

Univerzita Palackého v Olomouci

Disertační práce

Olomouc 2014

Mgr. Michaela Frýbortová

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra biofyziky



**Molekulární biofyzika a farmakologie nových
protinádorově účinných metalofarmak**

Mgr. Michaela Frýbortová

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

Olomouc 2014

ABSTRAKT

Cisplatina (*cis*-diammindichloridoplatnatý komplex) patří k nejrozšířenějším a nejběžněji používaným cytostatikům na světě. Velkého úspěchu dosahuje při léčbě nádorů varlat, vaječníku a močového měchýře. Přes její obrovský úspěch na poli léčby nádorových onemocnění se dostávají nežádoucí vedlejší účinky na organismus pacienta a často se setkáváme s problémem rezistence vůči tomuto cytostatiku při jeho opakovaném podání. Závažná omezení při léčbě vedla k syntéze nových platinových komplexů a v souvislosti s tím se přikládal stále větší důraz na pochopení mechanismu účinku těchto léčiv. Druhý izomer diammindichloridoplatnatého komplexu, transplatina (*trans*-diammindichloridoplatnatý komplex), je z hlediska protinádorového účinku inaktivní, později ale byla objevena řada komplexů s *trans*-geometrií odstupujících ligandů se slibnou protinádorovou aktivitou, působících na širší spektrum nádorových buněk *in vitro* a dokonce i aktivních v buňkách rezistentních k cisplatině. V těchto nových protinádorově účinných komplexech, derivátech neúčinné transplatiny, byla nahrazena skupina NH₃ relativně objemnými amino ligandy (pyridin, isochinolin, chinolin, thiazol, iminoeter atd.). Charakteristickou vlastností většiny protinádorově účinných léčiv vytvořených na bázi přechodných kovů je jejich vazba na molekulu DNA. Tato vazba vede ke změnám ve struktuře DNA a může vyvolat apoptózu. Bylo navrženo, že sterické efekty relativně objemných amino ligandů těchto nových protinádorově účinných derivátů neúčinné transplatiny, hrají zásadní roli v mechanismu vazby těchto komplexů na DNA a následně v mechanismu jejich toxicity v nádorových buňkách.

V předložené práci byl studován mechanismus účinku nového komplexu odvozeného od klinicky neefektivní transplatiny, jmenovitě *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂]. V tomto komplexu byly, na rozdíl od dosud testovaných protinádorově účinných derivátů transplatiny, skupiny NH₃ transplatiny nahrazeny pouze malým, neobjemným metylaminovým ligandem. Ukázali jsme, že tato malá změna vyvolala výrazné zvýšení cytotoxicity komplexu, stejně jako výrazné změny v mechanismu jeho vazby k DNA. Také buněčná akumulace studovaného komplexu korelovala s jeho zvýšenou cytotoxicitou v nádorových buňkách sensitivních i rezistentních ke klasické protinádorově účinné cisplatině, již využívané v klinické praxi.

Byla také studována stabilita 1,3-GNG vnitrořetězcového můstku tvořeného *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂] ve dvouřetězcové DNA, který patří k hlavním aduktům vytvořeným tímto komplexem na DNA. Objevili jsme, že tento adukt vytvořený v jednom vlákně

dvoušroubovicové DNA, se velmi snadno transformuje na meziřetězcové můstky, a to s výrazně menší sekvenční selektivitou, než je tomu u stejného aduktu vytvořeného ve dvoušroubovicové DNA klinicky neúčinnou transplatinou. Na základě tohoto výsledku je navržena nová aplikace jednořetězcových oligonukleotidů obsahujících 1,3-GNG vnitrořetězcový můstek komplexu *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂] v 'antisense' nebo 'antigene' technologiích.

Poslední část doktorského studia byla zaměřena na studii role proteinu STAT3 (přenašeč signálu a aktivátor transkripce 3) v mechanismu biologického působení vybraných komplexů platiny. Pro mnoho nádorových onemocnění je konstitutivní aktivace STAT3 spojena se špatnou prognózou. Zajímalo nás, zda modifikace konsenzuální sekvence v DNA proteinu STAT3 protinádorově účinným léčivem (cisplatinou a pro srovnání klinicky neúčinnou transplatinou) může ovlivnit vazebnou aktivitu tohoto transkripčního faktoru *in vitro*. Protein byl izolován jako rekombinantní protein s histidinovou kotvou v buňkách *E. Coli*. Pomocí gelové elektroforézy (electrophoretic mobility shift assay) jsme zjistili, že adukty vytvořené v konsenzuální sekvenci v DNA cisplatinou inhibují vazbu STAT3 ke konsenzuální sekvenci mnohem více, než adukty klinicky neefektivní transplatiny. Navrhujeme, že schopnost aduktů vytvořených komplexu platiny v konsenzuální sekvenci v DNA proteinu STAT3 by mohla být faktorem ovlivňujícím protinádorovou účinnost této třídy cytostatik.

ABSTRACT

Cisplatin [*cis*-diamminedichloridoplatinum(II)] belongs to one of the most widespread and most commonly used cytostatics in the world. A great success is achieved in the treatment of testicular, ovarian and bladder cancers. Despite its huge success in the treatment of cancer, adverse side effects have been observed on a patient and often problems are encountered in terms of acquired resistance during repeated administration. Severe limitations associated with the treatment led to the synthesis of new platinum complexes with an increasing emphasis on understanding the mechanism of action of these drugs. The other isomer of diamminedichloridoplatinum(II), transplatin [*trans*-diamminedichloridoplatinum(II)] is inactive in terms of antitumor effect, but later a number of complexes with *trans* geometry of leaving ligands were discovered with a promising anti-tumor activity, acting on a wider spectrum of tumor cells *in vitro* and even effective in cells resistant to cisplatin. In these novel antitumor active complexes, derivatives of ineffective transplatin, NH₃ group was replaced by a relatively bulky amino ligands (pyridine, isoquinoline, quinoline, thiazole, imino ether, etc.). A characteristic feature of most antitumor drugs developed on the basis of transition metals is their coordinative binding to the DNA molecule. This binding leads to changes in the structure of DNA and can induce apoptosis. It has been suggested that steric effects of the relatively bulky amino ligands of these new antitumor derivatives of ineffective transplatin, play an essential role in the mechanism of binding of these complexes to DNA and subsequently in their mechanism of toxicity in tumor cells.

In the present work, we studied the mechanism of action of the new complex derived from clinically ineffective transplatin, namely *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂]. In this complex, the NH₃ groups of transplatin was, unlike in the previously tested antitumor derivatives of transplatin, substituted by a small, unbulky methylamine ligand. We have shown that this small change caused a significant increase in cytotoxicity of the complex, which correlated with significant changes in the mechanism of its binding to DNA. Also the cellular accumulation of the studied complex correlated with the increased cytotoxicity in tumor cells sensitive and resistant to classical antitumor effective cisplatin already used in clinical practice.

The stability of 1,3-GNG intrastrand cross-link formed by *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂] in double stranded DNA was studied. This intrastrand cross-link represents one of the main adducts formed by the complex in the DNA. We have discovered that this adduct formed in the double-stranded DNA is easily transformed into interstrand cross-links, with a much smaller

sequence selectivity in comparison with the same adduct formed in double-stranded DNA by clinically ineffective transplatin. Based on this result, we have proposed new applications of single-stranded oligonucleotides containing 1,3-GNG intrastrand cross-link of complex *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂] in "antisense" or "antigene" technologies.

The last part of the doctoral studies was focused on the study of the role of protein STAT3 (signal transmitter and activator of transcription 3) in the mechanism of action of selected platinum complexes. For many cancers, the constitutive activation of STAT3 is associated with poor prognosis. We wondered whether modification of the consensus sequence in the DNA of STAT3 protein by anticancer efficient drug cisplatin can influence the binding activity of this transcription factor *in vitro*. The protein was isolated as a recombinant His-tagged protein in *E. Coli* cells. Using gel electrophoresis (electrophoretic mobility shift assay), we found that adducts formed in the consensus DNA sequence by the cisplatin inhibit the binding of STAT3 to the consensus sequence much more than the adducts of clinically ineffective transplatin. We propose that the ability of the adducts formed by complexes of platinum in the consensus DNA sequence of STAT3 protein could be a factor affecting the antitumor activity of this class of antitumor drugs.

Prohlašuji, že jsem disertační práci vytvořila samostatně s použitím literatury citované v závěru. Všechny publikované výsledky zahrnuté v této práci byly použity se souhlasem spoluautorů.

V Olomouci dne

Podpis:

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych touto cestou poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Viktoru Brabcovi, DrSc. za odborné vedení a všestrannou pomoc, kterou mi po celou dobu mé práce věnoval.

Mé velké díky patří Mgr. Olze Novákové, Dr. za její odborné rady, pomoc při experimentech, trpělivost, ochotu a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Děkuji všem svým kolegům z oddělení Molekulární biofyziky a farmakologie BFÚ AV ČR, v.v.i. za příjemnou spolupráci.

Dále děkuji za finanční podporu projektu IGA_PrF_2014-029.

OBSAH

1 ÚVOD	9
1.1 CISPLATINA	10
1.1.1 Cílové místo působení cisplatiny	11
1.1.2 Mechanismus působení v buňce	11
1.1.3 Adukty cisplatiny na DNA	12
1.1.4 Vliv vazby cisplatiny na funkci DNA a odpověď buňky	13
1.2 TRANSPLATINA	17
1.2.1 Vazba transplatiny na DNA	18
1.2.2 Přehled analogů transplatiny	20
1.2.2.1 <i>Trans</i> -Pt(II)Cl ₂ komplexy s iminoetherovým ligandem	20
1.2.2.2 <i>Trans</i> -platnaté komplexy s planárními aminy	20
1.2.2.3 <i>Trans</i> -karboxylato platnaté komplexy	21
1.2.2.4 <i>Trans</i> -platnaté komplexy s neplanárními heterocyklickými ligandy	21
1.2.2.5 <i>Trans</i> -platnaté komplexy s alifatickými aminy a/nebo heterocyklickými ligandy	21
1.2.2.6 <i>Trans</i> -platičité komplexy	22
1.2.2.7 Polynukleární platinové komplexy	22
1.2.2.8 <i>Trans</i> -platinové komplexy s různými typy ligandů	23
1.3 PLATINOVANÉ OLIGONUKLEOTIDY V ANTISENSE A ANTIGENE STRATEGII	24
1.3.1 Antisense a antigene oligonukleotidy	24
1.3.2 Modifikace antisense oligonukleotidů	26
1.3.3 Platinace anlisense oligonukleotidů	27
1.3.4 Transport antisense oligonukleotidů a klinické využití	28
1.4 STAT3 PROTEIN (přenašeč signálu a aktivátor transkripce 3)	29
1.4.1 Struktura STAT3	29
1.4.2 STAT3 signální dráha	31
1.4.3 Mechanismy aktivace STAT3 v nádorových buňkách a terapeutické využití	31
1.4.4 Platinové komplexy a STAT3	32
2 CÍLE PRÁCE	34
3 MATERIÁL A METODY	35
3.1 Platinace DNA	38
3.2 Kinetika vazby stanovená polarograficky a voltametriky	38
3.3 Kinetika vazby stanovená pomocí AAS	39
3.4 Měření teploty tání	39
3.5 Měření fluorescence ethidium bromidu	40
3.6 Rozvíjení negativně vinuté plazmidové DNA	41
3.7 Detekce meziřetězcových můstků na plazmidové DNA	42
3.8 Reakce s thiomocovinou	43
3.9 Nukleotidová excizní oprava DNA	44
3.10 Stanovení cytotoxicity – MTT test	45

3.11	Transkripční mapování	46
3.12	Akumulace komplexů v nádorových buňkách	46
3.13	Modifikace oligonukleotidů transplatinou a <i>trans</i> -[Pt(NH ₂ CH ₃) ₂ Cl ₂] a jejich radioaktivní značení.....	46
3.14	Ověření platinace na N7 guaninu reakcí s DMS	46
3.15	Chemické sondy pro studium konformačních distorzí DNA v okolí aduktu	47
3.16	Transformace vnitrořetězcových můstků transplatinu a <i>trans</i> -[Pt(NH ₂ CH ₃) ₂ Cl ₂]	48
3.17	Transformace TKB1 kompetentních buněk.....	49
3.18	Indukce TKB1 kompetentních buněk	49
3.19	Sonikace a purifikace STAT3 proteinu	50
3.20	EMSA (Electrophoretic mobility shift assay).....	51
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	52
4.1	Aktivace <i>trans</i> -geometrie v bifunkčních mononukleárních komplexech platiny s neobjemnými metylaminovými ligandy	53
4.2	Stabilita vnitrořetězcového můstku protinádorově účinného derivátu transplatinu s neobjemnými metylaminovými ligandy	59
4.3	STAT3: Produkce a studie vazby na DNA modifikovanou komplexu platiny	63
5	ZÁVĚR	67
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	69
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	81
8	STRUKTUROVANÝ ŽIVOTOPIS	82
9	SEZNAM PUBLIKACÍ	83
10	PŘÍLOHY	84

1 ÚVOD

Druhou nejčastější příčinou úmrtí v České republice jsou nádorová onemocnění. Ročně umírá na nádorová onemocnění přes 27 tisíc osob, což představuje 23 % z celkové úmrtnosti. Příčiny změny zdravých buněk v buňky nádorové nejsou zatím zcela objasněny. Může se jednat o faktory těžce ovlivnitelné - genetické, onemocnění snižující odolnost organismu a věk. Pozornost je věnována také chemickým látkám v životním prostředí a dále faktorům ovlivnitelným, jako kouření, nevhodná strava či nedostatek pohybu.

Vznik nádorového onemocnění je několikastupňový proces. V buňce, procházející maligní transformací, lze pozorovat mutace v určitých genech. Nádorová buňka získává schopnost neomezeného růstu, růstu bez stimulace růstovými faktory, nesmrtelnost, vytváří membránové antigeny pro ni specifické a velmi často vykazuje chromozomální nestabilitu.

Zásadní podmínkou úspěšné léčby je včasná diagnóza a terapie, která vyžaduje komplexní přístup. Kombinací chirurgického zákroku, chemoterapie, případně hormonální terapie a radioterapie můžeme dosáhnout cílených pozitivních výsledků.

Počátky novodobé protinádorové chemoterapie datujeme do 40. let 20. století (Goodman *et al.*, 1984). Vycházelo se z pozorování námořníků zasažených yperitem po náletu na přístav Bari za 2. světové války. V National Cancer Institute (NCI) v USA byl poprvé v roce 1955 spuštěn program „The National Chemotherapy Program“ a tak započal systematický screening nových léčiv (Chabner *et al.*, 2005).

1.1 CISPLATINA

Na objevu cisplatiny (*cis*-diammindichloroplatnatý komplex, Peyronův chlorid, cDDP) se podílela náhoda. V roce 1965 se američtí vědci pod vedením biofyzika Barnetta Rosenberga pokoušeli studovat vliv elektrického pole na růst a dělení bakterií *Escherichia coli*. Do nádoby s bakteriemi v živné půdě obsahující roztok chloridu amonného ponořili platinové elektrody a vložili mezi ně elektrické napětí. Výsledkem bylo zastavení buněčného dělení a později se ukázalo, že za tento efekt jsou zodpovědné produkty elektrolýzy na platinových elektrodách.

Tento objev vedl Rosenberga k syntéze dalších jednoduchých sloučenin platiny, mezi nimiž byla i cisplatina (Rosenberg *et al.*, 1969). Zavedení cisplatiny do klinické praxe nebylo jednoduché. První klinické testy prokázaly fatální nefrotoxicitu, gastrointestinální, hematologické a otologické nežádoucí účinky. Až posléze se podařilo nefrotoxicitu snížit hyperhydratací a forsírovanou diurézou (Klener, 2010; Vaisrub, 1979).

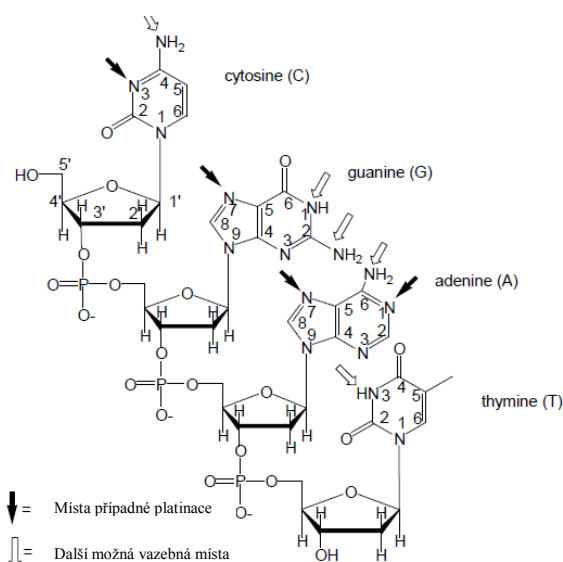
V roce 1978 byla cisplatina oficiálně schválena FDA (Správa potravin a léčiv) v USA pod názvem Platinol a zavedena do klinické praxe. V současnosti je jedním z nejúčinnějších a nejběžněji používaných cytostatik v léčbě řady karcinomů, zejména karcinomů varlat, ovaria, hlavy, krku, močového měchýře a malobuněčného karcinomu plic.

Přes obrovský úspěch na poli léčby rakoviny je aplikace cisplatiny spojena s řadou omezení. Nádory tlustého střeva a prsu jsou nejčastějšími nádory nejen v České republice. Na tyto nádory cisplatina nepůsobí, také úspěšnost léčby metastáz je nízká. Například kolorektální a nemalobuněčné karcinomy plic jsou vůči cisplatině přirozeně rezistentní, nádory vaječníku a malobuněčných karcinomů plic mohou rezistenci po opakované léčbě získat. Dalším limitujícím faktorem cisplatiny je její toxicita. Akumulace v ledvinách vyvolává vážné poškození (nefrotoxicitu), neméně závažnou komplikaci představuje poškození nervového systému (neurotoxicita), poškození krvetvorby, kostní dřeně, ztráta vnímání zvuků a alergické reakce (Cvitkovic *et al.*, 1977).

Tato všechna omezení a nežádoucí účinky se staly podnětem pro výzkum a vývoj nových protinádorově účinných komplexů platiny s nižší toxicitou a širším spektrem použití.

1.1.1 Cílové místo působení cisplatiny

Po objevu protinádorových vlastností cisplatiny započal výzkum mechanismu jejího působení a určení cílového místa v buňkách. Už profesor Rosenberg pozoroval filamentózní růst buněk bakterie *Escherichia Coli* (Rosenberg *et al.*, 1969), což je charakteristickým projevem poškození DNA. Lyze buněk *E. Coli* obsahující bakteriofága λ po aplikaci cisplatiny (Rešlová, 1971), sledování inhibičního efektu cisplatiny na syntézu DNA, RNA a proteinů inkorporací radioaktivně značených prekurzorů (Harder *et Rosenberg*, 1970), vazba radioaktivně značené cisplatiny na jednotlivé biomakromolekuly (Akaboshi *et al.*, 1992). Všechny tyto experimenty, a později i další, byly nezvratným důkazem toho, že cílovým místem pro cisplatinu je DNA.

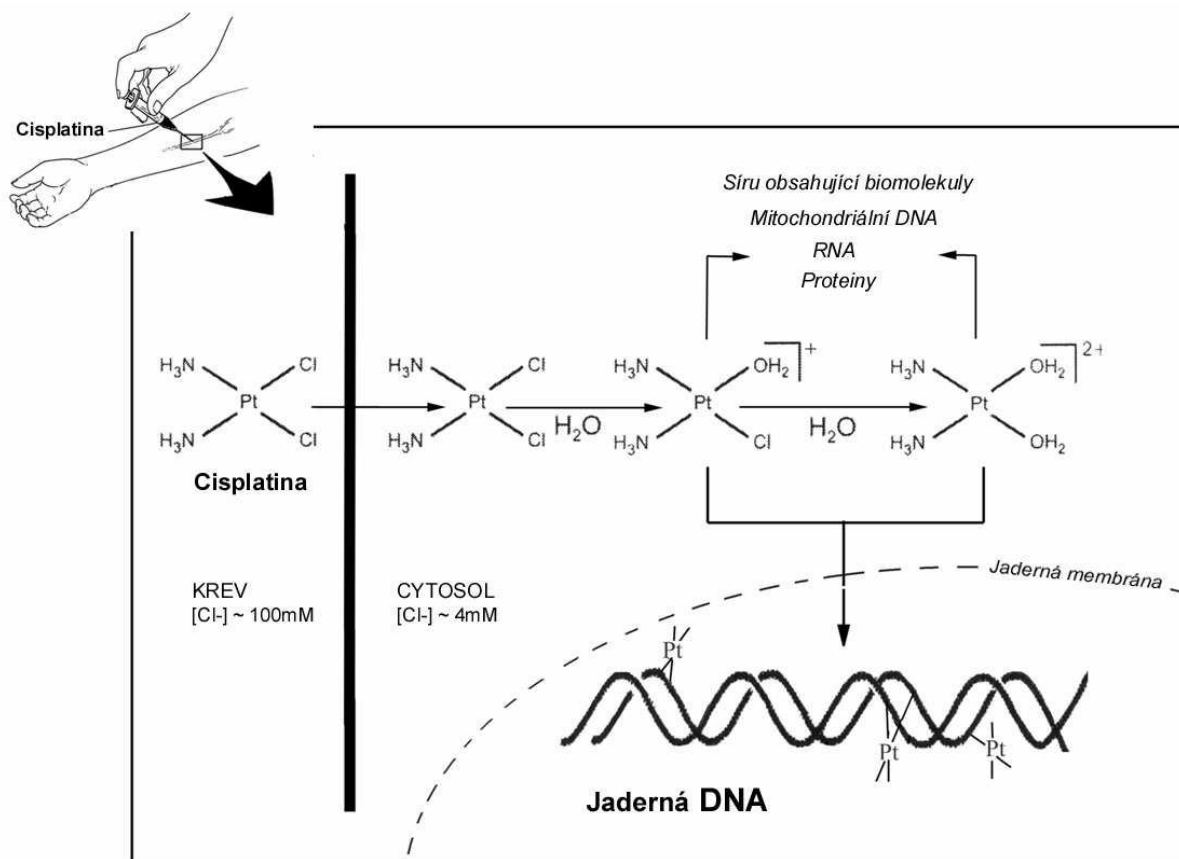


Obr. 1: Vazebná místa platiny na DNA (Převzato a upraveno: Elena Pantoja López, 1978).

1.1.2 Mechanismus působení v buňce

Cisplatinu se pacientům podává intravenózně v roztoku obsahujícím chloridové ionty.

V krevním řečišti je vysoká koncentrace chloridových iontů (~100 mM) a cisplatinu zůstává z 93 % ve stabilní dichloroformě. Do buňky, kde je nižší koncentrace chloridových iontů (~3-20 mM), proniká pasivní difúzí, nebo pomocí aktivního transportu membránovým přenašečem pro ionty mědi (Ctrl). Dochází k hydrolyze cisplatinu za vzniku hydratované (pozitivně nabitě) formy, která je vysoce reaktivní s buněčnými komponenty (Kelland, 2007).



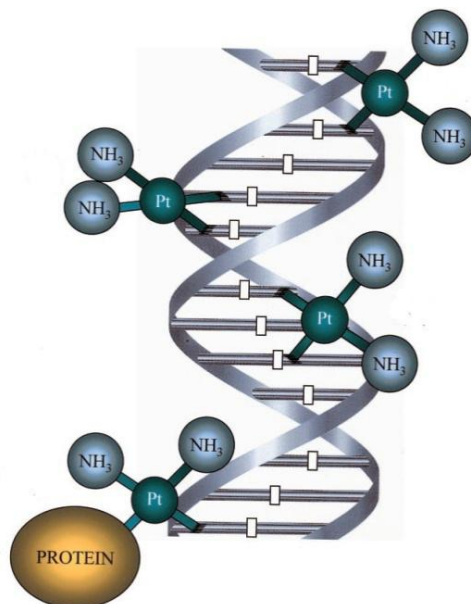
Obr. 2: Mechanismus působení cisplatiny (převzato a upraveno: DNA and RNA Binders, From Small Molecules to Drugs, 2003).

1.1.3 Aduktů cisplatiny na DNA

Cisplatin se v aktivní aqua formě kovalentně váže do velkého žlábků DNA na N7 guanin nebo adenin (Jung *et* Lippard, 2007). Po odstoupení chloridového ligandu a výměně za vodu, vzniká kladně nabitý mono aqua komplex, který je přitahován k záporně nabitě DNA. Voda je nahrazena atomem báze a je vytvořen monofunkční komplex. Pokud se v blízkosti aduktu nachází další reaktivní místo, dojde k formaci bifunkčního můstku a to meziřetězcového, nebo vnitřetězcového.

Nejčastějším aduktem jsou můstky vnitřetězcové, hlavně mezi sousedními guaniny (1,2-GG; zhruba 65 %) a mezi adeninem a guaninem (1,2-AG; 25 %). 1,2-GG vnitřetězcový můstek je považován za příčinu protinádorového působení cisplatiny, vyvolává strukturální změny, jako rozvíjení duplexu v místě modifikace o 23° , ohyb osy o $35-40^\circ$ směrem

k velkému žlábků a zkracování dvoušroubovice (Commer *et* Lippard, 1993). Meziřetězcové můstky, kterých cisplatina tvoří poměrně málo (6 %) vyvolávají výraznou distorzi na DNA s úhlem rozvinutí 79°, ohybem do malého žlábků 50° a lokální konverzi na levotočivou formu (Coste *et al.*, 1999).



Obr. 3: Hlavní adukty tvořené cisplatinou; meziřetězcové můstky, 1,2- vnitřetězcový můstek, 1,3- vnitřetězcový můstek, protein-DNA interakce (převzato a upraveno: Gonzales *et al.*, 2001).

1.1.4 Vliv vazby cisplatiny na funkci DNA a odpověď buňky

Po vazbě cisplatiny na DNA dochází k narušení nejen DNA samotné, ale i funkcí s DNA spojených, replikace a transkripce. Následkem toho se spouští buněčné mechanismy snažící se narušení opravit, zastavuje se buněčný cyklus a může dojít až ke smrti buňky. Cisplatina, stejně jako neúčinná transplatina, zastavuje replikaci DNA. Mnohem důležitějším faktem je inhibice transkripce, objevená při studiu buněk leukemie L1210 při inkubaci buněk s cisplatinou. Buňky prošly S fází, ale zastavily se v G2 fázi buněčného cyklu. Při nižší koncentraci cisplatiny byl buněčný aparát schopný narušení opravit, při koncentraci vyšší buňky zůstaly v G2 fázi následujícím spuštěním apoptózy (Sorenson *et al.*, 1990).

