

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

KATEDRA BIOFYZIKY



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Interakce DNA s novým protinádorově účinným komplexem ruthenia  
s flavonolovým ligandem**

Vypracovala: Bc. Lucie Folvarská

Studijní obor: Molekulární biofyzika

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Tereza Radošová Muchová, Ph.D.

Olomouc 2015

**Poděkování:**

Děkuji vedoucí diplomové práce Mgr. Tereze Radošové Muchové, Ph.D. za ochotu, trpělivost, odborné vedení a cenné rady při psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat konzultantce prof. RNDr. Janě Kašpárkové, Ph.D. za její rady a čas, který mi věnovala při řešení dané problematiky.

Tato práce vznikla s finanční podporou projektu IGA Přf\_2015\_025.

**Čestné prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením Mgr. Tereze Radošové Muchové, Ph.D. a za použití literatury uvedené v závěru práce.

V Olomouci dne 18. 4. 2015

Bc. Lucie Folvarská

## Souhrn

V polovině minulého století se začala využívat k léčbě nádorových onemocnění metalofarmaka na bázi komplexů platiny. Jelikož tyto komplexy mají řadu vedlejších účinků, jsou vyvíjena nová chemoterapeutika, ať už na bázi platiny nebo jiných přechodných kovů (jako jsou ruthenium, osmium, iridium a další), tak aby terapeutické účinky převýšily účinky vedlejší. Jedním z možných protinádorově účinných komplexů je  $[\text{Ru}(\text{tol})\text{flavonol}]\text{Cl}$ , který byl studován v této diplomové práci.

Pro platinová cytostatika bylo postulováno, že jejich cílovým místem působení je molekula deoxyribonukleové kyseliny (DNA). Tato léčiva se ve většině případů vážou kovalentně k DNA. V případě vícemocných komplexů (např. ruthenia) může být k atomu kovu připojena molekula, která s DNA interaguje jinou formou. Zajímavým přístupem při vytváření nových potenciálně protinádorově účinných komplexů přechodných kovů je možnost interakce jak kovalentní vazbou na DNA, tak interkalací mezi báze DNA.

## Summary

In the middle of the last century cancer started to be treated with metallopharmaceutical platinum complex. Since these complexes have a number of side effects, new chemotherapeutic agents are being developed, whether based on platinum or other transition metals (such as ruthenium, osmium, iridium, and others), so that the therapeutic effects outweigh the side effects. One of the possible antitumor effective complexes is  $[\text{Ru}(\text{tol})\text{flavonol}]\text{Cl}$  which was studied in this thesis.

For platinum cytostatics it is postulated that the deoxyribonucleic acid molecule (DNA) is their target site of action. These drugs in most cases bind covalently to DNA. In the case of multivalent complexes (e.g. ruthenium) a molecule that interacts with DNA in a different way may be attached to the metal atom. In the development of new potential anticancer active transition metal complexes there is an interesting approach: the possibility of interaction with both covalent binding to DNA and intercalation between DNA bases.

# Obsah

1. Úvod.....	1
2. Přehled řešené problematiky.....	2
2. 1 DNA .....	2
2. 1. 1 Konformace DNA.....	3
2. 2 Komplexy přechodných kovů v léčbě nádorových onemocnění.....	7
2. 2. 1 Cisplatina .....	8
2. 2. 2 Vývoj nových generací protinádorových preparátů.....	13
2. 3 Rutheniové komplexy .....	15
2. 3. 1 Chemické vlastnosti komplexů ruthenia ve vztahu k toxicitě .....	16
2. 3. 2 Transport v organismu .....	17
2. 4 Nekovalentní interakce sloučenin s molekulou DNA .....	17
2. 4. 1 Interkalace.....	18
2. 4. 2 Vazba do žlábků.....	20
3. Cíl práce.....	22
4. Materiál a metody .....	23
4. 1 Použité komplexy .....	23
4. 2 Chemikálie a biologický materiál .....	23
4. 3 Přístroje .....	24
4. 4 Metody .....	25
4. 4. 1 Modifikace DNA .....	25

4. 4. 2 Stanovení molárního absorpčního koeficientu komplexu Ru1 .....	26
4. 4. 3 Stanovení vazebné konstanty metodou titrace.....	26
4. 4. 4 Stanovení kovalentní vazby komplexu Ru1 na DNA .....	27
4. 4. 5 Měření teploty tání ( $T_m$ ).....	28
4. 4. 6 Cirkulární dichroismus .....	28
4. 4. 7 Viskozimetrie.....	30
4. 4. 8 Elektroforéza v nativním agarózovém gelu .....	31
4. 4. 9 Cytotoxicita – Inhibice růstu nádorových buněk <i>in vitro</i> .....	32
5. Výsledky .....	34
5. 1 Spektrofotometrická charakterizace zkoumaného komplexu Ru1 .....	34
5. 1. 1 Stanovení molárního absorpčního koeficientu rutheniového komplexu .....	34
5. 1. 2 Stanovení vazebné konstanty.....	35
5. 2 Viskozimetrie .....	40
5. 3 Cirkulární dichroismus.....	42
5. 4 Stanovení kovalentní vazby komplexu Ru1 na DNA .....	43
5. 5 Měření teploty tání ( $T_m$ ) .....	45
5. 6 Elektroforéza v nativním agarózovém gelu.....	47
5. 7 Inhibice růstu nádorových buněk <i>in vitro</i> .....	50
6. Závěr .....	52
7. Seznam použitých zkratk .....	53
8. Seznam použité literatury .....	55

# 1. Úvod

Již po několik desetiletí je ve středu vědeckého zájmu problém léčby nádorových onemocnění. Podle WHO se rakovina řadí mezi hlavní příčinu úmrtí na celém světě. Proto je velkou snahou navrhnout, testovat a uvést do klinické praxe metody, které budou schopné toto onemocnění účinně léčit. Mezi léčebné postupy patří chirurgický zákrok, radioterapie, chemoterapie. Hlavní cíl těchto postupů je stejný, vyléčit rakovinu nebo alespoň výrazně prodloužit život.

Principem chemoterapie je podávání kancerostaticky působících preparátů. Tyto preparáty se podávají v periodicky se opakujících dávkách. Výzkumy ukázaly schopnost některých koordinačních sloučenin přechodných kovů inhibovat bakteriální růst nebo indukovat jejich programovanou smrt neboli apoptózu. Proto se tato metoda dynamicky vyvíjí.

Základním mechanismem cytostatického působení komplexů přechodných kovů je jejich vazba na molekulu DNA. Tato vazba způsobuje strukturní změny na molekule DNA, které následně výrazně ovlivňují život buňky. Pro stanovení optimální léčby v klinické praxi je podstatné sledování strukturních změn nukleových kyselin vedoucích k zastavení růstu nádorových buněk. V minulosti byla protinádorová účinnost přiřazována pouze komplexům odvozených od cisplatiny. Vzhledem k velkému množství nežádoucích účinků se začaly syntetizovat a testovat sloučeniny s jinými centrálními atomy než je platina. Mezi přechodné kovy vhodné jako centrální atom se řadí například ruthenium, osmium nebo iridium. Na základě nových poznatků jsou syntetizována nová chemoterapeutika, která by měla co nejmenší negativní vliv na organismus.

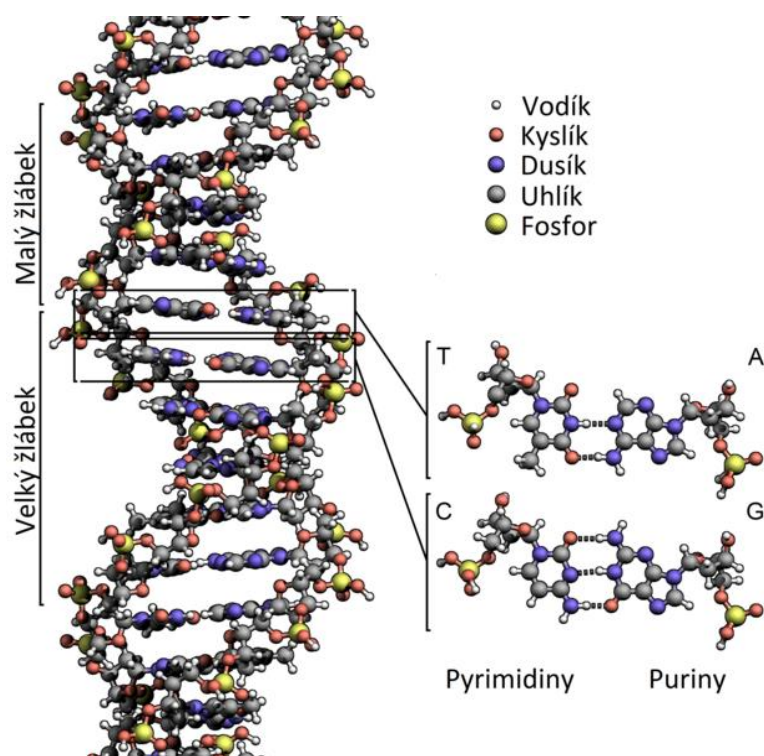
Tato diplomová práce se zabývá studiem interakcí rutheniového komplexu  $[\text{Ru}(\text{tol})\text{flavonol}]\text{Cl}$  s molekulou DNA.



## 2. Přehled řešené problematiky

### 2. 1 DNA

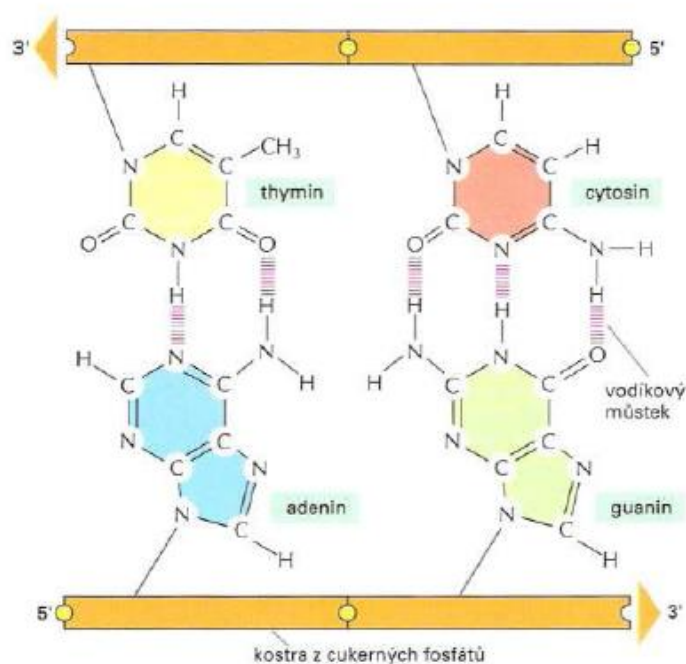
Nukleové kyseliny jsou sloučeniny obsahující ve své struktuře zbytek kyseliny fosforečné, 2'D-deoxyribosu nebo D-ribosu a některou z pěti heterocyklických bází (thymidin, guanosin, cytosin, adenosin nebo uracil). Tyto složky jsou spojeny do řetězce nukleové kyseliny a tímto je definována primární struktura molekuly DNA. Jedná se o spojení přes zbytek kyseliny fosforečné umístěné v pozici 5' cukru a vázající se na 3' pozici sousedního cukru, tímto vzniká cukr-fosfátová kostra. V pozici 1' každého cukru je kovalentně navázána heterocyklická báze. Toto uspořádání se nazývá nukleotid a je to základní stavební kámen každé nukleové kyseliny. Některé organismy a viry mají jako nositelku dědičné informace RNA, obsahující místo thyminu uracil. Ostatní organismy i člověk mají v jádře buňky jako nositelku dědičné informace molekulu DNA (obr. 1).



*Obr. 1. Struktura deoxyribonukleové kyseliny. (Převzato z <http://cs.wikipedia.org/wiki/DNA>).*

DNA molekula je charakteristická tím, že má dva antiparalelní řetězce ve své struktuře. To znamená, že dochází k interakci mezi jednotlivými bázemi.

Heterocyklické báze spolu interagují dle přísných pravidel a to tak, že adenin se pomocí dvou vodíkových můstků páruje s thyminem a cytosin s guaninem pomocí tří vodíkových můstků (obr. 2). Tyto vazby mají vliv na stabilitu dvoušroubovice, zároveň určují centrální osu dvoušroubovice. Tímto vzniká tzv. sekundární struktura molekuly DNA, která je charakteristická různými konformacemi.



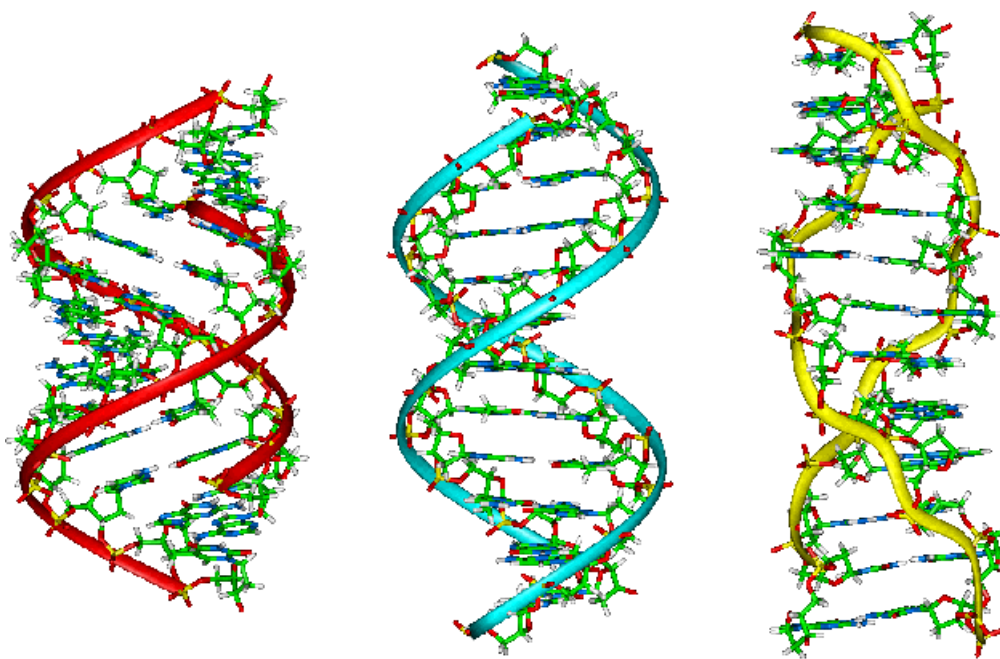
Obr. 2. Párování bází v DNA. (Alberts et al., 2004).

### 2. 1. 1 Konformace DNA

Molekula DNA se může vyskytovat v různých konformacích, a to především v závislosti na její hydrataci a na nukleotidové sekvenci. Charakteristické jsou žlábky, které se vytváří obtočením dvou řetězců kolem sebe. Za fyziologických podmínek je malý žlábek široký 6 Å a hluboký 7,5 Å, zatímco velký žlábek je široký 12 Å a hluboký 8,5 Å (King, R. C., et al., 2006). Do velkého žlábku vyčnívají různé skupiny na pozici 6 heterocyklické báze: aminoskupina adeninu, ketoskupina guaninu, aminoskupina cytosinu, ketoskupina a methylová skupina thyminu. Oproti tomu do malého žlábku vyčnívá například aminoskupina guaninu nebo ketoskupina cytosinu. Ve velkém žlábku se nachází většina funkčních skupin umožňujících rozeznání jednotlivých nukleových bází od sebe (King, R. C., et al., 2006).

Molekula DNA nabývá takové konformace, která je pro ni energeticky nejvýhodnější. Mezi základní konformace DNA řadíme B-DNA, A-DNA a Z-DNA (obr. 3). Jednotlivé rozdíly mezi těmito konformacemi jsou uvedeny v tab. 1.

Formy A a B jsou pravotočivé šroubovice a Z-forma je levotočivá šroubovice. Většina molekul DNA se v buňkách nachází ve formě B-DNA. Právě tuto konformaci poprvé popsali v roce 1953 v časopise Nature James D. Watson a Francis Crick (Watson, J. D., *et al.*, 1953). B-DNA je stabilní při relativní vlhkosti 95 %. Do konformace A přechází DNA při relativní vlhkosti prostředí kolem 75 %. B-DNA je za fyziologických podmínek tenčí a vyšší pravotočivá šroubovice, kde osa dvoušroubovice prochází středem vazby mezi komplementárními bázemi. Velký žlábek je hluboký a široký, malý žlábek je úzký a hluboký. A-DNA je krátká a plochá pravotočivá šroubovice, osa dvoušroubovice prochází velkým žlábkem. Velký žlábek je velice hluboký a úzký, malý žlábek je široký a mělký. Z-DNA je podlouhlá levotočivá dvoušroubovice. Její osa prochází malým žlábkem. Malý žlábek je hluboký a velice úzký, velký žlábek je plochý. (Rosypal, S., 2006).



**Obr. 3.** Tři konformace molekuly DNA. Červeně je znázorněna konformace A-DNA, modře B-DNA a žlutě Z-DNA (převzato z <http://en.wikipedia.org/wiki/DNA>).

