

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Charakterizace vazby platinových komplexů na
DNA**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Martina Michalová
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Vlastimil Mašek, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	9. 5. 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou v práci citovány a uvedeny v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne:.....

.....

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala panu Mgr. Vlastimilu Maškovi, Ph.D., vedoucímu diplomové práce, za odborné vedení a všestrannou pomoc. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Olze Novákové, Ph.D. za cenné rady a připomínky a Ing. Davidu Mildemu, Ph.D., z Katedry analytické chemie Univerzity Palackého Olomouc, za pomoc při měření vzorků na ICP – MS. Všem pracovníkům Ústavu farmakologie LF UPOL děkuji za pomoc, kterou mi v průběhu práce poskytovali.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc. Martina Michalová
Název práce	Charakterizace vazby platinových komplexů na DNA
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Vlastimil Mašek, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2013
Abstrakt	<p>Nejvýznamnějším a nejdéle používaným chemoterapeutikem je cisplatina (<i>cis</i> – diammindichloroplatnatý komplex). Bylo prokázáno, že DNA je cílovým místem působení cisplatiny a dalších cytostatik na bázi platiny. Nicméně, cisplatina vykazuje značné vedlejší účinky a toxicitu. Proto jsou syntetizovány nové látky, které jsou studovány z hlediska jejich protinádorové účinnosti.</p> <p>V této diplomové práci byly studovány platinové komplexy odvozené od transplatiny, záměnou ligandů za benzylaminopurinové deriváty (PSVM 002, PSVM 004, PSVM 005, PSVM 006). Bylo ověřeno, že se tyto látky váží na DNA, nicméně komplex PSVM 004 se váže pouze ze 2 %. Dále byla popsána charakteristika vazby na DNA a z experimentů vyplývá, že studované látky vytváří na DNA monofunkční adukty. Výsledky byly získány pomocí metod molekulární biologie a biochemie, AAS, ICP – MS.</p>
Klíčová slova	Cisplatina, transplatina, adukty na DNA
Počet stran	71
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Bc. Martina Michalová
Title	Characterization of the binding of platinum complexes on DNA
Type of thesis	Master
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Vlastimil Mašek, Ph.D.
The year of presentation	2013
Abstract	<p>The most important and longest – used chemotherapy agent is cisplatin (cis – diamminedichloroplatinum(II)). It has been shown that DNA is the critical target site of leverage of cisplatin and other platinum – based cytostatics. However, cisplatin show side effects and toxicity. Therefore, new compounds have been synthesized and their antitumor activity was further studied.</p> <p>In this master theses were studied the platinum complexes derived from transplatin, having benzylaminopurine derivatives as non retracting ligands (PSVM 002, PSVM 004, PSVM 005, PSVM 006). It was verified that this compounds are binding to the DNA, but the complex PSVM 004 binds only 2 %. It was described the characteristics of DNA binding and experiments indicate that complexes produce the monofunctional adducts to DNA. The results were obtained using methods of molecular biology and biochemistry, by AAS and ICP – MS.</p>
Keywords	Cisplatin, transplatin, adducts on DNA
Number of pages	71
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

Úvod	- 8 -
Cíle práce	- 9 -
1 Cisplatina.....	- 10 -
1.1 Mechanismus vazby na DNA.....	- 11 -
1.2 Transplatina.....	- 13 -
1.3 Aduky tvořené cisplatinou na DNA.....	- 14 -
1.4 Strukturní změny DNA indukované vazbou cisplatinou	- 16 -
1.4.1 Monofunkční adukt	- 16 -
1.4.2 1, 2 – GG intrastrand cross – link cisplatinou (1,2 – GG IAC).....	- 16 -
1.4.3 1, 3 – GG intrastrand cross – link cisplatinou (1,3 – GG IAC).....	- 17 -
1.4.4 1, 2 – GG interstrand cross – link cisplatinou (1,2 – GG IEC).....	- 17 -
1.4.5 Strukturní změny DNA indukované vazbou transplatinou.....	- 18 -
1.4.6 Termodynamické vlastnosti DNA modifikované cisplatinou	- 18 -
2 Důsledek vazby cisplatinou na funkci DNA a odpověď buněčného aparátu	- 19 -
2.1 Vliv na replikaci a transkripci DNA	- 20 -
2.2 Apoptóza	- 20 -
2.3 Buněčná rezistence	- 21 -
2.4 Reparace DNA	- 23 -
2.4.1 Nukleotidová excizní oprava	- 23 -
2.4.2 Oprava chybného párování.....	- 25 -
2.5 Proteiny se specifickou vazbou na DNA modifikovanou cisplatinou	- 26 -
2.5.1 Proteiny obsahující HMG doménu	- 28 -
2.5.2 Proteiny postrádající HMG doménu.....	- 29 -
3 Vývoj nových protinádorově účinných komplexů.....	- 30 -
3.1 Komplexy odvozené od cisplatinou	- 30 -
3.1.1 Karboplatina	- 31 -
3.1.2 Oxaliplatina.....	- 31 -
3.1.3 Nedaplatina	- 32 -

3.2	Komplexy odvozené od transplatiny	- 32 -
3.3	Polynukleární platinové komplexy	- 34 -
3.4	Platičité komplexy	- 35 -
3.5	Komplexy s centrálním kovem jiným než platina	- 36 -
	Seznam použité literatury	- 39 -
	Seznam použitých zkratk	- 50 -

Úvod

V roce 1953, kdy byla objevena struktura DNA, se vědecký zájem zaměřil na DNA jako nositelku genetické informace a hlavně jako na cílové místo působení mutagenních a karcinogenních látek. Díky těmto látkám může docházet k mutacím, které mohou zapříčinit až rakovinné bujení. Mezi úspěšné léčebné postupy užívané v klinické praxi patří chemoterapie – podávání léků potlačující růst zhoubných nádorů.

Důležitou roli v léčbě nádorových onemocnění hrají již několik desítek let chemoterapeutika založená na bázi těžkých kovů. Prvním a stále nejpoužívanějším cytostatikem na bázi platiny je cisplatina, jejímž místem působení je molekula DNA.

Vzhledem k některým závažným nežádoucím vlastnostem cisplatiny jsou intenzivně hledány sloučeniny, které by cisplatinu (alespoň v případě některých typů nádorového onemocnění) nahradily. Transplatina se ukázala jako klinicky neúčinná, byly však objeveny její deriváty, které mají významnou cytotoxickou aktivitu. Tyto látky by tedy mohly být kandidáty na protinádorová léčiva.

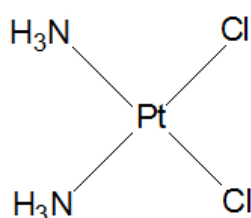
Cíle práce

Hlavní cíle diplomové práce byly:

- Vypracovat literární rešerši na téma cisplatina, její vazba na DNA a vliv na strukturní změny a funkci DNA.
- Ověřit, zda se testované komplexy váží na DNA a v jaké míře.
- Provést základní experimenty charakterizující vazbu testovaných komplexů na DNA – například vliv na teplotu tání DNA, rozvíjení nadšroubovicové struktury DNA, frekvenci tvorby meziřetězcových můstků.
- Porovnání výsledků s „klasickými“ komplexy – cisplatina, transplatina.

1 Cisplatina

Před objevením protinádorové aktivity cisplatiny se používaly komplexy obsahující atom kovu jako protinádorová léčiva (Rosenberg, 1999). Nicméně prvním a nejdéle používaným cytostatikem na bázi platiny je *cis* – diammindichloroplatnatý komplex $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$, známý jako cisplatina (Obr. 1). Tento komplex byl poprvé syntetizován v roce 1845 italským chemikem Michele Peyronem, ale objevitelem protinádorové aktivity cisplatiny byl americký biofyzik Barnett Rosenberg. Ten v roce 1965 na Michiganské univerzitě v USA zkoumal vliv elektrického pole na růst a buněčné dělení bakterií *Escherichia coli* (Rosenberg et al., 1965).



Obr. 1: Strukturní vzorec cisplatiny

Elektrické pole bylo vytvořeno mezi platinovými elektrodami a elektrolytem, který obsahoval NH_4Cl . Experiment ukázal neočekávaný filamentózní růst, který byl zpočátku zcela nepochopen. Pozdější studie ukázaly, že začátek filamentózního růstu neměl nic společného s elektrickým polem, ale ve skutečnosti byla příčina v přítomnosti malého množství platinových koordinačních sloučenin, které se vytvářely rozpouštěním platinové elektrody v roztoku NH_4Cl , a tak se vytvořily dva aktivní komplexy. Nejprve vznikl komplex $\text{Pt}(\text{NH}_4)_2\text{Cl}_6$ a ten se posléze působením slunečního záření, postupnou substitucí Cl^- ligandů za NH_3 ligandy, fotochemicky přeměnil na *cis* - $[\text{PtCl}_4(\text{NH}_3)_2]$, jenž vyvolal pozorovaný efekt dokonce i při velmi nízkých koncentracích. Dále byla ověřena účinnost [*cis* - $\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2$], který vzniká coby meziprodukt při syntéze Pt^{4+} komplexů (Rosenberg et al., 1967). Byl testovaný také efekt na růst *E. coli* dvěma isomery $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$, *cis* a *trans*. *Cis* isomer byl efektivní v zesílení filamentózního růstu, zatímco *trans* isomer nevykazoval viditelný efekt na proces buněčného růstu. Poté byly nasyntetizovány další komplexy platiny podobného typu (známé jako Peyronovy chloridy) a experimentálně zkoušeny na nádorových modelech.

O úspěchu komplexů platiny svědčí fakt, že v roce 1971 byly provedeny první klinické testy, které dodaly velmi slibné výsledky. Při léčbě nádoru varlete vykazovala cisplatina více než 90% úspěšnosti při včasné diagnóze. Dne 19. 12. 1978 byla

cisplatina Správou potravin a léčiv v USA (FDA – Food and Drug Administration) zavedena do klinické praxe pod názvem Platinol a v současnosti patří k nejrozšířenějším protinádorovým farmakům.

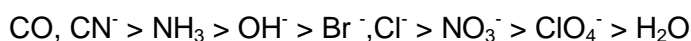
Poté, co cisplatina prošla klinickými testy, bylo zjištěno, že pozitivně působí i proti některým dalším pokročilým nádorům. V dnešní době se používá především proti nádorům varlat, vaječníků, močového měchýře, hlavy, krku a malobuněčným plicním nádorům. V kombinaci s radioterapií je pomocí cisplatiny dosahováno uspokojivých výsledků také při aplikaci proti nádorům kostí, tenkého střeva, plic, mozku a karcinomu děložního čípku. Léčba cisplatinou je ale neúspěšná proti nejčastěji vyskytujících se nádorů, jako jsou nádory prsu, tlustého střeva či konečníku (O'Dwyer et al., 1999).

Navzdory úspěchu, kterého cisplatina dosáhla, má různá omezení a vyznačuje se toxickými vedlejšími účinky. Nejčastějšími komplikacemi jsou zvracení, nefrotoxicita (narušení funkce ledvin), myelotoxicita (porušení nervových drah v míše), myelosuprese (potlačení funkce krvetvorby), ototoxicita (ztráta sluchu), poškození zažívacího traktu a alergické reakce. Vedlejší účinky léčiva je možné zmírnit podáváním podpůrných medikamentů. Nefrotoxicitu lze snížit vysokou hydratací organismu. Další vážnou nevýhodou je získaná rezistence některých nádorů, tedy snižování citlivosti nádoru vůči cisplatině při opakovaném podávání léčiva. Některé z těchto vlivů se daří potlačit vhodnou volbou léčebného postupu (Robik & Dolan, 2007).

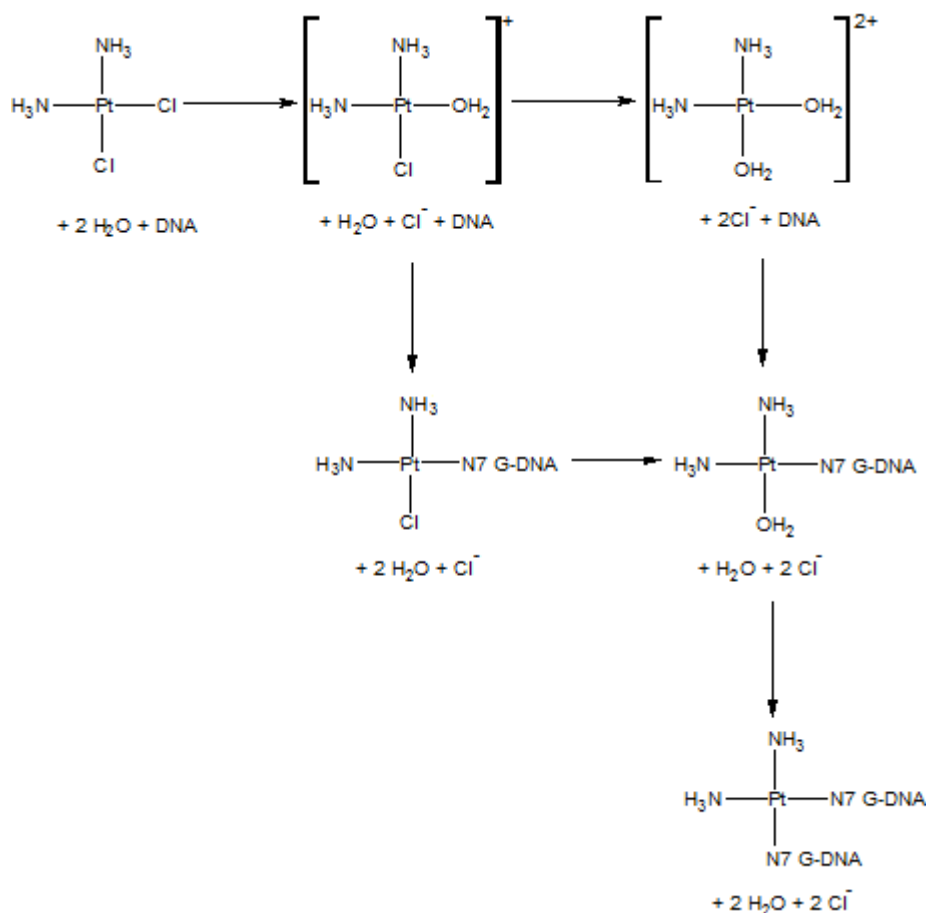
1.1 Mechanismus vazby na DNA

Hlavním úkolem po objevu protinádorové aktivity cisplatiny bylo určení cílového místa v buňce. Přestože se cisplatina váže na celou řadu buněčných komponent (DNA, RNA, membránové fosfolipidy, proteiny, mikrofilamenty), za klíčovou je považována právě vazba na DNA. Kromě efektu pozorovaného Rosenbergem na *E. coli*, přispělo k objasnění farmakologického cíle cisplatiny sledování inhibičního efektu na syntézu DNA, RNA a proteinů. Inkorporací radioaktivně značených prekurzorů do DNA, RNA a proteinů docházelo k nevratné inhibici DNA, což nebylo pozorováno u RNA a proteinů. Tím byla stanovena také distribuce platiny na jednotlivých biomakromolekulách. Zatímco na jednu molekulu DNA připadlo 22 navázaných atomů Pt, pro ostatní komponenty bylo pouhý 1 atom platiny na 1 molekulu mRNA, na 30 molekul rRNA a na 1500 molekul proteinů (Pascoe & Roberts, 1974). To potvrzuje i další experiment s radioaktivně značenou platinou (Akaboshi et al., 1992).