Schopnost blokovat syntézu RNA přímo souvisí s protinádorovou účinností. Může dojít k vylučování transkripčních faktorů cisplatinou, a proto nedochází k iniciaci transkripce, adukt cisplatiny také může stéricky bránit RNA polymeráze v postupu podél transkribovaného řetězce, nebo se naruší struktura či mobilita chromatinu. Tyto tři hypotézy se vzájemně nevylučují (Todd *et* Lippard, 2009).

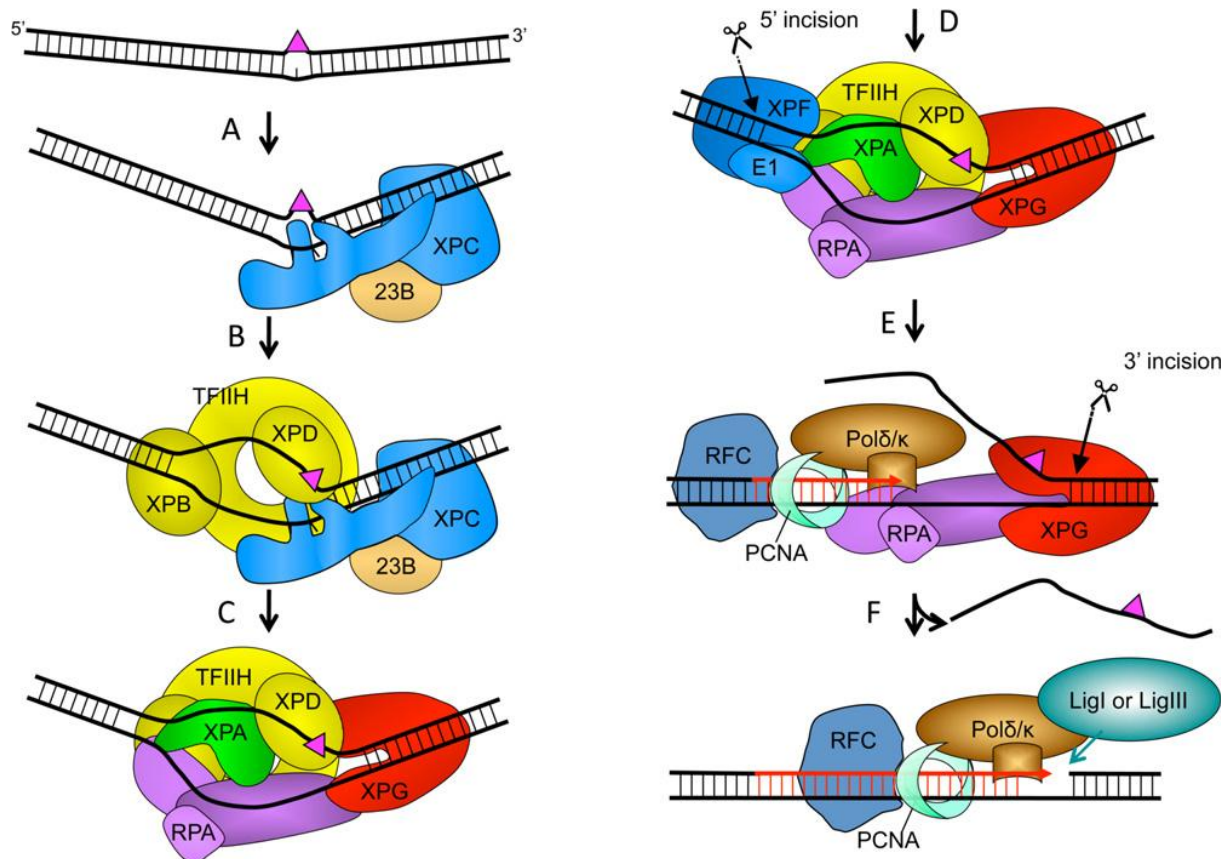
Po inkubaci buněk s cisplatinou se okamžitě aktivuje proces vedoucí k opravě poškození. Buňka obsahuje reparační mechanismy dovolující zachování integrity genomu schopností odstranit poškození vzniklá na DNA, ať již po působení nežádoucích látek z okolního prostředí, nebo vlivem UV záření, či po působení protinádorových terapeutik na bázi cisplatin. Právě aktivace reparačních mechanismů v nádorových buňkách pak významně snižuje léčebný efekt cisplatin.

Nukleotidová excizní oprava (NER) je pro organismy nesmírně důležitá. Narušení tohoto procesu může mít fatální následky s výskytem dědičných onemocnění. Mutace genů XPA, XPG zapříčiňují autozomálně recesivní dědičné onemocnění xeroderma pigmentosum.

Mechanismus NER eukaryotických buněk je znázorněn na Obr. 4.

Ve všech organismech však NER zahrnuje následující kroky:

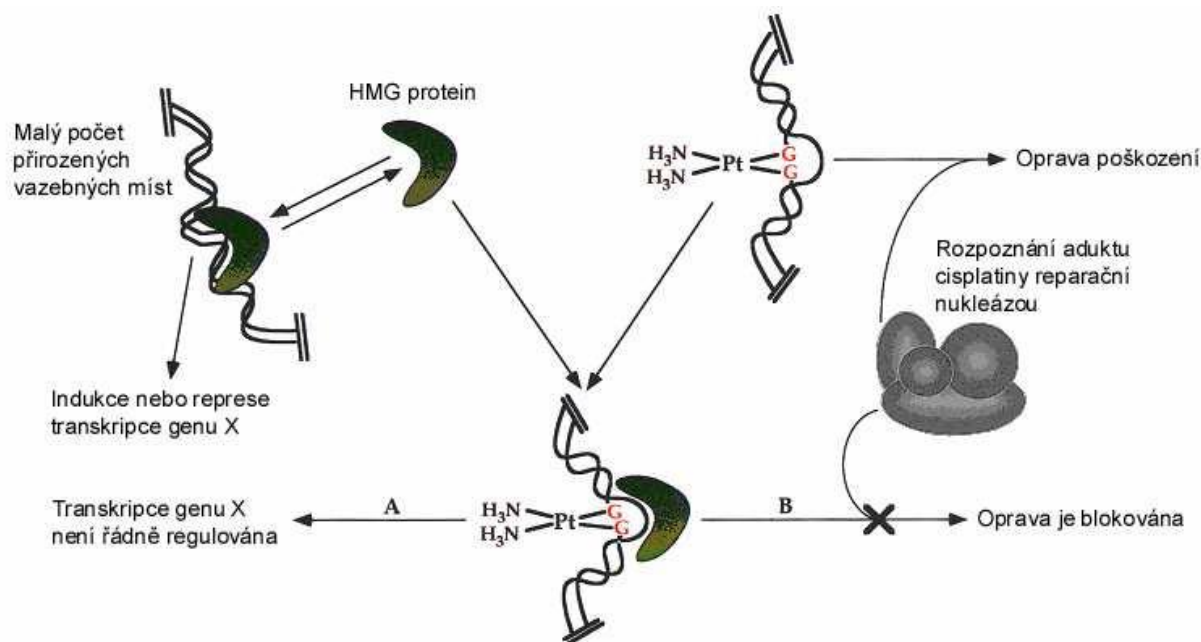
- rozpoznání poškozeného místa
- navázání multiproteinového komplexu na poškozené místo
- rozštěpení řetězce na obou stranách poškození ve vzdálenosti několika nukleotidů
- odstranění vyštěpeného fragmentu
- doplnění vzniklé mezery pomocí DNA polymerázy
- spojení nového úseku s DNA – ligace



Obr. 4: Model dráhy nukleotidové excizní opravy DNA. (Převzato: Adebanke *et al.*, 2011).

Poškození DNA je rozpoznáno komplexem proteinů XPC-hHR23B, které se váží na poškozený řetězec DNA, následně dochází k vazbě komplexu proteinů TFIIH, XPB, XPD, RPA, XPA, XPG, transkripční faktor TFIIH obsahuje dva faktory s helicázovou aktivitou – XPB (ve směru 3′- 5′) a XPD (ve směru 5′- 3′), za přítomnosti ATP způsobí lokální odvinutí DNA řetězců, jež je stabilizováno replikačním proteinem RPA, který vyhledá a obsadí nepoškozený řetězec. XPA protein zajistí interakce mezi jednotlivými proteiny v komplexu a dává možnost uskupení proteinů s endonukleázovou aktivitou XPG a XPF-ERCC1. Substrát v rozsahu 32 nukleotidů je poté vyštěpen specifickou endonukleázou XPG na 3′ konci a XPF-ERCC1 na 5′ konci od místa poškození. Dochází k odstranění vyštěpeného místa a dosyntetizování DNA působením DNA polymeráz a replikačních faktorů PCNA, RFC a DNA ligáz.

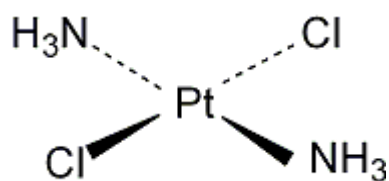
Pokud by ale k opravě poškození došlo rychle, cytostatický efekt cisplatiny by byl značně redukován. Proto bylo zjevné, že existuje nějaký proces v buňce, který rychlé opravě zabrání. Skupina proteinů HMGB1 a HMGB2 (High Mobility Group, proteiny skupiny vysoké pohyblivosti) mají schopnost rozpoznat a vázat se na DNA modifikovanou cisplatinou. Tyto nehistonové chromozomální proteiny se hojně vyskytují v jádře eukaryotických buněk, podílejí se na utváření vyšších struktur DNA a fungují také jako signální molekuly v geneticky řízených opravných drahách (Grosschedl *et al.*, 1994).



Obr. 5: Schématické znázornění funkce HMG proteinů (Převzato a upraveno: Zamble *et* Lippard, 1999).

HMG proteiny selektivně rozpoznávají 1,2-GG a 1,2-AG vnitřetězcový můstek cisplatinu. Váží se především do malého žlábků naproti aduktu cisplatinu. Meziřetězcové můstky jsou proteiny s HMG doménou rozpoznávány také, ale s menší afinitou. 1,3-vnitřetězcové můstky a monofunkční adukty cisplatinu však rozpoznávány nejsou (Brabec *et* Kašpárková, 2003). Teorie vysvětlující chování HMG proteinů jsou následující. HMG protein se váže na adukt cisplatinu a tím ho chrání před opravnými mechanismy, nebo se HMG proteiny váží s podobnou afinitou ke svým přirozeným vazebným místům jako k aduktům cisplatinu, čímž jsou odčerpány z prostředí a neplní funkci v regulaci transkripce (Zamble *et* Lippard, 1999).

1.2 TRANSPLATINA



Jelikož transplatin byla již od počátku výzkumu protinádorových léčiv považována za inaktivní, většina vědců se zaměřovala na zkoumání geometrie *cis* a také na vývoj a výzkum dalších cytostatik s *cis* konfigurací.

Transplatin je inaktivní *in vivo* a značně méně cytotoxická *in vitro* než cisplatin. Tato skutečnost je vysvětlená menší inhibicí replikace a transkripce po ošetření buněk transplatinou. Transplatin při replikaci zastavuje DNA polymerázu méně selektivně, proto adukty transplatin ovlivňují replikaci mnohem méně než adukty cisplatin (Comess *et al.*, 1992). RNA polymerázy, zajišťující průběh transkripce, dokáží vnitřetězcové můstky tvořené transplatinou překonat poměrně snadno, zato bifunkční adukty tvořené cisplatinou významně inhibují transkripci platinované DNA (Corda *et al.*, 1992). Poškození buněk transplatinou je také mnohem rychleji opravováno.

Odstupující ligandy transplatin jsou stericky uspořádány tak, že tento komplex nemůže vytvářet můstek mezi N7 atomy dvou sousedních purinů v jednom řetězci dvoušroubovicové DNA, transplatin tedy netvoří adukty 1,2-vnitřetězcové můstky, jež jsou považovány za vysvětlení protinádorového efektu cisplatin. Bylo prokázáno, že transplatin indukuje tvorbu monoadduktů, které jsou velmi účinně opravovány, nebo podléhají dalšímu formování DNA-DNA můstků stejně tak jako DNA-protein můstků. Nedostatek protinádorové aktivity *transplatin* může být tedy spojeno s preferenční vazbou k sérovým proteinům a účinnou biodegradací těchto látek v játrech, což vylučuje možnost přítomnosti aktivní formy léčiva v místech nádoru (Kelland *et al.*, 1995). HMG1 proteiny nerozpoznávají adukty této sloučeniny, které jsou navíc velmi odlišné od cisplatin a mají vyšší sklon k destabilizaci glutationem.

Transplatin také velmi ochotně tvoří značné množství meziřetězcových můstků mezi cytosinem a guaninem ve dvojšroubovici DNA, ale tato formace nemění výrazně stabilitu a strukturu DNA (Kalinowska *et al.*, 2008).

Transplatin je kineticky více reaktivní než cisplatin, což přispívá k její deaktivaci (Brabec *et al.*, 1993).

Platinové komplexy, vázající se k DNA odlišným způsobem od klasické cisplatin, mohou vykazovat odlišné farmakologické vlastnosti. V letech 1990 apatie vůči *trans*-platinovým komplexům skončila. Byla objevena řada komplexů transplatin s vysokou protinádorovou

aktivitou a působící na rozsáhlejší spektrum nádorových buněk *in vitro*. Některé *trans*-komplexy byly dokonce aktivní i v buňkách rezistentních k cisplatině. Při mechanistických studiích, využívajících transplatinová analoga, je teorie aktivace *trans*-geometrie v protinádorových bifunkčních platinových komplexech založena na chemické modifikaci neefektivní transplatiny za vzniku stabilního meziřetězcového můstku nebo na vyšší efektivitě tvorby vnitrořetězcových můstků (Kašpárková *et al.*, 2003).

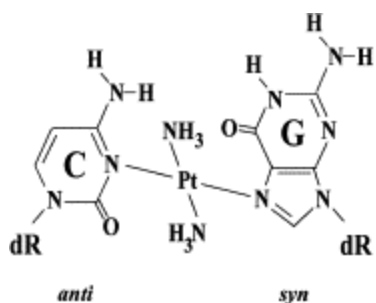
V roce 2006 bylo objeveno, že transplatina samotná vykazuje po ozáření v nádorových buňkách téměř stejně efektivní cytotoxicitu jako cisplatina. Chemické studie ukázaly, že světlo aktivuje oba chloridové ligandy a vysoce zvyšuje tvorbu meziřetězcových můstků a DNA-protein můstků, které se za tmy netvoří (Heringová *et al.*, 2006).

1.2.1 Vazba transplatiny na DNA

Výměna prvního chloridového iontu za vodu probíhá u transplatiny rychleji než u cisplatiny díky většímu *trans*-efektu chloridových iontů ve srovnání s NH₃, zato rychlost druhé hydrolyzy je o dva řády nižší než u cisplatiny (Legendre *et* Chottard, 1999). Prvním krokem vazby transplatiny na DNA je formace monofunkčního aduktu, který může dále reagovat vytvořením aduktu bifunkčního. Tato reakce byla poprvé identifikovaná nukleární magnetickou rezonancí a atomovou absorpční spektrometrií po separaci na vysokotlaké kapalinové chromatografii, enzymaticky naštěpené, transplatinou modifikované DNA (Eastman *et* Barry, 1987). Uzavírání monofunkčních aduktů do bifunkčních je pomalé (pouze 80 % za 48 hod), relativně velká část aduktů zůstává monofunkčních.

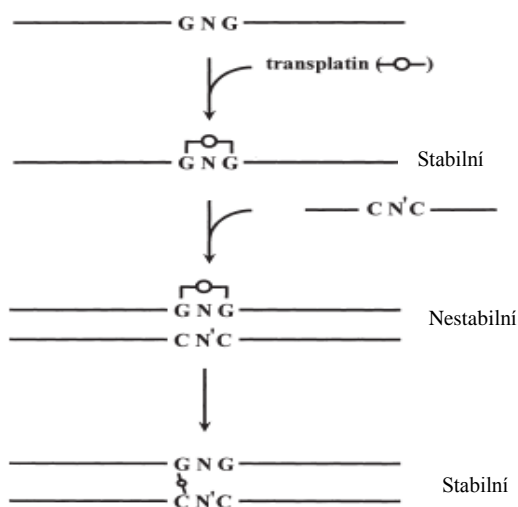
Hlavními adukty transplatiny jsou meziřetězcové můstky (12 % v lineární DNA) přednostně tvořené mezi deoxyriboguanosinem a komplementárním deoxyribocytosinem. Tento adukt ohýbá DNA o 26° směrem k velkému žlábků a rozvíjí DNA o 12° (Kartalou *et* Essigmann, 2001). V B-DNA konformaci je N7 guanin v hlavním žlábků a navázaná platina je tedy umístěná ven z helixu. Po vytvoření monofunkčního aduktu musí tento adukt rotovat okolo glykosidové vazby a přejít z konformace *anti* do konformace *syn* (viz Obr. 6), aby mohlo reagovat s komplementárním N3 cytosinem (Paquet *et al.*, 1999).

Popsány byly můstky vnitrořetězcové, vznikající vazbou transplatiny na dva guaninové zbytky separované třetí bázi, stabilní pouze v jednořetězcové DNA.



Obr. 6: Meziřetězcový můstek transplatiny mezi guaninem a komplementárním cytosinem. Cytosin je v konformaci *anti*, guanin v konformaci *syn*.

Formací dvouřetězcové DNA se spouští přeuspořádání můstku vnitrořetězcového na můstek meziřetězcový a tato reakce je nevratná (Malinge *et* Leng, 1999). Transformace je závislá na sekvenci bází v blízkosti vnitrořetězcového můstku, a také na přítomnosti purinu či pyrimidinu jako komplementární báze k bázi vyskytující se mezi guaniny (viz Obr. 7).



Obr. 7: Schéma přeuspořádání můstku vnitrořetězcového na můstek meziřetězcový u transplatiny. (G1,G3)-vnitrořetězcový můstek je tvořen v reakci s jednořetězcovou DNA v sekvenci GNG a transplatinou.

1.2.2 Přehled analogů transplatiny

1.2.2.1 *Trans*-Pt(II)Cl₂ komplexy s iminoetherovým ligandem

Nahrazení jednoho nebo dvou neodstupujících aminových ligandů v transplatině iminoetherovou skupinou vedlo k výrazně vyšší cytotoxicitě. Iminoetherové ligandy představují alifatické a aromatické aminy s vyšší lipofilitou a s tím související i vyšší akumulací těchto komplexů v buňkách A2780 a A278cisR (rezistentních k cisplatině).

Tato analoga tvoří menší množství meziřetězcových můstků a ve větší míře zůstávají ve formě monofunkčního aduktu s ohybem DNA o úhel 20° směrem k malému žlábků (Coluccia *et al.*, 1999). Tyto monofunkční adukty vytváří DNA-protein můstky ovlivňující DNA polymerázu *in vitro* při replikaci DNA, čímž dochází k horším opravám pomocí NER (Novakova *et al.*, 2003). Aduky nejsou rozpoznávány HMG proteiny a jsou odstraňovány pomocí NER, podobně jako adukty cisplatiny. Poškození vyvolané těmito komplexy je nedenedurujícího charakteru podobné jako u cisplatiny, ale odlišné od transplatiny, u které dochází k denaturačním změnám po modifikaci DNA. Komplexy jsou schopny zastavovat syntézu RNA na stejných místech a s podobnou frekvencí jako adukt tvořený cisplatinou (Zaludova *et al.*, 1997).

1.2.2.2 *Trans*-platnaté komplexy s planárními aminy

Trans-[PtCl₂(L)(L')] (L = NH₃, L' = pyridin, pikolin, chinolin, isochinolin nebo thiazol; L = L' = pyridin, thiazol) komplexy se stericky objemnými planárními aminy vykazují zvýšenou cytotoxicitu v různých typech buněčných liniích v porovnání s transplatinou, cisplatinou a buňkami k cisplatině rezistentními (Farrel *et al.*, 1992). Vhodně umístěné vodíkové atomy v kruhu vytváří sterickou zábranu, čímž snižují chemickou reaktivitu komplexů. Předpokládané povrchové a „stacking“ interakce probíhají pomocí vodíkových vazeb spojených s NH₃ skupinami. Tyto komplexy jsou převážně monofunkční s rychlostí vazby podobné transplatině. Také rychlost uzavírání bifunkčního aduktu je srovnatelná s transplatinou. Tvoří však více meziřetězcových můstků, které nejsou snadno odstraňovány NER, přetrvávají delší dobu a tím se zvyšuje jejich toxicita v nádorových buňkách (Brabec *et al.*, 2005).

1.2.2.3 *Trans*-karboxylato platnaté komplexy

Komplexy, obsahující dva halido anionty (Cl a Br) jako labilní odstupující ligandy, jsou charakterizovány vysokou aktivitou, ale i komplexy se stabilnějšími ligandy mohou být aktivními, jako například druhá generace platinových chemoterapeutik, karboplatina, oxaloplatina a nedaplatina obsahující kineticky inertní ligandy. Proto po nahrazení halido aniontů karboxylato ligandy dochází nejen k jejich vyšší rozpustnosti ve vodě, ale jsou také stabilnější vůči hydrolyze (Kalinowska *et al.*, 2008).

1.2.2.4 *Trans*-platnaté komplexy s neplanárními heterocyklickými ligandy

Tyto komplexy zahrnují komplexy s piperazinem, piperidinem a metylpiperidinem.

Komplexy jsou rozpustné ve vodě, pozitivně nabity a vykazují vysokou cytotoxicitu obzvláště k ovariálním nádorovým liniím rezistentních k cisplatině. Cytotoxicita byla testována v různých buněčných liniích, k cisplatině sensitivních i rezistentních. Buněčné linie byly vybrány na základě různých mechanismů rezistence k cisplatině: redukováný transport komplexů, zvýšený obsah redukováného glutationu, zvýšená oprava DNA či tolerance a kombinace snížené akumulace komplexů v buňkách se zvýšenou opravou DNA či tolerancí (Kalinowska *et al.*, 2008).

Komplexy tvoří více meziřetězcových můstků než transplatina, a tyto můstky modifikují DNA konformaci odlišným způsobem, než adukty transplatiny. Nahrazením aminoskupiny transplatiny heterocyklickým ligandem došlo ke zvýšení stability 1,3-GXG vnitrořetězcového můstku a tvořené můstky byly méně rozlišeny NER, což vysvětluje jejich vysokou toxicitu (Kašpárková *et al.*, 2003).

Komplexy prostupují buněčnou membránou mnohem snadněji a snadněji se váží k DNA (Kalinowska *et al.*, 2008).

1.2.2.5 *Trans*-platnaté komplexy s alifatickými aminy a/nebo heterocyklickými ligandy

Montero *et al.* nasyntetizovali a popsali novou skupinu *trans*-PtCl₂ komplexů s asymetrickými alifatickými aminy. Vykazují stejnou nebo dokonce i vyšší cytotoxicitu vůči nádorovým liniím k cisplatině sensitivním i rezistentním. Ramos-Lima *et al.*, modifikovali transplatinu nahrazením jedné aminoskupiny planární heterocyklickou skupinou a druhou aminoskupinu nahradili alifatickým ligandem. Tyto komplexy byly více rozpustné ve vodě a vykazovaly vyšší cytotoxicitu k ovariálním nádorovým liniím rezistentních i sensitivních k cisplatině, než cisplatina samotná.

1.2.2.6 *Trans*-platičité komplexy

Množství nasyntetizovaných *trans*-platičitých komplexů je velmi široké. Například Kelland *et al.* nasyntetizovali asi 25 *trans*-platičitých komplexů a jejich *trans*-platnaté protějšky a srovnali tyto komplexy na základě protinádorové aktivity *in vitro* a *in vivo*. Významnou roli u těchto látek hraje oxidační stav platiny, který se odráží v jejich geometrii a reaktivitě. Platičité komplexy podléhají substitučním reakcím pomaleji, než komplexy v oxidačním stavu II, což má za následek vyšší metabolickou stabilitu a s ní spojenou nižší toxicitu a redukci závažných vedlejších účinků na organismus člověka (Kalinowska *et al.*, 2008). Je známé, že k aktivaci platičitých komplexů je nezbytná jejich redukce na oxidační stav II. Kinetická inertnost a modifikace axiálních ligandů zvyšuje pravděpodobnost úspěšného transportu až do místa nádoru. Například modifikací axiálních ligandů můžeme dosáhnout toho, že se komplex dostane do nádorové buňky ještě před jeho redukcí na aktivní platnaté stavy.

Také některé fyzikálně-chemické vlastnosti komplexů jako lipofilicita a redukční potenciál jsou spjaty s charakterem axiálních ligandů. Nejvíce aktivními se ukázaly komplexy s axiálními ligandy OH (Kalinowska *et al.*, 2008). Platičité komplexy jsou všeobecně označovány jako proléčiva.

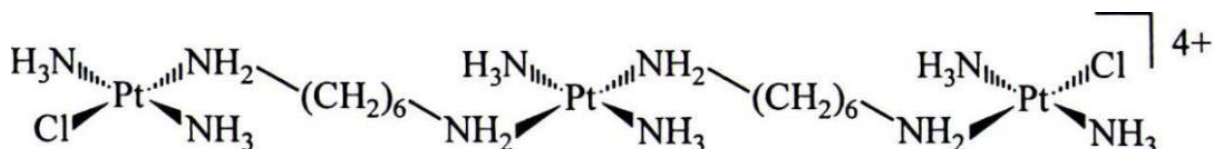
Platičité komplexy s *cis*-geometrií odstupujících ligandů zahrnují oxoplatinu používanou např. k léčbě kolorektálního karcinomu, iproplatinu, ornaplatinu a satraplatinu, které podstoupily fázi klinických zkoušek. Satraplatina je perorální platinový derivát 3. generace s omezenou nefrotoxicitou, ototoxicitou a hematologickou toxicitou. Vykazuje minimální zkříženou resistenci s cisplatinou a karboplatinou. Potencuje účinek radioterapie, ale přes výhody perorálního užití nejsou doklady o její vyšší účinnosti ve srovnání s jinými platinovými deriváty (Wheate *et al.*, 2010).

