

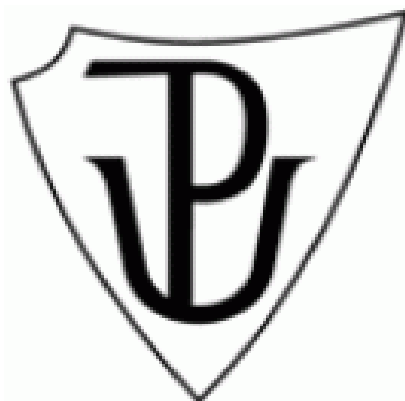
UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra biofyziky

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Biofyzikální analýza interakcí DNA s komplexem ruthenia
s akridinovým ligandem**



Vypracovala: Kateřina Kumbárová

Studijní obor: Molekulární biofyzika

Vedoucí bakalářské práce: prof. RNDr. Jana Kašpárková, Ph.D.

OLOMOUC 2018

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Kateřina Kumbárová

Název práce: Biofyzikální analýza interakcí DNA s komplexem ruthenia s akridinovým ligandem

Typ práce: Experimentální

Pracoviště: Katedra biofyziky

Vedoucí práce: prof. RNDr. Jana Kašpárková, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2018

Abstrakt:

Tato bakalářská práce se zabývá studiem interakce mezi komplexem ruthenia s akridinovým ligandem a molekulou DNA. Mezi aplikované biofyzikální metody patří měření teploty tání, cirkulární dichroismus, viskozimetrie, elektroforéza v nativním agarózovém gelu, atomová absorpční spektrometrie a elektronová absorpční a fluorescenční spektroskopie. Výstupy objasňují mechanismus interakce studovaného komplexu Ru1 s DNA. Získané výsledky jsou diskutovány s ohledem na protinádorovou účinnost této látky. Výsledky studie prokázaly interkalační vazbu rutheniového komplexu k molekule DNA.

Klíčová slova: DNA, interkalace, vazba do žlábků, komplex ruthenia

Počet stran: 49

Počet příloh: 0

Jazyk: Čeština

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Kateřina Kumbárová

Title of thesis: Biophysical analysis of DNA interactions of the ruthenium complex bearing acridine ligand

Type of thesis: Experimental

Department: Department of biophysics

Supervisor: prof. RNDr. Jana Kašpárková, Ph.D.

The year of defence: 2018

Abstract:

The aim of this bachelor thesis is to study interactions between a ruthenium complex bearing acridine ligand and a molecule of DNA. Applied biophysical methods are measurement of the melting point, circular dichroism, viscometry, electrophoresis in native agarose gels, atomic absorption spectrometry, electronic absorption spectroscopy, and fluorescence spectroscopy. Outcomes clarify a mechanism of the interaction of the investigated complex Ru1 with DNA. Obtained results are discussed with respect to the effectiveness of this substance against tumours. The result of this study indicated intercalation of ruthenium complex into the molecule of DNA.

Key words: DNA, intercalation, minor and major groove binding, ruthenium complex

Number of pages: 49

Number of attachments: 0

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vytvořila samostatně, pod vedením prof. RNDr. Jany Kašpárkové, Ph.D. a za použití literatury citované v závěru.

V Olomouci dne 24. 4. 2018

.....

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce prof. RNDr. Janě Kašpárkové, Ph.D. za poskytnuté cenné rady, vstřícný přístup, trpělivost a čas, který mi během měření a psaní této bakalářské práce věnovala.

Tato práce vznikla s finanční podporou projektu IGA PřF_2018_022.

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Přehled problematiky	2
2.1 Nukleové kyseliny.....	2
2.2 Deoxyribonukleová kyselina – DNA	3
2.2.1 Chemické složení	3
2.2.2 Primární struktura	3
2.2.3 Sekundární struktura	5
2.2.4 Neobvyklé struktury DNA.....	7
2.2.5 Terciální a kvartérní struktura DNA	10
2.3 Protinádorově účinná metalofarmaka	11
2.3.1 Cisplatina	11
2.3.2 Druhá generace platnatých cytostatik	12
2.3.3 Rutheniové komplexy	14
2.4 Interakce nízkomolekulárních látek s DNA	16
2.4.1 Kovalentní interakce	16
2.4.2 Nekovalentní interakce	16
3. Cíl práce.....	21
4. Materiál a metody	22
4.1 Použitý komplex.....	22
4.2 Chemikálie a biologický materiál	22
4.3 Roztoky	23
4.4 Přístroje	23
4.5 Metody	23
4.5.1 Modifikace DNA	23
4.5.2 Atomová absorpční spektrometrie	24
4.5.3 Elektronová absorpční spektroskopie	24

4.5.4	Fluorescenční spektroskopie	25
4.5.5	Měření teploty tání (T_m)	25
4.5.6	Cirkulární dichroismus	26
4.5.7	Viskozimetrie	27
4.5.8	Elektroforéza v nativním agarózovém gelu	28
5.	Výsledky a diskuse	30
5.1	Příprava a charakterizace zásobního roztoku	30
5.1.1	Atomová absorpční spektrometrie	30
5.1.2	Elektronová abs. spektroskopie – stanovení absorpčního koeficientu	31
5.2	Fluorescenční spektroskopie	32
5.2.1	Stanovení vazby	32
5.2.2	Stanovení sekvenční specifity	34
5.3	Absorpční titrace	36
5.4	Cirkulární dichroismus	37
5.5	Viskozimetrie	39
5.6	Měření teploty tání (T_m)	41
5.7	Elektroforéza v agarózovém gelu	42
6.	Závěr	45
7.	Literatura	46

1. Úvod

Nádorová onemocnění jsou v současné době nejčastější příčinou smrti. Proto je velkou snahou stále objevovat, vyvíjet a uvádět do klinické praxe metody, které mohou toto onemocnění léčit či prodloužit dobu života. Nejznámější metodou léčby nádorového onemocnění je protinádorová chemoterapie, jejíž principem je podávání cytostatik, která mají antineoplastickou schopnost.

Základní úlohou jedné skupiny těchto kancerostaticky působících preparátů je vazba na molekulu DNA. Dojde-li k navázání cytostatik na molekulu DNA, dochází tak k vazbě, která může ovlivnit konformační změny v molekule DNA. Od roku 1969, kdy Barnett Rosenberg zkoumal růst bakterií *E. coli* vlivem elektrického pole, se cisplatina a od ní odvozené komplexy řadí mezi nejpoužívanější cytostatika (Rosenberg 1999). Avšak při podávání bylo zjištěno množství nežádoucích účinků, proto se začaly testovat nové přechodné sloučeniny s jiným centrálním atomem, než je platina, které by měly mít méně negativní vliv na organismus.

Tato bakalářská práce se zabývá studiem komplexu ruthenia (Ru1) s akridinovým ligandem a jeho vazbou na molekulu DNA. V úvodní části práce je uveden přehled problematiky týkající se molekuly DNA a její struktury, typy protinádorově účinných metalofarmak a způsob jejich interakce s DNA. V následující části jsou zmíněny použité biofyzikální metody a přístroje, které byly při studii využívány. Nakonec v experimentální části práce bude popsána vazba komplexu ruthenia s DNA.

2. Přehled problematiky

2.1 Nukleové kyseliny

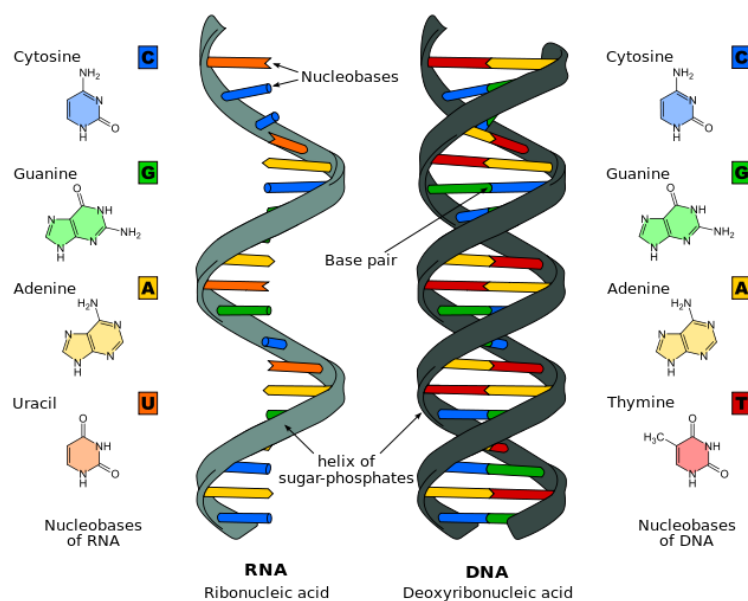
Nukleové kyseliny jsou makromolekulární sloučeniny, které se vyskytují ve všech buňkách. Tvoří relativně malé procento hmotnosti buňky, avšak svými vlastnostmi jsou nezbytné pro živou soustavu. Jsou nositelkami genetické informace, díky nimž dochází k přenosu dědičných znaků na potomstvo a k evoluci. Každá nukleová kyselina se skládá ze tří částí:

- zásaditá část (purinová či pyrimidinová báze)
- kyselá část (zbytek kyseliny fosforečné H_3PO_4)
- cukerná část (β -D-ribofuranosa či 2-deoxy- β -D-ribofuranosa)

Spojením zásadité a cukerné složky N-glykosidickou vazbou vzniká nukleosid.

Naváže-li se k nukleosidu kyselá část, vzniká nukleotid.

Rozlišujeme dva typy nukleových kyselin, ribonukleové kyseliny (RNA) a deoxyribonukleové kyseliny (DNA) (Obrázek 1). Obě kyseliny mají rozdílnou strukturu i funkci.



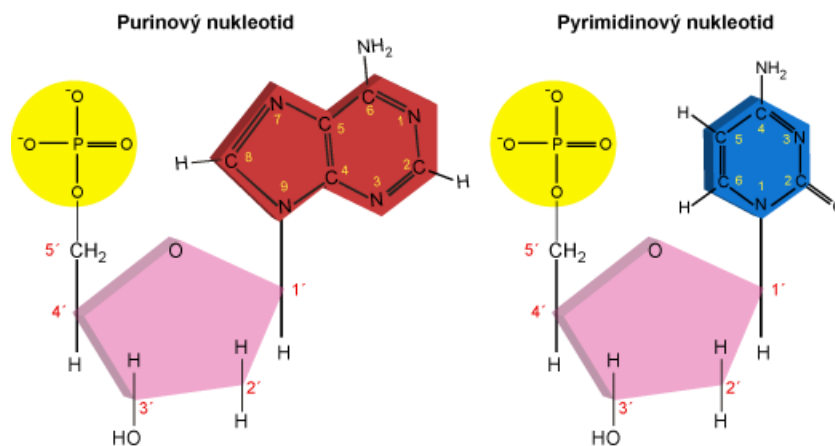
Obrázek 1 Rozdíl struktury RNA a DNA. (Převzato z: [1])

2.2 Deoxyribonukleová kyselina – DNA

První zmínka o DNA pochází z roku 1869, kdy byla izolována z bílých krvinek F. Miescherem (Dahm 2005). Až do roku 1953 bylo tajemstvím, jakou strukturu molekula DNA skrývá. Tento problém se ve zmiňovaném roce podařilo objasnit J. Watsonovi a F. Crickovi, což objasnilo další biologické procesy (Nečas 1989).

2.2.1 Chemické složení

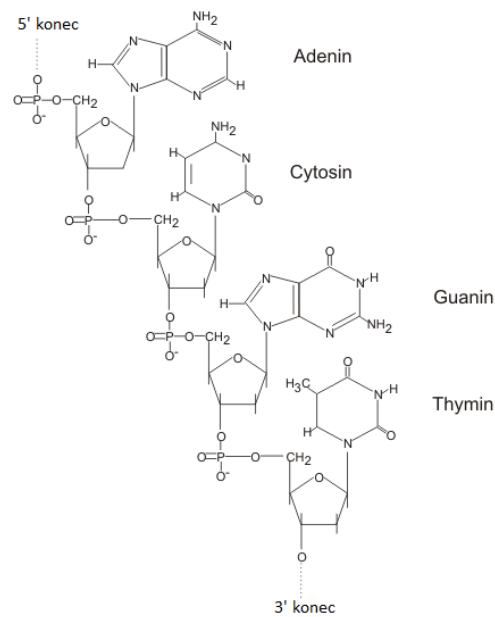
Základní stavební jednotkou molekuly DNA je nukleotid (Obrázek 2). Jedná se o nízkomolekulární sloučeninu tvořenou purinovými nebo pyrimidinovými dusíkatými bázemi a molekulou cukru s fosfátovou skupinou.



Obrázek 2 Stavba purinového a pyrimidinového nukleotidu. (Převzato z: [2])

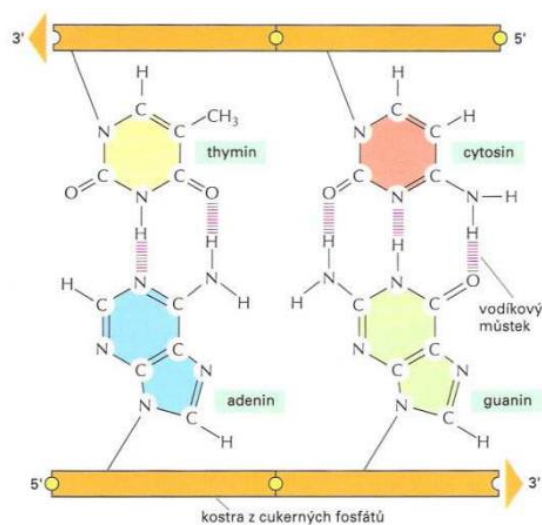
2.2.2 Primární struktura

Primární struktura je dána pořadím nukleotidů v řetězci. Deoxyribonukleová kyselina neboli DNA je tvořena ze dvou komplementárních polymerních řetězců, stočených do pravidelné dvoušroubovice. Průměr šroubovice je asi 2 nm a řetězec vytváří každých 3,4 nm jeden závit (Watson 1982). Řetězce jsou navzájem spojeny vodíkovými můstky mezi bázemi nukleotidů (Alberts a kol. 2002). Obě vlákna jsou vůči sobě antiparalelní - 3' a 5' konec řetězce. Každý řetězec je polynukleotidem, tzn., že se v něm nachází soubor nukleotidů, z nichž 4 jsou hlavní (Obrázek 3). Jednotlivé nukleotidy jsou vázány esterickou vazbou mezi fosfátovou skupinou jednoho nukleotidu a pátým uhlíkem pentózy druhého nukleotidu. V ose řetězce se tedy střídá pentóza a kyselina fosforečná, báze od osy odstupují (Nečas 1989).



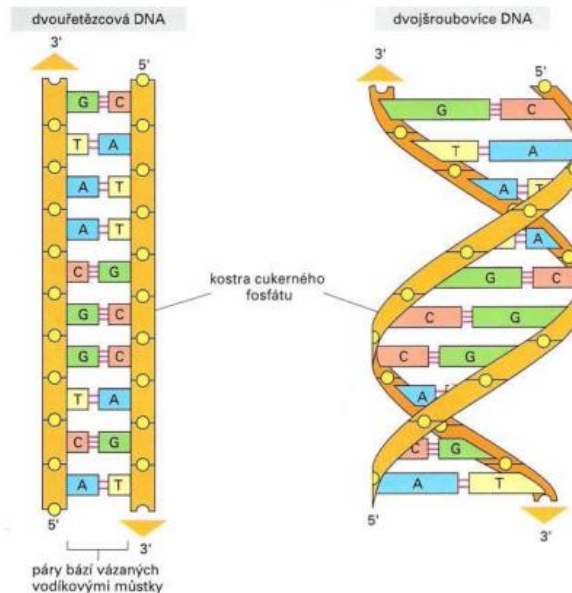
Obrázek 3 Stavba polynukleotidového řetězce DNA. (Převzato z: [3])

Čtyři hlavní nukleotidy obsahují fosfátovou skupinu, zbytek deoxyribózy a dusíkatou bázi (pyrimidinová a purinová). Mezi pyrimidinové báze řadíme cytosin (C), thymin (T). Purinové báze máme taktéž 2, adenin (A) a guanin (G). Adenin se vždy páruje s thyminem dvěma vodíkovými můstky a cytosin s guaninem třemi vodíkovými můstky (Obrázek 4). V obou případech se větší bicyklická báze (purin) páruje s monocyklickou (pyrimidin). Toto párování bází umožňuje zaujmout energeticky nejvýhodnější konformaci v rámci dvoušroubovice.



Obrázek 4 Stavební podjednotky DNA. (Převzato z: Alberts a kol. 2002)

Pokud máme v jednom řetězci například sekvenci ATGTC, musí mít protější řetězec sekvenci TACAG (Watson 1982) (Obrázek 5). Z principu vyplývá, že zastoupení jednotlivých dvojic bází musí být stejné ($A = T$, $C = G$).



Obrázek 5 Komplementární páry bází ve dvojšroubovici DNA. (Převzato z: Alberts a kol. 2002)

2.2.3 Sekundární struktura

Sekundární struktura je dána prostorovým uspořádáním řetězce. Nejčastější formou DNA je pravotočivá dvojšroubovice. Směr vinutí dvojšroubovice rozlišujeme podle pravidla pravé ruky na levotočivou či pravotočivou dvojšroubovici. Vinutím se tvoří žlábký – malý a velký. Za fyziologických podmínek je hloubka velkého žlábký 8,5 Å a šířka 12 Å, u malého žlábký je hloubka 7,5 Å a šířka 6 Å (King a kol. 2006).

