

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Studium molekulárního mechanismu protinádorové
aktivity dinukleárních komplexů platiny**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Petr Polanský
Studijní program:	M1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	prof. RNDr. Viktor Brabec, DrSc.

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracoval samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne 26. dubna 2011

Rád bych poděkoval svému školiteli prof. RNDr V. Brabcovi, DrSc. za odborné vedení a všestrannou pomoc, kterou mi věnoval. Zvláštní poděkování patří prof. RNDr. J. Kašpárkové. Všem pracovnícím Katedry biofyziky UP děkuji za vytvoření příjemného pracovního prostředí a za pomoc, kterou mi poskytovaly.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Petr Polanský
Název práce	Studium molekulárního mechanismu protinádorové aktivity dinukleárních komplexů platiny
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biofyziky
Vedoucí práce	prof. RNDr. Viktor Brabec, DrSc.
Rok obhajoby práce	2011
Klíčová slova	Cisplatina, DNA
Počet stran	53
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Petr Polanský
Type of thesis	master
Department	Department of biophysics
Supervisor	prof. RNDr. Viktor Brabec, DrSc.
The year of presentation	2011
Keywords	Cisplatine, DNA
Number of pages	53
Number of appendices	0
Language	Czech

I. ÚVOD

Lidské tělo je denně vystavováno velkému množství škodlivých látek a vlivu řady dalších faktorů. Mezi ně patří například UV-A záření zapříčiňující vznik reaktivních forem kyslíku nebo energeticky bohatší UV-B záření, které je příčinou vzniku dimérových pyrimidinových bází. Všechny tyto faktory poté působí nevratná poškození, a to hlavně na úrovni mutací v genomu. Mutace v krajním případě vedou k nevratným poškozením organismu, které může vyústit v rozvoj rakoviny. Rakovina je celosvětově rozšířený populační problém, jenž je po srdečním selhání druhou nejčastější příčinou úmrtí. Možnost nalezení nových postupů v léčbě rakoviny je v současné době předmětem mnoha výzkumů po celém světě.

Mutací v kódujících oblastech DNA se obvykle mění funkce nebo struktura produktu. Při větším poškození genetické informace, které už buňka svými reparačními mechanismy není schopna opravit, je vnější nebo vnitřní cestou spuštěna signální kaskáda vedoucí k zániku buňky. Pokud ale poškození genetické informace zasáhne i geny regulující buněčný cyklus, může dojít k patologické aktivaci vnitřních signálních drah vedoucí k nekontrolovatelnému dělení buňky a tím ke vzniku nádoru. Takto vzniklý nádor je možné odstranit přímým chirurgickým zákrokem nebo použitím neinvazivních metod, např. pomocí ionizujícího záření.

Genomové mutace mohou být kromě vnějších vlivů způsobeny také špatnou funkcí enzymu polymerázy při replikaci nebo spontánní přeměnou bází (deaminace nebo depurinace). Při replikaci buněk v lidském těle vznikne průměrně za hodinu asi 68 miliard chyb způsobených špatným párováním nukleotidových bází nebo nesprávnou funkcí polymerázy. Poškozená buněčná DNA je opravena reparačními mechanismy, nebo je celá buňka odstraněna imunitním systémem. Mutace na úrovni genomu v normální tkáni vede ke vzniku dysplazie. Jde o pokles buněčné organizace tkáně, který může vyústit až do stádia karcinomu.

Jestliže není zahájena včasná léčba, může nádor přejít do invazivního stádia. Nádorové buňky ztrácejí schopnost kontaktní inhibice, dostávají se do krevního řečiště, a díky snížením nároků mj. na množství kyslíku mohou metastazovat do jiných částí organismu. Nádorové buňky roztroušené v různých tkáních většinou nelze odstranit prostým chirurgickým zákrokem. Jednou z možností léčby je chemoterapie.

Zavedení nového chemoterapeutika do klinické praxe je dlouhý a finančně náročný proces. Ve fázi preklinického hodnocení se zjišťuje, zda má léčivo žádoucí protinádorový efekt. Poté následují tři fáze klinického hodnocení, po kterých dochází k registraci nového léčiva a dalším klinickým testům, které mají vyloučit negativní dopad na zdraví. K nejpoužívanějším léčivům, využívaných v chemoterapii lidských nádorů, patří koordinační komplexy platiny.

II. TEORETICKÁ ČÁST

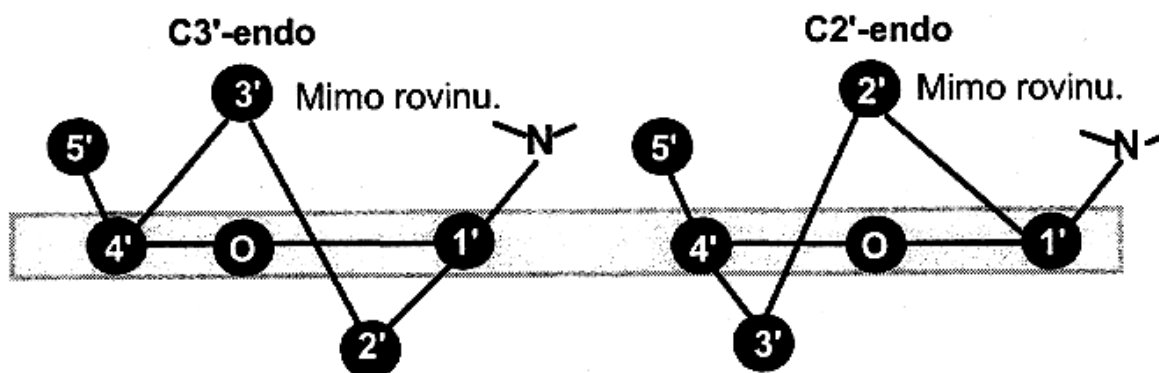
2. 0. 0. Úvod do problematiky

V protinádorové terapii se dnes aplikují různé léčebné postupy. Mezi často používané patří právě chemoterapie. Principem této metody je reakce farmaka s různými buněčnými strukturami, které jsou nezbytné pro buněčné dělení nebo jeho kontrolu.

Obecně se za nejvíce efektivní skupinu léčiv v protinádorové léčbě považují takové látky, které interagují s DNA. Po navázání na jejich cílovou strukturu dochází na DNA ke změnám vazebných úhlů bází. Tyto změny ze sterických důvodů nedovolují replikačním enzymům pokračovat v syntéze nového vlákna a tím dochází k inhibici dělení. Tato léčiva jsou převážně koordinační sloučeniny těžkých kovů. Mezi běžně používané patří komplexy platiny.

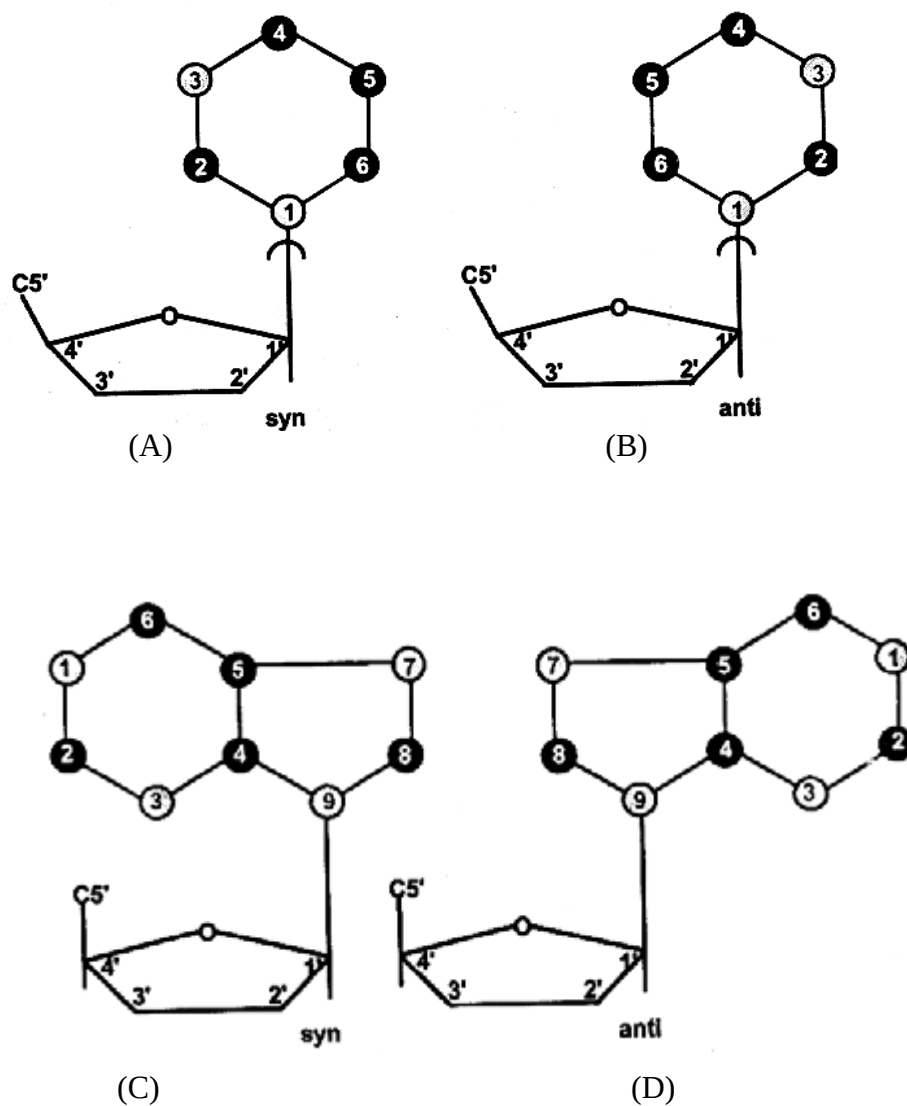
2. 0. 1. DNA

DNA je nukleová kyselina vzniklá polymerizací monomerních nukleotidů. Nukleotid je složen z pětiuhlíkatého cukru deoxyribózy, spojeného N-glykosidickou vazbou s nukleovou bází. Ribofuranózový kruh se vyznačuje tzv. pseudorotací, což mu umožňuje výskyt v konformaci *endo* nebo *exo* (Obr. 1) Nukleotidy patřící do jednoho řetězce jsou navzájem spojeny přes fosfodiesterovými vazbami. Takto vzniklá primární struktura nese genetickou informaci.



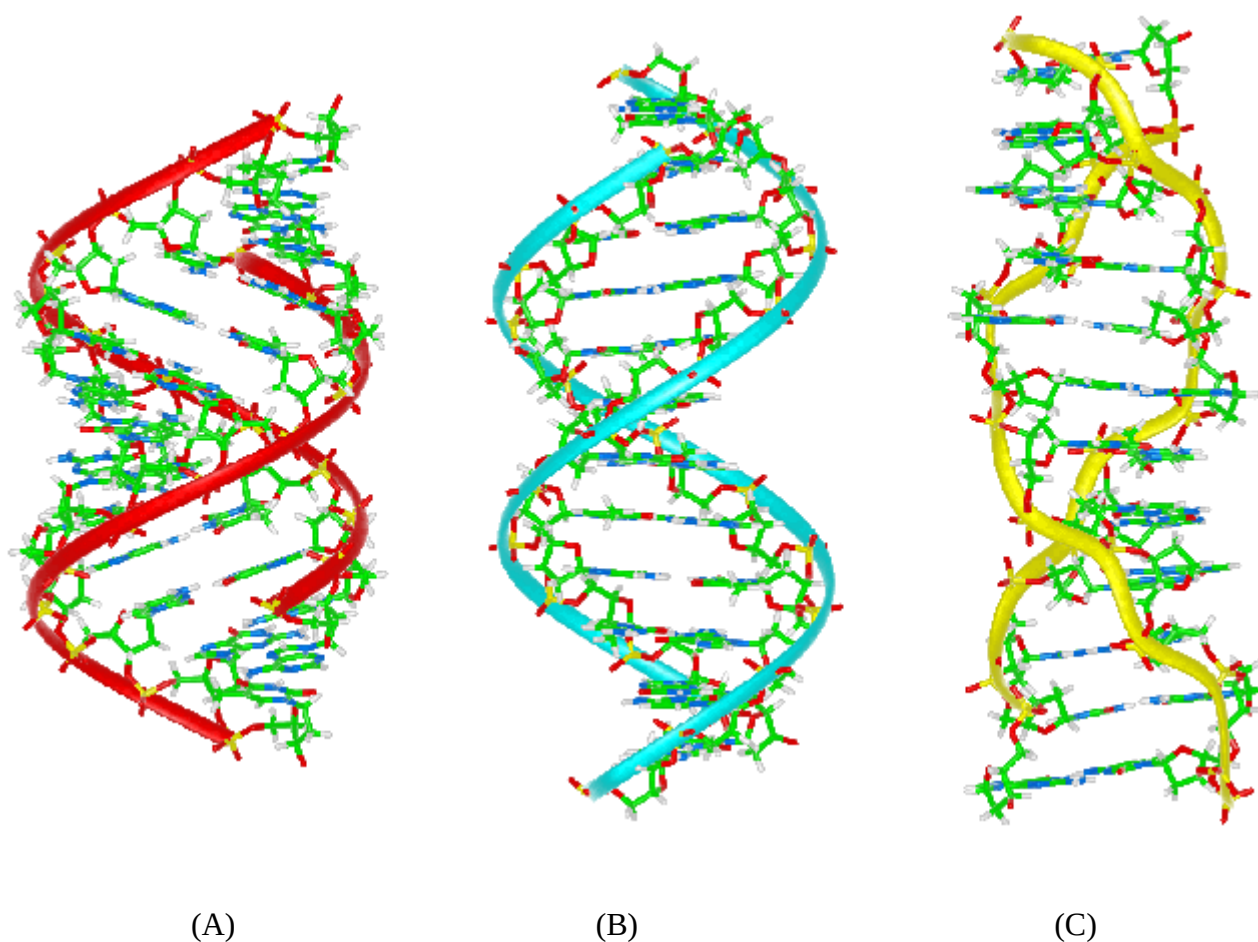
Obr. 1: Možnosti konformačního uspořádání ribózy. Převzato z [1]

Konformační uspořádání je také ovlivněno vzájemnou polohou báze a pentózy. Pokud je purinová báze natočena mimo rovinu pentózy, jedná se o antiklinální vazbu; je-li báze otočná dovnitř, hovoří se o synklinální vazbě (Obr. 2).



Obr. 2: Konformace N-glykosidické vazby (A) a (B) u purinů a (C) a (D) u pyrimidinu. Převzato z [1].