1.2.2.7 Polynukleární platinové komplexy

Profesor Farrell v roce 1988 poprvé zveřejnil dvojjaderný komplex cisplatinu, kdy dvě podjednotky cisplatinu byly spojeny flexibilním diaminovým řetězcem. Komplex byl elektricky neutrální, avšak jeho nevýhodou byla nízká rozpustnost ve vodě (Farrell *et al.*, 1988).

Polynukleární platinové komplexy patří nyní mezi nově připravovaná protinádorová léčiva. Jejich struktura je charakterizována dvěma nebo více atomy platiny spojenými různými typy ligandů. Tyto komplexy vytvářejí ve srovnání s cisplatinou strukturně odlišné adukty, tzv. můstky dlouhého dosahu přesahující přes několik párů bazí a způsobují rozsáhlejší poškození

DNA (Mangrum *et Farrell*, 2010). Přes buněčnou membránu pronikají poměrně snadno pomocí aktivního transportu či usnadněnou difúzí. Akumulují se v jádře, kde se váží na DNA a vykazují vysokou protinádorovou účinnost z důvodu tvorby můstků s dlouhým dosahem. Narozdíl od cisplatiny také vytváří více meziřetězcových můstků (Roberts *et al.*, 1999). Nejznámějším polynukleárním komplexem je komplex BBR3464 (triplatin tetranitrát), který podstoupil již II fázi klinických zkoušek. Další klinické testy této látky byly pozastaveny kvůli její snadné degradaci v krevním řečišti a nežádoucímu vlivu na organismus.



Obr. 8: Struktura trinukleárního platinového komplexu BBR3464

1.2.2.8 *Trans*-platinové komplexy s různými typy ligandů

Jedná se například o komplexy s ligandy obsahujícími DMSO, oximy, pyrazoly a fosforečné skupiny.

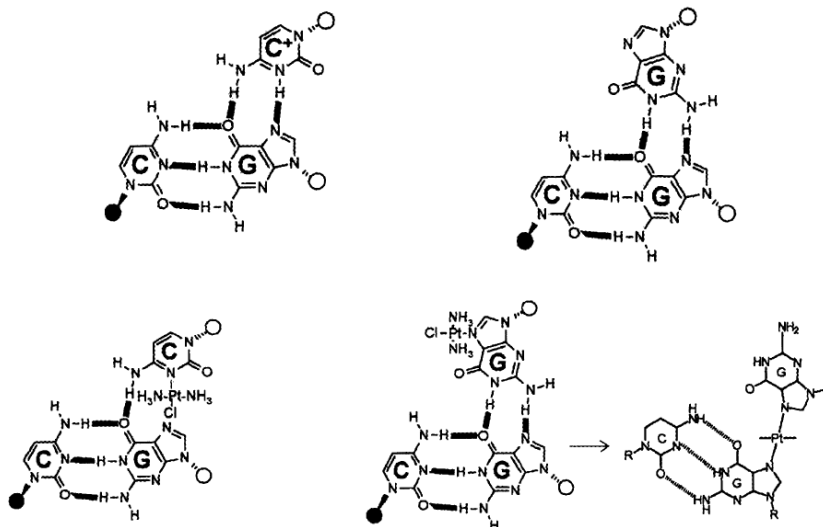
1.3 PLATINOVANÉ OLIGONUKLEOTIDY V ANTISENSE A ANTIGENE STRATEGII

1.3.1 Antisense a antigene oligonukleotidy

Nositelkou genetické informace je téměř vždy deoxyribonukleová kyselina, replikovaná a transkribovaná do mRNA pokračující v translaci do proteinů. Idea regulace genové exprese užitím oligonukleotidů vychází z prací Zamecnik *et* Stephenson z roku 1978. Objevili, že syntetický oligonukleotid (13-mer), komplementární k 3' a 5' terminální sekvenci Rous Sarkoma viru 35S, je schopný inhibovat produkci viru v infikovaných kuřecích embryonálních fibroblastových buněk. Mnoho studií již podpořilo hypotézu, že se oligonukleotidy mohou vázat *in vivo* k jejich komplementární sekvenci v mRNA nebo DNA a ovlivnit důležité buněčné procesy (Malinge *et* Lenge, 1999). Oligonukleotidy jako chemoterapeutika se dostávají do popředí zájmu výzkumu kvůli jejich schopnosti:

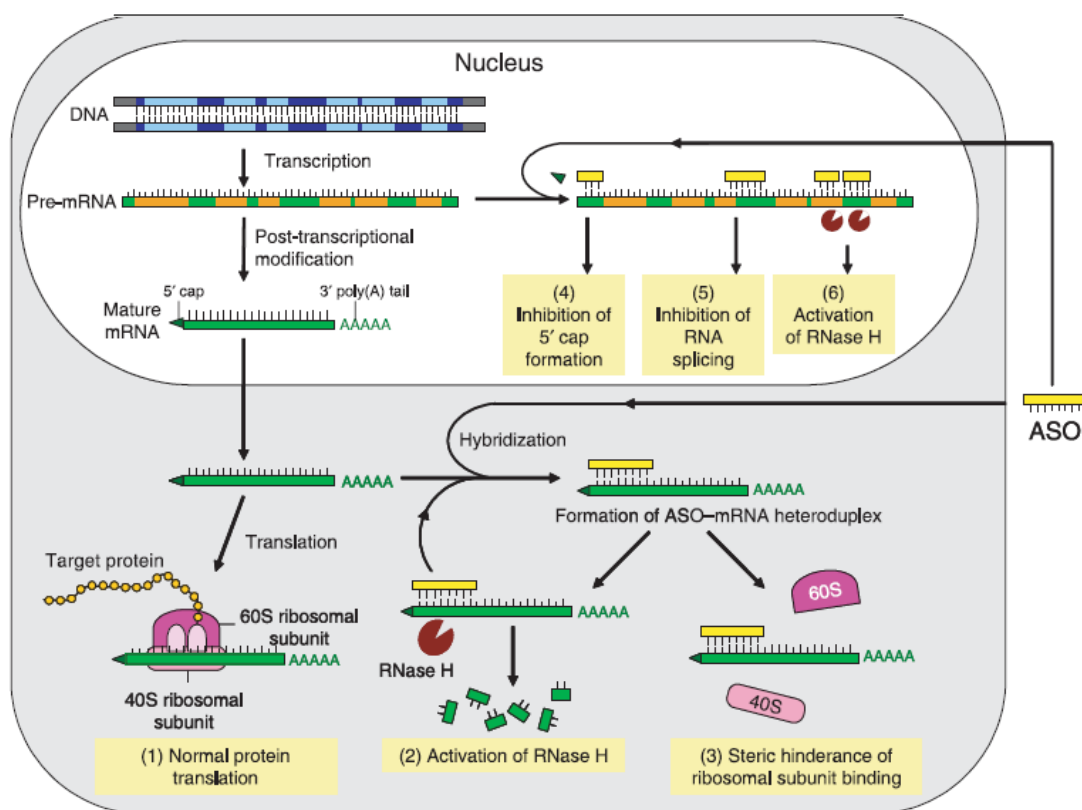
- zabránit translaci – antisense strategie (Stein *et* Cheng, 1993)
- narušit transkripci a replikaci – antigene strategie (Thuong *et* Helene, 1993)
- stát se přirozenými RNA molekulami schopnými sestříhu či štěpení dalších RNA molekul – cílení ribozymů (Lippert *et* Leng, 1999)
- vysoce specifické vazby k proteinům – aptamery (Ellington *et* Szostak, 1990)
- vystupovat jako dvouřetězcové RNA komplementární ke kódujícím regionům genů (Fire *et al.*, 1998).

Antisense a antigene strategie využívají schopnosti oligonukleotidů tvořit duplex s jednořetězcovou DNA nebo RNA na základě Watson-Crikové hybridizace, nebo triplex s dvouřetězcovou DNA nebo RNA na základě Watson-Crikové hybridizace a Hoogsteenového párování bazí (Malinge *et* Lenge, 1999). Antigene strategie využívá oligonukleotidy s nejméně 15 bazí obsahující pouze pyrimidiny, rozeznávající specifické sekvence dsDNA formací triplexu (Lippert *et* Leng, 1999). Třetí řetězec (Hoogsteenový) se váže podél hlavního žlábků v paralelním nebo anti-paralelním směru (Malinge *et* Lenge, 1999; Shafer, 1998). K inhibici transkripce dochází v iniciační nebo elongační fázi (Lippert *et* Leng, 1999, Cooney *et al.*, 1988).



Obr. 9: Báze zapojené do formace triplexů pomocí Watson-Crickového a Hoogsteenova párování bází v nemodifikované DNA a v DNA modifikované transplatinou

Antisense oligonukleotidy (ASO) jsou jednoduché řetězce DNA o délce obvykle 20 nukleotidů, které mohou být chemicky modifikovány. Pořadí nukleotidů je navrženo tak, aby oligonukleotid na základě komplementarity bází hybridizoval pomocí Watson-Crickového párování bází s molekulou mRNA, která kóduje požadovaný protein. ASO se využívají pro modifikaci exprese specifických genů *in vivo* a *in vitro* (Scanlon *et al.*, 1995) pomocí dvou hlavních mechanismů. Po vytvoření stabilního heteroduplexu mezi ASO a mRNA dochází k aktivaci RNázy H, která rozštěpí RNA-DNA heteroduplex, což vede k degradaci cílené mRNA, přičemž DNA oligonukleotidu zůstane zachována a může hybridizovat s další molekulou mRNA (Wu *et al.*, 2004). Další mechanismus zahrnuje zastavení translace pomocí sterického zabránění ribozomální aktivity (Obr. 10).



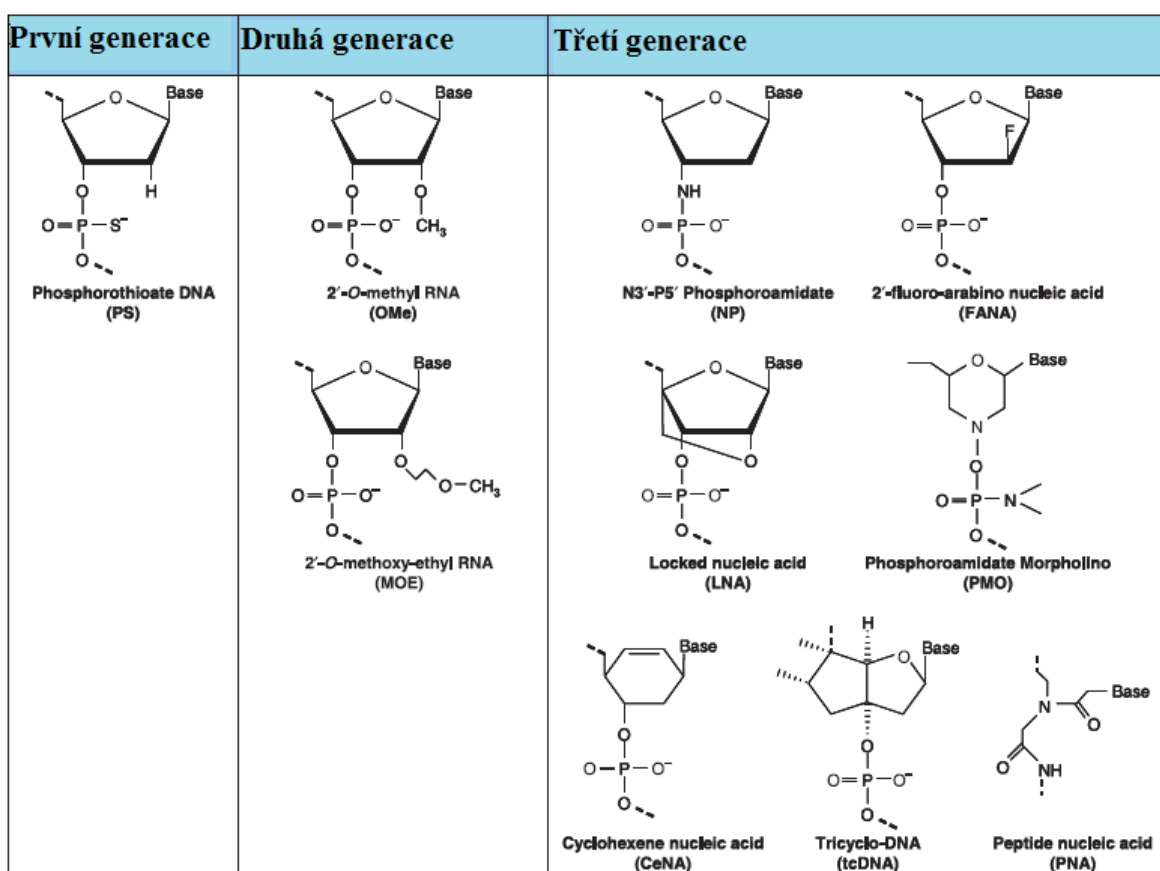
Obr. 10: Mechanismy antisense oligonukleotidů. 1.) Bez přítomnosti ASO dochází k normální expresi genů a tvorbě proteinu. 2.) ASO se do buňky dostává pomocí endocytózy a může hybridizovat s cílovou mRNA v cytoplasmě. Dochází k formaci ASO-mRNA heteroduplexu, aktivaci RNázy H a následné selektivní degradaci mRNA. 3.) Zastavení translace pomocí sterického zabránění ribozomální aktivity. 4.) ASO může vstupovat do jádra a regulovat zrání mRNA inhibicí formace 5' čepičky. 5.) Inhibice sestřihu mRNA a 6.) aktivace RNázy H. (Převzato: Chan *et al.*, 2006).

1.3.2 Modifikace antisense oligonukleotidů

ASO jsou *in vitro* i *in vivo* zničeny pomocí exo i endonukleáz. Pro zvýšení nukleázové rezistence, zvýšení afinity, účinnosti a redukci nesekvenční specifické toxicity, jsou vyvíjeny chemické modifikace antisense oligonukleotidů. Tyto jsou rozděleny do tří generací. První generace obsahuje fosforothioátovou modifikaci, která vykazuje vyšší rezistenci vůči nukleázám. Druhá generace ASO zvyšuje nukleázovou rezistenci a vazebnou afinitu k cílové mRNA v podobě modifikací 2-*O*-Methyl (2-OMe) a 2-*O*-Methoxyethyl (2-MOE). Třetí generace ASO byla vyvinuta převážně na základě chemické modifikace furanosového kruhu nukleotidu, zvyšuje dále cílovou afinitu, rezistenci vůči nukleázám, biostabilitu a farmakokinetické vlastnosti (Chan *et al.*, 2006). Nejvíce studovanou skupinou jsou peptidové nukleové kyseliny (PNA, peptide nucleic acid), syntetické DNA, kde kostru tvoří

opakující se monomery N-(2-aminoethyl)-glycinu spojené peptidovou vazbou, neobsahují žádné cukerné ani fosfátové zbytky, jsou nenabitě, achirární a acyklické. Translaci inhibují pomocí vazby na transkripty mRNA, brání posttranskripčním úpravám, transportu mRNA do cytoplasmy a následné translaci (Pellestor *et* Paulasova, 2004).

Další skupinu tvoří nukleové kyseliny s uzamčenou konformací (LNA, locked nucleic acid), kde součástí každého monomeru je metylenový můstek mezi 2'-hydroxylovou skupinou a 4'-uhlíkem furanosového kruhu (oxy-LNA). Tato modifikace výsoce zvyšuje afinitu hybridizace k mRNA a DNA (Chan *et al.*, 2006). Jsou odolné vůči nukleázám a taktéž nejsou substráty RNázy H.



Obr. 11: Chemické modifikace antisense oligonukleotidů (Převzato a upraveno: Chan *et al.*, 2006)

1.3.3 Platínace Oligonukleotidů

Pouze dostatečně stabilní komplexy ASO mohou zabránit ribosomální aktivitě, zastavit replikaci nebo transkripci, či blokovat funkci proteinu (Crooke, 1999). Problémem je častá disociace hybridu pomocí buněčných komponent. Stabilita finálního komplexu ASO může

být zlepšena formací kroslinek mezi oligonukleotidy a cílovou mRNA s použitím platiny. Například jednořetězcové oligonukleotidy obsahující dva sousední guaniny reagují s cisplatinou za vzniku 1,2-vnitřetězcového můstku, naopak transplatin vytváří 1,3-vnitřetězcové můstky v sekvenci GNG či ANG (kde N je libovolný nukleotid kromě guaninu). Uzavírání monofunkčních aduktů do meziřetězcových můstků je také mnohem častější u transplatiny a to mezi N7 guaninu a N3 protilehlého cytosinu v duplexu DNA (Brabec *et Leng*, 1993). Distorze vznikající u tohoto kroslinku je mnohem menší, než v případě cisplatiny. Transplatinou modifikované oligonukleotidy jsou efektivní modulátory genové exprese (Giraud-Panis *et Leng*, 2000; Aupeix-Scheidler *et al.*, 2000; Gee *et al.*, 1998). Kašpárková *et al.* v roce 2009 ukázali, že transplatin v dvouřetězci tvoří 1,3-vnitřetězcové můstky, ale rychlost transformace v můstky meziřetězcové a jejich stabilita je sekvencně závislá. Dalším problémem je stabilita finálního produktu a přítomnost vnitrobuněčných nukleofilů.

1.3.4 Transport antisense oligonukleotidů a klinické využití

Nemodifikované ASO mohou penetrovat přes plasmatickou membránu velmi těžší, jelikož jsou negativně nabitě. Buněčný transport zajišťuje primárně adsorpční endocytóza (Lysik *et Wu-Pong*, 2003). Množství ASO, které proniknou do buňky je všeobecně velmi nízké, dochází tedy k neustálému vývoji a výzkumu dalších modifikací. Například mechanistické techniky, jako elektroporace či mikroinjekce jsou velmi účinné při použití buněčných kultur, avšak nepraktické pro *in vivo* studie. Naopak chemické modifikace ASO jsou široce testovány *in vivo* i *in vitro*. ASO se po proniknutí do vnitrobuněčného prostoru buňky ve formě endozomu musí sžít endozomálními organelám, aby stihly přímo reagovat s mRNA v cytosolu či v jádře.

Všechny tři generace ASO prošly preklinickými toxikologickými studiemi a některé z nich dokonce podstoupily studie klinické. Dosud jediný povolený a prodávaný lék na bázi antisense DNA na světě je Vitravene - Fomivirsén sodium. Vitravene se používá pro lokální léčení cytomegalovirové (CMV) retinitidy (zánětu sítnice), což je degenerativní oportunní infekce, která postihuje osoby s AIDS a může mít za následek slepotu.

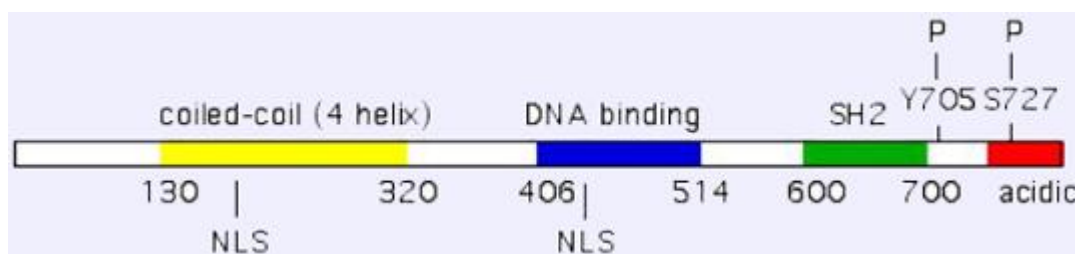
1.4 STAT3 PROTEIN (přenašeč signálu a aktivátor transkripce 3)

STAT3 protein patří do rodiny STAT proteinů zahrnující 7 členů (STAT 1, 2, 3, 4, 5a, 5b a 6). Přenáší signály z aktivovaného cytokinu a receptoru růstového faktoru v plazmatické membráně k jádru buňky (Heinrich *et al.*, 1998; Leeman *et al.*, 2006; Quesnelle *et al.*, 2007). STAT3 moduluje transkripci genů, zapojených v regulaci mnoha kritických funkcí, jakými jsou buněčná diferenciaci, proliferace, apoptóza, angiogeneze, metastáze a imunitní odpovědi. Tento protein se účastní v klíčových procesech vývoje malignit: podporuje proliferaci buněk, iniciuje vznik nádoru, migraci, invazi a indukuje mezenchymálně-epiteliální tranzici (Silver *et al.*, 2004). Geny, aktivované tímto transkripčním faktorem blokují apoptózu, upřednostňují buněčnou proliferaci a přežití buněk, podporují angiogenezi a metastázi a inhibují protinádorovou imunitní odpověď (Regis *et al.*, 2008). Mnoha pacientům se zvýšeným množstvím aktivovaného STAT3 je diagnostikována chabá prognóza (Leeman *et al.*, 2006). Nespočetné množství lidských malignit vykazuje zvýšenou hladinu konstitutivně aktivovaného STAT3. Jedná se o hematopoetické a solidní malignity zahrnující mnohočetný myelom, leukemie, lymfomy, epidermoidní kožní T-lymfom, rakovinu prostaty, prsu, vaječníku, plic, slinivky břišní, hlavy a krku (Gouilleux-Gruart *et al.*, 1996; Bowman *et al.*, 2000; Grandis *et al.*, 2000a; Huang *et al.*, 2000; Garcia *et al.*, 2001). V 94 % případech rakoviny vaječníku je aktivován STAT3 protein a tato prognóza má daleko agresivnější fenotyp (Han *et al.*, 2012; Duan *et al.*, 2006; Silver *et al.*, 2004). Je-li v nádorových buňkách narušena STAT3 signalizační dráha, dochází k inhibici růstu a apoptóze buněk (Leeman *et al.*, 2006).

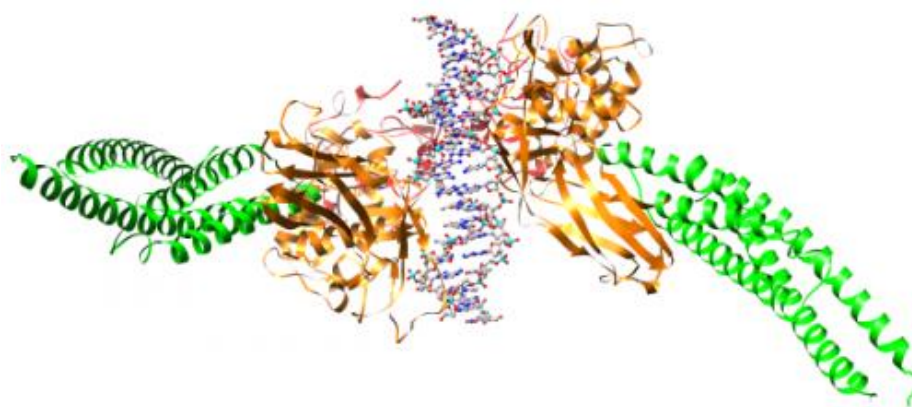
1.4.1 Struktura STAT3

STAT proteiny obsahují základní N-koncovou doménu, „coiled-coil doménu“, DNA-vazebnou doménu, SH-2 doménu a transaktivační doménu, přičemž každá z těchto domén hraje důležitou molekulární roli spjatou s funkcí STAT proteinů. SH-2 doména zprostředkovává klíčovou interakci se specifickým peptidovým motivem pTyr, zahrnující asociaci s receptorem a sepnutí aktivovaných STAT monomerů k sobě prostřednictvím interakce SH-2 domény a pTyr při dimerizaci proteinů (Zhao *et al.*, 2010). N-koncová doména zahrnuje koncových 130 aminokyselin a je složena z 8 spirál, vytvářející hákovitou strukturu. Tato doména je relativně separována od ostatních domén a není esenciální pro

dimerizaci proteinů nebo vazbu k DNA. Na druhou stranu je důležitá při interakci dimerů a kooperativě při vazbě k určitým vazebným místům DNA (Vinkemeiser *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1996). Transaktivační doména poskytuje 40-50 aminokyselin nacházejících se na karboxylovém konci STAT. „Coiled-coil“ doména, složená ze čtyř antiparalelních α -helixů, je zapojena v protein-protein interakci a bylo například publikováno, že krátký region v prvním α -helixu „coiled-coil“-domény a část DNA-vazebné domény STAT3 interaguje s transkripčním faktorem c-Jun a kooperativně aktivují transkripci α 2-makroglobulinového genu (Zhang *et al.*, 1999). „Coiled-coil“ doména STAT3 je nezbytná pro tyrosinovou fosforylaci, s tím související dimerizaci, jaderný transport a vazbu k DNA stimulovanou EGF nebo IL-6. Tento region je nezbytný pro vazbu STAT3 k cytokinovému receptoru. Asp170 lokalizovaný v prvním α helixu je důležitým reziduem pro tuto regulaci (Zhang *et al.*, 2000).



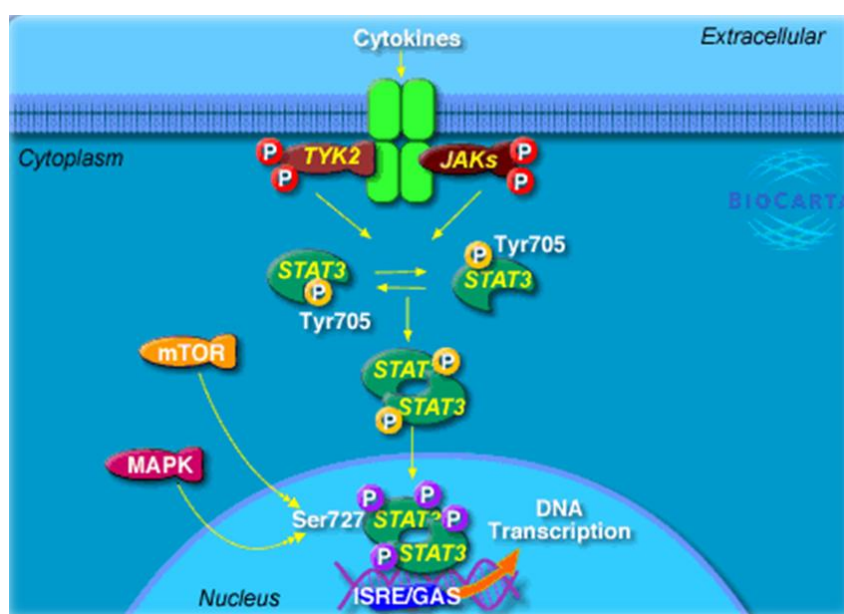
Obr. 12: Struktura STAT3, organizace domén. (Převzato: Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology).



Obr. 13: Čelní pohled STAT3 homodimeru v komplexu s DNA (Převzato: Molecular Anatomy Project).