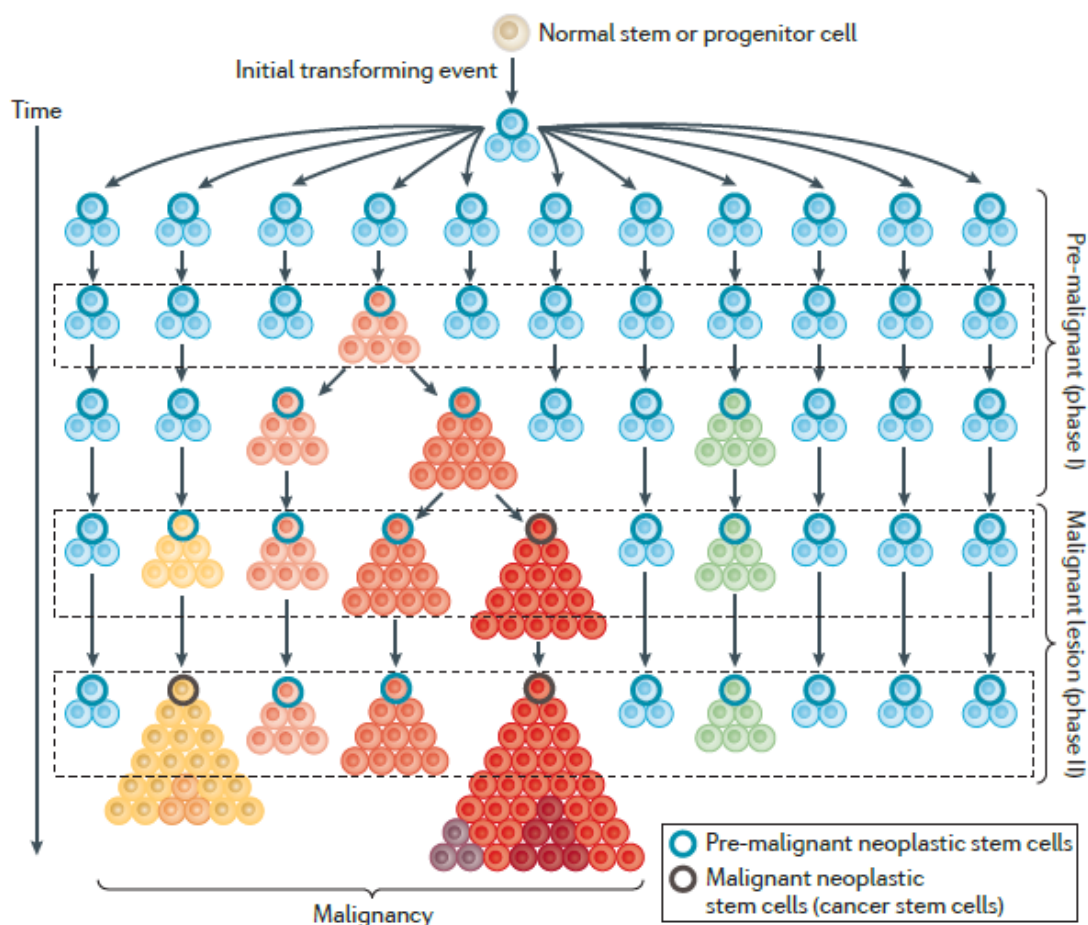
*Tab. 1. Průměrné parametry A-DNA, B-DNA a Z-DNA. (Rosypal, S., 2006, str. 56).*

	<b>Konformace A</b>	<b>Konformace B</b>	<b>Konformace Z</b>
<b>Vinutí (chiralita)</b>	pravotočivá	pravotočivá	levotočivá
<b>Celkový tvar</b>	krátká a široká	dlouhá a tenká	podlouhlá a tenká
<b>Umístění osy dvoušroubovice</b>	přes větší žlábek	přes páry bází	přes menší žlábek
<b>Menší žlábek</b>	velmi široký a mělký	úzký a hluboký	velmi úzký a hluboký
<b>Větší žlábek</b>	velmi úzký a hluboký	široký a hluboký	na povrchu zploštělý
<b>Průměrný počet párů na jedno otočení šroubovice</b>	11	10,5	12
<b>Konformace N-glykosidické vazby</b>	anti	anti	anti u C syn u G
<b>Konformace deoxyribózy</b>	C3' - endo	C2' – endo	C3' – endo u G C2' – endo u C

Každý den je buněčná DNA vystavena vlivu různých faktorů, ať už fyzikální či chemické povahy, které ji poškozují. Během jednoho dne se na DNA vytvoří cca 50 000 jednořetězcových zlomů, 10 000 depurinací a 5 000 alkylací, 2 000 oxidací, 60 deaminací a cca 10 dvouřetězcových zlomů. Ve zdravé buňce jsou tato poškození opravována specifickými proteinovými mechanismy. Mezi nejčastější opravné mechanismy patří básová excisní oprava, nukleotidová excisní oprava, oprava chybného párování atd.

Pokud jsou tyto opravné mechanismy narušeny, ať už mutací v genu kódujícím daný protein, nebo naopak pokud jsou proteiny overexprimovány a tím zajistí přežití i zásadně poškozených buněk, mohou se takto poškozené buňky začít nekontrolovaně množit. Tomuto stavu byl dán název rakovina. Rakovina je obecný termín pro velké skupiny nemocí, které mohou mít vliv na jakoukoliv část těla. Ostatní použité výrazy jsou zhoubné nádory a novotvary. Jedním z charakteristických znaků rakoviny je rychlá tvorba abnormálních buněk a jejich infiltrace do sousedních tkání a do dalších orgánů. Tímto způsobem se tvoří tzv. metastáze, které jsou poté hlavní příčinou úmrtí. Rakovina se řadí mezi hlavní příčiny úmrtnosti na celém světě. V roce 2012 na rakovinu zemřelo přes 8 milionů lidí (Stewart, B. W., et al., 2014). Očekává se, že v průběhu následujících několika let bude nových případů přibývat. U mužů patří mezi nejčastější rakovinné onemocnění rakovina plic, prostaty, tlustého střeva, žaludku a jater. U žen se nejčastěji jedná o rakovinu prsu, tlustého střeva, plic, děložního čípku a žaludku. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>).

Rakovina vzniká z jedné jediné buňky (obr. 4). Transformace z normální buňky do nádorové buňky je vícestupňový proces, obvykle postup z prekancerózní léze na zhoubné nádory. Tyto změny jsou výsledkem interakce mezi genetickými faktory člověka a třemi kategoriemi vnějších vlivů. K těmto vlivům řadíme: fyzikální karcinogeny (ultrafialové a ionizující záření), chemické karcinogeny (azbest, složky tabákového kouře, aflatoxin, apod.) a biologické karcinogeny (například infekce některými viry, bakteriemi či parazity) (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>).



**Obr. 4:** Navrhovaný model vývoje rakoviny kmenových buněk. Modrými obrysy jsou znázorněny pre-maligní neoplastické kmenové buňky. Černými obrysy jsou znázorněny maligní kmenové buňky (rakovinné buňky)(převzato z Valent et al, 2012).

Správná diagnóza rakoviny je nezbytná pro účinnou léčbu, protože každý druh rakoviny vyžaduje určité léčebné postupy, které zahrnují jeden nebo více způsobů, jako je chirurgický zákrok, radioterapie, chemoterapie. Hlavním cílem je vyléčit rakovinu anebo výrazně prodloužit život (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>).

## 2. 2 Komplexy přechodných kovů v léčbě nádorových onemocnění

Jak bylo uvedeno výše, důležitou roli při vzniku nádorových onemocnění hrají genetické, molekulární a buněčné procesy. Ve výzkumu rakoviny se klade velký důraz na pochopení mechanismů těchto procesů na vznik neoplasií. Dalo by se říct, že buněčné procesy jsou evolucí vycizelovány téměř k dokonalosti, není vždy možné

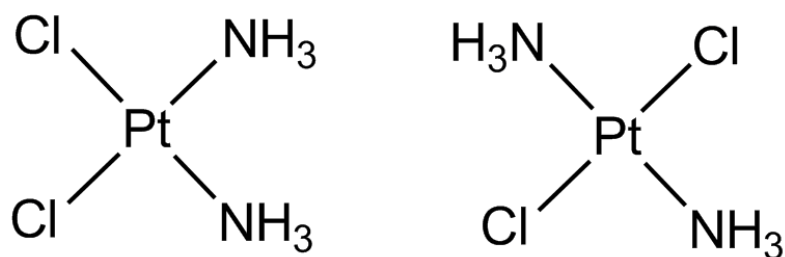
efektivně zasáhnout do poškozených metabolických či signálních drah, které bývají nejčastěji pozměněny u nádorového onemocnění. Existují různé přístupy při léčbě rakoviny, ať už se jedná o zablokování specifických receptorů na povrchu nádorových buněk, nebo o zablokování přehnané transkripce či replikace. Jedním z těchto přístupů je léčba solidních nádorů pomocí komplexů přechodných kovů, např. platiny, ruthenia, osmia, iridia atd.

Historie využití sloučenin kovů v protinádorové terapii sahá až do roku 1865, kdy byly pro tento účel použity sloučeniny arsenu (Waxman, S., *et al.*, 2001). Ve třicátých letech W. A. Collier a F. Kraus zkoumali vzájemné vztahy mezi chemickou strukturou, účinností a toxicitou kovových sloučenin, kdy pozorovali inhibici růstu nádorů účinkem kovových komplexů (Cleare, M. J., 1974).

### 2. 2. 1 Cisplatina

Moderní historie využití sloučenin těžkých kovů v protinádorové terapii začíná v polovině šedesátých let náhodným Rossenbergovým objevem schopnosti platinových derivátů zastavovat buněčné dělení (Rossenberg, B., *et al.*, 1965).

*Cis*-diammindichloridoplatinový komplex (neboli cisplatina, označení cDDP) [*cis*-PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (obr. 5) patří k významným a nejlépe prozkoumaným farmakům využívaných v klinické praxi. cDDP byla poprvé syntetizována v roce 1884 Michele Peyronem (Lippard, S.J., 1982). Trvalo více než jedno století, než došlo k objevu jejích protinádorových vlastností (cDDP je schopna potlačovat růst některých lidských zhoubných nádorů). Prof. Barnett Rossenberg se svými spolupracovníky v roce 1961 zkoumal vliv elektrického pole na růst bakterií *E. coli*. Při experimentu byly použity platinové elektrody ponořené v roztoku s obsahem chloridu amonného. Z těchto platinových elektrod se po elektrolýze uvolňovala platina a v elektrolytu vznikala cDDP komplex. Po určité době se zkoumané buňky v médiu přestaly dělit (zastavil se buněčný cyklus) a docházelo k filamentóznímu prodlužování (Rossenberg, B., *et al.*, 1965). Právě od roku 1961 se účinek cDDP začal úspěšně testovat na širokém spektru nádorů. Díky úspěšnosti testů se od roku 1978 (schválení pro klinické využití FDA) cDDP řadí k nejčastěji používaným cytostatikům.



*Obr. 5. Strukturní vzorec protinádorově aktivní cisplatiny (vpravo) a protinádorově neaktivní transplatiny (vlevo).*

Léčba cDDP probíhá formou série nitrožilních infúzí v intervalu 3 až 4 týdnů, v dávce 50 – 120 mg×m<sup>-2</sup>. Nejvíce se v oblasti onkologické léčby využívá při léčbě nádorů varlat. V případě včasné diagnózy tohoto typu tumoru je pravděpodobnost vyléčení až 90 %. Dále se cDDP využívá při léčbě nádorových onemocnění močového měchýře, trávicí trubice, vaječníků, plic, hlavy a krku (Guo, Z. J., *et al.*, 1999).

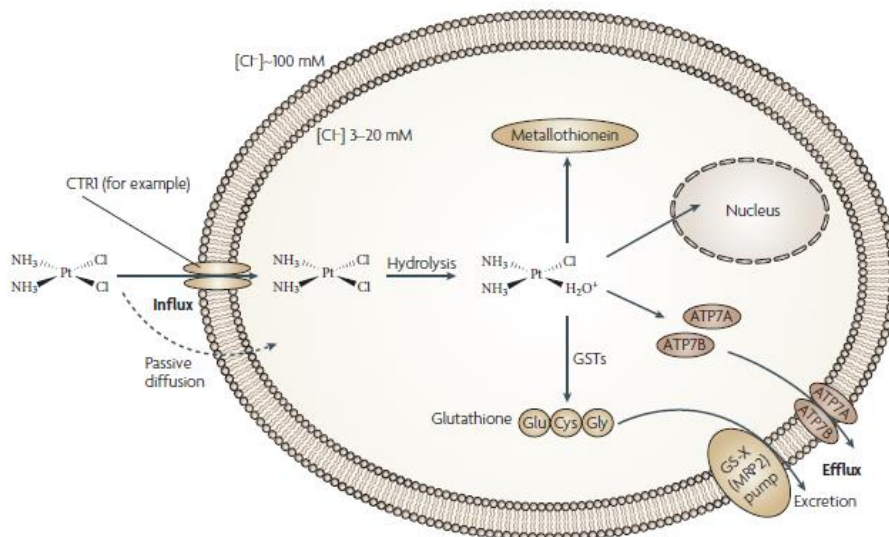
Při podávání cDDP dochází nejen k ničení rychle se množících nádorových buněk, ale také k ničení přirozeně rychle se množících buněk. Mezi tyto přirozeně rychle se množící buňky řadíme buňky jaterní tkáně, bílé a červené krvinky, spermie, vajíčka. Ničení zdravých a reprodukčních buněk je jedním z hlavních příkladů nežádoucích účinků cDDP.

Dle statistik WHO jsou však nejčastějšími příčinami úmrtí rakovina prsu a rakovina tlustého střeva, v těchto případech je cDDP neúčinná. Dalším problémem jsou vedlejší účinky, jako je zvracení, nefrotoxicita, myelotoxicita a také poruchy krvetvorby. Při dlouhodobé opakované terapii dochází ke vzniku rezistence. Rezistence má za následek snížení účinnosti léčby. Tyto skutečnosti vedou ke snaze vyvinout nové kovové komplexy, které by měly sníženou toxicitu, křížovou rezistenci s cDDP a širší spektrum léčitelných nádorů (Brabec, V., 1990).

### **2. 2. 1. 1 Vazba cDDP na DNA**

Protinádorová aktivita platinových komplexů je spjata s jejich vazbou na DNA. Po navázání komplexu vznikají adukty, které blokují transkripci a replikaci. Právě vznik řady aduktů je možným rozhodujícím jevem odpovědným za biologickou aktivitu (Brabec, V., *et Kasparkova, J.*, 2005).



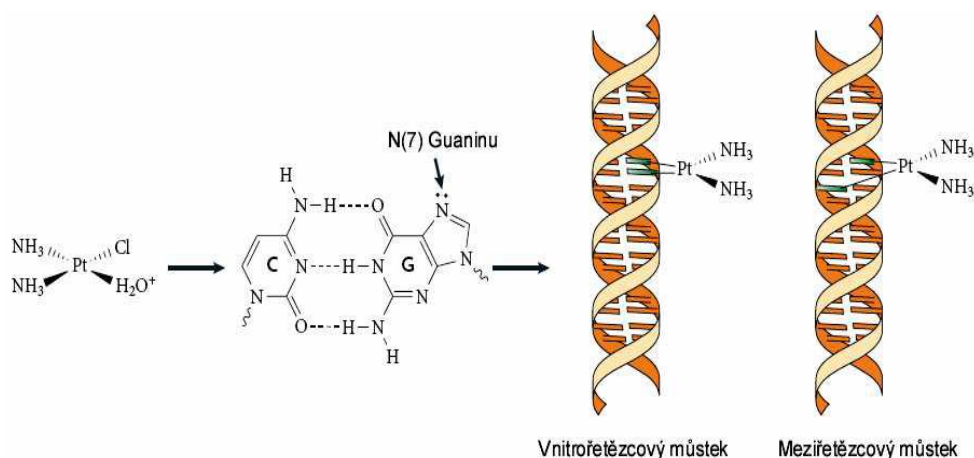


**Obr. 6.** Aktivace molekuly cDDP po prostupu z krevního řečiště do cytoplasmy buňky (převzato z Kelland, 2007).

Při intravenózním podání léčebného roztoku cDDP se tato molekula pohybuje krevním řečištěm s neutrálním nábojem, díky vysokému obsahu chloridových iontů v periferní krvi. Při prostupu této molekuly skrz cytoplasmatickou membránu (obr. 6) buňky dochází k odstoupení prvního atomu chloru, kvůli změně iontové síly prostředí, a vytvoření monoakvaformy cisplatiny. Při následném putování buněčnou cytoplasmou, k místu terapeutického účinku dochází k odstoupení i druhého chloridového ligandu a vzniká diakvaforma (kladně nabitá), která je vysoce reaktivní právě s molekulou DNA v jádře buňky.

Při reakci s molekulou DNA dochází v první řadě k elektrostatické interakci mezi kladně nabitým platinovým komplexem a záporně nabitým fosfátovým skeletem DNA. Přes odstupující ligand (nejčastěji chloridový iont, potažmo  $\text{H}_3\text{O}^+$ ) vzniká mezi atomem platiny a s dusíkem v pozici 7 (N7) molekuly guaninu (popř. adeninu) kovalentní vazba. Vytváří se takzvaný monofunkční adukt cisplatiny na DNA. V případě sterické blízkosti druhého odstupujícího ligandu a reaktivní pozice na heterocyklické bázi, může docházet k uzavření tzv. bifunkčního aduktu, a tak mohou vznikat buď vnitřetěžcové (IAC – intrastrand-crosslink), nebo meziřetěžcové (IEC – interstrand-crosslink) můstky (obr. 7). Vnitřetěžcové můstky se nejčastěji vytváří mezi dvěma sousedními guaniny (případně mezi sousedním guainem a adeninem) na jednom vlákně molekuly DNA, nebo mezi dvěma guaniny oddělenými libovolnou

bázi, tzv. 1,3-vnitřetězcový můstek (Kepler, B. K., *ed.*, 1993). Další bifunkční adukt může být uzavřen mezi protilehlými guaniny antiparalelních řetězců molekuly DNA, takto je vytvořen meziretězcový můstek.



