

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Oddělení buněčné biologie

Centrum regionu Haná pro biotechnologický výzkum a zemědělský výzkum



## **Inhibice transkripce indukovaná vybranými protinádorově účinnými komplexy platiny v lidských nádorových buňkách**

### **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Monika Trtíková</b>
Studijní program:	N0512A130007 Biotechnologie a genové inženýrství
Specializace:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Jitka Prachařová, Ph.D.</b>
Rok:	2021

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval/a samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl/a jsem seznámen/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne .....

... *podpis diplomanta*

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Monika Trtíková
Název práce	Inhibice transkripce indukovaná vybranými protinádorově účinnými komplexy platiny v lidských nádorových buňkách
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biofyziky
Vedoucí práce	Mgr. Jitka Prachařová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021

### Abstrakt

Platinové komplexy jako je cisplatina se mohou vázat na DNA za tvorby různých typů aduktů např. vnitrořetězcových či meziřetězcových můstků. V případě, že tyto léze nejsou odstraněny opravnými buněčnými mechanismy, může docházet mimo jiné k inhibici replikace a transkripce, v konečném důsledku pak až k induci programované buněčné smrti. Tohoto faktu se využívá v medicíně, protože můstky a další adukty platinových léčiv vznikají hlavně v rychle se dělících buňkách včetně nádorových. Cisplatinu a její analoga lze tedy použít k léčbě některých typů rakoviny. I přes vysokou protinádorovou účinnost má léčba uvedenými platinovými sloučeninami své nevýhody a omezení, proto jsou syntetizovány a testovány nové potenciální protinádorové léky a zkoumán jejich mechanismus účinku. Cílem diplomové práce bylo studovat vliv kovových komplexů s protinádorovým účinkem, konkrétně cisplatiny a BBR3464, na inhibici transkripce v lidských nádorových buňkách. Inhibice transkripce byla měřena pomocí luciferázového reportérového testu na buněčné linii A2780 transfekované plasmidem pCMV-Gluc2 globálně modifikovaným výše zmíněnými látkami. Bylo zjištěno, že komplex BBR3464 inhibuje transkripci více než cisplatina. BBR3464 může tvořit jiné typy aduktů, které zřejmě představují větší blok pro RNA polymerázu a jsou buňkou hůře opravitelné, proto je inhibice transkripce ve srovnání s mononukleární cisplatinou mnohem vyšší. Inhibice transkripce tedy představuje důležitý základ mechanismu biologického účinku látky BBR3464, která je kandidátem pro využití v protinádorové terapii.

Klíčová slova	cisplatina, inhibice transkripce, luciferázový test
Počet stran	60
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Monika Trtíková
Title	Transcription inhibition induced by selected anticancer platinum complexes in human cancer cells
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biophysics
Supervisor	Mgr. Jitka Prachařová, Ph.D.
The year of presentation	2021

### Abstract

Platinum complexes like cisplatin can bind to DNA and form various types of adducts, e.g. intrastrand or interstrand crosslinks. If these lesions are not removed or repaired by cellular mechanisms, it can inhibit replication and transcription. This mechanism can be used in medicine, where crosslinks and other platinum drug adducts are formed mainly in rapidly dividing cells (including cancer cells). Cisplatin and its analogues are clinically used for treating some types of cancer. Despite the high antitumor efficacy, treatment with these platinum compounds has its disadvantages and limitations, due to this fact new potential antitumor drugs are synthesized and their mechanism of action is investigated. The aim of the diploma thesis was to study the effect of metal complexes with antitumor activity, namely cisplatin and BBR3464, on the inhibition of transcription in human cancer cells. Transcriptional inhibition was measured using the luciferase reporter assay on the A2780 cell line with the plasmid pCMV-Gluc2 globally modified by above mentioned substances. Inhibitory activity of BBR3464 was more profound compared to cisplatin. BBR3464 probably creates different types of adducts which block RNA polymerase more efficiently and these adducts are more difficult to repair by cellular repair mechanism, this results in higher transcriptional inhibition compared to mononuclear cisplatin. Inhibition of transcription is an important basis of mechanism of biological action of BBR3464, which is a candidate for use in antitumour therapy.

