

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## **Role můstků vytvořených v molekule dvoušroubovicové DNA v mechanismu protinádorového působení komplexů platiny.**

### **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Zuzana Dvořáková</b>
Studijní program:	M1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Prof. RNDr. Jana Kašpárková, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	22. 4. 2011

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou prací vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své školitelce prof. RNDr. J. Kašpárkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky při vypracování této diplomové práce. Poděkování patří rovněž prof. RNDr. Viktoru Brabcovi, DrSc. za umožnění pracovat na diplomové práci na Biofyzikálním ústavu AV ČR v Brně.

Zvláštní poděkování patří RNDr. M. Vojtíškové za pomoc při zavádění metody Southernovy hybridizace a hlavně Mgr. L. Zerzánkové za všestrannou pomoc a ochotu, kterou mi věnovala.

Všem pracovníkům oddělení Molekulární biofyziky a farmakologie BFÚ AV ČR děkuji za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

**Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora	Bc. Zuzana Dvořáková
Název práce	Role můstků vytvořených v molekule dvoušroubovicové DNA v mechanismu protinádorového působení komplexů platiny.
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Biofyzikální ústav AVČR, v.v.i., Brno
Vedoucí práce	Prof. RNDr. Jana Kašpárková, PhD.
Rok obhajoby práce	2011
Klíčová slova	cisplatina, vícejaderné komplexy platiny, meziřetězcové můstky, plazmidová DNA, genomová DNA, Southernova hybridizace
Počet stran	94
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## ABSTRAKT

Komplexy platiny patří do skupiny chemoterapeutik. Nejvíce a nejdéle využívaná je monojaderná cisplatina, která reaguje s purinovými bázemi v DNA za vzniku vnitřetězcových (IAC), meziřetězcových (IEC) a monofunkčních můstků. Její podávání je však spojeno s řadou problémů – nežádoucí vedlejší účinky na organismus pacienta, vznik rezistence při jejím opakovaném podávání a úzké spektrum nádorů, které jsou k cisplatině citlivé. Proto se mnoho výzkumů zaměřilo na studium vícejaderných komplexů platiny, které jsou protinádorově aktivní i v buňkách rezistentních k cisplatině a to i při nižších dávkách.

Diplomová práce se zabývá studiem vzniku meziřetězcových můstků nových dinukleárních komplexů platiny s pracovním názvem BBR3535 a BBR3571, na plazmidové pUC19 a genomové DNA z lidských nádorových linií, s cílem objasnění mechanismů jejich protinádorové účinnosti. Nejprve byl studován vznik IEC dvojjaderných komplexů v bezbuněčném prostředí (*in vitro*), na plazmidu pUC19, a výsledky byly porovnány s cisplatinou. Tento experiment potvrdil již dříve publikované výsledky T. McGregor (2001) [55], kdy procentuální zastoupení IEC tvořených cisplatinou, BBR3535 a BBR3571 odpovídá hodnotám 6%, 55,3% a 38,2%.

Ke studiu vzniku IEC na genomové DNA, v buněčném prostředí (*in vivo*) a také v bezbuněčném prostředí (*in vitro*), byla využita metoda Southernovy hybridizace. Protože tato metoda nebyla doposud na oddělení Molekulární biofyziky a farmakologie (BFU, AVČR) používána, bylo prvotním cílem této práce metodu zavést a optimalizovat podmínky ke studiu meziřetězcových můstků vznikajících na gDNA po působení studovaných Pt komplexů. Tento cíl se podařilo bezesbytku splnit.

Výsledky studia tvorby IEC v gDNA modifikované v buňkách (*in vivo*) či *in vitro* ukazují překvapivě nižší procentuální zastoupení meziřetězcových můstků pro oba dinukleární komplexy, BBR3571: 1,9% (*in vivo*), 4 % (*in vitro*); BBR3535: 8 % (*in vitro*). Příčinou pozorovaného jevu může být použitá metodika Southernovy hybridizace, která proto, aby byla aplikovatelná na studium IEC polynukleárních komplexů platiny, bude zřejmě vyžadovat další metodické úpravy a optimalizace. Toto však již bylo nad rámec této diplomové práce.

**Bibliographical identification:**

Autor's first name and surname	Bc. Zuzana Dvořáková
Title	Role of DNA interstrand crosslinks in the mechanism of anticancer activity of platinum drugs.
Type of thesis	Master
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Prof. RNDr. Jana Kašpárková, Ph.D.
The year of presentation	2011
Keywords	cisplatin, polynuclear platinum complexes, interstrand cross-links, plasmid DNA, genomic DNA, Southern hybridization
Number of pages	94
Number of appendices	0
Language	Czech

## ABSTRACT

Platinum complexes belong to the group of chemotherapeutics. A strong and widely used chemotherapy drug, cisplatin, reacts with purine bases in DNA and forms intrastrand cross-links (IACs), interstrand cross-links (IECs) and monofunctional adducts. Cisplatin treatment is associated with several drawbacks – it causes undesirable side effects in patient's body; during cycles of therapy with cisplatin tumor may acquire resistance to this drug; moreover, its applicability is limited to a relatively narrow range of tumors. Hence, intensive research has focused on the study of new analogues of platinum complexes, such as polynuclear platinum complexes, which show enhanced anticancer efficiency and are capable of circumventing cisplatin resistance.

The main objective of this thesis is to study a formation of interstrand cross-links of new dinuclear platinum complexes, BBR3535 and BBR3571, in plasmid DNA pUC19 and in genomic DNA (gDNA) from the human ovarian cancer cells. The thesis should contribute to the knowledge of mechanism of anticancer action of these platinum compounds which still remains unclear. Firstly, *in vitro* study of IECs formation for both dinuclear platinum complexes in plasmid pUC19 was carried out and compared to that for cisplatin. Results were in a good correlation with previously published data (T. McGregor, 2001,) [55] and revealed the frequencies of IECs for cisplatin, BBR3535 and BBR3571 to be 6 %, 55.3 % and 38.2 % respectively.

Formation of IECs of platinum complexes in genomic DNA (formed in cancer cells - *in vivo*, or *in vitro*) was studied using a methodology of southern hybridization. Since at the department of Molecular Biophysics and Pharmacology (IBP, ASCR) this method hasn't been used so far, my first concern was to introduce and optimize this method for our purposes, it means for determination of IEC efficiencies of platinum complexes in gDNA. This goal was completely met.

The results showed surprisingly low IECs frequencies formed by both studied dinuclear complexes in gDNA modified in cells (*in vivo*) and even *in vitro*, BBR3571: 1.9 % (*in vivo*), 4 % (*in vitro*); BBR3535: 8 % (*in vitro*). This might be caused by methodology of southern hybridization used in our experiments. For the purposes of study of IECs efficiencies of polynuclear platinum complexes, this method will

probably require further modifications and optimization. However, this was beyond the scope of this thesis.

## OBSAH

1. ÚVOD .....	10
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	12
2.1 Vývoj platinových cytostatik .....	12
2.2 Cisplatina .....	16
2.2.1 Mechanismus působení cisplatiny .....	16
2.2.1.1 Biologický cíl působení cisplatiny .....	16
2.2.1.2 Aduky tvořené cisplatinou a následné strukturní změny .....	17
2.2.2 Následky způsobené navázáním cisplatiny .....	19
2.2.3 Reakce buňky na vzniklé adukty DNA-cisplatina .....	21
2.2.3.1 Proteiny s HMG doménou .....	21
2.2.3.2 Proteiny bez HMG domény .....	22
2.2.3.3 Opravné mechanismy .....	23
2.2.4 Buněčná rezistence k cisplatině .....	24
2.3 Vícejaderné komplexy platiny .....	25
2.3.1 Dvojjaderné komplexy .....	27
2.3.2 Trojjaderné komplexy .....	28
2.3.2.1 Působení komplexu BBR3464 na buňky s mutantním p53 ve srovnání s cisplatinou .....	29
2.3.3 Vliv struktury vícejaderných komplexů na jejich aktivitu .....	29
2.3.4 Mechanismus a kinetika vazby vícejaderných komplexů na DNA .....	31
2.4 Southern blot .....	33
2.4.1. Využití Southernové hybridizace pro studium meziřetězcových můstků .....	34
3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE .....	36
4. MATERIÁLY A METODY .....	37
4.1 Biologický materiál .....	37
4.2 Použité roztoky a pufry .....	37
4.3 Elektroforetické gely .....	38
4.4 Použité kity .....	39
4.5 Metody a postupy .....	41
4.5.1 Metody pro detekci meziřetězcových můstků na plazmidové DNA .....	41
4.5.1.1 Linearizace plazmidové DNA a příprava fragmentu o 212 bp .....	41
4.5.1.2 Elektroforéza v nativním agarózovém gelu – kontrola štěpení restrikčním enzymem .....	42



4.5.1.3	Deproteinace po štěpení restriční enzymem .....	42
4.5.1.4	Radioaktivní značení plazmidové DNA.....	42
4.5.1.5	<i>In vitro</i> modifikace DNA komplexu platiny.....	42
4.5.1.6	Elektroforetická separace v denaturačním agarózovém gelu .....	43
4.5.2	Metoda Southernova přenosu pro detekci meziřetězcových můstků komplexů platiny na genomové DNA z nádorové linie A2780 .....	43
4.5.2.1	Kultivace buněk a aplikace cytostatik ke studiu vzniku meziřetězcových můstků na genomové DNA.....	44
4.5.2.2	Metody izolace gDNA z buněk A2780 .....	44
4.5.2.3	Modifikace gDNA <i>in vitro</i> komplexu BBR3535, BBR3571 a cisplatinou .....	47
4.5.2.4	Štěpení gDNA restriční enzymem <i>HindIII</i> .....	47
4.5.2.5	Elektroforetická separace gDNA fragmentů v agarózovém gelu.....	48
4.5.2.6	Přenos gDNA z gelu na membránu.....	48
4.5.2.7	Příprava DNA próby .....	51
4.5.2.8	Hybridizace na membráně.....	54
5.	VÝSLEDKY .....	56
5.1	Studium vzniku meziřetězcových můstků na plazmidové DNA (pUC19) po modifikaci komplexu platiny <i>in vitro</i> pomocí alkalické denaturační elektroforézy .....	56
5.2	Studium meziřetězcových můstků na genomové DNA z nádorových linií A2780 – zavedení metody Southernovy hybridizace .....	60
5.2.1	Srovnání použitých metod izolace gDNA.....	60
5.2.2	Štěpení gDNA restriční enzymem <i>HindIII</i> a elektroforetická separace jejích fragmentů v agarózovém gelu.....	62
5.2.3	Srovnání kapilárního a vakuového přenosu gDNA na nylonovou membránu.....	64
5.2.4	Příprava hybridizační próby .....	66
5.2.5	Stanovení množství meziřetězcových můstků platinových komplexů na gDNA <i>in vivo</i> .....	70
6.	DISKUZE .....	73
7.	ZÁVĚR .....	80
8.	SEZNAM ZKRATEK.....	81
9.	POUŽITÁ LITERATURA.....	83

## 1. ÚVOD

Nádorová onemocnění, resp. rakovina, jsou v současné době druhou nejčastější příčinou úmrtí (hned po chorobách srdce a cév u dospělých a po úrazech u dětí). Rakovina je různorodá skupina chorob, kdy určitá skupina buněk začne nekontrolovaně růst a dělit se v důsledku náhodných mutací nebo poškození těch součástí DNA, které jsou zodpovědné za regulaci růstu buněk. Buňky se stávají velmi odolnými, utlačují a narušují své okolí a působí první zdravotní komplikace.

Léčba rakoviny téměř vždy závisí na spolupráci více specialistů z více oborů. Mezi nejdůležitější léčebné metody v současné době řadíme radioterapii, chirurgii a chemoterapii. Dochází ale i k rozvoji jiných metod léčby – biologické léčby, která působí cíleně na nádorové buňky a genové terapie, které se využívá zatím jen experimentálně. Principem radioterapie je opakované cílené ozařování nádoru, které všechny ozářené buňky nevratně poškodí. S tím ale dochází i k poškození okolních tkání. Cílem chirurgické léčby je vyjmout nádor z těla ven. V některých případech se používá jen ke zmenšení nebo oslabení nádoru před radioterapií nebo chemoterapií. Základem chemoterapie je podávání vysokých dávek cytostatik (látek toxických pro buňky), na jejichž účinek jsou citlivější rychle se dělící buňky. Nádorové buňky totiž většinou mají poškozené reparační mechanismy. Zdravá buňka je tedy poškození způsobené cytostatikem většinou schopná opravit. Existují však některé typy nádorů, které nejsou k cytostatikům z různých důvodů citlivé (např. nádor ledvin, který se léčí chirurgicky).

Do skupiny chemoterapeutik patří komplexy platiny, z nichž zejména cisplatina zaznamenala velkého úspěchu při léčbě nádorových onemocnění vaječnicků, močového měchýře či nádorů v oblasti hlavy a krku. Za cílové místo protinádorové účinnosti této skupiny léčiv je považována DNA v jádře buněk. Komplexy platiny se váží na DNA, kde vytvářejí vnitřetězcové a meziřetězcové můstky a brání tím některým důležitým buněčným procesům, jako je replikace či transkripce. Vzniklý Pt-DNA adukt zabraňuje DNA či RNA polymeráze v jejím pohybu podél DNA řetězce, mající za následek inhibici DNA či RNA syntézy. Tento efekt vedoucí k zastavení buněčného dělení je více uplatňován u často se dělících buněk, jakými jsou právě buňky nádorové. To, zda modifikace genomové DNA komplexy platiny povede až k zastavení dělení či smrti buněk závisí velkou měrou na procesech, které jsou díky vzniklé DNA modifikaci v buňce spuštěny. Některé buňky jsou schopny se s poškozením DNA vyrovnat tím, že adukt platiny odstraní opravnými mechanismy, či ho beze změny překlenou. Důležitou roli v rozpoznání a případném odstranění Pt-DNA aduktu opravnými proteiny hraje charakter tohoto aduktu. Na základě toho byla navržena hypotéza, že komplexy platiny s odlišným DNA vazebným módem, než má cisplatina, by byly odlišně rozpoznávány buněčnými proteiny a spouštěly by

tudíž odlišné buněčné procesy, čímž by bylo docíleno jejich odlišné protinádorové aktivity, např. v nádorech k cisplatině rezistentních.

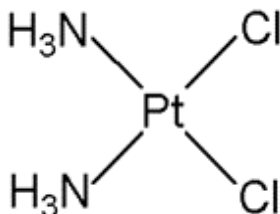
Na základě této hypotézy byly navrženy nové polynukleární komplexy platiny obsahující dvě či více platinových jader spojených řetězcem různé povahy. Jejich struktura poskytuje bohatší DNA vazebný mód, k jehož objasnění a porovnání s cisplatinou přispívá i předkládaná diplomová práce.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Vývoj platinových cytostatik

V roce 1969 na Michiganské státní univerzitě byly při studiu vlivu elektrického pole na růst bakterií *Escherichia Coli* náhodou objeveny cytostatické účinky sloučenin platiny biofyzikem Barnettem Rosenbergem. Vědci ponořili dvě platinové elektrody do nádoby s bakteriemi v živné půdě a mezi elektrody vložili napětí. Při elektrolytických dějích vznikala cisplatina a její analoga, která zastavila buněčné dělení bakterií a docházelo k filamentóznímu prodlužování. Tento náhodný objev vedl k rozvoji chemoterapeutik na bázi platiny [1].

Následovaly testy cisplatiny (*cis*-diammindichloroplatinatý komplex) (Obr. 1) na myších, při kterých byla zjištěna protinádorová aktivita [2, 3]. Prvotní klinické testy byly slibné, a protože při léčbě nádoru varlete vykazovala cisplatina více než 90% úspěšnost (při včasné diagnóze), byla roku 1978 schválena Správou potravin a léčiv v U.S.A. (FDA – Food and Drug Administration) [4]. Postupně se stala nejlépe prodávaným cytostatikem v U.S.A. V České republice ji vyráběla jako registrovaný lék společnost Lachema v Brně [5]. Cisplatina je dále využívána k léčbě dalších nádorových onemocnění, jako jsou nádory vaječníků, děložního krčku, hlavy a krku, jícnu, plic a močového měchýře. Léčba cisplatinou zahrnuje sérii intravenózních injekcí podávaných každé 3-4 týdny v dávkách 50-120 mg/m<sup>2</sup> [6].



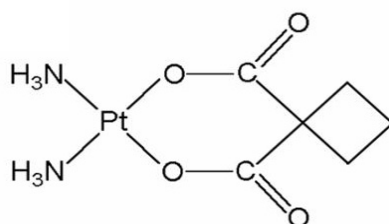
Obr. 1: Strukturální vzorec cisplatiny.

Používání cisplatiny jako cytostatika má ale i svá úskalí. Cisplatina působí jen na úzké spektrum nádorů – proti nejčastěji se vyskytujícím nádorům tlustého střeva a prsu není účinná. Při jejím opakovaném podávání pacientovi dochází vůči ní k rezistenci nádorových buněk [5]. Získaná rezistence může vzniknout z několika důvodů: redukované buněčné vstřebávání cisplatiny; zvýšená oprava aduktů cisplatina-DNA; zvýšená tolerance těchto aduktů; deaktivace cisplatiny proteiny, které obsahují funkční skupinu -SH [7]. Při léčbě se objevují i nežádoucí vedlejší účinky. Pacient trpí příznaky nefrotoxicity (poškození ledvin), neurotoxicity (poškození

nervového systému) a ototoxicity (ztráta sluchu) a také může mít zvýšený krevní tlak, průjem a nevolnost doprovázenou zvracením [8, 9].

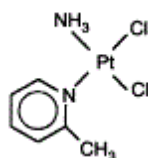
I přes zjištění, že intravenózní hydratace redukuje míru nefrotoxicity [10], představují nežádoucí vedlejší účinky hlavní nevýhodu použití cisplatiny jako cytostatika. V posledních 25 letech se mnoho vědců soustředilo na vývoj látek podobných cisplatině, které by měly mírnější vedlejší účinky [9].

Karboplatina (Obr. 2) sice vykazuje účinnost proti stejnému spektru nádorů jako cisplatina [11], ale v krvi je rozkládána pomaleji a je tudíž méně toxická. Může být tedy podávána ve vyšších dávkách (900 mg/m<sup>2</sup>) než cisplatina (60-120 mg/m<sup>2</sup>).



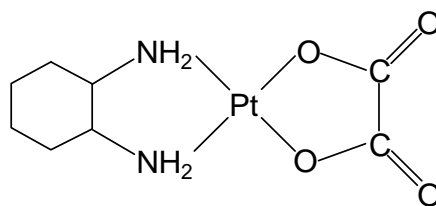
Obr. 2: Strukturální vzorec karboplatiny.

Platinový komplex AMD-473 (Obr. 3) disponuje menší toxicitou než cisplatina, ale větší než karboplatina. Pomalu reaguje s thiomocovinou a methioninem a nenechá se jimi tak snadno deaktivovat. Překonal i další typy rezistence – redukované buněčné vstřebávání komplexu a zesílené opravy DNA [8].



Obr. 3: Strukturální vzorec komplexu AMD-473.

Oxaliplatin (Obr. 4) byla schválena organizací FDA roku 2002 pod jménem Eloxantin. Je podávána v kombinaci s 5-fluorouracilem a leukovorinem (5FU/LV) při léčbě pacientů s rakovinou tlustého střeva [12], u které cisplatina ani karboplatina nejevily žádnou protinádorovou aktivitu [13]. To je přičítáno objemnému a hydrofóbnímu diaminocyklohexanovému ligandu, který se účastní inhibice transkripce [14, 15].



Obr. 4: Strukturální vzorec oxaliplatiny.

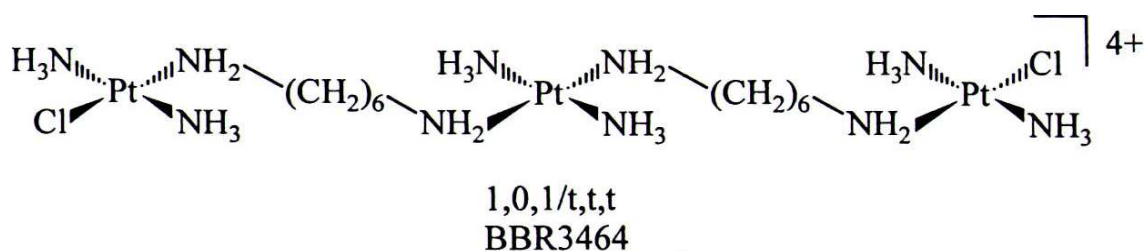
Ačkoliv byl zaznamenán omezený úspěch s objevením léčiv s menší toxicitou (karboplatina) a s překonáním získané rezistence proti cisplatině (AMD-473, oxaliplatina), stále probíhala snaha o vývoj látek, které by vykazovaly aktivitu v buněčných liniích s přirozenou i získanou rezistencí k cisplatině a karboplatině. Mnoho vědců se proto obrátilo ke studiu vícejaderných platinových komplexů [16]. Tyto speciální komplexy obsahují dvě a více spojených platinových jader. Každé z nich se může kovalentně vázat na DNA a tvořit úplně odlišnou řadu DNA aduktů než cisplatin [17]. Proto se předpokládá, že by mohly cytostaticky působit i proti odlišnému spektru nádorů [18].

Na počátku byla syntéza vícejaderných komplexů založena na spojení dvou center cisplatin. První vyvinutý komplex byl jednoduchý derivát cisplatin se dvěma bifunkčními  $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)]$  centry spojenými diaminovým řetězcem [19]. Náhradou chloridových ligandů za malonát byla vytvořena sloučenina s lepší rozpustností a vyšší aktivitou v buněčných liniích rezistentních vůči cisplatině. Tyto komplexy se mohou na DNA vázat podobným způsobem jako cisplatin, kdy vznikají vnitřetězcové můstky, ale většinou tvoří spíš meziřetězcové můstky [20]. Broomhead a kol. porovnával dva druhy těchto dvoujaderných tetrafunkčních komplexů: 1) s 4,4'-dipyrazolymethanovým ligandem a dvěma můstky mezi jádry [21]; 2) s dvěma chloridovými nebo DMSO ligandy a jedním můstkem. Vyšší toxicitu projevovaly komplexy s jedním můstkem, ale byly nerozpustné ve vodě a ve srovnání s cisplatinou nevykazovaly žádné výhody [22].

Mnohem důležitější byl následující vývoj dvoujaderných komplexů s monofunkčními platinovými centry [20]. První komplexy 1,1/*t,t*, a 1,1/*c,c* byly kladně nabitě a dobře rozpustné ve vodě. *Trans* izomerní komplex 1,1/*t,t* (BBR3005) byl protinádorově aktivní v buňkách rezistentních k cisplatině. Jeho *cis* izomer protinádorově působil už při nižších dávkách než BBR3005, ale jen v buňkách citlivých na cisplatinu [23, 24]. Komplex BBR3005 ale bohužel kvůli nežádoucím účinkům (plicní toxicitě) nemohl být nasazen v klinické praxi [23]. Dále byly studovány vícejaderné komplexy s jednou odstupující skupinou na každém atomu platiny, avšak se smíšenými výsledky [25 - 28]. Odlišný přístup zvolil Komeda a kol., když vytvořil komplex, který měl pyrazolem spojené cisplatinové jednotky. Odstup mezi dvěma platinovými centry byl

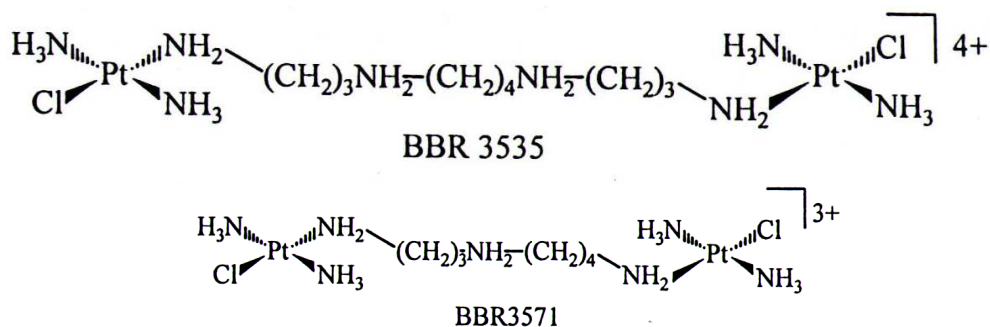
podobný jako mezi dvěma guaniny v B-DNA a proto se předpokládalo, že vazba komplexu na DNA nepoškodí dvoušroubovicovou strukturu [29, 30].

Vývoj pokračoval syntézou dvojjaderných a trojjaderných komplexů, kde jsou jádra spojena polyaminovým ligandem, který do komplexu vnáší kladný náboj a schopnost tvořit vodíkové vazby. Tyto komplexy vykazují vysokou rozpustnost ve vodě, která je důležitá pro podávání léku, a navíc jsou cytotoxické už při nanomolárních koncentracích. Nejvýznamnějším z této skupiny je komplex BBR3464 (Obr. 5), kde prostřední platinová jednotka tvoří vodíkové můstky s atomy DNA [17]. V roce 2000 vstoupil do druhé fáze klinického testování na nádorech plic a vaječníků [31]. Dále byla zkoušena jeho protinádorová aktivita i na nádorech tlustého střeva a slinivky břišní [32]. Lze ho podávat bez prehydratace, aniž by vznikala nefrotoxicita a podávané dávky byly 20x nižší než u cisplatiny [15, 31]. Ale v odpovědi na toto cytostatikum se objevují alergické reakce a porucha krvevotvorby [31]. Nakonec byly klinické testy komplexu BBR3464 ukončeny s podobnými výsledky jako u cisplatiny. Příčinou byla nejspíš vazba sérových proteinů, které komplex degradovaly [15].



Obr. 5: Strukturální vzorec trojjaderného komplexu BBR3464. Převzato z [17].

Souběžně probíhal i vývoj a studium dvojjaderných komplexů se spermidinovým (BBR3571, BBR3537) nebo sperminovým řetězcem (BBR3610, BBR3535) (Obr. 6).



Obr. 6: Strukturální vzorec komplexu BBR3571, který obsahuje spermidin a komplexu BBR3535, který obsahuje spermin. Převzato z [17].

Jejich cytotoxicita se projevovala při stejných nebo i nižších dávkách než u komplexu BBR3464 [33]. Zůstal ale problém s navázáním těchto komplexů na sérové proteiny, které je degradovaly. Z toho vyplýval další výzkum zaměřený na: 1) Použití nosičových molekul, které by neovlivňovaly vazbu komplexu na DNA. Pro tento účel se dají využít liposomy, protilátky [34, 35] a hlavně kukurbit[n]urily, které mají schopnost transportovat vícejaderný komplex do buňky. Tím se sníží degradace sérovými proteiny a toxicita komplexu [36, 37]. První experimenty byly provedeny na buněčných liniích adenokarcinomu vaječníků u myší, kdy byla zvýšena maximální tolerovaná dávka komplexu, který zároveň vykazoval stejný terapeutický index jako volný komplex [15]. 2) Další variantou je vývoj nových analog komplexu BBR3464 s amoniakem nebo aminovou skupinou místo chloridových ligandů, které se vážou na DNA nekovalentně. Po vstupu těchto analogů do buňky se jejich účinek projeví mnohem dříve než u komplexu BBR3464, což způsobí rychlý nástup apoptózy [38]. 3) Poslední přístup byl založen na použití prekursoru komplexu BBR3571, u něhož je centrální dusík blokován takovou skupinou, která se dá řízeně hydrolyzovat. Díky tomu by docházelo i k řízenému postupnému uvolňování samotného komplexu. Mezi tyto skupiny se dá zařadit například fluorenylmethyl karbamát nebo tertbutoxykarbonylová skupina [39].

## **2.2 Cisplatina**

V minulosti probíhalo mnoho výzkumů s cílem objasnit biologickou aktivitu cisplatiny a pokusit se podrobně popsat mechanismus jejího působení. Hlavní pozornost byla směřována k biologickému cíli této látky a k určení vlivu aduktů cisplatiny s DNA na buněčné pochody. Dále byla také věnována pozornost proteinům, které zprostředkovávají buněčnou odpověď na cisplatinu [40].

### **2.2.1 Mechanismus působení cisplatiny**

#### **2.2.1.1 Biologický cíl působení cisplatiny**

Cisplatina se podává intravenózně, přímo do krevního řečiště, kde vysoká koncentrace chloridových aniontů (100 mM) zabraňuje hydrolyze sloučeniny a udržuje ji v neutrálním stavu.