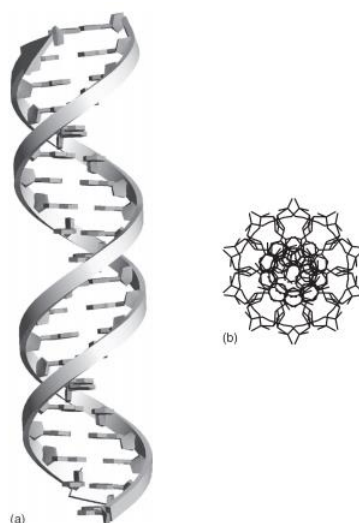
Molekula DNA taktéž tvoří jiné konformace, které se od sebe liší jistými fyzikálními parametry uvedené v tabulce 1. Jedná se o B-formu, A-formu a Z-formu.

Tabulka 1 Rozdíly konformací v DNA. (Převzato z: Rosypal 2006)

	A-konformace	B-konformace	Z-konformace
Vinutí	Pravotočivé	Pravotočivé	Levotočivé
Počet párů bází na závit	11	10,5	12
Průměr [nm]	2,3	2	1,8
Sklon páru k ose [°]	20	-6	7
Celkový tvar	krátká, široká	dlouhá, tenká	podlouhlá, tenká

B-DNA

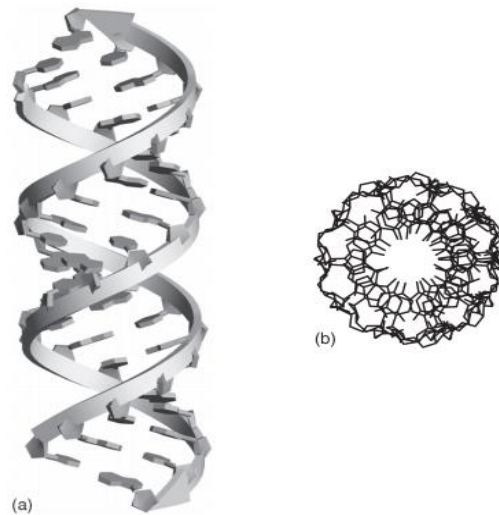
Tato konformace DNA se považuje za klasickou formu DNA, která již byla popsána Watsonem a Crickem. B-DNA se vyskytuje v prostředí s relativně vysokou (95%) vlhkostí. Odpovídá modelu pravotočivé dvoušroubovice s průměrem 2 nm. V jednom závitě obsahuje 10,5 párů bází, které jsou mezi sebou navzájem spojeny vodíkovými můstky - A•T a G•C (Obrázek 6). Osa šroubovice prochází středem mezi komplementárními bázemi (Rosypal 2006).



Obrázek 6 (a) Struktura kanonické B-DNA. (b) Zobrazení osy dvoušroubovice B-DNA. (Převzato z: Neidle 2007)

A-DNA

A-DNA vzniká za relativně nízké (75%) vlhkosti. Tedy při snížení relativní vlhkosti vzorku B-DNA vzniká A-konformace. A-DNA je nejkratší a průměr pravotočivé dvoušroubovice je nejširší ze všech tří konformací, 2,3 nm. Jeden závit obsahuje 11 párů bází, které jsou taktéž navzájem spojeny vodíkovými můstky. Osa dvoušroubovice prochází velkým žlábkem (Rosypal 2006) (Obrázek 7).



Obrázek 7 (a) Struktura kanonické A-DNA. (b) Zobrazení osy dvoušroubovice A-DNA. (Převzato z: Neidle 2007)

Z-DNA

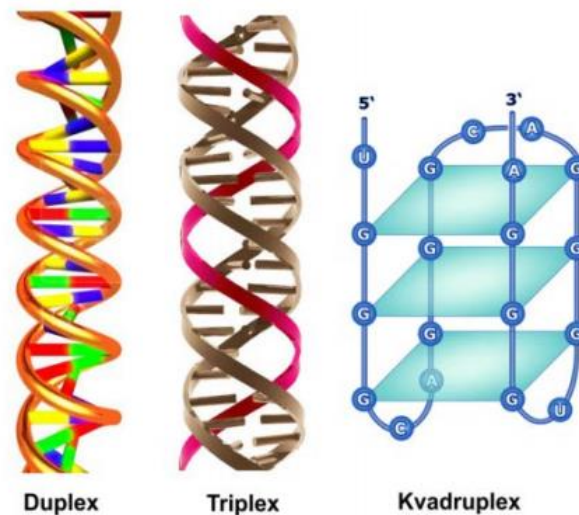
Konformace Z-DNA odpovídá modelu levotočivé dvoušroubovice s průměrem 1,8 nm. Jeden závit obsahuje 12 párů bází, které jsou stejně jak u A, B konformace spojeny vodíkovými můstky. Osa dvoušroubovice prochází malým žlábkem (Rosypal 2006) (Obrázek 8). Sekvence bází se vždy opakuje po dvou základních párech (Neidle 2007).



Obrázek 8 Struktura neobvyklé struktury Z-DNA. (Převzato z: Neidle 2007)

2.2.4 Neobvyklé struktury DNA

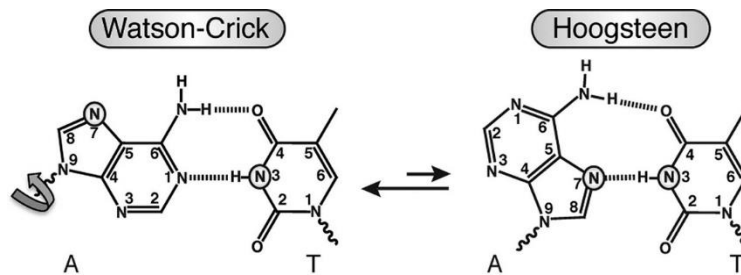
Obvyklá struktura molekuly DNA je uskupena v dvouřetězcové (dsDNA) kanonické vlákno. Avšak dokáže přijmout řadu nekanonických struktur. Existují tzv. víceřetězcové formy DNA – triplexy, kvadruplexy, pentaplexy, apod. (Jain a kol. 2008) (Obrázek 9).



Obrázek 9 Uskupení podle párování bázi mezi více řetězci. (Převzato z: Čudová 2014)

Triplexy

Trojvláknová DNA se tvoří, jsou-li základní báze dvoušroubovice navzájem spojené Watson-Crickovými vodíkovými můstky a třetí vlákno vytváří Hoogsteenovy vodíkové můstky s každým párem dvoušroubovice. (Obrázek 10) Dochází tedy k navázání jednoho řetězce do velkého zlábků dvoušroubovice pomocí Hoogsteenových vodíkových můstků neboli tzv. obráceného Watson-Crickova párování (Frank-Kamenetskii a Mirkin 1995).



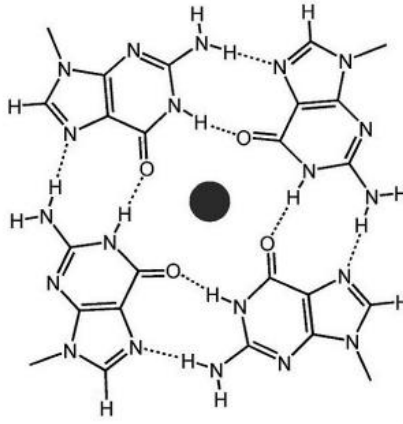
Obrázek 10 Rozdíl mezi Watson-Crickovým a Hoogsteenovým párování bázi. (Převzato z: [4])

Dle původu vzniku triplexu rozlišujeme intermolekulární a intramolekulární triplexy. Intermolekulární triplexy vznikají spojením dvou molekul DNA, kdy jeden úsek DNA tvoří dvoušroubovici a třetí vlákno je tvořeno z rozpojené dvoušroubovice druhého úseku DNA. Zatímco intramolekulární triplex (H-DNA) je tvořen v rámci jedné molekuly DNA (Jain a kol. 2008).

Kvadruplexy

Kvadruplexy, neboli také tetraplexy či G4 DNA s přívláskem guaninové je skupina struktur tvořená čtyřmi řetězci. Základní stavební jednotkou je guaninová

tetráda, kterou označujeme též jako kvartet. Kvartet je tvořen čtyřmi guaniny, které jsou spojeny vodíkovými můstky. Volný prostor uprostřed tetrády obsazuje iont, často Na^+ nebo K^+ (Obrázek 11).



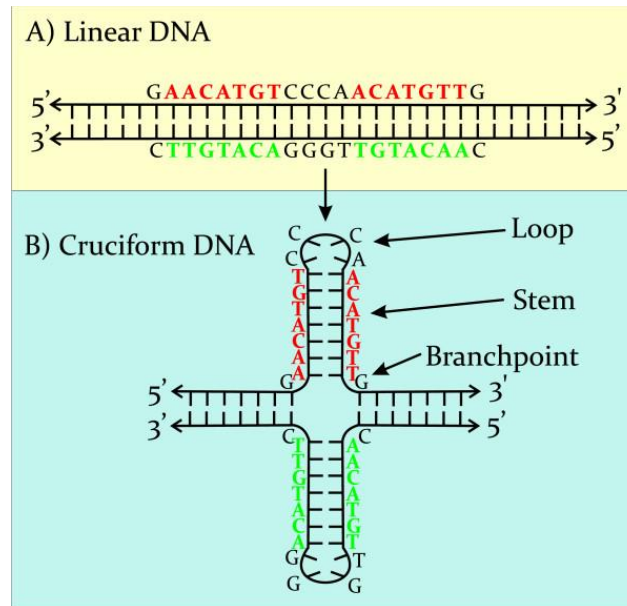
Obrázek 11 Schéma kvadruplexové tetrády. (Převzato z: Špačková 2009)

G4 DNA mají velice variabilní strukturu a existuje více kritérií, podle kterých je lze dělit. Jedním z nich je počet molekul DNA, tedy počet vláken obsažených v kvadruplexu. Unimolekulární kvadruplexy jsou tvořené jednou molekulou DNA, bimolekulární dvěma molekulami DNA a lineární obsahující čtyři nezávislá vlákna DNA. Unimolekulární a bimolekulární tetraplexy musí obsahovat „smyčky“, jejichž funkcí je zapojování další sekvence guaninů do struktury tetraplexu. Dalším kritériem pro dělení kvadruplexů je vzájemná orientace jednotlivých řetězců (paralelní nebo antiparalelní) či počtem guaninových tetrád. U známých kvadruplexů se počet tetrád pohybuje v rozmezí dvou až čtyř.

Existují také tetraplexy, které nejsou tvořeny pouze guaninovými tetrádami. Obecně jsou známy tetraplexy obsahující smíšené tetrády A.T.A.T. či G.C.G.C., nebo tetraplexy se stejnými tetrádami A.A.A.A., C.C.C.C. či T.T.T.T. Tyto neobvyklé struktury kvadruplexů mají však doposud ne příliš jasnou funkci (Špačková 2009).

Palindrom

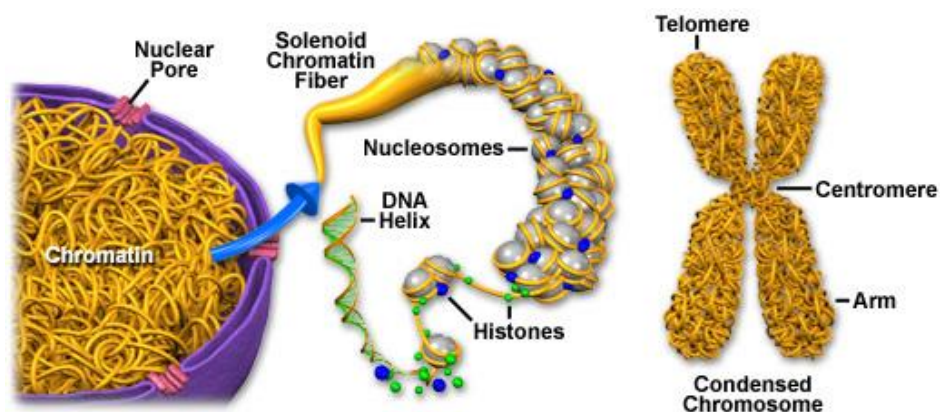
Termín palindrom v genetice označujeme jako sekvenci nukleotidů v řetězci, která obsahuje totožnou řadu dusíkatých bází bez ohledu na to, zda je vlákno analyzováno z 3' nebo 5' konce. Např. sekvence 5' GAATTC 3' a k tomu odpovídající sekvence 3' CTTAAG 5' (Obrázek 12). Mezi palindromy se někdy také řadí tzv. invertované (obrácené repetice). V těchto sekvencích se často tvoří další neobvyklé struktury, jako jsou vlásenky nebo křížové struktury.



Obrázek 12 Schéma křížové struktury, invertované repetice jsou barevně zvýrazněné. (Převzato z: Brázda a kol. 2011)

2.2.5 Terciální a kvartérní struktura DNA

Terciální struktura je dána prostorovým uspořádáním šroubovice. Dvoušroubovice DNA se navíjí na histony, což jsou bazické proteiny. DNA spolu s oktamerem histonů tvoří nukleosom, který připomíná „korálky na šňůrce DNA“. Nukleosom je základní podjednotka eukaryotického chromatinu. Vlákno s nukleosomy se dále stáčí do smyček zvaných solenoidy, které jsou přichyceny proteinovým lešením. Vytváří se záhyby, kterými je vytvořen samotný tvar chromosomu (Obrázek 13).



Obrázek 13 Struktura chromosomu. (Převzato z: [5])

2.3 Protinádorově účinná metalofarmaka

Buněčná DNA je každým dnem vystavována chemickým a fyzikálním změnám. Ve zdravé buňce jsou tyto změny opravovány specifickými proteinovými mechanismy. Jsou-li tyto opravné mechanismy poškozeny, může začít docházet k nekontrolovanému množení buněk. Tento stav nazýváme rakovina.

Jedná se nádorové onemocnění, kdy podle náležitosti buněk se nádorová onemocnění dělí na zhoubné – maligní a nezhooubné – benigní. Maligní nádor, na rozdíl od benigního, se vyznačuje invazním růstem, který ničí okolní tkáně zakládáním dceřiných ložisek – metastáz. Dochází tak k vyčerpání organismu a následné smrti.

Mezi nejčastější metody léčby patří chemoterapie, radioterapie a chirurgická léčba. Chemoterapie spočívá v podávání farmak – cytostatik (Prachařová 2013). Díky své toxicitě má chemoterapie obrovské množství vedlejších účinků – zvracení, nevolnost, vypadávání vlasů či ochlupení, anémie. Tyto účinky vyplývají z faktu, že cytostatika zastavují dělení jak nemocných buněk, tak i zdravých, tzv. antiproliferační aktivita.

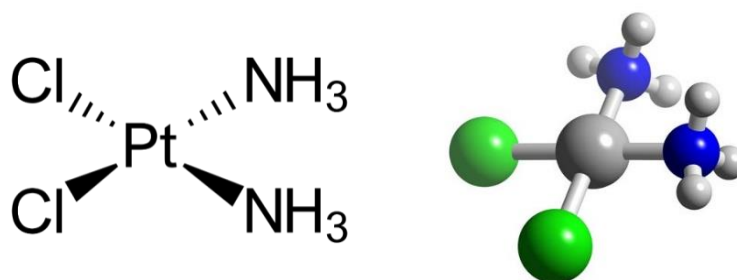
Protinádorová cytostatika momentálně zahrnují přes stovku preparátů různé chemické povahy a s různým mechanismem účinku. V praxi se často objevují metalofarmaka, což jsou látky založené na bázi komplexu přechodných kovů. V současné době se používají sloučeniny platiny, ostatní přechodné kovy např. osmium, ruthenium nebo iridium jsou ve fázi klinického a preklinického testování. Cílem léčiv je zajistit optimální farmakologický účinek při minimální toxicitě a poškodit nádorovou DNA. Mezi cytostatika řadíme antimetabolity (např. merkaptopurin, methotrexát, fluorouracil), alkylující látky (např. chlormethin, cyklofosfamid, melfalan), cytostatická antibiotika (např. mitomycin, bleomycin, daktinomycin), rostlinné alkaloidy (např. vinblastin, taxany, kolchicin) a dále i hormonální látky (např. testosteron, tamoxifen).

V současné době se v praxi nejvíce využívají platnatá cytostatika, tzv. cisplatina a druhá generace platnatých cytostatik odvozená od cisplatiny (Stavárková 2016).

2.3.1 Cisplatina

Cisplatina (cis-diamin-dichlorido-platnatý komplex, cis-[Pt(NH₃)₂Cl₂]) (Obrázek 14) je anorganická molekula složená z 11 atomů, z nichž je 6 atomů vodíku. K centrálnímu atomu platiny jsou vázány dvě NH₃ skupiny a dva atomy Cl.

Protinádorové účinky cisplatiny byly objeveny v 60. letech 20. století profesorem Barnettem Rosenbergem, který studoval vliv elektrického pole na růst bakterií *Escherichia coli*. Američtí vědci prováděli pokusy a to tak, že do nádoby s bakteriemi umístili dvě platinové elektrody, mezi které vložili elektrické napětí. Došlo tak k zastavení dělení bakteriálních buněk *E. coli*. Výsledkem bylo zjištění, že za tento jev mohou platinové elektrody, které vytvářely koordinační sloučeniny platiny (Rosenberg 1985).



