

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra biofyziky



Disertační práce

Olomouc 2020

Mgr. Ondřej Hrabina

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra biofyziky



***Energetika, konformace a rozlišení DNA poškozené
protinádorově účinnými metalofarmaky.***

*Energetics, conformation and recognition of DNA damage induced by
antitumour metal-based drugs.*

Mgr. Ondřej Hrabina

Vedoucí práce: prof. RNDr. Viktor Brabec, DrSc.

Olomouc 2020

BIBLIOGRAFICKÝ ZÁZNAM

Autor	Mgr. Ondřej Hrabina
Název práce	Energetika, konformace a rozlišení DNA poškozené protinádorově účinnými metalofarmaky
Studijní program	P1703 Fyzika
Studijní obor	Biofyzika
Školitel	prof. RNDr. Viktor Brabec, DrSc.
Rok obhajoby	2020
Klíčová slova	DNA, kovové komplexy, poškození, konformace

BIBLIOGRAPHIC RECORD

Author	Mgr. Ondřej Hrabina
Thesis	Energetics, conformation and recognition of DNA damage induced by antitumour metal-based drugs
Programme	P1703 Physics
Field of study	Biophysics
Supervisor	prof. RNDr. Viktor Brabec, DrSc.
Year of defence	2020
Keywords	DNA, metal-based drugs, damage, conformation

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracoval samostatně s použitím literatury ocitované v závěru práce. Všechny publikované výsledky zahrnuté v práci byly použité se souhlasem spoluautorů.

V Olomouci dne

Podpis

Děkuji svému školiteli prof. RNDr. Viktoru Brabcovi, DrSc. za podporu a odborné vedení při tvorbě předložené práce. Děkuji svým kolegům a odborníkům z oddělení Molekulární biofyziky a farmakologie, Biofyzikálního ústavu AV ČR v Brně, kteří mi poskytli cenné informace, čas a příjemné pracovní prostředí po práci na disertaci. V neposlední řadě bych rád poděkoval mojí rodině a přátelům za jejich morální podporu.

ABSTRAKT

Chorobám moderní doby jakožto nejrozšířenějším a nejvíce zákeřným onemocněním vévodí rakovina. V dalších 30 letech se předpokládá až dvounásobný nárůst pacientů trpících touto nemocí. Tento nepříznivý trend spolu se současným stavem vedou k překotnému vývoji nových a efektivnějších chemoterapeutik. Nedílnou součástí moderní chemoterapie rakoviny jsou komplexy přechodných kovů. Nejúspěšnějším a jedním z nejvyužívanějších chemoterapeutik je cisplatin. Objev její biologické aktivity Barnetem Rosenbergem odstartoval syntézu nových cytostatik na bázi přechodných kovů. Cílem této rozsáhlé vědecké studie je objevení cytostatik s vyšší účinností a vyšší paletou citlivých nádorů. Dále je vyvíjena snaha o minimalizaci nežádoucích účinků, jako je nevolnost, nefrotoxicita, ototoxicita a v neposlední řadě tzv. získaná rezistence k léčbě. Výše zmíněné komplikace při léčbě konvenčními cytostatiky jsou hlavní hnací silou ve vývoji nových léčiv. Mezi možnostmi modifikace cytostatik patří například záměna centrálního atomu, změna oxidačního stavu centrálního atomu či změna geometrie ligandů. V poslední době je také velice populární modifikace cytostatika různými biologicky aktivními ligandy, které podporují duální nebo multimodální efekt léčiva.

Jedním z těchto komplexů je velice slibný $\{[\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}]_2(4,4'\text{-methylenedianilin})\}^{2+}$. Jedná se o nový polynukleární komplex. Jeho protinádorová účinnost je srovnatelná s cisplatinou a u buněk na cisplatinu necitlivých dokonce vyšší. Jeho další zajímavou vlastností je tvorba podobné deformace v sekundární struktuře DNA ve srovnání s cisplatinou, přestože tvoří diametrálně odlišný typ aduktů na DNA. Také je nutné zmínit, že na rozdíl od konvenčních cytostatik tvoří meziřetězcové vazby výhradně ve směru 3'-3'.

Další cestou je návrh nových struktur metalofarmak, které nejsou založeny na derivatizaci dosud využívaných cytostatik. Příkladem těchto nových struktur jsou takzvané "helikáty", závitnicové struktury obsahující různé atomy kovů navržené prof. Hannonem (University of Birmingham, UK). Helikáty jsou chirální struktury složené z 2 kovových atomů a 3 rigidních organických ligandů.

Helikátní struktury nasyntetizované prof. Scottem (University of Warwick, UK) se ukázaly jako velice účinná antimikrobiální agens působící i na některé gram negativní bakterie. Zajímavý je také fakt, že pozorované vlastnosti helikátů při interakci s bakteriemi byly velice podobné jako u zavedených antibiotik. Tyto helikáty také silně interagují s DNA. Pouze dva helikáty, a to oba enantiomery **1** se váží na DNA organizovaně. Ostatní helikáty se váží náhodně. Vzhledem k polykationnímu charakteru těchto komplexů jsou tyto látky schopny velice účinně kondenzovat DNA. V neposlední řadě jsou tyto látky schopny velice účinně inhibovat klíčové buněčné enzymy, jako je RNA polymeráza či topoisomeráza I.

Oxidativní poškození DNA při aerobní respiraci a oxidativním stresu se objevuje v široké paletě nemocí. Častým příkladem je oxidativní poškození pyrimidinových bází, zejména

cytosinu. 5-hydroxyuridin a 5-methylhydroxyuridin jsou dva zástupci takovýchto poškození. Zatímco 5-hydroxyuridin je známý svou mutagenní aktivitou, 5-methylhydroxyuridin je považován za slibnou epigenetickou značku. Tento rozdíl je velice zajímavý vzhledem k minimálnímu rozdílu v jejich struktuře. Vliv inkorporace těchto lézí do DNA byl studován simulací translázové syntézy a z hlediska termodynamiky metodou „Microscale“ termoforézy. Bylo zjištěno že, polymerázy schopné snadno obejít poškození způsobené 5-methylhydroxyuridinem a to pravděpodobně způsobuje jeho menší mutagenitu, což je konzistentní s jeho rolí jako epigenetické značky.

ABSTRACT

Cancer is the most widespread disease of modern times. Approximately two-fold rise of cancer patients is expected in the next 30 years. This unpleasant trend combined with the current status of development leads to the rapid development of new and more effective chemotherapeutics. Metal-based drugs represent an integral part of modern chemotherapy of cancer. The most successful and one of the most used chemotherapeutics is cisplatin. Discovery of its biological activity by Barnett Rosenberg started the synthesis of new cytostatic drugs based on transition metals. The goal of this enormous project was the discovery of cytostatic drugs with higher efficiency and a larger portfolio of sensitive tumours in comparison with cisplatin. There is also a great effort to reduce undesirable side effects of the drug such as nephrotoxicity or ototoxicity. Another significant problem is so-called acquired resistance. These complications are the main driving force for the development of new drugs. A way to modify cytostatic drugs is for example change of central atom, change of oxidative state of the central atom, or altering of the ligand geometry. Recently modification of the cytostatic drug by biologically active ligands grew in popularity.

One of those derivatives is very prominent $\{[\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}]_2(4,4'\text{-methylenedianiline})\}^{2+}$. It is a new polynuclear platinum-based drug. Its antitumor efficiency is comparable with cisplatin for cells sensitive to cisplatin. Notably, this complex is efficient in cells resistant to cisplatin. Another important property of this complex is also a creation of DNA distortions similar to those induced by cisplatin, even though adducts on DNA made by this complex are dramatically different. Interstrand crosslinks produced by this complex are formed exclusively in the 3'-3' direction, compared to the 5'-5' direction observed in conventional platinum-based drugs.

Another path for developing new structures of metal-based drugs is to design structure that is not based on drugs used so far. Example of these structures are so-called metallohelicates, helical structures designed and synthesized by prof. Hannon (University of Birmingham, UK). These metallohelicates are chiral structures composed of three relatively rigid organic ligands and two metal ions.

Helicate structures developed and synthesized by prof. Scott (University of Warwick, UK) have shown very promising antimicrobial activity towards gram-negative bacteria. The observed activity and properties of the helicates are very similar to some conventional antibiotics. These structures also interact with DNA. The organized bond was observed only in both enantiomers of helicate **1**. Other helicates were bound unorganized. Moreover, these helicates are very potent agents that condense/aggregate DNA. Interestingly, a decrease of activity of key cellular enzymes such as RNA polymerase or topoisomerase I in the presence of helicates has been observed.

Oxidative damage of the DNA during aerobic respiration and oxidative stress is involved in various diseases. A typical example is oxidative damage of pyrimidine bases, especially cytosine. Two representatives are 5-hydroxyuridine and 5-methylhydroxyuridine. While 5-hydroxyuridine is known for its mutagenic activity, 5-methylhydroxyuridine is considered as potent epigenetic marker. This difference is very interesting because there is only a slight difference in their structures. The effect of incorporation these two lesions into DNA was observed by microscale thermophoresis and simulation of translesion synthesis. The results have shown that polymerases were able simply to bypass damage caused by 5-methylhydroxyuridine, which is probably responsible for its lesser mutagenicity. The observed results are in agreement with the role of 5-methylhydroxyuridine as an epigenetic marker.

OBSAH

1. Úvod	12
1.1. Výzva moderní medicíny – rakovina	12
1.2. Historie protinádorových léčiv na bázi kovů	12
1.3. DNA	13
1.3.1. Chemické složení DNA	13
1.3.2. Struktura DNA	16
1.3.3. Konformace páru bází	17
1.3.4. Kanonické formy DNA	18
1.3.4.1. B-DNA	19
1.3.4.2. A-DNA	20
1.3.4.3. Z-DNA	20
1.3.5. Neobvyklé formy DNA	21
1.3.5.1. DNA výdutě	21
1.3.5.2. Třicestná rozhraní	22
1.3.6. Energetika dvoušroubovice DNA	22
1.3.7. Oxidativní poškození DNA	24
1.4. Mechanismus působení léčiv na bázi platiny	25
1.4.1. DNA jako cílové místo působení	26
1.4.2. Buněčná odpověď na poškození DNA komplexy platiny	27
1.4.3. Oprava poškozené DNA	29
1.5. Vývoj nových léčiv na bázi kovů	29
1.5.1. Protinádorově účinná analoga cisplatiny	30
1.5.2. Polynukleární komplexy platiny	32
1.5.3. Komplexy dalších těžkých kovů	33
1.5.4. Helikáty	34
2. Cíle práce	38
3. Materiál a metody	39

3.1.1.	Chemikálie	39
3.1.1.1.	Použité komplexy.....	39
3.1.1.2.	Použitá DNA a oligonukleotidy	39
3.1.1.3.	Použité enzymy	39
3.1.1.4.	Použité chemikálie	39
3.1.2.	Metody	40
3.1.2.1.	Teplotní stabilita DNA	40
3.1.2.2.	Vytěšňování Ethidium bromidu	40
3.1.2.3.	Statický rozptyl světla	40
3.1.2.4.	Lineární dichroismus.....	40
3.1.2.5.	Církulární dichroismus.....	41
3.1.2.6.	Mikroskopie atomárních sil (AFM)	41
3.1.2.7.	Inhibice transkripce DNA	41
3.1.2.8.	Inhibice EcoRI	41
3.1.2.9.	Inhibice Topoisomerázy I.....	42
3.1.2.10.	Purifikace oligonukleotidů	42
3.1.2.11.	Microscale Termoforéza (MSD)	42
4.	Výsledky a diskuze.....	43
4.1.	Metallohelicates that kill Gram-negative pathogens using intracellular antimicrobial peptide pathways. (Publikace 3)	46
4.2.	Optically pure metallogelicates that accumulate in cell nuclei, condense/aggregate DNA and inhibit activities of DNA processing enzymes. (Publikace 1)	43
4.3.	Unique structural properties of DNA interstrand cross-links formed by a new antitumor dinuclear Pt(II) complex. (Publikace 4)	48
4.4.	Translesion DNA synthesis across lesions induced by oxidative products of pyrimidines. An insight into the mechanism by microscale thermophoresis. (Publikace 2) ..	45
5.	Závěr.....	50
6.	Seznam použité literatury	52
7.	Seznam použitých zkratek	59
8.	Přílohy	60

8.1.	Seznam publikací	60
8.1.1.	Publikace 1	61
8.1.2.	Publikace 2	63
8.1.3.	Publikace 3	65
8.1.4.	Publikace 4	67
8.1.5.	Publikace 5	69
8.2.	Strukturovaný životopis	71

1. Úvod

1.1. Výzva moderní medicíny – rakovina

Rakovina je pojmenování skupiny onemocnění, které se vyznačují abnormálním buněčným dělením. Tento stav je způsoben poškozením genetické informace, které naruší kontrolu buněčného cyklu. K rozšíření onemocnění dochází v případě, že se poškozené buňky začnou nekontrolovatelně dělit a formovat různé stupně nádorů. Léčením rakoviny se rozumí odstranění všech rakovinných buněk. Hlavní způsoby léčby jsou operační zákrok a radiační terapie pro lokalizované nádory a chemoterapie pro nádory nelokalizované. Velice často dochází ke kombinaci různých způsobů léčby a vytvoření „léčebného balíčku“, který je vhodný k léčbě pacienta a zjištěného nádoru [Internetové zdroje – [1]].

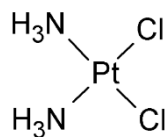
Chemoterapeutikum zastaví šíření nádorového bujení zabitím rychle se dělících buněk. Ideálním chemoterapeutikem je látka, která zabije pouze buňky rakovinné. V praxi je snaha o zničení nádoru s co možná nejmenšími důsledky pro pacienta [1]. Účinná protinádorové chemoterapeutika mohou pocházet z různých zdrojů. Prvním zdrojem jsou chemické bojové látky, jako je například yperit [2]. Druhým zdrojem jsou přírodní látky, jako jsou například vinca alkaloidy [3]. V neposlední řadě koordinační komplexy kovů, zejména platiny jsou považovány za důležitá chemoterapeutika [4]. Nejúspěšnějším chemoterapeutikem s nesporně největším dopadem na klinickou léčbu rakoviny je cisplatina.

1.2. Historie protinádorových léčiv na bázi kovů

První záznam o cisplatině je bezmála 175 starý [5]. Poprvé byla syntetizována roku 1844 v laboratoři německého chemika Michaela Peyrona. Při pokusu o syntézu komplexu platiny známém jako Magnusova zelená sůl, Peyron získal dva produkty, zelený a žlutý. Zeleným produktem je Peyronův chlorid, který se později proslavil pod názvem cisplatina. Po izolaci žlutého produktu se zjistilo, že ačkoliv je k Peyronovu chloridu izomerní, má jiné vlastnosti. Výsledky svého objevu publikoval v němčině v časopise *Annalen der Chemie und Pharmacie* [6].

Cesta cisplatiny k titulu nejúspěšnějšího chemoterapeutika začala bezmála bez mála před 60 lety v laboratoři Barnetta Rosenberga na Michiganské státní univerzitě ve Spojených státech [7, 8]. Hlavním zájmem prof. Rosenberga byl výzkum vlivu elektromagnetického pole na buněčné dělení u bakterií a savčích buněk. Během prvních experimentů s *E. coli* používal elektrody vyrobené z platiny. Po vystavení bakterií elektromagnetickému poli se bakterie staly velice dlouhými filamenti na rozdíl od normálního stavu, kdy vypadají jako malé tyčinky. Tohoto efektu nebylo dosaženo vystavením bakterií elektromagnetickému poli, ale mohly za něj produkty

vzniklé elektrolýzou na platinových elektrodách. Detailní analýzou byl identifikován aktivní komplex zodpovědný za pozorovaný efekt: *cis* - $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ později pojmenován jako cisplatina (Obr. 1) [7, 8].



Obrázek 1: Struktura cisplatiny (nakresleno v programu ChemSketch)

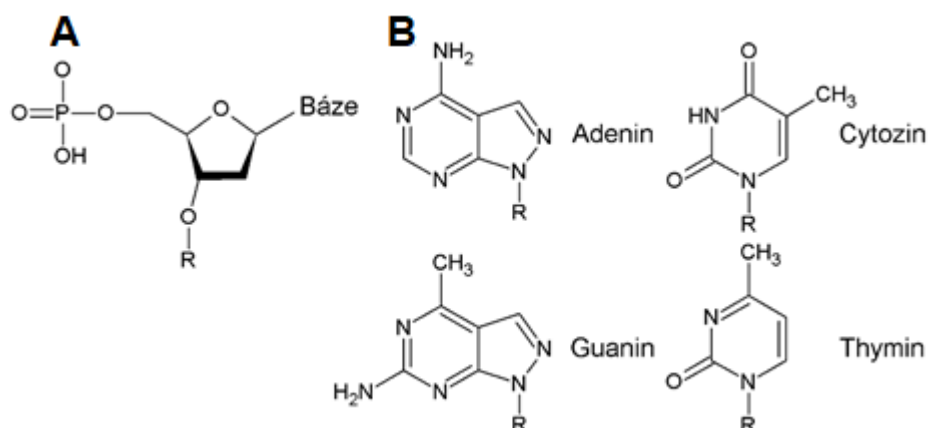
Po objevení biologické aktivity na buňkách byla testována účinnost cisplatiny na různé typy rakoviny. [7] Cisplatina je velice účinná při léčbě nádorů hlavy, krku a zejména rakoviny varlat. Velké množství pacientů úspěšně léčených cisplatinou odstartovalo zájem o nová léčiva obsahující kovy.

1.3. DNA

Deoxyribonukleová kyselina (DNA) se spolu s ribonukleovou kyselinou (RNA), proteiny, lipidy a sacharidy řadí mezi základní typy biomolekul, které jsou esenciální pro všechny známé formy života. DNA je nositelkou genetické informace. V sekvenci DNA jsou uloženy instrukce pro funkci, vývoj a růst organismu. O důležitosti DNA také vypovídá fakt, že je jako jediná molekula v buňce opravována.

1.3.1. Chemické složení DNA

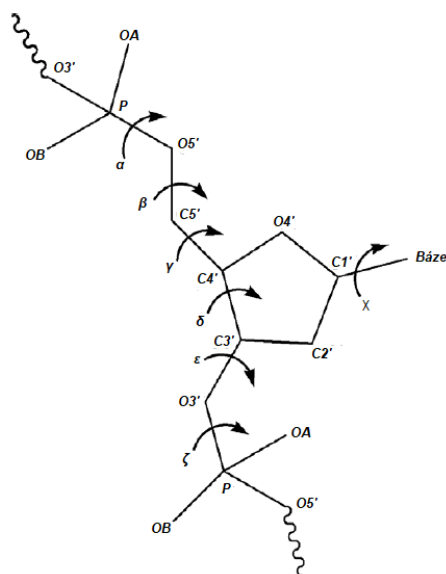
Deoxyribonukleová kyselina (DNA) je dlouhý lineární polymer složený ze dvou řetězců, které obsahují čtyři typy nukleotidových jednotek. [9] Každý nukleotid obsažen v DNA se skládá se tří částí: fosfátového zbytku, deoxyribózy a jedné ze čtyř bází. Báze jsou aromatické planární heterocyklické molekuly, které je možno rozdělit do dvou skupin. První skupina jsou purinové báze: adenin (A) a guanin (G), druhá skupina jsou pyrimidinové báze: cytosin (C) a thymin (T). Vazbou báze na cukerný zbytek vznikne tzv. nukleosid. (Obr. 2)



Obrázek 2: A: struktura nukleotidu. B: struktury bází obsažených v DNA. (nakresleno v programu ChemSketch.)

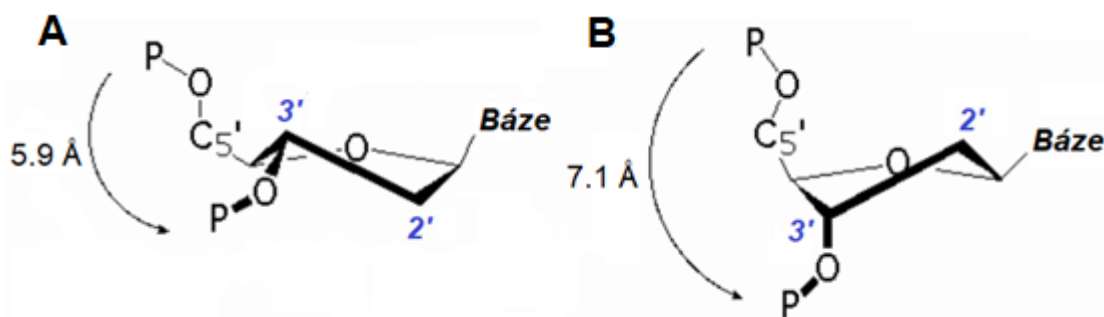
Báze je v nukleotidu kovalentně navázána skrze dusík N9 u purinů nebo dusík N1 u pyrimidinů glykosidickou vazbou na uhlík C1' deoxyribózy. Číslování jednotlivých atomů je stanoveno konvencí, kde se atomy cukerného zbytku číslijí čísla s apostrofem. Nukleotid vznikne přidáním jedné nebo více fosfátových skupin na uhlík C5' deoxyribózy. Nukleotidy v řetězci jsou vzájemně kovalentně pospojovány skrze fosfátové zbytky a hydroxylovou skupinu deoxyribózy, čímž vytvoří tzv. cukr-fosfátovou kostru DNA. Konce DNA lze od sebe velice jednoduše rozlišit. Jeden konec je zakončen fosfátem a konec druhý je zakončen hydroxylovou skupinou. Tato polarita řetězce DNA je znázorněna označením jednoho konce 5' (fosfát na uhlíku 5' deoxyribózy) a druhého konce 3' (hydroxylová skupina na uhlíku 3' deoxyribózy). Dle konvence se sekvence polynukleotidového řetězce udává ve směru 5' – 3'.

Vlastnosti polynukleotidového řetězce významně ovlivňuje konformace cukr-fosfátové kostry [10, 11, 12]. Flexibilita polynukleotidu je ovlivněna zejména faktem, že lze rotovat okolo šesti vazeb v každém nukleotidu. Vzhledem k velmi významným sterickým omezením je počet možných konformací omezen. Cukr-fosfátová kostra obsahuje šest proměnných torsních úhlů: α , β , γ , δ , ϵ , ζ spolu s glykosidickým úhlem χ a pěti torsními úhly ribózového cyklu $\tau_1 - \tau_5$ (Obr. 3).



Obrázek 3: Schéma torzních úhlů nukleotidů. (Převzato a upraveno z: [10])

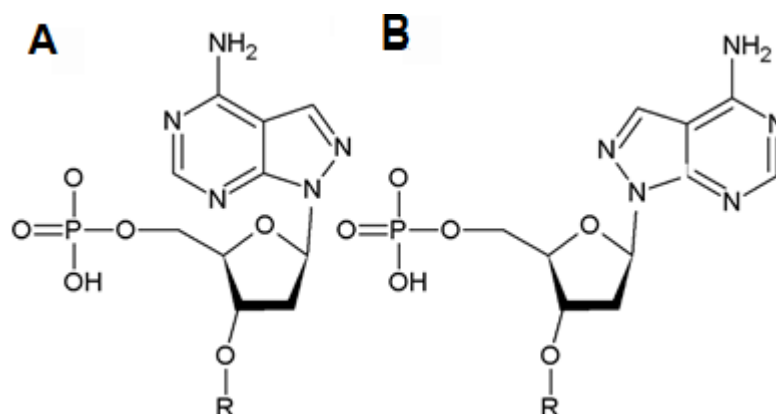
Uhlíkové atomy deoxyribózy neleží ve stejné rovině. Pět torsních úhlů $\tau_1 - \tau_5$ by v případě naprosto planárního cyklu bylo rovno nule. Tato konformace by ale byla vysoce nevýhodná. Ke snížení energie dochází při vychýlení alespoň jednoho uhlíkového atomu mimo rovinu cyklu, čímž vznikne „zvrásnění“ (pucker) deoxyribózového cyklu. Atomy nejčastěji vychýlené mimo rovinu cyklu jsou $C2'$ a $C3'$. V případě, že se vychýlený atom nachází na stejné straně roviny cyklu, hovoříme o této konformaci jako *-endo*. V případě opačném hovoříme o konformaci *-exo*. Konformace cukerného cyklu je z hlediska DNA velice důležitá, protože definuje relativní orientaci fosfátových skupin. (Obr. 4)



Obrázek 4: Konformace cukerného zbytku v nukleotidu. A: Konformace $C3'$ -endo, B: Konformace $C2'$ -endo. (Převzato a upraveno z: [13], Internetové zdroje – [12])

Jedním z nejdůležitějších torzních úhlů je v DNA úhel χ [14]. Již dlouhou dobu je χ považován za úhel zodpovědný za konformační vlastnosti DNA. Na základě rotace kolem glykosidické vazby se báze může nacházet ve dvou konformacích. První, s vysokou energií, se nazývá *-syn*. Druhá, s nízkou energií, se nazývá *-anti*. (Obr. 5) Vzhledem k energetické bariéře

pro přechod z jedné konformace do druhé je konformace -anti výhodnější pro pyrimidinové báze. Purinové báze jsou schopny přejít z konformace -anti do konformace -syn. Energeticky je v nukleotidech -syn konformace nejvíce přístupná pro guanin. Konformace -anti je přirozená pro všechny konformace DNA. Jedinou výjimkou je Z-DNA, kde se purinové báze nachází v konformaci -syn.

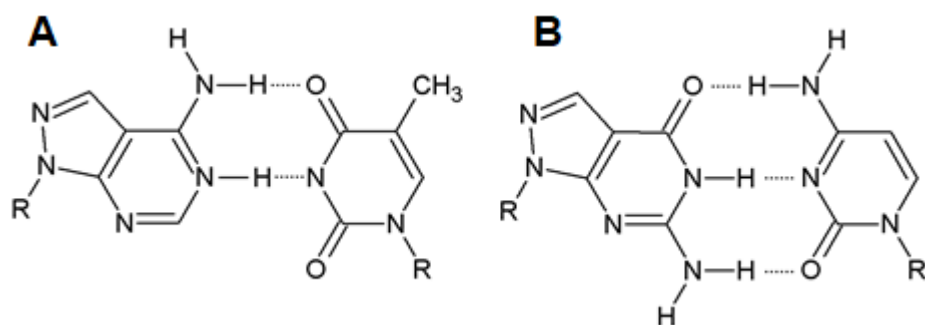


Obrázek 5: Konformace -syn (A) a -anti (B). (nakresleno v programu ChemSketch)

1.3.2. Struktura DNA

Jednotlivé řetězce DNA jsou spojeny vodíkovými vazbami mezi bázemi [15]. Na základě experimentálních dat bylo Chargaffem prokázáno, že molární poměry adenin:thymin a cytosin:guanin jsou ve shodě [16]. Tato skutečnost vedla Watsona a Cricka k domněnce, že každá z purinových a pyrimidinových bází je spojena specifickými vodíkovými vazbami a vytvoří tak planární pár bází, který drží dvoušroubovici DNA pohromadě.

Pár adenin:thymin (A•T) je spojen dvěma vodíkovými vazbami, v porovnání s párem guanin:cytosin (G•C), který je spojen třemi vodíkovými vazbami (Obr. 6) [10]. Základem Watson-Crickova uspořádání je předpoklad, že cukerné zbytky jsou navázány na stejné straně báze. Dalším předpoklad souvisí s velikostí páru bází. Pro dvoušroubovicové uspořádání dle Watson-Crickova modelu je nezbytné, aby páry A•T a G•C měly téměř identické rozměry. Vzdálenosti C1' – C1' jsou 10,48 Å pro A•T a 10,67 Å pro G•C pár. V přirozeně se vyskytující DNA se téměř vždy adenin páruje s thyminem a cytosin s guaninem. Nestandardní párování bází se může vyskytnout jak v syntetické DNA, tak teoreticky i v DNA přírodní.



Obrázek 6: Schéma A•T (A) a G•C (B) párů dle Watson-Crickova modelu. (nakresleno v programu ChemSketch)

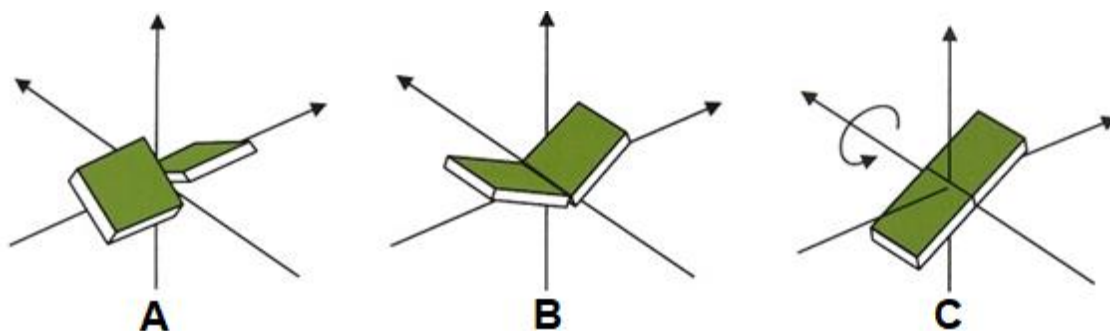
1.3.3. Konformace páru bází

Ačkoli jsou jednotlivé báze planární molekuly, páry bází (pb) vykazují značnou míru flexibility. Tato flexibilita je zčásti způsobena bázemi a vlastnostmi páru bází, ale z větší části závisí na prostředí. Tyto morfologické projevy bývají většinou diskutovány na úrovni dinukleosidů spojených vodíkovými můstky, zatímco větší konformační změny mohou být diskutovány na úrovni molekuly DNA.

K popsání geometrických závislostí v rámci páru bází bylo vytvořeno množství rotačních a translačních parametrů. Tyto parametry lze rozdělit do dvou skupin.

1) Parametry pro pár bází [10]

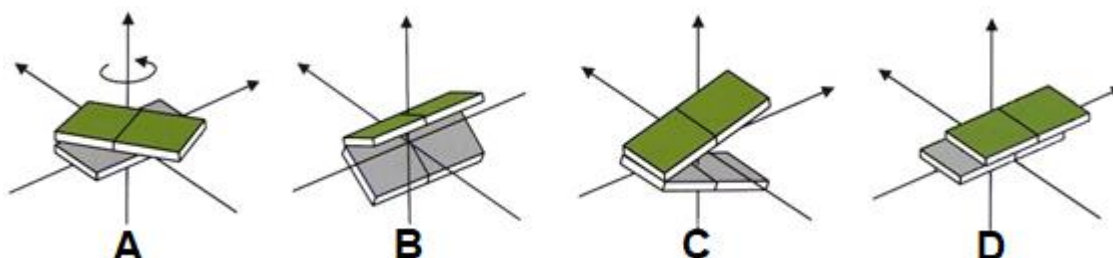
- **Vrtulový zkrut** (Propeller twist, ω) je definován jako dihederální úhel mezi normálovými vektory jednotlivých bází při zkrutu v rovině podélné osy páru bází (Obr. 7a). Za přirozených podmínek má tento úhel záporné znaménko. Za normální podmínky považujeme rotaci po směru hodinových ručiček nejbližší báze pozorované z podélné osy. Podélnou osou je pro purin-pyrimidinové páry bází vektor procházející atomem C8 purinu a atomem C6 pyrimidinu při Watson-Crickově párování. Při výskytu neobvyklého párování bází je možno aplikovat analogickou definici.
- **Buckle** (κ) je dihederální úhel podél krátké osy páru bází. Podmínkou je hodnota vrtulového zkrutu rovna 0° . Úhel má pozitivní znaménko, pakliže je distorze konvexní ve směru $5' - 3'$ v řetězci. (Obr. 7b)
- **Inclination** (η) je úhel mezi podélnou osou páru bází a rovinou kolmou k podélné ose dvoušroubovice. Kladné znaménko tohoto úhlu je definováno jako kladné pro pravotočivou rotaci okolo vektoru vycházejícího z podélné osy dvoušroubovice a směřujícího k velkému žlábků. (Obr. 7c)
- **Plošný posun** (X and Y displacements) definuje transformaci v rovině páru bází jako vzdálenost středu roviny od podélné osy dvoušroubovice. Kladným posunem ve směru x rozumíme posun k velkému žlábků. Posun v ose y je posun kolmý k posunu ve směru osy x a je kladný, pokud je ve směru k prvnímu řetězci dvoušroubovice.