Délka vlákna DNA v lidské buňce asi 1000 cm a jeho průměr je okolo 1 nm. Z tohoto důvodu je poskládaná do kompaktnějších struktur. Vzájemným navíjením komplementárních vláken DNA vzniká sekundární struktura- dvoušroubovice. Ta je tvořena dvěma vzájemně antiparalelními vlákny. Existují tři typy konformace DNA, které jsou závislé na primární struktuře a prostředí, v němž se nacházejí (Obr. 3). Odlišnosti všech typů uvádí tabulka 1.



Obr. 3: Typy DNA. (A) A-DNA, (B) B- DNA, (C) Z-DNA. Převzato z [1].

	<i>Konformace A</i>	<i>Konformace B</i>	<i>Konformace Z</i>
<i>vinutí</i>	pravotočivé	pravotočivé	levotočivé
<i>celkový tvar</i>	krátká a široká	dlouhá a tenká	podlouhlá a tenká
<i>umístění osy dvoušroubovice</i>	přes větší žlábek	přes páry bází	přes menší žlábek
<i>větší žlábek</i>	velmi úzký a hluboký	široký a hluboký	zploštělý na povrchu
<i>menší žlábek</i>	velmi široký a mělký	úzký a hluboký	velmi úzký a hluboký
<i>počet párů bází na jeden závit</i>	~ 11	~ 10,5	~ 12
<i>konformace glykosidové vazby</i>	anti	anti	anti u C syn u G
<i>konformace deoxyribózy</i>	C3 – endo	C2 – endo	C2 – endo u dC C3 – endo u dG

Tab. 1: Rozdíly mezi jednotlivými typy DNA. Převzato z [1].

2. 1. Cisplatina

2. 1. 1. Cisplatina jako cytostatikum

Ačkoliv byl cis- diammindichloroplatnatý komplex (Obr. 4) poprvé připraven již v polovině 19.století [2], objev jejího cytostatického efektu uskutečnil až o sto let později prof. Rosenberg. Cisplatina byla uvedena na trh jako léčivo v roce 1978 a do dvaceti let se stala světově nejpoužívanějším cytostatikem.

Cílem výzkumu prof. Rosenberga bylo zjistit, jakým způsobem elektrické pole ovlivňuje růst kolonií bakterie *E. Coli*. Při pokusu byly použity platinové elektrody, ze kterých se v roztoku elektrolytu uvolňovaly ionty platiny. U bakterií vystavených této sloučenině docházelo k zastavení buněčného dělení, ale zároveň byla zachována jejich biosyntetická aktivita [3].

Schopnost cisplatiny inhibovat dělení buněk byla vyzkoušena na řadě různých typů nádorů [4]. U nádorového onemocnění varlat vykazovala vysokou až 90% cytostatickou účinnost. Při použití cisplatiny na léčbu karcinomu plic, krku nebo močového měchýře, bylo toto cytostatikum méně účinné.

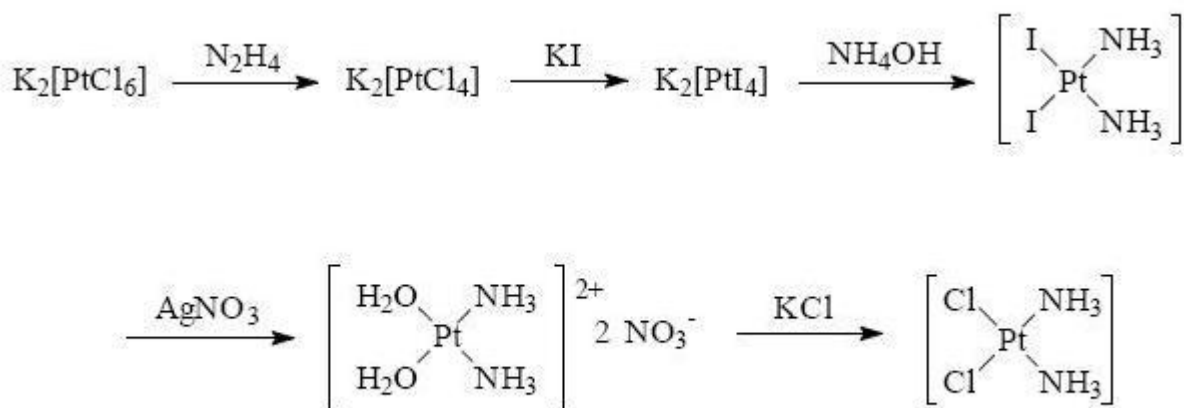


Obr. 4: Strukturní vzorec cisplatiny (a) a transplatiny (b)

Existují ovšem typy nádorů, které vykazují resistenci k léčbě cisplatinou. Jedná se například o rakovinu tlustého střeva. Hlavním omezením při aplikaci cisplatiny je její vysoká cytotoxicita (pro buňky ledvinových tubulů) a vznik resistance.

2. 1. 2. Syntéza

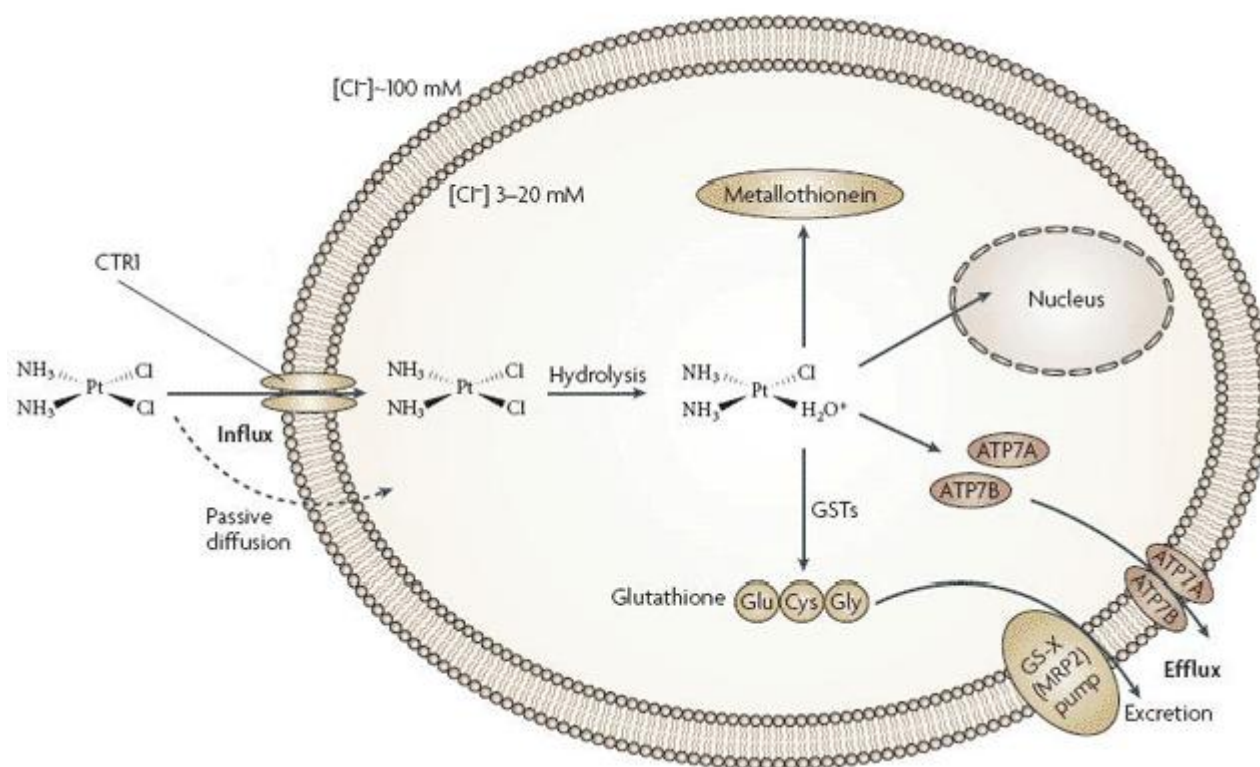
Syntéza cisplatiny (Obr. 5) vychází z hexachloroplatičitanu draselného, který je nejprve redukován hydrazinem. Dalším mezistupněm syntézy je vznik tetrajodoplatnatanu draselného, který je působením vodného roztoku amoniaku převeden na diaminoaquakomplex. V posledním kroku jsou molekuly vody vyměněny za chloridové ionty za vzniku cisplatiny.



Obr. 5: Schéma syntézy diammindichloroplatnatého komplexu. Převzato z [5]

2. 1. 3. Mechanismus účinku

Pro bližší poznání cis-diammindichloroplatnatého komplexu bylo třeba objasnit mechanismu jeho účinku. První studie byly zaměřeny na objasnění cílového místa účinku [7]. Bylo zjištěno, že cisplatina v buněčném prostředí tvoří adukty nejen s DNA, ale například i s RNA nebo proteiny [8]. Výsledky dalších studií nicméně ukázaly, že cílovým místem účinku je právě DNA [6]. Cisplatina se aplikuje nitrožilně v jedné dávce každé 3-4 týdny [7]. Po vstupu do krevního řečiště (Obr. 6) se značná část komplexu váže na proteiny obsahující síru. Zbývá část se poměrně rychle distribuuje do všech tkání. V nejvyšší koncentraci se deponuje v ledvinách a játrech, naopak do centrálního nervového systému je průnik značně omezen. Koncentrace chloridových iontů v krevní plasmě je průměrně 100 mmol/l, což umožňuje s molekulou cisplatiny resp. s jejími chloridovými ligandy ustavit rovnováhu.

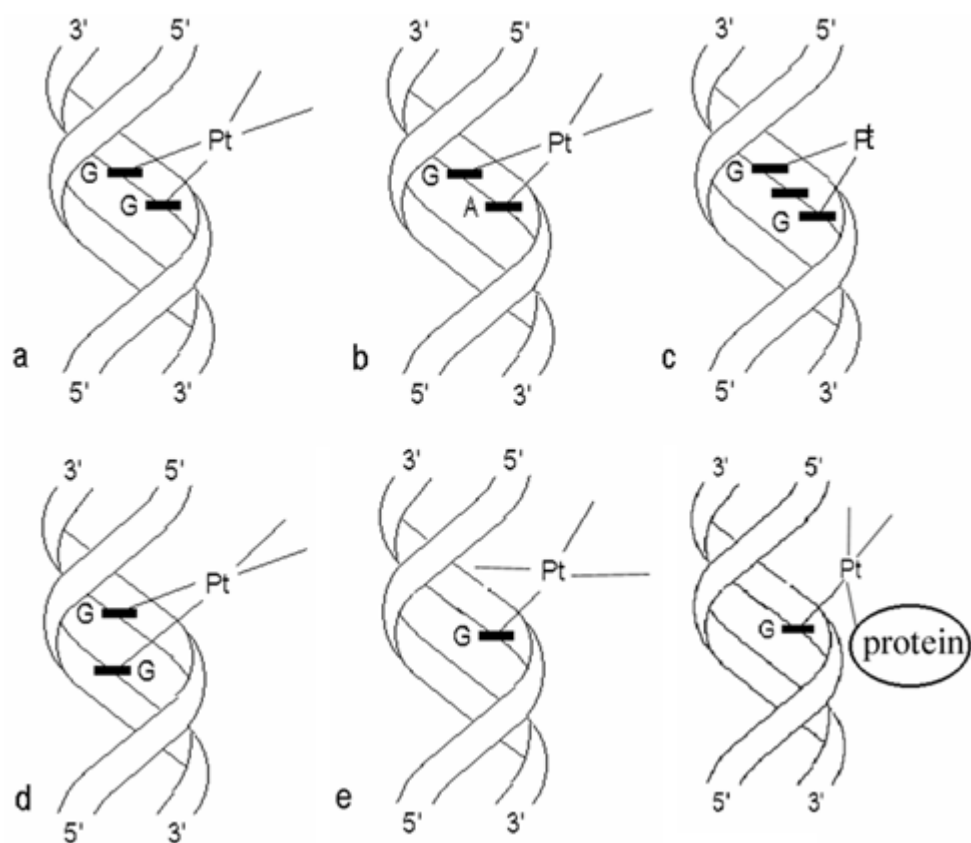


Obr. 6: Schéma průniku cisplatiny do buňky

Cisplatina vstupuje do buňky buď pasivní difuzí nebo aktivně pomocí přenašeče CTR1 [11]. Po průniku farmaka do cytoplasmy, kde je koncentrace chloridových iontů průměrně 6 mmol/l, dochází k narušení rovnováhy mezi volnou frakcí iontů a chloridy vázanými na platinový ligand. V důsledku toho dojde k odstoupení chloridového iontu, který je substituován molekulou vody. Tím se z elektroneutrální molekuly stane molekula kladně nabitá. V této formě se monofunkčně váže na své cílové místo- dusík N7 guaninové a méně často adeninové báze.

V následné fázi dochází k odstoupení druhého chloridového ligandu, čímž molekula ztrácí další záporný náboj. Poločas této reakce je 2 hodiny [9]. Pokud jsou guaninové nebo adeninové báze ve vhodné vzdálenosti, vzniká bifunkční vazba (Obr. 7).

Tato bifunkční vazba může vzniknout buď na nukleotidech ležících na stejném vlákně, pak se jedná o vnitřetězcové můstky, nebo dojde ke spojení nukleotidů patřících do různých vláken dvojšroubovice, tehdy se hovoří o meziřetězcových spojeních (Obr. 4).



Obr. 7: Možnosti vzniku bifunkční vazby . (a) vnitrořetězcový můstek mezi sousedními zbytky guaninu, (b) vnitrořetězcový můstek mezi sousedními zbytky guaninu a adeninu, (c) vnitrořetězcový můstek mezi dvěma zbytky guaninu oddělenými další bází, (d) meziřetězcový můstek mezi zbytky guanine, (e) monofunkční adukt, (f) můstek mezi řetězcem DNA a molekulou proteinu

Pravděpodobnost různých vazeb ukazuje tab. 2.

Vnitrořetězcové vazby	
pravděpodobnost	adukt
65%	G- G
25%	A- G
7%	G- X- G

Tab. 2: Pravděpodobnost vzniku bifunkční vnitrořetězcové vazby mezi cisplatinou nukleotidy v DNA

2. 1. 4. Resistance a opravy poškození

Při léčbě cisplatinou velmi často dochází k vzniku buněčné rezistence k tomuto léčivu. Po vstupu do cytoplasmy je cisplatina aktivně exportována z buňky pomocí ATP7A a ATP7B transportérů, což snižuje koncentraci léčiva uvnitř buňky [10]. To má za následek snížení možnosti utvořit vazbu mezi cisplatinou a DNA.

Cisplatina ovšem reaguje i s dalšími buněčnými proteiny, jako jsou glutathion nebo metallothionein [12].