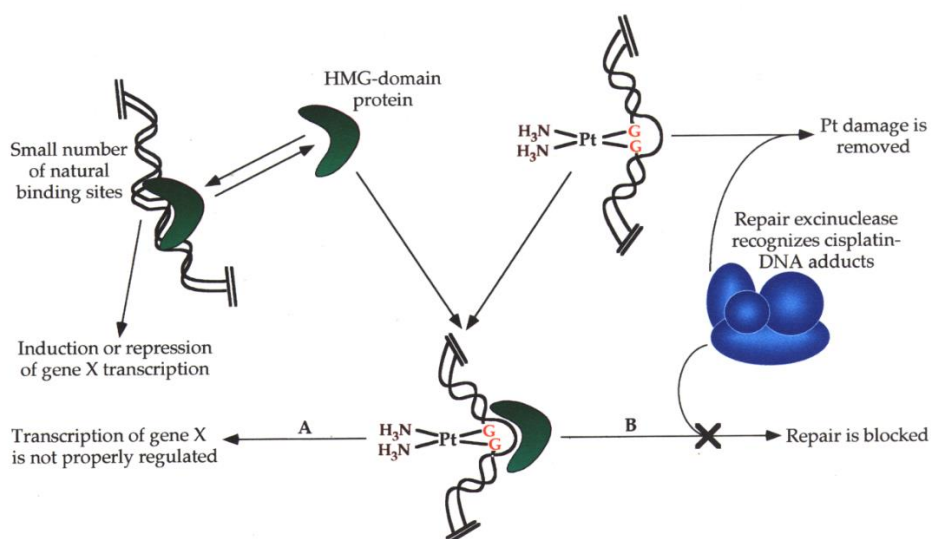
**Obr. 7.** Vznik cDDP aduktů na DNA (Kelland, L., 2007).

Vytvořené adukty společně s mnohonásobnými vazbami na DNA způsobující lokální denaturaci mají za následek deformaci DNA. Deformace DNA, kterou se rozumí její ohyb a rozvinutí, vede k blokaci mimo jiné replikace a transkripce a k vazbě proteinů rozpoznávající změny na DNA. Buňka s takto poškozenou DNA směřuje k apoptóze (programované smrti).

Molekulu DNA modifikovanou cDDP rozpoznávají proteiny, jedná se o nehistonové chromatinové proteiny, které se na tuto modifikaci specificky vážou a obsahují HMG (high mobility group) doménu. Na základě počtu HMG domén a evolučního vývoje dělíme proteiny do dvou skupin. Do první skupiny řadíme proteiny, které obsahují větší množství HMG domén a rozpoznávají DNA s malou specifitou. Proteiny první skupiny jsou nazývány strukturně specifické a patří mezi ně vazebné a transkripční faktory, které se označují jako HMGB1, HMGB2 proteiny. Do druhé skupiny řadíme proteiny sekvenčně specifické. Proteiny z obou skupin jsou složeny ze tří  $\alpha$  – helixů a mají tvar písmene L. HMG doména se váže do malého žlábků, kde způsobí ohyb a rozvíjení dvoušroubovice, čili jde o rozšíření malého žlábků a stlačení velkého žlábků. Do duplexu DNA se interkaluje aminokyselinový řetězec, který vazbu proteinu stabilizuje (Kartalou, M., *et al.*, 2001).

Selektivní afinitu ke klinicky účinným cytostatikům vykazují proteiny s doménou HMGB, které selektivně rozpoznávají (obr. 8) právě ohyb DNA způsobený komplexem platiny. Jsou schopny se vázat na DNA modifikovanou klinicky účinnou cisplatinou, ne však na DNA modifikovanou klinicky neúčinnou transplatinou (Pil, P. M., *et al.*, 1992).

Po objevení specifické vazby proteinů s HMG doménou na DNA byla vyslovena hypotéza, která vysvětluje úlohu proteinů s HMG doménou v protinádorové účinnosti cisplatiny. HMG protein, který je pevně navázaný na adukt cDDP, zabraňuje opravným mechanismům odstranit poškození způsobené cDDP. Tento neodstraněný adukt brání replikaci DNA. K HMG proteinům řadíme také transkripční faktory a pokud se v buňce nachází DNA poškozená cDDP, dochází k vazbě transkripčních faktorů na adukty. Kvůli nedostatku transkripčních faktorů nemůže být transkripce genů přesně regulována.



**Obr. 8.** Rozpoznávání a vazba HMG proteinů na můstek vytvořený molekulou cisplatiny (Zamble, D. B., *et al.*, 1999).

Využití *cis*-diammindichloridoplatnatého komplexu i přes velký úspěch má své nevýhody a omezení. Jednou z nevýhod jsou závažné vedlejší účinky, které zahrnují například poškození funkce ledvin, poškození nervových drah v míše, poškození zažívacího traktu. Spektrum nádorů, kdy je cDDP účinná, je velice úzké. Jak již bylo řečeno cDDP se nejčastěji používá k léčbě nádorů varlat. Avšak nejčastěji vyskytujícími

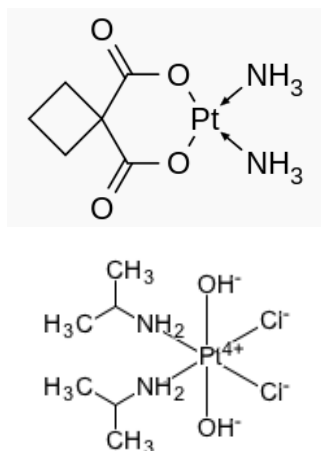
se nádory jsou karcinomy prsu a tlustého střeva. Na tyto typy nádorů nemá podávání cDDP žádný vliv. Další velkou nevýhodou je získání rezistence k léčivu při opakovaném podávání při recidivě choroby. Právě z těchto a mnoha dalších důvodů se hledají nejen různá analoga cDDP, ale také komplexy s jinými přechodnými kovy, které by se vyznačovaly sníženou toxicitou vůči nenádorovým buňkám, širším spektrem léčitelných nádorů a křížovou rezistencí s cisplatinou (Brabec, V., 1990).

### 2. 2. 2 Vývoj nových generací protinádorových preparátů

Vývoj protinádorově aktivních komplexů kovů je možné charakterizovat čtyřmi hlavními proudy:

1. syntéza a testování analogů cDDP;
2. testování komplexů s jiným centrálním atomem;
3. spojení protinádorově aktivních komplexů platiny (popř. komplexů s jiným centrálním atomem) spolu s nosičovými molekulami tak, aby to vedlo k jejich akumulaci v nádorových tkáních.,
4. spojením protinádorově účinných komplexů platiny s protinádorově účinnými molekulami, které mají jiný mechanismus účinku, např. interkalátory, HDACi, atd.

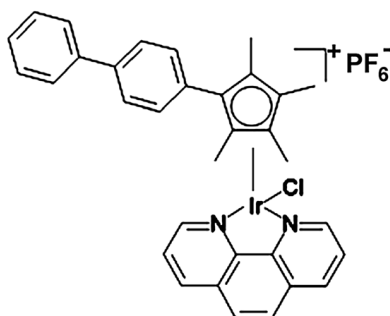
Mezi sloučeniny odvozené od cisplatiny patří například karboplatina (*cis*-1,1-cyklobutandikarboxyl-(2)-diaminplatnatý komplex) (obr. 9) a iproplatina (dichlorodihydroxo-bis(2-propamin)platičitý komplex) (obr. 9).



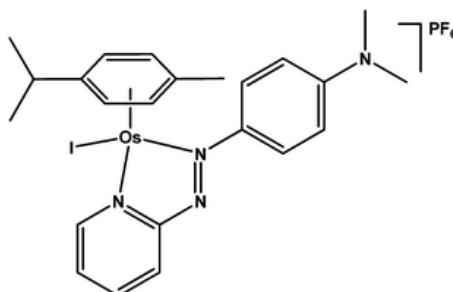
**Obr. 9.** Struktura karboplatiny a irpoplatiny. (<http://en.wikipedia.org/wiki/>).

Důvodem, proč jsou hledány nové sloučeniny na bázi cisplatiny, je především možnost jejich účinku na jiné druhy nádorů a zároveň jde o schopnost překonání resistance k cisplatině. Je zajímavé, že existují deriváty cisplatiny, které jsou schváleny pro užití v Japonsku (nedaplatina), Číně (lobaplatina) a v Jižní Korei (heptaplatina), protože mají velký klinický účinek právě na tyto populace na rozdíl od populace evropské a africké (Desoize *et* Madoulet, 2002).

Mezi komplexy s jiným centrálním atomem než platina patří například komplex iridia  $[(\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_4\text{C}_6\text{H}_4\text{C}_6\text{H}_5)\text{Ir}(\text{phen})\text{Cl}]\text{PF}_6$  (phen = fenantrolin) (obr. 10) a Os(II) azopyridinový komplex  $[\text{Os}(\eta^6\text{-p-cym})(\text{azpy-NMe}_2)]\text{PF}_6$  (obr. 11). Komplex iridia přednostně zabíjí rakovinné buňky před nekancerogenními buňkami a nevykazuje křížovou rezistenci s cisplatinou (Novohradský *et al.*, 2014). Bylo prokázáno, že komplex iridia indukuje buněčnou smrt mnohem rychleji než cisplatin. Osmiový komplex se od cisplatiny liší tím, že způsobuje malý ohyb DNA a řadí se mezi interkalátory (ávan Rijt *et* Sabine, H., 2011). Oba tyto komplexy se řadí k silným cytostatickým a cytotoxickým protinádorovým látkám.



**Obr. 10.** Struktura iridium(III) „half-sandwich“ komplexu. (převzato z Novohradský *et al.*, 2014).

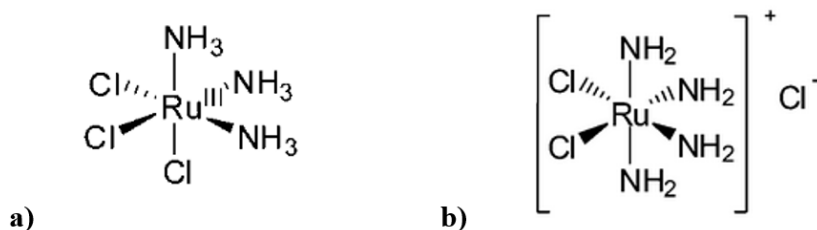


**Obr. 11.** Struktura Os(II) azopyridinového komplexu. (převzato z ávan Rijt *et* Sabine H., 2011).

Řada bílkovin, jejichž fyziologickou funkcí je transport kovových kationtů, se nachází v krvi člověka. Přenašečem pro ionty měďnaté, zinečnaté a vápenaté je albumin. Dalším příkladem je transferin, který přenáší trojmocné železo a mangan. Vysoká koncentrace trojmocného železa je zapotřebí pro intenzivní růst nádorových buněk. Přenašeč trojmocného železa transferin může do tkáně přenášet a v ní také uvolňovat kromě železa také protinádorově aktivní komplexy platiny (IV), ruthenia (III) a titanu (IV). Riziko vedlejších toxických účinků těchto komplexů v cílové tkáni je snižováno navázáním cytostatik na aminokyselinové zbytky v „kapse“ příslušného proteinu (Bertini, I., *et al.*, 1994).

### 2. 3 Rutheniové komplexy

Pro novou třídu protinádorově aktivních komplexů se mezi kovy vhodné jako centrální atom řadí mimo jiné také ruthenium. Rutheniové sloučeniny byly zprvu syntetizovány s podobnou strukturou jako má cDDP, a to kvůli studiu jejich protinádorové aktivity (obr. 12).



**Obr. 12.** Struktura *fac*- $RuCl_3(NH_3)_3$  (a) (převzato z Bratsos, Ioannis, *et al.*, 2007) a *cis*- $[RuCl_2(NH_2)_4]Cl$  (b) (převzato z Alessio, Enzo, *et al.*, 2004).

Hlavním důvodem pro zamítnutí těchto komplexů jako možných cytostatik bylo, že oktaedrální rutheniová analoga cDDP byla málo rozpustná ve vodě (Kepler, B. K., 1993).

V současné době je cDDP nejlépe prostudovaným cytostatikem, proto není divu, že nové rutheniové komplexy jsou srovnávány a studovány společně s cDDP. Je zřejmé, že rutheniové komplexy redukují růst nádorů, a to podobným způsobem jako cDDP prostřednictvím interakce s buněčnou DNA (Sava, G., *et al.*, 1990). Aktivní rutheniové komplexy se od cDDP nepatrně odlišují. Z chemického hlediska je podstatným

rozdílem geometrie komplexů. U rutheniových sloučenin je geometrie oktaedrální a u dvojmocných platinových sloučenin je geometrie čtvercově planární. Mezi další rozdíly patří elektronové přechody. Při redukci čtyřmocné platiny na dvojmocnou platinu dochází ke změně koordinačního čísla a tím i ke změně vazebné vzdálenosti ligandů od centrálního atomu (platiny). Oproti tomu je elektronový přechod mezi trojmocným a dvojmocným rutheniem velice snadný. Ve srovnání s dvojmocnou platinou má atom ruthenia dvě koordinační místa navíc. Právě tyto koordinační místa navíc umožňují komplexům ruthenia jiné typy interakcí s nukleovými kyselinami (Pyle, A. M., *et al.*, 1989).

### 2. 3. 1 Chemické vlastnosti komplexů ruthenia ve vztahu k toxicitě

Ruthenium se vyskytuje ve všech oxidačních stavech (od 0 do VIII.), i jako záporně nabitý dvojmocný anion. Ve vodných roztocích jsou nejstabilnější rutheniové komplexy s oxidačními čísly II, III a IV. Pro dvojmocné atomy ruthenia je důležitá přítomnost  $\pi$ -akceptorových ligandů ke stabilizaci. Tyto atomy se nacházejí v prostředí molekul umožňujících, aby redoxní potenciál  $\text{Ru}^{\text{II/III}}$  byl větší než 0,4 V. U komplexů čtyřmocného ruthenia se předpokládá jejich redukce na komplexy s nižším oxidačním stupněm (Doppelt, P., *et al.*, 1987).

Z důvodu toxicity protinádorových terapeutik je nutnost hledat nové preparáty, které budou schopné selektivně zasáhnout pouze nádorovou tkáň a nepoškodit tkáň zdravou. Této představě se přibližují komplexy trojmocného ruthenia. U těchto komplexu dochází *in cellulo* k transformaci do rychle se substituujících forem za podmínek typických pro nádorovou tkáň. Z tohoto hlediska je důležitým faktorem jednoelektronový rozdíl mezi  $d^6$  a  $d^5$  valenčními orbitaly iontů. Atom  $\text{Ru}^{\text{III}}$  má konfiguraci  $d^5$  a akceptuje  $\pi$ -elektrony do svého z poloviny zaplněného  $d_{\pi}$ -orbitalu. Díky tomuto efektu silně přitahuje halogenidy a anionty obsahující kyslík. Oproti tomu atom  $\text{Ru}^{\text{II}}$  s konfigurací  $d^6$  je  $\pi$ -akceptor s nižším nábojem. To vede k rozprostření  $d_{\pi}$ -orbitalů do prostoru. Díky tomu je umožněn jejich překryv a příjem od jiných  $\pi$ -elektronových systému. Oproti  $\text{Ru}^{\text{III}}$  váže  $\text{Ru}^{\text{II}}$  slaběji  $\pi$ -donorové ligandy, protože méně akceptuje elektrony (Clarke, M. J., *et al.*, 1989).

Na charakteru ligandů navázaných na centrální atom je závislá jeho redukce. Některé komplexy se mohou vázat přednostně do nádorové tkáně, a to díky rozdílům v redukčních vlastnostech nádorové a zdravé tkáně. V redukčním prostředí nádorové tkáně můžou komplexy s trojmocným rutheniovým atomem přecházet na dvojmocné rutheniové atomy. Za následek by to mohlo mít přeměnu na vysoce reaktivní formu (Clarke, M. J., *et al.*, 1989).

### **2. 3. 2 Transport v organismu**

Ruthenium může v některých metabolických procesech zastoupit železo. Oba prvky se vyskytují jako dvojmocné a trojmocné kationty ve vodných roztocích a to je jeden z hlavních důvodů, proč může být železo nahrazeno rutheniem. Trojmocné kationty jsou soustředovány v tenkém střevě a odtud jsou roznášeny do organismu. Tyto trojmocné kationty mají vysokou afinitu pro fenolátové ligandy, které jsou nezbytné pro přenos  $\text{Fe}^{3+}$  transferinem. Z tohoto důvodu mohou být transportovány také trojmocné rutheniové komplexy za pomoci transferinu (Sava, G., *et al.*, 1990).

Pravděpodobný způsob metabolizace probíhá tak, že neaktivní trojmocné rutheniové komplexy, které jsou přítomny v krvi, se naváží na transferin. Po navázání jsou dopraveny do tkání, které jsou bohaté na transferinové receptory. Mezi takovoto tkáně se řadí například hypoxická nádorová buňka, která je vhodná pro redukci trojmocných komplexů na reaktivní dvojmocné komplexy. Tato reaktivní dvojmocná analoga se mohou vázat na báze DNA (Clarke, M. J., *et al.*, 1993).

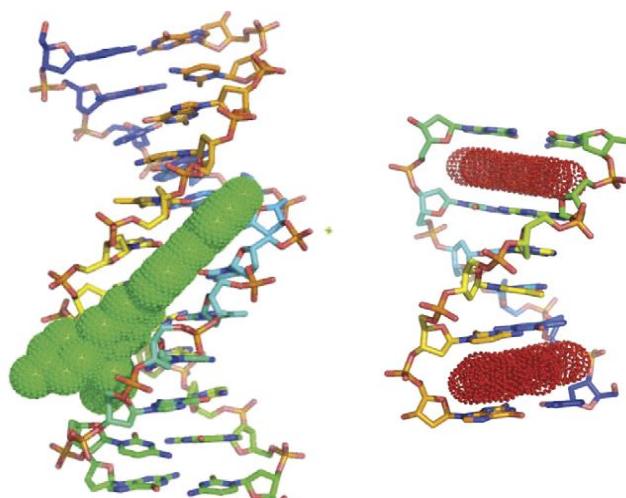
Tyto a další vlastnosti mohou být využity pro vývoj nových protinádorově účinných léčiv, které budou mít oproti cDDP nižší toxicitu, která méně zatíží pacienta při léčbě nádorového onemocnění.