Keywords	cisplatin, inhibition of transcription, luciferase assay
Number of pages	60
Number of appendices	0
Language	Czech

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala Mgr. Jitce Prachařové, Ph.D. za odborné vedení, milý přístup, cenné rady a zkušenosti při vypracování této diplomové práce.

## SEZNAM ZKRATEK

A2780 - buňky lidského ovariálního karcinomu

ABC - ABC transportní protein (odvozeno od ATP Binding Cassette)

AMP - adenosinmonofosfát

ATB - antibiotika

ATP - adenosintrifosfát

cDDP - cisplatina

CDK - cyklin dependentní kináza

CTR1/2 - transportéry pro ionty mědi (odvozeno od copper transporter receptor 1/2)

DACH ligand - (1R, 2R) -1,2-diaminocyklohexanu

DNA - deoxyribonukleová kyselina

EDTA - kyselina ethylendiamintetraoctová

FAAS - bezplamenná atomová absorpční spektrometrie

FBS - fetální hovězí sérum

GSH - glutathion

H3 - typ histonu

HMG proteiny - skupina chromozomálních proteinů (odvozeno od High Mobility Group)

IAC - vnitřetězcový můstek (odvozeno od intrastrand crosslink)

IEC - meziřetězcový můstek (odvozeno od interstrand crosslink)

mRNA - mediátorová RNA

OTC1 a 2 – transportéry organických kationtů (odvozeno od organic cation transporter 1 a 2)

PBS - fosfátový pufr (odvozeno od phosphate buffered saline)

Pt-DNA – adukty cisplatina-DNA

$r_b$  - počet aduktů testovaných sloučenin skutečně navázaných na jednu bázi DNA

RNA - ribonukleová kyselina

$r_i$  - počet atomů platiny teoreticky navázaných na jednu bázi DNA



rRNA - ribozomální RNA

RPMI - kultivační médium pro buňky A2780

TBP - TATA-vazebný protein

TF - transkripční faktor

TPL - triptolid

tRNA – transferová RNA

# Obsah

<b>1. ÚVOD</b> .....	13
<b>2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	14
2.1 Komplexy platiny v terapii rakoviny .....	14
2.1.1 Cisplatina .....	14
2.1.2 Karboplatina.....	20
2.1.3 Oxaliplatina.....	21
2.1.4 Polynukleární komplex platiny .....	21
2.2 Molekulární mechanismus účinku platinových metalofarmak .....	23
2.2.1 Inhibice replikace DNA .....	23
2.2.2 Inhibice telomerázové aktivity.....	24
2.3 Inhibice transkripce.....	26
2.3.1 Transkripce .....	26
2.3.2 Transkripční cyklus RNA-polymerázy II.....	27
2.3.3 Mechanismy inhibice transkripce cisplatinou.....	29
2.3.4 Další látky ovlivňující transkripci.....	31
<b>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	33
3.1 Materiál.....	33
3.1.1 Biologický materiál a chemikálie.....	33
3.1.2 Platinové komplexy.....	33
3.1.3 Použité roztoky .....	33
3.1.4 Přístroje, pomůcky, software .....	34
3.2 Metody .....	35
3.2.1 Modifikace plasmidové DNA .....	35
3.2.2 Kultivace nádorových buněk .....	36
3.2.3 Počítání buněk.....	37
3.2.4 Synchronizace buněk a příprava kultury pro transfekci.....	38
3.2.5 Lipofekce buněk.....	39
3.2.6 Optimalizace nového luminometru a optimalizace média pro měření.....	40
3.2.7 Luciferázový test.....	41
<b>4. VÝSLEDKY</b> .....	43
4.1 Výsledky optimalizace modulárního readeru a média pro měření.....	43
4.2 Výsledky luciferázového testu.....	44
<b>5. DISKUZE</b> .....	52



## **CÍLE PRÁCE**

Shromáždit nejnovější informace k tématu práce z odborné literatury.

Shrnout získané poznatky ve formě literární rešerše.

Studovat vliv cisplatiny a polynukleárního platinového komplexu BBR3464 s protinádorovým účinkem na inhibici transkripce v lidských nádorových buňkách.

Porovnat získané výsledky s údaji dostupnými v odborné literatuře.