Obrázek 7: Konformační parametry přiřazené páru bází. A: Vrtulový zkrut. B: Buckle. C: Inclination.

2) Parametry páru bází vzhledem k sousednímu páru bází [10]

- **Twist** (Ω) je úhel mezi následujícími páry bází, který je měřený jako změna orientace vektorů $C1'$ – $C1'$ jednotlivých párů bází. (Obr. 8a)
- **Roll** (ρ) je dihederální úhel pro rotaci páru báze okolo podélné osy páru báze vzhledem ke svému sousedovi. (Obr. 8b)
- **Tilt** (τ) je dihederální úhel pro rotaci páru báze podél osy kolmé na podélnou osu páru bází vzhledem ke svému sousedovi. (Obr. 8c)
- **Slide** je relativní posunutí páru bází ve srovnání se sousedním párem bází směrem k prvnímu řetězci dvoušroubovice. (Obr. 8d)

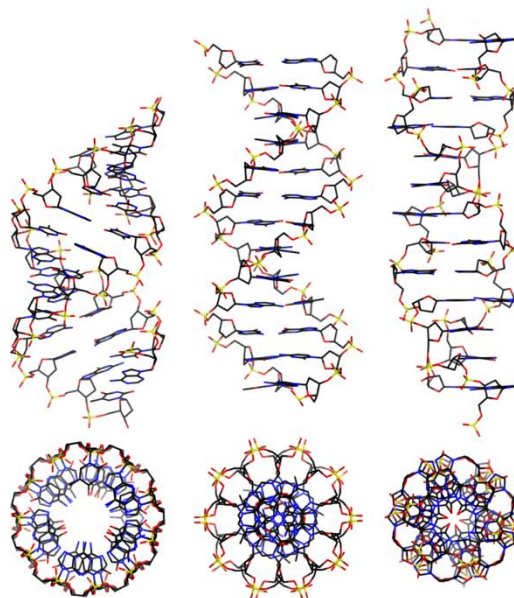


Obrázek 8: Konformační parametry přiřazené páru bází vzhledem k páru sousednímu. A: Twist. B: Roll. C: Tilt, D: Slide.

1.3.4. Kanonické formy DNA

Genetická informace je uložena ve formě dlouhých dvouřetězcových molekul DNA [17]. Vodíkové vazby mezi příslušnými nukleotidy udržují komplementární řetězce DNA organizované jako pravotočivou šroubovicovou strukturu nazývanou B-DNA. Strukturální přechody do dalších forem DNA mohou nastat při výskytu určitých sekvencí a mohou mít význam pro interakci DNA s proteiny, enzymy či se mohou podílet na regulaci genové exprese. Tyto struktury se mohou také podílet na formaci nukleozomů a jiných supramolekulárních struktur,

které obsahují DNA. Pravotočivé formy A- a B- DNA jsou tvořeny náhodnými/nеспецифickými sekvencemi, zatímco levotočivá Z-DNA vyžaduje specifickou sekvenci (Obr. 9).



Obrázek 9: Srovnání kanonických forem DNA. Zleva: A-DNA, B-DNA, Z-DNA (Převzato z Internetové zdroje – [13])

Základní strukturální parametry základních kanonických struktur DNA jsou shrnuty v tabulce 1.

Tabulka 1: Strukturální parametry kanonických forem DNA. (Převzato a upraveno z:[17])

Strukturální parametr		A-DNA	B-DNA	Z-DNA
Základní jednotka		1 pb	1 pb	2 pb
Rotace		pravotočivá	pravotočivá	levotočivá
Počet pb/otočka		11 Å	10,5 Å	12 Å
Vzdálenost pb		2,55 Å	3,4 Å	3,7 Å
Délka otočky		28,2 Å	34 Å	44,4 Å
Náklon pb k ose		20°	-6°	7°
Rotace pb		32,7°	34,3°	-30°
Průměr dvoušroubovice		23 Å	20 Å	18 Å
Glykosidická vazba	dA, dC, dT	anti	anti	anti
	dG	anti	anti	syn
Konformace cukerného zbytku	dA, dC, dT	C3'-endo	C2'-endo	C2'-endo
	dG	C3'-endo	C2'-endo	C3'-endo

1.3.4.1. B-DNA

B-DNA je pojmenování přiřazené nejčastěji se vyskytující formě DNA [17, 18]. Jedná se o pravotočivou dvojitou šroubovici o průměru 20 Å tvořenou dvěma antiparalelními řetězci. Řetězce jsou spojeny vodíkovými vazbami na základě Watson-Crickova modelu. Jedna otočka

B-DNA obsahuje přibližně 10,5 páru bází, které jsou přibližně kolmé na osu dvojité šroubovice. Vzdálenost dvou následujících párů bází je 3,4 Å. Na dvojité šroubovici DNA lze pozorovat dva žlábků, velký a malý. Přestože jsou rozměry těchto žlábků napříč kanonickými strukturami DNA různé, z pohledu báze je velký žlábek vždy na stejné straně pro daný pár bází. Cukerné zbytky vyskytující se v B-DNA preferují konformaci $C2'$ -endo pro jak purinové, tak pyrimidinové báze. Báze jsou více přístupné z velkého žlábků, což vysvětluje, proč proteiny tíhnou k vazbě na specifické sekvence. DNA struktura je v konformaci B- flexibilní v závislosti na sekvenci a prostředí, ve kterém se vyskytuje [19]. Například sekvence bohaté na adenin vedou k velice úzkému malému žlábků a vyššímu vrtulovému zkrutu, což vyústí v ohyb dvoušroubovice.

1.3.4.2. A-DNA

Přechod z B-DNA do A-DNA nastává při nízké relativní vlhkosti, například při přidání alkoholu [12, 17, 18]. Tento přechod je reverzibilní a děje se na mikrosekundové škále. Tyto dvě konformace sdílejí pravotočivé vinutí, ale v dalších parametrech nalézáme odlišnosti. V porovnání s B- konformací je konformace A- nižší a širší. Na jednu otočku dvoušroubovice připadá 11 párů bází vzdálených 2,55 Å a průměr je 23 Å. Dalším rozdílem je 20° náklon páru bází vzhledem k ose dvoušroubovice. Žlábků A-DNA nejsou tak hluboké jako u B-DNA a cukerné zbytky nukleotidu se vyskytují v konformaci $C3'$ -endo v porovnání s $C2'$ -endo u B-DNA. Báze jsou také vytlačeny více k obvodu šroubovice, což vytvoří 9 Å širokou „díru“ ve středu dvoušroubovice. A- dvoušroubovice se běžně vyskytuje u hybridu DNA – RNA či u dvou řetězcové RNA z důvodu hydroxylové skupiny na $C2'$ uhlíku ribózového cyklu.

1.3.4.3. Z-DNA

Levotočivá Z-DNA byla nalezena zejména v sekvencích poly(dCdG) a poly(dTdG) [12, 17, 18]. V porovnání s B-DNA je Z-DNA užší (18 Å) a báze jsou vytlačeny k okraji dvoušroubovice. Dalším rozdílem je přítomnost pouze jednoho hlubokého a úzkého žlábků. Na rozdíl od A- a B- konformace zde není základní jednotka 1 pár bází, ale opakující se 2 páry bází. Na jednu otočku dvoušroubovice připadá 12 párů bází a jejich průměrná vzdálenost je 3,7 Å. Cukr-fosfátová kostra není pravidelná, ale je uspořádaná „cik cak“. Cukerný zbytek se nachází v konformaci $C2'$ -endo pro pyrimidinové báze a v konformaci $C3'$ -endo v případě purinových bází. Purinové báze se v Z-DNA nachází v konformaci -syn. Elektrostatické repulzní síly cukr-fosfátové kostry jsou v porovnání s B-DNA vyšší, zejména díky „cik cak“ uspořádání. Z-DNA je proto stabilizována vysokou koncentrací soli a přítomností polyvalentních iontů, které jsou ve stínění repulze fosfátových skupin účinnější než ionty monovalentní. Počítačová analýza lidského genomu, která zahrnovala 137 kompletních genů, určila 329 sekvencí tvořících Z-DNA [17].

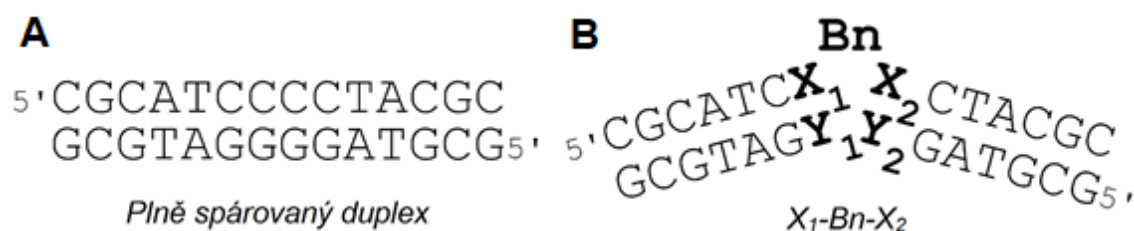
1.3.5. Neobvyklé formy DNA

Studie z poslední dekády ukázaly, že DNA je dynamická molekula a její struktura závisí na nukleotidové sekvenci, okolí a celkové topologii [20]. Tento strukturní polymorfismus pokrývá škálu od malých distorzí ve struktuře DNA až po změnu počtu řetězců. Při fyziologických podmínkách jsou tyto neobvyklé struktury obecně termodynamicky nevýhodné v porovnání s B-DNA.

Zatímco sekvence DNA kóduje genetickou informaci, klíč k expresi a regulaci této informace leží v rozpoznání struktury [21]. V přírodě je genetická informace zpracovávána a regulována skrze plejádu proteinů, jejichž vazba na DNA je součástí komplexních biologických regulačních drah. Možnost stimulování či zabránění exprese genetické informace za použití externí látky poskytuje nové možnosti při léčbě a prevenci nemocí. Syntetické látky, které jsou schopny selektivně interagovat s neobvyklými strukturami, jsou předmětem intenzivního výzkumu. Tradičně se selektivní interakcí myslí rozpoznání specifické nukleotidové sekvence, v tomto případě se ale jedná o rozpoznání specifického strukturního motivu.

1.3.5.1. DNA výdutě

Nukleové kyseliny jsou schopné přijmout značné množství různých struktur lišících se od dvoušroubovice [22, 23]. Struktury složené z nespárovaných nukleotidů, jako jsou výdutě, jsou důležité pro regulaci biologických procesů. Výdutí se rozumí místo v DNA, kde jeden nebo více nukleotidů zůstane v rámci dvoušroubovice nespárovaných. (Obr. 10) Výdutě se mohou lišit velikostí od jednoho po řetězec několika nespárovaných nukleotidů, které tvoří flexibilní smyčku vytlačenou z dvoušroubovice DNA.



Obrázek 10: Schéma výdutě na DNA. A: Plně spárovaný duplex, B: Výdut' X_1 - B_n - X_2 , kde $B = A, T, G, C$ a n udává počet nespárovaných nukleotidů.

Tyto struktury mohou vzniknout díky replikačním a rekombinačním chybám či při opravě poškození DNA způsobené ionizujícím zářením nebo kancerogeny. Výdutě jsou často meziprodukty při replikaci DNA. Tyto struktury jsou cílem opravných enzymů při nedokonalé

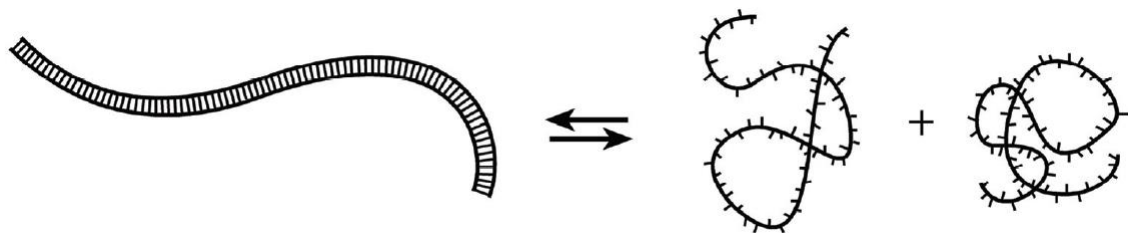
homologní rekombinaci a má se za to, že hrají důležitou roli u mnoha nemocí jako například rakovina, svalová dystrofie či Alzheimerova choroba [24, 25]. Mezi proteiny vykazující vysokou afinitu k výdutím patří nádorový supresorový protein p53 [26] a také proteiny MutS a RecA, které se podílí na opravě DNA [27, 28].

1.3.5.2. Třícestná rozhraní

Třícestná rozhraní jsou nejjednoduššími běžně se vyskytujícími rozvětvenými strukturami DNA [29]. Jsou složeny ze tří dvoušroubovicových ramen spojených tzv. spojovacím bodem. Spojovací bod tvoří kavita, v níž se mohou vyskytovat nespárované báze, příslušející třem řetězcům, ze kterých se třícestné rozhraní skládá. Rozhraní se klasifikují pomocí počtu nespárovaných nukleotidů. Třícestná rozhraní vyskytující se v RNA jako strukturní a funkční motivy hrají důležitou roli v buněčných procesech, zejména při translaci a sestřihu. V DNA vznikají při využití fágů při rekombinaci. Třícestné rozhraní se také vyskytují v geneticky nestabilních sekvencích spojených s onemocněními, jako je například Huntingtonova choroba. Díky jejich široké škále funkčních aktivit jsou třícestná rozhraní podrobena velice detailním strukturním studiím.

1.3.6. Energetika dvoušroubovice DNA

Studium energetiky a tání dvoušroubovice je jedním z hlavních témat zájmu biofyziků v posledních 60 letech [30]. Proces tání dvoušroubovice, nebo také denaturace, je hlavním zdrojem informace o energetice dvoušroubovice DNA. Denuraci lze chápat jako rovnovážný přechod rigidní dvoušroubovicové struktury na dvě flexibilní vlákna DNA (Obr. 11)



Obrázek 11: Schéma tání DNA (Převzato a upraveno z: [30])

Jedním ze základních parametrů dvoušroubovice DNA je takzvaná teplota tání [31]. Teplota tání je definována jako teplota, při které je 50 % molekul DNA ve vzorku denaturováno. Používá se zejména k popisu stability dvoušroubovice DNA. Stabilita dvoušroubovice DNA skládající se ze dvou kovalentních řetězců spojených Watson-Crickovými vodíkovými vazbami závisí na délce,

bázovému složení, sekvenci, pH, teplotě a iontové síle prostředí. Proces tání DNA je důležitý nejen pro popis vlastností, ale hraje důležitou roli v při replikaci a transkripci DNA.

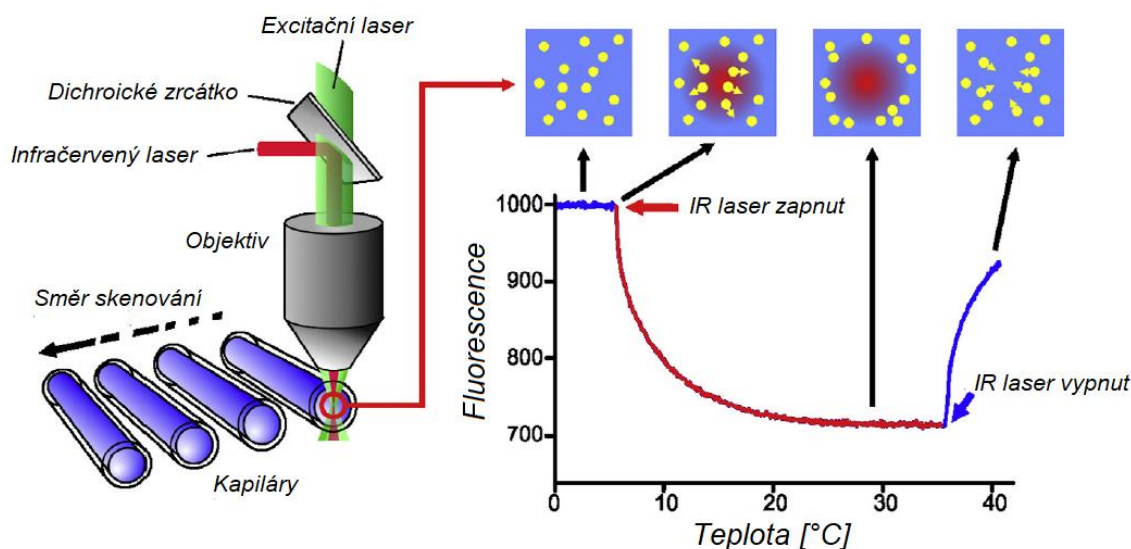
Termodynamickými parametry DNA se rozumí entalpie ΔH , entropie ΔS a Gibbsova energie ΔG . [32] Souvislost mezi těmito veličinami udává vztah 1.

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (1)$$

Termodynamická informace skrytá v křivkách tání napomáhá pochopení závislosti stability dvoušroubovice na sekundární a primární struktuře DNA [33].

Další přístup pro získání termodynamických parametrů DNA je jejich přímé měření. První metodika je kalorimetrické stanovení [34, 35]. Při kalorimetrickém měření se měří teplo, které bylo uvolněno či dodáno systému.

Nejnovější metodikou pro stanovení termodynamických parametrů je „Microscale“ termoforéza (MST) [36]. V této metodice je využito změny hybnosti molekuly v teplotním gradientu v závislosti na hmotnosti a solvatační obálce molekuly. Tento efekt se nazývá termodifuze nebo také Sorretův efekt [37]. Změna je pak měřena jako pokles fluorescence signální molekuly. Nesmírnou výhodou této metody je možnost práce v extrémně nízkých koncentracích a objemech, což je umožněno zejména použitím kapilár místo kyvet. Detailněji je princip znázorněn na obrázku 12.



Obrázek 12: Schéma Microscale thermoferézy. Schematicá reprezentace MST optiky. Typický signál experimentu MST. Zpočátku jsou molekuly homogenně distribuovány a je detekována konstantní „počáteční fluorescence“. V rámci první sekundy po aktivaci IR laseru je pozorován „T-Jump“, což odpovídá rychlé změně vlastností fluoroforu v důsledku rychlé změny teploty. Následně může být detekován termoforetický pohyb fluorescenčně značených molekul ze zahřátého objemu vzorku. Typicky je změna fluorescence měřena po dobu 30 s. Po deaktivaci IR-laseru dochází k inverznímu T-Jumpu a následnému „zpětnému rozptylu“ molekul, který je poháněn pouze hromadnou difúzí. (Převzato a upraveno z: [36])

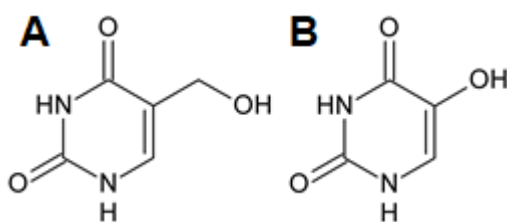
Výstupem termoforézy je vysoce přesné určení disociační konstanty k_d , kterou dává do souvislosti s termodynamickými veličinami vztah 2.

$$\Delta G = -RT \ln k_d \quad (2)$$

1.3.7. Oxidativní poškození DNA

Poškození způsobené oxidací bází při aerobní respiraci a oxidativním stresu se objevuje v široké paletě nemocí a v neposlední řadě má vliv na stárnutí. [38]. V buňkách je tento typ poškození způsoben reaktivními formami kyslíku (ROS).

Příkladem takového poškození jsou deriváty pyrimidinových bází 5-hydroxyuridin (HdU) a 5-methylhydroxyuridin (HMdU) (Obr.13) [39]. HdU vzniká zejména oxidativní deaminací cytozinu při vystavení reaktivním formám kyslíku.



Obrázek 13: A: HMdU a B: HdU (nakresleno v programu ChemSketch).

HMdU vzniká oxidací thyminu a také enzymatickou oxidací thyminu. Inkorporace HdU vede k přidání adeninu do komplementárního řetězce, což vyústí za záměnu G:C páru za pár A:T [40]. Inkorporace HdU je tedy považována za premutagenní. Při inkorporaci HMdU také preferenčně dochází přidání adeninu do komplementárního řetězce, ale nedochází k záměně páru. Tato inkorporace je tedy považována za nemutagenní.

Zajímavou vlastností HdU je, že nenarušuje strukturu dvoušroubovice DNA. DNA polymerázy rutinně obchází toto poškození a preferenčně inkorporují proti HdU adenin. Tato léze je při výskytu v DNA mutagenní, ale ne cytotoxická [41]. HdU je schopné formovat stabilní pár s A, G, C i T, což poukazuje na vysoký mutagenní potenciál [42].

Přítomnost HMdU nenarušuje sekundární strukturu DNA, ale zvyšuje flexibilitu a narušuje interakce DNA-protein [39]. V tomto případě formování mutagenní léze nesouvisí s inkorporací HMdU, ale s procesem odstranění z DNA pomocí reparačních enzymů a následných chybách v opravě. HMdU je jedním z epigenetických modifikací DNA, které byly v poslední době objeveny. Tento derivát pyrimidinu je v porovnání s HdU cytotoxický a má antivirální aktivitu [43, 44].

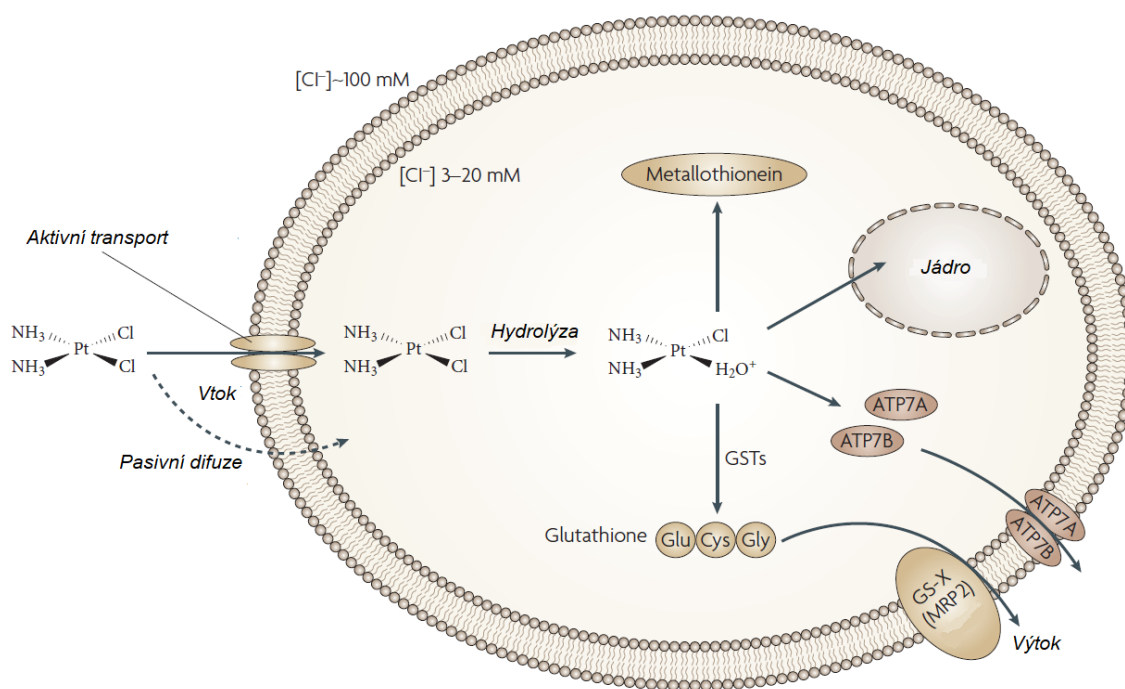
1.4. Mechanismus působení léčiv na bázi platiny

Od objevu protinádorového účinku cisplatiny bylo vynaloženo nemalé úsilí k objasnění jejího mechanismu působení [45]. Prvním problémem se ukázalo stanovení biologického cílového místa působení. Buňka obsahuje více komponent schopných reakce s cisplatinou, zejména nukleové kyseliny, proteiny, fosfolipidy a v neposlední řadě cytoskelet. Až pozdější experimenty určily DNA jako cílové místo působení cisplatiny a příbuzných protinádorově účinných farmak.

Mechanismus působení je již několik dekad předmětem intenzivního výzkumu [46]. Zjednodušené reakční schéma zahrnuje čtyři klíčové kroky: vstup do buňky, aktivace léčiva, vazba na DNA a buněčná reakce na poškození vedoucí k buněčné smrti.

Stabilita cisplatiny je v krevním řečišti zajištěna vysokou koncentrací chloridových aniontů [7, 47, 48]. Cisplatin vstupuje do buňky zejména pasivní difuzí, kdy vstup agens do buňky proporcčně roste s rostoucí koncentrací v médiu. Na další možnost vstupu do buňky poukázaly experimenty zabývající se inhibicí aktivního transportu buňky. Nejslibnějšími kandidáty na transportéry podílející se na vstupu cisplatin do buňky jsou transportéry mědi Ctr1 a Ctr2.

Po vstupu cisplatin do buňky dochází k její aktivaci. Aktivací je myšlena tzv. hydratace cisplatin, kdy jsou odstupující chloridové ligandy nahrazeny vodou v důsledku nižší koncentrace chloridových iontů (méně než 20 mM) v cytoplasmě. Schéma vstupu cisplatin do buňky a její aktivace je zobrazeno na obrázku 14.



Obrázek 14: Schéma působení cisplatiny. (Převzato a upraveno z: [7])

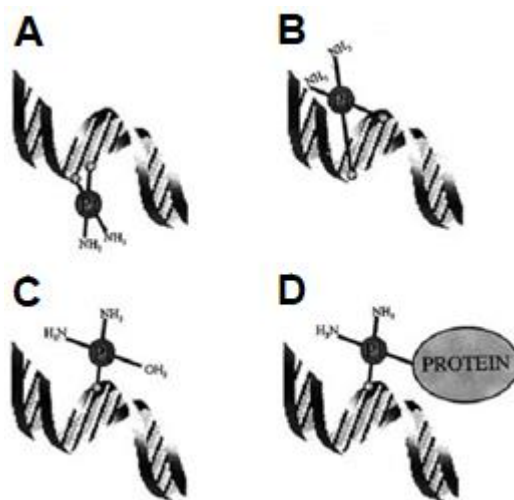
1.4.1. DNA jako cílové místo působení

Přestože cisplatin ochotně reaguje s rozličnými látkami v buňce, je její protinádorová aktivita spojená s vazbou na DNA [49, 50]. Nejvíce nukleofilními místy na DNA jsou atomy dusíku N7 na purinech. Cisplatin se na DNA váže ve dvou krocích. Jako první dochází k monofunkční vazbě hydratované cisplatin na dusík N7 guaninu. Ve druhém kroku se vytvoří druhá vazba mezi cisplatinou a dusíkem N7 sousedního guaninu nebo adeninu, čímž dojde ke vzniku tzv. příčné vazby.

Cisplatin navázaná na DNA tvoří 3 hlavní adukty (Obr. 15) [49]. Prvním a nejčastějším aduktem je 1,2-GG příčná vazba, jehož zastoupení je přibližně 60 – 65 %. Vnitrořetězcová příčná

vazba 1,2-GG způsobuje rozvinutí dvoušroubovice o 13° a dále ji ohýbá o 34° směrem do velkého žlábků [51]. Druhým typem aduktu je 1,2-AG příčná vazba, která se vyskytuje přibližně v 25 % případech. Vnitrořetězcová příčná vazba 1,2-AG deformuje dvoušroubovici DNA podobně jako 1,2-GG příčná vazba. DNA obsahující 1,2-GG nebo 1,2-AG vykazuje vlastnosti charakteristické pro A DNA. Posledním vnitrořetězcovým typem aduktu na DNA vyskytujícím se méně než v 10 % případech je 1,3-GXG příčná vazba, kde X reprezentuje thymin, cytosin a adenin. Příčná vnitrořetězcová vazba 1,3-GXG rozvíjí dvoušroubovici o 23° a ohýbá ji o 53° směrem do velkého žlábků.

Méně časté jsou monofunkční adukty a meziřetězcové příčné vazby. Meziřetězcové příčné vazby kovalentně spojí obě vlákna DNA a vzniká tak vysoce toxický adukt [52]. Toxicita tohoto aduktu spočívá v zamezení rozvolnění vláken DNA, což vede k blokaci replikace a transkripce DNA. Pokud nedojde k opravě tohoto poškození, může dojít k chromozomálním změnám, zlomům v DNA a k buněčné smrti. Vytvoření meziřetězcové vazby rozvíjí dvoušroubovici o $76^\circ - 86^\circ$ a ohýbá ji o $20^\circ - 40^\circ$ směrem do malého žlábků [53]. Monofunkční adukty jsou nejméně zastoupené, a také v tomto případě dochází k deformaci dvoušroubovice DNA. Deformace DNA je závislá na nukleotidové sekvenci v okolí vazby.

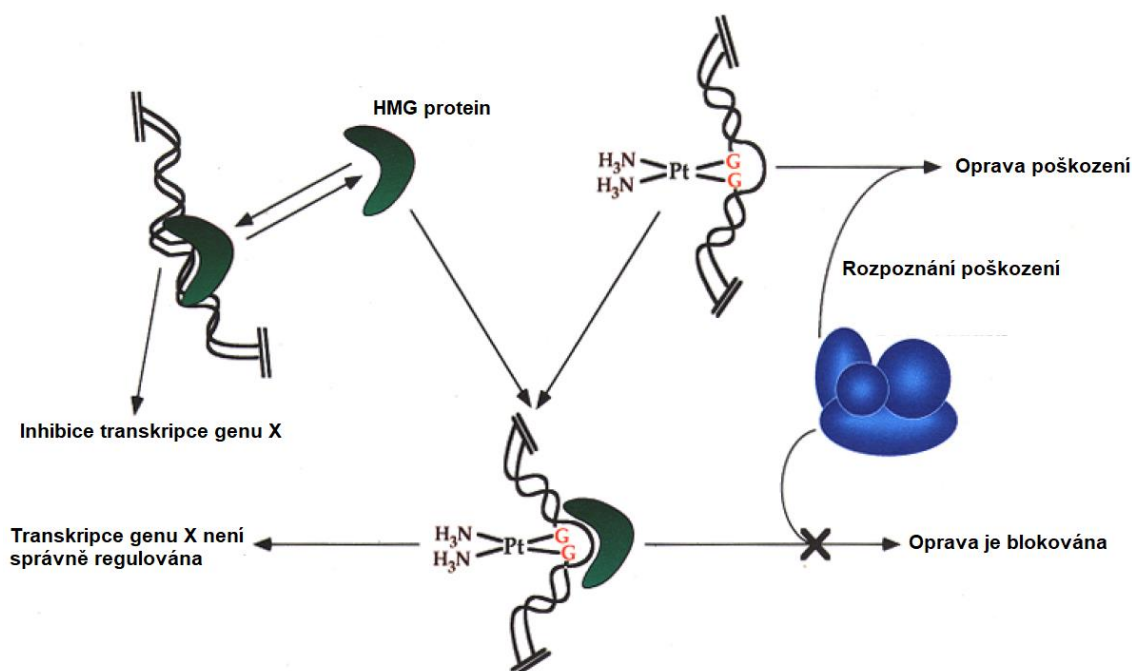


Obrázek 15: Adukty cisplatiny s DNA. A: vnitrořetězcová příčná vazba 1,2-GG, B: meziřetězcová příčná vazba, C: monofunkční adukt, D: Vazba DNA-Protein. (Převzato z: [54])

1.4.2. Buněčná odpověď na poškození DNA komplexů platiny

Po vazbě cytostatik na bázi platiny dojde k lokální změně sekundární struktury DNA [55]. V DNA dochází k ohybu, rozvíjení dvoušroubovice a zkrácení řetězce. Výše zmíněné změny ve struktuře DNA jsou natolik významné, že vedou k zastavení transkripce a replikace a v konečném důsledku k buněčné smrti.