## **2. 4 Nekovalentní interakce sloučenin s molekulou DNA**

Rakovinové onemocnění patří mezi nejčastější smrtelné onemocnění ve světě (<http://www.who.int>). Velké procento chemoterapeutických léčiv proti rakovině jsou sloučeniny, které interagují s DNA přímo nebo brání správnému rozvolnění DNA (např. inhibicí topoisomerázy I). Nukleové kyseliny mohou poskytnout mezibázový prostor pro vsunutí planárních částí molekul – interkalátorů, anebo mohou nekovalentně



interagovat s jinými molekulami prostřednictvím malého a velkého žlábků na svém povrchu (obr. 13). Formu a rozsah interakce ovlivňují vlastnosti prostředí, charakter ligandu a sekvence cílové molekuly nukleové kyseliny (Palchaudhuri, R., *et al.*, 2007).



**Obr. 13.** Vlevo je zobrazena interakce molekuly prostřednictvím žlábků a vpravo je zobrazena interkalace molekuly do DNA (Palchaudhuri, R., *et al.*, 2007).

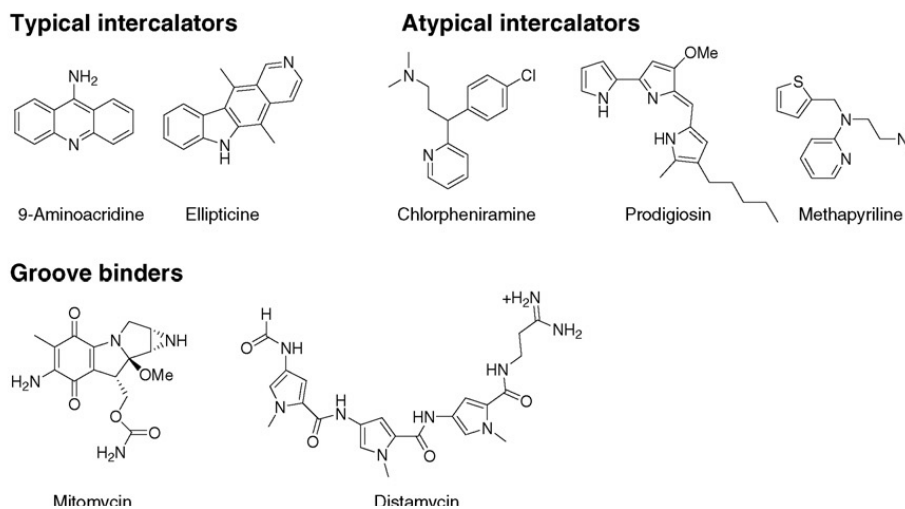
#### 2. 4. 1 Interkalace

Interkalační typ vazby je způsoben vmezeřením ligandu s vhodným prostorovým uspořádáním mezi páry bází. Poté dojde ke stabilizaci nekovalentními vazbami typu  $\pi$ - $\pi$  interakce (Bancroft, D. P., *et al.*, 1990).

Planární (hetero) aromatická struktura se vmezeří mezi páry bází DNA, přičemž dochází k stabilizaci, zpevnění konformace, prodloužení a k částečnému rozvinutí této molekuly nukleové kyseliny. Tato změna může způsobit inhibici funkce řady enzymů, které působí na DNA (např. transkripci a replikaci). Díky tomuto faktu má interkalace zásadní praktický význam pro chemoterapii nádorových onemocnění. Významný vliv úspěšné interkalace je připisován hydrofobicitě rozpouštědla, iontové síle prostředí, flexibilitě a sekvenci molekuly nukleové kyseliny (Palchaudhuri, R., *et al.*, 2007).

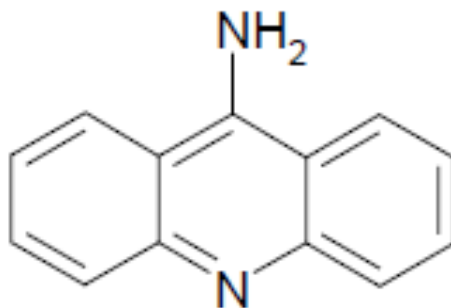
V současné době dělíme interkalátory na dvě základní skupiny: klasické a neklasické interkalátory (obr. 14). Klasické interkalátory jsou dokonalé planární molekuly a jedná se o dobře prostudované sloučeniny, jejichž silný sklon interkalovat do DNA často zapříčiňuje genotoxické účinky. Neklasické interkalátory jsou

ostatní ne zcela rovinné a většinou jen částečné aromatické molekuly (Palchadhuri, R., *et al.*, 2007).



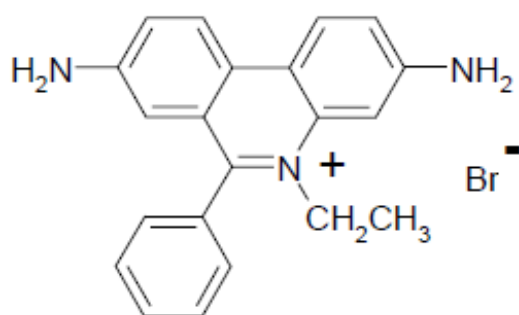
**Obr. 14.** Příklady sloučenin klasických interkalátorů, neklasických interkalátorů a sloučenin vázajících se do žlábků (Palchadhuri, R., *et al.*, 2007).

Mezi klasické interkalátory řadíme akridiny, kdy samotný 9-aminoakridin (obr. 15) interkaluje do DNA, přičemž celý heterocyklický systém interaguje se sousedními páry bází. Akridiny obvykle způsobí rozvinutí dvojité šroubovice o 17°. Předpokládá se, že tyto sloučeniny v protoionizované formě nejprve interagují se záporně nabitým polyfosfátem, podle kterého se volně pohybují a vzhledem k dynamice DNA interkalují mezi páry bází (Dervan, P. B., 2001).



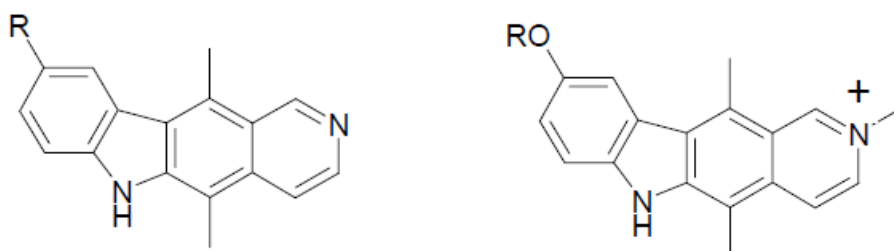
**Obr. 15.** Strukturní vzorec 9-aminoakridinu (převzato z Dervan, P. B., 2001).

Dalším zástupcem je ethidium bromid (obr. 16), polycyklické aromatické barvivo, které se velmi dobře ale neselektivně interkaluje do DNA. Každá interkalovaná molekula způsobí rozvinutí dvoušroubovice o 26° (Dervan, P. B., 2001).



*Obr. 16. Strukturní vzorec ethidium bromidu (převzato z Dervan, P. B., 2001).*

Příkladem přírodního, z rostliny extrahovaného interkalátoru je ellipticin (obr. 17) a jeho 9-methoxyderivát. Ellipticin sám o sobě není silným interkalátorem, avšak jeho hydroxyderivát ano, a navíc vykazuje G-C selektivitu. Ellipticin je základem řady od něj odvozených protinádorových chemoterapeutik (Dervan, P. B., 2001).



*Obr. 17. Strukturní vzorec ellipticinu a jeho 9-methoxyderivátu (převzato z Dervan, P. B., 2001).*

#### 2. 4. 2 Vazba do žlábků

Navázání sloučeniny do malého či velkého žlábků DNA nevyvolává, na rozdíl od interkalace, velké konformační změny DNA. Když se interkalátory vmezeří do molekuly DNA, dojde k prodloužení dvoušroubovice. Sloučenina, která se naváže do malého nebo velkého žlábků, nezpůsobí tak velké změny – nedojde například k prodloužení dvoušroubovice. Vazba do žlábků může být považována za podobnou modelu „zámek a klíč“ a to pro ligand-makromolekulární vazbu. Pro model enzym-substrát interakce platí, že substrát i enzym mají specifické geometrické tvary, které se hodí přesně do sebe – jako „klíč do zámku“. Vazby do žlábků jsou stabilizovány mezimolekulárními interakcemi a obvykle mají větší asociační konstantu než interkalátory (přibližně  $10^{11} \text{ M}^{-1}$ ). Obdobně jako interkalátory prokazují sloučeniny,

které interagují prostřednictvím malého či velkého žlábků, klinické využití ve formě protinádorových či antibakteriálních činidel. Mezi sloučeniny, které se vážou do žlábků, se řadí například mitomycin či antracykliny (obr. 14). Existuje také mnoho sloučenin, které vykazují oba typy nekovalentních interakcí s molekulou DNA – interkalace a vazba do žlábků. Například právě antracykliny, které můžeme řadit do skupin sloučenin schopných jak interkalace, tak vazby do žlábků (Palchaudhuri, R., *et al.*, 2007).

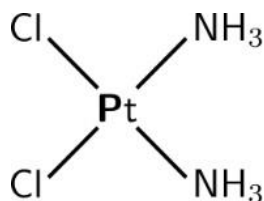
### 3. Cíl práce

Cílem této práce bylo:

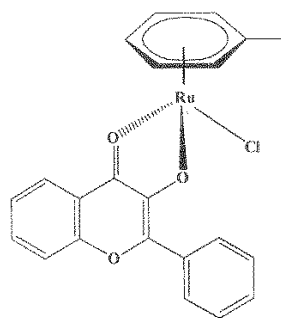
1. Vypracovat literární rešerši na zadané téma.
2. Stanovit molární absorpční koeficient  $\epsilon$  rutheniového komplexu.
3. Studovat interakce DNA s novým protinádorově účinným komplexem [Ru(tol)flavonol]Cl.
4. Stanovit vazbu rutheniového komplexu na DNA.
5. Určit sekvenční specificku vazby.
6. Stanovit, zda komplex [Ru(tol)flavonol]Cl stabilizuje nebo destabilizuje DNA.
7. Určit, jestli komplex [Ru(tol)flavonol]Cl rozvíjí DNA.
8. Stanovit  $IC_{50}$  rutheniového komplexu a porovnat cytotoxicitu s klinicky účinnou cisplatinou.
9. Diskutovat (porovnat) získané výsledky s údaji dostupnými v odborné literatuře.

## 4. Materiál a metody

### 4. 1 Použité komplexy



*Obr. 18. Strukturní vzorec cis-diamminodichloridoplatinatého komplexu. Molekulová hmotnost 300,05 g×mol<sup>-1</sup>.*



*Obr. 19. Strukturní vzorec [Ru(tol)flavonol]Cl. Molekulová hmotnost 465,89 g×mol<sup>-1</sup>.*

### 4. 2 Chemikálie a biologický materiál

- Deionizovaná voda (vodivost 18,3 MΩ.cm<sup>-1</sup>)
- DNA z telecího thymu (ttDNA obsahující 42 % G + C párů a 58 % A + T párů) o koncentraci 1,07.10<sup>-3</sup> mol×l<sup>-1</sup> a průměrné molekulové hmotnosti 20 000 kDa byla připravena postupem popsáním v literatuře (Brabec, V., *et al.*, 1976)
- Syntetické polynukleotidy poly-dG.dC a poly-dA.dT (Sigma Aldrich)
- Plasmid pUC19 o koncentraci 2,72.10<sup>-3</sup> mol×l<sup>-1</sup> (New England Biolabs, Velká Británie)
- Restrikční endonukleáza *EcoRI* (New England Biolabs, Velká Británie)
- TRIS-acetátový (TAE) pufr 50x
  - 0,04 mol×l<sup>-1</sup> Tris – acetát
  - 0,002 mol×l<sup>-1</sup> EDTA

- DMF – dimethylformamid (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo)
- DMSO – dimethylsulfoxid (Sigma Aldrich)
- TRIS – tris(hydroxymethyl)aminomethan (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo)
- Chlorid sodný – NaCl (SIGMA)
- Chloristan sodný – NaClO<sub>4</sub> (Sigma Aldrich)
- Agaróza a ethidium bromid (EtBr) (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo).
- Bromfenolová modř (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo)
- Acetát sodný CH<sub>3</sub>COONa (Sigma Aldrich)
- Kultivační média RPMI 1640 a trypsin (Sigma Aldrich)
- PBS pufr 10x
  - 80 g NaCl
  - 2 g KCl
  - 14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
  - 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- Buněčná linie A2780 (lidský ovariální karcinom) byla poskytnuta prof. B. Kepplerem z Univesity of Vienna
- Neutrální červeň (Sigma Aldrich)

### 4. 3 Přístroje

UV/VIS Spektrofotometr Beckman Coulter DU 730

Varian AA240Z Zeeman atomic absorption spectrometer

Spektrofotometr Varian Cary 4000

Spektropolarimetr JASCO J-720

Bio Vortex V1 – Biosan

Centrifuga Hemle Z 100M

Termoblok – MajorScience

Mikroviskozimetr AMVn - Anton Paar GmbH

Major science UV transluminátor Gel Logic 112

Flow box

Absorbanční reader Synergy MX (Biotek, VT, USA)

## 4. 4 Metody

### 4. 4. 1 Modifikace DNA

Pro spektrofotometrická měření a viskozimetrii byla použita ttDNA (telecí thymová, koncentrace ttDNA použité pro jednotlivé experimenty jsou uvedeny níže). Pro studium možného rozvinutí DNA komplexem ruthenia Ru1 byla využita plasmidová DNA (pUC19, NEB, Velká Británie, modifikováno bylo 0,6  $\mu$ g DNA).

DNA, jak telecí, tak plasmidová, byla modifikována zkoumaným komplexem Ru1 na předpokládané stupně modifikace. Poměr látkového množství volného komplexu Ru1 ku látkovému množství DNA se nazývá  $r_i$ :

$$r_i = \frac{n_{Ru}}{n_{DNA}} = \frac{c_{Ru}}{c_{DNA}} = \frac{c_{Ru,zás} \cdot V_{Ru,zás}}{c_{DNA,zás} \cdot V_{DNA,zás}},$$

kde  $n_{Ru}$  je látkové množství ruthenia,  $n_{DNA}$  je látkové množství DNA,  $c_{Ru}$  je koncentrace rutheniového komplexu v daném vzorku,  $c_{DNA}$  je koncentrace DNA vyjádřená v koncentraci nukleotidů v daném vzorku,  $c_{Ru,zás}$  je koncentrace zásobního roztoku daného komplexu Ru1,  $V_{Ru,zás}$  je objem roztoku komplexu Ru1,  $c_{DNA,zás}$  je koncentrace DNA použité do reakce vyjádřená jako koncentrace nukleotidů a  $V_{DNA,zás}$  je objem DNA.

Stupeň modifikace  $r_b$  je definován jako počet atomů ruthenia skutečně navázaných na jednu bázi DNA.



Veškeré modifikační reakce probíhaly v prostředí  $0,01 \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$  TRIS, pH 7,4, pokud není uvedeno jinak. Vzorky byly analyzovány ihned, pokud není uvedeno jinak.

#### 4. 4. 2 Stanovení molárního absorpčního koeficientu komplexu Ru1

Pro stanovení molárního absorpčního koeficientu komplexu Ru1 byl použit UV/VIS Spektrofotometr Beckman Coulter DU 730. Nejprve byl změřen samostatný  $0,01 \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$  TRIS, pH 7,4 (blank). Poté byla proměřena série pěti připravených vzorků komplexu Ru1 o koncentracích  $6,5 \times 10^{-6} - 2,6 \times 10^{-5} \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$ . Absorpční maximum komplexu Ru1 bylo zjištěno při  $\lambda = 344 \text{ nm}$ .

Z Lambert-Beerova zákona:

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

kde  $A$  je absorbance měřeného roztoku,  $\varepsilon$  je molární absorpční koeficient měřeného roztoku,  $c$  je koncentrace měřeného roztoku a  $l$  je délka optické dráhy v cm, která prochází měřeným vzorkem, byl následnou úpravou určen molární absorpční koeficient pro komplex Ru1.

Molární absorpční koeficient byl určen ze směrnice přímky závislosti absorbance komplexu Ru1 na jeho koncentraci v  $\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ . Hodnota absorbance byla odečtena při  $\lambda = 344 \text{ nm}$ , což je hodnota absorpčního maxima rutheniového komplexu.

#### 4. 4. 3 Stanovení vazebné konstanty metodou titrace

Afinita vazby studovaného komplexu ruthenia k DNA byla stanovena pomocí měření elektronových absorpčních spekter. Spektra komplexu Ru1 byla měřena na spektrofotometru Beckman Coulter DU 730 v křemenné kyvetě s délkou optické dráhy 1 cm. Roztok komplexu ruthenia v  $0,01 \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$  TRIS, pH 7,4 o koncentraci  $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$  a objemu 100  $\mu\text{l}$  byl postupně titrován 1  $\mu\text{l}$  přidavky DNA o koncentraci  $1,96 \times 10^{-3} \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$ .

Hodnoty vazebných konstant byly stanoveny s využitím naměřených hodnot absorbance při 344 nm pomocí metody publikované dříve (C.D. Kanakis, *et. al*, 2009) dle následující rovnice:

$$\frac{1}{A-A_0} = \frac{1}{A_\infty-A_0} + \frac{1}{K \cdot (A_\infty-A_0)} \cdot \frac{1}{c_{ligand}},$$

kde  $A_0$  je absorbance volného komplexu bez přídavku DNA,  $A_\infty$  je výsledná absorbance komplexu DNA.Ru a  $A$  je naměřená absorbance pro různé koncentrace přidané DNA (korigovaná na změnu objemu). Závislost  $\frac{1}{A-A_0}$  vs.  $\frac{1}{c_{DNA}}$  je lineární, jak vyplývá z tohoto vztahu, a vazebná konstanta  $K_b$  může být stanovena z této přímky jako poměr úseku ku směrnici.

