



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BIOFYZIKY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Modifikace DNA s novým komplexem platiny

$cis-[Pt^{II}(NH_3)_2I_2]$

Vypracoval: Ondřej Hrabina
Studijní obor: Molekulární biofyzika
Vedoucí práce: prof. RNDr. Jana Kašpárková, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením prof. RNDr. Jany Kašpárkové, Ph.D. a za použití uvedené literatury.

V Olomouci dne

Ondřej Hrabina

Děkuji své školitelce prof. RNDr. Janě Kašpárkové, Ph.D. za vedení, všestrannou pomoc, trpělivost a ochotu, kterou mi věnovala. Mé poděkování patří také Mgr. Jitce Prachařové, Ph.D., a Mgr. Tereze Radošové - Muchové, Ph.D., za ochotu a asistenci při praktické práci v laboratoři.

Tato práce vznikla s finanční podporou projektu IGA PřF_2015_025.

Abstrakt

Již řadu let se při léčbě rakoviny využívají komplexy platiny. Tyto látky se označují jako cytostatika. Nejpoužívanějším z nich je platnatý komplex známý pod názvem cisplatina. Mezi další cytostatika, která se využívají v praxi, patří oxaliplatina a karboplatina. Velkou nevýhodou v klinické praxi jsou jejich nežádoucí vedlejší účinky na organismus pacienta a vrozená, či častým opakováním získaná rezistence nádoru vůči těmto farmakům. Zmiňované nežádoucí efekty vedly k rozsáhlému výzkumu molekulárního mechanismu jejich působení a vzniku nových protinádorových léčiv. Tyto látky jsou z valné většiny odvozeny od cisplatiny nebo od transplatiny. Cílem práce bylo zjistit vlastnosti vazby *cis*-diammindijodoplatnatého komplexu a porovnat získané výsledky s vlastnostmi cisplatiny. Pomocí metod molekulární biofyziky byla stanovena rychlost vazby na DNA, charakterizovány distorze, které jsou v DNA touto vazbou vyvolány, a jejich vliv na teplotní stabilitu DNA. Bylo zjištěno, že *cis*-diammindijodoplatnatý komplex se váže na DNA výrazně pomaleji než cisplatina. Po navázání na DNA však tento komplex poškozuje DNA velmi podobným způsobem jako cisplatina.

Abstract

Platinum (II) complexes are used in the treatment of cancer for many years. These compounds are known as cytostatics. Among them, the most widely used is Pt(II) compound called cisplatin. Other drugs used in the clinics are carboplatin and oxaliplatin. Undesirable side effects on the patient and congenital or acquired resistance of tumor caused by frequent repetition of those compounds represent substantial drawbacks in clinical use. These side effects have led to intensive research of the molecular mechanism of their action and emergence of new anticancer drugs. Many of them are derived from cisplatin or transplatin. The aim of this thesis was to investigate binding properties of the *cis*-diaminodiiodoplatinum(II) complex and to compare obtained results with binding properties of cisplatin. Using biophysical methods we managed to determine kinetics of reaction, to characterize DNA distortions induced by binding of the compound and its effect on thermal stability of DNA. It was found that *cis*-diaminodiiodoplatinum(II) complex binds to DNA slowly than cisplatin. DNA damage induced by the binding of this compound is very similar to that induced by cisplatin.

Obsah

1. Teoretický úvod	1
1.1 Platinová cytostatika	1
1.1.1 Cisplatina.....	1
1.1.1.1 Historie	1
1.1.1.2 Chemický pohled	2
1.1.1.3 Využití v medicíně.....	2
1.1.2 Analoga cisplatiny	3
1.1.2.1 Karboplatina	3
1.1.2.2 Oxaliplatina.....	3
1.1.2.3 Lobaplatina, nedaplatina, heptaplatina.....	4
1.1.2.4 Lipoplatina	5
1.1.3 Komplexy platiny obsahující jod	5
1.2 Komplexy ostatních kovů	7
1.2.1 Komplexy ruthenia	7
1.2.2 Ferrocifeny	8
1.2.3 Komplexy paladia a niklu	8
1.2.4 Komplexy galia a titanu.....	9
1.3 Mechanismus působení a buněčná odpověď	10
1.3.1 Mechanismus působení	10
1.3.2 Interakce s proteiny a lipidy.....	12
1.3.3 DNA jako cílové místo působení	13
1.3.4 Poškození DNA vyvolané tvorbou aduktů.....	16
1.3.5 Rozpoznání aduktů cisplatiny buněčnými proteiny	17
1.3.6 Oprava poškozené DNA	18
2. Cíl práce	19
3. Materiál a metody.....	20
3.1 Použité chemikálie.....	20
3.2 Metody	21
3.2.1 Modifikace DNA komplexem platiny	21
3.2.2 Stanovení množství navázaného komplexu na DNA	21
3.2.3 Pokles fluorescence EtBr.....	22
3.2.4 Linearizace DNA	22

3.2.5	Deproteinace.....	23
3.2.6	Srážení DNA	23
3.2.7	Rozpouštění DNA	23
3.2.8	Elektroforéza v nativním agarózovém gelu.....	23
3.2.9	Elektroforéza v denaturačním agarózovém gelu	24
3.2.10	Rozvíjení plazmidové DNA.....	24
3.2.11	Stanovení množství meziřetězcových můstků	25
3.2.12	Měření teploty tání	26
4.	<i>Výsledky a diskuse</i>	27
4.1	Stanovení množství navázaného <i>cis</i> -[Pt ^{II} (NH ₃) ₂ I ₂] na DNA.....	27
4.2	Charakterizace DNA aduktů metodou fluorescence ethidium bromidu	28
4.3	Rozvíjení plazmidové DNA	29
4.4	Stanovení množství meziřetězcových můstků	30
4.5	Stanovení teploty tání.....	31
5.	<i>Závěr</i>	36
6.	<i>Seznam zkratk</i>	37
7.	<i>Seznam použité literatury</i>	38

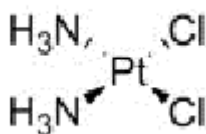
1. Teoretický úvod

1.1 Platinová cytostatika

1.1.1 Cisplatina

1.1.1.1 Historie

Cisplatina (Obr. 1) byla syntetizována téměř 130 let před objevením její biologické aktivity. Pod jménem Peyronův chlorid ji syntetizoval v roce 1844 Michele Peyron při výzkumu platinového komplexu známého jako Mangusova zelená sůl (Kauffman 2010). Při pokusu o syntézu Mangusovy zelené soli si Peyron všiml dvou produktů, jednoho zeleného a druhého žlutého. Po izolaci zjistil, že žlutý produkt je k Mangusově soli izomerní, ale má odlišné vlastnosti. Své pozorování publikoval v německém časopisu *Annalen der Chemie*.



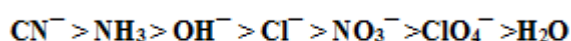
Obr. 1 – Cisplatina

Biologickou aktivitu tohoto komplexu objevil náhodou v roce 1968 americký biofyzik Barnett Rosenberg při výzkumu vlivu elektrického pole na buněčné dělení (Kelland 2007). Po aplikaci elektrického pole byly bakterie pozorovány jako dlouhá vlákna, která byla až třístokrát delší než v normálním stavu. Bylo dokázáno, že tento efekt není následkem elektrického pole, ale produktů vznikajících elektrolýzou platinových elektrod. Po detailní chemické analýze byly objeveny dva aktivní komplexy: neutrální *cis*-isomer, který byl pojmenován cisplatina, platičitý analog a podstatně méně aktivní *trans*-isomer.

1.1.1.2 Chemický pohled

Z chemického hlediska je cisplatina čistě anorganická látka skládající se z 11 atomů. Na centrálním atomu platiny v oxidačním stupni II jsou navázány dvě amonné skupiny NH_3 a dva atomy chlóru Cl. Tyto chloridové skupiny představují aktivní místa komplexu a jsou velice podstatné pro chemickou reaktivitu komplexu.

Chemická stabilita komplexu závisí na elektronové afinitě centrálního atomu k ligandu, tj. schopnost poskytovat elektrony na uskutečnění vazby. Afinita dvojmocné platiny k ligandům je zobrazena na Obr. 2 (Holler 1993).



Obr. 2 – Afinita dvojmocné platiny k ligandům

Cis-diammindichloroplatnatý komplex v kladně nabitě hydrolyzované formě tvoří kovalentní vazbu s DNA (Brabec 1989).

1.1.1.3 Využití v medicíně

V roce 1978 byla cisplatina oficiálně schválena Správou potravin a léčiv pro lékařské využití v USA (Muggia 2009). Cisplatina je registrovaná i v České republice.

Využívá se zejména k léčbě nádorů varlat, močového měchýře, vaječnicků, nádorů plic a nádorů v oblasti hlavy a krku (Kostrova 2006). Nevýhodou je, že cisplatina působí na poměrně úzké portfolio nádorů (Pérez a kol. 2003). Není účinná například při léčbě rakoviny tlustého střeva, prsu a slinivky břišní. Tyto nádory jsou rezistentní k cisplatině. Rezistence se při opakovaném podávání farmaka může vyvinout i na původně citlivém nádoru (Brabec, Kašpárková 2005a). Další nevýhodou jsou rozsáhlé vedlejší efekty, které zahrnují například nevolnost, zvracení, poškození ledvin, sluchu a kostní dřeně (Boulikas a kol. 2007). Za zmínku také stojí i možné kancerogenní a mutagenní působení cisplatiny, které nebylo zcela prozkoumáno.

1.1.2 Analoga cisplatiny

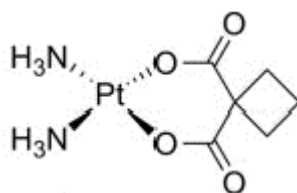
Výše uvedené nevýhody se staly hnacím motorem pro syntézu platinových cytostatik nové generace (Boulikas a kol. 2007). Cílem bylo vytvořit analoga cisplatiny, které by působily na rozsáhlejší spektrum nádorů a měly nižší vedlejší účinky na organismus pacienta.

V tomto směru byla pokroková myšlenka nahrazení odstupujícího chloridového ligandu jinou skupinou, která měla snížit toxicitu komplexu při zachování protinádorového účinku (Harrap 1985). Klinickým testováním však doposud prošlo pouze šest platnatých cytostatik. Po celém světě byly schváleny cisplatina, karboplatina, oxaliplatina a v Japonsku, Jižní Koreji a Číně lobaplatina, nedaplatina a heptaplatina (Boulikas a kol. 2007).

1.1.2.1 Karboplatina

Karboplatina, *cis*-diamminocyklobutandikarboxyplatnatý komplex (Obr. 3), je přímým analogem cisplatiny (Boulikas a kol. 2007; Brabec, Kašpárková 2005a). U tohoto farmaka jsou odstupující ligandy chloru nahrazeny stabilnějším cyklobudandikarboxilátovým ligandem, který se pomaleji hydrolyzuje a vykazuje menší reaktivitu s glutathionem.

V porovnání s cisplatinou je karboplatina mnohem méně toxická, což umožňuje podat větší dávku léčiva (Brabec, Kašpárková 2005b). Nevýhodou zůstává nitrožilní podávání a účinnost na stejné spektrum nádorů jako cisplatina. I přes vyšší hematotoxicitu nahradila karboplatina cisplatinu při léčbě některých nádorů citlivých na platinu.

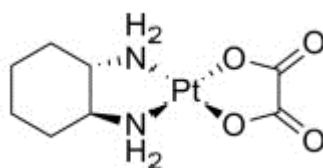


Obr. 3 – Karboplatina

1.1.2.2 Oxaliplatina

Oxaliplatina, 1*R*,2*R*-diamin-cyklohexan-oxalátoplastnatý komplex (Obr. 4), je platinové cytostatikum třetí generace, které bylo schváleno v medicínském využití (Boulikas a kol. 2007). Využívá se v kombinaci s leucovorinem a 5-fluorouracilem při léčbě rakoviny tlustého střeva. Dále je oxaliplatina v porovnání s cisplatinou méně závislá

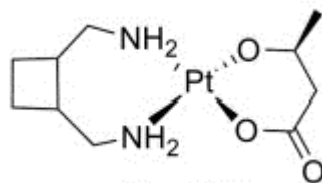
na transportéru Crt1 a opravný mechanismus chybného párování není schopen rozpoznat adukty vytvořené oxaliplatinou (Kelland 2007). Díky této schopnosti vykazuje oxaliplatinu i přes menší reaktivitu s DNA vyšší cytotoxicitu než cisplatinu. (Brabec, Kašpárková 2005a). Navíc oxaliplatinu potřebuje k zastavení růstu nádorových buněk méně lézí s DNA než cisplatinu. Omezením oxaliplatinu jsou její vedlejší účinky, zejména neurotoxicita a chronická neuropatie, které narůstají s rostoucí dávkou (Brabec, Kašpárková 2005a; Boulikas a kol. 2007).