Cisplatina je velice jednoduchá molekula složená pouze z 11 atomů, přičemž šest z nich představují vodíky a vykazuje čtvercově planární symetrii. Na centrální Pt (II) atom jsou navázány dva typy ligandů, a to odstupující chloridové ionty a neodstupující NH₃ ligandy. Chemická stabilita vazby mezi centrálním atomem platiny a ligandem závisí na jeho schopnosti poskytovat elektrony na uskutečnění vazby (tzv. elektrodonorním charakteru). Se zvyšující se polarizovatelností elektronového obalu roste také síla vazby. Podle klesající afinity k této vazbě můžeme ligandy seřadit následujícím způsobem (Alderden et al., 2006):



Z tohoto vztahu vyplývá, že odstupujícími ligandy jsou opravdu chloridové ionty. Jejich výměna za vodu nebo ionty s nižší afinitou k Pt (II) atomu vede k hydrolyze tohoto komplexu, která umožňuje jeho vazbu na DNA.

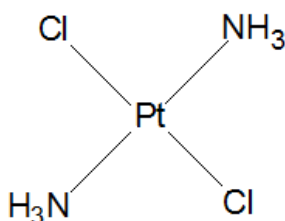


Obr. 2: Mechanismus tvorby aduktů cisplatiny na DNA (Převzato a upraveno dle Legendre & Chottard, 1999).

Cisplatina je podávána intravenózně a krví rozváděna do celého těla. Poměrně vysoká koncentrace chloridových iontů v plazmě (~100mM při pH 7,4) omezuje substituci chloridových skupin a tudíž téměř 93 % cisplatiny se nachází v dichloro- nebo chlorohydroxo- formě (Bruhn et al., 1990). Zatím není zcela objasněn mechanismus transportu cisplatiny přes buněčnou membránu, ale za dominantní se považuje pasivní transport (difuze) (Perez, 1998). K tomuto procesu může také přispívat aktivní transport pomocí membránového přenašeče pro ionty mědi ozn. jako Ctr1 (Ishida et al., 2002). V buňce je koncentrace chloridů mnohem nižší ve srovnání s krevním řečištěm (2 – 30mM, při pH 7,4) a dochází tedy k rychlé výměně chloridových skupin za molekuly vody (až 33 % dihydroxo formy cisplatiny). Při záměně chloridového iontu za vodu získá cisplatina kladný náboj a stává se tedy silně elektrofilní. Po průchodu do jádra reaguje cisplatina s DNA ve dvou krocích. V prvním kroku reaguje hydrolyzovaná forma cisplatiny zpravidla s N (7) guaninem za vzniku monofunkčního aduktu. V následujícím kroku, pokud je v blízkosti další vhodné reakční místo, hydrolyzuje druhá chloridová skupina a vytváří se další vazba s DNA za tvorby bifunkčního aduktu (Obr. 2). Rychlost reakce výměny prvního chloridového ligandu je přibližně dvakrát větší než rychlost výměny druhého chloridového ligandu (Legendre & Chottard, 1999).

1.2 Transplatina

Na počátku vývoje platinových komplexů se předpokládalo, že pouze komplexy s *cis* konfigurací mohou být protinádorově aktivní. Vycházelo se ze srovnání účinků cisplatiny a transplatiny (*trans* – diammindichloroplatnatý komplex) (Obr. 3) na buněčné dělení *E. coli*, kdy transplatina nevykazovala žádnou aktivitu (Reedijk, 1996).



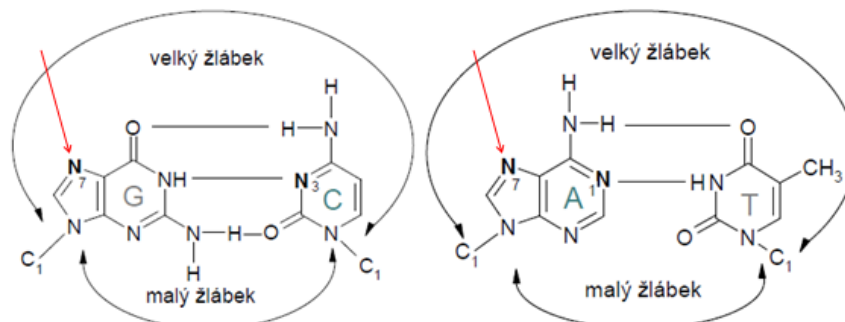
Obr. 3: Strukturní vzorec transplatiny

Transplatina je geometrický isomer cisplatiny, který se liší pouze polohou svých ligandů. Tento komplex vykazuje mnohem nižší cytotoxicitu než cisplatina, i když se také váže na DNA, která je cílovým místem jeho působení. Jako v případě ostatních

komplexů platiny, před vazbou na DNA musí dojít k aktivaci pomocí hydrolyzy. Konstanta první hydrolyzy je vyšší pro transplatinu než pro cisplatinu, v důsledku vyššího *trans* – efektu Cl⁻ oproti NH₃. Druhá hydrolyza je o 2 řády pomalejší pro monoaquo derivát transplatinu než cisplatinu (Legendre & Chottard, 1999).

1.3 Aduktů tvořené cisplatinou na DNA

Jakmile dojde k hydrataci cisplatinu, která se začne chovat jako elektrofilní činidlo, začne reagovat s nukleofilními místy na DNA. Nukleofilita bází klesá v řadě guanin – N(7) >> adenin – N(7) > cytosin – N(3) > adenin – N(1). Tymidin s cisplatinou nereaguje, jelikož aktivace vyžaduje příliš vysoké pH (Arpalahti, 1999). Atomy dusíku v poloze N(7) guaninu a adeninu jsou snadno přístupné pro vazbu komplexu, protože jsou orientovány do velkého žlábků. Naproti tomu atomy dusíku v poloze N(3) cytosinu a N(1) adeninu, se kterými může cisplatinu také reagovat v neutrálním prostředí, jsou velmi špatně přístupné a jejich vazba s DNA je znesnadněna Watson – Crickovým párováním bází (Obr. 4) (Pullman & Pullman, 1981).

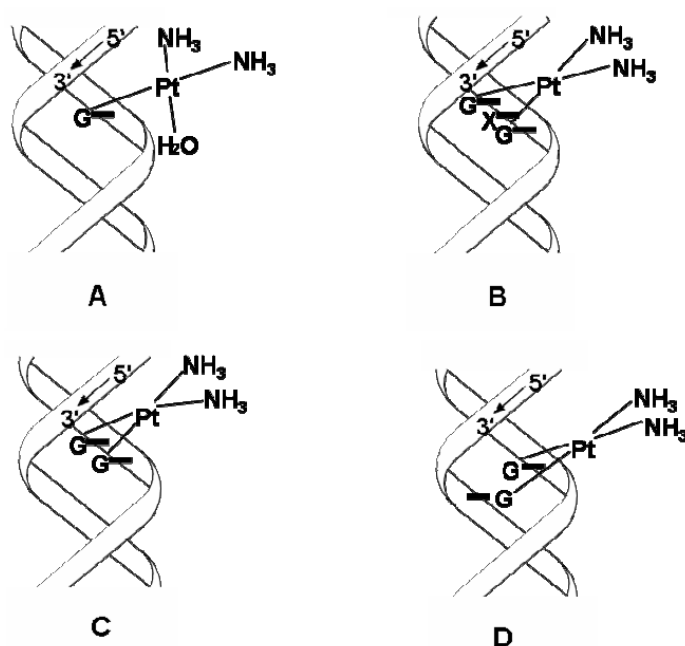


Obr. 4: Schematické znázornění umístění vazebných míst pro platinové komplexy (červená šipka)

Enzymatické štěpení modifikované DNA následované separací produktů na HPLC a jejich analýzou prostřednictvím NMR umožnilo identifikovat hlavní adukty cisplatinu (Fichtinger – Schepman et al., 1985).

V první fázi se cisplatinu váže na DNA monofunkčně (Obr. 5A) a následně přechází v bifunkční adukt, tedy ve vnitřetězcové příčné vazby (intrastrand cross – link, IAC) nebo meziřetězcové příčné vazby (interstrand cross – link, IEC). Největší zastoupení aduktů na dvouřetězcové DNA má IAC, který tvoří až 90 % všech aduktů cisplatinu (Eastman, 1987). Nejvíce aduktů se tvoří mezi dvěma sousedními guaninovými bázemi, popř. guaninovou a adeninovou bází. 1,2 – GG IAC je nejzastoupenějším aduktem a tvoří asi 60 % všech aduktů (Obr. 5C). Tento fakt je

vysvětlován skutečností, že sekvence GG je místem s nejvyšší elektronegativitou na dvouřetězcové DNA (Eastman, 1999). Dalším typem je 1,2 – GA IAC tvoří kolem 15 – 25 %. Dalším vnitřetězcovým typem je vazba cisplatiny na dva guaninové zbytky, které jsou od sebe separované jedním nukleotidem (1,3 – GG IAC) a tvoří asi 10 % (Obr. 5B). Cisplatina také vytváří meziřetězcové vazby, které jsou mezi guaninovými zbytky v komplementárních řetězcích. Tento adukt (1,2 – GG IEC) zastupuje pouze 6 % (Obr. 5D). Zbývající podíl (asi 10 %) se váže monofunkčně v N7 pozici guanosinových zbytků. Za významné z hlediska protinádorové aktivity jsou považovány bifunkční adukty, jelikož dienplatina a některé další neaktivní komplexy se váží pouze monofunkčně (Malinge & Leng, 1999).



Obr. 5: Typy aduktů tvořené cisplatinou po vazbě na DNA. Cisplatina tvoří monofunkční adukt (A) a bifunkční adukty – 1,3 – GG IAC (B), 1,2 – GG IAC (C) a 1,2 – GG IEC (D). (Eastman, 1987)

V průběhu doby se předmětem studií stal výzkum aduktů, které jsou na DNA tvořeny transplatinou, kvůli odlišnému farmakologickému efektu cisplatiny a transplatiny (Brabec & Leng, 1993). Dominantním aduktem transplatiny, až 80 %, je monofunkční adukt. Nejvíce zastoupeným bifunkčním aduktem jsou meziřetězcové vazby, kolem 12 %, což je přibližně dvojnásobné množství než u cisplatiny. Transplatina je schopna vytvářet přibližně 8% 1,3-GG IAC, který však není velmi stabilní. Jeden z nejvýznamnějších rozdílů mezi cisplatinou a jejím neaktivním izomerem transplatinou tkví v tom, že transplatina není schopna ze sterických důvodů vytvářet 1,2 – GG IAC. Lze se domnívat, že tento typ aduktu hraje významnou úlohu

v protinádorové aktivitě cisplatinu a většina prací je zaměřena na zkoumání právě jeho struktury a biologického působení.

1.4 Strukturní změny DNA indukované vazbou cisplatinu

V okolí vazby platinových komplexů pozorujeme změnu struktury DNA. Globální projevy pozorované po vazbě cisplatinu zahrnují ohyb, rozvíjení dvoušroubovice a zkrácení řetězce DNA. Základní údaje byly získány pomocí NMR, rentgenostrukturní analýzy, experimentů založených na elektroforetické mobilitě DNA v gelech a molekulárně mechanických výpočtů.

1.4.1 Monofunkční adukt

Po vazbě cisplatinu na N(7) guaninu vzniká monofunkční adukt. Jen malá část aduktů tvořených cisplatinou zůstává navázána monofunkčně. Tomuto typu aduktu byla zpočátku věnována pouze okrajová pozornost. Všeobecně byl přijímán názor, že takto navázané platinové komplexy neovlivňují strukturu DNA. Později ale bylo prokázáno, že monofunkční adukty cisplatinu a transplatinu do různé míry, v závislosti na sekvenci nukleotidů obklopujících adukt, distortují konformaci DNA a snižují teplotní stabilitu dvouřetězcové DNA (Brabec et al., 1994). Tyto distorze spočívají v narušení „stacking“ interakcí (vrstvení bází) v dvoušroubovicové DNA rozsahu několika bází v okolí aduktu, což vede ke zpřístupnění těchto bází.

Strukturní změny indukované monofunkčními adukty jsou závislé na sekvenci bází v okolí aduktu, průměrně však způsobují rozvinutí dvoušroubovice DNA o 6 - 8° (Keck & Lippard, 1992). Naproti tomu nebyl pozorován žádný ohyb indukovaný v DNA monofunkčně navázaným Pt komplexem (Brabec et al., 1992).

1.4.2 1, 2 – GG intrastrand cross – link cisplatinu (1,2 – GG IAC)

Nejvíce zastoupený adukt cisplatinu na DNA je 1,2 – GG intrastrand cross – link, který destabilizuje DNA (snižuje teplotu tání dvouřetězcové DNA) (Obr. 6A). (Naser et al., 1988). Dochází zde ke dvěma druhům vodíkových vazeb. Slabé vodíkové vazby vznikají mezi dusíkovým atomem z aminoskupiny cisplatinu a keto (O6) kyslíkem z bází a silné vodíkové vazby se tvoří mezi aminoskupinou a kyslíkovým atomem z 5'fosfátové skupiny.

Po navázání cisplatinu dochází v molekule DNA k rozvíjení o 13° a ohybu asi o 34 – 45° směrem do velkého žlábků (Malinge et al., 1994). S tím je spojena změna parametrů malého žlábků, který se v místě protilehlém k aduktu stává širším a plošším

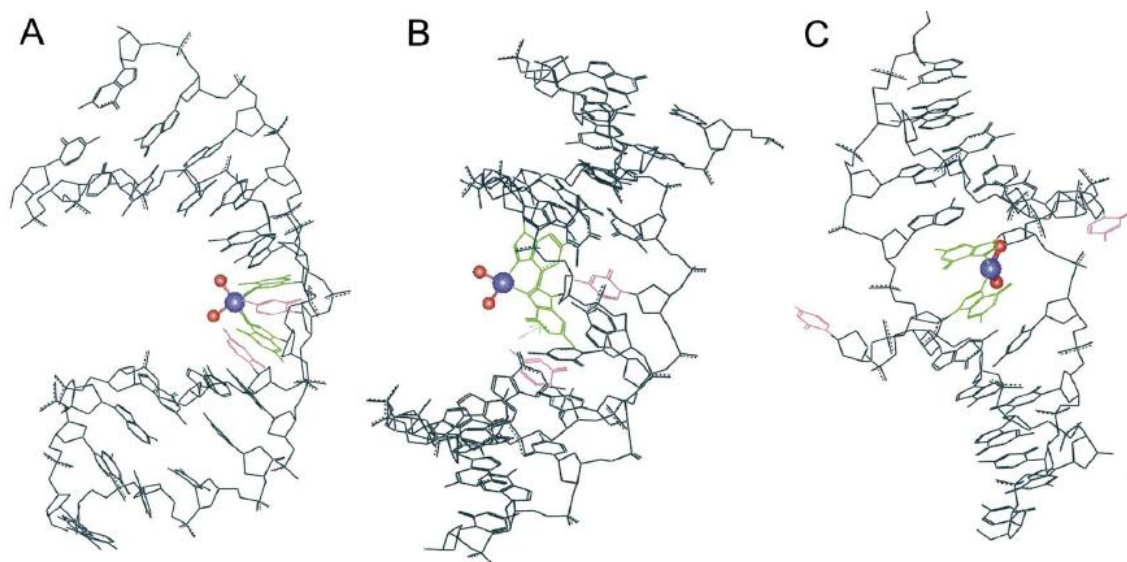
a dochází k poškození o 4 – 5 pb. Tím zároveň dochází k zúžení velkého žlábků a samotný ohyb je velmi rigidní. Podobné hodnoty úhlu rozvíjení a ohybu způsobuje také 1,2 – AG IAC.