#### 4. 4. 4 Stanovení kovalentní vazby komplexu Ru1 na DNA

Dialýza vzorků modifikované DNA se provádí pomocí vhodné dialyzační membrány. V našem případě jsme použili dialyzační membrány Spectra/Por MWCO 12 – 14 000 Da. Dialyzační membrány byly vyvařeny v destilované vodě, dokud nebyly zcela průhledné. Vzorky inkubované 24 hodin při 37 °C, obsahující modifikovanou DNA (koncentrace DNA byla  $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$ ) na příslušné  $r_i$  (0,05 – 0,5), byly rozděleny na dvě části. Jedna část vzorků byla dialyzována - vzorky byly uzavřeny v dialyzačních membránách pomocí dvou svorek (jedna z nich byla magnetická). Dialýza probíhala proti vhodnému médiu. Nejprve byly vzorky dialyzovány 1 h oproti  $0,5 \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$  NaCl, poté další hodinu oproti  $0,1 \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$  NaCl. Nakonec byly vzorky dialyzovány přes noc v chladu proti destilované vodě. Druhá část vzorků byla ponechána jako nedialyzovaná kontrola.

Koncentrace ruthenia v dialyzovaných i nedialyzovaných vzorcích byla stanovena pomocí bezplamenné atomové absorpční spektrofotometrie (FAAS), koncentrace DNA ve vzorcích byla stanovena pomocí absorpční spektroskopie měřením absorbance při 260 nm ( $\epsilon_{260} = 6400 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ). Z těchto hodnot byly vypočítány stupně modifikace jednotlivých vzorků (viz kapitola 4. 4. 1). Porovnáním získaných hodnot pro dialyzovaný a nedialyzovaný vzorek bylo stanoveno procentuální množství

rutheniového komplexu, které zůstalo na DNA navázáno i po dialýze, tj. množství komplexu kovalentně navázaného na ttDNA.

#### 4. 4. 5 Měření teploty tání ( $T_m$ )

Denaturační křivky modifikované DNA ( $c = 4,64 \times 10^{-5} \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$ ) o příslušném  $r_i$  (0,03 – 0,09) byly změřeny na spektrofotometru Varian Cary 4000 při postupném ohřevu vzorků o 1 °C v křemenných kyvetách o optické dráze 1 cm. Měření bylo provedeno v prostředí 0,01 mol $\times$ l $^{-1}$  TRIS, pH 7,4. Teplota tání ( $T_m$  – melting temperature) byla určena jako hodnota odpovídající inflexnímu bodu denaturační křivky (teplota, ve které nabývá první derivace absorbance podle teploty maximální hodnoty) pomocí programu GraphPad Prism 4.

#### 4. 4. 6 Cirkulární dichroismus

Jako cirkulární dichroismus (CD) se označuje rozdíl absorbancí levotočivě a pravotočivě kruhově polarizovaného světla po jeho průchodu vzorkem, který obsahuje chirální molekuly. Chirální molekuly obsahují jeden nebo více tzv. středů chiralit (chirálních atomů), což je atom, který má své sousedy navázány zrcadlově asymetricky. Většinou se jedná o atom uhlíku se čtyřmi různými substituenty. Tyto látky jsou opticky aktivní, tzn., že stáčí rovinu polarizovaného světla.

Nukleové kyseliny jsou chirálními molekulami. Proto tedy rovněž CD nukleových kyselin je výsledkem různých absorpcí analyzovaným vzorkem nukleové kyseliny pravotočivého a levotočivého kruhově polarizovaného světla. Jedná se však o velmi malý rozdíl dvou velkých čísel. Z tohoto důvodu výpočty spekter CD většinou nereprodukuje experimentálně získaná spektra CD. Kromě toho výpočty jsou velmi složité a přesné hodnoty polárních a magnetických momentů bází nukleových kyselin nejsou známy. Je to tedy hlavně z těchto důvodů, proč CD je většinou využíván pro empirické srovnávací studie nukleových kyselin. Nukleové kyseliny obsahují chirální nukleosidy, neboť obsahují uhlíkový atom C1' cukerného zbytku. Avšak hlavní příspěvek k CD nukleových kyselin pochází z asymetrického vrstvení nukleosidů do šroubovicového uspořádání, jako jsou například A-, B- nebo Z-

formy DNA, které poskytují specifický tvar spekter CD. Ke změnám ve spektrech CD dochází také vlivem změn v koncentraci solí, pH nebo dalších agens.

Spektra CD se měří pomocí spektropolarimetrů CD. K základním rysům těchto přístrojů patří zdroj monochromatického levotočivě a pravotočivě kruhově polarizovaného světla a zařízení pro detekci rozdílu absorbance těchto dvou polarizací světla ( $\Delta A = A_L - A_P$ ).

### **Molární CD:**

Molární CD může být vyjádřen pomocí Lambert-Beerova zákona jako:

$$\Delta A = (\varepsilon_L - \varepsilon_P) \cdot c \cdot l,$$

kde  $\varepsilon_L$  a  $\varepsilon_P$  jsou molární extinkční (absorpční) koeficienty pro levotočivě a pravotočivě kruhově polarizované světlo,  $c$  je molární koncentrace a  $l$  je délka optické dráhy vzorku, kterým prochází světlo. Z toho plyne definice molárního CD:

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_P.$$

Tato veličina je obvykle uváděna jako CD studované látky. Poněvadž  $\Delta\varepsilon$  je funkcí vlnové délky, hodnota molárního CD  $\Delta\varepsilon$  musí být přiřazena vlnové délce.

Většina spektropolarimetrů CD, přestože měří diferenční absorbanci  $\Delta A$ , poskytuje spektrum CD ve stupních elipticity,  $\theta$  versus  $\lambda$  (vlnová délka), spíše než  $\Delta A$  versus  $\lambda$ . Molární elipticita je CD korigovaný na koncentraci. Přepočtení mezi molárním CD a molární elipticitou  $\theta$  je možný následovně (Rodger, A., *et al*, 1997):

$$\theta = 3298,2 \cdot \Delta\varepsilon.$$

Nejjednodušší aplikace CD pro určení struktury DNA vychází ze skutečnosti, že CD měřený v oblasti vlnových délek od 200 do 300 nm vzniká v důsledku zkosené orientace bází v případech, kdy je DNA šroubovice rozvinutá, nebo báze jsou

nakloněné, což jsou typické odchylky od pravidelné konformace B-DNA. Spektroskopie CD je také velmi užitečná pro studium interakcí DNA s ligandy, které jsou achirální. Avšak jestliže se tyto ligandy naváží na DNA, mohou vyvolat tzv. indukovaný CD (ICD) charakteristický pro jejich interakci. Tohoto jevu se využívá jednoduše k prokázání vazby ligandu na DNA nebo například při detekci tzv. "interkalátorů", tj. ligandů schopných vmezeřovat se mezi páry bází ve dvoušroubovicové DNA.

V této práci jsme analyzovali interakci komplexu ruthenia Ru1 s ttDNA pomocí měření spekter CD. Měření byla provedena s DNA v koncentraci  $c = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$  nemodifikovanou a modifikovanou komplexem Ru1; modifikace odpovídala hodnotám  $r_i = 0,03 - 0,09$ . K měření spekter CD v rozmezí vlnových délek 240 – 490 nm byl využit spektropolarimetr JASCO J-720. Vzorky byly měřeny ihned po modifikaci DNA komplexem Ru1. Spektra označující volné ruthenium byla změřena pro vzorek obsahující komplex Ru1 v prostředí  $0,01 \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$  TRIS, pH 7,4. Koncentrace rozpouštědla (DMF) byla ve všech vzorcích totožná – 0,56 %. Jako vhodné kontroly byla zaznamenána také spektra CD vzorků obsahujících nemodifikovanou DNA nebo volný komplex Ru1 (bez DNA).

#### 4. 4. 7 Viskoziometrie

Viskoziometrie patří k metodám, které mohou určit, zda daná látka či komplex jsou interkalátory. Pro měření byl použit Mikroviskozimetr AMVn od firmy Anton Paar GmbH. Metoda je založena na měření doby pádu kuličky ve skleněné kapiláře s přesně definovanými parametry jak kuličky, tak kapiláry od výrobce.

Měření probíhalo v kapiláře o průměru 1,6 mm při 37°C v prostředí  $0,01 \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$  TRIS, pH 7,4. Viskozita roztoku ttDNA (v konstantní koncentraci  $4,7 \times 10^{-4} \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$ ) byla měřena v přítomnosti studovaného komplexu Ru1 o různých stupních modifikace  $r_i$  (0 – 0,08).

Měření bylo provedeno vždy třikrát a výsledné údaje zprůměrovány. Tato data byla poté použita k výpočtu specifické viskozity DNA

v nepřítomnosti rutheniového komplexu ( $\eta_0$ ) s využitím doby pádu kuličky v čistém pufru podle vztahu:

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

kde  $t$  je doba pádu kuličky v roztoku DNA a  $t_0$  je doba pádu kuličky v čistém pufru bez DNA.

Specifická viskozita DNA v přítomnosti komplexu ruthenia byla pak vypočítána jako:

$$\eta = \frac{(t_1-t_0)}{t_0},$$

kde  $t_1$  je doba pádu kuličky v roztoku DNA modifikované komplexem Ru1 a  $t_0$  je doba pádu kuličky v čistém pufru bez DNA. Takto získaná data byla vynesena jako  $\left(\frac{\eta}{\eta_0}\right)^{\frac{1}{3}}$  proti  $r_1$  (Jiang, Cai-Wu, 2004).

#### 4. 4. 8 Elektroforéza v nativním agarózovém gelu

Rozvařením příslušného množství agarózy v pufru TAE 1x byl připraven 1% agarózový gel. Agarózový gel byl vařen v Erlenmeyerově baňce po dobu 10 minut. Po postupném zchladnutí na teplotu přibližně 40 °C byl gel nalit do vaničky s připraveným hřebínkem, který nám vytvořil jamky vhodné k nanesení vzorků, a ponechán 30 minut tuhnout. Před začátkem samotné elektroforézy byl gel v elektroforetické vaně zalit elektrolytem, v našem případě puftrem TAE 1x.

Ke vzorkům o celkovém objemu 10  $\mu$ l obsahujícím 0,6  $\mu$ g DNA (pUC19) a modifikovaným komplexem Ru1 na  $r_1$  0,02 – 0,5, inkubovaným po dobu 10 minut při RT, byl přidán roztok bromfenolové modři (BFM) (1/6 objemu vzorku). Elektroforéza probíhala při pokojové teplotě (RT), při konstantním napětí 90 V po dobu 130 minut. Vizualizace fragmentů DNA byla provedena vodným roztokem EtBr

(0,75 mg×ml<sup>-1</sup>, 20 minut barvení). Po obarvení byl výsledek elektroforetické separace vizualizován na UV transluminátoru a vyfotografován. Rychlost pohybu molekul DNA v agarózovém gelu závisí na jejich superhelikální hustotě a je nazývána elektroforetickou mobilitou. Přirozená forma plasmidové DNA je charakteristická nadšroubovicovým vinutím, může být pozitivně nebo negativně zavinutá, a je označována jako SC. Tato forma při elektroforetické separaci putuje nejrychleji. Pokud dojde k snížení superhelikální hustoty nebo dokonce uvolnění nadšroubovicového vinutí díky zlomu v jednom řetězci (OC forma), nebo k linearizaci kruhové molekuly plasmidové DNA, tak se tyto formy pohybují pomaleji než SC forma, dochází tedy ke snížení elektroforetické pohyblivosti těchto molekul.

Intenzita proužků byla vyhodnocena denzitometricky a vyjádřena jako procentuální přírůstek OC formy DNA ve vzorcích v porovnání s kontrolním vzorkem bez přidaného komplexu Ru1.

#### **4. 4. 9 Cytotoxicita – Inhibice růstu nádorových buněk *in vitro***

Buňky lidského ovariálního karcinomu A2780 byly pěstovány v kultivačním médiu RPMI 1640 doplněném o FBS (fetální bovinní sérum, 10%) a penicilin-streptomycin (1%). Buňky byly kultivovány ve stálém prostředí 37°C, 5% CO<sub>2</sub> atmosféře a 100% vlhkosti ve vhodné nádobě. Do 96-jamkového panelu bylo nasazeno 10 000 buněk/jamka a inkubováno ve stálém prostředí (uvedeno výše) přes noc. Pro test cytotoxicity protinádorově účinného komplexu Ru1 byla připravena série koncentrací 0 – 100 μg×ml<sup>-1</sup> v růstovém médiu. 100 μl takto připraveného roztoku bylo přidáno do jednotlivých jamek. Buňky byly s komplexem Ru1 inkubovány následujících 72 hodin.

Po ukončení inkubace bylo kultivační médium s komplexem Ru1 odstraněno. Do každé jamky bylo přidáno 100 μl pracovního roztoku neutrální červení (40 μg×ml<sup>-1</sup>) v růstovém médiu RPMI 1640 a buňky byly dále inkubovány 2 hodiny v CO<sub>2</sub> inkubátoru. Roztok neutrální červení byl z jednotlivých jamek odstraněn a buňky byly promyty 100 μl pufru PBS 1x. Neutrální červeně je metabolizována v lysosomech a proto k uvolnění barviva z těchto buněčných organel bylo použito 100 μl

odbarvovacího roztoku. Intenzita zbarvení byla detekována na absorbančním readeru Synergy MX (Biotek, VT, USA) při vlnové délce 540 nm.

Hodnoty  $IC_{50}$  (koncentrace sloučeniny, při níž je 50 % buněk živých a 50 % buněk mrtvých) byly vypočítány z grafické závislosti přežívání buněk na koncentraci daného komplexu ( $\mu\text{mol}\times\text{l}^{-1}$ ). Hodnoty byly převedeny na procenta kontroly (procento přežití buněk). Všechny experimenty byly provedeny ve třech opakováních.



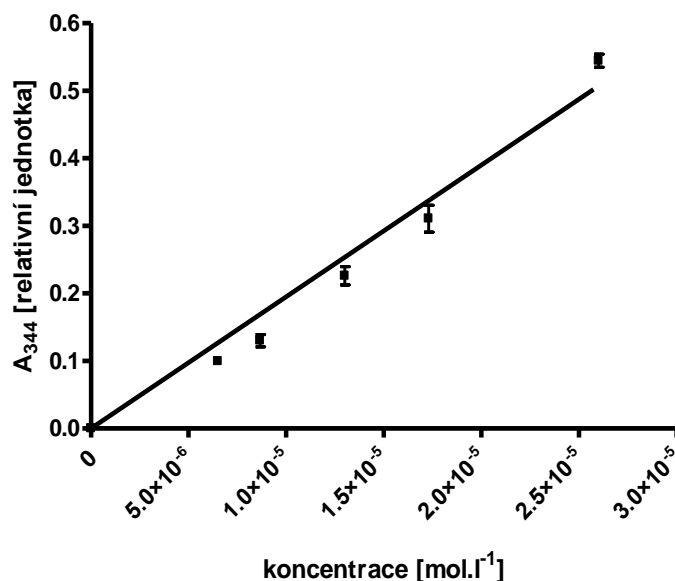
## 5. Výsledky

### 5. 1 Spektrofotometrická charakterizace zkoumaného komplexu Ru1

V této diplomové práci byl studován potenciálně protinádorově účinný komplex ruthenia, který má molekulovou hmotnost  $465,89 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Tento komplex byl rozpustný v DMF (dimethylformamid), což je bezbarvá kapalina dobře mísitelná s vodou. Byl studován na základě poznatků o jeho struktuře, ve které se objevuje jeden pravděpodobný odstupující ligand (atom chloru), který poskytuje prostor pro vytvoření kovalentní vazby. Zároveň se ve struktuře vyskytuje flavonolový ligand, který by potenciálně mohl interkalovat do molekuly DNA anebo s ní jinak nekovalentně interagovat.

#### 5. 1. 1 Stanovení molárního absorpčního koeficientu rutheniového komplexu

Absorpční spektroskopie je vhodnou metodou ke studiu vlastností komplexů přechodných kovů, které poskytují barevné roztoky (Hegde A. H., *et al.*, 2012). Tuto metodiku jsme využili ke stanovení hodnoty absorpčního maxima komplexu Ru1. Pro roztok komplexu Ru1 se toto absorpční maximum nachází při vlnové délce 344 nm. Jak vyplývá z Lambert-Beerova zákona, absorbance látky je přímo úměrná její koncentraci a molárnímu absorpčnímu koeficientu. Hodnotami uvedenými v grafu 1, který reflektuje zvyšování absorbance roztoku komplexu Ru1 se vzrůstající koncentrací téhož, byla proložena křivka. Protože závislost absorbance na zvyšující se koncentraci Ru1 komplexu je lineární (viz graf 1.), byl ze směrnice přímky vypočten molární absorpční koeficient komplexu Ru1, viz vzorec v kapitole 4. 4. 2.