Obrázek 14 Strukturální vzorec a 3D model cisplatiny. (Převzato z: [6],[7])

V současné době je cisplatina nejúspěšnější protinádorový preparát. Při užívání cisplatiny dochází k nežádoucím účinkům, a to jak k intenzivnímu ničení nádorových buněk, tak i k ničení přirozeně množících se buněk. Do přirozeně rychle množících se buněk řadíme buňky jaterní tkáně, červené a bílé krvinky, vajíčka, spermie (Folvarská 2015).

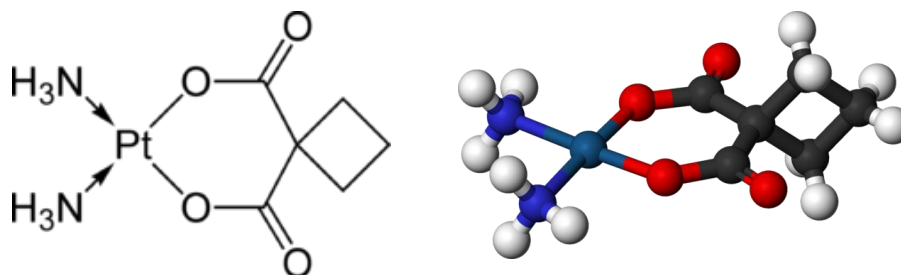
2.3.2 Druhá generace platnatých cytostatik

Důvodem tvorby platinových cytostatik nové generace byly nevýhody spojené s toxicitou, a rezistencí vůči cisplatině. Cílem je vyvíjet léčiva s menším množstvím nežádoucích účinků, s lepšími farmakologickými vlastnostmi a širším spektrem protinádorové aktivity. Nová cytostatika se vyvíjí modifikací cisplatiny tak, že se nahradí chloridový ligand jinou funkční skupinou (např. karboplatina). Případně je možné modifikovat i neodstupující amonné skupiny jinými funkčními skupinami (např. oxaliplatina) (Stavárková 2016).

Karboplatina

Karboplatina (*cis*-diamin-cyklobutan-dikarboxyl-platnatý komplex) (Obrázek 15) je biologicky aktivním derivátem cisplatiny. Byla odvozena náhradou chloridových

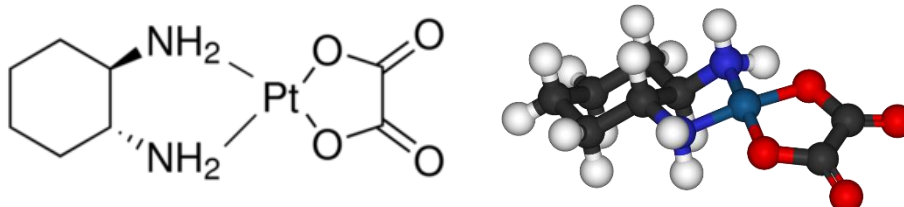
ligandů za 1,1-cyklobutan. Karboplatina má příznivější vedlejší účinky na lidský organismus než cisplatina. Avšak musí být podávána ve větších dávkách, protože má nižší účinnost na nádorové buňky (Pasetto a kol. 2006).



Obrázek 15 Strukturální vzorec a 3D model karboplatiny. (Převzato z: [8])

Oxaliplatina

Oxaliplatina ((1R,2R-diaminocyklohexan)oxalátplatnatý komplex) (Obrázek 16) je dalším derivátem cisplatiny neboli cytostatikum třetí generace (Boulikas a kol. 2007). Tento derivát se od cisplatiny liší nahrazením chloridových ligandů za molekulu oxalátu a neodstupující amonné skupiny byly nahrazeny RR-diaminocyklohexan.

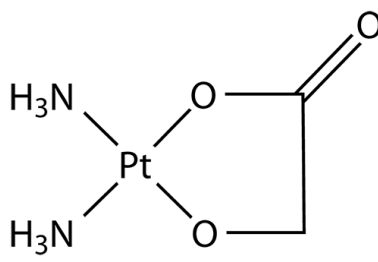


Obrázek 16 Strukturální vzorec a 3D model oxaliplatiny. (Převzato z: [9])

Nedaplatina

Nedaplatina (*cis*-diamin-glykolátplatnatý komplex) (Obrázek 17) byla vyvinuta v Japonsku. Stejně jako předchozí komplexy slouží k léčení nádorových onemocnění s podobnou účinností jako cisplatina, ale se sníženou toxicitou.

Nedaplatina má stejný centrální atom (Pt) jako cisplatina, ale má odlišnou odstupující skupinu skládající se z pětičlenného uzavřeného kruhu vázající se na platinový centrální atom (Shimada a kol. 2013).



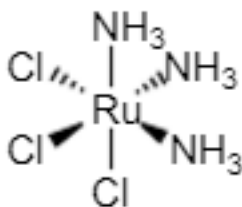
Obrázek 17 Strukturální vzorec nedaplatiny. (Převzato z: [10])

Z dalších zástupců druhé generace platnatých cytostatik lze zmínit heptaplatinu, lobapatinu, satraplatinu a další (Pizzaro a Sadler 2009).

2.3.3 Rutheniové komplexy

Prvek ruthenium se značením Ru byl poprvé objeven na Sibiři v roce 1844. Jedná se o relativně tvrdý, dobře vodivý, ale křehký kov šedivě bílé barvy, patřící do triády lehkých platinových kovů. Je to ušlechtilý kov vyznačující se odolností vůči kyselinám, tvrdostí a obtížnou tavitelností.

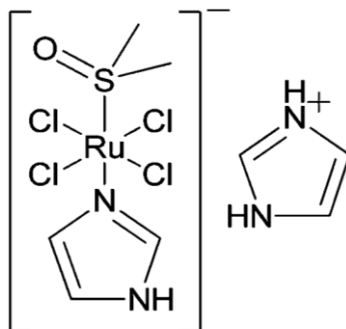
Rutheniové komplexy byly ze začátku syntetizovány s podobnou strukturou jako má cisplatina. Ale oproti cisplatině má ruthenium šest koordinačních míst (Obrázek 18 – *fac*-[Ru^{III}(NH₃)₃Cl₃] jeden z prvních studovaných komplexů ruthenia). Ruthenium je díky svým vlastnostem vhodný kov využívaný v metalurgii, ale v poslední době má své uplatnění i ve farmaceutickém průmyslu, kde se stává základem protinádorových cytostatik. Mezi zmiňované vlastnosti lze zařadit vhodnou kinetiku výměny ligandů a široký rozsah oxidačních stavů (Stavárková 2016). Ruthenium je schopno vystupovat ve všech oxidačních stavech, tzn. od 0 do VIII. Nejčastěji se však vyskytuje ve stupni Ru^{II}, Ru^{III}, Ru^{IV}.



Obrázek 18 Strukturální vzorec komplexu ruthenia. (Převzato z: Bratsos a kol. 2007)

NAMI-A – (H₂im)[trans-RuCl₄(Him)(DMSO)]; Him = imidazol

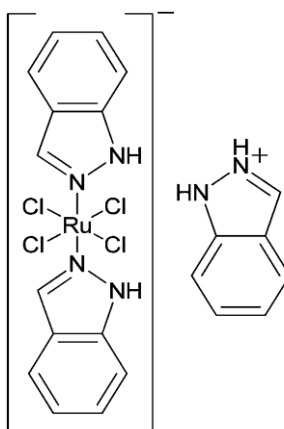
NAMI, zkratka pro Nový Atumurový Metastázový Inhibitor, kde A značí první ze série. (Obrázek 19). Studie prokázaly, že NAMI-A je jeden ze dvou ruthenioých komplexů, který dosáhl klinických studií a ukončil I. fázi studia (Bergamo a kol. 2012). Doposud bylo dokázáno, že NAMI-A interaguje s aktinovými proteiny na buněčném povrchu či s kolageny v intracelulárním matrixu. To vede ke snížení pohyblivosti a šíření rakovinných buněk (Levina a kol. 2009).



Obrázek 19 Strukturální vzorec NAMI-A. (Převzato z: Fischer a kol. 2014)

KP1019 - (H₂ind)[trans-RuCl₄(Hind)₂]; Hind = indazol

Jedná se o jednu z mnoha dalších látek, která vykazuje aktivitu proti tumorům, proti kterým je cisplatina neúspěšná. (Obrázek 20). KP1019 je druhý ze dvou ruthenioých komplexů, který prošel I. fází klinického testování (Bergamo a kol. 2012). Váže se na sérový protein transferin, který je schopen navázat dva ekvivalentní železité ionty na specifické vazebné místo a fungovat tak jako přirozený nosič (Rosenberg 1985).



Obrázek 20 Strukturální vzorec KP1019. (Převzato z: Fischer a kol. 2014)

2.4 Interakce nízkomolekulárních látek s DNA

Nízkomolekulární látky, mohou interagovat s molekulou DNA nevalebnými či kovalentními interakcemi, které často vyvolávají konformační změny v molekule DNA. Tyto interakce umožňuje jedinečná struktura deoxyribonukleové kyseliny.

2.4.1 Kovalentní interakce

Obecně k vytvoření kovalentní vazby dojde, pokud se dva subsystemy začnou překrývat. Nesmějí mít ovšem zcela zaplněný elektronový obal. Následně dojde ke zvýšení elektronové hustoty a to na či mimo spojnic atomových jader. K překryvu dojde pouze tehdy, jsou-li dva atomy od sebe vzdáleny $< 2 \text{ \AA}$ (Hobza 2008).

Příkladem kovalentní interakce je navázání alkylového radikálu na molekulu DNA. Po navázání dojde k inhibici buněčného dělení. Příkladem alkylového radikálu může být cyklofosfamid, busulfan, melfalan, apod. (Lüllmann 2009). Také celá řada protinádorově účinných komplexů kovů se váže k DNA kovalentně, a to převážně na guaninový zbytek v pozici N7. Mezi ně patří především cisplatina, a její analoga, která se již používají v klinické léčbě. Z komplexů ruthenia byla kovalentní vazba prokázána např. u polypyridylových komplexů (Nováková 1995) nebo u arenových komplexů ruthenia (Bugarcic 2008).

2.4.2 Nekovalentní interakce

Nekovalentní interakce neboli nevalebné interakce určují strukturu biomakromolekul. Na rozdíl od kovalentní interakce se nekovalentní interakce uplatňuje na mnohem větší vzdálenost $> 10 \text{ \AA}$ (Hobza 2008).

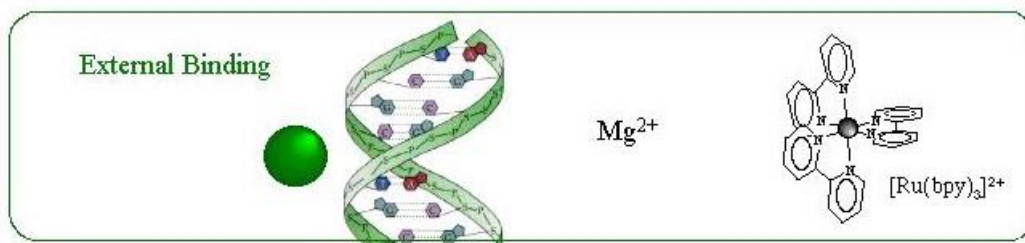
Typ nekovalentních interakcí mezi molekulami je určen vlastnostmi látek (interkalace, vazba do žlábků, elektrostatické interakce) (Obrázek 28).

Elektrostatické interakce

Elektrostatické interakce neboli přitažlivé síly, jejichž podstatou je přitahování opačně nabitých polárních molekul, tedy interakce dipól-dipól.

Příkladem elektrostatické interakce jsou vodíkové můstky. Jedná se o nejpevnější vazbu z nekovalentních interakcí. Vznik vodíkové vazby je možný pouze u molekul, kde je vodík vázán k silně elektronegativnějšímu prvku. Vodíkové vazby mají vliv na fyzikálně-chemické vlastnosti systému (teplotu, viskozitu, teplotu tání apod.)

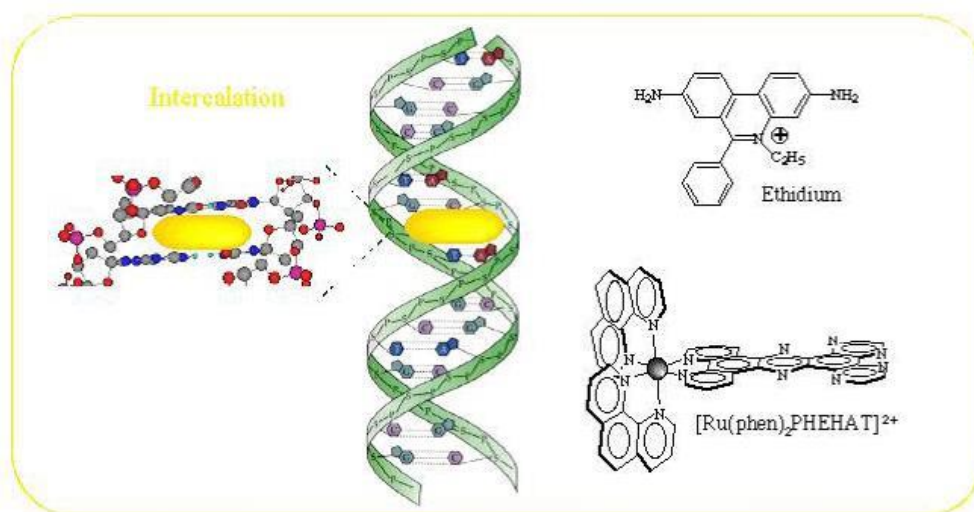
Také řada komplexů ruthenia, u nichž byla prokázána biologická aktivita včetně protinádorového působení, se váže k DNA externě a tato asociace je elektrostatické podstaty. Komplexy dvojmocného ruthenia mají pozitivní náboj $2+$ a mohou proto asociovat s negativně nabitou cukr-fosfátovou kostrou DNA. Tento způsob vazby byl prokázán pro $[\text{Ru}(\text{BPY})_3]^{2+}$ (Obrázek 21).



Obrázek 21 Schématické znázornění externí elektrostatické asociace k DNA a příklad komplexu ruthenia, pro nějž byl takový způsob vazby prokázán. (Převzato z: [11])

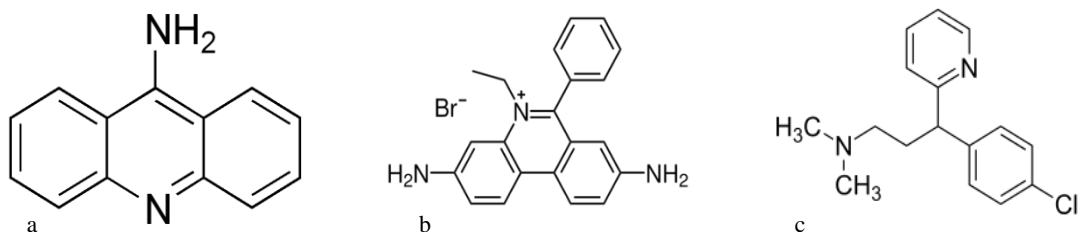
Interkalace

Jedná o vmezeření ligandu s vhodným prostorovým uspořádáním mezi páry bází molekuly DNA (Obrázek 22). Přičemž dochází k prodloužení a částečnému rozvinutí, zpevnění konformace a k stabilizaci molekuly. Interkalační mód vazby se nejčastěji vyskytuje u sloučeniny s kondenzovaným aromatickým jádrem a kladným nábojem na heterocyklickém dusíku či na postranním řetězci (Hendry a kol. 2007). Mezi faktory ovlivňující interkalaci se řadí hydrofobicita rozpouštědla, iontová síla prostředí, sekvence a flexibilita molekuly nukleové kyseliny. Interkalační reakce je obvykle za daných podmínek reverzibilní.

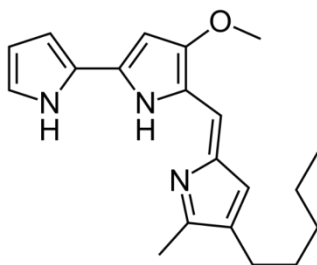


Obrázek 22 Schématické znázornění interkalace a příklady interkalátorů, včetně komplexu ruthenia, pro nějž byla interkalace prokázána. (Převzato z: [11])

V současné době rozlišujeme interkalátory na dvě skupiny: klasické a neklasické interkalátory. Klasické interkalátory obsahují 2-3 kondenzované aromatické kruhy. Zahrnují dobře prostudované sloučeniny, které mají silný sklon interkalovat do DNA, což zapříčiňuje genotoxické účinky. Mezi klasické interkalátory řadíme akridiny. Jejich navázání do dvoušroubovice obvykle způsobí rozvinutí o 17°. Zástupcem této skupiny je 9-aminoakridin (Obrázek 23a). Dalším zástupcem je ethidium bromid, polycyklická aromatická molekula. (Obrázek 23b). EtBr slouží jako barvivo, které se využívá k detekci DNA při agaróзовé elektroforéze. Molekula EtBr interkalující se do dvoušroubovice zapříčiní rozvinutí o 26° (Folvarská 2015). Do skupiny neklasických interkalátorů se řadí molekuly ne zcela rovinné a pouze částečně aromatické. Např. chlorfeniramin (Obrázek 23c), prodigiosin (Obrázek 24).