1.4.3 1, 3 – GG intrastrand cross – link cisplatiny (1,3 – GG IAC)

Tento minoritní adukt cisplatiny také deformuje strukturu DNA. Vyvolává úhel ohybu $\sim 30^\circ$ směrem do velkého žlábků a lokálně rozvíjí dvoušroubovici DNA o $\sim 19^\circ$. (Bellon & Lippard, 1990). V místě modifikace dochází k vytlačení nukleotidu, který se nachází mezi dvěma guaniny, na nichž je vytvořen můstek (Obr. 6B).

1.4.4 1, 2 – GG interstrand cross – link cisplatiny (1,2 – GG IEC)

Tento typ aduktu nejvýrazněji deformuje strukturu DNA. Meziřetězcová příčná vazba ruší všechny vodíkové vazby mezi 1,2 guaniny IEC a komplementárními cytosiny. Tyto cytosiny jsou vytočeny zcela mimo DNA duplex a tím se neúčastní „stacking“ interakcí s ostatními aromatickými bázemi. Porušení řetězce je patrné v rozsahu 4 pb v místě platinace (Jamieson & Lippard, 1999). Cisplatinový můstek je situován do malého žlábků, což způsobuje lokální změnu konformace dvoušroubovice, rozvinutí o $76 – 80^\circ$ a ohyb DNA duplexu v místě aduktu o $20 – 50^\circ$ směrem do malého žlábků (Obr. 6C) (Lemaire et al., 1991)



Obr. 6: NMR struktura DNA obsahující 1,2 – GG vnitřetězcový můstek (A), 1,3 – GG vnitřetězcový můstek (B) a 1,2 – GG meziřetězcový můstek (C) cisplatiny. Atom platiny je znázorněn modře, aminové ligandy červeně, zelenou barvou guaninové zbytky, na které je cisplatina navázána, a barvou fialovou jsou znázorněny komplementární cytosiny (Převzato a upraveno dle Kartalou & Essigmann, 2001).

1.4.5 Strukturální změny DNA indukované vazbou transplatiny

Podobně jako cisplatina se transplatina váže nejdříve na N(7) pozici guanosinového zbytku, ale na rozdíl od cisplatiny je druhý krok, tvorba bifunkčních aduktů, výrazně pomalejší. Značná část aduktů transplatiny zůstává po 48 hodinách monofunkčních, které ovšem ovlivňují strukturu DNA jen mírně.

Minoritně zastoupeným aduktem je 1,3 – intrastrand cross – link, který způsobuje rozvinutí dvoušroubovice DNA o 45°, ohyb o 26° a lokální denaturaci (Boudvillain et al., 1995). Jak jsem už výše zmínila, transplatina nemůže ze sterických důvodů tvořit nejčastější adukt cisplatiny, tedy vnitřetěžcovou vazbu mezi dvěma sousedními guanosinovými zbytky (1,2 – GG IAC) (Zamble & Lippard, 1999).

Transplatina tvoří na DNA dvakrát více meziřetězcových můstků, než je tomu u cisplatiny. Pro meziřetězcový můstek transplatina preferuje vazbu na guanosinový a k němu komplementární cytosinový zbytek (1,1 – GC IEC) (Brabec & Leng, 1993). Rozdíl mezi IEC cisplatiny a transplatiny je v tom, že transplatina způsobuje daleko menší konformační změny než cisplatina. Duplex je pouze lehce distortován na obou koncích IEC a všechny báze jsou spárovány vodíkovými vazbami. Meziřetězcový můstek transplatiny rozvíjí dvoušroubovici pouze o 12° a způsobuje jen mírný ohyb přibližně jen o 20° směrem do malého žlábků.

Tab. 1: Přehled některých konformačních změn DNA způsobených vazbou cisplatiny a transplatiny

	Typ můstku	Rozvinutí dvoušroubovice	Ohyb
	Monofunkční adukt	6 - 8°	není
cisplatina	1,2 - GG IAC	~13°	34 – 45° do velkého žlábků
	1,3 - GG IAC	19 – 23°	30 – 35° do velkého žlábků
	1,2, - GG IEC	76 – 80°	20 – 50° do malého žlábků
transplatina	1,1 - GC IEC	12°	~20° do malého žlábků

1.4.6 Termodynamické vlastnosti DNA modifikované cisplatinou

Koordinálně kovalentní vazba komplexů platiny na DNA neindukuje pouze strukturální změny, ale také změny termodynamické. Vazba komplexů platiny, které jsou kladně nabitě, způsobí uvolnění těchto iontů z místa vazby a tím odstiňuje záporný náboj cukr-fosfátové vazby na DNA.

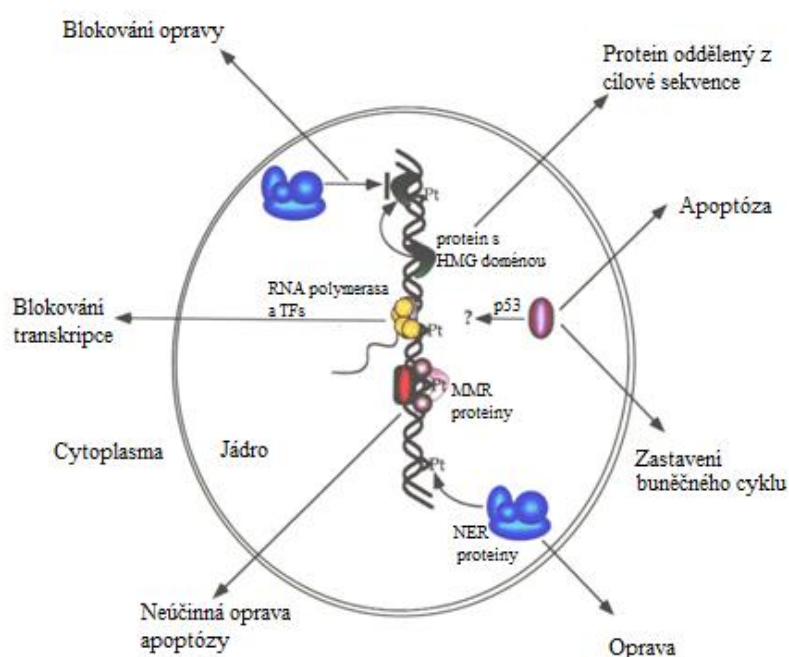
Studie termodynamických vlastností vazby cisplatiny na DNA byly prováděny na krátkých fragmentech DNA o známé sekvenci s přesně definovaným aduktem

komplexu. Srovnáním hodnot modifikované a nemodifikované DNA můžeme určit rozdíl v teplotě tání, změny entalpie, entropie a volné energie (Poklar et al., 1996).

Další studie se zaměřily především na nejvíce frekventovaný adukt cisplatinu 1,2 – GG IAC. Termodynamické parametry byly studovány pomocí UV spektrofotometrie a diferenční skenovací kalorimetrie, které ukázaly, že tento vnitřetěcový můstek snižuje termodynamickou stabilitu DNA. Destabilizace DNA je původu entalpického a je částečně kompenzována entropickou stabilizací (Pilch et al., 2000). Dříve publikovaná data, která byla získána pomocí rentgenostrukturní analýzy, NMR a elektroforetických metod ukazují, že tento typ aduktu nenarušuje vodíkové vazby mezi komplementárními páry v DNA, ale vede k částečnému narušení „stacking interakcí“ (Takahara et al., 1995; Malinge et al., 1994). Předpokládá se, že vytvořením 1,2 – GG IAC dochází k ohybu dvoušroubovice DNA kvůli kompenzaci destabilizace DNA.

2 Důsledek vazby cisplatinu na funkci DNA a odpověď buněčného aparátu

Vazba cisplatinu na DNA nezpůsobuje přímo smrt buňky, ale po navázání dochází k poškození DNA a narušení základních funkcí, např. replikace a transkripce. Následně se spouští celá kaskáda opravných mechanismů, které vedou k zastavení buněčného cyklu a poté až k smrti buňky (Obr. 7).



Obr. 7: Vliv aduktů cisplatinu na DNA na některé z proteinů v jádře, které interagují s poškozením (Převzato a upraveno dle Zamble & Lippard, 1999).

2.1 Vliv na replikaci a transkripci DNA

Již v raných experimentech bylo prokázáno, že adukty cisplatiny blokují činnost DNA polymerasy a tím inhibují syntézu DNA. Inhibice neprobíhá přímou interakcí cisplatiny s DNA polymerasou, ale zabráněním replikačnímu komplexu v pohybu podél templátu DNA. Nicméně, samotnou inhibicí replikace nelze vysvětlit mechanismus protinádorové aktivity cisplatiny (Suo et al., 1999).

Cisplatin je obecně považována za látku, která nepůsobí v konkrétní fázi buněčného cyklu, ale bylo dokázáno, že je více toxická pro buňky ve fázi dělení než pro buňky ve fázi klidové. Následně bylo zjištěno, že cisplatin je až 10x toxicitější pro buňky, které teprve vstupují do S fáze buněčného cyklu, než pro ty, které S fáze dosáhly (Eastman, 1999).

Experimentálně bylo zjištěno, že buňky vystavené cisplatině prošly S fází, ale byly zablokovány ve fázi G₂. Při vysoké koncentraci cisplatiny jsou buňky blokovány v G₂ fázi až do spuštění apoptózy. Pravděpodobnou příčinou je nejspíše neschopnost transkribovat geny potřebné pro zahájení mitózy (Fichtinger – Schepman et al., 1985).

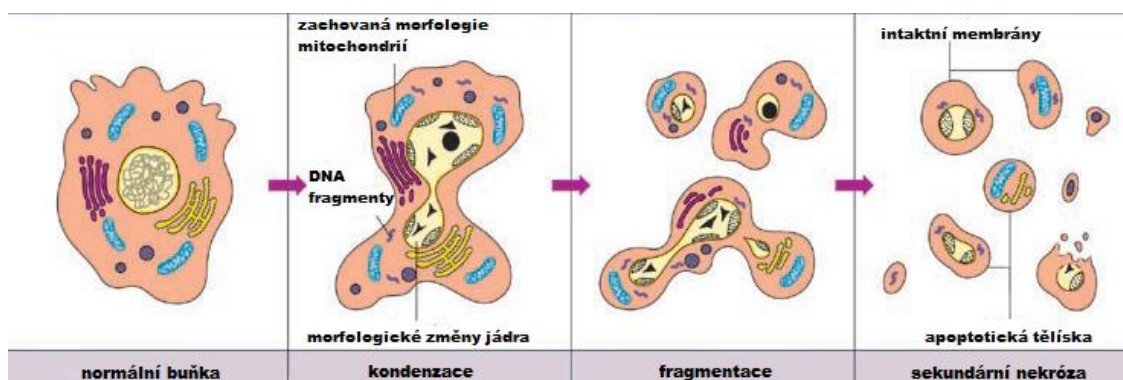
Existují různé domněnky, jak dochází k inhibici transkripce vlivem cisplatiny. Jednou z hypotéz je vychytávání transkripčních faktorů, kdy transkripční faktory mají vysokou vazebnou afinitu k aduktům cisplatiny. Další domněnkou je fyzické blokování enzymu. Vzniklý adukt představuje stérickou zábranu, která brání postupu RNA polymerasy podél transkribovaného řetězce. Třetím předpokladem je inhibice ve fázi remodelace a přebudovávání chromatinu (Todd & Lippard, 2009).

Studie ukázaly, že RNA polymerasy reagují v různé míře na jednotlivé typy aduktů. Bifunkční adukty významně inhibují transkripci DNA modifikované cisplatinou, nicméně, vnitřetězcové můstky tvořené transplatinou nepředstavují žádnou překážku pro RNA polymerasu. Z tohoto důvodu RNA polymerasa II překonává výrazně lépe adukty tvořené transplatinou než cisplatinou (Corda et al., 1993).

2.2 Apoptóza

Apoptóza, neboli programovaná smrt buňky, patří k nejpřirozenějším biologickým procesům a je indukována fyziologickými podněty. Z biochemického hlediska apoptóza vyžaduje přísun volné energie v podobě ATP a závisí na syntéze určitých proteinů. Dále se vyznačuje postupným zmenšováním a srašťováním buňky, kondenzací chromatinu spojenou s aktivací endogenních endonukleas, tvorbou tzv. apoptotických tělísek, která vznikají degradací DNA na kratší segmenty a rozpoznáním postižených buněk fagocyty zabraňujícími oxidativnímu vzplanutí (Obr. 8)

(Barry et al., 1990; Eastman, 1999). Bylo prokázáno, že navození apoptózy působením cisplatiny je důsledkem selhání mechanismů rezistence buňky.



Obr. 8: Apoptóza. Proces je doprovázen morfologickými buněčnými změnami, kdy dochází ke kondenzaci buňky a jádra, začínají se tvořit vychlípeniny membrány a po fragmentaci jádra dojde až k rozpadu buňky na apoptotická tělíska (Převzato a upraveno dle Rode, 2008).

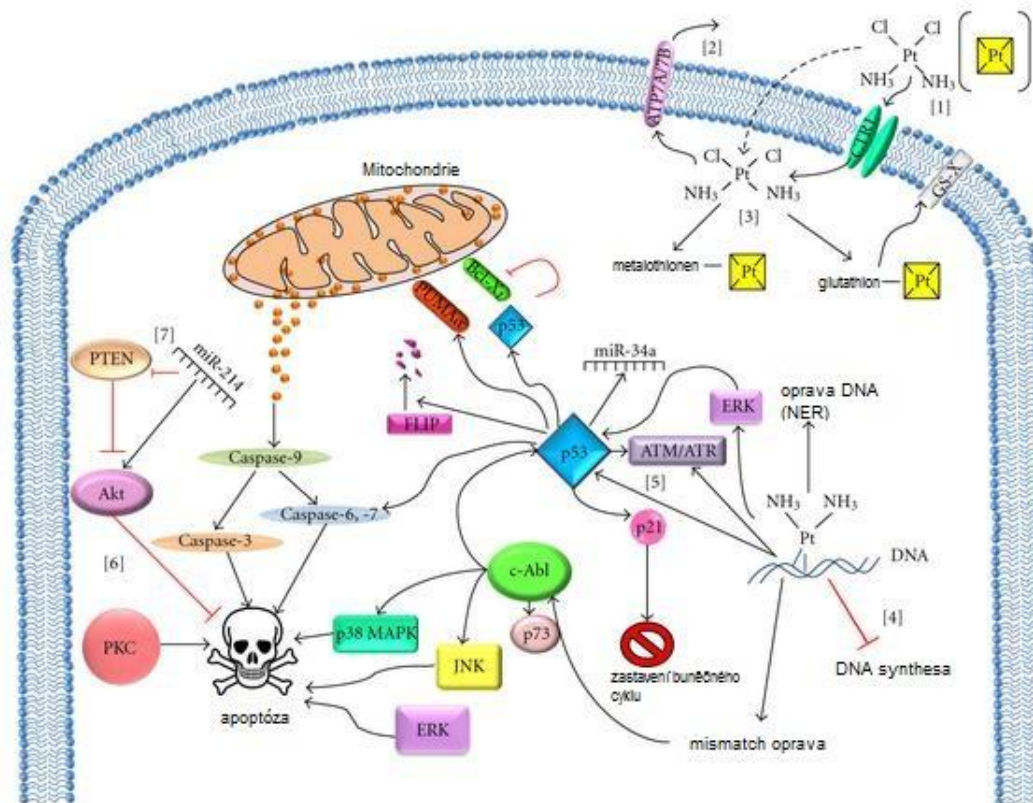
Regulace apoptózy je velmi složitý proces, který je rozdělen do tří fází. V první fázi, iniciační, dochází ke vzniku stimulu a k zapojení odpovídající signální dráhy. Efektorová fáze vyhodnocuje všechny iniciační signály a rozhodne, zdali buňka setrvá nebo bude odstraněna. Poslední fáze, tzv. nevratná (ireverzibilní), je typická spuštěním kaskády dějů vedoucích k samorozkladu buňky, degradaci proteinů a štěpení DNA pomocí endonukleas. Celý proces apoptózy je regulován proapoptotickými (Bax, Bak, BH3) a antiapoptotickými (Bcl-2) proteiny (Reed, 1994).