Obr. 4 – Oxaliplatinu

1.1.2.3 Lobaplatina, nedaplatina, heptaplatina

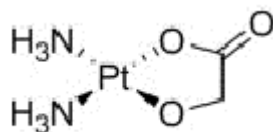
Lobaplatina (Obr. 5) byla schválena v Číně pro léčbu chronické myeloidní leukémie, rakoviny plic a neoperovatelné rakoviny prsu. (Boulikas a kol. 2007) V USA, Austrálii, Evropské unii, Brazílii a Jihoafrické republice úspěšně prošla druhou fází preklinického testování na léčbu rozmanitého spektra nádorů, mimo jiné prsu, jícnu, vaječnicků a také chronické myeloidní leukémie. Lobaplatina je účinná i na nádory, které jsou rezistentní k cisplatině a karboplatině.



Obr. 5 – Lobaplatina

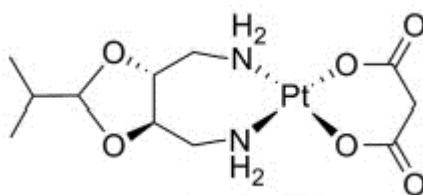
Nedaplatina, *cis*-diamminglykolátplatnatý komplex (Obr. 6), je další platinové cytostatikum, které je využíváno v klinické praxi (Boulikas a kol. 2007, Brabec, Kašpárková 2005b). V současné době se nejvíce využívá v Japonsku při léčbě rakoviny hlavy a krku, varlat, vaječnicků a plic. Nedaplatina neprokázala větší převahu nad cisplatinou nebo karboplatinou, ale vykazuje nižší neurotoxicitu a poškození ledvin než

cisplatina. Na druhou stranu může způsobit trombocytopenii a potenciálně může při nedostatečné hydrataci způsobit poškození ledvin.



Obr. 6 - Nedaplatina

Heptaplatina (Obr. 7) byla schválena v Jižní Koreji pro léčbu rakoviny trávicího traktu (Boulikas a kol. 2007). Preklinické studie naznačují, že by heptaplatina mohla mít vyšší protinádorovou aktivitu a zároveň nižší toxicitu než cisplatina. Heptaplatina je méně nefrotoxická a zkoumá se její účinnost v kombinaci s 5-floruracilem a paclitaxelem na rakovinu krku a hlavy. Nevýhodou je embryotoxicita, která byla zjištěna na pokusných myších.



Obr. 7 - Heptaplatina

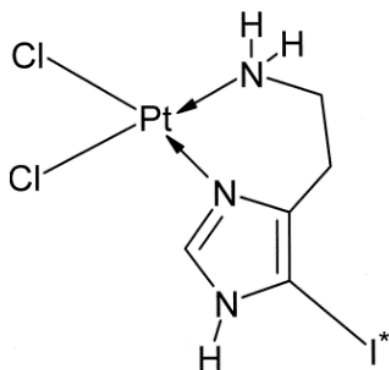
1.1.2.4 Lipoplatina

Lipoplatina je založena na tvorbě reverzních micel mezi cisplatinou a DPPG (dipalmitoylfosfatidylglycerol) při určitých hodnotách pH, obsahu etanolu a iontové síly (Boulikas a kol. 2007). Tyto micely jsou následně zabaleny do lipozomů. Taková úprava snižuje vedlejší efekty a minimalizuje nežádoucí vystavení zdravé tkáně, zatímco maximalizuje příjem a prostupnost léku do nádorové buňky. Lipoplatina je stejně účinná proti nádorům citlivým i rezistentním k cisplatině s RF faktorem rovným 1,1, což je mnohem méně než 6,3 u cisplatinu (Carvalho 2007).

1.1.3 Komplexy platiny obsahující jod

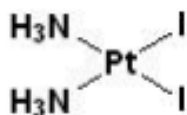
Od objevení cytotoxické aktivity cisplatinu bylo syntetizováno nepřehledné množství jejích analog vzniklých záměnami odstupujících a neodstupujících ligandů (Garnuszek a

kol. 2002). Mezi tato analoga patří i komplexy obsahující jod, například jodhistamin platnatý komplex (Obr. 8). Tento komplex má velice vysokou cytostatickou aktivitu vůči pevným nádorům, jako je například nádor tlustého střeva, a mírnou aktivitu proti leukémii. Dále je zkoumán pro možnou synergii působení s ionizujícím zářením.



Obr. 8 – Jodhistaminplatnatý komplex

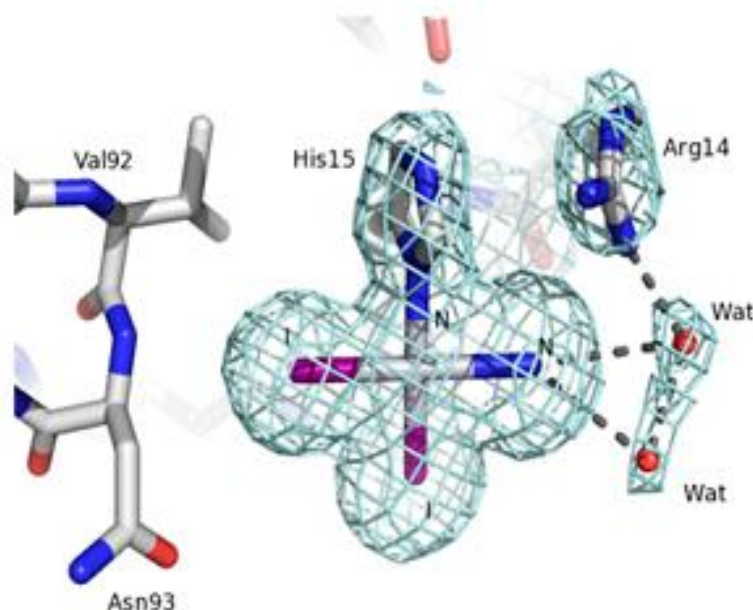
Dalším zástupcem je *cis*-diammindijodoplatnatý komplex (Obr. 9), který byl přehlížen zejména díky starým předpokladům o jeho neaktivitě. Nyní je tento komplex podroben výzkumu za účelem srovnání jeho vlastností s cisplatinou.



Obr. 9 – *cis*-diammindijodoplatnatý komplex

Tento komplex podobně jako cisplatina nereaguje jen s DNA, ale alternativními vazebnými místy jsou například zbytky cysteinu, metioninu a histidinu (Messori a kol. 2013). Interakce mezi proteiny a *cis*-diammindijodoplatnatým komplexem popisuje velké množství krystalografických studií, které charakterizují struktury komplexů mezi touto molekulou a například slepičím bílým vaječným lyzozomem (HEWL), transferinem, měděným chaperonem Atox-1 a hemoglobinem. Byly provedeny experimenty studující reakce mezi proteiny a syntetizovanými iodo-analogy cisplatinu a transplatinu jako například *cis*-[Pt(NH₃)₂I₂], *trans*-[Pt(NH₃)₂I₂]. Jako model bylo zvoleno detailní

prozkoumání interakce proteinu HEWL s těmito komplexy. Výsledné vazebné místo získané pomocí rentgenové krystalografie je zobrazeno na obrázku 10.



Obr. 10 – Vazba komplexu $cis-[Pt(NH_3)_2I_2]$ na HEWL. (převzato z: Messori 2013)

Tato struktura ukazuje, že platnatý iont se váže na protein v obsazení velice blízkému k 1, což je zatím největší obsazení pozorované u aduktu proteinu a na platině založenými cytostatiky. Nebyly pozorovány žádné další modifikace elektronové mapy, což vylučuje přítomnost dalšího vazného místa. Výše zmíněné podporuje názor, že interakce této platinového léku je vysoce sekvenčně specifická pro histidin 15.

1.2 Komplexy ostatních kovů

1.2.1 Komplexy ruthenia

Další cestou, jak obejít pravidla pro návrh analog cisplatiny, je prozkoumat možnosti ostatních kovových center (Hannon 2007). Ruthenium je velice zajímavé, protože kinetiky v jeho komplexech mohou být podobné, jako je tomu u komplexů založených na platině. Dva komplexy založené na tomto kovu jsou v současné době ve fázi klinického testování.

Prvním z těchto komplexů, který postoupil do klinického testování, je komplex NAMI-A, jenž byl navržen Savou a Allesiem. Tento komplex je velice málo aktivní proti

primárním nádorům, ale je považován za potenciální agens pro léčbu metastáz, které reprezentují hlavní klinickou výzvu. I když je NAMI-A schopné vazby na DNA, předpokládá se, že je to zdroj její protinádorové aktivity.

Druhým je komplex KP1019 navržený Kepplerem. I přes strukturní podobnost s NAMI-A se jedná o cytotoxin, který je účinný proti primárním nádorům, a testuje se jeho aktivita vůči rakovině tlustého střeva a konečníku. Komplex způsobuje apoptózu skrz mitochondriální dráhu a jeho aktivní část nebyla identifikována.

Dále byly vyvinuty další dvě třídy ruthenioých komplexů, které byly navrženy Sadlerem a Dysonem. I přes vzájemnou strukturní podobnost bylo dokázáno, že jeden vykazuje vysokou cytotoxicitu vůči primárním nádorům a je aktivní vůči některým nádorům resistantním na cisplatinu, zatímco druhý má nižší cytotoxicitu a je účinný vůči metastázám.

1.2.2 Ferrocifeny

Tento komplex byl vyvinut jako ferocenový derivát tamoxifenu v Jaouenově laboratoři (Hannon 2007). Tamoxifen je organický lék, který působí na receptory estrogenu a má velký význam při léčbě rakoviny prsu. Nevýhodou je, že přibližně jedna třetina nádorů prsu na léčbu tamoxifenem nereaguje, což je způsobeno dvěma různými receptory estrogenu v lidském těle. Tamoxifen je účinný pouze vůči nádorům bohatým na ER α .

1.2.3 Komplexy paladia a niklu

Vysoká podobnost koordinační chemie mezi dvoumocným paladiem a dvoumocnou platinou odstartovala výzkum komplexů dvoumocného paladia jako protinádorových léčiv (Abu-Surra, Kettunen 2006). Důvod, proč jsou komplexy platiny nejužívanější cytostatika, plyne z kinetiky výměny ligandu. Hydrolýza odstupujících ligandů v komplexech paladia je velice rychlá, až 10⁵krát rychlejší než jejich korespondující analog platiny. Velice rychlá disociace v roztoku vede ke značně reaktivním komplexům, které nemohou dosáhnout jejich farmakologických cílů. Navíc některé svého cíle dosáhnou v inaktivní formě. Z výše uvedeného plyne, že pokud má být vyvinuto léčivo na bázi paladia, musí být nějak stabilizované silně koordinovaným ligandem obsahujícím dusík a vhodnou odstupující skupinou. Testují se paladnatá analoga cisplatin, transplatin a složitějších sloučenin s více atomy paladia (Obr. 11).

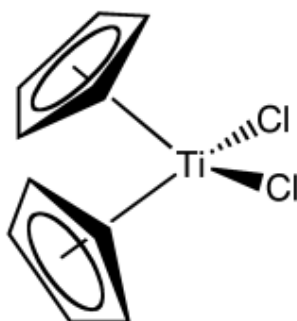


Obr. 11 – Paladnatá analoga cisplatiny (vlevo) a transplatiny (vpravo)

Nikl je nezbytná součást mnoha typů enzymů, jako jsou ureáza, hydrogenáza a dehydrogenáza oxidu uhelnatého (Abu-Surrak, Kettunen 2006). Práce z poslední doby ukázaly, že komplexy založené na niklu mají potenciál se stát protinádorově účinným cytostatikem. Komplexy dvoumocného niklu byly testovány na buněčných liniích nádoru prsu a měly velice vysokou hodnotu IC_{50} a to $2,2\mu M$. Studium mechanismu působení ukázalo, že tyto komplexy inhibují topoisomerázu II.

1.2.4 Komplexy galia a titanu

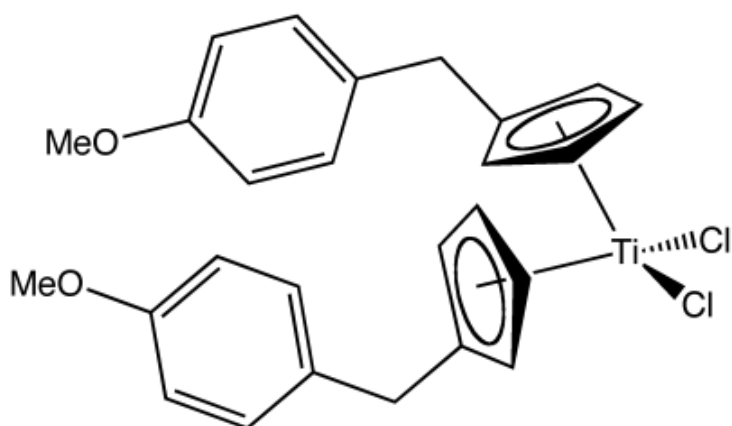
V devadesátých letech minulého století vstoupil do klinických testů organokovový lék titanocen dichlorid [Cp_2TiCl_2] (Obr. 12) jako potenciální protinádorově účinné agens (Hannon 2007). I když část struktury obsahující dva chloridové atomy v *cis* geometrii připomíná cisplatinu, je zajímavé, že zmíněné agens hydrolyzuje do několika struktur a je stále nejasné, která struktura je aktivní a zda jsou molekulární cílem báze DNA, nebo se jedná o specifickou či náhodnou vazbu na páteř DNA.