Obrázek 23 Strukturní vzorec a) 9-aminoakridinu, b) EtBr, c) chlorfeniraminu. (Převzato z: [12], [13], [14])

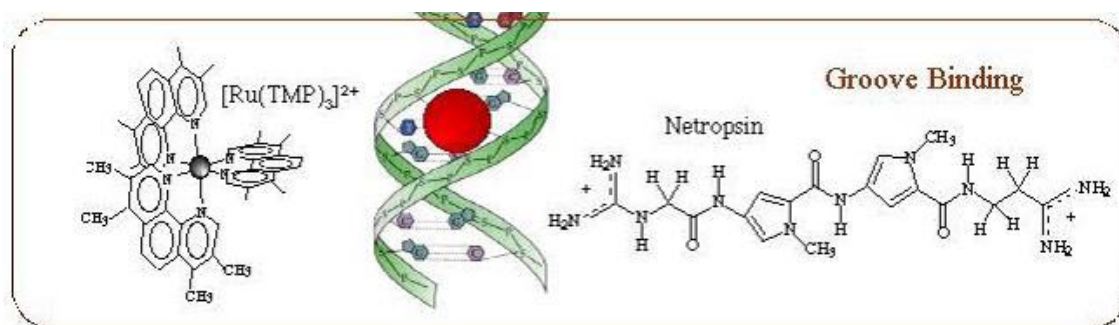


Obrázek 24 Strukturní vzorec prodigiosinu. (Převzato z: [15])

Vazba do žlábků

V molekule DNA se vyskytuje malý a velký žlábek. Dojde-li k navázání sloučeniny do velkého či malého žlábků, na rozdíl od interkalace, nezpůsobí velké konformační změny. V průběhu interkalace dochází k vmezeření látky do DNA, tedy dochází k prodloužení dvoušroubovice. Naopak při vazbě do malého/velkého žlábků

nezpůsobí interakce velké konformační změny molekuly DNA (Obrázek 25).

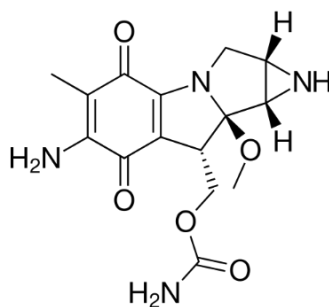


Obrázek 25 Schématické znázornění vazby do žlábků a příklady látek interagujících z malého žlábků, včetně komplexu ruthenia, pro nějž byl tento způsob vazby prokázán. (Převzato z: [11])

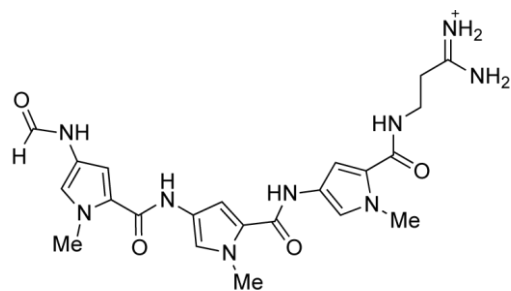
Látky, které se váží do žlábků, se vyznačují některými společnými rysy. Obvykle obsahují několik heterocyklických nebo aromatických cyklů, které jsou spojeny tak, že mohou volně rotovat. Molekuly díky tomu mohou zaujmout zahnutý tvar, který vhodně odpovídá vinutí DNA ve žlábků. Kromě toho mají tyto sloučeniny často pozitivní elektrostatický potenciál, který stabilizuje jejich interakci v elektronegativním žlábků DNA (Kim a Nordem 1993).

Nízkomolekulární látky se častěji váží do malého žlábků v DNA, který je v B-DNA užší a stericky vhodnější pro jejich vazbu. Tyto látky často vykazují preferenci pro A/T sekvenční, nicméně existují výjimky, jako např. chromomycin, který preferuje G/C páry bází (Niedle 2007). Naopak polymerní molekuly, jako jsou proteiny nebo PNA, se váží do velkého žlábků. Výjimkou je tzv. methylová zeleň, u níž byla jasně prokázána vazba do velkého žlábků v DNA (Kim a Nordem 1993).

Podobně jako interkalátory prokazují sloučeniny interagující vazbou do žlábků využití jako protinádorová činidla. Mezi sloučeniny mající schopnost vazby do žlábků řadíme např. mitomycin (Obrázek 26) a distamycin (Obrázek 27). (Folvarská 2015).



Obrázek 26 Strukturální vzorec mitomycinu. (Převzato z: [16])



Obrázek 27 Strukturální vzorec distamycinu. (Převzato z: [17])



Obrázek 28 Schématické znázornění tří hlavních typů nekovalentních interakcí komplexu ruthenia s DNA (zeleně - externí elektrostatické interakce, žlutě - interkalace, červeně - vazba do žlábků v DNA). (Převzato z: Turro a kol. 1991)

3. Cíl práce

Vzhledem k negativním vedlejším účinkům, které souvisí s chemoterapeutickou léčbou nádorových onemocnění, existuje potřeba připravovat a testovat nová, účinnější léčiva s lepšími vlastnostmi. Při navrhování nových cytostatik je značné úsilí vynakládáno také na studium komplexů přechodných kovů. Mezi těmito sloučeninami zaujímá především cisplatina a její přímá analoga přední místo mezi nejčastěji využívanými cytostatiky. V současné době se velká pozornost upírá i na jiné kovy. Především na ruthenium, jehož komplexy mohou vykazovat velmi slibné biologické vlastnosti. Některé z těchto látek byly již zařazeny do klinického testování. (Kašpárková, ústní sdělení).

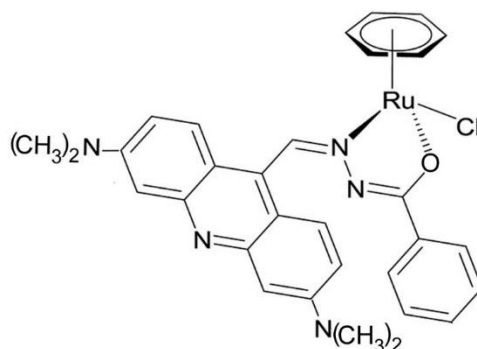
Cílem bakalářské práce je provést studii zaměřenou na porozumění molekulárnímu mechanismu účinku nového komplexu ruthenia s akridinovým ligandem, u něhož byly prokázány protinádorové účinky, které patrně souvisí s poškozením DNA. Hlavním cílem práce bude proto studovat, zda a jakým způsobem se tento komplex váže k DNA. K tomu budou využity některé vybrané biofyzikální metody. Získané výsledky pak budou diskutovány s ohledem na protinádorovou účinnost studovaného komplexu.

Jednotlivé dílčí cíle práce lze tedy shrnout takto:

- 1) Vypracovat přehled problematiky na téma struktura a vlastnosti DNA a její interakce s nízkomolekulárními látkami. Zaměřit se na dosud známé informace o interakci DNA s protinádorově účinnými komplexy těžkých kovů, především ruthenia.
- 2) Provést experimenty zaměřené na stanovení vazby a některých vazebných charakteristik nového komplexu ruthenia s akridinovým ligandem.
- 3) Diskutovat naměřené výsledky a na jejich základě odvodit, jakým mechanismem se nová sloučenina na DNA váže.

4. Materiál a metody

4.1 Použitý komplex



Obrázek 29 Strukturní vzorec komplexu ruthenia (RuI) studovaného v této práci.

Komplex RuI poskytl Dr. Peter Buglyo působící na katedře anorganické a analytické chemie Univerzity v Debrecínu, Maďarsko.

4.2 Chemikálie a biologický materiál

- DNA z telecího thymu (ttDNA obsahující 42 % GC párů a 58 % AT párů) o koncentraci $2,42 \cdot 10^{-3} \text{ l.mol}^{-1}$ (Sigma Aldrich, USA)
- Syntetické polynukleotidy poly(dG).poly(dC) (Sigma Aldrich, USA) a poly(dA).poly(dT) (P. L. Biochemical, USA)
- Plasmid pBR322 o koncentraci $3,125 \cdot 10^{-3} \text{ l.mol}^{-1}$ (New England Biolabs, USA)
- Kyselina chlorovodíková – 0,2% HCl (Sigma Aldrich, USA)
- TRIS- tris(hydroxymethyl)aminomethan (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo)
- Chloristan sodný – NaClO_4 (Sigma Aldrich, USA)
- Agaróza (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo)
- Ethidium bromid (EtBr) (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo)
- Bromfenolová modř (New England Biolabs, USA)
- Deionizovaná voda (vodivost $18,3 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$)
- EDTA- ethylendiamintetraoctová kyselina (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo)
- Kyselina octová (Sigma Aldrich, USA)

4.3 Roztoky

- TRIS – acetátový (TAE) pufr 50x
 - ⇒ 0,04 l.mol⁻¹ Tris – acetát
 - ⇒ 0,002 l.mol⁻¹ EDTA
- TRIS.Cl – o koncentraci 0,01 l.mol⁻¹ s pH 7,4

4.4 Přístroje

- The Varian AA 240Z Zeeman Atomic Absorption Spectrometer
- Beckaman DU-7400 Spectrophotometer
- Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer
- Cary 4000 UV-VIS Spectrophotometer
- AMVn Automated Micro Viscometer
- Jasco J-815 Circular Dichroism Spectropolarimeter
- Běžné laboratorní přístroje (váhy, vortex, apod.)

4.5 Metody

4.5.1 Modifikace DNA

Pro většinu použitých metod byla použita ttDNA (telecí thymová, pro jednotlivé experimenty je koncentrace ttDNA uvedena níže). Pro elektroforetické experimenty byla využita plasmidová DNA (pBR322, New England Biolabs).

DNA byla smíchána se zkoumaným komplexem Ru1 o různé koncentraci a ponechána při pokojové teplotě po dobu uvedenou níže u popisu jednotlivých experimentů. Poměr koncentrací DNA ku koncentraci komplexu Ru1 se označuje r_i :

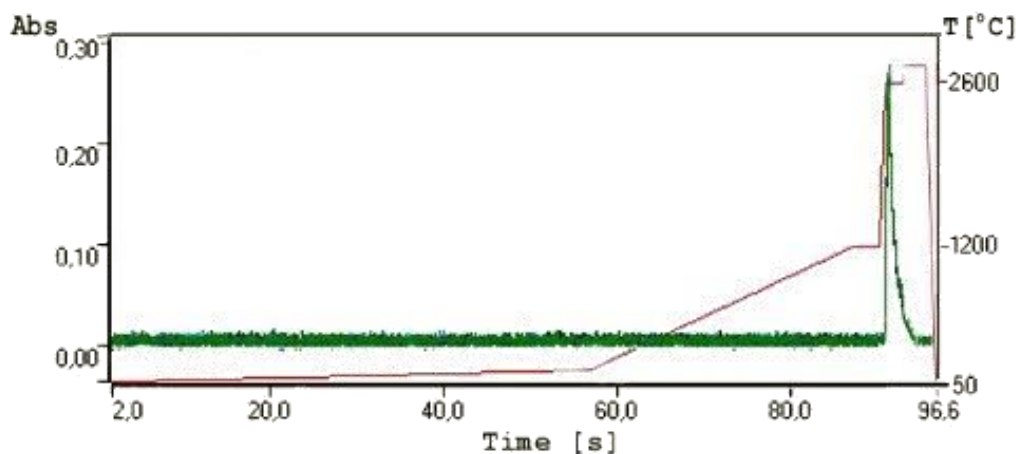
$$r_i = \frac{c_{Ru}}{c_{DNA}} = \frac{c_{Ru,zás} \cdot V_{Ru,zás}}{c_{DNA,zás} \cdot V_{DNA,zás}},$$

kde c_{Ru} představuje koncentraci rutheniového komplexu v daném vzorku, c_{DNA} je koncentrace DNA, $c_{Ru,zás}$ je koncentrace zásobního roztoku komplexu Ru1, $c_{DNA,zás}$ je koncentrace DNA použitá do reakce. $V_{Ru,zás}$ představuje objem roztoku komplexu Ru1 a $V_{DNA,zás}$ je objem DNA.

Veškerá modifikace DNA probíhala v prostředí o koncentraci 0,01 l.mol⁻¹ Tris.Cl, pH 7,4, pokud není v práci uvedeno jinak.

4.5.2 Atomová absorpční spektrometrie

Atomová absorpční spektrometrie byla využita pro stanovení koncentrace komplexu RuI. Pro stanovení byl použit přístroj The Varian AA 240Z Zeeman Atomic Absorption Spectrometer Zeeman vybavený grafitovým elektrotermickým atomizérem GTA 120. Vlnová délka použitého záření byla 349,9 nm, šterbina 0,2 nm. Tři měření v duplikátu probíhala bez přístupu vzduchu v prostředí argonu. Objem měřeného vzorku byl 20 μl . Vzorek byl dávkován pomocí automatického dávkovače. Atomizační teplota byla 2700°C. Změny teploty v atomizátoru v průběhu měření (teplotní gradient) použité pro experimenty popsané v této bakalářské práci byly již dříve optimalizovány pro nejúčinnější odpaření a atomizaci vzorku a jsou znázorněny na obrázku 30.



Obrázek 30 Průběh signálu v elektrotermickém atomizéru.

Na obrázku 30 je červeně vyznačena změna teploty a zelená barva značí průběh signálu snímaného detektorem.

Nejprve byla změřena koncentrace blanku - 0,2% HCl a standardu – roztok RuCl_3 v 5% HCl (1.000 g/l Ru) (Fischer Scientific, USA).

4.5.3 Elektronová absorpční spektroskopie

Pro stanovení molárního absorpčního koeficientu rutheniového komplexu byl využit přístroj Beckman DU-7400 Spectrophotometer. Vzorek byl umístěn do křemenné kyvety o optické dráze 1 cm a měřená absorbance vzorků byla v rozmezí od 200 do 800 nm.

Před začátkem každého měření byl nejprve změřen samostatný blank – 0,01 $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}$ Tris.Cl, pH 7,4. Následně byla změřena pětice přichystaných vzorků komplexu RuI o koncentracích $5,55\cdot 10^{-7}$ – $2,22\cdot 10^{-6}$ $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Metodou absorpční spektroskopie byla dále stanovena afinita vazby studovaného rutheniového komplexu k DNA měřeními elektronových absorpčních spekter. Roztok komplexu ruthenia v $0,01 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}$ Tris.Cl, pH 7,4 o koncentraci $2,22\cdot 10^{-6} \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}$ a objemu $90 \mu\text{l}$ byl s odstupem času postupně titrován $1 \mu\text{l}$ přídatku DNA o koncentraci $1,21\cdot 10^{-6} \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Hodnoty vazebných konstant byly určeny na základě naměřených hodnot absorbance při 491 nm pomocí metody publikované dříve (Kanakakis a kol. 2009) dle rovnice:

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

kde A je naměřená absorbance pro různé koncentrace přidané DNA, A_0 je absorbance samotného rutheniového komplexu, A_∞ představuje výslednou koncentraci komplexu Ru.DNA. Závislost $\frac{1}{A-A_0}$ a $\frac{1}{c_{\text{ligand}}}$ je lineární. Z toho vyplývá, že vazebná konstanta K je stanovena z přímky jako poměr úseku ku směrnici.

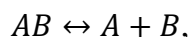
4.5.4 Fluorescenční spektroskopie

Fluorescence komplexu ruthenia po navázání k DNA byla stanovena měřeními fluorescenčních spekter. Spektra komplexu Ru1 byla měřena na přístroji Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer v kyvetě s délkou optické dráhy $0,5 \text{ cm}$. Roztok komplexu ruthenia o koncentraci $2,22\cdot 10^{-7} \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}$ v $0,01 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}$ Tris.Cl, pH 7,4 a objemu $600 \mu\text{l}$ byl s odstupem času postupně titrován s přídatky DNA o koncentraci $2,4\cdot 10^{-3} \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}$.

4.5.5 Měření teploty tání (T_m)

Při teplotě tání dvoušroubovice dochází k zániku vodíkových vazeb spojující dusíkaté báze a hydratačního obalu v důsledku tepelného pohybu molekul. Teplota tání T_m udává hodnotu, při které je rozpojena právě jedna polovina komplementárních bází. K tání (denaturaci DNA) dochází pouze tehdy, je-li do soustavy dodáno teplo. Jedná se tedy o děj endotermický. Teplota tání je ovlivněna délkou molekuly (počtem bází), složením sekvence (zastoupením GC a AT párů) nebo také koncentrací DNA v roztoku.

Jedná-li se o krátké fragmenty DNA, lze teplotu tání dopočítat z termodynamických veličin za předpokladu, že se jedná o dvoufázový přechod. Při tání zanikají vodíkové můstky spojující polynukleotidové řetězce dvoušroubovice (AB)



rovnici charakterizuje rovnovážná konstanta K , která je vyjádřena vztahem

$$K = \frac{[A][B]}{[AB]}.$$

Pomocí Gibbsovy volné energie ΔG , lze dopočítat teplotu tání T_m

$$\Delta G = -RT \ln \frac{[A][B]}{[AB]},$$

kde R je molární plynová konstanta $8,3144598 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$, T je teplota. Po úpravě vzorce a znalosti původní koncentrace DNA získáme teplotu tání T_m

$$T_m = - \frac{\Delta G}{R \ln \frac{[AB]_{\text{původní}}}{2}}.$$

Denaturační křivky modifikované DNA o koncentraci $4,5 \cdot 10^{-5} \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}$ o příslušném $r_i = 0,01$ a $0,03$ byly naměřeny na přístroji Cary 4000 UV-VIS Spectrophotometer při postupném ohřevu vzorků o $0,4 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ v kyvetách o optické dráze 1 cm . Měření teploty tání probíhalo v prostředí $0,01 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}$ Tris.Cl, pH 7,4 od $25 \text{ }^\circ\text{C}$ po $95 \text{ }^\circ\text{C}$. Teplota tání T_m byla určena za pomoci programu GraphPad Prism 4 jako hodnota odpovídající inflexnímu bodu denaturační křivky. Tzn., že se jedná o teplotu, ve které nabývá první derivace absorbance podle teploty maximální hodnoty.