1.4.2 STAT3 signální dráha

Aktivace růstových faktorů a cytokinových receptorů indukuje specifickou fosforylaci tyrozinu. Dochází k vytvoření vazebných míst pro latentní cytoplazmatický STAT3 obsahující SH-2 doménu, jež rozliší místa tyrozinové fosforylace. Po navázání STAT3 k aktivovanému receptoru, je STAT3 aktivován fosforylací v C-terminální doméně. Fosforylace STAT3 může být katalyzována vnitřní tyrozinkinázovou aktivitou aktivovaného růstového receptoru nebo JAK kinázou, která asociuje s aktivovaným cytokinovým receptorem. Fosforylovaný STAT3 homodimerizuje interakcí mezi SH-2 doménami a fosforylačními místy a tyto dimery se přesouvají do jádra pomocí jaderných pórů. Přesun do buněčného jádra je usnadněný interakcí importinů $\alpha 5$, $\alpha 6$ a importinu β , také import nefosforylovaného STAT3 byl popsán a to pomocí importinu $\alpha 3$ (Timofeeva *et al.*, 2012) V jádře se STAT3 dimery váží do promotoru cílových genů, kde regulují jejich transkripci.



Obr. 14: STAT3 signální dráha (Převzato: Biocarta).

1.4.3 Mechanismy aktivace STAT3 v nádorových buňkách a terapeutické využití

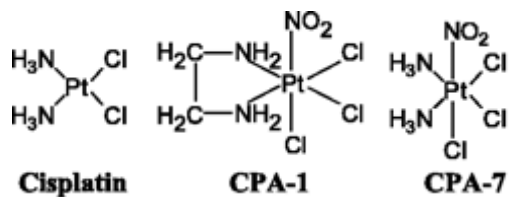
Přestože bylo detekované zvýšené množství aktivovaného fosforylovaného STAT3 v mnoha typech nádorových buněk, nebyla zatím nalezena žádná přirozená mutace zapříčiňující konstitutivní aktivaci STAT3 (Leeman *et al.*, 2006). Na aktivaci tohoto transkripčního faktoru

se podílí receptor růstového epidermálního faktoru (EGFR, human epidermal growth factor receptor), člen rodiny Erb/HER rodiny RTK (receptorové tyrozinkinázy), rodina IL-6 cytokinových receptorů a další růstové faktory a cytokiny. K dnešnímu dni existuje několik strategií, jakými zasahovat do signální dráhy STAT3 pro terapeutické využití. Příkladně inhibice fosforylace či aktivace cílí na aktivitu TRK (tyrozinkináz), JAK (Janusova kináza), SFK (Src rodina tyrozinkináz) a EGFR (epidermální růstový faktor). Existuje i několik léčiv zaměřené přímo na inhibici fosforylace, monoklonální protilátky jako například Cetuximab, inhibitor EGFR, který se využívá pro léčení metastatické rakoviny tlustého střeva. Inhibice intramolekulární interakce zahrnující STAT3 cílí na SH-2 doménu, inhibice jaderného importu či exportu využívá studie importinů a exportinů a v neposlední řadě je důležitá inhibice transkripce zprostředkované STAT3 transkripčním faktorem cílicí na vazebné místo STAT3.

Mezi strategie, kterými můžeme bokovat STAT3-DNA vazbu, patří využití dvouřetězcových oligonukleotidů (dsODN) soutěžící s aktivními STAT3 dimery o vazbu do konsenzuální sekvence, čímž dochází k blokaci indukce exprese genů a zastavení růstu nádorových buněk *in vitro* (Leeman *et al.*, 2006; Germain *et al.*, 2007; Jing *et al.*, 2005; Lui *et al.*, 2007, Zhang *et al.*, 2007). U myších modelů bylo pozorováno, že každodenní injekce dsODN inhibuje STAT3 zprostředkovanou transkripci a redukuje růst nádorových buněk (Lui *et al.*, 2007, Zhang *et al.*, 2007).

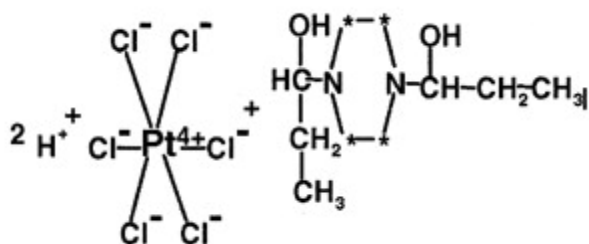
1.4.4 Platinové komplexy a STAT3

Platinové komplexy, jež vystupují jako DNA-alkylační činidla, indukují apoptotické odpovědi a jejich možná interakce s proteiny může být částí jejich celkového terapeutického působení. Dřívější práce ukázaly, že cisplatina indukuje aktivaci členů MAP kináz (mitogeny aktivované kinázy) (Sanchez-Perez *et al.*, 1998; Persons *et al.*, 1999), a proto pochopení interakce platinových komplexů se signálními drahami může přinést nové přístupy k terapeutickým benefitům těchto komplexů. Již roku 2004 byl publikován efekt komplexů platiny v signální dráze STAT3 proteinu. Turkson *et al.* popsali dva platinové komplexy CPA-1 a CPA-7 (Obr. 15), které interagují se STAT3 a ruší jeho schopnost vazby k DNA *in vitro*. Po inkubaci nádorových buněk s těmito komplexy došlo k blokaci konstitutivní aktivace STAT3, inhibici růstu buněk a apoptóze. Oba tyto komplexy patří k platičitým komplexům odvozeným od cisplatiny.



Obr. 15: Strukturní vzorce platinových komplexů odvozených od cisplatiny.

O rok později byl popsán další platičitý komplex IS3 295 (Obr. 16), který interaguje se STAT3 a inhibuje jeho vazbu ke specifickému DNA-vazebnému místu. V lidských i myších nádorových buňkách s konstitutivně aktivním STAT3 tuto signalizaci výrazně snižuje. Zastavuje buněčný cyklus v G₀/G₁ fázi a spouští apoptózu. Tento komplex navíc snižuje expresi cyklinu D1 a bcl-XL, overexprimované v maligních buňkách a regulované transkripčním faktorem STAT3 (Turkson *et al.*, 2005).



Obr. 16: Platičitý komplex IS3 295.

2 CÍLE PRÁCE

- Shrnout poznatky a vývoj dosažený v oblasti související s tématy této práce.
- Studovat mechanismus účinku *trans*-komplexů, popsat hlavní typy aduktů tvořené na DNA, určit cytotoxicitu těchto látek a rozšířit teoretické znalosti umožňující navržení nových, protinádorově aktivních léčiv s *trans*-konfigurací.
- Prohloubit znalosti ve výzkumu a vývoji antisense technologie s užitím nového komplexu s *trans*-geometrií.
- Osvojit si základní techniky práce s bakteriálními kulturami, produkci, purifikaci proteinu STAT3 a jeho následné interakční studie zahrnující vazbu STAT3 k DNA.

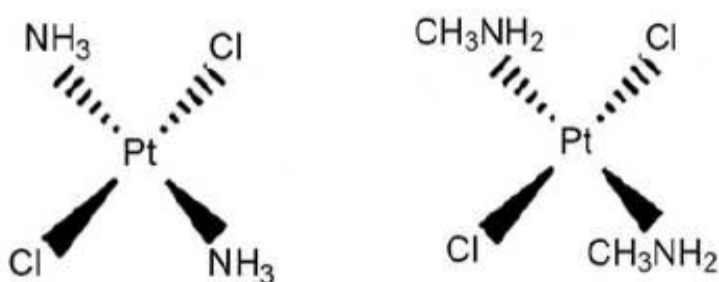
3 MATERIÁL A METODY

Materiál

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

Cytostatika

Platinový komplex *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂] byl syntetizován a charakterizován s použitím standardních metod a poskytnut profesorem D. Gibsonem z Univerzity Hebrew, Izrael, cisplatina a transplatina byly získány od firmy Sigma-Aldrich s.r.o. (Praha, Česká republika). Dienplatina [PtCl(diethylentriamin)]Cl byla poskytnuta profesorem G. Natilem z Univerzity z Bari, Itálie.



Obr. 17: Transplatina a studovaný *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂] komplex

Použitá DNA a enzymy

DNA z telecího brzlíku (42 % G + C párů, molekulová hmotnost cca 20 000 kDa) byla izolována postupem popsáním v práci (Brabec *et* Paleček, 1976), plazmid pU19 (2686 pb) byl připraven ing. M. Kořínkovou postupem popsáním v (Brabec *et* Paleček, 1976) a charakterizován standardními procedurami.

Enzymy EcoRI, Klenowův fragment DNA polymerázy I (exo-), T4 polynukleotid kináza a příslušné pufry byly dodané firmou New England Biolabs (Beverly, MA), T7 a SP6 RNA polymerázy, RNasin Ribonuclease inhibitor byl zakoupený od firmy Promega (Mannheim, Německo), ribonukleosidtrifosfáty a deoxyribonukleosidtrifosfáty od firmy Roche Diagnostic, GmbH (Mannheim, Německo), syntetické oligonukleotidy od firmy VBC-genomics (Viedeň, Rakousko).

Buněčné linie A2780 a A2780cisR, MCF-7 poskytl profesor B. Keppler z Univerzity ve Vídni, Rakousko; linii CHO-K1 poskytl dr. M. Piršel z Onkologického ústavu SAV, Bratislava; kompetentní buňky TKB1 byly poskytnuty firmou Aligent Technologies.

Syntetické oligodeoxyribonukleotidy

20-mer TOP (TGTGT): 5'-CCTCTTCTTGTGTTCTTCTC-3'
20-mer BOT 3'-GGAGAAGAACAACAAGAAGAG-5'
20-mer TOP (CGCGC): 5'-CCTCTTCTCGCGCTTCTC-3'
20-mer BOT 3'-GGAGAAGAGCGCGAGAAGAG-5'
20-mer TOP (TGAGT) 5'-CCTCTTCTTGAGTTCTTCTC-3'
20-mer BOT 3'-GGAGAAGAACTCAAGAAGAG-5'
20-mer TOP (TGCGC) 5'-CCTCTTCTTGCGCTTCTC-3'
20-mer BOT 3'-GGAGAAGAACGCGAGAAGAG-5'
15-mer TOP (TGTGT) 5'-CTTCTTGTGTTCTTC-3'
15-mer BOT 3'-GAAGAACAACAAGAAG-5'
15-mer TOP (TGAGT) 5'-CTTCTTGAGTTCTTC-3'
15-mer BOT 3'-GAAGAACTCAAGAAG-5'
15-mer TOP (CGCGC) 5'-CTTCTCGCGCTTTC-3'
15-mer BOT 3'-GAAGAGCGCGAGAAG-5'
15-mer TOP (TGCGC) 5'-CTTCTTGCGCTTTC-3'
15-mer BOT 3'-GAAGAACGCGAGAAG-5'
55-mer TOP 5'-TCTGCGCAACTCGTGCCCATTTCCCGTAAATCAGATTCAGGATCAGGTGACTTGG-3'
55-mer BOT 3'-AGACGCGTTGAGCACGGGTAAAGGGCATTTAGTCTAAGTCTTAGTCCACTGAACC-5'

byly zakoupeny od firmy VBC-Genomics (Víděň, Rakousko) a byly purifikovány a charakterizovány postupy popsány v práci Brabec *et al.* v roce 1992.

Chemikálie

Sephadex G-50 coarse byl dodán firmou Amersham Biosciences (Velká Británie), agaróza FMC BioProducts (Rockland, ME, USA) a ethidium bromid od firmy Merck KgaA (Darmstadt, Německo). Radioaktivní produkt [α -³²P]dATP a [γ -³²P]dATP byly získány od firmy Izotop (Budapešť), ethidium bromid, thiomocovina, acrylamid, bis(acrylamid) a kyanid sodný (NaCN) byly od firmy Merck KgaA (Darmstadt, Německo), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT) od firmy Calbiochem (Darmstadt, Německo), RPMI 1640 medium, fetální boviní sérum (FBS), trypsin, EDTA a DMEM medium od firmy PAA (Pasching, Austria), gentamycin od firmy Serva (Heidelberg, Německo), extrakt z buněk

(CFE, cell-free extract) byl připraven z buněk CHO-K1 s účinnou opravou (Reardon *et al.*, 1999), dimethyl sulfát (DMS), KMnO_4 , diethylpyrocarbonate (DEPC), KBr, a KHSO_5 , β -mercaptoethanol, phenylmethanesulfonyl fluorid, proteasový inhibitor, glycerol, 3-indoleakrylová kyselina, EZBlue gel staining reagent, chlorid hořečnatý, tetracyklin, kanamycin, Thyamin-HCl, Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranozid (IPTG), kyselina boritá, LB Broth a LB agar od firmy Sigma (Praha, ČR).

Metody

3.1 Platinace DNA

Plazmidová nebo DNA z telecího brzlíku byla inkubována s platinovými komplexy v NaClO₄ (10 mM) při 37°C. Po 24 hodinách byly vzorky dialyzovány a za pomoci FAAS bylo zjištěno r_b (r_b je definováno jako počet molekul platinového komplexu navázaného na nukleotid).

3.2 Kinetika vazby stanovená polarograficky a voltametricky

Jelikož je většina sloučenin polarograficky aktivních, rychlost vazby komplexu platiny na DNA byla stanovena pomocí diferenční pulzní polarografie (DPP) a 'square wave' voltametrie se čtvercovými vlnami (SWV) (Kim *et al.*, 1990) za použití přístroje EG&G Princeton Applied Research Model 384B Polarographic analyzer. U DPP i SWV dochází v elektrolytu (formaldehyd-hydrazin-kyselina sírová) ke srážení DNA i DNA s navázanou platinou, kdy nastává okamžité zastavení další reakce, přičemž nedojde k disociaci komplexu platiny již navázaného na DNA. Polarografický signál dává pouze nenavázaná sloučenina platiny.

Kinetika vazby *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂] na DNA byla stanovena pomocí DPP nebo SWV s využitím tříelektrodového systému se rtuťovou kapkovou elektrodou, argentchloridovou srovnávací elektrodou (3 M KCl) a pomocnou elektrodou realizovanou platinovým drátkem.

Při použití DPP je před odkápnutím kapky (každou 1 s) na elektrodu vložen napěťový puls. Výsledný proud v okolí rtuťové kapky je měřen dvakrát, před vložením pulzu a ke konci pulzu. Registruje se rozdíl těchto dvou proudů s výsledkem ve tvaru píku, tzv. polarogram (Bard *et Faulkner*, 2000).

Rtuťová kapka odkapávala každou 1 s, rychlost polarizace 5 mV/s s počátečním potenciálem 0,60 V a koncovým potenciálem -1,05 V.

Elektrolyt byl složen z 0,002 M hydrazinu, 0,02 M formaldehydu a 0,75 M kyseliny sírové. Nejprve byla získána kalibrační křivka a nalezena nejvyšší možná koncentrace sloučeniny platiny, pro kterou byla tato závislost ještě lineární. Výsledné koncentrace platinových sloučenin se pohybovaly v rozmezí $1 \cdot 10^{-8}$ M až $1 \cdot 10^{-9}$ M.

Poté byla DNA z telecího brzlíku inkubovaná s *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂] na $r_i = 0,1$ při 37°C v 0,01 M NaClO₄ (r_i = počet molekul komplexu připadajících na 1 nukleotid na počátku inkubace). Ihned po smíchání komponent byl odebrán alikvot z reakční směsi a přidán do

roztoku elektrolytu (čas 0, 100 % nenavázaného komplexu). Alikvoty byly odebírány i v dalších časových intervalech pro pozorování úbytku nenavázaného komplexu v roztoku.

Množství nenavázané platiny C (v procentech) bylo stanoveno podle vzorce:

$$C(\%) = [(I_p - I_b)/(I_{p0} - I_b)] \times 100,$$

kde C (%) je relativní množství nenavázané platiny v roztoku, I_{p0} je velikost proudu při - 0,9 V získaného v čase nula pro 100 % nenavázaného komplexu. I_p je velikost proudu v daném čase a I_b je velikost proudu stanovená pro čistý elektrolyt [v nepřítomnosti komplexu platiny (slepý vzorek)].

Jako další elektrochemická metoda pro stanovení rychlosti vazby sloučeniny platiny na DNA byla použita voltametrie se čtvercovými vlnami (SWV). Rozdílem mezi DPP a SWV je skutečnost, že k obnově rtuťové kapky nedochází po každém napěťovém pulzu, ale celé měření probíhá na povrchu jedné rtuťové kapky. Pozitivum SWV je tedy rychlé vyhodnocení experimentu. Složení elektrolytu, kompozice vzorku, použitý přístroj i vyhodnocení experimentu probíhalo stejně jako u DPP, rychlost polarizace byla 4 mV/s s počátečním potenciálem -0,5 V a koncovým potenciálem -1,0 V, výška napěťového pulzu 50 mV s frekvencí 100 Hz.

3.3 Kinetika vazby stanovená pomocí AAS

Reakční směs obsahovala DNA z telecího brzlíku v koncentraci $4,7 \cdot 10^{-4}$ M (vztažené na koncentraci fosforu), komplex platiny v koncentraci $4,2 \cdot 10^{-5}$ M. Tato směs byla inkubovaná při 37°C v 0,01 M NaClO₄. Z roztoku byly v časech 20 min, 60 min a 24 hod odebírány alikvoty a okamžitě zamrazeny pro zastavení další reakce. Následně byly vzorky dialyzovány proti 0,2 M NaCl a proti vodě pro odstranění nenavázané platiny. Vzorek v čase $t = 0$ byl ponechán bez dialýzy a byl brán jako 100 % obsahu komplexu platiny. Po dialýze byla spektrofotometricky stanovena koncentrace DNA měřením absorbance při 260 nm. Ve všech vzorcích byla také stanovena koncentrace navázaného komplexu za pomoci atomové absorpční spektrometrie na přístroji Varian Zeeman atomic absorption spectrometer AA240Z s atomizací v grafitové cele (graphite tube atomizer GTA 120).

3.4 Měření teploty tání

Při zvyšující se teplotě dochází k narušování párů bazí až do úplné denaturace DNA. Během tohoto procesu se zvyšuje absorbance v oblasti vlnových délek okolo 260 nm a jako záznam se uvádějí denaturační křivky DNA, což jsou závislosti absorbance měřené při 260 nm na

teplotě. Z těchto křivek se pak dá určit teplota tání T_m (teplota, při které dojde k denuraci 50 % páru bazí) z polohy inflexního bodu sigmoidy. Podle teploty tání se dá určit míra destabilizace DNA v důsledku jejího poškození.

Měření probíhalo při dvou iontových silách, v prostředí 10 mM NaClO₄ nebo 100 mM NaClO₄ s 1 mM Tris-HCl plus 0,1 mM EDTA pH 7,4 na přístroji Varian Cary 4000 UV-VIS Spectrometer, při vlnové délce 260 nm a v rozsahu teplot 25°C – 95°C. Teplota tání byla určena pomocí programu GrafPad jako 1. derivace naměřených křivek.

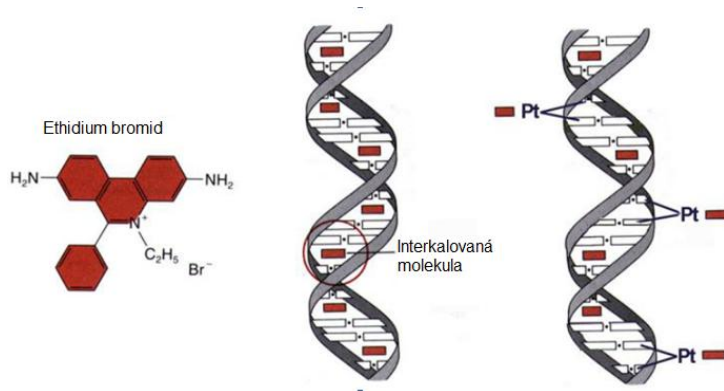
Bylo prokázáno, že teplota tání DNA modifikované platinovými komplexy silně závisí na koncentraci kationtů v médiu, které neutralizují negativní náboje fosfátových skupin DNA. Výsledky z práce (Žaludová *et al.*, 1996) dokazují, že nejméně tři faktory ovlivňují stabilitu DNA po vazbě platinových komplexů:

- Stabilizační efekt pozitivních nábojů komplexu platiny
- Meziřetězcové můstky; platina se váže na oba řetězce a znesnadňuje tak denuraci, dochází ke stabilizaci
- Destabilizační efekt konformačních distorzí v DNA po vazbě komplexu

3.5 Měření fluorescence ethidium bromidu

Ethidium bromid je fluorescenční barvivo, které interkaluje do nukleových kyselin, čímž se intenzita jeho fluorescence výrazně zvýší.

Vazba EtBr na DNA je znemožněna tvorbou bifunkčního aduktu, kdy dochází k poklesu intenzity fluorescence. Nejnižší pokles intenzity fluorescence ze známých studovaných sloučenin platiny je zaznamenán u dienplatiny, která tvoří převážně monofunkční adukty. DNA z telecího brzlíku ve výsledné koncentraci 10 µg/ml byla inkubována s *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂] a pro srovnání také s transplatinou, dienplatinou a cisplatinou při 37°C v 0,01 M NaClO₄ po dobu 24 hod na různé hodnoty r_b , tedy na různé hodnoty molárního poměru navázaného komplexu platiny na DNA, v rozmezí 0 – 0,08. Poté byl k jednotlivým vzorkům přidán roztok EtBr ve výsledné koncentraci 40 µg/ml. Intenzita fluorescence byla měřena na přístroji Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer v 0,4 M NaCl (pro zabránění sekundární vazby EtBr na DNA (Butour *et Macquet*, 1977; Butour *et al.*, 1991) za použití 0,5 cm křemenné kyvety při excitační vlnové délce 546 nm. Emitovaná fluorescence byla analyzována při 590 nm.



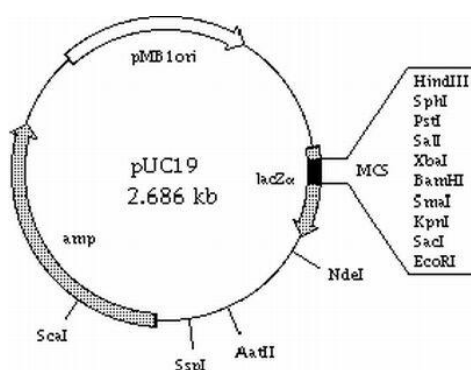
Obr. 18: Blokace interkalace ethidium bromidu do DNA bifunkčním aduktem cisplatiny.

3.6 Rozvíjení negativně vinuté plazmidové DNA

Elektroforetická pohyblivost DNA závisí na stupni superhelikálního vinutí cirkulární DNA.

Zvyšující se množství navázaného komplexu na negativně superhelikální DNA snižuje její pohyblivost, až do doby, kdy se DNA stane relaxovanou (OC, open circle). Dochází tedy k jejímu rozvíjení. Tato migruje v agarózovém gelu pomaleji, než nadšroubovicově zavinutá DNA. Další zvyšování modifikace DNA vyvolává pozitivní nadšroubovicové vinutí (Keck *et al.*, 1992). Je třeba najít stupeň modifikace komplexem platiny (r_b), kdy vzorky obou forem relaxované a negativně nadšroubovicově zavinuté DNA v gelu komigrují.

Pro tento pokus byl použit plazmid pUC19. Plazmid pUC19 (Obr. 19) patří mezi mnohokopiové plazmidy, replikuje se nezávisle na chromozomální DNA a mnohočetné klonovací místo je uloženo uvnitř regionu *lacZ* genu. Velikost DNA pUC19 je 2686 bp. Superhelikální hustota $\sigma = -0,05$ je podobná superhelikální hustotě nadšroubovice DNA u řady eukaryotických chromozomů *in vivo* (Serban *et al.*, 2002).



Obr. 19: Genetická mapa plazmidu pUC19 (<http://www.genaxxon.com>)

Vzorky plazmidové DNA byly inkubovány se studovaným platinovým komplexem po dobu 24 hod při 37°C v 0,01 M NaClO₄ při různých r_b (0 - 0,1). Poté byly podrobeny analýze v 1 % nativním agarózovém gelu v Tris-acetát/EDTA (TAE) pufru při napětí 18 V po dobu 12 hod. Následně byl gel obarven ethidium bromidem. Úhel rozvinutí připadající na jeden adukt Φ se vypočítá podle vztahu

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

kde σ je superhelikální hustota pro použité plazmid, $r_b(c)$ je stupeň modifikace, při kterém dochází ke komigraci superhelikální a relaxované formy.

3.7 Detekce meziřetězcových můstků na plazmidové DNA

Sloučeniny platiny jsou schopny tvořit meziřetězcové můstky studované na plazmidové DNA po její linearizaci restrikční endonukleázou EcoRI od firmy BioLabs o aktivitě 20 U/ μ l která štěpí DNA v sekvenci G↓AATC.

Plazmid pUC19 byl inkubován s EcoRI po dobu 1 hod, poté byla úspěšnost linearizace zkontrolována na 1% agarózovém minigelu obarveném ethidium bromidem v koncentraci 0,5 μ g/ml, enzym a další případné proteiny byly odstraněny pomocí extrakcí fenolem. Byl přidán stejný objem fenolu, jako byl objem analyzovaného vzorku, roztok byl protřepán a zcentrifugován pro oddělení vodné a organické fáze. Vodná fáze, v níž se vyskytovala DNA, byla odebrána a smíchána se stejným objemem chloroformu pro úplné odstranění zbytku fenolu. Roztok byl opět protřepán a zcentrifugován a vodná fáze byla odebrána do nové zkumavky.

Dále bylo nutné DNA převést do vhodného pufru pomocí srážení etanolem.

K lineární plazmidové DNA byl přidán octan sodný do výsledné koncentrace 0,3 M. Dále se přidal dvojnásobek objemu původního roztoku vychlazeného, 100 % etanolu a vzorek se přemístil na 30 min do -20°C. Po následné centrifugaci při 15000 g, 15 min, 4°C byla sraženina DNA promyta vychlazeným 80 % ethanolem a znovu zcentrifugována. Následovalo odstranění ethanolu jeho odpařením v exikátoru. Plazmidová DNA byla rozpuštěna v 0,01 M NaClO₄.

Volné 3' konce lineární DNA byly radioaktivně naznačeny pomocí radioizotopu [α - ³²P]dATP, Klenowova fragmentu DNA polymerázy I v prostředí pufru *Neb2* v celkovém

objemu 10 μ l. Nezareagovaný [α - 32 P]dATP byl odstraněn zachycením na chromatografické kolonce naplněné Sephadexem G50 coarse. Radioaktivně značená plazmidová DNA byla poté přidána k neznačené lineární DNA.

