

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

Katedra biofyziky



**Faktory ovlivňující biologické účinky  
metalofarmak. Vztah k protinádorové účinnosti**

*Factors influencing the biological effects of  
metallopharmaceuticals. Relationship to antitumor efficiency*

**Mgr. Monika Hreusová**

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

Olomouc 2021

# Bibliografický záznam

<b>Autor</b>	Mgr. Monika Hreusová Univerzita Palackého v Olomouci Přírodovědecká fakulta Katedra biofyziky
<b>Název práce</b>	Faktory ovlivňující biologické účinky metalofarmak. Vztah k protinádorové účinnosti
<b>Typ práce</b>	disertační
<b>Studijní program</b>	P1703 Fyzika
<b>Studijní obor</b>	Biofyzika
<b>Školitel</b>	prof. RNDr. Viktor Brabec, DrSc.
<b>Rok obhajoby</b>	2021
<b>Klíčová slova</b>	DNA, komplexy platiny, cisplatina, komplex gália, platinové adukty, fotoaktivovatelné komplexy platiny, mikroškálová termoforéza, translézová syntéza DNA
<b>Počet stran</b>	77 + 11
<b>Jazyk práce</b>	slovenský

# Bibliografický záznam

<b>Autor</b>	Mgr. Monika Hreusová Univerzita Palackého v Olomouci Přírodovědecká fakulta Katedra biofyziky
<b>Název práce</b>	Faktory ovlivňující biologické účinky metalofarmak. Vztah k protinádorové účinnosti
<b>Typ práce</b>	dizertačná
<b>Študijný program</b>	P1703 Fyzika
<b>Študijný odbor</b>	Biofyzika
<b>Školitel'</b>	prof. RNDr. Viktor Brabec, DrSc.
<b>Rok obhajoby</b>	2021
<b>Klíčové slová</b>	DNA, komplexy platiny, cisplatina, komplex gália, platinové adukty, fotoaktivovatelné komplexy platiny, mikroškalová termoforéza, translázová syntéza DNA
<b>Počet strán</b>	77 + 11
<b>Jazyk práce</b>	slovenský

# Bibliographic Entry

<b>Author</b>	Mgr. Monika Hreusová Palacký University Olomouc Faculty of Science Department of Biophysics
<b>Thesis</b>	Factors influencing the biological effects of metallopharmaceuticals. Relationship to antitumor efficiency
<b>Type of thesis</b>	doctoral
<b>Programme</b>	P1703 Physics
<b>Field of study</b>	Biophysics
<b>Supervisor</b>	prof. RNDr. Viktor Brabec, DrSc.
<b>Year of defence</b>	2021
<b>Keywords</b>	DNA, platinum complexes, cisplatin, gallium complex, platinum adducts, photoactivatable platinum complexes, MicroScale thermophoresis, translesion DNA synthesis
<b>Number of pages</b>	77 + 11
<b>Language</b>	Slovak

## Prehlásenie

Prehlasujem, že som svoju dizertačnú prácu vypracovala samostatne s použitím informačných zdrojov, ktoré sú v práci citované. Všetky publikované výsledky zahrnuté v práci boli použité so súhlasom spoluautorov.

V Olomouci dňa

.....

.....

Monika Hreusová

## Pod'akovanie

Na tomto mieste by som sa chcela poďakovať svojmu školiteľovi prof. RNDr. Viktorovi Brabcovi, DrSc. za podporu a odborné vedenie pri tvorbe dizertačnej práce. Moje poďakovanie ďalej patrí prof. RNDr. Jane Kašpárkovej, Ph.D. za ústretový prístup a pomoc pri písaní tejto práce. Vrelá vďaka patrí aj doc. Mgr. Olge Novákovej, Dr. za trpezlivosť, cenné pripomienky a rady a taktiež za odborné vedenie a časté konzultácie. Ďakujem všetkým kolegom a odborníkom z oddelenia Molekulárnej biofyziky a farmakológie BFÚ AV ČR za vytvorenie príjemného a priateľského prostredia a pomoc pri plnení zadaných úloh. Ďalej sa chcem poďakovať aj svojmu manželovi za podporu počas celého štúdia, rodičom a všetkým priateľom, ktorí mi pomáhali pri tvorbe tejto práce.

Dizertačná práca vznikla za podpory projektov UPOL (projekty Interní grantové agentury IGA\_PrF\_2017\_017, IGA\_PrF\_2018\_022, IGA\_PrF\_2019\_030, IGA\_PrF\_2020\_028, IGA\_PrF\_2021\_017).

## Abstrakt

Organokovové komplexy sú významnou súčasťou protinádorového výskumu od úspešného klinického schválenia cisplatiny. Popri konvenčných platinových cytostatikách, ktoré však majú svoje limity, je dôležitý výskum a vývoj v tejto oblasti za účelom získania nových koordinačných komplexov s centrálnym atómom kovu s lepším terapeutickým účinkom a nižšou systematickou toxicitou. Predkladaná dizertačná práca sa zaoberá mechanistickým štúdiom protinádorového účinku troch skupín nových platinových zlúčenín na molekulárnej úrovni a štúdiom komplexu gália na bunecnej úrovni.

Prvá časť práce pojednáva o výsledkoch štúdia *in vitro* interakcií nových fotoaktivovateľných dinukleárných platičitých komplexov s DNA a porovnaním ich účinku a zároveň vplyvu dĺžky spojovacieho linkru s príbuzným mononukleárnym **FM190** (*trans, trans, trans*-[Pt(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>(pyridín)<sub>2</sub>]). Zistilo sa, že po ožiarení modrým svetlom dochádza k fotodekompozícii študovaných dinukleárných komplexov za vzniku dvoch aktívnych mononukleárných platinových jednotiek podobných mononukleárnemu **FM190**. Následkom toho spôsobovali skúmané dinukleárne komplexy takmer rovnaké poškodenie DNA ako mononukleárny **FM190**.

Výsledky prezentované v druhej časti tejto dizertačnej práce ukazujú, že chiralita komplexov [Pt(**DABN**)Cl<sub>2</sub>], kde (DABN = 1,1'-binaftyl-2,2-diamín), môže výrazne ovplyvniť spôsob ich väzby na DNA, ktorá sa všeobecne považuje za hlavný farmakologický cieľ konvenčných protinádorových komplexov platiny a ich derivátov. Na druhej strane sa však rozdiely vo väzbe na DNA neprenášajú priamo do bunecného spracovania a toxicity **R**- a **S**-[Pt(**DABN**)Cl<sub>2</sub>] v rakovinových bunkách. Z toho vyplýva, že poškodenie DNA týmito komplexami nemusí byť hlavným dôvodom ich protinádorového účinku na rozdiel od konvenčných platinových cytostatík a ich derivátov.

Treťou časťou práce je štúdium komplexu gália na bunecnej úrovni a stanovenie jeho antiproliferatívnej aktivity na viacerých bunkových nádorových líniiach. V porovnaní s cisplatinou je tento komplex výrazne účinnejší a selektívnejší na nádorové bunky.

Jednou z príčin rezistencie na liečbu je tolerancia poškodenia DNA prostredníctvom translázovej syntézy DNA cez platinové adukty. V poslednej časti tejto dizertačnej práce bola študovaná translázová syntéza DNA cez špecifický monofukčný adukt protinádorového komplexu **AMD** ([PtCl(en)(L)](NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> en = ethylén-1,2-diamín, L = *N*-[2-(akridín-9-ylamino)ethyl]-*N*-methylpropionamidín)) pomocou DNA polymeráz a s tým spojené termodynamické zmeny prostredníctvom mikroškálovej termofórey (MST). Výsledky získané pomocou MST boli v súlade s experimentálnymi dátami popisujúcimi translázovú syntézu DNA cez adukt **AMD** prokaryotickou aj eukaryotickou DNA polymerázou. Termodynamické parametre taktiež prispeli k hlbšiemu porozumeniu toho, ktoré faktory vplyvajú na mechanizmus syntézy DNA cez adukt **AMD**.

## Abstract

Organometallic complexes have been an important part of anticancer research since the successful clinical approval of cisplatin. In addition to conventional platinum cytostatics, which have limitations, research and development in this field are essential to obtain new metal – based coordination complexes with a better therapeutic effect and lower systemic toxicity. The present dissertation thesis deals with the mechanistic study of the antitumor effect of three groups of new platinum compounds at the molecular level and the study of the gallium complex at the cellular level.

The first section pertains to the results of an *in vitro* study of DNA interactions of new photoactivatable dinuclear platinum (IV) complexes as well as the comparison of their effects and the influence of the length of the linker with the related mononuclear **FM190** (*trans, trans, trans*-[Pt(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>(pyridine)<sub>2</sub>]). It was found that after irradiation by blue light, photodecomposition of the studied dinuclear complexes occurred to form two active mononuclear platinum (II) units similar to mononuclear **FM190**. As a consequence, the investigated dinuclear complexes caused almost the same DNA damage as mononuclear **FM190**.

The results presented in the second section of this dissertation show that the chirality of [Pt(**DABN**)Cl<sub>2</sub> (DABN = 1,1' -binaphthyl-2,2-diamine) complexes can significantly affect the way they bind to DNA, which is commonly considered the main pharmacological target of conventional antitumor platinum complexes and their derivatives. On the other hand, the variations in DNA binding do not translate directly into cellular processing and toxicity of *R*- and *S*-[Pt(**DABN**)Cl<sub>2</sub> in cancer cells. Therefore, unlike conventional platinum drugs and their derivatives, the DNA damage resulting from binding of *R*- and *S*-[Pt(**DABN**)Cl<sub>2</sub> is not the major factor responsible for their biological actions.

The third section of this thesis describes the study of the gallium complex at the cellular level and the determination of its antiproliferative activity on several tumor cell lines. Compared to cisplatin, this complex is significantly more effective and selective for tumor cells.

One cause of resistance to treatment is the tolerance of DNA damage by translesion DNA synthesis through platinum DNA adducts. The last section of this dissertation deals with the study of the translesion DNA synthesis through site-specific monofunctional adduct formed by antitumor **AMD** complex [PtCl(en)(L)](NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, en = ethane-1,2-diamine, L = N-[2-(acridin-9-ylamino)ethyl]-N-methylpropionamide) using DNA polymerases and MicroScale thermophoresis (MST) for associated thermodynamic changes. The MST results were in good agreement with experimental data describing translesion DNA synthesis across the **AMD** adduct by DNA polymerases of eukaryotic and prokaryotic origin. The equilibrium thermodynamic data also contributed to a deeper understanding of the factors that control the mechanisms of template-directed DNA synthesis across the **AMD** adduct.



# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>11</b>
1.1	Štruktúrne a termodynamické vlastnosti DNA	12
1.2	Cisplatina	14
1.2.1	Mechanizmus pôsobenia	15
1.2.2	Odpoveď bunky na poškodenie DNA	18
1.2.3	Oprava poškodenia DNA	20
1.2.4	Súhrn príčin rezistencie nádorových buniek k cisplatine	25
1.2.5	Smrť nádorových buniek vyvolaná pôsobením cisplatiny	26
1.3	Vývoj nových liečiv na báze koordinačných zlúčenín s centrálnym atómom kovu	27
1.3.1	Klinicky používané deriváty cisplatiny	28
1.3.2	Monofunkčné komplexy platiny	30
1.3.3	Polynukleárne komplexy platiny	31
1.3.4	Komplexy platiny ako proliečivá	33
1.3.5	Komplexy gália	35
<b>2</b>	<b>Ciele práce</b>	<b>37</b>
<b>3</b>	<b>Materiál a metódy</b>	<b>38</b>
3.1	Komplexy platiny	38
3.2	Komplex gália	39
3.3	Chemikálie a biologický materiál	40
3.4	Prístrojové vybavenie	41
3.5	Metódy	41
3.5.1	Kinetika väzby študovaných komplexov platiny na DNA <i>in vitro</i>	41
3.5.2	Charakterizácia DNA aduktov pomocou EtBr fluorescencie	41
3.5.3	Rozvíjanie negatívne vinutej plazmidovej DNA	42
3.5.4	Formácia medzireťazcových mostíkov	43
3.5.5	Reakcia platinových komplexov s glutatiónom	43
3.5.6	Transkripčné mapovanie platinových aduktov na DNA	44
3.5.7	Ethanolová precipitácia DNA	44
3.5.8	DNázový footprinting	45
3.5.9	Reparačná syntéza DNA	45
3.5.10	Fenol – chloroformová deproteinácia DNA	46

3.5.11	Vytvorenie špecifického platinového aduktu na krátkych oligonukleotidoch DNA .....	47
3.5.12	Experimenty zaoberajúce sa translázovou syntézou.....	47
3.5.13	Mikroškálová termoforéza – MST.....	49
3.5.14	Kultivácia bunkových nádorových línií.....	50
3.5.15	Stanovenie antiproliferatívnej aktivity komplexov.....	51
<b>4</b>	<b>Výsledky a diskusia .....</b>	<b>52</b>
4.1	Photoactivatable cell-selective dinuclear trans-diazidoplatinum(IV) anticancer prodrugs. (Publikácia č. 1) .....	52
4.2	DNA modification by cisplatin-like Pt(II) complexes containing 1,1'-binaphthyl-2,2'-diamine ligand does not correlate with their antiproliferative activity in cancer cells. (Publikácia č. 2).....	56
4.3	Low-dimensional compounds containing bioactive ligands. Part XIV: High selective antiproliferative activity of tris(5-chloro-8-quinolinolato)gallium(III) complex against human cancer cell lines. (Publikácia č. 3).....	58
4.4	Thermodynamic Insights by Microscale Thermophoresis into Translesion DNA Synthesis Catalyzed by DNA Polymerases Across a Lesion of Antitumor Platinum–Acridine Complex. (Publikácia č. 4) .....	60
<b>5</b>	<b>Záver .....</b>	<b>63</b>
<b>6</b>	<b>Zoznam použitej literatúry .....</b>	<b>65</b>
<b>7</b>	<b>Zoznam skratiek .....</b>	<b>76</b>
<b>8</b>	<b>Prílohy .....</b>	<b>78</b>
8.1	Zoznam publikovaných prác .....	78
8.1.1	PUBLIKÁCIA Č. 1.....	79
8.1.2	PUBLIKÁCIA Č. 2.....	81
8.1.3	PUBLIKÁCIA Č. 3.....	83
8.1.4	PUBLIKÁCIA Č. 4.....	85
8.2	Štruktúrovaný životopis .....	87

# 1 Úvod

Koordináčné zlúčeniny s centrálnym atómom platiny majú popredné miesto v chemoterapii rakoviny. Prvým a zároveň doteraz najúspešnejším cytostatikom tohto typu je cisplatina. Okrem nej sa momentálne v klinickej praxi používa päť jej priamych derivátov a desiatky ďalších sa dostali do rôznych štádií klinických testov. Význam platinových cytostatík zdôrazňuje fakt, že liečba platinovými zlúčeninami či už samostatne, alebo v kombinácii s inými látkami, sa využíva pri chemoterapii 50 – 70 % onkologických pacientov s mnohými typmi nádorov [1].

Napriek vysokej terapeutickej účinnosti však používanie cisplatiny súvisí s výskytom viacerých závažných vedľajších účinkov a taktiež s častým vývojom rezistencie nádorových buniek na liečbu. Zavedením jej derivátov novej generácie do klinickej praxe (karboplatina, oxaliplatina, nedaplatina, heptaplatina a lobaplatina) sa síce znížila jej systematická toxicita, avšak mechanizmus ich účinku je v podstate rovnaký ako u cisplatiny. Za hlavný dôvod ich protinádorovej aktivity sa považuje väzba na DNA. Výnimkou je oxaliplatina, u ktorej boli odhalené už aj nové mechanizmy účinku [2]. Vzniknuté konformačné zmeny na DNA sú následne rozpoznávané a spracované rôznymi bunkovými proteínmi, čo vedie k programovanej smrti bunky – apoptóze [3].

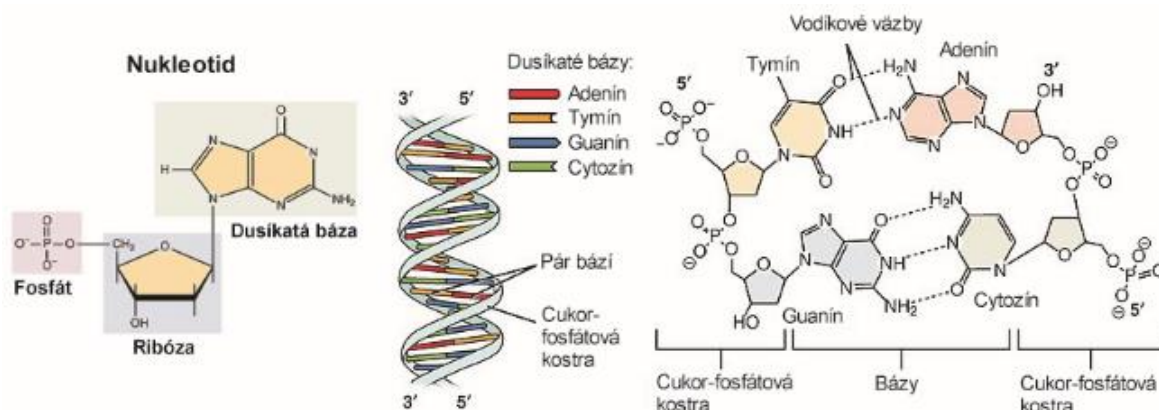
V dnešnej dobe sa intenzívnym výskumom koordináčnych zlúčenín s centrálnym atómom kovu zaoberá množstvo popredných svetových laboratórií. V snahe zlepšiť a rozšíriť cytotoxické účinky konvenčných platinových cytostatík sú stále analyzované nové zlúčeniny tohto typu s iným mechanizmom účinku a vyššou selektivitou na nádorové bunky. Ako veľmi úspešné sa javia napríklad polynukleárne komplexy platiny poškodzujúce DNA odlišným spôsobom ako cisplatina, selektívne platičité komplexy, komplexy so špecifickými ligandami s cieľom selektívnej akumulácie v nádorových bunkách a mnohé ďalšie. V centre záujmu je taktiež zlepšenie účinku už existujúcich komplexov ich kombináciou s inými zlúčeninami [4].

Teoretická časť predkladanej dizertačnej práce sa v prvej polovici venuje súhrnu mechanizmu účinku cisplatiny. Tá je ako prvé a najpoužívanejšie cytostatikum tohto typu veľmi dobre popísaná a z teoretických znalostí jej účinku sa odvíja následný výskum a vývoj ďalších koordináčnych zlúčenín na báze kovu s odlišným mechanizmom účinku. V druhej časti je popísaný vývoj nových protinádorových komplexov a protinádorové účinky vybraných derivátov, ktorými sa zaoberá experimentálna časť práce. Experimentálna časť práce popisuje metodiku práce a výsledky štúdií viacerých typov organokovových komplexov na molekulárnej a bunecnej úrovni.

## 1.1 Štruktúrne a termodynamické vlastnosti DNA

Genetické informácie všetkých organizmov sú zakódované v biomakromolekule DNA – deoxyribonukleovej kyseline. DNA je taktiež farmakologickým cieľom konvenčných platinových cytostatík. Skladá sa zo štyroch typov nukleotidových jednotiek a jej informačný obsah je daný poradím nukleotidov, ktoré sú navzájom spojené 5'– 3' fosfodiesterovou väzbou. Každý nukleotid pozostáva z troch častí: fosfátového zvyšku, deoxyribózy a purínovej alebo pyrimidínovej bázy – adenínu (6-aminopurín), guanínu (2-amino-6-oxopurín), tymínu (2,4-dioxo-5-methylpyrimidín) a cytozínu (4-amino-2-oxypyrimidín) (Obr. č. 1).

Molekula DNA sa najčastejšie vyskytuje v B-konformácii a má tvar pravotočivej dvojzávitnice s priemerom cca 2 nm. Skladá sa z dvoch antiparalelných komplementárnych reťazcov navzájom viazaných slabými nekovalentnými silami, ktoré ju stabilizujú. Ide o vodíkové väzby medzi jednotlivými bázami v pároch AT (2 vodíkové väzby) a CG (3 vodíkové väzby) (Obr. č. 1), interakcie medzi susediacimi bázami, vrstevnaté interakcie – „stacking“, hydrofóbne interakcie a elektrostatické interakcie s kladne nabitými iónmi. Asymetrické usporiadanie párov bází na cukor – fosfátových kostrách reťazcov ovplyvňuje vonkajší vzhľad DNA a spôsobuje výskyt dvoch žliabkov rôznej hĺbky a šírky – veľký a malý žliabok. V oboch žliabkoch môže dochádzať k väzbe proteínov alebo liečiv.

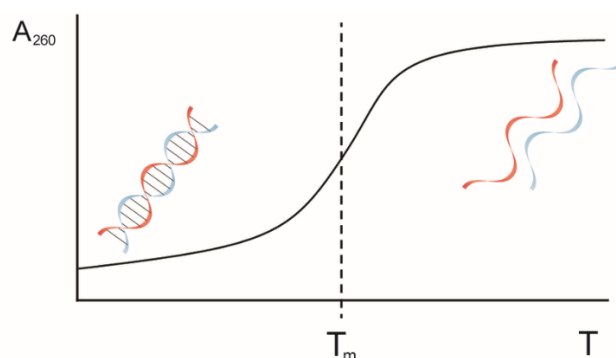


Obr. č. 1: Štruktúra nukleotidu, dvojzávitnice DNA, dusíkatých bází a spôsob ich párovania (Prevzaté a upravené z [11])

Nekovalentné interakcie stabilizujú DNA dvojzávitnicu v širokom rozmedzí teplôt a iónovej sily. Na druhej strane však nie sú príliš silné a umožňujú rozvíjanie DNA rôznymi proteínmi pri replikácii či transkripcii, čo je nevyhnutné pre jej funkciu v bunke. Kvantitatívne porozumenie stability DNA dvojzávitnice je dôležité pre analýzu mnohých základných problémov a aplikácií založených na tvorbe a disociácii komplementárnych reťazcov. Hlavným zdrojom informácií o energetike DNA je proces denaturácie, alebo tiež

topenia. Denaturáciou sa rozumie prechod dvojzávitnice na dve flexibilné samostatné vlákna DNA. Tento proces sa meria pomocou zisťovania teploty topenia DNA, ktorá sa používa hlavne k popisu stability duplexu DNA (Obr. č. 2) [5].

Teplota topenia DNA sa najčastejšie meria pomocou UV-VIS spektrometrie, kde dochádza postupným zvyšovaním teploty vzorky k denaturácii DNA. Denaturácia DNA je sprevádzaná hyperchrómnym efektom, kedy roztoky dvojzávitnicovej DNA absorbujú v UV oblasti (260 nm) menej než jednoreťazcová DNA pri rovnakej koncentrácii bází. Hyperchrómnny efekt je spôsobený narušením vrstevnatých interakcií. Teplota topenia DNA je definovaná ako teplota, pri ktorej je denaturované 50 % DNA zo vzorky (inflexný bod krivky) (Obr. č. 2). Stabilita DNA a tým pádom aj jej teplota topenia závisí na jej dĺžke, sekvencii nukleotidov, pH, iónovom zložení roztoku a teplote [6].



Obr. č. 2: Proces denaturácie DNA a zisťovania teploty topenia DNA ( $T_m$ ). Zvyšujúcou sa teplotou vzorky dvojreťazcovej DNA dochádza k separácii reťazcov a k zvýšeniu absorbancie pri 260 nm. Teplotu topenia určuje inflexný bod krivky (Prevzaté a upravené z [12])

Čiastočná separácia reťazcov v bunke zohráva dôležitú rolu pri replikácii, transkripcii, či oprave DNA a môže byť ovplyvnená nekovalentnou väzbou proteínov v bunkách, alebo kovalentnou väzbou platinových cytostatík a iných činidiel. Termodynamické dáta z kriviek topenia pomáhajú pochopeniu závislosti stability dvojzávitnice na sekundárnej a primárnej štruktúre DNA a taktiež podávajú informáciu o poškodení DNA [7].

Termodynamickými parametrami, ktorými sa popisuje proces disociácie reťazcov DNA, sú entalpia  $\Delta H$ , entropia  $\Delta S$  a Gibbsova energia  $\Delta G$ . Vzťah medzi jednotlivými veličinami vyjadruje rovnica 1:

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

Tieto parametre môžu byť získané výpočtom, pomocou počítačových simulácií, alebo ich priamym stanovením. Jednou z metodík je kalorimetrické stanovenie, počas ktorého sa meria teplo, ktoré bolo uvoľnené alebo dodané analyzovnému systému. Najčastejšie sa používajú diferenčná skenovacia kalorimetria a izotermálna titračná kalorimetria [8,9].

V tejto dizertačnej práci bola na stanovenie termodynamických parametrov platinovaných oligonukleotidov použitá mikroškálová termoforéza (MST – „MicroScale Thermophoresis“). Jej princíp je bližšie popísaný v časti Materiál a metódy. Je založená na termoforéze – riadenom pohybe molekúl v teplotnom gradiente, ktorý je závislý na mnohých vlastnostiach skúmaných molekúl, ako sú napríklad veľkosť, náboj, konformácia či hydratačný obal. Na vytvorenie teplotného gradientu sa používa infračervený laser. Detekcia a kvantifikácia riadeného pohybu častíc je umožnená použitím vhodne zvoleného vnútorného alebo kovalentne naviazaného fluoroforu. Vzhľadom k vysokej citlivosti tejto metódy na akúkoľvek zmenu v molekulárnych vlastnostiach, poskytuje MST vynikajúci nástroj k získaniu termodynamických parametrov rôznych typov molekulových interakcií, ako napríklad proteín-proteín, DNA-proteín, či interakcie medzi oligonukleotidmi [10]. Výstupným parametrom tejto metódy je presne určená disociačná konstanta  $K_d$ , ktorá súvisí s ostatnými termodynamickými parametrami podľa vzťahu 2.

$$\Delta G = RT \ln K_d \quad (2)$$

Hodnoty termodynamických parametrov prispievajú k objasneniu možného protinádorového mechanizmu cytostatík na báze koordinačných zlúčenín s centrálnym atómom kovu. V ich prípade dochádza väzbou na DNA k zmenám v jej stabilite vyjadrenej zmenou  $\Delta G$ . Napríklad k destabilizácii môže dochádzať na entalpickej úrovni, ktorá odráža zmeny spôsobené v sekundárnej štruktúre DNA – narušenie vrstevnatých interakcií a vodíkových väzieb. Táto destabilizácia môže byť kompenzovaná entropickou stabilizáciou DNA, ktorá odráža zmeny v hydratačnom obale DNA a flexibility DNA v mieste lézie [11,12]. K termodynamickej stabilizácii duplexu DNA môže dôjsť napríklad pri vytvorení medzireťazcových mostíkov pôsobením cisplatiny. V tomto prípade je stabilizácia entropického pôvodu a súvisí so zmenou molekularity v priebehu denaturácie duplexu [13].

## 1.2 Cisplatina

Objav cisplatiny je v oblasti chemoterapie rakoviny jedným z najvýznamnejších. Tento komplex bol prvýkrát nasyntetizovaný v roku 1844 nemeckým chemikom Michaelom Peyronom. Jej protinádorové účinky boli náhodne objavené až v roku 1965 Barnettom Rosenbergom pri štúdiu vplyvu elektrického poľa na rast baktérií *E. coli*. [14].

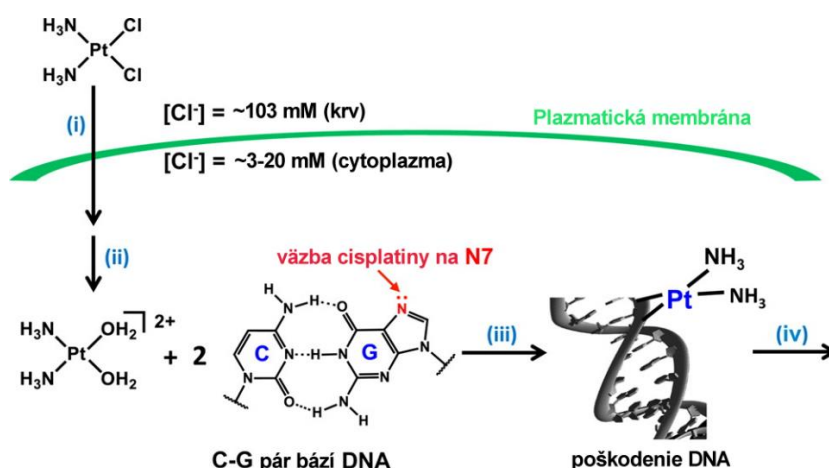
Po úspešných testoch na experimentálnych nádorových modeloch bola cisplatina v roku 1978 zavedená do klinickej praxe [14] a stále sa používa, či už samostatne alebo v kombinácii s inými liečivami pri liečbe mnohých typov nádorov. Najúspešnejšia je pri liečbe rakoviny semenníkov, kde je jej účinnosť takmer 100 % pri záchyte v skorých štádiách

ochorenia, ďalej sú to nádory vaječníkov, močového mechúra, pľúc, tenkého čreva, žalúdka či niektoré typy nádorov hlavy a krku [15–17].

### 1.2.1 Mechanizmus pôsobenia

Cisplatina – *cis*-diamminodichloridoplatnatý komplex (Obr. č. 3) je anorganická neutrálna zlúčenina so štvorcovo – planárnou geometriou. Silnou koordinačnou väzbou v *cis* geometrii sú na centrálny atóm Pt v oxidačnom stupni II naviazané aminoskupiny. Slabšia väzba chloridov zapríčiňuje ich prípadnú substitúciu nukleofilmi. Vo vodnom prostredí s nízkym obsahom chloridových iónov podlieha hydrolyze a tým pádom sa stáva aktivovanou [18]. Mechanizmus pôsobenia cisplatiny zahŕňa štyri kľúčové kroky: (i) akumuláciu v bunke, (ii) aktiváciu hydrolyzou, (iii) väzbu na DNA a (iv) bunecné spracovanie lézií vytvorených v DNA vedúce k smrti bunky (Obr. č. 3) [19].

Vzhľadom k tomu, že cisplatina je podávaná pacientom intravenózne, dostáva sa krvou do celého tela. Avšak vysoká koncentrácia chloridových iónov v krvnej plazme (~103 mM) bráni hydrolyze komplexu v krvi pacienta. Z tohoto dôvodu sa cisplatina dostáva do buniek hlavne ako neutrálna molekula. V cytoplazme buniek koncentrácia chloridov prudko klesá (~3 – 20 mM) a dochádza k jej aktivácii hydrolyzou (Obr. č. 3) – chloridové ióny postupne odstupujú a sú vymenené za vodu alebo hydroxid [15,18,20].

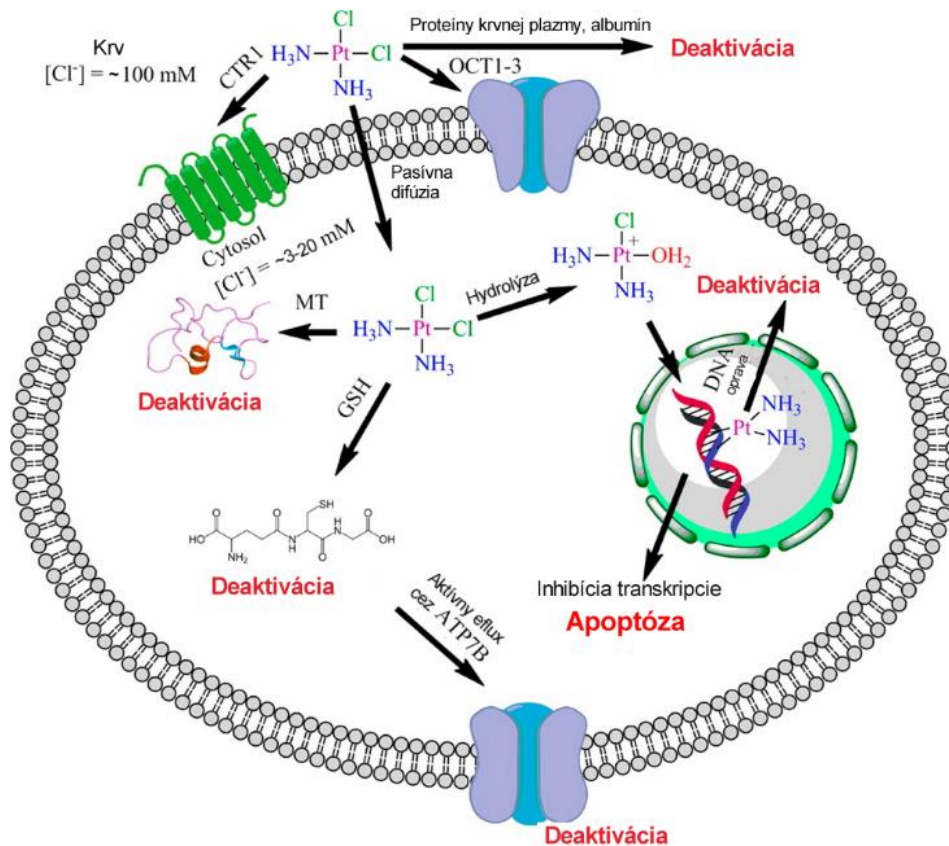


Obr. č. 3: Štruktúra cisplatiny a mechanizmus jej pôsobenia: (i) vstup do bunky, (ii) hydrolyza, (iii) väzba na DNA a (iv) bunecné spracovanie lézií vytvorených v DNA (Prevzaté a upravené z [21])

Cisplatina vstupuje do bunky dvoma spôsobmi (Obr. č. 4). Prvým a najčastejším je pasívna difúzia cez plazmatickú membránu vďaka svojej malej veľkosti a planárnemu tvaru. Druhou cestou liečiva do bunky je aktívny transport prostredníctvom transportérov medi Ctr1 a Ctr2 [19,22–24]. Aktivovaná cisplatina je kvôli získanému kladnému náboju silný elektrofil a interaguje s rôznymi bunecnými komponentami, ako sú napríklad nukleové kyseliny,

proteíny, membránové fosfolipidy a molekuly obsahujúce síru (glutatión, metalothioneíny) (Obr. č. 4) [15,18,20].

Aktivovaná cisplatina vstupuje do bunkového jadra. Získaním kladného náboja sa ochotne viaže na záporne nabitú DNA, predovšetkým na N7 guanínu ako najsilnejšieho nukleofilu [19]. V prípade purínových báz je pozícia N7 orientovaná do veľkého žliabku DNA [25]. Práve DNA sa považuje za hlavný biologický cieľ cisplatiny, čo bolo experimentálne potvrdené množstvom testov [26].

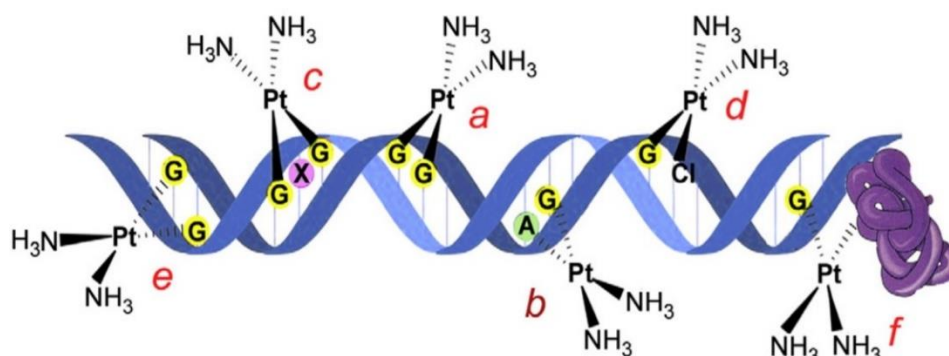


Obr. č. 4: Schéma akumulácie, metabolizmu a rezistencie cisplatiny v bunke (Prevzaté a upravené z [27])

## Poškodenie DNA

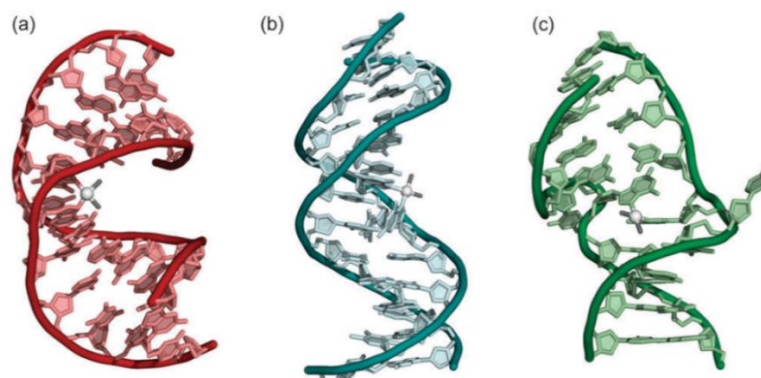
Väzbou cisplatiny na DNA dochádza k lokálnym zmenám konformácie DNA (Obr. č. 6) a vzniká viacero aduktov – typov deformácií DNA (Obr. č. 5). Existujú monofunkčné adukty (väzba komplexu na jednu bázu (Obr. č. 5d)), ktoré sú zastúpené najmenej a poškodenie DNA je závislé na nukleotidovej sekvencii v okolí väzby. Ďalej sú to bifunkčné adukty (medzi bázami v jednom reťazci, medzireťazcové mostíky medzi bázami komplementárnych reťazcov) a DNA – proteínový mostík (Obr. č. 5f) [3,16].





Obr. č. 5: Adukty cisplatiny s DNA. a) vnútroreťazcový mostík 1,2-d(GpG), b) vnútroreťazcový mostík 1,2-d(GpXpG), c) vnútroreťazcový mostík 1,2-d(GpXpG),: d) monofunkčný adukt, e) medzireťazcový mostík, f) väzba DNA-Proteín. (Prevzaté z: [3])

Práve najviac zastúpený adukt 1,2-d(GpG) (60-65%) – vnútroreťazcový mostík medzi dvoma susednými guanínmi (Obr. č. 5a), sa považuje za najdôležitejší v protinádorovej aktivite cisplatiny [16,28,29]. 1,2-d(GpG) adukt spôsobuje rozvinutie dvojzávitnice o  $13^\circ$  a taktiež jej ohyb o  $34^\circ$  smerom do veľkého žliabku. Druhým najviac zastúpeným aduktom je 1,2-d(ApG) (25%) (Obr. č. 5b) s rovnakou deformáciou dvojzávitnice ako 1,2-d(GpG). Málo častý 1,3-GXG vnútroreťazcový mostík (5-10 %) (Obr. č. 5c) spôsobuje lokálne rozvinutie dvojzávitnice o  $19 - 23^\circ$  a ohyb DNA o  $30 - 35^\circ$  smerom k veľkému žliabku [3,16,17]. K najväčším konformačným zmenám dochádza v prípade medzireťazcových mostíkov (Obr. č. 5e). Preferenčne vznikajú medzi guanínmi v 5'-GC/5'-GC sekvenciách [30,31]. Zaujímavosťou je, že ich vznikom dochádza k lokálnym zmenám pravotočivej formy DNA na ľavotočivú Z-formu. Táto zmena a vytlačenie nespárovaných cytozínov mimo dvojzávitnicu spôsobujú jej rozvinutie až o  $76^\circ - 86^\circ$  a ohyb dvojzávitnice o  $20^\circ - 40^\circ$  smerom k malému žliabku na rozdiel od vnútroreťazcových väzieb. Veľká toxicita tohoto aduktu spočíva v blokácii replikácie a transkripcie DNA, pretože nedochádza k separácii reťazcov [17,32–34].



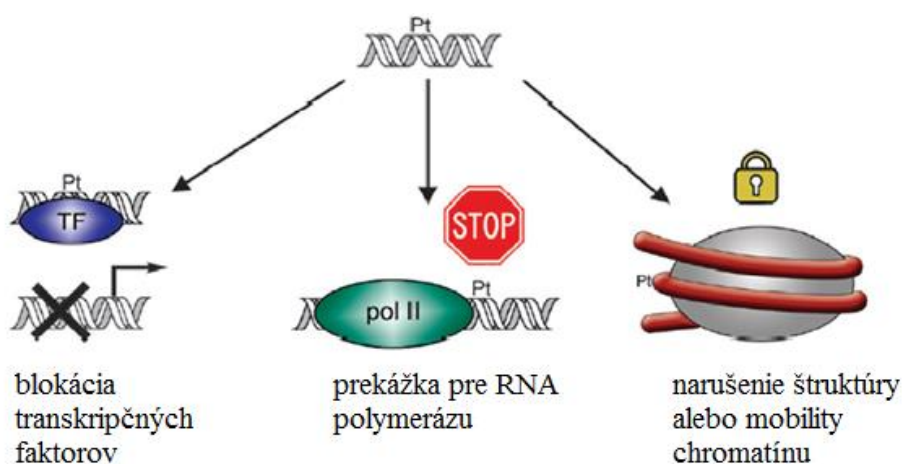
Obr. č. 6: Konformačné zmeny DNA vyvolané väzbou cisplatiny. a) vnútroreťazcový mostík 1,2-d(GpG), b) vnútroreťazcový mostík 1,2-d(GpXpG), c) medzireťazcový mostík (Prevzaté z [16])

## 1.2.2 Odpoveď bunky na poškodenie DNA

Biologická aktivita cisplatiny a jej derivátov je sprostredkovaná rozpoznávaním jej aduktov bunecnými proteínmi, ako sú enzýmy opravného systému, transkripčné faktory, históny a proteíny s HMG („high mobility group“) doménou, ktoré sa podieľajú na regulácii procesov závislých na DNA [3]. Afinita proteínov k modifikovanej DNA môže mať významný vplyv na protinádorovú aktivitu platinových komplexov. Lokálne zmeny v štruktúre DNA taktiež spôsobujú zastavenie DNA a RNA syntézy prostredníctvom blokácie DNA a RNA polymeráz [16].

### Inhibícia transkripcie

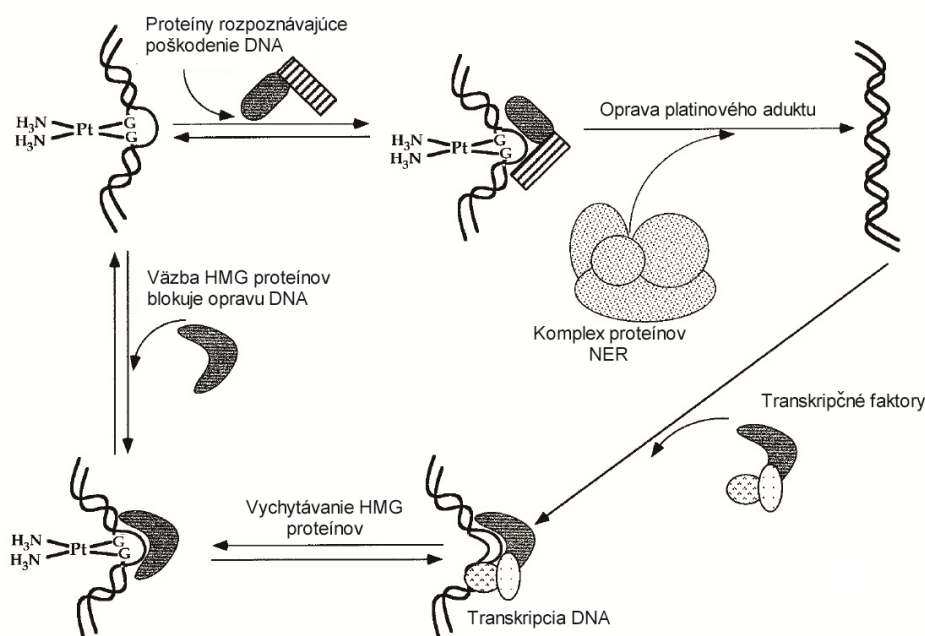
Platinové cytostatiká inhibujú transkripciu DNA, pričom tento proces je považovaný za jeden z hlavných dôvodov ich funkcie ako chemoterapeutík [16,35,36]. Cisplatina inhibuje transkripciu DNA viacerými spôsobmi (Obr. č. 7). Jedným z nich je tzv. „vychytanie“ transkripčného faktoru – adukty slúžia ako väzbové miesta pre transkripčné faktory ako napríklad TBP – „TATA – binding protein“, ktoré majú vysokú afinitu k platinovanej DNA. Interakcie týchto proteínov s aduktami cisplatiny bránia ich väzbe na natívne promotorové miesta a tak nedochádza k iniciácii transkripcie [16,37]. Ďalším zo spôsobov je blokácia RNA polymeráz, kedy platinové adukty slúžia ako fyzická prekážka pri elongácii [38–40]. Tretí prípad nastáva na úrovni reorganizácie chromatinu, kde je pre transkripciu rozhodujúce správne umiestnenie a mobilita nukleozómov, ktorá je narušená platinovými aduktami [41–43]. Hoci niet pochýb, že inhibícia replikácie a transkripcie je dôležitou súčasťou mechanizmu cytotoxického účinku platinových cytostatík, nevysvetľuje ho úplne, pretože tento efekt je viac komplexný [3,44].



Obr. č. 7: Grafická ukážka možných spôsobov inhibície transkripcie platinových zlúčenín (Prevzaté a upravené z [16])

## Interakcie s HMG proteínmi

Väzba HMG proteínov chráni platinové adukty na DNA pred rozpoznáním systémom nukleotidovej excízejnej opravy a opravou poškodenia (Obr. č. 8). Týmto spôsobom môžu pretrvávajúť dlhšiu dobu, čo sa prejaví na protinádorovom účinku daného liečiva [45,46]. Najintenzívnejšie skúmané boli interakcie platinovanej DNA s proteínom HMGB1, ale vysokú afinitu k platinovanej DNA má aj HMGB2. Tieto proteíny rozpoznávajú ohyb DNA smerom do veľkého žliabku, vzniknutý zmenou jej sekundárnej štruktúry po naviazaní platinového komplexu. Špecificky sa viažu do malého žliabku DNA oproti 1,2-(GpG) aduktu, prípadne v menšom množstve oproti 1,2-(ApG). Keďže množstvo HMG proteínov funguje ako transkripčné faktory, ich vychytávanie z promotorových sekvencií blokuje transkripciu DNA (Obr. č. 8) [17,47,48].