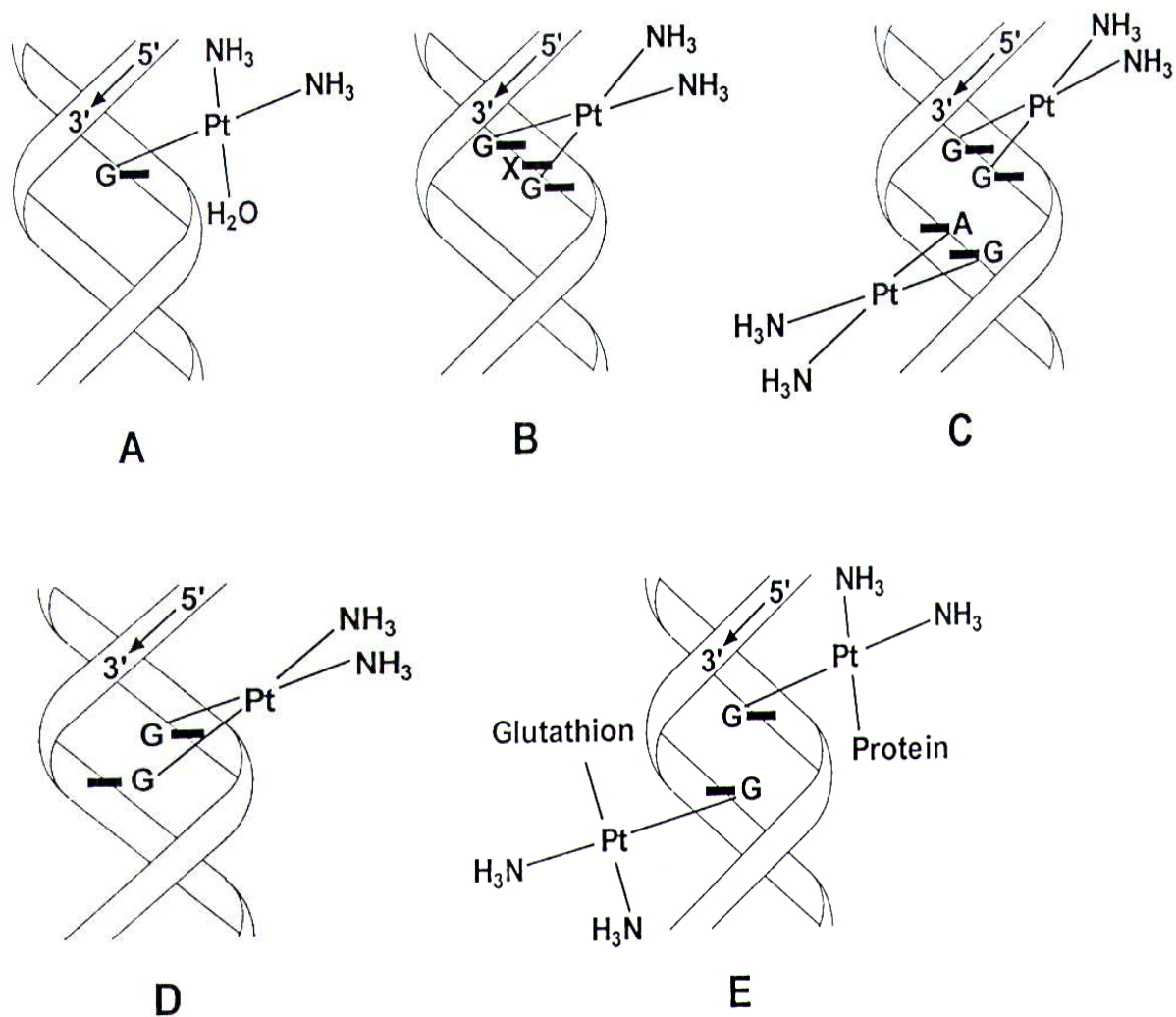
Do buňky vstupuje hlavně pasivní difúzí, ale existuje i důkaz, že z části může být přenesena i aktivním transportem. Nižší koncentrace chloridových aniontů (20 mM) uvnitř buňky usnadňuje hydrolyzu, přičemž vzniká reaktivnější (hydratovaná) forma cisplatinu [41].

Cisplatinu v buňce reaguje s RNA, DNA, proteiny, membránovými fosfolipidy a mikrofilamenty, která tvoří cytoskeleton. Nejprve bylo potřeba zjistit, jaká z těchto vazeb má cytostatický účinek. První vodítko pro určení buněčného cílu byl filamentózní růst u bakterií vyvolaný cisplatinou. Tento znak vykazuje i poškození DNA UV zářením, ionizačním zářením a hydroxymočovinou [42, 43, 44]. Inkorporací radioaktivně značených prekurzorů do RNA, DNA a proteinů došlo k selektivní inhibici DNA ve srovnání s RNA a proteiny [45, 46]. Na koloniích HeLa buněk bylo spočítáno množství navázané platiny – 22 atomů v molekule DNA, 1 atom v mRNA, 1 atom na 30 molekul rRNA a 1 atom na 1500 molekul proteinů [47]. Další studie prokázaly, že buňky s nefunkčním opravným mechanismem DNA jsou více citlivé k cisplatině než buňky s nesníženou schopností opravy. Z toho se odvíjí různá citlivost buněk k cytostatiku [48, 49, 50]. Všechny tyto studie poskytly dostatečné důkazy o tom, že cisplatinu působí primárně na DNA a nasměrovaly většinu výzkumů tímto směrem.

#### 2.2.1.2 Aduktu tvořené cisplatinou a následné strukturní změny

Vazba cisplatinu na DNA je kontrolována především kineticky. Hydrolyza chloridového ligandu při vstupu do buňky má poločas reakce zhruba 2 h. Hydratovaná forma se následně váže na atom N7 guaninu. Tento krok je velice rychlý, molekula vody se odštěpuje s poločasem reakce 0,1 h a vzniká monofunkční adukt. I druhý chloridový ligand může podléhat hydrolyze za vzniku bifunkčního aduktu ( $t_{1/2} \sim 2$  h). Tentokrát může vznikat vazba na guaninu i adeninu [51, 52, 53].

Cisplatinu může na DNA tvořit dva druhy můstků – vnitřetězcové a meziřetězcové (Obr. 7). Hlavní vazebné místo na dvoušroubovicové DNA je tvořeno dvěma sousedními guaniny (1,2-GG). Tyto můstky jsou tvořeny z 65 %. Okolo 20 % představují můstky mezi guaninem a adeninem také v těsném sousedství (1,2-AG). Další 9 % pochází s můstků mezi guaniny oddělených jednou bází (1,3-GXG) [54]. Mezi řetězci vznikají můstky pouze mezi guaniny, vyskytují se jen z 6 % [55]. Také mohou vznikat můstky mezi guaninem a glutathionem, který se vyskytuje v buňce v koncentraci 1 – 5 mM. [56].



Obr. 7: A – monofunkční adukt; B, C – vnitrořetězcové můstky; D – meziřetězcový můstek; E – můstek DNA-protein a DNA-glutathion. Převzato z [57].

U transplatininy probíhá první hydrolýza podobnou rychlostí jako u jejího izomerního analogu cisplatininy [51]. Avšak hydrolýza při tvorbě bifunkčního analogu se zdá pomalejší. Na monofunkční adukt, který nebyl dostatečně rychle hydrolyzován, se může navázat glutathion [56, 58]. Tento poznatek nejspíše zčásti vysvětluje neschopnost transplatininy vykazovat cytotoxickou aktivitu.

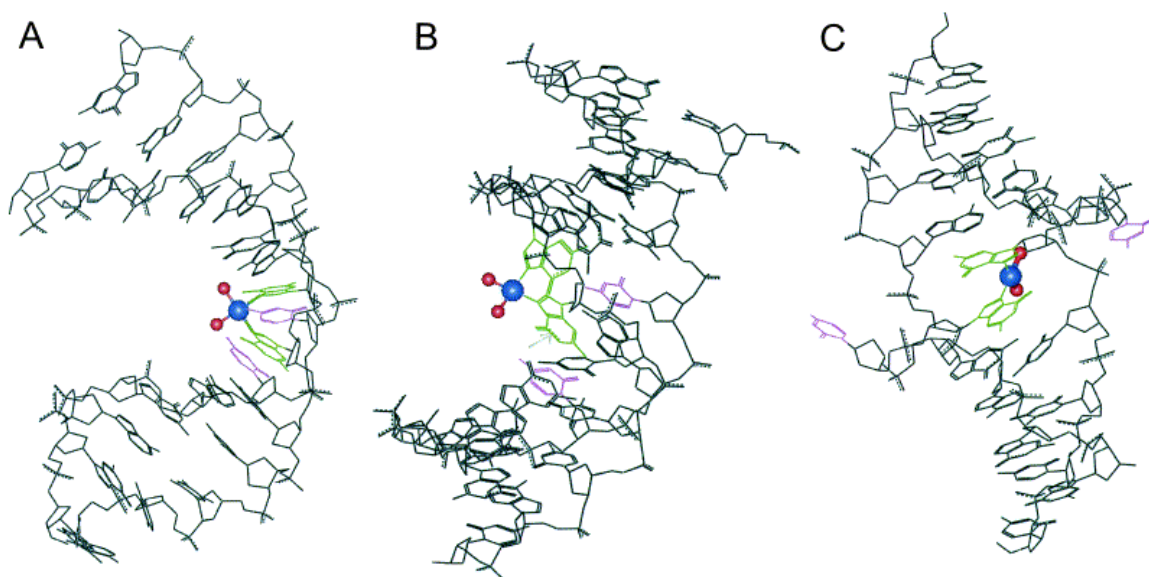
Adukty tvořené cisplatinou ovlivňují sekundární strukturu. Konkrétně vnitrořetězcové můstky 1,2-GG a 1,2-AG ohýbají DNA o 26 – 50° mezi platinovanými purinovými bázemi, atom platiny se posune z roviny purinového kruhu, podélná osa se nakloní směrem k velkému žlábků a vzniká lokální odvíjení o 9 - 11°. V místě aduktu dojde k rozšíření malého žlábků. Deformace zasahuje 4 – 5 párů bází. Takto porušená dvoušroubovice vykazuje prvky A-formy

DNA [40, 59] (Obr. 8).

1,3-GXG vnitřetězcový můstek ohýbá osu dvoušroubovice směrem k hlavnímu žlábků zhruba o  $30^\circ$  a způsobuje lokální odvíjení asi o  $19^\circ$ , denaturaci a flexibilitu v místě aduktu [60, 61] (Obr. 8).

Při vzniku meziřetězcového můstku mezi guaniny nejsou tyto báze spárovány s komplementárními cytosiny vodíkovými vazbami, cytosiny jsou odkloněny mimo dvoušroubovici a neinteragují s ostatními bázemi. Deformace pokrývá 4 páry bází. Můstek spočívá v malém žlábků a tím mění orientaci dvoušroubovice z pravotočivé na levotočivou Z-formu. Dále indukuje odvíjení o  $76 - 80^\circ$  a ohyb osy o  $20 - 40^\circ$  směrem k malému žlábků [62] (Obr. 8).

Monofunkční adukty přerušují vazby ve dvoušroubovici a tím činí báze více přístupné [63, 64]. Navíc způsobují odvíjení asi o  $6^\circ$  [65].



Obr. 8: Strukturální změny způsobené: (A) 1,2-GG vnitřetězcovým můstkem; (B) 1,3-GXG vnitřetězcovým můstkem; (C) meziřetězcovým můstkem. Převzato z [66].

### 2.2.2 Následky způsobené navázáním cisplatin

Schopnost cisplatin vázat se na DNA a poškozovat její strukturu naznačuje, že bude

pravděpodobně docházet i k ovlivňování důležitých buněčných pochodů. Replikace a transkripce jsou pro rychle se dělící nádorové buňky esenciální procesy, takže jejich inhibice může způsobit jejich smrt. Proto byl vliv cisplatinu na funkci DNA dopodrobna zkoumán s cílem lépe porozumět biologické aktivitě této látky.

Inhibice replikace DNA cisplatinou může způsobit smrt buňky blokováním její schopnosti syntetizovat novou DNA, která je vyžadována pro buněčné dělení [40]. Týká se hlavně míst s dvěma sousedními guaniny, které představují vazebné místo pro cisplatinu. Bylo prokázáno, že inhibice není úplná – polymerázy jsou schopné modifikované místo v průměru z 10 % obejít (platí jen pro bifunkční adukty, monoadukty ovlivňují replikaci jen nepatrně). Tato vlastnost se u každé polymerázy liší [67 – 69] a je pravděpodobné, že díky tomuto obcházení má cisplatina mutagenní účinky [69].

Dalším esenciálním buněčným pochodem ovlivněným tvorbou aduktů cisplatinu na DNA je transkripce. Bylo zjištěno, že při působení cisplatinu na buňky procházející S fází buněčného cyklu dochází k jeho zastavení v G<sub>2</sub> fázi. U buněk vystavených nízké koncentraci komplexu bylo zastavení dočasné, při vyšších dávkách se buněčný cyklus zastavil definitivně, což vedlo k buněčné smrti. Schopnost cisplatinu zastavit transkripci souvisí s citlivostí dané buněčné linie, na rozdíl od inhibice replikace DNA, která s citlivostí buněk k cisplatině nesouvisí [70, 71]. RNA polymeráza reaguje rozdílně na odlišné typy modifikace cisplatinu. Bifunkční adukty silně transkripci inhibují, naopak monofunkční adukty RNA polymeráza zcela obchází [72, 73, 74]. Vznikla hypotéza [74], že adukty platiny nepředstavují jen fyzickou bariéru postupu enzymu po templátu, ale že mohou i specificky pozměňovat vlastnosti transkripčních komplexů v důsledku konformačních změn, které způsobují v templátu DNA.

Na konci eukaryotického chromozomu se vyskytují telomery, které se skládají z tandemových, na guaniny bohatých sekvencí (5'-TTAGGG-3' u lidí) [75,76]. Chrání konce chromozomů před degradací a zajišťují, aby byla genetická informace při každém buněčném dělení správně zděděna [77]. Během každého dělení se telomery zkrátí o 50 – 200 bp [78 – 80]. Při velkém zkrácení nastává senescence a smrt. Existuje avšak ribonukleoprotein telomeráza, která dosyntetizovává tyto opakující se sekvence na konci chromozomu, což hraje roli při růstu maligních nádorů [81 – 83]. Protože jsou telomery bohaté na guaniny, představují velmi žádaný cíl pro cisplatinu. Výzkum prokázal, že u buněk vystavených působení cisplatinu došlo ke zkrácení a degradaci telomer [84]. Cisplatina se navíc může vázat přímo na telomerázu nebo ovlivňovat její expresi. Všechny tyto důkazy naznačují, že ovlivňování funkce telomer a telomerázy tvoří část protinádorového mechanismu cisplatinu [40].

Při experimentech studujících schopnost cisplatinu zastavit buněčný cyklus [70,71] bylo také objeveno, že podání cisplatinu indukuje apoptózu. Tato programovaná buněčná smrt je

charakterizována snížením buněčného objemu, zkroucením a vychlipováním povrchu a kondenzací chromatinu, což má za následek aktivaci endogenní endonukleázy a rozpoznání apoptotické buňky fagocyty, které ji zneškodní [85].

### 2.2.3 Reakce buňky na vzniklé adukty DNA-cisplatina

Schopnost cisplatinu inhibovat replikaci a transkripci není absolutní, takže existuje předpoklad, že musí být nějaké další faktory, které pomáhají vyvolat buněčnou smrt. Porozumění pochodům, kterými buňka reaguje na poškození DNA cisplatinou, může přispět ke kvalitnější chemoterapii platinovými cytostatiky [40].

#### 2.2.3.1 Proteiny s HMG doménou

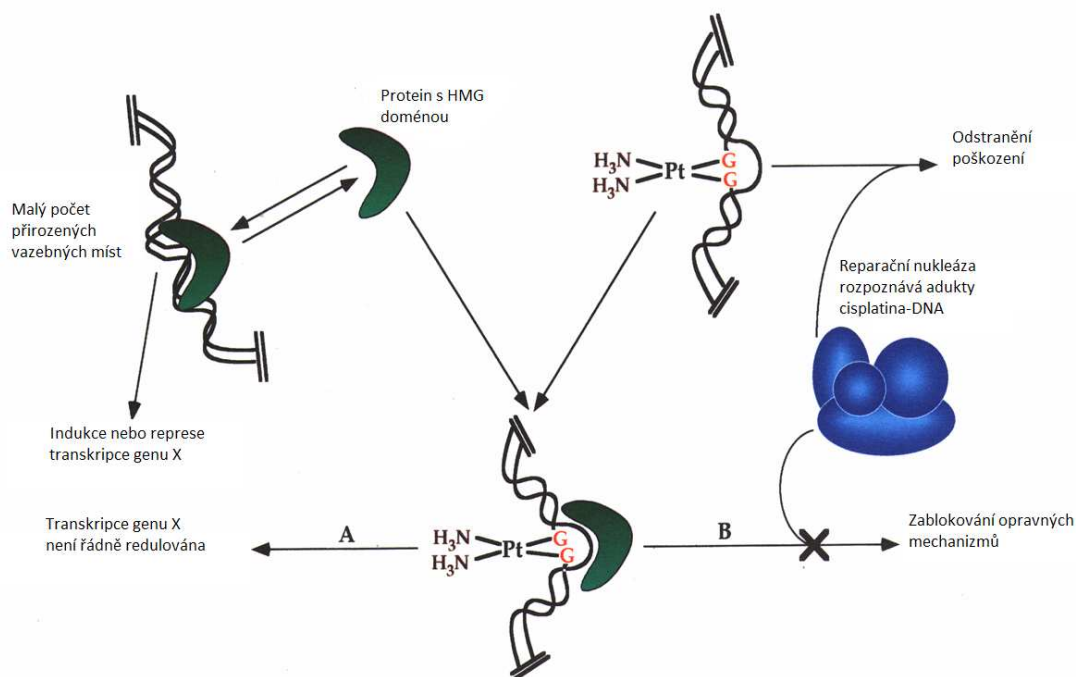
Proteiny s HMG (high mobility group) doménou patří mezi velkou rodinu proteinů, které specificky rozpoznávají a váží se na cisplatinou modifikovanou DNA [86]. HMG doména je kladně nabitý, převážně  $\alpha$ -helikální a 80 aminokyselin dlouhý polypeptid [87,88].

Můžeme sem zařadit např. proteiny HMG1 a HMG2, které obsahují dvě DNA-vazebné HMG-box domény (A a B) a dlouhou C-koncovou doménu. Váží se na DNA bez sekvenční specifity, ale mají vysokou afinitu k zohýbané nebo poničené DNA. Samy také lineární DNA ohýbají. Hrají důležitou strukturní roli při shlukování nukleoproteinových komplexů v rámci různých biologických procesů, např. při V(d)J rekombinaci, iniciaci transkripce nebo opravě DNA [89]. Tyto strukturně specifické proteiny rozpoznávají 1,2-vnitřetězcové můstky, ale 1,3-vnitřetězcové nikoliv [86]. Váží se do malého žlábků DNA naproti vytvořenému můstku ve velkém žlábků [90]. Deformace DNA v místě aduktu jsou důležité pro rozpoznání a navázání proteinů, které rozpoznávají DNA poškozenou komplexy platiny [91].

Také meziřetězcové můstky jsou proteiny s HMG doménou rozpoznávány, i když s menší afinitou. Oproti tomu 1,3-GXG vnitřetězcové můstky nejsou rozpoznávány vůbec [92].

Proteiny s HMG vazebnou doménou hrají důležitou roli při protinádorovém působení cisplatinu. Váží se na vzniklý adukt DNA-cisplatina a brání opravným mechanismům odstranit poškození. Tento adukt poté znemožňuje replikačním enzymům kopírovat řetězec (Obr. 9) [93].

Kromě HMG1 a HMG2 existují i jiné proteiny, které obsahují HMG doménu, zahrnující mnoho transkripčních faktorů [40].



Obr. 9: Mechanismus působení proteinů s HMG doménou jako reakce na vznik aduktu DNA-cisplatina. Převzato z [94].

#### 2.2.3.2 Proteiny bez HMG domény

Kromě proteinů s HMG doménou se můžou na cisplatinou modifikovanou DNA vázat i další buněčné faktory – transkripční faktory (TBP, YB-1), stavební proteiny (histon H1) a opravné proteiny, které budou probrány v rámci opravných mechanismů.

TBP (TATA-binding protein) se jako součást bazálního transkripčního faktoru TFIID [95] váže do malého žlábků na TATA box [96]. TBP i TFIID selektivně rozpoznávají DNA poškozenou cisplatinou i UV zářením [95]. Afinita tohoto proteinu k 1,2-vnitřetězcovým můstkům cisplatinu je vyšší než k 1,3-vnitřetězcovým, stejně jako u proteinů s HMG doménou [96]. I zde vznikla hypotéza, že by TBP mohl blokovat rozpoznání aduktu DNA-cisplatina excisními opravnými proteiny [95]. Avšak pro určení úplné role TBP v mechanismu působení cisplatinu jsou nutné další studie.

V roce 1997 bylo prokázáno, že i YB-1 (Y-box binding protein) rozpoznává DNA modifikovanou cisplatinou [97]. Váže se k Y-boxu v promotorové oblasti hlavně na jednořetězcové a depurinované DNA [98]. Nebyla však objevena specifita pro vazbu

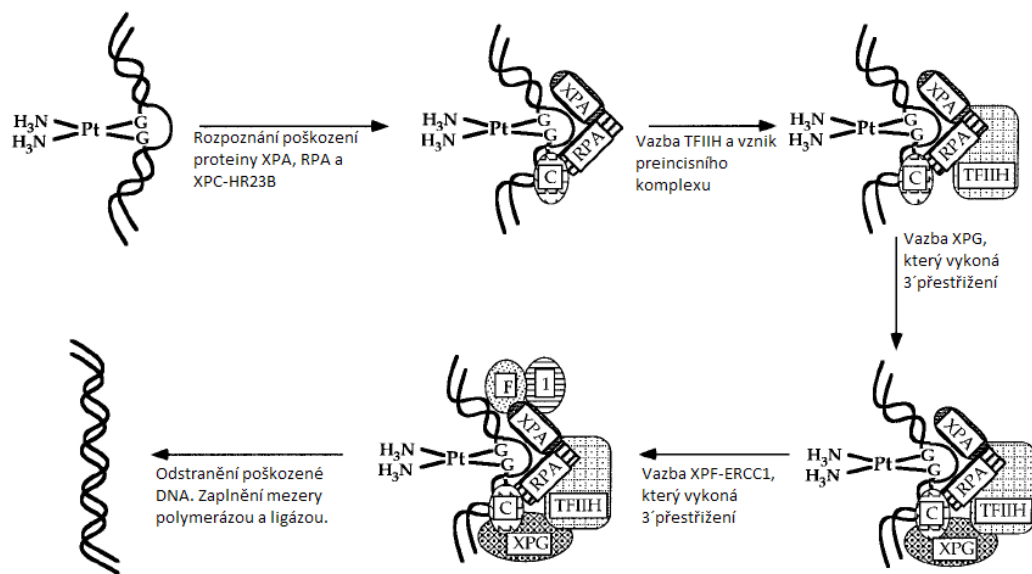
na 1,2-vnitrořetězcové můstky před 1,3-vnitrořetězcovými můstky. Tento chromatinový protein reaguje také s PCNA, komponentou zahrnutou v excisním opravném mechanismu [97]. Z těchto důvodů vyplývá, že by se YB-1 (stejně jako TBP) mohl podílet na mechanismu působení cisplatin. Tato teorie ovšem vyžaduje další experimenty pro potvrzení jeho potenciální role.

Do této skupiny můžeme zařadit i histon H1, který se na poškozenou DNA váže dokonce silněji než HMG1 [99]. Jeho přesná role v mechanismu působení cisplatin není známa, ale je možné, že některé mechanismy navržené pro proteiny s HMG doménou mohou být aplikovány i na H1 [40].

### 2.2.3.3 Opravné mechanismy

Vnitrořetězcové můstky cisplatin jsou v lidských buňkách opravovány hlavně nukleotidovou excisní opravou (NER = nukleotide excision repair) [100]. Tento proces zahrnuje mnoho proteinů a je schopný opravit různé druhy poškození DNA, např. poškození způsobené UV zářením. U eukaryot NER vystřihne poškození v rámci 24 – 32 nukleotidů dlouhé sekvence, u prokaryot je to jen 12 – 13 nukleotidů [101]. Překvapivé je, že oprava 1,2-vnitrořetězcových (ale ne 1,3-vnitrořetězcových) můstků může být blokována navázáním proteinů s HMG doménou. NER nemá schopnost opravit meziřetězcový můstek, který spojuje oba řetězce, takže nemůže být použita informace z komplementárního vlákna [102]. Defektní NER může u lidí způsobovat geneticky dědičnou nemoc xerodermu pigmentosum (XP). Postižení jedinci poté vykazují citlivost k UV záření a představují rizikovou skupinu pro vznik rakoviny kůže. Jejich buňky jsou také náchylnější k působení cisplatin [101, 103].

Mechanismus NER je znázorněn na obrázku 10. Proteiny XPA, RPA a XPC rozpoznají poškozenou DNA a naváží se na ni. Existují dva experimenty, které se snažily určit pořadí vazby těchto proteinů, avšak s protikladnými výsledky [104, 105]. Po rozpoznání je připojen TFIIH a vzniká preincisní komplex. Následuje vazba proteinu XPG, který přestřihne vlákno v místě 2 – 10 nukleotidů směrem k 3' - konci od poškození. Brzy poté se naváže komplex XPF-ERCC1, který provede druhý stříh, tentokrát v místě 20 – 26 nukleotidů a směrem k 5' - konci od aduktu [106]. Po vystřížení poškozené DNA se proteiny uvolní a mezera je doplněna polymerázou a ligázou. Tento opravný krok je závislý na jaderném antigenu proliferujících buněk (PCNA – proliferating cell nuclear antigen) a je vykonáván DNA polymerázou  $\delta$  a  $\epsilon$  [40].



Obr. 10: Schematické znázornění NER aduktů DNA-cisplatinu. Převzato z [40].

## 2.2.4 Buněčná rezistence k cisplatině

Jeden z hlavních důvodů neúspěchu cisplatinu jako cytostatika je rezistence nádoru k podávané látce. Nádorové buňky mohou být k cisplatině rezistentní od počátku, nebo rezistenci získají při opakovaném podávání léčiva (některé ovariální nádorové buňky). Byly určeny tři hlavní faktory, které ovlivňují buněčnou rezistenci. 1) Změny v intracelulární akumulaci léčiva. 2) Zvýšená produkce intracelulárních thiolů. 3) Zvýšená schopnost buněk opravovat adukty DNA-cisplatinu. Bylo provedeno mnoho experimentů s cílem objasnit podstatu rezistence, ale poskytly pouze rozporuplné výsledky. Zdá se, že rezistence buněk k cisplatině je multifaktoriální buněčná odpověď a bude těžké plně tomuto procesu porozumět [40].

Nejčastěji se vyskytující thiol v buňkách je GSH (glutathion) při koncentraci 0,5 – 10 mM. S cisplatinou reaguje v molekulovém poměru 2:1 a ve formě komplexu cisplatinu-glutathion je pomocí ATP-dependentní pumpy exportován ven z buňky. Může se také vázat na monofunkční adukt cisplatinu na DNA za vzniku glutathion-Pt-deoxyguanosinového můstku, čímž by mohl redukovat toxicitu léčiva [107]. Z mnoha experimentů vyplývá, že představuje faktor zahrnutý do mechanismu rezistence vůči cisplatině, ale není absolutně vyžadován [108 - 113].

Dalším intracelulárním thiolem, který by mohl hrát roli při rezistenci nádorových buněk vůči



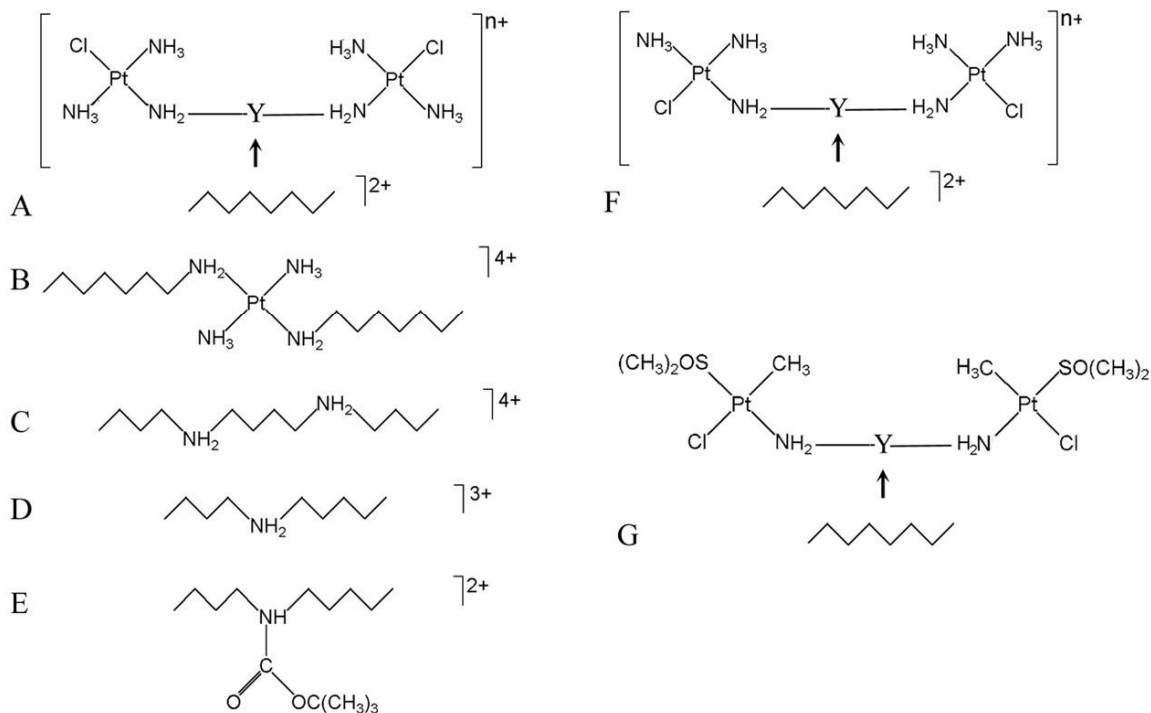
cisplatině, je metallothionein, který se podílí na detoxifikaci buněk od iontů těžkých kovů [100]. Ve studii na různých nádorových buněčných liniích se získanou rezistencí byla pozorována zvýšená exprese metallothioneinu [114]. Ačkoli stejně jako u glutathionu nemáme mnoho důkazů o účasti v mechanismu rezistence vůči cisplatině, je možné, že tento protein také reguluje toxicitu tohoto léčiva.

Další potenciální mechanismus rezistence je zvýšená schopnost buňky tolerovat poškození DNA [115]. Není ale přesně jasné, jak mohou poškození DNA tolerovat. Jedna hypotéza navrhuje, že by DNA adukt mohl být při replikaci obcházen [116,117]. Jiným přístupem je změna míry poškození DNA nutné k navození apoptózy [118,119].

Citlivost nádorových buněk k cisplatině je pravděpodobně spojena i s působením zahrnujícím nádorový supresorový protein p53 [120, 121]. Tento fosfoprotein se podílí na kontrole buněčného cyklu, opravě DNA a apoptóze, proto představuje potenciální mediátor buněčné odpovědi na genotoxické poškození a uplatňuje se v rámci regulace transkripce. Při genotoxickém působení se několika post-transkripčními mechanismy zvýší jeho hladina [122]. U poloviny lidských rakovin (kromě rakoviny varle) byla zpozorována porucha normální funkce proteinu p53 [123,124]. Bylo objeveno, že buňky s mutantním p53 jsou v průměru více rezistentní vůči cisplatině než s normálně fungujícím proteinem [125].

### **2.3 Vícejaderné komplexy platiny**

Vícejaderné komplexy platiny představují novou skupinu protinádorových léčiv s odlišnými chemickými i biologickými vlastnostmi, než má cisplatina. Jsou složeny ze dvou nebo i tří platinových jader spojených diaminovým řetězcem o různých délkách [126] (Obr. 11).