Obr. 12 – Titanocen dichlorid

Snaha o zvýšení stability hydratované formy, rozpustnosti ve vodě a cytotoxicity vedla k navázání substituentů na titanocen. Jedním z těchto pokusů je titanocen Y (Obr. 13), který obsahuje metoxyfenylové substituenty na b cyklopentadienylových kruzích.

V současné době, dle uveřejněných prací, se zdají tyto komplexy ve fázi vedoucí k optimalizaci.



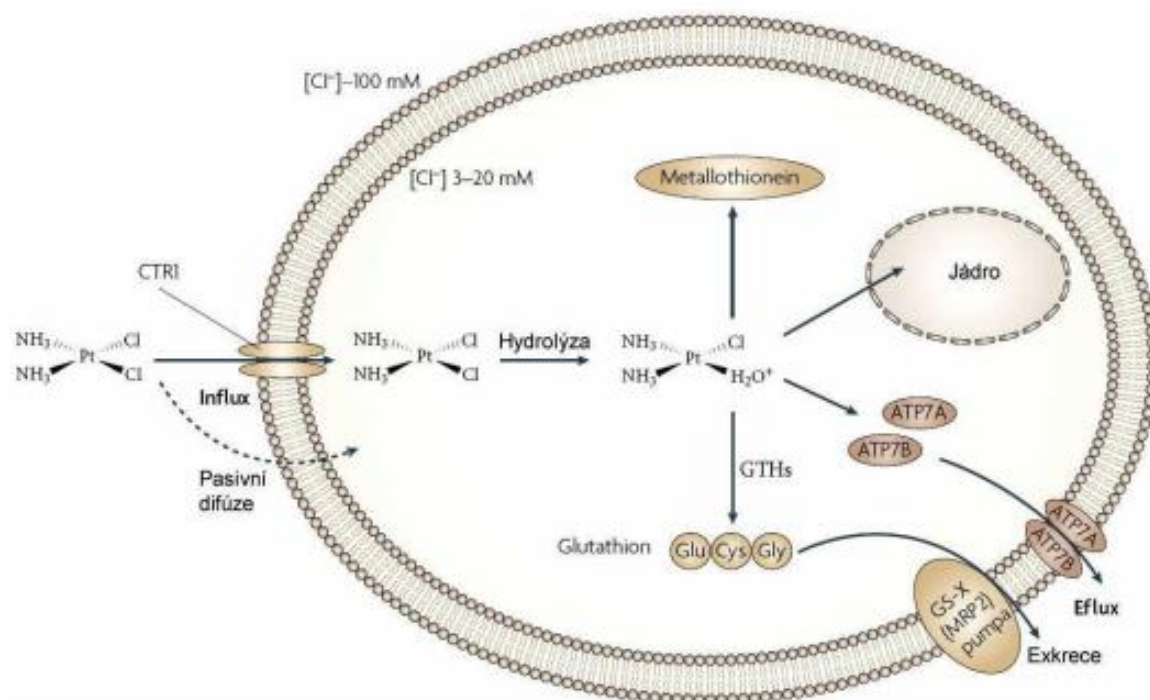
Obr. 13 - Titanocen Y

Komplexy galia také inhibují růst nádoru. Předpokládá se, že se jedná z velké části o souhru náhod a podobnosti třímocného galia a třímocného železa, protože galium narušuje buněčný transport železa vazbou na transferin. Dále narušuje funkci ribonukleotidreduktázy, což vyústí v inhibici syntézy DNA. Klíčem k aktivitě těchto komplexů je učinit třímocné galium biologicky dostupné a experimentuje se s ligandy, které činí galium stabilnější k hydrolyze a usnadňují prostupnost skrz biologickou membránu.

1.3 Mechanismus působení a buněčná odpověď

1.3.1 Mechanismus působení

Cisplatina do buňky vstupuje pasivní difuzí skrz membránu, nebo pomocí aktivního transportu pomocí transportérů mědi a měď transportujících ATPáz typu P (Obr. 14) (Jung, Lippard 2007).



Obr. 14 – Mechanismus působení cisplatiny (převzato a upraveno z: Kelland 2007)

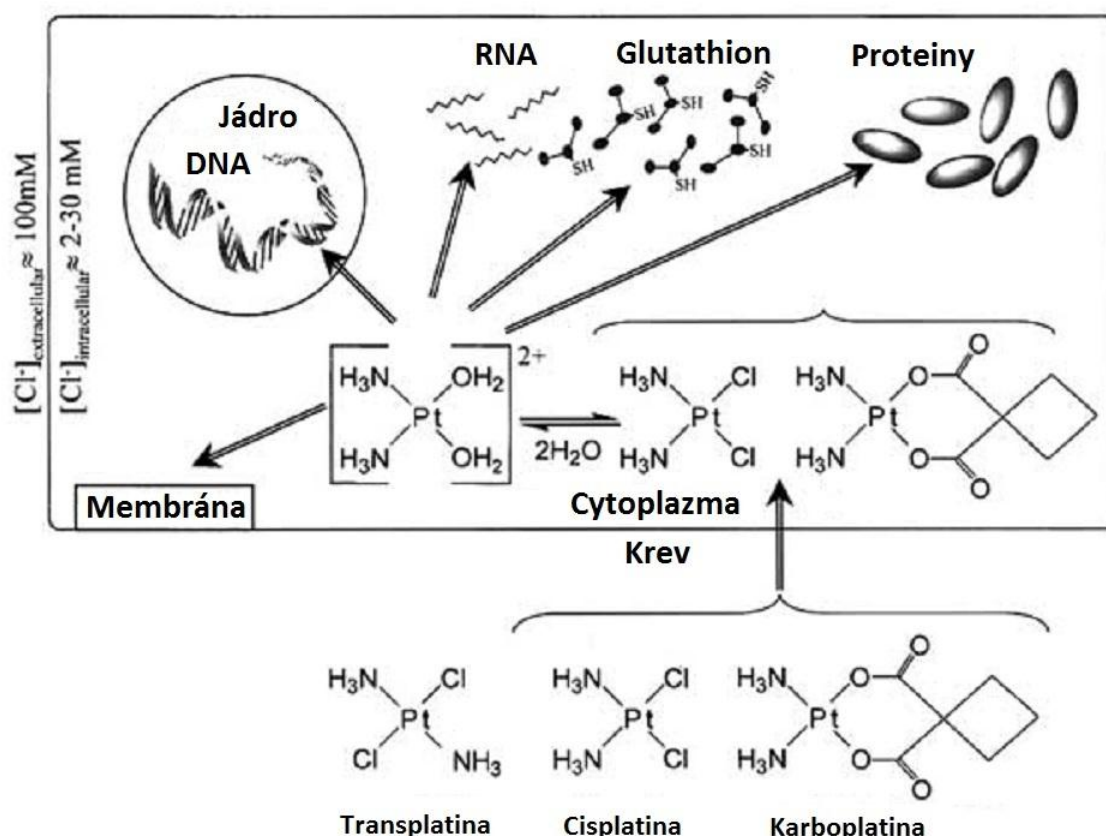
Jedním z transportérů mědi je protein Ctr1, skrze který se dostane do buňky většina měďnatých iontů (Espling 2013). Ctr1 zprostředkuje vstup cisplatiny, oxaliplatiny a karpoplatinu do buňky a udává citlivost na tyto cytostatika jak *in vitro*, tak *in vivo*. (Burger 2011) Další z těchto proteinů je Atox1 (Espling 2013). Tento měděný chaperon je zodpovědný za transport mědi od Ctr1 k měděným ATPázám v Golgiho aparátu. Mezi tyto ATPázy patří ATP7A (protein Menkeho choroby) a ATP7B (protein Wilsonovy choroby). Tyto dva proteiny mají přibližně z šedesáti procent stejnou sekvenci a nacházejí se v Golgiho aparátu, kde transportují dvojmocnou měď z cytosolu skrz buněčnou membránu. V dalších studiích bylo dokázáno, že zmíněné transportéry mědi regulují množství cisplatinu a jejích analogů v buňce.

Když cisplatinu vstoupí do buňky, dojde k její aktivaci (Brabec, Kašpárková 2005a). Aktivací se rozumí nahrazení odstupujících chloridových ligandů molekulami vody. Popsaný hydratovaný komplex je velice elektrofilní a může reagovat s jakýmkoli nukleofily, včetně atomů dusíku obsažených v nukleových kyselinách. Tato hydratovaná dvojmocná platina se váže na DNA ve dvou krocích (Brabec, Kašpárková 2005b). Jako první se komplex dvojmocné platiny monofunkčně naváže koordinační vazbou na dusík

N7 guaninu. Druhým krokem je vytvoření druhé koordinační vazby mezi platinou a sousedním adeninem nebo guaninem za vzniku vnitřetězcového nebo mezitřezcového můstku.

1.3.2 Interakce s proteiny a lipidy

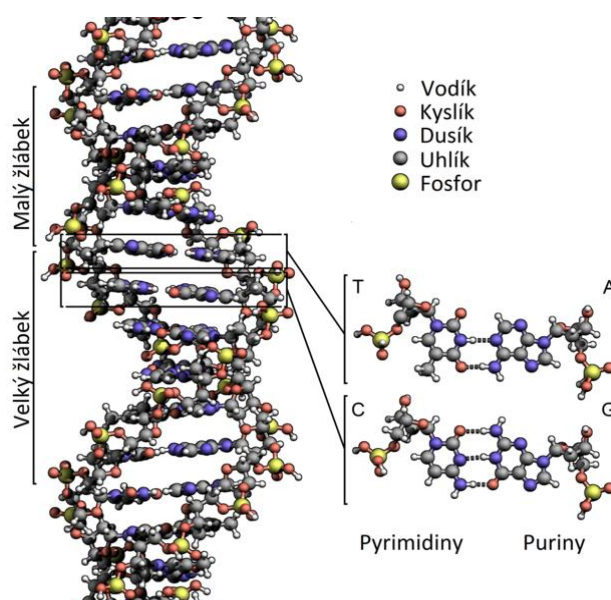
Dříve než se cisplatina nahromadí v cytoplasmě, může se navázat na buněčnou membránu, a to konkrétně na fosfolipidy, např. na fosfatidylserin (Pérez a kol. 2003). Navíc v cytoplasmě se vyskytuje velké množství látek, které jsou nukleofilní. Mezi tyto látky patří mikrofilamenta cytoskeletu, RNA a proteiny obsahující síru. Předpokládá se, že díky těmto nukleofilním látkám se k vazbě na jadernou DNA dostane jen asi 1 % z celkového množství cisplatiny. Díky silné reaktivitě cisplatiny s proteiny obsahujícími síru je pravděpodobně nejdůležitější cíl mimo DNA tripeptid glutathion. Dále byly pozorovány adukty cisplatiny s DNA a proteiny. Schéma reaktivity platnatých komplexů je znázorněno na obrázku 15.



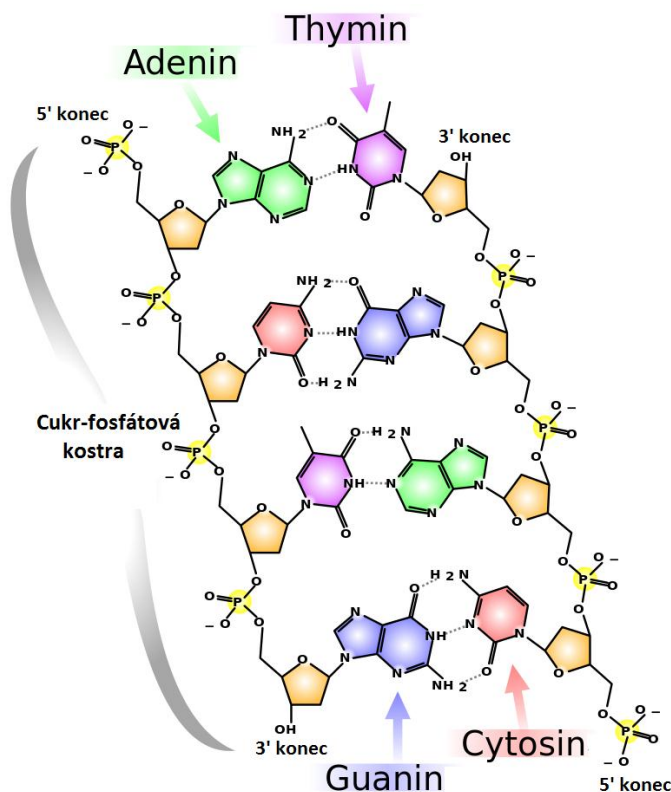
Obr. 15 – Schéma reaktivity platíkových cytostatik v buňce (převzato a upraveno z: Pérez 2003)

1.3.3 DNA jako cílové místo působení

DNA nebo deoxyribonukleová kyselina (Obr. 16) je nositelkou dědičné informace (Alberts a kol. 1998). DNA se skládá ze dvou polynukleotidových vláken, která jsou stočena do šroubovice. Tyto vlákna jsou vzájemně antiparalelní, což znamená, že směřují opačnými směry. Směr vlákna popisujeme pomocí pozice uhlíku na deoxyribóze, jedno vlákno má tedy směr 5' - 3' a druhé 3' - 5'. Základní jednotkou těchto řetězců jsou nukleotidy. Nukleotid se skládá z deoxyribózy, na které je navázán jeden nebo více fosfátů, a dusíkaté báze. V DNA se vyskytují purinové a pyrimidinové dusíkaté báze. Mezi purinové se řadí adenin A a guanin G a mezi pyrimidinové cytosin C a thymin T (Obr. 17).