2.3 Buněčná rezistence

Rezistence představuje velmi častou komplikaci při podávání platinových cytostatik, proto se tato problematika stala jedním z hlavních témat onkologického výzkumu. Především je snahou objasnit biochemické děje, které jsou za vznik rezistence odpovědné.

Rezistence buněk je jejich schopnost tolerovat dávky podávaných látek, které by byly pro normální buňku toxické a může být vrozená nebo získaná po kontaktu s danou látkou. Rezistence k určitému farmaku se stává obvykle nedostatkem cytostatika nebo se rezistence cisplatiny značně liší i mezi různými typy nádorů (Perez, 1998). Zatímco některé nádorové buněčné linie na působení cisplatiny nereagují (nádory trávicího traktu, nemalobuněčné karcinomy plic) (Muggia & Los, 1993), u jiných (rakovina hlavy a krku, nádory vaječníku a malobuněčné karcinomy

plic) se rezistence může vyvinout hned po počáteční léčbě nebo až během léčby (Perez, 1998).



Obr. 9: Buněčná odpověď na poškození DNA indukované cisplatinou. [1] Cisplatin proniká do buňky pasivní difúzí nebo aktivním transportem pomocí přenašeče transportéru mědi CTR1. [2] Odčerpávání cisplatinu z buňky přenašečem, který je závislý na ATP. [3] Cisplatin se váže na buněčné thiohy, jako je glutathion a metalothionen. [4] Zastavení buněčné proliferace inhibicí syntézy DNA, následovanou aktivací buněčné odpovědi na poškozenou DNA. [5] Aduktu cisplatinu na DNA jsou primárně opravovány přes NER mechanismus a také je inhibována syntéza DNA. Může docházet k aktivaci dráhy p53 a k zastavení buněčného cyklu. [6] Kinázy PKC, ERK a Akt se účastní regulace buněčné smrti indukované cisplatinou. [7] miR-214 podporuje rezistenci cisplatinu regulací PTEN a aktivací Akt (Převzato a upraveno dle Basu & Krishnamurthys, 2010).

Je celá řada procesů rezistence, například inaktivace toxické látky v cytoplasmě způsobená interakcí cisplatinu s různými biomolekulami při cestě k cílovému místu. Jedná se o látky obsahující síru (methioninové a cysteinové zbytky), např. glutathion, který interakcí s chemoterapeutikem snižuje množství navázané cisplatinu na DNA (Sancar, 1995). Dalším procesem je zvýšená aktivita opravných mechanismů aduktů

na DNA a rovněž zvýšená tolerance k poškození DNA těmito adukty. Hlavní ochrannou bariéru představuje plazmatická membrána, která zajišťuje omezení příjmu cisplatinu do buňky nebo naopak posílení jejího vylučování z cytoplazmy. Část molekul ale přesto dosáhne buněčného jádra, kde reaguje s DNA, čímž ovlivňuje životní procesy, a tím se spouští ochranné mechanismy (Obr. 9). Zjistilo se, že rezistentní buňky se vyznačují sníženou koncentrací cisplatinu a právě účinným reparačním mechanismem (Jamieson & Lippard, 1999).

Dosud se nepodařilo zjistit hlavní příčinu rezistence cisplatinu, ale zdá se, že se na ní podílí několik různých faktorů.

2.4 Reparace DNA

Při poškození DNA se v buňce aktivují opravné mechanismy. Zvláště po vytvoření aduktů na DNA buňka disponuje několika typy proteinů, které se s poškozením vypořádají a adukt odstraní. Mezi nejdůležitější mechanismy se řadí nukleotidová excizní oprava (NER), „mismatch“ oprava – oprava chybného párování bází (MMR) a další.

2.4.1 Nukleotidová excizní oprava

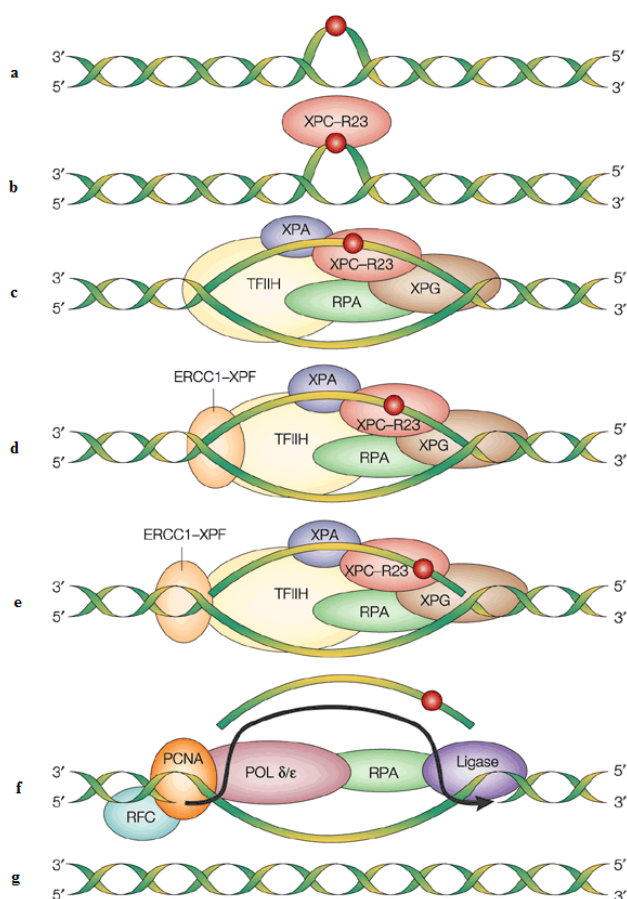
Nukleotidová excizní oprava (nucleotide excision repair - NER) je hlavním obranným mechanismem buňky proti aduktům na DNA a také jedním z faktorů, které ovlivňují rezistenci buňky k cisplatině. Dále bylo zjištěno, že savčí buňky, které mají méně aktivní nukleotidovou excizní opravu, jsou daleko více citlivé na cisplatinu než na buňky standardní (Kartalou & Essigmann, 2001).

Proteiny NER rozpoznávají poškozené místo na dvoušroubovici DNA na základě změny struktury DNA a využívají toho, že je DNA dvouřetězcová a je v obou řetězcích uložena stejná informace. Průběh NER zahrnuje tři hlavní kroky. Prvním krokem je rozpoznání poškození a navázání multiproteinového komplexu, v druhém kroku dojde k excisi poškozené DNA a v poslední fázi k syntéze odstraněného fragmentu prostřednictvím DNA polymerasy obnovující původní nepoškozenou sekvenci (Obr. 10).

U vnitřetězcových můstků cisplatinu se vyskytuje zvýšená NER v buněčných liniích, které jsou k cisplatině rezistentní. Pro tento typ můstků je NER velmi důležitým mechanismem, kdy jsou tyto adukty účinně opravovány. Podle předchozích studií bylo zjištěno, že 1,3 – GG IAC je 5 – 15krát více opravován více než 1,2 – GG IAC. To je

důsledkem rozdílných konformačních změn ve struktuře DNA a vystřížením méně zastoupených aduktů cisplatiny (Moggs et al., 1997).

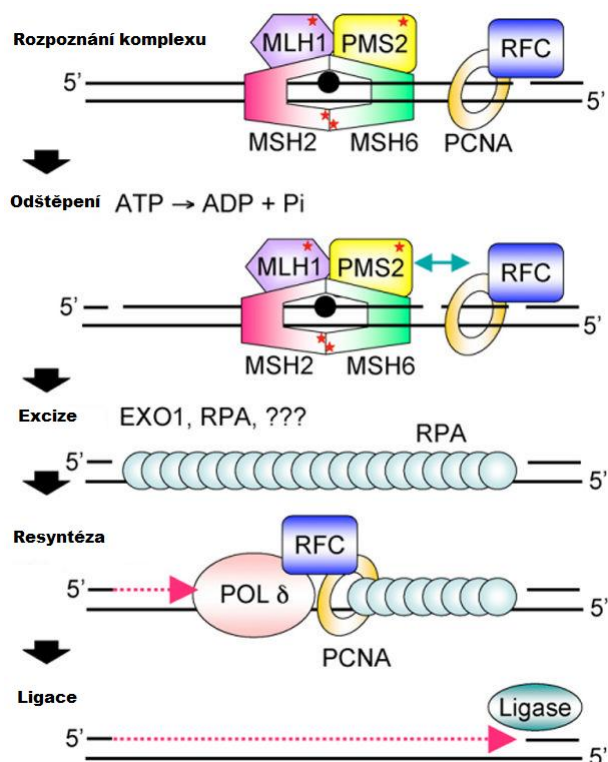
Doposud nebyl zjištěn žádný vztah mezi meziřetězcovými můstky a opravným mechanismem NER. Tento fakt je vysvětlován, že meziřetězcový můstek zahrnuje oba řetězce DNA a tedy nemůže být opraven tímto mechanismem, protože nemůže využít syntézy nukleotidů z komplementárního řetězce (Reardon et al., 1999).



Obr. 10: Mechanismus nukleotidové excizní opravy. Po navázání cisplatinu na DNA (a) dojde k rozpoznání poškození proteiny XPC – R23 (b). Následuje navázání komplexu proteinů, které jsou součástí NER mechanismu (XPA, RPA, XPG a transkripční faktor TFIIH). XPA a RPA usnadňují rozpoznání poškození a TFIIH, který obsahuje dvě helikasy XPB a XPD, způsobí lokální rozvinutí DNA řetězců kolem poškozeného místa (c). Následuje navázání heterodimeru ERCC1 – XPF, který vytváří kompletní sestavu NER multiproteinového komplexu (d). XPG a ERCC1 – XPF jsou endonukleasy, které vyštěpí kolem poškozeného místa úsek o délce 27 – 30 nukleotidů (e). Opravnou syntézu vzniklé mezery zajišťují polymerasy δ a ϵ a replikační faktory RPA, PCNA a RFC. Nakonec je kovalentní integrita poškozeného řetězce obnovena DNA lipasou (f). Výsledkem je nepoškozená DNA (g) (Převzato a upraveno dle Friedberg, 2001).

2.4.2 Oprava chybného párování

Mismatch repair (MMR) je postreplikační opravný systém, který opravuje chybně zainkorporované nukleotidy, místa s výskytem inzercí nebo delecí. Mechanismus tohoto typu opravy byl dokonale studován u bakterií *E. coli*, která obsahuje proteiny MutS a MutL.



Obr. 11: Mechanismus mismatch opravy. Rozpoznání poškozeného řetězce mismatch proteiny MutSα (MSH2 – MSH6) a MutLα (MLH1 – PMS2) má za následek vytvoření ternárního komplexu, jehož protein – protein a protein – DNA interakce jsou modulovány ATP/ADP kofaktory. PCNA hraje důležitou roli v získávání MMR proteinů do sousedství replikační vidličky přes PIP na MSH6 a MSH3. Odštěpení funkční endonukleasou PMS2 stimulovanou ATP, PCNA a RFC a významnou protein – protein interakcí (zelená šipka) může založit řetězec cílené opravy na nově syntetizovaný řetězec. Excize proteinem EXO1 a dalšími dosud neidentifikovanými exonukleasami vede k vytvoření komplexu RPA, který obaluje mezeru po vystřížení. Resyntéza DNA polymerasou δ a ligace DNA lipasou opět obnoví integritu duplexu (Převzato a upraveno dle Hsieh & Yamane, 2008).

U eukaryotních buněk po poškození cisplatinou dochází k rozeznání postižených míst heterodimery MutSα a MutSβ. MutSα se skládá z podjednotek MSH2 a MSH6 a preferenčně se váže a opravuje chyby v párování jedné báze. MutSα a jeho

podjednotka MSH2 se váží na DNA globálně modifikovanou cisplatinou a mohou specificky rozpoznávat 1,2 – GG IAC. MutS β se skládá z podjednotek MSH2 a MSH3 a opravuje 2 – 4 páry bází inserce nebo delece na DNA (Kartalou & Essigmann, 2001). U *E. coli* podjednotka MutL slouží jako spojka pro aktivaci a navázání MutH endonukleasy. U eukaryot je tato podjednotka nahrazena heterodimerem hMLH1 spojeným s dalšími proteiny. K opravě chybného párování bází přispívají nejméně dvě nukleasy: exonukleasa 1 (5' → 3') a Flap endonukleasa. Přesná úloha exonukleas nebyla zatím objasněna.

Po vytvoření komplexu heterodimeru s modifikovanou DNA dochází k aktivaci DNA helikasy, která od sebe oddělí vlákna DNA. Následně dojde k vystřížení postiženého úseku pomocí DNA exonukleas, chybějící nukleotidy jsou dosyntetizovány DNA polymerasou a nakonec vlákna spojí DNA lipasa (Obr. 11). Během opravy dceřiného řetězce může polymerasa opět včlenit chybný nukleotid. Poté je znovu zahájen MMR, což může vést až k zacyklení celého procesu a spuštění apoptózy (Kelland, 2000).

Význam mismatch opravy spočívá v udržení integrity genomu, a proto defekty v MMR často vedou ke vzniku rakoviny, především u nádorů tlustého střeva. Bylo prokázáno, že MMR zprostředkovává cytotoxicitu cisplatinu a mnohých klinicky účinných látek v nádorových buňkách a porucha v činnosti tohoto systému opravy DNA může vést k rezistenci a toleranci nádorových buněk k cisplatině (Papouli et al., 2004).

2.5 Proteiny se specifickou vazbou na DNA modifikovanou cisplatinou

Schopnost cisplatinu inhibovat replikaci a transkripci není úplně bezpodmínečná, protože existuje předpoklad, že se na procesech vedoucích k apoptóze podílejí další faktory. Porozumění pochodům, které se v buňce odehrávají po poškození DNA cisplatinou, může přispět k lepší a efektivnější chemoterapii platinovými cytostatiky. V současné době je známa celá řada takových proteinů a existují i představy jejich rolí v protinádorovém působení cisplatinu.

Významnou skupinu tvoří proteiny, které se účastní excizního reparačního mechanismu – XPE (*xeroderma pigmentosus* (XP) complementation group E), XPA (XP complementation group A), RPA (replication protein A) a ERCC1 (excision repair cross – complementing 1) a dále proteiny, které jsou součástí mismatch opravného systému, např. MutS α .

Protein XPE, jehož přesná funkce není dosud objasněna, se váže na poškozenou DNA, ale není součástí jádra excizního reparačního systému, nicméně

s ním úzce spolupracuje. Ve zvýšené koncentraci je tento protein produkován rezistentními nádorovými buňkami a tím vykazují intenzivnější reparační mechanismy. Zvýšená produkce je přímo úměrná úrovni rezistence působením cisplatinou. Indukce XPE se připisuje inhibici replikace DNA nebo tvorbě platinových aduktů na DNA (Chu & Chang, 1990; Vaisman & Chaney, 1995).