Obr. 11: Struktura vícejaderných komplexů platiny. (a) 1,1/*t,t* (b) 1,0,1/*t,t,t* (BBR3464), (c) 1,1/*t,t*-spermin, (d) 1,1/*t,t*-spermidin, (e) 1,1/*t,t* BOC-spermidin, (f) 1,1/*c,c* (g) ORGANOBisPt. Převzato z [126].

U více než padesáti vyrobených vícejaderných komplexů platiny byla na různých buněčných liniích testována jejich cytotoxicita. Většina z těchto komplexů vykazovala nižší rezistenční faktor než cisplatina, ale hladina cytotoxicity byla ovlivněna povahou přítomných ligandů [16].

Jako první z vícejaderných komplexů vstoupil do klinického testování trojjaderný komplex BBR3464 (Obr. 11b). Od cisplatiny a jiných monojaderných komplexů se liší nábojem 4+ a bifunkčním vazebným charakterem, který mu umožňuje vázat se na vzájemně vzdálené báze [126]. Ve všech testovaných buněčných nádorových liniích byl více aktivní než cisplatina. V pokusech *in vitro* vykazoval aktivitu srovnatelnou s cisplatinou dokonce až při 500x nižších dávkách [127,128]. V experimentu na 7 různých nádorových buněčných liniích byla jeho IC<sub>50</sub> mnohokrát nižší než u cisplatiny [129]. BBR3464 překonal získanou rezistenci vůči cisplatině [130] a navíc i vykazoval aktivitu u několika nádorových linií, které měly přirozenou rezistenci vůči cisplatině [127].

### 2.3.1 Dvojjaderné komplexy

Dvojjaderné komplexy obsahují dvě rovnocenná platinová jádra spojená alkandiaminovým řetězcem s různou délkou. Dva chloridové anionty na každém z těchto jader mohou být v pozici *cis* (1,1/*c,c*, Obr. 11f) nebo *trans* (1,1/*t,t*, Obr. 11a). I když vykazují aktivitu *in vitro* a *in vivo* srovnatelnou s cisplatinou v k cisplatině citlivých buňkách, důležitější je, že tato aktivita přetrvává i v buněčných liniích se získanou rezistencí vůči cisplatině. V tomto ohledu se jeví jako účinnější komplex 1,1/*t,t*, který spíše překonal získanou rezistenci [131]. Zde je vidět základní rozdíl mezi jednojadernými a dvojjadernými komplexy. U monojaderných komplexů vykazoval protinádorovou aktivitu *cis* izomer (cisplatin) a *trans* izomer (transplatin) byl neúčinný.

Stejně jako cisplatin i dvojjaderné komplexy platiny inhibují replikaci a transkripci DNA, což naznačuje, že modifikace DNA hraje také důležitou roli v mechanismu jejich působení [126]. 1,1/*t,t* se váže k DNA ochotněji než jeho *cis* izomer. Oba izomery odvíjí modifikovanou DNA podobně jako cisplatin o 10 – 12°. Ale také způsobují přechod z B-DNA na Z-DNA [132] a tvoří přednostně meziřetězcové můstky, což cisplatin nedělá [133]. Komplex 1,1/*t,t* ale navíc minoritně vytváří 1,2-GG vnitřetězcové můstky. Tato schopnost u druhého izomeru byla pozorována jen na jednovláknové DNA, na dvoušroubovicové DNA nikoliv [134]. Studie [135] odhalila důvod této neschopnosti. Pomocí <sup>1</sup>H NMR spektroskopie bylo zjištěno, že komplex 1,1/*c,c* navázaný na GG sekvenci krátkého jednořetězcového di- nebo tetranukleotidu má díky své struktuře omezenou rotaci kolem 3'G. Toto sterické omezení, které se u 1,1/*t,t* nevyskytuje, je pravděpodobně zodpovědné za neschopnost *cis* izomeru tvořit 1,2-GG vnitřetězcové můstky na dvoušroubovicové DNA.

Se zajímavými výsledky přišla studie [136], která byla zaměřena na dvojjaderný platnatý organokovový komplex ORGANObisPt (Obr. 11g). Tento komplex se trvale váže na DNA, ale s odlišným vazebným módem a větší rychlostí než jeho strukturní analog 1,1/*c,c*. Vykazuje přísnou sekvenci specifitu ke guaninům a na dvoušroubovicové DNA tvoří převážně monofunkční adukty. V malém množství (~2 %) mohou ale také vznikat meziřetězcové můstky, které na rozdíl od monofunkčních aduktů mohou inhibovat transkripci *in vitro*. ORGANObisPt svou vazbou také ovlivňuje konformaci DNA, ale rozdílným způsobem než 1,1/*c,c* a cisplatin.

Studie [137,138] se zaměřily na detailní strukturu meziřetězcových můstků tvořených 1,1/*c,c* a 1,1/*t,t*. 1,2-, 1,3- a 1,4-mezitřetězcové můstky komplexu 1,1/*c,c* vznikají podobnou rychlostí, jsou orientovány ve směru 5' → 5'a navíc inhibují transkripci *in vitro*. Druhý komplex 1,1/*t,t* nejčastěji tvoří můstky na guaninech v párech bází oddělených jedním nebo dvěma páry. 1,2-mezitřetězcové můstky vznikají mnohem pomaleji než 1,3- a 1,4-mezitřetězcové můstky.

Tyto můstky vznikají také ve směru 5' → 5' jako u 1,1/*c,c*. Vazba komplexu 1,1/*t,t* na DNA způsobuje jen mírný ohyb osy (10°) a odvíjení dvoušroubovice (9°).

Byl zkoumán DNA-vazebný profil tří bifunkčních dvojjaderných komplexů platiny s polyaminovým řetězcem – 1,1/*t,t*-sperminu ( $[\{trans\text{-PtCl}(\text{NH}_3)_2\}_2\{\mu\text{-spermin-N}^1,\text{N}^{12}\}]^{4+}$ ), 1,1/*t,t*-spermidinu ( $[\{trans\text{-PtCl}(\text{NH}_3)_2\}_2\{\mu\text{-spermidin-N}^1,\text{N}^8\}]^{3+}$ ) a 1,1/*t,t* BOC-spermidin ( $[\{trans\text{-PtCl}(\text{NH}_3)_2\}_2\{\mu\text{-BOC-spermidin}\}]^{2+}$ ) [55]. Všechny se váží na DNA bifunkčním způsobem a kinetika vazby odpovídá jejich vyššímu náboji.

### 2.3.2 Trojjaderné komplexy

Nejvýznamnějším členem této skupiny je bezpochyby komplex BBR3464 (Obr. 11b). Jako první z vícejaderných platinových sloučenin byl podroben klinickému testování, což vedlo k jeho podrobnějším studiím [139]. Vysoký náboj 4+ usnadňuje vazbu na DNA, s poločasem  $t_{1/2} \sim 40$  min je tato vazba mnohem rychlejší než u neutrální cisplatiny. Pro stejné stupně modifikace se teplota tání aduktů DNA zvyšuje v mírně iontovém prostředí a snižuje v kyselém. Cisplatina se chová opačně. Důkazem o bifunkčnosti komplexu BBR3464 je odvíjení negativně stočeného plazmidu pSP73. Na zlinearizovaném plazmidu bylo kvantitativně stanoveno, že komplex BBR3464 tvoří přibližně 20 % meziřetězcových můstků. To je výrazně více než u cisplatiny, ale méně než u dvojjaderných komplexů. Ke snížené schopnosti tvořit meziřetězcové adukty může přispívat jak vysoký náboj na řetězci, tak i velká vzdálenost platinových jader. Meziřetězcové můstky způsobují ireverzibilní přechod z B- na Z-formu DNA. Imunochemická analýza zjistila, že protilátky produkované proti aduktům DNA-cisplatina nerozeznávají DNA modifikovanou komplexem BBR3464. Potvrdila tak, že adukty komplexu BBR3464 na DNA mají výjimečné vlastnosti.

Dále byly zkoumány různé typy můstků komplexu BBR3464, jak ovlivňují konformační vlastnosti DNA a jestli jsou rozeznávány proteiny s HMG1 doménou a odstraňovány z DNA mechanismem NER *in vitro*. První experiment [140], zaměřený na 1,2-GG a delší vnitřetězcové můstky mezi guaniny, odhalil, že můstky způsobují na DNA zakřivení, které však není stabilní a trvalé. Navíc tyto můstky nebyly rozpoznány proteiny s HMG1 doménou, i když byly odstraněny působením NER.

Analýza dlouhých meziřetězcových můstků [141] prozradila, že tyto adukty také způsobují jen malé poškození DNA a proto nejsou rozpoznávány proteiny s HMG doménou. Ale nejsou také rozpoznávány proteiny XPA a RPA a z tohoto důvodu ani odstraňovány z DNA působením

NER. Proto se, stejně jako u dvoujaderného komplexu 1,1/*t,t*, předpokládá, že spíše meziřetězcové můstky komplexu BBR3464 mají protinádorový účinek. Zajímavé je, že BBR3464 tvoří meziřetězcové můstky orientované ve směru 3'→ 3' [141], což potvrzuje schopnost tohoto komplexu tvořit více typů aduktů než dvoujaderné analogy. Přítomnost náboje a schopnost tvořit vodíkové vazby u centrálního řetězce ve formě tetraaminplatnaté části nejspíše vede k preasociaci předcházející kovalentní vazbě, což může ovlivňovat rozpětí a směr meziřetězcového můstku.

### 2.3.2.1 Působení komplexu BBR3464 na buňky s mutantním p53 ve srovnání s cisplatinou

Protinádorový účinek cisplatiny nejspíše z části spočívá v indukci proteinu p53, a proto je v nádorech s nefunkčním p53 málo účinná [125]. Komplex BBR3464 vykazuje aktivitu v nádorech s mutantním p53, kterých je asi 60 %. Apoptóza v těchto buňkách indukovaná komplexem BBR3464 není tedy zprostředkována proteinem p53, ale nejspíše působením komplexu, které by mohlo být odlišné od cisplatiny a ostatních vícejaderných komplexů platiny [17].

Protein 53 se může vázat až na 100 různých vazebných míst, které se vyskytují přirozeně v lidském genomu a obsahují specifickou (tzv. p53 konsenzuální) sekvenci. P53 rozpoznává vzniklé ohyby na této sekvenci. Vazba cisplatiny na konsenzuální sekvenci snižuje afinitu proteinu p53 k této sekvenci a zároveň dochází ke zvýšení afinity p53 k ostatním modifikovaným místům na DNA [142]. BBR3464 také snižuje afinitu p53 ke konsenzuální sekvenci, ale na druhou stranu nezvyšuje afinitu proteinu p53 k modifikované DNA postrádající tuto specifickou sekvenci [143].

### 2.3.3 Vliv struktury vícejaderných komplexů na jejich aktivitu

V posledních letech probíhal důkladný výzkum dvojjaderných i trojjaderných komplexů, které by mohly představovat účinná cytostatika při léčbě různých nádorových onemocnění. Za podmínek *in vitro* a *in vivo* byla získána vhodná farmakologická data jako např. efektivní a toxické dávky v buněčných liniích L1210 (myší lymfocytické leukemické buňky) a poté i v liniích nádorů vaječníků A2780. Nakonec následovaly *in vivo* experimenty na některých nádorech u lidí (např. u nádoru plic LX-1). Všechny tyto výsledky byly detailně shrnuty N. Farrellem [17].

Jeden z nejdůležitějších strukturních znaků ovlivňující aktivitu komplexů je délka alifatického řetězce. Ideální se zdá být délka 8 atomů (tj. dvě aminové a šest methylenových skupin,  $n = 6$ ). Důkazem jsou dvoujaderný komplex  $1,1/t,t$  ( $n = 6$ ) a trojjaderný BBR3464. Oba vykazují vyšší aktivitu než jejich analogy s kratším ( $n = 2-5$ ) nebo delším ( $n = 7$ ) alifatickým řetězcem [144].

Pro zlepšení rozpustnosti ve vodě a afinity k DNA je potřeba řetězec, který by byl schopný vytvářet vodíkové můstky reagující s negativně nabitou DNA. Toho je možné dosáhnout použitím centrální platinové tetraaminové koordinační sféry (jako u BBR3464) nebo polyaminového řetězce – sperminu s nábojem  $4+$  a spermidinu s nábojem  $3+$  [17]. Takto získané sloučeniny mají pak zhruba stejnou aktivitu [129]. V rámci dvojjaderných komplexů s polyaminovým řetězcem avšak existují rozdíly. S rostoucím nábojem roste i aktivita. U komplexů se sperminovým řetězcem se nejvyšší cytotoxicita objevuje u sloučenin s dlouhým řetězcem (např. u BBR3610 a BBR3611,  $n = 14$ ). Byly navrženy tak, aby vzdálenost mezi jádry byla stejná jako u BBR3464. Oba komplexy vykazují cytotoxicitu už při nanomolárních koncentracích. Sloučeniny s kratším řetězcem (BBR3535,  $n = 10$ ) nedosahují tak vysoké afinity. Dále bylo zjištěno, že i nabitě centrální  $-NH_2^+$  skupiny jsou nutné pro vysokou účinnost a cytotoxicitu [17].

Komplexy BBR3005 ( $1,1/t,t$ ,  $n = 6$ ) a BBR3464 mají podobné profily protinádorové účinnosti (aktivita v buněčných liniích rezistentních vůči cisplatině, zvýšená aktivita u nádorů s mutantním p53). Zajímavé je, že BBR3005 s nábojem  $2+$  je aktivní při stejných dávkách jako cisplatina. Ovšem komplexy s nábojem  $3+$  a  $4+$  mají účinnou dávku o řád nižší [17].

Flexibilita komplexu také hraje roli u protinádorového působení. Při použití aromatického, konkrétně dpzm (dipyrazolylnmethanového) ligandu, u dvoujaderného i trojjaderného komplexu byly tyto komplexy méně aktivní než jejich alifatické ekvivalenty BBR3005 a BBR3464. Protože řetězce měly stejnou délku, byla snížená aktivita připsána snížené ohebnosti dpzm ligandu [26].

Všechny komplexy s chloridovým ligandem s orientací *cis* nebo *trans* vůči řetězci vykazují protinádorovou aktivitu, ale komplexy s *trans* konfigurací jsou zpravidla aktivnější v buněčných liniích rezistentních vůči cisplatině [17, 145]. Buněčné farmakologické studie na L1210/DDP (rezistentní buněčná linie) potvrdily, že buněčná akumulace obou dvojjaderných izomerů byla snížena, ale hladina na DNA navázaného komplexu byla vyšší pro  $1,1/t,t$ . Výsledky naznačily, že struktura DNA aduktů tvořených dvěma izomery je rozdílná a že se liší i tolerance aduktů opravnými mechanismy. Většina můstků komplexu  $1,1/c,c$  na DNA je rychle odstraněna, zatímco meziřetězcové adukty komplexu  $1,1/t,t$  přetrvávají v buňce [17]. Důvodem nejspíše je, že *cis* komplexy dovedou tvořit jen část DNA aduktů tvořených *trans* izomery. Ovšem nemůžou

být vyloučeny i další faktory jako např. rychlost hydrolyzy [16].

U trojjaderných komplexů je cytotoxicita a protinádorová aktivita také ovlivňována geometrií koordinačních sfér. Nejvyšší účinnost byla zjištěna u komplexu BBR3464 (1,0,1/*t,t,t*), následuje ho komplex 1,0,1/*c,t,c* a nakonec 1,0,1/*t,c,t*, což naznačuje, že centrální *cis* jednotka pravděpodobně snižuje cytotoxicitu [17].

### 2.3.4 Mechanismus a kinetika vazby vícejaderných komplexů na DNA

Navázání vícejaderného komplexu na DNA předchází elektrostatická interakce s povrchem DNA – tzv. preasociace. Významně ovlivňuje rychlost a místo modifikace DNA komplexem a může indukovat lokální konformační změny, které usnadňují vazbu k jednotlivým vazebným místům [16]. Johnson a kol. navrhli, že preasociace může indukovat reverzibilní konformační změny DNA, které by se staly nevratnými v případě vzniku kovalentní vazby [146].

Wheate a kol. stanovili jako preferované místo pro vznik prekovalentní vazby malý žlábek DNA, konkrétně oblasti bohaté na adenin a thymin [147,148]. Důvodem jsou nejspíše výhodné elektrostatické a van der Waalsovy síly a nepříznivé sterické interakce aminoskupin guaninu v sekvencích bohatých na guanin a cytosin [16].

Vícejaderné komplexy platiny tvoří ohebné, většinou meziřetězcové můstky, které mají schopnost indukovat konformační přechod z A- na Z-typ DNA [139,146,149-151]. Konformační změny na DNA v důsledku navázání komplexu jsou velmi odlišné od změn způsobených navázáním cisplatiny a pravděpodobně jsou jen slabě rozpoznávány opravnými proteiny [152]. To umožňuje komplexům platiny inhibovat replikaci a transkripci DNA [134].

Rychlost reakce vícejaderných komplexů se může značně lišit v závislosti na povaze spojovacího řetězce, geometrii platinových center a náboji komplexu. Komplex BBR3464 reaguje s DNA zhruba šestkrát rychleji než cisplatina. Předpokládá se, že náboj 4+ komplexu BBR3464 usnadňuje vazbu na záporně nabitou DNA [17]. Dále bylo zjištěno, že BBR3464 nejrychleji reaguje s jednovláknovou DNA nebo RNA. Důvodem je rozdílná konformace dvouvláknové DNA a jednovláknové DNA/RNA. Preasociace v malém žlábkou dvouřetězcové DNA totiž zpomaluje kovalentní reakci. Jednovláknová DNA/RNA malý žlábek nemá, tudíž je preasociace mnohem slabší nebo neexistuje vůbec [153].

Pomocí [<sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N] HSQC 2D NMR spektroskopie bylo prokázáno, že stejně jako u cisplatiny je hydrolyza prvního chloridového aniontu u dvojjaderných komplexů řídicí krok vazby komplexu k DNA s rychlostní konstantou  $4,15 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  (při 25 °C a pH 6,0). Rychlostní

konstanta hydrolyzy cisplatinu je  $1,1 - 1,8 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  [52,154]. Monofunkční adukt vzniká na N7 guaninu po částečném nebo úplném přesunu komplexu z malého žlábků do velkého [53]. Dvojjaderný komplex  $1,1/t,t$  ( $n = 6$ ) reaguje s DNA při podobné rychlosti jako cisplatinu, zatímco odpovídající *cis* izomer  $1,1/c,c$  reaguje pomaleji:

$$1,1/t,t (n = 6) > 1,1/t,t (n = 4) > 1,1/c,c (n = 4) > 1,1/c,c (n = 6) [94].$$

Důvodem je nejspíše sterické omezení chloridových ligandů u *cis* izomeru [135]. Odlišná studie prokázala, že i dvoj- a trojjaderné komplexy s dpzm řetězcem reagují s DNA pomaleji než cisplatinu [155]. Vzniklý monoadukt způsobuje částečné narušení vazby modifikovaného guaninu a prvního páru bází na 5' straně aduktu. Koordinační sféra svírá s rovinou modifikovaného guaninu úhel  $40^\circ$ . Mezi vodíky  $\text{NH}_3$  skupiny a kyslíkem O6 guaninu nebo kyslíkem fosfátové kostry vznikají vodíkové můstky. Volné platinové centrum reaguje s fosfátovou kistrou elektrostatickou interakcí nebo vodíkovými můstky [156].

K tvorbě bifunkčního aduktu je nezbytná hydrolyza druhého chloridového ligandu s rychlostní konstantou  $3,62 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  [157]. Rychlosti hydrolyz chloridových ligandů na obou platinových centrech na sobě nejsou závislé [158]. Uzavření bifunkčního aduktu je výrazně rychlejší než uzavření vnitřetězcového aduktu cisplatinu [157]. U dvojjaderných komplexů se adukt uzavírá pohybem nenavázaného platinového centra a jeho vazbou na dusík N7 guaninu komplementárního řetězce na rozdíl od cisplatinu, kde vzniklý monoadukt rotuje kolem již existující Pt-G(N7) vazby. Elektrostatická interakce nenavázaného platinového centra podporuje rychlejší fixaci bifunkčního aduktu, která vyžaduje celý komplex nebo jen platinová jádra ve velkém žlábků (spojovací řetězec je v malém žlábků) [156]. Studie [94] prokázala, že kinetika tvorby bifunkčních aduktů u dvojjaderných komplexů závisí na konformaci a délce spojovacího řetězce. Rychlost hydrolyzy klesá v následujícím pořadí:

$$1,1/t,t (n = 4) > 1,1/t,t (n = 6) > 1,1/c,c (n = 4) > 1,1/c,c (n = 6).$$

Uzavření bifunkčního aduktu je nejrychlejší u  $1,1/c,c$  izomerů - nejspíše kvůli krátké vzdálenosti chloridových ligandů a tím i menší flexibilitě.

Metodou [ $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ] HSQC 2D NMR byla zkoumána také kinetika tvorby bifunkčních aduktů komplexu BBR3464 [159]. Ve srovnání s dvojjaderným  $1,1/t,t$  byl mechanismus vazby na DNA velmi podobný [160]. U komplexu BBR3464 byla navíc zjištěna silnější preasociace v malém žlábků (nejspíše následkem vyššího náboje) a přítomnost dvou konformerů 1,4-meziretězcového můstku v průběhu reakce [159]. Vytváření majoritního konformeru probíhalo rychleji než vznik minoritního. 1,6-meziretězcový můstek se vyskytuje jen v jednom konformeru. Rychlostní konstanty jednotlivých kroků tvorby obou typů meziretězcových můstků byly velmi podobné [15].



Výzkum vícejaderných komplexů platiny představuje důležitou součást léčby rakoviny. Komplexy BBR3464, BBR3571, BBR3610 a BBR3611, které podstupují klinické testování, mohou být klíčové pro předcházení vlastní i získané rezistence k tradičním platinovým lékům. Tyto komplexy jsou aktivní v mnohem nižších dávkách než cisplatina, na druhou stranu jsou ale více toxické.

## **2.4 Southern blot**

Již v roce 1975 v Edinburghu byl britským biologem Edwinem Southernem popsán princip metody využívající hybridizaci komplementárních jednořetězcových vláken DNA. Metoda s názvem Southernova hybridizace našla široké uplatnění při lokalizaci specifických sekvencí na genomové DNA eukaryotních i prokaryotních organismů. Izolovaná DNA je nejprve naštěpena jedním či více restrikčními enzymy a výsledné fragmenty jsou děleny podle velikosti agarózovou elektroforézou [161]. DNA je poté alkalicky denaturována a kapilárními silami přenesena z gelu na pevný nosič, kterým obvykle bývá nitrocelulózová nebo nylonová membrána. Pufr (0,4M NaOH pro alkalický blot) vzlíná ze zásobníku přes gel na membránu a tím přenáší denaturovanou DNA. Vzájemná poloha fragmentů DNA na gelu je při transferu z gelu na membránu zachována. Klasický kapilární přenos je relativně pomalý (trvá několik hodin), ale proces může být urychlen v zařízení s použitím vakua. Díky tomu může být čas vyžadovaný pro přenesení DNA na membránu zkrácen až na 30 minut s odpovídajícím zlepšením ostroty a rozlišení proužků díky redukované difúzi.

Jednořetězcová DNA ukotvená na membránu může být hybridizována s próbou o komplementární DNA sekvenci, která je buď radioaktivně značená, nebo připojená k antigenu. Volná vazebná místa jsou na membráně zablokována (např. Denhardtovým činidlem) a po přidání značené próby proběhne hybridizace s komplementární sekvencí. Po odmytí nenavázané próby je výsledek hybridizace detekován autoradiograficky nebo imunologicky [162].

Výsledek hybridizace, intenzita hybridizačního signálu, závisí na mnoha faktorech, které zahrnují podíl genomu komplementárního k próbě, velikost próby a její specifickou aktivitu i množství genomové DNA přenesené na membránu. Protože je síla signálu hybridizace přímo úměrná specifické aktivitě próby a nepřímo úměrná její délce, dosahuje Southernový přenos nejvyšší citlivosti při použití velmi krátkých prób [161].

#### 2.4.1. Využití Southernové hybridizace pro studium meziřetězcových můstků

Southernova hybridizace má mnoho využití, ale nejdůležitější s ohledem na tuto diplomovou práci je možnost stanovení meziřetězcových můstků na DNA vytvořených v důsledku působení různých chemických látek na genomovou DNA.

V roce 1992 Zhen a kol. [163] studovali aspekty tvorby a následné opravy vnitřetězcových (IAC, intrastrand) a meziřetězcových (IEC, interstrand) můstků cisplatin na genomové DNA v buňkách. Využíval metody Southernovy hybridizace, která se ukázala být dostatečně citlivou pro sledování úbytku jednotlivých frakcí, IAC či IEC, v důsledku jejich opravy buněčnými proteiny. Zhen a kol. použili ke studiu genomovou DNA získanou jednak z lidských ovariálních nádorových linií k cisplatině sensitivních (A2780 a 2008) a také z jejich paralelních linií se získanou rezistencí k cisplatině. Cílem autorů bylo sledovat rozdíly mezi jednotlivými liniemi, citlivé versus rezistentní, a vyvodit závěry, zda právě zvýšená oprava vzniklých Pt-DNA aduktů přispívá k rezistenci nádorových buněk k použitému metalofarmaku. Kromě sledování opravy aduktů cisplatin na celkovém genomu byla sledována oprava těchto aduktů v místě specifického genu DHFR (gen pro dihydrofolát reduktázu). Výběr genu DHFR je zřejmě z důvodu jeho preferenční reparace v lidských buňkách [164]. Důležitým poznatkem této práce je, že zatímco na celkovém genomu není pozorován úbytek počáteční frakce IAC ani IEC v důsledku jejich opravy, na specifickém genu (DHFR) tento úbytek pozorován je. Zhen a kol. navíc pozorovali účinnější odstranění IEC cisplatin na DHFR genu u buněčných liniích rezistentních k cisplatině ve srovnání s liniemi senzitivními. Všechna tato zjištění napovídají, že získaná buněčná rezistence k cisplatině může být spojena s nárůstem účinnosti genově specifické opravy DNA meziřetězcových můstků.

Southernova hybridizace byla použita i v roce 2000 Cullinanem a kol. [165] pro studium meziřetězcových můstků (IEC) adriamycinu na buňkách MCF-7 za použití genově specifické IEC analýzy. Podobně jako v přechozí citované práci i v této se autoři zaměřili na studium vzniku meziřetězcových můstků na specifickém genu DHFR v genomové DNA. Práce je navíc obohacena studiem tvorby IEC adriamycinu na mitochondriální DNA (mtDNA). Bylo zjištěno, že rychlost tvorby IEC je v obou genomech, jaderném i mitochondriálním, podobná, dosahující maximálních hladin 0,55 a 0,4 můstků/10 kb v DHFR genu i v mtDNA.

O rok později, v roce 2001, použili Shahin a kol. [166] kombinaci PCR a Southernova přenosu ke studiu vzniku IAC a IEC v genomové a mitochondriální DNA izolované z lidských epidermálních keratocytů vystavených působení hořčičného plynu. Na obou typech DNA byla

pozorována tvorba IAC i IEC, ale vyšší počet se tvořil na gDNA (0,45 aduktů/kb v DHFR genu a 0,12 aduktů/kb v mt segmentu při 100  $\mu$ M hořčičném plynu).

Metody Southernovy hybridizace, jako metody vhodné ke studiu vzniku a opravy meziřetězcových můstků cisplatinou, bylo využito také v další práci z roku 2003 [167]. Moufarij a kol. sledovali synergistickou toxicitu mezi cisplatinou a nukleosidovým analogem gemcitabinem na lidských ovariálních buněčných liniích k cisplatině citlivých (A2780 a 2008) a rezistentních (A2780/cp70 a 2008/c13\*5.25). Byla zkoumána hypotéza, že synergistická toxicita mezi gemcitabinem a cisplatinou v těchto buněčných liniích může být způsobena gemcitabinem zprostředkovanou inhibicí opravných mechanismů IAC a IEC cisplatinou. Ke stanovení efektu gemcitabinu na akumulaci a opravu IAC a IEC cisplatinou byla metoda Southernovy hybridizace doplněna také další metodou - kvantitativní PCR. Sledováním úbytku IAC frakce na DHFR genu gDNA bylo zjištěno, že 57 % IAC bylo odstraněno při kombinaci obou látek (cisplatinou + gemcitabin) ve srovnání se 74 % v buňkách ovlivněných pouze cisplatinou. Podobně i oprava IEC byla inhibována u buněk vystavených zároveň působení cisplatinou a gemcitabinu ve srovnání s buňkami vystavenými pouze cisplatině (60 % proti 72 %). Tyto výsledky demonstrovaly přímý inhibiční efekt gemcitabinu na opravu IAC a IEC cisplatinou.

Metoda Southernovy hybridizace nachází širokého uplatnění při studiu meziřetězcových můstků jednotlivých agens vznikajících na DNA. Díky možnosti sledovat efekt akumulace a místně specifické opravy meziřetězcových můstků na genomové i mitochondriální DNA je metoda Southernovy hybridizace řazena k unikátním metodám, které nemohou být nahrazeny jinou i sebevíce moderní metodou schopnou poskytnout nám podobné informace.

### 3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Klíčovou úlohou při studiu cytostatik na bázi komplexů platiny je získat co nejvíce informací o mechanismu, kterým tyto látky působí na molekulární úrovni. Obecným záměrem této diplomové práce je tedy přispět k porozumění tomu, jak protinádorově účinné komplexy platiny působí na úrovni svého cílového místa, tj. DNA.

Protože tvorba meziřetězcových můstků na DNA hraje významnou roli v protinádorové terapii, bylo konkrétním cílem této práce rozšířit poznatky o vlivu meziřetězcových můstků, tvořených komplexy platiny s různou strukturou, na cytotoxickou aktivitu daných látek.

Dílčí cíle práce:

1) Studovat vznik meziřetězcových můstků v DNA *in vitro*, tj. v bezbuněčném prostředí, a to u strukturně odlišných komplexů platiny, a stanovit množství vznikajících můstků.

2) Zavést metodu Southernovy hybridizace, umožňující sledovat můstky v DNA vytvořené komplexy platiny *in vivo*, tj. v nádorových buňkách.

3) Tuto metodu využít ke sledování tvorby meziřetězcových můstků strukturně odlišných komplexů platiny v nádorových buňkách.