Obr. 16 – Struktura DNA (převzato a upraveno z: Wikipedia.org)

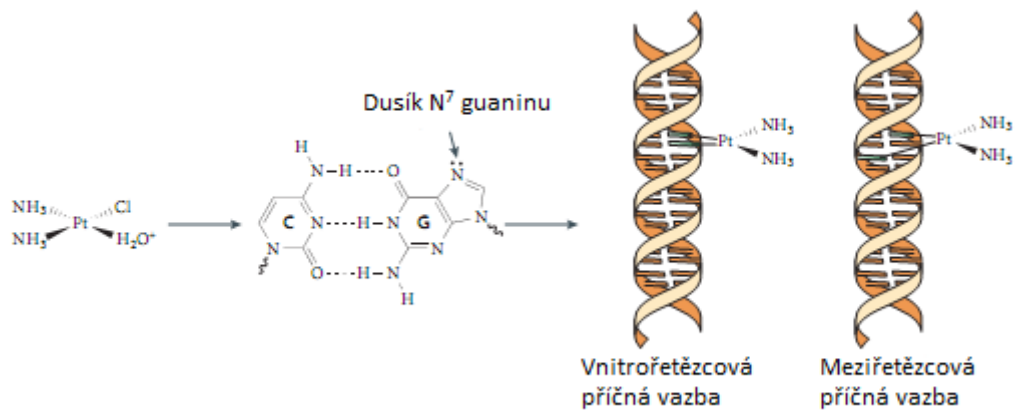


Obr. 17 – Struktura DNA a jejích bází (převzato a upraveno z: Wikipedia.org)

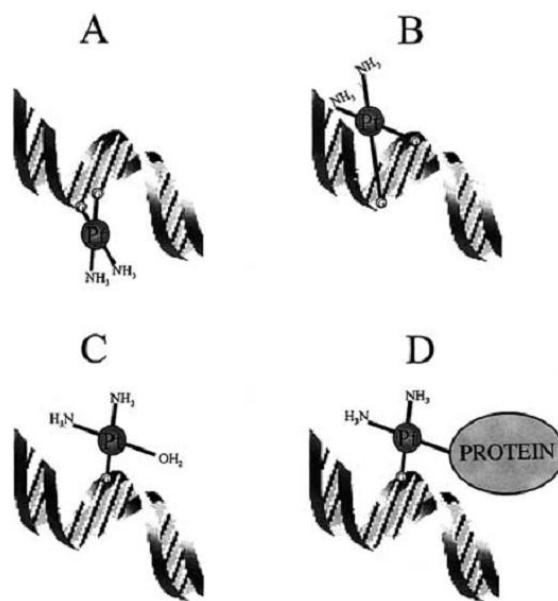
Polynukleotidové řetězce jsou mezi sebou spojeny vodíkovými vazbami, které se tvoří mezi bázemi na základě komplementarity. Spojí se purinové báze s pyrimidinovými tak, že guanin se páruje třemi vodíkovými vazbami s cytosinem a thymin dvěma vodíkovými vazbami s adeninem.

Za objevení struktury DNA byla v roce 1962 udělena Nobelova cena Jamesi Watsonovi a Francisi Crickovi.

Cisplatina preferenčně interaguje se zbytky guaninu (Obr. 18) (Brabec, Kašpárková 2005b). Hlavními adukty cisplatiny jsou 1,2 – GG příčná vazba a 1,2 – GA příčná vazba, méně časté adukty jsou 1,3 – GXG příčná vazba, kde X může být adenin, cytosin a thymin, monofunkční adukty a meziřetězcové příčné vazby (Obr. 19). U všech aduktů se platina váže na dusíkový atom N7. Statistické zastoupení 1,2 – příčné vazby je vyšší, než se očekávalo, tudíž se předpokládá, že tyto adukty souvisí s protinádorovou aktivitou. Analýzou cisplatinou modifikované DNA bylo zjištěno, že procentuální zastoupení aduktu 1,2 – GG je přibližně 60 – 65%, 1,2 – AG 20 – 25% a 1,3 – GXG méně než 10%. (Pérez a kol. 2003)



Obr. 18 – Schéma vazby cisplatiny na DNA (převzato a upraveno z: Kelland 2007)



Obr. 19 – Aduky tvořené cisplatinou. A: 1,2 – Vnitrořetězcová příčná vazba, B: Meziřetězcová příčná vazba, C: Monofunkční adukt, D: Protein-DNA vazba (převzato z: Pérez a kol. 2003)

1.3.4 Poškození DNA vyvolané tvorbou aduktů

Po navázání platinových cytostatik byly v okolí jejich vazby pozorovány změny v sekundární struktuře dvoušroubovice DNA. Mezi ty to změny patří ohyb, rozvíjení dvoušroubovice a zkrácení řetězce DNA. Předpokládá se, že tyto strukturální změny jsou natolik závažné, že vedou k zastavení replikace a transkripce DNA a k apoptóze (Lippard, Keck 1992).

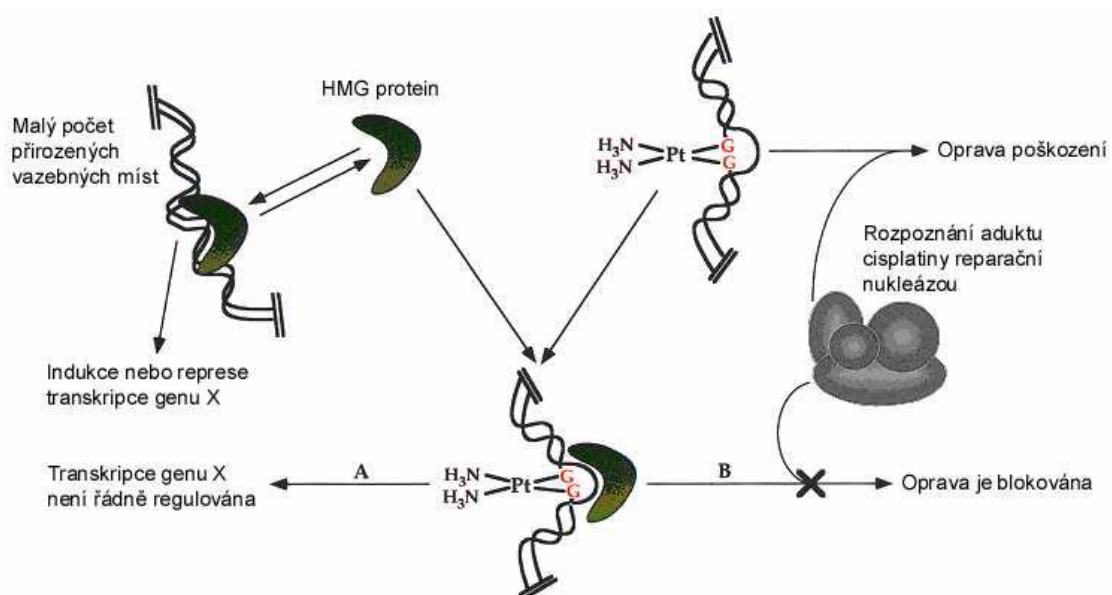
Bylo zjištěno, že vnitrořetězcová příčná vazba 1,2 GG způsobuje rozvinutí dvoušroubovice o 13° a ohyb se o 34° směrem do velkého žlábků (Gelasco, Lippard 1998). Tento adukt dále ohýbá podélnou osu DNA o $25^\circ - 50^\circ$ mezi sousedními guaniny, což vede k ohybu celé dvoušroubovice. Vzhledem k ohybu dochází také k porušení vodíkových vazeb mezi guaniny a cytoziny, a to v rozsahu 4 - 5 pb. Vnitrořetězcová příčná vazba 1,2 AG vykazuje velice podobné vlastnosti jako 1,2 GG. Takto modifikovaná DNA má znaky charakteristické pro A formu DNA. Poslední vnitrořetězcová příčná vazba 1,3 GXG rozvíjí o 23° a ohýbá o 53° směrem do velkého žlábků.

Meziřetězcové příčné vazby jsou vysoce toxické poruchy, které kovalentně spojují obě vlákna DNA a deformují tak dvoušroubovici (Jenssen 2012). Díky zabránění rozvolnění vláken DNA může tento typ aduktu fyzicky blokovat replikační a transkripční pochody v buňce. Neschopnost opravy takového druhu poškození může způsobovat zlomy v DNA, chromozomální změny a buněčnou smrt. Meziřetězcové příčné vazby se vytváří zejména mezi guaniny, které se nachází v komplementárních řetězcích v sekvenci GC (Huang 1995). Tyto guaniny a k nim komplementární cytosiny nejsou spojeny vodíkovými vazbami, protože cytosiny jsou vytlačeny mimo šroubovici a neinteragují tak s jinými bázemi. Vzniklá porucha se týká minimálně čtyř párů bází navázaných v okolí. V tomto případě způsobuje vazba cisplatin vznik můstků mezi bázemi v malém žlábků, což má za následek změnu z pravotočivé šroubovice na šroubovici levotočivou neboli Z-formu (Jamieson a kol. 1999). Meziřetězcová příčná vazba dále ohýbá osu dvoušroubovice o $20^\circ - 40^\circ$ k malému žlábků a odvíjí dvoušroubovici o $76^\circ - 86^\circ$. Nejmenší zastoupení odpovídá tvorbě monofunkčních aduktů cisplatin a DNA. I v tomto případě se cisplatin váže preferenčně na guanin a deformuje tak strukturu šroubovice DNA. Míra deformace je závislá na sekvenci v okolí vazby.

1.3.5 Rozpoznání aduktů cisplatin buněčnými proteiny

Předpokládá se, že protinádorová aktivita cisplatiny je regulována pomocí rozpoznání jejích aduktů na DNA (Brabec, Kašpárková 2005b). Bylo objeveno několik skupin proteinů a popsáno několik mechanismů, jak ovlivňují protinádorový účinek cisplatiny.

Největší pozornost byla věnována proteinům, které obsahují tzv. HMG (High Mobility Group) boxy. Zejména proteinům HMG1 a HMG2, které náleží k chromatinovým proteinům a fungují jako signální molekuly v opravných drahách. Díky vysoké afinitě k nekanonickým strukturám DNA rozpoznávají strukturálně specifické poškození DNA vyvolané tvorbou 1,2 – GG nebo 1,2 - AG příčné vazby, ale ne 1,3 příčných vazeb (Obr. 20) (Brabec, Kašpárková 2002).



Obr. 20 – Vazba proteinů s HMG doménou na DNA (převzato a upraveno z: Zamble a kol. 1999)

Bylo navrženo několik mechanismů vysvětlujících, jak proteiny vázající se na adukty cisplatin s DNA regulují citlivost buňky k léčivu (Pérez a kol. 2003). Předpokládá se, že HMG proteiny se strukturálně specificky naváží na adukt cisplatin s DNA a tím jej chrání před opravnými mechanismy buňky.

1.3.6 Oprava poškozené DNA

Oprava DNA je hlavní mechanismu resistance k chemoterapii založené na cisplatině (Brabec, Kašpárková 2005c). Aduky mezi cisplatinou a DNA mohou být odstraněny několika mechanismy. Mezi nejdůležitější patří nukleotidová excisní oprava (NER), oprava chybného párování (MMR) a rekombinační oprava (Pérez a kol. 2003).

Hlavním obranným mechanismem je nukleotidová excisní oprava (Brabec, Kašpárková 2005a). Spoluprací několika rodin proteinu NER dochází k rozpoznání a vymezení poškozeného úseku DNA a jeho následnému vystřížení. Následuje dosyntetizování nukleotidů ve vystříženém místě.

Oprava chybného párování je postreplicační opravný systém, který je zodpovědný za opravu chybně zařazených nukleotidů, místa s insercí nebo delecí (Pérez a kol. 2003). Poslední poznatky naznačují, že oprava chybného párování bází zprostředkovává cytotoxicitu cisplatinu a dysfunkce tohoto opravného mechanismu může vyústit v odolnost nebo toleranci nádorových buněk k cisplatině (Brabec a Kašpárková 2005 c).

2. Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo:

- 1) Studovat interakce DNA s novou sloučeninou odvozenou od cisplatinu záměnou atomů chlóru za atomy jódu. Předmětem zájmu byla zejména charakterizace vytvořených aduktů a popis konformačních změn vyvolaných v DNA těmito adukty.
- 2) Porovnat získané výsledky s údaji dostupnými v odborné literatuře o cisplatině.

3. Materiál a metody

3.1 Použité chemikálie

Všechny chemikálie byly p. a. čistoty.

Ve všech experimentech byla použita destilovaná voda.

Telecí tymová DNA - od firmy Sigma

cis-[Pt^{II}(NH₃)₂Cl₂] - od firmy Sigma

cis-[Pt^{II}(NH₃)₂I₂] - poskytnut pro účely tohoto měření prof. L. Messorim, Dipartimento di Chimica, Università di Firenze, Itálie

Restrikční endonukleáza EcoRI a příslušný restrikční pufr je od firmy New England Biolabs, Velká Británie.

Tris-acetátový (TAE) pufr: 0,04 M Tris-acetát
1 mM EDTA

Tris-borátový (TBE) pufr: 0,09 M Tris-borát
1 mM EDTA

Alkalický pufr: 0,03 M NaOH
1 mM EDTA

Elektrolyt pro diferenční pulzní polarografii: 0,675 M H₂SO₄
0,08 M formaldehyd
0,008 hydrazin

Nanášecí pufr: 40% (w) sacharóza
0,25% (w) bromfenolová modř

Agaróza – firma Serva elektroforesis, Německo

Ethidium bromid – koncentrace 10 mg/ml

Serva elektroforesis, Německo

3.2 Metody

3.2.1 Modifikace DNA komplexem platiny

Vzorky pro všechny provedené experimenty byly připraveny následovně. DNA byla inkubována s příslušným komplexem (cis -[Pt^{II}(NH₃)₂I₂] nebo cis -[Pt^{II}(NH₃)₂Cl₂]) dle příslušného r_i v prostředí 10 mM NaClO₄ o pH 6 při 37°C ve tmě po dobu 24 hodin. r_i vyjadřuje poměr mezi počtem volných molekul platiny a počtem nukleotidů DNA a vyjádří se pomocí vztahu

$$r_i = \frac{n_{Pt}}{n_{DNA}} = \frac{c_{Pt} \cdot V_{Pt}}{c_{DNA} \cdot V_{DNA}} \quad (1)$$

kde n_{Pt} je látkové množství komplexu platiny, n_{DNA} je látkové množství DNA, c_{Pt} a V_{Pt} jsou koncentrace a objem zásobního roztoku platiny a c_{DNA} a V_{DNA} jsou koncentrace a objem zásobního roztoku DNA. Stupeň modifikace DNA r_b vyjadřuje počet atomů platiny skutečně navázaných na jednu bázi DNA. Pro případ, že se komplex platiny za daných reakčních podmínek váže na DNA kvantitativně, je možno položit $r_i = r_b$.

3.2.2 Stanovení množství navázaného komplexu na DNA

Kinetika měřeného komplexu byla stanovena metodou diferenční pulzní polarografie (DPP). K měření byl použit přístroj EG&C PARC 32 Electrochemical analyzer, Model 384B.

Tymová DNA byla inkubována se studovaným komplexem v prostředí 10 mM NaClO₄ při 37° ve tmě. Použitá koncentrace DNA ve vzorku byla $3,2 \cdot 10^{-5}$ M a poměr látek v reakční směsi byl $r_i = 0,08$. V příslušných časových intervalech bylo z reakční směsi odebráno 10 µl vzorku a přidáno k 5 ml elektrolytu (viz Použité chemikálie). Výsledná směs byla změřena na výše uvedeném přístroji a proudová závislost byla přepočtena na množství navázaného komplexu na DNA.

3.2.3 Pokles fluorescence EtBr

Molekuly EtBr poskytují ve volném stavu v roztoku velmi malou intenzitu fluorescence. Dojde-li ale k interkalaci mezi báze DNA, intenzita fluorescence EtBr se znatelně zvýší. Přítomnost bifunkčních aduktů komplexu s DNA může ze sterických důvodů zabránit interkalaci EtBr mezi báze zahrnuté v daném můstku, což vede ke snížení intenzity fluorescence ve srovnání s nemodifikovanou DNA o stejné koncentraci.

Tymová DNA byla modifikována komplexem cis -[Pt^{II}(NH₃)₂I₂] a pro srovnání i komplexem cis -[Pt^{II}(NH₃)₂Cl₂] podle postupu uvedeného v kapitole 3.2.1 Modifikace DNA komplexem platiny. Hodnoty r_b byly použity v rozmezí 0,01 až 0,1 s krokem 0,01. Po inkubaci byl k reakční směsi přidán ethidium bromid a NaCl tak, že koncentrace DNA byla 1,07 mM, koncentrace ethidium bromidu byla 0,4 µg/ml a koncentrace NaCl byla 0,5 M. Měření bylo provedeno na spektrofluorimetru F4500 (Hitachi, Japan) při excitační vlnové délce 546 nm a emisní vlnové délce 590 nm.

Hodnoty fluorescence byly vypočteny pomocí vztahu pro relativní fluorescenci

$$I_{rel} = \frac{I - I_b}{I_0 - I_b} \cdot 100\% \quad (2)$$

kde I je intenzita fluorescence modifikované DNA, I_b je intenzita fluorescence blanku (slepého vzorku), tj. vzorku 10 mM NaClO₄, a směsi ethidium bromidu a chloridu sodného, I_0 je intenzita fluorescence nemodifikované DNA. Hodnota relativní fluorescence I_{rel} se obvykle vyjadřuje v procentech.

3.2.4 Linearizace DNA

Lineární plazmidová DNA byla použita při stanovení meziřetězcových můstků. Plazmidová DNA byla linearizována restričním enzymem EcoRI (1 U na 1 µg DNA) po dobu dvou hodin při 37°C. Jedna jednotka je definována jako množství enzymu, které našťepí 1 µg DNA při 37°C za 1 hodinu v reakčním objemu 50 µl. Restriční enzym EcoRI štěpí DNA mezi bázemi guaninem a adeninem v specifickém místě (Obr. 21) Kontrola linearizace byla provedena elektroforeticky v nativním agarózovém gelu.



Obr. 21 – Specifická sekvence enzymu EcoRI

3.2.5 Deproteinace

Ke zlinearizované DNA byl přidán vychlazený fenol v poměru 1 : 1. Směs byla zvortexována a následně stočena po dobu dvou minut při 15 000 rpm. Stočením se směs rozdělí na dvě fáze: vodná fáze (vrchní) a organické rozpouštědlo (spodní). Vrchní vodnou fázi odebereme do čisté zkumavky. K odebrané fázi byla přilita směs chloroformu a isoamylalkoholu (24 : 1) v poměru 1 : 1. Směs byla zvortexována a stočena. Svrchní fáze obsahující DNA byla odebrána do čisté zkumavky.

3.2.6 Srážení DNA

Ke vzorku získaného deproteinací byla přidána 1/10 jeho objemu 3M octanu sodného o pH 5,5. Směs byla zvortexována a následně byl přidán 2,5 -3 násobek objemu vymraženého 100% ethylalkoholu. Směs byla zvortexována a poté srážena při -20°C po dobu 30 minut. Po srážení byla směs stáčena po dobu 30 minut při 4°C a 14 000 rpm. Po stočení byl odebrán supernatant, k peletu bylo přidáno 200 μl vymraženého 80% ethylalkoholu a výsledná směs byla opět stáčena po dobu 30 minut při 4°C a 14 000 rpm. Po posledním stočení byl odebrán supernatant a pelet byl usušen v exikátoru.

3.2.7 Rozpouštění DNA

DNA byla rozpuštěna v 10 mM NaClO_4 .

3.2.8 Elektroforéza v nativním agarózovém gelu

Při elektroforéze v nativním gelu byl použit 1% (w/v) agarózový gel. Gel byl připraven rozvařením příslušného množství agarózy v TAE pufri (viz Použité chemikálie). Agarózový gel byl vařen v Erlenmeyerově baňce po dobu 5 až 10 minut. Po pomalém zchlazení na teplotu přibližně 60°C byl gel nalit do vany s hřebínkem a ponechán 30 – 40 minut tuhnout. Před začátkem elektroforézy byl v elektroforetické vaně gel zalit TAE pufrem, který plní úlohu elektrolytu. Čelo elektroforézy bylo zviditelněno přidáním nanášecího pufri (viz Použité chemikálie) o objemu 1/6 vzorku. Výsledné směsi

obsahující nanášecí pufr a DNA byly naneseny na gel. Elektroforéza probíhala po dobu 4 až 5 hodin (aby čelo doputovalo alespoň do poloviny gelu) při intenzitě pole 0,8 V/cm. Gel byl obarven pomalým třepáním s vodným roztokem ethidium bromidu (viz Použité chemikálie) po dobu 20 minut. Přebytný ethidium bromid byl odstraněn pomalým třepáním v destilované vodě po dobu 30 minut. Gel byl prosvícen UV zářením a vyfocen přístrojem GelLogic system.

3.2.9 Elektroforéza v denaturačním agarózovém gelu

Při alkalické denaturační elektroforéze byl použit 1% (w/v) agarózový gel. Příslušné množství agarózy bylo rozvařeno ve vodě. Agarózový gel byl vařen v Erlenmeyerově baňce po dobu 5 – 10 minut. Po pomalém zchlazení na teplotu přibližně 60°C byl ke gelu přidán NaCl tak, aby jeho výsledná koncentrace v gelu byla 0,03 M, a EDTA na výslednou koncentraci 10^{-3} M. Po promíchání byl gel nalit do vany s hřebínkem a ponechán 40 – 50 minut tuhnout. Následně byl gel zalit alkalickým pufrům (viz Použité chemikálie) a uložen přes noc při 4°C. Druhý den byl gel v elektroforetické vaně zalit čerstvým alkalickým pufrům, který plní úlohu elektrolytu. Ke vzorkům byla přidána 1/6 jejich objemu nanášecího pufru a NaOH tak, aby jeho koncentrace v roztoku byla 1 M. Elektroforéza probíhala po dobu 4 -5 hodin při intenzitě elektrického pole 0,8 V/cm. Gel byl neutralizován pomalým třepáním s roztokem TBE (viz Použité chemikálie) po dobu 20 minut. Poté byl gel obarven pomalým třepáním s vodným roztokem ethidium bromidu (viz Použité chemikálie) po dobu 20 minut. Přebytný ethidium bromid byl odstraněn pomalým třepáním v destilované vodě po dobu 30 minut. Gel byl prosvícen UV zářením a vyfocen přístrojem Major science UV transluminátor.

3.2.10 Rozvíjení plazmidové DNA

Plazmidová DNA pSP73KB byla modifikována komplexem $cis-[Pt^{II}(NH_3)_2I_2]$ a pro srovnání komplexem $cis-[Pt^{II}(NH_3)_2Cl_2]$ na zvolené r_b , jak je popsáno v kapitole Modifikace DNA (kapitola 3.2.1.). Po uplynutí doby inkubace byl ke každému vzorku přidán 1 μ l pufru TAE spolu s 3 μ l nanášecího pufru. Analýza míry rozvinutí pro jednotlivá r_b probíhala v 1% (w) nativním agarózovém gelu v pufru TAE při teplotě 4°C a napětí 10 V po dobu 20 hodin. Gel byl obarven pomalým třepáním s vodným roztokem ethidium bromidu (viz Použité chemikálie) po dobu 20 minut. Přebytný ethidium bromid byl odstraněn pomalým třepáním v destilované vodě po dobu 30 minut. Gel byl prosvícen UV zářením a vyfocen přístrojem Major science UV transluminátor.

Mobilita plazmidové DNA v gelu závisí na její superhelikální hustotě. Relaxovanou formou nebo také open circle formou (OC) označujeme formu DNA, která nemá žádné nadšroubovicové vinutí. DNA, která má nadšroubovicové vinutí, označujeme jako superhelikální. DNA, která je pozitivně či negativně zavinuta, je v porovnání s OC formou více kompaktní, a tudíž v gelu migruje rychleji než forma relaxovaná.

Úhel rozvinutí pro jeden adukt byl spočten použitím vztahu

$$\varphi = -\frac{18 \cdot \sigma}{r_b} \quad (3)$$

kde φ je úhel rozvinutí, r_b je stupeň modifikace, pro který dochází ke komigraci superhelikální a relaxované formy. Hodnota σ pro použitou DNA byla stanovena experimentálně za využití komplexu $cis\text{-}[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$, o kterém z literatury víme, že rozvíjí DNA o 13° (Lippard, Keck 1992).