Komplex platiny a pro kontrolu i cisplatina a transplatina byly inkubovány s takto připravenou DNA 24 hod při 37°C při různých hodnotách r_b .

Vzorky byly denaturovány přidávkem 0,1 M NaOH a naneseny na denaturační agarózový 1 % gel (0,03 M NaCl; 0,001 M EDTA).

Elektroforéza probíhala při pokojové teplotě po dobu 6 hodin při napětí 50 V. Za těchto podmínek došlo k denuraci DNA. Pokud jsou na DNA vytvořené meziřetězcové vazby, řetězce se neoddělí, dvouřetězcová forma putuje v gelu pomaleji než jednořetězcová. Gel byl poté vysušen, vyhodnocen pomocí přístroje Fujifilm BAS-2500 a radioaktivita v jednotlivých pásech vyhodnocena pomocí AIDA image analyzer software.

Po zjištění intenzity radioaktivity v jednotlivých pásech odpovídajících frakcím DNA, které obsahovaly nebo neobsahovaly meziřetězcové můstky, lze vypočítat množství meziřetězcových můstků připadajících na jeden adukt (IEC/Pt) dle následujícího vzorce:

$$\text{IEC/Pt} = \text{XL} / \text{N} \cdot r_b (\%)$$

kde XL je množství meziřetězcových vazeb na molekulu linearizované dvouřetězcové DNA, vypočítané podle Poissonova rozdělení jako $\text{XL} = -\ln A$, kde A je frakce molekul odpovídající jednořetězcové DNA, zjištěná denzitometrickým vyhodnocením gelu. N je počet bází plazmidu (pro pUC19 5372 bází), r_b je počet molekul platnatého komplexu vázaných na jeden nukleotidový zbytek v DNA.

3.8 Reakce s thiomochovinou

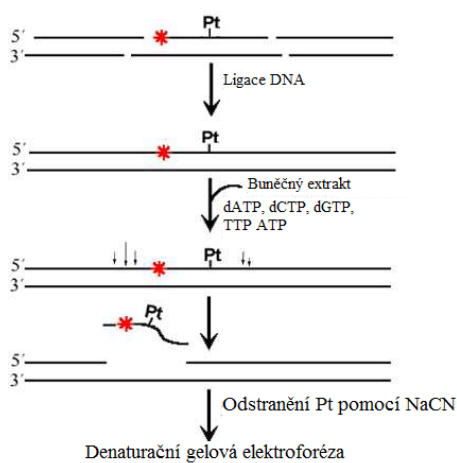
Cisplatina, transplatina a jejich analogy se váží k DNA ve dvou krocích, vytvářející nejprve monofunkční adukty, které se poté uzavírají do aduktů bifunkčních (Johnson *et al.*, 1989). Thiomočovina se využívá pro labilizaci monofunkční vazby transplatiny z DNA (Gelasco *et Lippard*, 1999). Vazba mezi dusíkem a platinou je oslabena díky silnému *trans*-efektu síry v thiomochovině. Díky tomu je transplatina v monofunkčním aduktu z DNA uvolněna, zatímco bifunkční adukty jsou k působení thiomochoviny inertní (Gelasco *et Lippard*, 1999).

Tento experiment byl zaměřen na charakterizaci aduktů transplatiny a jejího anagola.

DNA z telecího brzlíku o koncentraci $4,7 \cdot 10^{-4}$ byla modifikovaná *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂] a transplatinou při r_i 0,05 a inkubovaná v 10 mM NaClO₄ při 37°C. V různých časových intervalech byly odebírány alikvoty, reakce byla zastavena přidáním 0,2 M NaCl a okamžitým snížením teploty vzorku na -20°C. V paralelním experimentu byla k těmto alikvotám přidána 10 mM thiomočovina, inkubace probíhala následně při 37°C po dobu 10 min a poté byly vzorky zmrazeny na -20°C.

Vzorky byly dialyzovány proti 0,2 M NaCl a proti vodě, pro odstranění nenavázaného komplexu platiny. Vzorek v čase $t = 0$ byl ponechán bez dialýzy a byl brán jako 100 % obsahu komplexu platiny. Po dialýze byla spektrofotometricky stanovena koncentrace DNA měřením absorpance při 260 nm. Ve všech vzorcích byla také stanovena koncentrace navázaného komplexu za pomoci atomové absorpční spektrometrie na přístroji Varian Zeeman atomic absorption spectrometer AA240Z s atomizací v grafitové cele (graphite tube atomizer GTA 120).

3.9 Nukleotidová excizní oprava DNA



Ke studiu nukleotidové excizní opravy DNA poškozené komplexy platiny byl použit plazmid pUC19, který byl nejprve přesrážen a rozpuštěn v 10 mM NaClO₄. 0,6 μg DNA bylo inkubováno s danými komplexy (cisplatinou, transplatinou, *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂]) při $r_b = 0,5$ 24 hod při 37°C. Jako kontrola byl použit samotný plazmid pUC19. K daným vzorkům bylo přidáno 0,1 M ATP, 5x pufr pro opravnou syntézu (220 mM HEPES – KOH pH

7,8; 35 mM MgCl₂; 2,5 mM dithiothreitol; 100 μM dCTP; 100 μM dGTP; 100 μM dTTP; 20 μM dATP; 20 mM fosfokreatin; 17 % glycerol; 1,5 mg/ml hovězí sérum albumin), kreatinfosfokináza ($c = 2,5$ mg/ml), radioaktivní [α -³²P]dATP a buněčný extrakt z reparačně proficientních křeččích ovariálních nenádorových buněk. Reakce probíhala 3 hod při 37°C. Přidáním 0,5 % EDTA, 10 % SDS a proteinkinázy K (10 mg/ml) a ponecháním 20 minut při 45°C byla reakce zastavena. Vzorky byly podrobeny extrakci chloroformem a fenolem v poměru 1:1 a přesráženy ethanolem. Po vysušení byly následně rozpuštěny v TE pufru a linearizovány restrikčním enzymem EcoRI. Analýza probíhala za použití 1 % agarózového nativního gelu. Po obarvení ethidium bromidem byl gel vyfotografován a po vysušení gelu

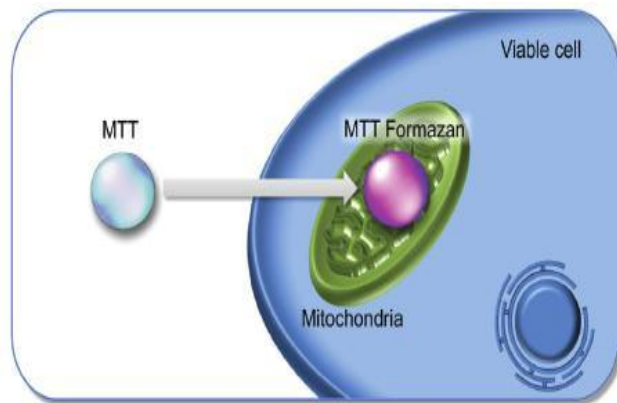
byla vyhodnocena intenzita radioaktivity související s jednotlivými pásy pomocí přístroje Typhoon FLA 9000 biomolecular imager a programu Aida Image Analyzer.

Oprava DNA poškozené protinádorově účinnými komplexy platiny vede ke snížení jejich protinádorové účinnosti, naopak pokud adukty vytvořené na DNA těmito komplexy jsou vůči systémům opravujícím poškozenou DNA rezistentní a přetrvávají na DNA, mohou spustit další procesy v buňce vedoucí k její programované smrti.

Opravná reakce plazmidu pUC19 poškozeného komplexy platiny byla studována sledováním inkorporace radioaktivně značených nukleotidů do nově syntetizované DNA během opravy, pomocí gelové elektroforézy a vyhodnocena denzitometricky. Celkové množství DNA v reakci analyzované gelovou elektroforézou bylo zjištěno pomocí obarvení gelu EtBr.

3.10 Stanovení cytotoxicity – MTT test

Přežití nádorových buněk se vyhodnocuje na základě spektrofotometrie. Tato metoda je založena na redukci žlutého solubilního 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidu (MTT) na nerozpustný formazan (modré krystaly hvězdicovitého tvaru). Reakce probíhá na mitochondriální membráně živých buněk. Formazan se rozpustí přidáním silného detergentu a zabarvení se vyhodnocuje spektrofotometricky při vlnové délce 540 nm. Hodnota absorbance roztoku odpovídá množství živých buněk (čím tmavší barva a tedy vyšší absorbance, tím vyšší procento živých buněk). Princip konverze byl popsán v roce 1954 Blackem *et* Speerem a metoda byla zavedena do laboratorní praxe Mosmanem v roce 1983 (tzv. kolorimetrický test stanovení životnosti buněk). Buňky byly vysety na 96 jamkovou destičku s hustotou 10 000 buněk/jamku. Po 12 hod byly buňky inkubovány s testovanými komplexy. Po 72 hodinové inkubaci bylo přidáno 10 μ l MTT (2,5 mg/ml) a dále byly inkubovány po dobu 4 hod. Po odstranění média bylo přidáno DMSO (100 μ l), kvůli rozpuštění formazanu. Životaschopnost buněk byla měřena při absorbanci 570 nm za použití přístroje Absorbance Reader SUNRISE TECAN SCHOLLER. Hodnota IC50 (koncentrace komplexu, která způsobí smrt 50 % buněk), byla vypočítána z grafické závislosti procenta cytotoxicity na koncentraci daného komplexu. Procento cytotoxicity se vypočítá jako podíl absorbance buněk s daným komplexem a absorbance kontroly s rozpouštědlem x100.



Obr. 20: Schéma působení MTT v buňce.

3.11 Transkripční mapování

Syntéza RNA *in vitro* se zastaví, jsou-li na templátové DNA různé typy bifunkčních aduktů komplexů platiny (Corda *et al.*, 1991; Lemaire *et al.*, 1991). Monofunkční adukty syntézu RNA nezastavují. Po štěpení plazminu pSP73 (NdeI/HpaI) získáme 221 bp dlouhý fragment obsahující promotor pro T7 RNA polymerázu. Po modifikaci platinovými komplexy byl tento fragment použit jako templát pro syntézu RNA. Výsledkem reakce byly fragmenty různé délky, jelikož došlo k ukončení syntézy v místech bifunkčních aduktů.

3.12 Akumulace komplexů v nádorových buňkách

Pro stanovení akumulace komplexu *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂], transplatiny a cisplatiny byly využity nádorové ovariální buňky A2780. Buňky byly vysety na 100 mm kultivační misky v počtu 30 000 buněk/cm² a inkubovány při 37°C v 5 % atmosféře CO₂ přes noc. Po inkubaci přes noc byly buňky inkubovány s platinovými komplexy (*trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂], cisplatina, transplatina) (10 μM) po dobu 24 hod. Buňky byly promyty ledovým fosfátovým pufrém (PBS) a buněčné pelety byly skladovány při teplotě -80°C.

Tyto pelety byly mineralizovány v koncentrované kyselině chlorovodíkové a rozloženy mikrovlnnou digescí v systému MARS5, CEM. Výsledný obsah platiny ve vzorcích byl stanoven pomocí FAAS.

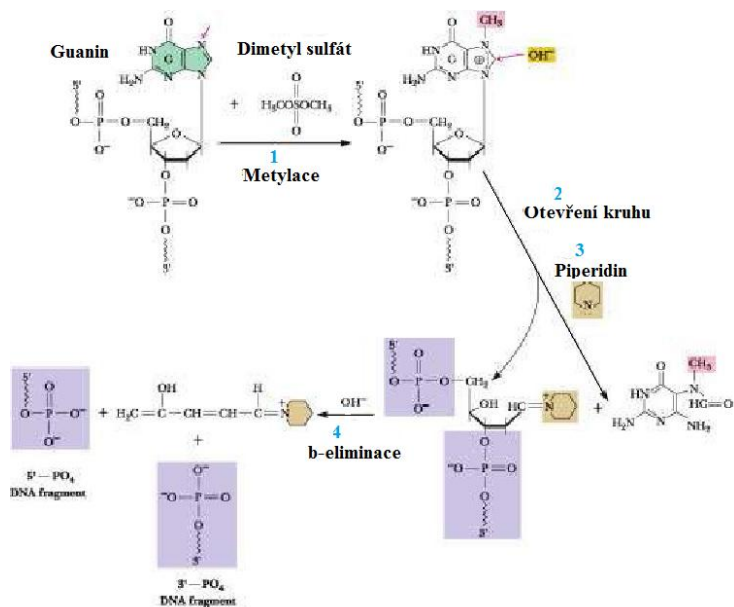
3.13 Modifikace oligonukleotidů transplatinou a *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂] a jejich radioaktivní značení

Horní řetězce oligonukleotidů byly po 24 hod inkubaci s komplexy platiny v poměru 1:1 přečištěny na FPLC. Pharmacia Biotech s kolonou MonoQ HR 5/5. Pomocí FAAS byl ověřen poměr jednoho atomu platiny připadajícího na jeden oligonukleotid. Řetězce byly naznačeny

na jejich 5' koncích pomocí T4 polynukleotid kinázy (PNK) a $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$. PNK katalyzuje přenos koncového fosfátu ATP na 5' hydroxylovou skupinu DNA. Reakcí s DMS, popsanou níže, bylo prokázáno, že se platinové komplexy navázaly na N7 guaniny a vytvořily 1,3-vnitrořetězcový můstek. Hybridizace komplementárních řetězců probíhala 1 hod při 4°C v pufru obsahujícím 0,1 M NaClO_4 nebo 0,2 M NaCl .

3.14 Ověření platinace na N7 guaninu reakcí s DMS

Tato metoda je modifikací metody navrženou A. Maxamem a W. Gilbertem (Maxam *et al.*, 1980). Je založena na schopnosti dimethyl sulfátu (DMS) metylovat dusíkové atomy bází neúčastnících se Watson-Crickových interakcí, zahrnující N7 guaninu a v mnohem menší míře také N3 adeninu. Horký piperidin poté štěpí fosfodiesterovou vazbu. Je-li na N7 guaninu kovalentně navázaná platina, nemůže k reakci s DMS a následnému štěpení dojít. Vzorky byly analyzovány na 20 % polyakrylamidovém gelu.



Obr. 21: Štěpení fosfodiesterové vazby pomocí DMS a piperidinu.

3.15 Chemické sondy pro studium konformačních distorzí DNA v okolí aduktu

K získání informací o ovlivnění konformace DNA adukty transplatiny a studovaného komplexu byly využity oligonukleotidy obsahující specifické místo pro vytvoření 1,3-vnitrořetězcového aduktu. Reakce se sondami manganistanem draselným (KMnO_4), dietylpyrokarbonátem (DEPC) a bromidem draselným/hydrogenperoxosíranem draselným (KBr/KHSO_5) byly provedeny podle dříve publikovaného postupu (Bailly *et al.*, 1994; Bailly

et Waring, 1997). Horní, případně spodní řetězce byly naznačeny [γ - ^{32}P]dATP na 5'konci a hybridizovány s komplementárním neznačeným řetězcem. Platina byla odstraněna inkubací s 0,2 M NaCN (alkalické pH) po dobu 10 hod při teplotě 55°C. Vzorky byly analyzovány na 20 % polyakrylamidovém gelu.

KMnO₄: reaguje s thyminovými a v menší míře cytosinovými bázemi jednořetězcové nebo distortované dvouřetězcové DNA (McCarthy *et al.*, 1990). KMnO₄ reaguje s 5,6 dvojnou vazbou thyminu a oxiduje je na 5,6-cis-diol. Destabilizovaný nukleotid je možné vyštěpit horkým piperidinem.

DEPC: reaguje s nespárovanými a distortovanými adeniny, díky karboxylaci dojde k labilizaci N9-glykosidické vazby a destabilizovaný nukleotid je možné vyštěpit horkým piperidinem.

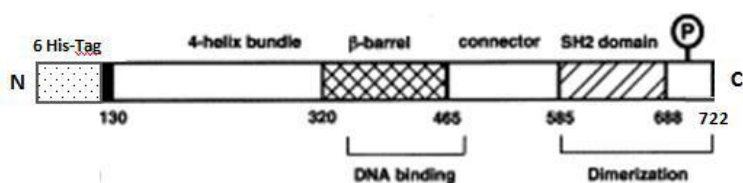
Br: při reakci KBr a KHSO₅ dochází k uvolňování bromu, který reaguje s 5,6 dvojnou vazbou cytosinu v jednořetězcové nebo distortované DNA: výsledným produktem je 5-bromodeoxycytidin. Destabilizovaný nukleotid je možné vyštěpit horkým piperidinem.

3.16 Transformace vnitrořetězcových můstků transplatiny a *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂]

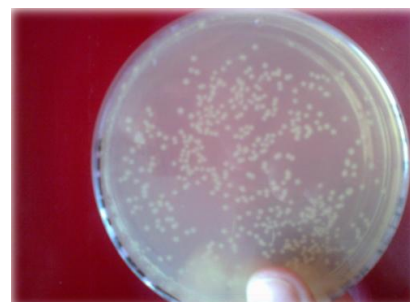
Vnitrořetězcové můstky vytvořené v DNA transplatinou a jejími deriváty jsou stabilní pouze v jednořetězcové DNA, zatímco v dvouřetězci může docházet k jejich transformaci na můstky meziřetězcové, dochází k izomerizaci. Radioaktivně značené jednořetězcové oligonukleotidy (horní řetězce, 20-mery) modifikované komplexy platiny byly hybridizovány s komplementárním spodním řetězcem v prostředí 0,2 M NaClO₄, 5 mM Tris-HCl (pH 7,5) a 0,1 mM EDTA 30 min při 20°C, poté 2 hod při 4°C. Při 37°C byly odebírány alikvoty v časech 0-24 hod a analyzovány pomocí 12 % polyakrylamidového gelu. Báze zapojené v meziřetězcových můstcích byly určeny štěpením hydroxylovými radikály (Leng *et al.*, 2000).

3.17 Transformace TKB1 kompetentních buněk

Buňky byly lehce promíchány na ledové lázni a rozděleny po 100 μ l do předem předchlazené 14 ml falkony. Bylo přidáno 1,7 μ l β -mercaptoethanolu ve finální koncentraci 25 mM a vzorky byly inkubovány na ledové lázni 10 min. Každé dvě minuty byly buňky promíchány. 10 ng plazmidu (zkrácený Stat3 β tc; Berg, 2004) bylo přidáno k buňkám a inkubováno 30 min na ledové lázni. Transformace bakterií byla provedena pomocí tepelného šoku a to při 42°C po dobu 45 sekund. Buňky byly inkubovány 2 min na ledu. Po přidání 0,9 ml předeřátého SOC média (www.genomics.agilent.com) byly falkony inkubovány při 37°C 1 hod za konstantního třepání 225-250 rpm. 50 μ l roztoku buněk bylo rozetřeno na agarové misky s přidáním antibiotik tetracyklinu (12 μ g/ml) a kanamycinu (50 μ g/ml).

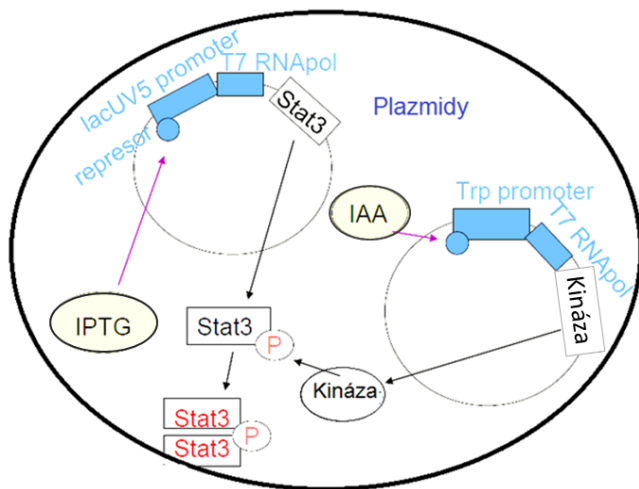


Obr. 22: Zkrácený Stat3 β tc (Berg, 2004) a kolonie TKB1 kompetentních buněk.



3. 18 Indukce TKB1 kompetentních buněk

Byla vybrána jedna kolonie transformovaných bakterií a inokulována do 10 ml LB média s příslušnými antibiotiky (tetracyklin a kanamycin). Buňky byly inkubovány přes noc za konstantního třepání 220 rpm při 37°C. Do 500 ml LB média s antibiotiky bylo druhý den přidáno 5 ml buněčné kultury (100 rpm, 37°C) a následně měřena absorbance při 600 nm každé cca 2 hod ze začátku, poté častěji, dle zakalení buněčné kultury. Odebrané vzorky byly pokaždé po měření absorbance zcentrifugovány a analyzovány elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsiranu sodného (SDS-PAGE). Po dosažení optické hustoty = 0,4 bylo přidáno IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) ve finální koncentraci 1 mM a kultura byla inkubována při 20°C 4 hod, při 100 rpm. Buňky byly zcentrifugovány při 2000 g a rozsuspendovány v TK médiu (www.genomics.agilent.com) s obsahem IAA (indoleakrylová kyselina), inkubovány při 37°C 2 hod, změřena absorbance, dále byly buňky zcentrifugovány a pelet buněk byl rozsuspendován v sonikačním pufru a zamražen pro následnou sonikaci.

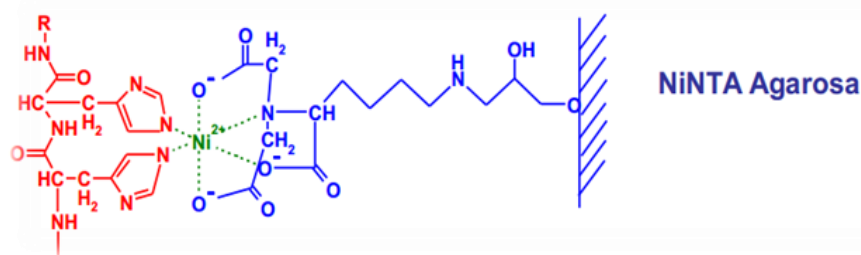


Obr. 23: TKB1 kompetentní buňka, schéma produkce STAT3 proteinu.

3.19 Sonikace a purifikace STAT3 proteinu

Po přidání 10 ml sonikačního pufru (20 mM Tris-HCl pH = 8, 300 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10 glycerol, 20 mM imidazol), 10 mM β-mercaptoetanolu, 10 μl proteázového inhibitoru a 0,5 mM PMFS byly buňky sonikovány na ledu a zcentrifugonány při 15000 g. Byly odebrány vzorky supernatantu a sedimentu pro následnou analýzu SDS-PAGE.

Purifikace STAT3 proteinu byla provedena pomocí Ni-NTA purifikačního systému. Tento systém využívá schopnosti histidinu vázat nikl. Protein, zachycený na agaróze obsahující navázaný nikl, je vymyt zvyšující se koncentrací imidazolu. Jednotlivé frakce vzorků byly analyzovány na SDS-PAGE. Protein byl zakoncentrován použitím Amicon-Ultra-15 a koncentrace (1,2 mg/ml) byla změřena pomocí Bradfordovy reakce.



Obr. 24: Ni-NTA purifikační systém a afinitní chromatografická kolona obsahující Ni-NTA agarózu pro purifikaci proteinů s histidinovou kotvou.

3.20 EMSA (Electrophoretic mobility shift assay)

EMSA se používá k detekci komplexu proteinu s nukleovými kyselinami. Princip metody spočívá v rozdílné pohyblivosti volné DNA a DNA v komplexu s proteiny. Byla použita specifická dsDNA (oligodeoxyribonukleotid, 55-mer) s vazebným místem pro STAT3 protein a nespecifická dsDNA jako kontrola. Koncentrace proteinu se pohybovala od 0 do 40 nM, přičemž 50 % vazbu jsme zjistili při 30 nM koncentraci STAT3. Gel byl obarven pomocí barviva SYBR Green. Dále byla specifická DNA modifikována cisplatinou a transplatinou. Cílem bylo zjistit, zda modifikace konsenzuální sekvence cisplatinou a pro srovnání také transplatinou může ovlivnit vazebnou aktivitu tohoto transkripčního faktoru *in vitro*.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

Předložená disertační práce je založena na dvou rukopisech zveřejněných v impaktovaných mezinárodních časopisech a na popisu dosud nezveřejněných výsledků a jejich interpretaci. Kopie publikovaných prací jsou doloženy v příloze.

Obě publikované práce jsou zaměřeny na studii vybraných aspektů molekulárních mechanismů biologického působení bifunkčních platnatých komplexů s konfigurací odstupujících ligandů *trans*, především na studii komplexu *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂] v porovnání s klinicky neefektivní transplatinou. Část disertace, popisující dosud nezveřejněné výsledky, je příspěvkem k poznání role proteinu STAT3 (transkripčního faktoru, jehož aktivita je zvýšená v řadě typů nádorových buněk) v molekulárním mechanismu protinádorového působení vybraných komplexů platiny.

První z publikovaných prací se zabývá některými aspekty molekulárního mechanismu komplexu *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂], který vykazuje relativně slibnou toxicitu v lidských nádorových buňkách. Jedná se o derivát klinicky neúčinné transplatiny, ve kterém došlo k nahrazení neodstupujících aminových ligandů malými, neobjemnými metylaminovými skupinami. Byla popsána cytotoxicita tohoto nového komplexu, jeho akumulace v buňkách, charakter modifikací DNA tímto komplexem a oprava těchto modifikací, tj. podstatné faktory, které hrají důležitou roli v molekulárním mechanismu protinádorové účinnosti komplexů platiny.

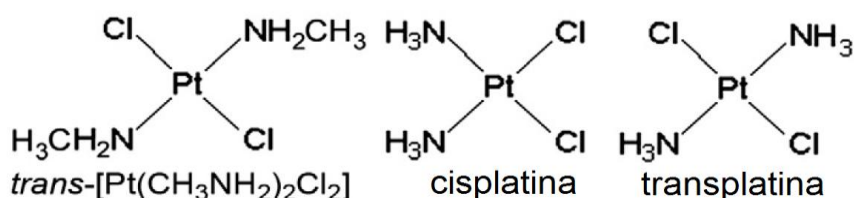
Druhá z publikovaných prací je zaměřena na stabilitu 1,3-GNG vnitrořetězcového aduktu vytvořeného výše zmíněným komplexem *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂] ve dvoušroubovici DNA a na transformaci tohoto aduktu na meziřetězcový můstek.