4) Korelovat získaná data s protinádorovou aktivitou daných komplexů platiny a vyvodit závěry o vztahu mezi schopností tvořit meziřetězcové můstky a biologickou aktivitou studovaných komplexů platiny.

## 4. MATERIÁLY A METODY

### 4.1 Biologický materiál

Buněčná linie A2780 lidského ovariálního karcinomu (adherentní buněčná linie citlivá k cisplatině)

Lososí spermatická ssDNA (Salmon testes ssDNA) (Sigma Aldrich)

Plazmidová DNA - pUC19, 2686 bp

Restrikční enzymy (BioLabs) – *NdeI*, *HindIII*, *EcoRI*

### 4.2 Použité roztoky a pufrы

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

Alkalický pufr: 0,03 M NaOH  
1 mM EDTA

PBS (fosfátový pufr): 0,17 M NaCl  
3,4 mM KCl  
5,6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O  
1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

DNA lyzační pufr (pro Metodu 1): 0,2 M Tris – HCl  
0,1 M EDTA

10x koncentrovaný nanášecí pufr: 10 mM EDTA  
20% ficoll

TE pufr: 0,01 M Tris-Cl  
1 mM EDTA

Denaturační pufr pro kapilární transfer:	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
Neutralizační pufr pro kapilární transfer:	1 M Tris (pH 7,4) 1,5 M NaCl
Transferový pufr pro kapilární transfer (20x SSC):	3 M NaCl 0,3 M citrát sodný
Alkalický pufr pro vakuový Southern blot:	1 M NaOH 1,2 M NaCl
Prehybridizační roztok:	H <sub>2</sub> O 6x SSC 5x Denhartovo činidlo 0,5% SDS 100 µg/ml lososí spermatická ssDNA (denaturována při 95°C, 10 min)
Hybridizační roztok:	H <sub>2</sub> O 6x SSC 0,5% SDS 100 µg/ml lososí spermatická ssDNA (denaturována při 100°C, 10 min)

### **4.3 Elektroforetické gely**

1) 1% neutrální agarózový gel (19 cm x 11,5 cm)

1,2 g agarózy

120 ml 1x TBE

Rozvařit směs v mikrovlnné troubě. Zkontrolovat objem, aplikovat do nosiče.

2) 1% neutrální agarózový gel (10 cm x 7 cm)

0,3 g agarózy

30 ml 1x TBE

Rozvařit směs v mikrovlnné troubě. Zkontrolovat objem, aplikovat do nosiče.

3) 0,6% neutrální agarózový gel (19 cm x 11,5 cm)

0,72 g agarózy

120 ml 1x TBE

Rozvařit směs v mikrovlnné troubě. Zkontrolovat objem, aplikovat do nosiče.

4) 1% agarózový gel pro alkalickou denaturační elektroforézu (19 cm x 11,5 cm)

1,2 g agaróza

120 ml H<sub>2</sub>O

Rozvařit směs v mikrovlnné troubě. Po rozpuštění agarózy a ochlazení roztoku na 60°C upravit na 0,03 M NaCl a 1 mM EDTA. Nechat gel ztuhnout v nosiči

#### **4.4 Použité kity**

1) Qiagen Blood and Cell Culture Kit

C1: 1,28 M sacharóza  
40 mM Tris – Cl (pH 7,5)  
20 mM MgCl<sub>2</sub>  
4% Triton X - 100

G2: 800 mM guanidin – HCl  
30 mM Tris – Cl (pH 8,0)  
30 mM EDTA (pH 8,0)  
5% Tween – 20

0,5% Triton X - 100

QBT: 750 mM NaCl  
50 mM MOPS (pH 7,0)  
15% izopropanol  
0,15% Triton X - 100

QC: 1 M NaCl  
50 mM MOPS (pH 7,0)  
15% izopropanol

QF: 1,25 M NaCl  
50 mM Tris – Cl (pH 8,5)  
15% izopropanol

2) DNA kit od firmy MRC – DNAzol

3) Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up Systém

Roztok pro vazbu DNA na membránu: 4,5 M guanidin izothiokyanát  
0,5 M acetát draselný (pH 5,0)

Promývací roztok: 10 mM acetát draselný (pH 5,0)  
80% ethanol  
16,7 μM EDTA (pH 8,0)

4) Prime-It II Random Primer Labeling Kit

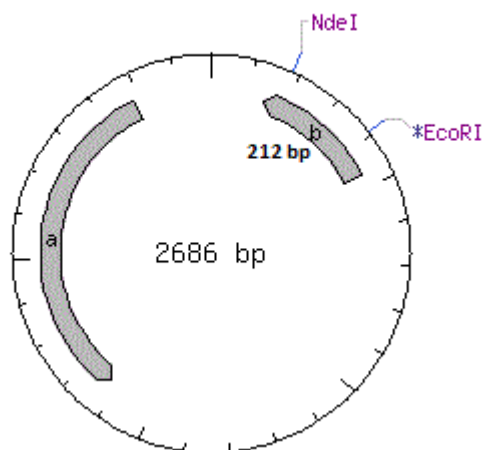


## 4.5 Metody a postupy

### 4.5.1 Metody pro detekci meziřetězcových můstků na plazmidové DNA

#### 4.5.1.1 Linearizace plazmidové DNA a příprava fragmentu o 212 bp

Kruhovou plazmidovou DNA bylo nejdříve třeba zlinearizovat naštěpením restrikním enzymem (či enzymy). Plazmidová DNA byla inkubována s restrikním enzymem (*EcoRI*, *NdeI*) 2 h při 37°C v příslušném restrikním pufru. *EcoRI* štěpí DNA v sekvenci G<sup>↓</sup>AATTC a *NdeI* v sekvenci CA<sup>↓</sup>TATG. Restrikní místa těchto enzymů na plazmidu pUC19 jsou ukázána na obrázku 12.



Obr. 12: Plazmid pUC19 s vyznačenými restrikními místy *EcoRI* a *NdeI*. Převzato a upraveno z [168].

Naštěpením plazmidu pUC19 enzymem *EcoRI* vznikla lineární molekula DNA o délce 2686 párů bazí. Následující štěpení enzymem *NdeI* poskytlo dva fragmenty o délkách 2474 a 212 párů bazí.

#### 4.5.1.2 Elektroforéza v nativním agarózovém gelu – kontrola štěpení restriční enzymem

Byl připraven 1% agarózový gel (30 ml), do kterého byl před nalitím do formy přidán 1,5  $\mu$ l ethidium bromidu pro vizualizaci DNA. Po ztuhnutí byl gel zalit v elektroforetické vaně 1x TBE pufrům a vzorky byly nanášeny na gel. Elektroforéza probíhala 2 h při napětí 60 V ( $\equiv$  6 V/cm).

#### 4.5.1.3 Deproteinace po štěpení restriční enzymem

Deproteinací vzorků DNA byly odstraněny štěpící enzymy. K roztoku DNA byl přidán jeden objem fenolu (8°C) a roztok byl protřepán a zcentrifugován (10000 g, 1 min). Po oddělení vodné a organické fáze byla vodná fáze odebrána a k ní bylo přidáno stejné množství chloroformu pro odstranění zbytků fenolu. Po oddělení fází centrifugací (10000 g, 1 min) byla opět vodná fáze odebrána.

Následovalo převedení plazmidové DNA do chloristanu sodného pomocí ethanolového srážení. K plazmidové DNA byl přidán 3 M octan sodný (výsledná koncentrace 0,3 M), 100% vychlazený ethanol (dvojnásobek objemu roztoku) a vzorek byl umístěn na 30 min do -20 °C, aby se vytvořila sraženina DNA. Roztok byl poté centrifugován 15 min při 4 °C (15000 g) a byl odebrán supernatant. Pelet byl promyt stejným objemem 80% vychlazeného ethanolu a vzorek byl opět 15 min centrifugován při 10 °C (15000 g). Po odebrání supernatantu byl pelet vysušen v exsikátoru a rozpuštěn v 0,01 M NaClO<sub>4</sub>.

#### 4.5.1.4 Radioaktivní značení plazmidové DNA

Volné 3' konce lineární DNA (1  $\mu$ g) byly radioaktivně naznačeny izotopem [ $\alpha$ -ATP<sup>32</sup>] pomocí Klenowova fragmentu DNA polymerázy I v prostředí pufru *Neb2* v celkovém objemu 10  $\mu$ l. Nezareagovaný [ $\alpha$ -ATP<sup>32</sup>] byl z roztoku odstraněn zachycením na chromatografické kolonce naplněné Sephadexem G50 coarse.

Radioaktivně značená plazmidová DNA byla přidána k neznačené DNA.

#### 4.5.1.5 *In vitro* modifikace DNA komplexu platiny

Lineární DNA (pUC19) byla inkubována s komplexem platiny na požadovaný teoretický

stupeň modifikace  $r_i$  v 10 mM NaClO<sub>4</sub> při 37 °C po dobu 24 h.

$r_i$  představuje molekulární poměr volného komplexu platiny ku počtu nukleotidů DNA vstupujících do reakce a vypočítá se podle vztahu:

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

kde  $n_{Pt}$  je látkové množství komplexu platiny,  $n_{DNA}$  je látkové množství DNA,  $c_{Pt, zás}$  je koncentrace zásobního roztoku daného komplexu platiny,  $V_{Pt, zás}$  je objem roztoku komplexu,  $c_{DNA, zás}$  je koncentrace použité DNA a  $V_{DNA, zás}$  je objem DNA.

Stupeň modifikace  $r_b$  je definován jako počet molekul komplexu skutečně navázaných na jednu bázi DNA.

#### 4.5.1.6 Elektroforetická separace v denaturačním agarózovém gelu

Vzorky DNA po chemické modifikaci byly denaturovány 0,1 M NaOH a poté byly nanесeny na 1% agarózový gel (s přísávkem 0,03 M NaCl a 0,001M EDTA). Elektroforéza probíhala v alkalickém pufru (0,03 M NaOH a 0,001 M EDTA) při pokojové teplotě - pro delší fragment (pUC19 štěpená pouze *EcoRI*) 5 h a pro kratší (plazmid naštěpený *EcoRI* i *NdeI*) po dobu 7 h, v obou případech při napětí 1,7 V·cm<sup>-1</sup>. Denaturační podmínky v gelu zabraňují zpětné renaturaci dvouřetězcové DNA – při vytvoření meziřetězcových můstků dvouřetězcová (ds) forma putuje po gelu pomaleji než jednořetězcová (ss) forma. Po skončení elektroforézy byl gel vysušen a vyhodnocen pomocí přístroje Fujifilm BAS-2500. Radioaktivita byla kvantitativně vyjádřena pomocí AIDA image analyzer software.

#### 4.5.2 Metoda Southernova přenosu pro detekci meziřetězcových můstků komplexů platiny na genomové DNA z nádorové linie A2780

Schopnost sloučenin platiny tvořit meziřetězcové můstky byla studována na genomové DNA (gDNA) vyizolované z kultivovaných lidských buněk ovariální nádorové linie A2780, které jsou citlivé k působení cisplatiny.

#### 4.5.2.1 Kultivace buněk a aplikace cytostatik ke studiu vzniku meziřetězcových můstků na genomové DNA

Buňky A2780 byly kultivovány v médiu RPMI 1640 (PAA) s přidavkem 50 mg/l gentamycinu (SERVA) a 10 % tepelně inaktivovaného bovinního fetálního séra (PAA) při teplotě 37°C a v atmosféře 5 % CO<sub>2</sub>. Buňky A2780 adherovaly na dno misky, ze kterého byly při pasážování (2 – 3 krát týdně) uvolňovány trypsinem. Celkový počet buněk byl pak stanoven ručním počítáním v kalibrované komůrce (Bürknerova komůrka) pod světelným mikroskopem.

Pro experiment byly buňky po pasáži přeneseny na Petriho misky o průměru 10 cm (3 · 10<sup>6</sup> buněk v 10 ml média/Petriho misku) a kultivovány po 42 h. Poté bylo s buňkami zacházeno následovně:

1) pro získání gDNA z buněk modifikovaných studovanými komplexy: kultivační médium bylo vyměněno za čerstvé a byly přidány komplexy (cisplatina nebo BBR3571) tak, aby jejich finální koncentrace v médiu činila 30, 60 a 120 μM. Cytostatika byla k buněčné kultuře přidávána z čerstvě připravených zásobních roztoků v solventu DMSO a následně pak rozředována médiem do požadovaných koncentrací. Po sedmihodinové inkubaci s komplexy byly buňky dvakrát promyty studeným PBS, ztrypsinizovány a zpeletovány centrifugací (1200 g, 10 min, 10 °C). Z buněčných peletů byla jednou ze tří dále uváděných metod izolována genomová DNA.

2) pro získání nemodifikované gDNA: bez jakékoliv předchozí modifikace platinovými komplexy byly buňky dvakrát promyty studeným PBS a uvolněny trypsinizací. Následovalo zpeletování buněk centrifugací (1200 g, 10 min, 10°C). gDNA izolovaná z těchto „netreatovaných“ buněk byla využita pro následnou modifikaci *in vitro* komplexy BBR3535, BBR3571 a cisplatinou.

#### 4.5.2.2 Metody izolace gDNA z buněk A2780

Byly porovnávány tři různé postupy izolace gDNA z buněk s cílem vybrat tu nejvhodnější z hlediska výtěžnosti, kvality a čistoty vyizolované gDNA.

Metoda 1: „Krok po kroku“ metoda dle protokolu [169].

Pelet připravený z narostlé buněčné kultury byl rozsuspendován v DNA lyzační pufru. Přidání 10% SDS způsobilo rozvolnění proteinů a narušení buněčné stěny. Dále byla přidána proteináza K (výsledná koncentrace 500 μg/ml) (2 h, 45°C), která proteiny štěpí. Nakonec byla

připipetována ribonukleáza A (finální koncentrace 100 µg/ml), která naštěpila ssRNA. Směs byla inkubována přes noc při 37°C.

Druhý den byl vzorek na chvíli zchlazen na ledu a poté byl k němu přidán jeden objem fenolu, který vysrážel proteiny. Po promíchání a centrifugaci (3000 g, 10 min, 10°C) se ve zkumavce vytvořily dvě vrstvy, přičemž se DNA nacházela v horní vodné fázi, která byla odebrána a smíchána s jedním objemem směsi fenol:chloroform (1:1). Ze zcentrifugovaného vzorku byla odebrána vrchní vrstva a k ní byl přidán jeden objem chloroformu. Po promíchání a centrifugaci byl horní supernatant opět odebrán a chloroform byl evaporován v exsikátoru po dobu 5 až 10 min.

Následovalo ethanolové přesrážení vyizolované DNA do menšího objemu (při množství 1 µl rozpouštědla na 1 µg DNA): Pro účinnější sražení byly vzorky po deproteinaci dány na chvíli na led. Dále byla přidána 1/10 objemu 3 M octanu sodného a po promíchání dva objemy 100% ethanolu vychlazeného na -20 °C. Po desetiminutovém pobytu v mrazáku při -80 °C byly vzorky zcentrifugovány (15000 g, 15 min, 4 °C), byl odebrán supernatant a přidáno 200 µl 80% vychlazeného ethanolu. Následoval proplach na třepačce a další centrifugace (15000 g, 15 min, 10 °C). Opět byl odebrán supernatant a sediment byl vysušen v exsikátoru (5 min). Pelet byl rozpuštěn ve vodě (na 1 µg předpokládaného výtěžku připadá 1 µl vody).

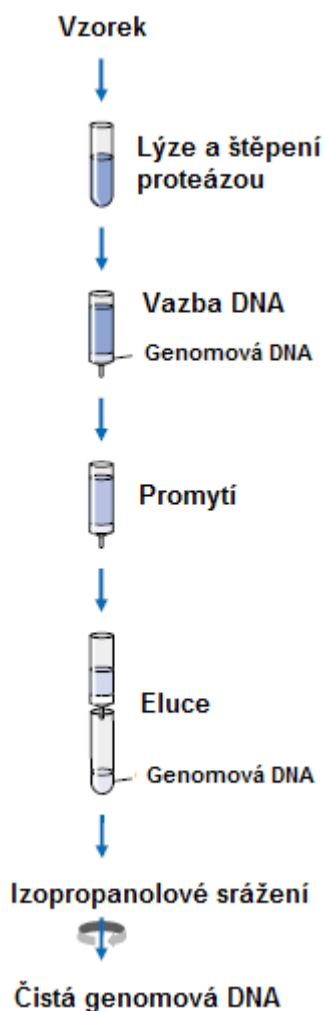
Metoda 2: Druhá metoda přípravy gDNA byla provedena pomocí Qiagen Blood and Cell Culture Kit s použitím dodaných pufrů a enzymů (Obr. 13).

Buňky byly nejprve zlyzovány: Ke 2 ml buněčné suspenze v PBS byl přidán jeden objem vychlazeného lyzačního pufru C1 a tři objemy ledové destilované vody. Vzorek ve zkumavce byl promíchán a inkubován na ledu po dobu 10 min. Zlyzované buňky byly centrifugovány (4 °C, 15 min, 1300 g). Po odstranění supernatantu byl k peletu přidán 1 ml ledového pufru C1 a 3 ml ledové vychlazené vody. Pelet jader byl resuspendován a centrifugován (4 °C, 15 min, 1300 g). Supernatant byl odstraněn. K peletu bylo napipetováno 5 ml štěpného pufru G2 a jádra byla resuspendována vortexováním po dobu 30 s při maximální rychlosti. Dále bylo přidáno 95 µl proteinázy K a vzorek byl inkubován při 50°C po dobu 90 min.

Kolonky Genomic-tip 100/G byly ekvilibrovány 4 ml pufru QBT, který byl nechán samovolně vytékat. Zvortexovaný vzorek byl aplikován na ekvilibrovanou kolonku a nechán protéct. Na kolonce zachycená gDNA byla promyta 2 x 7,5 ml pufru QC a eluována 5 ml pufru QF, předehřátého na 50 °C. gDNA byla přesrážena přidáním 0,7 objemu isopropanolu, zkumavka byla několikrát převrácena, DNA byla navinuta na skleněnou tyčinku a rozpuštěna ve 100 µl vody.

Vyizolovaná gDNA byla zkontrolována, zda během procesu nedošlo k fragmentaci molekul.

Nejprve byla gDNA denaturována v objemu cca 10  $\mu$ l přidáním 0,05 M NaOH a inkubací při 37 °C po dobu 20 min. Poté byl přidán nanášecí pufr, vzorky byly naneseny na 0,6% agarosový gel. Elektroforéza byla nastavena na 30 h při 25 V. Gel byl barven 30 min v ethidium bromidu.



Obr. 13: Schéma izolace gDNA pomocí Qiagen Blood and Cell Culture Kitu. Převzato a upraveno z [170].

Metoda 3: Poslední variantou byla izolace DNA kitem od firmy MRC – DNAzolem.

Pelet předem připravených buněk byl resuspendován v 1 ml DNAzolu (1 ml DNAzolu na  $10^7$  buněk) a centrifugován (10 °C, 10 min, 10000 g). Ze supernatantu přeneseného do čisté zkumavky byla DNA vysrážena přidáním 0,5 ml 100% ethanolu na 1 ml DNAzolu použitého při izolaci. Po ručním protřepání byl vzorek inkubován při pokojové teplotě po dobu 2 min.

DNA se vysrážela ve formě dlouhého vlákna, byla namotána na špičku a přenesena do 1 ml 75% ethanolu. Zkumavka s DNA a ethanolem byla 3 – 6 krát převrácena a po usazení DNA na dně zkumavky byl ethanol odstraněn. DNA byla rozpuštěna (bez sušení) ve vodě.

Kontrola vyizolované gDNA byla provedena elektroforeticky (50 V, 2 h) na nativním 0,8% agarózovém gelu s ethidium bromidem (o finální koncentraci 50  $\mu\text{g/ml}$ ).

Stanovení koncentrace vyizolované gDNA bylo provedeno spektrofotometricky změřením absorbance (A) vzorku při 260 nm a 280 nm. Hodnota absorbance 1 v 1 cm kyvetě odpovídá koncentraci 50 mg/ml pro dsDNA. Čistota vyizolované DNA byla stanovena poměrem absorbancí při dvou vlnových délkách  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ , přičemž optimální hodnoty jsou 1,8 - 2. Poměr nižší než 1,8 svědčí o kontaminaci proteiny a vyšší než 2 o přítomnosti RNA [161].

#### 4.5.2.3 Modifikace gDNA *in vitro* komplexy BBR3535, BBR3571 a cisplatinou

*In vitro* modifikace genomové DNA komplexy BBR3535, BBR3571 a cisplatinou probíhala v 0,01 M  $\text{NaClO}_4$  při teplotě 37 °C ve tmě po dobu 24 h, což je doba dostačující pro kvantitativní navázání studovaných komplexů na DNA [55]. Stupeň modifikace  $r_b$  se pohyboval v rozmezí  $3 \cdot 10^{-6} - 3 \cdot 10^{-3}$  pro dinukleární komplexy a  $3 \cdot 10^{-5} - 3 \cdot 10^{-3}$  pro cisplatinu.

Purifikace modifikovaných vzorků gDNA byla provedena s použitím kolonek Amicon Ultra Centrifugal Filters (MILLIPORE, Ultracel 100 K). Vzorek byl aplikován na kolonku a centrifugován (14000 g, 15 min). gDNA zachycená na kolonce byla následně propláchnuta 350  $\mu\text{l}$  vody a opět zcentrifugována (14000 g, 15 min). Kolonka byla poté otočena a vložena do čisté zkumavky. Po centrifugaci (1000 g, 2 min) byl purifikovaný vzorek jímán v objemu 18  $\mu\text{l}$ .

#### 4.5.2.4 Štěpení gDNA restrikčním enzymem *HindIII*

Pro další analýzu bylo potřeba genomovou DNA naštěpit na kratší fragmenty restrikčním enzymem, v našem případě enzymem *HindIII*. Vzorky DNA byly štěpeny 2 h v objemu 200  $\mu\text{l}$ , v přítomnosti pufru *Neb2* a při množství 5 U restrikčního enzymu na 1  $\mu\text{g}$  DNA. Po naštěpení byly vzorky přesráženy do 0,5x TE pufru.

#### 4.5.2.5 Elektroforetická separace gDNA fragmentů v agarózovém gelu

Pro následující kroky bylo potřeba provést denaturaci naštěpené dvouřetězcové gDNA. Jednořetězcová DNA je nutná k navázání radioaktivně naznačené próby. Denaturace vzorků byla provedena pomocí 0,05 M NaOH po dobu 20 min při 37 °C a poté byla zastavena umístěním vzorků na led. Před nanesením na 0,6% agarózový gel v TBE pufru byl ke vzorkům přidán nanášecí pufr. Následovala elektroforéza v TBE pufru při 25 V po dobu 30 h. Gel byl obarven v ethidium bromidu (30 min).

Na přípravu gelu pro Southern blot byla použita agaróza SeaKem®LE (od firmy Lonza) z důvodu vyšší odolnosti připraveného gelu vůči poškození při manipulaci.

#### 4.5.2.6 Přenos gDNA z gelu na membránu

Ke dvěma nejčastějším způsobům Southernova přenosu DNA z gelu na membránu se řadí kapilární a vakuový přenos.

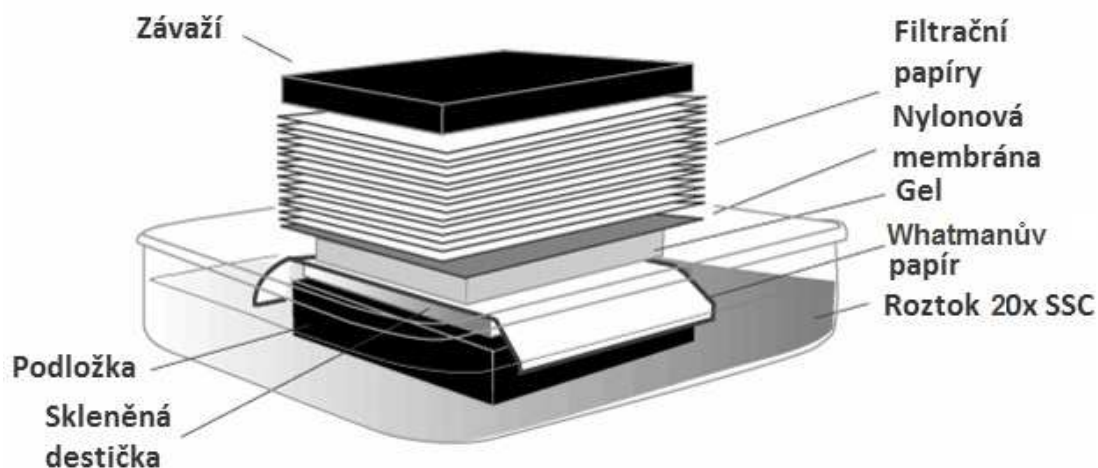
##### 1) Kapilární transfer

U kapilárního transferu je DNA přenášena z gelu na membránu kapilárními silami při postupu transferového pufru ze zásobníku přes gel a membránu do vrstvy filtračních papírů. Před experimentem bylo třeba gel ekvilibrovat (cca 45 min) v denaturačním pufru s následnou neutralizací v neutralizačním pufru (cca 30min). Pro kapilární přenos byla použita nylonová membrána (Amersham HYBOND-N+).

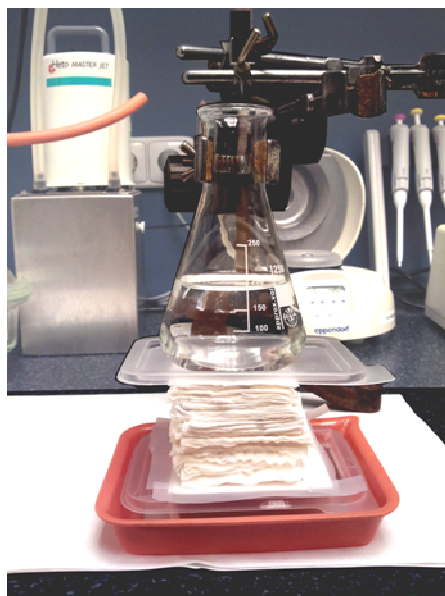
Podle obrázku 14 byla sestavena blotovací aparatura. Do vaničky s transferovým pufrům (20x SSC) byla položena podložka a na ni Whatmanův papír tak, aby dvě jeho protilehlé strany byly ponořeny do transferového pufru a vytvářely tzv. knot. Na Whatmanův papír byl umístěn gel (spodní stranou nahoru), na něj nylonová membrána (o velikosti gelu) a nakonec filtrační papíry. Celá aparatura byla zatížena závažím.

Samotný transfer probíhal v 20x SSC přes noc. Poté byla membrána opláchnuta v 2x SSC a zapečena (80 °C, 2 h) pro zakotvení DNA. Gel byl obarven v ethidium bromidu (30 min) pro kontrolu přenosu DNA z gelu na membránu.





Obr. 14: Schematické znázornění sestavení kapilární transferu. Převzato a upraveno z [171].



Obr. 15: Uspořádání aparatury pro kapilární přenos.

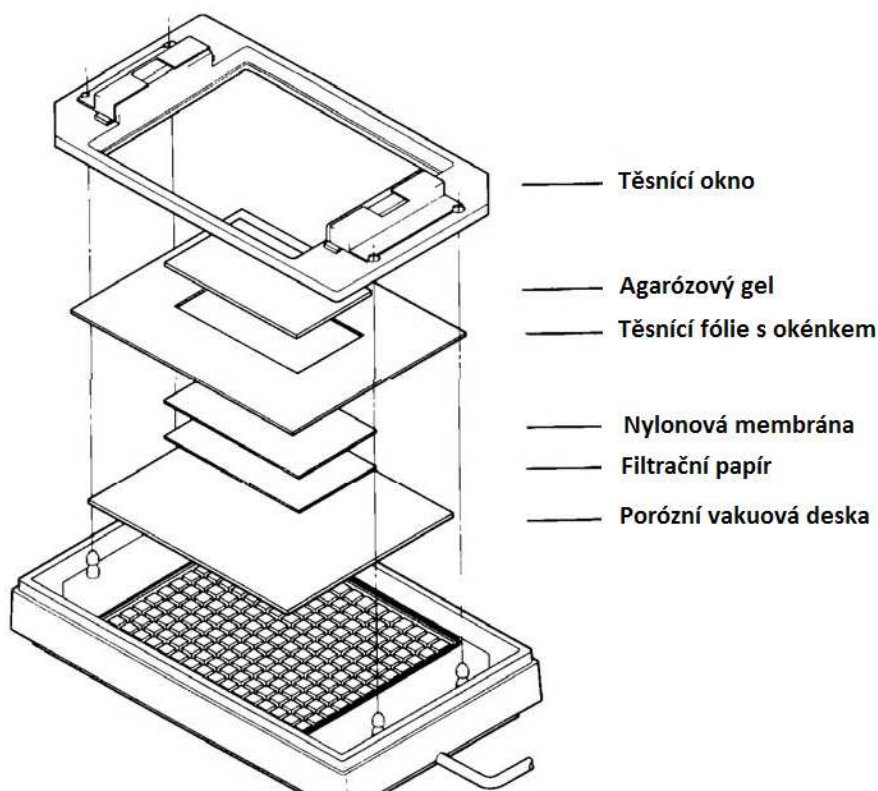
## 2) Vakuový transfer

Před samotným přenosem bylo potřeba vhodně připravit membránu i gel. Nylonová membrána HYBOND XL (ve stejné velikosti jako gel) byla namočena v destilované vodě a poté v transferovém pufru. Gel byl pro usnadnění přenosu DNA depurinován v 0,25 M HCl po dobu 15 min a poté promyt vodou.