3.2.11 Stanovení množství meziřetězcových můstků

Lineární plazmid pUC19 byl připraven postupem uvedeným v kapitolách 3.2.4 Linearizace DNA, 3.2.5 Deproteinace, 3.2.6 Srážení DNA a 3.2.7 Rozpouštění DNA. Přesná koncentrace lineární DNA byla určena spektrofotometricky na UV/VIS spektrofotometru. Pro experiment byla připravena sada vzorků, kde byla lineární DNA modifikována komplexem $cis\text{-}[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{I}_2]$ a pro srovnání komplexem $cis\text{-}[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ na hodnoty r_b 0,0001; 0,0003; 0,0005; 0,0007; 0,001 dle postupu uvedeného v Modifikace DNA. Po uplynutí inkubační doby byl ke každému vzorku přidán 1 μl 1 M NaOH a vzorek byl ponechán při pokojové teplotě 10 minut. Poté byly přidány 3 μl nanášecího pufru. Analýza přítomnosti meziřetězcových můstků (IEC) byla provedena pomocí elektroforézy v denaturačním agarózovém gelu (viz 3.2.9 Elektroforéza v denaturačním agarózovém gelu).

Zastoupení meziřetězcových můstků v procentech IEC/Pt (počet meziřetězcových můstků vztažených na 1 adukt) bylo spočteno pomocí vztahu

$$\text{počet můstků} = \frac{-\ln(\text{zastoupení jednořetězcové frakce})}{r_b \cdot N} \quad (4)$$

kde r_b je stupeň modifikace a N je počet nukleotidů plazmidu pUC19 ($N=5372b$).

3.2.12 Měření teploty tání

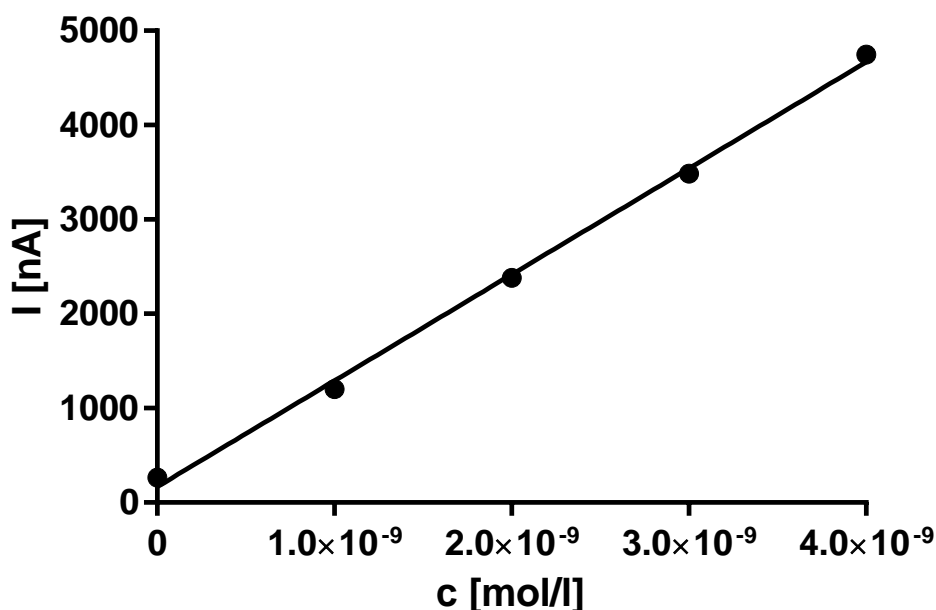
Denaturační křivky byly měřeny na spektrofotometru Varian Cary 4000 v Biofyzikálním ústavu AVČR. Pro měření experimentu byly použity křemenné zkumavky o optické dráze 1 cm. DNA byla modifikována komplexem *cis*-[Pt^{II}(NH₃)₂Cl₂] na hodnoty r_b 0,03; 0,06 a 0,09 a vzorky byly inkubovány po dobu 24 hodin při 37 °C. Po inkubaci byly vzorky rozděleny na dvě části. V první byla upravena hodnota Na⁺ přidavkem 1 M NaClO₄ na hodnotu 0,1 M a ve druhé byla ponechána hodnota 0,01 M.

Měření probíhalo v prostředí 10 mM nebo 1 M NaClO₄; 1 mM TRIS-HCl a 0,1 mM EDTA, pH = 7,4. Teplota tání byla vypočtena pomocí programu GraphPad jako maximální hodnota 1. derivace naměřené křivky. Teplota tání tedy odpovídá inflexnímu bodu křivky.

4. Výsledky a diskuse

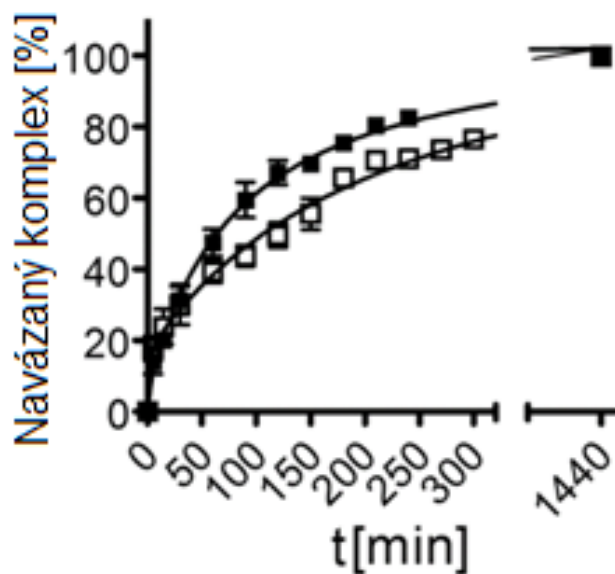
4.1 Stanovení množství navázaného *cis*-[Pt^{II}(NH₃)₂I₂] na DNA

V první části experimentu byla stanovena závislost intenzity proudu na koncentraci studovaného komplexu. Tato závislost je zobrazena na grafu 1.



Graf 1: Kalibrační křivka závislosti naměřeného proudu na koncentraci komplexu.

Z grafu vyplývá, že měřená závislost je lineární na celém intervalu měřených koncentrací. Pro další experimenty byly proto zvoleny koncentrace *cis*-[Pt^{II}(NH₃)₂I₂] v tomto rozsahu. Cílem tohoto experimentu bylo zjistit rychlost vazby komplexu *cis*-[Pt^{II}(NH₃)₂I₂] na CT DNA metodou diferenční pulzní polarografie. Pokles množství nenavázaného komplexu byl sledován v čase. Množství navázané platiny bylo vypočteno odečítáním množství nenavázané platiny od celkového množství platiny přítomné ve vzorku. Množství navázané platiny na CT DNA s časem vzrůstalo. V těchto reakcích bylo 50% ($t_{50\%}$) komplexu navázáno v časech 105 ± 11 min pro *cis*-[Pt^{II}(NH₃)₂I₂] a 64 ± 5 min pro cisplatinu. Oba měřené komplexy byly kvantitativně navázány po 24 hodinách. Kinetiky reakcí jsou zobrazeny v grafu 2.

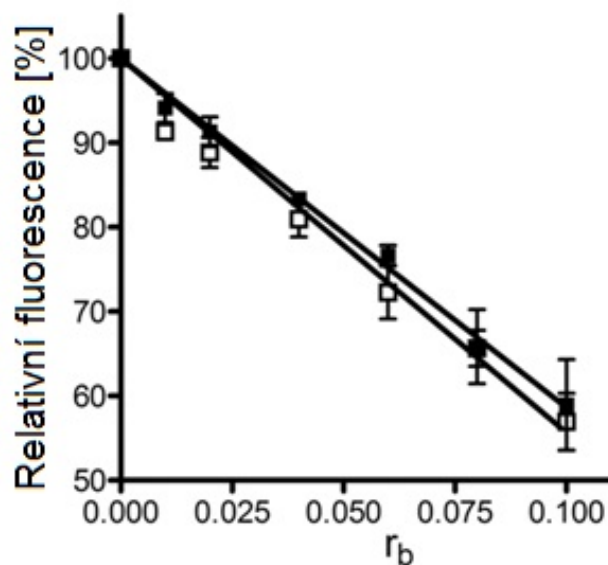


Graf 2: Kinetika reakce $cis-[Pt^{II}(NH_3)_2I_2]$ a cisplatinu s dvoušroubovicovou tymovou DNA při $r_b = 0,08$ a $37^\circ C$. Prázdné značky reprezentují komplex $cis-[Pt^{II}(NH_3)_2I_2]$ a vyplněné značky cisplatinu. Body a úsečky představují průměrné hodnoty a směrodatnou odchylku ze tří měření.

Z výsledků je patrné, že vazba komplexu $cis-[Pt^{II}(NH_3)_2I_2]$ na DNA je pomalejší než vazba cisplatinu. To může být způsobeno pomalejší hydrolyzou iodidových ligandů ve srovnání s chloridovými díky jejich nižší elektronegativitě. Skutečnost, že u těchto komplexů platiny iodidové ligandy hydrolyzují výrazně pomaleji než chloridové, byla již popsána dříve (Messori a kol. 2010).

4.2 Charakterizace DNA aduktů metodou fluorescence ethidium bromidu

Fluorescenční sonda ethidium bromid (EtBr) může být použita k rozlišení konformačních změn vyvolaných v DNA monofunkčními a bifunkčními adukty platinových komplexů. Interkalační vazba ethidium bromidu do DNA je stechiometricky blokována tvorbou bifunkčních aduktů, což vede ke snížení intenzity fluorescence EtBr. Vazba komplexu $cis-[Pt^{II}(NH_3)_2I_2]$ měla za následek pokles intenzity fluorescence EtBr, které bylo velice podobné poklesu vyvolanému cisplatinou (Graf 3).



Graf 3: Fluorescence ethidium bromidu. Závislost EtBr fluorescence na r_b pro CT DNA modifikovanou komplexy platiny v prostředí 10 mM NaClO₄ při 37 °C po dobu 24 h. Prázdné značky reprezentují komplex cis-[Pt^{II}(NH₃)₂I₂] a vyplněné značky cisplatinu. Body a úsečky představují průměrné hodnoty a směrodatnou odchylku ze tří měření.

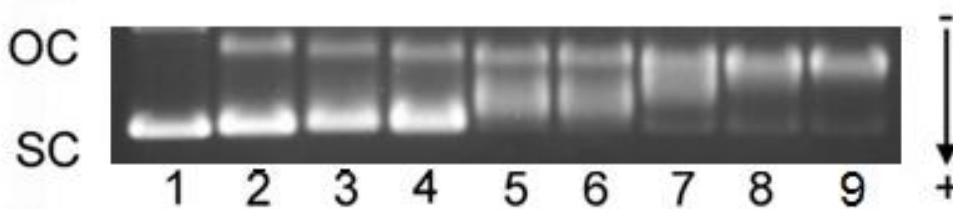
Tento výsledek naznačuje, že konformační distorze vyvolaná vazbou cis-[Pt^{II}(NH₃)₂I₂] na DNA je delokalizovaná a postihuje stejné množství párů bází kolem navázaného komplexu, jako je tomu u vazby s cisplatinou. Charakterizace DNA aduktů metodou EtBr fluorescence podporuje na základě výše uvedeného názoru, že vazba komplexu na DNA cis-[Pt^{II}(NH₃)₂I₂] je podobná jako vazba cisplatinu.

4.3 Rozvíjení plazmidové DNA

Elektroforéza v nativním agarózovém gelu byla použita pro zjištění rozvíjení superhelikálního vinutí v negativně vinuté plazmidové DNA pomocí stanovení úhlu rozvinutí. Komplex, který rozvíjí DNA, snižuje počet superhelikálních otoček v uzavřené cirkulární DNA. Snížení počtu otáček způsobuje snížení mobility plazmidu v elektroforetickém gelu, která umožní pozorovat a kvantifikovat průměrnou hodnotu rozvinutí na adukt.

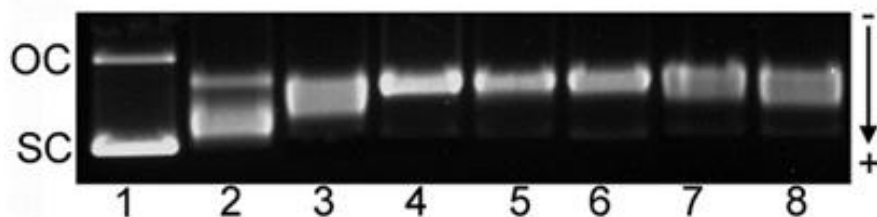
Pro zjištění superhelikální hustoty σ pro danou plazmidovou DNA byl experiment nejprve proveden s cisplatinou, pro kterou je z literatury znám úhel rozvinutí. (Lippard, Keck 1992). Stupeň modifikace, při kterém došlo ke komigraci relaxované a superhelikální formy, byl určen jako $r_b(c) = 0,1$ (Obr. 22, dráha 9).