Distorze v sekundární struktuře DNA jsou rozpoznávány buněčnými proteiny [7]. Některé z těchto proteinů se podílejí na opravě DNA. Jedná se například o proteiny p53 a ATR. Protein p53 je zodpovědný za spuštění procesu apoptózy v případě, že je DNA nenávratně poškozena [56]. Kináza ATR je jedním z hlavních regulátorů buněčné odpovědi na poškozenou DNA [57]. Dalšími proteiny, které rozpoznávají poškození DNA indukované cytostatiky na bázi platiny jsou proteiny z takzvané „High Mobility Group“ (HMG) [58]. HMG proteiny jsou důležitými proteiny pro funkci a strukturu chromatinu. Po navázání cisplatiny nebo příbuzného léčiva a vytvoření 1,2-GG nebo 1,2-AG příčné vazby dojde k rozpoznání strukturálního motivu (Obr.16). Následně dochází k navázání HMG proteinů na strukturální motiv vytvořený změnou sekundární struktury DNA. Z celé rodiny proteinů mají nejvyšší afinitu k těmto strukturálním motivům proteiny HMG1 a HMG2.



Obrázek 16: Schéma vazby HMG proteinů na poškozenou DNA (Převzato a upraveno z: [59, 60])

Pravděpodobným vysvětlením provázanosti HMG proteinů a citlivosti buňky k léčivu je specifická vazba na adukty léčiv na bázi platiny [54]. Dojde k takzvanému stínění aduktu, díky čemuž je chráněn před opravnými mechanismy buňky.

Další část metabolismu, který je ovlivněný tvorbou aduktů cisplatiny, jsou replikace a transkripce [61]. Tyto dva procesy jsou klíčové v životě rychle se množících nádorových buněk. Experimentálními daty bylo prokázáno, že ovlivnění transkripce a replikace hraje důležitou roli v protinádorové aktivitě cisplatiny.

Nejnovější studie taktéž ukázaly, že cisplatina v buňce indukuje reaktivní formy kyslíku. [62] V tomto případě nastává buněčná smrt současným spuštěním několika signálních drah reagujících na nárůst reaktivních forem kyslíku. Tyto dráhy jsou závislé na typu nádorové buňky. Vznik těchto forem kyslíku je závislý na koncentraci a době působení cisplatin v buňce.

1.4.3. Oprava poškozené DNA

Poškození způsobené komplexy platiny je opravováno tzv. nukleotidovou excisní opravou (NER) [63]. Jedná se o důležitý mechanismus pro odstranění poškození deformující dvoušroubovici DNA. Tento opravný mechanismus se skládá ze dvou dílčích mechanismů: globální opravy genomu (GGR) a opravy spojené s transkripcí (TCR) [64]. GGR rozpoznává a opravuje genom jako celek, TCR se specializuje na opravu transkribovaných genů. Poškození v DNA je rozpoznáno heterodimerem XPC-HR23B v případě GGR a blokací RNA polymerázy II v případě TCR. Další kroky jsou společné pro oba mechanismy. Následující krok obsahuje separaci vláken dvoušroubovice specifickými helikázami. Separaci následuje vyštěpení poškozeného místa na obou stranách nukleázami XPF/ERCC1. Po vyštěpení oligonukleotidu (cca 30 pb) je vzniklá mezera zaplněna DNA polymerázou ϵ za použití nepoškozeného řetězce jako předlohy.

Další metodou opravy je tzv. translézová syntéza (TLS) [64]. Poškození způsobené cisplatinou je objemné a může blokovat postupující replikaci DNA zablokováním DNA polymeráz. Stagnace může vyústit v tvorbu dvouřetězcových zlomů. Toto vážné poškození DNA může vést k hrubému přeskupení DNA nebo přímo k buněčné smrti. Aby se buňka vyhnula zablokování replikace, je schopna tolerovat poškození pomocí TLS. Při TLS jsou využívány specializované polymerázy z rodin Y a B. Samotnou toleranci poškození umožňuje rozměrné aktivní místo polymerázy, které dokáže pojmout lézi, a absence korekční schopnosti.

1.5. Vývoj nových léčiv na bázi kovů

Přestože cisplatina je jedním z nejúčinnějších léků, má její použití limitace. [62] Ačkoliv se cisplatina využívá k léčbě, je to stále jed. Pacienti, kterým je cisplatina podána, trpí vážnými vedlejšími účinky. Nejběžnějšími jsou snížená krevtvorba, nevolnost a zvracení. Mezi závažnější vedlejší účinky patří nefrotoxicita (poškození ledvin), neurotoxicita a v neposlední řadě poškození sluchu. Výše zmíněné toxické účinky cisplatin jsou závislé zejména na podané dávce. Pomocí správného dávkování a doplňkové léčby dochází ke zmírnění vedlejších účinků.

Další limitací cisplatin je buněčná rezistence [65]. Odolnost buňky vůči léčivu může být získána při chronickému vystavení nebo se může projevit jako vnitřní vlastnost buňky. Míru rezistence jedince k léčivu je velice těžké odhadnout.

Mechanismy rezistence jsou důsledkem změn uvnitř buňky, které se snaží zabránit cisplatině interagovat s DNA, spustit signální dráhy vedoucí k buněčné smrti nebo obě dvě zmíněné možnosti. Prvním mechanismem je snížená akumulace léčiva v buňce [66]. Předešlé studie ukazují pokles koncentrace cisplatinu přibližně o 20–70 % v závislosti na buněčné linii. Je nutné podotknout, že vzhledem ke komplexnosti mechanismu rezistence nelze předpokládat lineární závislost mezi poklesem koncentrace cisplatinu a mírou rezistence linie. Předpokládá se, že důvodem snížené akumulace je snížení absorpce léčiva, zvýšení vyloučení léčiva z buňky nebo obojí [67]. Snížení absorpce léčiva se považuje za převládající mechanismus, přesný proces ale stále zůstává nejasný.

Druhým mechanismem rezistence je inaktivace léčiva v buňce [Siddik 2003]. Aktivovaná forma cisplatinu v buňce reaguje nejen s DNA, ale i s proteiny obsahující nukleofilní SH skupinu. Při chronickém vystavení cisplatině narůstá koncentrace buněčných proteinů obsahujících SH skupinu. Výsledkem je redukce množství cisplatinu schopné reakce s DNA, což vyústí ve snížení aktivity léčiva.

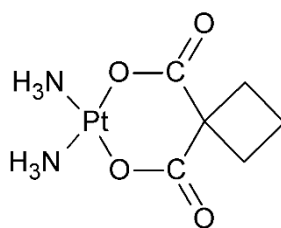
Třetím nejdůležitějším mechanismem rezistence je zvýšená míra opravy DNA [65, 68]. Tento mechanismus není univerzální pro všechny buněčné linie, a pokud je přítomen, tak dochází ke zvýšení rezistence 1,5-2krát. Toto mírné zvýšení je považováno za významné, protože inaktivita aduktů transplatinu je způsobena zejména díky jejich rychlé opravě.

Právě výše zmíněné nedostatky cisplatinu vedly k syntéze stovek nových komplexů v honbě za účinnějším cytostatikem se širším účinným spektrem nádorů a menšími vedlejšími účinky.

1.5.1. Protinádorově účinná analoga cisplatinu

Od představení cisplatinu jako velice účinného cytostatika bylo klinicky testováno více jak 23 analog [69]. Většina prvních pokusů byla neúspěšná z důvodu nedostatečné rozpustnosti, nízké aktivity nebo nepředpokládaných závažných vedlejších účinků. V klinické praxi je kromě cisplatinu používáno 5 jejích analog [70]. Celosvětově jsou používány karboplatina a oxaliplatina, zatímco lobaplatina, nedaplatina a heptaplatina jsou používány zejména v jihovýchodní Asii (Jižní Korea, Japonsko a Čína.) Tyto deriváty cisplatinu způsobují buněčnou smrt na základě podobného mechanismu jako cisplatin.

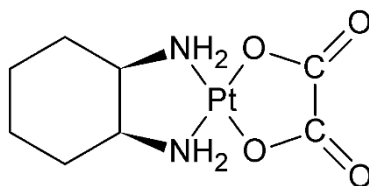
Karboplatina (Obr. 17) byla prvním komplexem vyvinutým ve snaze zmírnit vedlejší účinky způsobené léčbou [49, 71]. U tohoto analoga cisplatinu jsou odstupující ligandy nahrazeny stabilnějším cyklobutandikarboxilátem.



Obrázek 17: Karboplatina (nakresleno v programu Chems sketch)

Tato změna vyústila v menší toxicitu farmaka, což umožňuje podat při léčbě vyšší dávku. Další výhodou je menší reaktivita komplexu s glutationem [49]. Karboplatina tvoří podobné spektrum aduktů na DNA jako cisplatinu a je účinná ve stejném spektru nádorů. Díky své nižší toxicitě nahradila cisplatinu při léčbě některých nádorů. Karboplatina je sice méně toxická, ale nevýhody jako nitrožilní podávání a úzké spektrum senzitivity nádorů jsou stejné jako u cisplatinu.

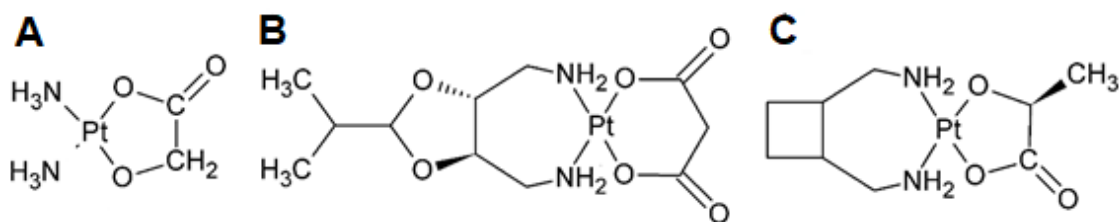
V případě oxaliplatinu (Obr. 18) došlo k nahrazení jak odstupujícího ligandu, tak ligandu neodstupujícího [70].



Obrázek 18: Oxaliplatina (nakresleno v programu Chems sketch)

V praxi se využívá zejména v kombinaci s 5-fluoruracilem při léčbě rakoviny tlustého střeva. Nespornou výhodou je menší závislost při vstupu do buňky na transportéru Crt1. Další vlastností je, že i přes nižší reaktivitu s DNA je oxaliplatina ve výsledku více cytotoxická než cisplatinu [7, 49]. Tato vlastnost souvisí s dynamikou vazby na DNA. Oxaliplatina je sice méně reaktivní než cisplatinu, ale vykazuje vyšší účinnost při stejném počtu aduktů na DNA. Vedlejší účinky oxaliplatinu jsou neurotoxicita a neuropatie, které se umocňují s rostoucí dávkou léčiva [59, 70, 71].

Nedaplatina, heptaplatina a lobaplatina (Obr. 19) jsou strukturně velice podobné karboplatině a oxaliplatině, tudíž můžeme předpokládat tvorbu podobného typu aduktů [70].



Obrázek 19. A: Nedaplatina, B: heptaplatina, C: lobaplatina (nakresleno v programu Chemsketch)

Publikovaná data u všech tří derivátů indikují vazbu na guaniny v DNA, ale pro vytvoření aduktu je potřeba vyššího času, než je tomu u cisplatiny. Nedaplatina je využívána zejména v Japonsku pro léčbu rakoviny varlat, vaječníků a krku [71]. V porovnání s cisplatinou a karboplatinou nevykazuje vyšší účinnost, ale je méně neurotoxická a méně poškozuje ledviny. Nevýhodou je potenciální způsobení trombocytopenie (snížení tvorby trombocytů v krvi). Heptaplatina je využívána zejména v Jižní Koreji za účelem léčby rakoviny trávicího traktu [71]. Dle nashromážděných dat by heptaplatina mohla mít vyšší cytostatickou aktivitu a zároveň nižší toxicitu než cisplatin. Bylo také zjištěno, že je méně nefrotoxická. Mezi vedlejší účinky patří zejména embryotoxicita, která byla zjištěna na pokusných myších. Lobaplatina je schválena pro léčbu rakoviny prsu, leukémie a rakoviny plic v Číně [71]. Dále se testuje v Evropské unii, USA, Austrálii a Brazílii jako farmakum pro léčbu zejména nádorů prsu, jícnu a vaječníků. Hlavní výhodou tohoto farmaka je fakt, že je účinné i na nádory rezistentní k cisplatině a karboplatině.

1.5.2. Polynukleární komplexy platiny

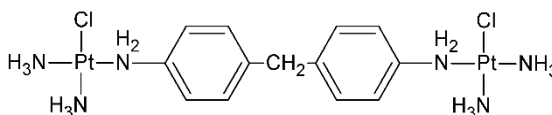
I přes pokroky v minimalizaci toxických vedlejších účinků a překonání resistance nádorových buněk zůstává spektrum citlivých nádorů pro všechna cytostatika odvozená od cisplatiny téměř neměnné [72]. Jedním z vysvětlení je fakt, že všechna analoga cisplatiny tvoří s DNA velice podobné adukty.

Důsledkem je snaha vyvinout komplexy s geometrií lišící se od „klasické“ geometrie cisplatiny. Polynukleární komplexy platiny jsou nová metalofarmaka, která jsou strukturně naprosto odlišná od cisplatiny a jejích analog [73, 74]. Tyto komplexy obsahují dvě nebo více reakčních center, která jsou spojena aromatickými nebo alifatickými řetězci a od cisplatiny se liší nejen svou geometrií, ale i mechanismem působení.

Mezi vlastnosti těchto komplexů patří vzdálené odstupující ligandy, dlouhé vnitřetězcové a meziřetězcové příčné vazby, které ovlivňují strukturu DNA. V neposlední řadě je nutno zmínit, že tato poškození jsou rozeznávána specifickými proteiny a jsou opravována

jinými mechanismy než adukty cisplatiny a jejích analog. Tyto nové komplexy tvoří kompletně nový směr uvažování při syntéze nových cytostatik a nabízejí vysoký potenciál při vývoji nových protinádorově účinných agens.

Mezi velice slibné zástupce patří komplex $\{[\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}]_2(4,4\text{-methylene-dianilin})\}^{2+}$ (Obr. 20)

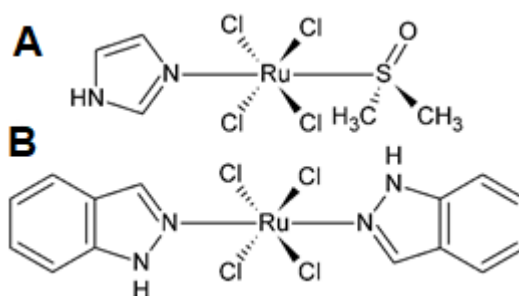


Obrázek 20: Komplex $\{[\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}]_2(4,4\text{-methylene-dianilin})\}^{2+}$ (nakresleno v programu Chems sketch)

Tento komplex je resistantní k deaktivaci nukleofilními látkami obsahujícími síru [73, 75]. Hodnoty IC₅₀ u buněk rakoviny vaječníku jsou porovnatelné s hodnotami cisplatiny. V případě buněk resistantních jsou hodnoty IC₅₀ podstatně nižší, než je tomu u cisplatiny. Mezi nejzajímavější aspekty tohoto komplexu patří rozdílné vlastnosti meziřetězcové příčné vazby v porovnání se stejným typem aduktu u cisplatiny. Tento komplex byl detailně studován v článku 3.

1.5.3. Komplexy dalších těžkých kovů

Další alternativou, jak pozměnit design komplexů, je nahrazení platiny jiným těžkým kovem [76, 77]. Prvním vhodným kandidátem je ruthenium, zejména díky stabilním a dobře predikovatelným strukturám, které lze získat uvážlivým výběrem ligandů. Dva komplexy ruthenia dosáhly klinických testů. Jedná se o NAMI-A a KP1019 (Obr. 21) [78].

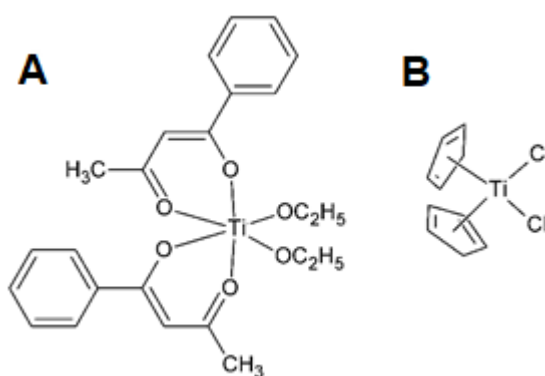


Obrázek 21: Komplexy A: NAMI-A a B: KP1019 (B) (nakresleno v programu Chems sketch)

Oba komplexy brání tvorbě metastáz a jsou účinné proti nádorům v pokročilém stádiu. Další vlastností je, že jsou relativně málo toxické. Předpokládá se, že tyto komplexy jsou inertní a

k aktivaci dochází až pomocí redukce v nádorových buňkách. Jak NAMI-A, tak KP1019 jsou schopny vazby na DNA, ale jejich mechanismus účinku se liší. NAMI-A ovlivňuje regulaci buněčného cyklu, zatímco KP1019 způsobuje přímou apoptózu pomocí formace reaktivních forem kyslíku.

Dalšími komplexy neobsahujícími platinu, které byly testovány v klinických testech jsou komplexy titanu [76, 77]. Jedná se o budotitan a titanocen dichlorid (Obr. 22).

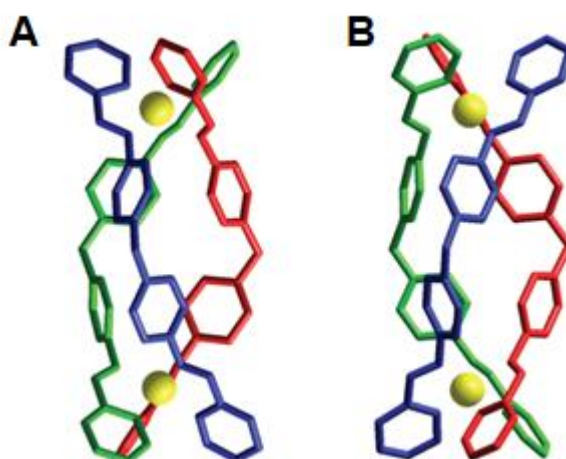


Obrázek 22: A: Budotitan a B: Titanocen (nakresleno v programu Chemscketch)

Titanocen byl testován ve fázi II klinického testování a byla zjištěna jeho akumulace v jádře buněk. Rozdílem od cisplatiny je extracelulární aktivace, která může vyústit ve vznik multijaderných komplexů při zachování aktivity. U komplexů titanu je také dokázána kovalentní vazba na DNA, ale o přesném mechanismu účinku toho není moc známo.

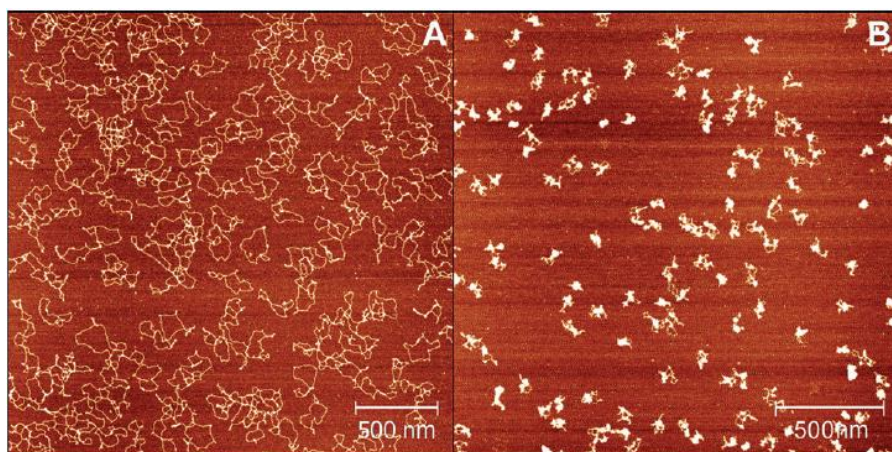
1.5.4. Helikáty

Další cestou je návrh nových struktur metalofarmak, které nejsou založeny na derivatizaci dosud využívaných cytostatik. Příkladem těchto nových struktur jsou takzvané "helikáty", závitnicové struktury obsahující různé atomy kovů navržené prof. Hannonem (University of Birmingham, UK). Helikáty jsou chirální struktury složené z 2 kovových atomů a 3 rigidních organických ligandů [76, 79]. Tyto helikátní struktury se vyskytují ve formě dvou optických enantiomerů, a to pravotočivého (P, Δ) a levotočivého (M, Λ) (Obr. 23).



Obrázek 23: 3D struktura helikátů. A: Levotočivý optický isomer . B: Pravotočivý optický isomer (Převzato a upraveno z: [80])

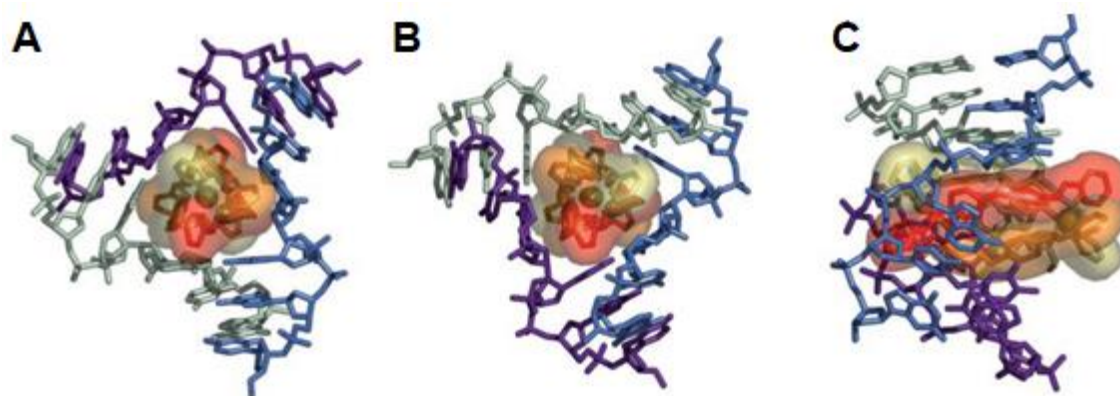
Helikáty byly navrženy k nekovalentní vazbě do velkého žlábků DNA. Navržené komplexy mají rozměry podobné motivům, u kterých je známa vazba do velkého žlábků DNA (alfa šroubovice v proteinech a tzv. zinkový prst). Je důležité zmínit, že pro vazbu do malého žlábků jsou helikáty příliš velké. Svou vazbou ovlivňují sekundární strukturu DNA [78]. Při vazbě na DNA dochází v případě obou enantiomerů k ohybu a rozvíjení DNA. Helikáty ohýbají DNA o přibližně 45° . Dále M enantiomer rozvíjí o 32° a P enantiomer o 22° . Pokud srovnáme míru rozvíjení dvoušroubovice způsobenou helikáty s dalšími neinterkalujícími látkami, zjistíme, že helikáty rozvíjí velice účinně. Zajímavou vlastností helikátů se ukázala jejich schopnost velice účinně kondenzovat DNA [79]. Tato schopnost je způsobená vysokým kladným nábojem helikátů ($4+$). Bylo prokázáno, že M enantiomer má schopnost kondenzovat jednotlivé molekuly DNA (Obr. 24).



Obrázek 24: Kondenzace jednotlivých molekul DNA enantiomerem M. A: plazmid pSP73 v přítomnosti 0,625 μM enantiomeru M, B: plazmid pSP73 v přítomnosti 1,25 μM enantiomeru M (převzato a upraveno z: [79])

Přestože je náboj shodný se sperminem, který se používá ke kondenzaci DNA, je aktivita M enantiomeru podstatně vyšší. Dále je zajímavé, že na rozdíl od konvenčních kondenzačních látek tento komplex nevyvolává mezimolekulovou agregaci.

Velkým překvapením bylo objevení druhého vazebného módu [76, 80, 81]. Helikáty se neváží jen do dvoušroubovice DNA, ale překvapivě se váží i do neobvyklých struktur DNA, jako jsou trojcestné rozhraní, výdutě a kvadruplexy. Vazbou do neobvyklé struktury nedošlo u helikátu k výrazné změně struktury a dokonale do ní zapadl. (Obr. 25)



Obrázek 25: Vazba helikátu do třícestného rozhraní. A: Pohled ze strany velkého žlábků, B: pohled ze strany malého žlábků, C: postranní pohled. (Převzato a upraveno z: [82])

Helikáty kromě interakce s DNA inhibují důležité buněčné enzymy [79]. V případě RNA polymerázy jsou koncentrace M a P enantiomerů nutné k zastavení transkripce přibližně 233krát

a 117krát menší, než je tomu u sperminu. Předpokládá se, že alespoň částečně se na tomto jevu podílí schopnost helikátu kondenzovat DNA.

Helikáty inhibují činnost topoisomerázy I při koncentracích pro M 500krát a pro P 250krát nižší, než je tomu u sperminu. Tyto nízké koncentrace jsou velice blízké koncentracím inhibitorů topoisomerázy I používaných při léčbě rakoviny. Při takto nízkých koncentracích nejsou helikáty schopny kondenzovat DNA, tudíž efekt inhibice topoisomerázy nemůže být vysvětlen kondenzací DNA.

2. Cíle práce

Disertační práce se skládá z několika částí. První část se zabývá novými helikátními strukturami, tzv. flexikátů, a jejich interakcí jak s DNA, tak s buněčnými proteiny. Druhá část se zabývá vazbou komplexu $\{[cis-Pt(NH_3)_2Cl]_2(4,4'-methylendianilin)\}^{2+}$ na DNA. Poslední část práce se zabývá vlivem mutace v sekvenci DNA na termodynamické parametry dvoušroubovice DNA.

Cílem disertační práce je popsání vazby nových metalofarmak na DNA. Využití získaných poznatků povede k dokonalejšímu popisu mechanismu vazby a mechanismu působení těchto farmak. Studie provedené v této práci přispěly k řešení projektů zaměřených na problematiku nových metalofarmak a na problematiku molekulární farmakologie při terapii nádorových onemocnění.

3. Materiál a metody

Všechny použité chemikálie byly p.a. čistoty.

Ve všech experimentech byla použita Mili-Q voda.

3.1.1. Chemikálie

3.1.1.1. Použité komplexy

Metalohelikáty (flexikáty) – poskytnuty prof. P. Scottem, University of Warwick, UK [83]

{[*cis*-Pt(NH₃)₂Cl]₂(4,4'-methylendianilin)}²⁺ – poskytnut prof. Z. Guem, Nanjing University [84]

3.1.1.2. Použitá DNA a oligonukleotidy

DNA z telecího thymu (ctDNA) – od firmy Sigma (Praha, Česká republika)

Plazmid pSP73KB (2455 pb) – byl izolován dle standardní procedury

Plazmid pBR322 (4361) – od firmy New England Biolabs (Beverly, MA, USA)

Syntetické deoxyribonukleotidy (Publikace 4) – od firmy VBC Genomics (Videň, Rakousko)

Syntetické deoxyribonukleotidy (Publikace 2) – od firmy Eurofinc Genomics (Ebersberg, Německo)

Syntetické deoxyribonukleotidy obsahující (HdU) nebo (HMdU) (Publikace 2) – od firmy TriLink biotechnologies (San Diego, CA, USA)

3.1.1.3. Použité enzymy

Escherichia coli RNA polymeráza a příslušný pufr – od firmy New England Biolabs (Beverly, MA, USA)

*Eco*RI restriční endonukleáza a příslušný pufr – od firmy New England Biolabs (Beverly, MA, USA)

DNA topoisomeráza I – od firmy Takara Bio Inc. (Otsu, Shiga, Japonsko)

3.1.1.4. Použité chemikálie

Agaróza – od firmy Serva elektroforesis (Heidelberg, Německo)

ATP, CTP, GTP, TTP – od firmy New England Biolabs (Beverly, MA, USA)

Ethidium bromid – od firmy Serva elektroforesis (Heidelberg, Německo)

HEPES – od firmy Sigma (Praha, Česká republika)

UTP- γ -AmNS – od firmy Jena Bioscience (Jena, Německo)

3.1.2. *Metody*

3.1.2.1. *Teplotní stabilita DNA*

Změna stability ctDNA v přítomnosti zkoumaných komplexů byla měřena jako změna absorbance při 260 nm (1 nm bandwidth, average time 10 s, heating rate: 0,4 °C min⁻¹) v závislosti na teplotě. Měření probíhalo v šesti 1cm kyvetách o maximálním objemu 1,2 ml. Reakční pufr obsahoval Tris (10 mM, pH 7,4). Měření proběhlo ve spektrofotometru 4000 UV/vis od firmy Varian Cary za použití Peltierova držáku na 6 kyvet. Hodnoty teploty tání (T_m) byly spočteny v ovládacím softwaru jako první derivace získaných křivek.

3.1.2.2. *Vytěšňování Ethidium bromidu*

Vzorek obsahující $3,9 \times 10^{-6}$ M ctDNA a $1,3 \times 10^{-6}$ M ethidium bromid (EtBr) byl připraven v 1 cm kyvetě v celkovém objemu 2,5 ml. Reakční pufr obsahoval Tris (10 mM, pH 7,4). Malé množství komplexu byly připipetovány do roztoku na požadovanou koncentraci a vzorek byl promíchán pipetou. Vzorek byl inkubován 3 min při pokojové teplotě. Fluorescence byla měřena pomocí spektrofluorimetru Varian Cary Eclipse. Excitační a emisní vlnové délky byly nastaveny na 546 a 595 nm, štěrby (slits) byly nastaveny na 10 nm a average time byl nastaven na 3 s.

3.1.2.3. *Statický rozptyl světla*

Vzorek obsahující $1,5 \times 10^{-6}$ M ctDNA byl připraven v 1 cm kyvetě v celkovém objemu 2,5 ml. Jako pufr byl použit kakodylát sodný (10 mM, pH 7). Malé množství komplexu byla připipetována do roztoku na požadovanou koncentraci a promíchána pipetou. Vzorek byl inkubován 3 min při pokojové teplotě. Rozptyl byl měřen pomocí spektrofluorimetru Varian Cary Eclipse. Excitační a emisní vlnové délky byly nastaveny na 305 a 305 nm, štěrby (slits) byly nastaveny na 5 nm a average time byl nastaven na 3s.

3.1.2.4. *Lineární dichroismus*

Vzorek obsahující 2×10^{-4} M ctDNA byl připraven v celkovém objemu 1,2 ml. Jako pufr byl použit Tris (10 mM, pH 7,4). Malé množství komplexu byly připipetovány do roztoku na požadovanou koncentraci a promíchány pipetou. LD signál byl měřen spektropolarimetrem J-715 (rozsah: 750 – 220 nm, rychlost 500 nm/min, štěrby: 2 nm, krok: 0,5 nm, accumulation: 2, average time: 0,25 s).

3.1.2.5. *Cirkulární dichroismus*

Vzorek obsahující 2×10^{-3} M oligonukleotid s připraveným aduktem byl připraven v celkovém objemu 600 μ l. Reakční pufr obsahoval Tris (10 mM, pH 7,4), NaCl (0,1 M) a EDTA (0,1 mM). CD signál byl měřen při 25 °C spektropolarimetrem J-715 (rozsah: 220 – 320 nm, krok: 1 nm, average time: 5 s).

3.1.2.6. *Mikroskopie atomárních sil (AFM)*

Roztok obsahující $6,25 \times 10^{-6}$ M lineární plazmidovou DNA pSP73KB by smíchán s komplexy na požadovanou koncentraci v celkovém objemu 10 μ l. Reakční pufr obsahoval MgCl₂ (4 mM), KCl (4 mM), HEPES (3,2 mM, pH 7,4). Směs byla inkubována 4 min při pokojové teplotě. Kapka (4 μ l) vzorku byla nanášena na čerstvě odštěpenou slídovou destičku a inkubována 2 min. Destička byla opatrně opláchnuta 1 ml MiliQ vody a okamžitě osušena stlačeným vzduchem. Snímání bylo provedeno na MultiMode 8 mikroskopu atomárních sil.

3.1.2.7. *Inhibice transkripce DNA*

Plazmid pBR322 o koncentraci 3×10^{-5} M (0,96 μ g/ μ l) byl použit jako templát. Uridin-5'-trifosfát- γ -(sulfo-1-naphthyl)amid (UTP- γ -AmNS) byl použit ke sledování transkripce. Transkripce byla provedena v Tris (10 mM, pH 7,6), ATP (0,1 mM), CTP (0,1 mM), GTP (0,1 mM), UTP-gamma-AmNS (0,01 mM), KCl (100 mM), MgCl₂ (5 mM), DTT (2mM) a různé koncentrace komplexů v reakčním objemu 28 μ l. Po 10 min preinkubaci bylo přidáno 0,5 jednotky *E. Coli* RNA polymerázy a transkripce provedena při 37°C po dobu 2 h. Reakce byla zastavena přidáním 42 μ l 40 mM EDTA. Fluorescence byla měřena pomocí spektrofluorimetru Varian Cary Eclipse. Excitační a emisní vlnové délky byly nastaveny na 330 a 463 nm, štěrbin (slits) byly nastaveny na 10 nm a average time byl nastaven na 3s.