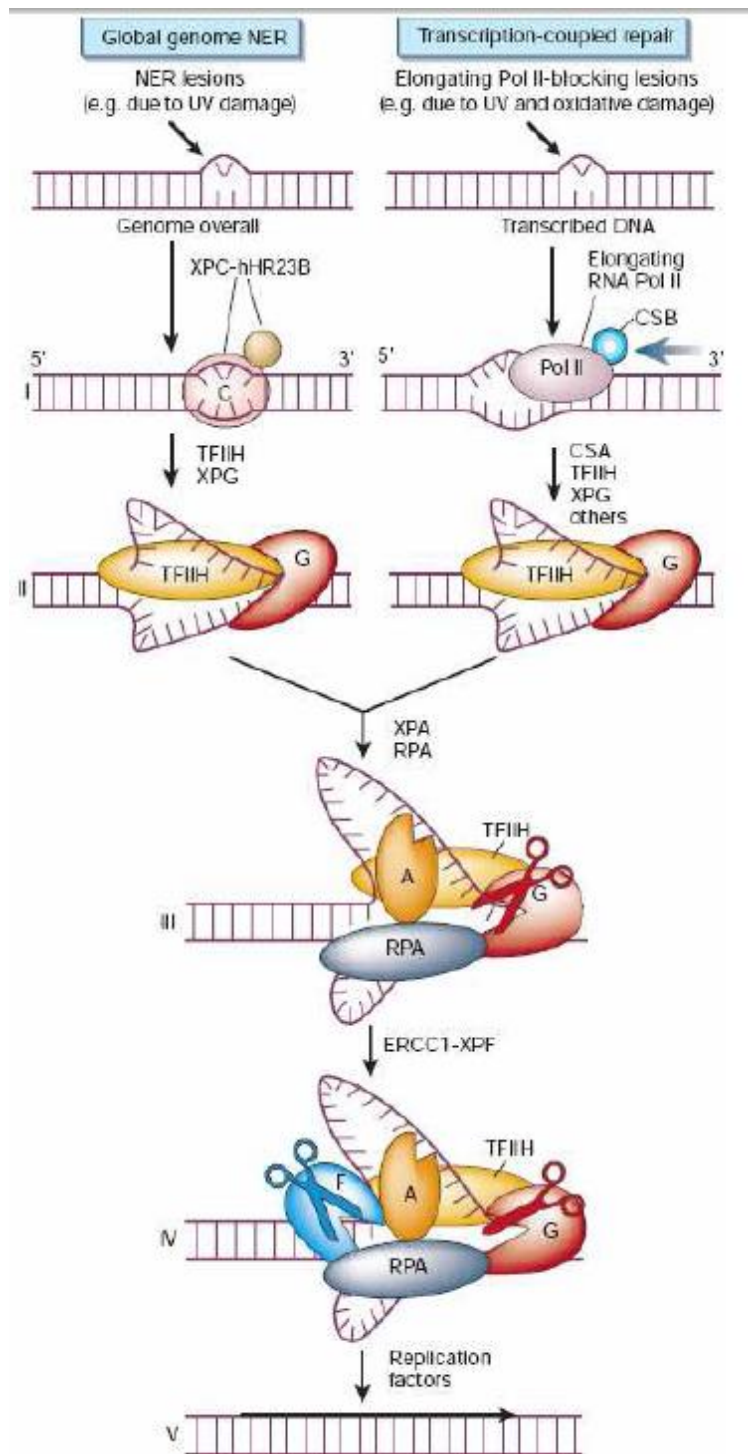
Glutathion je tripeptid složený z kyseliny glutamové, cysteinu a glycinu. Jeho koncentrace v cytoplasmě je 0,5 – 10 mmol/l [13]. Glutathion reaguje s cisplatinou v poměru 2:1. Vzniklý komplex platina-protein je aktivně transportován z buňky pomocí ATP-dependentní GS-X pumpy; popřípadě tvoří s platinou monofunkční komplex, čímž snižuje účinek farmaka [14].

Metallothionein je protein bohatý na aminokyselinu cystein. Jeho úlohou v buňce je vázat jak fyziologicky přítomné kovy např. zinek, selen nebo měď, tak i xenobiotika např. arsen, kadmium a jiné těžké kovy [15]. Vznik vazby mezi tímto proteinem a platinou tedy opět snižuje účinek léčiva.

Posledním faktorem ovlivňující účinnost léčiva je zvýšená schopnost buňky opravit poškozenou DNA mechanismem nukleotidové excizní opravy [16].

Nukleotidová excizní oprava (NER) byla například popsána pro modifikované pyrimidinové báze, u nichž je výrazným způsobem změněna sekundární struktura. K takovému poškození může dojít několika způsoby. Příkladem je tvorba dimerů vlivem UV záření nebo oxidativním poškozením DNA. Dalším možným způsobem je modifikace DNA navázáním těžkých kovů, včetně komplexů platiny.

Postup nukleotidové excizní opravy (Obr. 8) začíná tím, že proteiny XPA a XPC se naváží na poškozené místo. Úsek DNA je rozvolněn proteinem TFIIH (enzymem ze skupiny helikas), čímž vzniká preiniciační komplex 1. Ten je následně stabilizován vazbou proteinu XPG za vzniku preiniciačního komplexu 2. Nepoškozené ss-DNA vlákno je stabilizováno replikačním proteinem A. Protein XPG vystřihne ve směru 3'-konce 2-10 nukleotidů. Poté následuje navázání proteinů ERCCI- XPF, který provádí vystřížení 20- 26 nukleotidů ve směru 5'-konce. V posledním kroku speciální D/E polymeráza dosyntetizuje chybějící část vlákna, která je spojena enzymy ligázami.

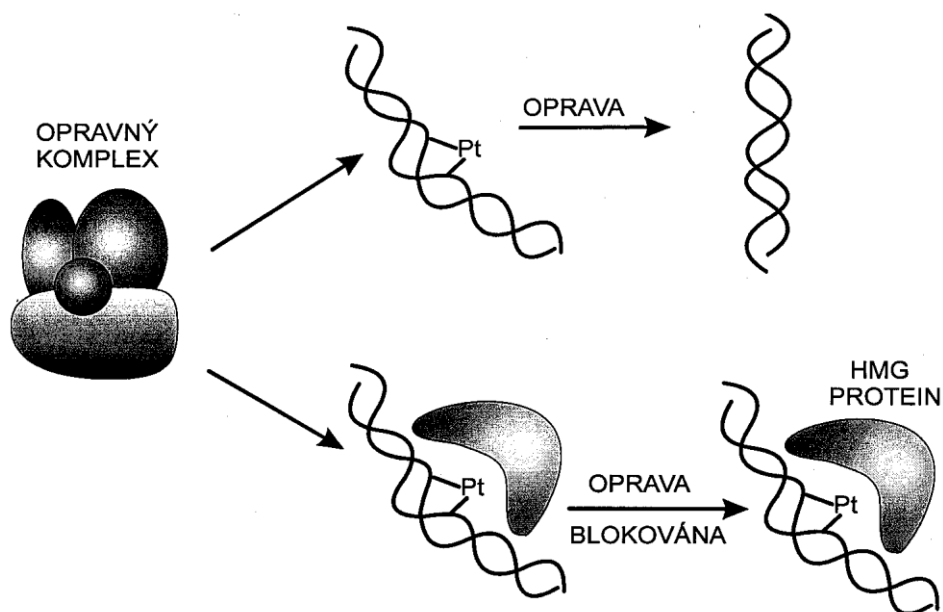


Obr. 8: Schéma nukleotidové excizní opravy při poškození UV zářením nebo oxidačním stresem.

K výraznému poškození sekundární struktury DNA může dojít právě v důsledku navázání platinového komplexu na purinové báze. Takové místo je dále rozpoznáno skupinou proteinů HMG.

Proteiny HMG (high mobility group) je souborné označení pro nadrodinu početných jaderných proteinů, které vykazují vysokou pohyblivost v elektrickém poli při gelové elektroforéze. Tyto proteiny se váží na nukleosomy a DNA, čímž způsobí strukturální změny v chromatinovém vlákně. Skupina HMG proteinů je rozdělena do tří podskupin: HMG-1/-2, HMG-I/Y a HMG-14/-17.

Na jednom závitě dvojšroubovice DNA je vzdálenost mezi bázemi 3,4 Å. Jelikož cisplatina nemůže vytvořit na takovou vzdálenost bifunkční adukt, dochází proto k ohybu DNA. V místě ohybu poté dochází k navázání HMG proteinů. Enzym polymeráza poté nemůže ze sterických důvodů pokračovat v syntéze nového vlákna a replikace se zastaví. Buňky, které obsahují takovou polymerázu, která dokáže i přes tuto sterickou blokaci pokračovat v syntéze nového vlákna, se poté označují jako k cisplatině resistantní buňky. Schéma funkce HMG proteinů ukazuje Obr. 9.



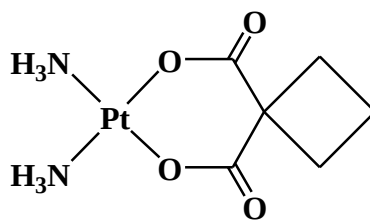
Obr. 9: Ukázka funkce HMG proteinů na místě s navázanou cisplatinou. Převzato z [1].

2. 2. Platinová cytostatika další generace

I přes vysokou úspěšnost léčby některých typů nádorů je cisplatina toxická a buňky si na ni mohou vytvořit resistenci. To byl impuls pro hledání nových cytostatik fungujících na podobném principu. Jde především o analogy cisplatiny, transplatiny a polynukleární komplexy platiny třetí generace. Farmaka druhé generace vykazují účinnost na podobném spektru nádorů jako cisplatina, ovšem se sníženou toxicitou. Z velkého množství připravených sloučenin se celosvětově používají jen karboplatina a oxaliplatina.

2. 2. 1. Karboplatina

Karboplatina (Obr. 10) (*cis*-diammin-cyklobutan-1,1'-dikarboxylátplatnatý komplex) je platinové cytostatikum druhé generace [17], které vychází z cisplatiny, proto je spektrum nádorů, u nichž karboplatina vykazuje klinickou účinnost, stejné jako v případě cisplatiny. Odstupující ligand je v buněčném prostředí disociován pomaleji než odstupující chloridové ionty, proto je cytotoxicita karboplatiny nižší. Hlavní mechanismus protinádorové aktivity spočívá v inhibici syntézy DNA.



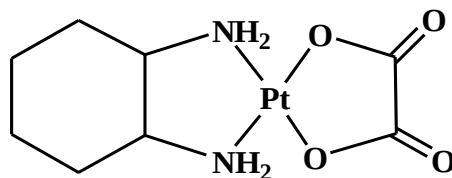
Obr. 10: Strukturní vzorec karboplatiny

I přes relativně malý rozdíl ve struktuře karboplatiny a cisplatiny, která se liší pouze odstupující skupinou (odstupující skupinou je cyklobutyldikarboxylát místo dvou chloridů), má karboplatina odlišnou sekvenční preferenci [18], ale vytváří adukty v podobném procentuálním zastoupení:

- 1,3 - vnitřetězcové d(GXG) - 36%
- 1,2 – vnitřetězcové : d(GG) - 30%
: d(GA) – 16%
meziřetězcové d(GG) můstky - 3 – 4%

Nejčastěji se vyskytujícím aduktem je 1,3 - vnitřetězcový d(GXG) adukt.

2. 2. 2. Oxaliplatina



Obr. 12: Strukturní vzorec oxaliplatiny

Oxaliplatina (Obr. 12); (1R, 2R-diammin-cyklohexan-oxalátplatnatý komplex) je dalším cytostatikem odvozeným od cisplatiny. Na rozdíl od ní však vykazuje účinnost proti nádorům tlustého střeva [19], [20] a to v kombinaci s 5- fluorouracilem a leucovorinem [20],[21].

Oxaliplatina tvoří:

- 1,2 vnitřetězcové: d(GG) - 60 - 65%
d(AG) - 25 - 30%
- 1,3 - d(GXG) vnitřetězcové - 5 - 10%
- mezitřetězcové d(GG) můstky - 1 - 3%

Substitucí chloridových iontů byla tedy změněna účinnost léčiva, což vedlo k hypotéze, že změna ve struktuře farmaka může vést k vylepšení jeho terapeutických vlastností.

2. 3. Polynukleární platinová cytostatika

Všechna předešlá léčiva, ačkoliv se liší odstupující skupinou, jsou deriváty cisplatiny a jejich strukturu lze napsat vzorcem $\text{cis-} \langle \text{PtX}_2(\text{amin})_2 \rangle$.

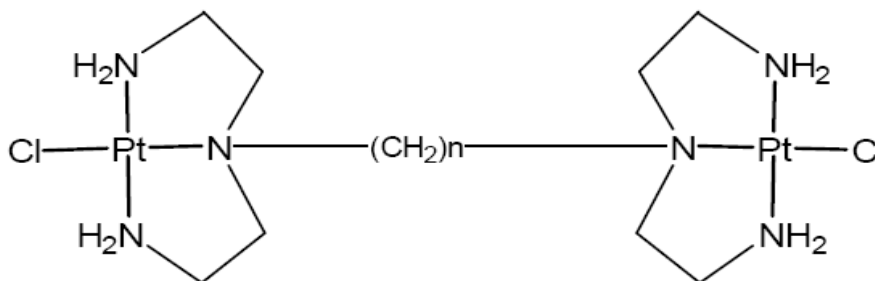
Snaha o nalezení farmaka s nižší toxicitou, širším spektrem protinádorové aktivity a malou možností vzniku resistance vedla k teorii, že výrazné změny v protinádorové aktivitě může dosáhnout léčivo zejména v případě, že se bude výrazně lišit ve struktuře od struktury cisplatiny.

Polynukleární platinové komplexy jsou tvořeny dvěma až čtyřmi platinovými jádry, které jsou spojeny diaminovým řetězcem různé délky. Odstupující chloridové ligandy mohou zaujímat vůči spojovacímu řetězci konfiguraci *cis* nebo *trans*.

První dvojjaderný komplex byl zveřejněn prof. Farrelem v roce 1988, trojjaderný motiv byl uveden v roce 1993.

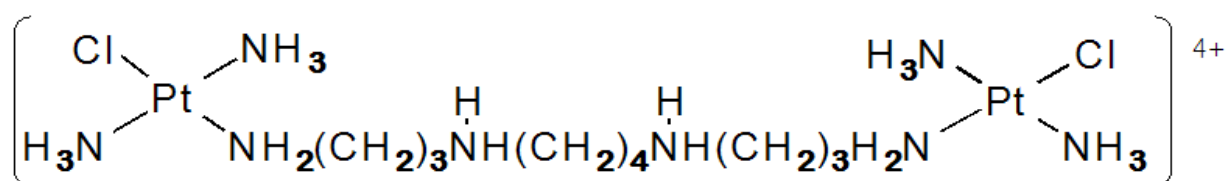
2. 3. 1. Dinukleární komplexy

Dvojjaderné komplexy jsou tvořeny spojením dvou platinových jednotek pomocí alkanového řetězce lišícího se počtem uhlíků (Obr. 13). Délka můstku zásadně ovlivňuje chování celé molekuly. S rostoucí délkou alkanového řetězce se snižuje polarita komplexu, což má za následek snadnější průnik do cytoplasmy resp. do jádra.