Proteiny XPA, RPA a ERCC1 mají za úkol rozpoznat poškození DNA. Předpokládá se, že RPA napomáhá vytvoření a stabilizaci otevřeného duplexu DNA v místě poškození a dále napomáhá vazbě NER nukleas. Specificky se váže na adukty cisplatinou, především rozpoznává 1,2 – GG IAC a 1,3 – GG IAC. RPA má větší afinitu k 1,3 – GG IAC a tento adukt je také účinněji opravován (Patrick & Turchi, 1999). RPA a XPA se váží společně na DNA modifikovanou cisplatinou. Vazebná afinita komplexu RPA – XPA k DNA se 1,3 – GG IAC je mnohem větší než u samotného RPA (He et al., 1995). Protein ERCC1 tvoří komplex s XPF (XP complementation group F) a pomáhá štěpit DNA na 5' straně od místa poškození. Vazba XPA na poškozenou DNA se stupňuje interakcí s ERCC1 (Wood, 1997).

Na modifikovanou DNA se také váží proteiny opravného mismatch systému. Lidský MutSα a jeho MSH2 projevují zvýšenou afinitu k DNA obsahující 1,2 – GG IAC (Mello et al., 1996). Srovnání mezi několika duplexy obsahující 1,2 – GG IAC ukazuje, že lidský MutSα rozpoznává jednotlivé můstky s vyšší afinitou než řetězec nemodifikované DNA s thyminem špatně spárovaným s guaninem na 3' - modifikovaném řetězci DNA (Yamada et al., 1997). Bylo zjištěno, že protein MutSα zodpovědný za rozpoznání poškozené DNA se nachází ve zvýšené koncentraci v tkáni vaječníků a varlat, jejichž nádory nejlépe reagují právě na léčbu cisplatinou.

Mezi další reparační enzymy se řadí fotolyasa se schopností vazby na adukty cisplatinou. Tato schopnost byla demonstrována u kvasinek a *E. coli*. Fotolyasa je flavoprotein využívající blízké UV – VIS záření k opravení *cis – syn* pyrimidinových dimerů produkovaných v DNA po UV ozáření (Essen & Klar, 2006). Struktura fotolyasy udává, že pyrimidinový dimer rotuje ven z DNA helixu a dovnitř aktivního místa enzymu. Zatímco kvasinky se stávají po vazbě fotolyasy citlivějšími na působení cisplatinou, u *E. coli* je tomu přesně naopak. Příčinou rozdílného chování je pravděpodobně rozdíl NER mezi kvasinkami a bakteriemi (Kartalou & Essigmann, 2001).

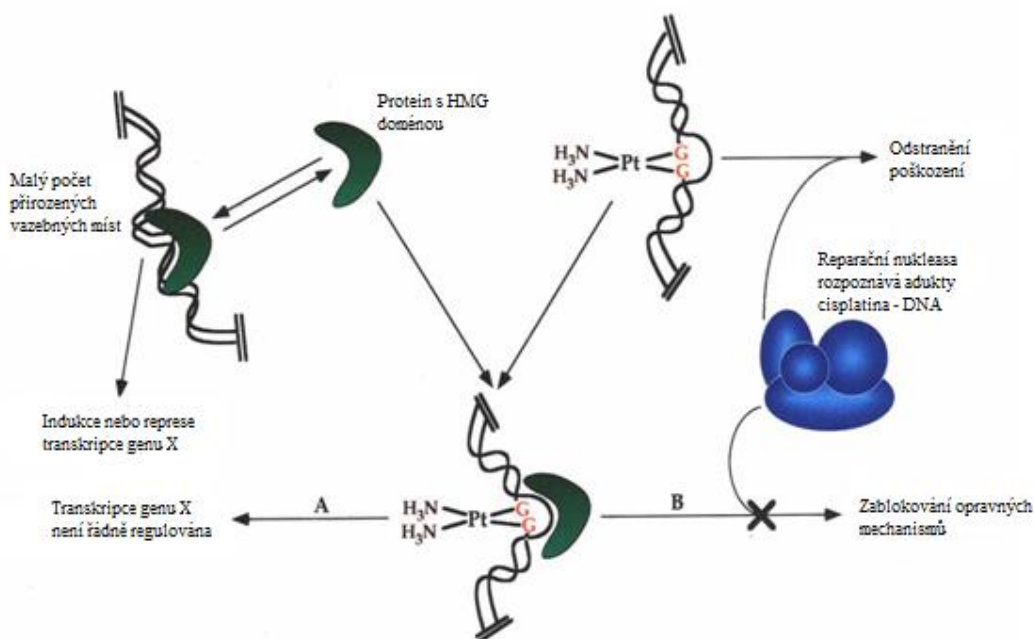
Dalšími skupinami, které se váží specifickou vazbou na modifikovanou DNA, jsou HMG („High mobility group“, proteiny skupiny vysoké pohyblivosti) proteiny a proteiny, které postrádají HMG doménu.

2.5.1 Proteiny obsahující HMG doménu

HMG proteiny jsou nehistonové chromozomální proteiny, které se hojně vyskytují v jádrech eukaryotických buněk. HMG doména je pozitivně nabitý, převážně α helikální a 80 aminokyselin dlouhý polypeptid, který má tvar do písmene L a váže se na DNA přednostně do malého žlábků (Bustin & Reeves, 1996). Tato doména umožňuje vazbu k DNA (tzv. HMG box). HMG proteiny lze rozdělit do dvou skupin. Podle počtu domén HMG v proteinu, podle vývojových vztahů a sekvence, kterou rozpoznávají.

První skupina HMG proteinů zahrnuje proteiny se dvěma nebo více doménami a rozpoznávají DNA s malou sekvenční specifitou. Do této skupiny se řadí HMG1 a HMG2 proteiny, transkripční faktor UBF (upstream binding factor) a mitochondriální transkripční faktor mTFA. Jejich funkce není přesně známá, ale předpokládá se, že vystupují jako stavební faktory při syntéze nukleových kyselin.

Do druhé skupiny se řadí proteiny s jednou HMG doménou a váží se s vysokou sekvenční specifitou. Zařazují se sem LEF – 1 (lymphoid enhancer binding factor), SRY (sex determining factor) a TCF – 1 (T cell factor 1). Tyto proteiny vystupují jako transkripční faktory a regulují buněčnou diferenciaci (Zamble & Lippard, 1999).



Obr. 12: Schéma mechanismů HMG proteinů účastnících se v protinádorovém působení cisplatinu (Převzato a upraveno dle Zamble & Lippard, 1999). (A) Když jsou buňky exponovány letální dávkou cisplatinu, vytvoří se na DNA adukt. Jestliže se HMG proteiny váží s podobnou afinitou do jejich vazebného místa, proteiny mohou být zbaveny jejich transkripční regulační funkce. (B) HMG proteiny mohou blokovat přístup excizní opravy komplexu a tím ochránit adukty před opravou.

HMG proteiny se selektivně váží k 1,2 – GG IAC, 1,2 – AG IAC a 1,2 – GG IEC, ale neváží se k 1,3 – GG IAC a k monofunkčním aduktům cisplatiny a aduktům transplatiny. HMG proteiny aktivně ohýbají a rozvíjejí dvoušroubovici DNA (Toney et al., 1989).

Na základě objevení vazby HMG proteinů na DNA byla vyslovena hypotéza, která by mohla vysvětlit úlohu HMG proteinů v protinádorové účinnosti cisplatiny. Existují dvě teorie, jak se HMG proteiny tohoto procesu účastní. První teorií je, že HMG protein se váže na vzniklý adukt cisplatiny na DNA a chrání jej před opravnými mechanismy. Jelikož poškození není odstraněno, přispívá k vyšší cytotoxicitě cisplatiny. Druhá teorie říká, že HMG proteiny se váží podobnou afinitou ke svým přirozeným vazebným místům i k aduktům cisplatiny. Vazbou k aduktům může být tento protein vyčerpán z prostředí, neváže se ke svému přirozenému místu a neplní tak svoji funkci v regulaci transkripce (Obr. 12) (Zamble & Lippard, 1999).

2.5.2 Proteiny postrádající HMG doménu

Jedním z proteinů, které neobsahují HMG doménu a vyznačují se specifickou vazbou na DNA modifikovanou cisplatinou, je TBP (TATA box binding) protein, který se za normálních okolností váže na TATA box (sekvence nukleotidů TATAAA), který je lokalizovaný v oblasti promotoru genu (Kartalou & Essigmann, 2001). TBP je součástí transkripčního faktoru TFIID a iniciuje transkripci genu do mRNA. Bylo prokázáno, že TBP se váže selektivně na poškozenou DNA, především po poškození UV zářením a cisplatinou (Vichi et al., 1997). Přednostně a lépe se tyto proteiny váží na 1,2 – GG IAC než na 1,3 – GG IAC a na adukty transplatiny. Pokud se 1,2 – GG IAC váže v těsné blízkosti TATA boxu, zvyšuje tím vazebnou afinitu TBP k TATA boxu (Cohen et al., 2000).

Do této skupiny se také řadí histon H1, hojně vyskytující se chromatinový protein, který se váže na specifické struktury DNA včetně superhelikální DNA a má schopnost ohýbat DNA v místě navázání (Zlatanova & Van Holde, 1998; Ohndorf et al., 1999). Jeho vazebné schopnosti jsou podobné proteinům HMG1 a HMG2 a při experimentech bylo zjištěno, že se dokonce histon H1 váže na modifikovanou DNA silněji než tyto HMG1. Specifita pro různé typy aduktů zatím nebyla prozkoumána, ale H1 má vyšší vazebnou afinitu k DNA modifikované cisplatinou než k DNA modifikované transplatinou nebo k nemodifikované DNA (Yaneva et al., 1997).

Mezi hlavní cíle studia vazby proteinů na modifikovanou DNA je interakce DNA s proteinem p53. Protein p53 je fosfoprotein, který se skládá z 393 aminokyselin a je kódován nádorově supresorovým genem p53 (May & May, 1999). Tento protein má

dvě vazebná místa na DNA a má funkci transkripčního faktoru, který reguluje aktivitu řady dalších genů odpovědných za zastavení buněčného cyklu či zahájení apoptózy (Fisher, 1994). Protein p53 hraje významnou roli při řízení růstového cyklu buňky a je často spojován s tvorbou nádorů. Bylo potvrzeno, že více než 50 % nádorů nese mutovaný gen proteinu p53. Složitost buněčných regulací znemožňuje jednoznačnou odpověď na otázku, jakým způsobem se protein p53 podílí na cytotoxicitě cisplatiny (Weller, 1998).

3 Vývoj nových protinádorově účinných komplexů

Pro velký úspěch cisplatiny při léčbě některých typů rakoviny, ale také kvůli nežádoucím účinkům a získané rezistenci, se pozornost obrátila k vývoji a studiu nových léčiv s centrálním Pt atomem. Vzhledem k tomu, že cílovým místem působení platinových komplexů je DNA, hledají se v současné době takové látky, které se vážou na DNA odlišným způsobem než „klasické“ komplexy (cisplatina, karboplatina, oxaliplatina), protože by mohlo být dosaženo i odlišného farmakologického efektu. Doposud bylo syntetizováno více než 3500 komplexů cisplatiny. Mnoho těchto sloučenin nevykazovalo protinádorovou aktivitu a nebylo tedy zavedeno do klinické praxe. Nicméně, nově získané poznatky o mechanismu působení nádorů vedly k hlavním bodům pro vývoj nových protinádorově účinných léčiv. Jednou z nejdůležitějších strategií bylo zlepšení transportu léčiva do místa nádoru a poté kombinování platinových léčiv s novými molekulárně cílenými léčivy. Dále byl kladen důraz na kombinaci komplexů s farmakologickými modulátory mechanismů rezistence a v neposlední řadě na zdokonalení designu platinových léčiv (Kelland, 2007).

Vývoj nových protinádorově aktivních komplexů je v dnešní době zaměřen na přímé analogy cisplatiny, transplatiny, polynukleární platinové komplexy, komplexy s atomem platiny ve čtvrtém oxidačním stupni a koordinační sloučeniny s jiným centrálním kovem než platinou (Ru, Rh, Pd, Os, Ir).

3.1 Komplexy odvozené od cisplatiny

Nové komplexy lze odvodit od cisplatiny dvěma způsoby, záměnou za odstupující ligandy (chloridových iontů) či neodstupující ligandy (NH₃). Dosud vyvinuté komplexy odvozené od cisplatiny se vyznačují spíše potlačenými vedlejšími účinky než zvýšenou účinností.

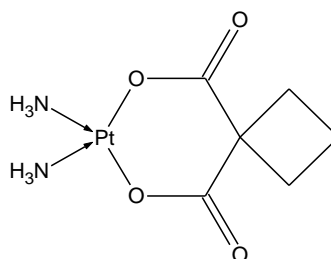
Kromě cisplatiny byly registrovány pro klinické použití Správou potravin a léčiv v USA (FDA – Food and Drug Administration) karboplatina a oxaliplatina.

3.1.1 Karboplatina

Karboplatina (*cis* – diamminocyklobutandikarboxyplatnatý komplex) byla zavedena do klinické praxe v roce 1986 (Obr. 13) (Harrap, 1985). Tento komplex vykazuje podobnou protinádorovou aktivitu a je účinný v podobném spektru nádorů jako cisplatina. Po podání efektivních dávek karboplatiny trpí pacienti méně žaludečními nevolnostmi a neuropatií než po podání cisplatiny (Harrap, 1985; Calvert et al., 1989). Tento komplex vykazuje i značně nižší toxicitu oproti cisplatině, proto může být podáván v daleko vyšších dávkách, a to i ambulantně.

Karboplatina vytváří podobné spektrum aduktů jako cisplatina, ale liší se rychlostí vazby na DNA. Rychlost tvorby aduktů u karboplatiny je až 10 krát pomalejší než u cisplatiny a je nutná až 40 krát vyšší koncentrace karboplatiny (Knox et al., 1986).

V praxi karboplatina působí na různé typy nádorů, ale především se používá k léčbě nádorů vaječníku. V roce 1989 byla schválena FDA (jako Paraplatin) a v České republice je známá pod názvem Cycloplatin.

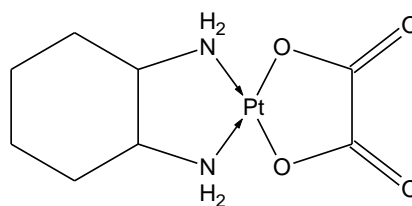


Obr. 13: Strukturní vzorec karboplatiny

3.1.2 Oxaliplatina

Dalším komplexem odvozeným přímo od cisplatiny je 1,2 – diaminocyklohexan – oxalátplatnatý komplex – tzv. oxaliplatina (Obr. 14). Poprvé byla popsána roku 1970 a v porovnání s cisplatinou a karboplatinou vykazuje odlišné vlastnosti v mechanismu protinádorového působení (Kidani et al., 1978). Oxaliplatina se hydrolyzuje pomaleji a je méně ochotná se vázat na DNA než cisplatina (Woynarowski et al., 2000). Hlavním aduktem na DNA je 1,2 – GG IAC. Ligand 1,2 – diaminocyklohexan vyplňuje téměř celý velký žlábek DNA a tím ji napřimuje a dělá ji méně polární.

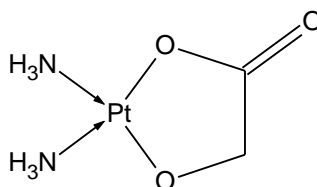
Oxaliplatina vykazuje aktivitu zejména u nádorů tlustého střeva a konečníku, přičemž dosahuje lepších výsledků v kombinaci s 5 – fluorouracilem a leucovorinem (Lévi et al., 1992). V roce 2002 byla schválena US FDA do klinické praxe pod názvem Eloxantin.