3.1.2.8. *Inhibice EcoRI*

Roztok obsahující $1,56 \times 10^{-4}$ M plazmidovou DNA pSP73KB byl smíchán s komplexy na požadovanou koncentraci v celkovém objemu 10 μ l. Reakční pufr obsahoval Tris (10 mM, pH 7,9), MgCl₂ (10 mM), NaCl (50 mM) a DTT (1 mM). Po 10 min inkubaci při 37°C byla přidána 1 jednotka EcoRI. Vzorky byly inkubovány 1 h při 37°C. Reakce byla zastavena přidáním 0,5 μ l 0,5 % SDS. Vzorky byly analyzovány elektroforézou v nativním agarózovém gelu (1%) v 1x TAE pufru. Gely byly obarveny ethidium bromidem a zobrazeny za použití Carestream GelLogic system.

3.1.2.9. *Inhibice Topoisomerázy I*

Roztok obsahující $1,56 \times 10^{-4}$ M plazmidovou DNA pSP73KB byl smíchán s komplexy na požadovanou koncentraci v celkovém 10 μ l. Reakční podmínky byly použity Tris (35 mM, pH 8), KCl (72 mM), $MgCl_2$ (5 mM) a DTT (5 mM). Po 10 min inkubaci při 37°C byla přidána 1 jednotka topoisomerázy I. Po 1 h inkubaci při 37°C byla reakce zastavena přidáním 0,5 μ l 0,5 % SDS. Vzorky byly analyzovány elektroforézou v nativním agarózovém gelu (1%) v 1x TAE pufru – Tris (40 mM, kys. Octová (20 mM), EDTA (1 mM). Gely byly obarveny ethidium bromidem a zobrazeny za použití Carestream GelLogic system.

3.1.2.10. *Purifikace oligonukleotidů*

Oligonukleotidy obsahující sekvenčně specifickou mutaci thyminu za HdU nebo HMdU byly přečištěny iontově-výměnnou HPLC, jak bylo popsáno v předchozí práci [85]. Koncentrace byla stanovena měřením optické hustoty. Extinční koeficienty byly generovány pomocí IDT OligoAnalyzer [<https://www.eu.idtdna.com/calc/analyzer>] na základě jejich sekvence.

3.1.2.11. *Microscale Termoforéza (MSD)*

Primer značený Cy5 na 5' konci o koncentraci 2 nM byl smíchán se zkoumaným řetězcem v rozsahu koncentrací 0.03 – 10 nM) Reakční podmínky byly použity fosfátový pufr (10 mM, pH 7), NaCl (150 mM), Tween 20 (0.05%). Reakční směsi byly přeneseny do klasických kapilár. Vazebné křivky byly měřeny v teplotním rozsahu 295 – 308 K s krokem 1-5 K. Měření pro každou teplotu bylo spuštěno po 180 s dlouhé inkubaci. Měření probíhalo za použití přístroje NanoTemper technologies Monolith NT115^{Pico}. MST power bylo nastaveno na medium (40 %), LED power bylo nastaveno na 5 – 20 %. Konstanty K_d byly pro každou teplotu vypočteny fitováním termoforetické křivky a vyneseny jako $\ln(1/K_d)$ proti $1/T$ (K) do van't Hoffova grafu. Entalpie ΔH byla vypočtena z lineárního fitu jako sklon $m = -H^\circ/R$. Za předpokladu, že ΔH je v malém lineárním rozsahu van't Hoffova grafu konstantní, může být ΔS přímo stanovena jako $y^\circ = S^\circ/R$, kde R je universální plynová konstanta [36].

4. Výsledky a diskuze

Experimentální část předkládané disertační práce je založená na 4 člancích publikovaných v mezinárodních žurnálech. Výsledky jsou pak rozděleny do několika kategorií dle problematiky příslušných článků. Kopie publikací jsou součástí příloh práce.

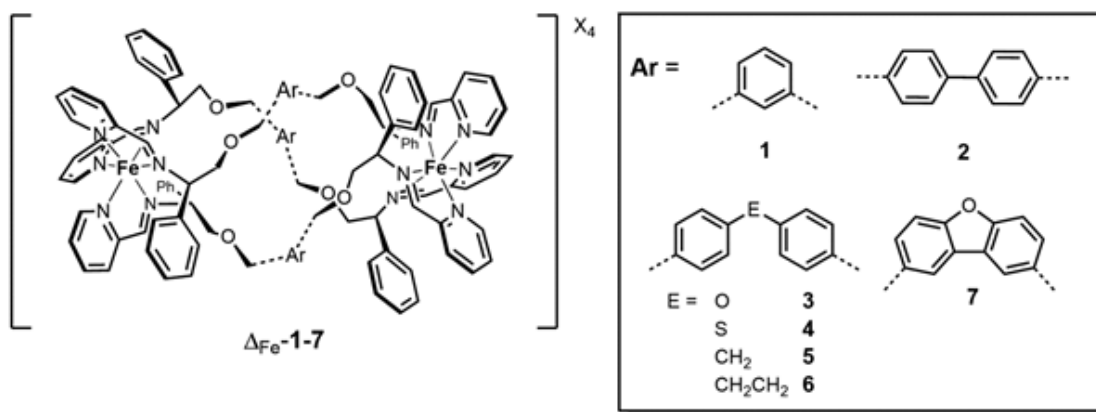
První část práce se zabývá vlastnostmi nových metalohelikátních struktur, tzv. flexikátů. Objektem zájmu je celkové chování těchto struktur v buňce a základní popis jejich interakce s DNA a buněčnými proteiny.

Druhá část je zaměřena na popis interakce dinukleárního komplexu platiny s DNA, která je biologickým cílem dané látky. Cílem práce byl zejména popis vazby tohoto komplexu na DNA.

V poslední části textu práce je shrnutý vliv mutace v primární struktuře DNA na termodynamické parametry dvoušroubovice. Jedná se o přirozeně se vyskytující mutace způsobené oxidativním stresem, kdy thymin mutuje na 5-hydroxyuridin nebo 5-hydroxymethyluridin.

4.1. Optically pure metallogelicates that accumulate in cell nuclei, condense/aggregate DNA and inhibit activities of DNA processing enzymes. (Publikace 1)

Tato práce navazuje na práci našeho zahraničního partnera prof. Scotta. Zatímco předešlá práce [83] byla zaměřena zejména na syntézu metalohelikátů a jejich interakci s mikrobiálními patogeny, tato práce je zaměřena na interakci daných helikátů s DNA, která je potenciálním farmakologickým cílovým místem této skupiny látek. Na základě předchozích pozorování byla tato práce zaměřena zejména na schopnost kladně nabitých helikátů kondenzovat/agregovat DNA [79]. Znalost mechanismu kondenzace DNA je nepostradatelná pro pochopení její role v regulaci genové exprese u živých organismů. Dále komplexy vážící se na DNA ovlivňují aktivitu důležitých enzymatických procesů, které probíhají přímo na DNA. Proto byl v rámci této práce studován vliv metalohelikátů (Obr. 25) na transkripční aktivitu RNA polymerázy II a aktivitu dalších enzymů pracujících s DNA.



Obrázek 25: Schéma metalohelikátů a struktury ligandů **1**–**7**. (Značení helikátů převzato z: [86])

Výsledky předešlé práce prokázaly, že studované helikáty jsou schopny vstoupit do bakteriálních buněk. V této práci je studován vliv helikátů na buňky eukaryotní. Jako model byly použity buňky rakoviny tlustého střeva HCT116p53^{+/+}. Koncentrace iontů železa v buňce byly stanoveny metodou hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) po vystavení buňky oběma enantiomerům helikátů **1** a **5** o koncentraci 10 μM po dobu 6 hodin. Koncentrace 10 μM byla zvolena jako kompromis mezi vysokou toxicitou helikátů a detekčními limity metody ICP-MS. Výsledky naznačují, že geometrie spojovacího ligandu ovlivňuje vstup helikátu do buňky, zatímco enantiomerní vinutí helikátu nikoliv.

Dále byla zkoumána akumulace helikátů v přečištěných a lyzovaných jádrech HCT116p53^{+/+}. Výsledky ukázaly, že 42 – 84 % helikátů Λ -**1**, Δ -**1**, Λ -**5** a Δ -**5** je akumulováno v jádře a může tedy interagovat s jadernou DNA. Byla pozorována vyšší akumulace enantiomerů helikátu **5** v porovnání s enantiomery helikátu **1**. Dalším rozdílem je různá akumulace jednotlivých enantiomerů. Enantiomeru Δ příslušného helikátu bylo v jádře nalezeno přibližně o 10 % více než enantiomeru Λ .

Vzhledem k důležitosti interakce helikátů s DNA a kvůli k jejich mechanismu působení byla studována náchylnost buněk HCT116p53^{+/+} k poškození jejich DNA helikáty. Pro studium poškození byl použit tzv kometový test (Comet assay). V alkalické verzi tohoto testu byla po vystavení buněk HCT116p53^{+/+} helikátům Λ -**1**, Δ -**1**, Λ -**5** a Δ -**5** zjištěna absence jak jednořetězcových, tak dvouřetězcových zlomů. Helikáty také neprojevily schopnost omezení tvorby „ohonu“ u buněk vystavených peroxidu vodíku, což naznačuje neschopnost helikátů tvořit nezvratné adukty na DNA.

Předešlé práce identifikovaly helikáty jako látky vážící se na DNA, aniž by způsobily její poškození. K dalšímu prozkoumání vazebných vlastností metalohelikátů na DNA byla

studována jejich přímá reakce s ctDNA. Vazebná afinita helikátů **1 – 7** byla stanovena metodou vytěšňování ethidium bromidu. Všechny zkoumané helikáty prokázaly vysokou afinitu k ctDNA.

Investigace spekter lineárního dichroismu ctDNA v přítomnosti helikátů odhalila, že oba enantiomery helikátu **1** se na DNA váží ve specifické orientaci pravděpodobně do velkého žlábků. Vazba helikátů **2 – 7** se zdá být náhodná na základě interakce mezi kladně nabitým helikátem a záporně nabitými fosfátovými skupinami v DNA. Redukce signálu DNA při 260 nm při narůstající koncentraci helikátů naznačuje zvýšení flexibility DNA ve vzorku nebo její zkrácení vlivem jejího svinutí či monomolekulární kondenzací/multimolekulární agregací.

Experimenty zabývající se agregací/kondenzací DNA prokázaly, že helikáty **2 – 7** jsou při nízkých koncentracích schopny kondenzovat DNA, což je pravděpodobně způsobeno elektrostatickou vazbou kladně nabitých helikátů na záporně nabitou kostru DNA. V porovnání je helikát **1** výrazně slabší kondenzační/agregační agens. Toto tvrzení bylo ještě podpořeno zobrazením linearizovaného plazmidu v přítomnosti helikátů pomocí mikroskopie atomárních sil. Tato skutečnost je v souladu s hypotézou, že se helikát **1** preferenčně váže do velkého žlábků DNA, čímž je výrazně snížena jeho schopnost vyvolat multimolekulární agregaci/kondenzaci DNA. Místo toho je posílena schopnost helikátu **1** kondenzovat jednotlivé molekuly DNA. Tato schopnost byla již dříve pozorována u helikátů $[\text{Fe}_2(\text{L})_3]\text{C}_{14}$ ($\text{L} = \text{C}_{25}\text{H}_{20}\text{N}_4$) [87]. Výsledky ukazují, že agregační/kondenzační vlastnosti těchto helikátů nejsou řízeny pouze vysokým elektrostatickým nábojem, ale spíše velikostí a tvarem každého helikátu, který ovlivňuje vazebnou orientaci a místo vazby na DNA.

Látky schopné kondenzovat DNA jsou často používány k narušení kritických enzymatických pochodů týkajících se DNA. Enzymatické studie ukázaly, že aktivita enzymů pracujících s DNA je značně snížena. Pro studii byla použita RNA polymeráza, topoisomeráza I a restriční enzym EcoRI. Aktivity těchto enzymů byly sníženy helikáty **2 – 7** podstatně více než helikátem **1**. Tato skutečnost je ve shodě s pozorováním schopnosti helikátů **2 – 7** výrazně měnit strukturu DNA do té míry, až přestane být substrátem pro zmíněné enzymy.

4.2. Translesion DNA synthesis across lesions induced by oxidative products of pyrimidines. An insight into the mechanism by microscale thermophoresis. (Publikace 2)

Tato práce byla zaměřena na studium simulované translézové syntézy přes poškození tvořené HdU nebo HMdU metodou microscale termoforézy (MST). Termodynamické změny spojené s replikací přes léze tvořené HdU nebo HMdU ukazují, že HdU spárované

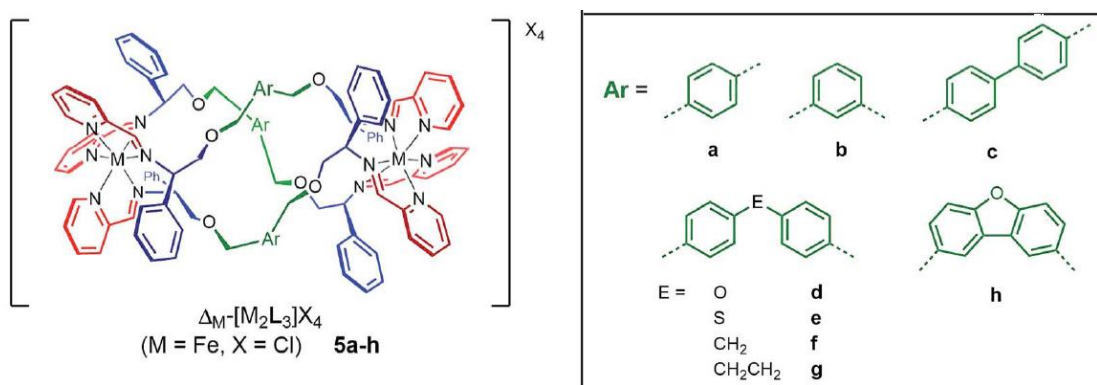
nekomplementárními bázemi narušuje dvoušroubovici DNA podstatně méně než dT nebo HMdU. Dále bylo ukázáno, že translázová syntéza přes lézi HdU byla méně extenzivní a potenciálně více mutagenní než u léze HMdU. Tato sledovaná zvýšená misinkorporace polymeráz Pol η , KF^- , and HIV-1 RT přes lézi HdU je v souladu s rozdílným stabilizačním efektem HdU a HMdU.

Hodnoty K_d při inkorporaci dAMP oproti HdU byly nižší než při inkorporaci dGMP, dCMP a dTMP. Toto zjištění je v souladu s ostatními výsledky ukazujícími, že adenin je v DNA preferenčně inkorporován proti lézi HdU. Výsledky jak MST, tak *in vitro* translázové syntézy naznačují, že léze HdU v DNA může způsobit záměnu cytozinu za thymin.

Hodnoty K_d při inkorporaci dAMP oproti HMdU byly nižší než při inkorporaci dGMP, dCMP a dTMP. Dále výsledky ukazují, že DNA polymerázy jsou schopny hladce obejít poškození tvořené HMdU. Výše zmíněné naznačuje, že toto poškození je méně mutagenní a méně ovlivňuje replikaci DNA, což je konzistentní s rolí HMdU jako epigenetické značky v DNA. Celkově výsledky této studie potvrdily předešlé výsledky ukazující vysokou mutagenitu lézi HdU a méně mutagenní vlastnosti léze HMdU.

4.3. Metallohelicates that kill Gram-negative pathogens using intracellular antimicrobial peptide pathways. (Publikace 3)

Tato práce byla zaměřena na sérii nových ve vodě rozpustných metalohelikátů (Obr. 26). Tyto metalohelikáty vznikají samosestavením z jednoduchých nepeptidových komponent okolo dvou iontů železa. Tyto helikáty se vyskytují jako dva optické enantiomery Λ a Δ .



Obrázek 26: Schéma metalohelikátů a struktury ligandů a – h. (Značení helikátů převzato z: [83])

Mezi vlastnosti těchto komplexů patří optická čistota, velmi dobrá rozpustnost ve vodě, možnost syntézy pomocí samosestavení v multigramovém měřítku a velice podobné strukturální vlastnosti jako mají kationní antimikrobiální peptidy (CAMPs). Tato série **5b – h** navazuje na metalohelikát **5a** [88], který jako jediný z předešlé série vykazoval antimikrobiální aktivitu. Pro zjištění antimikrobiální aktivity byla použita standartní procedura stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC). Zatímco proti gram-pozitivním mikrobům vykazovala většina komplexů relativně vysokou aktivitu, *E. coli* a *S. aureus* se ukázaly jako výzva. Obecně všechny enantiomery Λ vykazovaly vyšší účinnost než jejich Δ protějšky, přestože zejména u *E. coli* byly rozdíly v účinnosti malé. Komplex Λ -**5b** vykazoval nejvyšší aktivitu, kdy byl smrtící efekt dané látky u *E. coli* pozorován již po 20 – 40 minutách. Zajímavý je také fakt, že buňky *E. coli* ve stacionární fázi jsou na působení komplexu méně náchylné než aktivně rostoucí buňky. Podobné vlastnosti jsou pozorovány u zavedených antibiotik.

Nejvyšší selektivitu a aktivitu vůči *E. coli* vykazoval již zmíněný nejkratší helikát (12.4 Å) Λ -**5b**. Izomerní protějšek Δ -**5b** dosahoval mírně nižších hodnot. Rozdílné helikáty s delšími spojovacími ligandy, zejména pokud obsahovaly etherovou skupinu, jsou více selektivní pro *S. aureus*. V tomto případě měly vysokou aktivitu a selektivitu oba enantiomery **5h** i enantiomer Λ -**5d**.

Na základě těchto výsledků byla testována účinnost enantiomerů **5b** vůči širšímu spektru gram-negativních patogenů. Součástí tohoto screeningu byly klinicky izolované kmeny *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* a *Enterobacter cloacae*. Komplex Λ -**5b** prokázal velice slibnou aktivitu vůči patogenům, zejména vůči kmenům *E. coli*. Jako velice zajímavý se ukázal rozdíl v citlivosti mezi dvěma testovanými izoláty *K. pneumoniae*. Na základě celkového screeningu byl Λ -**5b** vybrán pro podrobnější studium účinku.

Rezistentní kmeny vznikají, pokud se v populaci vyskytnou mutantní buňky, které jsou farmakem méně ovlivněné. Notoricky známý gram-negativní patogen EEHC O157:H7 Sakai byl vystaven účinným koncentracím Λ -**5b** v takzvaných selekčních experimentech. Cílem těchto experimentů bylo stanovit, zda je možné izolovat mutanty, kteří se spontánně stali rezistentními. Mutantní kmeny byly rozděleny do 4 podtypů na základě rozdílů vůči kmenu, který mutace neobsahuje. Mezi rozdíly patří defekty v genech zapojených do údržby a modifikace vnější buněčné membrány.

Dva ze čtyř podtypů získaly mutace spojené s enzymy, které ovlivňují biofyzikální vlastnosti liposacharidů ve vnější membráně bakteriálních buněk, a tím vytvoří toleranci či odolnost vůči antimikrobiálnímu účinku metalohelikátu.

Třetí podtyp ztratil schopnost produkce přenašeče vitamínu B12 kódovaného genem *btuB*. Všechny kmeny získaly mutaci, která vedla k předčasnému zastavení translace pro tento gen, což vyústí ve zkrácení BtuB proteinu a jeho nefunkčnost. Předpokládáme, že tento přenašeč přispívá ke vstupu Λ -**5b** do periplasmu. Přestože tato mutace vede ke snížení vstupu

metalohelikátu, může také vést ke snížení zdraví kmenu a v konečném důsledku z něj udělat kmen neškodný.

Čtvrtý podtyp nevykazoval žádné chromozomální změny, ale u těchto kmenů došlo ke ztrátě plazmidu pO157. Tento plazmid je důležitý zejména proto, že jeho kódující geny jsou minimálně částečně zodpovědné za velmi vysokou aktivitu tohoto kmenu *E. coli*. Ztráta tohoto plazmidu opět vyústí v jeho neškodnost.

Pro studium schopnosti metalohelikátů volně vstupovat do buňky, byl nasyntetizován fluorescenčně značený derivát helikátu **A-5b**. Byla pozorována velice malá fluorescence ve stacionární fázi *E. coli*, zatímco u rychle se dělících buněk byla pozorována akumulace v cytoplazmě a v oblasti pólů bakteriálních buněk. Dále nebyla pozorována preferenční lokalizace helikátu v buněčné membráně a pozorované zabarvení nebylo homogenní. Lze tedy usuzovat diferencovaný vstup helikátu do buňky. Dále byla pozorována redukce fluorescence fluorescenční značky DAPI, která se váže na DNA. Následná analýza obrázků naznačuje kompetitivní vazbu na DNA.

Na základě pozorování fluorescence DAPI byla studována interakce **A-5b** s DNA. Interakce s DNA byla u metalohelikátů pozorována v předešlých pracích [88]. Studium vytěšňování ethidium bromidu z DNA z telecího thymu byla získána hodnota zdánlivé vazebné konstanty $K_{app} 1.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. Dále byl pozorován nárůst teploty tání DNA z telecího thymu v přítomnosti helikátu **A-5b**. Studium spekter lineárního dichroismu DNA v přítomnosti helikátů bylo zjištěno, že pouze komplexy **5a** a **5b** se váží organizovaně a ne pouze na základě elektrostatiky. Vazebným místem je pravděpodobně velký žlábek DNA. Dále studie lineárního dichroismu poukázaly na koncentračně závislé deformace struktury DNA, což bylo potvrzeno investigací pomocí mikroskopie atomárních sil na plazmidu pSP73. Dále byla studována afinita helikátu **5b** ke G-kvadruplexům DNA. Jedná se o strukturu podílející se na transkripci důležitých genů v bakteriích, mimo jiné i v *E. coli*. Bylo zjištěno, že oba enantiomery helikátu **5b** nejen značně stabilizují G-kvadruplex, ale preferují i vazbu do kvadruplexu před vazbou do velkého žlábků.

4.4. Unique structural properties of DNA interstrand cross-links formed by a new antitumor dinuclear Pt(II) complex. (Publikace 4)

V předešlé práci [73] byl zkoumán dvoujaderný komplex platiny $\{[cis-Pt(NH_3)_2Cl]_2(4,4'-methylendianilin)\}^{2+}$ (komplex **1**), který náleží do nové generace slibných protinádorově účinných polynukleárních komplexů platiny rezistentních k dekompozici sírovými nukleofily. Komplex **1**

je účinný vůči buňkám rakoviny vaječníků s hodnotami IC_{50} srovnatelnými s konvenční cisplatinou pro linii citlivou na cisplatinu a pro linii na cisplatinu rezistentní vykazhuje v provnání s cisplatinou podstatně lepší hodnoty cytotoxicity. Tato skutečnost je připisována schopnosti formování meziřetězcových můstků odlišných od cisplatinu a jejich následnému rozeznání buněčnými proteiny.

Výsledky této práce ukazují, že se komplex **1** preferenčně váže na guaninové zbytky. Důležitější je poznatek, že za kompetičních podmínek jsou všechny typy meziřetězcových můstků zkoumaného komplexu **1** ve směru 3'-3'. Zajímavý fakt je, že meziřetězcové můstky mononukleárních nebo dalších polynukleárních komplexů platiny jsou formovány výhradně ve směru 5'-5' při podmínkách použitých v této práci. Důvody unikátní orientace aduktu komplexu **1** na DNA zůstávají neobjasněny.

V této práci byla také studována změna konformace DNA vyvolaná tvorbou 1,4-GG meziřetězcového můstku mezi komplexem **1** a DNA. Bylo zjištěno, že tento adukt ohýbá dvoušroubovici o 31° směrem do velkého žlábků a rozvíjí ji o 18°. Změna konformace DNA je velice podobná poškození způsobeném hlavními adukty tvořenými cisplatinou. 1,4-GG meziřetězcový můstek komplexu **1** tvoří lokální konformační distorze objevené použitím chemických sond, cirkulárního dichroismu (CD) a UV absorbních experimentů.

Inhibice transkripce způsobená komplexy platiny je důležitá část mechanismu jejich protinádorové aktivity. Hlavní transkripční komponentou je RNA polymeráza II. Je tedy zřejmé, že meziřetězcové můstky tvořené komplexem **1** mohou zablokovat RNA polymerázu II, ale zároveň působí také jako substrát pro rozpoznání HMG proteiny [73]. Došli jsme k závěru, že díky rozpoznání aduktu komplexu **1** na DNA hraje HMG protein důležitou roli v jeho protinádorovém účinku. Závěrem lze říci, že cytotoxické účinky komplexu **1** jsou pravděpodobně způsobeny jak inhibicí RNA polymerázy II, tak stíněním aduktů komplexu **1** vazbou HMG proteinů.

5. Závěr

Disertační práce je sestavena jako souhrn čtyř publikovaných prací. Tři se zabývají studiem mechanismů účinku komplexů založených na přechodných kovech. Čtvrtá práce se zabývá změnou termodynamických parametrů dvoušroubovice DNA způsobenou mutací v primární struktuře DNA a jejich vlivem na replikaci DNA.

DNA je považována za farmakologické cílové místo farmak založených na bázi kovů, metalohelikáty nejsou výjimkou. Jedná se o chirální struktury složené z 2 iontů kovu a 3 rigidních organických ligandů. Helikáty diskutované v této práci byly syntetizovány prof. Scottem (University of Warwick, UK). Jako první byla testována akumulace helikátů v jádrech buněk HCT116p53^{+/+}. Výsledky ukázaly, že 42 – 84% helikátů je akumulováno v jádře a může tedy interagovat s jadernou DNA. Všechny helikáty prokázaly vysokou afinitu k ctDNA a zároveň bylo zjištěno, že vazba helikátů na DNA nezpůsobuje jednořetězcové a dvouřetězcové zlomy. Podrobnější investigace odhalila u enantiomerů helikátu **1** specifickou organizaci vazby na DNA v kontrastu s náhodnou vazbou zbylých komplexů. Dále byl pozorován pokles intenzity signálu LD při 260 nm v závislosti na narůstající koncentraci helikátů, což může být vysvětleno zvýšením flexibility DNA ve vzorku nebo jejím zkrácením vlivem jejího svinutí či monomolekulární kondenzací/multimolekulární agregací. Další experimenty prokázaly schopnost helikátů agregovat DNA při nízkých koncentracích, srovnatelných s dalšími používanými kondenzačními agens. Látky schopné kondenzovat DNA jsou často používány k narušení kritických enzymatických pochodů týkajících se DNA. Enzymatické studie ukázaly, že aktivita enzymů pracujících s DNA je značně snížena v přítomnosti helikátů.

Oxidované nukleotidy reprezentují jeden z hlavních zdrojů poškození DNA fyzikálními a chemickými agens. HdU a HMdU reprezentují nejčastější formu oxidovaných pyrimidinů v DNA, přičemž tyto oxidace jsou způsobeny zejména reaktivními formami kyslíku. HdU je znám svou mutagenní aktivitou (C → T), zatímco HMdU je považován za epigenetickou značku. Nejnižší disociační konstanty byly naměřeny MST při inkorporaci A proti HdU a HMdU, což je v souladu s výsledky simulované translézové syntézy. Dále bylo prokázáno, že translézová syntéza přes lézi způsobenou HdU může způsobit záměnu AT páru za pár CG. Dále výsledky ukazují, že DNA polymerázy jsou schopny hladce obejít poškození tvořené HMdU. Výše zmíněné naznačuje, že toto poškození je méně mutagenní a méně ovlivňuje replikaci DNA, což je konzistentní s rolí HMdU jako epigenetické značky v DNA. Výsledky této studie celkově potvrdily předešlé výsledky ukazující vysokou mutagenitu lézí HdU a méně mutagenní vlastnosti léze HMdU.

Příkladem nových potenciálních protinádorově účinných agens jsou takzvané helikáty. Jedná se o chirální struktury složené z 2 iontů kovu a 3 rigidních organických ligandů. Helikáty diskutované v této práci byly syntetizovány prof. Scottem (University of Warwick, UK) a

poskytnuty pro účely této práce. Poskytnuté komplexy strukturně navazují na předešlou sérii. Prvním cílem bylo ověření, zda helikáty z této skupiny také vykazují antimikrobiální aktivitu, stejně jako tomu bylo u helikátu **5a** z předchozí série. Výsledky potvrdily relativně vysokou aktivitu vůči gram-negativním mikrobům u všech zkoumaných helikátů. U gram negativních mikrobů vynikaly oba enantiomery helikátu **5b** jak aktivitou, tak selektivitou.

Dvoujaderné komplexy platiny jsou považovány za velice slibná protinádorově účinná agens nové generace. Zkoumaný komplex $\{[cis-Pt(NH_3)_2Cl]_2(4,4'-methylendianilin)\}^{2+}$ prokázal účinnost proti vybraným buněčným liniím srovnatelnou s cisplatinou. V liniích resistantních k cisplatině ukázal účinnost vyšší. Vysoce zajímavou vlastností se ukázala geometrie meziřetězcové vazby komplexu na DNA. Zatímco konvenční metalofarmaka založená na platině se preferenčně vážou ve směru 5'-5', námi zkoumaný komplex se preferenčně váže ve směru 3'-3'. Přestože má meziřetězcový můstek naprosto odlišnou geometrii, jeho tvorba vyústí ve velice podobné poškození DNA jako u cisplatiny. Závěrem lze říci, že cytotoxické účinky komplexu **1** jsou pravděpodobně způsobeny jak inhibicí RNA polymerázy II, tak i stíněním aduktů komplexu **1** vazbou HMG proteinů.

Přínosem disertační práce je popsání vazby nových metalofarmak na DNA. Využití těchto poznatků vedlo k dokonalejšímu popisu mechanismu vazby a mechanismu působení těchto farmak. Studie provedené v této práci přispěly k řešení projektů zaměřených na problematiku nových metalofarmak a na problematiku molekulární farmakologie při terapii nádorových onemocnění.

6. Seznam použité literatury

- [1] **Connors T. (1996):** *Anticancer drug development: The way forward*, *Oncologist*, 1(3), 180-181.
- [2] **Smith S. L. (2017):** *War! What is it Good for? Mustard gas medicine*, *CMAJ*, 189(8), E321-E322.
- [3] **Moudi M., Go R., Yien C. Y. , Nazre M. (2013):** *Vinca alkaloids*, *Int J Prev Med*, 4(11), 1231–1235.
- [4] **Kostova I. (2006):** *Platinum complexes as anticancer agents*, *Recent patents on Anticancer Drug Discovery*, 1(1), 1-22.
- [5] **Kauffman G. B. (2010):** *Michele Peyrone (1813 – 1883), Discover of cisplatin*. *Platinum Metals Rev.* 54, 250–256.
- [6] **Peyrone M. (1844):** *Ueber die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorür*, *Annalen der Chemie und Pharmacie* 51, 1-29.
- [7] **Kelland L. R. (2007):** *The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy*, *Nat. Rev. Cancer* 7(8), 573-578.
- [8] **Rosenberg B., van Camp L., Krigas T. (1965):** *Inhibition of cell division in escherchia coli by electrolysis products form a platinum electrode*, *Nature* 205, 698-699.
- [9] **Alberts, B. et al.(1998):** *Základy buněčné biologie*, 2. vydání, Ústí nad Labem: Espero Publishing, 183-188, ISBN 80-902906-2-0.
- [10] **Neidle S. (2008):** *The building-blocks of DNA and RNA*, *Principles of Nucleic Acid Structure*, ed S. Neidle. New York, NY: Academic Press, 20–37, ISBN 9780123695079.
- [11] **Altona C., Sundaralingam M. (1972):** *Conformational analysis of the sugar ring in nucleosides and nucleotides. A new description using the concept of pseudorotation*, *J. Am. Chem. Soc.* 94(23), 8205-8212.
- [12] **Ho P. S., Carter M (2011):** *DNA structure: Alphabet soup for the cellular soul*, *DNA replicaton – current advances (edited by Hervé Sligmann)*, 3-26, ISBN 978-953-307-593-8.
- [13] **Zeng G., Lu X., Olson W. K. (2009):** *Web 3DNA—a web server for the analysis, reconstruction, and visualization of three-dimensional nucleic-acid structures*, *Nucleic Acids Res.* 37, W240–W246.
- [14] **Foloppe N., Hartmann B., Nilsson L. MacKerell Jr. A. D. (2002):** *Intrinsic conformational energetics associated with the glycosyl torsion in DNA: A quantum mechanical study*, *Biophysical Journal* 82, 1554-1569.
- [15] **Watson J. D., Crick F. H. C. (1953):** *Molecular structure of nucleic acids: A structure of deoxyribose nucleic acid*, *Nature* 171, 737-738.