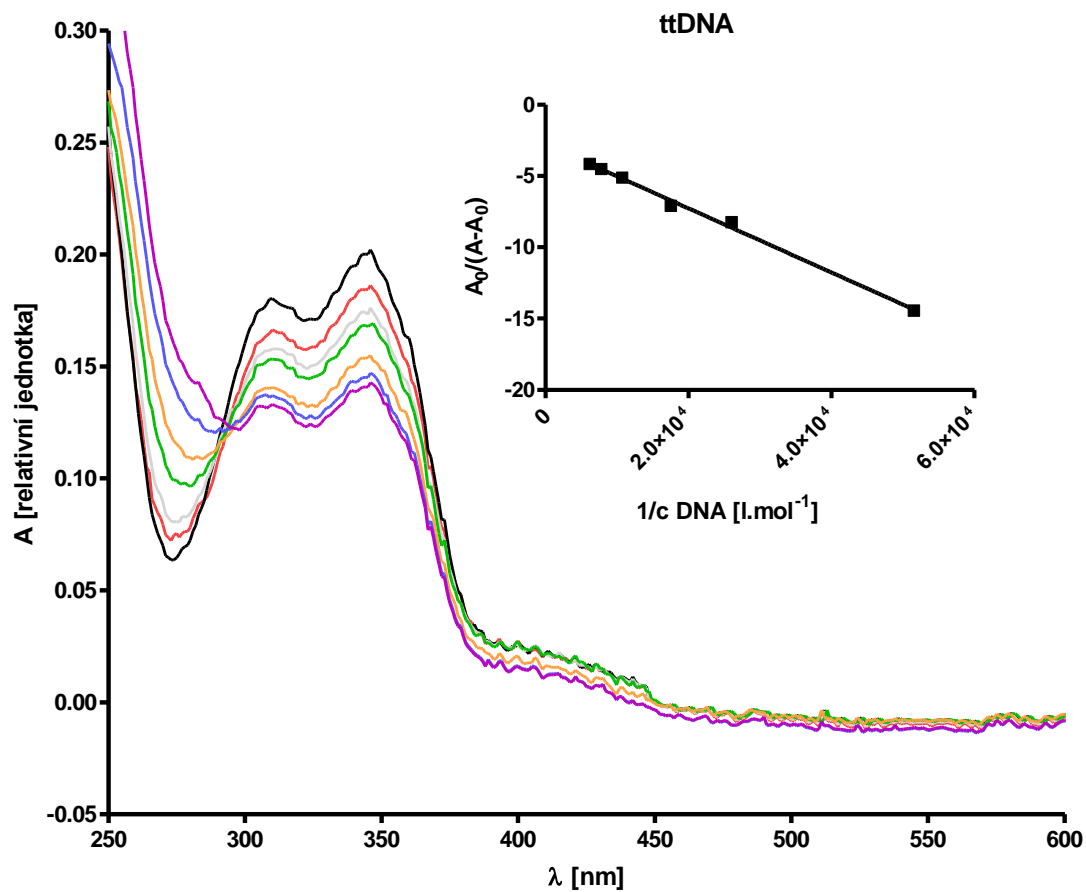


**Graf 1.** Závislost absorpce komplexu Ru1 při  $\lambda = 344$  nm na koncentraci tohoto komplexu. Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření a jsou uvedeny s SD.

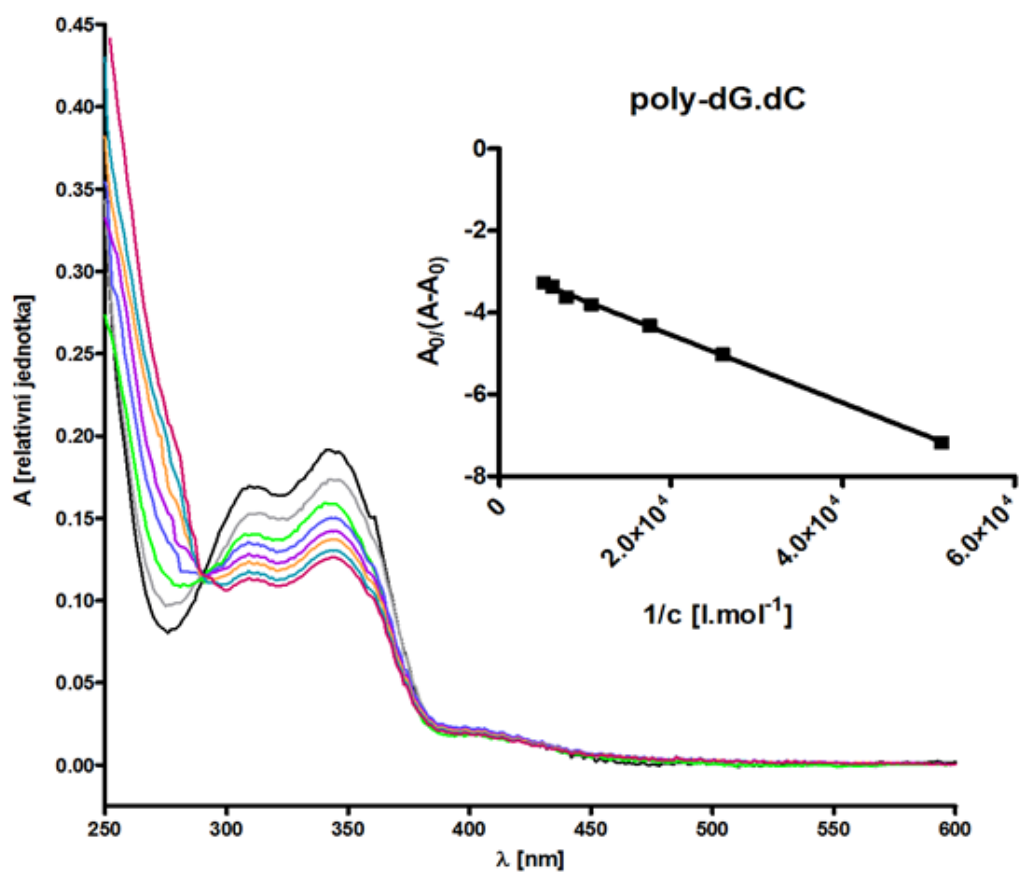
Hodnota molárního absorpčního koeficientu je  $\varepsilon = (19\,500 \pm 500) \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ . Tento údaj byl využit v experimentech níže a je přínosný pro rychlé určení koncentrace nově připravovaných roztoků studovaného komplexu Ru1, protože toto stanovení nevyžaduje složitější instrumentaci.

### 5. 1. 2 Stanovení vazebné konstanty

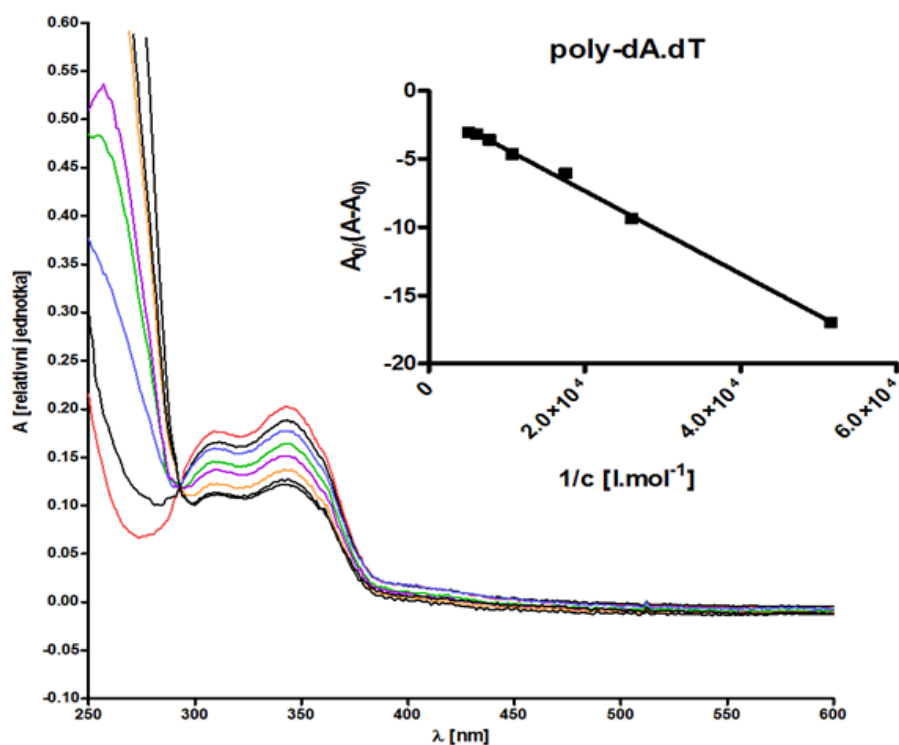
UV-VIS spektroskopie je výbornou technikou pro stanovení interakcí např. mezi malými molekulami a DNA. Stručně, v případě možné interkalace komplexu Ru1 jeho aromatickým ligandem může dojít k signifikantnímu červenému posunu a k velkému hypochromnímu efektu. V případě jiného typu vazby bude červený posun i hypochromní efekt menší (Zhang *et al.*, 2014). Grafy 2, 3, 4 ilustrují změnu absorpce pracovního roztoku komplexu Ru1 a pracovního roztoku studovaného komplexu při konstantním přidavku 1  $\mu\text{l}$  DNA ( $c = 1,96 \times 10^{-3} \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$ ), nebo polynukleotidů ( $1,96 \times 10^{-3} \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$ ).



**Graf 2.** Absorpční spektra komplexu Ru1 v  $0,01 \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$  TRIS, pH 7,4 s postupným přidavkem ttDNA při RT. Černá křivka odpovídá spektru samotného komplexu bez přidavku ttDNA.  $A_0$  je absorbance čistého roztoku komplexu Ru1.  $A$  je absorbance roztoku komplexu Ru1 s alikvotním přidavkem ttDNA.



**Graf 3.** Absorpční spektra komplexu Ru1 v  $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  TRIS, pH 7,4 s postupným přidavkem poly-dG.dC při RT. Černá křivka odpovídá spektru samotného komplexu bez přidavku poly-dG.dC.  $A_0$  je absorbance čistého roztoku komplexu Ru1.  $A$  je absorbance roztoku komplexu Ru1 s alikvotním přidavkem poly-dG.dC.



**Graf 4.** Absorpční spektra komplexu Ru1 v  $0,01 \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$  TRIS, pH 7,4 s postupným přidavkem poly-dA.dT při RT. Černá křivka odpovídá spektru samotného komplexu bez přidavku poly-dA.dT.  $A_0$  je absorbance čistého roztoku komplexu Ru1.  $A$  je absorbance roztoku komplexu Ru1 s alikvotním přidavkem poly-dA.dT.

Vynesením dat získaných při titračním experimentu dle rovnice z kapitoly 4. 4. 3 byla získána lineární křivka, ze které byla dle stejné rovnice určena hodnota vazebné konstanty  $K_b$ . Pro přehlednost jsou jednotlivé vazebné konstanty pro ttDNA nebo polynukleotidy vyneseny v Tab. 2.

**Tab. 2.** Vazebné konstanty určené titračním experimentem. Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých experimentů  $\pm$  SD.

oligonukleotid/genomická DNA	$K_b$ [ $\text{mol} \times \text{l}^{-1}$ ]
poly-(dG.dC)	$31\,400 \pm 3\,800$
ttDNA	$12\,500 \pm 400$
poly-(dA.dT)	$4\,000 \pm 1\,000$

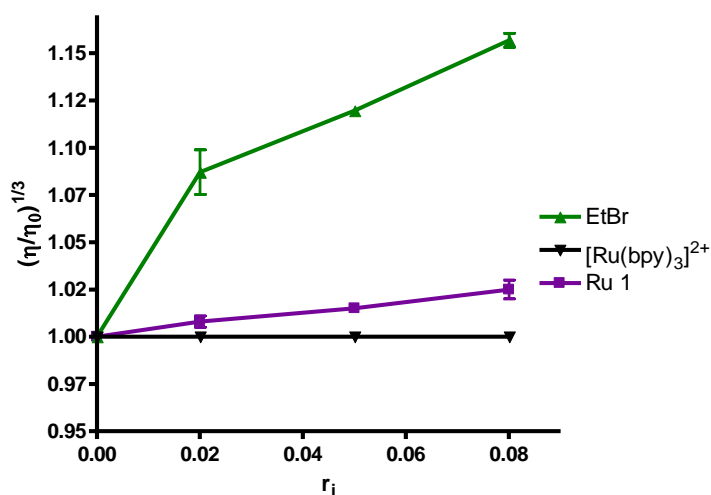
Ze spekter uvedených v grafu 2 je patrné, že s rostoucí koncentrací ttDNA dochází ke snížení absorbance při 344 nm (absorpční maximum komplexu Ru1). Dochází tedy k hypochromnímu efektu, což svědčí o tom, že dochází k interakci mezi komplexem Ru1 a molekulou DNA a komplex se na molekulu DNA váže. Nicméně v získaných spektrech nebyl pozorován žádný červený posun. Vzhledem k tomu, že proces interkalace je obvykle doprovázen jak hypochromním efektem, tak i velkým červeným posunem, lze z nepřítomnosti červeného posunu usoudit, že vazba komplexu Ru1 na molekulu DNA patrně probíhá jiným mechanismem než interkalací.

Protože experiment s ttDNA ukázal, že komplex Ru1 se na molekulu DNA váže, studovali jsme v dalším kroku, zda tato vazba vykazuje sekvenční preferenci nebo zda je na sekvenci nezávislá. Za tímto účelem jsme provedli titrační experiment s využitím syntetických polynukleotidů s alternující sekvencí G.C a A.T. Ze získaných hodnot vazebných konstant (tab. 2) vyplynulo, že komplex Ru1 vykazuje výrazně vyšší preferenci ke G.C párům než k párům A.T. V literatuře lze najít celou řadu studií týkajících se vztahu mezi preferencí vazby k určitým bázím (sekvenci) a typem této vazby, tj. zda jde o interkalaci nebo vazbu do žlábků DNA. Např. v práci (Ren, J. *et Chaires*, J., B, 1999) provedli autoři srovnávací studii s celou řadou sloučenin, jejichž DNA vazebný mód byl již dříve dobře charakterizován. Bylo zjištěno, že zatímco látky vázající se do žlábků vykazovaly vazebnou preferenci ke A.T párům (výrazně preferovaly poly-dA.dT) a poly dA.poly dT před poly-dG.dC a poly dG.poly dC), u interkalátorů tomu tak nebylo. Interkalátory nevykazovaly výraznou preferenci pro žádný z těchto polynukleotidů anebo vykazovaly mírnou preferenci pro G.C páry. Důvodem těchto rozdílů je vliv skutečnost, že látky vázající se do žlábků DNA mohou být ovlivněny geometrií žlábků, zatímco u interkalátorů bude hrát podstatnou roli energie „stecking“ interakcí bází, mezi které se daná látka vmezeňuje. Obě tyto charakteristiky závisí na složení a sekvenci DNA. Srovnáním námi získaného výsledku s výsledky uvedenými v literatuře (Ren, J. *et Chaires*, J., B, 1999; Biver, T., *et al.*, 2005) vyplývá, že na základě sekvenční selektivity by se mohl komplex Ru1 chovat jako spíše jako interkalátor než látka vázící se do žlábků DNA.

Pro zjištění typu nekovalentní interakce studovaného komplexu s molekulou DNA bylo využito viskozimetrie a měření spekter cirkulárního dichroismu.

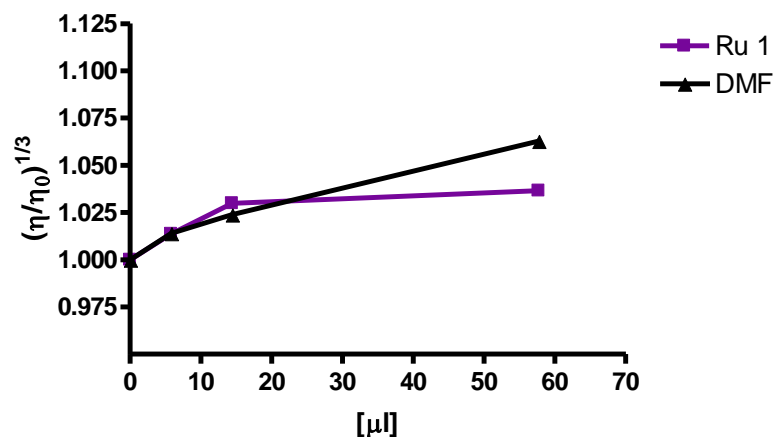
## 5. 2 Viskozimetrie

Struktura studovaného komplexu nabízí otázku, zda se může jednat o komplex schopný flavonolovým ligandem interagovat s DNA nekovalentně, například zda se v tomto případě jedná o interkalátor. Studovaný komplex byl srovnán s ethidium bromidem (interkalátor) a s komplexem  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  (dle literatury Cai-Wu Jiang, 2004 se jedná o negativní kontrolu – zástupce sloučenin, které nejsou interkalátory a interagují s DNA jiným způsobem).



**Graf 5.** Závislost relativní viskozity ttDNA na stupni modifikace  $r_i$ . V grafu je uveden průměr ze tří nezávislých experimentů  $\pm$  SD.

Relativní viskozita byla měřena nejprve pro nemodifikovanou ttDNA a dále pro čtyři stupně modifikace ttDNA ( $r_i = 0,02; 0,04; 0,06; 0,08$ ). Z grafu 5 je zřejmé, že studovaný rutheniový komplex v malé míře zvyšuje viskozitu a tedy na základě údajů z literatury by bylo možné usoudit, že tento komplex se chová částečně jako interkalátor. Relativní viskozita se vzrůstajícím stupněm modifikace roste jen nepatrně. Z důvodu přítomnosti organického rozpouštědla (DMF) v měřených vzorcích byl pro ověření proměřen vliv přídavku DMF na viskozitu ttDNA.



**Graf 6.** Vliv přidavku DMF na viskozitu ttDNA. V grafu je uveden průměr ze tří nezávislých experimentů a chybové úsečky reprezentují směrodatnou odchylku.