Obr. 14: Strukturální vzorec oxaliplatiny

3.1.3 Nedaplatina

Tento komplex odvozený od cisplatiny je schválen pouze v Japonsku a je registrován pro použití při léčbě rakoviny hlavy a krku, plic, jícnu, varlat, vaječnicků a děložního krčku. Nedaplatina (*cis* – diaminoglykolátplatnatý komplex) je křížově rezistentní k cisplatině, je méně toxická a má reakční čas asi 20 krát delší než cisplatin (Obr. 15) (Desoize & Madoulet, 2002).



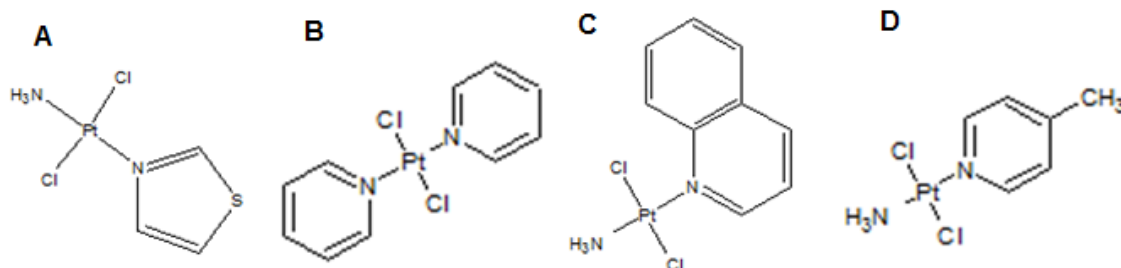
Obr. 15: Strukturální vzorec nedaplatinu

3.2 Komplexy odvozené od transplatiny

Biologicky aktivní *trans* – platinové komplexy byly odvozeny od transplatiny substitucí jedné nebo obou aminových skupin za jinou funkční skupinu – heterocyklickou aminovou skupinu, alifatickou a iminoéterovou skupinu, kdy dochází k dramatickému nárůstu protinádorové aktivity daného komplexu (Fuertes et al., 2002). Některá analoga vykazují vyšší účinnost proti širšímu spektru nádorů a dokonce působí i na nádory, které vykazují rezistenci vůči cisplatině.

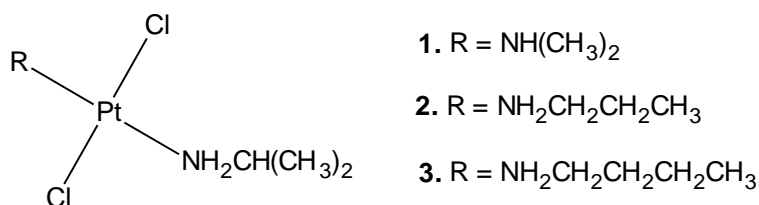
Transplatinové komplexy s heterocyklickou aminovou skupinou mají obecný vzorec *trans*-[PtCl₂L₂], kde L = thiazol, pyridin, γ – pikolin, chinolin (Obr. 16). Tyto sloučeniny vykazují podobnou cytotoxicitu jako jejich *cis* isomery nebo cisplatin, ale o řád vyšší než transplatin (Farrell et al., 1992). Analogy transplatin se váží na DNA monofunkčně s podobnou rychlostí jako transplatin a stejná je také rychlost u vytváření bifunkčního aduktu. Monofunkční adukty *trans* – thiazolového komplexu mohou vytvářet ternární komplexy s proteiny a tento typ aduktu je rozpoznáván HMG proteiny a zároveň je opravován NER mechanismem (Kašpárková et al., 2003; Farrell

et al., 2004). Vnitrořetězcové můstky vykazují podobné vlastnosti jako cisplatina, ale ohyb dvoušroubovice jde do malého žlábků, což zabraňuje rozpoznání HMG proteiny.



Obr. 16: Analogy transplatiny s heterocyklickým ligandem: *trans*-[PtCl₂(NH₃)(thiazol)] (A), *trans*-[PtCl₂(pyridin)₂] (B), *trans*-[PtCl₂(NH₃)(chinolin)] (C), *trans*-[PtCl₂(NH₃)(pikolin)] (D).

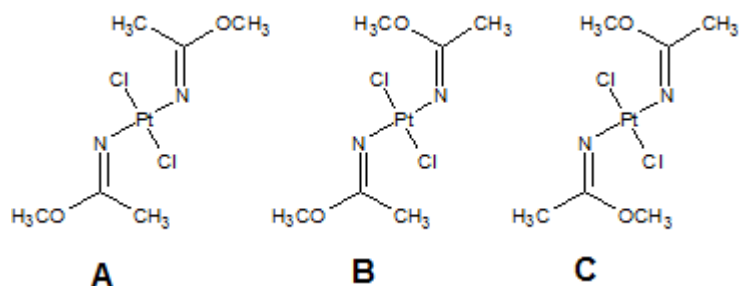
Analogy transplatiny s alifatickou funkční skupinou mají obecný strukturní vzorec *trans*-[PtCl₂(amin)(isopropylamin)], kde amin může být dimethylamin, propylamin, butylamin (Obr. 17). Tyto komplexy vykazují podobnou cytotoxicitu jako u cisplatiny. Na DNA snadno vytváří meziřetězcové můstky, které blokují syntézu DNA efektivněji než adukty cisplatiny, především *trans*-[PtCl₂(dimethylamin)(isopropylamin)] a tento komplex se vyznačuje vysokou afinitou k místům, kde se střídají pyrimidinové a purinové báze (Brabec, 2002).



Obr. 17: Analoga transplatiny s alifatickými aminy *trans*-[PtCl₂(amin)(isopropylamin)]: *trans*-[PtCl₂(dimethylamin)(isopropylamin)] (1), *trans*-[PtCl₂(propylamin)(isopropylamin)] (2), *trans*-[PtCl₂(butylamin)(isopropylamin)] (3)

Komplexy odvozené od transplatiny s iminoéterovými ligandy vykazují výraznou toxicitu a protinádorovou aktivitu u buněk rezistentních k cisplatině (Coluccia et al., 1993a). Díky dvojné vazbě C=N v iminoéterovém ligandu může docházet k vytvoření tří různých izomerů – EE, EZ, ZZ pro komplex *trans*-[PtCl₂(iminoether)₂] (Obr. 18). Nejčastější komplex *trans* – EE (*trans*-[PtCl₂(E – iminoether)₂]) vytváří přednostně monofunkční adukty, které se poté většinou na bifunkční už nemění (Brabec et al., 1996). Monofunkční adukty jsou snadno rozpoznávány různými typy proteinů, což zvyšuje účinnost tohoto komplexu při zastavení syntézy DNA a inhibuje opravu těchto

aduktů NER mechanismem (Nováková et al., 2003). Přítomnost iminoéterové skupiny by měla přispívat k tvoření vodíkových vazeb a stéricky by měla ovlivňovat kinetiku vazby DNA, stabilitu tvořených aduktů a změny v konformaci DNA.

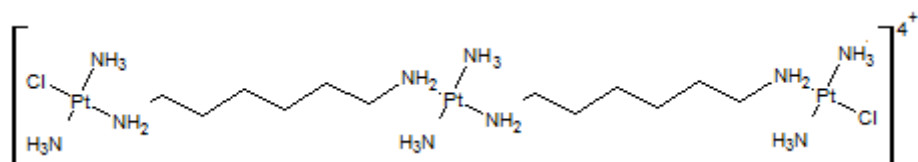


Obr. 18: Strukturální vzorce *trans*-EE (A), *trans*-EZ (B), *trans*-ZZ (C).

3.3 Polynukleární platinové komplexy

Polynukleární platinové sloučeniny vykazují značně odlišné chemické a biologické vlastnosti oproti mononukleárním platinovým sloučeninám. Ve své struktuře obsahují 2 – 4 atomy platiny, které jsou spojeny diaminovými alifatickými řetězci variabilní délky (Farrell, 2004). Bifunkční dinukleární platinové komplexy vytváří na rozdíl od cisplatiny meziřetězcové můstky a minoritně také 1,2 – GG IAC. Adukty komplexu indukují pouze malý ohyb a rozvíjení, proto tyto adukty nejsou rozpoznávány HMG proteiny, které se neúčastní mechanismu protinádorové aktivity těchto dinukleárních komplexů (Kašpárková et al., 2000). Bylo také zjištěno, že 1,2 – GG IAC adukty tohoto komplexu jsou na rozdíl od IEC opravovány NER mechanismem (Brabec, 2002).

Na základě studií polynukleárních platinových komplexů a ve snaze zvýšit afinitu k DNA a celkový náboj komplexu byly vyvinuty trinukleární sloučeniny (Farrell, 2000). Nejvýznamnější sloučeninou je trinukleární komplex $[\{trans\text{-PtCl}(\text{NH}_3)_2 \mu\text{-trans-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2\}_2]^{4+}$ označovaný jako BBR3464 (Obr. 19).

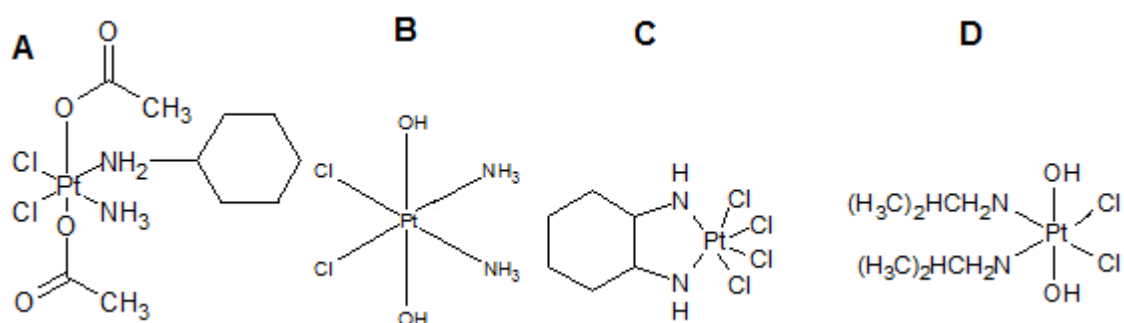


Obr. 19: Strukturální vzorec polynukleárního platinového komplexu BBR3464

Tato sloučenina již v předklinickém testování vykazovala několikanásobně vyšší protinádorovou účinnost než cisplatina, a to dokonce i v nádorech k cisplatině rezistentních (Manzotti et al., 2000). Klinické testy prokázaly účinnost proti nádorům slinivky, plic a melanomům kůže. Navíc je tento komplex aktivní v nádorech s mutovaným genem pro protein p53 (Zhang & Lippard, 2003). BBR3464 vytváří na DNA vnitřetězcové i meziřetězcové můstky, přitom IEC tvoří asi 20 % všech aduktů BBR3464 na DNA. Nedochozí k zásadním změnám konformace DNA jako u cisplatin, proto nejsou rozpoznány HMG proteiny a opravovány NER mechanismem jsou pouze vnitřetězcové můstky (Kašpárková et al., 2002).

3.4 Platičité komplexy

Komplexy Pt (IV) jsou ve srovnání s Pt(II) termálně stabilnější a chemicky méně reaktivní. Oktaedrická struktura Pt(IV) komplexů je kineticky více inertní, protože podléhají substitučním reakcím daleko pomaleji než jejich Pt(II) analoga. Platičité sloučeniny byly navrženy jako nereaktivní prekurzory, které nejsou schopné přímo reagovat s DNA. Proto je potřebná aktivace na reaktivní platnatý komplex, který již adukty na DNA tvoří. Po intravenózním podání tohoto léčiva je významná část molekul redukována ještě předtím, než se dostanou k místu působení. Také může dojít k situaci, kdy část molekul přijde do styku s DNA před svou redukcí a modifikuje ji, což vede k protinádorovému účinku této sloučeniny (Brabec, 2002). Díky chemické inertnosti platičitých komplexů byla vyvinuta perorálně podávaná léčiva. Mezi ně patří např. satraplatina ([bis-acetátoamindichloro(cyklohexylamino)platičitý komplex], JM 216), která je prvním orálně podávaným farmakem ze skupiny platičitých komplexů a nachází se ve třetí fázi klinického testování pro léčbu nádorů prostaty (Obr. 20A) (McKeage, 2007).



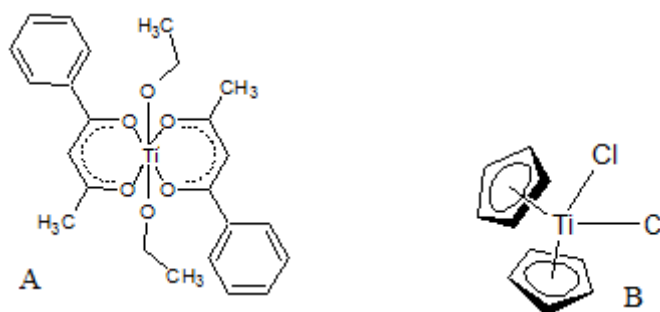
Obr. 20: Strukturní vzorce satraplatiny (A), oxoplatiny (B), tetraplatiny (C) a iproplatiny (D)

Do této skupiny se dále řadí oxoplatina (*cis*-diamindichloro-*trans*-dihydroxyplatičitý komplex), iproplatina (*cis*-dichloro-*trans*-dihydroxy-bis-isopropylamino platičitý komplex, JM-9) či tetraplatina, označovaná také jako ormaplatina (tetrachloro-1,2-diaminocyklohexan platičitý komplex) (Obr. 20B - D). Iproplatina a tetraplatina dosáhly dokonce preklinických a klinických testů, ale pro silné vedlejší účinky byly z testů vyřazeny (Hall et al., 2004).

3.5 Komplexy s centrálním kovem jiným než platina

Snaha vyvinout látky s dokonalejšími protinádorovými vlastnostmi, které by překonaly nevýhody spojené s podáváním cisplatin, vedla k pokusům syntetizovat léčiva s jiným centrálním kovem. Doposud byly odvozeny biologicky účinné komplexy od kovů, jako jsou železo, kobalt, titan, galium, zlato, germanium, ruthenium, aj. Vzhledem k rozdílné molekulové struktuře a chemickým vlastnostem lze očekávat, že jejich protinádorová aktivita bude odlišná (Ott & Gust, 2007).

Prvním komplexem, který obsahuje jiný kov než platinu a vstoupil do klinického testování, byl budotitan (Obr. 21A) (Heim et al., 1990). Po několika studiích byly prokázány silné toxické účinky a také podávání činilo značné komplikace, proto tato látka byla stažena z klinických studií. Mezi další léčiva na bázi titanu patří titanocen dichlorid (Obr. 21B), který dokonce postoupil do druhé fáze klinického testování. Tato látka vykazuje účinky vůči nádorům trávicího traktu, prsu či plic (Köpf – Maier, 1994).