- [16] **Chargaff E. (1950):** *Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation, Experientia* 6, 201-209.
- [17] **Potaman V. N., Siden R. R. (2005):** *DNA: Alternative conformations and biology, DNA Conformation and Transcription (edited by Takashi Ohyama), Springer US, 3-17, ISBN 978-0-387-29148-2*
- [18] **Ussery D. W. (2002):** *DNA Structure: A-, B- and Z-DNA Helix Families. Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, U.K.*
- [19] **Koo H., Wu H., Crothers (1986):** *DNA bending at adenine • thymine tracts, Nature* 320, 501-506.
- [20] **van Holde K., Zlatanova J. (1993):** *Unusual DNA structures, chromatin and transcription, BioEssays* 16, 59-68.
- [21] **Cerasino L., Hannon M. J., Sletten E. (2007):** *DNA three-way junction with a dinuclear iron (II) supramolecular helicate at the center: A NMR structural study, Inorg. Chem.* 46, 6245-6251.
- [22] **Baase W. A., Jose D., Ponedel B. C., von Hippel P. H., Johnson N. P. (2009):** *DNA models of trinucleotide frameshift deletions: the formation of loops and bulges at the primer-template junction, Nucleic Acids Research* 37, 1682-1689.
- [23] **Kunkel T. A., Bebenek K. (2000):** *DNA replication fidelity, Annu. Rev. Biochem* 69, 497-529.
- [24] **McNally E.M, Duggan D., Gorospe J. R., Bönemann C. G., Fanin M., Pegoraro E., Lidov H. G., Noguchi S., Ozawa E., Finkel R. S., Cruse R. P., Angelini C., Kunkel L. M., Hoffman E. P. (1996):** *Mutations that disrupt the carboxyl-terminus of gamma-sarcoglycan cause muscular dystrophy, Hum. Mo. Genet.* 5, 1841-1847.
- [25] **Li J., Yen C. Liaw D., Podsypanina K., Bose S., Wang S. I., Puc J., Meliaresis C. Rodgers L., McCombie R., Binger S. H., Giovanella B. C., Ittmann M., Tycko B., Hibshoosh H., Wigler M. H., Parsons R. (1997):** *PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast and prostate cancer, Science* 275, 1943-1947.
- [26] **Degtyareva N., Subramanian D., Griffith J. D. (2001):** *Analysis of the binding of p53 to DNAs containing mismatched and bulged bases, The Journal of Biological Chemistry* 27, 8778-8784
- [27] **Malkov V. A., Biswas I., Camerini-Otero R. D., Hsieh P. (1997):** *Photocross-linking of the NH2-terminal region of Taw MutS protein to the major groove of a heteroduplex DNA, J. Biol. Chem.,* 272, 23811-23817.
- [28] **Wang Y. H., Bortner C. D., Griffith J. (1993):** *RecA binding to bulge and mismatch containing DNAs. Certain single base mismatches provide strong signals for RecA binding equal to multiple base bulges, J. Biol. Chem* 268, 17571-17577.

- [29] **Wu B., Girard F., van Buuren B., Schleucher J., Tessari M., Wijmenga S. (2004):** *Global structure of a DNA three-way junction by solution NMR: towards prediction of 3H fold, Nucleic Acids Res. 32, 3228-3239.*
- [30] **Vologodskii A., Frank-Kamenetskii M. D. (2018):** *DNA melting and energetics of the double helix, Physics of Life Reviews 25, 1-21.*
- [31] **Bueren-Calabuig J. A., Giraudon C., Galmarini C. M., Egly J. M., Gago F. (2011):** *Temperature-induced melting of double-stranded DNA in the absence and presence of covalently bonded antitumour drugs: insight from molecular dynamics simulations, Nucleic Acids Research 39, 8248-8257*
- [32] **SantaLucia Jr. J. (1998):** *A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 1460-1465.*
- [33] **Howard K. P. (2000):** *Thermodynamics of DNA duplex formation: a biophysical chemistry laboratory experiment, J. Chem. Educ. 77, 1469.*
- [34] **Vaitiekunas P., Crane-Robinson C., Privalov P. L. (2015):** *The energetic basis of the DNA double helix: a combined microcalorimetric approach, Nucleic Acids Research 43, 8577-8589.*
- [35] **Florian J., Brabec V. (2011):** *Thermodynamics of translesion synthesis across a major DNA adduct of antitumor oxaliplatin: Differential scanning calorimetric study, Chemistry a European Journal 18, 1634-1639.*
- [36] **Jerabek-Willemsen M., André T., Wanner R., Roth H. M., Duhr S., Basske P., Breitsprecher D. (2014):** *MicroScale thermophoresis: Interaction analysis and beyond, Journal of Molecular Structure 1077, 101-113.*
- [37] **Rahman M. A., Saghir M. Z. (2014):** *Thermodiffusion or Soret effect: Historical review, International Journal of Heat and Mass Transfer 73, 693-705*
- [38] **Daviet S., Couvé-Privat S., Gros L., Shinozuka K., Ide H., Saparbaev M., Ishchenko A. A., (2007):** *Major oxidative products of cytosine are substrates for the nucleotide incision repair pathway, DNA Repair (Amst) 6, 8-18.*
- [39] **Hrabina O., Brabec V., Nováková O. (2019):** *Translesion DNA synthesis across lesions induced by oxidative products of pyrimidines: An insight into the mechanism by microscale. International Journal of Molecular Sciences 20, 5012*
- [40] **Kreutzer D. A., Essigmann J. M. (1998):** *Oxidized, deaminated cytosines are a source of C → T transitions in vivo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 3578-3582.*
- [41] **Greim H., Albertini R. J. (2015):** *Cellular response to the genotoxic insult: the question of threshold for genotoxic carcinogens, Toxicol. Res. 4, 36-45.*
- [42] **Thivjyanathan V., Soasunderam A., Volk D. E., Gorenstein D. G. (2005):** *5-hydroxyuracil can form stable base pairs with all four bases in DNA duplex, Chem. Commun. 3, 400-404.*

- [43] **Boorstein R. J., Teebor G. W. (1989):** *Effects of 5-hydroxymethyluracil and 3-aminobenzamide on the repair and toxicity of 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine in mammalian cells, Cancer Research 49, 1509–1514.*
- [44] **Shiau G. T., Schinazi R. F., Chen M. S., Prusoff W. H. (1980):** *Synthesis and biological activities of 5-(hydroxymethyl, azidomethyl or aminomethyl)-2'-deoxyuridine and related 5'-substitued analogs, J. Med. Chem. 23, 127-133.*
- [45] **Jamieson E. R., Lippard S. J. (1999):** *Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts, Chem. Rev. 99, 2467-2498.*
- [46] **Johnstone T. C., Suntharalingam K., Lippard S. J. (2014):** *The next generation of platinum drugs: targeted Pt(II) agents, nanoparticle delivery and Pt(IV) prodrugs, Chem. Rev. 116, 3436-3486.*
- [47] **Makovec T. (2019):** *Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance developmnet in cancer chemotherapy, Radiol. Oncol 53, 148-158.*
- [48] **Dasari S., Tchounwou P. B. (2014):** *Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanism of action, Eur. J. Pharmacol. 5, 364-378.*
- [49] **Brabec, V., Kasparkova, J. (2005):** Platinum-based drugs, In Gielen, M. and Tiekink, E. R. T. (eds.), *Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents: The Use of Metals in Medicine.* John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, pp. 489-506.
- [50] **Brouwer J., van de Putte P., Fichtinger-Schepman A. M., Reedijk J. (1981):** *Base-pair substitution hotspots in GAG and GCG nucleotide suquences in Escherichia coli K-12 induced by cis-diamminedichloroplatinum (II), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78(11), 7010-7014.*
- [51] **Gelasco A., Lippard S. J. (1998):** *NMR solution structure of a DNA dodecamer duplex containing a is-diammineplatinum(II) d(GpG) intrastrand cross-link, the major adduct of the anticancer drug cisplatin. Biochemistry , 37, 9230–9239*
- [52] **Jenssen D., Vare D., Groth P., Carlsson R., Johansson F., Erixon F. (2012):** *DNA interstrand crosslinks induce a potent replication block followed by formation and repair of double strand breaks in intact mammalian cells. DNA Repair, 11, 976–985.*
- [53] **Jamieson E. R., Jacobson M. P., Barnes C. M., Chow C. S., Lippard S. J. (1999):** *Structural and kinetic studies of a cisplatin-modified DNA icosamer binding to HMG1 domain B. Journal of Biological Chemistry 274, 12346-12354.*
- [54] **Fuertez M. A., Castilla J., Alonso C., Pérez J. M. (2003):** *Cisplatin biochemical mechanism of action: from cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways, Current Medical Chemistry 10, 257-256.*
- [55] **Lippard S. J., Keck M. V. (1992):** *Unwinding of supercoiled DNA by platinum-ethidium and related complexes. Jurnal of American Chemical Society, 114, 3386–3390.*

- [56] **Han J., Chung Y., Park S. W., Kim J. S., Rhyu M., Kim H., Lee K. S. (1999):** *The relationship between cisplatin-induced apoptosis and p53, bcl-2 and bax expression in human lung cancer cells, The Korean Journal of Internal Medicine 14, 42-52.*
- [57] **Hutcherson R. J., Kemp M. G., (2019):** *ATR kinase inhibition sensitizes quiescent human cells to the lethal effects of cisplatin but increases mutagenesis, Mutat. Res., 816-818.*
- [58] **Cryer J. E., Johnson S. W., Engelsberg B. N., Billings P. C. (1996):** *Analysis of HMG protein binding to DNA modified with the anticancer drug cisplatin, Cancer Chemother Pharmacol 38, 163-168.*
- [59] **Brabec V., Kasparkova J. (2005):** *DNA interactions of platinum anticancer drugs. Recent advances and mechanisms of action. In Metal Compounds in Cancer Chemotherapy, Pérez J. M., Fuertes M. A., Alonso C. (Eds.), 87-218.*
- [60] **Zamble D. B., et al. (1999):** *The response of cellular proteins to cisplatin-damaged DNA, in Cisplatin. Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug, B. Lippert, VHCA, WILEY-VCH: Zürich, Weinheim., Editor.p.73-110.*
- [61] **Todd R. C., Lippard S. J. (2009):** *Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds, Metallomics 1, 280-291.*
- [62] **Florea A. M., Büsselberg D. (2011):** *Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects, Cancers (Basels) 3, 1351-1371.*
- [63] **Malina J., Kasparkova J., Brabec V. (2002):** *Recognition of major DNA adducts of enantiomeric cisplatin analogs by HMG box proteins and nucleotide excision repair of these adducts, Chem. Biol. 9, 629-638.*
- [64] **Rocha C. R. R., Silva M. M., Quinet A., Cabral-Neto J. B., Menck C. F. M. (2018):** *DNA repair pathway and cisplatin resistance: an intimate relationship, Clinics. 73, e478s.*
- [65] **Siddik Z. H. (2003):** *Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance, Oncogene 22, 7265-7279.*
- [66] **Kelland L. R. (1991):** *New platinum antitumor complexes, Critical Reviews in Oncology/Hematology 15, 191-219.*
- [67] **Kelland L. R. (2000):** *Preclinical perspectives on platinum resistance. Drugs, 59(4), 1-8.*
- [68] **Kelland L. R., Mistry P., Abel G., Freidos F., Loh S. Y., Roberts J. J., Harrap K. (1992):** *Establishment and characterization of an in vitro model of acquired resistance to cisplatin in a human testicular nonseminomatous germ cell line, Cancer Research 52, 1710-1716.*
- [69] **Kelland L. R. (1993):** *New platinum antitumor complex, Crit. Rev. Oncol Hematol 15, 191-219.*
- [70] **Brabec V., Hrabina O., Kasparkova J. (2017):** *Cytotoxic platinum coordination compounds. DNA binding agents. Coordination Chemistry Reviews 351, 2-31*

- [71] **Boulikas T., Panto, A., Bellis E. Christofis P. (2007):** *Designing platinum compounds in cancer: structures and mechanism. Cancer Therapy, 5, 537–583*
- [72] **Wong E., Giandomenico C. M. (1999):** *Current status of platinum-based antitumor drugs, Chem. Rev. 99, 2451-2466.*
- [73] **Zerzankova L., Kostrhunova H., Vojtiskova M., Novakova O., Suchankova T., Lin M., Guo Z., Kasparkova J., Brabec V. (2010):** *Mechanistic insights into antitumor effects of new dinuclear cis Pt^{II} complexes containing aromatic linkers, Biochemical Pharmacology 80m 344-351.*
- [74] **Olivova R., Kasparkova J., Vrana O., Vojtiskova M., Suchankova T., Novakova O., He W., Guo Z., Brabec V. (2011):** *Unique DNA binding mode of antitumor trinuclear tridentate platinum (II) compound, Mol. Pharm 8, 2368-2378.*
- [75] **Hrabina O., Kasparkova J., Suchankova T., Novohradsky V., Guo Z., Brabec V. (2017):** *Unique structural properties of DNA interstrand cross-links formed by a new antitumor dinuclear Pt(II) complex. Metallomics 9, 494*
- [76] **Hannon M. J. (2007):** *Metal-based anticancer drugs: From a past anchored in platinum chemistry to a post-genomic future of diverse chemistry and biology, Pure Appl. Chem. 79, 2243-2261.*
- [77] **Pages B. J., Ang D. L., Wright E. P., Aldrich-Wright J. R. (2015):** *Metal complex interactions with DNA, Dalton Trans. 44, 3005-3526.*
- [78] **Malina J., Hannon M. J., Brabec V. (2008):** *DNA binding of dinuclear iron (II) metallosupramolecular cylinders. DNA unwinding and sequence preference., Nucleic Acids Res. 36, 3630-3638.*
- [79] **Meistremann I., Moreno V., Prieto M. J., Moldrheim E., Sletten E., Khalid S., Rodger P. M., Peberdy J. C., Rodger A., Hannon M. J. (2002):** *Itramolecular DNA coiling mediated by metallo-supramolecular cylinders: differential binding of P and M helical enantiomers, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 5069-5074.*
- [80] **Malina J., Hannon M. J., Brabec V. (2008):** *DNA binding of dinuclear iron (II) metallosupramolecular cylinders. DNA unwinding and sequence preference., Nucleic Acids Res. 36, 3630-3638.*
- [79] **Malina J., Hannon M. J., Brabec V. (2015):** *Iron(II) supramolecular helicates condense plasmid DNA and inhibit vital DNA-related enzymatic activities, Chemistry 21, 11189-11195.*
- [80] **Malina J., Hannon M. J., Brabec V. (2007):** *Recognition of DNA three-way junctions by metallosupramolecular cylinders: gel electrophoresis studies, Chemistry 13, 3871-3877.*
- [81] **Malina J., Hannon M. J., Brabec V. (2014):** *Recognition of DNA bulges by dinuclear iron (II) metallosupramolecular helicates, FEBS J. 281, 987-997.*

- [82] **Oleksi A., Blanco A. G., Boer R., Usón I., Aymamí J., Rodger A., Hannon M. J., Coll M. (2006):** *Molecular recognition of a three-way DNA junction by a metallosupramolecular helicate*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 45, 1227-1231.
- [83] **Simpson D., Hapeshi A., Rogers N.J., Brabec V., Clarkson G.J., Fox D., Hrabina O., Kay G., King A., Malina J., Millard A., Moat J., Roper D.I., Song H., Waterfield N., Scott P. (2019):** *Metallohelices that kill Gram-negative pathogens using intracellular antimicrobial peptide pathways*. *Chemical Science* 10, 9708-9720
- [84] **Fan D., Yang X., Wang X., Zang S., Mao J., Ding J., Lin L., Guo Z. (2007):** *A dinuclear monofunctional platinum (II) complex with an aromatic linker shows low reactivity towards glutathione but high DNA binding ability and antitumor activity*, *J. Biol. Inorg. Chem.* 12, 655-665.
- [85] **Brabec V., Reedijk J., Leng M. (1992):** *Sequence-dependent distortions induced in DNA by monofunctional platinum(II) binding*, *Biochemistry* 31, 12397-12402.
- [86] **Hrabina O., Malina J., Kostrhunova H., Novohradsky V., Pracharova J., Rogers N., Simpson D.H., Scott P., Brabec V. (2020):** *Optically pure metallohelices that accumulate in cell nuclei, condense/aggregate DNA, and inhibit activities of DNA processing enzymes*. *Inorganic Biochemistry – v tisku*
- [87] **Hannon M. J., Moreno V., Prieto M. J., Moldrheim E., Sletten, E., Meistermann I., Isaac C. J., Sanders K. J., Rodger A (2001):.** *Intramolecular DNA coiling mediated by a metallo-supramolecular cylinder*. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 40, 879–884.
- [88] **Howson S. E., Bolhuis A., Brabec V., Clarkson G. J., Malina J., Rodger A., Scott P. (2011):** *Optically pure, water-stable metallo-helical 'flexicate' assemblies with antibiotic activity*, *Nature Chemistry* 4, 31-36.

Internetové zdroje:

- [I1] **National Cancer Institute (2018):** Dostupné z: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
- [I2] **x3DNA (2013):** Dostupné z: <https://x3dna.org/highlights/sugar-pucker-correlates-with-phosphorus-base-distance>
- [I3] **wikipedia (2014):**Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/File:Dnaconformations.png>

7. Seznam použitých zkratek

A	adenin
ATP	adenosin trifosfát
C	cytosin
CAMPs	kationní antimikrobiální proteiny
CD	cirkulární dichroismus
CY5	fluorescenční značka cyanine 5
ctDNA	DNA z telecího thymu
CTP	cytosin trifosfát
DNA	deoxyribonukleotidová kyselina
DAPI	fluorescenční značka 2-(4-amidinophenyl)-1H -indol-6-carboxamid
DTT	dithiotreitol
EtBr	ethidium bromid
G	guanin
GGR	globální oprava genomu
GTP	guanosin trifosfát
HdU	5'-hydroxyuridin
HMG	proteiny rodiny high mobility group
HMdU	5'-methylhydroxyuridin
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
K _d	disociační konstanta
LD	lineární dichroismus
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MST	microscale termoforéza
NER	nukleotidová excisní oprava
P _b	pár bází
RNA	ribonukleotidová DNA
ROS	reaktivní formy kyslíku
SDS	dodecylsírán sodný
T	thymin
TCR	oprava spojená s transkripcí (transcription coupled repair)
TTP	thymidin trifosfát
UTP	uridin trifosfát
UTP-gamma-AmNS	uridin-5'-trifosfát- γ -(sulfo-1-naphthyl)amid
UV	ultrafialové záření

8. Přílohy

8.1. Seznam publikací

1. **Hrabina O., Malina J., Kostrhunova H., Novohradsky V., Pracharova J., Rogers N., Simpson D.H., Scott P., Brabec V. (2020):** *Optically pure metallohelices that accumulate in cell nuclei, condense/aggregate DNA, and inhibit activities of DNA processing enzymes. Inorganic Biochemistry – v tisku*
2. **Hrabina O., Brabec V., Nováková O. (2019):** *Translesion DNA synthesis across lesions induced by oxidative products of pyrimidines: An insight into the mechanism by microscale. International Journal of Molecular Sciences 20, 5012*
3. **Simpson D., Hapeshi A., Rogers N.J., Brabec V., Clarkson G.J., Fox D., Hrabina O., Kay G., King A., Malina J., Millard A., Moat J., Roper D.I., Song H., Waterfield N., Scott P. (2019):** *Metallohelices that kill Gram-negative pathogens using intracellular antimicrobial peptide pathways. Chemical Science 10, 9708-9720*
4. **Hrabina O., Kasparkova J., Suchankova T., Novohradsky V., Guo Z., Brabec V. (2017):** *Unique structural properties of DNA interstrand cross-links formed by a new antitumor dinuclear Pt(II) complex. Metallomics 9, 494*
5. **Brabec V., Hrabina O., Kasparkova J. (2017):** *Cytotoxic platinum coordination compounds. DNA binding agents. Coordination Chemistry Reviews 351, 2-31*

8.1.1. *Publikace 1*

OPTICALLY PURE METALLOHELICES THAT ACCUMULATE IN CELL NUCLEI, CONDENSE /AGGREGATE DNA, AND INHIBIT ACTIVITIES OF DNA PROCESSING ENZYMES

Ondrej Hrabina, Jaroslav Malina, Hana Kostrhunova, Vojtech Novohradsky, Jitka Pracharova,
Nicola Rogers, Daniel H. Simpson, Peter Scott, and Victor Brabec.

Inorganic Chemistry – v tisku

Prohlašuji, že můj podíl na přípravě publikace byl následující:

Stanovení zdánlivé vazebné konstanty flexikátů na DNA za použití metody vytěšňování ethidium bromidu. Stanovení vazebné geometrie flexikátu na DNA pomocí metody lineárního dichroismu. Studium kondenzace DNA metodou statického rozptylu světla a mikroskopie atomárních sil. Studium inhibice enzymatické aktivity v přítomnosti flexikátů.

.....

Optically Pure Metallohelices That Accumulate in Cell Nuclei, Condense/Aggregate DNA, and Inhibit Activities of DNA Processing Enzymes

Ondrej Hrabina, Jaroslav Malina, Hana Kostrhunova, Vojtech Novohradsky, Jitka Pracharova, Nicola Rogers, Daniel H. Simpson, Peter Scott, and Viktor Brabec*

Cite This: <https://dx.doi.org/10.1021/acs.inorgchem.0c00092>

Read Online

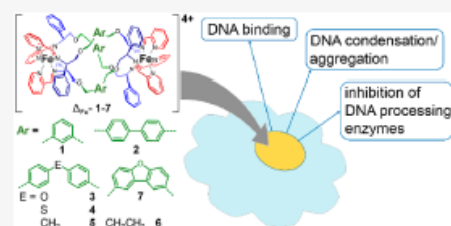
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: The water-compatible optically pure metallohelices made by self-assembly of simple nonpeptidic organic components around Fe(II) ions are now recognized as a distinct subclass of helicates that exhibit similar architecture to some natural cationic antimicrobial peptides. Notably, a new series of metallohelices was recently shown to exhibit biological activity, displaying high, structure-dependent activity against bacteria. It is also important that, thanks to their properties, such metallohelices can exhibit specific interactions with biomacromolecules. Here, following our prior report on the metallohelices that have high, structure-dependent activity against bacteria, we investigated the interactions of the series of iron(II) metallohelices with DNA, which is a potential pharmacological target of this class of coordination compounds. The results obtained with the aid of biophysical and molecular biology methods show that the investigated metallohelices accumulate in eukaryotic cells and that a significant fraction of the metallohelices accumulates in the cell nucleus, allowing them to interact also with nuclear DNA. Additionally, we have demonstrated that some metallohelices have a high affinity to DNA and are able to condense/aggregate DNA molecules more efficiently than conventional DNA-condensing agents, such as polyamines. Moreover, this capability of the metallohelices correlates with their efficiency to inhibit DNA-related enzymatic activities, such as those connected with DNA transcription, catalysis of DNA relaxation by DNA topoisomerase I, and cleavage by restriction enzymes.



INTRODUCTION

Supramolecular chemistry makes it possible to prepare functional, highly complex chemical systems from components assembled by intermolecular forces.¹ Some chiral assemblies of two or more metal atoms linked by short or relatively rigid multidentate organic ligands, named helicates, can have a similar size to α -helical peptides, particularly in terms of their diameter and charge.^{2–4} Thanks to these properties, such compounds can exhibit specific interactions with biomacromolecules.⁵ Recently, various supramolecular metallohelices have been shown to exhibit unique biological properties; antimicrobial and anticancer properties are examples.^{2,3,5,7} Additionally, some metallohelix compounds have also been shown to bind DNA^{8–11} and inhibit enzyme activity.^{8,9}

We recently described the design, synthesis, and characterization of a series of new water-compatible optically pure metallohelices made by self-assembly of simple nonpeptidic organic components around Fe(II) ions.¹² An attractive property of these self-assembled helical metallo-organic compounds is their ability to change the handedness, size, shape, and charge distribution in the structure by a selection of subcomponents for the self-assembly. Moreover, their hydro-

phobicity and biological function can be affected by changes of substituent groups, which offers the possibility to determine factors responsible for their specific efficiency observed. Notably, this new series of metallohelices has been already shown to exhibit biological activity, displaying high, structure-dependent activity against bacteria, including clinically problematic Gram-negative pathogens.¹² Interestingly, these metallohelices emulate some of the physical properties of natural cationic antimicrobial peptides.

In this work, we describe the interactions of this series of iron(II) metallohelices (Figure 1) with DNA, which is a potential pharmacological target of this class of coordination compounds, by biophysical and molecular biology methods. We concentrated our effort on the ability of the new compounds to condense/aggregate DNA as these +4 cationic metallohelices are likely to induce interactions between anionic

Received: January 13, 2020

Z důvodů dodržení autorských práv není přiložená plná verze publikace.
Článek je dostupný na stránkách:

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.inorgchem.0c00092?ref=pdf>

8.1.2. *Publikace 2*

**TRANSLATION DNA SYNTHESIS ACROSS
LESIONS INDUCED BY OXIDATIVE PRODUCTS OF
PYRIMIDINES: AN INSIGHT INTO THE
MECHANISM BY MICROSCALE
THERMOPHORESIS**

Ondrej Hrabina, Viktor Brabec, and Olga Novakova

International Journal of Molecular Sciences 20, 5012


Prohlašuji, že můj podíl na přípravě publikace byl následující:

*Investigace termodynamických parametrů DNA obsahující H₂O a HMdU metodou
Microscale thermophoresis.*

.....

Article

Translesion DNA Synthesis Across Lesions Induced by Oxidative Products of Pyrimidines: An Insight into the Mechanism by Microscale Thermophoresis

Ondrej Hrabina ^{1,2}, Viktor Brabec ^{1,2}  and Olga Novakova ^{1,*}

¹ Czech Academy of Sciences, Institute of Biophysics, Kralovopolska 135, CZ-61265 Brno, Czech Republic

² Department of Biophysics, Faculty of Science, Palacky University, Slechtitelu 27, CZ783717146 Olomouc, Czech Republic

* Correspondence: olga@ibp.cz; Tel: +420-541-517-135

Received: 27 August 2019; Accepted: 8 October 2019; Published: 10 October 2019



Abstract: Oxidative stress in cells can lead to the accumulation of reactive oxygen species and oxidation of DNA precursors. Oxidized nucleotides such as 2'-deoxyribo-5-hydroxyuridin (HdU) and 2'-deoxyribo-5-hydroxymethyluridin (HMdU) can be inserted into DNA during replication and repair. HdU and HMdU have attracted particular interest because they have different effects on damaged-DNA processing enzymes that control the downstream effects of the lesions. Herein, we studied the chemically simulated translesion DNA synthesis (TLS) across the lesions formed by HdU or HMdU using microscale thermophoresis (MST). The thermodynamic changes associated with replication across HdU or HMdU show that the HdU paired with the mismatched deoxyribonucleoside triphosphates disturbs DNA duplexes considerably less than thymidine (dT) or HMdU. Moreover, we also demonstrate that TLS by DNA polymerases across the lesion derived from HdU was markedly less extensive and potentially more mutagenic than that across the lesion formed by HMdU. Thus, DNA polymerization by DNA polymerase η ($\text{pol}\eta$), the exonuclease-deficient Klenow fragment of DNA polymerase I (KF^-), and reverse transcriptase from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1 RT) across these pyrimidine lesions correlated with the different stabilization effects of the HdU and HMdU in DNA duplexes revealed by MST. The equilibrium thermodynamic data obtained by MST can explain the influence of the thermodynamic alterations on the ability of DNA polymerases to bypass lesions induced by oxidative products of pyrimidines. The results also highlighted the usefulness of MST in evaluating the impact of oxidative products of pyrimidines on the processing of these lesions by damaged DNA processing enzymes.

Keywords: oxidized nucleotides; 2'-deoxyribo-5-hydroxyuridin; 2'-deoxyribo-5-hydroxymethyluridin; translesion DNA synthesis; DNA polymerases; microscale thermophoresis

1. Introduction

Oxidized nucleosides represent one of the main classes of damage induced in DNA by physical and chemical agents [1]. Examples of such oxidized nucleosides are 2'-deoxyribo-5-hydroxyuridin (HdU) and 2'-deoxyribo-5-hydroxymethyluridin (HMdU) (Figure 1). Both HdU and HMdU represent the most common oxidized pyrimidine 2'-deoxyribonucleosides found in DNA generated by reactive oxygen species (ROS), constantly formed by endogenous processes such as aerobic respiration and phagocytosis and by exposure to ionizing radiation [2–4]. The difference between the structures of HdU and HMdU is only seen in the absence of the methylene (CH_2) group in HdU. Despite this relatively small difference in structure, the presence of HdU and HMdU in double-helical DNA is detrimental to the cell in different ways. HdU is produced by the oxidative de-amination of cytosines

Z důvodů dodržení autorských práv není přiložená plná verze publikace.
Článek je dostupný na stránkách:

<https://www.mdpi.com/1422-0067/20/20/5012>

8.1.3. Publikace 3

METALLOHELICES THAT KILL GRAM-NEGATIVE PATHOGENS USING INTRACELLULAR ANTIMICROBIAL PEPTIDE PATHWAYS

Daniel H. Simpson, Alexia Hapeshi, Nicola J. Rogers, Viktor Brabec, Guy J. Clarkson, David J. Fox, **Ondrej Hrabina**, Gemma L. Kay, Andrew K. King, Jaroslav Malina, Andrew D. Millard, John Moat, David I. Roper, Hualong Song, Nicholas R. Waterfield, and Peter Scott

Chemical Science 10, 9708-9720

Prohlašuji, že můj podíl na přípravě publikace byl následující:

Investigace vazebných vlastností flexikátů na DNA využitím metod lineárního dichroismu a vytěšňování ethidium bromidu.

.....

Cite this: *Chem. Sci.*, 2019, 10, 9708

All publication charges for this article have been paid for by the Royal Society of Chemistry

Metallohelices that kill Gram-negative pathogens using intracellular antimicrobial peptide pathways†

Daniel H. Simpson,^{‡a} Alexia Hapeshi,^{‡b} Nicola J. Rogers,^{‡a} Viktor Brabec,^{‡c} Guy J. Clarkson,^a David J. Fox,^{‡b} Ondrej Hrabina,^{cc} Gemma L. Kay,^b Andrew K. King,^a Jaroslav Malina,^{‡c} Andrew D. Millard,^b John Moat,^d David I. Roper,^{kd} Hualong Song,^{‡a} Nicholas R. Waterfield^{ab} and Peter Scott^{‡a*}

A range of new water-compatible optically pure metallohelices – made by self-assembly of simple non-peptidic organic components around Fe ions – exhibit similar architecture to some natural cationic antimicrobial peptides (CAMPs) and are found to have high, structure-dependent activity against bacteria, including clinically problematic Gram-negative pathogens. A key compound is shown to freely enter rapidly dividing *E. coli* cells without significant membrane disruption, and localise in distinct foci near the poles. Several related observations of CAMP-like mechanisms are made via biophysical measurements, whole genome sequencing of tolerance mutants and transcriptomic analysis. These include: high selectivity for binding of G-quadruplex DNA over double stranded DNA; inhibition of both DNA gyrase and topoisomerase I *in vitro*; curing of a plasmid that contributes to the very high virulence of the *E. coli* strain used; activation of various two-component sensor/regulator and acid response pathways; and subsequent attempts by the cell to lower the net negative charge of the surface. This impact of the compound on multiple structures and pathways corresponds with our inability to isolate fully resistant mutant strains, and supports the idea that CAMP-inspired chemical scaffolds are a realistic approach for antimicrobial drug discovery, without the practical barriers to development that are associated with natural CAMPs.