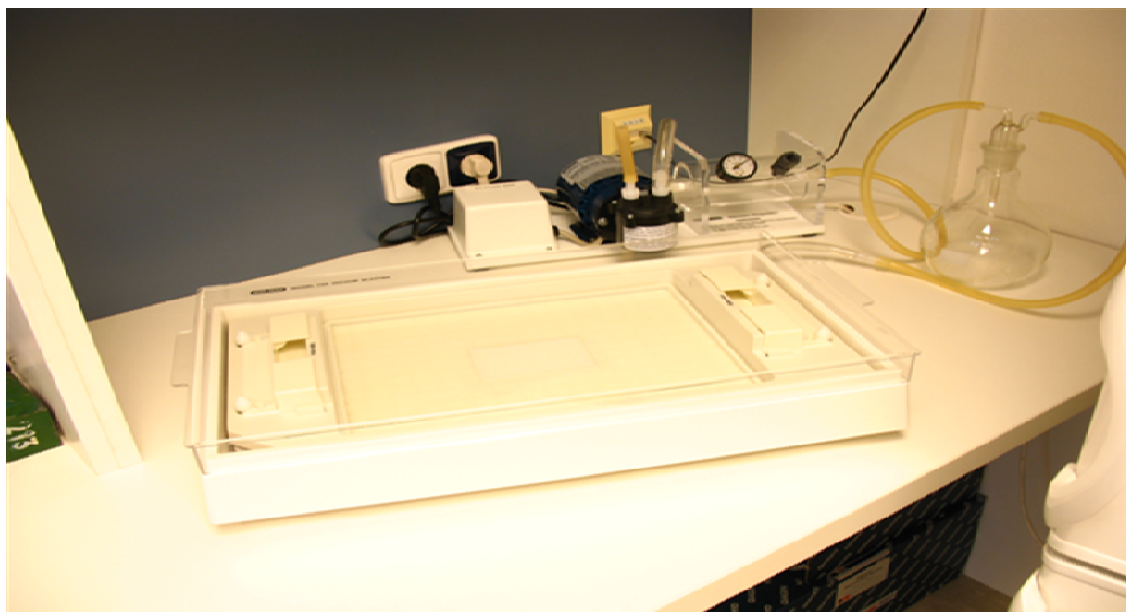
Podle obrázku 16 byla sestavena aparatura. Na porózní plát se postupně kladl filtrační papír (Whatmanův, velikost gelu), nylonová membrána (velikost gelu), těsnící fólie s okénkem (okénko musí být na každé straně o 0,5 cm kratší než gel), agarózový gel a těsnící rám. Bubliny vzniklé pod Whatmanovým papírem, membránou či gelem byly odstraněny skleněnou pipetou.

Po spuštění vakuové pumpy byl gel zalit transferovým puřrem a přenos probíhal 90 min.

Po přenosu byl gel zneutralizován v 1x TBE a obarven v ethidium bromidu pro kontrolu, že vzorky byly přeneseny na membránu. Membrána byla namočena do 2x SSC (5 min), vysušena mezi filtračními papíry a zapečena (80°C, 2 h).



Obr. 16: Schematické uspořádnání přístroje BIO-RAD pro vakuový přenos. Převzato a upraveno z [172].



Obr. 17: Přístroj pro vakuový přenos.

#### 4.5.2.7 Příprava DNA próby

Podle prací [166, 167] byl pro hybridizaci použit 1,8 kb dlouhý fragment obsahující exon 1 a 2 genu DHFR (gen pro dihydrofolát reduktázu) v lidském genomu. Próba detekovala sekvenci z 22 kb dlouhého fragmentu genu DHFR.

#### Syntéza próby

K syntéze próby o požadované velikosti a sekvenci byl použit přístroj na PCR *C1000 Thermal Cycler* od firmy BIO-RAD. Metoda PCR slouží k rychlému namnožení vybraného úseku templátové DNA, přičemž požadovaný úsek musí být na obou stranách ohraničen primery. K syntéze nového DNA řetězce se používá termostabilní Taq polymeráza (DNA polymeráza z bakterie *Thermus aquaticus*).

Nejprve byla připravena reakční směs o celkovém objemu 50  $\mu$ l, která obsahovala 27,5  $\mu$ l MiliQ vody, 10  $\mu$ l 5x HotStar HiFipufu (dNTP a 7,5 mM MgSO<sub>4</sub>), po 5  $\mu$ l 10  $\mu$ M roztoku od každého primeru („forward“ o sekvenci 5'-AAACGTAGCTCGTCCTCAAA, „reverse“ o sekvenci 5'-TTCCAGTCTACGGGAAGCC), 0,5  $\mu$ l ( $\equiv$  100 ng) templátové DNA a 2  $\mu$ l ( $\equiv$  5 U) HotStar HiFiDNA polymerázy (Taq polymeráza) [166]. Reakční směs byla poté vložena do termocyklu a proces amplifikace byl proveden ve 35 cyklech podle programu:

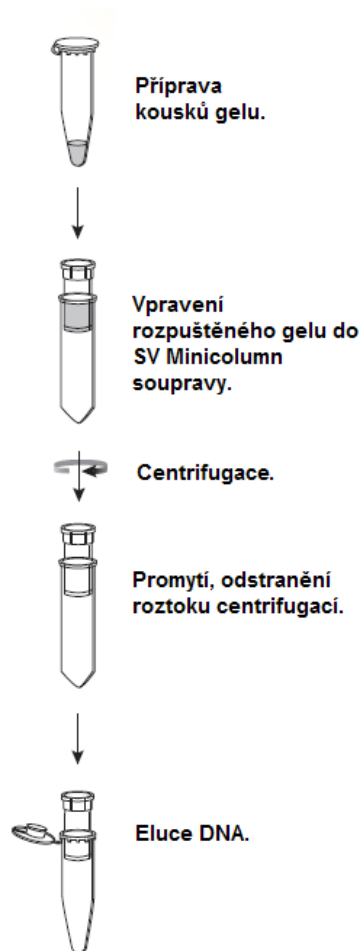
1. aktivace polymerázy – 95 °C, 5 min

2. denaturace – 95 °C, 15 min
3. připojení primerů – 53 °C, 1 min
4. polymerace – 68 °C, 4 min
5. závěrečná polymerace – 72 °C, 5 min

PCR produkt byl kontrolován na nativním agarózovém gelu (při 25 V, přes noc) následně obarveném v ethidium bromidu.

#### Purifikace próby

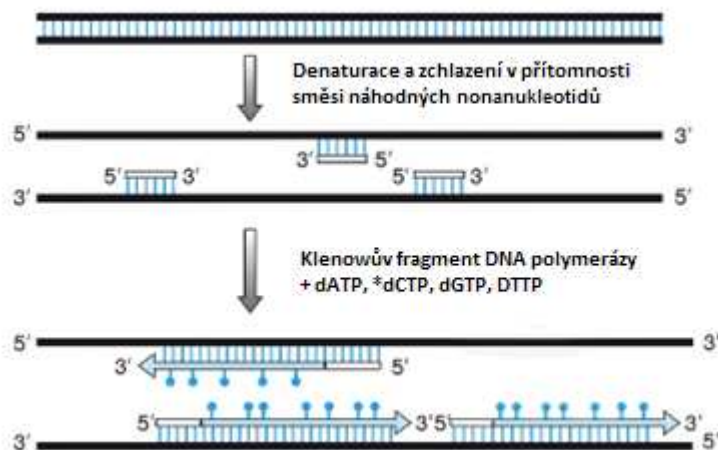
PCR fragment (pro použití jako próba) byl z gelu vyříznut a přečištěn pomocí izolačního kitu Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up Systém (PROMEGA) (Obr. 18). Ke kouskům gelu byl přidán roztok pro vazbu DNA na membránu (1 ml roztoku na 1 mg gelu) a gel byl skleněnou tyčinkou v roztoku rozdrcen. Vzniklá suspenze byla vortexována (1 min), inkubována (65 °C, 20 min) a přepipetována do kolonky nasazené na dvoumilitrovou zkumavku. DNA se přichytila na kladně nabitou membránu v kolonce. Následovala inkubace při pokojové teplotě (1 min) a centrifugace (14500 g, 1 min). DNA zachycená na membráně byla promyta 700 µl promývacího roztoku. Opět následovala inkubace při pokojové teplotě (1 min) a centrifugace (14500 g, 1 min). Bylo přidáno 500 µl promývacího roztoku a směs byla inkubována při pokojové teplotě (1 min) a centrifugována (14500 g, 5 min). Protečený roztok byl odstraněn a kolonka znovu centrifugována (14500 g, 1 min) v neuzavřené zkumavce, aby se odpařil ethanol přítomný v promývacím roztoku, který by zabraňoval úplnému rozpuštění DNA. Kolonka byla poté přemístěna do čisté zkumavky a DNA z membrány eluována přidáním 50 µl H<sub>2</sub>O. Po krátké inkubaci (1 min) následovala již závěrečná centrifugace (14500 g, 1 min). Vzorek DNA byl eluován do zkumavky a uchováván při -20 °C.



Obr. 18: Stručný postup přečištění nasyntetizované próby izolačním kitem Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System. Převzato a upraveno z [173].

#### Radioaktivní značení próby

Próba byla naznačena radioaktivně (izotopem <sup>32</sup>P) pomocí značícího kitu Prime-It II Random Primer Labeling Kit od firmy STRATAGENE (Obr. 19), umožňující přípravu próby s vysokou specifickou aktivitou.



Obr. 19: Schématické znázornění radioaktivního značení próby. Převzato a upraveno z [174].

K 25 ng (5,5  $\mu$ l) nasyntetizované próby (1,8 kb) bylo přidáno 18,5  $\mu$ l vody (RNAsa free H<sub>2</sub>O) a 10  $\mu$ l primerů (random primers). Směs byla inkubována 5 min při 100°C, zcentrifugována a zchlazena při pokojové teplotě. Dále bylo přidáno 10  $\mu$ l 5x \*dCTP primer buffer (obsahujícího dATP, dTTP, dGTP), 5  $\mu$ l značeného nukleotidu ( $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTP, 3000 Ci/mmol) a 1  $\mu$ l Exo(-) Klenowova fragmentu (5 U/1  $\mu$ l). Následovala inkubace při 37 °C po dobu 10 min. Reakce byla ukončena přidáním 2  $\mu$ l stop mixu. Nakonec byla naznačená próba přečištěna od nezreagovaného \*dCTP pomocí Sephadexové kolonky (G50 Coarse).

#### 4.5.2.8 Hybridizace na membráně

Membrána byla na dvě minuty namočena do 6x SSC. K potlačení nespecifické vazby próby na DNA byla poté inkubována v prehybridizačním roztoku (APH; 0,2 ml roztoku na 1 cm<sup>2</sup> membrány) v sáčku při 68°C po dobu 2 h. Po výměně prehybridizačního roztoku za hybridizační (0,2 ml roztoku na 1 cm<sup>2</sup> membrány) byla do sáčku přidána denaturovaná (100°C, 5 min) radioaktivně značená próba (1,2 ng/ml hybridizačního roztoku). Hybridizace probíhala přes noc (cca 20 h) při 68°C.

Po hybridizaci byla membrána propláchnuta postupně ve čtyřech odmývacích roztocích [161]:

2x SSC + 0,5% SDS (pokojová teplota, 5 min, občasné míchání)

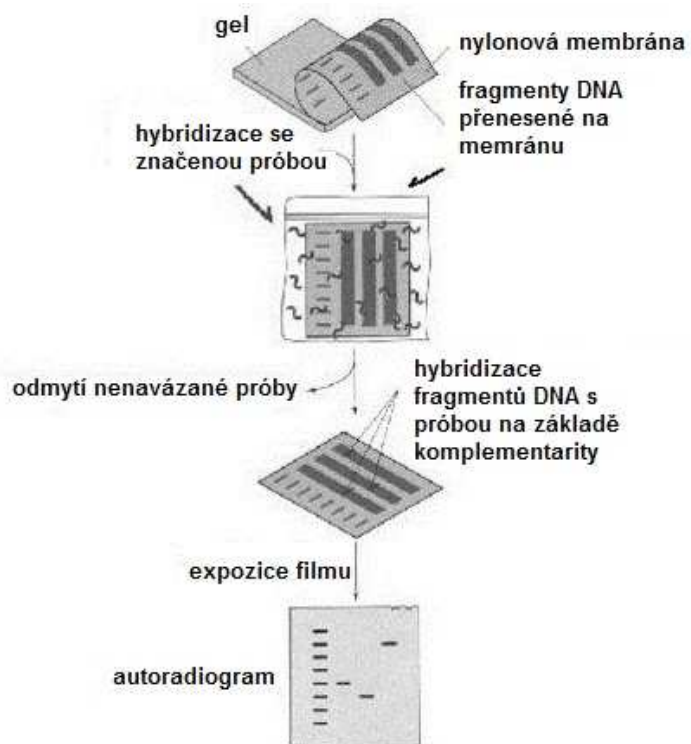
2x SSC + 0,1% SDS (pokojová teplota, 15 min, občasné míchání)

0,1x SSC + 0,5% SDS (37°C, 1 hod, občasné míchání)

0,1x SSC + 0,5% SDS (68°C, 1 hod, 30 min<sup>-1</sup>)

Následovalo propláchnutí membrány v 0,1x SSC při pokojové teplotě a autoradiografie.

Celková procedura je stručně znázorněna na obrázku 20.



Obr. 20: Schematické znázornění hybridizace radioaktivní próby k DNA na nylonové membráně. Převzato a upraveno z [175].

## 5. VÝSLEDKY

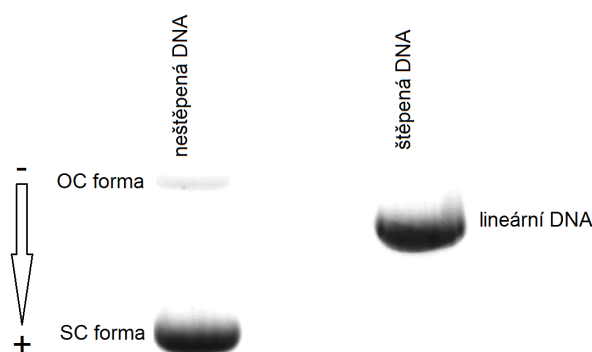
Schopnost sloučenin platiny tvořit meziřetězcové můstky byla studována jednak na plazmidové DNA (pUC19), *in vitro* metodou využívající elektroforetickou separaci za denaturačních podmínek, a také na genomové DNA (gDNA) vyizolované z lidských ovariálních nádorových linií A2780, metodou Southernova přenosu na nylonovou membránu s následnou hybridizací próby specifické ke genu DHFR (gen pro dihydrofolát reduktázu).

### 5.1 Studium vzniku meziřetězcových můstků na plazmidové DNA (pUC19) po modifikaci komplexu platiny *in vitro* pomocí alkalické denaturační elektroforézy

Cílem tohoto experimentu bylo sledovat výskyt meziřetězcových můstků komplexů platiny na lineární DNA pUC19 pomocí alkalické elektroforézy a získané poznatky posléze použít pro studium vznikajících aduktů těchto komplexů na genomové DNA v buněčném prostředí.

Experiment je založen na studiu zlinearizovaného radioaktivně značeného plazmidu pUC19, modifikovaného studovanými komplexy, pomocí agarózové elektroforézy za denaturujících podmínek.

Plazmidová DNA byla naštěpena nejprve restrikčním enzymem *EcoRI* za vzniku fragmentu o velikosti 2686 bp. Linearizace DNA byla zkontrolována elektroforeticky na agarózovém gelu s ethidium bromidem (Obr. 21).



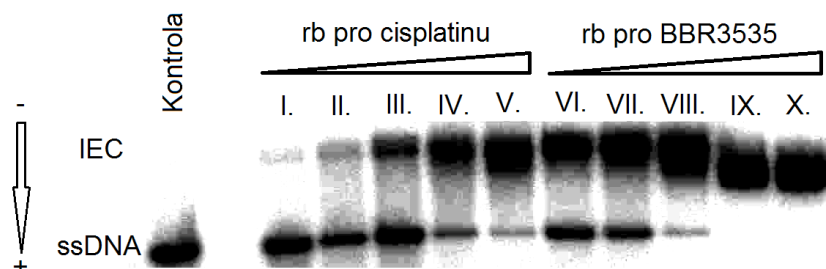
Obr. 21: Linearizace plazmidu na 1% agarózovém minigelu enzymem *EcoRI*.

Vzorky lineární DNA byly deproteinovány a přesráženy. Po radioaktivním naznačení zlinearizovaného plazmidu (o délce 2686 páru bazí) a jeho modifikaci studovanými komplexy BBR3535, BBR3571 a cisplatinou (zvoleny různé stupně modifikace,  $r_b$ ) byly vzorky naneseny

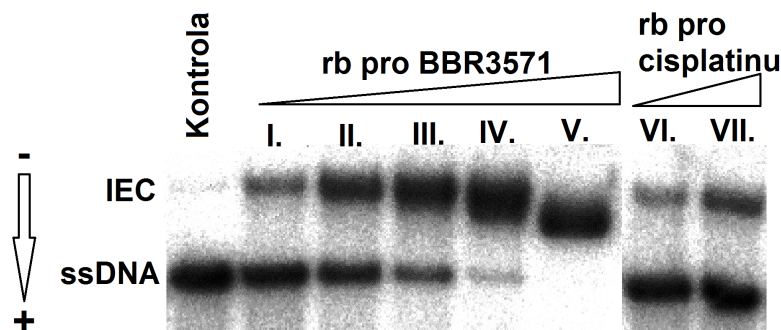


na 1% denaturační agarózový gel.

V důsledku modifikace vzniknou na dvouvláknové DNA meziřetězcové můstky (IEC), které způsobí kovalentní spojení mezi dvěma řetězci DNA. Takto spojené řetězce, na rozdíl od molekul dvouvláknové DNA bez tohoto typu aduktu, nemohou být za denaturačních podmínek odděleny. Na denaturačním gelu byla poté pozorována separovaná “zkroslikovaná” frakce, tzn. frakce DNA, jejíž řetězce byly spojeny vzniklým meziřetězcovým můstkem komplexu, a frakce jednořetězcových DNA. DNA, jejíž řetězce spojuje meziřetězcový adukt, putuje v gelu pomaleji než je tomu pro DNA bez meziřetězcových můstků (Obr. 22, Obr. 23).



Obr. 22: Vznik meziřetězcových můstků v závislosti na stupni modifikace lineární pUC19 o velikosti 2686 bp.  $r_b$  pro cisplatinu: 0,0003 (I.); 0,0005 (II.); 0,001 (III.); 0,003 (IV.); 0,005 (V.).  $r_b$  pro BBR3535: 0,0003 (VI.); 0,0005 (VII.); 0,001 (VIII.); 0,003 (IX.); 0,005 (X.). (Šipka označuje směr elektroforetického pohybu makromolekul.)



Obr. 23: Vznik meziřetězcových můstků v závislosti na stupni modifikace lineární pUC19 o velikosti 2686 bp.  $r_b$  pro BBR3571: 0,0001 (I.); 0,0003 (II.); 0,0005 (III.); 0,001 (IV.); 0,003 (V.).  $r_b$  pro cisplatinu: 0,0005 (VI.); 0,001 (VII.).

Po denzitometrickém vyhodnocení intenzity jednotlivých proužků v gelu bylo možné vypočítat množství meziřetězcových můstků připadajících na jeden adukt (IEC/Pt) podle vzorce:

$$IEC / Pt = \frac{XL}{N \cdot r_b} \cdot 100[\%], \quad \text{Rovnice 1}$$

kde  $XL$  je množství meziřetězcových vazeb na molekulu linearizované dvouřetězcové DNA, které bylo vypočítáno podle Poissonova rozdělení meziřetězcových vazeb jako  $XL = -\ln A$ , kde  $A$  je podíl molekul odpovídající jednořetězcové (denaturované) DNA, zjištěný denzitometrickým vyhodnocením gelu.  $N$  je počet bází plazmidu pUC19 (v našem případě  $2 \cdot 2686$ ).

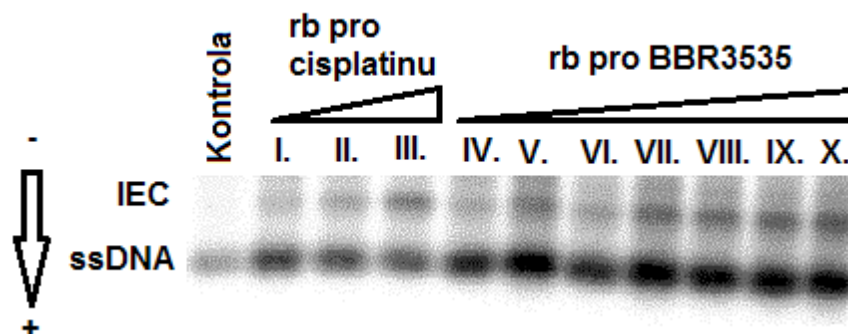
Vypočítané hodnoty jsou shrnuty v tabulce 1.

Tab. 1: Tvorba meziřetězcových můstků *in vitro* komplexů BBR3535, BBR3571 a cisplatiny na fragmentu (2686 bp) plazmidu pUC19. IEC/Pt - množství meziřetězcových můstků tvořených daným komplexem připadající na adukt, vyjádřeno v procentech. ND – nestanoveno.

	Cisplatina	BBR3535	BBR3571
IEC/Pt [%]	$6,2 \pm 0,8$	ND	$38,2 \pm 7,9$

Zkroslinkovaná frakce dinukleárního komplexu BBR3535 byla i při nízkém stupni modifikace pro takto dlouhou lineární DNA vyšší než 50% a nedal se pro ni tudíž použít výše uvedený vztah s Poissonovým rozdělením. Aby bylo možné množství meziřetězcových můstků vypočítat s využitím výše zmíněného vztahu, muselo by se velmi snížit  $r_b$ , což by mělo za následek i velmi nízké koncentrace komplexu BBR3535. Proto byl zvolen přístup jiný. Byly ponechány hodnoty  $r_b$  jako v předchozím experimentu, pouze byl použit podstatně kratší fragment DNA (212 bp).

Lineární plazmid pUC19 o délce 2868 bp byl štěpen restriční enzymem *NdeI*, za vzniku kratšího fragmentu o délce 212 bp (viz. restriční místa plazmidu pUC19, Obr. 12). Podobně jako v předchozím experimentu následovalo radioaktivní naznačení a modifikace komplexu. Výsledný autoradiogram je znázorněn na obrázku 24.



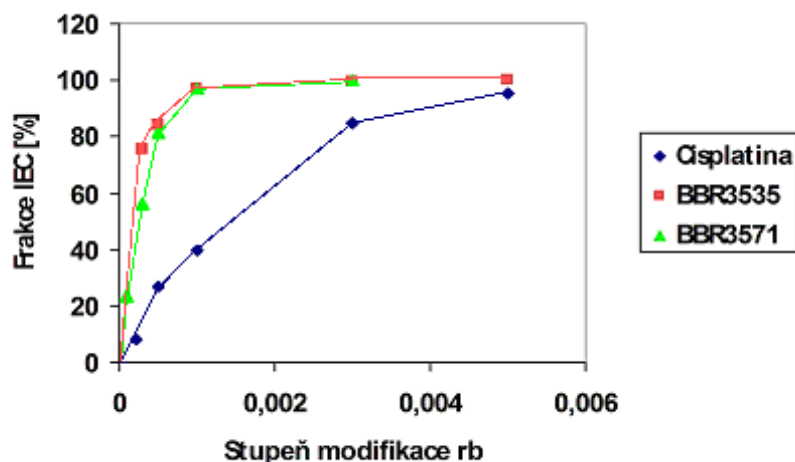
Obr. 24: Vznik meziřetězcových můstků v závislosti na stupni modifikace fragmentu o velikosti 212.  $r_b$  pro cisplatinu: 0,003 (I.); 0,005 (II.); 0,01 (III.).  $r_b$  pro BBR3535: 0,0003 (IV.); 0,0004 (V.); 0,0005 (VI.); 0,0006 (VII.); 0,0007 (VIII.); 0,0008 (IX.); 0,001 (X.).

Procentuální zastoupení meziřetězcových můstků bylo jako v předchozím případě vypočítáno podle rovnice 1. Výsledné hodnoty jsou shrnuty v tabulce 2.

Tab. 2: Tvorba meziřetězcových můstků *in vitro* komplexu BBR3535 na kratším fragmentu (212 bp) plazmidu pUC19. IEC/Pt - množství meziřetězcových můstků tvořených komplexem BBR3535 připadající na adukt, vyjádřeno v procentech.

	BBR3535
IEC/Pt [%]	55,3 ± 5,8

Každý experiment byl opakován nejméně třikrát a získané hodnoty byly zprůměrovány. Z autoradiografů (Obr. 22, Obr. 23) byly denzitometricky stanoveny intenzity proužků odpovídajících IEC frakci pro jednotlivé komplexy. Byla vynesena závislost této IEC frakce (v %) na stupni modifikace ( $r_b$ ) plazmidové DNA jednotlivými komplexy (Obr. 25).



Obr. 25: Závislost frakce IEC [%] na stupni modifikace ( $r_b$ ) DNA.

## 5.2 Studium meziřetězcových můstků na genomové DNA z nádorových linií A2780 – zavedení metody Southernovy hybridizace

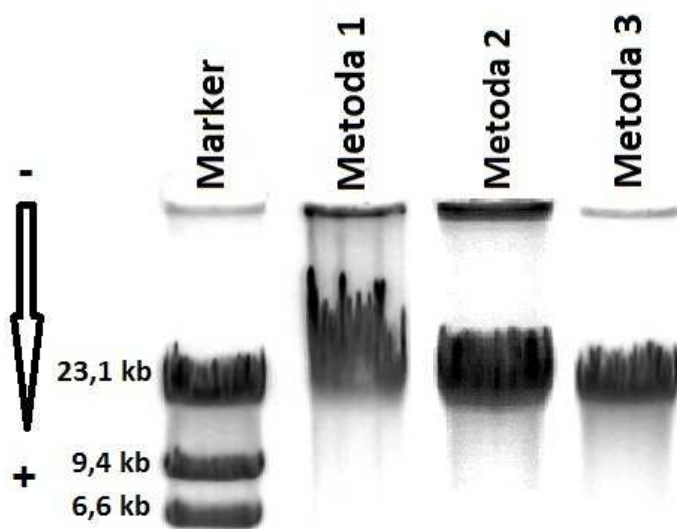
Ke studiu vzniku meziřetězcových můstků tvořených komplexy platiny na genomové DNA byla vybrána metoda Southernova přenosu s následnou hybridizací značené próby ke genu DHFR. Tato metoda nebyla na oddělení, kde jsem diplomovou prací vypracovávala, doposud používána. Proto jedním z mých prvotních cílů diplomové práce bylo metodu Southernova blotu zavést a optimalizovat podmínky právě pro studium meziřetězcových můstků. Již v metodické části této práce jsou popsány jednotlivé kroky, které metoda zahrnuje: příprava genomové DNA, její přenos na membránu a následná detekce vzniklých můstků. Každý z těchto kroků vyžadoval časově náročnou optimalizaci podmínek.

### 5.2.1 Srovnání použitých metod izolace gDNA

V dnešní době existuje již velký počet postupů a technik umožňující izolaci DNA z buněčných kultur. Společným rysem těchto technik je porušení buněčné membrány, lýze buněk, zbavení se buněčných proteinů, deproteinace, odstranění RNA a zbylého buněčného odpadu. Cílem je získat co nejčistší DNA, bez nežádoucí kontaminace. Dalším důležitým faktorem těchto technik je výtěžnost DNA. Protože je většinou vyizolovaná DNA dále

analyzována, je vhodné získat její dostatečné množství. Oba vyjmenované faktory jsou velmi důležité právě pro metodu Southernova přenosu, proto bylo v našem zájmu vyzkoušet více metod izolace DNA a následně vybrat pro naše účely tu nejvhodnější.

Byla porovnávána tzv. „krok po kroku“ metoda (Metoda 1) se dvěma metodami využívajícími komerčně dostupné kity (Metoda 2 – QIAGEN izolační kit na kolonkách, Metoda 3 – DNAzol) (viz kapitola 4.5.2.2). Na obrázku 26 jsou ukázány vzorky gDNA připravené jednotlivými metodami. Jejich nanesení na agarózový gel bylo kontrolou, zda nedošlo při izolaci k jejich mechanické či chemické degradaci na kratší fragmenty. Z obrázku 26 je patrné, že se tak nestalo a všechny tři metody poskytly nepoškozenou vysokomolární gDNA.



Obr. 26: Srovnání tří různých izolačních metod gDNA – 0,8% agarózový gel s ethidium bromidem. Metoda 1 – „Krok po kroku“, Metoda 2 – kit QIAGEN, Metoda 3 – DNAzol.

Jak je zmíněno výše, důležitým parametrem je čistota gDNA. Tzn. zda použité izolační techniky umožnily dostatečné odstranění nežádoucích kontaminantů, jako jsou proteiny či RNA. Změřením UV/VIS spekter DNA (rozpuštěné ve vodě) byly odečteny hodnoty absorpance (A) při 260 a 280 nm a vypočítány poměry  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  (Tab. 3).

Tab. 3: Porovnání čistoty gDNA získané ze tří různých metod.

	Metoda 1- „Krok po kroku“	Metoda 2 – kit QIAGEN	Metoda 3 - DNAzol
$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$	1,61	1,81	1,64

Optimální rozhraní poměru absorpance je 1,8 – 2. Hodnota nižší než 1,8 svědčí

pro kontaminaci proteiny a vyšší než 2 poukazuje na přítomnost RNA. Z tabulky je tedy patrné, že nejvýhodnější pro další experimenty je Metoda 2 využívající kit QIAGEN.

Z naměřených UV/VIS absorpčních spekter byla stanovena koncentrace vyizolované gDNA a po přepočtu na ředění mohlo být stanoveno celkové množství vyizolované gDNA. Tímto se dostáváme ke druhému důležitému faktoru izolačních technik DNA - výtěžnosti. Jde o hodnotu dosti proměnnou, a to i v rámci jedné izolační techniky. Například pro izolaci gDNA z kontrolních, komplexem neovlivněných buněk, byla průměrná výtěžnost (z  $3 \cdot 10^6$  nasazených buněk): Metodou 1: 70  $\mu\text{g}$  gDNA, Metodou 2: 60  $\mu\text{g}$  gDNA a Metodou 3: 100  $\mu\text{g}$  gDNA. Pro buňky modifikované jednotlivými komplexy platiny ale tato výtěžnost klesá a to se stoupajícím stupněm modifikace buněk.

Posledním parametrem při výběru izolační techniky byla časová náročnost a obtížnost provedení. V tomto bodě se nejvíce projevuje výhoda používání komerčních kitů.

Tab. 4: Porovnání výsledků izolace gDNA pomocí tří různých metod.

	Metoda 1 – „Krok po kroku“	Metoda 2 – kit QIAGEN	Metoda 3 - DNAzol
Přibližná délka experimentu	2 dny	3 – 4 hod	30 – 40 min
Průměrný výtěžek gDNA z kontrolních buněk ( $\mu\text{g}$ DNA / $3 \cdot 10^6$ buněk)	70	60	100
Kvalita a čistota výtěžku	+++	++++	++

Porovnání výsledků přípravy gDNA jednotlivými metodami je v tabulce 4. Pro další experimenty byla vybrána Metoda 2.