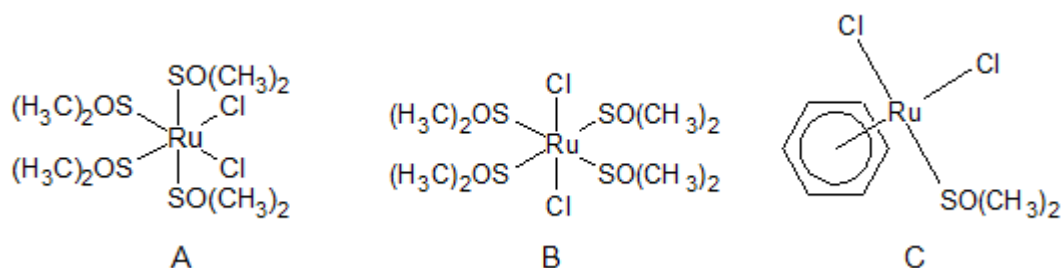
Obr. 21: Struktura léčiv na bázi titanu. (A) budotitan, (B) titanocen dichlorid

Díky vysoké protinádorové aktivitě se dostávají do středu pozornosti zejména komplexy obsahující atom ruthenia. Především se vyznačují nižšími vedlejšími toxickými účinky, jsou aktivní v nádorových buňkách rezistentních na cisplatinu a mají odlišný mechanismus působení (Coluccia et al., 1993b; Clarke, 2003). První zmínky o rutheniových komplexech se objevily v roce 1980, kdy Clarke a spol. pozoroval protinádorovou aktivitu komplexu ruthenia na myších (Clarke, 1980).

Ruthenium náleží do stejné skupiny jako železo, a proto vykazuje velmi silnou afinitu k transferinu. Rychle se dělicí nádorové buňky přijímají víc železa transportovaného pomocí transferinu, což znamená, že komplexy ruthenia se akumulují selektivně díky transportnímu mechanismu transferinu (Pongratz et al., 2004). Komplexy Ru (III) jsou prekurzory, které se mohou vázat v plazmě na proteiny a redukují se na komplexy Ru (II).

Protinádorově účinné komplexy ruthenia obsahují ligandy – dimethylsulfoxid, aminy, heterocyklické ligandy a polypyridyl.

Komplexy u obou sloučenin Ru (II) a Ru (III) s dimethylsulfoxidem (DMSO) vykazují protinádorovou aktivitu shodnou s cisplatinou, ale s daleko menšími vedlejšími účinky. Do této skupiny se řadí *cis* – a *trans* – $[\text{Ru(II)(DMSO)}_4\text{Cl}_2]$ (Obr. 22A, B). Studie jejich efektu na primární nádor a metastáze odhalily jejich antimetastatickou aktivitu vyšší než na primární nádor. Předmětem studia byl vždy komplex s *cis* – $[\text{Ru(II)(DMSO)}_4\text{Cl}_2]$, ale později se ukázalo, že komplex s *trans* konfigurací vykazuje vyšší protinádorovou aktivitu (Brabec & Nováková, 2006).



Obr. 22: Struktura rutheniových komplexů s DMSO. (A) *cis* – $[\text{Ru(II)(DMSO)}_4\text{Cl}_2]$, (B) *trans* – $[\text{Ru(II)(DMSO)}_4\text{Cl}_2]$, (C) $\text{Ru(II)(C}_6\text{H}_6\text{)(DMSO)Cl}_2$

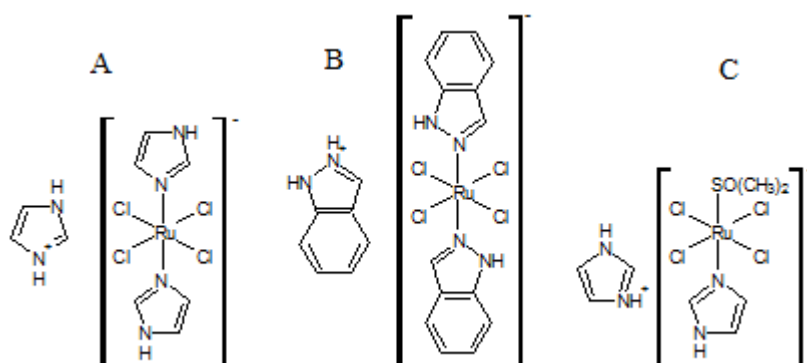
Zajímavé výsledky byly také získány ve studiích mechanismu protinádorové aktivity komplexu $\text{Ru(II)(C}_6\text{H}_6\text{)(DMSO)Cl}_2$ (Obr. 22C). Tato sloučenina vykazuje vysokou afinitu k DNA, ale nevyvolává žádné konformační změny (Gopal et al., 1999).

K rutheniovým komplexům se také řadí sloučeniny s heterocyklickým ligandem, které představují relativně novou skupinu v potencionálních protinádorových léčivech (Clarke et al., 1999). Tyto sloučeniny mají obecný vzorec $(\text{HB})[\text{Ru(III)B}_2\text{Cl}_4]$, kde B je heterocyklická báze, jako je imidazol (Im) (Obr. 23A) nebo indazol (Ind) (Obr. 23B). Tyto komplexy vykazují aktivitu v různých modelových nádorech a jsou částečně efektivní proti nádorům tenkého střeva, které vykazují rezistenci vůči cisplatině. Komplex $(\text{HInd})[\text{Ru(III)Ind}_2\text{Cl}_4]$ (KP1019) interaguje s DNA a vytváří křížové vazby, nebo indukuje zlomy v molekule DNA (Brabec & Nováková, 2006).

Později byly objeveny analogy těchto komplexů $\text{Na}[trans - \text{Ru(III)(DMSO)Cl}_4(\text{Im})]$ (NAMI), respektive $(\text{H}_2\text{Im})[trans - \text{Ru(III)(DMSO)Cl}_4(\text{Im})]$

(NAMI – A) (Obr. 23C), které vykazují povzbudivé protinádorové i antimetastatické vlastnosti (Brabec & Nováková, 2006).

Komplexy $(\text{HInd})[\text{Ru(III)Im}_2\text{Cl}_4]$, $(\text{HIm})[\text{Ru(III)Im}_2\text{Cl}_4]$ a $(\text{H}_2\text{Im})[\textit{trans} - \text{Ru(III)(DMSO)Cl}_4(\text{Im})]$ jsou pseudooktaedrické sloučeniny, které se ireverzibilně váží na DNA, avšak odlišně než cisplatina (Malina et al., 2001). NAMI se váže rychleji než ostatní dva rutheniové komplexy a cisplatina.



Obr. 23: Struktura ruthenioých komplexů. $(\text{HIm})[\text{Ru(III)Im}_2\text{Cl}_4]$ (A), $(\text{HInd})[\text{Ru(III)Im}_2\text{Cl}_4]$ – KP1019 (B), $(\text{H}_2\text{Im})[\textit{trans} - \text{Ru(III)(DMSO)Cl}_4(\text{Im})]$ – NAMI – A (C)

Interakce DNA s těmito komplexy byly studovány několika metodami molekulární biofyziky s tím cílem, aby přispěly k porozumění jejich biologických účinků a k ustanovení strukturně farmakologických vztahů těchto ruthenioých protinádorových léčiv.

Seznam použité literatury

- Akaboshi M., Kawai K., Maki H., Akuta K., Ujeno Y., Miyahara T. (2002) The member of platinum atoms binding to DNA, RNA, and protein molecules of HeLa cells treated with cisplatin at its mean lethal concentration. *Jpn. J. Cancer Res.* **83**, 522 – 526.
- Alderden R. A., Hall M. D., Hambley T. W. (2006) The discovery and developments of cisplatin. *J. Chem. Edu.* **83**, 728 – 734.
- Arpalahti J. (1999) Reactivity and inertness of Pt – nucleobase complexes. In *Cisplatin. Chemistry and biochemistry of leading anticancer drug* (Lippard B., ed.), pp. 207 - 222, VCH, Wiley – VCH, Zürich, Weinheim.
- Barry M. A., Benhke C. A., Eastman A. (1990) Actination of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem. Pharmacol.* **40**, 2353 – 2362.
- Basu A., Krishnamurthy S. (2010) Cellular responses to cisplatin – induced DNA damage. *J. Nucleic. Acids.*, 201367.
- Bellon S. F., Lippard S. J. (1990) Bending studies of DNA site – specifically modified by cisplatin, *trans* – diamminedichloroplatinum (II) and *cis* – [Pt(NH₃)₂(N³-cytosine)Cl]⁺. *Biophys. Chem.* **35**, 179 – 188.
- Boudvillain M., Dabbiès R., Aussoured C., Leng M. (1995) Intrastrand cross – links are not formed in the reaction between transplatin and native DNA: relation with the clinical inefficiency of transplatin. *Nucleic. Acids Res.* **23**, 2381 – 2388.
- Brabec V., Reedijk J., Leng M. (1992) Sequence – dependent distortions induced in DNA by monofunctional platinum (II) binding. *Biochemistry* **31**, 12397 – 12402.
- Brabec V., Leng M. (1993) DNA interstrands cross – links of *trans* – diamminedichloroplatinum (II) are preferentially formed between guanine and complementary cytosine residues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5345 – 5349.

- Brabec V., Boudný V., Balcarová Z. (1994) Monofunctional adducts of platinum (II) produce in DNA a sequence – dependent local denaturation. *Biochemistry* **33**, 1316 – 1322.
- Brabec V., Vrána O., Nováková O., Kleinwächter V., Intini F.P., Coluccia M., Natile G. (1996) DNA adducts of antitumor *trans* – [PtCl₂(E – iminoether)₂]. *Nucl. Acids Res.* **24**, 336 – 341.
- Brabec V. (2002) DNA modification by antitumor platinum and ruthenium compounds: Their recognition and repair. *Prog. Nucleic. Acid Res. Mol. Biol.* **71**, 1 – 68.
- Brabec V., Nováková O. (2006) DNA binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity. *Drug Resist. Updat.* **9**, 111 – 122.
- Bruhn S.L., Toney J.H., Lippard S.J. (1990) Biological processing of DNA modified by platinum compounds. *Prog. Inorgan. Chem.: Bioinorgan. Chem.* **38**, 477 – 518.
- Bustin M., Reeves R. (1996) High – mobility – group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin fiction. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **54**, 35 – 100.
- Calvert A.H., Newell D.R., Gumbrell C.A., O'Reilly S., Burnell M., Boxall F.F., Siddik Z.H., Judson R., Gore M.E., Wietshaw E. (1989) Carboplatin dosage: prospective evaluation of a simple formula based on renal function. *J. Clin. Oncol.* **7**, 1748 – 1756.
- Chu G., Chang E. (1990) Cisplatin – resistant cells express increased levels of a factor that recognises damaged DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3324 – 3327.
- Clarke M.J. (1980) Oncological implication of the chemistry of ruthenium. *Met. Ions Biol. Syst.* **11**, 231 – 283.
- Clarke M.J., Zhu F., Frasca D.R. (1999) Non – platinum chemotherapeutic metallopharmaceuticals. *Chem. Rev.* **99**, 2511 – 2533.
- Clarke M.J. (2003) Ruthenium metallopharmaceutical. *Coord. Chem. Rev.* **236**, 209 – 233.

- Cohen S.M., Jamieson E.R., Lippard S.J. (2000) Enhanced binding of the TATA – binding protein to TATA boxes containing flanking cisplatin 1,2 – cross – links. *Biochemistry* **39**, 8259 – 8265.
- Coluccia M., Nassi A., Loseto F., Boccarelli A., Marigio M.A., Giordano D., Intini F.P., Caputo P., Natile G. (1993a) Platinum (II) complexes containing iminoethers: A trans – platinum complexes showing higher antitumor activity than the cis congeners. *J. Med. Chem.* **36**, 510 – 512.
- Coluccia M., Sava G., Loseto F., Nassi A., Boccarelli A., Giordano D., Alessio E., Mestroni G. (1993b) Antileukemic action of RuCl₂(DMSO)₄ isomery and prevention of brain involvement on P388 leukemia and on P388/DDP subline. *Eur. J. Cancer* **29A**, 1873 – 1879.
- Corda Y., Job C., Anin M.F., Leng M., Job D. (1993) Spectrum of DNA – platinum adducts recognition by prokaryotic and eukaryotic DNA – depend RNA polymerases. *Biochemistry* **32**, 8582 – 8588.
- Desoize B., Madoulet C. (2002) Particular aspects of platinum compounds use dat present in cancer treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **42**, 317 – 325.
- Eastman A., Barry M.A. (1987) Interaction of *trans*-diamminedichloro - platinum(II) with DNA: Formation of monofunctional adducts and their reaction with glutathione. *Biochemistry* **26**, 3303 – 3307.
- Eastman A. (1987) The formation, isolation and characterization of DNA adducts produces by anticancer platinum complexes. *Pharmacol. Ther.* **34**, 155 – 166.
- Eastman A. (1999) The mechanism of action of cisplatin: From adducts to apoptosis. In *Cisplatin. Chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug* (Lippard B., ed.), pp. 111 – 134, VHCA, Wiley – VCH, Zürich, Weinheim.
- Essen L.O., Klar T. (2006) Light – driven DNA repair by photolyases. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 1266 – 1277.

- Farrell N., Kelland L.R., Roberts J.D., Van Beusichem M. (1992) Activation of the trans geometry in platinum antitumor complexes: A Survey of the cytotoxicity of trans complexes containing planar ligands in murine-L1210 and human tumor panels and studies on their mechanism of action. *Cancer Res.* **52**, 5065 – 5072.
- Farrell N. (2000) Polynuclear charged platinum compounds a new class of anticancer agents: Toward a new paradigm. In *Platinum – based drugs in cancer therapy* (Kelland L.R., Farrell N., eds), pp. 321 – 338, Humana Press Inc., Totowa/NJ.
- Farrell N. (2004) Polynuclear platinum drugs. In *Metal ions in biological systems, Vol. 42* (Sigel A., Sigel H., eds), pp. 251 - 296, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel.
- Farrell N., Povirk L.F., Dange Y., DeMasters G., Gupta M.S., Kohlhagen G., Khan Q.A., Pommier Y. Gewirtz D.A. (2004) Cytotoxicity, DNA strand breakage and DNA – protein crosslinking by a novel transplatinum compound in human A2780 ovarian and MCF – 7 breast carcinoma cells. *Biochem. Pharmacol.* **68**, 857 – 866.
- Fichtinger – Schepman A.M.J, Van der Veer J.L., Den Hartog J.H.J., Lohman P.M.M., Reedijk J. (1985) Adducts of the antitumor drug *cis* – diamminedichloroplatinum (II) with DNA: formation, identification, and quantitation. *Biochemistry* **24**, 707 – 713.
- Fisher D.E. (1994) Apoptosis in cancer therapy: Crossing the treshold. *Cell* **78**, 539 – 542.
- Friedberg E.C. (2001) How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat. Rev. Cancer* **1**, 22 – 33.
- Fuertes M.A., Castilla J., Alonso C., Pérez J.M. (2002) Novel concepts in development of platinum antitumor drugs. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* **2**, 539 – 551.
- Gopal Y. N. V., Jayaraju D., Kondapi A.K., (1999) Inhibition of topoisomerase II catalytic activity by two ruthenium compounds: a ligand – dependent mode of action. *Biochemistry* **38**, 4382 – 4388.
- Hall M.D., Dolman R.C., Hambley T.W. (2004) Metal complexes in tumor diagnosis and as anticancer agents. In *Metal ions in biological systems, Vol. 42* (Sigel A., Sigel H., eds), pp. 297 – 322, Marcel Dekker, Inc., New York, USA.