Obr. č. 8: Schéma väzby HMG proteínov na DNA modifikovanú cisplatinou. Na obrázku je zobrazený jednak model vchytávania transkripčných faktorov a zároveň model tienenia aduktov HMG proteínmi pred opravou DNA. (Prevzaté a upravené z [17])

## Inhibícia dôležitých enzýmov

Cisplatina taktiež selektívne redukuje aktivitu telomerázy špecifickým spôsobom v nádorových bunkách [49–51]. Telomeráza je špecifická DNA polymeráza, ktorá riadi predlžovanie telomér. Teloméry sú nukleoproteínové štruktúry na koncoch eukaryotických chromozómov obsahujúce tandemové repetície hexanukleotidov bohatých na G (TTAGGG). Chránia chromozomálnu DNA pred degradáciou a každým bunkovým delením sa skracujú. Po dosiahnutí kritickej dĺžky dochádza k senescencii alebo apoptóze bunky. Aby sa predišlo

tejto limitácii, u väčšiny malígnych nádorov dochádza k expresii telomerázy, ktorá tento proces kompenzuje [52]. Vzhľadom k vysokému obsahu guanínu v telomérnych jednotkách sú teloméry vhodným cieľom cisplatiny. Formácia cisplatinových aduktov v telomérovej jednotke blokuje telomerázovú reakciu [50].

Dôležitým cieľom v protinádorovej terapii sú topoizomerázy, enzýmy, ktoré menia topológiu DNA a účastia sa takmer všetkých procesov súvisiacich s replikáciou, transkripciou a rekombináciou DNA. Ich inhibítory sú považované za sľubné protirakovinové látky [53]. Cisplatina inhibuje topoizomerázu II vďaka priamej interakcii s enzýmom [54]. Na druhej strane je katalytická aktivita topoizomerázy I stericky blokovaná aduktami cisplatiny na DNA [55].

### **1.2.3 Oprava poškodenia DNA**

Celkový efekt poškodení v genóme nie je primárne riadený samotnou tvorbou poškodenia, ale efektívnosťou jeho opravy. Práve schopnosť opravy DNA určuje prežitie alebo smrť nádorových buniek. Mechanizmus odstránenia platinového aduktu a opravy DNA závisí na type jej poškodenia (Obr. č. 9, 10). Vnútroreťazcové mostíky sú opravované iným spôsobom ako medzireťazcové. Hlavnými mechanizmami opravy DNA po poškodení platinovými komplexami sú nukleotidová excízna oprava (NER), oprava chybné spárovaných báz (MMR), bázová excízna oprava (BER) ale opráv sa účastia aj proteíny homológnej rekombinácie (HR) a nehomológneho spájania koncov DNA (NHEJ). Medzi tolerantné opravy sa radí translázová syntéza DNA (TLS) [3,46,56].

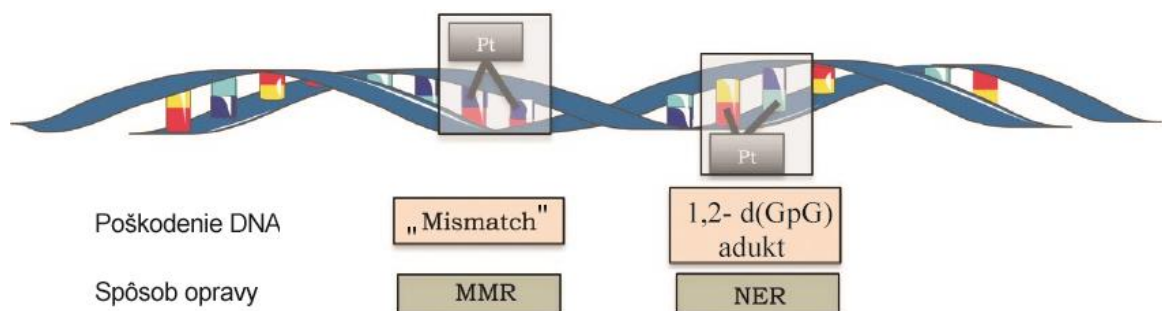
#### **Nukleotidová excízna oprava**

V bunkách sú DNA adukty cisplatiny (najmä 1,2-GG a 1,3-GXG) efektívne odstraňované hlavne pomocou nukleotidej excíznej opravy (NER) [57]. Tento reparačný mechanizmus je zložený z dvoch typov. Jedným je globálna oprava genómu, ktorá rozoznáva poškodenia v genóme ako celku prostredníctvom proteínov XPC-HR23B. Na druhej strane sú opravy spojené s transkripciou, u ktorých sú poškodenia rozpoznávané blokáciou RNA polymerázy II a týkajú sa teda len transkripčne aktívnych oblastí genómu. V nasledujúcich krokoch dochádza u oboch mechanizmov k separácii reťazcov DNA pomocou helikáz XPB a XPD a k vyštípeniu poškodenej časti reťazca na oboch stranách prostredníctvom endonukleáz XPF/ERCC1 a XPG. Po odstránení poškodeného miesta (oligonukleotid o dĺžke cca 30 nukleotidov), je vzniknutá medzera zaplnená DNA polymerázou  $\epsilon$ , ktorá v spolupráci s replikačnými faktormi nasyntetizuje chýbajúcu časť, pričom je neporušený reťazec DNA použitý ako templát [56,58].

Určujúcim faktorom vysokej citlivosti nádorov semenníkov na cisplatinu je práve neschopnosť opravy DNA v ich bunkách. Bunkové línie semenníkov mali v skutočnosti nižšiu schopnosť opravy aduktov platiny, než iné bunkové línie v celom genóme aj v aktívnych transkriptochoch [56,59]. Navyše, nižšia schopnosť opravy DNA u bunkových línií semenníkov bola tiež spojená v nízkymi hladinami XPA proteínu (proteín viažuci sa k poškodenej DNA) a komplexu ERCC1-XPF [60,61]. Nádorové línie rezistentné k cisplatinu vykazujú vyššiu mieru exprimácie opravných proteínov, čo znamená zvýšenú schopnosť opravy poškodenej DNA [56].

### Oprava chybné spárovaných bází – MMR

Za cytotoxicitu platinových komplexov v nádorových bunkách je spoluzodpovedný aj ďalší reparačný mechanizmus – „mismatch repair“ (MMR). Nefunkčnosť tohoto systému v nádorových bunkách prispieva k tolerancii poškodenia DNA a tým pádom k rezistencii na liečivo [62]. MMR je mechanizmus opravy DNA zodpovedný za opravu chýb jednovláknovej DNA (ssDNA), ako sú chyby v párovaní, alebo inzercie/delécie generované behom replikácie. Podobne ako NER, MMR pozostáva z rozpoznávania poškodenia, excízie, resyntézy a ligácie novo syntetizovaného vlákna [56,63]. Okrem opravy postreplikačných chýb MMR rozpoznáva taktiež lézie spôsobené aduktami cisplatinu, ktoré vyvolávajú postreplikatívne chybné párovanie hlavne G/T. Systém MMR však nie je schopný tieto lézie opraviť, pretože štiepi novo vzniknutý reťazec a nahrádza bázy oproti platinovému aduktu a tak udržuje zdroj „mismatchu“ nedotknutý. Keďže zlyhá oprava, cyklus sa naštartuje znovu a dochádza k zacykleniu [64]. Konštantný proces štiepenia a spájania reťazca môže viesť k tvorbe dvojreťazcových zlomov a k aktivácii signálnych faktorov vedúcich k apoptóze. MMR proteíny taktiež tienia adukty pred NER systémom a tak vedú k zvýšenej letalite cisplatinu [63,64]. Na rozdiel od NER, znížená schopnosť opravy pomocou MMR vedie k rezistencii na cisplatinu [64].



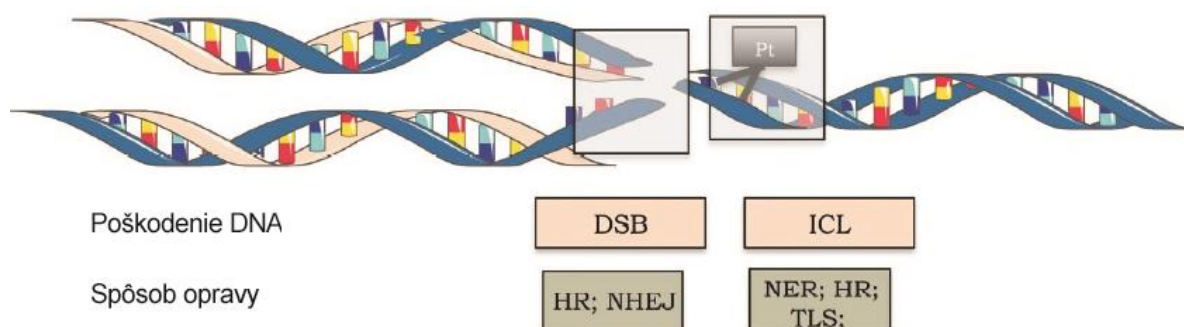
Obr. č. 9: Opravný mechanizmus poškodenia DNA vyvolaného väzbou cisplatinu. NER je zodpovedný za opravu 1,2-GG a 1,3-GXG aduktov, zatiaľ čo systém MMR síce rozpoznáva poškodenie, ale nie je schopný ho opraviť. (Prevzaté a upravené z [56])

## Bázová excízna oprava

Tento spôsob opravy DNA sa najčastejšie využíva pri odstránení nesprávnych či poškodených bází. Dochádza k rozpoznaní chybnej bázy príslušnou špecifickou DNA glykosylázou a k vytvoreniu apurínového/apyrimidínového miesta. Následne dôjde k rozštípeniu poškodeného reťazca a zaplneniu jednonukleotidovej medzery DNA polymerázou správnym nukleotidom. Bolo dokázané, že ľudská 3-methyladenín DNA glykosyláza sa špecificky viaže na vnútroreťazcové 1,2-d(GpG) a 1,2-d(ApG) adukty cisplatinu. Tieto poškodenia sú síce rozpoznané, ale nie sú týmto enzýmom vyštiepené [3,65]. Predpokladá sa, že adukty cisplatinu vychytávajú 3-methyladenín DNA glykosylázu z jej prirodzených väzbových miest, čo vedie k zvýšenej mutagenéze a bunkovej smrti z dôvodu pretrvávania poškodenia DNA [3].

## Oprava medzireťazcových mostíkov

Medzireťazcové mostíky, napriek tomu, že reprezentujú len cca 6 – 8 % z celkovej platinácie DNA, sú mimoriadne cytotoxické, najmä pre proliferujúce bunky. Kovalentná väzba platinového komplexu na obidve vlákna DNA bráni separácii reťazcov, a tým inhibuje životne dôležité procesy ako sú replikácia a transkripcia DNA [66]. Replikácia DNA obsahujúcej medzireťazcové mostíky (ICL) indukuje dvojreťazcové zlomy (DSB) pravdepodobne kvôli kolapsu replikačnej vidlice. Oprava je veľmi komplexná a zahŕňa početné mechanizmy vrátane NER, homológnej rekombinácie, nehomológneho spájania koncov DNA či translázovej syntézy (Obr. č. 10) [67]. Oprava ICL v ľudských bunkách do značnej miery závisí na stave bunkového cyklu, čo znamená, že požiadavky na opravu a výsledky opravy pre tento typ lézie sa líšia v deliacich a nedeliacich sa bunkách [66].



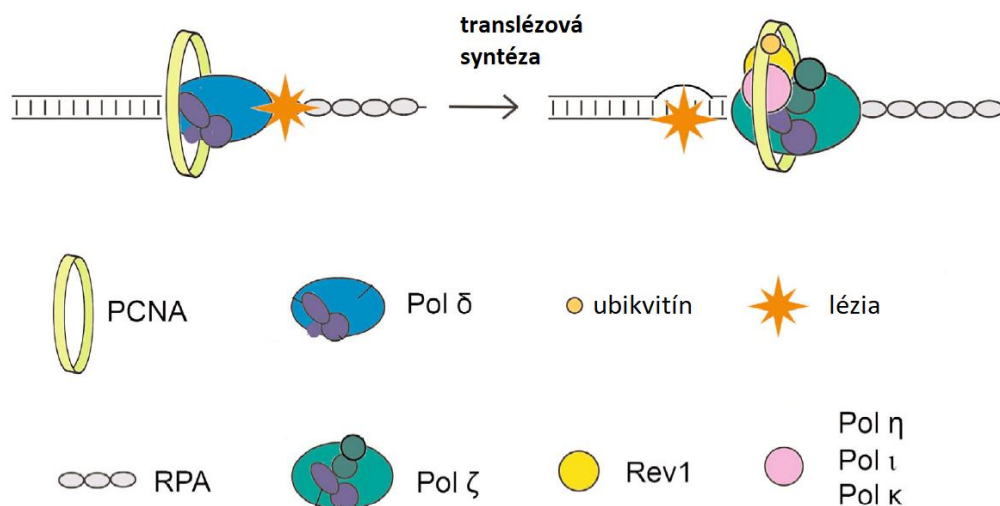
Obr. č. 10: Dvojreťazcové zlomy a medzireťazcové mostíky sú opravované početnými mechanizmami zahŕňajúcimi homológnu rekombináciu (HR), nehomológne spájanie koncov DNA (NHEJ), NER a TLS. (Prevzaté a upravené z [56])

## Translázová syntéza

Jeden z hlavných účinkov aduktov platínových komplexov na DNA je ich schopnosť blokovat' DNA a RNA polymerázy a zastaviť tak syntézu nukleových kyselín. Dlhodobé zastavenie replikačných vidlíc môže viesť k tvorbe dvojreťazcových zlomov a následne k bunkovej smrti [56,68]. Aby sa zabránilo kolapsu zastavených replikačných vidlíc, môže byť poškodenie DNA tolerované mechanizmom translázovej syntézy (TLS). Tá prebieha pomocou polymeráz z rodiny Y (Polymeráza  $\eta$  (Pol $\eta$ ), Pol $\iota$ , Pol $\kappa$  and Rev1) a B (Pol $\zeta$ ) (Obr. č. 12). Translázové polymerázy majú „široké“ katalytické miesto a nemajú korektívnu aktivitu, čo im umožňuje preklenúť poškodenia DNA správnym alebo mutagénym spôsobom [69,70].

Keď replikačná DNA polymeráza narazí na poškodenie DNA, dochádza k jej zastaveniu a spusteniu kaskády procesov vedúcich k ubikvitinácii PCNA („proliferating cell nuclear antigen“ – proliferačný bunkový jadrový antigén). Pri replikácii slúži PCNA ako svorka udržiavajúca DNA polymerázu na DNA. Po jeho ubikvitinácii dochádza k výmene replikačnej DNA polymerázy za translázové polymerázy (Obr. č. 12) [71–73]. Napriek tomu, že niektoré polymerázy, najmä Pol $\eta$ , sú schopné *in vitro* replikovať DNA cez adukt a pokračovať v predlžovaní reťazca, TLS *in vivo* väčšinou funguje ako dvojpolymerázový model [74]. Jedna polymeráza z rodiny Y (Pol $\eta$ , Pol $\iota$ , Pol $\kappa$  alebo Rev1) inkorporuje nukleotidy oproti poškodenému miestu a druhá DNA polymeráza, najčastejšie  $\zeta$  alebo menej často aj  $\kappa$ , pokračuje v syntéze DNA za poškodením [71,75].

Jednotlivé polymerázy sa líšia v biochemických vlastnostiach, efektívite a presnosti. Napriek tomu, že každá sa špecializuje na odlišný typ lézií, ich funkcie sa čiastočne prekrývajú [76,77]. Primárnym cieľom Pol $\kappa$  je TLS cez rôzne typy poškodenia DNA, hlavne modifikácie DNA indukované chemickými karcinogénmi v malom žliabku s rôznou presnosťou a efektívnosťou [78]. Pol $\kappa$  je taktiež najpresnejšia z rodiny Y na nepoškodenej DNA [71]. V spolupráci s Pol $\iota$ , ktorá inkorporuje nukleotidy oproti poškodeniu, predlžuje Pol $\kappa$  reťazec DNA [79]. Pol $\iota$  inkorporuje nukleotidy oproti apurínovým/apyrimidínovým miestam, uracilu a jeho derivátom a veľkým purínovým aduktom za vzniku Hoogsteenovho párovania bází [71,80].



Obr. č. 12: Schéma tolerancie poškodenia DNA prostredníctvom translézovej syntézy. Na obrázku je zobrazená ubiquitinácia PCNA a následná výmena replikačnej polymerázy  $\delta$  za komplex translézových polymeráz. (Prevzaté a upravené z [76])

Pol $\eta$  je zodpovedná za TLS množstva objemných DNA aduktov. Hlavnou funkciou Pol $\eta$  je efektívna a presná replikácia cez cyklobutánové tymínové diméry a ochrana bunky pred UV žiarením [76,81]. Štúdie *in vitro* ukázali, že je taktiež schopná replikovať DNA cez 1,2-d(GpG) adukty cisplatinu vložení správneho dCMP naproti 3'dG aduktu. Replikácia cez 5'dG je však menej presná a *in vivo* býva katalyzovaná Pol $\zeta$  [74]. Taktiež je schopná inkorporovať aj nesprávny nukleotid, ale v tom prípade nedôjde k predĺženiu reťazca [82,83]. Ľudské bunky, ktorým chýba Pol $\eta$ , sú citlivejšie na cisplatinu než wild-type bunky, alebo rovnaké bunkové línie obohatené o funkčnú Pol $\eta$  [56,84]. Taktiež Pol $\zeta$  hrá dôležitú úlohu v TLS. Je zapojená do premostenia cisplatinových aduktov DNA v spolupráci s Pol $\eta$  alebo Pol $\kappa$ , ktoré inkorporujú nukleotid oproti platinovému aduktu a Pol $\zeta$  predlžuje reťazec. Výsledkom aktivity Pol $\eta$  je nižšia inkorporácia chybných nukleotidov, zatiaľ čo Pol $\kappa$  je mutagénnejšia [85]. Ukázalo sa, že transformované myšie bunky, ktoré neobsahujú Pol $\zeta$  sú citlivejšie na cisplatinu ako ich náprotivky s vysokým obsahom Pol $\zeta$  [86]. Polymeráza Rev1 je taktiež dôležitá na premostenie cisplatinových aduktov [87]. Okrem schopnosti inkorporovať jeden správny nukleotid oproti lézii tiež zohráva nekatalytickú úlohu, ako je sprostredkovanie nasadnutia TLS polymeráz na DNA [88].

Translázové DNA polymerázy zohrávajú dôležitú úlohu v zachovávaní bunkovej stability, avšak pri ochrane DNA pred poškodením samy slúžia ako zdroj mutácií a karcinogénzie. Sú zahrnuté aj vo vývoji rezistencie nádoru k chemoterapii [71]. Vzhľadom k tomu, že tolerancia platinových aduktov pôsobí proti bunkovej smrti, koreluje expresia TLS polymeráz s rezistenciou voči cisplatinu. Inhibícia TLS polymeráz môže mať dvojaký protirakovinový účinok – zvýšenie citlivosti nádoru na liečivo a obmedzenie vzniku jeho chemorezistencie [56].



#### 1.2.4 Súhrn príčin rezistencie nádorových buniek k cisplatine

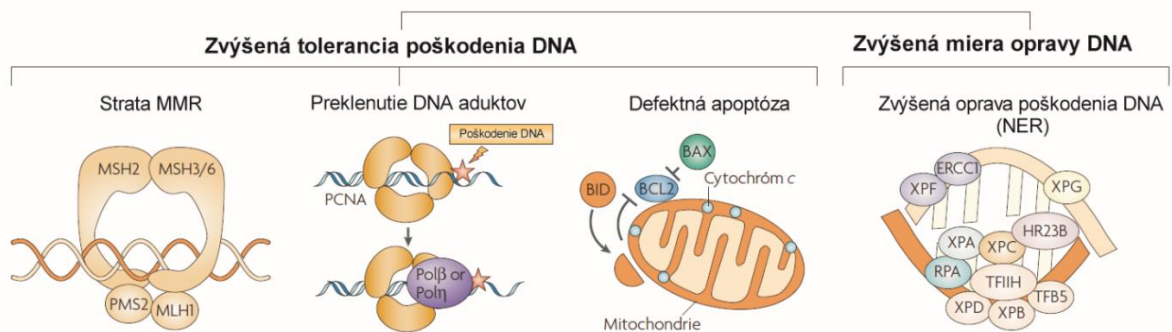
Rezistencia buniek k cisplatine, či už vrodená alebo získaná, je spôsobená dvomi hlavnými mechanizmami. Prvým je jej nedostatočná akumulácia v bunkách, čo spôsobuje nízku mieru platinácie DNA. Druhým mechanizmom je neschopnosť vyvolať bunkovú smrť po poškodení DNA (Obr. č. 13) [15].

V mnohých nádorových bunkách so získanou rezistenciou k cisplatine dochádza k zníženiu jej akumulácie v porovnaní s rodičovskými bunkami, pretože po každom delení sa dcérske bunky určitým spôsobom prispôbia [89]. Napriek tomu, že sa cisplatina dostáva do buniek hlavne pasívnou difúziou, dochádza aj k jej aktívnemu transportu prostredníctvom transportérov medi Ctr1 a Ctr2. V nádorových bunkách rezistentných k cisplatine dochádza k strate funkcie týchto proteínov a tým pádom k nižšiemu influxu cisplatinu do bunky [90,91]. K zníženej akumulácii cisplatinu v bunkách prispieva aj zvýšenie jej efluxu von z buniek (Obr. č. 4). Dochádza k nemu prostredníctvom efluxných proteínov ATP7A a ATP7B zapojených do transportu medi. Ďalšími exportnými proteínmi sú proteíny skupiny MRP („multidrug resistance protein“) [91]. Zvýšená expresia týchto proteínov koreluje so zvýšenou rezistenciou nádorových buniek k cisplatine [92].

Cisplatina je tiež známa svojou väzbou na rôzne ďalšie typy bunčných proteínov. Sú to napríklad transportéry, proteíny s antioxidantnou aktivitou či opravné proteíny. Interakcie s týmito proteínmi nie sú priamym dôvodom bunkovej smrti, ale hrajú dôležitú rolu v procesoch zahŕňajúcich biologickú aktivitu cisplatinu, ako je distribúcia, transport a akumulácia v bunke. Tiež ovplyvňujú celkovú toxicitu cisplatinu a vedľajšie efekty [93,94]. Preferenčne sa cisplatina viaže na proteíny obsahujúce síru. V krvnej plazme je vychytávaná a deaktivovaná albumínom, v prostredí bunky reaguje s metalotioneínmi a GSH (Obr. č. 4) [95,96]. Spoločným znakom rezistentných buniek je väčšinou zvýšená intracelulárna hladina thiolov. Väzby s cisplatinou sú irreverzibilné a poškodenia bývajú trvalé. Spôsobujú zmeny v konformácii a štruktúre daného proteínu a tým ovplyvňujú jeho biologickú funkciu. Práve väzba cisplatinu na thioly a tým pádom jej vychytávanie, deaktivácia a následný export konjugátu z bunky je jedným z dôvodov rezistencie na cisplatinu (Obr. č. 4) [3,94,97].

Po aktivácii cisplatinu a jej väzbe na DNA dochádza k bunčnej odpovedi na toto poškodenie. Môže dôjsť buď k zvýšenej miere odstraňovania platinových aduktov – opravy DNA, alebo k zvýšenej miere tolerancie tohto poškodenia (Obr. č. 13). Najfrekvencovanejšie bifunkčné adukty sú opravované pomocou vyššie spomínaného systému NER, hlavne prostredníctvom zvýšenej expresie opravných proteínov [56]. Adukty sú z DNA odstránené ešte predtým, ako by mohlo dôjsť k aktivácii apoptotických signálnych dráh [15]. Ďalším

dôvodom rezistencie nádorových buniek k cisplatinu je tolerancia poškodenia DNA. Tá môže byť spôsobená jednak dysfunkciou MMR a tiež zvýšenou mierou translázovej syntézy, ktorou dochádza k premosteniu aduktu DNA [15]. Tolerancia môže byť spôsobená taktiež aj zníženou expresiou, či úplnou stratou proteínov apoptotických signálnych dráh. Modifikácia DNA cisplatinou ovplyvňuje aj väzbu proteínu p53, ktorý je zodpovedný za spúšťanie procesu apoptózy v prípade, že je DNA nenávratne poškodená [98,99].



Obr. č. 13: Súhrn mechanizmov spôsobujúcich rezistenciu nádorových buniek k cisplatinu: tolerancia platinových aduktov stratou MMR, premostením aduktu translázovou syntézou, či poškodenie mechanizmu apoptózy. Na druhej strane je zvýšená miera opravy poškodenia DNA. (Prevzaté a upravené z [15])

### 1.2.5 Smrť nádorových buniek vyvolaná pôsobením cisplatinu

Cytotoxický efekt cisplatinu je spôsobený viacerými mechanizmami. Na jednej strane je neopravené poškodenie jadrovej DNA vedúce k zastaveniu bunkového cyklu. Okrem toho sa v niektorých nádorových bunkách cisplatinu viaže na mitochondriálnu DNA, takže ďalší jej mechanizmus cytotoxického pôsobenia súvisí so vznikom reaktívnych foriem kyslíka (ROS – singletný kyslík, hydroxylový, hydroperoxidový a superoxidový radikál) v dôsledku poškodenia mitochondriálnej DNA [100]. ROS vyvolávajú oxidačný stres vedúci k narušeniu permeability mitochondriálnej membrány, k aktivácii p53, či uvoľneniu cytochrómu c a následnej apoptóze [101]. Tieto cesty vedú k programovanej bunkovej smrti – apoptóze, ale aj k nekróze a autofágii. V nádorových bunkách dochádza k strate rovnováhy medzi delením a bunkovou smrťou. To znamená, že bunky, ktoré by mali zomrieť, k tomu nedostávajú signály. Práve schopnosť protinádorových zlúčenín indukovať apoptózu v nádorových bunkách je kľúčová v ich účinnosti [102]. Apoptóza je charakteristická viacerými morfológickými zmenami, ako sú zmršťovanie bunky, znižovanie jej objemu, poruchy membránovej integrity, či kondenzácia a fragmentácia DNA a následný rozpad bunky na apoptotické telieska [103].

### 1.3 Vývoj nových liečiv na báze koordinačných zlúčenín s centrálnym atómom kovu

Cisplatina sa bežne používa v klinickej praxi. Vzhľadom k jej nízkej selektivitě k nádorovým bunkám jej užívanie obmedzujú vedľajšie účinky. K najzávažnejším patria zvracanie, ototoxicita, myelotoxicita, poruchy krvotvorby, alergické reakcie a nefrotoxicita [4]. Spolu so systematickou toxicitou je účinok cisplatiny limitovaný aj vyššie popísanou rezistenciou nádorových buniek, či už získanou alebo prirodzenou. Je taktiež neúčinná pri liečbe najčastejšie sa vyskytujúcich nádorov, ako sú napríklad kolorektálny karcinóm, karcinóm prsníka a metastázy [101].

Nevýhody spojené s klinickým používaním cisplatiny viedli k vývoju množstva ďalších potenciálnych platinových zlúčenín s protinádorovou aktivitou. V ideálnom prípade by nové liečivá mali selektívne pôsobiť iba na nádorové bunky. Na začiatku bola snaha o výmenu odstupujúcich ligandov, ktorou by sa znížili vedľajšie účinky (karboplatina), neskôr došlo k výmene všetkých ligandov kvôli tvorbe iného typu poškodenia DNA (oxaliplatina) [104]. Obidva spôsoby priniesli viacero nových klinicky používaných platinových cytostatík. Týmito modifikáciami došlo k zníženiu celkovej toxicity, ale mechanizmus účinku týchto derivátov je s výnimkou oxaliplatiny v podstate rovnaký ako mechanizmus účinku cisplatiny [105,106]. Ďalšou stratégiou bola výmena atómu platiny za iný prechodný kov. Ako veľmi úspešné sa javí ruténium, ktorého dve zlúčeniny (NAMI-A a KP1019) sa dostali do klinického testovania, a taktiež aj gálium, osmium, titán, irídium, zlato či germánium [1,107].

Vo všeobecnosti sa dá povedať, že sú tri hlavné stratégie dizajnu nových platinových cytostatík [4]. Prvou sú komplexy s odlišným väzbovým módom než cisplatina. Patria sem monofunkčné komplexy, komplexy s *trans*-geometriou odstupujúcich ligandov a polynukleárne komplexy [108]. Do druhej kategórie spadajú inertné proliečivá, ktoré sú aktivované až v nádorovom tkanive. Príkladom tejto skupiny sú Pt<sup>IV</sup> komplexy, ktoré využívajú jedinečné vlastnosti nádoru ako kyslé pH a jeho hypoxické či redukčné prostredie. Pt<sup>IV</sup> komplexy sa v nádorovom prostredí redukujú na Pt<sup>II</sup> komplexy, pričom dochádza k strate dvoch axiálnych ligandov práve kvôli redukčnému nádorovému prostrediu [4,109,110].

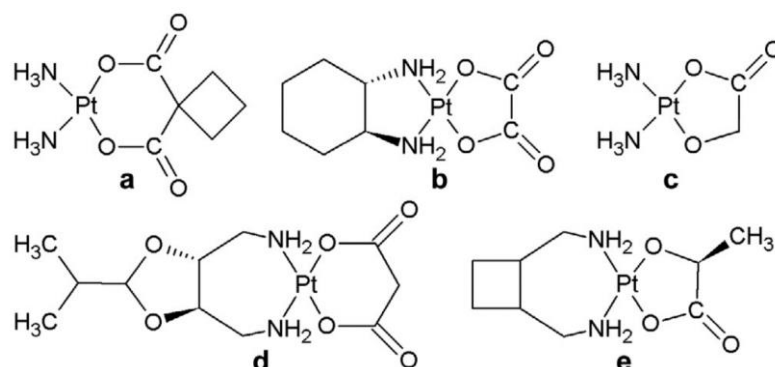
Treťou stratégiou je cieleňá akumulácia liečiva v nádorových tkanivách (DTD – „drug targeting and delivery“) [4]. Aktívny DTD je založený na špecifických biomolekulárnych interakciách medzi liečivom a nádorovými bunkami líšiacimi sa od zdravých [111]. V typickom DTD systéme je farmakofor naviazaný k cieľovej jednotke ligandom so špecifickou funkciou transportéru, antigénu či receptora [111]. Ako ligandy

môžu byť použité hormóny, cukry, aminokyseliny, proteíny a iné [112]. Pasívny DTD je založený na efekte zvýšenej priepustnosti a retencii nádorových buniek (EPR – „enhanced permeability and retention“ efekt) [113,114]. Intenzívajšia akumulácia liečiva v nádorových bunkách je spôsobená ich abnormálnou štruktúrou – hustou sieťou tenších a lepšie priepustných ciev, či zlou lymfatickou drenážou [114,115]. Príkladom jeho využitia je lipoplatina (Lipoplatin™, Regulon, Inc., CA, USA), v ktorej je cisplatina uzavretá v lipozóme. Viaceré štúdie preukázali vyššiu selektívnu akumuláciu takto viazanej cisplatiny v nádorových bunkách [4].

Existuje veľké množstvo ďalších skupín protinádorových komplexov na báze koordinačných zlúčenín s centrálnym atómom kovu, ktorých účinky boli a stále sú testované. V nasledujúcich kapitolách tejto práce sú okrem klinicky používaných derivátov cisplatiny podrobnejšie popísané tie, ktorými sa dizertačná práca najviac zaoberá – monofunkčné, polynukleárne, fotoaktivovateľné komplexy platiny a komplexy gália.

### 1.3.1 Klinicky používané deriváty cisplatiny

Na liečbu rakoviny sa v súčasnosti okrem cisplatiny používa päť jej derivátov (Obr. č. 14), ktoré majú podobný mechanizmus účinku ako cisplatina, tvoria podobné adukty, avšak líšia sa rýchlosťou väzby komplexu na DNA. Karboplatina a oxaliplatina sa spolu s cisplatinou používajú celosvetovo, zatiaľ čo nedaplatina, heptaplatina a lobaplatina sú schválené v Japonsku, Číne a Južnej Kórei [3]. Odstupujúce ligandy v ich štruktúre sú nahrádzané molekulami vody oveľa pomalšie, ako v prípade cisplatiny. Z toho sa dá usudzovať, že kľúčovým krokom v ich mechanizme môže byť buď priama reakcia s nukleobázami v DNA alebo ich aktivácia silnejším nukleofilom [3,116].



Obr. č. 14: Štruktúra klinicky používaných derivátov cisplatiny. a) karboplatina, b) oxaliplatina, c) nedaplatina, d) heptaplatina, e) lobaplatina (Prevzaté z [3])

Karboplatina (Obr. č. 14a) je kvôli stabilnejšej odchádzajúcej skupine (cyklobutandikarboxylát) menej toxická v porovnaní s cisplatinou, čo umožňuje podávanie

vyšších dávok. Je aktivovaná nukleofilmi a kyslejším pH v nádorových bunkách na rozdiel od cisplatinu, ktorá k aktivácii potrebuje hydrolyzu. Tvorí podobné spektrum aduktov s mierne odlišnou sekvenčnou preferenciou [117–119]. Používa sa predovšetkým k liečbe rakoviny vaječníkov, ale našla uplatnenie aj pri liečbe retinoblastómov, neuroblastómov, nefroblastómov a mozgových nádorov, ako aj nádorov hlavy a krku, endometria, krčku maternice, semenníkov, prsníkov, pľúc a močového mechúra. V niektorých prípadoch nahradila cisplatinu [13].

U oxaliplatinu (Obr. č. 14b) došlo kvôli zvýšeniu protinádorovej aktivity a rozpustnosti k výmene všetkých ligandov. Hydrolyza oxaliplatinu prebieha oveľa pomalšie ako u cisplatinu. Spektrá aduktov u oboch komplexov sú takmer rovnaké, avšak oxaliplatina tvorí adukty v menšej miere [120]. Rozdiel v protinádorovej aktivite a iných biologických účinkoch oxaliplatinu oproti cisplatinu je často vysvetľovaný schopnosťou oxaliplatinu tvoriť DNA adukty s odlišnou konformáciou. Medzireťazcové mostíky oxaliplatinu vo väčšej miere ohýbajú, rozvíjajú a termálne destabilizujú DNA. Afinity HMG proteínov k medzireťazcovým mostíkom je nižšia ako u cisplatinu [121]. Jej adukty sú odstraňované pomocou opravných systémov bunky podobne ako u cisplatinu [122,123]. Oxaliplatina však efektívnejšie inhibuje elongáciu reťazca DNA. Napriek nižšej reaktivite s DNA vykazuje vyššiu cytotoxicitu v niektorých nádorových líniiach a je potrebné menšie množstvo DNA lézií na inhibíciu rastu bunky [124]. Mechanizmus protinádorového pôsobenia oxaliplatinu zahŕňa jednak vyvolanie apoptózy spôsobené poškodením DNA, ale tiež smrť buniek vyvolanú spustením imunologických reakcií a inhibíciou ribozomálnej biogenézy [2,125]. Oxaliplatina je účinná aj v nádorových líniiach rezistentných k cisplatinu. Najčastejšie sa používa v kombinácii s 5-fluorouracilom a leucovorinom na liečbu metastázujúcej rakoviny hrubého čreva [15].

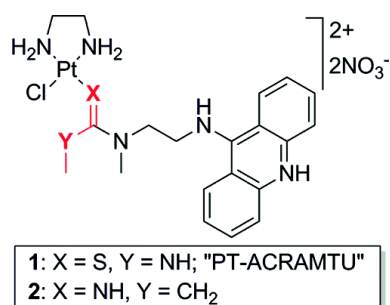
Nedaplatina, heptaplatina a lobaplatina sú štruktúrne podobné oxaliplatinu a karboplatine, preto sa predpokladá podobná tvorba aduktov. Viazu sa na guaníny, ale vyžadujú dlhší čas reakcie ako v prípade väzby cisplatinu [3]. Nedaplatina (Obr. č. 14c) vytvára väčšie množstvo medzireťazcových mostíkov a výrazne zvyšuje aktivitu inhibítora topoizomerázy I – irinotecanu [126]. Heptaplatina (Obr. č. 14d) sa viaže na dvojzávitnicu DNA a efektívne ju kondenzuje [127]. Lobaplatina (Obr. č. 14e) formuje na DNA adukty ovplyvňujúce expresiu *c-myc* génu, ktorý hrá rolu v onkogenéze, apoptóze a bunkovej proliferácii [128]. Nedaplatina je registrovaná v Japonsku na liečbu rakoviny semenníkov, vaječníkov a krku. V porovnaní s cisplatinou vykazuje nižšiu neurotoxicitu a nefrotoxicitu, ale môže znížiť tvorbu trombocytov v krvi [129,130]. Heptaplatina je využívaná v Južnej Kórei na liečbu rakoviny tráviaceho traktu, má nižšiu toxicitu než cisplatinu, jej nevýhodou

je však embryotoxická. V Číne je schválená lobaplatina na liečbu rakoviny prsníkov, leukémie a pľúc. Jej hlavnou výhodou je účinnosť aj na nádoroch rezistentných k cisplatine a karboplatine [130].

### 1.3.2 Monofunkčné komplexy platiny

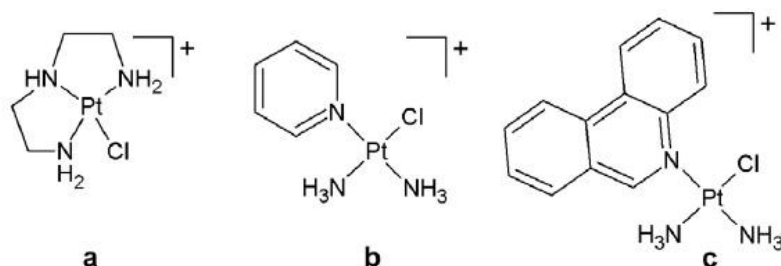
Monofunkčné komplexy platiny, obsahujúce iba jeden odstupujúci ligand, boli dlhú dobu považované za neaktívne, pretože rodičovská dienplatina  $[Pt(dien)Cl]Cl$  (dien=diethylentriamín) nie je cytotoxická (Obr. č. 16a). Jej adukty síce distortujú DNA, ale v oveľa menšej miere ako adukty bifunkčných platinových komplexov. Tým pádom nedochádza k významnej bunecnej odpovedi na poškodenie DNA. Neskôr sa však ukázalo, že použitím objemnejšieho ligandu došlo k zvýšeniu cytotoxicity monofunkčných zlúčenín [3].

Veľmi úspešné bolo predstavenie komplexov s interkalátorovým ligandom. U nich sa predpokladalo, že platinová jednotka je kovalentne naviazaná na DNA a interkalátor taktiež interaguje s DNA za vzniku stabilného aduktu štruktúrne odlišného od aduktov cisplatiny [131,132]. Príkladom takýchto komplexov sú Pt-ACRAMTU (ACR) a jeho amidínový derivát (AMD) (Obr. č. 15). AMD derivát bol vyvinutý s cieľom zlepšiť cytotoxicitu ACR nahradením thiomocoviny za amidínovú skupinu. Táto jednoduchá modifikácia viedla k zvýšenej tvorbe DNA aduktov, k závažnejšiemu narušeniu B-DNA a tým pádom aj k jeho zvýšenej cytotoxicite oproti ACR komplexu [131,133,134]. Vo všeobecnosti oba tieto komplexy rýchlo interkalujú medzi páry bází DNA, za čím nasleduje platinácia purínových nukleobází. Týmto mechanizmom dochádza k zmene klasických väzbových miest platinových komplexov [135]. Obidva komplexy spôsobujú oveľa menšie distorzie na DNA ako klasický 1,2-(GpG) adukt cisplatiny. Nie sú rozpoznávané HMG proteínmi, čo indikuje odlišnosti v bunecnej odpovedi na poškodenie DNA oproti cisplatine [136]. Protinádorová aktivita oboch komplexov je spôsobená vyššou akumuláciou v bunkách, rýchlejšou tvorbou aduktov a ich menej efektívnou opravou v porovnaní s cisplatinou [135,136]. Je pozoruhodné, že hoci tieto komplexy nevytvárajú bifunkčné adukty na rozdiel od konvenčných platinových cytostatík, ich adukty na DNA účinnejšie zastavujú DNA a RNA polymerázy. Dochádza tak k inhibícii syntézy DNA a zastaveniu bunkového cyklu v S fáze, pričom cisplatina ho spravidla zastavuje až v G2/M fáze [131,137].



Obr. č. 15: Štruktúra komplexov  $[\text{PtCl}(\text{en})(\text{L})](\text{NO}_3)_2$  (en = ethylén-1,2-diamín, L = 1-[2-(akridín-9-ylamino)ethyl]-1,3-dimethylthiourea (1) - **ACR** a en = ethylén-1,2-diamín, L = N-[2-(akridín-9-ylamino)ethyl]-N-methylpropionamidín(2) - **AMD**) (Prevzaté z [136])

Ďalšou významnou skupinou látok tvoriacich monofunkčné adukty na DNA sú komplexy so všeobecným vzorcom  $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{AmCl}]^+$ , kde AM je planárna aromatická báza ako pyridín, purín, pyrimidín či anilín. Monofunkčné adukty týchto komplexov na DNA sú schopné blokovať replikáciu DNA s takmer rovnakou účinnosťou ako cisplatina, ale nie sú rozpoznávané systémom NER [138,139]. Najvýznamnejším z nich je pyriplatina (Obr. č. 16b), ktorá má značnú afinitu k transportérom organických katiónov OCT1 a OCT2 prispievajúcim k aktívnemu transportu oxaliplatiny [140]. Komplex vytvára monofunkčné adukty indukujúce len malé distorzie na dožzavitnici DNA [141]. Adukty nie sú opravované MMR a NER je oveľa menej efektívny než u cisplatinových aduktov [27]. Pyriplatina však vykazuje nižšiu cytotoxicitu než cisplatina. Vzhľadom k tomu, že štúdie ukázali významnú inhibíciu RNA polymerázy II N-heterocyklickým ligandom, bol pyridín u pyriplatiny nahradený väčšími ligandami ako napríklad fenantridínom (Obr. č. 16c), čo zvýšilo jeho toxicitu [131,141]. Biologický efekt fenantriplatiny zahŕňa kombináciu rôznych mechanizmov účinku. Blokuje nielen RNA polymerázy, ale aj DNA polymerázy a inhibuje tak transkripciu a replikáciu DNA. Taktiež výrazne blokuje aktivitu topoizomerázy II [3].



Obr. č. 16: Štruktúra komplexov  $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{AmCl}]^+$ : a) dienplatina, b) pyriplatina a c) fenantriplatina (Prevzaté z [3])

### 1.3.3 Polynukleárne komplexy platiny

Polynukleárne komplexy platiny sú ďalšou veľmi významnou skupinou protinádorových zlúčenín. V týchto zlúčeninách sú dve alebo viacero platinových reakčných centier spojených linkrom rôznej dĺžky a typu. Ich vývoj bol založený na predpoklade, že

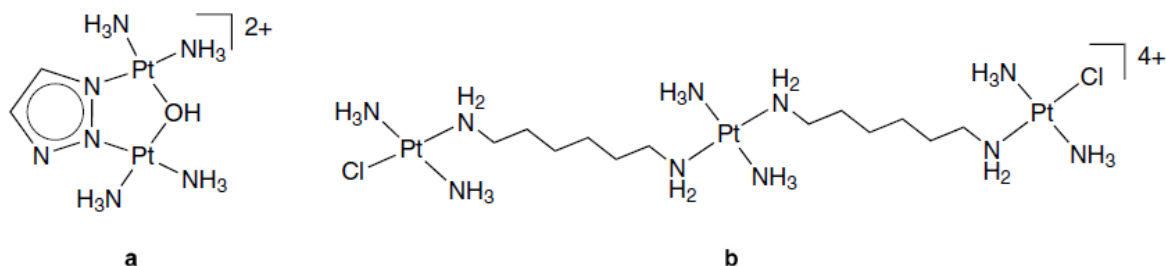
väzbou a poškodením DNA a tým pádom aj samotnou bunecnou odpoveďou sa budú odlišovať od účinku cisplatiny. Väčšina polynukleárných komplexov sa viaže na DNA rýchlejšie než cisplatina. Preferenčne sa takisto viažu na N7 guanínu, ale vytvárajú odlišné spektrum aduktov [131].

Jednou z významných skupín sú dinukleárne komplexy s azolátovým spojovacím mostíkom (Obr. č. 17a). Tieto dinukleárne komplexy majú oveľa vyššiu cytotoxicitu než cisplatina. Vytvárajú, podobne ako cisplatina, hlavne vnútroreťazcové adukty, avšak navyše bola pozorovaná aj elektrostatická interakcia s DNA [142]. Adukty týchto komplexov čiastočne rozvíjajú dvojzávitnicu, ale v porovnaní s cisplatinou je pozorovaný len malý rozsah ohybu DNA. Vďaka relatívne malým konformačným zmenám vyvolaným na DNA nie sú rozpoznávané HMG proteínmi a proteínmi NER [142,143]. Majú odlišné spektrum protinádorovej aktivity ako klinicky schválené platinové zlúčeniny a taktiež sú schopné prekonať rezistenciu k cisplatinu na viacerých bunkových líniách [144,145].