Využitím tohoto údaje a znalosti úhlu rozvinutí pro cisplatinu byla stanovena superhelikální hustota použité plazmidové $\sigma = -0,072$.



Obr. 22: Rozvíjení DNA modifikované cisplatinou. Dráhy: dráha 1 – kontrola (nemodifikovaná DNA); dráha 2 – $r_b = 0,03$; dráha 3 – $r_b = 0,04$; dráha 4 – $r_b = 0,05$; dráha 5 – $r_b = 0,06$; dráha 6 – $r_b = 0,07$; dráha 7 – $r_b = 0,08$; dráha 8 – $r_b = 0,09$; dráha 9 – $r_b = 0,1$.

Pro námi zkoumaný komplex $cis-[Pt^{II}(NH_3)_2I_2]$ byl stupeň modifikace, při kterém nastává komigrace relaxované a superhelikální formy, určen jako $r_b(c) = 0,12$ (Obr. 23, dráha 6).



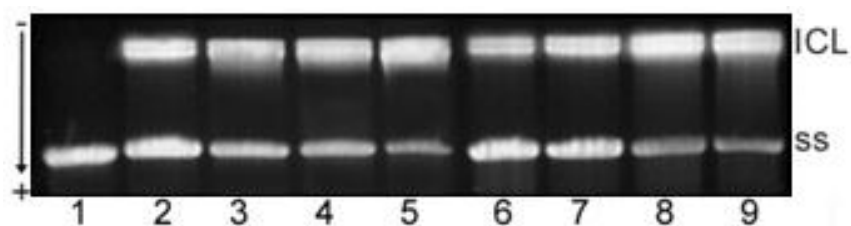
Obr. 23: Rozvíjení DNA modifikované komplexem $cis-[Pt^{II}(NH_3)_2I_2]$. Dráhy: dráha 1 – kontrola (nemodifikovaná DNA); dráha 2 – $r_b = 0,05$; dráha 3 – $r_b = 0,07$; dráha 4 – $r_b = 0,09$; dráha 5 – $r_b = 0,1$; dráha 6 – $r_b = 0,12$; dráha 7 – $r_b = 0,14$; dráha 8 – $r_b = 0,16$.

Využitím výsledků získaných ze zmíněných měření byl úhel rozvinutí pro komplex $cis-[Pt^{II}(NH_3)_2I_2]$ stanoven $\varphi = 11 \pm 2^\circ$, který je velice podobný úhlu, o který rozvíjí cisplatinu (13°).

4.4 Stanovení množství meziřetězcových můstků

Protinádorová účinnost komplexů platiny souvisí s jejich vazbou na DNA. Největší poškození způsobují meziřetězcové můstky. Množství meziřetězcových můstků je závislé

na stupni modifikace r_b (Obr. 24). S rostoucím stupněm modifikace roste množství molekul DNA, které obsahují meziřetězcové můstky.



Obr. 24: Stanovení meziřetězcových můstků. Dráhy: dráha 1 – kontrola (nemodifikovaná DNA); dráha 2 – komplex $cis-[Pt^{II}(NH_3)_2I_2]$, $r_b = 0,0003$; dráha 3 – komplex $cis-[Pt^{II}(NH_3)_2I_2]$, $r_b = 0,0005$; dráha 4 – komplex $cis-[Pt^{II}(NH_3)_2I_2]$, $r_b = 0,0007$; dráha 5 – komplex $cis-[Pt^{II}(NH_3)_2I_2]$, $r_b = 0,001$; dráha 6 – cisplatina, $r_b = 0,0003$; dráha 7 – cisplatina, $r_b = 0,0005$; dráha 8 – cisplatina, $r_b = 0,0007$; dráha 9 – cisplatina, $r_b = 0,001$.

Množství meziřetězcových můstků bylo spočteno pomocí vztahu (4). Výsledné množství meziřetězcových můstků komplexu $cis-[Pt^{II}(NH_3)_2I_2]$ (5%) je velice podobné množství meziřetězcových můstků indukovaných cisplatinou (6%).

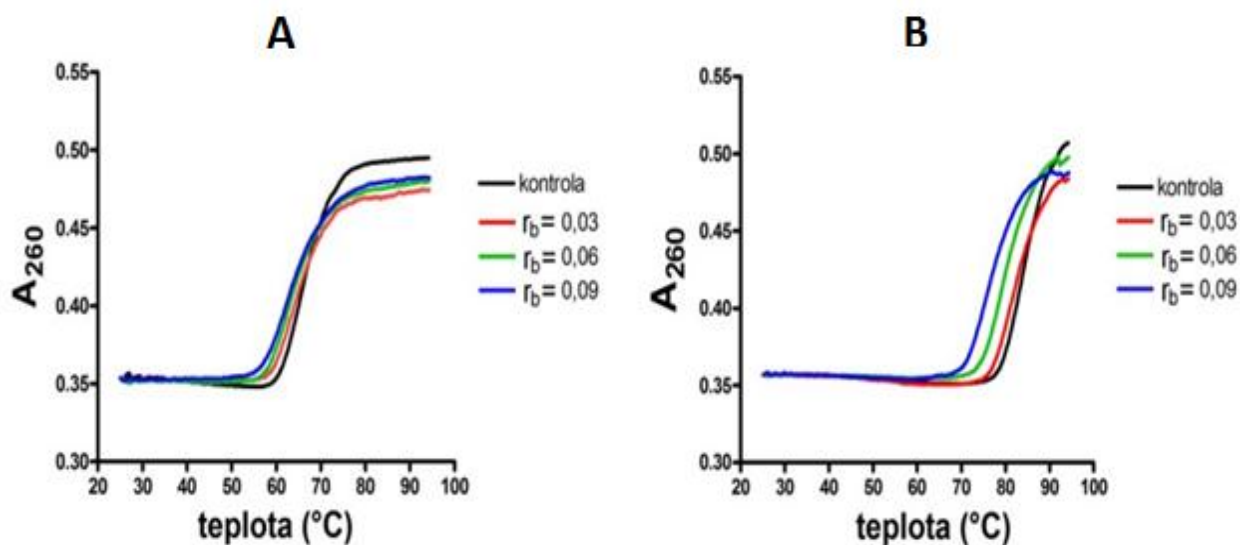
4.5 Stanovení teploty tání

Vazbou platinových komplexů na DNA jsou vyvolány tři hlavní faktory, a to

- Destabilizační efekt vyvolaný konformační distorzí po vazbě komplexu
- Stabilizace struktury meziřetězcovými můstky
- Stabilizace struktury vyvolaná kladným nábojem navázaného platinového komplexu

Všechny výše zmíněné faktory se uplatňují při nízké iontové síle a dochází ke stabilizaci struktury pomocí meziřetězcových můstků a kladného náboje. Ve vyšší iontové síle je stabilizace nábojem vyrušena vysokým obsahem iontů Na^+ , projeví se tedy pouze distorze

způsobená vazbou komplexu a vliv meziřetězcových můstků. Křivky tání pro obě měření iontové síly jsou zobrazeny v grafu 4.

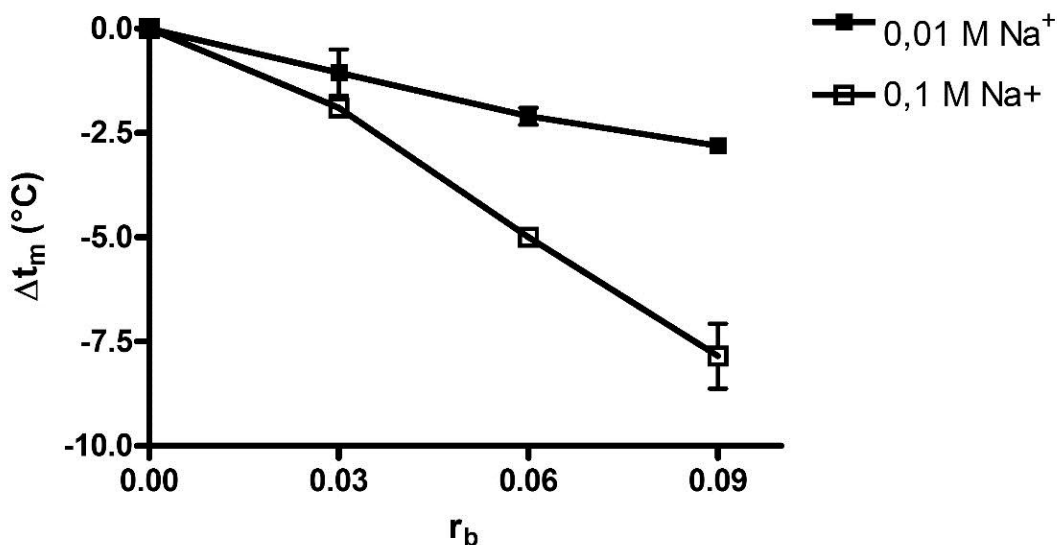


Graf 4: Křivky tání vzorků DNA modifikovaných komplexem $cis-[Pt^{II}(NH_3)_2I_2]$. A: prostředí 0,01 M $NaClO_4$, B: prostředí 0,1 M $NaClO_4$. Koncentrace DNA ve vzorku byla $5,4 \cdot 10^{-5}$ M.

Na základě výše uvedeného je možné konstatovat, že snížení teploty tání t_m (Tabulka 1, graf 5) je způsobeno konformační distorzí, která dominuje nad stabilizací meziřetězcovými můstky.

Tabulka 1: Hodnoty Δt_m tymové DNA modifikované $cis-[Pt^{II}(NH_3)_2I_2]$. Hodnoty jsou vyjádřeny ve $^{\circ}C$ a představují průměr \pm směrodatnou odchylku ze tří měření.

	$r_b = 0.03$	$r_b = 0.06$	$r_b = 0.09$
$cis-[Pt^{II}(NH_3)_2I_2]$ (0,1M Na^+)	$-1,9 \pm 0,1$	$-5,0 \pm 0,1$	$-7,9 \pm 0,6$
$cis-[Pt^{II}(NH_3)_2I_2]$ (0,01M Na^+)	$-1,1 \pm 0,4$	$-2,1 \pm 0,2$	$-2,8 \pm 0,0$



Graf 5: Grafické znázornění průběhu Δt_m v závislosti na stupni modifikace r_b . Body a úsečky představují průměrné hodnoty a směrodatnou odchylku ze tří měření.

Vzhledem k tomu, že jak cisplatina, tak $cis\text{-}[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{I}_2]$ nesou stejný 2+ náboj na platinové části a tvoří přibližně stejný počet meziřetězcových můstků, hodnoty t_m odrážejí především destabilizační účinky konformační deformace vyvolané vazbou komplexu na DNA. Po srovnání výsledků získaných v této práci s výsledky publikovanými dříve pro cisplatinu (Tabulka 2) proto můžeme tvrdit, že výsledky experimentu, ve kterém bylo sledováno tání DNA (Tabulka 1a Graf 5), jsou v souladu s teorií, že adukty komplexu $cis\text{-}[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{I}_2]$ s DNA narušují a destabilizují dvoušroubovici DNA přibližně stejným způsobem a v podobném rozsahu jako adukty, které tvoří cisplatina.

Tabulka 2: Hodnoty Δt_m tymové DNA modifikované cisplatinou. Hodnoty (ve °C) jsou převzaty z práce Žaludová a kol., 1996

	$r_b = 0.03$	$r_b = 0.09$
$cis\text{-}[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ (0,1M Na ⁺)	-2,1	-8,3
$cis\text{-}[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ (0,01M Na ⁺)	-1,1	-3,5

I přes značnou pozornost, která byla doposud věnována studiu komplexů odvozených od cisplatin, existuje v literatuře jen velmi málo informací o přímém jodidovém analogu cisplatin $cis-[Pt^{II}(NH_3)_2I_2]$, který byl studován v rámci této diplomové práce. To může být pravděpodobně důsledkem počátečních negativních studií publikovaných Hoeschelem a Clearem (Cleare a kol. 1973), které ukázaly, že $cis-[Pt(NH_3)_2I_2]$ byl téměř neaktivní u zvířecích modelů sarkomu 180, a současně zmínily extrémně nízkou rozpustnost této sloučeniny ve vodě a obtíže se stanovením toxických dávek. Nikdy však nebyly publikovány údaje o cytotoxicitě tohoto komplexu na lidských nádorových buněčných liniích.

Několik studií vzniklých v pozdější době však začalo přehodnocovat přístup ke komplexům platiny s jodidovými ligandy jako potenciálním protinádorově účinným látkám. Např. v práci Kratochwila a kolektivu je popsán diaminodijodidoplatnatý komplex vykazující zjevnou cytotoxicitu *in vitro* (Kratochwil a kol. 1999). Během posledních let byly popsány některé diaminodijodidoplatnaté komplexy se smíšenými ligandy, které také byly cytotoxické v testech na buněčných nádorových liniích (Messori a kol. 2010; Messori a kol. 2012; Parro a kol. 2013). V roce 2013 pak byla popsána reakce $cis-[Pt(NH_3)_2I_2]$ s lysozomem a struktura takto modifikovaného proteinu, která byla velmi neobvyklá a odlišná od modifikace téhož modelového proteinu cisplatinou (Messori a kol. 2013).