### 5.2.2 Štěpení gDNA restričním enzymem *HindIII* a elektroforetická separace jejích fragmentů v agarózovém gelu

Dalším z důležitých kroků přípravy gDNA pro Southernovu hybridizaci bylo její naštěpení

na kratší fragmenty. V našem případě byl použit restriční enzym *HindIII*. Po štěpení gDNA enzymem *HindIII* byla získána směs různě dlouhých fragmentů DNA, včetně 22 kb dlouhého fragmentu obsahujícího sekvenci DHFR genu, který byl posléze detekován.

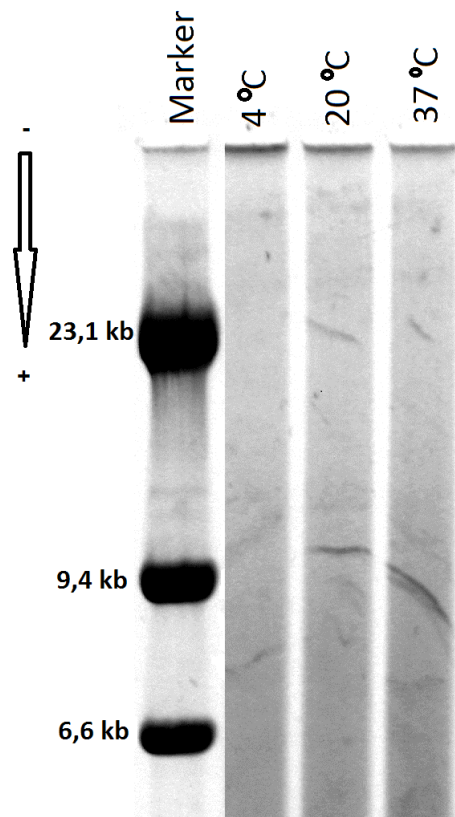
#### Optimalizace podmínek štěpení gDNA restričním enzymem *HindIII*

Nejprve bylo potřeba zjistit, jaký čas je dostačující pro naštěpení veškeré gDNA a kolik jednotek enzymu (U) na 1 µg gDNA je potřeba do směsi dát, protože udávané podmínky štěpení byly odlišné v různých publikacích [163, 165, 166]. Bylo namícháno šest štěpných směsí, které obsahovaly gDNA, *Neb2* pufr, restriční enzym *HindIII* a vodu. Dvě z nich byly štěpeny 2 h, dvě 6 h a poslední dvě 16 h při 37 °C. Každá z páru obsahovala různý počet jednotek enzymu (2 U a 5 U na 1µg DNA).

Z tohoto experimentu bylo zjištěno, že zvolené kratší časy (2 h a 6 h) jsou pro naštěpení gDNA zcela dostačující.

Výsledek štěpení gDNA restričním enzymem nebyl výrazně ovlivněn množstvím jednotek enzymu vstupujících do reakce. Jediným úskalím je tu viskozita roztoku gDNA. Je třeba si dát pozor, aby po přidání štěpícího enzymu a příslušného pufru byl roztok důsledně promíchán.

Vzniklé DNA fragmenty bylo potřeba před nanesením na 0,6% agarózový gel zdenaturovat, přidáním NaOH (0,05 M) a současným zahřátím vzorků. Bylo zjišťováno, zda teplota ovlivňuje denaturaci vzorků. Vzorky byly denaturovány při 4 °C, 20 °C a 37 °C. Experiment ukázal (Obr. 27), že nemodifikovaná gDNA byla denaturována i při nižší teplotě a že vyšší teplota neovlivňuje kvalitu gDNA. Na základě toho byla pro denaturaci modifikované DNA zvolena teplota 37°C.



Obr. 27: Alkalická denaturace gDNA štěpené *HindIII* při různých teplotách – elektroforetická separace na agarózovém gelu.

### 5.2.3 Srovnání kapilárního a vakuového přenosu gDNA na nylonovou membránu

Metoda kapilárního přenosu DNA z gelu na membránu je původní postup dosud často používaný, především proto, že nevyžaduje žádná speciální drahá zařízení. Součásti potřebné pro sestavení aparatury ke kapilárnímu transferu lze nalézt mezi běžně používaným laboratorním vybavením.

Jedna taková aparatura byla postavená i námi (Obr. 14, Obr. 15) a vyzkoušena pro přenos připravené naštěpené gDNA z agarózového gelu na nylonovou membránu. Účinnost, s jakou přenos fragmentů DNA proběhl, byla ověřena jednoduše obarvením gelu po přenosu, tzv. oblotovaného gelu. Jak je vidět na obrázku 28, přenos kapilárními silami je účinný jen pro malé fragmenty DNA (cca do 10 kb). Delší fragmenty už zůstávají zachyceny v gelu.

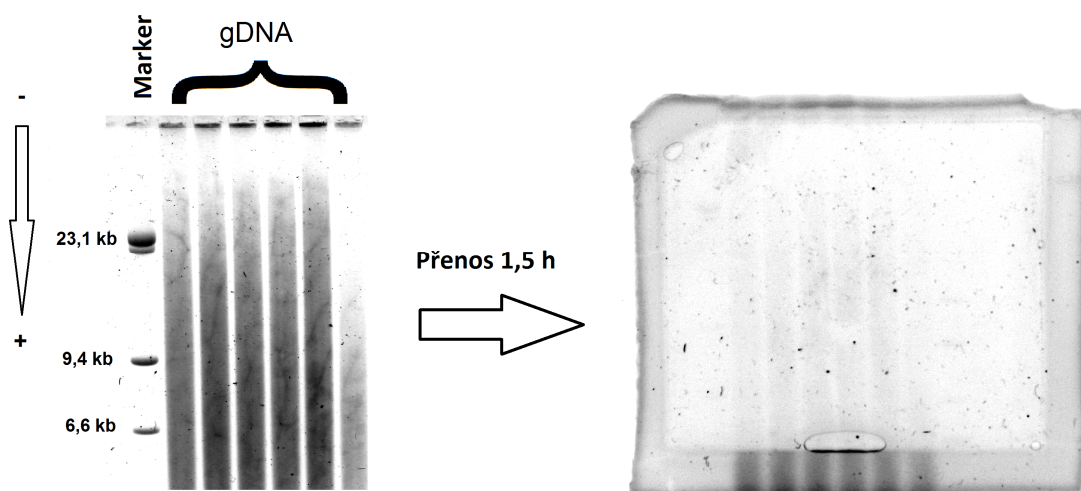




Obr. 28: Agarózový gel před a po kapilárním přenosu gDNA na nylonovou membránu.

Pro naše účely, kdy bylo potřeba detekovat fragment o délce 22 kb, se jeví kapilární transfer jako nevyhovující, a proto byla vyzkoušena další možná technika přenosu DNA na membránu, a to pomocí vakua.

Vakuový přenos již vyžaduje náročnější aparaturu, včetně vakuové pumpy a regulátoru vakua. Výsledkem, kterého bylo díky tomuto přístroji docíleno, byl efektivní přenos všech fragmentů DNA z gelu na membránu. Pro nás důležité fragmenty o délce větší než cca 20 kb byly také kvantitativně transferovány, jak je ukázáno na obrázku 29. Metoda se tedy ukázala jako vhodná pro naše účely studia.



Obr. 29: 0,8% agarózový gel před a po vakuovém přenosu gDNA na nylonovou membránu.

Srovnání výsledků pro jednotlivé parametry pro kapilární a vakuový přenos je shrnuto v tabulce 5.

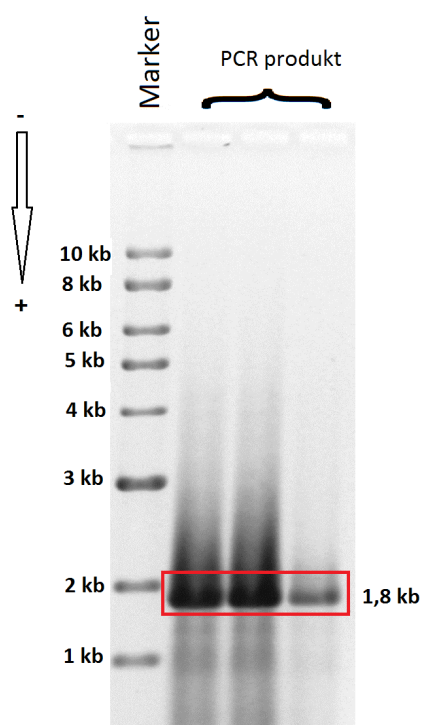
Tab. 5: Porovnání kapilárního a vakuového přenosu gDNA na nylonovou membránu.

		Kapilární přenos	Vakuový přenos
Účinnost přenosu DNA fragmentů	< 5kb	+++	+++
	5 kb – 10 kb	+	++
	> 10 kb	+/-	++
Přibližná délka přenosu		24 h	1,5 – 2 h

#### 5.2.4 Příprava hybridizační próby

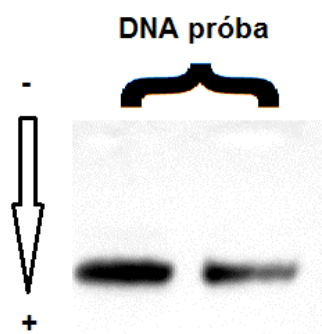
Pro úspěšné zavedení metody ke studiu meziřetězcových můstků na gDNA bylo třeba také získat vhodnou próbu, komplementární k vybranému genu DHFR. Podle dřívějších prací [165, 166] byl použit 1,8 kb dlouhý fragment exonu 1 a 2 genu DHFR lidské genomové DNA. Citovaní autoři získali tuto próbu vyštěpením z rekombinantního plazmidu pBH31R.8, který byl amplifikován v transfektovaných buňkách *E.Coli*. My jsme tento plazmid k dispozici neměli, proto jsme se rozhodli pro nasyntetizování a amplifikaci próby metodou PCR postupem uvedeným v kapitole 4.5.2.7.

Po proběhnutí cyklů byl produkt PCR reakce nanesen na gel a zkontrolován co do velikosti (bp) a specificity (Obr. 30).



Obr. 30: Elektroforéza v 0,8% agarózovém gelu s PCR produkty (v červeném rámečku).

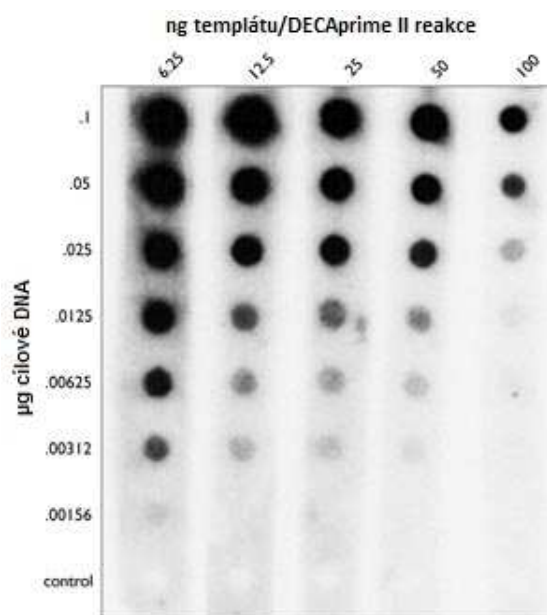
Protože naamplifikovaný 1,8 kb dlouhý fragment byl vyráběn za účelem hybridizační próby, bylo třeba jej očistit od nezreagovaných komponent přítomných v reakční směsi. 1,8 kb fragment byl z gelu vyříznut a přečištěn postupem popsaným v kapitole 4.5.2.7 – purifikace próby (Obr. 31).



Obr. 31: Kontrola nasyntetizované a přečištěné DNA próby na 0,8% agarózovém gelu.

Hybridizační próba byla radioaktivně naznačena ( $^{32}\text{P}$ ) s použitím komerčního kitu (STRATAGENE) (postup viz. kap. 4.5.2.7 – radioaktivní značení próby) tak, aby byla získána próba s vysokou specifickou aktivitou. Právě specifická aktivita próby je důležitým parametrem

pro úspěšnou hybridizaci a citlivou detekci cílového úseku DNA zakotveného na membráně ve velmi malém množství. Na obrázku 32 převzatého z [176] je uveden výsledek testu na vztah mezi specifickou aktivitou próby a citlivostí detekce.



Obr. 32: Efekt specifické aktivity próby na detekci hraničního množství cílové DNA. V tomto experimentu bylo naznačeno v DECAprime II reakci šest různých množství templátové DNA a hybridizováno k individuálním nylonovým membránám obsahujícím koncentrační řadu cílové DNA. Je vidět, že próba vyrobená z menšího množství templátu (6,25 ng) byla schopná detekovat cílovou DNA při 1/4 - 1/8 hladiny než próba vyrobená z většího množství templátu (100 ng). Převzato a upraveno z [176].

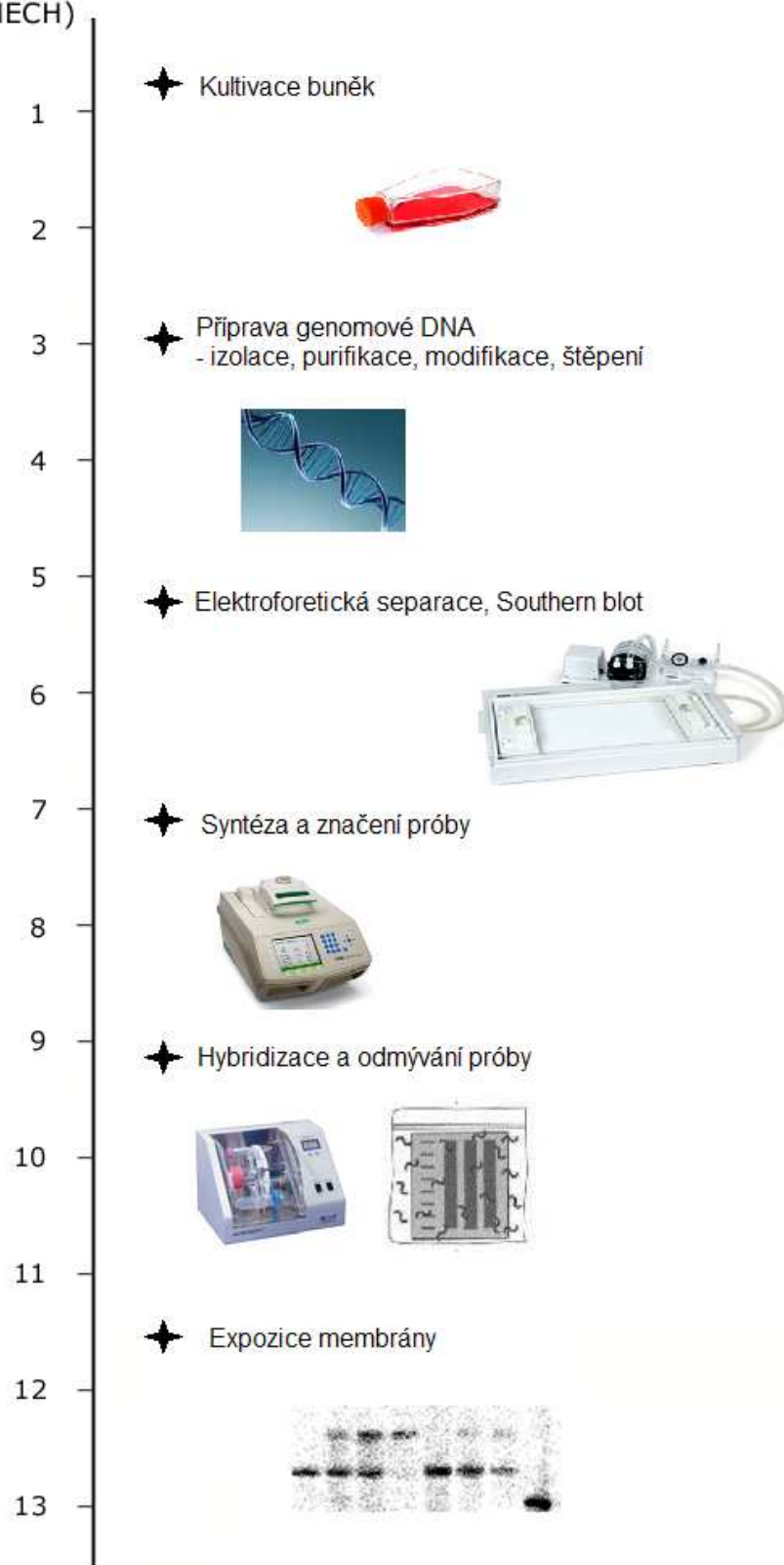
Z celkových 10 µg DNA, které na agarózový gel nanášíme, se množství detekovaného 22 kb fragmentu pohybuje v rozmezí pouhých jednotek až desítek ng. Proto bylo naším cílem získat próbu s vysokou specifickou aktivitou. Na základě výsledků uvedených na obrázku 32 bylo sníženo původní množství próby 1,8 kb vstupující do značení z 25 ng templátové DNA, doporučených firmou STRATAGENE ve značícím kitu, na 12,5 ng. Takto zvýšena specifická aktivita próby zvýšila i citlivost detekce hybridizací na membráně.

Takto již finálně připravená próba byla hybridizována s 22kb dlouhým fragmentem gDNA imobilizovaným na nylonové membráně a autoradiograficky detekována.

Na obrázku 33 je znázorněno časové rozvržení zavedené metodiky Southernova přenosu pro detekci meziřetězcových můstků na DNA.

## ČASOVÉ ROZVRŽENÍ EXPERIMENTU

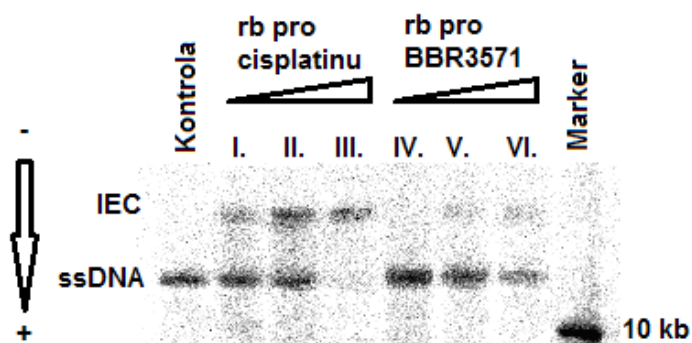
(ve DNECH)



Obr. 33: Harmonogram navrženého postupu.

### 5.2.5 Stanovení množství meziřetězcových můstků platinových komplexů na gDNA *in vivo*

Z buněk lidské nádorové linie A2780 po působení jednotlivými komplexy platiny (cisplatinou a dinukleárním komplexem BBR3571) po dobu 7 hodin byla vyizolována genomová DNA s využitím Metody 2 popsané v kap. 4.5.2.2. Tato gDNA byla dále naštěpena enzymem *HindIII* a imobilizována na membránu (postup viz kap. 4.5.2.4-6). Poté byly detekovány 22 kb fragmenty DNA s využitím připravené radioaktivně značené próby. Získaný autoradiogram je ukázán na obrázku 34, kde pozorujeme jednak jednořetězcové (ss, nekroslinkované) fragmenty DNA a také se objevila frakce IEC odpovídající řetězcům DNA spojeným meziřetězcovým můstkem jednotlivých komplexů platiny.



Obr. 34: Autoradiogram Southern blotu po vakuovém přenosu gDNA modifikované komplexem BBR3571 a cisplatinou v buňkách. Hodnoty  $r_b$  byly zjištěny změřením jednotlivých vzorků na ICP-MS.  $r_b$  pro cisplatinu: 0,00006 (I.); 0,00028 (II.); ND (nestanoveno pro nedostatek vzorku na analýzu na ICP, III.).  $r_b$  pro BBR3571: 0,00005 (IV.); 0,000086 (V.); ND (VI.).

Po denzitometrickém vyhodnocení bylo procentuální zastoupení meziřetězcových můstků komplexů BBR3571 a cisplatinou vypočítáno podle rovnice 1, kdy za počet bází fragmentu  $N$  nyní dosazujeme  $2 \cdot 22000$ . Velikost detekovaného fragmentu DHFR genu vyštěpeného z gDNA enzymem *HindIII* je totiž 22 kb.

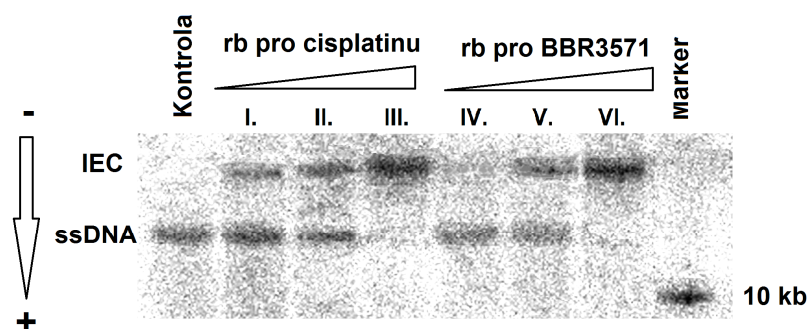
Výsledek *in vivo* modifikace gDNA a tvorba meziřetězcových můstků komplexů platiny jsou uvedeny v tabulce 6.

Tab. 6: Tvorba meziřetězcových můstků komplexu BBR3571 a cisplatiny na gDNA modifikované v buňkách. IEC/Pt - množství meziřetězcových můstků tvořených daným komplexem připadající na adukt, vyjádřeno v procentech.

	Stupeň modifikace $r_b$	IEC/Pt [%]
Cisplatina	0,00006	4,2
	0,00026	11,4
	0,00028	5,3
	Průměr	$6,9 \pm 3,1$
BBR3571	0,000086	2,6
	0,00005	1,2
	Průměr	$1,9 \pm 0,7$

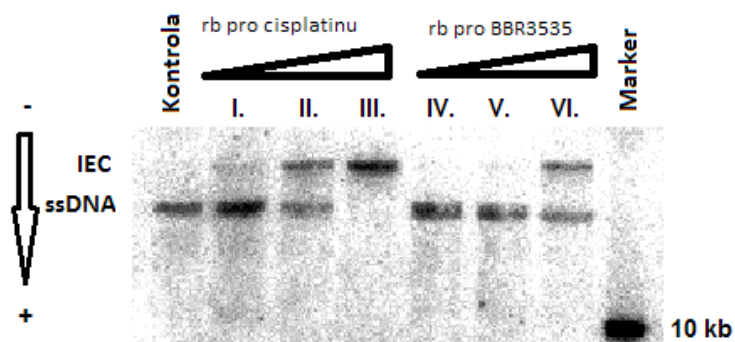
Protože procentuální zastoupení meziřetězcových můstků komplexu BBR3571 na gDNA modifikované v buňkách byl překvapivě nízký oproti výsledkům získaným *in vitro* na plazmidové DNA (Tab. 1), byl stejný experiment proveden i na gDNA modifikované *in vitro*. Naším cílem bylo zjistit, zda opravdu v buňkách vzniká takto nízké procento IEC pro dinukleární komplex BBR3571, či může být důvodem pozorovaného rozdílného chování použitá metoda Southernovy hybridizace.

Genomová DNA vyizolovaná z kontrolních (komplexy neovlivněných) buněk byla modifikována až posléze *in vitro*. Procedura separace DNA fragmentů na agarózovém gelu, jejich přenos na membránu a následná detekce, byla provedena stejně jako v předchozím experimentu. Získaný autoradiogram pro gDNA modifikovanou dinukleárním komplexem BBR3571 je ukázán na obrázku 35.



Obr. 35: Autoradiogram výsledku hybridizace na membráně: gDNA modifikovaná cisplatinou a komplexem BBR3571 *in vitro*.  $r_b$  pro cisplatinu: 0,00003 (I.); 0,0003 (II.); 0,003 (III.).  $r_b$  pro BBR3571: 0,00003 (IV.); 0,0003 (V.); 0,003 (VI.).

Stejný experiment byl proveden pro gDNA modifikovanou *in vitro* také dinukleárním komplexem BBR3535 (Obr. 36).



Obr. 36: Autoradiogram výsledku hybridizace na membráně: gDNA modifikovaná cisplatinou a komplexem BBR3535 *in vitro*.  $r_b$  pro cisplatinu: 0,00003 (I.); 0,0003 (II.); 0,003 (III.).  $r_b$  pro BBR3535: 0,000003 (IV.); 0,00003 (V.); 0,0003 (VI.).

Opět bylo s využitím rovnice 1 vypočítáno procentuální zastoupení meziřetězcových můstků tvořených komplexem cisplatin, BBR3535 a BBR3571 ( $N = 2 \cdot 22000$ ). Hodnoty jsou uvedeny v tabulce 7.

Tab. 7: Tvorba meziřetězcových můstků komplexů BBR3571, BBR3535 a cisplatinu na gDNA modifikované *in vitro*. IEC/Pt - množství meziřetězcových můstků tvořených daným komplexem připadající na adukt, vyjádřeno v procentech.

	Průměrná frakce IEC [%]
Cisplatina	5,1
BBR3571	4
BBR3535	$8 \pm 3$

Výsledek ukázal, že i při modifikaci gDNA *in vitro* poskytuje metoda Southern blotu nižší hodnoty meziřetězcových můstků než metoda alkalické elektroforézy pro plazmid pUC19.



## 6. DISKUZE

Sloučeniny platiny představují samostatnou skupinu chemoterapeutik, které se v současné době díky jejich protinádorovým a protivirovým účinkům široce používají v klinické medicíně. Jako první byla podrobena klinickému testování monojaderná cisplatina, u které se ale objevilo několik nevýhod (úzké spektrum nádorů, vznik rezistence). V závislosti na tom vznikla myšlenka, že vícejaderné komplexy s bohatším vazebným módem by mohly působit na větší spektrum nádorů s tím, že by si nádorové buňky vůči nim tak snadno nevytvářely rezistenci. Předpokladem je také vyšší odolnost vůči opravným mechanismům nádorové buňky.

Cílem této diplomové práce bylo získat co nejvíce poznatků o mechanismu, kterým tyto látky působí na molekulární úrovni (tzn. na DNA). Byly srovnávány dvoujaderné komplexy (BBR3535 a BBR3571) s již prozkoumaným monojaderným komplexem, cisplatinou.

Nejprve byla pozorována tvorba meziřetězcových můstků těchto komplexů v bezbuněčném prostředí na plazmidu pUC19 metodou alkalické denaturační elektroforézy a získané výsledky byly porovnávány s již publikovanými hodnotami [55] (Tab. 8).

Tab. 8: Srovnání námi získaných hodnot IEC/Pt s již publikovanými hodnotami [55]. IEC/Pt - množství meziřetězcových můstků tvořených daným komplexem připadající na adukt, vyjádřeno v procentech

	Cisplatina	BBR3535	BBR3571
Hodnoty z výzkumu T. McGregor [55]	6 %	57 %	40 %
Získané hodnoty pro plazmid	6,2 %	55,3 %	38,2 %

Publikované hodnoty IEC/Pt z výzkumu T. McGregor (2001) na plazmidu byly námi potvrzeny. Dvojjaderné komplexy tvoří zhruba sedmkrát resp. devětkrát (pro BBR3571, resp. BBR3535) vyšší procento meziřetězcových můstků na plazmidové DNA *in vitro* než cisplatina.

Na základě těchto výsledků byla již dříve [55] navržena hypotéza, že výrazně vyšší protinádorová účinnost studovaných dinukleárních komplexů souvisí s jejich zvýšenou schopností tvořit meziřetězcové můstky. Meziřetězcové můstky představují závažné poškození DNA, protože dochází ke kovalentnímu spojení komplementárních řetězců DNA, které nemohou být od sebe odděleny při procesu transkripce nebo replikace, což má zásadní

biologické důsledky. Kromě toho bylo ukázáno [141], že na rozdíl od vnitrořetězcových můstků, meziřetězcové můstky polynukleárních komplexů jsou jen velmi obtížně, pokud vůbec, odstraňovány z DNA opravnými procesy. Navržená hypotéza však vychází jen z výsledků experimentů na izolované DNA, proto je potřeba pro posouzení skutečného významu meziřetězcových můstků pro biologické působení dinukleárních komplexů stanovit jejich zastoupení v buňkách.

Ve srovnání s experimenty *in vitro*, kdy jsou ve studovaných reakčních směsích přítomny pouze komplex platiny a DNA ve vhodném prostředí, je situace v buněčném prostředí (*in vivo*) podstatně složitější. V buňkách se vyskytuje velké množství proteinů, které interagují jednak se samotnými komplexy platiny, a také proteiny schopné rozpoznávat a vázat se na DNA v místě modifikace. Navíc samotná DNA v jádře buněk, cílové místo komplexů platiny, se nachází v kondenzované formě, ve formě chromozómů, což ovlivňuje přístupnost komplexů platiny k jejich vazebnému místu na N7 dusíku purinovýchází. Všechny tyto vyjmenované faktory ovlivňují schopnost a také způsob, jakým se komplexy platiny na jadernou DNA váží a s tím související protinádorovou účinnost těchto metalofarmak. Studium modifikací DNA v buněčném prostředí se proto ukazuje být velmi důležitým přístupem pro získání poznatků o mechanismu, kterým dané látky působí.

Ke studiu vzniku meziřetězcových můstků cisplatiny a jiných chemických látek v buněčném prostředí byla již v minulosti využita metoda Southernovy hybridizace [163, 165, 166, 167], avšak nikdy nebyla aplikována pro studium meziřetězcových můstků vícejaderných komplexů platiny. Nedílnou součástí této práce tedy bylo nejen metodu Southernovy hybridizace zavést, ale také optimalizovat podmínky jednotlivých dílčích kroků metodiky tak, aby ji bylo možné použít pro studium meziřetězcových můstků dinukleárních komplexů platiny vznikajících na genomové DNA.

Metoda Southernovy hybridizace zahrnuje mnoho časově náročných kroků včetně přípravy gDNA (růst buněk, izolace, purifikace, štěpení), elektroforetické separace fragmentů gDNA na agarózovém gelu, přenos fragmentů na membránu a konečně samotnou hybridizaci radioaktivně značené próby k fragmentům gDNA na membráně. Konečné námi navržené časové rozvržení celé metodiky je uvedeno na obrázku 33 (str. 69). Než však byl tento harmonogram vytvořen, bylo třeba jednotlivé kroky v postupu optimalizovat pro naše účely.