Ďalšou skupinou polynukleárných platinových komplexov sú *trans*-platinové jednotky spojené alifatickými amínmi. Najvýznamnejším z tejto skupiny je trinukleárny komplex  $[\{trans\text{-PtCl}(\text{NH}_3)_2\}_2(\mu\text{-trans}\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2\{\text{NH}_2(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2\}_2)]^{4+}$  (BBR3464) (Obr. č. 17b), ktorý v porovnaní s cisplatinou vykazuje vyššiu akumuláciu v nádorových bunkách a taktiež vyššiu mieru platinácie DNA aj u buniek rezistentných k cisplatinu [146]. Do bunky sa dostáva aktívnym transportom a uľahčenou difúziou [147]. Viaže sa na guaníny a vytvára delokalizované vnútro- a medzireťazcové adukty dlhého dosahu, ktoré nie sú rozpoznávané HMG proteínmi. Medzireťazcové mostíky sú veľmi ťažko opraviteľné a pokladajú sa za hlavnú príčinu protinádorového účinku komplexu BBR3464 [148–150]. K vyššej miere platinácie DNA prispieva aj elektrostatická väzba centrálnej platinovej jednotky, ktorá je spôsobená vysokým nábojom (4+) tohto komplexu [151]. Všetky tieto vlastnosti sa odrážajú v cytotoxicite tohto komplexu, ktorá je u viacerých bunkových nádorových línií až 100-krát vyššia než u cisplatiny, dokonca aj u niektorých bunkových línií rezistentných k cisplatinu [152]. BBR3464 sa dostal do druhej fáze klinických testov. Avšak u pacientov sa prejavili viaceré gastrointestinálne a hematologické škodlivé vedľajšie účinky, ktoré sú následkom silného vychytávania platinového komplexu proteínmi obsahujúcimi síru. Dochádzalo k rozpadu komplexu na tri platinové jednotky s vysokou celkovou toxicitou. Z tohto dôvodu bolo ďalšie klinické testovanie tohto komplexu zastavené [131,153].

Okrem týchto látok bolo vyvinuté množstvo ďalších potenciálnych protinádorových polynukleárných zlúčenín. Niektoré z nich sú v spojitosti s fotoaktiváciou analyzované aj v tejto dizertačnej práci.

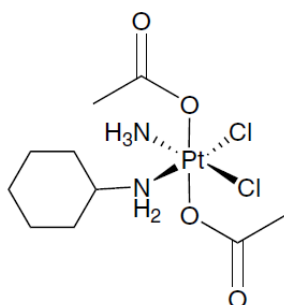




Obr. č. 17: Príklad štruktúry dinukleárneho platinového komplexu s azolátovým spojovacím linkrom (a) a štruktúra trinukleárneho komplexu BBR3464 (b) (Prevzaté z [131])

### 1.3.4 Komplexy platiny ako proliečivá

Pri hľadaní nových potenciálnych liečiv je dôležitým faktorom ich selektívna cytotoxicita k nádorovým bunkám. Významnou skupinou týchto látok sú proliečivá, ktoré sú netoxické a neaktívne a ich cytostatický účinok vzniká po ich konverzii až v tele pacienta. Zo zlúčenín platiny pôsobia ako proliečivá  $Pt^{IV}$  komplexy. Na rozdiel od planárnych  $Pt^{II}$  majú oktaedrálnu štruktúru, ktorá je viac kineticky inertná a preto podliehajú substitučným reakciám pomalšie. Dochádza k zníženej interakcii komplexu s proteínmi krvnej plazmy a tým pádom sú stabilnejšie v krvi pacienta [154,155]. Zástupcom tejto skupiny látok je satraplatina (Obr. č. 18), ktorá bola ako prvá vyvinutá pre orálne podanie a momentálne je vo fáze III klinických testov v kombinácii s inými liečivami [110]. Redukciou  $Pt^{IV}$  na  $Pt^{II}$  v redukčnom prostredí nádorových buniek dochádza k strate dvoch odstupujúcich ligandov a aktivácii inertného komplexu na toxický. Po konverzii reaguje aktivovaný  $Pt^{II}$  podobným mechanizmom ako klasické deriváty cisplatiny. Vzhľadom k tomu, že pri aktivačnom kroku sú odstránené axiálne ligandy, je možné ich farmakologicky využiť napríklad na zvýšenie selektívnej bunecnej akumulácie či aktivity [131,154,156]. Existuje niekoľko spôsobov redukcie platíčitých komplexov – reakcia s GSH, kyselinou askorbovou alebo fotochemická aktivácia a podobne [156,157].



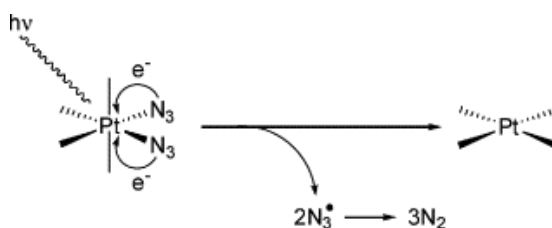
Obr. č. 18: Štruktúra satraplatiny (Prevzaté z [3])

## Fotoaktivovateľná chemoterapia

Objav fotodynamickej reakcie bol kľúčovým pre vývoj modernej terapeutickkej metódy – fotodynamickej terapie [158]. Fotodynamická terapia je založená na aplikácii svetlocitlivej látky – fotosenzitizéru (injekčne, v podobe masti alebo intravenózne), jej selektívnom hromadení v nádorových bunkách a následnej expozícii cieľového miesta svetlu určitej vlnovej dĺžky, čím dochádza k aktivácii fotosenzitizéru [115]. Fotosenzitizéry po ožiarení absorbujú svetelnú energiu a v organizme fungujú ako katalyzátory. Energia svetlom excitovaného fotosenzitizéru je transferovaná na molekuly kyslíka, pričom vznikajú ROS, ktoré rýchlou interakciou s bunecnými komponentami odštartujú kaskádu biochemických procesov vedúcich až k bunkovej smrti [159].

Veľkou nevýhodou fotodynamickej terapie je potreba prítomnosti kyslíka, ktorý je v nádorových bunkách len v obmedzenom množstve. Preto je nevyhnutný vývoj nových fotosenzitizérov fungujúcich aj v hypoxickom prostredí nádorových buniek. Fotochemoterapia s použitím vhodných komplexov platiny má potenciál prekonať niektoré limity fotodynamickej terapie a tiež konvenčnej chemoterapie cisplatinou, ako sú napríklad farmakokinetika, vedľajšie účinky, obmedzené spektrum protinádorovej aktivity či rezistencia [157]. Fotoaktivácia sa dá použiť aj k zvýšeniu cytotoxicity známych liečiv ako je karboplatina či neaktívna transplatina [160]. Dôležité vlastnosti ideálneho fotoaktivovateľného komplexu sú – stabilita za fyziologických podmienok, nulová toxicita a reaktivita v tme, preferenčná akumulácia v nádorových bunkách a vysoká vlnová dĺžka aktivačného svetla (600 – 1000 nm), od ktorej závisí hĺbka jeho prieniku do nádorového tkaniva [155,159].

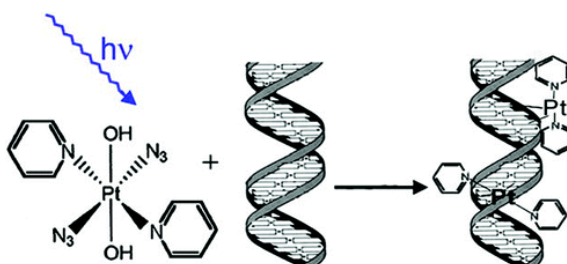
Významnou skupinou potenciálnych fotoaktivovateľných komplexov platiny sú diazidoplatičité komplexy. Po ožiarení svetlom vhodnej vlnovej dĺžky sú redukované na aktívne platnaté formy a cytotoxicky pôsobia na rakovinové bunky [161]. Pri ich konverzii do aktívneho stavu nie je potrebný kyslík, čo je výhodou oproti bežne používaným fotosenzitizérom vo fotodynamickej terapii [157]. Fotodekompozícia (Obr. č. 19) pozostáva z dvoch nevratných jednoelektrónových prenosov z azidových ligandov za vzniku molekulárneho dusíku  $N_2$  a  $Pt^{II}$  jednotiek, ktoré následne poškodzujú DNA [162].



Obr. č. 19: Pravdepodobný mechanizmus fotoredukcie diazidoplatičitých komplexov (Prevzaté z [162])

Nevýhodou prvých diazidoplatických komplexov cytotoxických v nádorových líniách bola ich fotoaktivácia po ožiarení UVA svetlom, čo nie je optimálne pri klinických aplikáciách [157]. Preto je dôležitý vývoj komplexov s podobným mechanizmom aktivovateľným svetlom s vyššou vlnovou dĺžkou.

Medzi nich patrí aj *trans, trans, trans*- [Pt(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>(pyridín)<sub>2</sub>] (**FM-190**) (Obr. č. 20), ktorý je vysoko účinný dokonca aj v bunkových líniách rezistentných na cisplatinu, dobre rozpustný vo vode a za fyziologických podmienok stabilný. Je aktivovaný UVA a viditeľným svetlom [163,164]. Po fotoaktivácii sa komplex akumuluje v bunkách, penetruje do jadra a viaže sa na DNA vo väčšej miere než cisplatinu (Obr. č. 20). Povaha DNA aduktov, vrátane konformačných zmien indukovaných fotoaktiváciou **FM-190**, sa výrazne líši od aduktov na DNA produkovaných konvenčnou cisplatinou alebo transplatinou. Aduky **FM-190** na DNA vyvolávajú odlišnú bunecnú odpoveď než cisplatinu. Fotoaktivovaný **FM-190** výrazne účinnejšie inhibuje RNA syntézu v porovnaní s cisplatinou, pričom inhibícia transkripcie DNA sa považuje za jeden z hlavných dôvodov smrti buniek [16,164]. K cytotoxicite tohto komplexu prispievajú aj ďalšie produkty fotodekompozície. Môže ísť napríklad o uvoľňovanie azidu a reakcie azidových radikálov alebo nitrénov s biomolekulami [164].



Obr. č. 20: Štruktúra fotoaktivovateľného komplexu *trans, trans, trans*- [Pt(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>(pyridín)<sub>2</sub>] (**FM-190**) a názorná ukážka jeho väzby na DNA po aktivácii modrým svetlom. (Prevzaté z [164])

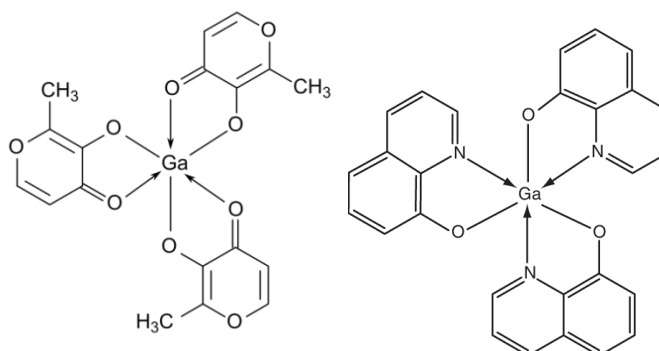
### 1.3.5 Komplexy gália

Od klinického schválenia používania cisplatiny sú cytostatiká na báze koordinačných zlúčenín s centrálnym atómom kovu významnou súčasťou protinádorového výskumu. Okrem platinových zlúčenín bola skúmaná aj antiproliferatívna a protinádorová aktivita iných kovových komplexov. Zlúčeniny trojmocného gália sa v protinádorovej terapii javia ako vysoko perspektívne so širokou škálou aktivít. Chemické vlastnosti Ga<sup>3+</sup> sú veľmi podobné Fe<sup>3+</sup>, čo sa týka elektrického náboja, iónového polomeru, koordinačného čísla a elektrónovej konfigurácie [165]. Znamená to, že gálium môže v niektorých bunecných procesoch zastúpiť železo. Gálium zastupuje železo pri väzbe na transferín, čo je proteín prenášajúci železo do buniek. Transferín s Ga<sup>3+</sup> sa viaže na špecifické transferínové receptory v plazmatickej

membráne buniek a prenáša tak  $\text{Ga}^{3+}$  dovnútra buniek. Zaujímavé je, že nádorové bunky obsahujú na svojom povrchu viac transferínových receptorov ako normálne bunky a týmto spôsobom dochádza k selektívnej akumulácii  $\text{Ga}^{3+}$  v nádorových bunkách [166–168].

V bunkách sa  $\text{Ga}^{3+}$  viaže na DNA elektrostaticky, modifikuje trojrozmernú štruktúru DNA a indukuje kondenzáciu chromatinu. Jeho hlavným špecifickým cieľom je ribonukleotid reductáza, ktorá využíva  $\text{Fe}^{3+}$  ako kofaktor. Nahradením železa gáliom dochádza k inhibícii tohto enzýmu a tak k celkovej inhibícii replikačnej syntézy DNA [165,169]. Gárium taktiež moduluje syntézu proteínov, destabilizuje mikrotubuly a inhibuje aktivitu množstva enzýmov, ako sú ATPázy, DNA polymerázy, spomínaná ribonukleotid reductáza a tyrozín-špecifická proteínová fosfatáza [165,170,171].  $\text{Ga}^{3+}$  tiež mení permeabilitu plazmatickej membrány a mitochondriálne funkcie, čo je prvým krokom k apoptóze [165].

Niektoré zo zlúčenín gália –  $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$  (účinný v kombinácii s inými zlúčeninami pri liečbe uroteliálneho karcinómu), maltolát galitý (účinný v liečbe hepatocelulárnych nádorov) a KP46 sa dostali aj do fázy klinického testovania (Obr. č. 21) [172]. Najvýznamnejším z nich je práve komplex KP46 (tris-(8-chinolinolato) gárium (III)), ktorý je momentálne v druhej fáze klinických testov. Tento komplex vykazuje silnú antiproliferatívnu aktivitu na rôznych bunkových nádorových líniách, ako sú napríklad pľúcne, ovariálne, prsné, kolorektálne karcinómy a melanómy s  $\text{IC}_{50} < 5 \mu\text{M}$  [172]. Taktiež veľmi účinne pôsobí na kostné primárne aj metastatické nádory [173]. Hlavným cieľom pri syntéze tohto komplexu bola nová liečebná stratégia založená na kombinácii s cisplatinou. Bol preukázaný synergický efekt KP46 s cisplatinou, karboplatinou a oxaliplatinou na nádorových bunkách hrubého čreva a ovariálnych nádorových bunkách, ktoré sú menej citlivé k samotnej cisplatine [165,174,175].



Obr. č. 21: Štruktúra klinicky testovaných komplexov gália: a) maltolát galitý, b) KP46 (Prevzaté z [176])

## 2 Ciele práce

Cieľom teoretického úvodu bolo zhrnúť poznatky a vývoj dosiahnutý v oblasti protinádorových zlúčenín s centrálnym atómom kovu. Vzhľadom k tomu, že podstatná časť experimentálnej práce sa venuje popisu interakcií platinových zlúčenín s DNA, bolo jedným z cieľov teoretickej časti popísať zmeny na DNA a ich následné bunecné spracovanie vyvolané väzbou cisplatiny ako prvého a najpoužívanejšieho cytostatika na báze kovov. Ďalším cieľom bolo popísať vývoj a pôsobenie nových protinádorových zlúčenín na báze kovu, ktoré majú odlišné štruktúrne vlastnosti ako materská cisplatina.

Experimentálna časť práce sa skladá zo štyroch čiastkových cieľov, ktoré sa týkajú popisu vlastností nových potenciálnych protinádorových zlúčenín pomocou dostupných molekulárne-biologických, biofyzikálnych, biochemických a fyzikálne-chemických metód.

Prvým bolo štúdium interakcií nových fotoaktivovateľných dinukleárných platičitých komplexov s DNA a porovnaním ich účinku s príbuzným mononukleárnym **FM190** (poskytnuté skupinou prof. Sadlera). Druhým cieľom bolo popísať rozdiely v mechanizme účinku dvoch enantiomérnych komplexov **R-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>]** a **S-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>]** (poskytnuté skupinou prof. Bednarskiho), ktorý je zjavne odlišný od cisplatiny. Tretím cieľom tejto práce bolo študovať translázovú syntézu DNA cez špecifický monofunkčný adukt platinového komplexu **AMD** (poskytnutý skupinou prof. Bierbacha).

Okrem popisu platinových derivátov a ich pôsobenia na molekulárnej úrovni bolo ďalším z cieľov dizertačnej práce štúdium komplexu gália (poskytnutý skupinou prof. Potočňáka) na bunecnej úrovni stanovením jeho antiproliferatívnej aktivity a selektivity na viacerých bunkových nádorových líniách.

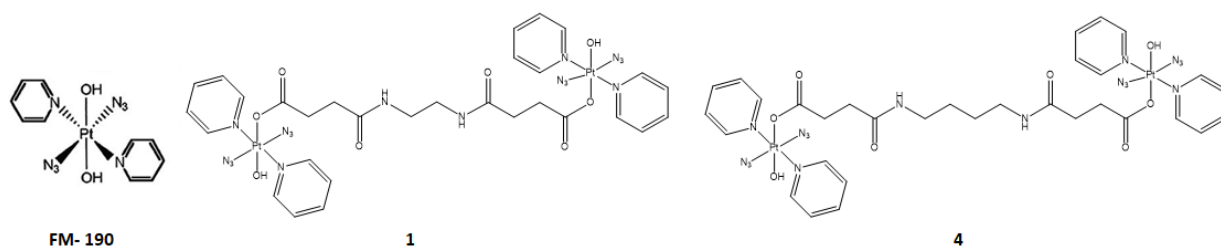
### 3 Materiál a metódy

#### 3.1 Komplexy platiny

Zásobné roztoky komplexov boli pripravované v deionizovanej vode a koncentrácia platiny v roztoku bola overená atómovou absorpčnou spektrometriou.

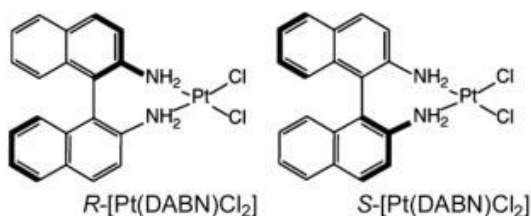
Cisplatina [*cis*-Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] a transplatina [*trans*-Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] boli zakúpené od firmy Sigma-Aldrich, Česká Republika.

Fotoaktivovateľné komplexy platiny *trans,trans,trans*-[Pt(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>(py)<sub>2</sub>] (**FM-190**), *trans,trans*-[Pt(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(pyridín)<sub>2</sub>(OH)(OC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)NH)<sub>2</sub>R], kde [R= -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-(**1**), alebo -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- (**4**)] (Obr. č. 22) boli syntetizované, charakterizované a poskytnuté prof. P. J. Sadlerom z University of Warwick, Veľká Británia (publikácia č. 1).



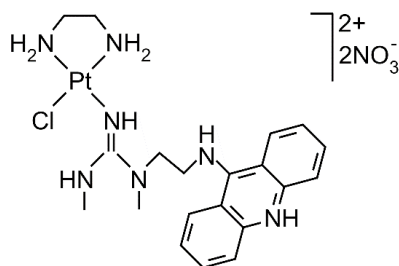
Obr. č. 22: Štruktúra testovaných komplexov *trans,trans,trans*-[Pt(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>(pyridín)<sub>2</sub>] (**FM-190**), *trans,trans*-[Pt(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(pyridín)<sub>2</sub>(OH)(OC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)NH)<sub>2</sub>R] [R= -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-(**1**); R= -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- (**4**)] (Prevzaté z [164,177])

Platinové komplexy *R*-[Pt(**DABN**)Cl<sub>2</sub>] a *S*-[Pt(**DABN**)Cl<sub>2</sub>], kde **DABN** = 1,1'-binaftyl-2,2-diamín (Obr. č. 23) poskytol prof. P. Bednarski z University of Greifswald, Nemecko, (publikácia č. 2).



Obr. č. 23: Štruktúra testovaných komplexov *R*-[Pt(**DABN**)Cl<sub>2</sub>] a *S*-[Pt(**DABN**)Cl<sub>2</sub>] (Prevzaté z [178])

Komplexy platiny [PtCl(en)(L)](NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (en = ethylén-1,2-diamín, L = 1-[2-(akridín-9-ylamino)ethyl]-1,3-dimethylthiourea) **ACR** a en = ethylén-1,2-diamín, L = *N*-[2-(akridín-9-ylamino)ethyl]-*N*-methylpropionamidín **AMD**) (Obr. č. 24) boli poskytnuté prof. U. Bierbachom, Wake Forest University, USA (publikácia č. 4).

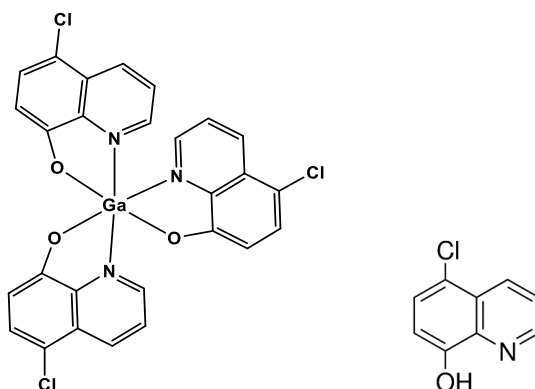


Obr. č. 24: Štruktúra testovaného komplexu **AMD**  $[\text{PtCl}(\text{en})(\text{L})](\text{NO}_3)_2$  en = ethylén-1,2-diamín, L = *N*-[2-(akridín-9-ylamino)ethyl]-*N*-methylpropionamidín (Prevzaté z [179])

### 3.2 Komplex gália

Zásobné roztoky komplexu gália a ligandu (5-chloro-8-chinolinol) boli čerstvo pripravované v DMSO a následne riedené v bunčnom médiu, takže finálna koncentrácia DMSO v bunkách neprekročila 1 %. Koncentrácia komplexu gália bola overená pomocou ICP-MS.

Komplex gália  $\text{Ga}(\text{ClQ})_3$  (ClQ = 5-chloro-8-chinolinol) a ligand H-ClQ (Obr. č. 25) boli syntetizované a poskytnuté prof. I. Potočňákom z Univerzity P.J. Šafárika, Košice. (publikácia č. 3)



Obr. č. 25: Štruktúra testovaného komplexu **Ga(ClQ)<sub>3</sub>** (ClQ = 5-chloro-8-chinolinol) a ligandu **H-ClQ** (Prevzaté z [180])

### 3.3 Chemikálie a biologický materiál

- CT-DNA, Sephadex G-50 coarse, DMSO, glutatión (GHS), neesenciálne aminokyseliny – Sigma-Aldrich, Česká Republika
- pSP73 (2464 pb), pSP73KB (2455 pb), pUC19 (2686 pb) boli izolované podľa štandardných procedúr.
- pBR322 (4361 pb), *HindIII*, *NdeI*, *HpaI*, Klenow fragment ( $KF^{exo-}$ ), DNázaI, T4polynukleotid kináza, *EcoRI* a príslušné pufre, deoxyribonukleotid trifosfáty (dNTPs), proteináza K – New England Biolabs, Beverly, MA, USA
- Rádioaktívny materiál – M.G.P. Zlín, Česká Republika
- Riboprobe® System – SP6/T7 na transkripčné mapovanie obsahujúci T7 and SP6 RNA polymerázy, Wizard SV Gel and PCR Clean-Up systém – Promega, Mannheim, Nemecko
- Ethidium bromid (EtBr), akrylamid, bisakrylamid, močovina a agaróza – Merck, Darmstadt, Nemecko
- Syntetické oligodeoxyribonukleotidy a Cy5-značené DNA primery – Eurofins Genomics, Ebersberg, Nemecko
- Ľudské DNA polymerázy eta (XPV protein), DNA polymeráza kappa (DINB 1) a DNA polymeráza iota (RAD30B Protein) – EnzyMax, LLC Lexington, KY
- CFE – „cell-free“ extrakt pripravený z „repair-proficient“ HeLa buniek postupom popísaným v publikácii [122]
- Expresia a purifikácia proteínu HMGB1 prevedená postupom popísaným v publikácii [181]
- Bunkové línie A2780 (ľudský ovariálny karcinóm) a HTC-116 (ľudský kolorektálny karcinóm) poskytnuté prof. B. Kepplerom (University of Vienna, Rakúsko). Línie MDA-MB-231 (trojito-negatívny ľudský karcinóm prsníku) a MRC5pd30 (bunky z normálneho pľúcneho tkaniva) boli zakúpené z Európskej zbierky autentizovaných bunkových kultúr ECACC; Salisbury, UK
- RPMI 1640 médium – Biosera, Boussens, Francúzsko
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), FBS (% teplom inaktivované fetálne bovinné sérum) – PAA, Pasching, Rakúsko
- Gentamycín – Serva, Heidelberg, Nemecko



### 3.4 Prístrojové vybavenie

Meranie atómovej absorpčnej spektrometrie (AAS) prebiehalo na prístroji Varian AA240Z vybavenom grafitovým trubicovým atomizérom GTA 120. Všetky spektrofotometrické stanovenia boli prevedené na spektrometri Beckman 7400 DU a fluorimetrické na prístroji Varian Cary Eclipse. Detekcia DNA v géle farbenom EtBr prebiehala fluorescenčne UV svetlom na Transiluminátore Gel Logic 112 a gél bol odfotený na denzitometrické vyhodnotenie programom AIDA image analyzer. HPLC purifikácia oligonukleotidov bola prevedená na Waters 600S Controller HPLC System s MonoQ HR 5/5 kolónou. V prípade rádioaktívne značených vzoriek bol gél vysušený, exponovaný na zobrazovacej fólii BAS-MS 2040 v závislosti na aktivite vzoriek po dobu 4 – 24 hodín a po zobrazení prístrojom Typhoon FLA 7000 denzitometricky vyhodnotený v programe AIDA image analyzer. MST merania boli prevedené na prístroji Monolith NT115 Pico instrument za použitia štandardných sklenených kapilár. Bunky boli počítané prístrojom TC10 Automatic Cell Counter a ich životaschopnosť bola vyhodnocovaná meraním absorbancie na prístroji Synergy MX.

### 3.5 Metódy

#### 3.5.1 Kinetika väzby študovaných komplexov platiny na DNA *in vitro*

CT-DNA bola inkubovaná so študovanými komplexami platiny v 10 mM NaClO<sub>4</sub>, pri 37 °C v tme po dobu 24 h. Hodnota  $r_i$  (definovaná ako počet molekúl komplexu pripadajúcich na jeden nukleotid) bola zvolená v rozmedzí 0,05 – 0,08. V prípade svetlocitlivých komplexov bola DNA hneď po pridaní komplexu ožarovaná viditeľným svetlom ( $\lambda_{\max} = 455$  nm) po dobu 60 – 120 min a potom inkubovaná pri 37 °C v tme do dosiahnutia celkového času 24 h. V rôznych časových intervaloch boli zo vzoriek odoberané alikvóty a filtrované cez kolónky obsahujúce Sephadex G-50 coarse, alebo dialyzované oproti vhodnému médiu kvôli odstráneniu nenaviazaného platinového komplexu. Obsah platiny vo vzorkách –  $r_b$  (definované ako počet molekúl platinového komplexu naviazaných na jeden nukleotid) bol určený pomocou AAS a koncentrácia DNA pomocou UV-VIS spektrofotometrie.

#### 3.5.2 Charakterizácia DNA aduktov pomocou EtBr fluorescencie

Ethidium bromid (EtBr) je fluorescenčné farbivo, ktoré sa interkaluje medzi páry bází DNA a následne dochádza k mnohonásobnému zvýšeniu jeho fluorescencie. Často sa používa na charakterizáciu väzby platinových molekúl na DNA. Bifunkčné adukty

platinových komplexov blokujú väzbu EtBr na DNA, tým pádom sa znižuje jeho fluorescencia. Pokles intenzity fluorescencie EtBr závisí na stupni modifikácie DNA [182].

CT-DNA bola inkubovaná s platinovými komplexami pri rôznych hodnotách  $r_b$  v 10 mM NaClO<sub>4</sub> pri 37 °C v tme po dobu 24 h. V prípade použitia svetlocitlivých komplexov bola DNA po pridaní komplexu ožarovaná viditeľným svetlom ( $\lambda_{max} = 455$  nm) 2 h a následne inkubovaná v tme pri 37 °C ďalších 22 h. Po inkubácii bol ku vzorkám pridaný roztok EtBr. Meranie intenzity fluorescencie EtBr prebiehalo v 0,4 M NaCl pri 25 °C, aby sa predišlo nešpecifickej väzbe EtBr na DNA, pričom výsledná koncentrácia DNA bola 0,01 mg/ml a EtBr 0,04 mg/ml, čo odpovedá plnej saturácii interkalačných miest EtBr v DNA. Fluorescencia bola meraná v 0,5 cm kvete pri vlnovej dĺžke excitácie 546 nm a emitovaná fluorescencia bola analyzovaná pri 590 nm.

### 3.5.3 Rozvíjanie negatívne vinutej plazmidovej DNA

Plazmidová DNA sa môže vyskytovať v troch štruktúrnych formách – superhelikálna (sc), relaxovaná (oc) a lineárna, ktoré majú rôzny tvar a líšia sa rýchlosťou migrácie v géle. Najrýchlejšie migruje sc forma, ktorá je kompaktná a najpomalšie oc forma s kruhovým tvarom molekuly. Plazmidová DNA v lineárnej forme migruje medzi sc a oc formou v závislosti na podmienkach analýzy. Väzba rôznych protinádorových komplexov na uzavretú kruhovú DNA môže spôsobiť lokálne zmeny a čiastočné rozvinutie DNA. Tento proces znižuje superhelikálnu hustotu plazmidovej DNA, čo spôsobuje zníženie rýchlosti jej migrácie v agarózovom géle a umožňuje pozorovať a kvantifikovať priemernú hodnotu rozvíjania DNA na adukt [183].

Sledovaním zmien mobility DNA v agarózovom géle pri rôznych stupňoch modifikácie DNA študovaným komplexom bol určený uhol rozvíjania negatívne vinutej plazmidovej DNA [183]. Superhelikálna plazmidová DNA pSP73KB bola inkubovaná s platinovými komplexami pri rôznych hodnotách  $r_i$  v 10 mM NaClO<sub>4</sub> pri 37 °C v tme po dobu 24 h. V prípade použitia svetlocitlivých komplexov bola DNA po pridaní komplexu ožarovaná viditeľným svetlom ( $\lambda_{max} = 455$  nm) 1 h a následne inkubovaná v tme pri 37 °C. Vzorky boli podrobené natívnej elektroforéze (25 °C, 18 V) na 1 % agarózovom géle v TAE pufri (40 mM Tris-acetát, pH 8,0, 1mM EDTA). Gél bol farbený EtBr. Uhol rozvinutia  $\Phi$ , ktorý pripadá na jeden adukt, bol vypočítaný pomocou vzťahu 3:

$$\Phi = 18\sigma/r_b(c) \quad (3)$$

kde  $\sigma$  je superhelikálna hustota použitej plazmidovej DNA a  $r_b(c)$  je hodnota  $r_b$ , pri ktorej bolo dosiahnuté úplné rozvinutie superhelikálnej DNA [183].

### 3.5.4 Formácia medzireťazcových mostíkov

Niektoré platinové komplexy vytvárajú pevné koordinačne-kovalentné spojenie medzi dvoma reťazcami DNA, ktoré sú veľmi toxické, lebo pri replikácii a transkripcii nemôže dôjsť k separácii reťazcov. Táto metóda je založená na rozdielnej migrácii jednoreťazcovej a dvojreťazcovej DNA v denaturačnej alkalickéj gélovej elektroforéze, kde frakcia s medzireťazcovými mostíkmi kvôli vyššej molekulovej hmotnosti spojených reťazcov migruje v géle pomalšie než nemodifikovaná jednoreťazcová DNA.

Plazmid pUC19 bol linearizovaný restričným enzýmom *EcoRI* a rádioaktívne značený na 3' konci použitím [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP a Klenowho fragmentu DNA polymerázy I (KF<sup>exo</sup>). Po deproteinácii boli vzorky linearizovanej DNA modifikované platinovými komplexami (rovnako ako v prípade rozvíjania DNA) na hodnoty  $r_b$  0,0003 a 0,0006 (v prípade **FM-190**) alebo 0,00015 a 0,0003 (v prípade **1** a **4**). Nasledovala aktivácia komplexov ožarovaním viditeľným svetlom ( $\lambda_{max} = 455$  nm) po dobu 1 h a inkubáciou v tme pri 37 °C 23 h. Modifikované aj nemodifikované vzorky linearizovanej DNA (50  $\mu$ g/ml) boli podrobené denaturačnej alkalickéj elektroforéze v 1 % agarózovom géle (0,03 M NaOH a 0,001 M EDTA). Percentuálne zastúpenie medzireťazcových mostíkov na jeden adukt bolo vypočítané podľa vzťahu 4:

$$\%ICL/Pt = (XL/2*pb*r_b) \quad (4)$$

Kde XL je počet medzireťazcových mostíkov na molekulu linearizovanej DNA vypočítaný podľa Poissonovho rozdelenia ako  $XL = -\ln A$ , pričom A je denzitometricky vyhodnotená frakcia molekúl jednoreťazcovej DNA, „pb“ je počet párov báz plazmidu (pUC 19 má 2686 pb) a  $r_b$  je počet molekúl platinového komplexu naviazaných na jeden nukleotid.

### 3.5.5 Reakcia platinových komplexov s glutatiónom

Vzhľadom k tomu, že platinové zlúčeniny majú silnú preferenciu k väzbe na molekuly obsahujúce síru, sú často týmito molekulami „vychytávané“. Tieto interakcie vedú k inaktivácii a rozpadu platinového liečiva, čo môže byť príčinou rezistencie a nepriaznivých vedľajších účinkov platinových cytostatík. Na *in vitro* štúdium kinetiky interakcií platinových zlúčenín s thiolmi sa používa GSH. Väzba komplexov platiny s GSH bola skúmaná monitorovaním UV absorpcie roztoku pri 260 nm, keďže absorpcia pri tejto vlnovej dĺžke odráža prítomnosť väzby platina-síra, v pravidelných časových intervaloch [184].

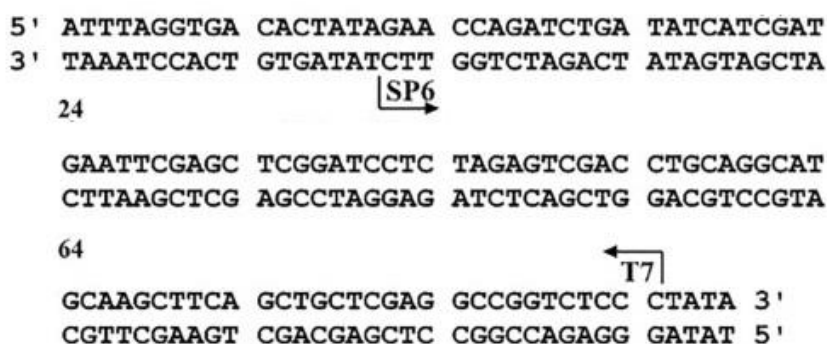
Platinové komplexy boli inkubované s GSH v pomere 1:500, čo reprezentuje fyziologicky relevantné hodnoty [184] pri 37 °C v prostredí 4,6 mM NaCl, 100mM NaClO<sub>4</sub> a 0,1 M Tris-HCl v dusíkovej atmosfére. Na stanovenie rýchlosti reakcie bola krivka

závislosti absorbančie na čase preložená nelineárnou regresiou na rovnicu  $I_d = C + A_1 \exp(-b_1 t) + A_2 \exp(-b_2 t)$ ; ( $A_1$ ,  $A_2$ ,  $b_1, b_2$ , a  $C$  sú konštanty a  $t$  je čas reakcie) použitím softvéru GraphPad Prism.

### 3.5.6 Transkripčné mapovanie platinových aduktov na DNA

Fakt, že syntéza RNA pomocou DNA-dependentných RNA polymeráz je predčasne ukončená bifunkčnými aduktmi zlúčenín platiny [16], umožňuje identifikáciu ich preferovaných väzbových miest. RNA polymeráza pri syntéze RNA na templátovom reťazci modifikovanej DNA produkuje fragmenty definovanej dĺžky, ktoré indikujú miesta, kde bola predčasne ukončená [185].

Štiepením plazmidu pSP73KB restriktívnymi endonukleázami *NdeI* a *HpaI* bol pripravený 212-pb dlhý fragment DNA. Podstatná časť jeho sekvencie je znázornená na Obr. č. 26. Tento fragment obsahuje vyznačené promotory RNA polymeráz T7 a SP6.



Obr. č. 26: Časť sekvencie 212-pb fragmentu DNA, ktorý bol použitý na transkripčné mapovanie s vyznačenými promotorovými sekvenciami polymeráz T7 a SP6.

Transkripcia fragmentu DNA modifikovaného cisplatinou, transplatinou a vybranými platinovými komplexami (24 h, 37 °C v tme alebo podmienkach ožiarenia popísaných vyššie) pomocou DNA dependentných RNA polymeráz T7 a SP6 a následná elektroforetická analýza (8% PAGE/8M močovina sekvenčný gél) transkriptu bola prevedená podľa protokolu odporúčaného výrobcom (Promega Protocols and Applications, 43–46, 1989/90) a detailne popísaná v iných prácach [31,185]. Koncentrácia DNA bola  $1.54 \times 10^{-4}$  M. Hodnoty  $r_b$  sa pohybovali od 0,001 do 0,01. Nenaviazané komplexy boli odstránené ethanolovou precipitáciou.

### 3.5.7 Ethanolová precipitácia DNA

Precipitácia DNA sa využíva v prípade potreby prečistenia DNA. V prvom kroku sú k roztoku DNA dodané katióny, ktoré stabilizujú DNA. V druhom kroku je pridaný alkohol, ktorý DNA vyzráža a v poslednom kroku získame centrifugáciou sediment DNA. Po premytí sedimentu sa DNA rozpustí v požadovanom pufrí.

K vzorkám bol pridaný octan sodný (výsledná koncentrácia 0,3 M) a dvojnásobný objem 100 % EtOH. Po 20 min inkubácii v -70°C boli vzorky centrifugované (15000 g, 15 min, 4°C) a supernatant bol odstránený. Následne bola zrazenina premytá vychladeným 80% EtOH a opätovne zcentrifugovaná. Po odobraní supernatantu bol zvyšok EtOH odstránený v exsikátore a DNA bola rozpustená v požadovanom pufri.

### 3.5.8 DNázový footprinting

DNázový footprinting je metóda, ktorá skúma interakcie proteínov a iných molekúl s DNA na základe faktu, že väzba objemného ligandu na DNA ju chráni pred enzymatickým štiepením deoxyribonukleázou – DNázou I. Táto metóda môže byť využitá na bližšiu špecifikáciu sekvenčných preferencií platinových zlúčenín. V dizertačnej práci bola pomocou tejto metódy analyzovaná sekvenčná preferencia polynukleárných fotoaktivovateľných platinových zlúčenín. Cieľom bolo zistiť, či dĺžka spojovacieho ligandu týchto komplexov ovplyvňuje mapu ich väzbových miest a či dochádza k rozdielom vo ich väzbe so zvyšujúcou sa modifikáciou DNA.

Plazmid pSP73 bol štiepený restriktívnou endonukleázou *HindIII* a rádioaktívne značený pomocou  $\text{KF}^{\text{exo-}}$  a  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ . Následne bol štiepený použitím *NdeI* za vzniku 2 fragmentov o veľkosti 158 a 2306 pb. Menší fragment bol purifikovaný a izolovaný z 1 % agarózového gélu systémom Promega Wizard SV Gel cleanup. Rádioaktívne značená DNA ( $5.4 \times 10^{-6}$  M) a platinové komplexy ( $r_1 = 0.1, 0.2$  a  $0.4$ ) v 10 mM  $\text{NaClO}_4$  boli ožarované 1 h ( $\lambda = 420$  nm) a následne inkubované 23 h v tme pri 37 °C. Reakčná zmes bola lyofilizovaná a rozpustená v 9  $\mu\text{l}$  roztoku obsahujúcom TKCM pufor (10 mM Tris, pH 7,9, 10 mM KCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$  a 5 mM  $\text{CaCl}_2$ ) a 3  $\mu\text{g}$  CT-DNA. Enzymová reakcia bola iniciovaná pridaním 0,25 U DNázy I (1U RQ1 RNase-free DNázy I je definovaná ako množstvo enzýmu vyžadované na kompletnú degradáciu 1  $\mu\text{g}$  lambda DNA za 10 min pri 37 °C v pufri obsahujúcom 40 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM NaCl, 6 mM  $\text{MgCl}_2$  a 10 mM  $\text{CaCl}_2$ ). Reakcia bola zastavená po 30 s roztokom 3 M NaOAc a 0,25 M EDTA. Vzorky boli následne precipitované ethanolom, lyofilizované, rozpustené v nanášacom pufri a analyzované elektroforeticky na denaturačnom géle (8% polyAA gél/8M močovina).

### 3.5.9 Reparačná syntéza DNA

Celkový efekt poškodení v genóme nie je primárne riadený samotnou tvorbou poškodenia, ale efektivitou jeho opravy. Práve schopnosť opravy DNA určuje prežitie alebo smrť nádorových buniek [122]. Väzba HMG proteínov chráni DNA adukty pred rozpoznaním systémom NER a opravou poškodenia. Týmto spôsobom môžu pretrvávať dlhšiu dobu, čo sa prejaví na protinádorovom účinku daného liečiva [149]. V rámci dizertačnej práce bola

s cieľom zistenia mechanizmu opravy a rozpoznávania platinových aduktov prevedená reparačná syntéza DNA v prítomnosti aj neprítomnosti HMG proteínov. Plazmid pSP73KB modifikovaný študovanými komplexami a cisplatinou bol inkubovaný s extraktom z HeLa buniek. Reparačná syntéza DNA bola monitorovaná meraním aktivity inkorporovaného [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP.

Plazmid pSP73 bol náhodne modifikovaný komplexami platiny pri  $r_b=0,03$  a inkubovaný v prítomnosti aj absencii HMGB proteínov. V prípade reakcie s HMG proteínom boli vzorky preinkubované 30 min na ľade so 180 ng HMGB1a v 10  $\mu$ L pufru (10 mM Hepes, pH 7.5, 10 mM  $MgCl_2$ , 50 mM LiCl, 100 mM NaCl, 1 mM spermidín, 0.2 mg  $mL^{-1}$  BSA a 0.05% Nonidet P40). Po preinkubácii bolo ku všetkým vzorkám pridané 300 ng nemodifikovaného pBR322, ATP (2 mM), KCl (30 mM), kreatín-fosfokináza (0.05 mg  $mL^{-1}$ ), 20 mM roztoky dGTP, dATP a dTTP, dCTP (8 mM), 74 kBq [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP, kreatín fosfát (22 mM), glutamát draselný (70 mM), BSA (1,2 mg  $mL^{-1}$ ) a 20 mg CFE (cell free extrakt) z HeLa buniek. Reakčné zmesi boli inkubované 4 h pri 30 °C a ukončené 30 min inkubáciou s EDTA (20 mM), SDS (0,6%) a proteinázou K (250 mg  $mL^{-1}$ ). Po fenol – chloroformovej precipitácii bola DNA linearizovaná pomocou *HindIII* a elektroforeticky analyzovaná na 1 % agarózovom géle. Gély boli farbené EtBr, vysušené a rádioaktivita v jednotlivých frakciách bola kvantifikovaná programom „AIDA Image Analyser“. Reparačná aktivita bola monitorovaná meraním aktivity inkorporovaného [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP. Celková inkorporácia rádioaktívneho prekursoru bola korigovaná na relatívny obsah DNA v každej frakcii.

### 3.5.10 Fenol – chloroformová deproteinácia DNA

Princíp tejto metódy je založený na dobrej rozpustnosti DNA v polárnom vodnom roztoku. Polarita proteínov je však určená jednotlivými aminokyselinami, preto dochádza k rozličnej rozpustnosti v polárnych (voda) a menej polárnych (fenol) rozpúšťadlách v rámci molekuly. Dochádza tak k viditeľnému hromadeniu proteínov na rozhraní medzi organickou fázou a vodným roztokom.

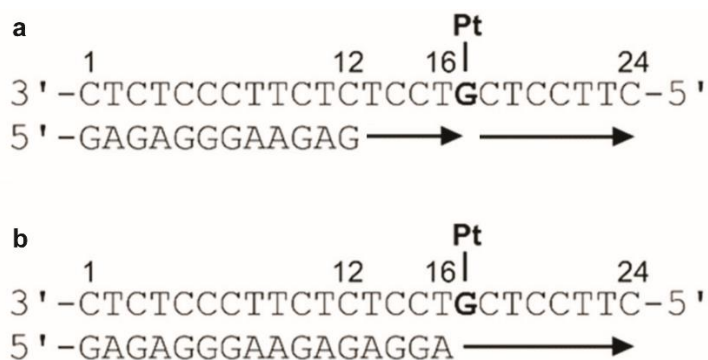
K roztoku DNA bol pridaný rovnaký objem vychladeného fenolu a po dôkladnom pretrepaní boli vzorky centrifugované. Došlo k rozdeleniu vodnej fáze s DNA a organickej fáze. Vodná fáza bola odobraná a na odstránenie zvyšku fenolu k nej bol pridaný rovnaký objem chloroformu. Po opätovnom oddelení fáz centrifugáciou a odobraní vodnej fázy bola DNA izolovaná ethanolovou precipitáciou.

### 3.5.11 Vytvorenie špecifického platinového aduktu na krátkych oligonukleotidoch DNA

Oligonukleotidy 24-mer 5'-CTTCCTCGTCCTCTCTTCCCTCTC-3' a 15-mer 5'-CTTCCTCGTCCTCTC-3 boli inkubované s platinovým komplexom AMD v pomere 1:1 po dobu 24 h v 37 °C. Následne bol platinovaný oligonukleotid purifikovaný iónovo – výmennou HPLC. Pomocou AAS a meraním optickej hustoty bolo potvrdené, že modifikovaný oligonukleotid obsahoval jednu molekulu platiny na jeden reťazec. Maxam – Gilbertovým DMS footprintom bolo potvrdené, že jedna molekula komplexu bola koordinovaná na N7 atóm guanínu v každom reťazci týchto templátov.