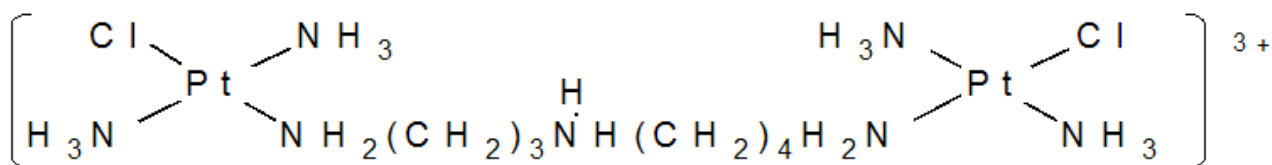


Obr. 13: Strukturní vzorec dinukleárních komplexů

Klinicky dobré výsledky přináší studium dinukleárních platinových komplexů spojených sperminovým (Obr. 14) nebo spermidinovým řetězcem (Obr. 15). Tento kladně nabitý řetězec se pomocí kovalentní vazby váže na záporně nabitou DNA, čímž umožňuje pevnější vazbu molekuly cytostatika. Díky tomu může být léčebná dávka farmaka nižší než v případě cisplatiny a jejích derivátů.



Obr. 14: Dinukleární komplex se sperminovým řetězcem



Obr. 15: Dinukleární komplex se spermidinovým řetězcem

Mezi nejznámější dinukleární komplexy se spermidinovým řetězcem patří: BBR3571 a BBR3537; komplexy se sperminovým řetězcem jsou BBR3610 a BBR3535.

Komplex se spermidinovým řetězcem BBR3610 vykazoval z celé skupiny nejvyšší toxicitu; jeho nejvyšší tolerovaná dávka byla 100x nižší než u cisplatiny. Z tohoto důvodu nebyl využit pro další testy.

III.CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je studovat interakce nových protinádorově účinných dvojjaderných komplexů platiny s DNA, která je cílovým místem působení této třídy cytostatik, a to v prostředí *in vitro*. Diplomová práce se snaží přispět k lepšímu porozumění mechanismu protinádorového působení dvojjaderných komplexů platiny.

Pro zjištění informací byly použity tyto metody:

- Gelová elektroforéza
- Bezplamenná atomová absorpční spektrometrie
- Spektro fluorimetrie
- Cirkulární dichroismus

IV. MATERIÁL A METODY

4. 1. Použité chemikálie

Všechny použité chemikálie byly p. a. čistoty. Při všech experimentech byla použita deionizovaná voda.

Komplexy Pt-7, Pt-10 a Pt-12 byly poskytnuty prof. Gibsonem, Hebrew University, Jerusalem, Izrael.

Cisplatina byla získána od firmy Sigma Praha.

DNA z telecího thymu byla připravena na Biofyzikálním ústavu AV ČR, v.v.i. v Brně postupem popsaným v [24].

Plasmid pSP73KB byl připraven podle standardních procedur.

Agaróza byla od firmy Biotech.

Ethidium bromid byl od firmy JM Biomedicals.

4. 2. Použité roztoky a pufry

Roztok bromfenolové modři:	40 % sacharóza
	0,25 % bromfenolová modř

TAE (Tris- acetátový pufr):	0,04 M Tris- acetát
	0,001 M EDTA

Roztok EtBr:	0,2 µg/ml
--------------	-----------

Roztok NaClO ₄ :	0,001 M
-----------------------------	---------

TBE (Tris- borátový pufr):	0,09 M Tris- borát
	0,001 M EDTA

Alkalický pufr	0,03 M NaOH
	0,001 M EDTA

Roztok NaCl	4 M
-------------	-----

NaOH	4 M, 1 M
------	----------

Výsledky elektroforetických experimentů byly vyhodnoceny na transiluminátoru Herolab UVT-20M.

4. 3. Metody

4. 3. 1. Izolace DNA

DNA z telecího thymu (42 % G + C; $M_r = \sim 2 \cdot 10^7$) byla připravena podle..... Plazmidová DNA (2464 pb, nadšroubovicová hustota $\sigma = -0,063$) byla izolována z bakterií *E. Coli* nesoucí plasmid pSP 73 pomocí soupravy QUIAGEN.

4. 3. 2. Modifikace DNA platinovými komplexy

DNA byla inkubována po dobu 24 hodin při 37° C s roztoky komplexů Pt-7, Pt-10 a Pt-12 (dle požadovaného stupně modifikace r_b), a to v prostředí 0,001 M NaClO₄.

4. 3. 3 Dialýza DNA

Dialyzační membrána byla nejdříve vyvařena v destilované vodě s přidavkem malého množství EDTA po dobu 10 minut. Poté byla propláchnuta a dvakrát převařena v samotné destilované vodě po dobu 10 minut. Pak byl vzorek s DNA uzavřen do dialyzační membrány a dialyzován proti 3 litrům 0,001 M NaClO₄ po dobu 12 hodin. Dialyzační roztok chloristanu byl během této doby dvakrát vyměněn za čerstvý.

4. 3. 4. Elektroforéza v nativním gelu

1% agarózový gel na nativní elektroforézu byl připraven odvážením příslušného množství práškové agarózy do Erlenmeyerovy baňky. Následně bylo toto množství rozvařeno ve vodě s přidavkem 1x TAE pufru a nalito na elektroforetickou plotnu vhodné velikosti s hřebínkem a ponecháno tuhnout. Po ztuhnutí gelu byl hřebínek vyjmut a plotna s gelem byla ponořena do elektroforetického tanku. Do něj byl přidán elektrolyt- 1x TAE. Do vzorků byl také přidán TAE pufr, a to v takovém množství, aby jeho koncentrace ve vzorku byla 1x. Poté byla přidána ke vzorkům bromfenolová modř (1/6 objemu vzorku) a

obarvené vzorky byly nanесeny na gel. Na gel bylo aplikováno stejnosměrné napětí o velikosti 20 V. Elektroforéza probíhala za laboratorní teploty 25°C, a to do doby, než čelo vzorků doputovalo přibližně do poloviny délky gelu. Barvení bylo provedeno třepáním gelu ve vhodné nádobě s přidavkem ethidium bromidu- látky, která se interkaluje mezi páry bází DNA a to o koncentraci 0,2 µg/ml. Třepání probíhalo 30 minut za nepřístupu světla. Po obarvení a následném odbarvení (z důvodu snížení interferenčního pozadí při vyhodnocení) byl gel pozorován na UV transiluminátoru.

4. 3. 5. Elektroforéza v denaturačním agarózovém gelu.

1% agarózový gel na denaturační alkalickou elektroforézu byl připraven odvážením příslušného množství práškové agarózy do Erlenmeyerovy baňky. Následně bylo toto množství rozvařeno ve vodě. Po ochladnutí na teplotu okolo 60°C bylo přidáno tolik 4 M NaCl, aby jeho výsledná koncentrace byla 0,03 M a EDTA, aby jeho výsledná koncentrace byla 0,001 M. Poté byl gel nalit na elektroforetickou plotnu s hřebínkem a ponechán tuhnout. Následně byl vložen do elektroforetického tanku, zalit alkalickým pufrem a ponechán přes noc při teplotě 4°C. Před dávkováním vzorku do jamek byl alkalický pufr vyměněn za nově připravený. Do vzorků byl přidán NaOH tak, aby jeho koncentrace byla 1 M a roztok bromfenolové modři (1/6 objemu vzorku). Elektroforéza probíhala 30 minut při 30 V a 4 hodiny při napětí 35 V. Poté byl gel neutralizován třepáním v 1x TBE pufru po dobu 30 minut a následně barven ethidium bromidem po stejnou dobu. Gel byl poté proprán v destilované vodě a vyhodnocen na UV transiluminátoru.

4. 3. 6. Cirkulární dichroismus

CD Spektra DNA omodifikované platinovými komplexy byla naměřena v prostředí 0,001 M NaClO₄ při laboratorní teplotě na spektropolarimetru JASCO- J720.

4. 3. 7. Měření teploty tání

Denaturační křivky DNA modifikované platinovými komplexy a kontroly byly změřeny na UV-VIS spektrofotometru Varian Cary 4000. Měření probíhalo při vlnové délce 260 nm v prostředí 10 mM NaClO₄ a 100 mM NaClO₄. Teplota tání byla poté určena jako první derivace křivek tání.

4. 3. 8. Stanovení vazby platinových komplexů na DNA

DNA byla inkubována s platinovými komplexy při teplotě 37 °C. Pro určení stupně vazby byl v různých časech odebrán vzorek a napipetován na equilibrovanou sephadexovou kolonku. Ta byla poté centrifugována při 2500 ot./min a 25 °C po dobu 4 minut. Eluát obsahující jen omodifikovanou DNA byl změřen na spektrofotometru při vlnové délce 260 nm a byla určena koncentrace DNA ve vzorku. Část vzorku byla odebrána a následně byla metodou AAS změřena koncentrace platinových iontů. Z těchto údajů byla vypočítána r_b hodnota. Hodnota r_b je definována jako počet molekul komplexu platiny navázaného na jeden nukleotidový zbytek DNA.

Další metodou k určení hodnoty r_b byla dialýza vzorku. Z reakční směsi DNA- platina byl vzorek odebrán a dialyzován v prostředí NaClO₄. Poté byla spektrofotometricky určena koncentrace DNA a metodou FAAS byla určena koncentrace platiny.

4. 3. 9. Zhášení fluorescence ethidium bromidu

DNA z telecího thymu byla omodifikována platinovými komplexy. Kontrolní vzorek tvořila DNA s navázanou cisplatinou. Všechny vzorky byly inkubovány 24 hodin při 37 °C v prostředí 10 mM NaClO₄. Po 24 hodinách byl do vzorků přidán ethidium bromid a následně byla měřena intenzita fluorescence.

4. 3. 10. Rozvíjení DNA

Pohyblivost plasmidové DNA při elektroforéze je ovlivněna také terciální strukturou DNA. V relaxované formě bez nadšroubovicového vinutí (OC forma) migruje plasmid pomaleji než v případě, kdy převažuje zavinutá forma.

Při modifikaci DNA platinovými komplexy dochází k jejímu lokálnímu rozvíjení. S rostoucí koncentrací platiny klesá elektroforetická pohyblivost plasmidu jako důsledek vzniku relaxované formy DNA. Situace, kdy dochází k úplnému rozvinutí DNA, se nazývá bod ekvivalence. Dalším zvyšováním koncentrace platiny dochází k opětovnému zavíjení a tím i zvýšení elektroforetické mobility DNA, tentokrát ale v opačném směru. Úhel rozvinutí připadající na jeden adukt se vypočítá podle vztahu:

$$\Phi = -\frac{18\sigma}{r_b(c)},$$

Kde σ je superhelikální hustota pro daný plasmid, $r_b(c)$ je stupeň modifikace, při němž dochází ke komigraci obou frakcí. Pro plasmid pSP73KB je $\sigma = -(0,0578)$.

Plasmid byl inkubován s platinovými komplexy a cisplatinou v prostředí 10 mM NaClO₄ 24 hodin při 37 °C. Poté byly vzorky s různými r_b elektroforeticky rozděleny na 1% agarózovém gelu v TAE pufru. Po obarvení ethidium bromi byl gel vyhodnocen na transiluminátoru.

4. 3. 11. Určení množství meziřetězcových můstků

Linearizovaná plasmidová DNA je omodifikovaná platinovými komplexy a inkubována 24 hodin při 37 °C. Poté je přidán 4M NaOH a dochází k rozštěpení ds DNA na ss DNA. Denaturace nenastává, je-li fragment stabilizován navázaným platinovým komplexem. V závislosti na rostoucím r_b roste počet meziřetězcových můstků a tím také intensita ds frakce. Množství meziřetězcových můstků je dáno vztahem:

$$\frac{\%IEC}{Pt} = \frac{XL}{r_b \cdot 4910}$$

kderb je stupeň modifikace, 4910 je počet nukleotidů plasmidu. XL je počet IEC na jednu molekulu linearizovaného DNA duplexu; je určen pomocí Poissonova rozdělení vztahem:

$$XL = -\ln SS$$

Kde SS znamená frakci DNA bez meziřetězcových můstků.

Metoda měření IEC pomocí ethidium bromidu je zatížena chybou, jelikož řetězce propojené platinovými komplexy renaturují snaději, tudíž dochází k interkalaci většího množství EtBr. Tato chyba se odstraňuje použitím přepočítávacího faktoru $f = 1,55$.

4. 1. 12. Transkripční mapování

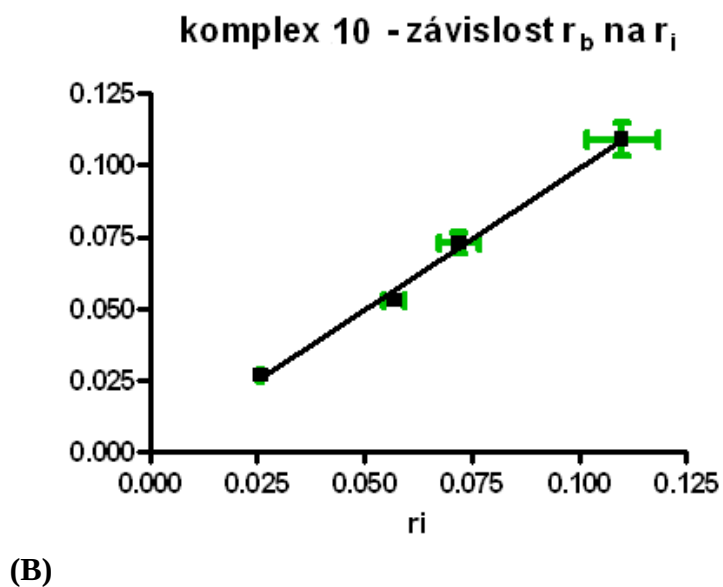
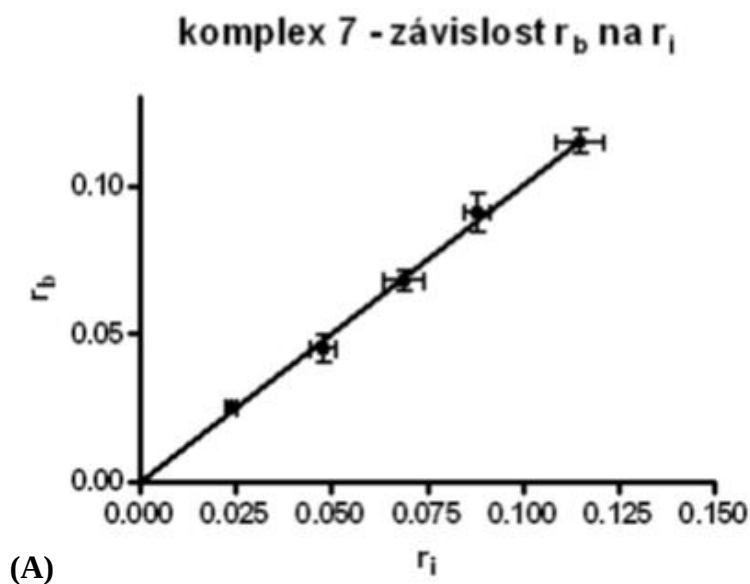
Fragment plasmidové DNA pSP73KB byl linearizován pomocí NdeI a omodifikován platinovými komplexy na hodnotu $r_b = 0,001$. Inkubace probíhala v 10 mM NaClO₄ při 37°C po dobu 24 hodin. Nezareagované komplexy byly odstraněny srážením s ethanolem. Po alkalické denaturaci byl přidán SP6 primer (VBC Genomic Austria). Syntéza DNA probíhala pomocí enzymu sekvenáza 2 (Amersham Pharmacia) za přítomnosti radioaktivně značeného [α -³²ATP] a neznačených dNTP podle protokolu firmy. Produkty syntézy byly separovány na denaturujícím polyakrylamidovém gelu (6 % polyakrylamid / 8 M močovina) v paralelním uspořádání s nemodifikovanou DNA jako kontrolou. Po skončení elektroforézy byl gel vizualizován opět pomocí zařízení Fujifilm BAS-2500 v programu Image reader BAS-2500.