4.5.6 Cirkulární dichroismus

Cirkulární dichroismus (CD, kruhová dvojbarevnost) označujeme metodu, založenou na rozdílu absorbancí levo a pravotočivě kruhově polarizovaného světla po průchodu vzorkem obsahující chirální molekuly. Sloučeniny obsahující chirální molekuly jsou opticky aktivní, tzn., že stáčí rovinu polarizovaného světla. Za chirální atom se nejčastěji označuje uhlík, který má na sebe navázány čtyři různé substituenty.

CD spektropolarimetr zaznamenává obě složky polarizovaného světla odděleně. Dichrograf zobrazuje dichroismus při dané vlnové délce záření jako rozdíl absorbance levo a pravotočivě polarizovaného světla.

$$\Delta A = A_L - A_P$$

Molární CD

Molární cirkulární dichroismus může být vyjádřen užitím Lambert-Beerova zákona.

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

kde ε_L představuje molární extinkční koeficient pro světlo LCP, ε_P je molární extinkční koeficient pro světlo RCP, c je molární koncentrace a l je délka optické dráhy vzorku, kterým světlo prochází. Z toho plyne výpočet pro molární CD

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

Veličina $\Delta \varepsilon$ je funkcí vlnové délky, tzn., že hodnota molárního cirkulárního dichroismu $\Delta \varepsilon$ specifikuje vlnovou délku, na které je platná.

DNA se taktéž řadí mezi chirální molekuly. K výzkumu DNA se nejvíce využívá ultrafialové světlo v rozmezí 180 – 300 nm, kde báze DNA silně absorbují. CD spektroskopie se také využívá ke studiu interakce DNA s ligandy, které jsou sami o sobě achirální. Dochází tak k tzv. indukovanému CD, který se využívá při detekci interakce s DNA.

V této práci jsme zkoumali interakci komplexu Ru1 s ttDNA na základě měření spekter CD. Při měření byla použita nemodifikovaná a modifikovaná DNA s komplexem Ru1 o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$. Stupeň modifikace odpovídal hodnotám $r_i = 0,005 - 0,02$. CD spektra byla naměřena při vlnové délce v rozmezí 210 – 650 nm a při teplotě 23 °C pomocí přístroje Jasco J-815 Circular Dichroism Spectropolarimeter v křemenné kyvetě o optické dráze 1 cm. Pro kontrolu byla také naměřena spektra CD vzorků obsahující pouze nemodifikovanou DNA, nebo volný komplex Ru1 (bez DNA, pouze v prostředí 0,01 $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1}$ Tris.Cl, pH 7,4). Vzorky byly měřeny s odstupem času po modifikaci DNA rutheniovým komplexem.

4.5.7 Viskozimetrie

Viskozimetrie se řadí k metodám určující, zda daný komplex je interkalátor či ne. Prodlouží-li se perzistentní délka DNA, je možné komplex považovat za interkalátor, který se vmezeří mezi páry bází ve dvoušroubovici DNA. Protože viskozita DNA je přímo úměrná třetí mocnině perzistentní délky (Palchaudhuri a Hergenrother 2007), umožňuje měření viskozity citlivě detekovat změny v perzistentní délce DNA. Měření doby pádu kuličky ve skleněné kapiláře probíhalo na přístroji AMVn Automated Micro Viscometer. Parametry kuličky a skleněné kapiláry jsou uvedeny od výrobce.

Při měření byla použita kapilára o průměru 1,6 mm o délce 1500 mm. Měření probíhalo při konstantní teplotě 37 °C pod úhlem 50° v prostředí 0,01 l.mol⁻¹ Tris.Cl, pH 7,4. Viskozita ttDNA o koncentraci 4,68·10⁻⁴ l.mol⁻¹ byla naměřena v přítomnosti komplexu Ru1 s různými s modifikačními stupni $r_i = 0,007 - 0,015$.

Měření bylo vždy šestkrát opakováno a výsledné hodnoty byly zprůměrovány. Data byla následně použita pro výpočet relativní specifické viskozity nemodifikované DNA s využitím doby pádu kuličky v pufru dle vztahu

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

kde η_0 je viskozita nemodifikované DNA, t je doba pádu kuličky v roztoku DNA modifikovaném komplexem Ru1, t_B je doba pádu kuličky v pufru bez DNA a t_0 je doba pádu kuličky v nemodifikované DNA.

4.5.8 Elektroforéza v nativním agarózovém gelu

Elektromigrační separační metody se využívají k separaci makromolekul na základě náboje, konformace nebo velikosti. Migrace nabitě částice v elektrickém poli je ovlivňována interakcí mezi ionty a závisí především na celkovém náboji, velikosti a tvaru částice a na viskozitě prostředí.

Elektroforéza spočívá v migraci elektricky nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Toto pole se vytváří vložením konstantního stejnosměrného napětí mezi elektrody. V zónové elektroforéze je prostředí mezi elektrodami tvořeno základním elektrolytem, který zajišťuje dostatečnou elektrickou vodivost v celém systému. Vzorek se dávkuje do určitého místa tohoto systému. Kationty migrují k zápornému pólu, anionty ke kladnému pólu. Neutrální částic se nepohybují. Na nabitou částici v elektrickém poli o intenzitě E působí síla elektrická, která uvádí částici do pohybu, a odpor viskózního prostředí, který ji brzdí.

V praxi se nejčastěji používá elektroforéza gelová k izolaci a analýze nukleových kyselin (NK) či proteinů. Pro analýzu se používají agarosové (k separaci NK) nebo polyakrylamidové gely (k separaci proteinů).

Navážené příslušné množství agarózy se rozvařilo v pufru TAE 1x, výsledkem byl 1% agarózový gel. Doba varu v Erlenmeyerově baňce trvala po dobu, než se agaróza úplně rozpustila v pufru. Po zchlazení gelu byl gel nalit do vaničky s hřebínkem, který

vytvořil jamky k nanesení vzorků. Před nanášením vzorků do jamek byl do zbytku vaničky nalit elektrolyt TAE 1x.

Ke vzorkům o celkovém objemu 10 μl obsahujícím 0,5 μg DNA (pBR322) a modifikovaným komplexem Ru1 na $r_i = 0,001 - 0,1$ byl přidán roztok bromfenolové modři ve 40% sacharose (BFM) o objemu 2 μl . Elektroforéza probíhala za pokojové teploty při napětí 30 V. Vizualizace fragmentů byla provedena obarvením gelu pomocí EtBr. Po obarvení byl výsledek elektroforézy vizualizován na UV transluminátoru a vyfotografován.

Intenzita proužků byla vyhodnocena pomocí programu AIDA Image Analyzer (Raytest, Německo).

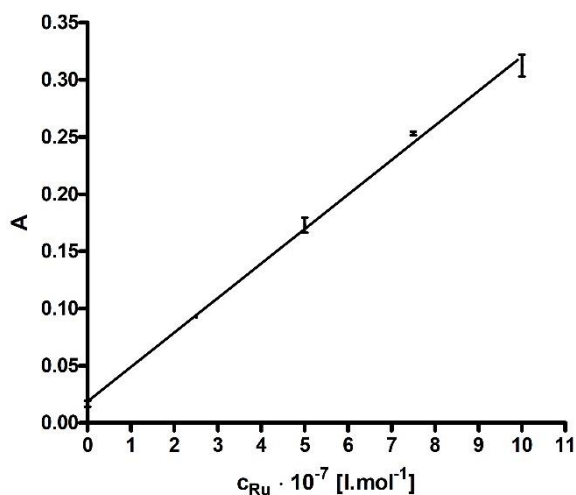
5. Výsledky a diskuse

V předložené bakalářské práci byl studován potenciálně protinádorový komplex ruthenia s akridinovým ligandem, označovaný jako Ru1 (Obrázek 29 v kapitole Materiál a metody). Komplex Ru1 byl rozpuštěn v deionizované vodě. Po rozpuštění vznikl čirý roztok sytě oranžové barvy.

5.1 Příprava a charakterizace zásobního roztoku

5.1.1 Atomová absorpční spektrometrie

Atomová absorpční spektrometrie se využívá ke stanovení koncentrace kovů v roztocích a biologických vzorcích a byla využita i v této práci ke stanovení koncentrace zásobního roztoku komplexu Ru1. Absorpční maximum bylo naměřeno při vlnové délce 349,9 nm (viz kapitola 4.5.2, Obrázek 30). Vyhodnocení výsledků bylo provedeno metodou kalibrační křivky sestavené z naměřených absorbancí kalibračních roztoků. Z obrázku 31 lze vyčíst, že při zvyšující se koncentraci roztoku vzrůstá absorbance. Naměřené hodnoty byly proloženy křivkou, která je lineární a její rovnice je $Abs = 0,30090xC + 0,01908$.



Obrázek 31 Závislost absorpance kalibračních roztoků na jejich koncentraci při $\lambda = 349,9$ nm. Naměřené hodnoty jsou průměrem tří měření v duplikátu se SD.

Zásobní roztok byl, vzhledem k rozsahu citlivosti přístroje, před počátkem měření 400x zředěn v 0,2% HCl. Byly připraveny tři nezávislé vzorky, které byly následně proměřeny v duplikátu. Koncentrace ruthenia byla dopočítána z rovnice kalibrační přímky pomocí naměřené absorpance. Hodnoty pro naměřené absorpance

a dopočítané koncentrace jsou uvedeny v tabulce 2. Znalost koncentrace ruthenia v zásobním roztoku byla využita při dalších experimentech.

Tabulka 2 Naměřené absorbance a dopočítané koncentrace ruthenia ve vzorcích připravených 400x zředěním zásobního roztoku komplexu RuI.

n	A ₁	A ₂	\bar{A}	$c \cdot 10^{-7}$ [l.mol ⁻¹]	RSD [%]
1	0,1859	0,1962	0,191	5,715	5,3
2	0,1771	0,177	0,1771	5,25	0,1
3	0,185	0,1952	0,1901	5,684	5,2
				$\bar{c} = 5,55 \cdot 10^{-7}$ [M]	

A₁, A₂ – hodnoty absorbancí ze dvou opakovaných měření téhož vzorku

\bar{A} – průměrná hodnota absorbance

c – koncentrace roztoku vypočítaná z kalibrační přímky

RSD – relativní směrodatná odchylka

Z naměřených hodnot vyplývá, že koncentrace měřeného roztoku byla $5,55 \cdot 10^{-7}$ l.mol⁻¹. Protože zásobní roztok RuI byl pro měření 400x zředěn, koncentrace zásobního roztoku byla 400x vyšší, tzn. $2,22 \cdot 10^{-4}$ l.mol⁻¹. Znalost koncentrace zásobního roztoku byla využita při přípravě vzorků pro další měření.

5.1.2 Elektronová abs. spektroskopie – stanovení absorpčního koeficientu

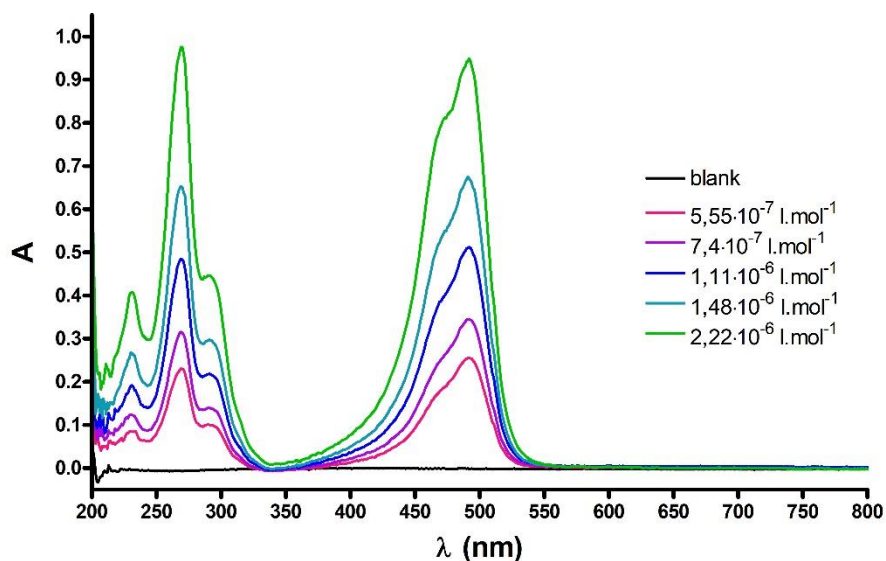
Protože měření metodou AAS, jak bylo popsáno výše, je instrumentálně i finančně náročné, využili jsme skutečnosti, že roztok komplexu RuI vykazuje absorpci záření při vlnové délce od 220 – 550 nm. Pro stanovení koncentrace zásobního roztoku je tedy možné využít také měření pomocí elektronové absorpční spektroskopie, která je dostupnější a levnější než výše uvedená metoda AAS.

Pomocí elektronové absorpční spektroskopie byl stanoven absorpční koeficient, což umožní využít tuto metodu ke stanovení koncentrace komplexu RuI v dalších experimentech.

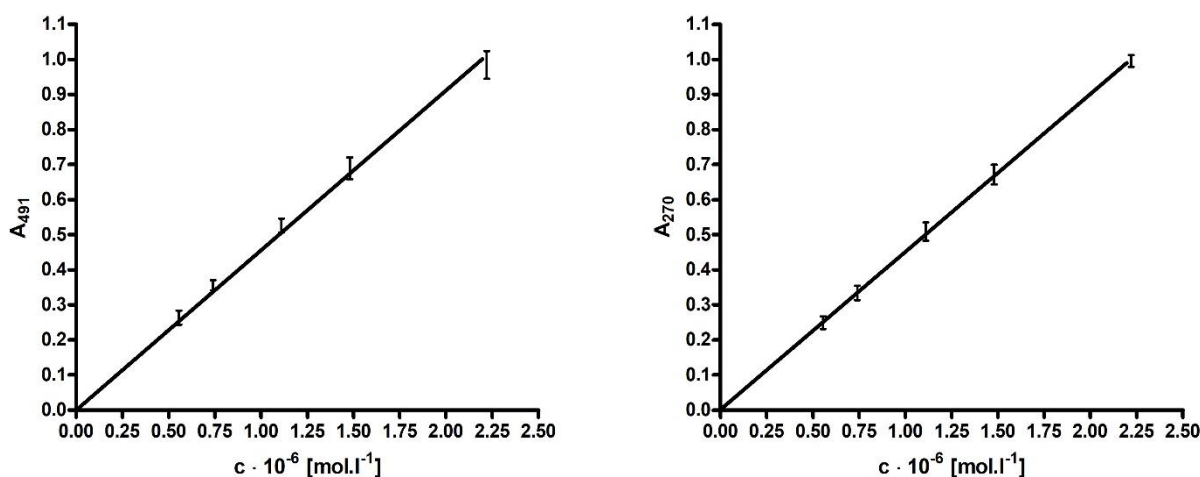
Postupným ředěním bylo připraveno šest vzorků o koncentraci 0 – $2,22 \cdot 10^{-6}$ l.mol⁻¹. Naměřená spektra jsou na obrázku 32. Ze spekter je zřejmé, že komplex vykazuje dvě absorpční maxima, a to při hodnotě $\lambda = 270$ nm a $\lambda = 491$ nm.

Naměřené hodnoty absorbancí byly vyneseny do grafu v závislosti na koncentraci měřeného vzorku a byly proloženy přímkou, jak je vidět na obrázku 33. Směrnice této

přímky určuje absorpční koeficient, jak vyplývá z Lambert-Beerova zákona. Stanovené absorpční koeficienty jsou $\varepsilon_{270} = (0,449 \pm 0,006)$, $\varepsilon_{491} = (0,456 \pm 0,005)$.



Obrázek 32 Elektronová absorpční spektra roztoků komplexu RuI o různých koncentracích.



Obrázek 33 Závislost absorpance na koncentraci při dané vlnové délce. Úsečky představují SD ze tří měření.