Jak je známo, Southernova hybridizace vyžaduje velké množství vstupního materiálu, tedy DNA, neboť je jí detekován pouze určitý fragment DNA zaujímající z celé molekuly DNA pouze minoritní část. Pro studium meziřetězcových můstků je tento parametr o to důležitější, neboť detekovaný fragment je při separaci vnitrořetězcových a meziřetězcových můstků rozdělen do dvou frakcí, IAC a IEC, čímž se snižuje detekční limit jednotlivých frakcí.

Vezmeme-li navíc v úvahu ztráty, ke kterým dochází při přípravě gDNA, hraje výtěžnost použité izolační techniky jednu z klíčových rolí. Dalším neméně důležitým parametrem při přípravě gDNA pro Southernovu hybridizaci je její čistota a kvalita. Je třeba zvolit izolační postup, který co nejméně poškozuje vysokomolekulární gDNA. Ať už chemickým či mechanickým poškozením mohou totiž na gDNA vznikat nescifické zlomy, které jsou velmi nežádoucí při detekci DNA fragmentů určité délky, na čemž je metoda Southernovy hybridizace založena. Z uvedených důvodů byly testovány tři různé postupy izolace gDNA z buněk (Metoda 1 – „Krok po kroku“, Metoda 2 – kit QIAGEN, Metoda 3 – DNAzol) a vzájemně porovnávány s cílem vybrat tu neoptimálnější z hlediska výtěžnosti, kvality a čistoty DNA. V tabulce 4 (str. 62) jsou jednotlivé parametry pro všechny tři testované izolační techniky shrnuty. Co se týče časové náročnosti a výtěžku, nejlépe se jevila izolace DNAzolem, ale kvalita a čistota vyizolované gDNA byla nedostačující. gDNA nejvyšší kvality, bez kontaminace RNA či proteiny, byla získána izolací na kolonkách komerčním kitem QIAGEN. I když z hodnot uvedených v tabulce (Tab. 4) se může metoda využívající kit QIAGEN zdát nevhodnou z důvodu nízké výtěžnosti a nabízí se nám tu zvolit spíše kompromis mezi výtěžností a kvalitou - Metodu 1 „krok po kroku“, byla pro další experiment zvolena právě izolace kitem QIAGEN. K výběru přispěla mnohem nižší časová náročnost a obtížnost provedení izolace v porovnání s metodou „krok po kroku“.

Je třeba si také uvědomit, že v tabulce 4 jsou uvedeny průměrné výtěžky, kterých lze jednotlivými metodami docílit při izolaci genomové DNA z kontrolních „netreatovaných“ buněk. Situace je jiná při izolaci gDNA z buněk po jejich ovlivnění komplexy. Z těchto buněk je obtížnější získat neporušenou vysokomolekulární gDNA a navíc s dostatečnou výtěžností. Koncentrace komplexů platiny, která je pro modifikaci buněk v práci použita (30, 60 a 120  $\mu\text{M}$ ) je natolik vysoká, že velké množství buněk velmi rychle umírá. Spuštění procesů vedoucích k buněčné smrti má také za následek degradaci gDNA vedoucí ke ztrátám v procesu její izolace běžnými izolačními postupy, přizpůsobenými spíše pro vysokomolekulární DNA. Takto vysoké koncentrace komplexu byly zvoleny podle vzoru dřívějších prací [163, 165, 166, 167] a jsou zřejmě nezbytné pro možnost pozorování vzniku meziřetězcových můstků na gDNA.

Příprava gDNA pro Southernovu hybridizaci zahrnovala také její naštěpení restrikcí enzymem *HindIII* pro získání 22 kb dlouhého fragmentu sekvence DHFR genu, který byl posléze detekován komplementární próbou. Pro optimalizaci podmínek štěpení byly vyzkoušeny tři různé časy štěpení (2 h, 6 h a 16 h) při různém množství enzymu vstupujícího do reakce (2 U a 5 U na 1  $\mu\text{g}$  DNA). Bylo zjištěno, že zvolené kratší časy jsou pro naštěpení gDNA zcela dostačující. Pro přípravu gDNA jsme tedy zvolili dobu štěpení 2 h při množství enzymu 5U na 1  $\mu\text{g}$  DNA.

Experiment týkající se alkalické denaturace vzorků před nanesením na gel byl prováděn pro různé teploty (4 °C, 20 °C a 37 °C). Z obrázku gelu (Obr. 27) alkalicky denaturovaných vzorků gDNA za různé teploty je patrné, že ani při nejvyšší teplotě 37 °C nedochází k výraznému zkrácení řetězců DNA a proto byla tato teplota zařazena do testované metody Southernovy hybridizace.

Dalším důležitým krokem, při kterém může snadno dojít ke ztrátě cílového fragmentu gDNA, je jeho přenos z gelu na membránu. Proces, díky němuž je přenos uskutečněn, se nazývá blotování a může být proveden s využitím rozličných technik. Zřejmě nejčastěji využívaným přenosem je přenos kapilární. My jsme měli možnost tento typ přenosu porovnat s vakuovým přenosem (Tab. 5, str. 66). I když je kapilární přenos v mnohých laboratořích upřednostňován pro svoji přístrojovou nenáročnost a aparatura na kapilární transfer může být jednoduše sestavena z běžně používaného laboratorního vybavení (Obr. 15, str. 49), tento typ přenosu se neukázal být vhodným pro přenos fragmentů delších než 10 kb. Pomocí vakuového přenosu bylo již po 2 hodinách docíleno rovnoměrného přenosu fragmentů DNA i o delkách větších než 10 kb. Jelikož naším cílovým fragmentem DNA je fragment o délce 22 kb, byla volba vakuového blotování pro přenos fragmentů gDNA na membránu pro naše účely jednoznačná.

DNA imobilizovaná na membráně je připravena pro hybridizaci s radioaktivně značenou próbou [161]. Próbou k detekovanému 22 kb fragmentu genu DHFR byl 1,8 kb dlouhý fragment obsahující exon 1 a 2 genu DHFR. Tato hybridizační próba byla vyrobena metodou PCR, a protože jde o relativně dlouhý fragment DNA, bylo pro úspěšnou amplifikaci tohoto fragmentu třeba optimalizovat podmínky PCR programu a počet cyklů.

Zjistili jsme, že jelikož množství detekovaného 22 kb fragmentu gDNA imobilizovaného na membráně se pohybuje v jednotkách či desítkách ng, je pro jeho úspěšnou detekci potřeba próby s vysokou specifickou aktivitou. Radioaktivní značení 1,8 kb naamplifikovaného fragmentu postupem doporučeným v rámci značícího kitu STRATAGENE nám umožnilo získat próbu s vysokou specifickou aktivitou, ne však zcela dostačující pro detekci IEC na membráně. Proto na základě obrázku 32 (str. 68), kde autoři sledovali vliv specifické aktivity próby na detekci hraničního množství cílové DNA, jsme se rozhodli pro snížení množství templátové DNA vstupující do značící reakce z původních 25 ng na 10 ng. Z obrázku 32 totiž vyplývá, že množství DNA templátu vstupujícího do značící reakce je nepřímo úměrné specifické aktivitě naznačené próby. Při použití doporučeného množství templátové DNA je sice i výtěžek vysoký, ale s nižší specifickou aktivitou. Tudíž bylo potřeba zvolit kompromis mezi výtěžkem próby a její specifickou aktivitou.

Zavedená metoda Southernovy hybridizace s takto optimalizovanými podmínkami jednotlivých kroků byla použita pro sledování tvorby meziřetězcových můstků dinukleárního

komplexu BBR3571 na gDNA v buněčném prostředí (*in vivo*). Důvodem, proč stejný experiment nebyl proveden také pro druhý z dinukleárních komplexů platiny, pro BBR3535, bylo jeho nedostačující množství, které jsme měli k dispozici. Jak zmiňuji výše, pro Southernovu hybridizaci je třeba velké množství vstupního materiálu, tzn. gDNA vyizolované z nádorových linií. Abychom získali dostatečné množství gDNA je třeba kultivovat velké množství buněk, nejlépe na třech Petriho miskách (v množství  $3 \times 3 \cdot 10^6$  buněk v 10 ml), a buněčné suspenze poté před izolací gDNA spojit do jedné. Komplex je samozřejmě třeba přidat do všech Petriho misek, s čímž souvisí i jeho velká spotřeba (cca 1 – 3 mg komplexu na jeden experiment). Komplexy BBR3535 i BBR3571 jsou nová analoga komplexů platiny, která nejsou komerčně dostupná. V rámci spolupráce jsou nám zasílány z pracoviště prof. Farrella (z Virginia Commonwealth Univerzity, Richmond, USA), kde tyto komplexy syntetizují, a proto i jejich množství, které máme k dispozici je omezené. Zejména pro experimenty *in vivo*, kde je jejich spotřeba opravdu vysoká.

Nicméně o úspěšném zavedení metody Southernovy hybridizace pro studium meziřetězcových můstků na gDNA svědčí výsledný autoradiogram, který jsme získali pro gDNA modifikovanou komplexy cisplatinou a BBR3571 v buňkách A2780 (Obr. 34, str. 70). Získali jsme dvě separované frakce, jednořetězcové DNA (ssDNA) a “zkroslinkované” frakce, tzn. frakce, jejíž řetězce spojuje meziřetězcový adukt (IEC). Vyhodnocení obnášelo jednak stanovení stupně modifikace gDNA pro dané komplexy ( $r_b$ ) a také denzitometrické stanovení intenzit jednotlivých proužků na autoradiogramu. Množství platiny navázané na gDNA bylo stanoveno jejím změřením na ICP-MS, což je metoda schopná detekovat jednotlivé atomy platiny i ve velmi nízkých koncentracích, cca 0,3 ng/ml.

Po výpočtu procentuálního zastoupení meziřetězcových můstků na gDNA modifikované v buněčném prostředí komplexem BBR3571 jsme obdrželi překvapivý výsledek. Zatímco pro cisplatinu se procentuální zastoupení meziřetězcových můstků pohybuje kolem 6,9 %, což je ve velmi dobré shodě s *in vitro* experimenty na plazmidové DNA, pro dinukleární komplex BBR3571 je toto zastoupení IEC kolem 1,9 % (Tab. 6, str. 71), čili mnohonásobně nižší než jak je tomu při modifikaci plazmidové DNA *in vitro*.

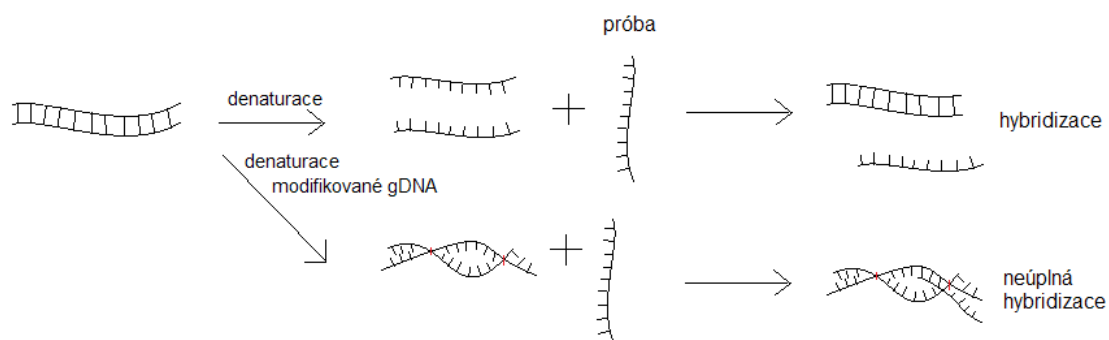
Nyní vyvstává otázka, zda v buňkách opravdu vzniká na gDNA takto nízké procento meziřetězcových můstků pro dinukleární komplex BBR3571, či je důvodem rozdílu použita metoda Southernovy hybridizace.

Proto byl stejný experiment proveden i na gDNA modifikované komplexem BBR3571 *in vitro*, tzn. až po její izolaci z kontrolních “netreatovaných” buněk. Avšak výsledek byl obdobný. Tudíž jsme vyloučili vliv buněčného prostředí na vznik studované modifikace gDNA. Získané procentuální zastoupení meziřetězcových můstků tvořených na gDNA komplexem

BBR3571 v bezbuněčném prostředí se pohybovalo kolem hodnoty 4 %. Stejný experiment modifikace gDNA *in vitro* byl proveden také pro druhý studovaný dinukleární komplex BBR3535 s podobným výsledkem (% IEC<sub>BBR3535</sub> ~ 8 %).

Vysvětlení jsme tedy hledali v použité metodice Southernovy hybridizace. Je možné, že jsme narazili na úskalí vedoucí ke snížené citlivosti této metody pro detekci meziřetězcových můstků tvořených studovanými polynukleárními komplexy.

Jelikož metoda Southernovy hybridizace zahrnuje velké množství nejednoduchých kroků, nelze s jistotou říci, který z nich by mohl být příčinou sledovaného jevu. Krok, který se nabízí nejvíce, je hybridizační krok, kdy se značená próba páruje s komplementárním úsekem na gDNA. Pokud je jí ale v tomto spojení bráněno, např. není-li fragment DNA zcela denaturován v důsledku jeho vysoké modifikace komplexem platiny, nemůže próba se svým komplementárním úsekem zcela hybridizovat a dochází k tzv. neúplné hybridizaci (Obr. 37). Tato neúplně hybridizovaná próba pak může být z cílové sekvence uvolněna v některém z promývacích kroků, což vede ke sníženému detekovanému signálu.



Obr. 37: Neúplná hybridizace próby k DNA s velkým počtem meziřetězcových můstků.

Samozřejmě nevylučujeme ani možnost, že na studovaném fragmentu 22 kb sekvence genu DHFR vzniká nižší procento meziřetězcových můstků pro dinukleární komplexy.

Jedná se o problém dosti diskutabilní a k jeho objasnění, jak doufáme, přispějí další navrhované postupy, které jsou již však nad rámec této diplomové práce.

Řešením by mohlo být využití kratší hybridizační próby, která by i při neúplné denaturaci fragmentů gDNA (v důsledku vysoké modifikace komplexu platiny) byla schopná s cílovým úsekem zcela hybridizovat. Tím by nedocházelo k jejímu odmývání a k následnému snížení detekovaného signálu.

Pro potvrzení, zda je problémem neúplná hybridizace próby k cílovému úseku DNA, je navržen experiment, při kterém bude sledováno, zda zvýšený stupeň *in vitro* modifikace cílové DNA (př. plazmidu) komplexu BBR3535 či BBR3571, bude mít opravdu za následek inhibici

hybridizace próby k cílové DNA.

Studované dinukleární komplexy platiny, BBR3535 a BBR3571, se vyznačují vysokou protinádorovou aktivitu a to i v nádorových liniích k cisplatině rezistentních. Proto je studium mechanismu jejich protinádorové účinnosti ať už v *in vitro* podmínkách či v buněčném prostředí (*in vivo*) velmi důležité. Nový přístup, který předkládaná diplomová práce pro toto studium přináší, využívající metody Southernovy hybridizace, sice vyžaduje ještě další metodické úpravy a optimalizace, již nyní se ale zdá být pro dané účely studia gDNA meziřetězcových můstků zcela nenahraditelným.

## 7. ZÁVĚR

Cílem práce bylo studovat vazbu dvojjaderných komplexů (BBR3535 a BBR3571) na DNA a tvorbu jejich meziřetězcových můstků ve srovnání z již probádanou cisplatinou nejprve v bezbuněčném prostředí a poté na genomové DNA.

1. Byl studován vznik meziřetězcových můstků v bezbuněčném prostředí na plazmidu pUC19 metodou alkalické denaturační elektroforézy. Komplex BBR3535 tvořil asi devětkrát více IEC než cisplatin a komplex BBR3571 asi šestkrát. Získaný výsledek byl shodný s již publikovanými hodnotami [55].
2. Pro studium meziřetězcových můstků na gDNA modifikované v buňkách byla zavedena a optimalizována metoda Southernovy hybridizace.
3. V této práci byla metoda Southernovy hybridizace použita pro detekci meziřetězcových můstků tvořených cisplatinou a poprvé také aplikována na studium meziřetězcových můstků dinukleárních komplexů (BBR3535 a BBR3571) tvořených přímo v buňkách nádorové linie A2780.
4. Metodou Southernovy hybridizace byla detekována tvorba IEC komplexu BBR3535 a BBR3571 na gDNA za podmínek *in vitro*.
5. Uplatnění a citlivost metody Southernovy hybridizace pro detekci IEC pro různé typy nově syntetizovaných metalofarmak bude předmětem dalšího studia.



## 8. SEZNAM ZKRATEK

**A-DNA** – pravotočivá forma DNA

**ATP** – adenosin-5'-trifosfát

**APH** – prehybridizační roztok

**B-DNA** – pravotočivá forma DNA

**BOC** - tertbutoxykarbonyl

**bp** – páry bazí (base pair)

**dATP** – deoxyadenosintrifosfát

**dCTP** – deoxycytidintrifosfát

**dGTP** - deoxyguanosintrifosfát

**DMSO** – dimethylsulfoxid

**DNA** – deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)

**dpzm ligand** – dipyrazolymethanový ligand

**dsDNA** – dvouřetězcová DNA (double stranded)

**dTTP** - deoxythymidintrifosfát

**EDTA** – ethylendiamintetraoctová kyselina (ethylenediaminetetraacetic acid)

**ERCC1** – DNA excisní opravný protein, u lidí kódovaný gene ERCC1

**FDA**- Správa potravin a léčiv v U.S.A. (Food and Drug Administration)

**gDNA** – genomová DNA

**gen DHFR** – gen dihydrofolát reduktázy (dihydrofolate reductase gen)

**GSH** - glutathion

**HeLa** – nesmrtelná buněčná linie lidských epiteliálních buněk (podle Henrietty Lacksonové)

**HMG proteiny** – proteiny s HMG doménou (High Mobility Group)

**HSQC 2D NMR** – dvourozměrná nukleární magnetická rezonance (HSQC - Heteronuclear Single-Quantum Correlation)

**IAC** – vnitřetězcové můstky (intrastrand cross-links)

**ICP-MS** – hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (inductively coupled plasma mass spectrometry)

**IC<sub>50</sub>** – koncentrace látky, která způsobí 50% inhibici

**IEC** - meziřetězcové vazby (interstrand cross-links)

**kb** – kilobáze (kilo base pair)

**MOPS** – 3-(N-morfolino)propansulfonová kyselina

**mRNA** – mediátorová RNA (messenger RNA)

**mtDNA** – mitochondriální DNA

**NER** – nukleotidová excisní oprava (Nucleotide Excision Repair)  
**oc DNA** - ds DNA se zlomem v jednom řetězci (open circle)  
**PAA** - polyakrylamid  
**PBS** – fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)  
**PCNA** – antigen proliferačních buněk (proliferating cell nuclear antigen)  
**PCR** – polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)  
**RNA** – ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)  
**RPA** – replikační protein A  
**RPMI médium** - Roswell Park Memorial Institute medium  
**rRNA** – ribozomální RNA (ribosomal RNA)  
**sc DNA** - superhelikální (supercoiled) DNA  
**SDS** – sodium dodecyl sulfát  
**ss DNA** - jednořetězcová (single stranded) DNA  
**TBP**- protein vázající se na TATA-box (TATA-binding protein)  
**TFIID** – transkripční faktor  
**TFIIH** - transkripční faktor  
**t<sub>1/2</sub>**- poločas reakce  
**UV/VIS spektroskopie** – ultrafialovo-viditelná spektroskopie (ultraviolet-visible)  
**V(d)J rekombinace** - mechanismus genetické rekombinace u obratlovců, který náhodně vybírá a spojuje segmenty genů kódujících specifické proteiny zásadní pro fungování imunitního systému  
**XPA** – DNA opravný protein, u lidí kódovaný genem XPA  
**XPC** – DNA opravný protein, u lidí kódovaný genem XPC (Xeroderma pigmentosum, complementation group C)  
**XPF** – DNA opravná endonukleáza, u lidí kódovaná genem ERCC4  
**YB-1** – protein vázající se na Y-box (Y-box binding protein)  
**Z-DNA** – levotočivá forma DNA

## 9. POUŽITÁ LITERATURA

1. Rosenberg B., Van Camp L., Krigas T., *Inhibition of division in Escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode*. Nature, **1965**. 205: 698 – 699.
2. Rosenberg B., Van Camp L., Trosko J.E., Mansour V.H., *Platinum compounds: a new class of potent antitumor agents*. Nature, **1969**. 222: 385-386.
3. Rosenberg B., Van Camp L., *The successful regression of large solid sarcoma 180 tumors by platinum compounds*. Cancer Res., **1970**. 30: 1799 – 1802.
4. Bosl G.J., Motzer R.J., *Testicular germ-cell cancer*. N. Engl. J. Med., **1997**. 337: 242 – 253.
5. Brabec V., *Nové možnosti v léčbě zhoubných nádorů sloučeninami platiny a ruthenia*. Živa, **1998**. 4: 148 – 149.
6. Loehrer P., Einhorn L.H., *Drugs five years later. Cisplatin*. Ann. Intern. Med., **1984**. 100: 704 – 713.
7. Wong E., Giandomenico C.M., *Current status of platinum-based antitumor drugs*. Chem. Rev., **1999**. 99: 2451 – 2466.
8. Lippard S.J., *Progress in Inorganic Chemistry*, Bioinorganic Chemistry. Wiley, Sydney, **1995**.
9. Lippert B., *Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*. Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.
10. Weiss R.B., Christian M.C., *New cisplatin analogues in development*. Drugs, **1993**. 46: 360 – 377.
11. Blommaert F.A., Van Dijk-Knijenburg H.C.M., Dijt F.J., den Engelse L., Bann R.A., Berends F., Fichtinger-Schepman A.M.J., *Formation of DNA adducts by the anticancer drug carboplatin: different nucleotide sequence preferences in vitro and in cells*. Biochemistry, **1995**. 34: 8474 – 8480.
12. US Food and Drug Administration Drug Fact Sheet: Eloxantin, **2003**
13. Levi F., Metzger G., Massari C., Milano G., *Oxaliplatin: pharmacokinetics and chronopharmacological aspects*. Clin. Pharmacokinetics, **2000**. 38: 1 – 21.
14. Rixe O., Ortuzar W., Alvarez M., Parker R., Reed E., Paull K., Fojo T., *Oxaliplatin, tetraplatin, cisplatin, and carboplatin: spectrum of activity in drug-resistant cells lines and in the cells lines of the National Cancer Institute's Anticancer Drug Screen panel*. Biochem. Pharmacol., **1996**. 52: 1855 – 1865.
15. Wheate N.J., Collins J.G., *Multi-nuclear platinum drugs: a new paradigm in chemotherapy*. Curr. Med. Chem. Anticancer Agents, **2005**. 5: 267 – 279.
16. Wheate N.J., Collins J.G., *Multi-nuclear platinum complexes as anti-cancer drugs*. Coord. Chem. Rev., **2003**. 241: 133 – 145.
17. Farrell N., *Polynuclear charged platinum compounds as a new class of anticancer agents: Toward a new paradigm in Platinum-based Drugs in Cancer Therapy*, ed. Kelland L.R., Farrell N.P., Humana Press, Totowa/NJ, **2000**, 321 – 338.
18. Farrell N., *Interactions of Metal Ions with Nucleotides, Nucleic Acid and their Constituents*. Marcel Decker, Basel, **1996**.
19. Farrell N., Qu Y., *Chemistry of bis(platinum) complexes. Formation of trans derivatives from tetraamine complexes*. Inorg. Chem., **1989**. 28: 3416 – 3420.
20. Farrell N., Qu Y., Feng L., Van Houten B., *Comparison of chemical reactivity, cytotoxicity, interstrand cross-linking and DNA sequence specificity of bis(platinum) complexes containing monodentate or bidentate coordination spheres with their monomeric analogues*. Biochemistry, **1990**. 29: 9522 – 9531.
21. Broomhead J.A., Rendina L.M., Webster L.K., *Dinuclear complexes of platinum having anticancer properties. DNA-binding studies and biological activity of bis(4,4'-dipyrazolylmethane-N,N')-bis[dichloroplatinum(II)] and related complexes*. J. Inorg. Biochem., **1993**. 49: 221 – 234.

22. Broomhead J.A., Lynch M.J., *The synthesis and characterization of dinuclear platinum complexes bridged by the 4,4'-dipyrazolylmethane ligand*. Inorg. Chim. Acta, **1995**. 240: 13 – 17.
23. Farrell N.P., de Almeida S.G., Skov K.A., *Bis(platinum) complexes containing two platinum cis-diammine units. Synthesis and initial DNA-binding studies*. J. Am. Chem. Soc., **1988**. 110: 5018 – 5019.
24. Qu Y., Appleton T.G., Hoeschele J.D., Farrell N., *Cisplatin as a synthon. Synthesis and characterization of triplatinum complexes containing three cis-(Pt(amine)<sub>2</sub> units linked in a linear fashion*. Inorg. Chem., **1993**. 32: 2591 – 2593.
25. Zhao G., Lin H., Zhu S., Sun H., Chen Y., *Synthesis and biological activity of binuclear platinum complexes containing two monofunctional cis-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl]<sup>+</sup> units bridged by 4,4'-dipyridyl selenides or sulfides*. Anticancer Drug Des., **1998**. 13: 769 – 777.
26. Wheate N.J., Cullinane C., Webster L.K., Collins J.G., *Synthesis, cytotoxicity, cell uptake and DNA interstrand cross-linking of 4,4'-dipyrazolylmethane-linked multinuclear platinum anti-cancer complexes*. Anticancer Drug Des., **2001**. 16: 91 – 98.
27. Bart A., Jansen J., van der Zwan J., Reedijk J., den Dulk H., Brouwer J., *A Tetranuclear Platinum Compound Designed to Overcome Cisplatin Resistance*. Eur. J. Inorg. Chem., **1999**. 9: 1429 – 1433.
28. Bierbach U., Roberts J.D., Farrell N., *Modification of Platinum(II) Antitumor Complexes with Sulfur Ligands. 2. Reactivity and Nucleotide Binding Properties of Cationic Complexes of the Types [PtCl(diamine)(L)]NO<sub>3</sub> and [{PtCl(diamine)}<sub>2</sub>(L-L)](NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (L = Monofunctional Thiourea Derivative; L-L = Bifunctional Thiourea Derivative) in Relation to Their Cytotoxicity*. Inorg. Chem., **1998**. 37: 717 – 723.
29. Komeda S., Lutz M., Spek A.L., Chikuma M., Reedijk J., *New antitumor-active azole-bridged dinuclear platinum(II) complexes: synthesis, characterization, crystal structures, and cytotoxic studies*. Inorg. Chem., **2000**. 39: 4230 – 4236.
30. Komeda S., Lutz M., Spek A.L., Yamanaka Y., Sato T., Chikuma M., Reedijk J., *A novel isomerization on interaction of antitumor-active azole-bridged dinuclear platinum(II) complexes with 9-ethylguanine. Platinum(II) atom migration from N2 to N3 on 1,2,3-triazole*. J. Am. Chem. Soc., **2002**. 124: 4738 – 4746.
31. Kraker A.J., Hoeschele J.D., Elliott W.L., Showalter H.D., Sercel A.D., Farrell N., *Anticancer activity in murine and human tumor cell lines of bis(platinum) complexes incorporating straight-chain aliphatic diamine linker groups*. J. Med. Chem., **1992**. 35: 4526 – 4532.
32. Farrell N., *Current status of structure-activity relationships of platinum anticancer drugs: activation of the trans geometry*. Met. Ions Biol. Syst., **1996**. 32: 603 – 639.
33. Sessa C., Capri G., Gianni L., Peccaroti F., Graselli G., Bauer J., Zucchetti M., Vigano L., Gatti A., Minoia C., Liati P., Van den Bosch S., Bernareggi A., Camboni G., Marsoni S., *Clinical and pharmacological phase I study with accelerated titration design of a daily times five schedule of BBR3464, a novel cationic triplatinum complex*. Ann. Oncol., **2000**. 11: 977 – 983.
34. Boulikas T., Vougiouka M., *Cisplatin and platinum drugs at the molecular level*. Oncol. Rep., **2003**. 10: 1663 – 1682.
35. Sadler P.J., Muncie C., Shipman M.A., *Biological Inorganic Chemistry: Structure and Reactivity*, chapter VIII: Metal in Medicine, ed. Bertini I., Stiefel E.I., Gray H.B., Valentine J.S., University Science Books. **2006** (in press)
36. Wheate N.J., Day A.I., Blanch R.J., Arnold A.P., Cullinane C., Collins J.G., *Multinuclear platinum complexes encapsulated in cucurbit[n]uril as an approach to reduce toxicity in cancer treatment*. Chem. Commun., **2004**. 12: 1424 – 1425.
37. Wheate N.J., Buck D.P., Day A.I., Collins J.G., *Cucurbit[n]uril binding of platinum anticancer complexes*. Dalton Trans., **2005**. 3: 451 – 458.
38. Harris A.L., Ryan J.J., Farrell N., *Biological consequences of trinuclear platinum*