Received 17th July 2019
Accepted 4th September 2019

DOI: 10.1039/c9sc03532j

rsc.li/chemical-science

Introduction

Bacteria naturally evolve resistance to most antimicrobial compounds, and the widespread careless use of antibiotics is exacerbating the situation. When coupled with a dearth of discovery of new antimicrobial drugs, antimicrobial resistance has emerged as a grave threat to current and future medical practice and socioeconomic activity, as recently highlighted by numerous organizations and governments.^{1,2}

Antimicrobial peptides are part of the innate immune systems of plants and animals that evolved to defend against a range of microbes.^{3,4} They are typically small molecules, comprising 10–50 amino acids. The majority – the so-called cationic antimicrobial peptides (CAMPs) – have an excess of both cationic and hydrophobic subunits arranged into secondary structures, such that the folded assembly exhibits an amphipathic or patchy charge distribution. While the surfaces of eukaryotic cell membranes are typically neutral, those of bacteria are intrinsically anionic due to the incorporation of negatively charged phospholipids, teichoic acid or lipopolysaccharides (LPS).^{5,6} Therefore, CAMPs have strong electrostatic interactions with bacterial cell membranes but not those of the host cells, providing generalised specificity. In some cases, the site of action is the membrane itself, with the CAMP inducing fatal changes in membrane structure and fluidity, or the creation of ungated pores allowing uncontrolled solute exchange with the environment.^{7,8} Alternatively, CAMPs may cross the membrane barrier and interact with intracellular targets with lethal consequences^{9–11} or indeed have combinations of modes of action.^{4,12} CAMPs and derivatives have been investigated as clinical antibiotics,^{13–15} but unfortunately their pharmacokinetic profiles tend to be unfavourable and large scale manufacture presents a challenge.¹⁶ Nevertheless it is worth noting

^aDepartment of Chemistry, University of Warwick, Gibbet Hill Road, Coventry, CV4 7AL, UK. E-mail: peter.scott@warwick.ac.uk

^bWarwick Medical School, University of Warwick, Coventry, CV4 7AL, UK

^cThe Czech Academy of Sciences, Institute of Biophysics, Královopolská 135, CZ-61265 Brno, Czech Republic

^dSchool of Life Sciences, University of Warwick, Gibbet Hill Campus, Coventry, CV4 7AL, UK

^{kd}Department of Biophysics, Palacký University, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc, Czech Republic

† Electronic supplementary information (ESI) available. Data created during this study are openly available from the University of Warwick Research Archive Portal (WRAP) (<http://wrap.warwick.ac.uk>). CCDC 1904782–1904784. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/c9sc03532j

‡ These authors contributed equally.



Z důvodů dodržení autorských práv není přiložená plná verze publikace.
Článek je dostupný na stránkách:

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2019/sc/c9sc03532j#!divAbstract>

8.1.4. Publikace 4

UNIQUE STRUCTURAL PROPERTIES OF DNA INTERSTRAND CROSS-LINKS FORMED BY A NEW ANTITUMOR DINUCLEAR PT(II) COMPLEX

Ondrej Hrabina, Jana Kasparkova, Tereza Suchankova, Vojtech Novohradsky, Zijian Guo,
and Viktor Brabec

Metallomics 9, 494

Prohlašuji, že můj podíl na přípravě publikace byl následující:

Investigace vazebných parametrů komplexu na DNA za využití metod cirkulárního dichroismu a UV-absorpční spektroskopie. Investigace unikátního vazebného módu v porovnání s ostatními komplexy na bázi platiny.

.....



Cite this: DOI:10.1039/c7mt00052a

Received 23rd February 2017,
Accepted 11th April 2017

DOI: 10.1039/c7mt00052a

rsc.li/metallomics

Unique structural properties of DNA interstrand cross-links formed by a new antitumor dinuclear Pt(II) complex†

O. Hrabina,^{ab} J. Kasparikova,^b T. Suchankova,^a V. Novohradsky,^a Z. Guo^{bc} and Viktor Brabec^{ab*}

The DNA interstrand cross-links of the antitumor drug $[(cis-Pt(NH_3)_2Cl)_2(4,4'-methylene dianiline)]^{2+}$ (**1**) play a prevalent role in its antitumor effects. Complex **1** forms DNA long-range interstrand cross-links uniquely in the 3'-3' direction. Conformational distortions induced by these interstrand cross-links in DNA represent a potential structural motif for recognition by high-mobility-group proteins.

Significance to metallomics

The DNA interstrand crosslinks of a new dinuclear platinum complex play a prevalent role in its antitumor effects. This complex forms DNA long-range interstrand cross-links uniquely in the 3'-3' direction. Conformational distortions induced by these lesions in DNA represent a structural motif for recognition by damaged-DNA binding proteins. Thus, the mechanism of antitumor activity of the dinuclear platinum complex involves the recognition of DNA interstrand cross-links by damaged-DNA binding proteins as a crucial step, a feature not observed for other antitumor platinum drugs. The results may help shed light on the potency of this distinct class of antitumor polynuclear platinum complexes.

Introduction

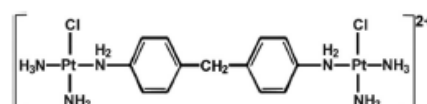
Nuclear DNA is an important molecular target for platinum anticancer compounds. An important feature of the mechanism of action of conventional antitumor cisplatin is that the altered structures produced in DNA by the major 1,2-intrastrand cross-links of cisplatin attract high-mobility-group (HMG) domains and other proteins.¹ This binding of HMG domain proteins to cisplatin-modified DNA has been postulated to mediate or enhance the antitumor properties of the drug.

The HMG protein most frequently used in studies on the recognition of 1,2-intrastrand adducts of cisplatin is HMGB1. This protein consists of two tandem DNA-binding domains, HMG boxes A and B, and a highly acidic C-terminal tail. In full-length HMGB1, it is the A domain that mainly binds to the major DNA adducts of cisplatin.²

Platinum antitumor drugs used in the clinic suffer from major drawbacks, such as intrinsic and acquired resistance and severe side effects. To overcome these limitations, structurally and

functionally unique metallodrugs have been designed.^{3,4} Recent insights into the mechanisms triggering tumor cell death caused by platinum complexes have led to the hypothesis that platinum drugs that damage DNA in a fundamentally different manner than conventional cisplatin may show unique biological properties, including an altered spectrum of antitumor activity.⁵

An earlier report⁶ has introduced a new antitumor dinuclear Pt(II) complex, $[(cis-Pt(NH_3)_2Cl)_2(4,4'-methylene dianiline)]^{2+}$ (complex **1**, Scheme 1), which belongs to a new generation of promising polynuclear platinum drugs resistant to decomposition by sulfur nucleophiles, which hamper the clinical use of several bifunctional polynuclear *trans* Pt^{II} complexes hitherto tested. Complex **1** is quite toxic to ovarian tumor cells, with IC₅₀ values that were comparable to those observed for cisplatin in the cisplatin-sensitive cell line A2780, and noticeably much lower in the cisplatin-resistant cell line A2780cisR. Notably, in contrast to cisplatin, the DNA interstrand cross-links of **1** and the



Scheme 1 Structure of the dinuclear complex $[(cis-Pt(NH_3)_2Cl)_2(4,4'-methylene dianiline)]^{2+}$ (**1**).

^a Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Kralovopolska 135, CZ-61265 Brno, Czech Republic. E-mail: brabec@ibp.cz

^b Department of Biophysics, Faculty of Science, Palacky University, 17. listopadu 12, CZ-77146 Olomouc, Czech Republic

^c State Key Laboratory of Coordination Chemistry, School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210093, P. R. China

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c7mt00052a

Z důvodů dodržení autorských práv není přiložená plná verze publikace.
Článek je dostupný na stránkách:

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2017/mt/c7mt00052a#!divAbstract>

8.1.5. *Publikace 5*

**CYTOTOXIC PLATINUM COORDINATION
COMPOUNDS. DNA BINDING AGENTS**

Viktor Brabec, **Ondrej Hrabina**, Jana Kasparkova

Coordination Chemistry Reviews 351, 2-31

Prohlašuji, že můj podíl na přípravě publikace byl následující:

Příprava a korekce ilustrací struktur komplexů těžkých kovů.

.....



Review

Cytotoxic platinum coordination compounds. DNA binding agents

Viktor Brabec^{a,*}, Ondrej Hrabina^{a,b}, Jana Kasparkova^a^a Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Královopolská 135, CZ-61265 Brno, Czech Republic
^b Department of Biophysics, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 February 2017

Received in revised form 4 April 2017

Accepted 30 April 2017

Available online 6 May 2017

Keywords:

Platinum

DNA binding

Cross-links

Photoactivation

Cytotoxicity

ABSTRACT

Despite the widespread use of antineoplastic platinum drugs, a number of accompanying disadvantages exist. In connection with attempts to circumvent these problems, new platinum compounds have been prepared and mechanisms underlying their biological activity have been extensively investigated. These mechanistic investigations involve research focused on understanding interactions of platinum agents with DNA since DNA binding and recognition of DNA modified by these metalodrugs are the important processes responsible for their anticancer properties. In this review, we discuss how various classes of platinum(II) complexes, which can interact with DNA by coordination, intercalation and other noncovalent modes of binding or by a combination of these DNA binding modes, can alter the cellular response induced by conventional platinum drugs. We describe that these alterations can be achieved by changing: (i) the nature and structure of the DNA lesion induced; (ii) conformational alterations induced in DNA by these lesions; and (iii) various cellular signaling pathways initiated by platinum-DNA damage. We anticipate that summarization of the results on DNA binding of cytotoxic platinum compounds may help to shed light on their potency and will make it possible to create new strategies to design rationally new anticancer platinum compounds and/or combine platinum drugs with other cytotoxic agents.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	3
2. Key experiments suggesting that DNA is the primary target of cisplatin in cells	3
3. Interactions of cytotoxic platinum complexes with DNA	4
3.1. Conventional platinum(II) complexes	4
3.1.1. Cisplatin	4
3.1.2. Bifunctional mononuclear derivatives of cisplatin used clinically	8

Abbreviations: 1,0,1/*tt,t*, [(*trans*-PtCl(NH₃)₂)₂]-*μ*-*cis*-Pt(NH₃)₂(H₂NCH₂)₂NH₂]⁴⁺; 1,0,1/*tt,t*, *trans*-PtCl(NH₃)₂)-*μ*-*trans*-Pt(NH₃)₂(H₂NCH₂)₂NH₂]⁴⁺ (BBR3464); 1,1/*c,c*, [(*cis*-PtCl(NH₃)₂)₂]-*μ*-(H₂NCH₂)₂NH₂]²⁺; 1,1/*cc*, [(*cis*-PtCl(NH₃)₂)₂]-*μ*-OH(*μ*-pyrazolato)]²⁺; 1,1/*tt*, [(*trans*-PtCl(NH₃)₂)₂]-*μ*-(H₂NCH₂)₂NH₂]²⁺; 1,1/*tt*-dien, [(*trans*-PtCl(dien))₂]-*μ*-(CH₂)₂]²⁺; 1,2/*cc*, [(*cis*-PtCl(NH₃)₂)₂]-*μ*-(H₂NCH₂)₂NH₂]-*cis*-PtCl₂(NH₃)₂]²⁺; 1,2/*tt*, [(*trans*-PtCl(NH₃)₂)₂]-*μ*-(H₂NCH₂)₂NH₂]-*cis*-PtCl₂(NH₃)₂]²⁺; 2,2/*c,c*, *cis*-[(Pt(NH₃)Cl₂)₂]-*μ*-(H₂NCH₂)₂NH₂]; 2,2/*tt*-*pp*, *trans*-*trans*-[(Pt(NH₃)Cl₂)₂]-*μ*-piperazine]; 4-*dpt*, 2,4-diamino-6-(4-pyridyl)-1,3,5-triazine; ACRAMTU, 1-[2-(acridin-9-ylamino)ethyl]-1,3-dimethyl thiourea; ACV, acyclovir; AO, acridine orange; BBR3464, *trans*-PtCl(NH₃)₂)-*μ*-*trans*-Pt(NH₃)₂(H₂NCH₂)₂NH₂]⁴⁺ (1,0,1/*tt,t*); BER, base excision repair; bpy, 2,2'-bipyridine; carboplatin, *cis*-diammine[1,1-cyclobutanedicarboxylato]platinum(II); chrysi, 5,6-chrysenquinonediimine; cisplatin, *cis*-diamminedichloridoplatinum(II); CL, cross-link; DAB, 2,3-diaminobutane; DACH, diamminocyclohexane; dien, diethylenetriamine; dpa, bis-(2-pyridylmethyl)amine; DPE, 1,1-di(pyridin-2-yl)ethanol; dppm, 4,4'-dipyrazolylmethane; DSC, differential scanning calorimetry; en, ethane-1,2-diamine; GSH, glutathione; HAAG, human 3-methyladenine DNA glycosylase; Han-acac, anthracenyl appended acetylacetonate; HCNN, 6-phenyl-2,2'-bipyridine; Hcur, curcumin; HET, 2-hydroxyethanethiolate; HL, 4,4'-bis(dimethoxyazobenzene); HMG, high mobility group; HAS, human serum albumin; hptab, *N,N,N',N',N'*-hexakis(2-pyridylmethyl)-1,3,5-tris(amino methyl)benzene; Hpy-acac, pyrenyl appended acetylacetonate; hUBE, human upstream binding factor; JM118, *cis*-diamminedichlorido(cyclohexylamine)platinum(II); ME, 2-mercaptoethanol; MMR, DNA mismatch repair; NER, nucleotide excision repair; NF-κB, nuclear factor-kappa B; oxaliplatin, [(1*R*,2*R*-diamminocyclohexane)oxalatoplatinum(II)]; PARP-1, poly(ADP-ribose) polymerase 1; phen, 1,10-phenanthroline; ptp, 6-(pyridin-3-yl)-3,2':4',3''-terpyridine; RPA, replication protein A; TBP, TATA-binding protein; terpy, terpyridine; TFIIH, transcription factor II H; Tm, melting temperature; tppz, tetrakis(pyridine-2-yl)pyrazine; terpy, terpyridine; XPA, Xeroderma pigmentosum group A protein; XPE-BF, Xeroderma pigmentosum complementation group E binding factor; Yb-1, Y-box binding protein.

* Corresponding author.

E-mail address: brabec@ihp.cz (V. Brabec).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2017.04.013>

0010-8545/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

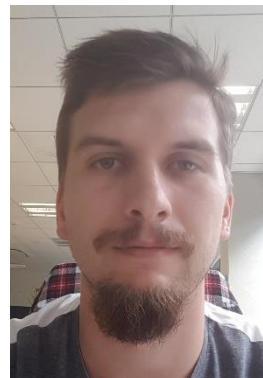
Z důvodů dodržení autorských práv není přiložená plná verze publikace.
Článek je dostupný na stránkách:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0010854517300863?via%3Dihub>

8.2. Strukturovaný životopis

Osobní údaje

Jméno a příjmení: Ondřej Hrabina
Titul: Mgr.
Datum narození: 19. 5. 1991
Adresa: Jabloňova 34, Přerov 751 24
Telefon: +420 721 545 801
E-mail: hrabina.ondra@gmail.com



Pracovní zkušenosti

2019 – nyní **ThermoFisher Scientific, Brno**

- Výrobní inženýr – fyzik
- Podpora výroby a řešení problémů týkajících se fyzikálních aspektů spektrofotometrů
- Samostatné řešení úkolů, návrh a realizace nových výrobních pomůcek

2016 – 2019 **Biofyzikální ústav Akademie věd České republiky, Brno**

- Odborný pracovník – laboratorní analýza nových potenciálně protinádorově účinných farmak a popis jejich interakce s DNA
- Samostatné plánování, realizace a hodnocení experimentů

2019 **Letní škola Badatele pořádaná Univerzitou Palackého**

- Hlavní organizátor Letní školy – organizace a příprava programu a volnočasových aktivit pro středoškolské studenty, administrativa se zajištěním akce, komunikace s účastníky a zřizovatelem Letní školy

2015, 2016 **Letní škola v Jevíčku pořádaná Univerzitou Palackého**

- Pedagogický dozor a přednášející – příprava přednášek a organizace programu a volnočasových aktivit pro středoškolské studenty, administrativa spojená se zajištěním akce, průběžná komunikace s účastníky a zřizovatelem Letní školy

Dosažené vzdělání

2015 – nyní **Universita Palackého v Olomouci**

Obor: Biofyzika – doktorský studijní program

Téma: Energetika, konformace a rozlišení DNA poškozené protinádorově účinnými metalofarmaky.

2013 – 2015 **Universita Palackého v Olomouci**

Obor: Molekulární biofyzika - navazující

Závěrečná práce: Modifikace DNA s novým komplexem platiny cis-[PtII(NH₃)₂I₂].

2010 – 2013 **Universita Palackého v Olomouci**

Obor: Molekulární biofyzika - bakalářský

Závěrečná práce: Stanovení sekvenční preference protinádorově účinné oxaliplatinu na DNA pomocí restrikčních endonukleáz.

Mezinárodní kurzy a stáže

2018

“Epigenetic chemical biology” computational methods in drug design Istanbul, Turecko
COST, CM1406

2017

Pracovní stáž, Joint Institute for Nuclear Research (1. 9. – 29. 11.) Dubna, Rusko
Téma: Matematické modelování opravy DNA poškozené ionizujícím zářením

2014

Wolfram Mathematica summer school Waltham, USA

2014

Higher Mathematica: Modelling differential and difference equations Szeged, Maďarsko

Příspěvky na konferencích

2018

The XXII International scientific conference of young scientists and specialists (AYSS-2018)
23. 4. – 27. 4. 2018 Dubna, Rusko

Příspěvek: Mathematical modeling of DNA repair

Dovednosti

Cizí jazyky:	Anglický jazyk	aktivní
	Německý jazyk	pasivní
	Ruský jazyk	pasivní
Práce na PC:	Mathematica	pokročilý
	Python	mírně pokročilý
	C#	začátečník
	PyMol	pokročilý
	AMBER	mírně pokročilý
	Gaussian	mírně pokročilý
	Linux/Bash	mírně pokročilý

Energetika, konformace a rozlišení DNA
poškozené protinádorově účinnými
metalofarmaky.

*Energetics, conformation and recognition of DNA
damage induced by antitumour metal-based
drugs.*

Autoreferát k disertační práci

Mgr. Ondřej Hrabina

Olomouc 2020

Uchazeč: Mgr. Ondřej Hrabina

Školitel: prof. RNDr. Viktor Brabec, DrSc.

Oponenti:

Místo a termín obhajoby:

S disertační prací a posudky je možné se seznámit na studijním oddělení Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

ABSTRAKT

Chorobám moderní doby jakožto nejrozšířenějším a nejvíce zákeřným onemocněním vévodí rakovina. V dalších 30 letech se předpokládá až dvounásobný nárůst pacientů trpících touto nemocí. Tento nepříznivý trend spolu se současným stavem vedou k překotnému vývoji nových a efektivnějších chemoterapeutik. Nedílnou součástí moderní chemoterapie rakoviny jsou komplexy přechodných kovů. Nejúspěšnějším a jedním z nejvyužívanějších chemoterapeutik je cisplatina. Objev její biologické aktivity Barnetem Rosenbergem odstartoval syntézu nových cytostatik na bázi přechodných kovů. Cílem této rozsáhlé vědecké studie je objevení cytostatik s vyšší účinností a vyšší paletou citlivých nádorů. Dále je vyvíjena snaha o minimalizaci nežádoucích účinků, jako je nevolnost, nefrotoxicita, ototoxicita a v neposlední řadě tzv. získaná rezistence k léčbě. Výše zmíněné komplikace při léčbě konvenčními cytostatiky jsou hlavní hnací silou ve vývoji nových léčiv. Mezi možnosti modifikace cytostatik patří například záměna centrálního atomu, změna oxidačního stavu centrálního atomu či změna geometrie ligandů. V poslední době je také velice populární modifikace cytostatika různými biologicky aktivními ligandy, které podporují duální nebo multimodální efekt léčiva.

Jedním z těchto komplexů je velice slibný {[cis-Pt(NH₃)₂Cl]₂(4,4'-methylenedianilin)}²⁺. Jedná se o nový

z těchto komplexů je velice slibný {[cis-Pt(NH₃)₂Cl]₂(4,4'-methylenedianilin)}²⁺. Jedná se o nový polynukleární komplex. Jeho protinádorová účinnost je srovnatelná s cisplatinou a u buněk na cisplatinu necitlivých dokonce vyšší. Ukazujeme, že jeho další zajímavou vlastností je tvorba podobné deformace v sekundární struktuře DNA ve srovnání s cisplatinou, přestože tvoří diametrálně odlišný typ aduktů na DNA. Také je nutné zmínit, že na rozdíl od konvenčních cytostatik tvoří meziřetězcové vazby výhradně ve směru 3'-3'.

Další cestou je návrh nových struktur metalofarmak, které nejsou založeny na derivatizaci dosud využívaných cytostatik. Příkladem těchto nových struktur jsou takzvané "helikáty", závitnicové struktury obsahující různé atomy kovů navržené prof. Hannonem (University of Birmingham, UK). Helikáty jsou chirální struktury složené z 2 kovových atomů a 3 rigidních organických ligandů.

Helikátní struktury nasyntetizované prof. Scottem (University of Warwick, UK) se ukázaly jako velice účinná antimikrobiální agens působící i na některé gram negativní bakterie. Zajímavý je také fakt, že pozorované vlastnosti helikátů při interakci s bakteriemi byly velice podobné jako u zavedených antibiotik. Tyto helikáty také silně interagují s DNA. Pouze dva helikáty, a to oba enantiomery **1** se váží na DNA organizovaně. Ostatní helikáty se váží náhodně. Ukázali jsme, že vzhledem

k polykationnímu charakteru těchto komplexů jsou tyto látky schopny velice účinně kondenzovat DNA. V neposlední řadě jsou tyto látky schopny velice účinně inhibovat klíčové buněčné enzymy, jako je RNA polymeráza či topoisomeráza I.

Oxidativní poškození DNA při aerobní respiraci a oxidativním stresu se objevuje v široké paletě nemocí. Častým příkladem je oxidativní poškození pyrimidinových bází, zejména cytosinu. 5-hydroxyuridin a 5-methylhydroxyuridin jsou dva zástupci takovýchto poškození. Zatímco 5-hydroxyuridin je známý svou mutagenní aktivitou, 5-methylhydroxyuridin je považován za slibnou epigenetickou značku. Tento rozdíl je velice zajímavý vzhledem k minimálnímu rozdílu v jejich struktuře. Vliv inkorporace těchto lézí do DNA jsme studovali simulací translázové syntézy a z hlediska termodynamiky metodou „Microscale“ termoforézy. Bylo zjištěno že, některé DNA polymerázy jsou schopné snadno obejít poškození způsobené 5-methylhydroxyuridinem, což pravděpodobně způsobuje jeho menší mutagenitu. Získané výsledky jsou konzistentní s rolí 5-methylhydroxyuridinu jako epigenetické značky.

ABSTRACT

Cancer is the most widespread disease of modern times. Approximately two-fold rise of cancer patients is expected in the next 30 years. This unpleasant trend, combined with the current status of development, leads to the rapid development of new and more effective anticancer chemotherapeutics. Metal-based drugs represent an integral part of modern chemotherapy of cancer. The most successful and one of the most used chemotherapeutics is cisplatin. Discovery of its biological activity by Barnett Rosenberg started the synthesis of new cytostatic drugs based on transition metals. The goal of this enormous project was the discovery of cytostatic drugs with higher efficiency and a broader portfolio of sensitive tumours in comparison with cisplatin. There is also a great effort to reduce undesirable side effects of the drug such as nephrotoxicity or ototoxicity. Another significant problem is the so-called acquired resistance. These complications are the main driving force for the development of new drugs. A way to modify cytostatic drugs is for example change of the central atom, change of oxidative state of the central atom, or altering of the ligand geometry. Recently modification of the cytostatic drug by biologically active ligands grew in popularity.

One of those derivatives is very prominent {[cis-Pt(NH₃)₂Cl]₂(4,4'-methylenedianiline)}²⁺. It is a new polynuclear platinum-based drug. Its antitumor efficiency is comparable with cisplatin for cells sensitive to cisplatin. Notably, this complex is efficient in cells resistant to cisplatin. We show that another important property of this complex is also a creation of DNA distortions similar to those induced by cisplatin, even though adducts on DNA made by this complex are dramatically different. Interstrand crosslinks produced by this complex are formed exclusively in the 3'-3' direction, compared to the 5'-5' direction observed in conventional platinum-based drugs.

Another way how to develop new structures of metal-based drugs is to design a structure that is not based on drugs used so far. Examples of these structures are so-called metallohelicates, helical structures designed and synthesized by prof. Hannon (University of Birmingham, UK). These metallohelicates are chiral structures composed of three relatively rigid organic ligands and two metal ions.

Helicate structures developed and synthesized by prof. Scott (University of Wawrick, UK) have shown very promising antimicrobial activity towards gram-negative bacteria. The observed activity and properties of the helicates are very similar to some conventional antibiotics. These structures also interact with DNA. The organized bond was observed only in both enantiomers

of helicate **1**. Other helicates were bound unorganized. Moreover, we show that these helicates are very potent agents that condense/aggregate DNA. Interestingly, a decrease of activity of key cellular enzymes such as RNA polymerase or topoisomerase I in the presence of helicates has been observed.

Oxidative damage of the DNA during aerobic respiration and oxidative stress is involved in various diseases. A typical example is oxidative damage of pyrimidine bases, especially cytosine. Two representatives are 5-hydroxyuridine and 5-methylhydroxyuridine. While 5-hydroxyuridine is known for its mutagenic activity, 5-methylhydroxyuridine is considered a potent epigenetic marker. This difference is very interesting because there is only a slight difference in their structures. We demonstrate that the effect of incorporation of these two lesions into DNA can be observed by microscale thermophoresis and simulation of translesion synthesis. The results have shown that polymerases can simply bypass damage caused by 5-methylhydroxyuridine, which is probably responsible for its lesser mutagenicity. The observed results are in agreement with the role of 5-methylhydroxyuridine as an epigenetic marker.

OBSAH

1. Úvod.....	10
1.1. Výzva moderní medicíny – rakovina	10
1.2. Historie protinádorových léčiv na bázi kovů.....	10
1.3. Vývoj nových léčiv na bázi kovů	12
1.3.1. Protinádorově účinná analoga cisplatiny	12
1.3.2. Polynukleární komplexy platiny.....	14
1.3.3. Helikáty	15
1.4. Mechanismus působení léčiv na bázi platiny	19
1.5. DNA	21
1.5.1. Energetika dvoušroubovice DNA.....	23
1.5.2. Oxidativní poškození DNA.....	26
2. Cíle práce	28
3. Výsledky a diskuze	29
3.1. Optically pure metallogelicates that accumulate in cell nuclei, condense/aggregate DNA and inhibit activities of DNA processing enzymes. (Publikace 1)	30

3.2.	Translesion DNA synthesis across lesions induced by oxidative products of pyrimidines. An insight into the mechanism by microscale thermophoresis. (Publikace 2).....	35
3.3.	Metallohelicates that kill Gram-negative pathogens using intracellular antimicrobial peptide pathways. (Publikace 3)	37
3.4.	Unique structural properties of DNA interstrand cross-links formed by a new antitumor dinuclear Pt(II) complex. (Publikace 4)	42
4.	Závěr	44
5.	Seznam použité literatury	48
6.	Seznam použitých zkratek	57
7.	Přílohy.....	58
7.1.	Seznam publikací	58
7.2.	Strukturovaný životopis	60

1. Úvod

1.1. Výzva moderní medicíny – rakovina

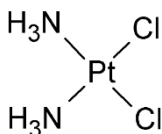
Rakovina je pojmenování skupiny onemocnění, které se vyznačují abnormálním buněčným dělením. Tento stav je způsoben poškozením genetické informace, které naruší kontrolu buněčného cyklu. K rozšíření onemocnění dochází v případě, že se poškozené buňky začnou nekontrolovatelně dělit a formovat různé stupně nádorů. Léčením rakoviny se rozumí odstranění všech rakovinných buněk. Hlavní způsoby léčby jsou operační zákrok a radiační terapie pro lokalizované nádory a chemoterapie pro nádory nelokalizované. Velice často dochází ke kombinaci různých způsobů léčby a vytvoření „léčebného balíčku“, který je vhodný k léčbě pacienta a zjištěného nádoru [Internetové zdroje – [11]].

1.2. Historie protinádorových léčiv na bázi kovů

První záznam o cisplatině je bezmála 175 starý [1]. Poprvé byla syntetizována roku 1844 v laboratoři německého chemika

Michaela Peyrona. Při pokusu o syntézu komplexu platiny známém jako Magnusova zelená sůl.

Cesta cisplatiny k titulu nejúspěšnějšího chemoterapeutika začala bezmála bez mála před 60 lety v laboratoři Barnetta Rosenberga na Michiganské státní univerzitě ve Spojených státech [2, 3]. Hlavním zájmem prof. Rosenberga byl výzkum vlivu elektromagnetického pole na buněčné dělení u bakterií a savčích buněk. Během prvních experimentů s *E. coli* používal elektrody vyrobené z platiny. Po vystavení bakterií elektromagnetickému poli se bakterie staly velice dlouhými filamenti na rozdíl od normálního stavu, kdy vypadají jako malé tyčinky. Tohoto efektu nebylo dosaženo vystavením bakterií elektromagnetickému poli, ale mohly za něj produkty vzniklé elektrolyzou na platinových elektrodách. Detailní analýzou byl identifikován aktivní komplex zodpovědný za pozorovaný efekt: *cis* - $[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ později pojmenován jako cisplatina (Obr. 1) [2, 3].



Obrázek 1: Struktura cisplatiny (nakresleno v programu ChemSketch)

Po objevení biologické aktivity na buňkách byla testována účinnost cisplatiny na různé typy rakoviny. [2] Cisplatina je velice účinná při léčbě nádorů hlavy, krku a zejména rakoviny varlat. Velké množství pacientů úspěšně léčených cisplatinou odstartovalo zájem o nová léčiva obsahující kovy.

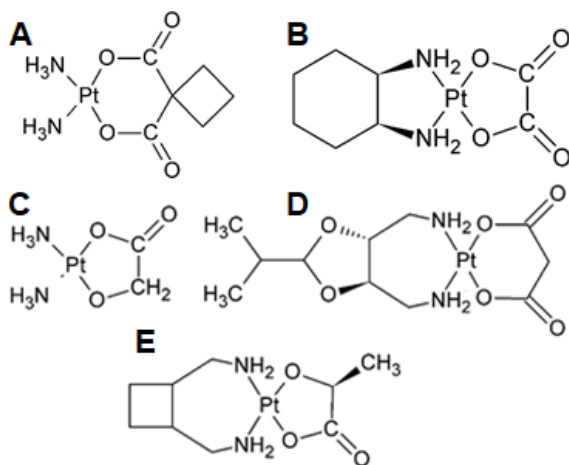
1.3. Vývoj nových léčiv na bázi kovů

Přestože cisplatina je jedním z neúčinnějších léků, má její použití limitace. [4] Ačkoliv se cisplatina využívá k léčbě, je to stále jed. Pacienti, kterým je cisplatina podána, trpí vážnými vedlejšími účinky. Nejběžnějšími jsou snížená krevtvorba, nevolnost a zvracení. Mezi závažnější vedlejší účinky patří nefrotoxicita (poškození ledvin), neurotoxicita a v neposlední řadě poškození sluchu. Výše zmíněné toxické účinky cisplatiny jsou závislé zejména na podané dávce. Pomocí správného dávkování a doplňkové léčby dochází ke zmírnění vedlejších účinků.

1.3.1. Protinádorově účinná analoga cisplatiny

Od představení cisplatiny jako velice účinného cytostatika bylo klinicky testováno více jak 23 analog [5]. Většina prvních pokusů byla neúspěšná z důvodu nedostatečné rozpustnosti, nízké aktivity

nebo nepředpokládaných závažných vedlejších účinků. V klinické praxi je kromě cisplatiny používáno 5 jejích analog [6]. Celosvětově jsou používány karboplatina a oxaliplatina, zatímco lobaplatina, nedaplatina a heptaplatina jsou používány zejména v jihovýchodní Asii (Jižní Korea, Japonsko a Čína.) (Obr. 2) Tyto deriváty cisplatiny způsobují buněčnou smrt na základě podobného mechanismu jako cisplatina.