### 3.5.12 Experimenty zaoberajúce sa translézovou syntézou

V tejto časti boli prevedené 2 typy experimentov – „running a standing start“. (Obr. č. 27) V rámci týchto experimentov boli vytvorené 2 typy DNA duplexov z platinovanej aj nemodifikovanej DNA – 12-mer/24-mer primer-templát „running start“ a 16-mer/24-mer primer-templát „standing start“. Guanín v templátovom reťazci vo vyššie popísanej sekvencii 3'-TGCT-5', na ktorom je platinový adukt, je lokalizovaný na 17. nukleotide od 3' konca. 3'-koniec primeru je buď 5 báz pred aduktom (12-mer/24-mer) v templátovom reťazci alebo tesne pred ním (16-mer/24-mer). Bola skúmaná schopnosť polymerázy  $KF^{exo-}$  a ľudskej DNA polymerázy  $\eta$  prekonať poškodenie DNA spôsobené aduktom AMD.



Obr. č. 27: Schéma reakcie translézovej syntézy a) „running start“ experiment, b) „standing start“ experiment (Prevzaté a upravené z [179])

5'-<sup>32</sup>P-rádioaktívne značený DNA substrát (zložený z primeru a templátu) bol získaný reakciou 5' rádioaktívne značeného primeru (12-meru 5'-GAGAGGGAAGAG-3' alebo 16-meru 5'-GAGAGGGAAGAGAGGA-3') s neznačeným 24-merným templátom 5'-CTTCCTCGTCCTCTCTTCCCTCTC-3' (modifikovaným aj nemodifikovaným) v pomere 1:3 v 50 mM NaClO<sub>4</sub>. Hybridizácia prebiehala 10 min pri 55 °C a 2 h pri izbovej teplote.

Všetky experimenty s  $KF^{exo-}$  boli prevedené pri 25 °C v 25  $\mu$ l pufru (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 100  $\mu$ g/ml BSA, 40 nM 5'-<sup>32</sup>P-značený

primer – templát, 0,5 U  $KF^{exo-}$  a štyri deoxynukleosid trifosfáty (dNTPs) každý o koncentrácii 100  $\mu$ M).

Všetky experimenty s Pol $\eta$  boli prevedené pri 37 °C v 25  $\mu$ l pufru (40 mM Tris–HCl (pH 8.0), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 250  $\mu$ g/ml BSA, 60 mM KCl, 2.5% glycerol, 40 nM 5'- <sup>32</sup>P-značený primer–templát, Pol $\eta$  (1 ng/ $\mu$ l) a štyri deoxynukleosid trifosfáty (dNTPs) každý o koncentrácii 100  $\mu$ M).

V časových intervaloch (5, 10, 20, 40 a 60 min), boli odobrané alikvóty (5  $\mu$ l) a všetky enzymatické reakcie boli ukončené pridaním 2  $\mu$ l roztoku obsahujúceho 95% formamid, 20 mM EDTA, 0,025% bromfenol and 0,025% xylencyanolovú zeleň. Produkty boli denaturované zahriatím na 90 °C na 3 min a separované elektroforézou na denaturačnom 15 % polyakryamidovom géle.

V prípade skúmania inkorporácie chybných nukleotidov boli reakcie prevedené v rovnakých podmienkach na 16-mer/24-mer DNA substráte s tým rozdielom, že reakcia prebiehala po dobu 60 min, v prítomnosti všetkých štyroch dNTPs alebo v prítomnosti vybraného nukleotidu – komplementárneho dCTP alebo nekomplementárnych dATP, dGTP a dTTP (100  $\mu$ M).

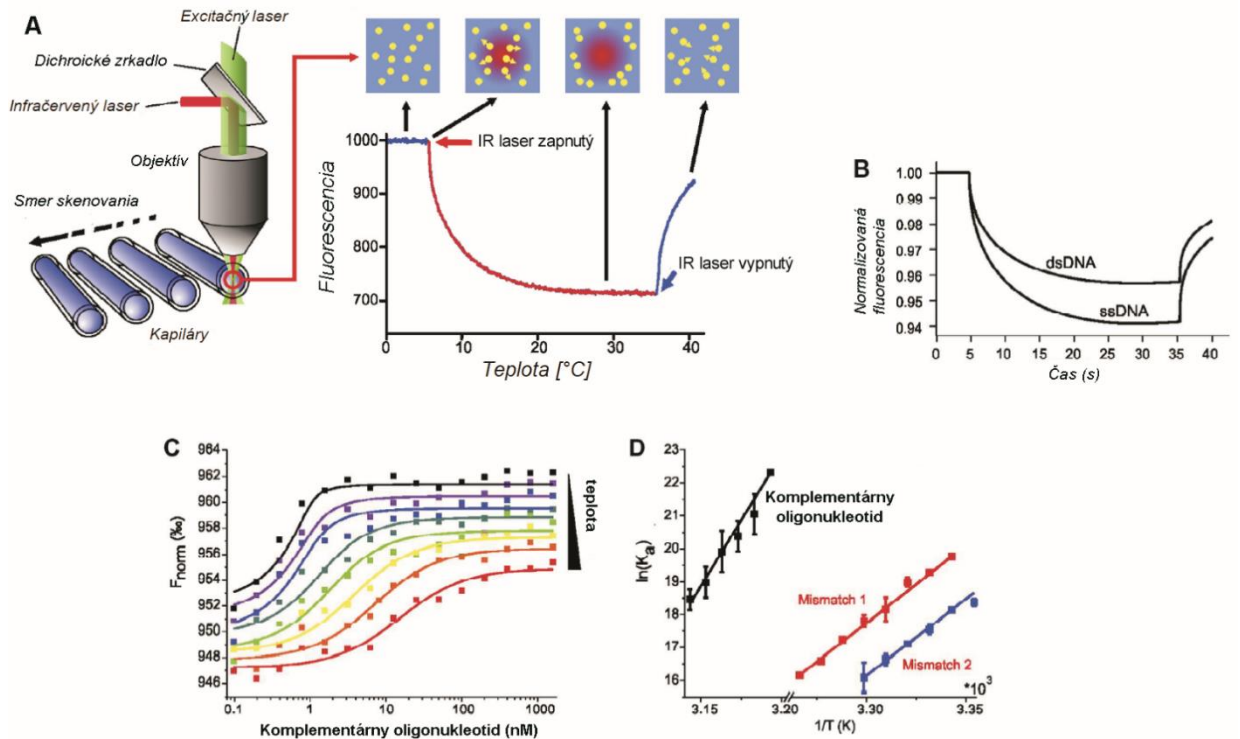
Kinetická analýza inkorporácie dNTPs oproti platinovanej a nemodifikovanej DNA katalyzovaná  $KF^{exo-}$  a Pol $\eta$  prebiehala v rovnakých podmienkach, ako je popísané vyššie. Rovnaké množstvo DNA substrátu a polymeráz bolo inkubované s DNA substrátom (16-mer/24-mer primer-templát) v prítomnosti jednotlivých dNTPs (rastúca koncentrácia 0,125-1000  $\mu$ M každého skúmaného dNTP) po dobu 10 min. Množstvo predĺženého primeru (súčet intenzít všetkých produktov polymerácie 17+) bolo vynesené do grafu ako funkcia koncentrácie produktu. Dáta boli preložené funkciou nelineárnej regresie použitím softvéru GraphPad do rovnice Michaelis-Mentenovej opisujúcej hyperbolu  $v = (V_{max} \times [dNTP] / K_m + [dNTP])$ .

Zdanlivé parametre  $K_m$  a  $V_{max}$  za ustáleného stavu boli získané z najlepšieho preloženia a použité k výpočtu relatívnej efektivity (RF) inkorporácie dNTPS oproti guanínu v templátovom reťazci:  $(V_{max}/K_m)_{platinovaný\ templát} / (V_{max}/K_m)_{neplatinovaný\ templát}$ . Relatívna mutagenita oligonukleotidov s naviazaným komplexom a kontrolnej nemodifikovanej DNA bola vyjadrená ako frekvencia misinkorporácie:  $f = (V_{max}/K_m)_{nesprávny\ nukleotid} / (V_{max} / K_m)_{správny\ nukleotid}$ .



### 3.5.13 Mikroškálová termoforéza – MST

Mikroškálová termoforéza je vhodná na získanie termodynamických parametrov interakcií biomakromolekúl. Táto technika je veľmi citlivá ku zmenám molekulových vlastností, čo umožňuje precíznu kvantifikáciu molekulárnych dejov nezávisle na type a veľkosti pozorovaných makromolekúl. Jej výhodou je práca s nízkymi koncentraciami a objemami, čo je umožnené používaním kapilár namiesto kviet [10]. Princíp metódy je bližšie popísaný na Obr. č. 28.

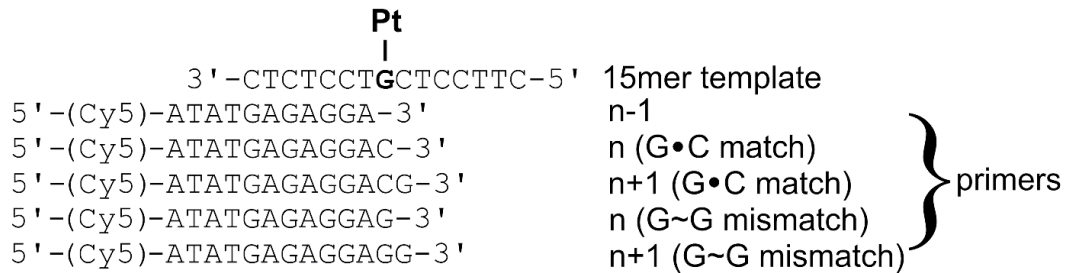


Obr. č. 28: Schéma Mikroškálovej termoforézy. A) Schematická reprezentácia MST optiky a typický signál získaný z termoforetického experimentu. Začiatok – homogénna distribúcia molekúl, konštantná počiatočná fluorescencia. Aktivácia laseru - „T-Jump“, rýchla zmena vlastností fluoroforu v dôsledku rýchlej zmeny teploty. Termoforetický pohyb fluorescenčne značených molekúl – zmena fluorescencie po dobu 30 s. Dektivácia laseru – spätný rozptyl molekúl poháňaný difúziou. B) Ukážka rozdielu v signále jednoreťazcovej a dvojreťazcovej DNA C) Ukážka väzbových kriviek nameraných v rozsahu teplôt. D) Van't Hoffove diagramy hybridizačnej reakcie (Prevzaté a upravené z: [10])

V tejto dizertačnej práci bola technika MST použitá k simulácii translázovej syntézy. Templát s dĺžkou pätnásť nukleotidov (Obr. č. 29 15-mer) obsahoval jeden guanín buď platinovaný AMD komplexom, alebo nemodifikovaný ako kontrola. Templáty boli zhybridizované s dvomi setmi primerov – plne komplementárnymi a nekomplementárnymi. V nekomplementárných primeroch bol na simuláciu chybnéj inkorporácie nukleotidov zaradený G v primeri oproti guanínu v templátovom reťazci (Obr. č. 29). Boli sledované zmeny termodynamických parametrov po inkorporácii jednotlivých nukleotidov pri elongácii reťazca. Bola získaná rovnovážna väzbová konštanta  $K_a$  hybridizácie platinovaného aj nemodifikovaného 15-mer oligonukleotidu a Cy5-značeného komplementárneho primeru

v rozsahu teplôt (22 – 45 °C). Platinácia oligonukleotidu je popísaná vyššie. Hybridizácia DNA môže byť priamo detekovaná pomocou MST kvôli rozdielnemu signálu jednoreťazcovej a dvojreťazcovej DNA vid' Obr. č. 28.

Sériovo riedený platinovaný 15-mer 5'-CTTCCTCGTCCTCTC-3' a nemodifikovaná kontrola ( $5 \times 10^{-6}$  M –  $3 \times 10^{-11}$  M) boli hybridizované so sériou 5'Cy5 značených primerov (n-1 až n+1, znázornené na Obr. č. 29) (1 – 4 nM) v objemovom pomere 1:1 v 10 mM fosfátovom pufrí (pH = 7.0, 150 mM NaCl a 0.05% TWEEN).



Obr. č. 29: Sekvencie templátu a série značených primerov (Prevzaté z [179])

Sklenené kapiláry boli naplnené reakčnými roztokmi a okamžite zmerané. Analýza dát a preloženie kriviek boli uskutočnené pomocou softvéru „Nanotemper Analysis“. Použité parametre prístroja MST: LED power: 20-100 %, laser power: 40%. Získané hodnoty  $K_d$  pre každú teplotu boli vynesené do Van't Hoffovho grafu ako  $\ln(K_d)$  vs.  $1/T$ . Teplotná závislosť asociačnej konštanty  $K_a$  ( $1/K_d$ ) bola použitá na odvodenie termodynamických parametrov  $\Delta H$  a  $\Delta S$  lineárnou extrapoláciou údajov vo Van't Hoffovom grafe.  $\Delta G$  bola získaná pomocou rovnice  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ .

### 3.5.14 Kultivácia bunkových nádorových línií

Použité bunkové línie:

A2780 (ľudský ovariálny karcinóm)

HTC-116 (ľudský kolorektálny karcinóm)

MDA-MB-231 (trojito-negatívny chemorezistentný ľudský karcinóm prsníku)

MRC5pd30 (bunky z normálneho pľúcneho tkaniva)

Bunky A2780 boli kultivované podľa štandardného protokolu v RPMI 1640 médiu s prídavkom gentamycínu (50 mg/ml) a 10 % FBS. Bunky HTC-116, MDA-MB-231 a MRC5pd30 boli kultivované v DMEM médiu s prídavkom gentamycínu (50 mg/ml) a 10 % FBS. Médium pre MDA-MB-231 a MRC5pd30 tiež obsahovalo 1% neesenciálnych aminokyselín. Všetky bunkové línie boli kultivované pri 37 °C v 5% atmosfére CO<sub>2</sub> a po dosiahnutí konfluencie pasážované s pomocou trypsínu podľa štandardného protokolu. Po zafarbení Trypanovou modrou boli bunky spočítané.

### 3.5.15 Stanovenie antiproliferatívnej aktivity komplexov

Na zistenie vplyvu protinádorových komplexov kovov na životaschopnosť (proliferáciu) nádorových buniek sa najčastejšie používa kolorimetrický MTT test. Metóda je založená na enzymatickej redukcii žltého rozpustného MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-difenyyl-2H-tetrazolium bromid) na nerozpustný tmavo fialový formazán, pričom intenzita fialovej farby je priamo úmerná počtu živých buniek. Túto zmenu spôsobuje vplyv mitochondriálnych dehydrogenáz v živých, metabolicky aktívnych bunkách [186].

Bunky boli nasadené na 96 jamkové doštičky v 100  $\mu$ l média v hustote 2000 buniek/jamku (HTC-116) alebo 5000 buniek/jamka (MDA-MB-231, A2780, MRC5pd30) a inkubované cez noc (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Následne k nim boli pridané testované zlúčeniny (v rade koncentrácií od 0 do 100  $\mu$ M pre A2780, HCT116, MDA-MB-231 a 0 -200  $\mu$ M pre MRC5pd30) v celkovom objeme 200  $\mu$ l/jamka a bunky boli ďalej inkubované po dobu 72 h. Potom bolo do každej jamky pridaných 20  $\mu$ l roztoku MTT (1,25 mg/ml v PBS). Doštičky boli inkubované 4 h za vyššie popísaných kultivačných podmienok a počas tejto doby bolo MTT živými bunkami premieňané na formazán. Po odstránení média bol formazán rozpustený v DMSO (100  $\mu$ l/jamka). Bunková proliferácia bola vyhodnotená meraním absorbancie pri 570 nm (referenčná vlnová dĺžka 620 nm). Koncentrácie komplexu indikujúce 50 % inhibíciu proliferácie buniek – hodnoty IC<sub>50</sub>, boli vypočítané z grafickej závislosti prežívania buniek (%) na koncentrácii daného komplexu ( $\mu$ M).

## 4 Výsledky a diskusia

Experimentálna časť predkladanej dizertačnej práce je založená na štyroch samostatných publikáciách zverejnených v medzinárodných impaktovaných časopisoch (viď Zoznam publikovaných prác). Kópie jednotlivých publikácií sú súčasťou príloh. Táto kapitola je rozdelená do štyroch kategórií, v ktorých sú zhrnuté a okomentované výsledky jednotlivých publikácií. Tri články sú tematicky zamerané na štúdium molekulárneho mechanizmu účinku nových potenciálnych protinádorových zlúčenín platiny na DNA a jeden článok sa zaoberá stanovením cytotoxicity komplexu gália.

Prvá časť pojednáva o výsledkoch štúdia *in vitro* interakcií nových fotoaktivovateľných dinukleárných platičitých komplexov s DNA (publikácia č. 1).

Druhá časť sa zaoberá *in vitro* analýzou mechanizmu účinku dvoch enantiomérnych derivátov cisplatiny s dôrazom na štúdium interakcií týchto komplexov s DNA a porovnaním ich účinku s cisplatinou. V práci sa popisuje, aký vplyv má chiralita zlúčeniny na mechanizmus protinádorového účinku.

Tretia podkapitola je zameraná na stanovenie cytotoxicity nového potenciálneho protinádorového komplexu gália na viacerých bunkových líniách a jej porovnaní s cytotoxicitou cisplatiny a ligandu študovaného komplexu.

V poslednej časti tejto práce je zhrnutý vplyv aduktu monofunkčného komplexu platiny s duálnym väzbovým módom na translázovú syntézu DNA pomocou špecifických DNA polymeráz. Energetický dopad poškodenia DNA týmto komplexom na proces translázovej syntézy DNA (TLS) a s tým spojené termodynamické zmeny boli študované technikou mikroškálovej termoforézy (MST).

### 4.1 Photoactivatable cell-selective dinuclear trans-diazidoplatinum(IV) anticancer prodrugs. (Publikácia č. 1)

Fotoaktivácia je veľmi efektívna a neinvazívna chemoterapeutická stratégia [187]. Fotochemoterapia za použitia vhodných komplexov platiny má potenciál predísť niektorým limitáciám cisplatiny [157]. Vzhľadom k tomu, že  $Pt^{IV}$  komplexy sú kineticky inertné a k ich cytotoxicite je potrebná aktivácia (redukcia  $Pt^{IV}$  komplexov na  $Pt^{II}$  v nádorových bunkách), majú vysoký potenciál v selektívnej liečbe niektorých typov nádorov [188]. Axiálne ligandy v platičitých zlúčeninách sú po redukcii na  $Pt^{II}$  odstupujúcimi skupinami a majú veľký vplyv na redukčný potenciál  $Pt^{IV}$ . Derivatizáciou axiálneho ligandu je možné zlepšiť farmakologické vlastnosti komplexu bez zmeny mechanizmu účinku aktivovanej platinovej jednotky. Jedným zo spôsobov aktivácie diazidoplatičitých komplexov je ich fotoredukcia na  $Pt^{II}$  komplexy

[157] bližšie popísaná v teoretickej časti tejto práce. Medzi nich patrí aj *trans, trans, trans*-[Pt(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>(pyridín)<sub>2</sub>] (**FM-190**), ktorý je aktivovateľný UVA, modrým a zeleným svetlom. Vykazuje vysokú toxicitu dokonca aj v bunkových líniiach rezistentných na cisplatinu [164] a jeho účinok je bližšie popísaný v teoretickej časti práce.

Ďalšou významnou skupinou protinádorových zlúčenín sú polynukleárne komplexy platiny. Mechanizmus ich pôsobenia je odlišný od materskej cisplatiny a sú účinné v mnohých nádorových líniiach rezistentných k cisplatine [189]. Trojjadrový komplex **BBR3464** je najznámejším polynukleárnym komplexom, ktorý sa dostal do 2. fázy klinických skúšok, na základe ktorých však nebol doporučený k ďalšiemu klinickému skúmaniu kvôli rozkladu v ľudskej krvnej plazme [153].

Práve spojenie fotoaktivovateľných Pt<sup>IV</sup> komplexov s polynukleárnymi komplexami by mohlo zvýšiť selektívny cytotoxický účinok obidvoch skupín.

V tejto práci boli syntetizované, charakterizované a testované fotoaktivovateľné dinukleárne komplexy platiny *trans,trans,trans*-[Pt(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(pyridín)<sub>2</sub>(OH)(OC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)NH)}<sub>2</sub>R] [R = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-(**1**), -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-(**4**)] (Obr. č. 22). Ich biologické účinky boli porovnávané s príbuzným mononukleárnym *trans,trans,trans*-[Pt(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>(pyridín)<sub>2</sub>] (**FM-190**) (Obr. č. 22), aby sa potvrdil vplyv spájajúceho ligandu. Fotoaktivácia týchto komplexov prebiehala ich ožarovaním viditeľným svetlom ( $\lambda_{\max} = 455$  nm) po dobu 60 – 120 min a je bližšie popísaná v kapitole Materiál a metódy.

Fotodekompozíciou dinukleárných komplexov **1** a **4** vznikajú azidylové a hydroxylové radikály a mononukleárne platinové jednotky podobné produktom aktivovaného **FM-190**.

Bola skúmaná schopnosť fotoaktivovaných dinukleárných komplexov **1** a **4** viazať sa na DNA v porovnaní s mononukleárnym **FM-190**. Po inkubácii CT-DNA s platinovými komplexami boli nenaviazané komplexy odstránené. Obsah platiny vo vzorkoch –  $r_b$  (definované ako počet molekúl platinového komplexu naviazaných na jeden nukleotid) bol určený pomocou AAS a koncentrácia DNA pomocou UV-VIS spektrofotometrie. Množstvo platiny viazanej na DNA sa postupom času zvyšovalo pre všetky komplexy až na hodnotu 60 % po 24 h (publikácia č. 1, fig. 5A), pričom medzi skúmanými komplexami nebol pozorovaný žiaden signifikantný rozdiel.

Na charakterizáciu poškodení spôsobených aduktmi komplexov **FM-190**, **1** a **4** indukovaných v DNA bol použitý interkalátor DNA EtBr ako fluorescenčná sonda. Po jeho interkalácii na DNA dochádza k nárastu jeho fluorescence. Modifikácia DNA komplexami platiny za podmienok ožarovania však viedla k zníženiu fluorescence EtBr (publikácia č. 1,

fig. 5B) oproti kontrolnému, nemodifikovanému vzorku. Pokles fluorescencie spôsobený aduktami fotoaktivovaných **1** a **4** na DNA bol pri ekvivalentných hodnotách  $r_b$  dvojnásobný, než v prípade **FM-190**. Bolo taktiež potvrdené, že ožarovanie samotnej CT-DNA viditeľným svetlom nemalo žiaden vplyv na fluorescenciu EtBr. Výsledky tohto experimentu naznačujú, že konformačné deformácie indukované v DNA aduktami ožiarených komplexov **1** a **4** sú delokalizované a predĺžené cez páry bází okolo miest platinácie v miere odpovedajúcej distorziám DNA spôsobeným dvoma aduktami mononukleárneho **FM-190**. Tieto výsledky sú konzistentné s rozpadom dinukleárných komplexov **1** a **4** v dôsledku ožiarovania, ktoré vedie k uvoľneniu dvoch mononukleárných jednotiek podobných tým z **FM-190**.

Bolo dokázané, že modifikácia DNA ožiareným **FM-190** vedie k vytvoreniu medzireťazcových mostíkov [164]. Preto bola táto schopnosť tiež skúmaná u komplexov **1** a **4**. Plazmid pUC19 bol modifikovaný na hodnoty  $r_b$  0,0003 a 0,0006 (v prípade **FM-190**) alebo 0,00015 a 0,0003 (v prípade **1** a **4**) a podrobený denaturačnej agarózovej elektroforéze (publikácia č 1, fig. 5C). Kvantitatívne vyhodnotenie rádioaktivity ukázalo, že ožiarené komplexy **1** a **4** vytvorili v DNA dvojnásobne väčšie množstvo medzireťazcových mostíkov než **FM-190**. Frekvencia medzireťazcových mostíkov bola  $12,5 \pm 0,5$  % zo všetkých aduktov pre **FM-190**,  $24 \pm 2$  % pre **1** a  $24 \pm 2$  % pre **4** na rovnakom stupni modifikácie vzťahujúcej sa na komplex. Výsledky experimentu tiež podporujú hypotézu, že ožarovaním dinukleárných komplexov dochádza k ich rozpadu a uvoľneniu dvoch molekúl podobných fotoproduktu mononukleárneho komplexu **FM-190**.

Študované komplexy spôsobovali podobne ako **FM-190** rozvíjanie superhelikálnej DNA [164]. Uhol rozvíjania ( $\Phi$ ) DNA modifikovanej komplexami **1** a **4** fotoaktivovanými viditeľným svetlom bol  $57 \pm 8^\circ$  (publikácia č. 1, fig. 5D). Táto hodnota je dvakrát vyššia než uhol rozvíjania DNA modifikovanej komplexom **FM-190** stanovený za rovnakých podmienok ( $28 \pm 4^\circ$ ) [164]. V súlade s výsledkami experimentov zameraných na charakterizáciu DNA aduktov pomocou fluorescencie EtBr a medzireťazcových mostíkov sa dajú výsledky experimentu rozvíjania DNA interpretovať tak, že v dôsledku ožiarovania dinukleárných komplexov **1** a **4** a ich rozpadu vznikajú 2 molekuly podobné molekulám mononukleárneho **FM-190**.

Experiment transkripčného mapovania DNA umožňuje identifikáciu preferenčných väzbových miest protinádorových komplexov platiny [185]. Syntéza RNA pomocou T7 RNA polymerázy bola sledovaná na 212-pb dlhom fragmente DNA získanom restričným štiepením cirkulárneho plazmidu pSP73KB endonukleázami *NdeI* a *HpaI*. Tento fragment obsahoval promotor pre T7 RNA polymerázu a bol náhodne modifikovaný fotoaktivovanými dinukleárnymi komplexami **1** a **4** (hodnoty  $r_b$  0,004 – 0,01) (publikácia č. 1, fig. S13) a pre

porovnanie tiež cisplatinou a transplatinou na hodnotu  $r_b = 0,01$  a  $0,005$ . Syntéza RNA bola predčasne ukončená, čím sa získali fragmenty definovanej dĺžky. Sekvenčnou analýzou sa zistilo, že hlavné stop miesta transkripcie DNA modifikovanej dinukleárnymi komplexami **1** a **4** boli totožné so stop miestami získanými pre DNA modifikovanú ožiareným komplexom **FM-190** za rovnakých podmienok v sekvenciách bohatých na G/A [164].

Za účelom získania ďalších informácií o sekvenčnej špecificite väzby komplexov **FM-190** a **1** a **4** na DNA bol tiež prevedený DNázový footprinting (publikácia č. 1, fig. S14). Výsledky ukazujú, že preferované sekvencie väzby komplexov **1** a **4** bohaté na G/A sú identické s miestami väzby mononukleárneho komplexu **FM-190**. Súhrn výsledkov mapovania transkripcie DNA a DNázového footprintingu naznačujú, že preferenčné väzbové miesta DNA ožiarených dinukleárných komplexov **1** a **4** sú podobné ako v prípade mononukleárneho komplexu **FM-190**, čo tiež podporuje hypotézu, že ožiarením dinukleárných komplexov **1** a **4** dochádza k ich rozkladu a uvoľneniu dvoch molekúl podobných fotoproduktom z mononukleárneho komplexu **FM-190**.

Dinukleárne komplexy **1** a **4** vykazovali sľubnú fotocytotoxicitu po ožiarení modrým svetlom (465 nm, 1 h) v množstve ľudských rakovinových bunkových línii. Okrem toho boli aj po ožiarení netoxické voči normálnym bunkám (MRC5). Inhibícia prechodu z G2/M do G0/G1 fázy v bunkovom cykle indukovaná fotoaktivovanými dinukleárnymi komplexmi naznačuje, že hlavným molekulárnym cieľom týchto komplexov je DNA. Vzhľadom k fotodekompozícii dinukleárných komplexov na dve molekuly podobné produktom fotoaktivovaného **FM-190**, reagovali komplexy **1** a **4** po fotoaktivácii *in vitro* podobne ako mononukleárny komplex **FM-190**, pokiaľ ide o kinetiku väzby na CT-DNA, mapovanie transkripcie či DNázový footprinting. Avšak boli približne dvojnásobne účinnejšie pri potlačení fluorescence EtBr naviazaného na DNA, vytváraní medzireťazcových mostíkov a rozvíjaní DNA v porovnaní s fotoaktivovaným mononukleárnym **FM-190**.

## 4.2 DNA modification by cisplatin-like Pt(II) complexes containing 1,1'-binaphthyl-2,2'-diamine ligand does not correlate with their antiproliferative activity in cancer cells. (Publikácia č. 2)

Enantiomérméne deriváty cisplatiny **R**-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] a **S**-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] (DABN = 1,1'-binaftyl-2,2'-diamín) (Obr. č. 23), vykazujú antiproliferatívne účinky v niektorých nádorových bunkových líniiach citlivých na konvenčnú cisplatinu alebo oxaliplatinu. Tieto účinky sú porovnateľné alebo dokonca lepšie, ako účinky rodičovskej cisplatiny alebo oxaliplatiny, pričom **R**-izomér bol väčšinou menej cytotoxický ako **S**-izomér. Obidva komplexy sú taktiež aktívne v izogénnych nádorových bunkách rezistentných na cisplatinu, čo naznačuje ich účinnosť pri obchádzaní získanej rezistencie na cisplatinu [190–192].

Tieto sľubné výsledky boli impulzom na štúdium mechanizmu účinku týchto zlúčenín, vrátane prác zameraných na pochopenie ich interakcií s DNA *in vitro*. **R**-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] a **S**-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] sa viažu na CT-DNA [192]. Napriek vyššej účinnosti **S**-izoméru vykazoval **R**-izomér väčšiu akumuláciu v bunkách a účinnejšiu väzbu na CT-DNA. Ďalšie štúdie odhalili, že **S**-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] sa viaže na bázy v ľudskej telomerickéj sekvencii zloženej v G-kvadruplexnej štruktúre efektívnejšie ako jeho **R**-enantiomér [190,191].

Na pochopenie molekulárneho mechanizmu ich účinku, ktorý sa zjavne líši od účinku cisplatiny, bolo dôležité podrobnejšie skúmanie interakcií DNA s **R**-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] a **S**-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] *in vitro*.

Kvôli zisteniu sekvenčnej selektivity väzby týchto komplexov na DNA bol prevedený experiment transkripčného mapovania platinových aduktov DNA. Syntéza RNA pomocou T7 a SP6 RNA polymeráz bola sledovaná na cirkulárnom plazmide pSP73KB náhodne modifikovanom **R**-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] a **S**-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] a pre porovnanie tiež cisplatinou a transplatinou na hodnotu  $r_b = 0,01$ , podobne ako v publikácii č. 1. Syntéza RNA bola predčasne ukončená, čím sa získali fragmenty definovanej dĺžky (publikácia č. 2, fig. 2). Oba izoméry sú schopné blokovat' polymerizáciu RNA podobným spôsobom. Sekvenčná analýza odhalila, že stop miesta transkripcie DNA spôsobené aduktmi **R**-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] sú aj napriek *cis* konfigurácii chloridových ligandov podobné stop miestam transplatiny v oblastiach G a C [185]. **R**-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] vytvára viac typov DNA aduktov ale s menšou sekvenčnou špecifitou ako cisplatinou. Naopak, **S**-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] vykazuje odlišnú sekvenčnú závislosť inhibície transkripcie ako **R**-izomér. Adukty **S**-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] blokujú RNA polymerázy pravidelnejšie a väčšinou v sekvenciách d(GpG), ktoré sú podobné



cisplatine. Výsledky transkripčného mapovania naznačujú, že axiálna chiralita týchto dvoch izomérov významne ovplyvňuje typ a sekvenčnú preferenciu aduktov DNA.

Schopnosť aduktov komplexov **R-** a **S-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>]** rozvíjať dvojzávitnicu DNA bola monitorovaná pomocou natívnej agarózovej elektroforézy (publikácia č. 2, fig. 4). Uhly rozvíjania DNA stanovené týmto spôsobom boli  $17 \pm 4^\circ$  pre **R-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>]** a  $9 \pm 3^\circ$  pre **S-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>]**. Výsledky jasne ukazujú, že obidva komplexy rozvíjajú superhelikálnu DNA, ale líšia sa mierou účinku. Zatiaľ čo uhol rozvíjania pozorovaný pre **S**-izomér bol podobný uhlu zistenému pre transplatinu ( $9^\circ$ , [183]), **R**-izomér bol ešte účinnejší ako cisplatina ( $13^\circ$ , [183]). Väčšia rozvíjacia kapacita **R-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>]** teda koreluje so silnejšou deformáciou a destabilizáciou DNA týmto komplexom v porovnaní s **S**-izomérom.

Vyššia schopnosť **R-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>]** deformovať DNA bola potvrdená aj zvýšením intenzity fluorescencie Tb<sup>3+</sup> oproti komplexu **S-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>]**, čo indikuje väčšie zmeny v konformácii DNA (publikácia č. 2, fig. 3A experiment prevedený jedným zo spoluautorov). Komplex **R-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>]** taktiež významne viac termálne destabilizuje DNA. To bolo potvrdené meraním teploty topenia DNA modifikovanej týmito komplexami (publikácia č. 2, fig. 3B, experiment prevedený jedným zo spoluautorov) a zisťovaním frekvencie tvorby medzireťazcových mostíkov (publikácia č. 2, table 1, experiment prevedený jedným zo spoluautorov), ktorá bola pre obidva komplexy rovnaká ( $11 \pm 2,5\%$  pre **R**- a  $10,6 \pm 2,7\%$  pre **S**-izomér).

S cieľom objasniť úlohu rozpoznávania DNA aduktov spôsobených **R-** a **S-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>]** HMG proteínmi a opravy DNA v ich mechanizme pôsobenia bola skúmaná reparačná syntéza DNA v neprítomnosti a v prítomnosti proteínu HMGB1a. Plazmid pSP73 (2464 bp) bol náhodne modifikovaný **R-**, **S-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>]** alebo cisplatinou pri  $r_b = 0,03$  a inkubovaný s bunkovým extraktom v prítomnosti alebo neprítomnosti proteínu HMG, ako je uvedené v kapitole Materiál a metódy. Reparačná syntéza detekovaná v plazmide modifikovanom obidvoma izomérmii **R-** a **S-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>]** bez HMG proteínu bola približne dvojnásobná oproti reparačnej syntéze na cisplatinou modifikovanom plazmide, pričom medzi nimi nebol signifikantný rozdiel (publikácia č. 2, fig. 5). V prítomnosti proteínu HMGB1a bola opravná syntéza DNA poškodenej cisplatinou významne potlačená v súlade so skôr publikovanými údajmi [45,46]. Avšak reparačná syntéza DNA poškodenej komplexami **R-** a **S-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>]** nebola ovplyvnená prítomnosťou proteínu HMGB1a (publikácia č. 2, fig. 5B), čo naznačuje, že lézie spôsobené týmito dvoma enantiomermi nie sú významne rozpoznávané a tienené proteínmi s HMG doménou.

Jedným z dôvodov zníženého účinku platinových cytostatík je ich inaktivácia v dôsledku interakcie s látkami obsahujúcimi síru. Kvôli vyhodnoteniu účinku týchto

interakcií na bunecnú cytotoxicitu komplexov **R-** a **S-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>]** bola pomocou UV absorpčnej spektrometrie skúmaná ireverzibilná väzba GSH na oba komplexy v porovnaní s cisplatinou (publikácia č. 2, fig. 6) [184]. Za experimentálnych podmienok použitých v tejto práci oba izoméry reagovali s GSH porovnateľnou rýchlosťou ako cisplatina, pričom **S-**izomér bol mierne, ale nevýznamne rýchlejší.

Chiralita potenciálnych liečiv môže výrazne ovplyvniť spôsob väzby na DNA, ale zmeny vo väzbe na DNA sa nemusia prenášať priamo do procesov bunky a cytotoxicity. V prípade **R-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>]** a **S-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>]** nie je poškodenie DNA spôsobené väzbou komplexov platiny hlavným dôvodom zodpovedným za ich biologické pôsobenie. **R-**izomér vytvára lézie, ktoré DNA deformujú a destabilizujú vo väčšej miere ako **S-**izomér, ktorý je však cytotoxický [190,191]. Preto je pravdepodobný iný molekulárny cieľ v bunkách, ktorého modifikácia by mohla byť zodpovedná za biologický účinok týchto komplexov. DNA sa bežne považuje za farmakologický cieľ pre protinádorové komplexy na báze platiny a iných kovov. Tento predpoklad je často založený iba na štruktúrnej analógii s cisplatinou, bez akýchkoľvek podporných experimentálnych dôkazov. Výsledky prezentované v tejto práci ďalej naznačujú, že dokonca aj komplexy štruktúrne odvodené od cisplatinu, ako napríklad **R-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>]** a **S-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>]**, by mohli mať biologický mechanizmus účinku zreteľne odlišný od „rodičovskej“ cisplatinu.

### **4.3 Low-dimensional compounds containing bioactive ligands.**

#### **Part XIV: High selective antiproliferative activity of tris(5-chloro-8-quinolinolato)gallium(III) complex against human cancer cell lines. (Publikácia č. 3)**

Zlúčeniny trojmocného gália sa v protinádorovej terapii javia ako vysoko perspektívne, pretože gálium (III) má niekoľko vlastností podobných so železom (III) ako napríklad elektrický náboj, iónový plomer, koordinačné číslo a elektrónovú konfiguráciu [176]. Niektoré z jeho zlúčenín sa dostali aj do fázy klinického testovania [172]. Najvýznamnejšou z nich je práve KP46 (tris-(8-chinolinolato) gálium (III)), ktorý je momentálne v druhej fáze klinických testov. Tento komplex vykazuje silnú antiproliferatívnu aktivitu na širokej škále bunkových nádorových línií [165,173].

Samotný ligand 8-chinolinol a rôzne jeho deriváty sú účinné pri liečbe niektorých neurodegeneratívnych chorôb či rakovín [174,193]. 8-chinolinol (8-HQ) a klichinol (5-chlór-7-jód-8-chinolinol, H-CQ) pôsobia ako inhibítory proteazómu s protirakovinovou účinnosťou v nádorových bunkách (ľudské leukemické Jurkat T-bunky) [194] potlačením

účinku proteolýzy založenej na aktivácii apoptózy a paraptózy, ale vyvolávajú závažné vedľajšie účinky. Kloxiquín (5-chlór-8-chinolinol, H-ClQ) vykazuje antiproliferatívnu aktivitu prostredníctvom alosterickej inhibície proteazómu [195]. Okrem toho je aj dobre známym antiinfekčným a antibakteriálnym liečivom používaným pri liečbe tuberkulózy [196].

V tejto práci boli syntetizované 4 nové komplexy gália (III) s haloderivátmi 8-chinolinolu – [Ga(ClQ)<sub>3</sub>]-MeOH (**1-MeOH**), [Ga(ClQ)<sub>3</sub>] (**1**), [Ga(BrQ)<sub>3</sub>] (**2**), [Ga(dIQ)<sub>3</sub>] (**3**) a [Ga(CQ)<sub>3</sub>] (**4**), kde H-ClQ = 5-chlór-8-chinolinol, H-BrQ = 7-bróm-8-chinolinol, H-dIQ = 5,7-dijód-8-chinolinol a H-CQ = 5-chlór-7-jód-8-chinolinol.

Pomocou MTT testu bola stanovená cytotoxicita komplexu **1** a pre porovnanie aj jeho ligandu **ClQ** (Obr. č. 25) a cisplatiny na ľudských nádorových bunkách A2780 (ľudský ovariálny karcinóm), HTC-116 (ľudský kolorektálny karcinóm), MDA-MB-231 (trojito-negatívny ľudský karcinóm prsníka) a MRC5pd30 (bunky z normálneho pľúcneho tkaniva). Kvôli nízkej rozpustnosti komplexov **2** – **4** nebolo možné stanoviť ich cytotoxicitu. Komplex **1** vykazoval vysokú účinnosť vo všetkých študovaných bunkových nádorových líniiach (Tabuľka 1) s nízkymi hodnotami IC<sub>50</sub> (publikácia č. 3, table 3). V prípade A2780, ktoré sú citlivé k cisplatine, mal podobný účinok ako cisplatina. Na bunkách kolorektálneho karcinómu a ťažko liečiteľného, silne metastázujúceho karcinómu prsníka bola jeho cytotoxicita v porovnaní s cisplatinou a samotným ligandom **ClQ** výrazne vyššia (Tabuľka 1). Dôležitým zistením je, že komplex **1** taktiež vykazuje zreteľnú selektivitu pre nádorové bunky oproti nezhubným pľúcny fibroblastom MRC5pd30, na ktorých sa jeho účinok prejavil pri koncentráciách 24-65-krát vyšších ako pre nádorové bunky. Vďaka tomuto faktoru je komplex **1** perspektívnym kandidátom na ďalšie biologické testovanie.

Tabuľka 1: Hodnoty IC<sub>50</sub> [μM] pre komplex **1** v rôznych bunkových líniiach potvrdené MTT testom po 72 h inkubácii. Dáta sú priemerom ± SD troch nezávislých meraní, pričom každé bolo prevedené v triplicáte

IC <sub>50</sub> [μM]	H-ClQ	<b>1</b>	Cisplatina
<b>A2780</b>	6,5 ± 0,7	2,1 ± 0,7	2,7 ± 0,4
<b>MDA-MB-231</b>	15 ± 3	6 ± 2	21 ± 4
<b>HCT116</b>	14 ± 4	2,8 ± 0,9	7 ± 1
<b>MRC5pd30</b>	76 ± 6	136 ± 23	13 ± 2

#### 4.4 Thermodynamic Insights by Microscale Thermophoresis into Translesion DNA Synthesis Catalyzed by DNA Polymerases Across a Lesion of Antitumor Platinum–Acridine Complex. (Publikácia č. 4)

Poslednou publikáciou zahrnutou v tejto dizertačnej práci je štúdium translézovej syntézy – schopnosti špecifických DNA polymeráz syntetizovať DNA cez jej poškodenie spôsobené platinovým konjugátom s duálnym väzbovým módom – komplexom **AMD** (Obr. č. 24). To bolo prevedené pomocou polymeráz a mikroškálovej termoforézy. Aduktý platinových komplexov na DNA blokujú viaceré kľúčové funkcie bunky, ako napríklad replikáciu DNA a zapríčiňujú programovanú bunkovú smrť [16]. Na druhej strane sa bunky snažia obnoviť zastavenú replikáciu DNA a využívajú aktivitu translézových DNA dependentných DNA polymeráz, ktoré sú schopné „premostiť“ platinové adukty. TLS polymerázy sa účastnia na procesoch spojených s opravami poškodení DNA a sú menej presné ako väčšina replikačných DNA dependentných DNA polymeráz. Sú schopné inkorporovať nesprávne nukleotidy oproti lézii na DNA a tak indukovať vznik mutácií [70,71,73].

V snahe nájsť nové štruktúrne motívy platinových komplexov vedúce k protinádorovým efektom odlišným od klinicky používaných platinových cytostatík, boli syntetizované monofunkčné komplexy s akridínovým ligandom. Komplexy ACR a jeho amidínový derivát **AMD** ukázali vysokú antiproliferatívnu aktivitu vo viacerých bunkových líniiach, vrátane niektorých rezistentných k cisplatine [133,134]. Ich farmakologický cieľ je taktiež DNA, na ktorú sa viažu interkaláciou akridínovej podjednotky a zároveň kovalentnou väzbou platinového atómu s purínovými bázami [132]. Amidínový derivát **AMD** (Obr. č. 24), v ktorom je thiomocovina nahradená amidínovou skupinou, bol syntetizovaný kvôli zvýšeniu cytotoxicity pôvodného ACR komplexu. Táto modifikácia viedla k zvýšenej tvorbe aduktov na DNA a k väčšiemu poškodeniu DNA [133]. DNA adukty komplexu **AMD** efektívnejšie inhibujú DNA replikáciu a sú menej opravované než adukty ACR [136].

V tejto práci bolo transkripčným mapovaním zistené, že komplex **AMD** (Obr. č. 24) sa viaže na DNA v sekvenciách 5-CTG, 5-CGATG, a 5-CGG (publikácia č. 4, fig. S1). Následne bolo študované premostenie špecifického DNA-**AMD** aduktu pomocou dvoch polymeráz, ktoré sa líšia svojou procesivitou a presnosťou: bakteriálnej ( $KF^{exo-}$ ) a ľudskej DNA polymerázy  $\eta$  ( $Pol\eta$ ). V ďalších experimentoch boli skúmané kinetické parametre inkorporácie jednotlivých nukleotidov týmito DNA polymerázami.

Boli prevedené 2 typy experimentov – „running a standing start“. (Obr. č. 27) V nich boli vytvorené 2 typy DNA duplexov z platinovanej aj nemodifikovanej DNA – 12-mer/24-mer primer-templát „running start“ a 16-mer/24-mer primer-templát „standing start“ bližšie popísané v kapitole Materiál a metódy.

Inhibícia syntézy DNA translázovými polymerázami môže byť spôsobená nielen ich sterickou blokáciou, zapríčinenou aduktom komplexu, ale tiež energetickým dopadom poškodenia DNA na proces TLS [9]. Na meranie termodynamických zmien (publikácia 4, tabuľka 3), spojených s TLS cez **AMD** adukt, bola použitá technika MST. TLS bola simulovaná pomocou dvoch setov primerov: komplementárne n-1, n, n+1 a nekomplementárne  $n_G$  a  $n_{G+1}$ , kde bol G v templátovom reťazci spárovaný s nekomplementárnym G v primeri (publikácia 4, fig. 4).