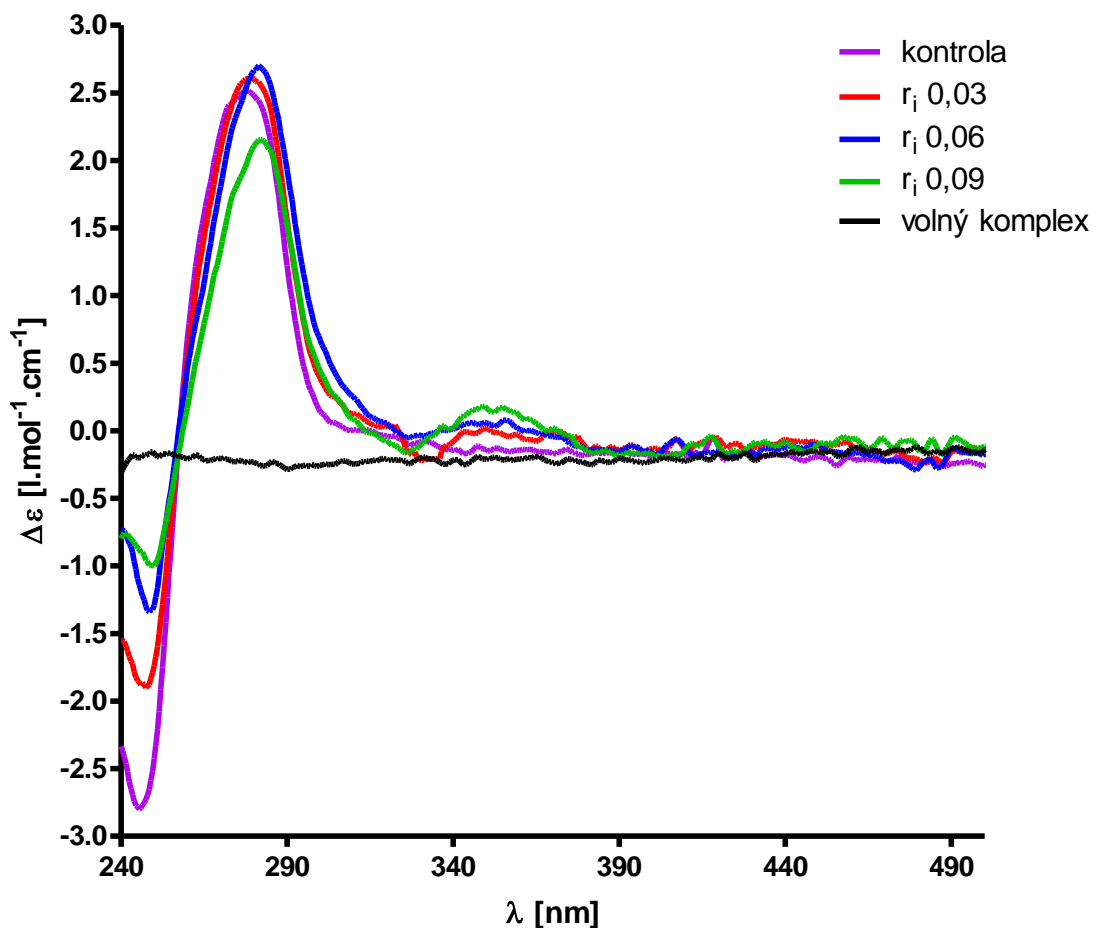
Jak lze usoudit z grafu 6, přidavek DMF má vliv na viskozitu ttDNA. Se vzrůstajícím přidavkem DMF roste relativní viskozita. Přidavek DMF pro ověření jeho vlivu na viskozitu DNA byl ekvivalentní s přidavkem tohoto rozpouštědla pro měření změny viskozity ttDNA komplexem Ru1. Z tohoto je zřejmé, že relativní viskozita nepatrně roste (graf 5) na základě vlivu DMF a ne komplexu Ru1.

Nukleové kyseliny mohou poskytnout mezibázový prostor pro vsunutí planárních částí molekul – interkalátorů, anebo mohou nekovalentně interagovat s jinými molekulami prostřednictvím malého či velkého žlábků ve své struktuře (Lepre, C. A., *et al.*, 1990). Tyto dva způsoby vazby se vyznačují spojitým přechodem mezi ligandem čistě obsazujícím žlábek a interkalátorem. Interkalátory jsou významné pro využití jako léčiva v klinické praxi. Právě ethidium bromid je typickým interkalátorem (Dalton, Shannon R., *et al.*, 2008). Relativní viskozita DNA modifikované ethidium bromidem lineárně roste se vzrůstajícím  $r_i$  a to poměrně velice rychle. Oproti tomu například u  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  relativní viskozita DNA zůstává konstantní a proto se o interkalátor nejedná. Je patrné, že rutheniový komplex Ru1 není interkalátorem (graf 5 a 6), jak by bylo možné usuzovat z jeho porovnání s  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$  a Ru-L-amino (Dalton, Shannon R., *et al.*, 2008).



### 5.3 Cirkulární dichroismus

K získání informací o globálních změnách ve struktuře DNA způsobených vazbou komplexů různých kovů se využívá CD spektroskopie.



Graf 8. Záznam CD spekter ttDNA modifikované ruthenioým komplexem.

Na grafu 8 jsou znázorněna CD spektra ttDNA modifikované ruthenioým komplexem. ttDNA byla modifikována komplexem RuI na  $r_i = 0,03$ ;  $0,06$ ;  $0,09$ . Nemodifikovaná DNA, tedy kontrola, je v naměřených spektrech zobrazena fialovou barvou a představuje spektrum klasické B konformace DNA. Se vzrůstajícím  $r_i$  se projevuje vzestup a pak postupný pokles intenzity pozitivního pásu B-DNA okolo vlnové délky 275 nm.

Po navázání ruthenioého komplexu v různých stupních modifikace došlo ke změnám v intenzitě jak pozitivního tak negativního pásu CD spektra. V negativním

pásu, v okolí hodnoty vlnové délky 245 nm, došlo k nárůstu intenzity se vzrůstajícím  $r_1$ . Pro vyšší stupeň modifikace ( $r_1 = 0,9$ ) začala intenzita pozitivního pásu klesat.

Studovaný komplex ruthenia Ru1 je achirální, takže sám o sobě signál CD neposkytuje. Je možné tedy jakýkoli signál CD pozorovaný v oblasti vlnových délek nad 300 nm, kde samotná molekula DNA CD neposkytuje, připsat interakcím komplexu ruthenia s chirální DNA. Směs komplexu ruthenia a DNA poskytla indukovaný CD v okolí vlnových délek  $\sim 350$  nm (graf 8). Vznik tohoto indukovaného CD je možné vysvětlit úplnou nebo částečnou interkalací komplexu ruthenia mezi páry bází ve dvoušroubovici DNA nebo také interakcemi molekul komplexu ruthenia s povrchem molekuly DNA vedoucími k určitému stupni jejich orientace. Výsledky viskozimetrických měření nepodporují možnost interpretovat výsledky měření CD jako interkalaci komplexu ruthenia. Na druhé straně pozitivní znaménko indukovaného CD pozorovaného při vlnových délkách v okolí 350 nm nasvědčuje tomu, že molekuly komplexu ruthenia jsou seřazeny na povrchu molekul DNA takovým způsobem, že například flavonolové ligandy molekul komplexu ruthenia (samotné molekuly flavonolů interkalují do DNA) jsou vrstveny s rovinami polyfenolu nad sebou, orientovanými přibližně kolmo k ose dvoušroubovice díky patrovým (stacking) interakcím (Schipper, P. E., et al., 1980). V oblasti vlnových délek nižších než 300 nm, změny ve spektrech CD mohou nastat v důsledku narušení pravidelné sekundární struktury dvoušroubovice DNA. Snížení amplitu negativního pásu DNA o oblasti vlnových délek okolo 245 nm se často na základě empirických pravidel interpretuje jako rozvinutí DNA (snížení počtu párů bází na jednu otočku dvoušroubovice). Poněvadž však komplex ruthenia Ru1 sám absorbuje při vlnových délkách nižších než 300 nm, může indukovaný CD poskytovaný molekulou DNA v důsledku její interakce s komplexem ruthenia významně přispívat k pozorovaným změnám CD v této oblasti vlnových délek, což znemožňuje jednoznačnou interpretaci těchto změn.

#### **5. 4 Stanovení kovalentní vazby komplexu Ru1 na DNA**

Z předcházejících experimentů vyplývá, že rutheniový komplex interaguje s molekulou DNA nekovalentně. Je otázkou zda, díky přítomnosti odstupujícího chloridového ligandu je schopen také kovalentní vazby k DNA.

Pomocí dialyzačních membrán Spectra/Por MWCO 12 – 14 000 Da jsme provedli dialýzu DNA. Připravili jsme si vzorky obsahující modifikovanou ttDNA na příslušné  $r_i$  (0,05; 0,10; 0,25; 0,50). Alikvot připraveného vzorku byl dialyzován proti vhodnému médiu. Nejprve proti  $0,5 \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$  NaCl a poté oproti  $0,1 \text{ mol} \times \text{l}^{-1}$  NaCl, pro následnou analýzu množství navázaného komplexu na ttDNA byly vzorky dialyzovány proti vodě. Dialyzační membrány dovolují vstup malých molekul, čili dochází k odstranění volného (nenavázaného) komplexu a také komplexu navázaného k DNA nekovalentně, zatímco velké molekuly (např. ttDNA modifikovaná komplexem) skrz tuto membránu neprojdou. Malé molekuly přes membránu difundují ve směru koncentračního spádu až do té doby, než se dostanou do ustáleného stavu (rychlost difúze oběma směry je shodná).

Pomocí bezplamenové atomové absorpční spektrometrie (FAAS) jsme určili množství rutheniového komplexu kovalentně navázaného na ttDNA. Pro vypočítání množství navázaného komplexu jsme museli proměřit jak nedialyzované (tzn. vzorky obsahující jak navázaný, tak nenavázaný Ru1 komplex) tak dialyzované vzorky (obsahující pouze navázaný komplex). Pomocí UV/VIS absorpční spektrofotometrie byla stanovena koncentrace ttDNA v jednotlivých vzorcích.

*Tab. 3. Množství kovalentně navázaného rutheniového komplexu. ND jsou nedialyzované vzorky a D jsou vzorky po dialýze. Hodnoty uvedené v tabulce jsou průměrem ze tří nezávislých měření  $\pm$  SD.*

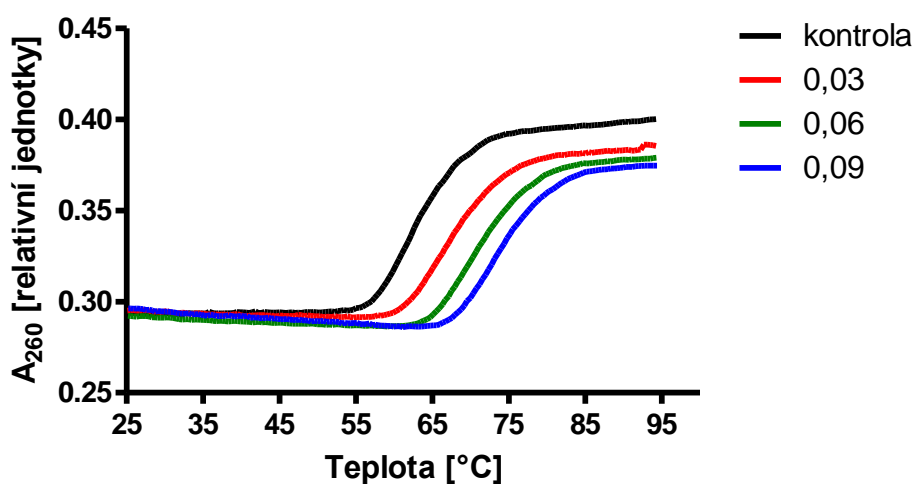
$r_i$	$r$ ND	$r_b$ D	% kovalentně navázaného Ru1
0,05	$0,046 \pm 0,005$	$0,005 \pm 0,001$	$9,5 \pm 0,2$
0,10	$0,089 \pm 0,009$	$0,006 \pm 0,005$	$10,4 \pm 1,4$
0,25	$0,244 \pm 0,038$	$0,019 \pm 0,001$	$8,7 \pm 0,1$
0,50	$0,427 \pm 0,055$	$0,045 \pm 0,005$	$9,6 \pm 0,8$

Procento navázání komplexu na molekulu DNA jsme získali podělením  $r_b$  dialyzovaného vzorku nedialyzovaným vzorkem o příslušném  $r$ . Z tab. 3 je patrné, že se přibližně 10 % rutheniového komplexu kovalentně navázalo na ttDNA.

Předchozí experimenty ukázaly, že komplex Ru1 se váže k DNA jak nekovalentně, tak v malé míře i kovalentně. Kovalentní vazba přechodných kovů (např. platiny v molekule cisplatiny i transplatiny a dalších platnatých komplexech) často ovlivňuje stabilitu dvoušroubovice DNA (Zaludova *et al.*, 1996). Také nekovalentní interakce může vést k stabilizaci či destabilizaci DNA. Pro zjištění účinku navázaného komplexu Ru1 na strukturu DNA – její stabilizaci – byly změřeny změny hodnot teplot tání.

## 5. 5 Měření teploty tání ( $T_m$ )

Jedna z nejčastějších fyzikálních charakteristik, která se využívá k popisu změn ve struktuře DNA způsobených vazbou nízkomolekulárních látek, je teplotní stabilita dvoušroubovice DNA (Zaludova *et al.*, 1996).



Graf 7. Denaturační křivky ttDNA modifikované komplexem Ru1 měřené při různých stupních modifikace.

Stručně, ttDNA byla modifikována ruthenioým komplexem na  $r_1 = 0,03$ ; 0,06; 0,09. Pro každý stupeň modifikace byla měřena denaturační křivka DNA a z ní určena, 1. derivací této křivky a zjištěním inflexního bodu, hodnota teploty tání DNA ( $T_m$ ). Vliv

Ru1 komplexu na denuraci ttDNA je znázorněn na grafu 7 a hodnoty jsou uvedeny v tabulce 4.

**Tab. 4.** Tabulka hodnot  $T_m$  [°C] při různém stupni modifikace. Hodnoty jsou průměrem ze tří měření  $\pm$  SD.

$r_i$	Teplota [°C]
0,00	63,7 $\pm$ 0,3
0,03	67,5 $\pm$ 0,7
0,06	72,1 $\pm$ 0,3
0,09	75,8 $\pm$ 1,0

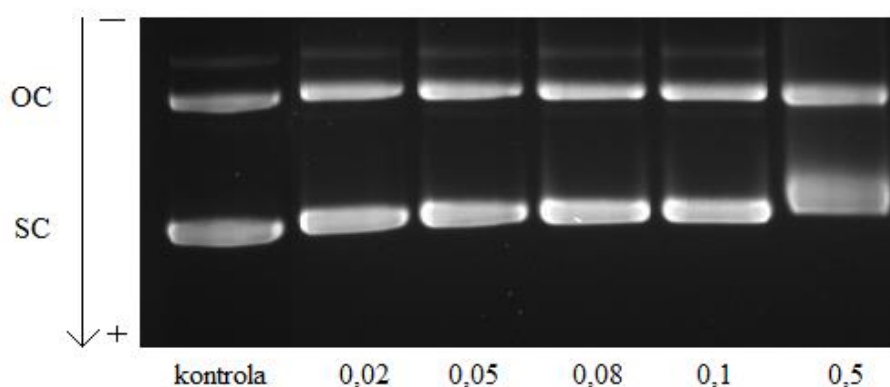
Teplota tání byla určena jako hodnota odpovídající inflexnímu bodu denurační křivky. Modifikace DNA rutheniovým komplexem působí výrazné zvýšení stability DNA. Látky, které fyzicky interagují s DNA, velmi často stabilizují tento duplex, a tak zvyšují teplotu tání. V porovnání s daty dostupnými v literatuře (Dalton, S., R., *et al.*, 2008) pro  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ , který nezpůsobuje zvýšení teploty tání a zároveň není interkalátorem, můžeme usuzovat ze získaných dat pro komplex Ru1, který výrazně stabilizoval dvoušroubovici DNA, že by mohl být interkalátor. Na interkalaci odkazuje srovnání námi studovaného komplexu Ru1 s komplexem studovaným v Dalton, S., R., *et al.*, 2008 s označením Ru-L-amino, který byl interkalátorem a hodnota  $T_m$  byla velmi podobná námi studovanému komplexu (Dalton, S., R., *et al.*, 2008). Toto vysvětlení však není pravděpodobné vzhledem k výsledkům předchozích experimentů (viskozimetrie, nepřítomnost červeného posunu v titračních spektrech). Nicméně zvýšení teplotní stability DNA po interakci s nízkomolekulárními látkami nemusí být způsobeno pouze interkalací. Bylo např. ukázáno, že některé sloučeniny, které se váží kovalentně a tvoří meziřetězcové můstky, také stabilizují DNA. Dalším

důvodem pro stabilizaci DNA může být přítomnost kladného náboje v molekule interagující sloučeniny, která zvyšuje teplotní stabilitu DNA díky kompenzaci odpuzujících se záporných nábojů na cukr-fosfátové kostře DNA.

Z literatury víme (Kepler, B. K., 1993), že stabilizací struktury DNA je znemožněn přístup replikačním anebo transkripčním mechanismům. Tato zábrana způsobí, že je narušena proteosyntéza nebo proces dělení buňky a je to jedna z možností, jakou je navozena programovaná buněčná smrt. Z této teorie můžeme usoudit, že pokud rutheniový komplex stabilizuje DNA, a pokud jsou některé jiné komplexy přechodných kovů, např. cDDP, Nami-A atd. (Kurzwernhart, A., *et al.*, 2012) stabilizátory DNA a zároveň jsou protinádorově aktivní, může být studovaný komplex taktéž účinný proti nádorovým buňkám (Palachaudhuri *et Hergenrother*, 2007).

## **5. 6 Elektroforéza v nativním agarózovém gelu**

Nativní gelová elektroforéza na 1% agarosovém gelu byla využita ke kvantifikaci rozvíjení plasmidové DNA s interagujícím rutheniovým komplexem. Obrázek 20 ukazuje výsledky gelové elektroforézy směsi relaxované (OC forma) a superhelikální (SC forma) plasmidové DNA (pUC 19) modifikované rutheniovým komplexem v rozsahu 0,02 – 0,5. OC forma má porušeno nadšroubovicové vinutí a v gelu migruje pomaleji. Superhelikální formou je myšlena taková DNA, která má nadšroubovicové vinutí. Je-li plasmidová DNA negativně (pozitivně) zavinuta, je více kompaktní a v gelu migruje rychleji než OC forma. Pokud by zkoumaný komplex zvyšoval mobilitu relaxované formy DNA a při určitém stupni modifikace nastala komigrace relaxované (OC) a superhelikální (SC) formy, rozvíjel by DNA.



**Obr. 20.** Rozvíjení plazmidové DNA v nadšroubovicové konformaci způsobené vazbou ruthéniového komplexu při různých  $r_i$ .