- Harrap K.R. (1985) Preclinical studies identifying as a viable cisplatin alternative. *Cancer Treat. Rev.* **12**, 21 – 33.
- He Z., Henricksen L.A., Wold M.S., Ingles C.J. (1995) RPA involvement in the damage – recognition and incision step of nucleotide excision repair. *Nature* **374**, 566 – 569.
- Heim M.E., Bischoff H., Keppler B.K. (1990) Clinical – studies with budotitan – a new nonplatinum complex for cancertherapy. In *Metal ions in biology and medicine* (Collery P., Corbella J., Domingo J.L., Etienne J – C. Llobet J.M., eds), pp. 508 – 510, John Librey Eurotext, Paris, France.
- Hsieh P., YamanenK. (2008) DNA mismatch repair: Molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mech. Ageing Dev.* **129**, 391 – 407.
- Ishida S., Lee J., Thiele D.J., Herskowitz I. (2002) Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammalian. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 14298 – 14302.
- Jamieson E.R., Lippard S.J. (1999) Structure, recognition, and processing of cisplatin – DNA adducts. *Chem. Rev.* **99**, 2467 – 2498.
- Kartalou M., Essigmann J.M. (2001) Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. *Mutat. Res. – Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **478**, 1 – 21.
- Kašpárková J., Farrell N., Brabec V. (2000) Sequence specificity, conformation, and recognition by HMG1 protein of major DNA interstrand cross – link of antitumor dinuclear platinum complexes. *J. Biol. Chem.* **275**, 15789 – 15798.
- Kašpárková J., Zehnulová J., Farrell N., Brabec V. (2002) DNA interstrand cross – links of the novel antitumor trinuclear platinum complex BBR3464: conformation, recognition by high mobility group domain proteins, and nucleotide excision repair. *J. Biol. Chem* **277**, 48076 – 48086.
- Kašpárková J., Nováková O., Farrell N., Brabec V. (2003) DNA binding by antitumor *trans* – [PtCl₂(NH₃)(thiazole)]. Protein recognition and nucleotide excision repair of monofunctional adducts. *Biochemistry* **42**, 792 – 800.

- Keck M.V., Lippard S.J. (1992) Unwinding of supercoiled DNA by platinum – ethidium and related complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 3386 – 3390.
- Kelland L.R. (2000) Preclinical perspective on platinum resistance. *Drugs* **59**, 1 – 8.
- Kelland L. (2007) The resurgence of platinum – based cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 573 – 584.
- Kidani Y., Inagaki K., Iigo M., Hoshi A., Kurefani K. (1978) Antitumor activity of 1,2 – diamminocyclohexaneplatinum complexes against Sarcoma-180 ascites form. *J. Med. Chem.* **21**, 1315 – 1318.
- Knox R.J., Friedlos F., Lydall D.A., Roberts J.J. (1986) Mechanism of cytotoxicity of anticancer platinum drugs: evidence that *cis* – diamminedichloroplatinum (II) and *cis* – diammine – (1,1 – cyclobutanedicarboxylato)platinum (II) differ only in the kinetics of their interaction with DNA. *Cancer Res.* **46**, 1972 – 1979.
- Köpt – Maier P. (1994) Complexes of metals other than platinum as antitumor agents. *Eur. J. Clin. Pharmacol* **47**, 1 – 16.
- Legendre F., Chottard J-C. (1999) Kinetics and selectivity of DNA – platination. In *Cisplatin. Chemistry and biochemistry of leading anticancer drug* (Lippard B., ed.), pp. 223 – 246, VCH, Wiley – VCH, Zürich, Weinheim.
- Lemaire M.A., Schwartz A., Rahmouni A.R., Leng M. (1991) Interstrand cross – links are preferentially formed at the d(GC) sites in the reaction between *cis* – diamminedichloroplatinum (II) and DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1982 – 1985.
- Lévi F., Misset J-L., Brienza S., Adam R., Melzger G., Itzakhi M., Caussanel J-P., Kunstlinger F., Lecouturier S., Declère A.D., Jasmin C., Bismuth H., Reinberg A. (1992) A chromopharmacologic phase II clinical trial with 5 – fluorouracil, folinic acid and oxaliplatin using an ambulatory multichannel programmable pump. High antitumor effectiveness against metastatic colorectal cancer. *Cancer* **69**, 893 – 900.

- Lišková B., Zerzánková L., Nováková O., Kostrhunová H., Trávníček Z., Brabec V. (2012) Cellular Response to antitumor cis – dichloro platinum (II) complexes of CDK inhibitor bohemine and its analogues. *Chem. Res. Toxicol.* **25**, 500 - 509
- Malina J., Nováková O., Keppler B-K-, Alession E., Brabec V. (2001) Biophysical analysis of nature double – helical DNA, modified by anticancer heterocyclic complexes of ruthenium (III) in cell – free media. *J. Biol. Inorg. Chem.* **6**, 435 – 445.
- Malinge J.M., Perez C., Leng M. (1994) Base sequence – independent distortion induced by interstrand cross – links in cis – diamminedichloroplatinum (II) – modified DNA. *Nucl. Acids Res.* **22**, 3834 – 3839.
- Malinge J.M., Leng M. (1999) Interstrand cross – links in cisplatin or transplatin – modified DNA. In *Cisplatin. Chemistry and biochemistry of leading anticancer drug* (Lippard B., ed.), pp. 159 - 182, VHCA, Wiley – VCH, Zürich, Weinheim.
- Manzotti C., Pratesi G., Menta E., Di Dominico R., Cavalletti E., Fiebig H.H., Kelland L.R., Farrell N., Polizzi D., Sepino R., Pezzoni G., Zumino F. (2000) BBR3464: a novel triplatinum complex, exhibiting a preclinical profile of antitumor efficacy different from cisplatin. *Clin. Cancer Res.* **6**, 2626 – 2634.
- May P., May E. (1999) Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* **18**, 7621 – 7636.
- McKeage M.J. (2007) Satraplatin in hormone . refractory prostate cancer and other tumor types: pharmacological properties and clinical evaluation. *Drugs* **67**, 859 – 869.
- Mello J.A., Acharya S., Fishel R., Essigmann J.M. (1996) The mismatch – repair protein hMSH2 binds selectively to DNA adducts of the anticancer drug cisplatin. *Chem. Biol.* **3**, 579 – 589.
- Moggs J.G., Szymkowski D.E., Yamada M., Karran P., Wood R.D. (1997) Differential human nucleotide excision repair of paired and mispaired cisplatin – DNA adducts. *Nucl. Acids Res.* **25**, 480 – 490.

- Muggia F.M., Los G. (1993) Platinum resistance: laboratory findings and clinical implications. *Stem. Cells.* **11**, 182 – 193.
- Naser L.J., Pinto A.L., Lippard S.J., Essigmann J.M. (1988) Chemical and biological studies of the major DNA adduct of *cis* – diamminedichloroplatinum (II), *cis* [Pt(NH₃)₂{d(GpG)}], built into a specific site in a viral genome. *Biochemistry* **27**, 4357 – 43676.
- Nováková O., Kašpárková J., Malina J., Natile G., Brabec V. (2003) DNA – protein cross - linking by *trans* – [PtCl₂(E – iminoether)₂]. A concept for activation of the *trans* geometry in platinum antitumor complexes. *Nucl. Acids Res.* **31**, 6450 – 6460.
- O'Dwyer P.J., Stevenson J.P., Johnson S.W. (1999) Clinical status of cisplatin, carboplatin, and other platinum – based antitumor drugs. In *Cisplatin. Chemistry and biochemistry of leading anticancer drug* (Lippard B., ed.), pp. 31 – 70, VHCA, Wiley – VCH, Zürich, Weinheim.
- Ohndorf V.M., Rould M.A., He Q., Pabo C.O., Lippard S.J. (1999) Basis for recognition of cisplatin – modified DNA by high – mobility – group proteins. *Nature* **399**, 708 – 712.
- Ott I., Gust R. (2007) Nonplatinum metal complexes as anti-cancer drugs. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **340**, 117 – 126.
- Papouli E., Cejka P., Jiricny J. (2004) Dependence of the cytotoxicity of DNA – damaging agents on the mismatch repair status of human cells. *Cancer Res.* **64**, 3391 – 3394.
- Patrick S.M., Turchi J.J. (1999) Replication protein A (RPA) binding to duplex cisplatin – damaged DNA is mediated through the generation of single – stranded DNA. *J. Biol. Chem.* **274**, 14972 – 14978.
- Perez R.P. (1998) Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. *Eur. J. Cancer* **34**, 1535 – 1542.

- Pilch D.S., Dunham S.V., Jamieson E.R., Lippard S.J., Breslauer K.J. (2000) DNA sequence context modulates the impact of a cisplatin 1,2 – d(GpG) intrastrand crosslink on the conformation and thermodynamic properties of duplex DNA. *J. Mol. Biol.* **296**, 803 – 812.
- Poklar N., Pilch D.S., Lippard S.J., Redding E.A., Dunhan S.U., Breslauer K.J. (1996) Influence of cisplatin intrastrand crosslinking on the conformation, thermal stability and energetics of a 20 – mer DNA duplex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 7606 – 7611.
- Pongratz M., Schluga P., Jakubec M.A., Arion V.B., Hartinger C.G., Allmaier G., Keppler B.K. (2004) Transferrin binding and transferrin – mediated cellular uptake of the ruthenium coordination compound KP1019, studied by means of AAS, ESI-MS and CD spectroscopy. *J. Anal. At. Spectrom.* **29**, 46 – 51.
- Pullman A., Pullman B. (1981) Molecular electrostatic potential of the nucleic acids. *Q. Rev. Biophys.* **14**, 289 – 294.
- Rabik C.A., Dolan M.E. (2007) Molecular mechanism of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat. Rev.* **33**, 9 – 23.
- Rascoe J.M., Roberts J.J. (1974) Interaction between mammalian cell DNA and inorganic platinum compound. I. DNA interstrand cross – linking and cytotoxic properties of platinum (II) compounds. *Biochem. Pharmacol.* **23**, 1345 – 1357.
- Reardon J.T., Vaisman A., Chaney S.G., Sancar A. (1999) Efficient nucleotide excision repair of cisplatin, oxaliplatin, and bis – aceto – ammine – dichloro – cyclohexylamine – platinum (IV) (JM216) platinum intrastrand DNA diadducts. *Cancer Res.* **59**, 3968 – 3971.
- Reed J.C. (1994) Bcl – 2 and the regulation of programmed cell death. *J. Cell. Biol.* **124**, 1 – 6.
- Reedijk J. (1996) Improved understanding in platinum antitumor chemistry. *Chem. Commun.*, 801 – 806.
- Rode H.J. (2008) Apoptosis, cytotoxicity and cell proliferation. *Roche diagnostics GmbH*, Roche Applied Science, Mannheim, 4th edition.

- Rosenberg B., Van Camp L., Krigas T. (1965) Inhibition of division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* **205**, 698 – 699.
- Rosenberg B., Van Camp L., Grimley E.B., Thomson A.J. (1967) The inhibition of growth or cell division in *Escherichia coli* by different ionic species of platinum (IV) complexes. *J. Biol. Chem.* **242**, 1347 – 1352.
- Rosenberg B. (1999) Platinum complexes for the treatment of cancer: Why the search goes on. In *Cisplatin. Chemistry and biochemistry of leading anticancer drug* (Lippard B., ed.), pp. 3 - 30, VCH, Wiley – VCH, Zürich, Weinheim.
- Sancar A. (1995) Excision repair in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 15915 – 15918.
- Suo Z., Lippard S.J., Johnson K.A. (1999) Single d(GpG) / *cis* – diammineplatinum (II) adducts – induced inhibition of DNA polymerization. *Biochemistry* **38**, 715 – 726.
- Takahara D.M., Rosenzweig A.C., Frederick C.A., Lippard S.J. (1995) Crystal structure of double – stranded DNA containing the major adduct of anticancer drug cisplatin. *Nature* **377**, 649 – 952.
- Todd R.C., Lippard S.J. (2009) Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds. *Metallomics* **1**, 280 – 291.
- Toney J.H., Donahue B.A., Kellett P.J., Bruhn S.L., Essigmann J.M., Lippard S.J. (1989) Isolation of cDNAs encoding a human protein that binds selectively to DNA modified by the anticancer drug *cis* – diamminedichloroplatinum (II). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 8328 – 8332.
- Vaisman A., Chaney S.G. (1995) Induction of UV – damage recognition protein by cisplatin treatment. *Biochemistry* **34**, 105 – 114.
- Vichi P., Coin F., Renaud J.P., Vermeluen W., Hoeijmakers J.H., Moras D., Egly J.M. (1997) Cisplatin – and UV – damaged DNA lure the basal transcription factor TFIID/ TBP. *Embo J.* **16**, 7444 – 7456.

- Weller M. (1998) Predicting response to cancer chemotherapy: the role of p53. *Cell Tissue Res.* **292**, 435 – 445.
- Wood R.D. (1997) Nucleotide excision repair in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 23465 – 23468.
- Woynarowski J.M., Faivre S., Herrig M.C.S., Arnett B., Chapman W.G., Trevino A.V., Raymond E., Chaney S.G., Vaisman A., Varchenko M., Juniewicz P.E. (2000) Oxaliplatin – induced damage of cellular DNA. *Mol. Pharmacol.* **58**, 920 – 927.
- Yamada M., O'Regan E., Brown R., Karran P. (1997) Selective recognition of a cisplatin – DNA adduct by human mismatch repair proteins. *Nucl. Acids Res.* **25**, 491 – 495.
- Yaneva J., Leuba S.H., Van Holde K., Zlatanova J. (1997) The major chromatin protein histone H1 binds preferentially to cis – platinum – damage DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 13448 – 13451.
- Zamble D.B., Lippard S.J. (1999) The response of cellular proteins to cisplatin – damaged DNA. In *Cisplatin. Chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug* (Lippard B., ed.), pp. 73 – 110, VHCA, Wiley – VCH, Zürich, Weinheim.
- Zhang Ch.X., Lippard S.J. (2003) New metal complexes as potential therapeutics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, 481 – 489.
- Zlatanova J., Van Holde K. (1998) Binding to four – way junction DNA: a common property of architectural proteins? *Faseb J.* **12**, 421 – 431.
- Žaludová R., Žáková A., Kašpárková J., Balcarová Z., Kleinwächter V., Vrána O., Farrell N., Brabec V. (1997) DNA interaction of bifunctional dinuclear platinum (II) antitumor agents. *Eur. J. Biochem.* **246**, 508 – 517.

Seznam použitých zkratek

AAS – atomová absorpční spektrometrie

Cisplatina – *cis* – diammindichloroplatnatý komplex

CT DNA – calf thymus DNA, DNA z telecího brzlíku

DMF – N, N'- dimethylformamid

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina

ERCC1 – excision repair cross – complementing 1

FDA – Food and Drug Administration, Správa potravin a léčiv v USA

HMG – high mobility group, proteiny skupiny vysoké pohyblivosti

IAC – intrastrand cross – link, vnitřetězcové příčné vazby

ICP – MS – inductively coupled plasma mass spectrometry, hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

IEC – interstrand cross – link, meziřetězcové příčné vazby

Karboplatina – *cis* – diamminocyklobutandikarboxyplatnatý komplex

LEF – 1 – lymphoid enhancer binding factor

MMR – mismatch repair, oprava chybného párování

Nedaplatina – *cis* – diaminoglykolátplatnatý komplex

NER – nukleotide excision repair, nukleotidová excizní oprava

Oxaliplatina – 1,2 – diaminocyklohexan – oxalátplatnatý komplex

RPA – replication protein A

RT – room temperature

SRY – sex determining factor

TBP – TATA box binding protein

TCF – 1 – T cell factor 1

Transplatina – *trans* – diammindichloroplatnatá komplex

UBF – upstream binding factor

XPA – *xeroderma pigmentosus* complementation group A

XPE – *xeroderma pigmentosus* complementation group E

XPF – *xeroderma pigmentosus* complementation group F