V prítomnosti všetkých štyroch dNTPs bol adukt **AMD** veľmi účinný v inhibícii TLS obidvoma polymerázami. Polη bola schopná syntetizovať komplementárny reťazec cez adukt **AMD** efektívnejšie ako  $KF^{exo-}$  a taktiež s vyššou mierou nesprávne inkorporovaných dNTPs. Obidve polymerázy zablokovali syntézu DNA najneskôr na prvom nukleotide za aduktom (publikácia 4, fig 2 a 3). Hodnoty v Tabuľkách 1 a 2 (publikácia 4) dokazujú, že najviac bol inkorporovaný správny dCTP v prípade aduktu komplexu **AMD**, rovnako aj v kontrole. Na druhej strane, Polη bola schopná inkorporovať nesprávny dGTP oproti platinovanému G s vyššou relatívnou účinnosťou ako oproti nemodifikovanému G v kontrolnom templáte. To bolo potvrdené pomocou MST, kde termodynamické parametre (publikácia 4, tabuľka 3) ukázali vyššiu stabilitu duplexu s aduktom a chybnou inkorporáciou dGMP v porovnaní s kontrolným nemodifikovaným duplexom. Zároveň bolo potvrdené, že inkorporácia správneho dCTP je výhodnejšia, pretože dochádzalo k zvýšeniu termodynamickej stability vznikajúceho duplexu. To sa dalo očakávať, pretože dCTP je súčasťou Watson-Crickovho párovania bází DNA, zatiaľ čo dGTP nie je. V súlade s týmto tvrdením je fakt, že inkorporácia dGTP dokonca znížila termodynamickú stabilitu platinovaného aj nemodifikovaného nekomplementárneho G~G duplexu oproti komplementárnemu G~C duplexu. Modifikáciou DNA komplexom **AMD** došlo k entalpickej destabilizácii, ktorá bola kompenzovaná zvýšením entropie. Celkový efekt (vyjadrený zmenou  $\Delta G$ ) komplexu **AMD** na DNA duplex je termodynamická stabilizácia, ktorá je entropického pôvodu. Tento výsledok sa dá interpretovať tak, že **AMD** adukt zvyšuje termodynamickú stabilitu párov bází v tesnej blízkosti aduktu, čo je spôsobené interkaláciou akridínovej podjednotky **AMD**.

Vzhľadom k tomu, že entalpicko – entropická kompenzácia je v katalytickom mieste enzýmu potlačená, preferencia inkorporácie jednotlivých nukleotidov je riadená entalpicky [197]. Experimentálne dáta potvrdzujú, že adukt **AMD** blokuje študované DNA dependentné

DNA polymerázy jeden alebo viac nukleotidov pred poškodením. V prípade translázovej syntézy je preferovaná inkorporácia správneho dCTP, ktorá je entalpicky výhodnejšia.

Väzba **AMD** na DNA zahŕňa kombináciu interkalácie akridínovej podjednotky a monofunkčnú koordinačnú väzbu platiny na N7 guanínu. Interkaláciou akridínovej podjednotky dochádza k delokalizovaným konformačným distorziám, ktoré ovplyvňujú páry bází v bezprostrednom susedstve aduktu [136]. Adukt sa nachádza vo veľkom žliabku DNA, takže priama interakcia **AMD** s  $KF^{exo-}$  a Pol $\eta$  je nepravdepodobná. Na druhej strane by adukty **AMD** mohli ovplyvňovať silu interakcie študovaných DNA polymeráz s DNA v prípade, že adukt bráni konformačným zmenám DNA potrebným k vytvoreniu komplexu DNA-DNA polymeráza-dNTP [198].

Záverom tejto práce je potvrdenie užitočnosti MST na získanie detailných termodynamických parametrov translázovej syntézy DNA cez adukt **AMD**. Výsledky získané pomocou MST boli v súlade s experimentálnymi dátami popisujúcimi translázovú syntézu DNA cez adukt **AMD** prokaryotickou aj eukaryotickou DNA polymerázou.

## 5 Záver

Úvodná časť dizertačnej práce sa venuje popisu interakcií DNA a cisplatiny ako najpoužívanejšieho cytostatika na báze kovov. Boli popísané konformačné zmeny v DNA vyvolané väzbou cisplatiny a ich bunčné spracovanie. Ďalej nasledoval popis vývoja a vlastností nových komplexov na báze kovov s odlišnou štruktúrou a mechanizmom pôsobenia ako cisplatina.

Primárnym cieľom tejto práce boli prispieť k teoretickým poznatkom o mechanizme účinku nových protinádorových zlúčenín s centrálnym atómom kovu, Biologická aktivita cisplatiny a jej derivátov je sprostredkovaná rozpoznávaním jej aduktov bunčnými proteínmi a celkovou odpoveďou bunky na poškodenie DNA. Je veľmi dôležité poznať mechanizmus účinku týchto látok, jednak z dôvodu zlepšenia celkovej cytotoxicity a taktiež kvôli efektívnemu zvládnutiu liečby.

V práci boli skúmané rôzne skupiny platinových derivátov – polynukleárne platinové komplexy v spojení so selektívnymi Pt<sup>IV</sup> komplexami, priame deriváty cisplatiny, monofunkčný komplex a komplex gália.

V snahe zlepšiť vlastnosti polynukleárných platinových zlúčenín a zvýšiť ich selektívny cytotoxický účinok boli syntetizované nové dinukleárne fotoaktivovateľné Pt<sup>IV</sup> komplexy. V prvej časti tejto práce bola študovaná väzba dvoch nových fotoaktivovateľných dinukleárných platičitých komplexov na DNA. Ich fotodekompozíciou po aktivácii modrým svetlom sa uvoľnili dve platinové jednotky podobné mononukleárnemu **FM-190**. To malo za následok, že **1** a **4** reagovali podobne, ako mononukleárny komplex **FM-190** čo sa týka kinetiky väzby na DNA, transkripčného mapovania a footprintu DNA aduktov pomocou DNázy I. Na druhej strane však boli v porovnaní s fotoaktivovaným mononukleárnym **FM-190** približne dvojnásobne účinnejšie pri potlačení fluorescencie EtBr interkalovaného do DNA, vytváraní medzireťazcových mostíkov a rozvíjajú DNA. Toto spojenie fotoaktivovateľných Pt<sup>IV</sup> komplexov s polynukleárnymi komplexami sa ukazuje ako úspešné z hľadiska zvýšenej cytotoxicity a selektivity na nádorové bunky.

Intenzívny výskum mechanizmu účinku platinových cytostatík a ich derivátov viedol k záveru, že za ich protinádorové účinky je zodpovedné poškodenie DNA vyvolané ich koordinačnou väzbou. Výsledky prezentované v druhej časti tejto dizertačnej práce ukazujú, že chiralita komplexov [Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] môže výrazne ovplyvniť spôsob ich väzby na DNA. Na druhej strane sa však rozdiely vo väzbe na DNA neprenášajú priamo do bunčného spracovania a toxicity **R**- a **S**-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] v rakovinových bunkách. Tieto výsledky podporujú hypotézu, že na rozdiel od konvenčných platinových liečiv a ich priamych

analógov nie je poškodenie DNA spôsobené väzbou komplexov  $[\text{Pt}(\text{DABN})\text{Cl}_2]$  hlavným faktorom zodpovedným za ich biologické pôsobenie. Získané výsledky naznačujú, že dokonca aj komplexy štruktúrne odvodené od cisplatiny, ako napríklad  $R\text{-}[\text{Pt}(\text{DABN})\text{Cl}_2]$  a  $S\text{-}[\text{Pt}(\text{DABN})\text{Cl}_2]$ , by mohli mať biologický mechanizmus účinku výrazne odlišný od cisplatiny.

Jednou zo stratégií na vylepšenie platinových cytostatík je výmena centrálného atómu platiny za iný kov ako napríklad gálium. Niekoľko jeho úspešných zlúčenín je v rôznych fázach klinického testovania. V tejto práci bola skúmaná antiproliferatívna aktivita komplexu gália s ligandom kloxiquínom na celej škále bunkových nádorových línií a porovnávaná s účinkom cisplatiny a samotného ligandu kloxiquínu, ktorý taktiež vykazuje protinádorové účinky. Tento komplex vykazoval vyššiu antiproliferatívnu aktivitu a výraznejšiu selektivitu na nádorové bunky v porovnaní s cisplatinou a ligandom kloxiquínom.

Translázová syntéza cez adukty protinádorových komplexov platiny na DNA koreluje s rezistenciou nádorových buniek na liečbu. Práve z tohto dôvodu bolo zaujímavé sledovať premostenie a s tým spojené termodynamické zmeny špecifického monofunkčného aduktu komplexu **AMD** na DNA pomocou dvoch DNA polymeráz a MST. Adukt **AMD** veľmi účinne inhiboval aktivitu obidvoch polymeráz a oproti poškodeniu DNA bola najviac preferovaná inkorporácia správneho nukleotidu dCTP. Na druhej strane, Pol $\eta$  bola schopná inkorporovať nesprávny dGTP oproti platinovanému G s vyššou relatívnou účinnosťou ako oproti nemodifikovanému G v kontrolnom templáte. To bolo potvrdené pomocou MST, kde termodynamické parametre ukázali vyššiu stabilitu platinovaného nekomplementárneho G~G duplexu, ako nemodifikovanej kontroly. Zároveň bolo potvrdené, že inkorporácia správneho dCTP je termodynamicky výhodnejšia. Výsledky získané pomocou MST boli v súlade s experimentálnymi dátami popisujúcimi translázovú syntézu DNA cez adukt **AMD** prokaryotickou aj eukaryotickou DNA polymerázou. Termodynamické parametre taktiež prispeli k hlbšiemu porozumeniu toho, ktoré faktory vplyvajú na mechanizmus DNA syntézy cez adukt **AMD**.

Výsledky získané v tejto dizertačnej práci viedli k popísaniu väzby nových metalofarmak na DNA a mechanizmu ich pôsobenia na molekulárnej a bunecnej úrovni. Práca prispieva k riešeniu projektov zameraných na problematiku nových účinnejších a bezpečnejších metalofarmak použiteľných pri protinádorovej terapii.



## 6 Zoznam použitej literatúry

1. Hannon, M.J. Metal-Based Anticancer Drugs: From a Past Anchored in Platinum Chemistry to a Post-Genomic Future of Diverse Chemistry and Biology. *Pure Appl. Chem.* **2007**, *79*, 2243–2261, doi:10.1351/pac200779122243.
2. Tesniere, A.; Schlemmer, F.; Boige, V.; Kepp, O.; Martins, I.; Ghiringhelli, F.; Aymeric, L.; Michaud, M.; Apetoh, L.; Barault, L.; et al. Immunogenic Death of Colon Cancer Cells Treated with Oxaliplatin. *Oncogene* **2010**, *29*, 482–491, doi:10.1038/onc.2009.356.
3. Brabec, V.; Hrabina, O.; Kasparkova, J. Cytotoxic Platinum Coordination Compounds. DNA Binding Agents. *Coord. Chem. Rev.* **2017**, *351*, 2–31, doi:10.1016/j.ccr.2017.04.013.
4. Wang, X.; Guo, Z. Targeting and Delivery of Platinum-Based Anticancer Drugs. *Chem Soc Rev* **2013**, *42*, 202–224, doi:10.1039/C2CS35259A.
5. Vologodskii, A.; Frank-Kamenetskii, M.D. DNA Melting and Energetics of the Double Helix. *Phys. Life Rev.* **2018**, *25*, 1–21, doi:10.1016/j.plrev.2017.11.012.
6. Mergny, J.-L.; Lacroix, L. Analysis of Thermal Melting Curves. *Oligonucleotides* **2003**, *13*, 515–537, doi:10.1089/154545703322860825.
7. Bueren-Calabuig, J.A.; Giraudon, C.; Galmarini, C.M.; Egly, J.M.; Gago, F. Temperature-Induced Melting of Double-Stranded DNA in the Absence and Presence of Covalently Bonded Antitumor Drugs: Insight from Molecular Dynamics Simulations. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 8248–8257, doi:10.1093/nar/gkr512.
8. Vaitiekunas, P.; Crane-Robinson, C.; Privalov, P.L. The Energetic Basis of the DNA Double Helix: A Combined Microcalorimetric Approach. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 8577–8589, doi:10.1093/nar/gkv812.
9. Florian, J.; Brabec, V. Thermodynamics of Translesion Synthesis across a Major DNA Adduct of Antitumor Oxaliplatin: Differential Scanning Calorimetric Study. *Chem. - Eur. J.* **2012**, *18*, 1634–1639, doi:10.1002/chem.201102425.
10. Jerabek-Willemsen, M.; André, T.; Wanner, R.; Roth, H.M.; Dühr, S.; Baaske, P.; Breitsprecher, D. MicroScale Thermophoresis: Interaction Analysis and Beyond. *J. Mol. Struct.* **2014**, *1077*, 101–113, doi:10.1016/j.molstruc.2014.03.009.
11. Pilch, D.S.; Dunham, S.U.; Jamieson, E.R.; Lippard, S.J.; Breslauer, K.J. DNA Sequence Context Modulates the Impact of a Cisplatin 1,2-d(GpG) Intrastrand Cross-Link on the Conformational and Thermodynamic Properties of Duplex DNA. *J. Mol. Biol.* **2000**, *296*, 803–812, doi:10.1006/jmbi.2000.3496.
12. Poklar, N.; Pilch, D.S.; Lippard, S.J.; Redding, E.A.; Dunham, S.U.; Breslauer, K.J. Influence of Cisplatin Intrastrand Crosslinking on the Conformation, Thermal Stability, and Energetics of a 20-Mer DNA Duplex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93*, 7606–7611, doi:10.1073/pnas.93.15.7606.
13. Hofr, C.; Brabec, V. Thermal and Thermodynamic Properties of Duplex DNA Containing Site-Specific Interstrand Cross-Link of Antitumor Cisplatin or Its Clinically Ineffective Trans Isomer. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 9655–9661, doi:10.1074/jbc.M010205200.
14. Rosenberg, B. Platinum Complexes for the Treatment of Cancer: Why the Search Goes On. In *Cisplatin*; Lippert, B., Ed.; Verlag Helvetica Chimica Acta: Zürich, 2006; pp. 1–27 ISBN 978-3-906390-42-0.
15. Kelland, L. The Resurgence of Platinum-Based Cancer Chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 573–584, doi:10.1038/nrc2167.
16. Todd, R.C.; Lippard, S.J. Inhibition of Transcription by Platinum Antitumor Compounds. *Metallomics* **2009**, *1*, 280–291, doi:10.1039/B907567D.
17. Jamieson, E.R.; Lippard, S.J. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin–DNA Adducts. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2467–2498, doi:10.1021/cr980421n.
18. Basu, A.; Krishnamurthy, S. Cellular Responses to Cisplatin-Induced DNA Damage. *J. Nucleic Acids* **2010**, *2010*, 1–16, doi:10.4061/2010/201367.
19. Johnstone, T.C.; Suntharalingam, K.; Lippard, S.J. The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 3436–3486, doi:10.1021/acs.chemrev.5b00597.
20. Brabec, V.; Kasparkova, J. Modifications of DNA by Platinum Complexes: Relation to Resistance of Tumors to Platinum Antitumor Drugs. *Drug Resist. Updat.* **2005**, *8*, 131–146, doi:10.1016/j.drup.2005.04.006.

21. Johnstone, T.C.; Suntharalingam, K.; Lippard, S.J. Third Row Transition Metals for the Treatment of Cancer. *Philos. Trans. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.* **2015**, *373*, 20140185, doi:10.1098/rsta.2014.0185.
22. Gately, D.P.; Howell, S.B. Cellular Accumulation of the Anticancer Agent Cisplatin: A Review. *Br. J. Cancer* **1993**, *67*, 1171–1176, doi:10.1038/bjc.1993.221.
23. Abada, P.; Howell, S.B. Regulation of Cisplatin Cytotoxicity by Cu Influx Transporters. *Met.-Based Drugs* **2010**, *2010*, 1–9, doi:10.1155/2010/317581.
24. Howell, S.B.; Safaei, R.; Larson, C.A.; Sailor, M.J. Copper Transporters and the Cellular Pharmacology of the Platinum-Containing Cancer Drugs. *Mol. Pharmacol.* **2010**, *77*, 887–894, doi:10.1124/mol.109.063172.
25. Esteban-Fernández, D.; Moreno-Gordaliza, E.; Cañas, B.; Antonia Palacios, M.; Milagros Gómez-Gómez, M. Analytical Methodologies for Metallomics Studies of Antitumor Pt-Containing Drugs. *Metallomics* **2010**, *2*, 19–38, doi:10.1039/B911438F.
26. Johnson, N.P.; Butour, J.-L.; Villani, G.; Wimmer, F.L.; Defais, M.; Pierson, V.; Brabec, V. Metal Antitumor Compounds: The Mechanism of Action of Platinum Complexes. In *Ruthenium and Other Non-Platinum Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*; Baulieu, E., Forman, D.T., Ingelman-Sundberg, M., Jaenicke, L., Kellen, J.A., Nagai, Y., Springer, G.F., Träger, L., Will-Shahab, L., Wittliff, J.L., Eds.; Progress in Clinical Biochemistry and Medicine; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1989; Vol. 10, pp. 1–24 ISBN 978-3-642-74762-5.
27. Johnstone, T.C.; Wilson, J.J.; Lippard, S.J. Monofunctional and Higher-Valent Platinum Anticancer Agents. *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 12234–12249, doi:10.1021/ic400538c.
28. Vrâna, O.; Boudny, V.; Brabec, V. Superhelical Torsion Controls DNA Interstrand Cross-Linking by Antitumor Cis - Diamminedichloroplatinum(II). *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 3918–3925, doi:10.1093/nar/24.20.3918.
29. Jones, J.C.; Zhen, W.P.; Reed, E.; Parker, R.J.; Sancar, A.; Bohr, V.A. Gene-Specific Formation and Repair of Cisplatin Intrastrand Adducts and Interstrand Cross-Links in Chinese Hamster Ovary Cells. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 7101–7107, doi:10.1016/S0021-9258(20)89616-1.
30. Brabec, V. Chemistry and Structural Biology of 1,2-Interstrand Adducts of Cisplatin. In *Platinum-Based Drugs in Cancer Therapy*; Kelland, L.R., Farrell, N.P., Eds.; Cancer Drug Discovery and Development; Humana Press: Totowa, NJ, 2000; pp. 37–61 ISBN 978-1-59259-012-4.
31. Lemaire, M.A.; Schwartz, A.; Rahmouni, A.R.; Leng, M. Interstrand Cross-Links Are Preferentially Formed at the d(GC) Sites in the Reaction between Cis-Diamminedichloroplatinum (II) and DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**, *88*, 1982–1985, doi:10.1073/pnas.88.5.1982.
32. Bellon, S.F.; Lippard, S.J. Bending Studies of DNA Site-Specifically Modified by Cisplatin, Trans-Diamminedichloroplatinum(II) and Cis-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(N<sub>3</sub>-Cytosine)Cl]<sup>+</sup>. *Biophys. Chem.* **1990**, *35*, 179–188, doi:10.1016/0301-4622(90)80007-T.
33. Huang, H.; Zhu, L.; Reid, B.R.; Drobny, G.P.; Hopkins, P.B. Solution Structure of a Cisplatin-Induced DNA Interstrand Cross-Link. *Science* **1995**, *270*, 1842–1845, doi:10.1126/science.270.5243.1842.
34. Malinge, J.-M.; Pérez, C.; Leng, M. Base Sequence-Independent Distortions Induced by Interstrand Cross-Links in Cis -Diamminedichloroplatinum (II)-Modified DNA. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 3834–3839, doi:10.1093/nar/22.19.3834.
35. Villani, G.; Gac, N.T.L.; Hoffmann, J.-S. Replication of Platinated DNA and Its Mutagenic Consequences. In *Cisplatin*; John Wiley & Sons, Ltd, 1999; pp. 135–157 ISBN 978-3-906390-42-0.
36. Tremeau-Bravard, A.; Riedl, T.; Egly, J.-M.; Dahmus, M.E. Fate of RNA Polymerase II Stalled at a Cisplatin Lesion\*. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 7751–7759, doi:10.1074/jbc.M309853200.
37. Cullinane, C.; Mazur, S.J.; Essigmann, J.M.; Phillips, D.R.; Bohr, V.A. Inhibition of RNA Polymerase II Transcription in Human Cell Extracts by Cisplatin DNA Damage. *Biochemistry* **1999**, *38*, 6204–6212, doi:10.1021/bi982685+.

38. Tornaletti, S.; Patrick, S.M.; Turchi, J.J.; Hanawalt, P.C. Behavior of T7 RNA Polymerase and Mammalian RNA Polymerase II at Site-Specific Cisplatin Adducts in the Template DNA\*. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 35791–35797, doi:10.1074/jbc.M305394200.
39. Lainé, J.-P.; Egly, J.-M. Initiation of DNA Repair Mediated by a Stalled RNA Polymerase IIO. *EMBO J.* **2006**, *25*, 387–397, doi:10.1038/sj.emboj.7600933.
40. Jung, Y.; Lippard, S.J. Multiple States of Stalled T7 RNA Polymerase at DNA Lesions Generated by Platinum Anticancer Agents\*. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 52084–52092, doi:10.1074/jbc.M310120200.
41. Luger, K. Dynamic Nucleosomes. *Chromosome Res.* **2006**, *14*, 5–16, doi:10.1007/s10577-005-1026-1.
42. Workman, J.L. Nucleosome Displacement in Transcription. *Genes Dev.* **2006**, *20*, 2009–2017, doi:10.1101/gad.1435706.
43. Harder, H.C.; Smith, R.G.; Leroy, A.F. Template Primer Inactivation by Cis- and Trans-Dichlorodiammine Platinum for Human DNA Polymerase  $\alpha$ ,  $\beta$ , and Rauscher Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, as a Mechanism of Cytotoxicity. *Cancer Res.* **1976**, *36*, 3821–3829.
44. Sorenson, C.M.; Eastman, A. Mechanism of Cis-Diamminedichloroplatinum(II)-Induced Cytotoxicity: Role of G2 Arrest and DNA Double-Strand Breaks. *Cancer Res.* **1988**, *48*, 4484–4488.
45. Huang, J.C.; Zamble, D.B.; Reardon, J.T.; Lippard, S.J.; Sancar, A. HMG-Domain Proteins Specifically Inhibit the Repair of the Major DNA Adduct of the Anticancer Drug Cisplatin by Human Excision Nuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, *91*, 10394–10398, doi:10.1073/pnas.91.22.10394.
46. Zamble, D.B.; Mu, D.; Reardon, J.T.; Sancar, A.; Lippard, S.J. Repair of Cisplatin–DNA Adducts by the Mammalian Excision Nuclease. *Biochemistry* **1996**, *35*, 10004–10013, doi:10.1021/bi960453+.
47. Park, S.; Lippard, S.J. Redox State-Dependent Interaction of HMGB1 and Cisplatin-Modified DNA. *Biochemistry* **2011**, *50*, 2567–2574, doi:10.1021/bi2000214.
48. Thomas, J.O. HMG1 and 2: Architectural DNA-Binding Proteins. *Biochem. Soc. Trans.* **2001**, *29*, 395–401, doi:10.1042/bst0290395.
49. Burger, A.M.; Double, J.A.; Newell, D.R. Inhibition of Telomerase Activity by Cisplatin in Human Testicular Cancer Cells. *Eur. J. Cancer* **1997**, *33*, 638–644, doi:10.1016/S0959-8049(96)00521-7.
50. Furuta, M.; Nozawa, K.; Takemura, M.; Izuta, S.; Murate, T.; Tsuchiya, M.; Yoshida, K.; Taka, N.; Nimura, Y.; Yoshida, S. A Novel Platinum Compound Inhibits Telomerase Activity in Vitro and Reduces Telomere Length in a Human Hepatoma Cell Line. *Int. J. Cancer* **2003**, *104*, 709–715, doi:https://doi.org/10.1002/ijc.11022.
51. Mese, H.; Ueyama, Y.; Suzuki, A.; Nakayama, S.; Sasaki, A.; Hamakawa, H.; Matsumura, T. Inhibition of Telomerase Activity as a Measure of Tumor Cell Killing by Cisplatin in Squamous Cell Carcinoma Cell Line. *Chemotherapy* **2001**, *47*, 136–142, doi:10.1159/000048513.
52. Masutomi, K.; Hahn, W.C. Telomerase and Tumorigenesis. *Cancer Lett.* **2003**, *194*, 163–172, doi:10.1016/S0304-3835(02)00703-6.
53. Pommier, Y.; Leo, E.; Zhang, H.; Marchand, C. DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs. *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 421–433, doi:10.1016/j.chembiol.2010.04.012.
54. Neumann, S.; Simon, H.; Zimmer, C.; Quiñones, A. The Antitumor Agent Cisplatin Inhibits DNA Gyrase and Preferentially Induces GyrB Gene Expression in *Escherichia Coli*. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler* **1996**, *377*, 731–740, doi:10.1515/bchm3.1996.377.11.731.
55. Malina, J.; Vrana, O.; Brabec, V. Mechanistic Studies of the Modulation of Cleavage Activity of Topoisomerase I by DNA Adducts of Mono- and Bi-Functional PtII Complexes. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 5432–5442, doi:10.1093/nar/gkp580.
56. Rocha, C.; Silva, M.; Quinet, A.; Cabral-Neto, J.; Menck, C. DNA Repair Pathways and Cisplatin Resistance: An Intimate Relationship. *Clinics* **2018**, *73*, e478, doi:10.6061/clinics/2018/e478s.

57. Malina, J.; Kasparkova, J.; Natile, G.; Brabec, V. Recognition of Major DNA Adducts of Enantiomeric Cisplatin Analogs by HMG Box Proteins and Nucleotide Excision Repair of These Adducts. *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 629–638, doi:10.1016/S1074-5521(02)00134-5.
58. Menck, C.F.; Munford, V. DNA Repair Diseases: What Do They Tell Us about Cancer and Aging? *Genet. Mol. Biol.* **2014**, *37*, 220–233, doi:10.1590/S1415-47572014000200008.
59. Köberle, B.; Grimaldi, K.A.; Sunter, A.; Hartley, J.A.; Kelland, L.R.; Masters, J.R.W. DNA Repair Capacity and Cisplatin Sensitivity of Human Testis Tumour Cells. *Int. J. Cancer* **1997**, *70*, 551–555, doi:https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19970304)70:5<551::AID-IJC10>3.0.CO;2-G.
60. Usanova, S.; Piée-Staffa, A.; Sied, U.; Thomale, J.; Schneider, A.; Kaina, B.; Köberle, B. Cisplatin Sensitivity of Testis Tumour Cells Is Due to Deficiency in Interstrand-Crosslink Repair and Low ERCC1-XPF Expression. *Mol. Cancer* **2010**, *9*, 248, doi:10.1186/1476-4598-9-248.
61. Welsh, C.; Day, R.; McGurk, C.; Masters, J.R.W.; Wood, R.D.; Köberle, B. Reduced Levels of XPA, ERCC1 and XPF DNA Repair Proteins in Testis Tumor Cell Lines. *Int. J. Cancer* **2004**, *110*, 352–361, doi:https://doi.org/10.1002/ijc.20134.
62. Johnson, S.W.; Ferry, K.V.; Hamilton, T.C. Recent Insights into Platinum Drug Resistance in Cancer. *Drug Resist. Updat.* **1998**, *1*, 243–254, doi:10.1016/S1368-7646(98)80005-8.
63. Martin, S.A.; Lord, C.J.; Ashworth, A. Therapeutic Targeting of the DNA Mismatch Repair Pathway. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 5107–5113, doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0821.
64. Fram, R.J.; Cusick, P.S.; Wilson, J.M.; Marinus, M.G. Mismatch Repair of Cis-Diamminedichloroplatinum(II)-Induced DNA Damage. *Mol. Pharmacol.* **1985**, *28*, 51–55.
65. Kartalou, M.; Samson, L.D.; Essigmann, J.M. Cisplatin Adducts Inhibit 1,N<sup>6</sup>-Ethenoadenine Repair by Interacting with the Human 3-Methyladenine DNA Glycosylase. *Biochemistry* **2000**, *39*, 8032–8038, doi:10.1021/bi000417h.
66. Deans, A.J.; West, S.C. DNA Interstrand Crosslink Repair and Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 467–480, doi:10.1038/nrc3088.
67. Muniandy, P.A.; Liu, J.; Majumdar, A.; Liu, S.; Seidman, M.M. DNA Interstrand Crosslink Repair in Mammalian Cells: Step by Step. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2010**, *45*, 23–49, doi:10.3109/10409230903501819.
68. Roos, W.P.; Kaina, B. DNA Damage-Induced Cell Death: From Specific DNA Lesions to the DNA Damage Response and Apoptosis. *Cancer Lett.* **2013**, *332*, 237–248, doi:10.1016/j.canlet.2012.01.007.
69. Sale, J.E. Competition, Collaboration and Coordination – Determining How Cells Bypass DNA Damage. *J. Cell Sci.* **2012**, *125*, 1633–1643, doi:10.1242/jcs.094748.
70. Lange, S.S.; Takata, K.; Wood, R.D. DNA Polymerases and Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 96–110, doi:10.1038/nrc2998.
71. Sale, J.E. Translesion DNA Synthesis and Mutagenesis in Eukaryotes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*, a012708, doi:10.1101/cshperspect.a012708.
72. Yang, K.; Weinacht, C.P.; Zhuang, Z. Regulatory Role of Ubiquitin in Eukaryotic DNA Translesion Synthesis. *Biochemistry* **2013**, *52*, 3217–3228, doi:10.1021/bi400194r.
73. Sale, J.E.; Lehmann, A.R.; Woodgate, R. Y-Family DNA Polymerases and Their Role in Tolerance of Cellular DNA Damage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 141–152, doi:10.1038/nrm3289.
74. Shachar, S.; Ziv, O.; Avkin, S.; Adar, S.; Wittschieben, J.; Reißner, T.; Chaney, S.; Friedberg, E.C.; Wang, Z.; Carell, T.; et al. Two-Polymerase Mechanisms Dictate Error-Free and Error-Prone Translesion DNA Synthesis in Mammals. *EMBO J.* **2009**, *28*, 383–393, doi:10.1038/emboj.2008.281.
75. Rizzo, A.A.; Korzhnev, D.M. The Rev1-Pol $\zeta$  translesion synthesis mutasome: Structure, interactions and inhibition. In *The Enzymes*; Elsevier, 2019; Vol. 45, pp. 139–181 ISBN 978-0-12-817396-1.
76. Shilkin, E.S.; Boldinova, E.O.; Stolyarenko, A.D.; Goncharova, R.I.; Chuprov-Netochin, R.N.; Khairullin, R.F.; Smal, M.P.; Makarova, A.V. Translesion DNA Synthesis and Carcinogenesis. *Biochem. Mosc.* **2020**, *85*, 425–435, doi:10.1134/S0006297920040033.
77. Ignatov, A.V.; Bondarenko, K.A.; Makarova, A.V. Non-Bulky Lesions in Human DNA: The Ways of Formation, Repair, and Replication. *Acta Naturae* **2017**, *9*, 12–26.

78. Stern, H.R.; Sefcikova, J.; Chaparro, V.E.; Beuning, P.J. Mammalian DNA Polymerase Kappa Activity and Specificity. *Molecules* **2019**, *24*, 2805, doi:10.3390/molecules24152805.
79. Washington, M.T.; Minko, I.G.; Johnson, R.E.; Wolfle, W.T.; Harris, T.M.; Lloyd, R.S.; Prakash, S.; Prakash, L. Efficient and Error-Free Replication Past a Minor-Groove DNA Adduct by the Sequential Action of Human DNA Polymerases  $\iota$  and  $\kappa$ . *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 5687–5693, doi:10.1128/MCB.24.13.5687-5693.2004.
80. Johnson, R.E.; Prakash, L.; Prakash, S. Biochemical Evidence for the Requirement of Hoogsteen Base Pairing for Replication by Human DNA Polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102*, 10466–10471, doi:10.1073/pnas.0503859102.
81. Masutani, C.; Kusumoto, R.; Yamada, A.; Dohmae, N.; Yokoi, M.; Yuasa, M.; Araki, M.; Iwai, S.; Takio, K.; Hanaoka, F. The XPV (Xeroderma Pigmentosum Variant) Gene Encodes Human DNA Polymerase  $\eta$ . *Nature* **1999**, *399*, 700–704, doi:10.1038/21447.
82. Vaisman, A.; Masutani, C.; Hanaoka, F.; Chaney, S.G. Efficient Translesion Replication Past Oxaliplatin and Cisplatin GpG Adducts by Human DNA Polymerase  $\eta$  <sup>†</sup>. *Biochemistry* **2000**, *39*, 4575–4580, doi:10.1021/bi000130k.
83. Masutani, C. Mechanisms of Accurate Translesion Synthesis by Human DNA Polymerase Eta. *EMBO J.* **2000**, *19*, 3100–3109, doi:10.1093/emboj/19.12.3100.
84. Albertella, M.R.; Green, C.M.; Lehmann, A.R.; O'Connor, M.J. A Role for Polymerase  $\eta$  in the Cellular Tolerance to Cisplatin-Induced Damage. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 9799–9806, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1095.
85. Lee, Y.-S.; Gregory, M.T.; Yang, W. Human Pol Purified with Accessory Subunits Is Active in Translesion DNA Synthesis and Complements Pol in Cisplatin Bypass. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111*, 2954–2959, doi:10.1073/pnas.1324001111.
86. Zander, L.; Bemark, M. Immortalized Mouse Cell Lines That Lack a Functional Rev3 Gene Are Hypersensitive to UV Irradiation and Cisplatin Treatment. *DNA Repair* **2004**, *3*, 743–752, doi:10.1016/j.dnarep.2004.03.031.
87. Hicks, J.K.; Chute, C.L.; Paulsen, M.T.; Ragland, R.L.; Howlett, N.G.; Guéranger, Q.; Glover, T.W.; Canman, C.E. Differential Roles for DNA Polymerases Eta, Zeta, and REV1 in Lesion Bypass of Intrastrand versus Interstrand DNA Cross-Links. *Mol. Cell. Biol.* **2010**, *30*, 1217–1230, doi:10.1128/MCB.00993-09.
88. Murakumo, Y.; Ogura, Y.; Ishii, H.; Numata, S.; Ichihara, M.; Croce, C.M.; Fishel, R.; Takahashi, M. Interactions in the Error-Prone Postreplication Repair Proteins HREV1, HREV3, and HREV7. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 35644–35651, doi:10.1074/jbc.M102051200.
89. Loh, S.Y.; Mistry, P.; Kelland, L.R.; Abel, G.; Harrap, K.R. Reduced Drug Accumulation as a Major Mechanism of Acquired Resistance to Cisplatin in a Human Ovarian Carcinoma Cell Line: Circumvention Studies Using Novel Platinum (II) and (IV) Ammine/Amine Complexes. *Br. J. Cancer* **1992**, *66*, 1109–1115, doi:10.1038/bjc.1992.419.
90. Ishida, S.; Lee, J.; Thiele, D.J.; Herskowitz, I. Uptake of the Anticancer Drug Cisplatin Mediated by the Copper Transporter Ctr1 in Yeast and Mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 14298–14302, doi:10.1073/pnas.162491399.
91. Safaei, R.; Holzer, A.K.; Katano, K.; Samimi, G.; Howell, S.B. The Role of Copper Transporters in the Development of Resistance to Pt Drugs. *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 1607–1613, doi:10.1016/j.jinorgbio.2004.05.006.
92. Samimi, G.; Safaei, R.; Katano, K.; Holzer, A.K.; Rochdi, M.; Tomioka, M.; Goodman, M.; Howell, S.B. Increased Expression of the Copper Efflux Transporter ATP7A Mediates Resistance to Cisplatin, Carboplatin, and Oxaliplatin in Ovarian Cancer Cells. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 4661–4669, doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0137.
93. Mezenzev, R. Interactions of Cisplatin with Non-DNA Targets and Their Influence on Anticancer Activity and Drug Toxicity: The Complex World of the Platinum Complex. *Curr. Cancer Drug Targets* **2014**, *14*, 794–816.
94. Casini, A.; Reedijk, J. Interactions of Anticancer Pt Compounds with Proteins: An Overlooked Topic in Medicinal Inorganic Chemistry? *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 3135–3144, doi:10.1039/C2SC20627G.
95. Ferraro, G.; Massai, L.; Messori, L.; Merlino, A. Cisplatin Binding to Human Serum Albumin: A Structural Study. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 9436–9439, doi:10.1039/C5CC01751C.

96. Chu, G. Cellular Responses to Cisplatin. The Roles of DNA-Binding Proteins and DNA Repair. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 787–790, doi:10.1016/S0021-9258(17)42175-2.
97. Lau, J.K.-C.; Deubel, D.V. Loss of Ammine from Platinum(II) Complexes: Implications for Cisplatin Inactivation, Storage, and Resistance. *Chem. - Eur. J.* **2005**, *11*, 2849–2855, doi:10.1002/chem.200401053.
98. Janus, F.; Albrechtsen, N.; Dornreiter, I.; Wiesmüller, L.; Grosse, F.; Deppert, W. The Dual Role Model for P53 in Maintaining Genomic Integrity. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **1999**, *55*, 12–27, doi:10.1007/s000180050266.
99. O'Connor, P.M.; Jackman, J.; Bae, I.; Myers, T.G.; Fan, S.; Mutoh, M.; Scudiero, D.A.; Monks, A.; Sausville, E.A.; Weinstein, J.N.; et al. Characterization of the P53 Tumor Suppressor Pathway in Cell Lines of the National Cancer Institute Anticancer Drug Screen and Correlations with the Growth-Inhibitory Potency of 123 Anticancer Agents. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 4285–4300.
100. Kleih, M.; Böpple, K.; Dong, M.; Gaißler, A.; Heine, S.; Olayioye, M.A.; Aulitzky, W.E.; Essmann, F. Direct Impact of Cisplatin on Mitochondria Induces ROS Production That Dictates Cell Fate of Ovarian Cancer Cells. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 1–12, doi:10.1038/s41419-019-2081-4.
101. Florea, A.-M.; Büsselberg, D. Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. *Cancers* **2011**, *3*, 1351–1371, doi:10.3390/cancers3011351.
102. Devarajan, P.; Savoca, M.; Castaneda, M.P.; Park, M.S.; Esteban-Cruciani, N.; Kalinec, G.; Kalinec, F. Cisplatin-Induced Apoptosis in Auditory Cells: Role of Death Receptor and Mitochondrial Pathways. *Hear. Res.* **2002**, *174*, 45–54, doi:10.1016/S0378-5955(02)00634-2.
103. Wong, R.S. Apoptosis in Cancer: From Pathogenesis to Treatment. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2011**, *30*, 87, doi:10.1186/1756-9966-30-87.
104. Lovejoy, K.S.; Lippard, S.J. Non-Traditional Platinum Compounds for Improved Accumulation, Oral Bioavailability, and Tumor Targeting. *Dalton Trans.* **2009**, 10651, doi:10.1039/b913896j.
105. Kostova, I. Platinum Complexes as Anticancer Agents. *Recent Patents Anticancer Drug Discov.* **2006**, *1*, 1–22, doi:10.2174/157489206775246458.
106. Wheate, N.J.; Walker, S.; Craig, G.E.; Oun, R. The Status of Platinum Anticancer Drugs in the Clinic and in Clinical Trials. *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 8113–8127, doi:10.1039/c0dt00292e.
107. Muhammad, N.; Guo, Z. Metal-Based Anticancer Chemotherapeutic Agents. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 144–153, doi:10.1016/j.cbpa.2014.02.003.
108. Wang, X. Fresh Platinum Complexes with Promising Antitumor Activity. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2010**, *10*, 396–411, doi:10.2174/1871520611009050396.
109. Zorbas-Seifried, S.; Hartinger, C.G.; Meelich, K.; Galanski, M.; Keppler, B.K.; Zorbas, H. DNA Interactions of PH-Sensitive, Antitumor Bis(Aminoalcohol)Dichloroplatinum(II) Complexes <sup>†</sup> · <sup>‡</sup>. *Biochemistry* **2006**, *45*, 14817–14825, doi:10.1021/bi061063i.
110. Hall, M.D.; Mellor, H.R.; Callaghan, R.; Hambley, T.W. Basis for Design and Development of Platinum(IV) Anticancer Complexes. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3403–3411, doi:10.1021/jm070280u.
111. Dancey, J.E.; Chen, H.X. Strategies for Optimizing Combinations of Molecularly Targeted Anticancer Agents. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 649–659, doi:10.1038/nrd2089.
112. Momekov, G.; Momekova, D. Recent Developments in Antitumour Platinum Coordination Compounds. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2006**, *16*, 1383–1403, doi:10.1517/13543776.16.10.1383.
113. Galanski, M.; Keppler, B.K. Searching for the Magic Bullet: Anticancer Platinum Drugs Which Can Be Accumulated or Activated in the Tumor Tissue. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2007**, *7*, 55–73, doi:10.2174/187152007779314017.
114. Iyer, A.K.; Khaled, G.; Fang, J.; Maeda, H. Exploiting the Enhanced Permeability and Retention Effect for Tumor Targeting. *Drug Discov. Today* **2006**, *11*, 812–818, doi:10.1016/j.drudis.2006.07.005.

115. Dougherty, T.J.; Gomer, C.J.; Henderson, B.W.; Jori, G.; Kessel, D.; Korbek, M.; Moan, J.; Peng, Q. Photodynamic Therapy. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, *90*, 889–905, doi:10.1093/jnci/90.12.889.
116. Kleine, M.; Wolters, D.; Sheldrick, W.S. The Influence of Methionine-Containing Peptides on the Reaction of Carboplatin with 5'-Guanosine Monophosphate: A Comparison with Cisplatin. *J. Inorg. Biochem.* **2003**, *97*, 354–363, doi:10.1016/S0162-0134(03)00289-7.
117. Frey, U.; Ranford, J.D.; Sadler, P.J. Ring-Opening Reactions of the Anticancer Drug Carboplatin: NMR Characterization of Cis-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(CBDCA-O)(5'-GMP-N7)] in Solution. *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 1333–1340, doi:10.1021/ic00060a005.
118. Blommaert, F.A.; van Dijk-Knijnenburg, H.C.M.; Dijt, F.J.; den Engelse, L.; Baan, R.A.; Berends, F.; Fichtinger-Schepman, A.M.J. Formation of DNA Adducts by the Anticancer Drug Carboplatin: Different Nucleotide Sequence Preferences in Vitro and in Cells. *Biochemistry* **1995**, *34*, 8474–8480, doi:10.1021/bi00026a031.
119. Barnham, K.J.; Djuran, M.I.; Murdoch, P. del S.; Ranford, J.D.; Sadler, P.J. Ring-Opened Adducts of the Anticancer Drug Carboplatin with Sulfur Amino Acids. *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 1065–1072, doi:10.1021/ic950973d.
120. Woynarowski, J.M.; Chapman, W.G.; Napier, C.; Herzig, M.C.S.; Juniewicz, P. Sequence- and Region-Specificity of Oxaliplatin Adducts in Naked and Cellular DNA. *Mol. Pharmacol.* **1998**, *54*, 770–777, doi:10.1124/mol.54.5.770.
121. Kasparkova, J.; Vojtiskova, M.; Natile, G.; Brabec, V. Unique Properties of DNA Interstrand Cross-Links of Antitumor Oxaliplatin and the Effect of Chirality of the Carrier Ligand. *Chem. – Eur. J.* **2008**, *14*, 1330–1341, doi:https://doi.org/10.1002/chem.200701352.
122. Reardon, J.T.; Vaisman, A.; Chaney, S.G.; Sancar, A. Efficient Nucleotide Excision Repair of Cisplatin, Oxaliplatin, and Bis-Aceto-Ammine-Dichloro-Cyclohexylamine-Platinum(IV) (JM216) Platinum Intrastrand DNA Diadducts. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 3968–3971.
123. Wu, H.I.; Brown, J.A.; Dorie, M.J.; Lazzeroni, L.; Brown, J.M. Genome-Wide Identification of Genes Conferring Resistance to the Anticancer Agents Cisplatin, Oxaliplatin, and Mitomycin C. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 3940–3948, doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-3113.
124. Woynarowski, J.M.; Faivre, S.; Herzig, M.C.S.; Arnett, B.; Chapman, W.G.; Trevino, A.V.; Raymond, E.; Chaney, S.G.; Vaisman, A.; Varchenko, M.; et al. Oxaliplatin-Induced Damage of Cellular DNA. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *58*, 920–927, doi:10.1124/mol.58.5.920.
125. Bruno, P.M.; Liu, Y.; Park, G.Y.; Murai, J.; Koch, C.E.; Eisen, T.J.; Pritchard, J.R.; Pommier, Y.; Lippard, S.J.; Hemann, M.T. A Subset of Platinum-Containing Chemotherapeutic Agents Kills Cells by Inducing Ribosome Biogenesis Stress. *Nat. Med.* **2017**, *23*, 461–471, doi:10.1038/nm.4291.
126. Kanzawa, F.; Koizumi, F.; Koh, Y.; Nakamura, T.; Tatsumi, Y.; Fukumoto, H.; Saijo, N.; Yoshioka, T.; Nishio, K. In Vitro Synergistic Interactions between the Cisplatin Analogue Nedaplatin and the DNA Topoisomerase I Inhibitor Irinotecan and the Mechanism of This Interaction. *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 202–209.
127. Liu, W.; Jiang, J.; Xie, C.; Hou, S.; Quan, H.; Ye, Q.; Lou, L. Synthesis, Anticancer Activity and Toxicity of a Water-Soluble 4S,5S-Derivative of Heptaplatin, Cis-{Pt(II)[(4S,5S)-4,5-Bis(Aminomethyl)-2-Isopropyl-1,3-Dioxolane]·(3-Hydroxyl-Cyclobutane-1,1-Dicarboxylate)}. *J. Inorg. Biochem.* **2014**, *140*, 126–130, doi:10.1016/j.jinorgbio.2014.07.013.
128. McKeage, M.J. Lobaplatin: A New Antitumour Platinum Drug. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2001**, *10*, 119–128, doi:10.1517/13543784.10.1.119.
129. Uehara, T.; Yamate, J.; Torii, M.; Maruyama, T. Comparative Nephrotoxicity of Cisplatin and Nedaplatin: Mechanisms and Histopathological Characteristics. *J. Toxicol. Pathol.* **2011**, *24*, 87–94, doi:10.1293/tox.24.87.
130. Boulikas, T.; Pantos, A.; Bellis, E.; Christofis, P. Designing Platinum Compounds in Cancer: Structures and Mechanisms. *Cancer Therapy* **2007**, *5*, 537–583.
131. Dilruba, S.; Kalayda, G.V. Platinum-Based Drugs: Past, Present and Future. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2016**, *77*, 1103–1124, doi:10.1007/s00280-016-2976-z.
132. Baruah, H.; Rector, C.L.; Monnier, S.M.; Bierbach, U. Mechanism of Action of Non-Cisplatin Type DNA-Targeted Platinum Anticancer Agents: DNA Interactions of Novel Acridinylthioureas and Their Platinum Conjugates. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *64*, 191–200, doi:10.1016/S0006-2952(02)01107-3.