Po elektroforetické separaci a barvení v roztoku EtBr jsme jednotlivé zóny kvantifikovali jako procentuální podíl přímou denzitometrií. Denzitometr je přístroj, který slouží k vyhodnocení hustoty zbarvení v plošném uspořádání. Při denzitometrii se měří intenzita záření a získává se grafický záznam fotometrovaného úseku. Křivky zvonovitého tvaru jsou na záznamu tvořeny jednotlivými frakcemi dělené směsi. Plocha pod křivkou těchto píků připadající jednotlivým frakcím, je úměrná relativnímu zastoupení jednotlivých frakcí. Z obrázku 20 a tabulky 5 je patrné, že ruthéniový komplex nezvyšoval mobilitu relaxované formy DNA s výjimkou vzorku s nejvyšším stupněm modifikace, a ani při jednom studovaném stupni modifikace nenastala komigrace relaxované (OC) a superhelikální (SC) formy. Tento výsledek by bylo možné interpretovat tak, že komplex Ru1 DNA nerozvíjí. To je ale v rozporu s výsledky získanými pomocí metody CD. Možné vysvětlení tohoto rozporu spočívá v tom, že experiment s využitím elektroforézy v agarosovém gelu je určen především pro studium látek vážících se kovalentně k DNA (Keck, M., V., *et* Lippard, S., J., 1992). Nekovalentní interakce, která je relativě slabá ve srovnání s vazbou kovalentní, nepřežije migraci skrz relativně malé póry gelu a dojde k uvolnění komplexu Ru1 z DNA. Podobné efekty byly již dříve pozorovány pro nízkomolekulární látky vážící se k DNA, dokonce i pro interkalátory jako je např. EtBr. Výsledky tohoto experimentu tedy ukazují, že tento experimentální přístup není pro studium rozvíjení DNA komplexem Ru1 příliš vhodný. Vhodnější by patrně bylo využití topoizomerázy I, toto však již bylo nad rámec této diplomové práce.

Provedli jsme také kvantitativní vyhodnocení relativního zastoupení jednotlivých forem DNA. Nejvyšší procentuální zastoupení ocDNA bylo při stupni modifikace 0,5 (22,1 %) a nejnižší při 0,02 (9,9 %) (viz tab. 5).

**Tab. 5.** Tabulka hodnot % ocDNA při různém stupni modifikace. Hodnoty jsou průměrem ze tří měření  $\pm$  SD.

$r_i$	% ocDNA
0,02	9,9 $\pm$ 1,8
0,05	12,1 $\pm$ 1,6
0,08	14,6 $\pm$ 2,2
0,1	16,1 $\pm$ 1,3
0,5	22,1 $\pm$ 4,5

Z výsledků vyplývá, že s rostoucím stupněm modifikace se zvyšuje zastoupení OC formy. Toto by mohlo naznačovat na vnášení např. jednořetězcových zlomů do struktury DNA komplexem Ru1. V literatuře bylo uvedeno (Malina, J., *et al.*, 2008), že rutheniové komplexy mohou generovat některé z kyslíkových radikálů, které mohou poškozovat DNA. Tento efekt by mohl být předmětem dalšího zkoumání.

Tyto změny ve struktuře DNA jsou zásadního charakteru, co se týká poškození DNA a dalšího osudu buňky. Narušením integrity struktury DNA dochází k aktivaci reparačních mechanismů, které mohou, ale nemusí být schopny poškození napravit. Pokud toho schopny nejsou, buňka je směřována do apoptózy (programovaná buněčná smrt).



## 5. 7 Inhibice růstu nádorových buněk *in vitro*

Jelikož studovaný komplex interaguje s molekulou DNA, mohl by být zástupcem protinádorově účinných komplexů ruthenia. K ověření, zda rutheniový komplex působí na nádorové buňky, jsme provedli jednoduchý test cytotoxicity založený na akumulaci neutrální červeni v lysozomech, čehož jsou schopny jen životaschopné buňky.

Byla zjišťována cytotoxicita cDDP a studovaného komplexu Ru1 a to pomocí pracovního roztoku neutrální červeni. Experimenty byly provedeny na buňkách lidského ovarialního karcinomu A2780.

**Tab. 6.** Tabulka hodnot  $IC_{50}$  cDDP a rutheniového komplexu Ru1. Hodnoty jsou průměrem tří nezávislých měření provedených v triplikátu  $\pm$  SD.

Komplex	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}\times\text{l}^{-1}$ ]
cDDP	$2,7 \pm 0,6$
Ru 1	$25,2 \pm 0,8$

Intenzita zbarvení byla detekována na absorbančním readeru Synergy MX (Biotek, VT, USA) při vlnové délce 540 nm. Hodnoty  $IC_{50}$  (koncentrace sloučeniny, při níž je 50 % buněk živých a 50 % buněk mrtvých) byly vypočítány z grafické závislosti přežívání buněk na koncentraci daného komplexu ( $\mu\text{mol}\times\text{l}^{-1}$ ). Hodnoty byly převedeny na procenta kontroly (procento přežití buněk). Cytotoxické účinky byly vyjádřeny jako  $IC_{50}$ . Z tabulky 6 je zřejmé, že rutheniový komplex má hodnoty  $IC_{50}$  ve vyšších koncentracích nežli cDDP. Cytotoxické účinky tohoto komplexu mohou, jak vyplývá z předchozích výsledků, souviset se schopností Ru1 zvyšovat teplotní stabilitu DNA a/nebo tvořit zlomy v řetězcích DNA.

Během své cesty do jádra může být nějaké procento komplexu zastaveno již v počátku a to tím, že neprojde přes cytoplasmatickou membránu. Další ztráty

se objevují v cytoplasmě, kde komplex může reagovat s buněčnými kompartmenty a nukleofily (např. GSH-glutathion). Do jádra se dostane již jen malé množství rutheniového komplexu, což by mohlo kopírovat situaci akumulace protinádorově účinné cDDP a další podobných komplexů. Ačkoli ve srovnání s jinými rutheniovými komplexy (Kurzwehnart *et al.*, 2012) je možné tento komplex považovat za méně účinný proti zvolené nádorové linii.

Jelikož se jedná o rutheniový komplex s pouze jedním odstupujícím ligandem, v našem případě chlorem, bude tvořit zejména monofunkční adukty (jejich stanovení nebylo předmětem této diplomové práce), bude i poškození DNA uvnitř buněk rozdílné oproti srovnávané cDDP. Stanovení množství tohoto rutheniového komplexu v buňkách lidského ovarialního karcinomu (A2780) by mohlo být předmětem dalšího zkoumání, stejně tak jako stanovení množství kovalentně navázaného komplexu na buněčnou DNA, či jeho schopnost reakce s nukleofily uvnitř buňky.

## 6. Závěr

V této práci byly studovány interakce nového potenciálně protinádorově účinného komplexu ruthenia [Ru(tol)flavonol]Cl (Ru1) s molekulou DNA. Tento komplex vykazuje zajímavou strukturu, ve které se objevuje jeden odstupující ligand (atom chloru), který poskytuje prostor pro vytvoření kovalentní vazby. Zároveň se ve struktuře vyskytuje flavonolový ligand, který by potenciálně mohl interkalovat do molekuly DNA, protože flavonoly jsou obecně prokázány jako vysoce účinné interkalátory.

S využitím vybraných metod molekulární biofyziky bylo zjištěno, že komplex Ru1 se váže k molekule DNA nekovalentně s preferencí pro G.C páry oproti A.T párům. Tato nekovalentní interakce pravděpodobně nezahrnuje úplnou interkalaci, jak bylo prokázáno měřením vlivu tohoto komplexu na viskozitu DNA a z nepřítomnosti červeného posunu ve spektrech studovaného komplexu při titraci DNA. Nicméně komplex se na molekulu DNA váže tak, že molekuly po vazbě na DNA poskytují indukovaný signál v CD spektrech DNA, pozorovatelný při vlnové délce odpovídající absorpčnímu maximu tohoto komplexu. To svědčí o pravidelném uspořádání molekul komplexu Ru1 vzhledem k DNA a tedy vazbě do žlábků (malého nebo velkého) molekuly DNA. Mimo nekovalentní interakci jsme také prokázali schopnost Ru1 vázat se kovalentně k molekule DNA, i když jen v malé míře (10%). Vzhledem k tomu, že komplex Ru1 obsahuje pouze jeden odstupující chloridový ligand, předpokládáme, že takto vznikají na molekule DNA monofunkční adukty.

Bylo také ukázáno, že komplex Ru1 zvyšuje teplotní stabilitu DNA a je schopen tvořit jednořetězcové zlomy v molekule DNA. Tyto a možné další vlastnosti mohou být příčinou cytotoxicity v nádorové linii lidských ovariálních buněk.

## 7. Seznam použitých zkratek

A	adenine
AAS	atomová absorpční spektroskopie
BFM	Bromfenolová modř
C	cytosine
CD	cirkulární dichroismus
cDDP	cisplatina ( <i>cis</i> -diammindichloroplatnatý komplex)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
E. coli	Escherichia coli
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EtBr	ethidium bromid
FAAS	bezplamenná atomová absorpční spektroskopie
FBS	fetální hovězí sérum
FDA	„Food and Drug Administration”, Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
HMG	„high mobility group“, proteiny vysoké pohyblivosti
IAC	vnitrořetězcový můstek
IEC	meziřetězcový můstek
OC	„open circle“, relaxovaná forma DNA
PBS	fosfátový pufr (phosphate buffered saline)

$r_b$	počet molekul komplexu skutečně navázaných na jeden nukleotid
$r_i$	počet molekul komplexu připadajících na jeden nukleotid
RNA	ribonukleová kyselina
RT	„room temperature“ pokojová teplota
Ru1	komplex [Ru(tol)flavonol]Cl
SC	suprahelikální forma DNA
SD	směrodatná odchylka
T	thymin
TAE	tris-acetát/EDTA pufr
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	uracil
UV	ultrafialové světlo
VIS	viditelné světlo
WHO	World Health Organization – Světová zdravotnická organizace

## 8. Seznam použité literatury

Albert et al., *Základy buněčné biologie*, 2005, s. 185-186.

Alessio, Enzo, et al. "Ruthenium antimetastatic agents." *Current topics in medicinal chemistry* 4.15 (2004): 1525-1535.

ávan Rijt, Sabine H. "Anti-colorectal cancer activity of an organometallic osmium arene azopyridine complex." *MedChemComm* 2.7 (2011): 666-668.

Bancroft, Daniel P., Christopher A. Lepre, and Stephen J. Lippard. "Platinum-195 NMR kinetic and mechanistic studies of cis- and trans-diamminedichloroplatinum (II) binding to DNA." *Journal of the American Chemical Society* 112.19 (1990): 6860-6871.

Biver, Tarita, et al. "Cyanine dyes as intercalating agents: kinetic and thermodynamic studies on the DNA/Cyan40 and DNA/CCyan2 systems." *Biophysical journal* 89.1 (2005): 374-383.

Brabec, V., and E. Paleček. "The influence of salts and pH on polarographic currents produced by denatured DNA." *Biophysik* 6.4 (1970): 290-300.

Brabec, V. (1990) *Biologické listy* 55, 42

Brabec, Viktor, and Jana Kasparkova. "Modifications of DNA by platinum complexes: relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs." *Drug Resistance Updates* 8.3 (2005): 131-146

Bratsos, Ioannis, et al. "Ruthenium anticancer compounds: challenges and expectations." *CHIMIA International Journal for Chemistry* 61.11 (2007): 692-697.

Cleare, M. J. "Transition metal complexes in cancer chemotherapy." *Coordination Chemistry Reviews* 12.4 (1974): 349-405.

Clarke, Michael J. *Ruthenium and other non-platinum metal complexes in cancer chemotherapy*. Vol. 10. Springer, 1989.

Dalton, Shannon R., et al. "DNA binding by Ru (II)-bis (bipyridine)-pteridinyl complexes." *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 13.7 (2008): 1133-1148.

Dervan, Peter B. "Molecular recognition of DNA by small molecules." *Bioorganic & medicinal chemistry* 9.9 (2001): 2215-2235.

Desoize, Bernard, and Claudie Madoulet. "Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment." *Critical reviews in oncology/hematology* 42.3 (2002): 317-325.

Doppelt, P., and T. J. Meyer. "Synthesis and redox properties of the unsymmetrical, oxo-bridged complex [(bpy)<sub>2</sub>(py)Ru<sup>III</sup>O Ru<sup>III</sup>(H<sub>2</sub>O)(bpy)<sub>2</sub>]<sup>U24+</sup>." *Inorganic chemistry* 26.13 (1987): 2027-2034.

Guo, Z.J. and P.J. Sadler, *Metals in medicine*. Angew. Chem. Int. Ed., 1999. 38(11): p. 1513-1531.].

Hegde, Ashwini H., S. N. Prashanth, and J. Seetharamappa. "Interaction of antioxidant flavonoids with calf thymus DNA analyzed by spectroscopic and electrochemical methods." *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 63 (2012): 40-46.

Jameson, G. B., et al. "Bioinorganic Chemistry." *Bertini, I., Gray, HB, Lippard, SJ, Valentine, JS, Eds* (1994): 167-252.

Jiang, Cai-Wu. "Syntheses, characterization and DNA-binding study of chiral complexes  $\Delta\Delta$ -and  $\Lambda\Lambda$ -[Ru (bpy)<sub>2</sub>(bdptb)Ru(bpy)<sub>2</sub>]<sup>4+</sup>." *Journal of inorganic biochemistry* 98.3 (2004): 497-501.

Kartalou, M. and J.M. Essigmann, *Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins*. Mutation Res., 2001. 478(1-2): p. 1-21

Kanakis, C. D., et al. "Structural analysis of DNA and RNA interactions with antioxidant flavonoids." *Journal of Spectroscopy* 23.1 (2009): 29-43.

Keck, Michael V., and Stephen J. Lippard. "Unwinding of supercoiled DNA by platinum-ethidium and related complexes." *Journal of the American Chemical Society* 114.9 (1992): 3386-3390.

Kelland, Lloyd. "The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy." *Nature Reviews Cancer* 7.8 (2007): 573-584.

Kepler, Bernhard K., ed. *Metal complexes in cancer chemotherapy*. Wiley-VCH, 1993.

King, R. C.; Stansfield, W. D.; Mulligan, P. K.. *A Dictionary of Genetics, Seventh Edition*. [s.l.] : Oxford University Press, 2006.

Kurzwernhart, Andrea, et al. "Structure–Activity Relationships of Targeted RuII ( $\eta^6$ -p-Cymene) Anticancer Complexes with Flavonol-Derived Ligands." *Journal of medicinal chemistry* 55.23 (2012): 10512-10522.

Lippard, S.J., *New chemistry of an old molecule: cis-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]*. *Science* 218 (1982) 1075-1082, 1982

Malina, Jaroslav, Michael J. Hannon, and Viktor Brabec. "Interaction of Dinuclear Ruthenium (II) Supramolecular Cylinders with DNA: Sequence-Specific Binding, Unwinding, and Photocleavage." *Chemistry-A European Journal* 14.33 (2008): 10408-10414.

Nordén, Bengt, and Alison Rodger. *Circular dichroism and linear dichroism*. Oxford University Press, 1997.

Novohradsky, Vojtech, et al. "A dual-targeting, apoptosis-inducing organometallic half-sandwich iridium anticancer complex." *Metallomics* 6.8 (2014): 1491-1501.

Palchaudhuri, Rahul, and Paul J. Hergenrother. "DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action." *Current opinion in biotechnology* 18.6 (2007): 497-503.

Pil, Pieter M., and Stephen J. Lippard. "Specific binding of chromosomal protein HMG1 to DNA damaged by the anticancer drug cisplatin." *Science* 256.5054 (1992): 234-237.

Pyle, A. M., et al. "Mixed-ligand complexes of ruthenium (II): factors governing binding to DNA." *Journal of the American Chemical Society* 111.8 (1989): 3051-3058.

Ren, Jinsong, and Jonathan B. Chaires. "Sequence and structural selectivity of nucleic acid binding ligands." *Biochemistry* 38.49 (1999): 16067-16075.



Rossenberg, B., L. Van Camp, and T. Krigas, *Inhibition of division in Escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode*. *Nature*, 1965. **205**: p. 698-699

Rosypal, S., *Úvod do molekulární biologie Díl První*. 1998, Brno.

Sava, Gianni, et al. "Metal complexes of ruthenium: antineoplastic properties and perspectives." *Anti-cancer drugs* 1.2 (1990): 99-108.

Sava, Gianni, et al. "Effects of ruthenium complexes on experimental tumors: irrelevance of cytotoxicity for metastasis inhibition." *Chemico-biological interactions* 95.1 (1995): 109-126.

Schipper, Pieter E., Bengt Nordén, and Folke Tjerneld. "Determination of binding geometry of DNA-adduct systems through induced circular dichroism." *Chemical Physics Letters* 70.1 (1980): 17-21.

Stewart, B. W., and C. P. Wild. "World Cancer Report 2014. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer." *World Health Organization* (2014).

Watson, James D., and Francis HC Crick. "Molecular structure of nucleic acids." *Nature* 171.4356 (1953): 737-738.

Waxman, Samuel, and Kenneth C. Anderson. "History of the development of arsenic derivatives in cancer therapy." *The oncologist* 6.Supplement 2 (2001): 3-10.

Zamble, Deborah B., and Stephen J. Lippard. "The response of cellular proteins to cisplatin-damaged DNA." *Cisplatin: chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug* (1999): 71-110.

Zhang, Yang, et al. "DNA binding and nuclease activity of cationic iron (IV) and manganese (III) corrole complexes." *Applied Organometallic Chemistry* 28.7 (2014): 559-566.

Žaludová, Renata, Vladimír Kleinwächter, and Viktor Brabec. "The effect of ionic strength on melting of DNA modified by platinum (II) complexes." *Biophysical chemistry* 60.3 (1996): 135-142.

## **Internetové zdroje**

<http://cs.wikipedia.org/wiki/DNA>

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

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>