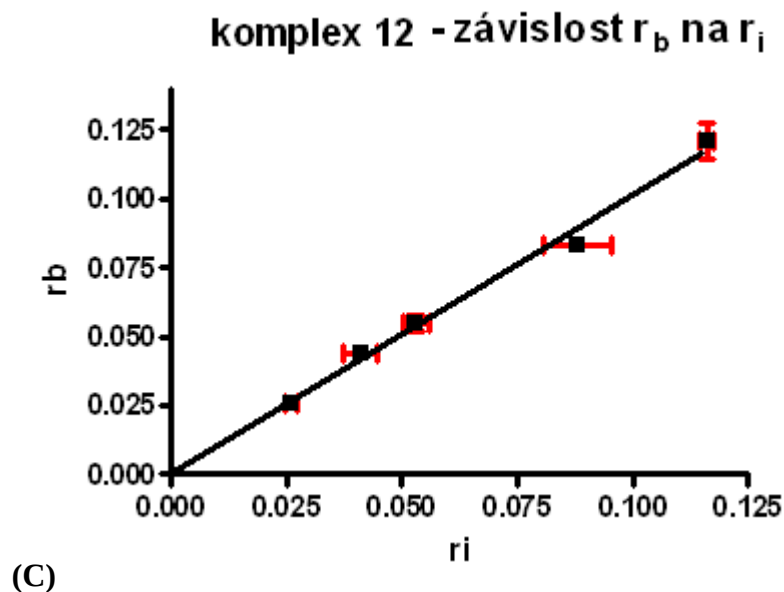
V. VÝSLEDKY

5. 1. Vazba platinových komplexů na tt- DNA

5. 1. 1. Srovnání teoretické a skutečné vaznosti komplexů

Hodnoty r_b (r_b je definováno jako počet molekul komplexu platiny navázaného na jeden nukleotidový zbytek DNA) získané při měření koncentrace komplexů FAAS byly vyneseny do grafu oproti teoretickým hodnotám r_i (r_i je definováno jako počet molekul komplexu platiny připadajících na jeden nukleotidový zbytek DNA na začátku reakce).



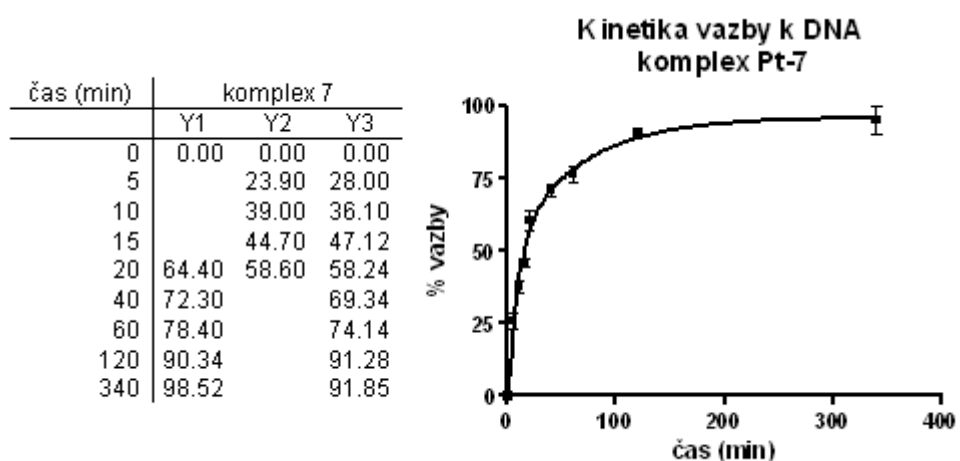


Obr. 1: Závislost r_b na hodnotě r_i pro (A) komplex Pt- 7, (B) komplex Pt- 10,
(C) komplex Pt- 12

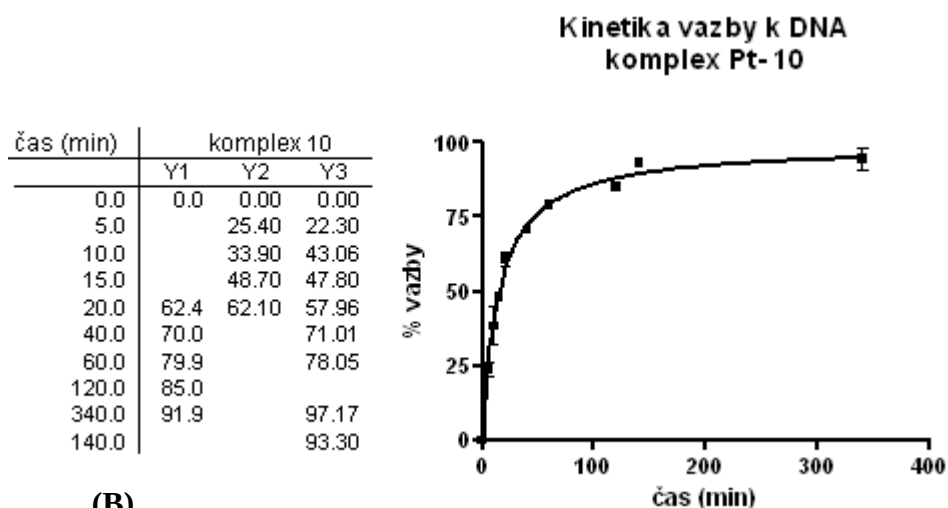
Studovaná závislost byla lineární (Obr. 1) v celém rozsahu r_i . To znamená, že vazba všech platinových komplexů na DNA je kvantitativní. Tento poznatek je velmi důležitý pro další experimenty, při nichž je tak možné modifikovat DNA na předem stanovenou hodnotu r_b .

5. 1. 2 Kinetika vazby platinových komplexů

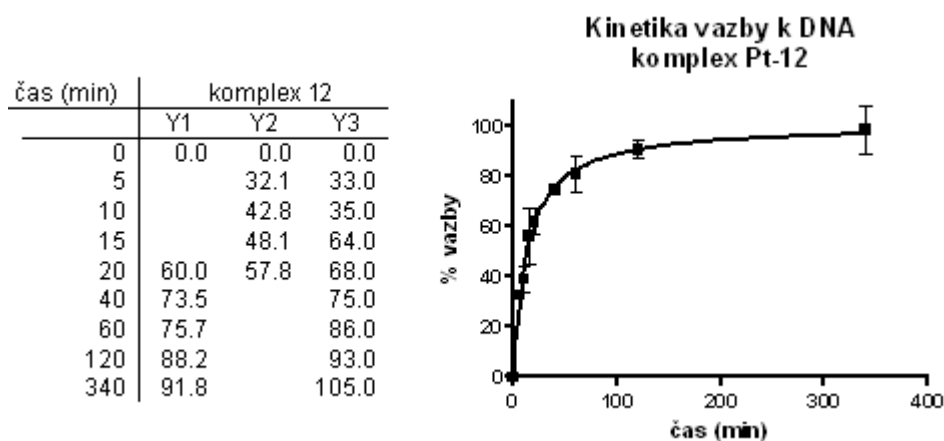
Oddělením omodifikované DNA na sephadexové kolonce od nenavázané platiny a následným změřením koncentrace platiny metodou AAS byla stanovena kinetika vazby komplexů na telecí thymovou- DNA. Průběh měření je pro všechny studované komplexy znázorněn na obr. 2.



(A)



(B)



(C)

Obr. 2: Kinetika vazby pro (A) Pt- 7, (B) Pt- 10, (C) Pt- 12

Při tomto experimentu byl měřen přírůstek navázané platiny v čase. Pro studované komplexy byl vypočítán čas $t_{1/2}$. $T_{1/2}$ je takový čas, kdy je vyvázáno právě poloviční množství platiny v reakci. Výsledky byly získány zprůměrováním hodnot tří měření. Poločas cisplatiny je 120 minut. Poločasy jednotlivých komplexů udává tabulka 1.

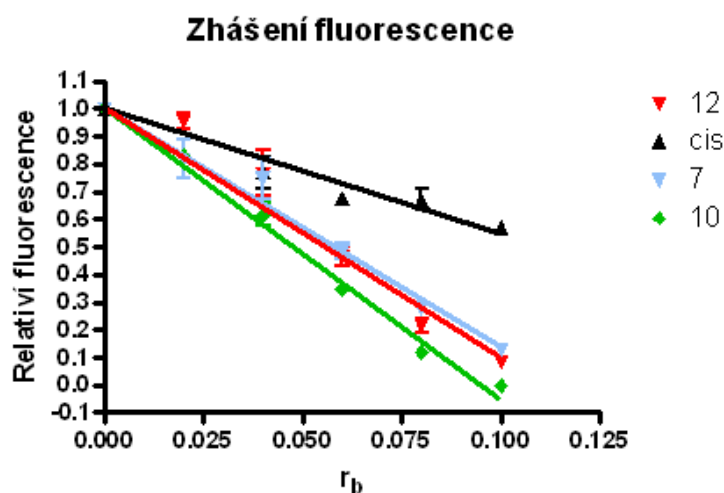
Komplex	$t_{1/2}$ (min)
Pt- 7	16,3
Pt- 10	15,5
Pt- 12	13,4
Cisplatina	120

Tab. 1: Hodnoty poločasů vazby pro tři studované komplexy a referenční cisplatinu

Naměřené výsledky ukazují, že všechny studované komplexy se vážou na DNA mnohem rychleji než cisplatina.

5. 2. Zhášení fluorescence ethidium bromidu

Ethidium bromid je látka, která má schopnost vmezeřit se do DNA. Po její interkalaci a následné excitaci zářením o vhodné vlnové délce dochází k fluorescenci. Na DNA omodifikovanou komplexy platiny je schopnost ethidium bromidu vázat se ze sterických důvodů blokována. Vmezeření barviva brání přítomnost bifunkčních aduktů. Jako referenční vzorek byla použita cisplatina. K měření byly použity komplexy o r_b od 0,01 po 0,08.



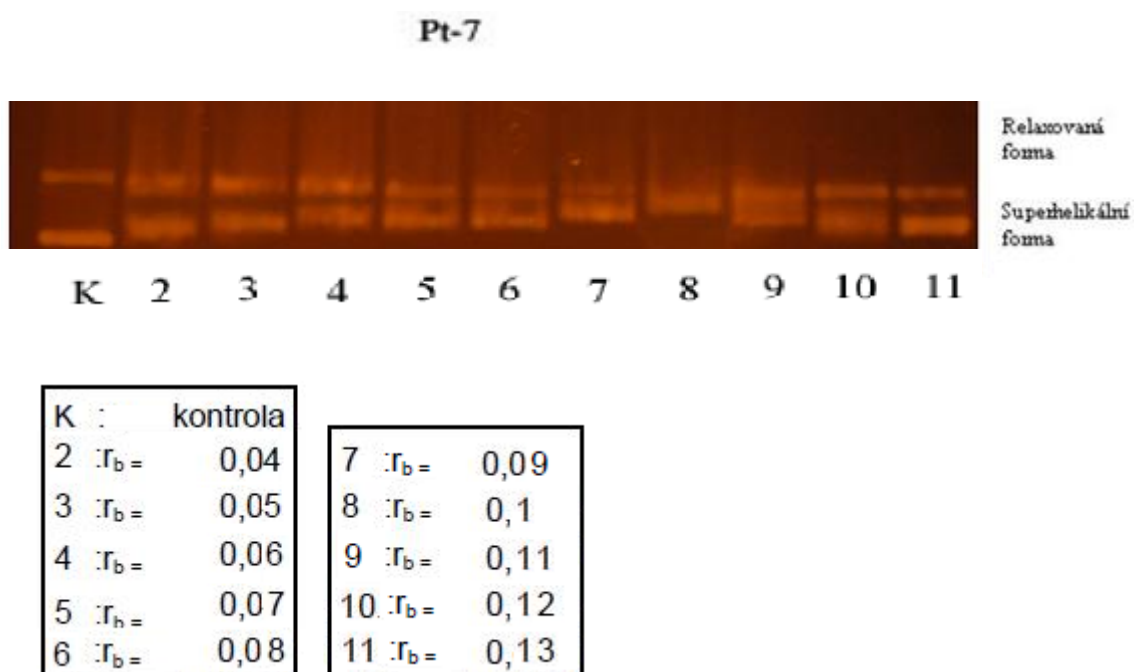
Obr. 3: Závislost intensity fluorescence na r_b

Výsledky představují průměrné hodnoty ze tří měření; odchylky jsou na grafu znázorněny úsečkami.

Z grafu závislosti intenzity fluorescence na koncentraci platiny (Obr. 3) vyplývá, že největší pokles fluorescence byl naměřen pro komplex Pt- 10. Pokles intenzity fluorescence ostatních studovaných komplexů se liší pouze o hodnotu chyby měření. Míra poklesu všech tří studovaných komplexů je pro dané r_b větší než ukontrolního vzorku cisplatiny. Toto zjištění je ve shodě s předpokladem, že molekula cisplatiny brání interkalaci ethidiumbromidu méně, než větší molekuly dinukleárních platinových komplexů.