Tyto výsledky vedly ke snaze o nové, systematictější zhodnocení některých klíčových chemických a biologických aspektů působení komplexu $cis-[Pt^{II}(NH_3)_2I_2]$. Celá studie, na níž se podílela i naše laboratoř, byla zaměřena na čtyři hlavní oblasti:

- 1) Studium procesů aktivace komplexu $cis-[Pt^{II}(NH_3)_2I_2]$ ve vodných roztocích jak při fyziologickém pH, tak v mírně kyselém prostředí odpovídajícím pH v hypoxických pevných tumorech.
- 2) Pomocí počítačového modelování přispět k porozumění získaných spektrálních dat.
- 3) Stanovit vliv komplexu $cis-[Pt^{II}(NH_3)_2I_2]$ na lidské nádorové buňky několika odlišných linií.
- 4) Studovat přímé reakce $cis-[Pt^{II}(NH_3)_2I_2]$ s DNA. Výsledky týkající se reakcí studovaného komplexu s vysokomolekulární DNA byly získány v rámci této diplomové práce a tím jsme přispěli k mezinárodní studii, která byla předložena k uveřejnění v časopise Dalton Transactions .

Naše výsledky ukázaly, že $cis\text{-}[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{I}_2]$ poškozuje DNA velmi podobným způsobem jako cisplatina. Pouze kinetika vazby komplexu na DNA je pomalejší a výsledná úroveň platinace může být tedy nižší, než je tomu u cisplatin. Vezmeme-li v úvahu, že komplex $cis\text{-}[\text{Pt}^{\text{II}}(\text{NH}_3)_2\text{I}_2]$ je ve srovnání s cisplatinou ve všech studovaných nádorových liniích stejně účinný, nebo dokonce účinnější, lze námi získané výsledky interpretovat tak, že vazba na DNA nebude jediným faktorem, podílejícím se na cytotoxickém působení námi studovaného komplexu a že k výslednému biologickému efektu patrně přispívají ještě další faktory. Pro opodstatnění této hypotézy by však byly potřeba další, rozsáhlejší studie, které přesahují rámec diplomové práce.

5. Závěr

Cílem této práce bylo studovat interakce *cis*-diammindijodoplatinatého komplexu *cis*-[Pt^{II}(NH₃)₂I₂] s vysokomolekulární savčí DNA. Podnětem pro studium byla skutečnost, že v poslední době došlo k přehodnocení donedávna zastávaného názoru, že komplexy s odstupujícími jodidovými ligandy nejsou protinádorově účinné. Byly proto zahájeny studie, které měly za cíl podrobněji ověřit na buněčné i molekulární úrovni biologické vlastnosti tohoto komplexu; tato diplomová práce tedy byla koncipována jako příspěvek k uvedené společné mezinárodní studii.

Získané výsledky ukázaly, že *cis*-[Pt^{II}(NH₃)₂I₂] kinetika vazby komplexu na DNA je pomalejší a výsledná úroveň platinace tedy nižší, než je tomu u cisplatinu. To může souviset s výrazně pomalejší hydrolyzou komplexu ve srovnání s cisplatinou, danou rozdílem v chemických vlastnostech jodidových a chloridových ligandů. Po vazbě na DNA poškozuje DNA velmi podobným způsobem jako cisplatinu. Vzhledem k tomu, že komplex *cis*-[Pt^{II}(NH₃)₂I₂] vykazuje vyšší cytotoxicitu v nádorových liniích než cisplatinu, lze soudit, že na cytotoxickém působení komplexu *cis*-[Pt^{II}(NH₃)₂I₂] se patrně podílejí ještě další faktory než jen poškození DNA. Pro objasnění by však byly potřeba další, rozsáhlejší studie, které přesahují rámec této diplomové práce.

6. Seznam zkratek

A	adenin
ATP	adenosin trifosfát
C	cytozin
CT DNA	telecí tymová DNA
DPP	diferenční pulsní polarografie
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPPG	dipalmitoylfosfatidylglycerol
EDTA	etylen diamin tetraoctová kyselina
EtBr	ethidium bromid
ER	estrogenový receptor
G	guanin
HEWL	slepičí vaječný bílý lyzozom
HMG	high mobility group
IEC	meziřetězcová příčná vazba
MMR	oprava chybného párování
NER	nukleotidová excisní oprava
RF faktor	růstový faktor
Rpm	počet otáček za minutu
T	tymín
TAE	tris-acetátový pufr
TBE	tris-borátový pufr

7. Seznam použité literatury

- [1]. Alberts, B. et al.(1998): *Základy buněčné biologie*. 2. vydání. Ústí nad Labem: Espero Publishing, 183 - 188. ISBN 80-902906-2-0.
- [2]. Boulikas, T., Pantos, A., Bellis, E. Christofis, P. (2007): *Designing platinum compounds in cancer: structures and mechanism*. *Cancer Therapy*, 5, 537 – 583
- [3]. Brabec V. (1989): *Molekulární aspekty mechanismu protinádorového působení cisplatiny*, *Biophysical Chemistry*, 42-43.
- [4]. Brabec V., Kasparkova J. (2002): *Molecular aspects of resistance to antitumor platinum drugs*. *Drug Resistance Updates* 5, 147-161.
- [5]. Brabec, V., Kasparkova J. (2005): *DNA interactions of platinum anticancer drugs. Recent advances and mechanisms of action*. In *Metal Compounds in Cancer Chemotherapy*, Pérez J. M., Fuertes M. A., Alonso C. (Eds.), 87-218.
- [6]. Brabec, V. and Kasparkova, J. (2005) *Platinum-based drugs*. In Gielen, M. and Tiekink, E. R. T. (eds.), *Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents: The Use of Metals in Medicine*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, pp. 489-506.
- [7]. Brabec, V. Kasparkova J. (2005): *Modifications of DNA by platinum complexes. Relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs*. *Drug Resistance Updates*, 8, 131 – 146.
- [8]. Burger, H., Loos, W. J., Eechoute, K., Verweij, J., Mathijssen, H. J., Wiemer, E. A. C. (2011): *Drug transporters of platinum-based anticancer agents and their clinical significance*. *Drug Resistance Updates*, 14, 22 – 34.

- [9]. Carvalho, Júnior A.D., Vieira, F. P., Melo, V. J., Lopes, M. T., Silveira, J. N., Ramaldes, G. A., Garnier-Suillerot, A., Pereira-Maia, E. C., Oliveira, M. C. (2007): *Preparation and cytotoxicity of cisplatin-containing liposomes*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 40(8), 1149 – 1157.
- [10]. Cleare, M. J., Hoeschele, J. D. (1973): *Antitumor activity of group VIII transition metal complexes. 1. Platinum(II) complexes*. Bioinorg. Chem. 1973, 2. 187-210.
- [11]. Espling, M. (2013): *Copper-transporting proteins and their interactions with platinum-based anticancer substances*. Umeå, Sweden: VMC-KBC Umeå, 2013, 12 – 15. ISBN 978-91-7459-705-9. Dostupné z: <http://umu.diva-portal.org/>
- [12]. Garnuszek, P., Licińska, I., Skierski, J. S., Koronkiewicz, M., Mirowski, M., Wiercioch, R., Mazurek, A. P. (2002): *Biological investigation of the platinum(II)-[*I]iodohistamine complexes of potential synergistic anti-cancer activity*. Nuclear Medicine and Biology, 20, 169 – 175.
- [13]. Gelasco, A., Lippard, S. J. (1998): *NMR solution structure of a DNA dodecamer duplex containing a cis-diammineplatinum(II) d(GpG) intrastrand cross-link, the major adduct of the anticancer drug cisplatin*. Biochemistry , 37, 9230–9239
- [14]. Hannon M. J. (2007): *Metal-based anticancer drugs: From a past anchored in platinum chemistry to a post-genomic future of diverse chemistry and biology*. Pure and Applied Chemistry 79, 2243–2261.
- [15]. Harrap K. R. (1985): *Preclinical studies identifying carboplatin as a viable cisplatin alternative*. Cancer Treatment Reviews, 12, 21-33.
- [16]. Holler, E. (1993): *Metal complexes in cancer chemotherapy*, ed. B. K. Keppler. Weinheim: VCH. 37.
- [17]. Huang, H.F., et al. (1995): *Solution structure of a cisplatin-induced DNA interstrand crosslink*. Science, 270(5243), 1842-1845.

- [18]. Jamieson E. R., Jacobson M. P., Barnes C. M., Chow C. S., Lippard S. J. (1999): *Structural and kinetic studies of a cisplatin-modified DNA icosamer binding to HMG1 domain B*. Journal of Biological Chemistry 274, 12346-12354.
- [19]. Jenssen, D., Vare, D., Groth, P., Carlsson, R., Johansson, F., Erixon, F. (2012): *DNA interstrand crosslinks induce a potent replication block followed by formation and repair of double strand breaks in intact mammalian cells*. DNA Repair, 11, 976 – 985.
- [20]. Jung Y., Lippard S. J. (2007): *Direct cellular response to platinum-induced DNA damage*. Chemical Reviews 107, 1387-1407.
- [21]. Kauffman, G. B. (2010): *Michele Peyrone (1813 – 1883), Discover of cisplatin*. Platinum Metals Rev. 54, 250 – 256.
- [22]. Kelland L. (2007): *The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy*. Nature Reviews Cancer 7, 573-584.
- [23]. Kostova I. (2006): *Platinum complexes as anticancer agents*. Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery 1, 1-22.
- [24]. Kratochwil, N. A., Ivanov, A. I., Patriarca, M., Parkinson, J. A., Gouldsworthy, A. M., Murdoch, P. D., Sadler, P. J. (1999): *Surprising reactions of iodo Pt(IV) and Pt(II) complexes with human albumin: Detection of Cys34 sulfenic acid*. Journal of the American Chemical Society, 121. 8193-8203
- [25]. Lippard, S. J., Keck, M. V. (1992): *Unwinding of supercoiled DNA by platinum-ethidium and related complexes*. Journal of American Chemical Society, 114, 3386 – 3390.
- [26]. Messori, L., Casini, A., Gabbiani, Ch., Michelucci, E., Cubo, L., Ríos-Luci, C., Padrón, J. M., Navro-Ranninger, C., Quiroga, A. G. (2010): *Cytotoxic Profile and Peculiar Reactivity with Biomolecules of a Novel „Rule-Breaker“ Iodidoplatinum(II) Complex*. ACS Medicinal Chemistry Letters, 1, 381 – 385.

- [27]. Messori, L., Cubo, L., Gabbaiani, C., Alvarez-Valdes, A., Micheluuci, E., Pieraccini, G., Rios-Luci, C., Leon, L. G., Padron, J. M., Navarro-Ranninger, C., Casini, A., Quiroga, A. G. (2012): *Reactivity and Biological Properties of a Series of Cytotoxic PtI₂(amine)₂ Complexes, Either cis or trans Configured*. Inorganic Chemistry, 51, 1717-1726.
- [28]. Messori, L., Marzo, T., Gabbiani, C., Valdes, A. A., Quiroga, A. G., Merlino, A. (2013): *Particular Features in the Crystal of the Adduct Formed between cis-PtI₂(NH₃)₂ and Hen Egg White Lysozyme*. Inorganic Chemistry, 52, 13827 – 13829.
- [29]. Muggia, F. (2009): *Platinum compounds 30 years after the introduction of cisplatin: Implications for the treatment of ovarian cancer*. Gynecologic Oncology 112, 275 – 281.
- [30]. Parro, T., Medrano, M. A., Cubo, L., Muñoz-Galván, S., Carnero, A., Navarro-Ranninger, C., Quiroga, A. G. (2013): *The second generation of iodido complexes: trans-[PtI₂(amine)(amine')] bearing different aliphatic amines*. Journal of Inorganic Biochemistry, 127, 182 – 187.
- [31]. Perez R. P. (1998): *Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance*. European Journal of Cancer, 34, 1535-1542.
- [32]. Abu-Surrah, A. S., Kettunen, M. (2006): *Platinum Group Antitumor Chemistry: Design and Development of New Anticancer Drugs Complementary to Cisplatin*. Current Medical Chemistry, 13, 1337 – 1357.
- [33]. Zamble, D. B., et al. (1999): *The response of cellular proteins to cisplatin-damaged DNA*, in *Cisplatin. Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, B. Lippert, VHCA, WILEY-VCH: Zürich, Weinheim., Editor.p.73-110.
- [34]. Zaludova, R., Kleinwächter, V., Brabec, V. (1996): *The effect of ionic strength on melting of DNA modified by platinum(II) complexes*. Biophysical Chemistry, 60, 135-142.

Internetové zdroje

[35]. Wikipedia: the free encyclopedia [online]: *DNA*. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 5.3. 2015 [cit. 2015-03-12].

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