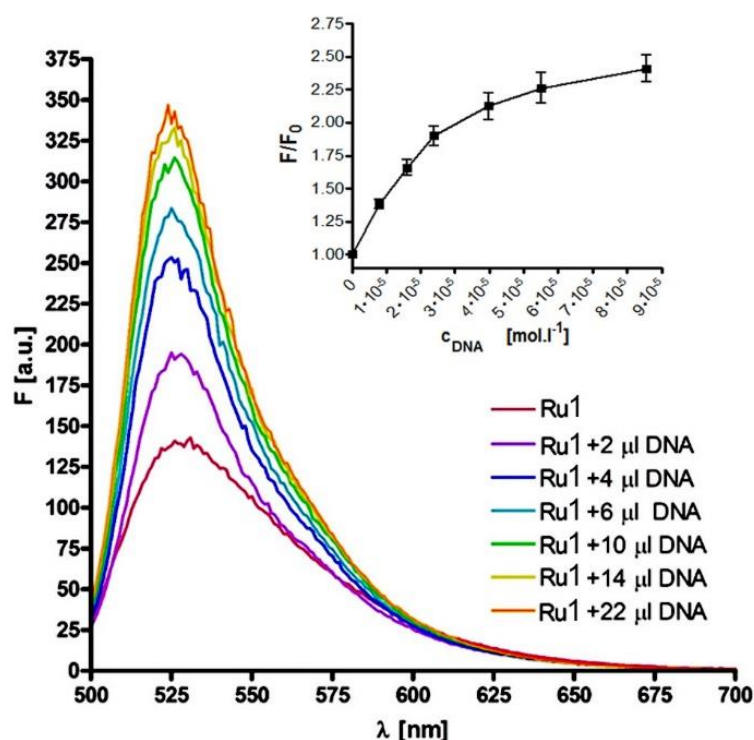
5.2 Fluorescenční spektroskopie

Fluorescenční spektroskopie je metoda, která se velmi často využívá ke studiu vazby nízkomolekulárních látek na nukleové kyseliny. Jedním z důvodů tohoto využití fluorescenční spektroskopie je její vysoká citlivost a selektivita.

5.2.1 Stanovení vazby

Před počátkem měření byl zásobní roztok komplexu ruthenia zředěn pomocí $0,01 \text{ l.mol}^{-1}$ Tris.Cl, pH 7,4 na výslednou koncentraci $2,22 \cdot 10^{-7} \text{ l.mol}^{-1}$. 600 μl tohoto roztoku bylo

umístěno do křemenné kyvety 5x5 mm. V průběhu experimentu byla k tomuto roztoku komplexu Ru1 přidávána ttDNA o koncentraci $2,4 \cdot 10^{-3} \text{ l.mol}^{-1}$ vždy po 1 μl . Prodleva mezi přídávky ttDNA byla přibližně 5 minut, kdy byl vzorek ponechán ve tmě, aby se v reakční směsi ustavila rovnováha. Vlnová délka excitačního záření byla nastavena na 490 nm, emise byla zaznamenávána v rozsahu 500 - 800 nm. Zaznamenaná emisní spektra jsou na obrázku 34.



Obrázek 34 Fluorescenční spektra roztoku komplexu Ru1 v $0,01 \text{ l.mol}^{-1}$ Tris.Cl, pH 7,4 s postupným přidávkem ttDNA o různých koncentracích. Body ve vloženém grafu závislosti F/F_0 na koncentraci DNA představují průměr ze čtyř nezávislých měření, úsečka představuje směrodatnou odchylku. F je intenzita fluorescenční emise v průběhu experimentu, F_0 je fluorescence na začátku experimentu (pro $c_{\text{DNA}} = 0$)

Naměřené hodnoty relativní fluorescence F/F_0 (F = maximální fluorescence vzorku při dané koncentraci DNA a F_0 = maximální fluorescence roztoku bez přítomnosti DNA) byly vyneseny do grafu v závislosti na koncentraci DNA, jak je patrné na obrázku 34. Z grafu je zřejmé, že fluorescence komplexu Ru1 roste při zvyšování koncentrace ttDNA.

Podobné chování, tj. nárůst intenzity fluorescence po přidání DNA ve vodném prostředí, bylo zaznamenáno i pro jiné látky vážící se k DNA, jako je ethidium bromid (Suh a Chaires 1995), Hoechst 33258 (Suh a Chaires 1995) nebo některé jiné komplexy ruthenia nebo iridia (Prachařová a kol. 2018). Příčinou nárůstu fluorescence po přidání DNA je skutečnost, že interakce dané sloučeniny s DNA chrání chromofor před

zhášením molekulami okolního prostředí, především vody. Samotný rutheniový komplex ve vodném roztoku by sám o sobě fluoreskoval, ale dochází ke zhášení molekulami vody, proto je fluorescence relativně nízká. Po přidání ttDNA dochází k navázání komplexu Ru1 do ttDNA. Takto navázaný komplex Ru1 do ttDNA je chráněn před kontaktem s molekulami zhášedla např. díky tomu, že vazba na DNA omezuje deaktivující kolize s molekulami roztoku a fluorescence je proto vyšší. Pozorovaný nárůst fluorescence komplexu Ru1 lze tedy interpretovat tak, že komplex interaguje s DNA.

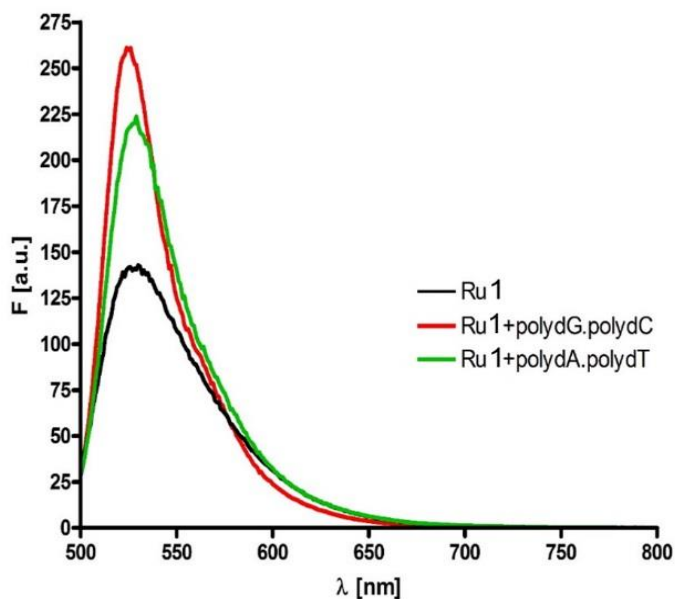
Nárůst intenzity fluorescence se běžně používá k monitorování vazby dané látky na DNA. Nicméně tento experiment není možné využít z rozlišení typu vazby na DNA, protože nárůst fluorescence byl prokázán jak pro interkalátory, tak i látky vážící se do žlábků v DNA. Proto pro určení typu interakce komplexu Ru1 s DNA bylo nutno využít další experimenty.

5.2.2 Stanovení sekvenční specifity

Metoda fluorescenční spektroskopie byla využita i k určení toho, zda se komplex Ru1 váže preferenčně k A:T nebo G:C pářům v DNA. K experimentu byl použit roztok komplexu Ru1 o koncentraci $2,22 \cdot 10^{-5} \text{ l.mol}^{-1}$ v $0,01 \text{ l.mol}^{-1}$ Tris.Cl, pH 7,4. Dále byly použity syntetické homopolynukleotidy polydA.polydT a polydG.polydC o koncentracích zásobních roztoků $c_{dA/dT} = 4,7 \cdot 10^{-3} \text{ l.mol}^{-1}$ a $c_{dG/dC} = 4,5 \cdot 10^{-3} \text{ l.mol}^{-1}$. K roztoku komplexu Ru1 byl přidán vždy jeden z těchto polynukleotidů tak, že výsledná koncentrace ve vzorku byla $3,8 \cdot 10^{-5} \text{ l.mol}^{-1}$. Poté byla změřena fluorescenční spektra těchto vzorků a srovnána s fluorescenčním spektrem samotného komplexu Ru1 o stejné koncentraci.

Na obrázku 35 jsou znázorněna fluorescenční spektra komplexu Ru1 v nepřítomnosti (černá křivka) a v přítomnosti polydA.polydT (zelená křivka) nebo polydG.polydC (červená křivka). Fluorescence vzrostla v obou případech. To ukazuje, že komplex Ru1 se váže k oběma polynukleotidům, a je tedy schopen interagovat jak s G:C, tak i s A:T páry v DNA.

Z obrázku je ale patrné, že v případě navázání rutheniového komplexu ke G:C pářům bází vzrostla fluorescence více. To lze interpretovat tak, že komplex Ru1 má větší afinitu k polydG.polydC než k polydA.polydT.



Obrázek 35 Fluorescenční spektra roztoku komplexu Ru1 v 0,01 l.mol⁻¹ Tris.Cl, pH 7,4 s přidavkem polydG.polydC nebo polydA.polydT. Experiment byl nezávisle zopakován dvakrát, vždy se stejným výsledkem.

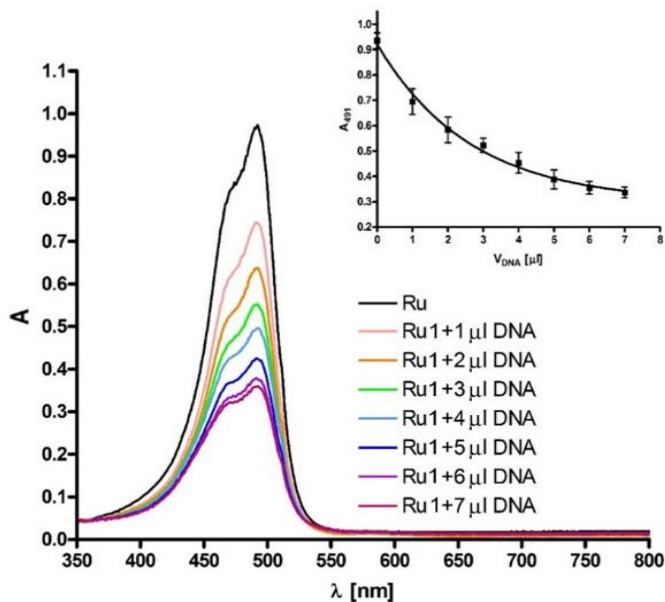
V literatuře existuje celá řada studií, zabývajících se vztahem mezi preferencí vazby k určitým bázím (sekvenci) a typem této vazby. Např. v práci (Ren a Chaires 1999) provedli autoři srovnávací studii s celou řadou sloučenin, jejichž DNA vazebný mód byl již dříve dobře charakterizován. Bylo zjištěno, že zatímco látky vázající se do žlábků vykazovaly vazebnou preferenci k A:T párům (výrazně preferovaly poly(dA.dT) a polydA.polydT před poly(dG.dC) a polydG.polydC, u interkalátorů tomu tak většinou nebylo. Interkalátory vykazovaly mírnou preferenci pro G:C páry nebo nevykazovaly výraznou preferenci pro žádný z těchto polynukleotidů. Příčinou těchto rozdílů je skutečnost, že látky vázající se do žlábků DNA mohou být ovlivněny geometrií žlábků, protože v oblastech DNA bohatých na A:T je malý žlábek užší a stericky vhodnější, což usnadňuje vazbu řady nízkomolekulárních látek do tohoto žlábků. Naproti tomu u interkalátorů hraje podstatnou roli energie patrových („stacking“) interakcí bází, mezi které se daná látka vmezeňuje. Obě tyto charakteristiky závisí na složení a sekvenci DNA (Ren a Chaires 1999, Biver a kol. 2005). Naše výsledky ukazují, že komplex Ru1 vykazuje mírnou preferenci pro G:C páry, což by mohlo nasvědčovat interkalaci. Z tohoto experimentu ale není možné typ vazby určit s jistotou, proto byly provedeny další experimenty.

5.3 Absorpční titrace

Předchozí experiment založený na měření změn fluorescence (kapitola 5.2.1) potvrdil, že komplex Ru1 se na DNA váže. Pro kvantitativní vyhodnocení vazby komplexu Ru1 k DNA je třeba stanovit rovnovážnou vazebnou konstantu. Vazebná konstanta (K_b) je parametr charakterizující sílu interakce mezi Ru1 a DNA, resp. kvantitativně popisuje stabilitu vzniklého komplexu Ru1.DNA.

Pro stanovení K_b byla využita metoda založená na elektronové absorpční spektroskopii, nazývaná absorpční titrace. Metoda je založena na přidávání konstantního objemu roztoku DNA k roztoku komplexu Ru1 tak, aby koncentrace roztoku Ru1 zůstávala téměř konstantní. Jak bylo ukázáno v kapitole 5.2.1., komplex Ru1 vykazuje dvě absorpční maxima při 270 nm a 491 nm. V tomto experimentu jsme sledovali změnu absorpce komplexu Ru1 při 491nm, protože při této vlnové délce neinterferuje přidávaná DNA (při 491 nm nevykazuje DNA téměř žádnou absorbanci). Získaná absorpční spektra jsou znázorněna na obrázku 36.

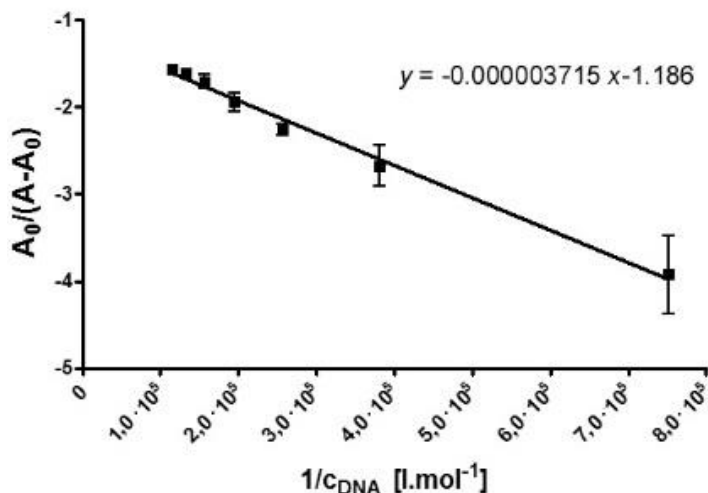
Z obrázku je patrné, že při zvyšování objemu přidané DNA se absorbance vzorku snižuje.



Obrázek 36 Absorpční spektra komplexu Ru1 v 0,01 l.mol⁻¹ TRIS, pH 7,4 s postupným přidáváním ttDNA. Černá křivka odpovídá spektru samotného komplexu bez přidavku ttDNA. Vložený obrázek: graf ilustrující změnu absorbance při 491 nm (λ_{max}) na množství přidané DNA. Body a úsečky představují průměr a SD ze dvou nezávislých měření.

Vynesím dat získaných při titračním experimentu podle rovnice z kapitoly 4.5.3 byla získána lineární křivka (Obrázek 37), ze které byla určena hodnota vazebné

konstanty K_b jako poměr úseku a směrnice výsledné lineární závislosti (Altaf a kol. 2016). Tímto způsobem byla stanovena hodnota $K_b = 3,2 \cdot 10^5 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}$.



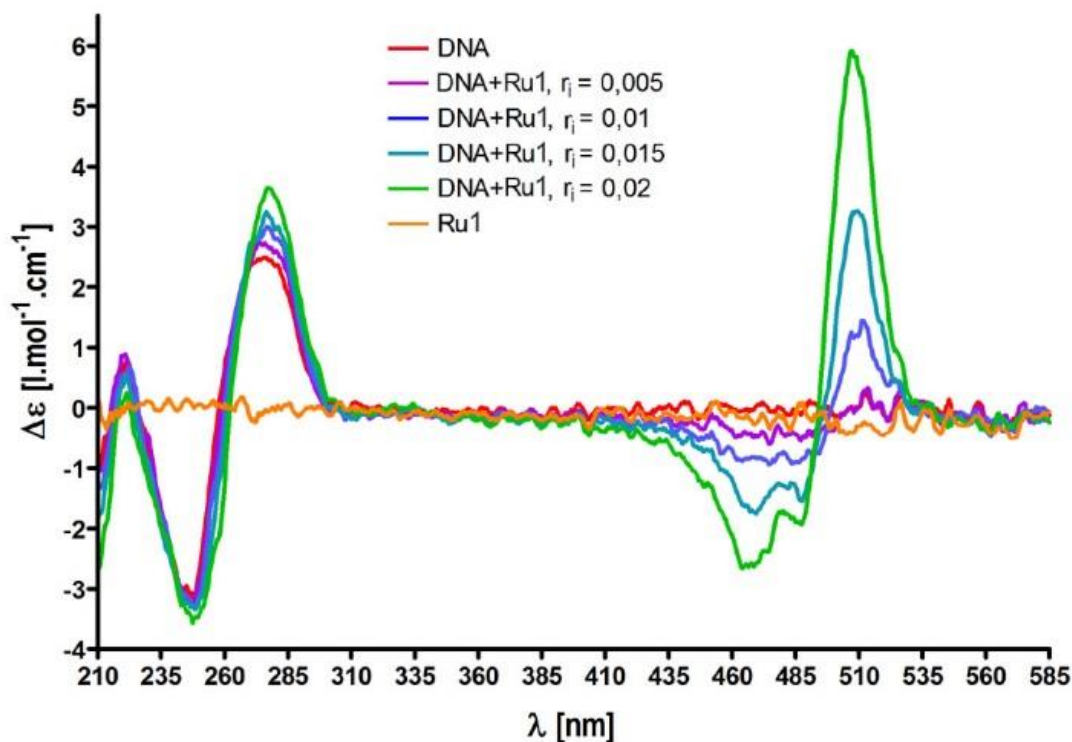
Obrázek 37 Závislost $A_0/(A-A_0)$ na $1/c_{DNA}$ využitá pro stanovení vazebné konstanty. Body a úsečky představují průměr a SD ze dvou nezávislých měření. A_0 = absorbance komplexu Ru1 bez přídavku DNA, A = absorbance komplexu Ru1 po interakci s DNA o dané koncentraci.

V literatuře se uvádí, že látky, které se váží do žlábků v DNA, mají obvykle větší rovnovážné vazebné konstanty (přibližně $10^{11} \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}$), protože není nutné vynaložit energii na vytvoření vazebného místa (Chaires 1997). U interkalátorů, protože vytvoření aktivity pro interkalaci vyžaduje energii, vede celková energetická bilance k tomu, že vazebné konstanty se pohybují v rozmezí 10^5 do $10^{11} \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}$. (Chaires 1997). Z těchto údajů vyplývá, že velikost vazebné konstanty komplexu Ru1 svědčí spíše pro interkalaci než pro vazbu do žlábků.