133. Ma, Z.; Choudhury, J.R.; Wright, M.W.; Day, C.S.; Saluta, G.; Kucera, G.L.; Bierbach, U. A Non-Cross-Linking Platinum–Acridine Agent with Potent Activity in Non-Small-Cell Lung Cancer. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 7574–7580, doi:10.1021/jm800900g.
134. Cheung-Ong, K.; Song, K.T.; Ma, Z.; Shabtai, D.; Lee, A.Y.; Gallo, D.; Heisler, L.E.; Brown, G.W.; Bierbach, U.; Giaever, G.; et al. Comparative Chemogenomics To Examine the Mechanism of Action of DNA-Targeted Platinum–Acridine Anticancer Agents. *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 1892–1901, doi:10.1021/cb300320d.
135. Suryadi, J.; Bierbach, U. DNA Metalating-Intercalating Hybrid Agents for the Treatment of Chemoresistant Cancers. *Chem. - Eur. J.* **2012**, *18*, 12926–12934, doi:10.1002/chem.201202050.
136. Kostrhunova, H.; Malina, J.; Pickard, A.J.; Stepankova, J.; Vojtiskova, M.; Kasparkova, J.; Muchova, T.; Rohlfing, M.L.; Bierbach, U.; Brabec, V. Replacement of a Thiourea with an Amidine Group in a Monofunctional Platinum–Acridine Antitumor Agent. Effect on DNA Interactions, DNA Adduct Recognition and Repair. *Mol. Pharm.* **2011**, *8*, 1941–1954, doi:10.1021/mp200309x.
137. Smyre, C.L.; Saluta, G.; Kute, T.E.; Kucera, G.L.; Bierbach, U. Inhibition of DNA Synthesis by a Platinum–Acridine Hybrid Agent Leads to Potent Cell Kill in Nonsmall Cell Lung Cancer. *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 870–874, doi:10.1021/ml2001888.
138. Hollis, L.S.; Amundsen, A.R.; Stern, E.W. Chemical and Biological Properties of a New Series of Cis-Diammineplatinum(II) Antitumor Agents Containing Three Nitrogen Donors: Cis-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(N-Donor)Cl]<sup>+</sup>. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 128–136, doi:10.1021/jm00121a024.
139. Hollis, L.S.; Sundquist, W.I.; Burstyn, J.N.; Heiger-Bernays, W.J.; Bellon, S.F.; Ahmed, K.J.; Amundsen, A.R.; Stern, E.W.; Lippard, S.J. Mechanistic Studies of a Novel Class of Trisubstituted Platinum(II) Antitumor Agents. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 1866–1875.
140. Lovejoy, K.S.; Todd, R.C.; Zhang, S.; McCormick, M.S.; D’Aquino, J.A.; Reardon, J.T.; Sancar, A.; Giacomini, K.M.; Lippard, S.J. Cis-Diammine(Pyridine)Chloroplatinum(II), a Monofunctional Platinum(II) Antitumor Agent: Uptake, Structure, Function, and Prospects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 8902–8907, doi:10.1073/pnas.0803441105.
141. Johnstone, T.C.; Park, G.Y.; Lippard, S.J. Understanding and Improving Platinum Anticancer Drugs – Phenanthriplatin. *Anticancer Res.* **2014**, *34*, 471–476.
142. Mlcouskova, J.; Kasparkova, J.; Suchankova, T.; Komeda, S.; Brabec, V. DNA Conformation and Repair of Polymeric Natural DNA Damaged by Antitumor Azolato-Bridged Dinuclear PtII Complex. *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *114*, 15–23, doi:10.1016/j.jinorgbio.2012.04.015.
143. Mlcouskova, J.; Malina, J.; Novohradsky, V.; Kasparkova, J.; Komeda, S.; Brabec, V. Energetics, Conformation, and Recognition of DNA Duplexes Containing a Major Adduct of an Anticancer Azolato-Bridged Dinuclear PtII Complex. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **2012**, *1820*, 1502–1511, doi:10.1016/j.bbagen.2012.05.014.
144. Komeda, S.; Takayama, H.; Suzuki, T.; Odani, A.; Yamori, T.; Chikuma, M. Synthesis of Antitumor Azolato-Bridged Dinuclear Platinum(Ii) Complexes with in Vivo Antitumor Efficacy and Unique in Vitro Cytotoxicity Profiles†. *Metallomics* **2013**, *5*, 461–468, doi:10.1039/c3mt00040k.
145. Uemura, M.; Suzuki, T.; Nishio, K.; Chikuma, M.; Komeda, S. An in Vivo Highly Antitumor-Active Tetrazolato-Bridged Dinuclear Platinum(Ii) Complex Largely Circumvents in Vitro Cisplatin Resistance: Two Linkage Isomers Yield the Same Product upon Reaction with 9-Ethylguanine but Exhibit Different Cytotoxic Profiles†. *Metallomics* **2012**, *4*, 686–692, doi:10.1039/c2mt20026k.
146. Perego, P.; Gatti, L.; Caserini, C.; Supino, R.; Colangelo, D.; Leone, R.; Spinelli, S.; Farrell, N.; Zunino, F. The Cellular Basis of the Efficacy of the Trinuclear Platinum Complex BBR 3464 against Cisplatin-Resistant Cells. *J. Inorg. Biochem.* **1999**, *77*, 59–64, doi:10.1016/S0162-0134(99)00142-7.
147. Kabolizadeh, P.; Ryan, J.; Farrell, N. Differences in the Cellular Response and Signaling Pathways of Cisplatin and BBR3464 ( $\{[trans-PtCl(NH_3)_2]_2\mu-(Trans-Pt(NH_3)_2(H_2N(CH_2)_6-NH_2)_2)4+\}$ ) Influenced by Copper Homeostasis. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *73*, 1270–1279, doi:10.1016/j.bcp.2006.12.016.



148. Summa, N.; Maigut, J.; Puchta, R.; van Eldik, R. Possible Biotransformation Reactions of Polynuclear Pt(II) Complexes. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 2094–2104, doi:10.1021/ic061990d.
149. Zehnulova, J.; Kasparkova, J.; Farrell, N.; Brabec, V. Conformation, Recognition by High Mobility Group Domain Proteins, and Nucleotide Excision Repair of DNA Intrastrand Cross-Links of Novel Antitumor Trinuclear Platinum Complex BBR3464\*. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 22191–22199, doi:10.1074/jbc.M103118200.
150. Kasparkova, J.; Zehnulova, J.; Farrell, N.; Brabec, V. DNA Interstrand Cross-Links of the Novel Antitumor Trinuclear Platinum Complex BBR3464: CONFORMATION, RECOGNITION BY HIGH MOBILITY GROUP DOMAIN PROTEINS, AND NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR\*. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 48076–48086, doi:10.1074/jbc.M208016200.
151. Hegmans, A.; Berners-Price, S.J.; Davies, M.S.; Thomas, D.S.; Humphreys, A.S.; Farrell, N. Long Range 1,4 and 1,6-Interstrand Cross-Links Formed by a Trinuclear Platinum Complex. Minor Groove Preassociation Affects Kinetics and Mechanism of Cross-Link Formation as Well as Adduct Structure. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2166–2180, doi:10.1021/ja036105u.
152. Manzotti, C.; Pratesi, G.; Menta, E.; Domenico, R.D.; Cavalletti, E.; Fiebig, H.H.; Kelland, L.R.; Farrell, N.; Polizzi, D.; Supino, R.; et al. BBR 3464: A Novel Triplatinum Complex, Exhibiting a Preclinical Profile of Antitumor Efficacy Different from Cisplatin. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 2626–2634.
153. Jodrell, D.I.; Evans, T.R.J.; Steward, W.; Cameron, D.; Prendiville, J.; Aschele, C.; Noberasco, C.; Lind, M.; Carmichael, J.; Dobbs, N.; et al. Phase II Studies of BBR3464, a Novel Tri-Nuclear Platinum Complex, in Patients with Gastric or Gastro-Oesophageal Adenocarcinoma. *Eur. J. Cancer* **2004**, *40*, 1872–1877, doi:10.1016/j.ejca.2004.04.032.
154. Hall, M.D.; Hambley, T.W. Platinum(IV) Antitumour Compounds: Their Bioinorganic Chemistry. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *232*, 49–67, doi:10.1016/S0010-8545(02)00026-7.
155. Pizarro, A.M.; Sadler, P.J. Unusual DNA Binding Modes for Metal Anticancer Complexes. *Biochimie* **2009**, *91*, 1198–1211, doi:10.1016/j.biochi.2009.03.017.
156. Hu, X.; Li, F.; Noor, N.; Ling, D. Platinum Drugs: From Pt(II) Compounds, Pt(IV) Prodrugs, to Pt Nanocrystals/Nanoclusters. *Sci. Bull.* **2017**, *62*, 589–596, doi:10.1016/j.scib.2017.03.008.
157. Bednarski, P.J.; Mackay, F.S.; Sadler, P.J. Photoactivatable Platinum Complexes. *Anti-Cancer Agents Med. Chem. - Anti-Cancer Agents* **2007**, *7*, 75–93, doi:10.2174/187152007779314053.
158. Juzeniene, A.; Peng, Q.; Moan, J. Milestones in the Development of Photodynamic Therapy and Fluorescence Diagnosis. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2007**, *6*, 1234–1245, doi:10.1039/B705461K.
159. Juarranz, Á.; Jaén, P.; Sanz-Rodríguez, F.; Cuevas, J.; González, S. Photodynamic Therapy of Cancer. Basic Principles and Applications. *Clin. Transl. Oncol.* **2008**, *10*, 148–154, doi:10.1007/s12094-008-0172-2.
160. Štarha, P.; Trávníček, Z.; Dvořák, Z.; Radošová-Muchová, T.; Prachařová, J.; Vančo, J.; Kašpárková, J. Potentiating Effect of UVA Irradiation on Anticancer Activity of Carboplatin Derivatives Involving 7-Azaindoles. *PLOS ONE* **2015**, *10*, e0123595, doi:10.1371/journal.pone.0123595.
161. Mackay, F.S.; Woods, J.A.; Heringová, P.; Kaspárková, J.; Pizarro, A.M.; Moggach, S.A.; Parsons, S.; Brabec, V.; Sadler, P.J. A Potent Cytotoxic Photoactivated Platinum Complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 20743–20748, doi:10.1073/pnas.0707742105.
162. Ronconi, L.; Sadler, P.J. Using Coordination Chemistry to Design New Medicines. *Coord. Chem. Rev.* **2007**, *251*, 1633–1648, doi:10.1016/j.ccr.2006.11.017.
163. Farrer, N.J.; Woods, J.A.; Salassa, L.; Zhao, Y.; Robinson, K.S.; Clarkson, G.; Mackay, F.S.; Sadler, P.J. Inside Cover: A Potent Trans-Diimine Platinum Anticancer Complex Photoactivated by Visible Light (Angew. Chem. Int. Ed. 47/2010). *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 8766–8766, doi:https://doi.org/10.1002/anie.201004988.
164. Pracharova, J.; Zerkankova, L.; Stepankova, J.; Novakova, O.; Farrer, N.J.; Sadler, P.J.; Brabec, V.; Kasparkova, J. Interactions of DNA with a New Platinum(IV) Azide Dipyrindine Complex Activated by UVA and Visible Light: Relationship to Toxicity in Tumor Cells. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 1099–1111, doi:10.1021/tx300057y.

165. Collery, P.; Keppler, B.; Madoulet, C.; Desoize, B. Gallium in Cancer Treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2002**, *42*, 283–296, doi:10.1016/S1040-8428(01)00225-6.
166. Larson, S.M.; Grunbaumi, Z.; Raseyz, J.S. The Role of Transferrins in Gallium Uptake. *Int. J. Nucl. Med. Biol.* **1981**, *8*, 257–266, doi:10.1016/0047-0740(81)90031-0.
167. Rasey, J.S.; Nelson, N.J.; Larson, S.M. Tumor Cell Toxicity of Stable Gallium Nitrate: Enhancement by Transferrin and Protection by Iron. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **1982**, *18*, 661–668, doi:10.1016/0277-5379(82)90212-7.
168. Hayes, R.L.; Rafter, J.J.; Byrd, B.L.; Carlton, J.E. Studies of the in Vivo Entry of Ga-67 into Normal and Malignant Tissue. *J. Nucl. Med.* **1981**, *22*, 325–332.
169. Hedley, D.W.; Tripp, E.H.; Slowiaczek, P.; Mann, G.J. Effect of Gallium on DNA Synthesis by Human T-Cell Lymphoblasts. *Cancer Res.* **1988**, *48*, 3014–3018.
170. Berggren, M.M.; Burns, L.A.; Abraham, R.T.; Powis, G. Inhibition of Protein Tyrosine Phosphatase by the Antitumor Agent Gallium Nitrate. *Cancer Res.* **1993**, *53*, 1862–1866.
171. Perchellet, E.M.; Ladesich, J.B.; Collery, P.; Perchellet, J.-P. Microtubule-Disrupting Effects of Gallium Chloride in Vitro: *Anticancer. Drugs* **1999**, *10*, 477–488, doi:10.1097/00001813-199906000-00008.
172. Chitambar, C.R. Medical Applications and Toxicities of Gallium Compounds. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2010**, *7*, 2337–2361, doi:10.3390/ijerph7052337.
173. Kubista, B.; Schoefl, T.; Mayr, L.; van Schoonhoven, S.; Heffeter, P.; Windhager, R.; Keppler, B.K.; Berger, W. Distinct Activity of the Bone-Targeted Gallium Compound KP46 against Osteosarcoma Cells - Synergism with Autophagy Inhibition. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2017**, *36*, 52, doi:10.1186/s13046-017-0527-z.
174. Afzal, O.; Kumar, S.; Haider, M.R.; Ali, M.R.; Kumar, R.; Jaggi, M.; Bawa, S. A Review on Anticancer Potential of Bioactive Heterocycle Quinoline. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *97*, 871–910, doi:10.1016/j.ejmech.2014.07.044.
175. Timerbaev, A.R. Advances in Developing Tris(8-Quinolinolato)Gallium(III) as an Anticancer Drug: Critical Appraisal and Prospects. *Metallomics* **2009**, *1*, 193, doi:10.1039/b902861g.
176. Chitambar, C.R. Gallium-Containing Anticancer Compounds. *Future Med. Chem.* **2012**, *4*, 1257–1272, doi:10.4155/fmc.12.69.
177. Shi, H.; Romero-Canelón, I.; Hreusova, M.; Novakova, O.; Venkatesh, V.; Habtemariam, A.; Clarkson, G.J.; Song, J.; Brabec, V.; Sadler, P.J. Photoactivatable Cell-Selective Dinuclear *Trans*-Diazidoplatinum(IV) Anticancer Prodrugs. *Inorg. Chem.* **2018**, *57*, 14409–14420, doi:10.1021/acs.inorgchem.8b02599.
178. Hreusová, M.; Nováková, O.; Kostřhunová, H.; Prachařová, J.; Brabec, V.; Kašpárková, J. DNA Modification by Cisplatin-like Pt(II) Complexes Containing 1,1'-Binaphthyl-2,2'-Diamine Ligand Does Not Correlate with Their Antiproliferative Activity in Cancer Cells. *Inorganica Chim. Acta* **2019**, *495*, 118952, doi:10.1016/j.ica.2019.06.003.
179. Hreusova, M.; Novakova, O.; Brabec, V. Thermodynamic Insights by Microscale Thermophoresis into Translesion DNA Synthesis Catalyzed by DNA Polymerases Across a Lesion of Antitumor Platinum–Acridine Complex. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7806, doi:10.3390/ijms21207806.
180. Litecká, M.; Hreusová, M.; Kašpárková, J.; Gyepes, R.; Smolková, R.; Obuch, J.; David, T.; Potočňák, I. Low-Dimensional Compounds Containing Bioactive Ligands. Part XIV: High Selective Antiproliferative Activity of Tris(5-Chloro-8-Quinolinolato)Gallium(III) Complex against Human Cancer Cell Lines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2020**, *30*, 127206, doi:10.1016/j.bmcl.2020.127206.
181. Štros, M. DNA Bending by the Chromosomal Protein HMG1 and Its High Mobility Group Box Domains. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 10355–10361, doi:10.1016/S0021-9258(18)44746-1.
182. Brabec, V.; Kašpárková, J.; Vrána, O.; Nováková, O.; Cox, J.W.; Qu, Y.; Farrell, N. DNA Modifications by a Novel Bifunctional Trinuclear Platinum Phase I Anticancer Agent †. *Biochemistry* **1999**, *38*, 6781–6790, doi:10.1021/bi990124s.
183. Keck, M.V.; Lippard, S.J. Unwinding of Supercoiled DNA by Platinum-Ethidium and Related Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3386–3390, doi:10.1021/ja00035a033.
184. Dabrowiak, J.C.; Goodisman, J.; Souid, A.-K. Kinetic Study of the Reaction of Cisplatin with Thiols. *Drug Metab. Dispos.* **2002**, *30*, 1378–1384, doi:10.1124/dmd.30.12.1378.

185. Brabec, V.; Leng, M. DNA Interstrand Cross-Links of Trans-Diamminedichloroplatinum(II) Are Preferentially Formed between Guanine and Complementary Cytosine Residues. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, *90*, 5345–5349, doi:10.1073/pnas.90.11.5345.
186. Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63, doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.
187. Dolmans, D.E.J.G.J.; Fukumura, D.; Jain, R.K. Photodynamic Therapy for Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 380–387, doi:10.1038/nrc1071.
188. Wong, E.; Giandomenico, C.M. Current Status of Platinum-Based Antitumor Drugs. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2451–2466, doi:10.1021/cr980420v.
189. Malina, J.; Farrell, N.P.; Brabec, V. DNA Condensing Effects and Sequence Selectivity of DNA Binding of Antitumor Noncovalent Polynuclear Platinum Complexes. *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 1662–1671, doi:10.1021/ic402796k.
190. Bombard, S.; Gariboldi, M.B.; Monti, E.; Gabano, E.; Gaviglio, L.; Ravera, M.; Osella, D. Biological Activity of Enantiomeric Complexes [PtCl<sub>2</sub>L<sub>2</sub>] (L<sub>2</sub> Is Aromatic Bisphosphanes and Aromatic Diamines). *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2010**, *15*, 841–850, doi:10.1007/s00775-010-0648-8.
191. Gabano, E.; Gama, S.; Mendes, F.; Gariboldi, M.B.; Monti, E.; Bombard, S.; Bianco, S.; Ravera, M. Study of the Synthesis, Antiproliferative Properties, and Interaction with DNA and Polynucleotides of Cisplatin-like Pt(II) Complexes Containing Carcinogenic Polyaromatic Amines. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2013**, *18*, 791–801, doi:10.1007/s00775-013-1022-4.
192. Sørensen, B.H.; Werth, P.; Lambert, I.H.; Bednarski, P.J. *In Vitro* Evaluation of the Enantiomeric *R*- and *S*-1,1'-Binaphthyl-2,2'-Diaminodichlorido-Pt(II) Complexes in Human Burkitt Lymphoma Cells: Emphasis on Cellular Accumulation, Cytotoxicity, DNA Binding, and Ability to Induce Apoptosis. *Metallomics* **2018**, *10*, 323–336, doi:10.1039/C7MT00237H.
193. Beck, M.W.; Derrick, J.S.; Kerr, R.A.; Oh, S.B.; Cho, W.J.; Lee, S.J.C.; Ji, Y.; Han, J.; Tehrani, Z.A.; Suh, N.; et al. Structure-Mechanism-Based Engineering of Chemical Regulators Targeting Distinct Pathological Factors in Alzheimer's Disease. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 13115, doi:10.1038/ncomms13115.
194. Daniel, K.G.; Gupta, P.; Harbach, R.H.; Guida, W.C.; Dou, Q.P. Organic Copper Complexes as a New Class of Proteasome Inhibitors and Apoptosis Inducers in Human Cancer Cells. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *67*, 1139–1151, doi:10.1016/j.bcp.2003.10.031.
195. Oliveri, V.; Lanza, V.; Milardi, D.; Viale, M.; Maric, I.; Sgarlata, C.; Vecchio, G. Amino- and Chloro-8-Hydroxyquinolines and Their Copper Complexes as Proteasome Inhibitors and Antiproliferative Agents. *Metallomics* **2017**, *9*, 1439–1446, doi:10.1039/C7MT00156H.
196. Vandekerckhove, S.; D'hooghe, M. Quinoline-Based Antimalarial Hybrid Compounds. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 5098–5119, doi:10.1016/j.bmc.2014.12.018.
197. Petruska, J.; Goodman, M.F.; Boosalis, M.S.; Sowers, L.C.; Cheong, C.; Tinoco, I. Comparison between DNA Melting Thermodynamics and DNA Polymerase Fidelity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1988**, *85*, 6252–6256, doi:10.1073/pnas.85.17.6252.
198. Guengerich, F.P. Interactions of Carcinogen-Bound DNA with Individual DNA Polymerases. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 420–452, doi:10.1021/cr0404693.

## Internetové zdroje

- I1 Wikipedia, Nucleotide, (2016) [cit. 7. 12. 2020] Dostupné z: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:0322\\_DNA\\_Nucleotides.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:0322_DNA_Nucleotides.jpg)
- I2 Cheng, Y.S., A handy R function for DNA melting temperature, (2016) [cit. 22. 3. 2021] Dostupné z: <https://yongshengcheng.wordpress.com/2016/06/09/a-hand-y-r-function-for-dna-melting-temperature/>
- I3 National Institutes of Health, U.S. National Library of Medicine, Medline Plus, Carboplatin Injection (2012) [cit. 19. 3. 2021] Dostupné z: <https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a695017.html>

## 7 Zoznam skratiek

A – adenín

AAS – atómová absorpčná spektroskopia

ACR –  $[\text{PtCl}(\text{en})(\text{L})](\text{NO}_3)_2$  (en = ethylén-1,2-diamín, L = 1-[2-(akridín-9-ylamino)ethyl]-1,3-dimethylthiourea]

AMD –  $[\text{PtCl}(\text{en})(\text{L})](\text{NO}_3)_2$  (en = ethylén-1,2-diamín, L = *N*-[2-(akridín-9-ylamino)ethyl]-*N*-methylpropionamidín]

BBR3464 –  $[\{\textit{trans}\text{-PtCl}(\text{NH}_3)_2\}_2(\mu\text{-}\textit{trans}\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2\{\text{NH}_2(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2\}_2)]^{4+}$

BER – bázová excízna oprava

C – cytozín

H-ClQ – kloxiquín (5-chlór-8-chinolinol)

CT-DNA – DNA z telecího thymu

Cy5 – fluorescenčná značka cyanine 5

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EDTA – kyselina ethyléndiamíntetraoctová

EPR – „enhanced permeability and retention“ efekt – efekt zvýšenej permeability a retencie

DMS – dimethylsulfid

DMSO – dimetylsulfoxid

DTD – „drug targeting and delivery“ - cielená akumulácia liečiva v nádorových tkanivách

dCMP – deoxycytozín monosfát

dNTP – 2'-deoxyribonukleotid-5'-trifosfát

dATP – 2'-deoxyadenozín-5'-trifosfát

dCTP – 2'-deoxycitidín-5'-trifosfát

dGTP – 2'-deoxyguanozín-5'-trifosfát

dTTP – 2'-deoxytymidín-5'-trifosfát

EtBr – ethidium bromid

EtOH – ethanol

FM-190 – *trans,trans,trans*- $[\text{Pt}(\text{N}_3)_2(\text{OH})_2(\text{pyridín})_2]$

G – guanín

GSH – glutatión

HMG – („high mobility group protein“ – skupina proteínov s vysokou pohyblivosťou

HPLC – vysokoúčinná kvapalinová chromatografia

HR – homológna rekombinácia

IC<sub>50</sub> – koncentrácia komplexu indikujúca 50 % inhibíciu proliferácie buniek  
ICL – „interstrand crosslink“ – medzireťazcový mostík  
ICP-MS - hmotnostná spektrometria s indukčne viazaným plazmatom  
K<sub>a</sub> – asociačná konštanta  
K<sub>d</sub> – disociačná konštanta  
KF<sup>exo-</sup> – Klenow fragment DNA polymerázy I bez exonukleázovej aktivity  
KP46 – tris-(8-chinolinolato) gálium (III)  
MMR – „mismatch repair“ – oprava chybné spárovaných bází  
MST – „MicroScale Thermophoresis“ – mikroškálová termoforéza  
MTT – 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium bromid  
NER – nukleotidová excízna oprava  
NHEJ – nehomológne spájanie koncov DNA  
PAA – polyakryl amid  
PBS – fosfátový pufor  
PCNA – „proliferating cell nuclear antigen“ – proliferačný bunkový jadrový antigén  
Pol $\eta$  – DNA polymeráza  $\eta$   
Pol $\iota$  – DNA polymeráza  $\iota$   
Pol $\kappa$  – DNA polymeráza  $\kappa$   
Pol $\zeta$  – DNA polymeráza  $\zeta$   
r<sub>b</sub> – počet molekúl platinového komplexu naviazaných na jeden nukleotid  
r<sub>i</sub> – počet molekúl komplexu pripadajúcich na jeden nukleotid  
RNA – ribonukleová kyselina  
ROS – reaktívne formy kyslíka  
T – tymín  
TLS – translézová syntéza  
T<sub>m</sub> – teplota topenia  
UV-VIS spektrometria – spektrometria v ultrafialovej a viditeľnej oblasti spektra

## 8 Prílohy

### 8.1 Zoznam publikovaných prác

1. Shi H., Romero-Canelón I., **Hreusova M.**, Novakova O., Venkatesh V., Habtemariam A., Clarkson G.J., Song J.-I., Brabec V., Sadler P.J. (2018) Photoactivatable cell-selective dinuclear trans-diazidoplatinum(IV) anticancer prodrugs. *Inorganic Chemistry* **57**, 14409-14420
2. **Hreusová M.**, Nováková O., Kostrhunová H., Prachařová J., Brabec V., Kašpárková J. (2019) DNA modification by cisplatin-like Pt(II) complexes containing 1,1'-binaphthyl-2,2'-diamine ligand does not correlate with their antiproliferative activity in cancer cells. *Inorganica Chimica Acta* **495**, 118952
3. Litecká M., **Hreusová M.**, Kašpárková J., Gyepesc R., Smolkova R., Obuch J., David T., Potočňak I. (2020) Low-dimensional compounds containing bioactive ligands. Part XIV: High selective antiproliferative activity of tris(5-chloro-8-quinolinolato)gallium (III) complex against human cancer cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **30**, 127206
4. **Hreusova M.**, Novakova O., Brabec V. (2020) Thermodynamic insights by microscale thermophoresis into translesion DNA synthesis catalyzed by DNA polymerases across a lesion of antitumor platinum-acridine complex. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 7806

### 8.1.1 PUBLIKÁCIA Č. 1

## Photoactivatable cell-selective dinuclear trans-diazidoplatinum(IV) anticancer prodrugs

Shi H., Romero-Canelón I., **Hreusova M.**, Novakova O., Venkatesh V., Habtemariam A., Clarkson G.J., Song J.-I., Brabec V., Sadler P.J.

*Inorganic Chemistry* **57**, 14409-14420 (2018)

*IF(2018) = 4,850*

Prehlasujem, že môj podiel na príprave tejto práce je nasledujúci:

*Kinetika väzby komplexov na DNA in vitro, štúdium EtBr fluorescencie, detekcia medzireťazcových mostíkov, transkripčné mapovanie DNA aduktov platiny, rozvíjanie negatívne vinutej DNA, DNázový footprinting*

.....



## Photoactivatable Cell-Selective Dinuclear *trans*-Diazidoplatinum(IV) Anticancer Prodrugs

Huayun Shi,<sup>†</sup> Isolda Romero-Canelón,<sup>†,‡</sup> Monika Hreusova,<sup>§,⊥</sup> Olga Novakova,<sup>⊥</sup> V. Venkatesh,<sup>†</sup> Abraha Habtemariam,<sup>†</sup> Guy J. Clarkson,<sup>†</sup> Ji-inn Song,<sup>†</sup> Viktor Brabec,<sup>⊥</sup> and Peter J. Sadler<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>Department of Chemistry, University of Warwick, Coventry CV4 7AL, U.K.

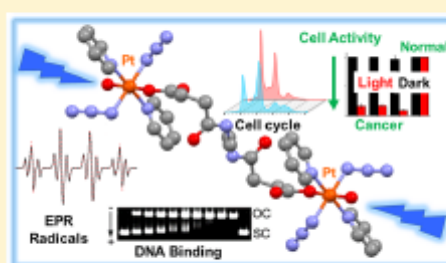
<sup>‡</sup>School of Pharmacy, Institute of Clinical Sciences, University of Birmingham, Birmingham B15 2TT, U.K.

<sup>§</sup>Department of Biophysics, Faculty of Science, Palacky University, 17 listopadu 12, Olomouc CZ-77146, Czech Republic

<sup>⊥</sup>Institute of Biophysics, Czech Academy of Sciences, Kralovopolska 135, Brno CZ-61265, Czech Republic

### Supporting Information

**ABSTRACT:** A series of dinuclear octahedral Pt<sup>IV</sup> complexes *trans,trans,trans*-[Pt(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(py)<sub>2</sub>(OH)(OC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)NH)]<sub>2</sub>R containing pyridine (py) and bridging dicarboxylate [R = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- (1), *trans*-1,2-C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>- (2), *p*-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>- (3), -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- (4)] ligands have been synthesized and characterized, including the X-ray crystal structures of complexes 1–2, MeOH and 4, the first photoactivatable dinuclear Pt<sup>IV</sup> complexes with azido ligands. The complexes are highly stable in the dark, but upon photoactivation with blue light (420 nm), they release the bridging ligand and mononuclear photoproducts. Upon irradiation with blue light (465 nm), they generate azidyl and hydroxyl radicals, detected using a 5,5-dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide electron paramagnetic resonance spin trap, accompanied by the disappearance of the ligand-to-metal charge-transfer (N<sub>3</sub> → Pt) band at ca. 300 nm. The dinuclear complexes are photocytotoxic to human cancer cells (465 nm, 4.8 mW/cm<sup>2</sup>, 1 h), including A2780 human ovarian and esophageal OE19 cells with IC<sub>50</sub> values of 8.8–78.3 μM, whereas cisplatin is inactive under these conditions. Complexes 1, 3, and 4 are notably more photoactive toward cisplatin-resistant ovarian A2780cis compared to A2780 cells. Remarkably, all of the complexes were relatively nontoxic toward normal cells (MRC5 lung fibroblasts), with IC<sub>50</sub> values >100 μM, even after irradiation. The introduction of an aromatic bridging ligand (3) significantly enhanced cellular uptake. The populations in the stages of the cell cycle remained unchanged upon treatment with complexes in the dark, while the population of the G2/M phase increased upon irradiation, suggesting that DNA is a target for these photoactivated dinuclear Pt<sup>IV</sup> complexes. Liquid chromatography–mass spectrometry data show that the photodecomposition pathway of the dinuclear complexes results in the release of two molecules of mononuclear platinum(II) species. As a consequence, DNA binding of the dinuclear complexes after photoactivation in cell-free media is, in several respects, qualitatively similar to that of the photoactivated mononuclear complex FM-190. After photoactivation, they were 2-fold more effective in quenching the fluorescence of EtBr bound to DNA, forming DNA interstrand cross-links and unwinding DNA compared to the photoactivated FM-190.



### INTRODUCTION

Photoactivation is a promising effective and noninvasive chemotherapeutic strategy.<sup>1–4</sup> Photochemotherapy using the appropriate Pt complexes has the potential to overcome some of the limitations of conventional cisplatin therapy, including poor pharmacokinetics, dose-limiting side effects, restricted spectrum of anticancer activity, high incidence of resistance, and lack of normal-cell discrimination.<sup>5,6</sup> The application of O<sub>2</sub>-dependent photodynamic therapy is limited because of the low concentration of O<sub>2</sub> in hypoxic tumors, together with the need for diffusion of O<sub>2</sub> from adjacent tissues.<sup>7</sup> Photoactivated chemotherapy, in contrast, is less dependent on O<sub>2</sub> for cytotoxicity and provides a new avenue to anticancer drug design.

Octahedral, low-spin 5d<sup>6</sup> Pt<sup>IV</sup> complexes are usually considered to be prodrugs because they are kinetically more inert than their Pt<sup>II</sup> counterparts under biological conditions.<sup>8–10</sup> Photoactivatable Pt<sup>IV</sup> prodrugs can exhibit high dark stability and potential photocytotoxicity;<sup>11–13</sup> examples include diazidoplatinum(IV) complexes containing various nonleaving amines and axial substituents.<sup>14–20</sup> Among them, *trans,trans,trans*-[Pt(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>(py)<sub>2</sub>] (FM-190) is highly potent,<sup>21,22</sup> has good aqueous solubility, is relatively stable in cell culture media and toward reactions with abundant intracellular tripeptide glutathione (GSH;  $\gamma$ -L-Glu-L-Cys-Gly),

Received: September 13, 2018

Published: October 26, 2018

! Z dôvodu dodržania autorských práv nie je priložená plná verzia publikácie. Článok je v plnom texte dostupný na stránkach:

<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.inorgchem.8b02599>



## 8.1.2 PUBLIKÁCIA Č. 2

**DNA modification by cisplatin-like Pt(II) complexes containing 1,1'-binaphtyl-2,2'-diamine ligand does not correlate with their antiproliferative activity in cancer cells.**

**Hreusová M., Nováková O., Kostrhunová H., Prachařová J.,  
Brabec V., Kašpárková J.**

*Inorganica Chimica Acta* **495**, 118952 (2019)

*IF(2019) = 2,304*

Prehlasujem, že môj podiel na príprave tejto práce je nasledujúci:

*Modifikácia DNA in vitro, transkripčné mapovanie DNA aduktov platiny,  
rozvíjanie negatívne vinutej DNA, reparačná syntéza DNA, reakcia študovaných  
komplexov s glutatiónom*

.....



## DNA modification by cisplatin-like Pt(II) complexes containing 1,1'-binaphthyl-2,2'-diamine ligand does not correlate with their antiproliferative activity in cancer cells



Monika Hreusová<sup>a,b</sup>, Olga Nováková<sup>a</sup>, Hana Kostrhunová<sup>a</sup>, Jitka Prachařová<sup>c</sup>, Viktor Brabec<sup>a,b</sup>, Jana Kašpárková<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Czech Academy of Sciences, Institute of Biophysics, Královopolská 135, 61265 Brno, Czech Republic

<sup>b</sup> Department of Biophysics, Palacký University, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc, Czech Republic

<sup>c</sup> Department of Biophysics, Centre of the Region Hana for Biotechnological and Agricultural Research, Palacký University, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc, Czech Republic

### ABSTRACT

DNA-reactive platinum complexes, such as cisplatin and its antitumor derivatives, are presupposed to kill actively proliferating cancer cells. Thus, the intense research of the mechanism of action (MoA) of this class of platinum drugs led to the conclusion that a major factor responsible for antitumor effects of conventional platinum drugs and their derivatives is DNA damage induced by their coordinative binding. Here, we present the results of the investigations aimed at clarification of the DNA binding modes of two direct derivatives of cisplatin, such as enantiomeric Pt(II) complexes, *R*- and *S*-1,1'-binaphthyl-2,2'-diaminodichlorido-Pt(II) complexes (*R*- and *S*-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>]), and compared these modes to that of cisplatin. We show that the chirality of [Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] complexes can markedly affect their DNA binding mode. On the other hand, the variations in DNA binding do not translate directly into cellular processing and toxicity in cancer cells. Thus, the results are consistent with the view and support the hypothesis that, in contrast to conventional platinum drugs and their derivatives, the DNA damage resulting from the binding of the [Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] complexes is not a major factor accountable for their biological actions.

### 1. Introduction

Platinum complexes belong to the cytostatics most frequently used worldwide in the treatment of human cancer. The utilization of clinically used platinum cytostatics (cisplatin and their derivatives, carboplatin, and oxaliplatin), is connected, despite their medicinal and commercial successfulness, with some limitations, such as side effects, the resistance of a number of tumors to these drugs and acquired resistance. These limitations have led to an intense search for new platinum cytostatics, which would at least partially overcome these restraints. Consequently, several hundreds of new platinum complexes have been introduced which exhibit improved antitumor properties compared to conventional platinum cytostatics, both *in vitro* and *in vivo*. Concurrently with the search for new platinum cytostatics, the intense research of their mechanism of action is under way as well. This research led to the conclusion that an important pharmacological target of conventional platinum drugs and their derivatives is nuclear DNA [1,2]. A consequence of this finding was that DNA modifications by conventional and new platinum cytostatics, the recognition of these modifications by cellular components and repair of the resulting DNA damage have been intensively investigated as well. The results of this research are becoming the background for formularization of new

relationships between the structure of the platinum complexes and their pharmacological activity on the basis of which new, more effective platinum cytostatics can be proposed.

Recently, the new platinum(II) derivatives of cisplatin, the enantiomeric *R*- and *S*-1,1'-binaphthyl-2,2'-diaminodichlorido-Pt(II) complexes (*R*- and *S*-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>], Fig. 1) were introduced [3–5]. They were shown to exhibit antiproliferative effects in some tumor cell lines sensitive to conventional cisplatin or oxaliplatin. These effects were comparable or even better than those of parental cisplatin or oxaliplatin, with the *R*-isomer being mostly less potent than the *S*-congener [4,5]. Interestingly, *R*- and *S*-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] are also active in the cisplatin-resistant isogenic tumor cells indicating their efficiency to circumvent acquired resistance to cisplatin. These promising results were an impetus for carrying out mechanistic studies of the mechanism of action (MoA) of these compounds including also some studies aimed at understanding their interactions with DNA in cell-free media. The results of the latter studies showed that both *R*- and *S*-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] bind mammalian calf thymus DNA [5]. Despite a higher potency of the *S*-isomer, the *R*-isomer showed greater cellular accumulation and more effective binding to ct-DNA. Additional studies revealed that *S*-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] binds to base residues in the human telomeric sequence folded in the G-quadruplex structure more effectively than its *R*-

\* Corresponding author.

E-mail address: [jana@ibp.cz](mailto:jana@ibp.cz) (J. Kašpárková).

<https://doi.org/10.1016/j.ica.2019.06.003>

Received 29 April 2019; Received in revised form 31 May 2019; Accepted 3 June 2019

Available online 04 June 2019

0020-1693/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

**! Z dôvodu dodržania autorských práv nie je priložená plná verzia publikácie. Článok je v plnom texte dostupný na stránkach:**

[https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020169319305912?casa\\_token=YHQ-qTBpgBgAAAAA:aQiLk5g3L-u72xjuC4G1IW9SkIb938VWD39emX3wwqRltdcKFi63YdG2buzMA7G1R8HozYtKXMQ](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020169319305912?casa_token=YHQ-qTBpgBgAAAAA:aQiLk5g3L-u72xjuC4G1IW9SkIb938VWD39emX3wwqRltdcKFi63YdG2buzMA7G1R8HozYtKXMQ)

### 8.1.3 PUBLIKÁCIA Č. 3

#### **Low-dimensional compounds containing bioactive ligands.**

#### **Part XIV: High selective antiproliferative activity of tris(5-chloro-8-quinolinolato)gallium(III) complex against human cancer cell lines**

Litecka M., **Hreusova M.**, Kašparkova J., Gyepes R., Smolkova R., Obuch J., David T., Potočňak I.

*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 30, 127206 (2020)

*IF(2019) = 2,572*

Prehlasujem, že môj podiel na príprave tejto práce je nasledujúci:

*Kultivácia bunkových línií, stanovenie antiproliferatívnej aktivity komplexov pomocou MTT testu*

.....



Contents lists available at ScienceDirect

## Bioorganic &amp; Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bmcl](http://www.elsevier.com/locate/bmcl)

## Low-dimensional compounds containing bioactive ligands. Part XIV: High selective antiproliferative activity of tris(5-chloro-8-quinolinolato)gallium (III) complex against human cancer cell lines

Miroslava Litecká<sup>a</sup>, Monika Hreusová<sup>b</sup>, Jana Kašpárková<sup>b</sup>, Róbert Gyepes<sup>c</sup>, Romana Smolková<sup>d</sup>, Jakub Obuch<sup>c</sup>, Tomáš David<sup>c</sup>, Ivan Potočňák<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Inorganic Chemistry, Institute of Chemistry, P. J. Šafárik University in Košice, Moyasova 11, 040 01 Košice, Slovakia

<sup>b</sup> Department of Biophysics, Faculty of Science, Palacký University, Štechtelův 27, 783 71 Olomouc, Czech Republic

<sup>c</sup> Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Hlavova 2030/8, 128 40 Prague 2, Czech Republic

<sup>d</sup> Department of Ecology, Faculty of Humanities and Natural Sciences, University of Prešov, Ulka 17. novembra 1, 081 16 Prešov, Slovakia

<sup>e</sup> Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences, Flemingovo nám. 2, 16610 Prague 6, Czech Republic

## ARTICLE INFO

## InChIKey:

CVDXKQYIISDISKZ-UHFFFAOYSA-K

5-Chloro-8-quinolinol

7-Bromo-8-quinolinol

5,7-Diiodo-8-quinolinol

5-Chloro-7-iodo-8-quinolinol

Gallium(III) complexes

Antiproliferative activity

Antitumor activity

## ABSTRACT

Four gallium(III) complexes, [Ga(ClQ)<sub>3</sub>]-MeOH (**1** - MeOH), [Ga(ClQ)<sub>3</sub>] (**1**), [Ga(BrQ)<sub>3</sub>] (**2**), [Ga(IQ)<sub>3</sub>] (**3**) and [Ga(CQ)<sub>3</sub>] (**4**), were prepared (H-ClQ = 5-chloro-8-quinolinol, H-BrQ = 7-bromo-8-quinolinol, H-IQ = 5,7-diiodo-8-quinolinol, H-CQ = 5-chloro-7-iodo-8-quinolinol) and characterised by elemental analysis, IR and NMR spectroscopy. Single crystal structure analysis of **1** - MeOH confirmed that the complex has a molecular structure with gallium(III) metal ion coordinated in *mer*-fashion by *N*- and *O*-donor atoms of three ClQ ligands. Stability of all complexes in DMSO was proved by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. The *in vitro* antiproliferative activity of **1** was evaluated against the A2780, MBA-MB-231 and HCT116 cell lines. Complex **1** displays higher antiproliferative activity (IC<sub>50</sub> values in the range 2.1–6 μM) compared to the ClQ ligand and cisplatin; and a significant selective antiproliferative potency (IC<sub>50</sub> = 1.36 μM, for normal MRC5pd30 cell line). Radical scavenging experiments revealed that complex **1** exhibits the highest antioxidant activity of the prepared complexes as well as the ligands.

Metal-based drugs are one of the dominant interests of the anticancer research since the successful clinical approval of cisplatin.<sup>1</sup> After platinum-based compounds, antiproliferative or anticancer activity of more metal compounds was investigated *in vitro*<sup>2–3</sup> or *in vivo*,<sup>4</sup> respectively. Gallium(III) compounds appear as highly perspective ones because gallium(III) shares several characteristics with iron(III).<sup>5</sup> In the past decades, detailed pharmacokinetic studies of gallium(III) compounds were conducted<sup>6–8</sup>, antitumor mechanisms were indicated,<sup>9–11</sup> new effective treatment strategies based on bioavailability were identified<sup>12,13</sup> and some of the perspective compounds have proceeded in clinical trials (Ga(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, gallium(III) maltolate and KP46)<sup>13,14</sup>. One of the most elegant examples of new generation of metal-based drugs is KP46 (tris-(8-quinolinolato)gallium(III)).<sup>7</sup> The superior chelating ability of KP46 is represented by a very high stability constant (logβ<sub>3</sub> = 40.7), but kinetically the complex was identified as labile (dissociation in the stationary silica phase in HPLC separation). However, the kinetic inertness should not be affected in the gastro-enteric

tract and KP46 solution in water or in physiologic buffers is chemically stable for several hours (50% of the drug).<sup>15</sup> Preclinical research focused on the *in vitro* cancer cell lines studies (lung, ovarian, breast, colon cancers and melanoma) indicated obvious antiproliferative activity (IC<sub>50</sub> of KP46 is < 5 μM for corresponding cancer cell lines).<sup>14,16</sup> Similarly, the *in vivo* studies have shown remarkable cytotoxicity and bioavailability in comparison with simple gallium(III) salts in mice and KP46 also exhibited high affinity to bone tissues. These findings demonstrated that KP46 is suitable as a therapeutic choice for osseous tumours and bone metastatic cancers as well. The *in vitro* studies suggest high cytotoxicity against osteosarcoma cells.<sup>17</sup>

The main goal of the KP46 discovery was a new treatment strategy based on a combination with cisplatin chemotherapy. Jakupec *et al.*<sup>18</sup> have analysed combination effects of KP46 with platinum-based drugs (cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin) in human cancer cell lines and compared them with single-agent activities. Their results suggest an additive and synergistic antitumor ability in ovarian (41 M, CH1) and

\* Corresponding author.

E-mail address: [ivan.potocnak@upjs.sk](mailto:ivan.potocnak@upjs.sk) (I. Potočňák).