- complexes: comparison of  $[[\text{trans-PtCl}(\text{NH}_3)_2]_2\mu\text{-(trans-Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{-NH}_2)_2)]_4^+$  (BBR 3464) with its noncovalent congeners. *Mol. Pharmacol.*, **2006**. 60: 666 – 672.
39. Farrell N., *Metal Ions in Biological Systems*, vol. 42 *Metal Complexes in Tumor Diagnosis and as Anticancer Agents*, ed. Sigel A., Sigel H., Fontis Media S.A. – Marcel Dekker, Inc., 252. **2004**.
  40. Jamieson E.R., Lippard S.J., *Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts*. *Chem. Rev.*, **1999**. 99: 2467 – 2498.
  41. Gale G.R., Morris C.R., Atkins L.M., Smith A.B., *Binding of an antitumor platinum compound to cells as influenced by physical factors and pharmacologically active agents*. *Cancer Res.*, **1973**. 33: 813 – 818.
  42. Witkin E.M., *The radiation sensitivity of Escherichia coli B: a hypothesis relating filament formation and prophage induction*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1967**. 57: 1275 – 1279.
  43. Adler H.I., Hardigree A.A., *Postirradiation growth, division, and recovery in bacteria*. *Radiat. Res.*, **1965**. 25: 92 – 102.
  44. Rosenkranz H.S., Garro A.J., Levy J.A., Carr H.S., *Studies with hydroxyurea. I. The reversible inhibition of bacterial DNA synthesis and the effect of hydroxyurea on the bactericidal action of streptomycin*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1966**. 114: 501 – 515.
  45. Harder H.C., Rosenberg B., *Inhibitory effects of anti-tumor platinum compounds on DNA, RNA and protein syntheses in mammalian cells in vitro*. *Int. J. Cancer*, **1970**. 6: 207 – 216.
  46. Howle J.A., Gale G.R., *Cis-dichlorodiammineplatinum (II). Persistent and selective inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis in vivo*. *Biochem. Pharmacol.*, **1970**. 19: 2757 – 2762.
  47. Pascoe J.M., Roberts J.J., *Interactions between mammalian cell DNA and inorganic platinum compounds. II. Interstrand cross-linking of isolated and cellular DNA by platinum(IV) compounds*. *Biochem. Pharmacol.*, **1974**. 23: 1345 – 1357.
  48. Beck D.J., Brubaker R.R., *Effect of cis-platinum(II)diamminodichloride on wild type and deoxyribonucleic acid repair deficient mutants of Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **1973**. 116: 1247 – 1252.
  49. Drobnik J., Urbankova M., Krekulova A., *The effect of cis-dichlorodiammineplatinum(II) on Escherichia coli B. The role of fil, exr and hcr markers*. *Mutat. Res.*, **1973**. 17: 13 – 20.
  50. Beck D.J., Popoff S., Sancar A., Rupp W.D., *Reactions of the UVRABC excision nuclease with DNA damaged by diamminedichloroplatinum(II)*. *Nucleic Acids Res.*, **1985**. 13: 7395 – 7412.
  51. Bacroft D.P., Lepre C.A., Lippard S.J., *Platinum-195 NMR kinetic and mechanistic studies of cis- and trans-diamminedichloroplatinum(II) binding to DNA*. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**. 112: 6860 – 6871.
  52. Johnson N.P., Hoeschele J.D., Rahn R.O., *Kinetic analysis of the in vitro binding of radioactive cis- and trans-dichlorodiammineplatinum(II) to DNA*. *Chem. Biol. Interact.*, **1980**. 30: 151 – 169.
  53. Barnham K.J., Berners-Price S.J., Frenkiel T.A., Frey U., Sadler P.J., *Platination Pathways for Reactions of Cisplatin with GG Single-Stranded and Double-Stranded Decanucleotides*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1995**. 34: 1874 – 1877.
  54. Eastman A., *Interstrand cross-links and sequence specificity in the reaction of cis-dichloro(ethylenediamine)platinum(II) with DNA*. *Biochemistry*, **1985**. 24: 5027 – 5032.
  55. McGregor T.D., Hegmans A., Kasparkova J., Nephlechova K., Novakova O., Penazova H., Vrana O., Brabec V., Farrell N., *A comparison of DNA binding profiles of dinuclear platinum compounds with polyamine linkers and the trinuclear platinum phase II clinical agent BBR3464*. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2002**. 7: 397 – 404.
  56. Eastman A., Barry M.A., *Interaction of trans-diamminedichloroplatinum(II) with DNA:*

- formation of monofunctional adducts and their reaction with glutathione.* *Biochemistry*, **1987**. 26: 3303 – 3307.
57. Eastman A., *The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes.* *Pharmac. Ther.*, **1987**. 34: 155 – 166.
  58. Bernal-Méndez E., Boudvillain M., González-Vilchez F., Leng M., *Chemical versatility of transplatin monofunctional adducts within multiple site-specifically platinated DNA.* *Biochemistry*, **1997**. 36: 7281 – 7287.
  59. Gelasco A., Lippard S.J., *Anticancer activity of cisplatin and related complexes*, in *Metallopharmaceuticals I. DNA Interactions*, eds Clarke M.J. and Sadler P.J. Springer, Berlin, **1999**, 1 – 43.
  60. Bellon S.F., Lippard S.J., *Bending studies of DNA site-specifically modified by cisplatin, trans-diamminedichloroplatinum(II) and cis-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(N<sup>3</sup>-cytosine)Cl]<sup>+</sup>.* *Biophys. Chem.*, **1990**. 35: 179 – 188.
  61. Teuben J.M., Bauer C., Wang A.H., Reedijk J., *Solution structure of a DNA duplex containing a cis-diammineplatinum(II) 1,3-d(GTG) intrastrand cross-link, a major adduct in cells treated with the anticancer drug carboplatin.* *Biochemistry*, **1999**. 38: 12305 – 12312.
  62. Huang H., Zhu L., Reid B.R., Drobny G.P., Hopkins P.B., *Solution structure of a cisplatin-induced DNA interstrand cross-link.* *Science*, **1995**. 270: 1842 – 1845.
  63. Brabec V., Reedijk J., Leng M., *Sequence-dependent distortions induced in DNA by monofunctional platinum(II) binding.* *Biochemistry*, **1992**. 31: 12397 – 12402.
  64. Brabec V., Boudny V., Balcarova Z., *Monofunctional adducts of platinum(II) produce in DNA a sequence-dependent local denaturation.* *Biochemistry*, **1994**. 32: 1316 – 1322.
  65. Keck M.V., Lippard S.J., *Unwinding of supercoiled DNA by platinum-ethidium and related complexes.* *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**. 114: 3386 – 3390.
  66. Kartalou M., Essigmann J.M., *Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins.* *Mutation Res.*, **2001**. 478: 1-21.
  67. Pinto A.L., Lippard S.J., *Sequence-dependent termination of in vitro DNA synthesis by cis- and trans-diamminedichloroplatinum (II).* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1985**. 82: 4616 – 4619.
  68. Villani G., Hubscher U., Butour J.L., *Sites of termination of in vitro DNA synthesis on cis-diamminedichloroplatinum(II) treated single-stranded DNA: a comparison between E. coli DNA polymerase I and eucaryotic DNA polymerases alpha.* *Nucleic Acids Res.*, **1988**. 16: 4407 – 4418.
  69. Comess K.M., Burstyn J.N., Essigmann J.M., Lippard S.J., *Replication inhibition and translesion synthesis on templates containing site-specifically placed cis-diamminedichloroplatinum(II) DNA adducts.* *Biochemistry*, **1992**. 31: 3975 – 3990.
  70. Sorenson C.M., Eastman A., *Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced cytotoxicity: role of G2 arrest and DNA double-strand breaks.* *Cancer Res.*, **1988**. 48: 4484 – 4488.
  71. Sorenson C.M., Eastman A., *Influence of cis-diamminedichloroplatinum(II) on DNA synthesis and cell cycle progression in excision repair proficient and deficient Chinese hamster ovary cells.* *Cancer Res.*, **1988**. 48: 6703 – 6707.
  72. Lemaire M.A., Schwartz A., Rahmouni A.R., Leng M., *Interstrand cross-links are preferentially formed at the d(GC) sites in the reaction between cis-diamminedichloroplatinum (II) and DNA.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1991**. 88: 1982 – 1985.
  73. Brabec V., Leng M., *DNA interstrand cross-links of trans-diamminedichloroplatinum(II) are preferentially formed between guanine and complementary cytosine residues.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1993**. 90: 5345 – 5349.
  74. Corda A., Job C., Anin M.F., Leng M., Job D., *Spectrum of DNA-platinum adduct recognition by prokaryotic and eukaryotic DNA-dependent RNA polymerases.* *Biochemistry*, **1993**. 32: 8582 – 8588.

75. Moyzis R.K., Buckingham J.M., Cram L.S., Dani M., Deaven L.L., Jones M.D., Meyne J., Ratliff R.L., Wu J.R., *A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **1988**. 85: 6622 – 6626.
76. Meyne J., Ratliff R.L., Moyzis R.K., *Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> among vertebrates.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **1989**. 86: 7049 – 7053.
77. Counter C.M., *The roles of telomeres and telomerase in cell life span.* Mutant. Res., **1996**. 366: 45 – 63.
78. Allsopp R.C., Vaziri H., Patterson C., Goldstein S., Younglai E.V., Futcher A.B., Greider C.W., Harley C.B., *Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **1992**. 89: 10114 – 10118.
79. Harley C.B., Futcher A.B., Greider C.W., *Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts.* Nature, **1990**. 345: 458 – 460.
80. Levy M.Z., Allsopp R.C., Futcher A.B., Greider C.W., Harley C.B., *Telomere end-replication problem and cell aging.* J. Mol. Biol., **1992**. 225: 951 – 960.
81. Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R., Harley C.B., West M.D., Ho P.L., Coviello G.M., Wright W.E., Weinrich S.L., Shay J.W., *Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer.* Science, **1994**. 266: 2011 – 2015.
82. Bednarek A., Budunova I., Slaga T.J., Aldaz C.M., *Increased telomerase activity in mouse skin premalignant progression.* Cancer Res., **1995**. 55: 4566 – 4569.
83. Chadeneau C., Hay K., Hirte H.W., Gallinger S., Bacchetti S., *Telomerase activity associated with acquisition of malignancy in human colorectal cancer.* Cancer Res., **1995**. 55: 2533 – 2536.
84. Ishibashi T., Lippard S.J., *Telomere loss in cells treated with cisplatin.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **1998**. 95: 4219 – 4223.
85. Wyllie A.H., *Apoptosis: cell death in tissue regulation.* J. Pathol., **1987**. 153: 313 – 316.
86. Pil P.M., Lippard S.J., *Specific binding of chromosomal protein HMG1 to DNA damaged by the anticancer drug cisplatin.* Science, **1992**. 256: 234 – 237.
87. Bustin M., Reeves R., *High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function.* Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., **1996**. 54: 35 – 100.
88. Grosschedl R., Giese K., Pagel J., *HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures.* Trends Genet., **1994**. 10: 94 – 100.
89. Thomas J.O., *HMG1 and 2: architectural DNA-binding proteins.* Biochem. Soc. Trans., **2001**. 29: 395 – 401.
90. Ohndorf U.M., Rould M.A., He Q., Pabo C.O., Lippard S.J., *Basis for recognition of cisplatin-modified DNA by high-mobility-group proteins.* Nature, **1999**. 399: 708 – 712.
91. Stros M., *Two mutations of basic residues within the N-terminus of HMG-1 B domain with different effects on DNA supercoiling and binding to bent DNA.* Biochemistry, **2001**. 40: 4769 – 4779.
92. Kasparikova J., Brabec V., *Recognition of DNA interstrand cross-links of cis-diamminedichloroplatinum(II) and its trans isomer by DNA-binding proteins.* Biochemistry, **1995**. 34: 12379 – 12387.
93. McANulty M.M., Lippard S.J., *The HMG-domain protein Ixr1 blocks excision repair of cisplatin-DNA adducts in yeast.* Mutat. Res., **1996**. 362: 75 – 86.
94. Zamble D.B., Lippard S.J., *The response of Cellular Proteins to Cisplatin-Damaged DNA in Cisplatin – Chemistry and Biochemistry of a Leading anticancer Drug*, ed. Lippert B., **1999**, VHCA, Wiley-VCH: Zurich, Weinheim.
95. Vichi P., Coin F., Renaud J.P., Vermeulen W., Hoeijmakers J.H., Moras D., Egly J.M., *Cisplatin- and UV-damaged DNA lure the basal transcription factor TFIID/TBP.* EMBO J., **1997**. 16: 7444 – 7456.
96. Coin F., Frit P., Viollet B., Salles B., Egly J.M., *TATA binding protein discriminates between different lesions on DNA, resulting in a transcription decrease.* Mol. Cell Biol.,

- 1998.** 18: 3907 – 3914.
97. Ise T., Nagatani G., Imamura T., Kato K., Takano H., Nomoto M., Izumi H., Ohmori H., Okamoto T., Ohga T., Uchiumi T., Kuwano M., Kohno K., *Transcription factor Y-box binding protein 1 binds preferentially to cisplatin-modified DNA and interacts with proliferating cell nuclear antigen.* *Cancer Res.*, **1999.** 59: 342 – 346.
  98. Hasegawa S.L., Doetsch P.W., Hamilton K.K., Martin A.M., Okenquist S.A., Lenz J., Boss J.M., *DNA binding properties of YB-1 and dbpA: binding to double-stranded, single-stranded, and abasic site containing DNAs.* *Nucleic Acids Res.*, **1991.** 19: 4915 – 4920.
  99. Yaneva J., Leuba S.H., van Holde K., Zlatanova J., *The major chromatin protein histone H1 binds preferentially to cis-platinum-damaged DNA.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1997.** 94: 13448 – 13451.
  100. Chu G., *Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair.* *J. Biol. Chem.*, **1994.** 269: 787 – 790.
  101. Wood R.D., *Nucleotide excision repair in mammalian cells.* *J. Biol. Chem.*, **1997.** 272: 23465 – 23468.
  102. Zamble D.B., Mu D., Reardon J.T., Sancar A., Lippard S.J., *Repair of cisplatin - DNA adducts by the mammalian excision nuclease.* *Biochemistry*, **1996.** 35: 10004 – 10013.
  103. Sancar A., *Excision repair in mammalian cells.* *J. Biol. Chem.*, **1995.** 270: 15915 – 15918.
  104. Sugasawa K., Ng J.M., Masutani C., Iwai S., van der Spek P.J., Eker A.P., Hanaoka F., Bootsma D., Hoeijmakers J.H., *Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair.* *Mol. Cell*, **1998.** 2: 223 – 232.
  105. Wakasugi M., Sancar A., *Order of assembly of human DNA repair excision nuclease.* *J. Biol. Chem.*, **1999.** 274: 18759 – 18768.
  106. Sancar A., *DNA exciton repair.* *Annu. Rev. Biochem.*, **1996.** 65: 43 – 81.
  107. Eastman A., *Cross-linking of glutathione to DNA by cancer chemotherapeutic platinum coordination complexes.* *Chem. Biol. Interact.*, **1987.** 61: 241 – 248.
  108. Batist G., Behrens B.C., Makuch R., Hamilton T.C., Katki A.G., Louie K.G., Myers C.E., Ozols R.F., *Serial determinations of glutathione levels and glutathione-related enzyme activities in human tumor cells in vitro.* *Biochem. Pharmacol.*, **1986.** 35: 2257 – 2259.
  109. Andrews P.A., Murphy M.P., Howell S.B., *Differential potentiation of alkylating and platinating agent cytotoxicity in human ovarian carcinoma cells by glutathione depletion.* *Cancer Res.*, **1985.** 45: 6250 – 6253.
  110. Richon V.M., Schulte N., Eastman A., *Multiple mechanisms of resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II) in murine leukemia L1210 cells.* *Cancer Res.*, **1987.** 47: 2056 – 2061.
  111. Hromas R.A., Andrews P.A., Murphy M.P., Burns C.P., *Glutathione depletion reverses cisplatin resistance in murine L1210 leukemia cells.* *Cancer Lett.*, **1987.** 34: 9 – 13.
  112. Fram R.J., Woda B.A., Wilson J.M., Robichaud N., *Characterization of acquired resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) in BE human colon carcinoma cells.* *Cancer Res.*, **1990.** 50: 72 – 77.
  113. Kelland L.R., Mistry P., Abel G., Freidlos F., Loh S.Y., Roberts J.J., Harrap K.R., *Establishment and characterization of an in vitro model of acquired resistance to cisplatin in a human testicular nonseminomatous germ cell line.* *Cancer Res.*, **1992.** 52: 1710 – 1716.
  114. Kelley S.L., Basu A., Teicher B.A., Hacker M.P., Hamer D.H., Lazo J.S., *Overexpression of metallothionein confers resistance to anticancer drugs.* *Science*, **1988.** 241: 1813 – 1815.
  115. Perez R.P., *Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance.* *Eur. J. Cencer*, **1998.** 34: 1535 – 1542.
  116. Mamenta E.L., Poma E.E., Kaufmann W.K., Delmastro D.A., Grady H.L., Chaney S.G.,



- Enhanced replicative bypass of platinum-DNA adducts in cisplatin-resistant human ovarian carcinoma cell lines.* *Cancer Res.*, **1994**. 54: 3500 – 3505.
117. Gibbons G.R., Kaufmann W.K., Chaney S.G., *Role of DNA replication in carrier-ligand-specific resistance to platinum compounds in L1210 cells.* *Carcinogenesis*, **1991**. 12: 2253 – 2257.
  118. Johnson S.W., Swiggard P.A., Handel L.M., Brennan J.M., Godwin A.K., Ozols R.F., Hamilton T.C., *Relationship between platinum-DNA adduct formation and removal and cisplatin cytotoxicity in cisplatin-sensitive and -resistant human ovarian cancer cells.* *Cancer Res.*, **1994**. 54: 5911 – 5916.
  119. Johnson S.W., Laub P.B., Beesley J.S., Ozols R.F., Hamilton T.C., *Increased platinum-DNA damage tolerance is associated with cisplatin resistance and cross-resistance to various chemotherapeutic agents in unrelated human ovarian cancer cell lines.* *Cancer Res.*, **1997**. 57: 850 – 856.
  120. Riva C.M., *Restoration of wild-type p53 activity enhances the sensitivity of pleural metastasis to cisplatin through an apoptotic mechanism.* *Anticancer Res.*, **2000**. 20: 4463 – 4471.
  121. Jordan P., Carmo-Fonseca M., *Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity.* *Cell. Mol. Life Sci.*, **2000**. 57: 1229 – 1235.
  122. Janus F., Albrechtsen N., Dornreiter I., Wiesmüller L., Grosse F., Deppert W., *The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity.* *Cell. Mol. Life Sci.*, **1999**. 55: 12 – 27.
  123. Levine A.J., *p53, the cellular gatekeeper for growth and division.* *Cell*, **1997**. 88: 323 – 331.
  124. Agarwal M.L., Taylor W.R., Chernov M.V., Chernova O.B., Stark G.R., *The p53 network.* *J. Biol. Chem.*, **1998**. 273: 1 – 4.
  125. O'Connor P.M., Jackman J., Bae I., Myers T.G., Fan S., Mutoh M., Scudiero D.A., Monks A., Sausville E.A., Weinstein J.N., Friend S., Fornace A.J. Jr., Kohn K.W., *Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents.* *Cancer Res.*, **1997**. 57: 4285 – 4300.
  126. Brabec V., Kasparova J., *DNA Interactions of Novel Platinum Anticancer Drugs in DNA and RNA Binders: From small Molecules to Drugs*, ed. Demeunynck M., Bailly C., Wilson D., Wiley-VCH, Weinheim, **2003**, 178 – 223.
  127. Pratesi G., Perego P., Polizzi D., Righetti S.C., Supino R., Caserini C., Manzotti C., Giuliani F.C., Pezzoni G., Tognella S., Spinelli S., Farrell N., Zunino F., *A novel charged trinuclear platinum complex effective against cisplatin-resistant tumours: hypersensitivity of p53-mutant human tumour xenografts.* *Br. J. Cancer*, **1999**. 80: 1912 – 1919.
  128. Roberts J.D., Peroutka J., Beggiolin G., Manzotti C., Piazzoni L., Farrell N., *Comparison of cytotoxicity and cellular accumulation of polynuclear platinum complexes in L1210 murine leukemia cell lines.* *J. Inorg. Biochem.*, **1999**. 77: 47 – 50.
  129. Roberts J.D., Peroutka J., Farrell N., *Cellular pharmacology of polynuclear platinum anti-cancer agents.* *J. Inorg. Biochem.*, **1999**. 77: 51 – 57.
  130. Perego P., Caserini C., Gatti L., Carenini N., Romanelli S., Supino R., Colangelo D., Viano I., Leone R., Spinelli S., Pezzoni G., Manzotti C., Farrell N., Zunino F., *A novel trinuclear platinum complex overcomes cisplatin resistance in an osteosarcoma cell system.* *Mol. Pharmacol.*, **1999**. 55: 528 – 534.
  131. Farrel N., Qu Y., Bierbach U., Valsecchi M., Menta E., *Structure-activity relationship within di- and trinuclear platinum phase I clinical agents in Cisplatin.* *Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, ed. Lippert B., VHCA, Wiley-VCH, Zurich, Weinheim, **1999**, 479 – 496.
  132. Farrell N., Appleton T.G., Qu Y., Roberts J.D., Fontes A.P., Skov K.A., Wu P., Zou Y., *Effects of geometric isomerism and ligand substitution in bifunctional dinuclear*

- platinum complexes on binding properties and conformational changes in DNA.* Biochemistry, **1995**. 34: 15480 – 15486.
133. Zaludová R., Záková A., Kasparková J., Balcarová Z., Kleinwächter V., Vrána O., Farrell N., Brabec V., *DNA interactions of bifunctional dinuclear platinum(II) antitumor agents.* Eur. J. Biochem., **1997**. 246: 508 – 517.
134. Kaspárková J., Mellish K.J., Qu Y., Brabec V., Farrell N., *Site-specific d(GpG) intrastrand cross-links formed by dinuclear platinum complexes. Bending and NMR studies.* Biochemistry, **1996**. 35: 16705 – 16713.
135. Mellish K.J., Qu Y., Scarsdale N., Farrell N., *Effect of geometric isomerism in dinuclear platinum antitumor complexes on the rate of formation and structure of intrastrand adducts with oligonucleotides.* Nucleic Acids Res., **1997**. 25: 1265 – 1271.
136. Marini V., Kasparkova J., Novakova O., Monsú Scolaro L., Romeo R., Brabec V., *Biophysical analysis of natural, double-helical DNA modified by a dinuclear platinum(II) organometallic compound in a cell-free medium.* J. Biol. Inorg. Chem., **2002**. 7: 725 – 734.
137. Kasparkova J., Novaková O., Vrana O., Farrell N., Brabec V., *Effect of geometric isomerism in dinuclear platinum antitumor complexes on DNA interstrand cross-linking.* Biochemistry, **1999**. 38: 10997 – 11005.
138. Kasparkova J., Farrell N., Brabec V., *Sequence specificity, conformation, and recognition by HMG1 protein of major DNA interstrand cross-links of antitumor dinuclear platinum complexes.* J. Biol. Chem., **2000**. 275: 15789 – 15798.
139. Brabec V., Kaspárková J., Vrána O., Nováková O., Cox J.W., Qu Y., Farrell N., *DNA modifications by a novel bifunctional trinuclear platinum phase I anticancer agent.* Biochemistry, **1999**. 38: 6781 – 6790.
140. Zehnulova J., Kasparkova J., Farrell N., Brabec V., *Conformation, recognition by high mobility group domain proteins, and nucleotide excision repair of DNA intrastrand cross-links of novel antitumor trinuclear platinum complex BBR3464.* J. Biol. Chem., **2001**. 276: 22191 – 22199.
141. Kasparkova J., Zehnulova J., Farrell N., Brabec V., *DNA interstrand cross-links of the novel antitumor trinuclear platinum complex BBR3464. Conformation, recognition by high mobility group domain proteins, and nucleotide excision repair.* J. Biol. Chem., **2002**. 277: 48076 – 48086.
142. el-Deiry W.S., Kern S.E., Pietenpol J.A., Kinzler K.W., Vogelstein B., *Definition of a consensus binding site for p53.* Nat. Genet., **1992**. 1: 45 – 49.
143. Kasparkova J., Fojta M., Farrell N., Brabec V., *Differential recognition by the tumor suppressor protein p53 of DNA modified by the novel antitumor trinuclear platinum drug BBR3464 and cisplatin.* Nucleic Acids Res., **2004**. 32: 5546 – 5552.
144. Menta E., Farrell N., Valsecchi M., Conti M., Piazzoni L., Randisi E., Manzotti L., Pezzoni G., Spinelli S., ISPCC'99, P13, **1999**.
145. Manzotti C., Pratesi G., Menta E., Di Domenico R., Cavalletti E., Fiebig H.H., Kelland L.R., Farrell N., Polizzi D., Supino R., Pezzoni G., Zunino F., *BBR 3464: a novel triplatinum complex, exhibiting a preclinical profile of antitumor efficacy different from cisplatin.* Clin. Cancer Res., **2000**. 6: 2626 – 2634.
146. Johnson A., Qu Y., Van Houten B., Farrell N., *B-Z DNA conformational changes induced by a family of dinuclear bis(platinum) complexes.* Nucleic Acids Res., **1992**. 20: 1697 – 1703.
147. Wheate N.J., Collins J.G., *A 1H NMR study of the oligonucleotide binding of [(en)Pt(mu-dpzm)2Pt(en)]Cl4.* J. Inorg. Biochem., **2000**. 78: 313 – 320.
148. Wheate N.J., Webster L.K., Brodie C.R., Collins J.G., *Synthesis, DNA binding and cytotoxicity of isohelical DNA groove binding platinum complexes.* Anticancer Drug Des., **2000**. 313 – 322.
149. McGregor T.D., Balcarová Z., Qu Y., Tran M.C., Zaludová R., Brabec V., Farrell N., *Sequence-dependent conformational changes in DNA induced by polynuclear platinum*

- complexes*. J. Inorg. Biochem., **1999**. 77: 43 – 46.
150. Wu P.K., Kharatishvili M., Qu Y., Farrell N. *A circular dichroism study of ethidium bromide binding to Z-DNA induced by dinuclear platinum complexes*. J. Inorg. Biochem., **1996**. 63: 9 – 18.
  151. McGregor T.D., Bousfield W., Qu Y., Farrell N., *Circular dichroism study of the irreversibility of conformational changes induced by polyamine-linked dinuclear platinum compounds*. J. Inorg. Biochem., **2002**. 91: 212 – 219.
  152. Farrell N., *DNA Binding and Chemistry of Dinuclear Platinum Complexes*. Comments Inorg. Chem., **1995**. 16: 373 – 389.
  153. Kloster M.B., Hannis J.C., Muddiman D.C., Farrell N., *Consequences of nucleic acid conformation on the binding of a trinuclear platinum drug*. Biochemistry, **1999**. 38: 14731 – 14737.
  154. Sadler P.J., Barnham K.J., Berners-Price S.J., Frey U., *Kinetic Analysis of the Stepwise Platination of Single- and Double-Stranded GG Oligonucleotides with Cisplatin and cis-[PtCl(H<sub>2</sub>O)(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>*. Chem. Eur. J., **1996**. 2: 1283 – 1291.
  155. Wheate N.J., Ph.D. Thesis, University of New South Wales, Canberra, **2001**.
  156. Cox J.W., Berners-Price S.J., Davies M.S., Qu Y., Farrell N., *Kinetic analysis of the stepwise formation of a long-range DNA interstrand cross-link by a dinuclear platinum antitumor complex: evidence for aquated intermediates and formation of both kinetically and thermodynamically controlled conformers*. J. Am. Chem. Soc., **2001**. 123: 1316 – 1326.
  157. Reeder F., Guo Z., Murdoch P.D., Corazza A., Hambley T.W., Berners-Price S.J., Chottard J.C., Sadler P.J., *Platination of a GG site on single-stranded and double-stranded forms of a 14-base oligonucleotide with diaqua cisplatin followed by NMR and HPLC -- influence of the platinum ligands and base sequence on 5'-G versus 3'-G platination selectivity*. Eur. J. Biochem., **1997**. 249: 370 – 382.
  158. Davies M.S., Thomas D.S., Hegmans A., Berners-Price S.J., Farrell N., *Kinetic and equilibria studies of the aquation of the trinuclear platinum phase II anticancer agent [(trans-PtCl(NH<sub>3</sub>)(2))(2)(μ-trans-Pt(NH<sub>3</sub>)(2)(NH<sub>2</sub>)(CH<sub>2</sub>)(6)NH<sub>2</sub>)(2))](4+)* (BBR3464). Inorg. Chem., **2002**. 41: 1101 – 1109.
  159. Hegmans A., Berners-Price S.J., Davies M.S., Thomas D.S., Humphreys A.S., Farrell N., *Long range 1,4 and 1,6-interstrand cross-links formed by a trinuclear platinum complex. Minor groove preassociation affects kinetics and mechanism of cross-link formation as well as adduct structure*. J. Am. Chem. Soc., **2004**. 126: 2166 – 2180.
  160. Qu Y., Scarsdale N.J., Tran M.C., Farrell N.P., *Cooperative effects in long-range 1,4 DNA-DNA interstrand cross-links formed by polynuclear platinum complexes: an unexpected syn orientation of adenine bases outside the binding sites*. J. Biol. Inorg. Chem., **2003**. 8: 19 – 28.
  161. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, **1989**.
  162. Pingoud A., Urbanke C., Hoggett J., Jeltsch A., *Biochemical Methods*. Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
  163. Zhen W., Link C.J. Jr., O'Connor P.M., Reed E., Parker R., Howell S.B., Bohr V.A., *Increased gene-specific repair of cisplatin interstrand cross-links in cisplatin-resistant human ovarian cancer cell lines*. Mol. Cell Biol., **1992**. 12: 3689 – 3698.
  164. Mellon I., Bohr V.A., Smith C.A., Hanawalt P.C., *Preferential DNA repair of an active gene in human cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **1986**. 83: 8878 – 8882.
  165. Cullinane C., Cutts S.M., Panousis C., Phillips D.R., *Interstrand cross-linking by adriamycin in nuclear and mitochondrial DNA of MCF-7 cells*. Nucleic Acids Res., **2000**. 28: 1019 – 1025.
  166. Shahin S., Cullinane C., Gray P.J., *Mitochondrial and nuclear DNA damage induced by sulphur mustard in keratinocytes*. Chem. Biol. Interact., **2001**. 138: 231 – 245.
  167. Moufarij M.A., Phillips D.R., Cullinane C., *Gemcitabine potentiates cisplatin*

- cytotoxicity and inhibits repair of cisplatin-DNA damage in ovarian cancer cell lines.* Mol. Pharmacol., **2003**. 63: 862 – 869.
168. Vincze T., Posfai J., Roberts R.J., *NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes.* Nucleic Acids Res., **2003**. 31: 3688 – 3691.
169. [www.riedlab.nci.nih.gov/publications/DNA](http://www.riedlab.nci.nih.gov/publications/DNA), **2004**.
170. QIAGEN Genomic DNA Handbook, **2001**. [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
171. <http://www.plantbiology.siu.edu/PLB479/images/Southern.gif>, **2011**.
172. Model 785 Vacuum Blotter, Instruction Manual, BIO-RAD, **2000**. [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com).
173. Wizard<sup>®</sup>SV Gel and PCR Clean-Up System, Quick Protokol, PROMEGA, **2005**. [www.promega.com](http://www.promega.com).
174. <http://whhrneqy.blogspot.com/2011/04/nucleic-acid-probe.html>, **2011**.
175. <http://www.koreanbio.org/Biocourse/images/1/1b/Southern.gif>, **2011**.
176. [http://www.ambion.com/techlib/tb/tb\\_157.html](http://www.ambion.com/techlib/tb/tb_157.html), **2011**.