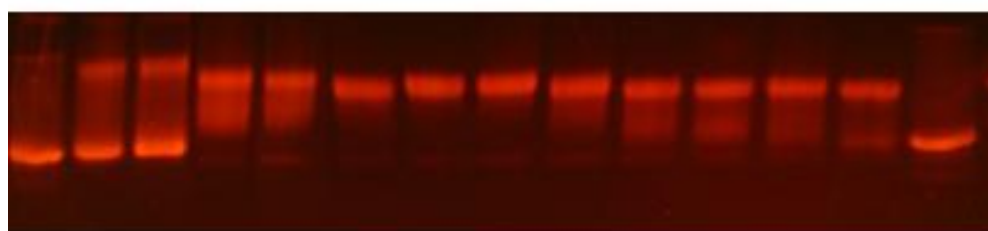
5. 3. Rozvíjení plasmidové DNA

Výsledky rozvíjení DNA po navázání platinových komplexů ukazuje obr 4. Z obrázků gelů je patrné, že všechny studované komplexy zvyšují elektroforetickou mobilitu relaxované formy DNA. Bod komigrace obou rozdělených forem je pro komplex Pt- 7 $r_b(c) = 0,1$, pro komplex Pt- 10 je $r_b(c) = 0,06$ a pro komplex Pt- 12 je $r_b(c) = 0,14$.



(A)

Pt_10

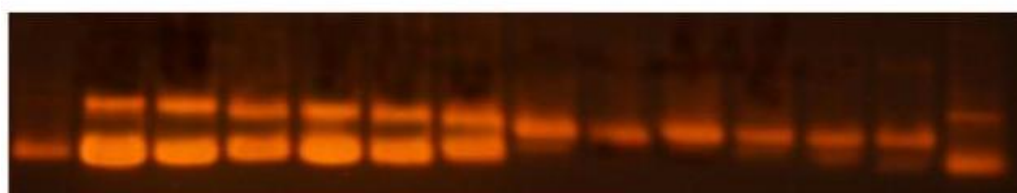


K 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 K

1 $\sigma_b = 0,07$	6 $\sigma_b = 0,12$	11 $\sigma_b = 0,17$
2 $\sigma_b = 0,08$	7 $\sigma_b = 0,13$	12 $\sigma_b = 0,18$
3 $\sigma_b = 0,09$	8 $\sigma_b = 0,14$	K : kontrola
4 $\sigma_b = 0,10$	9 $\sigma_b = 0,15$	
5 $\sigma_b = 0,11$	10 $\sigma_b = 0,16$	

(B)

Pt-12



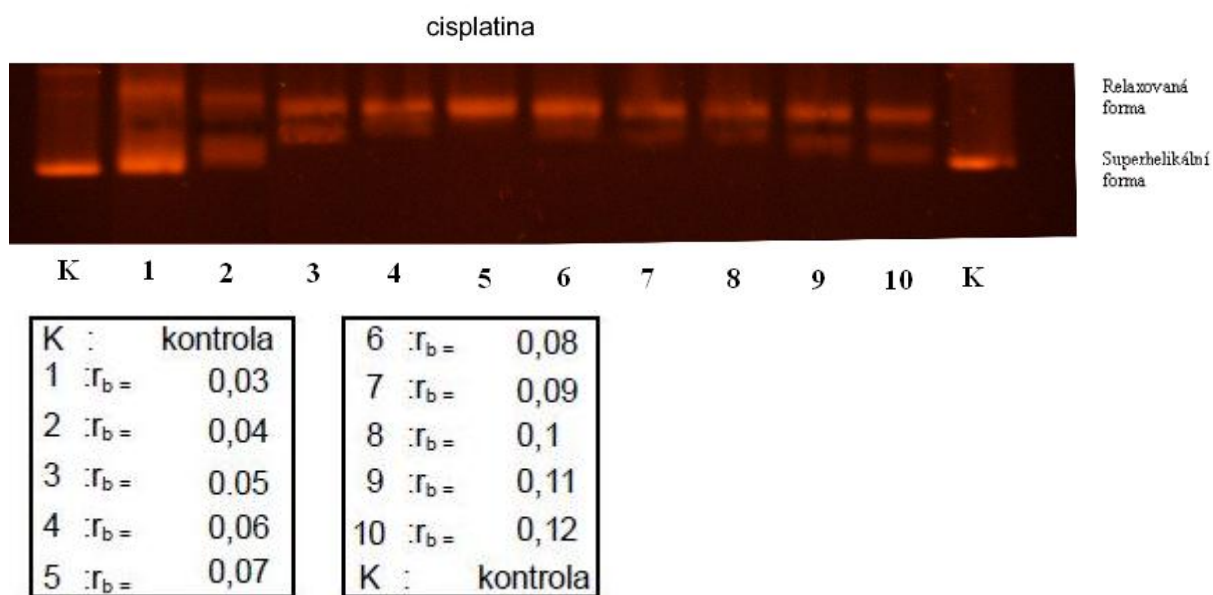
Relaxovaná
forma

Superhelikální
forma

K 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 K

1 $\sigma_b = 0,07$	6 $\sigma_b = 0,12$	11 $\sigma_b = 0,17$
2 $\sigma_b = 0,08$	7 $\sigma_b = 0,13$	12 $\sigma_b = 0,18$
3 $\sigma_b = 0,09$	8 $\sigma_b = 0,14$	K : kontrola
4 $\sigma_b = 0,10$	9 $\sigma_b = 0,15$	
5 $\sigma_b = 0,11$	10 $\sigma_b = 0,16$	

(C)



(D)

Obr. 4: Rozvíjení plasmidové DNA (A) komplexem Pt-7, (B) komplexem Pt- 10, (C) komplexem Pt-12 a (D) cisplatinou

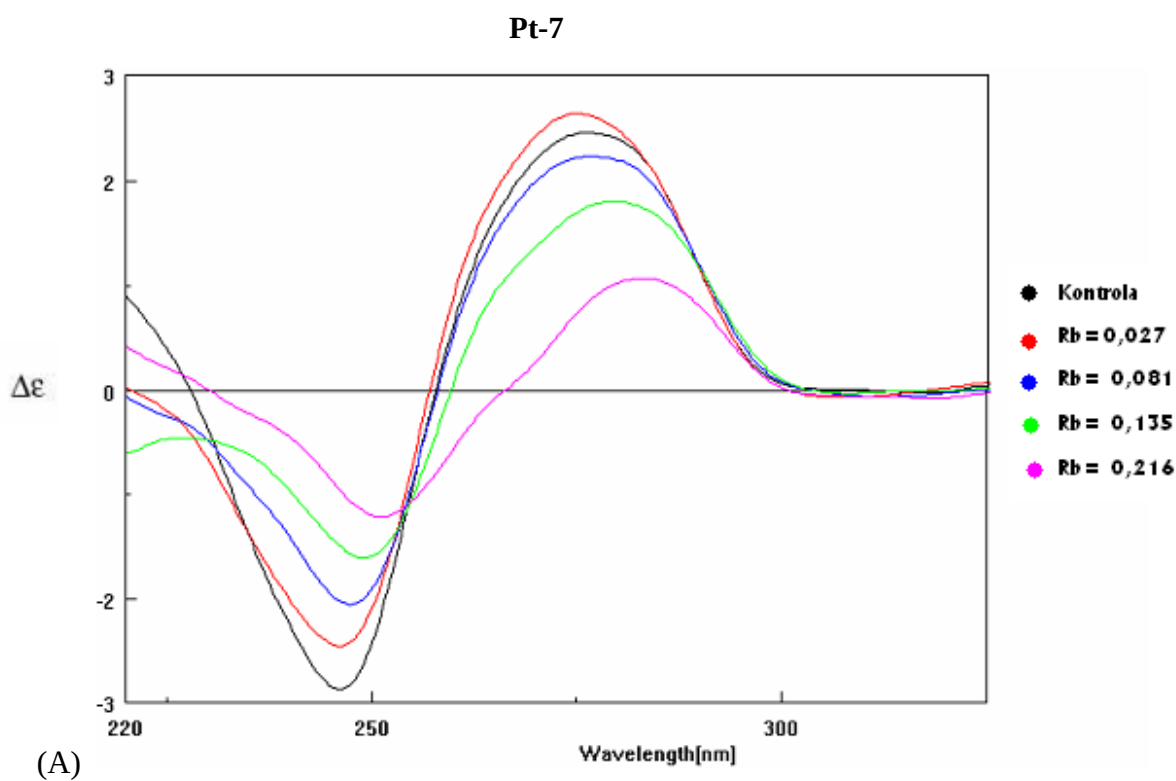
Po dosažení hodnot r_b z bodu komigrace do vztahu:

$$\Phi = -\frac{18\sigma}{r_b(c)},$$

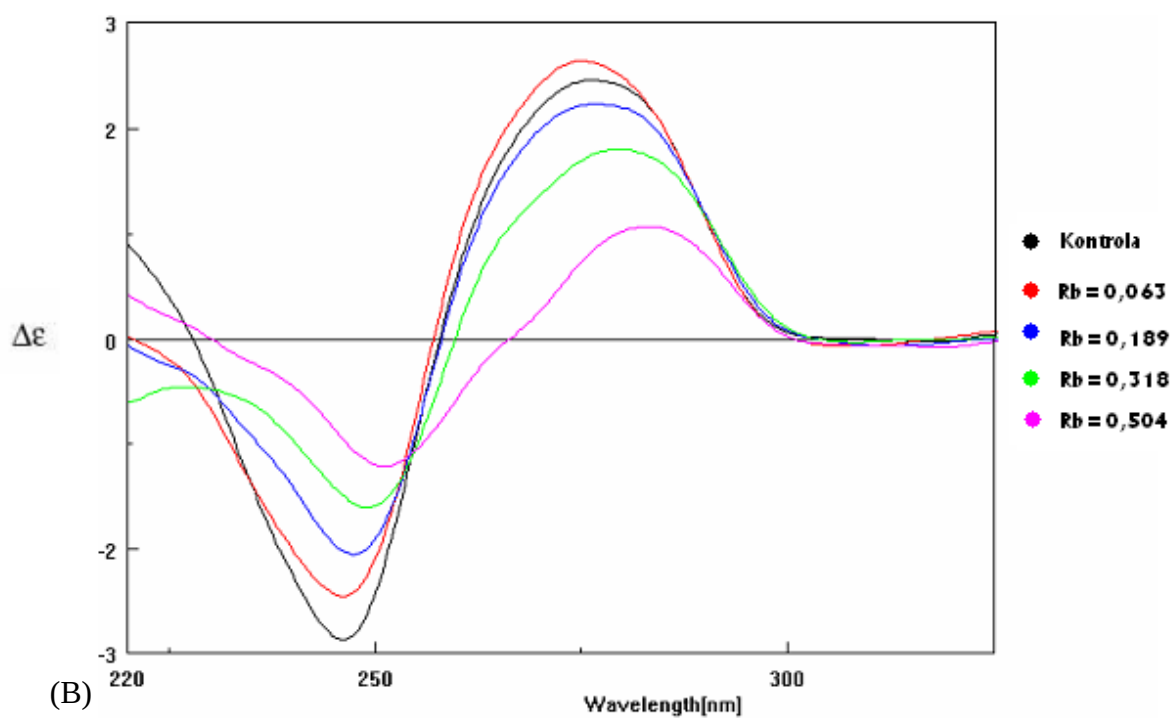
kde $\sigma = -0,0578$ (pro plasmid pSP73KB) byl určen úhel rozvinutí pro komplex Pt-7 $\Phi = (10,4 \pm 2,1)^\circ$, pro Pt-10 $\Phi = (8,7 \pm 1,4)^\circ$ a pro Pt-12 $\Phi = (7,43 \pm 1,1)^\circ$. Úhel rozvíjení pro platinu byl změřen $\Phi = -13^\circ$

5. 4. Spektra cirkulárního dichroismu

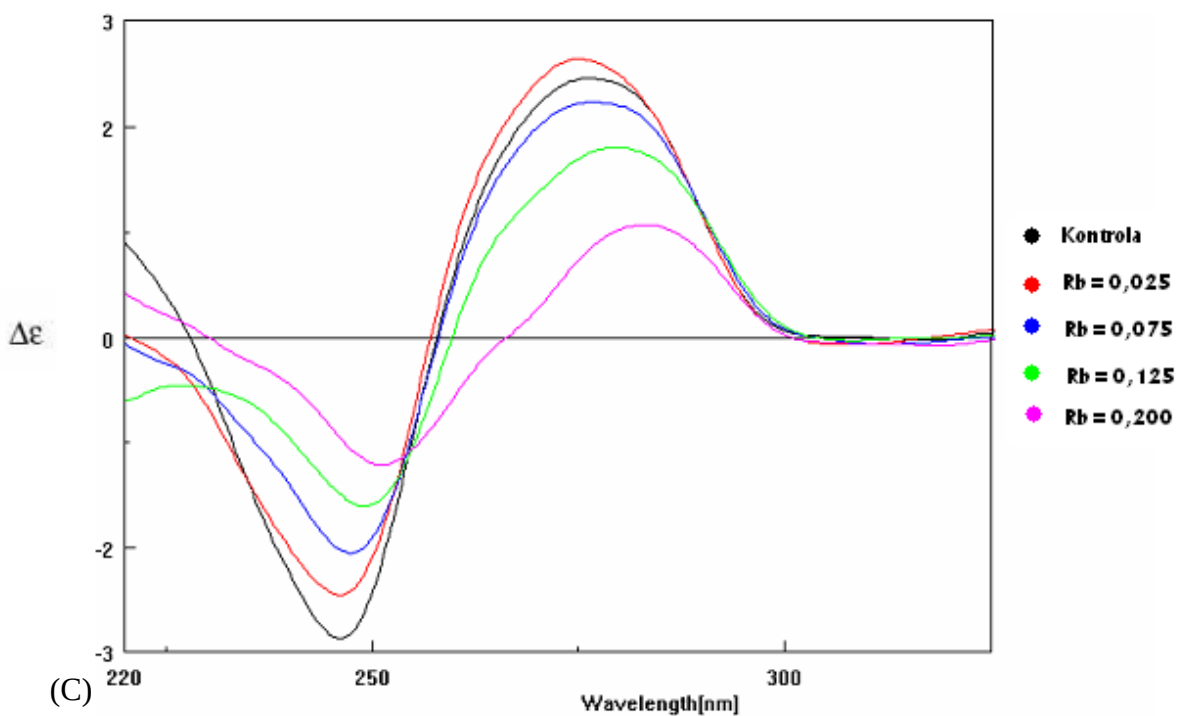
CD spektra byla měřena pro všechny tři studované sloučeniny v prostředí 0,01M NaClO₄. Thymová DNA byla omodifikovaná platinovými komplexy v rozmezí r_b od 0,01 po 0,08. Z grafu (obr. 5) je patrné, že po navázání komplexů na DNA dochází ke změnám v pozitivním i negativním pásu spekter. Po modifikaci DNA komplexy platiny ($r_b = 0,01$ a 0,03) došlo ke zvýšení intensity pozitivního pásu v oblasti vlnové délky okolo 280 nm. Při modifikaci na vyšší stupeň r_b ($> 0,03$) došlo k poklesu intensity pozitivního pásu. Intenzita negativního pásu rostla pro všechna měřená r_b .



