc

Gasser G, Ott I, Metzler-Nolte N (2011) Organometallic Anticancer Compounds. *J Med Chem* 54, 3 – 25

Geldmacher Y, Oleszak M, Sheldrick WS (2012) Rhodium(III) and iridium (III) complexes as anticancer agents. *Inorg Chim Acta* 393, 84 – 102

Janockova J, Zilecka E, Kasparkova J, Brabec V, Soukup O, Kuca K, Kozurkova M (2016) Assessment of DNA-binding affinity of cholinesterase reactivators and electrophoretic determination of their effect on topoisomerase I and II activity. *Mol Bi-syst* 12, 2910 – 2920

King RC, Stansfield WD, Mulligan PK (2006) *A Dictionary of Genetics*. Oxford University Press, New York

Liu Z, Sadler PJ (2014) Organoiridium Complexes: Anticancer Agents and Catalysts. *Acc Chem Res* 47, 1174 – 1185

Malina J, Farrell NP, Brabec V (2014) DNA Condensing Effects and Sequence Selectivity of DNA Binding of Antitumor Noncovalent Polynuclear Platinum Complexes. *Inorg Chem* 53, 1662 – 1671

Mjos KD, Orvig C (2014) Metallodrugs in Medicinal Inorganic Chemistry. *Chem Rev* 114, 4540 – 4563

Palchaudhuri R, Hergenrother PJ (2007) DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. *Curr Opin Biotech* 18, 497 – 503

Prachařová J (2013) Role modifikací DNA komplexy kovů v terapii rakoviny. *Disertační práce*, UP Olomouc

Ren J, Chaires JB (1999) Sequence and Structural Selectivity of Nucleic Acid Binding Ligands. *Biochem* 38, 16067 – 16075

Rodger A (2013) *Encyclopedia of Biophysics*. Springer. Berlin

Rosenberg B, Van Camp L, Krigas T (1965) Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis product from a platinum electrode. *Nature* 205, 698 – 699

Rozsypal S (2003) *Nový přehled biologie*. Nakladatelství Scientia. Praha

Rozsypal S (2006) *Úvod do molekulární biologie*. Brno

Sangeetha GKR, Blessy BM, Sudhamani CN, Bhojya N (2014) Mechanism of DNA Binding and Cleavage. *J Biomed Biotechnol* 2 (1), 1 – 9

Santoni D, Castiglione F, Paci P (2013) Identifying Correlations between Chromosomal Proximity of Genes and Distance of Their Products in Protein-Protein Interaction Networks of Yeast. *Plos One* 8 (3), e57707

Suh D, Chaires JB (1995) Criteria for the Mode of Binding of DNA Binding Agents. *Bioorganic Med Chem* 3 (6), 723 – 728

Watson JD, Crick FHC (1953) Molecular Structure of Nucleic Acids. *Nature* 171, 737 – 738

Zhang CX, Lipard SJ (2003) New metal complexes as potential therapeutics. *Curr Opin Chem Biol* 7, 481 – 489

internetové zdroje:

<http://en.wikipedia.org/wiki/A-DNA>

<http://www.who.int/cancer/en>

Errata (opravy bakalářské práce)

Oprava: Seznam zkratk

špatně – cisplatina (cis-diamindichloroplatnatý komplex, cDDP)

správně – cisplatina (cis-diammindichloroplatnatý komplex, cDDP)

Oprava: str. 3

špatně – Nejznámějším komplexem na bázi platiny je cisplatina (cis-diamindichloroplatnatý komplex, cis-[Pt(NH₃)₂(Cl)₂].

správně – Nejznámějším komplexem na bázi platiny je cisplatina (cis-diammindichloroplatnatý komplex, cis-[Pt(NH₃)₂(Cl)₂].

Oprava: str. 8

špatně – Jednotlivé mononukleotidy spojuje kovalentní fosfodiesterová vazba, která je mezi fosfátovou skupinou napojenou na cukr prvního nukleotidu na 5'-konci a hydroxylovou skupinou napojenou na cukr druhého nukleotidu na 3'-konci. Na 1'-konci každého cukru se nachází kovalentně navázaná heterocyklická báze.

správně – Jednotlivé mononukleotidy spojuje kovalentní fosfodiesterová vazba, která je mezi fosfátovou skupinou napojenou na cukr prvního nukleotidu na 5' uhlíku a hydroxylovou skupinou napojenou na cukr druhého nukleotidu na 3' uhlíku. Na 1' uhlíku každého cukru se nachází kovalentně navázaná heterocyklická báze.

Oprava: str. 12

špatně – V této konformaci se nachází většina molekul DNA v prokaryotických a eukaryotických buňkách. B-DNA je stabilní i při relativní vlhkosti 95 %, je tenčí a vyšší oproti ostatním formám a osa dvoušroubovice prochází středem vazby páru báze.

správně – V této konformaci se nachází většina molekul DNA v prokaryotických a eukaryotických buňkách. B-DNA je stabilní i při relativní vlhkosti 95 %, je tenčí a vyšší oproti ostatním formám a osa dvoušroubovice prochází středem vazby párů bází.

Oprava: str. 16

špatně – Při interkalaci poskytují nukleové kyseliny svůj mezibázový prostor dané sloučenině a dochází tak ke vsunutí planární části molekuly mezi páry báze DNA.

správně – Při interkalaci poskytují nukleové kyseliny svůj mezibázový prostor dané sloučenině a dochází tak ke vsunutí planární části molekuly mezi páry bází DNA.

Oprava. str. 16

špatně – Touto vazbou ligand přímo interaguje s okrajovými páry báze velkého a malého žlábků DNA, kde je stabilizován intermolekulárními interakcemi. DNA zůstává v podstatě v neporušeném formátu.

správně – Touto vazbou ligand přímo interaguje s okrajovými páry bází velkého a malého žlábků DNA, kde je stabilizován intermolekulárními interakcemi. DNA zůstává v podstatě v neporušeném formátu.

Oprava: str. 31

špatně – Pro porovnání byl použit vzorek s cisplatinou, která je známá jako interkalátor a je pro ni charakteristické rozvíjení dvoušroubovice DNA (Sangeetha *et al.* 2014).

správně – Pro porovnání byl použit vzorek s cisplatinou, pro kterou je charakteristické rozvíjení dvoušroubovice DNA (Sangeetha *et al.* 2014).

Oprava: str. 35

špatně – Pokud jsou páry báze orientované kolmo na osu šroubovice DNA, je očekáván negativní LD signál v oblasti okolo 260 nm, kde absorbují báze v DNA (Janočková *et al.* 2016).

správně – Pokud jsou páry bází orientované kolmo na osu šroubovice DNA, je očekáván negativní LD signál v oblasti okolo 260 nm, kde absorbují báze v DNA (Janočková *et al.* 2016).