Poslední část disertace popisuje izolaci a purifikaci proteinu STAT3 a jeho vazbu na DNA poškozenou komplexy platiny, které se liší toxickými účinky v nádorových buněčných liniích.

4.1 Aktivace *trans*-geometrie v bifunkčních mononukleárních komplexech platiny s neobjemnými metylaminovými ligandy

Po objevení protinádorového léčiva cisplatiny započal výzkum mechanismu jejího účinku a nedlouho poté byly objeveny další protinádorově aktivní komplexy na bázi cisplatiny. Zpočátku byl kladen důraz pouze na komplexy v *cis* konfiguraci a sloučeniny s konfigurací *trans* byly považovány za inaktivní. V 90 letech apatie vůči *trans*-platinyovým komplexům skončila a byla objevena řada *trans*-komplexů s prokazatelně vyšší protinádorovou aktivitou, působících na rozsáhlejší spektrum nádorových buněk *in vitro* včetně buněk rezistentních k cisplatině. Při syntéze nových protinádorově účinných *trans*-komplexů byly aminy dosud používané k nahrazení skupiny NH_3 v molekule transplatiny obecně výrazně objemnější než NH_3 skupina samotná.

K objasnění mechanismu účinku bifunkčních mononukleárních platnatých analogů transplatiny byl studován *trans*-komplex, u kterého byla NH_3 skupina nahrazena pouze malým metylaminovým ligandem. Zajímalo nás, zda i tato malá změna ve velikosti neodstupujícího ligandu v molekule transplatiny může ovlivnit cytotoxicitu tohoto nového komplexu, jeho akumulaci v buňkách, charakter modifikací DNA tímto komplexem a opravu těchto modifikací.



Obr. 25: Komplexy platiny použité v této práci.

Výsledky ukázaly, že pro aktivaci geometrie *trans* v bifunkčních mononukleárních platinyových komplexech není nutné nahrazovat amminové skupiny v transplatině pouze relativně objemnými ligandy (pyridin, isochinolin, chinolin, thiazol, iminoeter atd.), ale nahrazením amminové skupiny transplatiny malou metylaminovou skupinou došlo k výraznému zvýšení aktivity v nádorových buňkách a to i v nádorových buňkách rezistentních k cisplatině (viz Tab. 1).

Komplex	A2780	A2780cisR
<i>trans</i> -Pt(NH ₂ CH ₃) ₂ Cl ₂]	14.0 ± 0.9	2.5 ± 3.1 (1.5)
transplatina	>250	>250
cisplatina	2.8 ± 0.1	13.8 ± 0.1 (4.9)

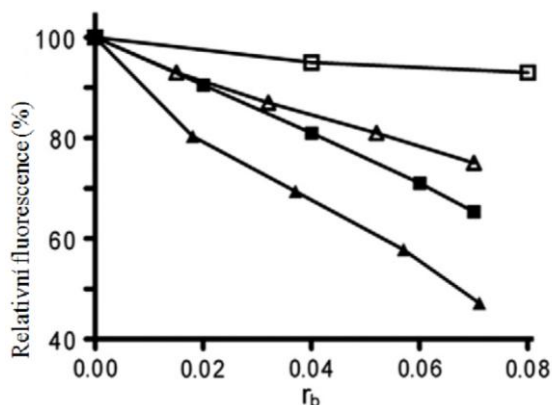
Tab. 1: Cytotoxicita [hodnoty IC₅₀ (μM)] získaná pro *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂], transplatinu a cisplatinu. A2780 jsou buňky lidského ovariálního karcinomu citlivé k působení cisplatiny, zatímco A2780cisR jsou buňky se získanou rezistencí vůči cisplatině odvozené od buněk A2780. Rezistenční faktor (v závorkách) je definovaný jako IC₅₀(rezistentní) / IC₅₀(sensitivní).

Sterické efekty relativně objemných amino ligandů protinádorově účinných analogů transplatiny hrají zásadní roli v mechanismu vazby těchto komplexů na DNA. Jelikož farmakologickým cílem platinových komplexů je právě molekula DNA, dále jsme zkoumali mechanismus účinku tohoto komplexu. Methylaminový ligand neovlivnil výrazně rychlost vazby *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂] na DNA, zato značně ovlivnil celkovou míru transformace monofunkčních aduktů do bifunkčních lezí, převážně do vnitřetězcových můstků. Toto je v kontrastu s transplatinou, která tvoří převážně monofunkční adukty, jež distortují dvoušroubovici méně, než můstky. *Trans*-komplexy nejsou schopny tvořit můstky mezi sousedními nukleotidy v jednom řetězci dvoušroubovice, které jsou považovány za jeden z důvodů protinádorového působení cisplatiny. Běžněji vytváří 1,3-meziretězcové můstky, které výrazně narušují konformaci DNA a toto narušení může zasahovat i několik bazí v okolí aduktu.

Studium teploty tání umožňuje určit relativní míru poškození DNA. Po vazbě platinových komplexů zvyšují stabilitu dvoušroubovice pozitivní náboje platinových komplexů, stejně jako meziretězcové můstky znesnadňující separaci řetězců DNA během její denaturace. Naopak destabilizační efekt pozorujeme v důsledku konformačních distorzí vyvolaných v DNA po vazbě komplexu. Schopnost komplexu *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂] zvyšovat teplotu tání byla nižší, než u transplatiny. Skutečnost, že oba komplexy nesou stejný náboj (2+) a vykazují stejné procento tvorby meziretězcových můstků, ale liší se v teplotě tání, může být vysvětlena rozdíly v destabilizačních efektech konformačních distorzí vyvolaných v DNA adukty *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂] a transplatiny.

Výsledky experimentu zaměřeného na charakterizaci aduktů vytvořených na DNA měřením fluorescence ethidium bromidu byly konzistentní s tezí, podle které adukty vytvořené na DNA

komplexe $trans$ -[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂] vyvolávaly v DNA rozsáhlejší konformační změny, než adukty transplatiny, což je ve shodě se zjištěním, že nový $trans$ -komplex tvoří mnohem více vnitrořetězcových můstků.

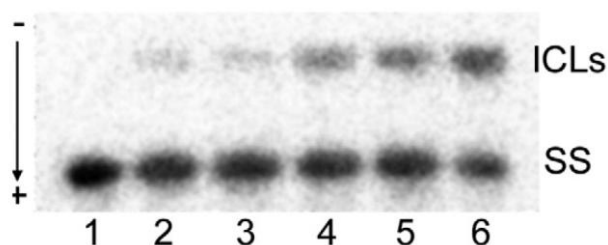


Graf 1: Závislost fluorescence ethidium bromidu na r_b v dvouřetězcové tymové DNA z telecího brzlíku modifikované komplexy platiny. Prázdný čtvereček = monofunkční dienplatina, prázdný trojúhelník = transplatina, plný čtvereček = cisplatina, plný trojúhelník = $trans$ -[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂].

Zvýšená konverze monofunkčních aduktů do bifunkčních lezí byla pozorovaná také u $trans$ -komplexů, kde byla amminová skupina nahrazená objemným ligandem. Například vysoká rychlost formace můstků $trans$ -platinových analogů může být zapříčiněná konformačními změnami ve dvouřetězcové DNA, kdy změněný aminový ligand v monofunkčním aduktu může modulovat druhý vazebný krok a tím usnadnit formaci můstku. Další hypotéza předpokládá, že NH₃ skupina monofunkčního aduktu transplatiny tvoří vodíkovou vazbu s molekulou DNA, čímž dojde ke zpomalení možnosti uzavření monofunkčního aduktu do můstku. Pokud je ale k amminové skupině přidána metylová skupina, může tvorbě vodíkového můstku zabránit.

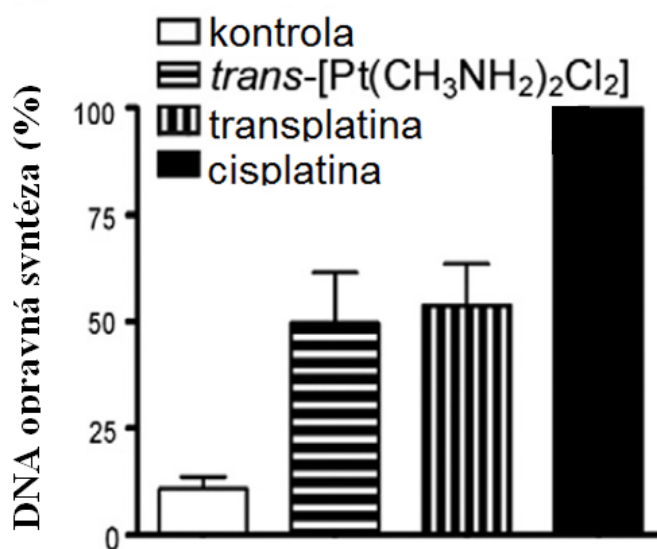
Thiomočovina byla použita jako sonda k určení relativního zastoupení monofunkčních aduktů. Po 24 hod thiomočovina odstranila pouze 20 % monofunkčních aduktů vytvořených komplexe $trans$ -[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂] z DNA, zbylých 80 % aduktů vytvořených tímto komplexe a 50 % vytvořených transplatinou se uzavřelo do bifunkčních lezí, což ukazuje, že $trans$ -[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂] tvoří mnohem větší procento bifunkčních aduktů než transplatina (Kašpárková *et al.*, 2003).

Dále nás zajímalo, kolik z celkového počtu bifunkčních aduktů na DNA reprezentují meziřetězcové můstky (IEC). Pomocí agarózové gelové elektroforézy za denaturačních podmínek bylo určeno, že *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂] tvoří 13 % IEC. Hlavními adukty tohoto komplexu jsou tedy vnitřetězcové můstky tvořené z 67 %.



Obr. 26: Formace meziřetězcových můstků komplexem *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂], SS = jednořetězcová frakce, ICLs = meziřetězcové můstky.

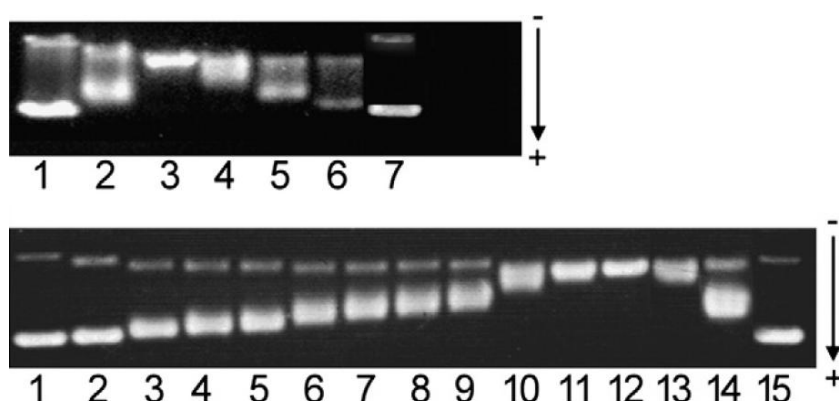
Oprava DNA je faktorem redukcujícím počet aduktů platinových komplexů na DNA v buňkách (Brabec *et al.*, 2009). Odstranění aduktů systémy opravy DNA vede ke snížení protinádorové účinnosti zkoumaných komplexů, naopak pokud adukty tvořené komplexy odstraněny nejsou, mohou spustit regulační procesy vedoucí až k apoptóze. V našich pokusech cisplatina byla brána jako 100 % opravy DNA, oprava u *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂] byla podstatně nižší (50 %), srovnatelná s transplatinou (44,4 %). Není tedy pravděpodobné, že oprava DNA je zodpovědná za zvýšenou cytotoxicitu studovaného komplexu v nádorových buňkách.



Graf 2: Oprava DNA plazmidu pUC19 modifikovaného komplexu platiny.

Schopnost komplexů platiny rozvíjet negativně zavínutou superhelikální DNA byla testována sledováním mobility DNA v agarózovém gelu při různých stupních modifikace danou

sloučeninou (Keck *et* Lippard, 1992). Úhel rozvinutí byl určen $\Phi = (20 \pm 3)^\circ$, což je vzhledem k úhlu rozvinutí u transplatiny (9°) velký rozdíl. Bylo dokázáno, že koordinační sloučeniny platiny rozvíjí šroubovici DNA v závislosti na vazbě komplexu na DNA. Sloučeniny, jež se váží monofunkčně, rozvíjí šroubovici málo, méně než o 6° . Ty látky, které se váží spíše bifunkčně, rozvíjí DNA více, 10-13°. Toto rozvíjení je typické pro transplatinu a cisplatinu.



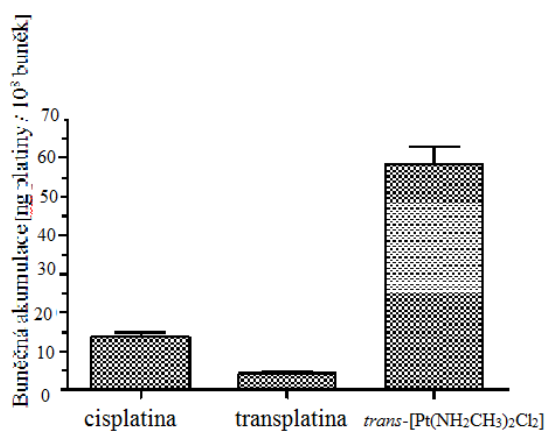
Obr. 27: Rozvíjení negativně vinuté plazmidové DNA, nahoře *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂], dráhy 1-7 pro r_b 0,02-0,1; dole pro transplatinu a r_b 0,01-0,1.

	<i>trans</i> -Pt(NH ₂ CH ₃) ₂ Cl ₂]	transplatinu	cisplatinu
% meziřetězcových můstků / adukt	13	12	6
% monofunkčních lezí / adukt	20	50	~1
% vnitřetězcových můstků / adukt	67	38	~90
úhel rozvíjení / adukt	20°	9°	13°
teplota tání (Δt_m) $r_b = 0.1$	9.3°C	12.5°C	-8.0°C
pokles EtBr fluorescence	vysoký	střední	střední

Tab. 2: Shrnutí výsledků charakteristiky vazby *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂], transplatiny a cisplatiny na DNA.

Aktivace *trans*-geometrie v bifunkčních mononukleárních platnatých komplexech není tedy limitována nahrazením NH₃ skupiny transplatiny pouze objemným ligandem, vazebné vlastnosti *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂] na DNA a akumulace tohoto komplexu v buňkách koreluje s toxicitou v nádorových buňkách a to i v nádorových buňkách, rezistentních k cisplatině. Akumulace *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂] v buňkách A2780 po 24 hod byla asi 14 krát vyšší než u transplatiny a asi 6 krát vyšší než u cisplatiny. Tato zvýšená akumulace může souviset s vyšší hydrofobicitou studovaného komplexu v důsledku přítomnosti metylové skupiny. Na

akumulaci komplexu v buňkách se mohou podílet také různé druhy přenašečů vyskytující se v plazmatické membráně.



Graf 3: Buněčná akumulace komplexů platiny po 24 hod inkubaci s ekvimolárními koncentracemi (10 μ M) cisplatiny, transplatiny a *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂].

Tato práce rozšiřuje poznatkové zázemí potřebné k pochopení mechanismu účinku *trans*-komplexů a může poskytnout cenné informace k syntéze nových protinádorově účinných léčiv.

4.2 Stabilita vnitřetězcového můstku protinádorově účinného derivátu transplatinu s neobjemnými metylaminovými ligandy

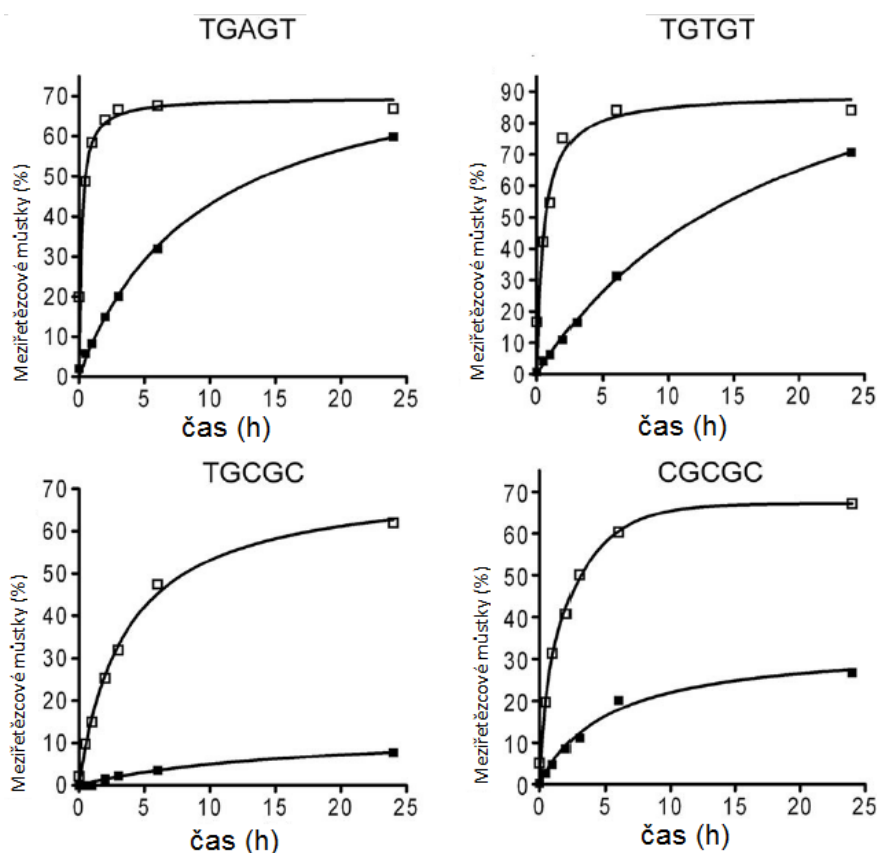
Cílená molekulární léčba se může stát reálným novým přístupem k inhibici genové exprese na úrovni transkripce a translace. Genová terapie se zaměřením na oligonukleotidy zprostředkovanou genovou terapii, které jsou komplementární k sekvenci RNA, využívá klinicky neefektivní transplatinu. Hlavním záměrem klinického použití antisense (nebo antigene) oligonukleotidů je zabránění disociace heteroduplexu, vytvořeného mezi ASO a mRNA, pomocí buněčných komponent. Tomuto se můžeme vyhnout vytvořením můstku mezi oligonukleotidem a cílovou mRNA s použitím komplexu platiny. V některých nukleotidových sekvencích dochází k transformaci 1,3-GNG vnitřetězcového můstku tvořeného transplatinou v dvouřetězcové DNA na můstek meziřetězcový, který může vytvořit kovalentní můstek mezi oligonukleotidem a cílovou mRNA. V některých sekvencích je ale tento 1,3-GNG můstek stabilní, což představuje zásadní problém v klinickém použití antisense oligonukleotidů modifikovaných transplatinou.

V této práci jsme studovali stabilitu 1,3-GNG vnitřetězcového můstku tvořeného *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂] v dvouřetězcové DNA. Byly vybrány sekvence, ve kterých se adukty transplatinu ochotně transformují v meziřetězcové můstky (TGAGT, TGTGT) a ve kterých jsou relativně stabilní (TGCGC, CGCGC):



Jednořetězcové oligonukleotidy (20-mery) obsahující 1,3-GNG adukt nebo odpovídající duplexy byly radioaktivně naznačeny na jejich 5'konci a inkubovány v 0,2 M NaClO₄ při 37°C a v jednotlivých časech byly alikvoty analyzovány pomocí gelové elektroforézy za denaturačních podmínek. 1,3-GNG adukt transplatinu a *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂] v jednořetězcovém horním řetězci byl stabilní (5 dnů) a pomocí reakce s DMS bylo ověřeno, že po tuto dobu nenastala žádná transformace tohoto aduktu. Naopak po hybridizaci s komplementárním spodním řetězcem se tento vnitřetězcový adukt komplexu *trans*-

[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂] transformoval do meziřetězcového můstku. Po 24 hod inkubaci bylo 62-84 % 1,3-GNG aduktů vnitrořetězcového můstku komplexu *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂] transformováno v meziřetězcové můstky ve všech použitých sekvencích.



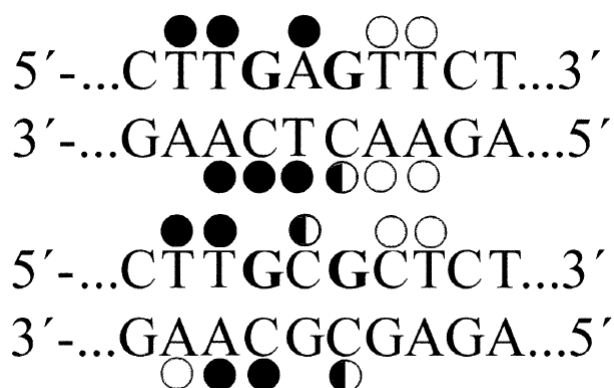
Graf 4: Procentuální zastoupení meziřetězcových můstků tvořeného *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂] a transplatinou v duplexech.

Oproti tomu stejná reakce u transplatiny vykazovala nižší procento meziřetězcových můstků v sekvencích TGCGC a CGCGC (7 % a 26 %). V souladu s již publikovanými výsledky (Kasparkova *et al.*, 2008) v sekvencích TGAGT a TGTGT došlo k transformaci 60-71% 1,3-GNG aduktů transplatiny do meziřetězcových můstků. Výsledky ukazují, že komplex *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂] tvoří ve dvouřetězcové DNA 1,3-GNG vnitrořetězcové adukty, jejichž stabilita je daleko méně sekvencně závislá než v případě stejných aduktů transplatiny, přičemž tendence k transformaci vnitrořetězcového můstku v meziřetězcový je zvýšená, je-li NH₃ skupina transplatiny nahrazena malým metylaminovým ligandem. Báze zapojené do meziřetězcového můstku (5'G platinovaného 1,3-GNG vnitrořetězcového můstku a komplementárního C) byly identifikovány štěpením pomocí hydroxylových radikálů.

centrální sekvence	<i>trans</i> -[Pt(NH ₂ CH ₃) ₂ Cl ₂]	transplatina		
	% meziřetězcových můstků po 24 hod při 37°C	t _{50%} (hod)	% meziřetězcových můstků po 24 hod při 37°C	t _{50%} (hod)
TGAGT	67	0.6	60	13
TGTGT	84	0.9	71	12
TGCGC	62	7	7	> 24
CGCGC	67	3	26	> 24

Tab. 3: Transformace místně-specifického 1,3-GNG vnitrořetězcového aduktu *trans*-Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂] a transplatiny v duplexu (20-mer) v meziřetězcové můstky. t_{50%} = čas, za který se transformuje 50% aduktů. Zvýrazněná „G“ v sekvencích značí místa platince.

Kasarkova *et al.* v roce 2008 prokázali, že transformaci vnitrořetězcového můstku v meziřetězcový adukt doprovází konformační distorze indukovaná v dvouřetězcové DNA. Například v sekvenci CGCGC byla tendence k transformaci do meziřetězcového můstku nižší, což korelovalo také s menší distorzi DNA v okolí vnitrořetězcového aduktu. Charakterizovali jsme tedy konformační změny indukované v DNA místně-specifickým aduktem 1,3-GNG vnitrořetězcového můstku komplexem *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂] v duplexu (20-mer) s centrální sekvencí TGAGT a TGCGC. Tyto sekvence reprezentovaly duplexy, kde byla izomerizace vysoká a velmi nízká v případě transplatiny a vysoká v obou sekvencích v případě komplexu *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂]. Na základě reakcí s chemickými sondami (KMnO₄ reagující se zbytky thyminu, bróm se zbytky cytosinu a DEPC se zbytky adeninu/guaninu v jednořetězcové nebo distortované DNA) bylo zjištěno, že vnitrořetězcový můstek studovaného komplexu distortuje dvouřetězcovou DNA v obou sekvencích ve velkém rozsahu.



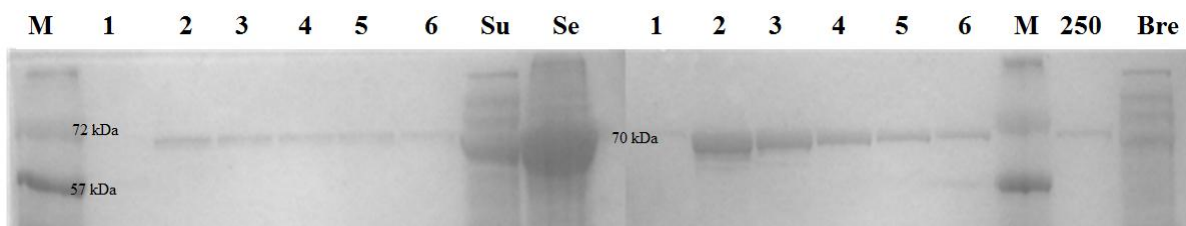
Obr. 28: Shrnutí reaktivity určené pomocí chemických sond v oligonukleotidových duplexech s centrálními sekvencemi TGAGT a TGCGC obsahujícími 1,3-GNG vnitrořetězcový můstek komplexu *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂]. Plná kolečka znamenají vysokou reaktivitu, prázdná slabou reaktivitu.

Snadnější transformace 1,3-GNG aduktu komplexu *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂] v meziřetězcové můstky je doprovázena mnohem menší sekvenční seletivitou, než je tomu u transplatiny. Ukázali jsme, že jednoduchý analog transplatiny v DNA tvoří 1,3-vnitrořetězcové můstky, jež jsou stabilní pouze v jednořetězcové DNA, narozdíl od 1,3-vnitrořetězcových aduktů transplatiny. Hybridizace oligonukleotidů obsahujících tento adukt komplexu *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂] s komplementárním řetězcem spouští rychlou izomerizační reakci ve výsledný meziřetězcový můstek, čímž se tento *trans*-komplex dostává do popředí zájmu použití v antisense nebo antigene strategiích.