Pt-10

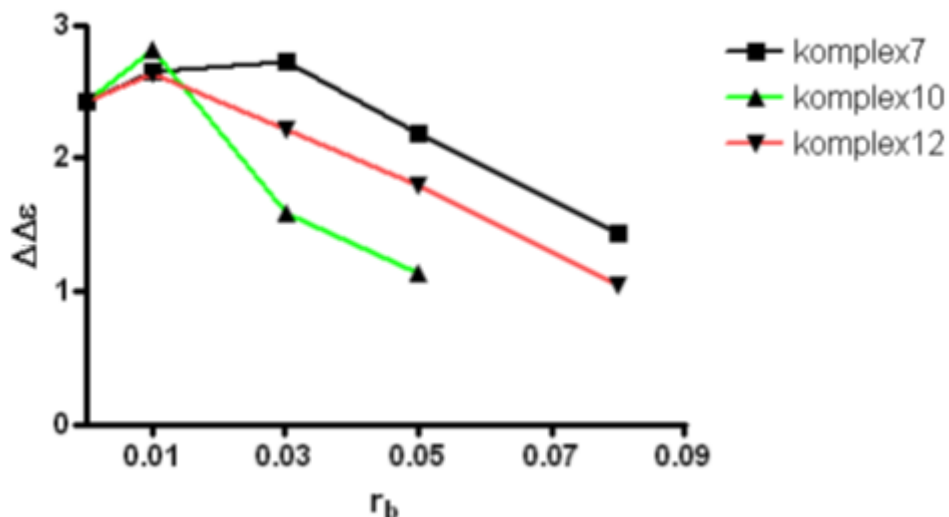


Pt-12



Obr. 5: CD spektrum modifikované (A) komplexem Pt- 7, (B) komplexem Pt- 10, (C) komplexem Pt-12

Změny intensity pozitivního pásu CD spekter znázorňuje obr. 6. Jedná se o závislost výšky pos. pásu na r_b při maximální vlnové délce. Maximální vlnová délka je taková hodnota, při níž jsou intensity pozitivních pásů na maximálních hodnotách.



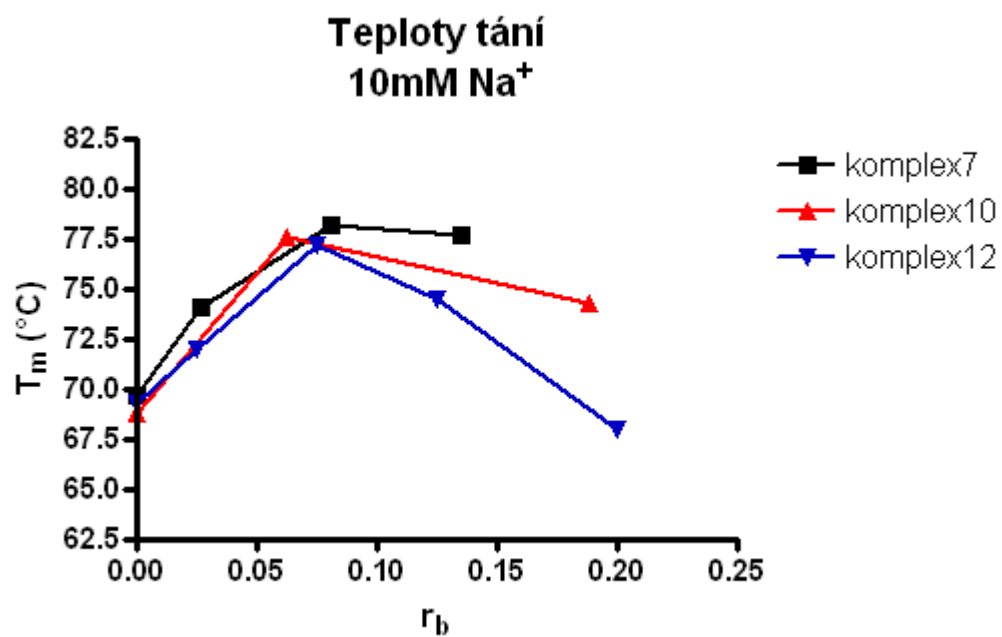
Obr. 6: Změny v CD spektrech při maximální vlnové délce

5. 5. Teplota tání

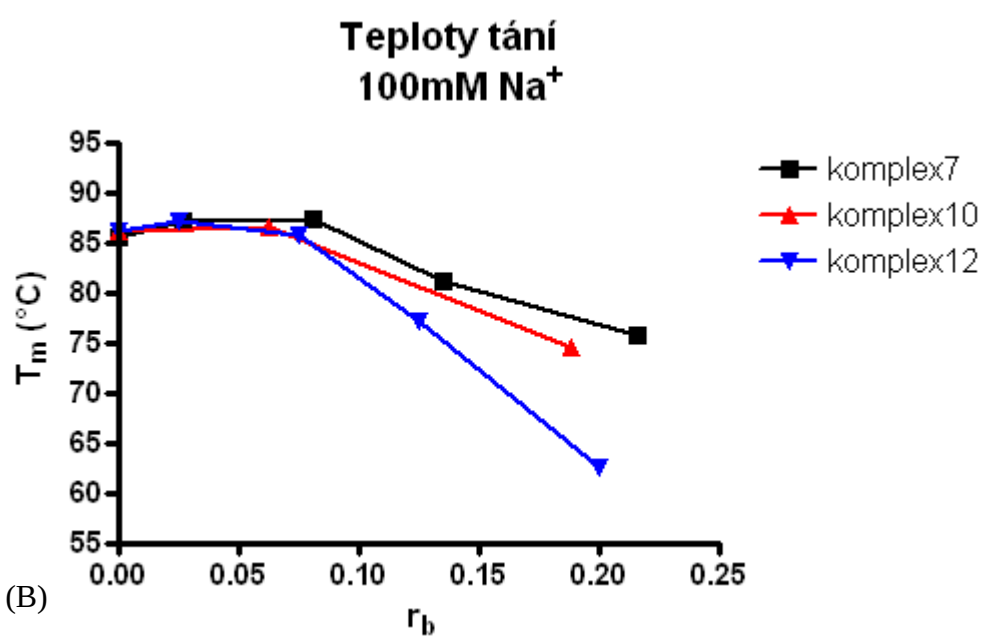
Teplota tání (T_m) u dvoušroubovice B-DNA je teplota, při níž dochází k oddělování jednotlivých vláken a tím i ke zvýšení absorbance. Teplotní stabilita dvoušroubovice je ovlivněna třemi faktory, kterými platinové komplexy působí: stabilizací pomocí kladných nábojů navázané platiny, stabilizací pomocí meziřetězcových můstků a destabilizací navázáním komplexů, což způsobuje distorzi bází.

V prostředí o nízké iontové síle působí všechny tři faktory. Stabilizaci DNA zajišťují kladné náboje platinových komplexů a vznik meziřetězcových vazeb. V prostředí s vysokou iontovou silou je počet kladně nabitých platinových iontů zanedbatelný v porovnání s množstvím kladně nabitých sodných iontů, takže změny teploty tání DNA zapříčiňují pouze meziřetězcové můstky a distorze bází vzniklé navázáním komplexů.

Měření probíhalo v prostředí 10 mM NaClO_4 a 100 mM NaClO_4 . Výsledky jsou znázorněny na obr. 7.



(A)

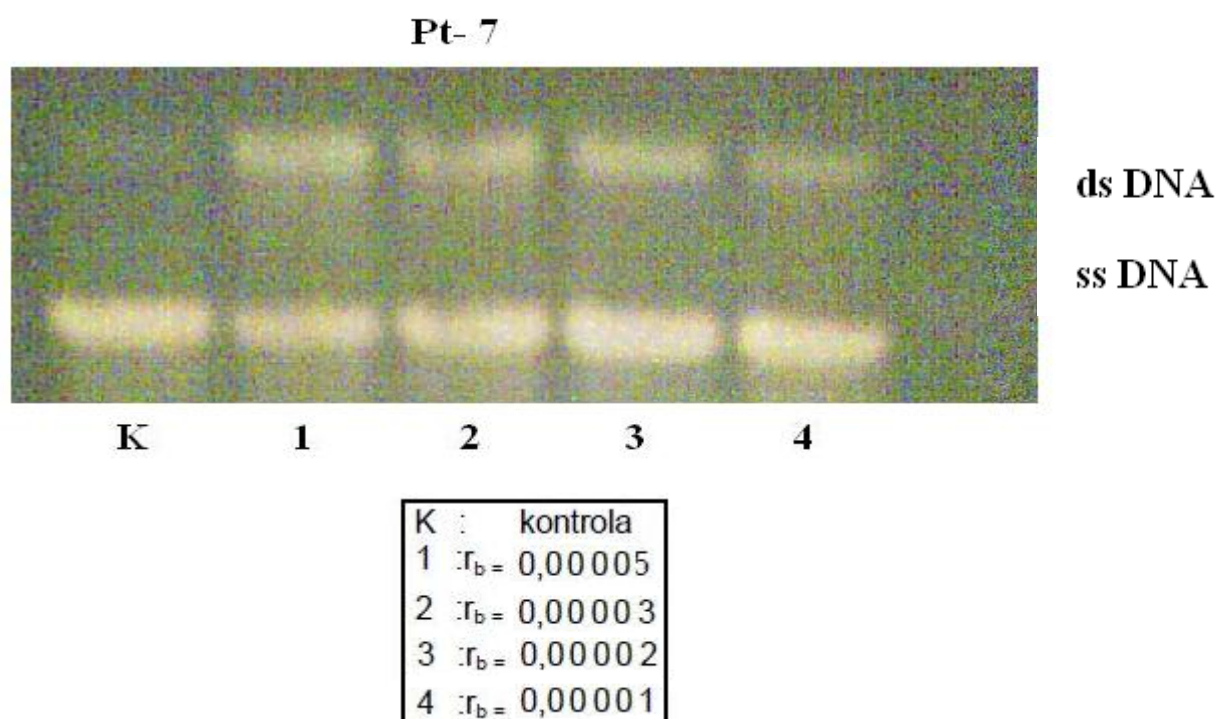


(B)

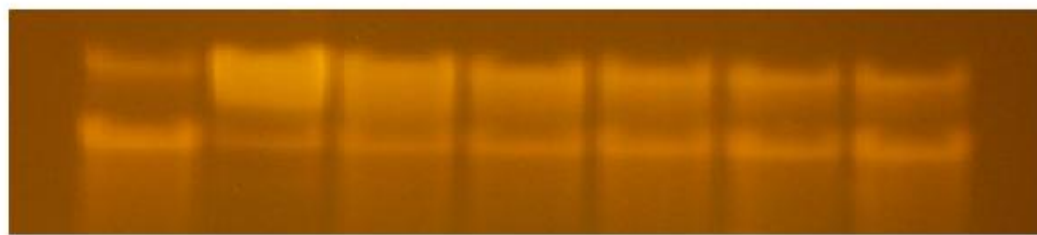
Obr. 7: Křivky teplot tání v závislosti na stupni modifikace platinovými komplexy v (A) prostředí o nízké iontové síle, (B) v prostředí o vysoké iontové síle

5. 6. Měření meziřetězcových můstků

Pro měření vzniku meziřetězcových můstků byla použita elektroforéza za alkalických denaturačních podmínek. Plasmidová DNA byla modifikována studovanými komplexy na r_b od 0,00001 po 0,0002. Po elektroforetickém rozdělení byl snímek gelu (obr. 7) denzitometricky vyhodnocen a byl stanoven podíl dvouřetězcové DNA.



Pt- 10



K 1 2 3 4 5 6

K	:	kontrola
1	$r_b =$	0,002
2	$r_b =$	0,001
3	$r_b =$	0,00005

4	$r_b =$	0,00003
5	$r_b =$	0,00002
6	$r_b =$	0,00001

Pt- 12



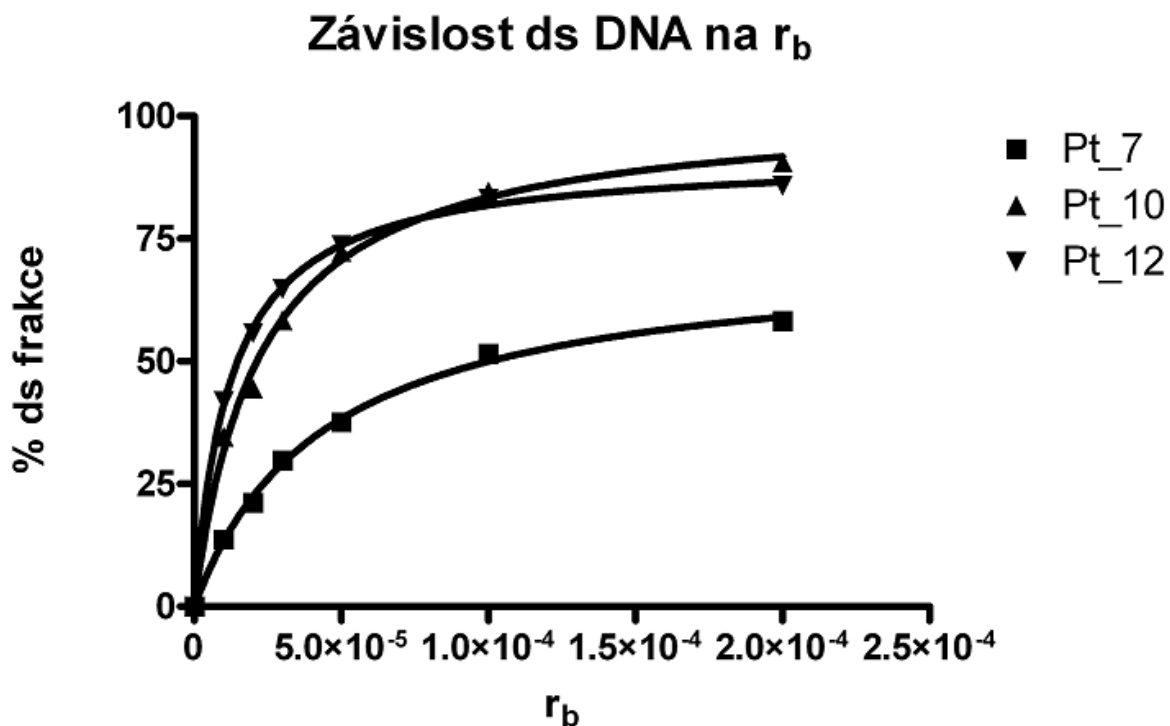
K 1 2 3 4 5 6

K	:	kontrola
1	$r_b =$	0,002
2	$r_b =$	0,001
3	$r_b =$	0,00005

4	$r_b =$	0,00003
5	$r_b =$	0,00002
6	$r_b =$	0,00001

Obr. 7: Densitometrické vyhodnocení denaturační elektroforézy s komplexem (A) Pt- 7, (B) Pt- 10, (C) Pt-12

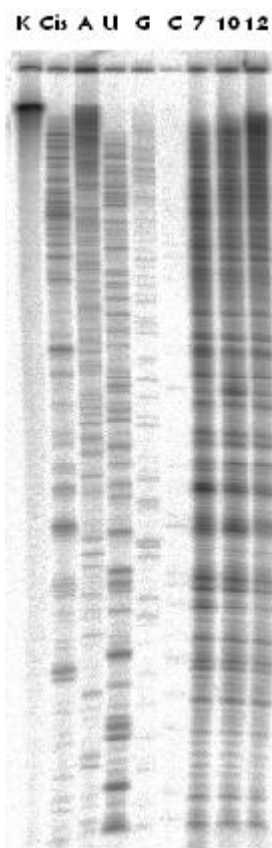
Závislosti renaturace dvojřetězcové DNA v závislosti na stupni modifikaci DNA studovanými komplexy platiny udává obr. 8.