Obrázek 2: A: karboplatina, B: oxaliplatina, C: nedaplatina, D: heptaplatina, E: lobaplatina. (nakresleno v programu ChemSketch)

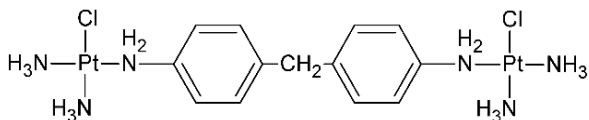
1.3.2. *Polynukleární komplexy platiny*

I přes pokroky v minimalizaci toxických vedlejších účinků a překonání resistance nádorových buněk zůstává spektrum citlivých nádorů pro všechna cytostatika odvozená od cisplatiny téměř neměnné [7]. Jedním z vysvětlení je fakt, že všechna analoga cisplatiny tvoří s DNA velice podobné adukty.

Důsledkem je snaha vyvinout komplexy s geometrií lišící se od „klasické“ geometrie cisplatiny. Polynukleární komplexy platiny jsou nová metalofarmaka, která jsou strukturně naprosto odlišná od cisplatiny a jejích analog [8, 9]. Tyto komplexy obsahují dvě nebo více reakčních center, která jsou spojená aromatickými nebo alifatickými řetězci a od cisplatiny se liší nejen svou geometrií, ale i mechanismem působení.

Mezi vlastnosti těchto komplexů patří vzdálené odstupující ligandy, dlouhé vnitřetězcové a meziřetězcové příčné vazby, které ovlivňují strukturu DNA. V neposlední řadě je nutno zmínit, že tato poškození jsou rozeznávána specifickými proteiny a jsou opravována jinými mechanismy než adukty cisplatiny a jejích analog. Tyto nové komplexy tvoří kompletně nový směr uvažování při syntéze nových cytostatik a nabízejí vysoký potenciál při vývoji nových protinádorově účinných agens.

Mezi velice slibné zástupce patří komplex $\{[cis-Pt(NH_3)_2Cl]_2(4,4\text{-methylenedianilin})\}^{2+}$ (Obr. 3)



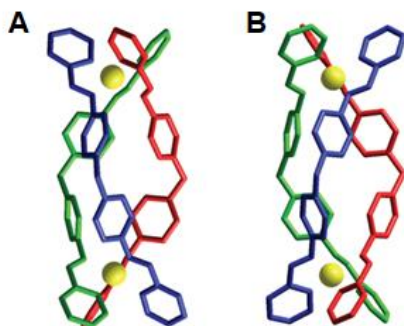
Obrázek 3: Komplex $\{[cis-Pt(NH_3)_2Cl]_2(4,4-$
methylenedianilin)\}^{2+} (nakresleno v programu ChemSketch)

Tento komplex je resistantní k deaktivaci nukleofilními látkami obsahujícími síru [8, 10]. Hodnoty IC_{50} u buněk rakoviny vaječníku jsou porovnatelné s hodnotami cisplatin. V případě buněk resistantních jsou hodnoty IC_{50} podstatně nižší, než je tomu u cisplatin. Mezi nejzajímavější aspekty tohoto komplexu patří rozdílné vlastnosti meziřetězcové příčné vazby v porovnání se stejným typem aduktu u cisplatin. Tento komplex byl detailně studován v článku 4.

1.3.3. Helikáty

Další cestou je návrh nových struktur metalofarmak, které nejsou založeny na derivatizaci dosud využívaných cytostatik. Příkladem těchto nových struktur jsou takzvané "helikáty", závitnicové struktury obsahující různé atomy kovů navržené prof. Hannonem (University of Birmingham, UK). Helikáty jsou chirální struktury složené z 2 kovových atomů a 3 rigidních organických ligandů [11, 12]. Tyto helikátní struktury se vyskytují

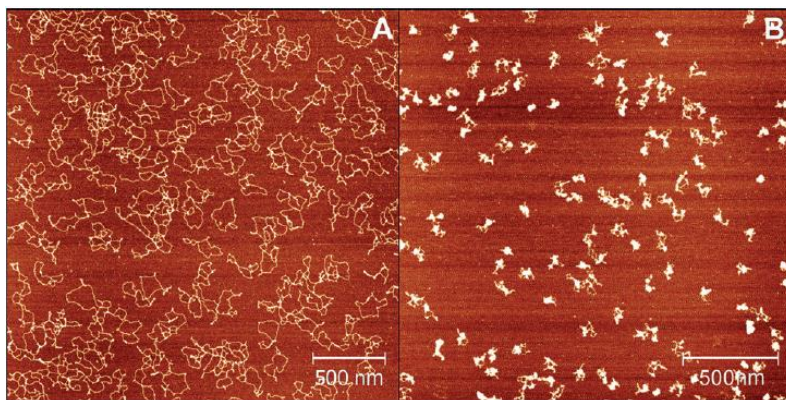
ve formě dvou optických enantiomerů, a to pravotočivého (P, Δ) a levotočivého (M, Λ) (Obr. 4).



Obrázek 4: 3D struktura helikátů. A: Levotočivý optický isomer .
B: Pravotočivý optický isomer (Převzato a upraveno z: [14])

Helikáty byly navrženy k nekovalentní vazbě do velkého žlábků DNA. Navržené komplexy mají rozměry podobné motivům, u kterých je známa vazba do velkého žlábků DNA (alfa šroubovice v proteinech a tzv. zinkový prst). Je důležité zmínit, že pro vazbu do malého žlábků jsou helikáty příliš velké. Svou vazbou ovlivňují sekundární strukturu DNA [13]. Při vazbě na DNA dochází v případě obou enantiomerů k ohybu a rozvíjení DNA. Helikáty ohýbají DNA o přibližně 45°. Dále M enantiomer rozvíjí o 32° a P enantiomer o 22°. Pokud srovnáme míru rozvítí dvoušroubovice způsobenou helikáty s dalšími neinterkalujícími látkami, zjistíme, že helikáty rozvíjí velice účinně. Zajímavou vlastností helikátů

se ukázala jejich schopnost velice účinně kondenzovat DNA [12]. Tato schopnost je způsobená vysokým kladným nábojem helikátů (4+). Bylo prokázáno, že M enantiomer má schopnost kondenzovat jednotlivé molekuly DNA (Obr. 5).

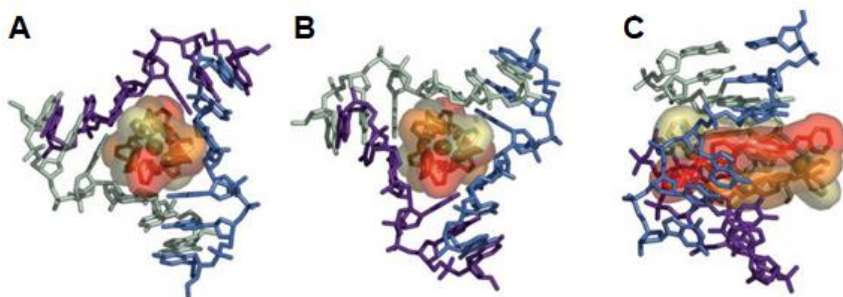


Obrázek 24: Kondenzace jednotlivých molekul DNA enantiomerem M. A: plazmid pSP73 v přítomnosti 0,625 μ M enantiomeru M, B: plazmid pSP73 v přítomnosti 1,25 μ M enantiomeru M (převzato a upraveno z: [12])

Přestože je náboj shodný se sperminem, který se používá ke kondenzaci DNA, je aktivita M enantiomeru podstatně vyšší. Dále je zajímavé, že na rozdíl od konvenčních kondenzačních látek tento komplex nevyvolává mezimolekulovou agregaci.

Velkým překvapením bylo objevení druhého vazebného módu [11, 14, 15]. Helikáty se neváží jen do dvoušroubovice DNA,

ale překvapivě se váží i do neobvyklých struktur DNA, jako jsou trojcestné rozhraní, výdutě a kvadruplexy. Vazbou do neobvyklé struktury nedošlo u helikátu k výrazné změně struktury a dokonale do ní zapadl. (Obr. 6)



Obrázek 6: Vazba helikátu do třícestného rozhraní. A: Pohled ze strany velkého žlábků, B: pohled ze strany malého žlábků, C:postranní pohled. (Převzato a upraveno z: [16])

Helikáty kromě interakce s DNA inhibují důležité buněčné enzymy [12]. V případě RNA polymerázy jsou koncentrace M a P enantiomerů nutné k zastavení transkripce přibližně 233krát a 117krát menší, než je tomu u sperminu. Předpokládá se, že alespoň částečně se na tomto jevu podílí schopnost helikátu kondenzovat DNA.

Helikáty inhibují činnost topoisomerázy I při koncentracích pro M 500krát a pro P 250krát nižší, než je tomu u sperminu. Tyto nízké koncentrace jsou velice blízké koncentracím inhibitorů

topoisomerázy I používaných při léčbě rakoviny. Při takto nízkých koncentracích nejsou helikáty schopny kondenzovat DNA, tudíž efekt inhibice topoizomerázy nemůže být vysvětlen kondenzací DNA.

1.4. Mechanismus působení léčiv na bázi platiny

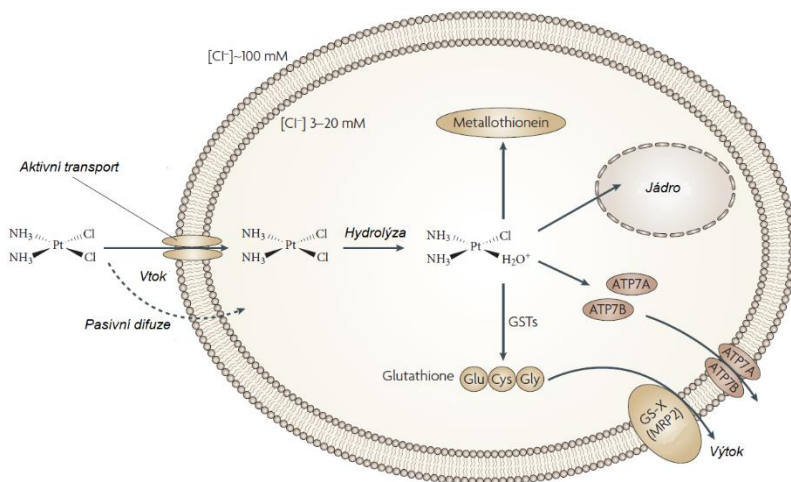
Od objevu protinádorového účinku cisplatin bylo vynaloženo nemalé úsilí k objasnění jejího mechanismu působení [17]. Prvním problémem se ukázalo stanovení biologického cílového místa působení. Buňka obsahuje více komponent schopných reakce s cisplatinou, zejména nukleové kyseliny, proteiny, fosfolipidy a v neposlední řadě cytoskelet. Až pozdější experimenty určily DNA jako cílové místo působení cisplatin a příbuzných protinádorově účinných farmak.

Mechanismus působení je již několik dekad předmětem intenzivního výzkumu [18]. Zjednodušené reakční schéma zahrnuje čtyři klíčové kroky: vstup do buňky, aktivace léčiva, vazba na DNA a buněčná reakce na poškození vedoucí k buněčné smrti.

Stabilita cisplatin je v krevním řečišti zajištěna vysokou koncentrací chloridových aniontů [2, 19, 20]. Cisplatin vstupuje do buňky zejména pasivní difuzí, kdy vstup agens do buňky

proprčně roste s rostoucí koncentrací v médiu. Na další možnost vstupu do buňky poukázaly experimenty zabývající se inhibicí aktivního transportu buňky. Nejslibnějšími kandidáty na transportéry podílející se na vstupu cisplatinu do buňky jsou transportéry mědi Ctr1 a Ctr2.

Po vstupu cisplatinu do buňky dochází k její aktivaci. Aktivací je myšlena tzv. hydratace cisplatinu, kdy jsou odstupující chloridové ligandy nahrazeny vodou v důsledku nižší koncentrace chloridových iontů (méně než 20 mM) v cytoplazmě. Schéma vstupu cisplatinu do buňky a její aktivace je zobrazeno na obrázku 7.



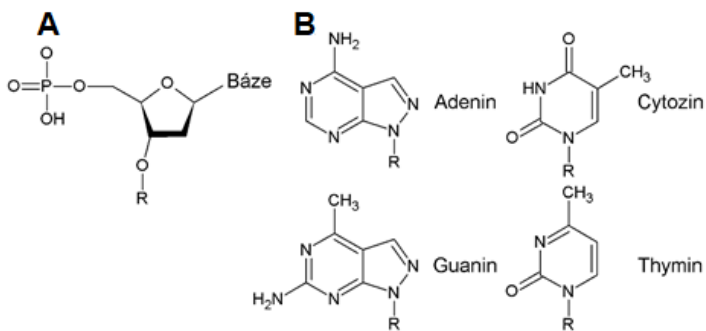
Obrázek 7: Schéma působení cisplatinu. (Převzato a upraveno z:

[2])

1.5. DNA

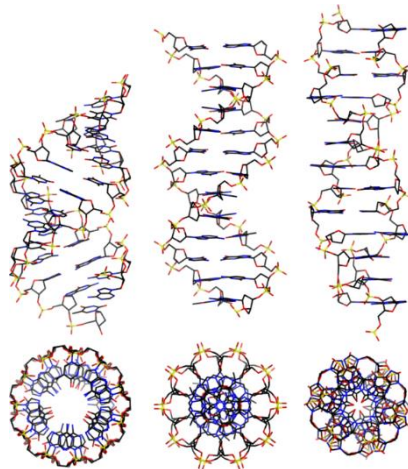
Deoxyribonukleová kyselina (DNA) se spolu s ribonukleovou kyselinou (RNA), proteiny, lipidy a sacharidy řadí mezi základní typy biomolekul, které jsou esenciální pro všechny známé formy života. DNA je nositelkou genetické informace. V sekvenci DNA jsou uloženy instrukce pro funkci, vývoj a růst organismu. O důležitosti DNA také vypovídá fakt, že je jako jediná molekula v buňce opravována.

Deoxyribonukleová kyselina (DNA) je dlouhý lineární polymer složený ze dvou řetězců, které obsahují čtyři typy nukleotidových jednotek, které spolu s cukerným zbytkem a fosfátovým zbytkem tvoří tzv nukleotid (Obr. 8). [24]



Obrázek 8: A: struktura nukleotidu. B: struktury bází obsažených v DNA. (nakresleno v programu ChemSketch)

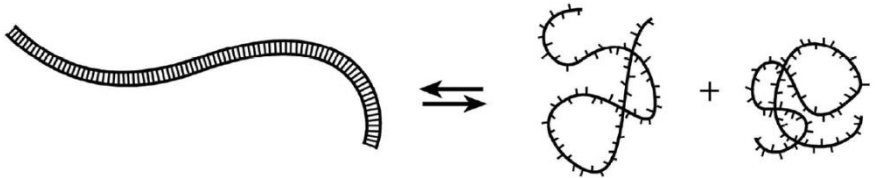
Genetická informace je uložena ve formě dlouhých dvouřetězcových molekul DNA [25]. Vodíkové vazby mezi příslušnými nukleotidy udržují komplementární řetězce DNA organizované jako pravotočivou šroubovicovou strukturu nazývanou B-DNA. Strukturální přechody do dalších forem DNA mohou nastat při výskytu určitých sekvencí a mohou mít význam pro interakci DNA s proteiny, enzymy či se mohou podílet na regulaci genové exprese. Tyto struktury se mohou také podílet na formaci nukleozomů a jiných supramolekulárních struktur, které obsahují DNA. Pravotočivé formy A- a B- DNA jsou tvořeny náhodnými/nеспецифickými sekvencemi, zatímco levotočivá Z-DNA vyžaduje specifickou sekvenci (Obr. 9).



Obrázek 9: Srovnání kanonických forem DNA. Zleva: A-DNA, B-DNA, Z-DNA (Převzato z Internetové zdroje – [12])

1.5.1. Energetika dvoušroubovice DNA

Studium energetiky a tání dvoušroubovice je jedním z hlavních témat zájmu biofyziků v posledních 60 letech [26]. Proces tání dvoušroubovice, nebo také denaturace, je hlavním zdrojem informace o energetice dvoušroubovice DNA. Denaturaci lze chápat jako rovnovážný přechod rigidní dvoušroubovicové struktury na dvě flexibilní vlákna DNA (Obr. 10)



Obrázek 10: Schéma tání DNA (Převzato a upraveno z: [26])

Jedním ze základních parametrů dvoušroubovice DNA je takzvaná teplota tání [27]. Teplota tání je definována jako teplota, při které je 50 % molekul DNA ve vzorku denaturováno. Používá se zejména k popisu stability dvoušroubovice DNA. Stabilita dvoušroubovice DNA skládající se ze dvou kovalentních řetězců spojených Watson-Crickovými vodíkovými vazbami závisí na délce, bázevému složení, sekvenci, pH, teplotě a iontové síle prostředí. Proces tání DNA je důležitý nejen pro popis vlastností, ale hraje důležitou roli v při replikaci a transkripci DNA.

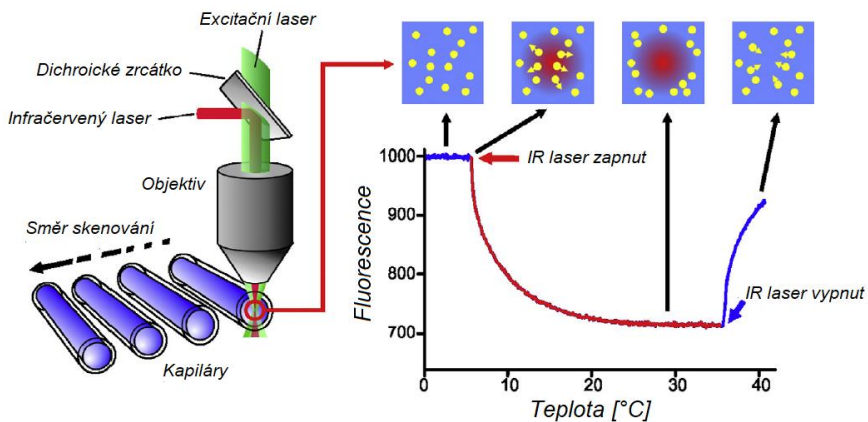
Termodynamickými parametry DNA se rozumí entalpie ΔH , entropie ΔS a Gibbsova energie ΔG . [28] Souvislost mezi těmito veličinami udává vztah 1.

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (1)$$

Termodynamická informace skrytá v křivkách tání napomáhá pochopení závislosti stability dvoušroubovice na sekundární a primární struktuře DNA [29].

Další přístup pro získání termodynamických parametrů DNA je jejich přímé měření. První metodika je kalorimetrické stanovení [30, 31]. Při kalorimetrickém měření se měří teplo, které bylo uvolněno či dodáno systému.

Nejnovější metodikou pro stanovení termodynamických parametrů je „Microscale“ termoforéza (MST) [32]. V této metodice je využito změny hybnosti molekuly v teplotním gradientu v závislosti na hmotnosti a solvatační obálce molekuly. Tento efekt se nazývá termodifuze nebo také Sorretův efekt [33]. Změna je pak měřena jako pokles fluorescence signální molekuly. Nesmírnou výhodou této metody je možnost práce v extrémně nízkých koncentracích a objemech, což je umožněno zejména použitím kapilár místo kyvet. Detailněji je princip znázorněn na obrázku 11.



Obrázek 11: Schéma Microscale thermoforézy. Schematická reprezentace MST optiky. Typický signál experimentu MST. Zpočátku jsou molekuly homogenně distribuovány a je detekována konstantní „počáteční fluorescence“. V rámci první sekundy po aktivaci IR laseru je pozorován „T-Jump“, což odpovídá rychlé změně vlastností fluoroforu v důsledku rychlé změny teploty. Následně může být detekován termoforetický pohyb fluorescenčně značených molekul ze zahřátého objemu vzorku. Typicky je změna fluorescence měřena po dobu 30 s. Po deaktivaci IR-laseru dochází k inverznímu T-Jumpu a následnému „zpětnému rozptýlu“ molekul, který je poháněn pouze hromadnou difúzí. (Převzato a upraveno z: [32])

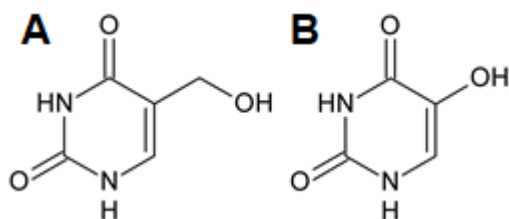
Výstupem termoforézy je vysoce přesné určení disociační konstanty k_d , kterou dává do souvislosti s termodynamickými veličinami vztah 2.

$$\Delta G = -RT \ln k_d \quad (2)$$

1.5.2. Oxidativní poškození DNA

Poškození způsobené oxidací bází při aerobní respiraci a oxidativním stresu se objevuje v široké paletě nemocí a v neposlední řadě má vliv na stárnutí. [34]. V buňkách je tento typ poškození způsoben reaktivními formami kyslíku (ROS).

Příkladem takového poškození jsou deriváty pyrimidinových bází 5-hydroxyuridin (HdU) a 5-methylhydroxyuridin (HMdU) (Obr.12) [35]. HdU vzniká zejména oxidativní deaminací cytozinu při vystavení reaktivním formám kyslíku.



Obrázek 12: A: Struktury HMdU a B: HdU (nakresleno v programu ChemSketch).

HMdU vzniká oxidací thyminu a také enzymatickou oxidací thyminu. Inkorporace HdU vede k přidání adeninu do komplementárního řetězce, což vyústí za záměnu G:C páru za pár A:T [36]. Inkorporace HdU je tedy považována za premutagenní. Při inkorporaci HMdU také preferenčně dochází přidání adeninu do komplementárního řetězce, ale nedochází k záměně páru. Tato inkorporace je tedy považována za nemutagenní.

Zajímavou vlastností HdU je, že nenarušuje strukturu dvoušroubovice DNA. DNA polymerázy rutinně obchází toto poškození a preferenčně inkorporují proti HdU adenin. Tato léze je při výskytu v DNA mutagenní, ale ne cytotoxická [37]. HdU je schopné formovat stabilní pár s A, G, C i T, což poukazuje na vysoký mutagenní potenciál [38].

Přítomnost HMdU nenarušuje sekundární strukturu DNA, ale zvyšuje flexibilitu a narušuje interakce DNA-protein [35]. V tomto případě formování mutagenní léze nesouvisí s inkorporací HMdU, ale s procesem odstranění z DNA pomocí reparačních enzymů a následných chybách v opravě. HMdU je jedním z epigenetických modifikací DNA, které byly v poslední době objeveny. Tento derivát pyrimidinu je v porovnání s HdU cytotoxický a má antivirální aktivitu [39, 40].

2. Cíle práce

Disertační práce se skládá z několika částí. První část se zabývá novými helikátními strukturami, tzv. flexikátů, a jejich interakcí jak s DNA, tak s buněčnými proteiny. Druhá část se zabývá vazbou komplexu $\{[cis-Pt(NH_3)_2Cl]_2(4,4'-methylendianilin)\}^{2+}$ na DNA. Poslední část práce se zabývá vlivem mutace v sekvenci DNA na termodynamické parametry dvoušroubovice DNA.

Cílem disertační práce je popsání vazby nových metalofarmak na DNA. Využití získaných poznatků povede k dokonalejšímu popisu mechanismu vazby a mechanismu působení těchto farmak. Studie provedené v této práci přispěly k řešení projektů zaměřených na problematiku nových metalofarmak a na problematiku molekulární farmakologie při terapii nádorových onemocnění.

3. Výsledky a diskuze

Experimentální část předkládané disertační práce je založená na 4 článcích publikovaných v mezinárodních žurnálech. Výsledky jsou pak rozděleny do několika kategorií dle problematiky příslušných článků. Kopie publikací jsou součástí příloh práce.

První část práce se zabývá vlastnostmi nových metalohelikátních struktur, tzv. flexikátů. Objektem zájmu je celkové chování těchto struktur v buňce a základní popis jejich interakce s DNA a buněčnými proteiny.

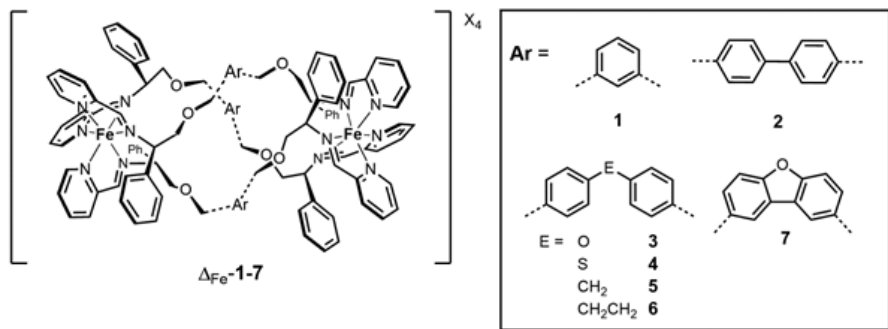
Druhá část je zaměřena na popis interakce dinukleárního komplexu platiny s DNA, která je biologickým cílem dané látky. Cílem práce byl zejména popis vazby tohoto komplexu na DNA.

V poslední části textu práce je shrnutý vliv mutace v primární struktuře DNA na termodynamické parametry dvoušroubovice. Jedná se o přirozeně se vyskytující mutace způsobené oxidativním stresem, kdy thymin mutuje na 5-hydroxyuridin nebo 5-hydroxymethyluridin.

3.1. Optically pure metallogelicates that accumulate in cell nuclei, condense/aggregate DNA and inhibit activities of DNA processing enzymes. (Publikace 1)

Tato práce navazuje na práci našeho zahraničního partnera prof. Scotta. Zatímco předešlá práce [3] byla zaměřena zejména na syntézu metalohelikátů a jejich interakci s mikrobiálními patogeny, tato práce je zaměřena na interakci daných helikátů s DNA, která je potenciálním farmakologickým cílovým místem této skupiny látek. Na základě předchozích pozorování byla tato práce zaměřena zejména na schopnost kladně nabitých helikátů kondenzovat/agregovat DNA [12]. Znalost mechanismu kondenzace DNA je nepostradatelná pro pochopení její role v regulaci genové exprese u živých organismů. Dále komplexy vázící se na DNA ovlivňují aktivitu důležitých enzymatických procesů, které probíhají přímo na DNA. Proto byl v rámci této práce studován vliv metalohelikátů (Obr. 13) na transkripční

aktivitu RNA polymerázy II a aktivitu dalších enzymů pracujících s DNA.



Obrázek 13: Schéma metalohelikátů a struktury ligandů 1–7.

(Značení helikátů převzato z: [41])

Výsledky předešlé práce prokázaly, že studované helikáty jsou schopny vstoupit do bakteriálních buněk. V této práci je studován vliv helikátů na buňky eukaryotní. Jako model byly použity buňky rakoviny tlustého střeva HCT116p53^{+/+}. Koncentrace iontů železa v buňce byly stanoveny metodou hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) po vystavení buňky oběma enantiomerům helikátů 1 a 5 o koncentraci 10 μM po dobu 6 hodin. Koncentrace 10 μM byla zvolena jako kompromis mezi vysokou toxicitou helikátů a detekčními limity metody ICP-MS. Výsledky naznačují, že geometrie spojovacího ligandu ovlivňuje

vstup helikátu do buňky, zatímco enantiomerní vinutí helikátu nikoliv.

Dále byla zkoumána akumulace helikátů v přečištěných a lyzovaných jádrech HCT116p53^{+/+}. Výsledky ukázaly, že 42 – 84 % helikátů **Λ-1**, **Δ-1**, **Λ-5** a **Δ-5** je akumulováno v jádře a může tedy interagovat s jadernou DNA. Byla pozorována vyšší akumulace enantiomerů helikátu **5** v porovnání s enantiomery helikátu **1**. Dalším rozdílem je různá akumulace jednotlivých enantiomerů. Enantiomeru Δ příslušného helikátu bylo v jádře nalezeno přibližně o 10 % více než enantiomeru Λ .

Vzhledem k důležitosti interakce helikátů s DNA a kvůli k jejich mechanismu působení byla studována náchylnost buněk HCT116p53^{+/+} k poškození jejich DNA helikáty. Pro studium poškození byl použit tzv kometový test (Comet assay). V alkalické verzi tohoto testu byla po vystavení buněk HCT116p53^{+/+} helikátům **Λ-1**, **Δ-1**, **Λ-5** a **Δ-5** zjištěna absence jak jednořetězcových, tak dvouřetězcových zlomů. Helikáty také neprojevily schopnost omezení tvorby „ohonu“ u buněk vystavených peroxidu vodíku, což naznačuje neschopnost helikátů tvořit nezvratné adukty na DNA.

Předešlé práce identifikovaly helikáty jako látky vážící se na DNA, aniž by způsobily její poškození. K dalšímu prozkoumání vazebných vlastností metalohelikátů na DNA byla studována jejich přímá reakce s ctDNA. Vazebná afinita helikátů **1** – **7** byla

stanovena metodou vytěšňování ethidium bromidu. Všechny zkoumané helikáty prokázaly vysokou afinitu k ctDNA.

Investigace spekter lineárního dichroismu ctDNA v přítomnosti helikátů odhalila, že oba enantiomery helikátu **1** se na DNA váží ve specifické orientaci pravděpodobně do velkého žlábků. Vazba helikátů **2 – 7** se zdá být náhodná na základě interakce mezi kladně nabitým helikátem a záporně nabitými fosfátovými skupinami v DNA. Redukce signálu DNA při 260 nm při narůstající koncentraci helikátů naznačuje zvýšení flexibility DNA ve vzorku nebo její zkrácení vlivem jejího svinutí či monomolekulární kondenzací/multimolekulární agregací.

Experimenty zabývající se agregací/kondenzací DNA prokázaly, že helikáty **2 – 7** jsou při nízkých koncentracích schopny kondenzovat DNA, což je pravděpodobně způsobeno elektrostatickou vazbou kladně nabitých helikátů na záporně nabitou kostru DNA. V porovnání je helikát **1** výrazně slabší kondenzační/agregační agens. Toto tvrzení bylo ještě podpořeno zobrazením linearizovaného plazmidu v přítomnosti helikátů pomocí mikroskopie atomárních sil. Tato skutečnost je v souladu s hypotézou, že se helikát **1** preferenčně váže do velkého žlábků DNA, čímž je výrazně snížena jeho schopnost vyvolat multimolekulární agregaci/kondenzaci DNA. Místo toho je posílena schopnost helikátu **1** kondenzovat jednotlivé molekuly DNA. Tato schopnost byla již dříve pozorována u helikátů

$[\text{Fe}_2(\text{L})_3]\text{C}_{14}$ ($\text{L} = \text{C}_{25}\text{H}_{20}\text{N}_4$) [42]. Výsledky ukazují, že agregační/kondenzační vlastnosti těchto helikátů nejsou řízeny pouze vysokým elektrostatickým nábojem, ale spíše velikostí a tvarem každého helikátu, který ovlivňuje vazebnou orientaci a místo vazby na DNA.

Látky schopné kondenzovat DNA jsou často používány k narušení kritických enzymatických pochodů týkajících se DNA. Enzymatické studie ukázaly, že aktivita enzymů pracujících s DNA je značně snížena. Pro studii byla použita RNA polymeráza, topoisomeráza I a restriční enzym EcoRI. Aktivity těchto enzymů byly sníženy helikáty **2 – 7** podstatně více než helikátem **1**. Tato skutečnost je ve shodě s pozorováním schopnosti helikátů **2 – 7** výrazně měnit strukturu DNA do té míry, až přestane být substrátem pro zmíněné enzymy.