4.3 STAT3: Produkce a studie vazby na DNA modifikovanou komplexy platiny

STAT3 je klíčovým transkripčním faktorem zapojeným v řadě lidských malignit, jeho aktivita je zvýšená v mnoha typech nádorových buněk. Transkripční aktivita STAT3 je závislá na schopnosti vázat se do konsenzuální sekvence přítomné v promotorech mnoha genů. Je zajímavé, že tato sekvence obsahuje několik zbytků guaninu, které jsou preferenčními vazebnými místy v DNA pro nádorového léčiva, cisplatinu a jejich derivátů. STAT3 není komerčně dostupný ve formě fosforylovaného dimeru, byl proto produkován jako rekombinantní protein s histidinovou kotvou v bakteriálních buňkách *E. Coli*. Po transformaci TKB1 kompetentních buněk plazmidem pro produkci proteinu STAT3 byla provedena purifikace tohoto proteinu s využitím Ni-NTA purifikačního systému. Tento systém využívá schopnosti histidinu vázat nikl. Na koloně bylo nejprve zachyceno velké množství různých proteinů. Po promytí kolony pufrům s nízkou koncentrací imidazolu (20 mM) byly odstraněny proteiny, které se na Ni-NTA agarózu vázaly slabě, tedy znečišťující proteiny. Po zvýšení koncentrace imidazolu nejprve na 50 mM a poté na 100 mM koncentrací byl eluován STAT3 protein. Jednotlivé frakce (8 μ l) byly smíchány s reagentií Bio-Rad Protein assay (2 μ l) na parafilmu a po dvou minutách byl odečten výsledek. Dle zabarvení kapky jsme předběžně konstatovali přítomnost a přibližnou koncentraci proteinu. Při vysoké koncentraci proteinu se kapka zbarvila modře, při nízké nebo v nepřítomnosti proteinu, kapka zůstala oranžová.

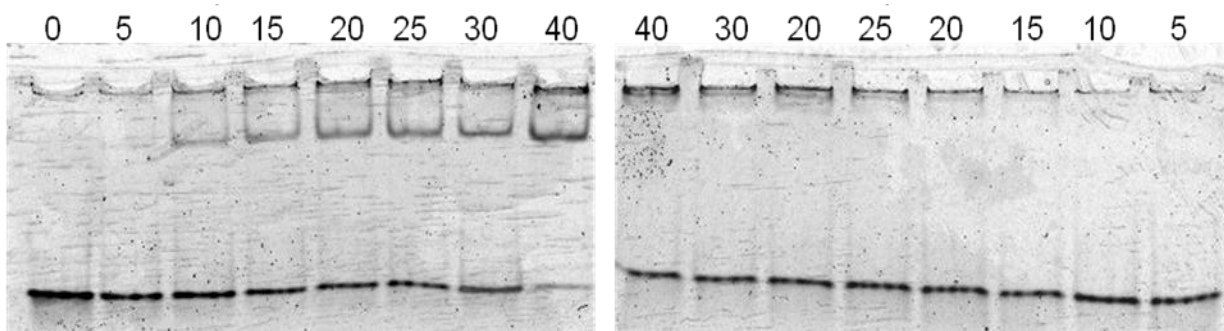
Jednotlivé frakce eluce proteinu byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (Obr. 29). Analýza pomocí SDS-PAGE odhalila, že se protein vyskytoval jak v buněčném sedimentu, tak v supernatantu po sonikaci a následné centrifugaci buněk při 15000 rpm. Důvodem výskytu proteinu v sedimentu může být jeho částečná nerozpustnost, nebo se může jednat o proteiny znečišťující. Ve frakci eluce s imidazolem v koncentraci 50 mM se vyskytovalo ještě malé množství znečišťujících proteinů, avšak frakce s koncentrací imidazolu 100 mM byla již bez znečišťujících proteinů. Obě frakce byly zakoncentrovány pomocí zařízení Amicon-Ultra-15 a jejich koncentrace byla změřena pomocí Bradfordovy reakce. Koncentrace proteinu STAT3 (100 mM frakce) byla stanovena na 1,2 mg/ml. Tyto frakce zakoncentrovaného proteinu byly poté zkontrolovány pomocí SDS-PAGE. Frakce eluce s 50 mM koncentrací imidazolu obsahovala stále malé množství znečišťujících proteinů, proto k dalším experimentům nebyla použita.



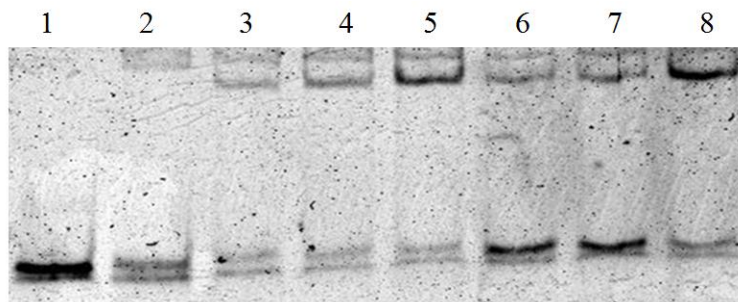
Obr. 29: Jednotlivé frakce eluce analyzovány pomocí 10 % SDS-PAGE. Vlevo frakce s použitím elučního pufru s 50 mM imidazolem, „Su“ = supernatant a „Se“ = sediment, Vpravo frakce použitého elučního pufru se 100 mM imidazolem, frakce s 250 mM imidazolem a „Bre“ = frakce elučního pufru bez použití imidazolu, „M“ = marker molekulové hmotnosti.

Po získání STAT3 proteinu a určení jeho koncentrace byla zjištěna jeho vazebná aktivita k DNA. Oligonukleotid (55-mer) s vazebným místem pro STAT3 a nespecifický oligonukleotid (55-mer, neobsahující vazebné místo) jako byl podroben vazebné reakci s purifikovaným proteinem a analyzován pomocí EMSA gelu obarveného barvivem SYBR Green pro následnou vizualizaci (Obr. 30). Bylo zjištěno, že 50 % vazba je dosažena přibližně při 30 nM koncentraci STAT3 proteinu.

Tento oligonukleotid (horní řetězec) byl dále modifikován cisplatinou, pro porovnání také transplatinou v poměrech (oligonukleotid:komplex platiny) 1:1, 1:2 a 1:3 a hybridizován se spodním řetězcem. Bylo dokázáno (Obr. 31), že cisplatina inhibuje vazbu STAT3 mnohem účinněji (pro modifikaci 1:1, 1:2, 1:3; 53 %, 26 % a 23 %), než klinicky neefektivní transplatinou (pro modifikaci 1:1, 1:2, 1:3; 63 %, 43 % a 18 %).

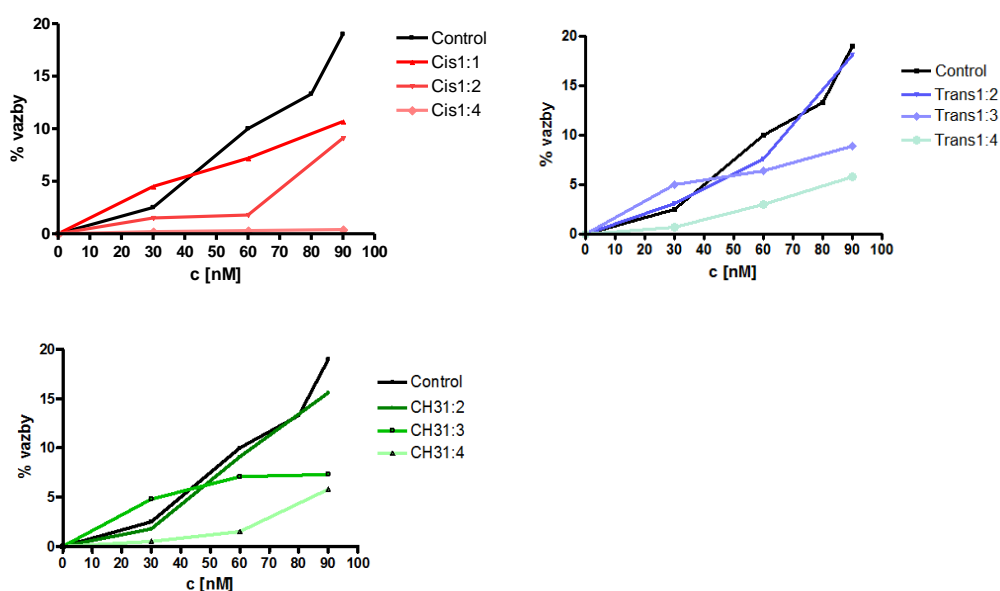


Obr. 30: EMSA analýza, vazba proteinu STAT3 k oligodeoxyribonukleotidu (55-mer, 10 nM), který obsahuje (vlevo) a neobsahuje (vpravo) konsenzuální sekvenci proteinu STAT3. 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 = koncentrace proteinu STAT3 v nM.



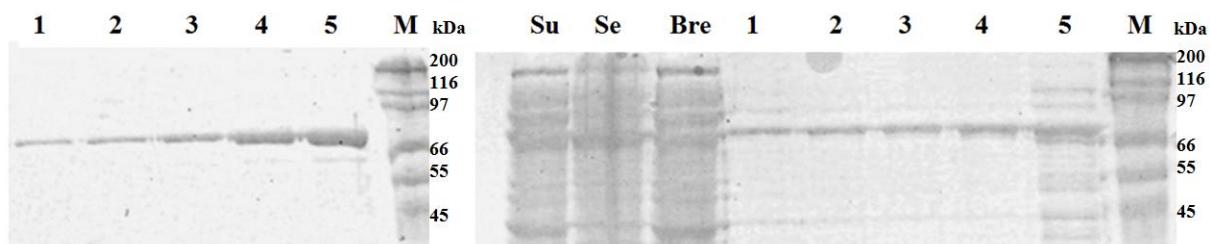
Obr. 31: EMSA analýza, vazba proteinu STAT3 k duplexu (55-mer) obsahujícího konsenzuální sekvenci modifikovaného komplexu platiny. 1 = DNA modifikovaná cisplatinou v nepřítomnosti proteinu STAT3, 2 = nespecifická DNA modifikovaná cisplatinou 3-5 = modifikace duplexu s konsenzuální sekvencí transplatinou (1:3, 1:2, 1:1) 6-8 = modifikace duplexu s konsenzuální sekvencí cisplatinou (1:3, 1:2, 1:1).

Tyto výsledky byly získány na zahraniční stáži v Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS, Orleans ve Francii. Protein byl transportován do ČR v suchém ledu a interakční studie byly dále prováděny na globálně modifikované DNA (oligonukleotid, 55-mer s vazebným místem pro STAT3, radioaktivně značený pomocí $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ na 5'konci) modifikované platinovými komplexy v různých poměrech (Graf 5), cisplatinou, transplatinou a také komplexem studovaným v této disertaci, *trans*- $[\text{Pt}(\text{NH}_2\text{CH}_3)_2\text{Cl}_2]$. Zjistili jsme, že adukty vytvořené v konsenzuální sekvenci v DNA cisplatinou, inhibují vazbu STAT3 k vazebnému místu na DNA mnohem více, než adukty vytvořené transplatinou a komplexem *trans*- $[\text{Pt}(\text{NH}_2\text{CH}_3)_2\text{Cl}_2]$. Dále jsme zjistili, že vazebná aktivita transportovaného proteinu klesá, proto jsme se rozhodli provést produkci a purifikaci STAT3 proteinu na pracovišti v Brně.

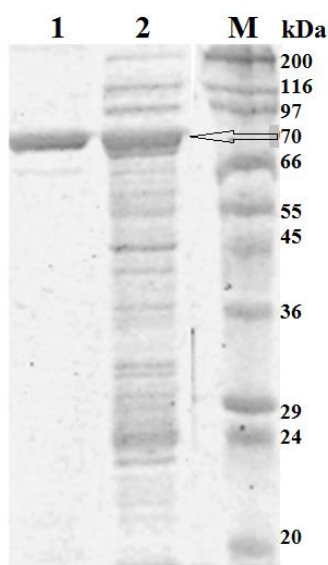


Graf 5: Vazebná afinita STAT3 proteinu ke konsenzuální sekvenci globálně modifikované DNA platinovými komplexy v různých poměrech. Červeně cisplatina, modře transplatina, zeleně *trans*- $[\text{Pt}(\text{NH}_2\text{CH}_3)_2\text{Cl}_2]$.

Protein STAT3 byl produkován jako rekombinantní protein s histidinovou kotvou v bakteriálních buňkách *E. Coli*. Jeho purifikace byla provedena s použitím Ni-NTA purifikačního systému. K eluci proteinu STAT3 byly použity pufrы s 50 mM imidazolem a 100 mM imidazolem (Obr. 32). Frakce eluce se 100 mM imidazolem byla bez znečišťujících proteinů, u druhé frakce jsme detekovali značnou část proteinů znečišťujících. Obě frakce byly zakoncentrovány systémem Amicon-Ultra15 a zkontrolovány na SDS-PAGE (Obr. 33).



Obr. 32: 10 % SDS-PAGE, Jednotlivé frakce eluce (1-5), s použitím 50 mM imidazolu (vpravo) a 100 mM imidazolu (vlevo). M = marker molekulové hmotnosti. Su = supernatant, Se = sediment, Bre = frakce elučního pufru bez použití imidazolu.



Obr. 33: 10% SDS-PAGE jednotlivých zakoncentrovaných elučních frakcí proteinu STAT3. 1 = protein STAT3 z frakce eluce se 100 mM imidazolem, 2 = protein STAT3 z frakce eluce s 50 mM imidazolem, M = marker molekulové hmotnosti.

Koncentrace jednotlivých elučních frakcí proteinu STAT3 bude změřena pomocí Bradfordovy reakce a dále budou prováděny interakční studie s radioaktivně značenými oligonukleotidy obsahující vazebné místo pro STAT3 protein modifikovanými studovanými komplexy platiny: cisplatinou, transplatinou a komplexem *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂].

5 ZÁVĚR

Platinové komplexy hrají důležitou roli v chemoterapii zhoubných nádorů. Cisplatina, jejíž protinádorová účinnost byla objevena již v roce 1965, je dodnes stále jedním z nejvíce používaných cytostatik. Cílem onkologické léčby je zajistit optimální farmakoterapeutický účinek při minimální toxicitě a za současné prevence vývoje rezistence. Je tedy nezbytné studovat mechanismus účinku protinádorových léčiv pro zajištění teoretického zázemí pro syntézu nových platinových komplexů s lepšími cytostatickými účinky.

Transplatina, *trans*-izomer cisplatiny je sice klinicky neúčinná, ale bylo objeveno mnoho *trans*-komplexů s prokazatelně vyšší protinádorovou aktivitou, působících na širší spektrum nádorových buněk *in vitro* a dokonce i aktivních v buňkách rezistentních k cisplatině. V těchto komplexech byly sekundární aminy, nahrazující NH_3 skupiny transplatiny, objemnější než metylaminová skupina komplexu *trans*- $[\text{Pt}(\text{NH}_2\text{CH}_3)_2\text{Cl}_2]$, studovaného v této práci.

Tento komplex vykazoval významně zvýšenou aktivitu v nádorových buňkách a to i v nádorových buňkách rezistentních k cisplatině. V souvislosti s tímto zjištěním byl také studován molekulární mechanismus cytostatického účinku komplexu *trans*- $[\text{Pt}(\text{NH}_2\text{CH}_3)_2\text{Cl}_2]$, především modifikace DNA (která je hlavním cílovým místem protinádorového působení komplexů platiny) tímto komplexem. Byly popsány typy aduktů tvořené daným komplexem v porovnání s inaktivní transplatinou. Komplex tvořil převážně vnitřetězcové můstky a distorze v okolí aduktu zasahovala DNA mnohem více, než transplatina. Transplatina vytváří převážně monofunkční adukty, které distordují konformaci DNA mnohem méně. Také buněčná akumulace komplexu *trans*- $[\text{Pt}(\text{NH}_2\text{CH}_3)_2\text{Cl}_2]$, koreluje s jeho zvýšenou cytotoxicitou v nádorových buňkách sensitivních i rezistentních k cisplatině.

Druhá část práce se zabývá stabilitou 1,3-GNG vnitřetězcového můstku tvořeného *trans*- $[\text{Pt}(\text{NH}_2\text{CH}_3)_2\text{Cl}_2]$ ve dvouřetězcové DNA. K testování byly vybrány sekvence, v nichž se adukty transplatiny transformují velmi ochotně v meziřetězcové můstky (TGAGT, TGTGT) a sekvence, ve kterých jsou vnitřetězcové adukty transplatiny relativně stabilní (TGCGC, CGCGC). Transplatina byla navržena jako vhodné agens schopné stabilizovat hybrid oligonukleotidu s cílovou molekulou mRNA tvorbou meziřetězcových vazeb při antisense strategii v genové terapii. Omezením v použití transplatiny v této terapii je právě její sekvenční závislost. U studovaného nového analogu transplatiny jsme objevili velmi ochotnou transformaci jeho 1,3-GNG vnitřetězcového můstku v meziřetězcové můstky, a to

s výrazně menší sekvenční selektivitou, než je tomu u stejného aduktu vytvořeného ve dvoušroubovici DNA transplatinou. Tato práce navrhuje novou aplikaci jednořetězcových oligonukleotidů obsahujících 1,3-GNG vnitrořetězcový můstek komplexu *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂] v antisense nebo antigene technologiích.

Třetí část práce popisuje počáteční studii vazby proteinu STAT3 ke konsenzuální sekvenci v DNA modifikované komplexy platiny, které se lišily protinádorovou aktivitou. Protein STAT3 (přenašeč signálu a aktivátor transkripce 3) patří do rodiny proteinů STAT a hraje významnou roli v mnoha buněčných procesech jako buněčný růst a apoptóza. Při jeho konstitutivní aktivaci dochází k podporování vývoje onkogeneze. STAT3 po fosforylaci tvoří homodimery, které se translokují do jádra, kde účinkují jako transkripční faktory. Jelikož tento protein není komerčně dostupný jako fosforylovaný dimer, produkovali jsme STAT3 jako rekombinantní protein s histidinovou kotvou v bakteriálních buňkách *E. Coli*. Pro ověření funkčnosti proteinu byly provedeny předběžné experimenty (EMSA, electrophoretic mobility shift assay) s použitím oligonukleotidu obsahujícího vazebné místo pro protein STAT3. Byla potvrzena vazba proteinu se specifickou DNA při K_d 30 nM a při reakci s nescifickou DNA nebyla pozorována vazba žádná. Vazebné místo STAT3 obsahuje několik zbytků guaninu, které jsou preferenčními vazebnými místy v DNA protinádorového léčiva cisplatinu a jejich derivátů. Modifikovali jsme tedy toto vazebné místo platinovými komplexy (cisplatinou a transplatinou) a pozorovali jsme, že cisplatinu inhibuje vazbu STAT3 mnohem více, než klinicky neefektivní transplatinu. Podobný efekt jsme zjistili při použití fragmentu DNA globálně modifikovaného platinovými komplexy (cisplatinou, transplatinou a *trans*-[Pt(NH₂CH₃)₂Cl₂]). Zvýšená inhibice vazby STAT3 proteinu do konsenzuální sekvence byla pozorována u oligonukleotidu globálně modifikovaného cisplatinou.

Předkládaná disertační práce přispívá k rozšíření poznatkového zázemí o mechanismu účinku *trans*-komplexů a může být využita při syntéze nových léčiv na bázi platiny, či navržích účinnější chemoterapeutické strategie.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Adebanke F., Orelli F.B., Orlando D., Schärer K. (2011): Regulation of endonuclease activity in human nucleotide excision repair, *DNA Repair* 15, 722-9.

Akaboshi M., Kawai K., Maki H., Akuta K., Ujeno Y., Miyahara T. (1992): The Number of Platinum Atoms Binding to DNA, RNA and Protein Molecules of HeLa Cells Treated with Cisplatin at Its Mean Lethal Concentration. *Japanese Journal of Cancer Research* 83, 522-526.

Aupeix-Scheidler K., Chabas S., Bidou L., Rousset J.P., Leng M., Toulme J.J. (2000): Inhibition of in vitro and ex vivo translation by a transplatin-modified oligo(29-O-methylribonucleotide) directed against the HIV-1 gag-pol frameshift signal. *Nucleic Acids Research* 28, 438–445.

Bailly C., Gentle D., Hamy F., Purcell M., Waring M.J. (1994): Localized chemical reactivity in DNA associated with the sequencespecific bisintercalation of echinomycin. *Biochemistry* 300, 165–173.

Bailly C., Waring M. (1997): Diethylpyrocarbonate and osmium tetroxide as probes for drug-induced changes in DNA conformation in vitro. In: *Drug-DNA Interaction Protocols*. K. R. Fox, editor. Humana Press Inc., Totowa, NJ. 51–79.

Bard A.J., Faulkner L.R. (2000): *Electrochemical method: fundamentals and applications*. John Wiley & Sons Inc., New York, 594.

Bowman T., Garcia R., Turkson J., Jove R. (2000): STATs in oncogenesis. *Oncogene* 19, 2474–2488.

Brabec V., Reedijk J., Leng M. (1992): Sequence-dependent distortions induced in DNA by monofunctional platinum(II) binding. *Biochemistry* 31, 12397–12402.

Brabec V., Kasparkova J. (2003): DNA interactions of novel platinum anticancer drugs, in DNA and RNA Binders: From Small Molecules to Drugs, M. Demeunynck, C. Bailly, D. Wilson, Wiley-VCH: Weinheim, Editors, 178-223.

Brabec V., Kasparkova J. (2009): in N. Hadjiliadis, E. Sletten (Eds.), Metal Complex – DNA Interactions, Wiley, Chichester, UK, 2009, 175-208.

Brabec V., Kasparkova J. (2005): Modifications of DNA by platinum complexes - Relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs, *Drug resistance updates* 8, 131-146.

Brabec V., Leng M. (1993): DNA interstrand cross-links of trans-diamminedichloroplatinum(II) are preferentially formed between guanine and complementary cytosine residues, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 5345-5349

Brabec V., Palecek E. (1976): Interaction of nucleic acids with electrically charged surfaces. II. Conformational changes in double-helical polynucleotides. *Biophysical Chemistry* 4, 76-92.

Butour J.L., Alvinerie P., Souchard J.P., Colson P., Houssier C., Johnson N.P. (1991): Effect of the amine group nonleaving group on the structure and stability of DNA complexes with cis - [Pt(R-NH₂)₂(NO₃)₂]. *European Journal of Biochemistry* 202, 975-980.

Butour J.L., Macquet J.P. (1977): Differentiation of DNA - platinum complexes by fluorescence. The use of an intercalating dye as a probe. *European Journal of Biochemistry* 78, 455-463.

Coluccia M.A., Nassi A., Boccarelli D., Giordano N., Cardellicchio D., Locker M., Leng M., Sivo F.P., Intini G., Natile J. (1999): In vitro and in vivo antitumour activity and cellular pharmacological properties of new platinum-iminoether complexes with different configuration at the iminoether ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry* 77, 3-35.

Comess K.M., Burstyn J.N., Essigmann J.M., Lippard S.J. (1992): Replication inhibition and translesion. *Biochemistry* 31, 3975-3990.

Comess K.M., Lippard S.J. (1993): In *Molecular Aspects of Anticancer Drug-DA Interactions*; Neidle, S., Waring, M., Eds., Mac-Millan Press: London, Vol. 1, p 134.

Cooney M., Czernuszewicz G., Postel E. H., Flint S. J., Hogan M. E. (1988): Site-specific oligonucleotide binding represses transcription of the human c-myc gene in vitro. *Science* 241, 456–459.

Corda Y., Anin M.F., Leng M., Job D. (1992): RNA polymerases react differently at d(ApG) and d(GpG) adducts in DNA modified by cis-diamminedichloroplatinum(II). *Biochemistry* 31, 1904-1908.

Corda Y., Job C., Anin M.F., Leng M., Job D. (1991): Transcription by eucaryotic and procaryotic RNA polymerases of DNA modified at a d(GG) or a d(AG) site by the antitumor cisplatin. *Biochemistry* 30, 222-230.

Coste F., Malinge J.M., Serre L., Shepard W., Roth M., Leng M., Zelwer C. (1999): Crystal structure of a double-stranded DNA containing a cisplatin interstrand cross-link at 1.63 Å resolution: hydration at the platinated site. *Nucleic Acids Research* 27, 1837-1846.

Crooke S.T. (1999): Molecular mechanisms of action of antisense drugs. *Biochimica et Biophysica Acta* 1489, 31- 44.

Cvitkovic E., Spaulding J., Bethune V. (1977): Improvement of cis-dichlorodiammineplatinum (NSC 119875): therapeutic index in an animal model. *Cancer* 39, 1357–1361.

Duan Z., Foster R., Bell D.A., Mahoney J., Wolak K., Vaidya A. (2006): Signal transducers and activators of transcription 3 pathway activation in drug-resistant ovarian cancer. *Clinical Cancer Research* 12, 5055-5063.

Eastman A., Barry M.A. (1987): The interaction of trans-diamminedichloroplatinum(II) with DNA : formation of monofunctional adducts and their reaction with glutathione. *Biochemistry* 26, 3303-3307.

Elena Pantoja López (1978): Differences Between Asymmetric cis and trans Platinum Complexes. *Applications in Cancer Chemotherapy*.

Ellington A. D., Szostak J.W. (1990): In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands". *Nature* 346, 818–22.

Farrell N., Kelland L.R., Roberts J.D., Van Beusichem M. (1992): Activation of the trans geometry in platinum antitumor complexes: a survey of the cytotoxicity of trans complexes containing planar ligands in murine L1210 and human tumor panels and studies on their mechanism of action, *Cancer Research* 52, 5065-5072.

Farrell N.P., De Almeida S.G., Skov K.A. (1988): Bis(platinum) complexes containing two platinum cis-diammine units. Synthesis and initial DNA-binding studies. *Journal of the American Chemical Society* 110, 5018-5019.

Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.

Garcia R., Bowman T.L., Niu G., Yu H., Minton S., Muro-Cacho C.A., Cox C.E., Falcone R., Fairclough R., Parsons S., Laudano A., Gazit A., Levitzki A., Kraker A., Jove R. (2001): Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene* 20, 2499–2513.

Gee J.E., Robbins I., VanderLaan A.C., VanBoom J.H., Colombier C., Leng M., Raible A.M., Nelson J.S., Lebleu B. (1998): Assessment of high-affinity hybridization, RNase H cleavage, and covalent linkage in translation arrest by antisense oligonucleotides. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development* 8, 103–111.

Gelasco A., Lippard S.J. (1999): Anticancer activity of cisplatin and related compounds. *Top journals in inorganic chemistry* 1, 1– 43.

Germain D., Frank D.A. (2007): Targeting the cytoplasmic and nuclear functions of signal transducers and activators of transcription 3 for cancer therapy. *Clinic Cancer Research* 13, 5665–5669.

Giraud-Panis M.J., Leng M. (2000): Transplatin-modified oligonucleotides as modulators of gene expression. *Pharmacology & Therapeutics* 85, 175–181.