<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127206>

Received 17 February 2020; Received in revised form 12 April 2020; Accepted 18 April 2020

Available online 21 April 2020

0960-894X/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**! Z dôvodu dodržania autorských práv nie je priložená plná verzia publikácie. Článok je v plnom texte dostupný na stránkach:**

[https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X20303061?casa\\_token=WLDIiYQHb28AAAAA:-:pg0comUPNnFSWZLtWCYq\\_YX6Nw32f3ksHq91px2k71L9jS2euswkzyk8k3htJWvyO0ObUbi8](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X20303061?casa_token=WLDIiYQHb28AAAAA:-:pg0comUPNnFSWZLtWCYq_YX6Nw32f3ksHq91px2k71L9jS2euswkzyk8k3htJWvyO0ObUbi8)

#### 8.1.4 PUBLIKÁCIA Č. 4

### **Thermodynamic Insights by Microscale Thermophoresis into Translesion DNA Synthesis Catalyzed by DNA Polymerases Across a Lesion of Antitumor Platinum–Acridine Complex**

**Hreusová M., Nováková O., Brabec V.,**

*International Journal of Molecular Sciences* 21, 7806 (2020)

*IF(2019) = 4,556*

Prehlasujem, že môj podiel na príprave tejto práce je nasledujúci:

*Platinácia DNA in vitro, štúdium translézovej syntézy a inkorporácie dNTP DNA  
polymerázami, MST meranie*

.....



Article

# Thermodynamic Insights by Microscale Thermophoresis into Translesion DNA Synthesis Catalyzed by DNA Polymerases Across a Lesion of Antitumor Platinum–Acridine Complex

Monika Hreusova <sup>1,2</sup>, Olga Novakova <sup>1</sup> and Viktor Brabec <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Czech Academy of Sciences, Institute of Biophysics, Kralovopolska 135, CZ-61265 Brno, Czech Republic; monca.hreusova@gmail.com (M.H.); olga@ibp.cz (O.N.)

<sup>2</sup> Department of Biophysics, Faculty of Science, Palacky University, Slechtitelu 27, CZ 78371 Olomouc, Czech Republic

\* Correspondence: brabec@ibp.cz; Tel: +420-541-517-148

Received: 22 September 2020; Accepted: 19 October 2020; Published: 21 October 2020



**Abstract:** Translesion synthesis (TLS) through DNA adducts of antitumor platinum complexes has been an interesting aspect of DNA synthesis in cells treated with these metal-based drugs because of its correlation to drug sensitivity. We utilized model systems employing a DNA lesion derived from a site-specific monofunctional adduct formed by antitumor [PtCl(en)(L)](NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (complex AMD, en = ethane-1,2-diamine, L = N-[2-(acridin-9-ylamino)ethyl]-N-methylpropionamidine) at a unique G residue. The catalytic efficiency of TLS DNA polymerases, which differ in their processivity and fidelity for the insertion of correct dCTP, with respect to the other incorrect nucleotides, opposite the adduct of AMD, was investigated. For a deeper understanding of the factors that control the bypass of the site-specific adducts of AMD catalyzed by DNA polymerases, we also used microscale thermophoresis (MST) to measure the thermodynamic changes associated with TLS across a single, site-specific adduct formed in DNA by AMD. The relative catalytic efficiency of the investigated DNA polymerases for the insertion of correct dCTP, with respect to the other incorrect nucleotides, opposite the AMD adduct, was reduced. Nevertheless, incorporation of the correct C opposite the G modified by AMD of the template strand was promoted by an increasing thermodynamic stability of the resulting duplex. The reduced relative efficiency of the investigated DNA polymerases may be a consequence of the DNA intercalation of the acridine moiety of AMD and the size of the adduct. The products of the bypass of this monofunctional lesion produced by AMD and DNA polymerases also resulted from the misincorporation of dNTPs opposite the platinated G residues. The MST analysis suggested that thermodynamic factors may contribute to the forces that governed enhanced incorporation of the incorrect dNTPs by DNA polymerases.

**Keywords:** platinum-acridine; antitumor; translesion DNA synthesis; DNA polymerases; microscale thermophoresis

## 1. Introduction

Platinum-based coordination compounds offer broad possibilities for the design of anticancer chemotherapeutics [1]. The conventional platinum drugs, cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin, are approved worldwide in the treatment of cancer. Currently, great effort has been devoted worldwide to the development of new, nonclassical platinum complexes that operate via mechanisms of action distinct from those of the approved platinum anticancer drugs [1–5]. Designing new antitumor platinum drugs and suggesting strategies for improving the chemotherapeutic effectiveness of the existing drugs

**! Z dôvodu dodržania autorských práv nie je priložená plná verzia publikácie. Článok je v plnom texte dostupný na stránkach:**

<https://www.mdpi.com/1422-0067/21/20/7806>

## 8.2 Štruktúrovaný životopis

### Osobné údaje:

Meno a priezvisko: Monika Hreusová, rod. Pavolková  
Kontakt: monca.hreusova@gmail.com

### Dosiahnuté vzdelanie:

2017 – súčasnosť: **Doktorský študijný program (Biofyzika),**  
Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci  
Téma dizertačnej práce: *Faktory ovlivňující biologické účinky metalofarmak. Vztah k protinádorové účinnosti* pod vedením prof. RNDr. Viktora Brabca, DrSc. na Oddelení molekulárnej biofyziky a farmakológie BFÚ AV ČR

2015 – 2017 **Magisterské nadväzujúce štúdium, (Biochemie),**  
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno  
Diplomová práca: *Interakce cytotoxických organokovových komplexů DNA – vliv na stabilitu a kompaktizaci nukleosomů* pod vedením doc. Mgr. Olgy Novákovej, Dr. na Oddelení molekulárnej biofyziky a farmakológie BFÚ AV ČR

2012 – 2015 **Bakalárske štúdium (Biofyzikální chemie),**  
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno  
Bakalárska práca: *Interakce DNA s cytotoxickými komplexy ruthenia – vliv na stabilitu nukleosomu a organizaci chromatinu* pod vedením doc. Mgr. Olgy Novákovej, Dr. na Oddelení molekulárnej biofyziky a farmakológie BFÚ AV ČR

### Pracovné skúsenosti:

2018 – súčasnosť: Výskumný pracovník na Oddelení molekulárnej biofyziky a farmakológie Biofyzikálního ústavu Akademie věd České republiky

### **Účast' na konferencii:**

**Monika Hreusová**, Olga Nováková, Viktor Brabec. Posterová prezentácia: Bypass of the Pt-DNA adduct by DNA polymerases and thermodynamic aspects of this process. XX. Workshop of Biophysical Chemists and Electrochemists, Masarykova univerzita Brno, 17. – 18. 9. 2020,

### **Absolvovaná vedecko – výskumná stáž:**

1. 3. 2020 – 13. 3. 2020 (stáž bola prerušená a skrátená z dôvodu celosvetovej pandémie koronavírusu), stáž pokračovala od 4.10. 2020 do 5.11. 2020 (spolu 7 týždňov)

Stáž bola absolvovaná na University of Vienna, Department of Inorganic Chemistry, Cell Culture Facility Laboratories, Vídeň, Rakousko, pod vedením Dr. Michaela Jakupca.

Predmetom stáže bolo štúdium akumulácie potenciálnych protinádorových zlúčenín na rôznych bunkových nádorových líniiach (2D a 3D) a následnej bunkovej smrti pomocou prietokovej cytometrie.



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

Katedra biofyziky



**Faktory ovlivňující biologické účinky metalofarmak.  
Vztah k protinádorové účinnosti**

Autoreferát k disertační práci

Monika Hreusová

Olomouc 2021

**Uchazeč:** Mgr. Monika Hreusová  
Katedra biofyziky  
Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v  
Olomouci

**Školitel:** prof. RNDr. Viktor Brabec, DrSc.

**Název práce:** Faktory ovlivňující biologické účinky  
metalofarmak. Vztah k protinádorové účinnosti

**Oponenti:** prof. RNDr. Pavel Anzenbacher, DrSc.  
Ústav farmakologie LF UP a FN Olomouc,  
Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc

doc. RNDr. Miroslav Fojta, CSc.  
Biofyzikální ústav AV ČR,  
Královopolská 135, 612 65 Brno

**Místo a termín obhajoby:**

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

## ABSTRAKT

Organokovové komplexy sú významnou súčasťou protinádorového výskumu od úspešného klinického schválenia cisplatiny. Popri konvenčných platinových cytostatikách, ktoré však majú svoje limity, je dôležitý výskum a vývoj v tejto oblasti za účelom získania nových koordinačných komplexov s centrálnym atómom kovu s lepším terapeutickým účinkom a nižšou systematickou toxicitou. Predkladaná dizertačná práca sa zaoberá mechanistickým štúdiom protinádorového účinku troch skupín nových platinových zlúčenín na molekulárnej úrovni a štúdiom komplexu gália na bunečnej úrovni.

Prvá časť práce pojednáva o výsledkoch štúdia *in vitro* interakcií nových fotoaktivovateľných dinukleárných platičitých komplexov s DNA a porovnaním ich účinku a zároveň vplyvu dĺžky spojovacieho linkru s príbuzným mononukleárnym **FM190** (*trans, trans, trans*- [Pt(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>(pyridín)<sub>2</sub>]). Zistilo sa, že po ožiarení modrým svetlom dochádza k fotodekompozícii študovaných dinukleárných komplexov za vzniku dvoch aktívnych mononukleárných platinových jednotiek podobných mononukleárnemu **FM190**. Následkom toho spôsobovali skúmané dinukleárne komplexy takmer rovnaké poškodenie DNA ako mononukleárny **FM190**.

Výsledky prezentované v druhej časti tejto dizertačnej práce ukazujú, že chiralita komplexov [Pt(**DABN**)Cl<sub>2</sub>], kde (DABN = 1,1'-binaftyl-2,2-diamín), môže výrazne ovplyvniť spôsob ich väzby na DNA, ktorá sa všeobecne považuje za hlavný farmakologický cieľ konvenčných protinádorových komplexov platiny a ich derivátov. Na druhej strane sa však rozdiely vo väzbe na DNA neprenášajú priamo do bunečného spracovania a toxicity *R*- a *S*-[Pt(**DABN**)Cl<sub>2</sub>] v rakovinových bunkách. Z toho vyplýva, že poškodenie DNA týmito komplexami nemusí byť hlavným dôvodom ich protinádorového účinku na rozdiel od konvenčných platinových cytostatík a ich derivátov.

Treťou časťou práce je štúdium komplexu gália na bunecnej úrovni a stanovenie jeho antiproliferatívnej aktivity na viacerých bunkových nádorových líniách. V porovnaní s cisplatinou je tento komplex výrazne účinnejší a selektívnejší na nádorové bunky.

Jednou z príčin rezistencie na liečbu je tolerancia poškodenia DNA prostredníctvom translázovej syntézy DNA cez platinové adukty. V poslednej časti tejto dizertačnej práce bola študovaná translázová syntéza DNA cez špecifický monofukčný adukt protinádorového komplexu **AMD** ( $[\text{PtCl}(\text{en})(\text{L})](\text{NO}_3)_2$  en = ethylén-1,2-diamín, L = *N*-[2-(akridín-9-ylamino)ethyl]-*N*-methylpropionamidín)) pomocou DNA polymeráz a s tým spojené termodynamické zmeny prostredníctvom mikroškálovej termoforézy (MST). Výsledky získané pomocou MST boli v súlade s experimentálnymi dátami popisujúcimi translázovú syntézu DNA cez adukt **AMD** prokaryotickou aj eukaryotickou DNA polymerázou. Termodynamické parametre taktiež prispeli k hlbšiemu porozumeniu toho, ktoré faktory vplývajú na mechanizmus syntézy DNA cez adukt **AMD**.

## ABSTRACT

Organometallic complexes have been an important part of anticancer research since the successful clinical approval of cisplatin. In addition to conventional platinum cytostatics, which have limitations, research and development in this field are essential to obtain new metal-based coordination complexes with a better therapeutic effect and lower systemic toxicity. The present dissertation deals with the mechanistic study of the antitumor effect of three groups of new platinum compounds at the molecular level and the study of the gallium complex at the cellular level.

The first section pertains to the results of an *in vitro* study of DNA interactions of new photoactivatable dinuclear platinum (IV) complexes, as well as the comparison of their effects and the influence of the length of the linker with the related mononuclear **FM190** (*trans, trans, trans*- [Pt(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>(pyridine)<sub>2</sub>]). It was found that after irradiation by blue light, photodecomposition of the studied dinuclear complexes occurred to form two active mononuclear platinum (II) units similar to mononuclear **FM190**. As a consequence, the investigated dinuclear complexes caused almost the same DNA damage as mononuclear **FM190**.

The results presented in the second section of this dissertation show that the chirality of [Pt(**DABN**)Cl<sub>2</sub> (DABN = 1,1'-binaphthyl-2,2-diamine) complexes can significantly affect the way they bind to DNA, which is commonly considered the main pharmacological target of conventional antitumor platinum complexes and their derivatives. On the other hand, the variations in DNA binding do not translate directly into cellular processing and toxicity of *R*- and *S*-[Pt(**DABN**)Cl<sub>2</sub> in cancer cells. Therefore, unlike conventional platinum drugs and their derivatives, the DNA damage resulting from binding of *R*- and *S*-[Pt(**DABN**)Cl<sub>2</sub> is not the major factor responsible for their biological actions.

The third section of this thesis describes the study of the gallium complex at the cellular level and the determination of its antiproliferative activity on several tumor cell lines. Compared to cisplatin, this complex is significantly more effective and selective for tumor cells.

One cause of resistance to treatment is the tolerance of DNA damage by translesion DNA synthesis through platinum DNA adducts. The last section of this dissertation deals with the study of the translesion DNA synthesis through site-specific monofunctional adduct formed by antitumor **AMD** complex  $[\text{PtCl}(\text{en})(\text{L})](\text{NO}_3)_2$ , en = ethane-1,2-diamine, L = N-[2-(acridin-9-ylamino)ethyl]-N-methylpropionamide) using DNA polymerases and MicroScale thermophoresis (MST) for associated thermodynamic changes. The MST results were in good agreement with experimental data describing translesion DNA synthesis across the **AMD** adduct by DNA polymerases of eukaryotic and prokaryotic origin. The equilibrium thermodynamic data also contributed to a deeper understanding of the factors that control the mechanisms of template-directed DNA synthesis across the **AMD** adduct.

## Zoznam publikovaných prác

1. Shi H., Romero-Canelón I., **Hreusova M.**, Novakova O., Venkatesh V., Habtemariam A., Clarkson G.J., Song J.-I., Brabec V., Sadler P.J. (2018) Photoactivatable cell-selective dinuclear trans-diazidoplatinum(IV) anticancer prodrugs. *Inorganic Chemistry* **57**, 14409-14420; IF (2018) = 4,850
2. **Hreusová M.**, Nováková O., Kostrhunová H., Prachařová J., Brabec V., Kašpárková J. (2019) DNA modification by cisplatin-like Pt(II) complexes containing 1,1'-binaphthyl-2,2'-diamine ligand does not correlate with their antiproliferative activity in cancer cells. *Inorganica Chimica Acta* **495**, 118952 IF (2019) = 2,304
3. Litecká M., **Hreusová M.**, Kašpárková J., Gyepesc R., Smolkova R., Obuch J., David T., Potočňak I. (2020) Low-dimensional compounds containing bioactive ligands. Part XIV: High selective antiproliferative activity of tris(5-chloro-8-quinolinolato)gallium (III) complex against human cancer cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **30**, 127206; IF (2019) = 2,572
4. **Hreusova M.**, Novakova O., Brabec V. (2020) Thermodynamic insights by microscale thermophoresis into translesion DNA synthesis catalyzed by DNA polymerases across a lesion of antitumor platinum-acridine complex. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 7806; IF (2019) = 4,556

## **OBSAH**

<b>1. Zoznam použitých skratiek.....</b>	<b>8</b>
<b>2. Úvod.....</b>	<b>9</b>
2.1. Mechanizmus pôsobenia liečiv na bázi cisplatiny.....	9
2.2. Vývoj nových liečiv na báze kovov.....	11
2.2.1. Monofunkčné komplexy platiny.....	13
2.2.2. Polynukleárne komplexy platiny.....	14
2.2.3. Komplexy platiny ako proliečivá.....	15
2.2.4. Komplexy gália.....	16
<b>3. Ciele práce.....</b>	<b>17</b>
<b>4. Výsledky a diskusia.....</b>	<b>18</b>
4.1. Publikácia č. 1.....	18
4.2. Publikácia č. 2.....	21
4.3. Publikácia č. 3.....	24
4.4. Publikácia č. 4.....	25
<b>5. Záver.....</b>	<b>30</b>
<b>6. Zoznam použitej literatúry.....</b>	<b>33</b>



# 1. Zoznam použitých skratiek

A – adenín

ACR – [PtCl(en)(L)](NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (en = ethylén-1,2-diamín, L = 1-[2-(akridín-9-ylamino)ethyl]-1,3-dimethylthiourea)

AMD – [PtCl(en)(L)](NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (en=ethylén-1,2-diamín, L=N-[2-(akridín-9-ylamino)ethyl]-N-methylpropionamidín]

BBR3464 – [ { *trans*-PtCl(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> }<sub>2</sub>(μ-*trans*-Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>{NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH<sub>2</sub>})<sub>2</sub> ]<sup>4+</sup>

C – cytozín

H-ClQ – kloxiquín (5-chlór-8-chinolinol)

CT-DNA – DNA z telecího thymu

Cy5 – fluorescenčná značka cyanine 5

DTD – „drug targeting and delivery“ – cieleňá akumulácia liečiva v nádorových tkanivách

dCMP – deoxycytozín monosfát

dNTP – 2'-deoxyribonukleotid-5'-trifosfát

dATP – 2'-deoxyadenozín-5'-trifosfát

dCTP – 2'-deoxycitidín-5'-trifosfát

dGTP – 2'-deoxyguanozín-5'-trifosfát

dTTP – 2'-deoxytymidín-5'-trifosfát

EtBr – ethidium bromid

FM-190 – *trans,trans,trans*-[Pt(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>(pyridín)<sub>2</sub>]

G – guanín

GSH – glutatión

HMG – „high mobility group protein“ – skupina proteínov s vysokou pohyblivosťou

IC<sub>50</sub> – koncentrácia komplexu indikujúca 50 % inhibíciu proliferácie buniek

ICL – „interstrand crosslink“ – medzireťazcový mostík

K<sub>d</sub> – disociačná konštanta

KF<sup>exo-</sup> – Klenow fragment DNA polymerázy I bez exonukleázovej aktivity

KP46 – tris-(8-chinolinolato) gálium (III)

MST – „MicroScale Thermophoresis“ – mikroškálová termofórezá

MTT – 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium bromid

NER – nukleotidová excízna oprava

PAA – polyakryl amid

Polη – DNA polymeráza η

r<sub>b</sub> – počet molekúl platinového komplexu naviazaných na jeden nukleotid

r<sub>i</sub> – počet molekúl komplexu pripadajúcich na jeden nukleotid

T – tymín

TLS – translézová syntéza

UV-VIS spektrometria – spektrometria v ultrafialovej a viditeľnej oblasti spektra

## 2. Úvod

Koordináčne zlúčeniny s centrálnym atómom platiny majú popredné miesto v chemoterapii rakoviny. Prvým a zároveň doteraz najúspešnejším cytostatikom tohto typu je cisplatina. Okrem nej sa momentálne v klinickej praxi používa päť jej priamych derivátov a desiatky ďalších sa dostali do rôznych štádií klinických testov. Význam platinových cytostatík je zdôraznený tým, že liečba platinovými zlúčeninami, či už samostatne alebo v kombinácii s inými látkami, sa využíva pri chemoterapii 50 – 70 % pacientov s mnohými typmi nádorov [1].

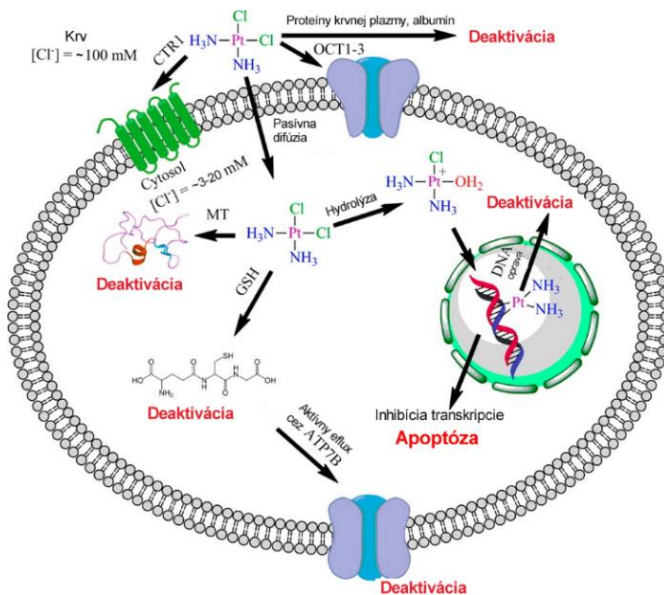
V dnešnej dobe sa intenzívnym výskumom koordináčnych zlúčenín s centrálnym atómom kovu zaoberá množstvo popredných svetových laboratórií. V snahe zlepšiť a rozšíriť cytotoxické účinky konvenčných platinových cytostatík sú stále analyzované nové zlúčeniny tohto typu s iným mechanizmom účinku a vyššou selektivitou na nádorové bunky.

### 2.1. Mechanizmus pôsobenia liečiv na bázi cisplatiny

Dôležitým pokrokom v liečbe rakoviny je objav cytotoxickej aktivity cisplatiny, ktorá patrí k najznámejším a najvyužívanejším cytostatikám v protinádorovej chemoterapii [2]. Najúspešnejšia je pri liečbe rakoviny semenníkov, kde je jej účinnosť takmer 100 % pri záchyte v skorých štádiách ochorenia, ďalej sú to nádory vaječníkov, močového mechúra, pľúc, tenkého čreva, žalúdka či niektoré typy nádorov hlavy a krku [2–4].

Mechanizmus pôsobenia cisplatiny zahŕňa štyri kľúčové kroky: (i) akumuláciu v bunke, (ii) aktiváciu hydrolýzou, (iii) väzbu na DNA a (iv) bunecné spracovanie lézií vytvorených v DNA vedúce k smrti bunky (Obr. č. 1) [5]. Cisplatina vstupuje do bunky dvoma spôsobmi (Obr. č. 1). Prvým a najčastejším je pasívna difúzia cez plazmatickú membránu vďaka svojej malej veľkosti a planárnemu tvaru. Druhou cestou liečiva do bunky je aktívny transport prostredníctvom transportérov medi Ctr1 a Ctr2 [5–8]. Aktivovaná cisplatina je

kvôli získanému kladnému náboju silný elektrofil a interaguje s rôznymi bunecnými komponentami, ako sú napríklad nukleové kyseliny, proteíny, membránové fosfolipidy a molekuly obsahujúce síru (glutatión, metalothioneíny) (Obr. č. 1) [2,9,10].

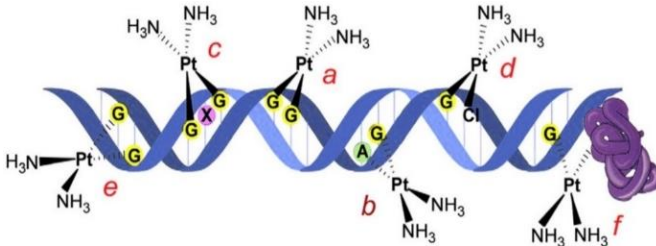


Obr. č. 1: Schéma akumulácie, metabolizmu a rezistencie cisplatiny v bunke (Prevzaté a upravené z [11])

Jej hlavným farmakologickým cieľom je však DNA, na ktorú sa viaže prostredníctvom hydrolyzy komplexu. Naviazaním cisplatiny na DNA dochádza k lokálnym zmenám konformácie DNA a vzniká viacero aduktov – typov deformácií DNA (Obr. č. 2).

Biologická aktivita cisplatiny a jej derivátov je sprostredkovaná rozpoznávaním jej aduktov bunecnými proteínmi ako sú enzýmy opravného systému, transkripčné faktory, históny a proteíny s HMG („high mobility group“) doménou, ktoré sa podieľajú na regulácii procesov závislých na DNA [12]. Afinita proteínov k modifikovanej DNA môže mať významný vplyv na protinádorovú

aktivitu platinových komplexov. Lokálne zmeny v štruktúre DNA taktiež spôsobujú zastavenie DNA a RNA syntézy prostredníctvom blokácie DNA a RNA polymeráz [12].



Obr. č. 2: Typy aduktov tvorených na DNA cisplatinou: a) b) c) vnútroreťazcové bifunkčné adukty; d) monofunkčný adukt; e) medzireťazcový mostík; f) DNA-proteínový mostík (prevzaté a upravené [12])

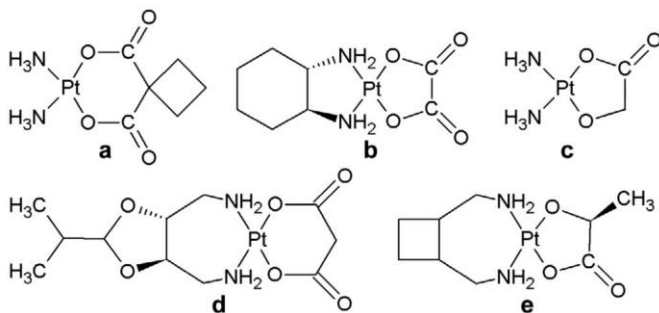
Celkový efekt poškodení v genóme nie je primárne riadený samotnou tvorbou poškodenia, ale efektivitou jeho opravy. Práve schopnosť opravy DNA určuje prežitie alebo smrť nádorových buniek. Mechanizmus odstránenia platinového aduktu a opravy DNA závisí na type jej poškodenia. V bunkách sú adukty cisplatinu na DNA (najmä 1,2 GG a 1,3 GXG) efektívne odstraňované hlavne pomocou nukleotidovej excíznej opravy (NER) [4].

## 2.2. Vývoj nových liečiv na báze kovov

Vzhľadom k nízkej selektivitě cisplatinu k nádorovým bunkám jej užívanie obmedzujú závažné vedľajšie účinky [13]. Spolu so systematickou toxicitou je účinok cisplatinu limitovaný aj získanou rezistenciou nádorových buniek. Je taktiež neúčinná pri liečbe najčastejšie sa vyskytujúcich nádorov ako sú napríklad kolorektálny karcinóm, karcinóm prsníka či metastázy [14].

Nevýhody spojené s klinickým používaním cisplatinu viedli k vývoju množstva ďalších potenciálnych platinových zlúčenín s protinádorovou aktivitou. Na začiatku bola snaha o výmenu odstupujúcich ligandov, ktorou by sa znížili vedľajšie účinky (karboplatina), neskôr došlo k výmene všetkých ligandov kvôli tvorbe iného typu poškodenia DNA (oxaliplatinu) [15]. Týmito modifikáciami došlo

k zníženiu celkovej toxicity, ale mechanizmus účinku týchto derivátov je v podstate rovnaký ako mechanizmus účinku cisplatiny [16,17] Výnimkou je oxaliplatina, u ktorej boli odhalené už aj nové mechanizmy účinku a taktiež účinnosť na nádory hrubého čreva v kombinácii s 5-fluoruracilom [18]. Na liečbu rakoviny sa v súčasnosti okrem cisplatiny používa päť jej derivátov (Obr. č. 3). Karboplatina a oxaliplatina sa spolu s cisplatinou používajú celosvetovo, zatiaľ čo nedaplatina, heptaplatina a lobaplatina sú schválené v Japonsku, Číne a Južnej Kórei [12].



Obr. č. 3: Štruktúra klinicky používaných derivátov cisplatiny. a) karboplatina, b) oxaliplatina, c) nedaplatina, d) heptaplatina, e) lobaplatina (Prevzaté z [12])

Ďalšou stratégiou bola výmena atómu platiny za iný prechodný kov. Ako veľmi úspešné sa javia ruténium, gálium, osmium, titán, irídium, zlato či germánium [19].

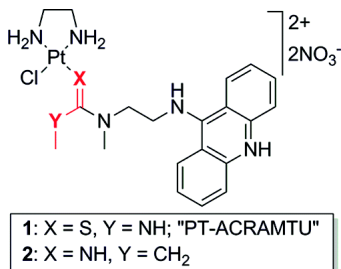
Vo všeobecnosti sa dá povedať, že sú tri hlavné stratégie dizajnu nových platinových cytostatík [13]. Prvou sú komplexy s odlišným väzbovým módom než cisplatina. Patria sem monofunkčné komplexy, komplexy s *trans*-geometriou odstupujúcich ligandov a polynukleárne komplexy [20]. Do druhej kategórie spadajú inertné proliečivá, ktoré sú aktivované až v nádorovom tkanive. Príkladom tejto skupiny sú Pt<sup>IV</sup> komplexy, ktoré využívajú jedinečné vlastnosti nádoru ako kyslé pH a jeho hypoxické či redukčné prostredie. Pt<sup>IV</sup> komplexy sa v nádorovom prostredí redukujú na Pt<sup>II</sup> komplexy, pričom dochádza k strate dvoch axiálnych ligandov práve kvôli redukčnému nádorovému prostrediu [13,21,22].

Treťou stratégiou je cieľená akumulácia liečiva v nádorových tkanivách (DTD – „drug targeting and delivery“). Aktívny DTD je založený na špecifických biomolekulárnych interakciách medzi liečivom a nádorovými bunkami líšiacimi sa od zdravých [13].

### 2.2.1. Monofunkčné komplexy platiny

Monofunkčné komplexy platiny, obsahujúce iba jeden odstupujúci ligand, boli dlhú dobu považované za neaktívne. Jednými z prvých komplexov tohoto typu sú komplexy so všeobecným vzorcom  $cis\text{-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{AmCl}]^+$ , kde AM je planárna aromatická báza ako pyridín, purín, pyrimidín či anilín, ktoré vykazujú protinádorovú aktivitu v rade myších a ľudských nádorových bunkových líniiach [23].

Veľmi úspešné bolo predstavenie komplexov s interkalátorovým ligandom, kde sa predpokladalo, že platínová jednotka je kovalentne naviazaná na DNA a interkalátor taktiež interaguje s DNA za vzniku stabilného aduktu štruktúrne odlišného od aduktov cisplatinu [24,25]. Príkladom takýchto komplexov sú Pt-ACRAMTU (ACR) a jeho amidínový derivát (AMD) (Obr. č. 4). Vo všeobecnosti oba tieto komplexy rýchlo interkalujú medzi páry bází DNA, za čím nasleduje platinácia purínových nukleobází. Týmto mechanizmom dochádza k zmene klasických väzbových miest platínových komplexov [26]. Protinádorová aktivita oboch komplexov je spôsobená vyššou akumuláciou v bunkách, rýchlejšou tvorbou aduktov a ich menej efektívnou opravou v porovnaní s cisplatinou [26,27]. Je pozoruhodné, že hoci tieto komplexy nevytvárajú bifunkčné adukty na rozdiel od konvenčných platínových cytostatík, ich adukty na DNA účinnejšie zastavujú DNA a RNA polymerázy. Dochádza tak k inhibícii syntézy DNA a zastaveniu bunkového cyklu v S fáze, pričom cisplatinu ho spravidla zastavuje až v G2/M fáze [24,28].

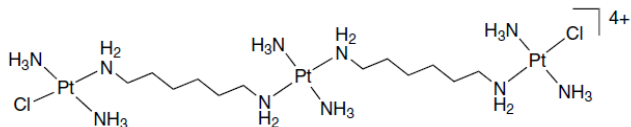


Obr. č. 4: Štruktúra komplexov  $[PtCl(en)(L)](NO_3)_2$  (en = ethylén-1,2-diamín, L = 1-[2-(akridín-9-ylamino)ethyl]-1,3-dimethylthiourea) (1) - **ACR** a en = ethylén-1,2-diamín, L = *N*-[2-(akridín-9-ylamino)ethyl]-*N*-methylpropionamidín(2) - **AMD** (Prevzaté z [27])

### 2.2.2. Polynukleárne komplexy platiny

Polynukleárne komplexy platiny sú ďalšou veľmi významnou skupinou protinádorových zlúčenín. V týchto zlúčeninách sú dve alebo viacero platinových reakčných centier spojených linkrom rôznej dĺžky a typu. Ich vývoj bol založený na predpoklade, že väzbou a poškodením DNA a tým pádom aj samotnou bunecnou odpoveďou sa budú odlišovať od účinku cisplatiny. Väčšina polynukleárných komplexov sa viaže na DNA rýchlejšie, než cisplatina. Preferenčne sa takisto viažu na N7 guanínu, ale vytvárajú odlišné spektrum aduktov [24].

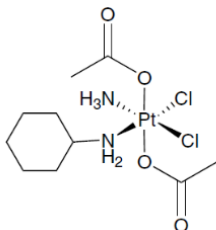
Najvýznamnejším z tejto skupiny je trinukleárny komplex  $[{trans-PtCl(NH_3)_2}_2(\mu-trans-Pt(NH_3)_2\{NH_2(CH_2)_6NH_2\}_2)]^{4+}$  (BBR3464) (Obr. č. 5), ktorý v porovnaní s cisplatinou vykazuje vyššiu akumuláciu v nádorových bunkách a taktiež vyššiu mieru platinácie DNA aj u buniek rezistentných k cisplatinu [29]. Viaže sa na guaníny a vytvára delokalizované vnútro- a medzireťazcové adukty dlhého dosahu. Medzireťazcové mostíky sú veľmi ťažko opraviteľné a pokladajú sa za hlavnú príčinu protinádorového účinku komplexu BBR3464 [30–32]. BBR3464 sa dostal do druhej fázy klinických testov, na základe ktorých však nebol doporučený k ďalšiemu klinickému skúmaniu kvôli rozkladu v ľudskej krvnej plazme [33].



Obr. č. 5: Štruktúra trinukleárneho komplexu BBR3464 (Prevzaté z [24])

### 2.2.3. Komplexy platiny ako proliečivá

Pri hľadaní nových potenciálnych liečiv je dôležitým faktorom ich selektívna cytotoxicita k nádorovým bunkám. Významnou skupinou týchto látok sú proliečivá, ktoré sú netoxické a neaktívne a ich cytostatický účinok vzniká po ich konverzii až v tele pacienta. Zo zlúčenín platiny pôsobia ako proliečivá  $Pt^{IV}$  komplexy. Na rozdiel od planárnych  $Pt^{II}$  majú oktaedrálnu štruktúru (Obr. č. 6), ktorá je viac kineticky inertná a preto podliehajú substitučným reakciám pomalšie. Dochádza k zníženej interakcii komplexu s proteínmi krvnej plazmy a tým pádom sú stabilnejšie v krvi pacienta [34]. Zástupcom tejto skupiny látok je satraplatina (Obr. č. 6), ktorá bola ako prvá vyvinutá pre orálne podanie a momentálne je vo fáze III klinických testov v kombinácii s inými liečivami [22]. Po konverzii  $Pt^{IV}$  na  $Pt^{II}$  v redukčnom prostredí nádorových buniek reaguje aktivovaný  $Pt^{II}$  podobným mechanizmom ako klasické deriváty cisplatiny. Vzhľadom k tomu, že pri aktivačnom kroku sú odstránené axiálne ligandy, je možné ich farmakologicky využiť napríklad na zvýšenie selektívnej bunecnej akumulácie či aktivity [24,34,35]. Existuje niekoľko spôsobov redukcie platičitých komplexov – reakcia s GSH, kyselinou askorbovou či fotochemická aktivácia a podobne [35,36].



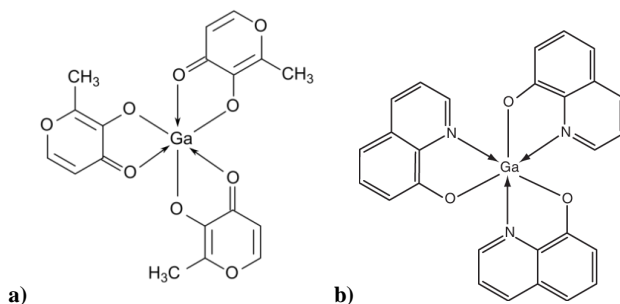
Obr. č. 6: Štruktúra satraplatiny (Prevzaté z [12])



#### 2.2.4. Komplexy gália

Od klinického schválenia používania cisplatiny sú cytostatiká na báze koordinačných zlúčenín s centrálnym atómom kovu významnou súčasťou protinádorového výskumu. Zlúčeniny trojmocného gália sa v protinádorovej terapii javia ako vysoko perspektívne, pretože gálium (III) má niekoľko vlastností podobných so železom (III) ako napríklad elektrický náboj, iónový polomer, koordinačné číslo a elektrónovú konfiguráciu. Znamená to, že gálium môže v niektorých bunčných procesoch železo zastúpiť [37].

Niektoré zo zlúčenín gália –  $(\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ , účinný v kombinácii s inými zlúčeninami pri liečbe uroteliálneho karcinómu, maltolát galitý (Obr. č. 7), účinný v liečbe hepatocelulárnych nádorov, a KP46 (Obr. č. 7) sa dostali aj do fázy klinického testovania [38]. Najvýznamnejším z nich je práve KP46 (tris-(8-chinolinolato) gálium (III)), ktorý je momentálne v druhej fáze klinických testov. Tento komplex vykazuje silnú antiproliferatívnu aktivitu na rôznych bunkových nádorových líniách ako sú napríklad pľúcne, ovariálne, prsné, kolorektálne nádorové línie a melanómy s  $\text{IC}_{50} < 5 \mu\text{M}$  [37,39]. Taktiež veľmi účinne pôsobí na kostné primárne aj metastatické nádory [40].



Obr. č. 7: Štruktúra klinicky testovaných gáliových komplexov: a) maltolát galitý, b) KP46

(Prevzaté z [41])

### 3. Ciele práce

Cieľom teoretického úvodu bolo zhrnúť poznatky a vývoj dosiahnutý v oblasti protinádorových zlúčenín s centrálnym atómom kovu.

Experimentálna časť práce sa skladá zo štyroch čiastkových cieľov, ktoré sa týkajú popisu vlastností nových potenciálnych protinádorových zlúčenín pomocou dostupných molekulárne – biologických, biofyzikálnych, biochemických a fyzikálne – chemických metód.

Prvým bolo štúdium interakcií nových fotoaktivovateľných dinukleárných platičitých komplexov s DNA a porovnaním ich účinku s príbuzným mononukleárnym **FM190** (poskytnuté skupinou prof. Sadlera). Druhým cieľom bolo popísať rozdiely v mechanizme účinku dvoch enantiomérnych komplexov **R-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>]** a **S-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>]** (poskytnuté skupinou prof. Bednarskiho), ktorý je zjavne odlišný od cisplatiny. Tretím cieľom tejto práce bolo študovať translézovú syntézu DNA cez špecifický monofunkčný adukt platinového komplexu **AMD** (poskytnutý skupinou prof. Bierbacha).

Okrem popisu platinových derivátov a ich pôsobenia na molekulárnej úrovni bolo ďalším z cieľov dizertačnej práce štúdium komplexu gália (poskytnutý skupinou prof. Potočňáka) na bunecnej úrovni stanovením jeho antiproliferatívnej aktivity a selektivity na viacerých bunkových nádorových líniiach.

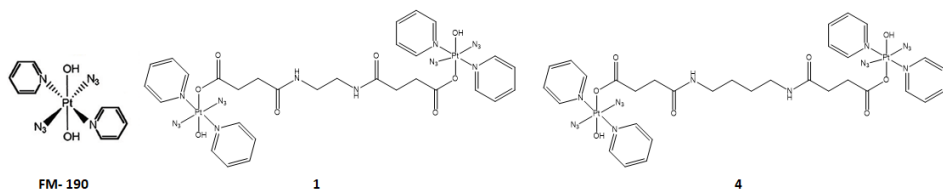
## 4. Výsledky a diskusia

Experimentálna časť predkladanej dizertačnej práce je založená na štyroch samostatných publikáciách zverejnených v medzinárodných impaktovaných časopisoch (viď Zoznam publikovaných prác). Tri články sú tematicky zamerané na štúdium molekulárneho mechanizmu účinku nových potenciálnych protinádorových zlúčenín platiny na DNA a jeden článok sa zaoberá stanovením cytotoxicity komplexu gália.

### 4.1. Publikácia č. 1

#### Photoactivatable cell-selective dinuclear trans-diazidoplatinum(IV) anticancer prodrugs.

Prvý projekt v rámci tejto dizertačnej práce sa zaoberá popisom väzby fotoaktivovateľných dinukleárných komplexov platiny *trans,trans,trans*-[Pt(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(pyridín)<sub>2</sub>(OH)(OC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)NH)<sub>2</sub>R] [R=–CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>–(**1**), –CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>– (**4**)] na DNA a ich porovnaním s príbuzným mononukleárnym *trans,trans,trans*-[Pt(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>(pyridín)<sub>2</sub>] (**FM-190**) (Obr. č. 8), aby sa potvrdil vplyv spojujúceho ligandu.

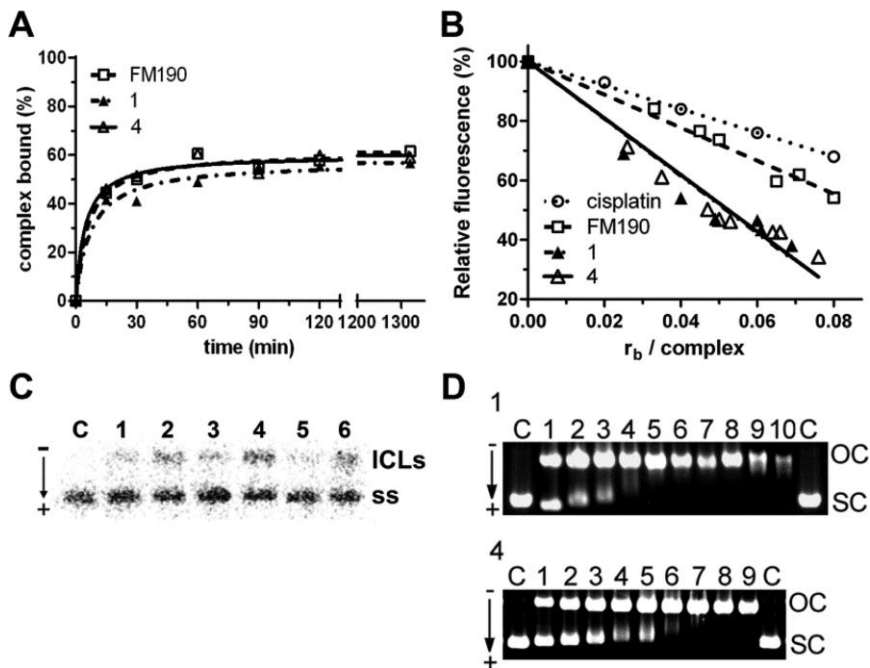


Obr. č. 8: Štruktúra testovaných komplexov *trans,trans,trans*-[Pt(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>(pyridín)<sub>2</sub>] (**FM-190**), *trans,trans*-[Pt(N<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(pyridín)<sub>2</sub>(OH)(OC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)NH)<sub>2</sub>R] [R=–CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>–(**1**); R=–CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>– (**4**)] (Prevzaté z [42,43])

V prípade testovaných komplexov bola použitá aktivácia modrým svetlom ( $\lambda_{\text{max}}=420$  nm 1h a následná inkubácia v tme pri 37 °C po dobu 23h). Komplexy **1** a **4** po fotoaktivácii *in vitro* reagovali podobne ako mononukleárny komplex **FM-190**. Čo sa týka kinetiky väzby komplexov **1** a **4** na CT-DNA, nebol medzi nimi

a komplexom **FM-190** zistený signifikantný rozdiel (Obr. č. 9A). Na charakterizáciu poškodení spôsobených aduktmi komplexov **FM-190**, **1** a **4** indukovaných v DNA bol použitý DNA interkalátor EtBr ako fluorescenčná sonda. Modifikácia DNA komplexami platiny za podmienok ožarovania viedla k zníženiu fluorescence EtBr (Obr. č. 9B). Pokles fluorescence spôsobený aduktmi fotoaktivovaných **1** a **4** na DNA bol pri ekvivalentných hodnotách  $r_b$  (definované ako počet molekúl platinového komplexu naviazaných na jeden nukleotid) dvojnásobný než v prípade **FM-190**. Modifikácia DNA ožiareným **FM-190** vedie k vytvoreniu medzireťazcových mostíkov [42]. Preto bola táto schopnosť tiež skúmaná u komplexov **1** a **4**. Ožiarené komplexy **1** a **4** vytvorili v DNA dvojnásobne väčšie množstvo medzireťazcových mostíkov než **FM-190** (Obr. č. 9C). Frekvencia medzireťazcových mostíkov bola  $12,5 \pm 0,5$  % pre **FM-190**,  $24 \pm 2$  % pre **1** a  $24 \pm 2$  % pre **4** na rovnakom stupni modifikácie vzťahujúcej sa na komplex.

Študované komplexy spôsobovali podobne ako **FM-190** rozvíjanie superhelikálnej DNA [42]. Uhol rozvíjania ( $\Phi$ ) DNA modifikovanej komplexami **1** a **4** bol  $57 \pm 8$  ° (Obr. č. 9D). Táto hodnota je dvakrát vyššia, než uhol rozvíjania DNA modifikovanej komplexom **FM-190**, stanovený za rovnakých podmienok ( $28 \pm 4$  °) [42]. V súlade s výsledkami experimentov zameraných na charakterizáciu DNA aduktov pomocou EtBr fluorescence a medzireťazcových mostíkov sa dajú výsledky experimentu rozvíjania DNA interpretovať tak, že v dôsledku ožiarovania dinukleárných komplexov **1** a **4** a ich rozpadu vznikajú 2 molekuly podobné molekulám mononukleárneho **FM-190**.