3.2. Translesion DNA synthesis across lesions induced by oxidative products of pyrimidines. An insight into the mechanism by microscale thermophoresis. (Publikace 2)

Tato práce byla zaměřena na studium simulované translézové syntézy přes poškození tvořené HdU nebo HMdU metodou microscale termoforézy (MST). Termodynamické změny spojené s replikací přes léze tvořené HdU nebo HMdU ukazují, že HdU spárované nekomplementárními bázemi narušuje dvoušroubovici DNA podstatně méně než dT nebo HMdU. Dále bylo ukázáno, že translézová syntéza přes lézi HdU byla méně extenzivní a potenciálně více mutagenní než u léze HMdU. Tato sledovaná zvýšená misinkorporace polymeráz Pol η , KF⁻, and HIV-1 RT přes lézi HdU je v souladu s rozdílným stabilizačním efektem HdU a HMdU.

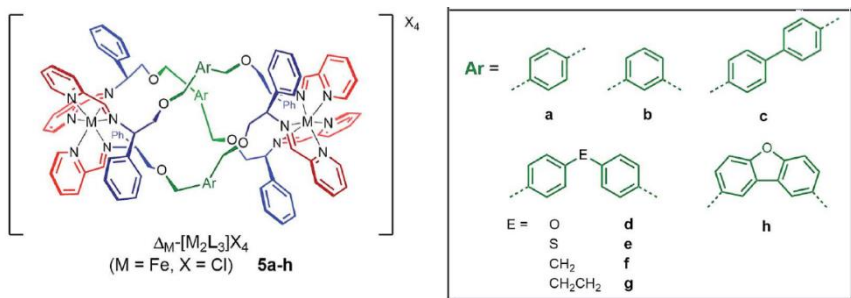
Hodnoty K_d při inkorporaci dAMP oproti HdU byly nižší než při inkorporaci dGMP, dCMP a dTMP. Toto zjištění je v souladu s ostatními výsledky ukazujícími, že adenin je v DNA preferenčně

inkorporován proti lézi HdU. Výsledky jak MST, tak *in vitro* translázové syntézy naznačují, že léze HdU v DNA může způsobit záměnu cytozinu za thymin.

Hodnoty K_d při inkorporaci dAMP oproti HMdU byly nižší než při inkorporaci dGMP, dCMP a dTMP. Dále výsledky ukazují, že DNA polymerázy jsou schopny hladce obejít poškození tvořené HMdU. Výše zmíněné naznačuje, že toto poškození je méně mutagenní a méně ovlivňuje replikaci DNA, což je konzistentní s rolí HMdU jako epigenetické značky v DNA. Celkově výsledky této studie potvrdily předešlé výsledky ukazující vysokou mutagenitu lézí HdU a méně mutagenní vlastnosti léze HMdU.

3.3. Metallohelicates that kill Gram-negative pathogens using intracellular antimicrobial peptide pathways. (Publikace 3)

Tato práce byla zaměřena na sérii nových ve vodě rozpustných metalohelikátů (Obr. 14). Tyto metalohelikáty vznikají samosestavením z jednoduchých nepeptidových komponent okolo dvou iontů železa. Tyto helikáty se vyskytují jako dva optické enantiomery Λ a Δ .



Obrázek 14: Schéma metalohelikátů a struktury ligandů **a** – **h**.
(Značení helikátů převzato z: [43])

Mezi vlastnosti těchto komplexů patří optická čistota, velmi dobrá rozpustnost ve vodě, možnost syntézy pomocí samosestavení

v multigramovém měřítku a velice podobné strukturní vlastnosti jako mají kationní antimikrobiální peptidy (CAMPs). Tato série **5b** – **h** navazuje na metalohelikát **5a** [43], který jako jediný z předešlé série vykazoval antimikrobiální aktivitu. Pro zjištění antimikrobiální aktivity byla použita standartní procedura stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC). Zatímco proti gram-positivním mikrobům vykazovala většina komplexů relativně vysokou aktivitu, *E. coli* a *S. aureus* se ukázaly jako výzva. Obecně všechny enantiomery Λ vykazovaly vyšší účinnost než jejich Δ protějšky, přestože zejména u *E. coli* byly rozdíly v účinnosti malé. Komplex Λ -**5b** vykazoval nejvyšší aktivitu, kdy byl smrtící efekt dané látky u *E. coli* pozorován již po 20 – 40 minutách. Zajímavý je taktéž fakt, že buňky *E. coli* ve stacionární fázi jsou na působení komplexu méně náchylné než aktivně rostoucí buňky. Podobné vlastnosti jsou pozorovány u zavedených antibiotik.

Nejvyšší selektivitu a aktivitu vůči *E. coli* vykazoval již zmíněný nejkratší helikát (12.4 Å) Λ -**5b**. Izomerní protějšek Δ -**5b** dosahoval mírně nižších hodnot. Rozdílně helikáty s delšími spojovacími ligandy, zejména pokud obsahovaly etherovou skupinu, jsou více selektivní pro *S. aureus*. V tomto případě měly vysokou aktivitu a selektivitu oba enantiomery **5h** i enantiomer Λ -**5d**.

Na základě těchto výsledků byla testována účinnost enantiomerů **5b** vůči širšímu spektru gram-negativních patogenů. Součástí tohoto screeningu byly klinicky izolované kmeny *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* a *Enterobacter cloacae*. Komplex **A-5b** prokázal velice slibnou aktivitu vůči patogenům, zejména vůči kmenům *E. coli*. Jako velice zajímavý se ukázal rozdíl v citlivosti mezi dvěma testovanými izoláty *K. pneumoniae*. Na základě celkového screeningu byl **A-5b** vybrán pro podrobnější studium účinku.

Rezistentní kmeny vznikají, pokud se v populaci vyskytnou mutantní buňky, které jsou farmakem méně ovlivněné. Notoricky známý gram-negativní patogen EEHC O157:H7 Sakai byl vystaven účinným koncentracím **A-5b** v takzvaných selekčních experimentech. Cílem těchto experimentů bylo stanovit, zda je možné izolovat mutanty, kteří se spontánně stali rezistentními. Mutantní kmeny byly rozděleny do 4 podtypů na základě rozdílů vůči kmenu, který mutace neobsahuje. Mezi rozdíly patří defekty v genech zapojených do údržby a modifikace vnější buněčné membrány.

Dva ze čtyř podtypů získaly mutace spojené s enzymy, které ovlivňují biofyzikální vlastnosti liposacharidů ve vnější membráně bakteriálních buněk, a tím vytvoří toleranci či odolnost vůči antimikrobiálnímu účinku metalohelikátu.

Třetí podtyp ztratil schopnost produkce přenašeče vitamínu B12 kódovaného genem *btuB*. Všechny kmeny získaly mutaci, která vedla k předčasnému zastavení translace pro tento gen, což vyústí ve zkrácení BtuB proteinu a jeho nefunkčnost. Předpokládáme, že tento přenašeč přispívá ke vstupu **Λ -5b** do periplasmy. Přestože tato mutace vede ke snížení vstupu metalohelikátu, může také vést ke snížení zdraví kmenu a v konečném důsledku z něj udělat kmen neškodný.

Čtvrtý podtyp nevykazoval žádné chromozomální změny, ale u těchto kmenů došlo ke ztrátě plazmidu pO157. Tento plazmid je důležitý zejména proto, že jeho kódující geny jsou minimálně částečně zodpovědné za velmi vysokou aktivitu tohoto kmenu *E. coli*. Ztráta tohoto plazmidu opět vyústí v jeho neškodnost.

Pro studium schopnosti metalohelikátů volně vstupovat do buňky, byl nasyntetizován fluorescenčně značený derivát helikátu **Λ -5b**. Byla pozorována velice malá fluorescence ve stacionární fázi *E. coli*, zatímco u rychle se dělících buněk byla pozorována akumulace v cytoplasmě a v oblasti pólů bakteriálních buněk. Dále nebyla pozorována preferenční lokalizace helikátu v buněčné membráně a pozorované zabarvení nebylo homogenní. Lze tedy usuzovat diferencovaný vstup helikátu do buňky. Dále byla pozorována redukce fluorescence fluorescenční značky DAPI, která se váže na DNA. Následná analýza obrázků naznačuje kompetitivní vazbu na DNA.

Na základě pozorování fluorescence DAPI byla studována interakce **A-5b** s DNA. Interakce s DNA byla u metalohelikátů pozorována v předešlých pracích [44]. Studium vytěšňování ethidium bromidu z DNA z telecího thymu byla získána hodnota zdánlivé vazebné konstanty K_{app} $1.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. Dále byl pozorován nárůst teploty tání DNA z telecího thymu v přítomnosti helikátu **A-5b**. Studium spekter lineárního dichroismu DNA v přítomnosti helikátů bylo zjištěno, že pouze komplexy **5a** a **5b** se váží organizovaně a ne pouze na základě elektrostatiky. Vazebným místem je pravděpodobně velký žlábek DNA. Dále studie lineárního dichroismu poukázaly na koncentračně závislé deformace struktury DNA, což bylo potvrzeno investigací pomocí mikroskopie atomárních sil na plazmidu pSP73. Dále byla studována afinita helikátu **5b** ke G-kvadruplexům DNA. Jedná se o strukturu podílející se na transkripci důležitých genů v bakteriích, mimo jiné i v *E.coli*. Bylo zjištěno, že oba enantiomery helikátu **5b** nejen značně stabilizují G-kvadruplex, ale preferují i vazbu do kvadruplexu před vazbou do velkého žlábků.

3.4. Unique structural properties of DNA interstrand cross-links formed by a new antitumor dinuclear Pt(II) complex. (Publikace 4)

V předešlé práci [8] byl zkoumán dvoujaderný komplex platiny $\{[cis-Pt(NH_3)_2Cl]_2(4,4'-methylendianilin)\}^{2+}$ (komplex **1**), který náleží do nové generace slibných protinádorově účinných polynukleárních komplexů platiny rezistentních k dekompozici sírovými nukleofily. Komplex **1** je účinný vůči buňkám rakoviny vaječníků s hodnotami IC_{50} srovnatelnými s konvenční cisplatinou pro linii citlivou na cisplatinu a pro linii na cisplatinu rezistentní vykazuje v provnání s cisplatinou podstatně lepší hodnoty cytotoxicity. Tato skutečnost je připisována schopnosti formování meziřetězcových můstků odlišných od cisplatinu a jejich následnému rozeznání buněčnými proteiny.

Výsledky této práce ukazují, že se komplex **1** preferenčně váže na guaninové zbytky. Důležitější je poznatek, že za kompetičních podmínek jsou všechny typy meziřetězcových můstků zkoumaného komplexu **1** ve směru 3'-3'. Zajímavý fakt je, že meziřetězcové můstky mononukleárních nebo dalších

polynukleárních komplexů platiny jsou formovány výhradně ve směru 5'-5' při podmínkách použitých v této práci. Důvody unikátní orientace aduktu komplexu **1** na DNA zůstávají neobjasněny.

V této práci byla také studována změna konformace DNA vyvolaná tvorbou 1,4-GG meziřetězcového můstku mezi komplexem **1** a DNA. Bylo zjištěno, že tento adukt ohýbá dvoušroubovici o 31° směrem do velkého žlábků a rozvíjí ji o 18°. Změna konformace DNA je velice podobná poškození způsobeném hlavními adukty tvořenými cisplatinou. 1,4-GG meziřetězcový můstek komplexu **1** tvoří lokální konformační distorze objevené použitím chemických sond, cirkulárního dichroismu (CD) a UV absorbních experimentů.

Inhibice transkripce způsobená komplexy platiny je důležitá část mechanismu jejich protinádorové aktivity. Hlavní transkripční komponentou je RNA polymeráza II. Je tedy zřejmé, že meziřetězcové můstky tvořené komplexem **1** mohou zablokovat RNA polymerázu II, ale zároveň působí také jako substrát pro rozpoznání HMG proteiny [8]. Došli jsme k závěru, že díky rozpoznání aduktu komplexu **1** na DNA hraje HMG protein důležitou roli v jeho protinádorovém účinku. Závěrem lze říci, že cytotoxické účinky komplexu **1** jsou pravděpodobně způsobeny jak inhibicí RNA polymerázy II, tak stíněním aduktů komplexu **1** vazbou HMG proteinů.

4. Závěr

Disertační práce je sestavena jako souhrn čtyř publikovaných prací. Tři se zabývají studiem mechanismů účinku komplexů založených na přechodných kovech. Čtvrtá práce se zabývá změnou termodynamických parametrů dvoušroubovice DNA způsobenou mutací v primární struktuře DNA a jejich vlivem na replikaci DNA.

DNA je považována za farmakologické cílové místo farmak založených na bázi kovů, metalohelikáty nejsou výjimkou. Jedná se o chirální struktury složené z 2 iontů kovu a 3 rigidních organických ligandů. Helikáty diskutované v této práci byly syntetizovány prof. Scottem (University of Warwick, UK). Jako první byla testována akumulace helikátů v jádrech buněk HCT116p53^{+/+}. Výsledky ukázaly, že 42 – 84% helikátů je akumulováno v jádře a může tedy interagovat s jadernou DNA. Všechny helikáty prokázaly vysokou afinitu k ctDNA a zároveň bylo zjištěno, že vazba helikátů na DNA nezpůsobuje jednořetězcové a dvouřetězcové zlomy. Podrobnější investigace odhalila u enantiomerů helikátu **1** specifickou organizaci vazby na DNA v kontrastu s náhodnou vazbou zbylých komplexů. Dále byl pozorován pokles intenzity signálu LD při 260 nm v závislosti na narůstající koncentraci helikátů, což může být vysvětleno zvýšením flexibility DNA ve vzorku nebo jejím zkrácením vlivem jejího svinutí či monomolekulární kondenzací/multimolekulární

agregací. Další experimenty prokázaly schopnost helikátů agregovat DNA při nízkých koncentracích, srovnatelných s dalšími používanými kondenzačními agens. Látky schopné kondenzovat DNA jsou často používány k narušení kritických enzymatických pochodů týkajících se DNA. Enzymatické studie ukázaly, že aktivita enzymů pracujících s DNA je značně snížena v přítomnosti helikátů.

Oxidované nukleotidy reprezentují jeden z hlavních zdrojů poškození DNA fyzikálními a chemickými agens. HdU a HMdU reprezentují nejčastější formu oxidovaných pyrimidinů v DNA, přičemž tyto oxidace jsou způsobeny zejména reaktivními formami kyslíku. HdU je znám svou mutagenní aktivitou ($C \rightarrow T$), zatímco HMdU je považován za epigenetickou značku. Nejnižší disociační konstanty byly naměřeny MST při inkorporaci A proti HdU a HMdU, což je v souladu s výsledky simulované translázové syntézy. Dále bylo prokázáno, že translázová syntéza přes lézi způsobenou HdU může způsobit záměnu AT páru za pár CG. Dále výsledky ukazují, že DNA polymerázy jsou schopny hladce obejít poškození tvořené HMdU. Výše zmíněné naznačuje, že toto poškození je méně mutagenní a méně ovlivňuje replikaci DNA, což je konzistentní s rolí HMdU jako epigenetické značky v DNA. Výsledky této studie celkově potvrdily předešlé výsledky ukazující vysokou mutagenitu lézí HdU a méně mutagenní vlastnosti léze HMdU.

Příkladem nových potenciálních protinádorově účinných agens jsou takzvané helikáty. Jedná se o chirální struktury složené z 2 iontů kovu a 3 rigidních organických ligandů. Helikáty diskutované v této práci byly syntetizovány prof. Scottem (University of Warwick, UK) a poskytnuty pro účely této práce. Poskytnuté komplexy strukturně navazují na předešlou sérii. Prvním cílem bylo ověření, zda helikáty z této skupiny také vykazují antimikrobiální aktivitu, stejně jako tomu bylo u helikátu **5a** z předchozí série. Výsledky potvrdily relativně vysokou aktivitu vůči gram-negativním mikrobům u všech zkoumaných helikátů. U gram negativních mikrobů vynikaly oba enantiomery helikátu **5b** jak aktivitou, tak selektivitou.

Dvoujaderné komplexy platiny jsou považovány za velice slibná protinádorově účinná agens nové generace. Zkoumaný komplex $\{[cis-Pt(NH_3)_2Cl]_2(4,4'-methylendianilin)\}^{2+}$ prokázal účinnost proti vybraným buněčným liniím srovnatelnou s cisplatinou. V liniích resistantních k cisplatině ukázal účinnost vyšší. Vysoce zajímavou vlastností se ukázala geometrie meziřetězcové vazby komplexu na DNA. Zatímco konvenční metalofarmaka založená na platině se preferenčně vážou ve směru 5'-5', námi zkoumaný komplex se preferenčně váže ve směru 3'-3'. Přestože má meziřetězcový můstek naprosto odlišnou geometrii, jeho tvorba vyústí ve velice podobné poškození DNA jako u cisplatinu. Závěrem lze říci, že cytotoxické účinky

komplexu **1** jsou pravděpodobně způsobeny jak inhibicí RNA polymerázy II, tak i stíněním aduktů komplexu **1** vazbou HMG proteinů.

Přínosem disertační práce je popsání vazby nových metalofarmak na DNA. Využití těchto poznatků vedlo k dokonalejšímu popisu mechanismu vazby a mechanismu působení těchto farmak. Studie provedené v této práci přispěly k řešení projektů zaměřených na problematiku nových metalofarmak a na problematiku molekulární farmakologie při terapii nádorových onemocnění.

5. Seznam použité literatury

- [1] **Kauffman G. B. (2010):** *Michele Peyrone (1813 – 1883), Discover of cisplatin. Platinum Metals Rev. 54, 250–256.*
- [2] **Kelland L. R. (2007):** *The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy, Nat. Rev. Cancer 7(8), 573-578.*
- [3] **Rosenberg B., van Camp L., Krigas T. (1965):** *Inhibition of cell division in escherchia coli by electrolysis products form a platinum electrode, Nature 205, 698-699.*
- [4] **Florea A. M., Büsselberg D. (2011):** *Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects, Cancers (Basels) 3, 1351-1371.*
- [5] **Kelland L. R. (1993):** *New platinum antitumor complex, Crit. Rev. Oncol Hematol 15, 191-219.*
- [6] **Brabec V., Hrabina O., Kasparkova J. (2017):** *Cytotoxic platinum coordination compounds. DNA binding agents. Coordination Chemistry Reviews 351, 2-31*
- [7] **Wong E., Giandomenico C. M. (1999):** *Current status of platinum-based antitumor drugs, Chem. Rev. 99, 2451-2466.*

- [8] **Zerzankova L., Kostrhunova H., Vojtiskova M., Novakova O., Suchankova T., Lin M., Guo Z., Kasparkova J., Brabec V. (2010):** *Mechanistic insights into antitumor effects of new dinuclear cis Pt^{II} complexes containing aromatic linkers, Biochemical Pharmacology 80m 344-351.*
- [9] **Olivova R., Kasparkova J., Vrana O., Vojtiskova M., Suchankova T., Novakova O., He W., Guo Z., Brabec V. (2011):** *Unique DNA binding mode of antitumor trinuclear tridentate platinum (II) compound, Mol. Pharm 8, 2368-2378.*
- [10] **Hrabina O., Kasparkova J., Suchankova T., Novohradsky V., Guo Z., Brabec V. (2017):** *Unique structural properties of DNA interstrand cross-links formed by a new antitumor dinuclear Pt(II) complex. Metallomics 9, 494*
- [11] **Hannon M. J. (2007):** *Metal-based anticancer drugs: From a past anchored in platinum chemistry to a post-genomic future of diverse chemistry and biology, Pure Appl. Chem. 79, 2243-2261.*

- [12] **Meistremann I., Moreno V., Prieto M. J., Moldrheim E., Sletten E., Khalid S., Rodger P. M., Peberdy J. C., Rodger A., Hannon M. J. (2002):** *Itramolecular DNA coiling mediated by metallo-supramolecular cylinders: differential binding of P and M helical enantiomers, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 5069-5074.*
- [13] **Malina J., Hannon M. J., Brabec V. (2008):** *DNA binding of dinuclear iron (II) metallosupramolecular cylinders. DNA unwinding and sequence preference., Nucleic Acids Res. 36, 3630-3638.*
- [14] **Malina J., Hannon M. J., Brabec V. (2007):** *Recognition of DNA three-way junctions by metallosupramolecular cylinders: gel electrophoresis studies, Chemistry 13, 3871-3877.*
- [15] **Malina J. Hannon M. J., Brabec V. (2014):** *Recognition of DNA bulges by dinuclear iron (II) metallosupramolecular helicates, FEBS J. 281, 987-997.*
- [16] **Oleksi A., Blanco A. G., Boer R., Usón I., Aymamí J., Rodger A., Hannon M. J., Coll M. (2006):** *Molecular recognition of a three-way DNA junction by a metallosupramolecular helicate, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 45, 1227-1231.*

- [17] **Jamieson E. R., Lippard S. J. (1999):** *Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts, Chem. Rev. 99, 2467-2498.*
- [18] **Johnstone T. C., Suntharalingam K., Lippard S. J. (2014):** *The next generation of platinum drugs: targeted Pt(II) agents, nanoparticle delivery and Pt(IV) prodrugs, Chem. Rev. 116, 3436-3486.*
- [19] **Makovec T. (2019):** *Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy, Radiol. Oncol 53, 148-158.*
- [20] **Dasari S., Tchounwou P. B. (2014):** *Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanism of action, Eur. J. Pharmacol. 5, 364-378.*
- [21] **Brabec, V., Kasparkova, J. (2005):** Platinum-based drugs, In Gielen, M. and Tiekink, E. R. T. (eds.), *Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents: The Use of Metals in Medicine.* John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, pp. 489-506.
- [22] **Brouwer J., van de Putte P., Fichtinger-Schepman A. M., Reedijk J. (1981):** *Base-pair substitution hotspots in GAG and GCG nucleotide sequences in Escherichia coli K-12 induced by cis-diamminedichloroplatinum (II), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78(11), 7010-7014.*

- [23] **Fuertes M. A., Castilla J., Alonso C., Pérez J. M. (2003):** *Cisplatin biochemical mechanism of action: from cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways, Current Medical Chemistry 10, 257-256.*
- [24] **Alberts, B. et al.(1998):** *Základy buněčné biologie, 2. vydání, Ústí nad Labem: Espero Publishing, 183-188, ISBN 80-902906-2-0.*
- [25] **Potaman V. N., Siden R. R. (2005):** *DNA: Alternative conformations and biology, DNA Conformation and Transcription (edited by Takashi Ohyama), Springer US, 3-17, ISBN 978-0-387-29148-2*
- [26] **Vologodskii A., Frank-Kamenetskii M. D. (2018):** *DNA melting and energetics of the double helix, Physics of Life Reviews 25, 1-21.*
- [27] **Bueren-Calabuig J. A., Giraudon C., Galmarini C. M., Egly J. M., Gago F. (2011):** *Temperature-induced melting of double-stranded DNA in the absence and presence of covalently bonded antitumour drugs: insight from molecular dynamics simulations, Nucleic Acids Research 39, 8248-8257*
- [28] **SantaLucia Jr. J. (1998):** *A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 1460-1465.*

- [29] **Howard K. P. (2000):** *Thermodynamics of DNA duplex formation: a biophysical chemistry laboratory experiment, J. Chem. Educ.* 77, 1469.
- [30] **Vaitiekunas P., Crane-Robinson C., Privalov P. L. (2015):** *The energetic basis of the DNA double helix: a combined microcalorimetric approach, Nucleic Acids Research* 43, 8577-8589.
- [31] **Florian J., Brabec V. (2011):** *Thermodynamics of translesion synthesis across a major DNA adduct of antitumor oxaliplatin: Differential scanning calorimetric study, Chemistry a European Journal* 18, 1634-1639.
- [32] **Jerabek-Willemsen M., André T., Wanner R., Roth H. M., Duhr S., Basske P., Breitsprecher D. (2014):** *MicroScale thermophoresis: Interaction analysis and beyond, Journal of Molecular Structure* 1077, 101-113.
- [33] **Rahman M. A., Saghir M. Z. (2014):** *Thermodiffusion or Soret effect: Historical review, International Journal of Heat and Mass Transfer* 73, 693-705
- [34] **Daviet S., Couvé-Privat S., Gros L., Shinozuka K., Ide H., Sapparbaev M., Ishchenko A. A., (2007):** *Major oxidative products of cytosine are substrates for the nucleotide incision repair pathway, DNA Repair (Amst)* 6, 8-18.

- [35] **Hrabina O., Brabec V., Nováková O. (2019):** *Translesion DNA synthesis across lesions induced by oxidative products of pyrimidines: An insight into the mechanism by microscale. International Journal of Molecular Sciences* 20, 5012
- [36] **Kreutzer D. A., Essigmann J. M. (1998):** *Oxidized, deaminated cytosines are a source of C → T transitions in vivo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3578-3582.
- [37] **Greim H., Albertini R. J. (2015):** *Cellular response to the genotoxic insult: the question of threshold for genotoxic carcinogens, Toxicol. Res.* 4, 36-45.
- [38] **Thivjyanathan V., Soasunderam A., Volk D. E., Gorenstein D. G. (2005):** *5-hydroxyuracil can form stable base pairs with all four bases in DNA duplex, Chem. Commun.* 3, 400-404.
- [39] **Boorstein R. J., Teebor G. W. (1989):** *Effects of 5-hydroxymethyluracil and 3-aminobenzamide on the repair and toxicity of 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine in mammalian cells, Cancer Research* 49, 1509–1514.
- [40] **Shiau G. T., Schinazi R. F., Chen M. S., Prusoff W. H. (1980):** *Synthesis and biological activities of 5-(hydroxymethyl, azidomethyl or aminomethyl)-2'-deoxyuridine and related 5'-substitued analogs, J. Med. Chem.* 23, 127-133.

- [41] **Hrabina O., Malina J., Kostrhunova H., Novohradsky V., Pracharova J., Rogers N., Simpson D.H., Scott P., Brabec V. (2020):** *Optically pure metallohelices that accumulate in cell nuclei, condense/aggregate DNA, and inhibit activities of DNA processing enzymes. Inorganic Biochemistry – v tisku*
- [42] **Hannon M. J., Moreno V., Prieto M. J., Moldrheim E., Sletten, E., Meistermann I., Isaac C. J., Sanders K. J., Rodger A (2001):** *Intramolecular DNA coiling mediated by a metallo-supramolecular cylinder. Angew. Chem., Int. Ed., 40, 879–884.*
- [43] **Simpson D., Hapeshi A., Rogers N.J., Brabec V., Clarkson G.J., Fox D., Hrabina O., Kay G., King A., Malina J., Millard A., Moat J., Roper D.I., Song H., Waterfield N., Scott P. (2019):** *Metallohelices that kill Gram-negative pathogens using intracellular antimicrobial peptide pathways. Chemical Science 10, 9708-9720*
- [44] **Howson S. E., Bolhuis A., Brabec V., Clarkson G. J., Malina J., Rodger A., Scott P. (2011):** *Optically pure, water-stable metallo-helical ‘flexicate’ assemblies with antibiotic activity, Nature Chemistry 4, 31-36.*

Internetové zdroje:

- [I1] **National Cancer Institute (2018):** Dostupné z:
<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
- [I2] **wikipedia (2014):**Dostupné z:
<https://en.wikipedia.org/wiki/File:Dnaconformations.png>

6. Seznam použitých zkratek

A	adenin
C	cytosin
CAMPs	kationní antimikrobiální proteiny
CD	cirkulární dichroismus
CY5	fluorescenční značky cyanine 5
ctDNA	DNA z telecího thymu
CTP	cytosin trifosfát
DNA	deoxyribonukleotidová kyselina
DAPI	fluorescenční značka 2-(4-amidinophenyl)- 1H -indol-6-carboxamid
G	guanin
GTP	guanosin trifosfát
HdU	5'-hydroxyuridin
HMG	proteiny rodiny high mobility group
HMdU	5'-methylhydroxyuridin
Kd	disociační konstanta
LD	lineární dichroismus
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MST	microscale termoforéza
RNA	ribonukleotidová DNA
ROS	reaktivní formy kyslíku
T	thymin
UTP	uridin trifosfát

7. Přílohy

7.1. Seznam publikací

6. **Hrabina O., Malina J., Kostrhunova H., Novohradsky V., Pracharova J., Rogers N., Simpson D.H., Scott P., Brabec V. (2020):** *Optically pure metallohelices that accumulate in cell nuclei, condense/aggregate DNA, and inhibit activities of DNA processing enzymes. Inorganic Biochemistry – v tisku*
7. **Hrabina O., Brabec V., Nováková O. (2019):** *Translesion DNA synthesis across lesions induced by oxidative products of pyrimidines: An insight into the mechanism by microscale. International Journal of Molecular Sciences 20, 5012*
8. **Simpson D., Hapeshi A., Rogers N.J., Brabec V., Clarkson G.J., Fox D., Hrabina O., Kay G., King A., Malina J., Millard A., Moat J., Roper D.I., Song H., Waterfield N., Scott P. (2019):** *Metallohelices that kill Gram-negative pathogens using intracellular antimicrobial peptide pathways. Chemical Science 10, 9708-9720*
9. **Hrabina O., Kasparkova J., Suchankova T., Novohradsky V., Guo Z., Brabec V. (2017):** *Unique structural properties of DNA interstrand cross-links formed by a new antitumor dinuclear Pt(II) complex. Metallomics 9, 494*

10. **Brabec V., Hrabina O., Kasparkova J.**
(2017): *Cytotoxic platinum coordination compounds.*
DNA binding agents. Coordination Chemistry
Reviews 351, 2-31

7.2. *Strukturovaný životopis*

Osobní údaje

Jméno a příjmení:	Ondřej Hrabina
Titul:	Mgr.
Datum narození:	19. 5. 1991
Telefon:	+420 721 545 801
E-mail:	hrabina.ondra@gmail.com
Národnost:	česká

Pracovní zkušenosti

2019 – nyní ThermoFisher Scientific, Brno

- Výrobní inženýr – fyzik
- Podpora výroby a řešení problémů týkajících se fyzikálních aspektů spektrofotometrů
- Samostatné řešení úkolů, návrh a realizace nových výrobních pomůcek

2016 – 2019 Biofyzikální ústav Akademie věd České republiky, Brno

- Odborný pracovník – laboratorní analýza nových potenciálně protinádorově účinných farmak a popis jejich interakce s DNA
- Samostatné plánování, realizace a hodnocení experimentů

2019 Letní škola Badatele pořádaná Univerzitou Palackého

- Hlavní organizátor Letní školy – organizace a příprava programu a volnočasových aktivit pro středoškolské studenty, administrativa se zajištěním akce, komunikace s účastníky a zřizovatelem Letní školy

2015, 2016 Letní škola v Jevíčku pořádaná Univerzitou Palackého

- Pedagogický dozor a přednášející – příprava přednášek a organizace programu a volnočasových aktivit pro středoškolské studenty, administrativa spojená se zajištěním akce, průběžná komunikace s účastníky a zřizovatelem Letní školy

Dosažené vzdělání

2015 – nyní Universita Palackého v Olomouci

Obor: Biofyzika – doktorský studijní program

Téma: Energetika, konformace a rozlišení DNA poškozené protinádorově účinnými metalofarmaky.

2013 – 2015 Universita Palackého v Olomouci

Obor: Molekulární biofyzika - navazující

Závěrečná práce: Modifikace DNA s novým komplexem platiny cis-[PtII(NH₃)₂I₂].

2010 – 2013 Universita Palackého v Olomouci

Obor: Molekulární biofyzika - bakalářský

Závěrečná práce: Stanovení sekvenční preference protinádorově účinné oxaliplatiny na DNA pomocí restrikčních endonukleáz.

Mezinárodní kurzy a stáže

2018

“Epigenetic chemical biology” computational methods in drug design

Istanbul, Turecko

COST, CM1406

2017

Pracovní stáž, Joint Institute for Nuclear Research

Dubna, Rusko

Téma: Matematické modelování opravy DNA poškozené ionizujícím zářením

2014

Wolfram Mathematica summer school

Waltham, USA

2014

Higher Mathematica: Modelling differential and difference equations

Szeged, Maďarsko

Příspěvky na konferencích

2018

The XXII International scientific conference of young scientists and specialists (AYSS-2018)

23. 4. – 27. 4. 2018

Dubna, Rusko

Příspěvek: Mathematical modeling of DNA repair

Dovednosti

Cizí jazyky:	Anglický jazyk	aktivní
	Německý jazyk	pasivní
	Ruský jazyk	aktivní

Práce na PC:	Mathematica	pokročilý
	Python	mírně pokročilý
	C#	začátečník
	PyMol	pokročilý
	AMBER	mírně pokročilý
	Gaussian	mírně pokročilý