Goodman L.S., Wintrobe M.M., Damesek W., Goodman M.L., Gilman A., McLennan M.T. (1984): Use of methyl-bis(beta-chloroethyl)amine hydrochloride and tris(beta-chloroethyl)amine hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders. *The Journal of the American Medical Association* 251, 2255-2261.

Gouilleux-Gruart V., Gouilleux F., Desaint C., Claisse J.F., Capiod J.C., Delobel J., Weber-Nordt R., Dusanter-Fourt I., Dreyfus F., Groner B., Prin L. (1996): STAT-related transcription factors are constitutively activated in peripheral blood cells from acute leukemia patients. *Blood* 87, 1692–1697.

Grandis J.R., Drenning S.D., Zeng Q., Watkins S.C., Melhem M.F., Endo S., Johnson D.E., Huang L., He Y., Kim J.D. (2000a). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 4227–4232.

Grosschedl R., Giese K., Pagel J. (1994): HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *Trends in Genetics* 10, 94-100.

Han Z., Hong Z., Gao Q., Chen C., Hao Z., Ji T. (2012): A potent oncolytic adenovirus selectively blocks the STAT3 signaling pathway and potentiates cisplatin antitumor activity in ovarian cancer. *Human Gene Therapy* 23, 32-45.

Harder H.C., Rosenberg B. (1970): Inhibitory effects of anti-tumor platinum compounds on DNA, RNA and protein synthesis in mammalian cells in vitro. *International Journal of Cancer* 6, 207-216

Heinrich P.C., Behrmann I., Muller-Newen G., Schaper F., Graeve L. (1998): Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochemistry* 334, 297–314.

Heringová P., Woods J., Mackay F.S., Kašpárková J., Sadler P.J., Brabec V. (2006): Transplatin is cytotoxic when photoactivated: Enhanced Formation of DNA Cross-Links. *Journal of Medicinal Chemistry* 49, 7792-7798.

Huang M., Page C., Reynolds R.K., Lin J. (2000): Constitutive activation of stat 3 oncogene product in human ovarian carcinoma cells. *Gynecologic Oncology* 79, 67–73.

Chabner B.A., Roberts T.G. (2005): Rosenberg, B., et al., Platinum compounds: A new class of potent antitumor agents. *Nature*, 1969. 222, 385-386.

Chan Jasmine H.P., Lim S., Wong W.S. (2006): Antisense Oligonucleitides: From Design to Therapeutic Application. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 33, 533-540.

Jing N., Tweardy D.J. (2005): Targeting Stat3 in cancer therapy. *Anticancer Drugs* 16, 601–607.

Johnson N.P., Butour J.L., Villani G., Wimmer F.L., Defais M., Pierson V., Brabec V. (1989): *Progress in Clinical Biochemistry and Medicine* 10, 1.

Jung Y., Lippard S. J. (2007): Direct cellular response to platinum-induced DNA damage. *Chemical Reviews* 107, 1387-1407.

Kalinowska-Lis U., Ochocki J., Matlawska-Wasowska K. (2008): Trans geometry in platinum antitumor complexes, *Coordination Chemistry Reviews*. 252(12-14), 1328.

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

Kasparkova J., Marini V., Najajreh Y., Gibson D., Brabec V. (2003): DNA binding mode of the cis and trans geometries of newantitumor nonclassical platinum complexes containing piperidine, piperazine or 4-picoline ligand in cell-free media. Relations to their activity in cancer cell lines. *Biochemistry* 42, 6321-6332.

Keck M.V., Lippard S.J. (1992): Unwinding of supercoiled DNA by platinum ethidium and related complexes. *Journal of the American Chemical Society* 114, 3386-3390.

Kelland L. (2007): The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer* 7, 573-584.

Kelland L.R., Barnard C.F.J., Evans I.G., Murrer B.A., Theobald B.R.C., Wyer S.B., Goddard P.M., Jones M., Valenti M., Bryant A., Rogers P.M., Harrap K.R. (1995): Synthesis and in vitro and in vivo antitumor activity of a series of trans platinum antitumor complexes. *Journal of Medicinal Chemistry* 38, 3016-3024.

Kim S.D., Vrána O., Kleinwachter V., Niki K., Braber V. (1990): Polarographic Determination of Subnanogram Quantities of Free Platinum in Reaction Mixture with DNA. *Analytical Letters* 23, 1505-1518

Klener P., Klener Jr.P. (2010): Nová protinádorová léčiva aléčebné strategie v onkologii. Grada Publishing a.s., Praha.

Leeman R.J., Lui V.W., Grandis J.R. (2006): STAT3 as a therapeutic target in head and neck cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy* 6, 231–241.

Legendre F., Chottard J.-C (1999): Kinetics and selectivity of DNA-platination. Cisplatin: chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug, ed. B. Lippert. 1999, Zurich: Verlag Helvetica Chimic Acta. 563.

Lemaire M.A., Schwarz, A., Rahmouni, A.R., Leng, M. (1991): Interstrand cross-links are preferentially formed at the d(GC) sites in the reaction between cis-diamminedichloro-platinum(II) and DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 1982-1985.

Leng M., Locker D., Giraud-Panis M.J., Schwartz A., Intini F.P., Natile G., Pisano C., Boccarelli A., Giordano D., Coluccia M. (2000): Replacement of an NH₃ by an iminoether in transplatin makes an antitumor drug from an inactive compound, *Molecular Pharmacology* 58, 1525-1535.

Lippert B., Leng M. (1999): in "Topics in Biological Inorganic Chemistry". *Metallopharmaceuticals* 1, (Eds.: M. J. Clarke, P. J. Sadler), Springer, Berlin, 117–142.

Lui V.W., Boehm A.L., Koppikar P., Leeman R.J., Johnson D., Ogagan M., Childs E., Freilino M., Grandis J.R. (2007): Antiproliferative mechanisms of a transcription factor decoy targeting signal transducer and activator of transcription (STAT) 3: the role of STAT1. *Molecular Pharmacology* 71, 1435–1443.

Lysik M.A, Wu-Pong S. (2003): Innovations in oligonucleotide drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 92, 1559–73.

Malinge J.M., Leng M. (1999): Interstrand cross-links in cisplatin- or transplatin-modified DNA. In B. Lippert (Ed.), *Cisplatin-Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug* (159–180). Zurich: Verlag Helvetica Chimica Acta.

Mangrum J.B., Farrell N.P. (2010): Excursions in polynuclear platinum DNA binding. *Chemical Communications* 46, 6640-6650.

Maxam A.M., Gilbert W. (1980): Sequencing end-labeled DNA with basespecific chemical cleavages. *Methods in Enzymology* 65, 499-560.

McCarthy J. G., L. D. Williams, Rich A. (1990): Chemical reactivity of potassium permanganate and diethyl pyrocarbonate with B-DNA: specific reactivity with short A-tracts. *Biochemistry* 29, 6071– 6081.

Novakova O., Kasparikova J., Malina J., Natile G., Brabec V, (2003): DNA-protein cross-linking by trans-[PtCl₂(E-iminoether)(2)]. A concept for activation of the trans geometry in platinum antitumor complexes. *Nucleic Acids Research* 31, 6450-6460.

Paquet F., Boudvillain M., Lancelot G., Leng, M. (1999): NMR solution structure of a DNA dodecamer containing a transplatin interstrand GN7/CN3 cross-link. *Nucleic Acids Research* 27, 4261–4268.

Pellestor F., Paulasova P. (2004): The peptide nucleic acids (PNAs), powerful tools for molecular genetics and cytogenetics, *European Journal of Human Genetics* 12, 694–700.

Persons D.L., Yazlovitskaya E.M., Cui W., Pelling J.C. (1999): Cisplatin-induced activation of mitogen-activated protein kinases in ovarian carcinoma cells: inhibition of extracellular signal-regulated kinase activity increases sensitivity to cisplatin. *Clinical Cancer Research* 5, 1007–14.

Quesnelle K.M., Boehm A.L., Grandis J.R. (2007): STAT-mediated EGFR signaling in cancer. *Journal of Cellular Biochemistry* 102, 311–319.

Reardon JT., Vaisman A., Chaney S.G., Sancar A. (1999): Efficient Nucleotide Excision Repair of Cisplatin, Oxaliplatin and JM216 Platinum Intrastrand DNA Diadducts. *Cancer Research* 59, 3968-3971.

Regis G., Pensa S., Boselli D., Novelli F., Poli V. (2008): Ups and downs: the STAT1:STAT3 seesaw of Interferon and gp130 receptor signalling. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 19, 351–359.

Rešlová S. (1971): The induction of lysogenic strains of *Escherichia coli* by cisdichlorodiammineplatinum (II). *Chemico-Biological Interactions* 4, 66-70.

Roberts J.D., Peroutka J., Farrell N. (1999): Cellular pharmacology of polynuclear platinum anti-cancer agents. *Journal of Inorganic Biochemistry* 77, 51-7.

Sanchez-Perez I., Murguia J.R., Perona R.. (1998): Cisplatin induces a persistent activation of JNK that is related to cell death. *Oncogene* 16, 533–40.

Scanlon K.J., Ohta Y, Ishida H., Kijima H., Ohkawa T., Kaminski A., Tsai J., Horng G., Kashani-Sabet M. (1995): Oligonucleotide-mediated modulation of mammalian gene expression. *FASEB Journal* 9, 1288–1296.

Serban D., Benevides J.M., Thomas G.J. (2002): DNA secondary structure and Raman markers of supercoiling in *Escherichia coli* plasmid pUC19. *Biochemistry* 41(3), 847-853.

Shafer R. H. (1998): Stability and structure of model DNA triplexes and quadruplexes and their interactions with small ligands. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 59, 55–94.

Silver D.L., Naora H., Liu J., Cheng W., Montell D.J. (2004): Activated signal transducer and activator of transcription (STAT) 3: localization in focal adhesions and function in ovarian cancer cell motility. *Cancer Research* 64, 3550-3558.

Sorenson C.M., Barry M.A., Eastman A. (1990): Analysis of events associated with cell cycle arrest at G2 phase and cell death induced by cisplatin. *The Journal of the National Cancer Institute* 82, 749–55.

Timofeeva OA, Chasovskikh S, Lonskaya I, Tarasova N.I, Khavrutskii L, Tarasov S.G, Zhang X, Korostyshevskiy V.R, Cheema A, Zhang L, Dakshanamurthy S, Brown M.L, Dritschilo A. (2012): Mechanisms of unphosphorylated STAT3 transcription factor binding to DNA. *Journal of Biological Chemistry* 20, 287(17), 14192-200.

Todd R.C., Lippard S.J. (2009): Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds. *Metallomics* 1, 280-91.

Turkson J., Zhang S., Mora L.B., Burns A., Sebti S., Jove R. (2005): A novel platinum compound inhibits constitutive Stat3 signaling and induces cell cycle arrest and apoptosis of malignant cells. *Journal of Biological Chemistry* 2, 32979-88.

Turkson J., Zhang S., Palmer J., Kay H., Stanko J., Mora L.B., Sebti S., Yu H., Jove R. (2004): Inhibition of constitutive signal transducer and activator of transcription 3 activation

by novel platinum complexes with potent antitumor activity. *Molecular Cancer Therapy* 12, 1533-42.

Vaisrub S. (1979): Humble Therapeutic Beginnings for a Noble Metal. *The Journal of the American Medical Association* 241, 2738

Vinkemeier U., Cohen S.L., Moarefi I., Chait B.T., Kuriyan J., Darnell J.E. (1996): DNA binding of in vitro activated Stat1 alpha, Stat1 beta and truncated Stat1: interaction between NH2-terminal domains stabilizes binding of two dimers to tandem DNA sites. *EMBO Journal* 15, 5616–5626.

Wheate N.J., Walker S., Craig G. E., Oun R. (2010): The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Transactions* 39, 8113-8127.

Wu H., Lima W.F, Zhang H, Fan A, Sun H, Crooke S.T. (2004): Determination of the role of the human RNase H1 in the pharmacology of DNA-like antisense drugs. *Journal of Biological Chemistry* 279, 181–189.

Xu X., Sun Z.L., Hoey T. (1996): Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain. *Science* 273, 794–797.

Zaludova R., Kleinwachter V., Brabec V. (1996): The effect of ionic strength on melting of DNA modified by platinum(II) complexes. *Biophysical Chemistry* 60, 135-142.

Zamble D.B., Lippard S.J. (1999): The response of cellular proteins to cisplatin-damaged DNA, in Cisplatin. *Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, 73-110.

Zamecnik P. C., Stephenson M. L. (1978): Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 75, 280–284.

Zhang X., Zhang J., Wang L., Wei H., Tian Z. (2007): Therapeutic effects of STAT3 decoy oligodeoxynucleotide on human lung cancer in xenograft mice. *BMC Cancer* 7, 149–160.

Zhang T., Kee, W.H., Seow, K.T., Fung, W., Cao, X. (2000c): The coiled-coil domain of Stat3 is essential for its SH2 domain-mediated receptor binding and subsequent activation induced by epidermal growth factor and interleukin-6. *Molecular and Cellular Biology* 20, 7132-7139.

Zhang X., Wrzeszczynska M.H., Horvath C.M., Darnell J.E. (1999): Interacting regions in Stat3 and c-Jun that participate in cooperative transcriptional activation. *Molecular and Cellular Biology* 19, 7138–7146.

Zhao W., Jaganathan S., Turkson J. J. (2010): A Cell-permeable Stat3 SH2 Domain Mimetic Inhibits Stat3 Activation and Induces Antitumor Cell Effects in Vitro. *The Journal of Biological Chemistry* 285, 35855–35865.

Žaludová R., Žáková A., Kašpárkova J., Balcarová Z., Vrána O., Coluccia M., Natile G., Brabec V. (1997): DNA modifications by antitumor trans-[PtCl₂(E-iminoether)₂]. *Molecular Pharmacology* 52, 354–361.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAS – atomová absorpční spektrometrie

ASO - antisense oligonukleotidy

Cisplatina – *cis*-diammindichloridoplatnatý komplex

DMSO – dimetyl-sulfoxid

DPP – diferenční pulzní polarografie

DTT - dithiotreitol

dsDNA – dvouřetězcová DNA

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina

EtBr – ethidium bromid

FAAS – bezplamenná atomová absorpční spektrometrie

FDA – Správa potravin a léčiv (v USA)

HMG protein – protein skupiny vysoké pohyblivosti

IC₅₀ – inhibiční koncentrace komplexu, která vyvolá 50 % úhyn buněk

IEC – meziřetězcový můstek

MTT - 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid

NER – nukleotidová excizní oprava

PAGE – polyakrylamidová gelová elektroforéza

PBS – fosfátový solný pufr

PMFS - fenylmetylsulfonyl fluorid

r_b – množství molekul komplexu navázaných na 1 nukleotid.

r_i – počet molekul komplexu připadajících na 1 nukleotid.

RF – faktor rezistence

SDS - dodecylsulfát sodný

STAT3 - přenašeč signálu a aktivátor transkripce 3

SW voltametrie – „square wave“ voltametrie se čtvercovými vlnami

TAE – trisacetátový pufr

Transplatina – *trans*-diammindichloridoplatnatý komplex

8 STRUKTUROVANÝ ŽIVOTOPIS

Osobní údaje:

Jméno: **Mgr. Michaela Frýbortová**
Adresa: Letců 9, Olomouc, 77900
Přechodné bydliště: Brno
Telefon: +420 777 073 619
E-mail: michaela.frybortova@gmail.com
Národnost: Česká
Datum narození: 20. 6. 1986

Vzdělání:

2010-nyní Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého, Olomouc (doktorské studium)
Biofyzika

Pracoviště Biofyzikální ústav AV ČR, molekulární biofyzika a farmakologie
Název dizertační práce: Molekulární biofyzika a farmakologie nových protinádorově účinných metalofarmak

2008-2010 Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého, Olomouc
(titul Mgr.), laboratoř molekulární toxikologie a farmakologie
Molekulární a buněčná biologie
Název diplomové práce: Úloha c-jun N-terminální kinázy v regulaci CYP3A4

2005-2008 Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého, Olomouc
(titul Bc.), laboratoř molekulární biologie mikroorganismů
Molekulární a buněčná biologie
Název bakalářské práce: Molekulární taxonomie fytoplazem ze skupiny stolburu

Pracovní zkušenosti:

10/2010-03/2011; 03/2014-08/2014- výzkumný pracovník, Biofyzikální ústav, Akademie věd České republiky, Brno
srpen 2009 – Odborná stáž, Oddělení rostlinné fyziologie a genetiky, Výzkumný ústav pícninářský, Troubsko
léto 2007 – Laboratoř molekulární biologie a mikroorganismů, Univerzita Palackého, Olomouc

Jazykové znalosti:

NJ- středně pokročilá znalost, AJ - středně pokročilá znalost

Zahraniční pobyt:

09/2013-11/2013 Vědecký pobyt v rámci COST (Evropská spolupráce v oblasti vědeckého a technického výzkumu), Centre de biophysique moléculaire, Orléans, Francie

9 SEZNAM PUBLIKACÍ

Frybortova M., Novakova O., Stepankova J., Novohradsky V., Gibson D., Kasparikova J., Brabec V. (2013): Activation of trans geometry in bifunctional mononuclear platinum complexes by a non-bulky methylamine ligand. *Journal of Inorganic Biochemistry* 126, 26-54.

Frybortova M., Novakova O., Brabec V. (2014): The stability of DNA intrastrand cross-links of antitumor transplatin derivative containing non-bulky methylamine ligands. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2014, rukopis přijatý do tisku.

10 PŘÍLOHY

PUBLIKACE Č.1

Activation of trans geometry in bifunctional mononuclear platinum complexes by a non-bulky methylamine ligand

Michaela Frybortova, Olga Novakova, Jana Stepankova, Vojtech Novohradsky, Dan Gibson,
Jana Kasparkova, Viktor Brabec

Journal of Inorganic Biochemistry 126, 46-54 (2013)

Prohlašuji, že můj podíl na této práci je následující:

Kinetika vazby komplexu na DNA in vitro, charakterizace DNA aduktů pomocí thiomocoviny, detekce meziřetězcových můstků, studium fluorescence ethidium bromidu, rozvíjení negativně vinuté DNA, nukleotidová excizní oprava.

! Z důvodu dodržení autorských práv není přiložena plná verze publikace. Celý článek je k dispozici na následujících stránkách:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0162013413001220>

Journal of Inorganic Biochemistry 126 (2013) 46–54



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Inorganic Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jinorgbio



Activation of trans geometry in bifunctional mononuclear platinum complexes by a non-bulky methylamine ligand



Michaela Frybortova^{a,b}, Olga Novakova^b, Jana Stepankova^b, Vojtech Novohradsky^{a,b}, Dan Gibson^c, Jana Kasparkova^{a,b}, Viktor Brabec^{a,b,*}

^a Department of Biophysics, Faculty of Science, Palacký University, 17. listopadu 12, CZ-77146 Olomouc, Czech Republic

^b Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Kralovopolská 135, CZ-61265 Brno, Czech Republic

^c Institute for Drug Research, School of Pharmacy, The Hebrew University, Jerusalem 91 120, Israel

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 February 2013

Received in revised form 23 May 2013

Accepted 23 May 2013

Available online 28 May 2013

Keywords:

Platinum(II)-based agents

Activation of trans geometry

Cytotoxicity

DNA adducts

ABSTRACT

In order to shed light on the mechanism that underlies activity of bifunctional mononuclear Pt^{II} analogs of transplatin we examined in the present work the analog of transplatin, namely *trans*-[Pt(CH₃NH₂)₂Cl₂], in which NH₂ groups were replaced only by a small, non-bulky methylamine ligand. This choice was made because we were interested to reveal the role of the bulkiness of the amines used to substitute NH₂ in transplatin to produce an antitumor-active Pt^{II} drug. The results indicate that *trans*-[Pt(CH₃NH₂)₂Cl₂] forms a markedly higher amount of more distorting intrastrand cross-links than transplatin which forms in DNA preferentially less distorting and persisting monofunctional adducts. Also importantly, the accumulation of *trans*-[Pt(CH₃NH₂)₂Cl₂] in tumor cells was considerably greater than that of transplatin and cisplatin. In addition, the results of the present work demonstrate that the replacement of ammine groups by the non-bulky methylamine ligand in the molecule of ineffective transplatin results in a radical enhancement of its activity in tumor cell lines including cisplatin-resistant tumor cells. Thus, activation of the trans geometry in bifunctional mononuclear Pt^{II} complexes can be also accomplished by replacement of ammine groups in transplatin by non-bulky methylamine ligands so that it is not limited only to the replacement by relatively bulky and stereochemically more demanding amino ligands.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The platinum anticancer compounds currently in clinical use conform to the originally devised structure–pharmacological activity relationship delineated for platinum anticancer drugs soon after discovery of antitumor effects of cisplatin [1,2]. The paradigm for this original structure–pharmacological activity relationship of platinum complexes [3] was that the trans isomer of cisplatin (transplatin) was inactive at biologically relevant concentrations and that only neutral Pt^{II} complexes with two *cis* oriented inert ligands [such as am(m)ines carrying at least one H atom] and semi-labile ligands in the other positions would possess anticancer activity. Trans compounds and complexes having only one leaving group were considered inactive.

However, the search for platinum compounds having novel pre-clinical properties, such as activity in cisplatin-resistant cells or a pattern of cytotoxicity significantly different from that of cisplatin [4]

casted doubts upon most of these early structure–activity rules. Several diverse classes of active platinum compounds that violate the classical structure–activity relationships for cisplatin have been identified, including Pt^{IV} complexes [5], polynuclear platinum complexes [6], and platinum compounds with a trans stereochemistry (for reviews, see Refs. [7–10]). Thus, to this end several new complexes of the trans structure have been identified that exhibit an enhanced toxicity in tumor cell lines, such that cytotoxicity is equivalent or even better than that of the analogous *cis* counterparts and, indeed, cisplatin itself (for reviews, see Refs. [7–12]). Examples of such new antitumor *trans*-platinum compounds are: (i) those of general formula *trans*-[PtCl₂(L)(L')] in which L and L' represent planar or nonplanar heterocyclic ligands, aliphatic amines, heterocyclic aliphatic amines, iminoethers [7–10] and acetoxime [13]; (ii) *trans*-platinum(IV) complexes of general formula *trans*-PtCl₂X₂(L)(L'), where X represents chloride, hydroxide, carboxylate, or carbonate ligands, belong to the family of anticancer *trans*-platinum agents as well. Pt^{IV} compounds serve as prodrugs being reduced to the Pt^{II} analogs under physiological conditions (axial ligands of Pt^{IV} compounds can be detached during cellular activation by reductive elimination yielding antitumor active Pt^{II} analogs) [14]; (iii) bifunctional polynuclear Pt^{II} complexes with up to four positive charges [6] in which two monofunctional Pt^{II} spheres with the single chloride leaving group on each platinum are linked by

* Corresponding author at: Department of Biophysics, Faculty of Science, Palacký University, 17. listopadu 12, CZ-77146 Olomouc, Czech Republic. Tel.: +420 585634154 or Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Kralovopolská 135, CZ-61265 Brno, Czech Republic. Tel.: +420 541517148; fax: +420 541240499.

E-mail address: brabec@ujp.cz (V. Brabec).

PUBLIKACE Č. 2

The stability of DNA intrastrand cross-links of antitumor transplatin derivative containing non-bulky methylamine ligands

Michaela Frybortova, Olga Novakova, Viktor Brabec

Journal of Biological Inorganic Chemistry

Prohlašuji, že můj podíl na této práci je následující:

Platinace DNA, transformace vnitrořetězcových můstků komplexu trans-[Pt(CH₃NH₂)₂Cl₂] a transplatiny, chemické modifikace

.....

The stability of DNA intrastrand cross-links of antitumor transplatin derivative containing non-bulky methylamine ligands

Michaela Frybortová · Olga Nováková ·
Václav Brábec

Received: 9 April 2014 / Accepted: 14 June 2014
© SBIC 2014

Abstract Oligonucleotides modified by clinically ineffective *trans*-diamminedichlorodoplatinum(II) (transplatin) have been shown to be effective modulators of gene expression. This is so because in some nucleotide sequences the 1,3-GNG intrastrand adducts formed by transplatin in double-helical DNA readily rearrange into interstrand cross-links so that they can cross-link the oligonucleotides to their targets. On the other hand, in a number of other sequences these intrastrand adducts are relatively stable, which represents the major difficulty in the clinical use of the antisense transplatin-modified oligonucleotides. Therefore, we examined in this study, the stability of 1,3-GNG intrastrand adducts in double-helical DNA formed by a new antitumor derivative of transplatin, *trans*-[Pt(CH₃NH₂)₂Cl₂], in the sequence contexts in which transplatin formed relatively stable intrastrand cross-links which did not readily rearrange into interstrand cross-links. We have found that 1,3-GNG intrastrand adducts in double-helical DNA formed by *trans*-[Pt(CH₃NH₂)₂Cl₂] even in such sequences readily rearrange into interstrand

cross-links. This work also suggests that an enhanced frequency of intrastrand cross-links yielded by *trans*-[Pt(CH₃NH₂)₂Cl₂] is a consequence of the fact that these DNA lesions considerably distort double-helical DNA in far more sequence contexts than parent transplatin. Our results suggest that *trans*-[Pt(CH₃NH₂)₂Cl₂]-modified oligonucleotides represent promising candidates for new agents in antisense or anti gene approach.

Keywords Platinum drugs · Antisense technology · Anticancer · DNA · Cross-links

Abbreviations

ATP	Adenosine triphosphate
Bp	Base pair
CL	Cross-link
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
DMS	Dimethyl sulfate
FAAS	Flameless atomic absorption spectrometry
HPLC	High-performance liquid chromatography
PAA	Polyacrylamide
Transplatin	<i>trans</i> -Diamminedichlorodoplatinum(II)

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00775-014-1176-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M. Frybortová · V. Brábec
Department of Biophysics, Faculty of Science,
Palacký University,
17. Listopadu 12, 77146 Olomouc,
Czech Republic

M. Frybortová · O. Nováková · V. Brábec (✉)
Institute of Biophysics,
Academy of Sciences of the Czech Republic,
v.v.i., Kralovopolská 135,
61265 Brno, Czech Republic
e-mail: brabec@ibp.cz

Introduction

Selective control of gene expression can be obtained using artificially created nucleic acids that are complementary to a RNA sequence (antisense approach) [1]. The advantage of the antisense oligonucleotides is their ability to recognize a given sequence of nucleic acid and subsequently to inhibit selectively the cellular machinery at a predetermined step [2–4]. One of the major difficulties in the