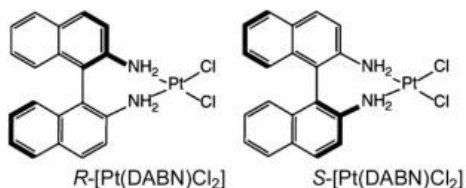


Obr. č. 9: Vázba fotoaktivovaných komplexov na DNA in vitro. Obsah platiny vo vzorkoch –  $r_b$  bol určený pomocou AAS a koncentrácia DNA pomocou UV-VIS spektroskopie. A) Kinetika reakcie skúmaných komplexov fotoaktivovaných viditeľným svetlom  $\lambda_{max} = 420$  nm na CT-DNA. B) Závislosť fluorescence EtBr na  $r_b$  modifikovanej CT-DNA platinovými komplexami. C) Tvorba medzireťazcových mostíkov DNA modifikovanej komplexami 1, 4 ( $r_b = 0,00015$  a  $0,0003$ ) a FM-190 ( $r_b = 0,0003$  a  $0,0006$ ). Medzireťazcové mostíky (ICLs) migrujú v géle pomalšie ako jednovláknová DNA (ss). D) Rozvíjanie superhelikálnej plazmidovej DNA pSP73KB komplexami 1 a 4 fotoaktivovateľnými viditeľným svetlom. „OC“ frakcie zodpovedajú rozvinutej forme DNA, ktorá migruje pomalšie a frakcie „SC“ označujú superhelikálnu negatívne vinutú DNA. Hodnoty  $r_b$  pre komplex 1: 0,0005, 0,0025, 0,005, 0,0075, 0,01, 0,0125, 0,015, 0,0175, 0,02 a 0,015 a pre komplex 4: 0,001, 0,0015, 0,0025, 0,0035, 0,005, 0,01, 0,015, 0,0175 a 0,02.

## 4.2. Publikácia č. 2

### DNA modification by cisplatin-like Pt(II) complexes containing 1,1'-binaphthyl-2,2'-diamine ligand does not correlate with their antiproliferative activity in cancer cells.

Druhá časť dizertačnej práce sa zaoberá enantiomérnymi derivátmi cisplatinu **R**-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] a **S**-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] (DABN = 1,1'-binaftyl-2,2'-diamín) (Obr. č. 10), ktoré vykazujú antiproliferatívne účinky v niektorých nádorových bunkových líniách citlivých na konvenčnú cisplatinu alebo oxaliplatinu [44–46].



Obr. č. 10: Štruktúra testovaných komplexov **R**-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] a **S**-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] (Prevzaté z [47])

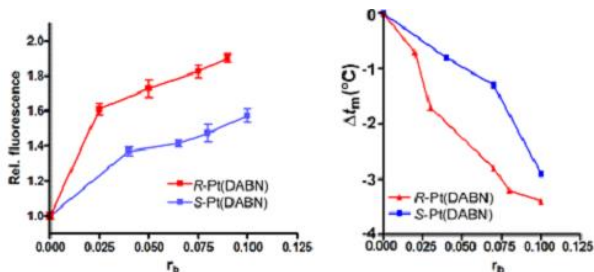
Sú taktiež aktívne v nádorových bunkách rezistentných na cisplatinu, čo naznačuje ich účinnosť pri obchádzaní získanej rezistencie na cisplatinu. Napriek vyššej účinnosti **S**-izoméru vykazoval **R**-izomér väčšiu akumuláciu v bunkách a účinnejšiu väzbu na CT-DNA [44–46]. Na pochopenie molekulárneho mechanizmu ich účinku, ktorý sa zjavne líši od účinku cisplatinu, bolo dôležité podrobnejšie skúmanie interakcií DNA s **R**-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] a **S**-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] *in vitro*.

Sekvenčná analýza odhalila, že stop miesta transkripcie DNA spôsobené aduktmi **R**-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] sú aj napriek *cis* konfigurácii chloridových ligandov podobné stop miestam transplatinu v oblastiach G a C [48]. **R**-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] vytvára viac typov aduktov na DNA ale s menšou sekvenčnou špecifitou ako cisplatinu. Naopak, **S**-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] vykazuje odlišnú sekvenčnú závislosť

inhibície transkripcie ako *R*-izomér. Adukty *S*-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] blokujú RNA polymerázy pravidelnejšie a väčšinou v sekvenciách d(GpG), ktoré sú podobné cisplatine.

Schopnosť komplexov *R*- a *S*-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] rozvíjať dvojzávitnicu DNA bola monitorovaná pomocou natívnej agarózovej elektroforézy. Uhly rozvíjania DNA stanovené týmto spôsobom boli  $17 \pm 4^\circ$  pre *R*-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] a  $9 \pm 3^\circ$  pre *S*-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>]. Výsledky jasne ukazujú, že obidva komplexy rozvíjajú superhelikálnu DNA, ale líšia sa mierou účinku. Zatiaľ čo uhol rozvíjania pozorovaný pre *S*-izomér bol podobný uhlu zistenému pre transplatinu ( $9^\circ$ , [49]), *R*-izomér bol ešte účinnejší ako cisplatina ( $13^\circ$ , [49]). Väčšia rozvíjacia kapacita *R*-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] teda koreluje so silnejšou deformáciou a destabilizáciou DNA týmto komplexom v porovnaní s *S*-izomérom.

Vyššia schopnosť *R*-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] deformovať DNA bola potvrdená aj zvýšením intenzity fluorescencie Tb<sup>3+</sup> oproti komplexu *S*-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>], čo indikuje väčšie zmeny v konformácii DNA (Obr. č. 11A). Komplex *R*-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] taktiež význame viac termálne destabilizuje DNA, čo bolo potvrdené meraním teploty topenia DNA modifikovanej týmito komplexami a zisťovaním frekvencie tvorby medzireťazcových mostíkov, ktorá bola pre obidva komplexy rovnaká ( $11 \pm 2,5\%$  pre *R*- a  $10,6 \pm 2,7\%$  pre *S*-izomér) (Obr. č. 11B).



Obr. č. 11: A. Zmena relatívnej fluorescence  $Tb^{3+}$  iónu naviazaného na dvojzávitnicovú CT-DNA modifikovanú komplexmi platiny  $R$ -[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] a  $S$ -[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>]. Fluorescencia nemodifikovanej DNA bola normalizovaná na 1. Hodnoty v grafe sú priemerom ( $\pm$  SEM) z troch nezávislých meraní. (B) Graf hodnôt  $\Delta T_m$  CT-DNA modifikovanej  $R$ -[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] a  $S$ -[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] na rôzne stupne modifikácie ( $r_b$ ). Hodnoty  $T_m$  boli merané v médiu obsahujúcom 0,05 M NaClO<sub>4</sub>.  $\Delta T_m$  je definovaná ako rozdiel medzi  $T_m$  hodnotami platinovanej a nemodifikovanej (kontrolnej) DNA. (Prevzaté z [47])

S cieľom objasniť úlohu rozpoznávania DNA aduktov spôsobených  $R$ - a  $S$ -[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] HMG proteínmi a opravy DNA v ich mechanizme pôsobenia bola skúmaná reparačná syntéza DNA v neprítomnosti a v prítomnosti proteínu HMGB1a. Reparačná syntéza detekovaná v plazmide modifikovanom obidvoma izomérmi  $R$ - a  $S$ -[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] bez HMG proteínu bola približne dvojnásobná oproti reparačnej syntéze na cisplatinou modifikovanom plazmide, pričom medzi nimi nebol významný rozdiel. V prítomnosti proteínu HMGB1a bola opravná syntéza DNA poškodenej cisplatinou významne potlačená v súlade so skôr publikovanými údajmi [50,51]. Avšak reparačná syntéza DNA poškodenej komplexami  $R$ -,  $S$ -[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] nebola ovplyvnená prítomnosťou proteínu HMGB1a, čo naznačuje, že lézie, spôsobené týmito dvoma enantiomérmi, nie sú významne rozpoznávané a tierené proteínmi s HMG doménou.

Jedným z dôvodov zníženého účinku platinových cytostatík je ich inaktivácia v dôsledku interakcie s látkami obsahujúcimi síru. Kvôli vyhodnoteniu účinku týchto interakcií na cytotoxicitu komplexov  $R$ -,  $S$ -[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>] bola pomocou UV absorpčnej spektrometrie skúmaná ireverzibilná väzba GSH na oba komplexy v porovnaní s cisplatinou [52]. Za experimentálnych podmienok použitých v tejto



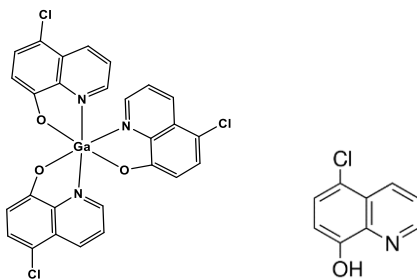
práci oba izoméry reagovali s GSH porovnateľnou rýchlosťou ako cisplatina, pričom *S*-izomér bol mierne, ale nevýznamne rýchlejší.

Chiralita potenciálnych liečiv môže výrazne ovplyvniť spôsob väzby na DNA, ale zmeny vo väzbe na DNA sa nemusia transportovať priamo do procesov bunky a cytotoxicity. V prípade ***R*-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>]** a ***S*-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>]** nie je poškodenie DNA spôsobené väzbou komplexov platiny hlavným dôvodom zodpovedným za ich biologické pôsobenie. ***R***-izomér vytvára lézie, ktoré DNA deformujú a destabilizujú vo väčšej miere ako ***S***-izomér, ktorý je však cytotoxický [44,45]. Preto je pravdepodobný iný molekulárny cieľ v bunkách, ktorého modifikácia by mohla byť zodpovedná za biologický účinok týchto komplexov.

### 4.3. Publikácia č. 3

#### **Low-dimensional compounds containing bioactive ligands. Part XIV: High selective antiproliferative activity of tris(5-chloro-8-quinolinolato)gallium(III) complex against human cancer cell lines.**

Tretím projektom tejto práce je skúmanie antiproliferatívnej aktivity nového komplexu gália (III) s haloderivátom 8-chinolinolu - [Ga(ClQ)<sub>3</sub>] (**1**), kde H-ClQ = 5-chlór-8-chinolinol (Obr. č. 12).



Obr. č. 12 :Štruktúra testovaného komplexu Ga(ClQ)<sub>3</sub> (ClQ = 5-chloro-8-chinolinol) (**1**) a ligandu **H-ClQ** (Prevzaté z [53])

Pomocou MTT testu bola stanovená antiproliferatívna aktivita komplexu **1** a pre porovnanie aj jeho ligandu **CIQ** a cisplatiny na ľudských nádorových bunkách A2780 (ľudský ovariálny karcinóm), HTC-116 (ľudský kolorektálny karcinóm) MDA-MB-231 (triple-negatívny ľudský karcinóm prsníku) a MRC5pd30 (bunky z normálneho pľúcneho tkaniva).

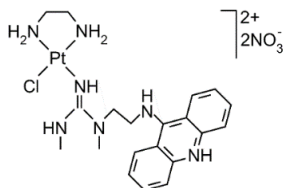
Komplex **1** vykazoval vysokú účinnosť v celej škále bunkových nádorových línií s nízkymi hodnotami  $IC_{50}$  (koncentrácie komplexu indikujúce 50 % inhibíciu proliferácie buniek). V prípade A2780, ktoré sú citlivé k cisplatine, mal podobný účinok ako cisplatina. Na bunkách kolorektálneho karcinómu a ťažko liečiteľného, silne metastázujúceho karcinómu prsníka bola jeho antiproliferatívna aktivita v porovnaní s cisplatinou a samotným ligandom **CIQ** výrazne vyššia. Dôležitým zistením je, že komplex **1** taktiež vykazuje zreteľnú selektivitu pre nádorové bunky oproti nezhubným pľúcny fibroblastom MRC5pd30, na ktorých sa jeho účinok prejavil pri koncentráciách 24 – 65-krát vyšších ako pre nádorové bunky. Vďaka tomuto faktoru je komplex **1** perspektívnym kandidátom na ďalšie biologické testovanie.

#### **4.4. Publikácia č. 4**

### **Thermodynamic Insights by Microscale Thermophoresis into Translesion DNA Synthesis Catalyzed by DNA Polymerases Across a Lesion of Antitumor Platinum–Acridine Complex.**

Poslednou časťou dizertačnej práce je štúdium translázovej syntézy DNA (TLS) modifikovanej komplexom **AMD** (Obr. č. 13) pomocou polymeráz a mikroškálovej termofórey (MST). Aduky platinových komplexov na DNA blokujú viaceré kľúčové funkcie bunky ako napríklad replikáciu DNA a zapríčiňujú programovanú bunkovú smrť [3]. Na druhej strane sa bunky snažia obnoviť zastavenú replikáciu DNA a využívajú aktivitu translázových DNA polymeráz, ktoré sú schopné premostiť platinové adukty. TLS polymerázy sú menej presné ako

väčšina replikačných DNA polymeráz a sú schopné inkorporovať nesprávne nukleotidy a tak indukovať mutácie [3,54–56].



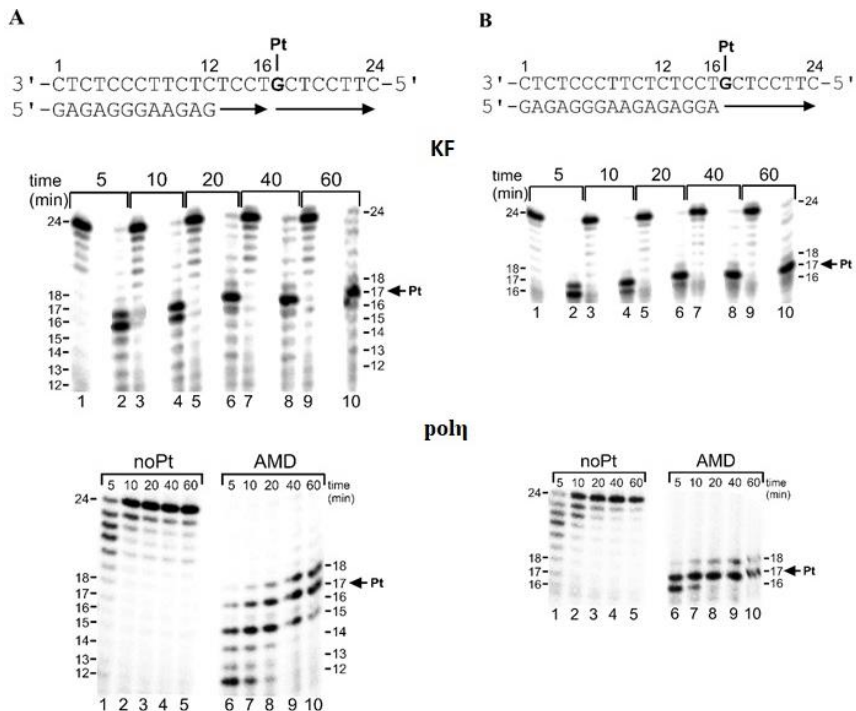
Obr. č. 13: Štruktúra testovaného komplexu AMD  $[PtCl(en)(L)](NO_3)_2$  (en = ethylén-1,2-diamín, L = *N*-[2-(akridín-9-ylamino)ethyl]-*N*-methylpropionamidín) (Prevzaté z [57])

V práci bolo študované premostenie špecifického aduktu komplexu **AMD** na DNA pomocou polymeráz  $KF^{exo}$  a DNA polymerázy  $\eta$  (Pol $\eta$ ), ktoré sa líšia svojou procesivitou a presnosťou. Boli prevedené 2 typy experimentov – „running (Obr. č. 14A) a standing start“ (Obr. č. 14B) a následne boli skúmané kinetické parametre inkorporácie jednotlivých nukleotidov.

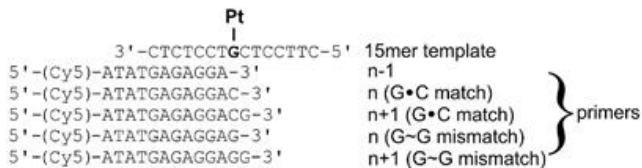
Inhibícia syntézy DNA translázovými polymerázami môže byť spôsobená nielen ich sterickou blokáciou, zapríčinenou aduktom komplexu, ale tiež energetickým dopadom poškodenia DNA na proces TLS [58,59]. Na meranie termodynamických zmien (Tabuľka 1) spojených s TLS cez adukt **AMD** bola použitá technika MST, ktorá je bližšie popísaná na Obr. č. 16. TLS bola simulovaná pomocou dvoch setov fluorescenčne značených primerov: komplementárne  $n-1$ ,  $n$ ,  $n+1$  a nekomplementárne  $n_G$  a  $n_G+1$  (Obr. č. 15).

V prítomnosti všetkých štyroch dNTPs bol adukt **AMD** veľmi účinný v inhibícii TLS obidvoch polymeráz. Najviac bol inkorporovaný správny dCTP v prípade aduktu **AMD**, rovnako aj v kontrole. Na druhej strane, Pol $\eta$  bola schopná inkorporovať nesprávny dGTP oproti platinovanému G s vyššou relatívnou účinnosťou ako oproti nemodifikovanému G v kontrolnom templáte. To bolo potvrdené pomocou MST, kde termodynamické parametre (Tabuľka 1) ukázali

vyššiu stabilitu platinovaného nekomplementárneho duplexu G~G ako nemodifikovanej kontroly. Zároveň bolo potvrdené, že inkorporácia správneho dCTP je termodynamicky výhodnejšia.



Obr. č. 14: Reprezentatívne snímky produktov DNA polymerázovej reakcie v 15 % PAA géle. Translézová syntéza DNA pomocou KF<sup>-</sup> a Pol $\eta$  na 12-mer/24-mer (running start experiment) (A) a 16-mer/24-mer (standing start experiment) (B) primer-templát duplexe modifikovanom komplexom AMD a kontrolnom - nemodifikovanom. TLS prebiehala v prítomnosti všetkých štyroch dNTPs v rôznych časových intervaloch. Sekvencia duplexu je ukázaná vo vrchnej časti obrázku. KF: kontrola: 1, 3, 5, 7, 9; modifikovaný templát: 2, 4, 6, 8, 10. (Prevzaté z [57])



Obr. č. 15: Sekvencie templátu a značených primerov použitých pri MST. (Prevzaté z [57])

Tabuľka 1: Termodynamické parametre disociácie komplementárnych aj nekomplementárnych duplexov - kontrolného, alebo obsahujúceho AMD adukt.

15mer templát/ primer n-1 <sup>1</sup>	$\Delta H^b$ (kJmol <sup>-1</sup> )	$\Delta S^2$ (kJK <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G_{310}^{0,2}$ (kJmol <sup>-1</sup> )	$K_d^3$ (nM)
Nemodifikovaná kontrola	187	0.511	28.5	15 846
AMD adukt	225	0.612	35.2	1 179

15mer templát/ primer n (G·C match) <sup>1</sup>	$\Delta H^b$ (kJmol <sup>-1</sup> )	$\Delta S^2$ (kJK <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G_{310}^{0,2}$ (kJmol <sup>-1</sup> )	$K_d^3$ (nM)
Nemodifikovaná kontrola	295 (108)	0.853 (0.342)	30.4 (1.9)	7 585
AMD adukt	259 (34)	0.720 (0.108)	35.7 (0.5)	971

15mer templát/ primer n+1 (G·C match) <sup>1</sup>	$\Delta H^b$ (kJmol <sup>-1</sup> )	$\Delta S^2$ (kJK <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G_{310}^{0,2}$ (kJmol <sup>-1</sup> )	$K_d^3$ (nM)
Nemodifikovaná kontrola	327 (140)	0.935 (0.424)	37.0 (8.5)	587
AMD adukt	293 (68)	0.809 (0.197)	42.1 (6.9)	81

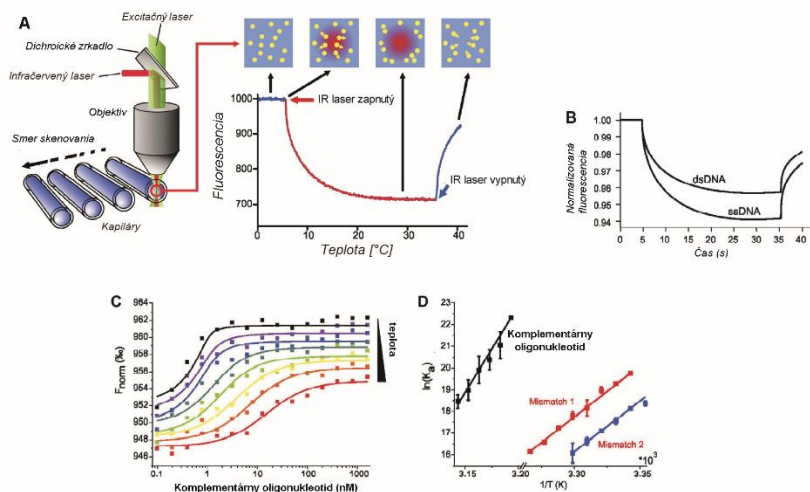
  

15mer templát/ primer n (G~G mismatch) <sup>1</sup>	$\Delta H^b$ (kJmol <sup>-1</sup> )	$\Delta S^{2b}$ (kJK <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G_{310}^{0,2}$ (kJmol <sup>-1</sup> )	$K_d^3$ (nM)
Nemodifikovaná kontrola	204 (17)	0.573 (0.062)	26.3 (-2.2)	37 193
AMD adukt	250 (25)	0.715(0.103)	28.2 (-7.0)	17 802

15mer templát/ primer n+1 (G~G mismatch) <sup>1</sup>	$\Delta H^b$ (kJmol <sup>-1</sup> )	$\Delta S^2$ (kJK <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G_{310}^{0,2}$ (kJmol <sup>-1</sup> )	$K_d^3$ (nM)
Nemodifikovaná kontrola	245 (58)	0.700 (0.189)	27.9 (-0.6)	19 998
AMD adukt	267 (42)	0.766 (0.154)	29.4 (-5.8)	11 178

<sup>1</sup> Sekvencia nukleotidov ukázaná na Obr. č.13. <sup>2</sup> Hodnoty  $\Delta H$  a  $\Delta S$  sú priemerom z 2 nezáviských meraní. Chyby merania:  $\Delta H$ :  $\pm 3\%$ ,  $\Delta S$ :  $\pm 5\%$ ,  $\Delta G_{310}^0$ :  $\pm 1\%$ ,  $K_d$ :  $\pm 10\%$ . “ $\Delta\Delta$ ” parametre v zátvorkách sú získané odčítaním hodnoty získanej pre n-1 od hodnôt, získaných pre ostatné duplexy <sup>3</sup>  $K_d$  – disociačná konstanta pre disociáciu reťazca ( $\Delta G_{310}^0 = -RT\ln K_d$ ).



Obr. č. 16: Schéma Mikroškálovej termoforézy. A) Schematická reprezentácia MST optiky a typický signál získaný z termoforetického experimentu. Začiatok – homogénna distribúcia molekúl, konštantná počiatočná fluorescencia. Aktivácia laseru - „T-Jump“, rýchla zmena vlastností fluoroforu v dôsledku rýchlej zmeny teploty. Termoforetický pohyb fluorescenčne značených molekúl – zmena fluorescencie po dobu 30 s. Deaktivácia laseru – spätný rozptyl molekúl poháňaný difúziou. B) Ukážka rozdielu v signále jednoreťazcovej a dvojreťazcovej DNA C) Ukážka väzbových kriviek nameraných v rozsahu teplôt, z ktorých sú pre každú teplotu získané disociačné konštanty. D) Získané hodnoty  $K_d$  pre každú teplotu boli vynesené do Van't Hoffovho grafu ako  $\ln(K_d)$  vs.  $1/T$ . Teplotná závislosť asociačnej konštanty  $K_a$  ( $1/K_d$ ) bola použitá na odvodenie termodynamických parametrov  $\Delta H$  a  $\Delta S$  lineárnou extrapoláciou údajov vo Van't Hoffovom grafe.  $\Delta G$  bola získaná pomocou rovnice  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ . (Prevzaté a upravené z [60])

## 5. Záver

Úvodná časť dizertačnej práce sa venuje popisu interakcií DNA a cisplatiny ako najpoužívanejšieho cytostatika na báze kovov. Boli popísané konformačné zmeny v DNA vyvolané väzbou cisplatiny a ich bunecné spracovanie. Ďalej nasledoval popis vývoja a vlastností nových komplexov na báze kovov s odlišnou štruktúrou a mechanizmom pôsobenia ako cisplatina.

Primárnym cieľom tejto práce boli prispieť k teoretickým poznatkom o mechanizme účinku nových protinádorových zlúčenín s centrálnym atómom kovu, Biologická aktivita cisplatiny a jej derivátov je sprostredkovaná rozpoznávaním jej aduktov bunecnými proteínmi a celkovou odpoveďou bunky na poškodenie DNA. Je veľmi dôležité poznať mechanizmus účinku týchto látok, jednak z dôvodu zlepšenia celkovej cytotoxicity a taktiež kvôli efektívnemu zvládnutiu liečby.

V práci boli skúmané rôzne skupiny platinových derivátov – polynukleárne platinové komplexy v spojení so selektívnymi Pt<sup>IV</sup> komplexami, priame deriváty cisplatiny, monofunkčný komplex a komplex gália.

V snahe zlepšiť vlastnosti polynukleárnych platinových zlúčenín a zvýšiť ich selektívny cytotoxický účinok boli syntetizované nové dinukleárne fotoaktivovateľné Pt<sup>IV</sup> komplexy. V prvej časti tejto práce bola študovaná väzba dvoch nových fotoaktivovateľných dinukleárnych platičitých komplexov na DNA. Ich fotodekompozíciou po aktivácii modrým svetlom sa uvoľnili dve platinové jednotky podobné mononukleárnemu **FM-190**. To malo za následok, že **1** a **4** reagovali podobne, ako mononukleárny komplex **FM-190** čo sa týka kinetiky väzby na DNA, transkripčného mapovania a footprintu DNA aduktov pomocou DNázy I. Na druhej strane však boli v porovnaní s fotoaktivovaným mononukleárnym **FM-190** približne dvojnásobne účinnejšie pri potlačení fluorescencie EtBr interkalovaného do DNA, vytváraní medzireťazcových mostíkov a rozvíjaní DNA. Toto spojenie fotoaktivovateľných Pt<sup>IV</sup> komplexov s polynukleárnymi komplexami

sa ukazuje ako úspešné z hľadiska zvýšenej cytotoxicity a selektivity na nádorové bunky.

Intenzívny výskum mechanizmu účinku platinových cytostatík a ich derivátov viedol k záveru, že za ich protinádorové účinky je zodpovedné poškodenie DNA vyvolané ich koordinačnou väzbou. Výsledky prezentované v druhej časti tejto dizertačnej práce ukazujú, že chiralita komplexov **[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>]** môže výrazne ovplyvniť spôsob ich väzby na DNA. Na druhej strane sa však rozdiely vo väzbe na DNA neprenášajú priamo do bunecného spracovania a toxicity **R-** a **S-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>]** v rakovinových bunkách. Tieto výsledky podporujú hypotézu, že na rozdiel od konvenčných platinových liečiv a ich priamych analógov nie je poškodenie DNA spôsobené väzbou komplexov **[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>]** hlavným faktorom zodpovedným za ich biologické pôsobenie. Preto je pravdepodobný iný molekulárny cieľ v bunkách, ktorého modifikácia by mohla byť zodpovedná za biologický účinok týchto komplexov. DNA sa bežne považuje za farmakologický cieľ pre protinádorové komplexy na báze platiny a iných kovov. Tento predpoklad je často založený iba na štruktúrnej analógii s cisplatinou, bez akýchkoľvek podporných experimentálnych dôkazov. Výsledky prezentované v tejto práci ďalej naznačujú, že dokonca aj komplexy štruktúrne odvodené od cisplatiny, ako napríklad **R-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>]** a **S-[Pt(DABN)Cl<sub>2</sub>]**, by mohli mať biologický mechanizmus účinku zreteľne odlišný od „rodičovskej“ cisplatiny.

Jednou zo stratégií na vylepšenie platinových cytostatík je výmena centrálného atómu platiny za iný kov ako napríklad gálium. Niekoľko jeho úspešných zlúčenín je v rôznych fázach klinického testovania. V tejto práci bola skúmaná antiproliferatívna aktivita komplexu gália s ligandom kloxiqúinom na celej škále bunkových nádorových línií a porovnávaná s účinkom cisplatiny a samotného ligandu kloxiqúinu, ktorý taktiež vykazuje protinádorové účinky. Tento komplex vykazoval vyššiu antiproliferatívnu aktivitu a výraznejšiu selektivitu na nádorové bunky v porovnaní s cisplatinou a ligandom kloxiqúinom.



Translézová syntéza cez adukty protinádorových komplexov platiny na DNA koreluje s rezistenciou nádorových buniek na liečbu. Práve z tohto dôvodu bolo zaujímavé sledovať premostenie a s tým spojené termodynamické zmeny špecifického monofunkčného aduktu komplexu **AMD** na DNA pomocou dvoch polymeráz a MST. Výsledky získané pomocou MST boli v súlade s experimentálnymi dátami popisujúcimi translézovú syntézu DNA cez adukt **AMD** prokaryotickou aj eukaryotickou DNA polymerázou. Termodynamické parametre taktiež prispeli k hlbšiemu porozumeniu toho, ktoré faktory vplývajú na mechanizmus DNA syntézy cez adukt **AMD**.

Výsledky získané v tejto práci viedli k popísaniu väzby nových metalofarmak na DNA a mechanizmu ich pôsobenia na molekulárnej a bunečnej úrovni. Práca prispieva k riešeniu projektov zameraných na problematiku nových účinnejších a bezpečnejších metalofarmak použiteľných pri protinádorovej terapii.

## 6. Zoznam použitej literatúry

1. Hannon, M.J. Metal-Based Anticancer Drugs: From a Past Anchored in Platinum Chemistry to a Post-Genomic Future of Diverse Chemistry and Biology. *Pure Appl. Chem.* **2007**, *79*, 2243–2261, doi:10.1351/pac200779122243.
2. Kelland, L. The Resurgence of Platinum-Based Cancer Chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 573–584, doi:10.1038/nrc2167.
3. Todd, R.C.; Lippard, S.J. Inhibition of Transcription by Platinum Antitumor Compounds. *Metallomics* **2009**, *1*, 280–291, doi:10.1039/B907567D.
4. Jamieson, E.R.; Lippard, S.J. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin–DNA Adducts. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2467–2498, doi:10.1021/cr980421n.
5. Johnstone, T.C.; Suntharalingam, K.; Lippard, S.J. The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 3436–3486, doi:10.1021/acs.chemrev.5b00597.
6. Gately, D.P.; Howell, S.B. Cellular Accumulation of the Anticancer Agent Cisplatin: A Review. *Br. J. Cancer* **1993**, *67*, 1171–1176, doi:10.1038/bjc.1993.221.
7. Abada, P.; Howell, S.B. Regulation of Cisplatin Cytotoxicity by Cu Influx Transporters. *Met.-Based Drugs* **2010**, *2010*, 1–9, doi:10.1155/2010/317581.
8. Howell, S.B.; Safaei, R.; Larson, C.A.; Sailor, M.J. Copper Transporters and the Cellular Pharmacology of the Platinum-Containing Cancer Drugs. *Mol. Pharmacol.* **2010**, *77*, 887–894, doi:10.1124/mol.109.063172.
9. Basu, A.; Krishnamurthy, S. Cellular Responses to Cisplatin-Induced DNA Damage. *J. Nucleic Acids* **2010**, *2010*, 1–16, doi:10.4061/2010/201367.
10. Brabec, V.; Kasparkova, J. Modifications of DNA by Platinum Complexes: Relation to Resistance of Tumors to Platinum Antitumor Drugs. *Drug Resist. Updat.* **2005**, *8*, 131–146, doi:10.1016/j.drug.2005.04.006.
11. Johnstone, T.C.; Wilson, J.J.; Lippard, S.J. Monofunctional and Higher-Valent Platinum Anticancer Agents. *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 12234–12249, doi:10.1021/ic400538c.
12. Brabec, V.; Hrabina, O.; Kasparkova, J. Cytotoxic Platinum Coordination Compounds. DNA Binding Agents. *Coord. Chem. Rev.* **2017**, *351*, 2–31, doi:10.1016/j.ccr.2017.04.013.
13. Wang, X.; Guo, Z. Targeting and Delivery of Platinum-Based Anticancer Drugs. *Chem Soc Rev* **2013**, *42*, 202–224, doi:10.1039/C2CS35259A.
14. Florea, A.-M.; Büsselberg, D. Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. *Cancers* **2011**, *3*, 1351–1371, doi:10.3390/cancers3011351.
15. Lovejoy, K.S.; Lippard, S.J. Non-Traditional Platinum Compounds for Improved Accumulation, Oral Bioavailability, and Tumor Targeting. *Dalton Trans.* **2009**, 10651, doi:10.1039/b913896j.
16. Kostova, I. Platinum Complexes as Anticancer Agents. *Recent Patents Anticancer Drug Discov.* **2006**, *1*, 1–22, doi:10.2174/157489206775246458.
17. Wheate, N.J.; Walker, S.; Craig, G.E.; Oun, R. The Status of Platinum Anticancer Drugs in the Clinic and in Clinical Trials. *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 8113–8127, doi:10.1039/c0dt00292e.
18. Tesniere, A.; Schlemmer, F.; Boige, V.; Kepp, O.; Martins, I.; Ghiringhelli, F.; Aymeric, L.; Michaud, M.; Apetoh, L.; Barault, L.; et al. Immunogenic Death of Colon Cancer Cells Treated with Oxaliplatin. *Oncogene* **2010**, *29*, 482–491, doi:10.1038/onc.2009.356.
19. Muhammad, N.; Guo, Z. Metal-Based Anticancer Chemotherapeutic Agents. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 144–153, doi:10.1016/j.cbpa.2014.02.003.

20. Wang, X. Fresh Platinum Complexes with Promising Antitumor Activity. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2010**, *10*, 396–411, doi:10.2174/1871520611009050396.
21. Zorbas-Seifried, S.; Hartinger, C.G.; Meelich, K.; Galanski, M.; Keppler, B.K.; Zorbas, H. DNA Interactions of PH-Sensitive, Antitumor Bis(Aminoalcohol)Dichloroplatinum(II) Complexes  $\dagger \cdot \ddagger$ . *Biochemistry* **2006**, *45*, 14817–14825, doi:10.1021/bi061063i.
22. Hall, M.D.; Mellor, H.R.; Callaghan, R.; Hambley, T.W. Basis for Design and Development of Platinum(IV) Anticancer Complexes. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3403–3411, doi:10.1021/jm070280u.
23. Hollis, L.S.; Amundsen, A.R.; Stern, E.W. Chemical and Biological Properties of a New Series of Cis-Diammineplatinum(II) Antitumor Agents Containing Three Nitrogen Donors: Cis-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(N-Donor) Cl]<sup>+</sup>. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 128–136, doi:10.1021/jm00121a024.
24. Dilruba, S.; Kalayda, G.V. Platinum-Based Drugs: Past, Present and Future. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2016**, *77*, 1103–1124, doi:10.1007/s00280-016-2976-z.
25. Guddneppanavar, R.; Bierbach, U. Adenine-N3 in the DNA Minor Groove - An Emerging Target for Platinum Containing Anticancer Pharmacophores. *Anti-Cancer Agents Med. Chem. - Anti-Cancer Agents* **2007**, *7*, 125–138, doi:10.2174/187152007779313991.
26. Suryadi, J.; Bierbach, U. DNA Metalating-Intercalating Hybrid Agents for the Treatment of Chemoresistant Cancers. *Chem. - Eur. J.* **2012**, *18*, 12926–12934, doi:10.1002/chem.201202050.
27. Kostrhunova, H.; Malina, J.; Pickard, A.J.; Stepankova, J.; Vojtiskova, M.; Kasparkova, J.; Muchova, T.; Rohlfing, M.L.; Bierbach, U.; Brabec, V. Replacement of a Thiourea with an Amidine Group in a Monofunctional Platinum–Acridine Antitumor Agent. Effect on DNA Interactions, DNA Adduct Recognition and Repair. *Mol. Pharm.* **2011**, *8*, 1941–1954, doi:10.1021/mp200309x.
28. Smyre, C.L.; Saluta, G.; Kute, T.E.; Kucera, G.L.; Bierbach, U. Inhibition of DNA Synthesis by a Platinum–Acridine Hybrid Agent Leads to Potent Cell Kill in Nonsmall Cell Lung Cancer. *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 870–874, doi:10.1021/ml2001888.
29. Perego, P.; Gatti, L.; Caserini, C.; Supino, R.; Colangelo, D.; Leone, R.; Spinelli, S.; Farrell, N.; Zunino, F. The Cellular Basis of the Efficacy of the Trinuclear Platinum Complex BBR 3464 against Cisplatin-Resistant Cells. *J. Inorg. Biochem.* **1999**, *77*, 59–64, doi:10.1016/S0162-0134(99)00142-7.
30. Summa, N.; Maigut, J.; Puchta, R.; van Eldik, R. Possible Biotransformation Reactions of Polynuclear Pt(II) Complexes. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 2094–2104, doi:10.1021/ic061990d.
31. Zehnulova, J.; Kasparkova, J.; Farrell, N.; Brabec, V. Conformation, Recognition by High Mobility Group Domain Proteins, and Nucleotide Excision Repair of DNA Intrastrand Cross-Links of Novel Antitumor Trinuclear Platinum Complex BBR3464\*. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 22191–22199, doi:10.1074/jbc.M103118200.
32. Kasparkova, J.; Zehnulova, J.; Farrell, N.; Brabec, V. DNA Interstrand Cross-Links of the Novel Antitumor Trinuclear Platinum Complex BBR3464: CONFORMATION, RECOGNITION BY HIGH MOBILITY GROUP DOMAIN PROTEINS, AND NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR\*. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 48076–48086, doi:10.1074/jbc.M208016200.
33. Jodrell, D.I.; Evans, T.R.J.; Steward, W.; Cameron, D.; Prendiville, J.; Aschele, C.; Noberasco, C.; Lind, M.; Carmichael, J.; Dobbs, N.; et al. Phase II Studies of BBR3464, a Novel Tri-Nuclear Platinum Complex, in Patients with Gastric or Gastro-Oesophageal Adenocarcinoma. *Eur. J. Cancer* **2004**, *40*, 1872–1877, doi:10.1016/j.ejca.2004.04.032.
34. Hall, M.D.; Hambley, T.W. Platinum(IV) Antitumour Compounds: Their Bioinorganic Chemistry. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *232*, 49–67, doi:10.1016/S0010-8545(02)00026-7.

35. Hu, X.; Li, F.; Noor, N.; Ling, D. Platinum Drugs: From Pt(II) Compounds, Pt(IV) Prodrugs, to Pt Nanocrystals/Nanoclusters. *Sci. Bull.* **2017**, *62*, 589–596, doi:10.1016/j.scib.2017.03.008.
36. Sigel, A.; Sigel, H.; Freisinger, E.; Sigel, R.K.O. *Metallo-Drugs: Development and Action of Anticancer Agents*; Walter de Gruyter GmbH & Co KG, 2018; ISBN 978-3-11-047073-4.
37. Collery, P.; Keppler, B.; Madoulet, C.; Desoize, B. Gallium in Cancer Treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2002**, *42*, 283–296, doi:10.1016/S1040-8428(01)00225-6.
38. Chitambar, C.R. Medical Applications and Toxicities of Gallium Compounds. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2010**, *7*, 2337–2361, doi:10.3390/ijerph7052337.
39. Schreiber-Brynzak, E.; Klapproth, E.; Unger, C.; Lichtscheidl-Schultz, I.; Göschl, S.; Schweighofer, S.; Trondl, R.; Dolznig, H.; Jakupec, M.A.; Keppler, B.K. Three-Dimensional and Co-Culture Models for Preclinical Evaluation of Metal-Based Anticancer Drugs. *Invest. New Drugs* **2015**, *33*, 835–847, doi:10.1007/s10637-015-0260-4.
40. Kubista, B.; Schoefl, T.; Mayr, L.; van Schoonhoven, S.; Heffeter, P.; Windhager, R.; Keppler, B.K.; Berger, W. Distinct Activity of the Bone-Targeted Gallium Compound KP46 against Osteosarcoma Cells - Synergism with Autophagy Inhibition. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2017**, *36*, 52, doi:10.1186/s13046-017-0527-z.
41. Chitambar, C.R. Gallium-Containing Anticancer Compounds. *Future Med. Chem.* **2012**, *4*, 1257–1272, doi:10.4155/fmc.12.69.
42. Pracharova, J.; Zerkankova, L.; Stepankova, J.; Novakova, O.; Farrer, N.J.; Sadler, P.J.; Brabec, V.; Kasparkova, J. Interactions of DNA with a New Platinum(IV) Azide Dipyridine Complex Activated by UVA and Visible Light: Relationship to Toxicity in Tumor Cells. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 1099–1111, doi:10.1021/tx300057y.
43. Shi, H.; Romero-Canelón, I.; Hreusova, M.; Novakova, O.; Venkatesh, V.; Habtemariam, A.; Clarkson, G.J.; Song, J.; Brabec, V.; Sadler, P.J. Photoactivatable Cell-Selective Dinuclear *Trans* -Diazydoplatinum(IV) Anticancer Prodrugs. *Inorg. Chem.* **2018**, *57*, 14409–14420, doi:10.1021/acs.inorgchem.8b02599.
44. Bombard, S.; Gariboldi, M.B.; Monti, E.; Gabano, E.; Gaviglio, L.; Ravera, M.; Osella, D. Biological Activity of Enantiomeric Complexes [PtCl<sub>2</sub>L<sub>2</sub>] (L<sub>2</sub> Is Aromatic Bisphosphanes and Aromatic Diamines). *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2010**, *15*, 841–850, doi:10.1007/s00775-010-0648-8.
45. Gabano, E.; Gama, S.; Mendes, F.; Gariboldi, M.B.; Monti, E.; Bombard, S.; Bianco, S.; Ravera, M. Study of the Synthesis, Antiproliferative Properties, and Interaction with DNA and Polynucleotides of Cisplatin-like Pt(II) Complexes Containing Carcinogenic Polyaromatic Amines. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2013**, *18*, 791–801, doi:10.1007/s00775-013-1022-4.
46. Sørensen, B.H.; Werth, P.; Lambert, I.H.; Bednarski, P.J. *In Vitro* Evaluation of the Enantiomeric *R* - and *S* -1,1'-Binaphthyl-2,2'-Diaminodichlorido-Pt(II) Complexes in Human Burkitt Lymphoma Cells: Emphasis on Cellular Accumulation, Cytotoxicity, DNA Binding, and Ability to Induce Apoptosis. *Metallomics* **2018**, *10*, 323–336, doi:10.1039/C7MT00237H.
47. Hreusová, M.; Nováková, O.; Kostrhunová, H.; Prachařová, J.; Brabec, V.; Kašpárková, J. DNA Modification by Cisplatin-like Pt(II) Complexes Containing 1,1'-Binaphthyl-2,2'-Diamine Ligand Does Not Correlate with Their Antiproliferative Activity in Cancer Cells. *Inorganica Chim. Acta* **2019**, *495*, 118952, doi:10.1016/j.ica.2019.06.003.
48. Brabec, V.; Leng, M. DNA Interstrand Cross-Links of *Trans*-Diamminedichloroplatinum(II) Are Preferentially Formed between Guanine and

- Complementary Cytosine Residues. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, *90*, 5345–5349, doi:10.1073/pnas.90.11.5345.
49. Keck, M.V.; Lippard, S.J. Unwinding of Supercoiled DNA by Platinum-Ethidium and Related Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3386–3390, doi:10.1021/ja00035a033.
50. Huang, J.C.; Zamble, D.B.; Reardon, J.T.; Lippard, S.J.; Sancar, A. HMG-Domain Proteins Specifically Inhibit the Repair of the Major DNA Adduct of the Anticancer Drug Cisplatin by Human Excision Nuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, *91*, 10394–10398, doi:10.1073/pnas.91.22.10394.
51. Zamble, D.B.; Mu, D.; Reardon, J.T.; Sancar, A.; Lippard, S.J. Repair of Cisplatin–DNA Adducts by the Mammalian Excision Nuclease. *Biochemistry* **1996**, *35*, 10004–10013, doi:10.1021/bi960453+.
52. Dabrowiak, J.C.; Goodisman, J.; Souid, A.-K. Kinetic Study of the Reaction of Cisplatin with Thiols. *Drug Metab. Dispos.* **2002**, *30*, 1378–1384, doi:10.1124/dmd.30.12.1378.
53. Litecká, M.; Hreusová, M.; Kašpárková, J.; Gyepes, R.; Smolková, R.; Obuch, J.; David, T.; Potočná, I. Low-Dimensional Compounds Containing Bioactive Ligands. Part XIV: High Selective Antiproliferative Activity of Tris(5-Chloro-8-Quinololato)Gallium(III) Complex against Human Cancer Cell Lines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2020**, *30*, 127206, doi:10.1016/j.bmcl.2020.127206.
54. Lange, S.S.; Takata, K.; Wood, R.D. DNA Polymerases and Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 96–110, doi:10.1038/nrc2998.
55. Sale, J.E. Translesion DNA Synthesis and Mutagenesis in Eukaryotes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*, a012708, doi:10.1101/cshperspect.a012708.
56. Sale, J.E.; Lehmann, A.R.; Woodgate, R. Y-Family DNA Polymerases and Their Role in Tolerance of Cellular DNA Damage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 141–152, doi:10.1038/nrm3289.
57. Hreusova, M.; Novakova, O.; Brabec, V. Thermodynamic Insights by Microscale Thermophoresis into Translesion DNA Synthesis Catalyzed by DNA Polymerases Across a Lesion of Antitumor Platinum–Acridine Complex. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7806, doi:10.3390/ijms21207806.
58. Minetti, C.A.S.A.; Remeta, D.P.; Dickstein, R.; Breslauer, K.J. Energetic Signatures of Single Base Bulges: Thermodynamic Consequences and Biological Implications. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 97–116, doi:10.1093/nar/gkp1036.
59. Florian, J.; Brabec, V. Thermodynamics of Translesion Synthesis across a Major DNA Adduct of Antitumor Oxaliplatin: Differential Scanning Calorimetric Study. *Chem. - Eur. J.* **2012**, *18*, 1634–1639, doi:10.1002/chem.201102425.
60. Jerabek-Willemsen, M.; André, T.; Wanner, R.; Roth, H.M.; Duhr, S.; Baaske, P.; Breitsprecher, D. MicroScale Thermophoresis: Interaction Analysis and Beyond. *J. Mol. Struct.* **2014**, *1077*, 101–113, doi:10.1016/j.molstruc.2014.03.009.