5.4 Cirkulární dichroismus

Pro další ověření vazby komplexu Ru1 a jeho vlivu na celkovou strukturu DNA byla DNA po vazbě komplexu Ru1 studována CD spektroskopii.

ttDNA o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ byla vložena do kyvety a postupně titrována konstantními přídávky komplexu Ru1 tak, že stupeň modifikace odpovídal hodnotám $r_i = 0,005 - 0,02$. Výsledná CD spektra byla zaznamenána a jsou uvedena na obrázku 38.



Obrázek 38 CD spektra DNA po interakci s komplexem Ru1. Červená křivka zobrazuje spektrum samotné DNA, oranžová křivka je spektrum samotného komplexu Ru1 o stejné koncentraci, jak ve vzorku s nejvyšší koncentrací Ru ($r_i = 0,02$).

Spektrum nemodifikovaná DNA (kontrola), je v obrázku 38 zobrazena **červenou barvou** a odpovídá spektru klasické B konformace DNA – obsahuje pozitivní pás s maximem 279 nm a negativní pás při 245 nm. Se vzrůstajícím r_i se projevuje vzestup pozitivního pásu B-DNA, zatímco negativní signál se téměř nemění.

Po navázání komplexu Ru1 na DNA došlo k indukci signálu v oblasti viditelných vlnových délek (410 - 530 nm), kde samotná DNA signál neposkytuje. Je to však oblast absorpce komplexu Ru1 (viz obrázek 32), lze tedy předpokládat, že signál pochází z komplexu Ru1. S rostoucí koncentrací signál narůstá. Studovaný komplex ruthenia Ru1 je achirální, takže sám o sobě signál CD neposkytuje (viz **oranžová křivka** v obrázku 38). Je možné tedy jakýkoli signál CD pozorovaný v oblasti vlnových délek nad 400 nm připsat interakcím komplexu ruthenia s chirální molekulou DNA. Vznik tohoto indukovaného CD je možné vysvětlit interakcemi molekul komplexu Ru1 s molekulami DNA vedoucími k určitému stupni jejich orientace. Pozitivní znaménko indukovaného CD pozorovaného při vlnových délkách v okolí 510 nm nasvědčuje tomu, že molekuly komplexu ruthenia jsou seřazeny na povrchu molekul DNA takovým způsobem, že jsou vrstveny nad sebou a orientovány přibližně kolmo k ose dvojité

šroubovice (Schipper a kol. 1980). Tato geometrie svědčí pro úplnou nebo částečnou interkalaci komplexu Ru1 mezi páry bází ve dvojité šroubovici DNA.

5.5 Viskozimetrie

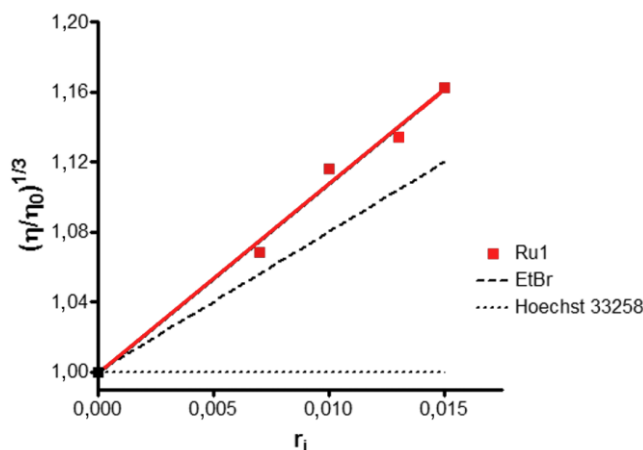
Rozdílný způsob vazby nízkomolekulárních látek k DNA se projevuje v rozdílném vlivu na strukturu DNA. Vazba do žlábků obvykle vyvolává jen slabší změny ve struktuře DNA a DNA tak zůstává v podstatě v nepozměněné B-formě. Naproti tomu, interkalace vede obvykle k podstatným změnám ve struktuře DNA a vyvolává prodloužení, zvýšení rigidity a rozvinutí DNA. Typické pro interkalaci je právě prodloužení délky DNA, protože páry bází jsou odděleny navázanou látkou, která je mezi ně vmezeřena. Proto hydrodynamické metody, které jsou citlivé na změny délky molekul DNA (tj. měření sedimentace nebo viskozity), patří k nejvhodnějším metodám pro stanovení typu vazby chemických sloučenin na DNA. Z uvedených dvou metod je viskozimetrie citlivější, protože viskozita je přímo úměrná třetí mocnině perzistentní délky molekul DNA, zatímco sedimentační koeficient je úměrný první mocnině této délky. Měření viskozity tak může poskytnout výsledky, umožňující rozlišit typ vazby na DNA.

Výsledky viskozimetrických měření, získané v této práci pro DNA z telecího thymu modifikovanou komplexem Ru1, jsou shrnuty v tabulce 3. Z naměřených hodnot času pádu kuličky byla vypočtena relativní specifická viskozita postupem uvedeným v kapitole 4.5.7. Závislost relativní viskozity na stupni modifikace DNA komplexem Ru1 je na uvedena na obrázku 39 **červeně**. Pro účely srovnání a interpretace výsledků byla do grafu také zanesena data pro typický interkalátor (ethidium bromid, EtBr) a typickou sloučeninu vážící se do žlábků (Hoechst 33258), převzaté z literatury (Suh a Chaires 1995).

Z obrázku je patrné, že interakce komplexu Ru1 vede k výraznému nárůstu délky molekul DNA a tedy i k nárůstu relativní viskozity. Tento nárůst je dokonce mírně větší než nárůst způsobený typickým interkalátorem ethidium bromidem. To ukazuje, že interakce komplexu Ru1 vede k většímu prodloužení perzistentní délky DNA, popř. k její větší rigiditě, než je tomu u ethidium bromidu. Tyto výsledky ukazují, že komplex s vysokou pravděpodobností interkaluje do DNA.

Tabulka 3 Naměřené nezávislé hodnoty pro blank (B), kontrolu (K), šest vzorků (B, K, v₁-v₄) o různém poměru koncentraci Ru1 a DNA a dopočítaná výsledná relativní viskozita (η/η_0) pro jednotlivé vzorky.

t_n [s]	B	K	v ₁ $r_i = 0,01$	v ₂ $r_i = 0,007$	v ₃ $r_i = 0,015$	v ₄ $r_i = 0,013$
t_1	11,47	12,24	12,08	12,07	12,19	12,17
t_2	11,58	12,03	12,22	12,17	12,31	12,27
t_3	11,68	11,91	12,08	12,05	12,20	12,17
t_4	11,52	12,04	12,47	12,16	12,34	12,27
t_5	11,52	11,87	12,08	12,05	12,27	12,17
t_6	11,51	12,00	12,19	12,16	12,30	12,27
\bar{t}	11,55	12,01	12,19	12,11	12,27	12,22
$\bar{t} - t_B$	-	0,46	0,64	0,56	0,72	0,67
η/η_0	-	-	1,39	1,22	1,57	1,46



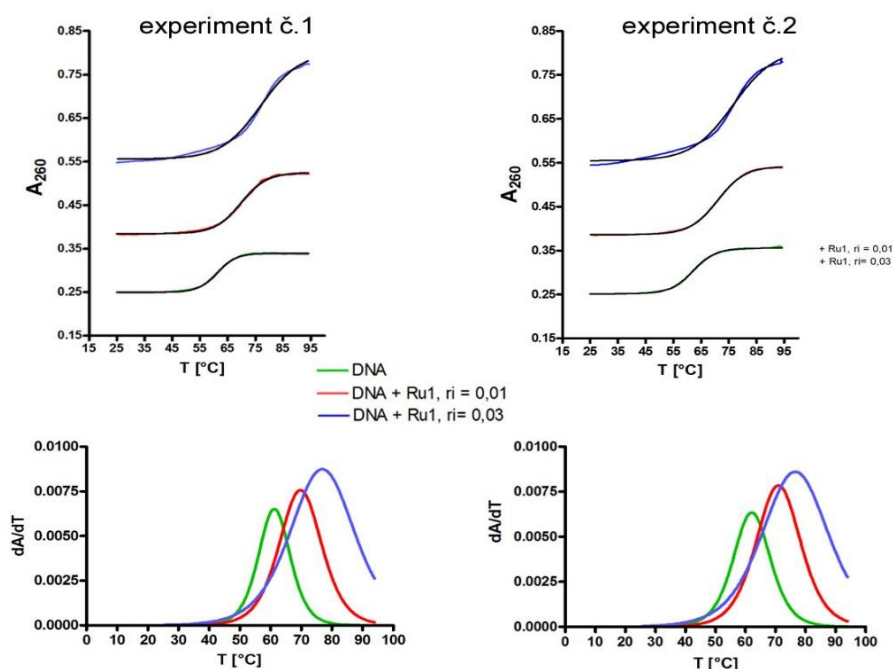
Obrázek 39 Závislost třetí odmocniny relativní viskozity DNA na stupni modifikace (r_i) komplexem Ru1. Body v grafu byly vypočítány z experimentálně naměřených hodnot uvedených v tabulce Y a proloženy přímkou $y=10,8x+0,998$ pomocí programu GraphPhad Prism. Závislost pro ethidium bromid (EtBr) a Heechst 33258 byly převzaty z (Suh a Chaires 1995).

Avšak při interpretaci těchto výsledků je potřeba postupovat opatrně, protože bylo ukázáno, že některé, i když relativně málo běžné látky, které se váží na cukr-fosfátovou kostru v DNA (Suh a Chaires 1995), mohou také prodlužovat řetězce DNA a tak zvyšovat relativní viskozitu. Proto tyto výsledky nelze považovat za zcela jednoznačný průkaz interkalace a je třeba je doplnit s využitím jiných metod.

5.6 Měření teploty tání (T_m)

Interakce nízkomolekulárních látek s DNA může ovlivnit teplotní stabilitu DNA, což se projeví změnou teploty tání (T_m) (Zaludova a kol. 1996). Bylo ukázáno, že vazba interkalací stabilizuje dvoušroubovici DNA a proto interkalace vždy vede ke zvýšení hodnoty T_m (Bjorndal a Fygenon 2002).

Proto jsme také v této práci studovali vliv vazby komplexu Ru1 na teplotní stabilitu ttDNA, jak je popsáno v kapitole 4.5.5. Byly připraveny dva vzorky o různém stupni modifikace ($r_i = 0,01$ a $0,03$) a jejich teplotní stabilita srovnána s kontrolní DNA o stejné koncentraci bez přítomnosti Ru1. Výsledné denaturační křivky jsou ukázány na obrázku 40 v horní části.



Obrázek 40 Horní část: Závislost absorbance (A_{260}) na teplotě roztoku telecí thymové DNA nemodifikované (zelené body) a modifikované komplexem Ru1 na $r_i = 0,01$ (červené body) nebo $r_i = 0,03$ (modré body). Černé křivky ukazují průběh funkce proložené naměřenými body. Dolní část: Derivace funkcí, kterými byly proloženy body z jednotlivých grafů. Měření probíhalo v $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaClO}_4$, indexy 1, 2 a 3 u značení jednotlivých panelů označují pořadové číslo měření

Pro vyhodnocení byly naměřené závislosti A_{260} na teplotě proloženy s pomocí programu GraphPhad 4 rovnicí označovanou jako Boltzmanova sigmoida. Teplota tání odpovídá x-ové souřadnici inflexního bodu na křivce tání a byla zjištěna jako maximum první derivace dané křivky. Derivace funkcí proložených křivkami jsou na obrázku 40

v dolní části a byly provedeny pomocí programu GraphPad 4. Zjištěné hodnoty T_m jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4 Tabulka hodnot T_m [°C] při různém stupni modifikace DNA. Hodnoty v posledním sloupci jsou průměrem ze dvou měření \pm SD.

	T_{m1} [°C]	T_{m2} [°C]	$\bar{T}_m \pm$ SD [°C]
DNA	61,3	62,1	61,7 \pm 0,4
DNA+Ru1, $r_i = 0.01$	69,9	71,0	70,5 \pm 0,6
DNA+Ru1, $r_i = 0.03$	76,8	76,6	76,7 \pm 0,1

Z tabulky je patrné, že modifikace DNA komplexem Ru1 vede k výraznému zvýšení stability DNA, a to i při velmi nízkém stupni modifikace. Při $r_i = 0,01$ došlo ke zvýšení T_m o 8,8 °C, při $r_i = 0,03$ o 18,0 °C. Takto výrazné zvýšení teplotní stability je typické pro interkalátory (Martínez a Chacón-García 2005, Bjorndal a Fygenon 2002). Proto můžeme na základě těchto výsledků usuzovat, že komplex Ru1 interkaluje do DNA.

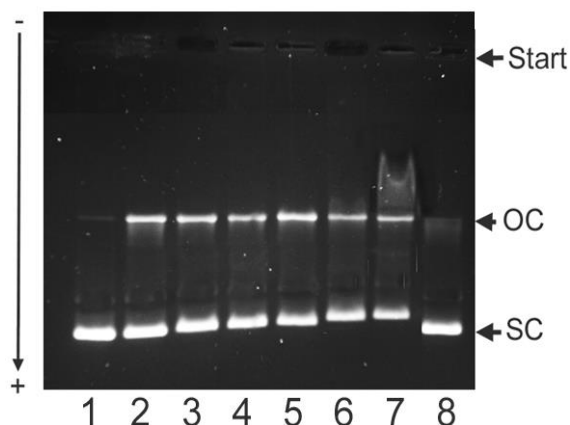
Nicméně zvýšení teplotní stability DNA po interakci s nízkomolekulárními látkami nemusí být způsobeno pouze interkalací. Bylo např. ukázáno (Lemmerhirt a kol. 2018), že některé sloučeniny, které se váží kovalentně a tvoří meziřetězcové můstky, také stabilizují DNA. Dalším důvodem pro stabilizaci DNA může být přítomnost kladného náboje v molekule interagující sloučeniny, která zvyšuje teplotní stabilitu DNA díky kompenzaci odpuzujících se záporných nábojů na cukr-fosfátové kostře DNA (Dalton a kol. 2008). Pro jednoznačné určení typu vazby komplexu Ru1 je nutné srovnat výsledky získané touto metodou s výsledky z jiných metod.

5.7 Elektroforéza v agarózovém gelu

Jak již bylo zmíněno v kapitole 4.5.8, interkalace do DNA vede k charakteristickému rozvinutí dvouřetězcové DNA. V případě, že použijeme kruhovou plasmidovou DNA, vede rozvinutí dvojité šroubovice ke změnám superhelikální hustoty. Proto můžeme rozvinutí DNA sledovat s využitím gelové elektroforézy jako změny v elektroforetické mobilitě superhelikální DNA.

Abychom ověřili, zda studovaný komplex Ru1 rozvíjí DNA, inkubovali jsme bakteriální plasmidovou DNA pBR322 s komplexem Ru1 po dobu 2 hodin. Poměr koncentrací c_{Ru1}/c_{DNA} (r_i) se pohybovat v rozmezí 0 – 0,1.

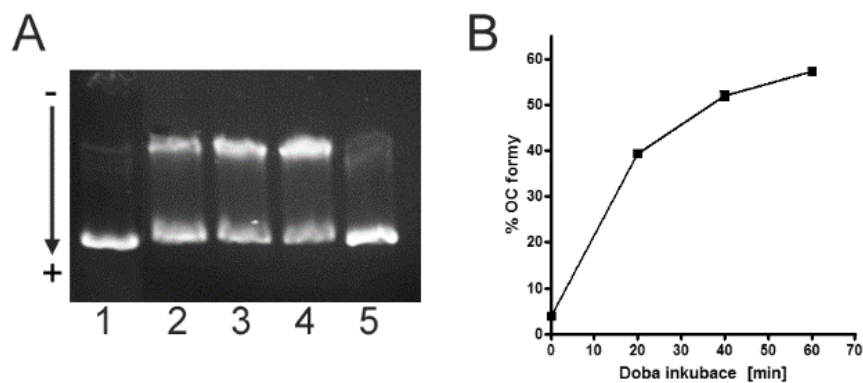
Obrázek 41 ukazuje reprezentativní fotografii výsledného gelu. Z obrázku je patrné, že vazba komplex Ru1 mírně, ale významně snižuje mobilitu superhelikální (SC) formy DNA. Tento výsledek by bylo možné interpretovat tak, že komplex Ru1 rozvíjí DNA, i když relativně málo, protože ani při nejvyšší koncentraci Ru1 ($r_i = 0,1$) nedošlo k úplnému rozvinutí SC DNA. Toto úplné rozvinutí by se projevilo komigrací s OC formou. Je známo, že interkalátory silně rozvíjejí DNA tak, že úhel rozvinutí je obvykle vyšší než relativně malý rozvíjecí efekt. To interkalaci nenasvědčuje a nesouhlasí s výsledky získanými pomocí viskozimetrie a CD. Možné vysvětlení tohoto rozporu spočívá v tom, že experiment s využitím elektroforézy v agarosovém gelu je určen především pro studium látek vážících se k DNA kovalentně (Keck a Lippard 1992). Nekovalentní interakce, která je relativně slabá ve srovnání s vazbou kovalentní, „nepřežije“ migraci skrz relativně malé póry gelu a mohlo dojít k uvolnění komplexu Ru1 z DNA. Podobné efekty byly již dříve pozorovány pro nízkomolekulární látky vážící se nekovalentně k DNA, dokonce i pro interkalátory jako je např. EtBr. Výsledky tohoto experimentu tedy ukazují, že tento experimentální přístup není pro studium rozvíjení DNA komplexem Ru1 příliš vhodný. Vhodnější by patrně bylo využití topoizomerázy I, toto však již bylo nad rámec této práce.