Obr. 8: Graf závislosti opětovného vzniku ds DNA na r_b pro všechny studované komplexy

5. 7. Transkripční mapování

K určení místa na DNA, na které se platinové komplex přednostně vážou, bylo provedeno měření pomocí transkripčního mapování. Ke vzorkům DNA se přidá enzym T7 RNA polymerasa a ribonukleosid trifosfát tak, aby mohla proběhnout syntéza nových vláken RNA. Syntéza, která využívá jako templát plazmidovou DNA (obsahující promotor T7 RNA polymerázy) s navázanými platinovými komplexy, probíhá až do místa, kde RNA polymerasa dále nemůže ze sterických důvodů pokračovat v syntéze, čímž dojde k předčasnému zastavení syntézy RNA (ve srovnání s transkripcí využívající jako templát kontrolní nemodifikovanou DNA). Výsledkem reakce byla směs fragmentů RNA, která byla dále analyzována na sekvenačním gelu (obr. 9)



Obr. 9: Sekvenační gel. Dráhy: K- kontrola, A, U, G, C – sekvenační reakce- předčasně ukončené syntézy RNA s využitím nemodifikované templátové DNA v přítomnosti pouze jednoho rNTP - ATP, UTP, GTP, CTP; Cis- DNA modifikovaná cisplatinou; 7, 10, 12 – DNA modifikovaná platinovými komplexy 7, 10, 12.

Sekvenční analýza potvrdila, že adukty vytvořené platinovými komplexy na DNA zastavují transkripci DNA na úrovni zbytků guaninu. Tento výsledek znamená, že preferenční místa vazby dvojjaderných platinových komplexů na DNA jsou podobná jako v případě vazby cisplatiny, tj. tyto komplexy se váží přednostně na zbytky guaninu v DNA.

VI. DISKUZE

Cílovým místem působení studovaných komplexů je molekula DNA. Lze tedy usuzovat, že rozdíly ve výsledcích měření mezi jednotlivými platinovými komplexy a referenční cisplatinou mohou být přisouzeny odlišnému působení těchto komplexů na své cílové místo. Tato diplomová práce se zabývala studiem zejména strukturních změn DNA vzniklých po navázání studovaných komplexů.

Ze studia možností komplexů kovalentně modifikovat DNA vyplývá, že všechny studované komplexy se vážou na DNA kvantitativně. Tento výsledek prokázal, že je možno připravit vzorky DNA o přesném stupni modifikace. Rozdíl v poločasech vazby mezi studovanými dinukleárními komplexy se lišily jen o chybu měření. Naproti tomu všechny poločasy vazby byly významně nižší než u referenční cisplatiny.

Výsledky studia transkripčního mapování prokázaly, že se všechny studované komplexy preferenčně vážou, stejně jako referenční cisplatina, na guaninové báze DNA. Tento experiment nadále prokázal schopnost platinových komplexů zastavovat replikaci DNA mechanismem sterické blokace polymerasy.

Další experimenty byly zaměřeny na charakterizaci strukturních změn DNA vyvolaných navázáním platinových komplexů. Výsledky studia spekter cirkulárního dichroismu DNA po navázání komplexů ukazují, že modifikací cílového místa došlo ke změnám sekundární struktury. Nárůst pozitivního pásu CD spektra v oblasti okolo 280 nm při nízkých r_b svědčí pro vznik distorzi pro všechny studované komplexy. Tyto změny jsou nedenaturačního charakteru, takže nedochází k přerušování vodíkových můstků mezi komplementárními bázemi. Pokles pozitivního pásu CD spektra pro vyšší stupně modifikace svědčí o změnách denaturačního charakteru.

Navázáním studovaných komplexů na DNA dochází také ke změně teplotní stability. Teplota tání je ovlivňována třemi hlavními faktory. Stabilizační vliv je způsoben kladnými náboji platiny a vznikem meziřetězcových můstků; destabilizaci způsobují vzniklé distorze ve struktuře vzniklé modifikací DNA. Při vysoké iontové síle prostředí se projevuje vliv sodných iontů prostředí, které svými kladnými náboji podobně jako platinové atomy stabilizují DNA. Při vyšších stupních modifikace už ale převládají destabilizační vlivy navázaných komplexů, což se projeví snižováním teplotní stability. V prostředí o nízké iontové síle není vliv sodných

iontů tak znatelný a hlavními stabilizačními prvky jsou meziřetězcové můstky a kladné náboje platinových komplexů. S rostoucím stupněm modifikace ale dochází opět k destabilizaci struktury a snižováním teploty tání. Vzhledem ke skutečnosti, že v prostředí o vysoké iontové síle je vliv náboje komplexu platiny minimální, lze usuzovat, že stabilizační efekt zajišťují právě meziřetězcové můstky. Všechny tři studované komplexy vykazovaly při modifikaci DNA podobné chování, a to v prostředí o vysoké, tak i nízké iontové síle.

Dalšími experimenty bylo prokázáno, že všechny tři studované komplexy po navázání lokálně rozvíjejí DNA. Podle předchozích výzkumů [24] lze dvojmocné koordinační platinové sloučeniny rozdělit podle způsobu vazby. Komplexy, které působí malé lokální rozvíjení DNA (pod 6°) se vážou pouze monofunkční vazbou. Komplexy, které se vážou bifunkční vazbou, rozvíjejí DNA o $10-13^\circ$. Všechny tři studované komplexy měly úhel rozvíjení vyšší než 6° , což potvrzuje, že tyto komplexy tvoří bifunkční adukty.

Metodou gelové elektroforézy za denaturačních podmínek bylo měřeno množství vzniklých meziřetězcových můstků. Všechny studované komplexy tvořily výrazně více meziřetězcových můstků, než referenční cisplatina.

VII. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo objasnit molekulární mechanismus cytotoxického působení dinukleárních platinových komplexů. Studované komplexy vykazovaly mezi sebou podobné vlastnosti, které se však mnohdy velmi lišily od vlastností referenční cisplatiny. Díky své výrazně od cisplatiny odlišné struktuře tvoří studované komplexy adukty s DNA ve výrazně nižším poločase a s vyšším počtem meziřetězcových můstků.

Seznam použité literatury

1. Rozsypal, S.: *Úvod do molekulární biologie*, Scientia (2005).
2. Lippard, S.J.: *New chemistry of an old molecule: cis-[Pt(NH₃)₂Cl₂]*. Science 218 (1982).
3. Rosenberg, B.: *Inhibition of division in Escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode*. Nature (1965).
4. Rosenberg, B., *Platinum coordination complexes in cancer chemotherapy*. Naturwissenschaften 60 (1973)
5. Andrews, P.: *Cellular pharmacology of cisplatin, perspectives on mechanism of acquired resistance*. Cancer Cells (1990).
6. Johnson, N.: *Metal antitumor compounds: The mechanism of action of platinum complexes*. Prog. Clin. Biochem. Med. (1989), 10, 1-24
6. Guo, Z.J.: *Metals in medicine*. Angew. Chem. Int. Ed., 1999. 38(11): p. 1513-1531.
7. Witkin, E.M.: *Ultraviolet-induced mutation and DNA repair*. Annual Review of Genetics, 1969. 3: p. 525-552.
8. Howle, J.A.: *Cis-dichlorodiammineplatinum(II): Persistent and selective inhibition of Dna synthesis in vivo*. Biochem.Pharmacol. 19 (1970) 2757, 1970.
9. Bancroft, D.P.: *Pt-195 NMR kinetic and mechanistic studies of cis-diamminedichloroplatinum and trans-diamminedichloroplatinum(II) binding to DNA*. J. Am. Chem. Soc., 1990. 112: p. 6860-6871.
10. Brabec, V. : *DNA interactions of novel platinum anticancer drugs*, in *DNA and RNA Binders: From Small Molecules to Drugs*, M. Demeunynck, C. Bailly, and D. Wilson, Editors. 2003, Wiley-VCH: Weinheim. p. 178-223.
11. Howell, S. B.: *Copper transporters and the cellular pharmacology of the platinum-containing cancer drugs*. Mol. Pharmacol. 2010, 77, 887-894.
12. Meijer, C.: *Relationship of Cellular Glutathione to the Cytotoxicity and Resistance of Seven Platinum Compounds*. Cancer Res, 1992. 52: p. 6885-6889

13. Chu, G.: *Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair*. J. Biol. Chem., 1994. 269(2): p. 787-790.
14. Eastman, A., *Cross-linking of glutathione to DNA by cancer chemotherapeutic platinum coordination complexes*. Chem.-Biol. Interactions, 1987. 61: p. 241-248.
15. Chu, G., *Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair*. J. Biol. Chem., 1994. 269(2): p. 787-790.
16. Brabec, V.: *Role of DNA repair in antitumor effects of platinum drugs. In Metal Complex – DNA Interactions*, Hadjiladis, N.; Sletten, E., Eds. Wiley: Chichester, UK, 2009; pp 175-208).
17. Brabec, V.: *DNA interactions of platinum anticancer drugs. Recent advances and mechanisms of action. In Metal Compounds in Cancer Chemotherapy*, Perez-Martin, J.-M.; Fuertes, M. A.; Alonso, C., Eds. Research Signpost: Trivandrum, Kerala (India), 2005; pp 187-218
18. Blommaert, F.A.: *Formation of DNA adducts by the anticancer drug carboplatin: Different nucleotide sequence preferences in vitro and in cells*. Biochemistry, 1995. 34(26): p. 8474-8480.
19. Wiseman, L.R.: *Oxaliplatin - A review of its use in the management of metastatic colorectal cancer*. Drugs & Aging, 1999. 14: p. 459-475.
20. Lokich, J.: *What is the "best" platinum: Cisplatin, carboplatin, or oxaliplatin?* Cancer Invest., 2001. 19(7): p. 756-760.
21. Levi, F.A.: *Chronomodulated versus fixed-infusion-rate delivery of ambulatory chemotherapy with oxaliplatin, fluorouracil, and folinic acid (leucovorin) in patients with colorectal cancer metastases: a randomized multi-institutional trial*. Journal of the National Cancer Institute, 1994. 86: p. 1608-1617.
22. Woloschuk, J.M.: *Carboplatin: a new cisplatin analog*. Investigat. Drug Inform. 22 (1988), pp. 843-849.
23. Masahede N.: *Preparation of antitumor oxaliplatin/cisplatin docking dinuclear platinum complex*. Biomedecine & Pharmacotherapy, 2005. p.224-229.

24. Keck, M.V. : *Unwinding of supercoiled DNA by platinum ethidium and related complexes*. J. Am. Chem. Soc., 1992. **114**: p. 3386-3390.
25. Brabec, V.: *Interaction of nucleic acids with electrically charged surfaces. II. Conformational changes in double-helical polynucleotides*. *Biophys. Chem.* **1976**, 4, 76-92 a Brabec, V.; Palecek, E., The influence of salts and pH on polarographic currents produced by denatured DNA. *Biophysik* **1970**, 6, 290-300).

OBSAH

I. ÚVOD.....	6
II. TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2. 0. 0 ÚVOD DO PROBLEMATIKY.....	8
2. 0. 1 DNA.....	8
2. 1 CISPLATINA.....	11
2. 1. 1 Cisplatina jako cytostatikum.....	11
2. 1. 2 Syntéza cisplatiny.....	12
2. 1. 3 Mechanismus účinku.....	13
2. 1. 4 Resistance a opravy poškození.....	16
2. 2 PLATINOVÁ CYTOSTATIKA DALŠÍ GENERACE.....	19
2. 2. 1 KARBOPLATINA.....	19
2. 2. 2 OXALIPLATINA.....	21
2. 3 POLYNUKLEÁRNÍ PLATINOVÁ CYTOSTATIKA.....	22
2. 3. 1 Dinukleární platinové komplexy.....	22
III. CÍL PRÁCE.....	24
IV. MATERIÁL A METODY.....	25
4. 1 Použité chemikálie.....	25
4. 2 Použité roztoky a pufrý.....	25
4. 3 Metody.....	26
4. 3. 1 Izolace DNA.....	26
4. 3. 2 Modifikace DNA platinovými komplexy.....	26
4. 3. 3 Dialýza DNA.....	26
4. 3. 4 Elektroforéza v nativním gelu.....	26
4. 3. 5 Elektroforéza v denaturačním gelu.....	27
4. 3. 6 Cirkulární dichroismus.....	27
4. 3. 7 Měření teploty tání.....	28
4. 3. 8 Stanovení vazby platinových komplexů na DNA.....	28
4. 3. 9 Zhášení fluorescence ethidium bromidu.....	29

4. 3. 10 Rozvíjení DNA.....	29
4. 3. 11 Určení množství meziřetězcových můstků.....	29
4. 3. 12 Transkripční mapování.....	30
V. VÝSLEDKY.....	31
5. 1. VAZBA PLATINOVÝCH KOMPLEXŮ NA DNA.....	31
5. 1. 1 Srovnání teoretické a skutečné vaznosti komplexů.....	31
5. 1. 2 Kinatika vazby platinových komplexů.....	32
5. 2 ZHÁŠENÍ FLUORESCENCE ETHIDIUM BROMIDU.....	34
5. 3 ROZVÍJENÍ PLASMIDOVÉ DNA.....	35
5. 4 SPEKTRA CÍRKULÁRNÍHO DICHROISMU.....	38
5. 5 TEPLOTA TÁNÍ.....	40
5. 6 MĚŘENÍ MEZIŘETĚZCOVÝCH MŮSTKŮ.....	42
5. 7 TRANSKRIBČNÍ MAPOVÁNÍ.....	44
VI. DISKUZE.....	46
VII. ZÁVĚR.....	48
VIII. POUŽITÁ LITERATURA.....	49