Obrázek 41 Fotografie 1% agarosového gelu po obarvení ethidium bromidem. Dráha č. 1 a 8 - kontrolní nemodifikovaná DNA; 2 - DNA + Ru1 $r_i = 0,001$; 3 - DNA + Ru1 $r_i = 0,005$; 4 - DNA + Ru1 $r_i = 0,01$; 5 - DNA + Ru1 $r_i = 0,03$; 6 - DNA + Ru1 $r_i = 0,005$; 7 - DNA + Ru1 $r_i = 0,1$. OC – relaxovaná.

Zajímavá je také skutečnost, že u všech vzorků (Obrázek 41) je patrná superhelikální (SC) forma plasmidové DNA. Naopak pouze u vzorků inkubovaných

s komplexem Ru1 se objevuje také relaxovaná (OC) forma DNA. OC forma je DNA, která má přerušný jeden řetězec a díky tomu nemá nadšroubovicové vinutí. V gelu proto migruje pomaleji než SC forma, která je negativně zavinuta, je více kompaktní a v gelu migruje rychleji než OC forma. Skutečnost, že tato forma se objevuje jen po inkubaci s komplexem Ru1 může znamenat, že komplex Ru1 vytváří v DNA jednořetězcové zlomy. Proto byl proveden další experiment, kdy byla plasmidová DNA pBR322 inkubována s komplexem Ru1 a z tohoto roztoku byly v určených časových intervalech odbírány aliquoty. Tyto vzorky pak byly analyzovány v 1% agarosovém gelu. Poté byl gel obarven ethidium bromidem. Kvantitativní relativní zastoupení OC formy ve vzorcích bylo vyhodnoceno pomocí programu Aida Image Analyzer. Výsledky jsou ukázány na obrázku 42. Z grafu (Obrázek 42B) je patrné, že podíl OC formy v DNA narůstá s rostoucí dobou inkubace DNA s komplexem Ru1, což potvrzuje závěr, že komplex Ru1 DNA štěpí a vytváří zlomy v jednom řetězci. Toto chování je v souladu s údaji uvedenými v literatuře – bylo ukázáno, že některé komplexy ruthenia štěpí DNA díky své redoxní aktivitě a to buď přímo v důsledku přenosu elektronů po vazbě na DNA (Brabec a kol. 2016), nebo prostřednictvím vzniku reaktivních sloučenin kyslíku (Malina a kol. 2008).



Obrázek 42 Fotografie 1% agarózového gelu po obarvení ethidium bromidem. Dráha č. 1 - kontrolní nemodifikovaná DNA; 2 - DNA +Ru1, $t = 20$ min; 3 - DNA +Ru1, $t = 40$ min; 4 - DNA +Ru1, $t = 60$ min; 5 - DNA +Ru1 $t = 0$. OC – relaxovaná („open circular“) forma DNA; SC – superhelikální („supercoiled circular“) forma DNA. Šipka ukazuje směr migrace.

6. Závěr

V této práci byly studovány interakce DNA s novým komplexem ruthenia připraveným na Univerzitě v Debrecínu. V molekule této sloučeniny se vyskytuje ligand odvozený od akridinu, který by potenciálně mohl interkalovat do molekuly DNA, protože akridiny jsou obecně prokázány jako vysoce účinné interkalátory.

S využitím vybraných metod molekulární biofyziky bylo zjištěno, že komplex Ru1 se váže k DNA nekovalentně s mírnou preferencí pro G:C páry oproti A:T párům. Tato nekovalentní interakce pravděpodobně zahrnuje úplnou nebo částečnou interkalaci, jak naznačují výsledky měření vlivu tohoto komplexu na viskozitu DNA a z velikosti vazebné konstanty stanovené absorpční titrací. Komplex Ru1 se na DNA váže tak, že molekuly po vazbě na DNA poskytují indukovaný signál v CD spektrech DNA, pozorovatelný při vlnové délce odpovídající absorpčnímu maximu tohoto komplexu. To nasvědčuje o pravidelném uspořádání molekul Ru1 vzhledem k DNA typickému pro interkalační typ vazby.

Výstupy dále naznačují, že Ru1 zvyšuje teplotní stabilitu DNA a rozvíjí DNA. Tyto vlastnosti také odpovídají interkalaci.

Interkalace nízkomolekulárních látek do DNA se velmi obtížně prokazuje. S výjimkou rentgenové strukturní krystalografie a NMR, kdy můžeme určit přesně strukturu molekuly DNA s navázanou látkou. Ostatní metody poskytují jen důkazy nepřímé. Proto bylo vždy třeba provést více experimentů založených na různých fyzikálních vlastnostech. Pokud všechny získané výsledky podporují interkalaci a nejsou v rozporu s tím, co bylo o vlastnostech interkalátorů doposud zjištěno, lze s velkou pravděpodobností usoudit, že daná látka skutečně interkaluje. Toto je případ i komplexu Ru1, studovaného v této práci. Proto můžeme ze získaných výsledků vyvodit závěr, že komplex Ru1 se může vmezeřit do DNA pravděpodobně tou částí molekuly, která obsahuje akridinový ligand.

Kromě toho bylo zjištěno, že Ru1 je schopen tvořit jednořetězcové zlomy v molekule DNA. Tyto a mnohé další vlastnosti mohou být příčinou cytotoxicity v nádorových liniích lidských ovariálních buněk, která byla zjištěna na KBF UP (Kašpárková, ústní sdělení).

7. Literatura

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2002) *Molecular biology of the cell*. 4th ed, Garland science, New York, 1616 stran.
- Altaf A.A., Hashmat U., Yousaf M., Lal B., Ullah S., Holder A.A., Badshah A. (2016) Synthesis and characterization of azo-guanidine based alcoholic media naked eye DNA sensor. *Royal Society Open Science* **3**: 160351.
- Bergamo A., Gaiddon C., Schellens J.H.M., Beijnen J.H., Sava G. (2012) Approaching tumour therapy beyond platinum drugs Status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates. *Journal of Inorganic Biochemistry* **106**, 90-99.
- Biver T., De Biasi A., Secco F., Venturini M., Yarmoluk S. (2005) Cyanine Dyes as Intercalating Agents: Kinetic and Thermodynamic Studies on the DNA/Cyan40 and DNA/CCyan2 Systems. *Biophysical Journal* **89**, 374-383.
- Bjorndal M.T. a Fygenon D.K. (2002) DNA melting in the presence of fluorescent intercalating oxazole yellow dyes measured with a gel-based assay. *Biopolymers* **65**, 40-4.
- Boulikas T., Pantos A., Bellis E., Christofis P. (2007) Designing platinum compounds in cancer: structures and mechanisms. *Cancer Therapy* **5**, 537-583.
- Brabec V., Prachařová J., Štěpánková J., Sadler P.J., Kašpárková J. (2016) Photo-induced DNA cleavage and cytotoxicity of a ruthenium(II) arene anticancer complex. *Journal of Inorganic Biochemistry* **160**, 149-155.
- Bratsos I., Jedner S., Gianferrara T., Alessio E. (2007) Ruthenium anticancer compounds: Challenges and expectations. *Chimia* **61**, 692-697.
- Brázda V., Laister R.C., Jagelská E.B., Arrowsmith C. (2011) Cruciform structures are common DNA feature important for regulating biological processes. *BMC Molecular Biology* **12**: 33.
- Bugarcic T., Nováková O., Halámiková A., Zerzánková L., Vrána O., Kašpárková J., Habtemariam A., Parsons S., Sadler P.J., Brabec V. (2008) Cytotoxicity, cellular uptake, and DNA interactions of new monodentate ruthenium(II) complexes containing terphenyl arenes. *Journal of Medicinal Chemistry* **51**, 5310-5319.
- Chaires J.B. (1997) Energetics of drug-DNA interactions. *Biopolymers* **44**, 201-215.
- Čudová M. (2014) Vizualizace sekundárních struktur DNA v prostředí r/bioconductor. Bakalářská práce, VUT v Brně, Česká republika.
- Dahm R. (2005) Fridrich Miescher and the discovery of DNA. *Developmental Biology* **278**, 274-288.
- Dalton S.R., Glazier S., Leung B., Win S., Megatulski C., Burgmayer S.J. (2008) DNA binding by Ru(II)-bis (bipyridine)-pteridinyl complexes. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **13**, 1133-1148.
- Fischer B., Heffeter P., Kryeziu K., Gille L., Meier S.M., Berger W., Kowol C.R., Keppler B.K. (2014) Poly(lactic acid) nanoparticles of the lead anticancer ruthenium compound KP1019 and its surfactant-mediated activation. *Dalton Transactions* **43**, 1096-1104.

- Folvarská L. (2015) *Interakce DNA s novým protinádorově účinným komplexem ruthenia s flavonolovým ligandem*. Diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.
- Frank-Kamenetskii M.D. a Mirkin S.M. (1995) Triplex DNA Structures. *Annual Review of Biochemistry* **64**, 65-95.
- Hendry L.B., Mahesh V.B., Bransome E.D., Swing D. E. (2007) Small molecule intercalation with double stranded DNA: Implications for normal gene regulation and for predicting the biological efficacy and genotoxicity of drugs and other chemicals. *Mutation Research* **623**, 53–71.
- Hobza P. (2008) Nekovalentní interakce s přímou participací vodíku: vodíková vazba, nepravá vodíková vazba a dvouvodíková vazba. *Chemické listy* **102**, 884-888.
- Jain A., Wang G., Vasquez K.M. (2008) DNA triple helices: Biological consequences and therapeutic potential. *Biochimie* **90**, 1117-1130.
- Kanakis C.D., Nafisi Sh., Rajabi M., Shadaloï A., Tarantilis P.A., Polissiou M.G., Bariyanga J., Tajmir-Riahi H.A. (2009) Structural analysis of DNA and RNA interactions with antioxidant flavonoids. *Journal of Spectroscopy* **23**, 29-43.
- Keck M.V a Lippard S.J. (1992) Undwinding of supercoiled DNA by platinum-ethidium and related complexes. *Journal of the American Chemical Society* **114**, 3386-3390.
- Kim S.K. a Nordem B. (1993) Methyl green – a DNA major-groove binding-drug. *FEBS Letters* **315**, 61-64.
- King R.C., Stansfield W.D., Mulligan P.K. (2006) *A Dictionary of Genetics*. 7th ed., Oxford University Press, Oxford, Anglie, 439 stran.
- Lemmerhirt H., Behnisch S., Bodtke A., Lillig C.H., Pazderová L., Kašpárková J., Brabec V., Bednarski P.J. (2018) Effects of cytotoxic cis- and trans-diammine monochlorido platinum(II) complexes on selenium-dependent redox enzymes and DNA. *Journal of Inorganic Biochemistry* **178**, 94-105.
- Levina A., Mitra A., Lay, P.A. (2009) Recent developments in ruthenium anticancer drugs. *Metallomics* **1**, 458–470.
- Lüllmann H., Mohr K., Wehling M. (2009) *Farmakologie a toxikologie*, 15th ed., Grada, Praha, Česká republika, 725 stran.
- Malina J., Hannon M.J., Brabec V. (2008) Interaction of dinuclear ruthenium(II) supramolecular cylinders with DNA: Sequence-specific binding, unwinding, and photocleavage. *Chemistry – A European Journal* **14**, 10408-10414.
- Martínez R. a Chacón-García L. (2005) The search of DNA-intercalators as antitumoral drugs: what it worked and what did not work. *Current Medicinal Chemistry* **12**, 127-151.
- Nečas O. (1989) *Biologie. Učebnice pro lékařské fakulty*. 2nd ed., Avicenum, Praha, Česká republika, 622 stran.
- Neidle S. (2007) *Principles of Nucleic Acid Structure*. 1st ed., Academic Press, Cambridge, USA, 302 stran.
- Nováková O., Kašpárková J., Vrána O., van Vliet P. M., Reedijk J., Brabec V. (1995) Correlation between cytotoxicity and DNA binding of polypyridyl ruthenium complexes. *Biochemistry* **34**, 12369-12378.
- Palchaudhuri R. a Hergenrother P.J. (2007) DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. *Current Opinion in Biotechnology* **18**, 497–503.
- Pasetto L.M., D'Andrea, M.R., Brandes A.A., Rossi E., Monfardini S. (2006) The development of platinum compounds and their possible combination. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **60**, 59-75.

- Pizzaro A.M. a Sadler P.J. (2009) Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes. *Biochimie* **91**, 1198-1211.
- Prachařová J. (2013) *Role modifikací DNA komplexu kovů v terapii rakoviny*. Diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.
- Prachařová J., Viguera G., Novohradský V., Cutillas N., Janiak Ch., Kostrhunová H., Kašpárková J., Ruiz J., Brabec V. (2018) Exploring the Effect of the Polypyridyl Ligands on Anticancer Activity of Phosphorescent Iridium(III) Complexes: From Proteosynthesis Inhibitors to Photodynamic Therapy Agents. *Chemistry - A European Journal* **24**, 4607-4619.
- Ren J. a Chaires J.B. (1999) Sequence and Structural Selectivity of Nucleic Acid Binding Ligands. *Biochemistry* **38**, 16067-16075.
- Rosenberg B. (1985) Fundamental Studies With Cisplatin. *Cancer* **55**, 2303-2316.
- Rosenberg B. (1999) The Start. In: *Cisplatin. Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*. (Lippert B. ed.), Wiley-VCH, Curych, Švýcarsko, 563 stran.
- Rosypal S. (2006) *Úvod do molekulární biologie 1*. 4th ed., Prof. RNDr. Stanislav Rosypal, DrSc., Brno, Česká republika, 290 stran.
- Schipper P.E., Norden B., Tjernelid, F. (1980) Determination of binding geometry of DNA-adduct systems through induced circular-dichroism. *Chemical Physics Letters* **70**, 17-21.
- Shimada M., Itamochi H., Kigawa J. (2013) Nedaplatin: a cisplatin derivate in cancer chemotherapy. *Cancer Management and Research* **5**, 67-76.
- Špačková N. (2009) Tři jsou málo, pět je moc aneb seznamte se s kvadruplexy. *Živa* **3**, 98-100.
- Stavárková A. (2016) *Kombinovaný účinek nového protinádorově účinného komplexu ruthenia a UV záření na DNA*. Diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.
- Suh D. a Chaires J.B. (1995) Criteria for the Mode of Binding of DNA Binding Agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **3**, 723-728.
- Turro N.J., Barton J.K., Tomalia D.A. (1991) Molecular Recognition and chemistry in Restricted Reaction Spaces. Photophysics and Phoroinduced Electron Transfer on the Surfaces of Micelles, Dendrimers, and DNA. *Accounts of Chemical Research* **24**, 332-340.
- Watson J.D. (1982) *Molekulární biologie genu*. 3rd ed., Academia, Praha, Česká republika, 757 stran.
- 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

- [1] Wikipedia home page: <https://cs.wikipedia.org/wiki/RNA> (3. 7. 2017).
- [2] MENDELU home page: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1480&typ=html (3. 7. 2017).
- [3] Wikipedia home page: <https://cs.wikipedia.org/wiki/DNA> (22. 2. 2018).
- [4] C&EN home page: <https://cen.acs.org/articles/90/web/2012/02/Twist-DNA-Base-Pairing.html> (22. 2. 2018).
- [5] National High Magnetic Field Laboratory home page: <https://micro.magnet.fsu.edu/cells/nucleus/chromatin.html> (23. 3. 2018).

-
- [6] Wikipedia home page: <https://en.wikipedia.org/wiki/Cisplatin> (21. 8. 2017).
- [7] 3DChem home page: <http://www.3dchem.com/cisplatin.asp> (21. 8. 2017).
- [8] Wikipedia home page: <https://en.wikipedia.org/wiki/Carboplatin> (21. 8. 2017).
- [9] Wikipedia home page: <https://en.wikipedia.org/wiki/Oxaliplatin> (21. 8. 2017).
- [10] Platinum home page: <https://platinumclay.weebly.com/biomedical.html> (21. 8. 2017).
- [11] Photobiology home page:
<http://www.photobiology.com/photoiupac2000/pierard/Interactionmain.html>
(28. 3. 2018).
- [12] Wikipedia home page: <https://en.wikipedia.org/wiki/9-Aminoacridine>
(11. 11. 2017).
- [13] Wikipedia home page: https://cs.wikipedia.org/wiki/Ethidium_bromid
(11. 11. 2017).
- [14] Wikipedia home page: <https://de.wikipedia.org/wiki/Chlorphenamin> (11. 11. 2017).
- [15] Wikipedia home page: <https://en.wikipedia.org/wiki/Prodigiosin> (13. 11. 2017).
- [16] Wikipedia home page: <https://en.wikipedia.org/wiki/Mitomycins> (13. 11. 2017).
- [17] ATDBio home page: <https://www.atdbio.com/content/16/Nucleic-acid-drug-interactions> (11. 11. 2017).