## 1. ÚVOD

Moderní medicína dokáže v současném světě opravdu neuvěřitelné věci, o kterých se lidem před pár desítkami let mohlo nechat jen zdát. I přesto, že průměrný věk se stále zvyšuje a životní úroveň roste, doprovází lidstvo mnoho civilizačních chorob. Mezi nejrozšířenější civilizační choroby patří i rakovina. Dříve byla rakovina neléčitelné onemocnění, ale s nástupem chemoterapie, radioterapie a dalších způsobů léčby se rakovina stala do jisté míry léčitelnou, případně byly objeveny alespoň přístupy schopné prodloužit život pacienta s rakovinou až o několik let. V minulosti byla např. rakovina varlat smrtelnou nemocí, ale poté, co byla objevena cisplatina, se tento typ rakoviny stal dobře léčitelným. Ovšem ne vždy má cisplatina, tak dobré výsledky jako právě u rakoviny varlat. Stále existují druhy rakoviny, u kterých je cislatina neúčinná. U některých nádorů pak dochází k vzniku rezistence při opakovaném podání cisplatinu. Nádorové buňky mohou být také přirozeně rezistentní k tomuto léčivu nebo se vyskytnou závažné vedlejší účinky na organismus pacienta spojené právě s podáním zmíněné látky.

Samotná léčba nádorového onemocnění představuje pro organismus velkou psychickou i fyzickou zátěž. Výzkumníci se tedy snaží o vývoj nových látek, které by byly při léčbě efektivnější, vykazovaly širší spektrum působení či ideálně fungovaly u i doposud nevléčitelných nádorů a měly méně nebo žádné vedlejší účinky. K přiblížení se takovému cíli je klíčové dobře prozkoumat mechanismus biologického působení stávajících i nových látek.

Předmětem diplomové práce bylo zkoumat vliv polynukleárního platinového komplexu BBR3464 na inhibici transkripce v lidských nádorových buňkách s využitím luciferázového testu. Pro srovnání byl stejný experiment proveden také s klinicky využívanou cisplatinou, jejíž adukty na DNA mohou inhibici transkripce způsobovat. V rámci této diplomové práce byla porovnávána efektivita inhibice transkripce těchto dvou sloučenin a bylo studováno, zda je tedy inhibice transkripce také důležitým základem mechanismu protinádorového působení látky BBR3464.

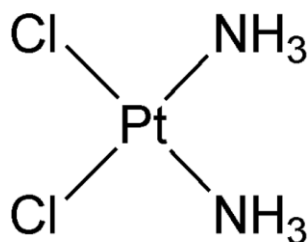
## 2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Komplexy platiny v terapii rakoviny

Metalofarmaka, konkrétně zejména komplexy platiny, se běžně používají v klinické praxi při léčbě různých typů rakoviny. Nejpoužívanějším metalofarmakem je známá a velice dobře prostudovaná cisplatina. I přes velikou protinádorovou účinnost má tato látka některé nevýhody a omezení, proto jsou syntetizována a testována další potenciální léčiva, jež by měla širší spektrum působení, stejnou nebo vyšší účinnost a zároveň vykazovala méně nežádoucích vedlejších účinků než cisplatina. V následujících kapitolách jsou přehledně shrnuty informace o struktuře, vlastnostech a využití cisplatiny a dalších látek na bázi platiny, které jsou používány v protinádorové terapii nebo testovány pro možnost tohoto uplatnění.

#### 2.1.1 Cisplatina

Cisplatina nebo *cis*-diammindichloroplatinatý komplex (cDDP) je malá a jednoduchá molekula složená z jednoho atomu platiny, na který jsou navázané dvě aminoskupiny a dva atomy chloru (obr. 1). Tento komplex byl prvním cytostatikem založeným na bázi platiny. Cisplatina byla syntetizována již v roce 1845, ale její schopnost zastavovat buněčné dělení byla objevena náhodně až v roce 1965 biofyzikem Barnettem Rosenbergem. Ten původně zkoumal vliv elektrického pole na růst a dělení bakterií *Escherichia coli*. Při tomto experimentu vložil do živného roztoku, ve kterém byly amonné soli, platinové elektrody. Při zapnutí elektrického napětí se zastavilo dělení *E. coli*, avšak buňky stále rostly. Takto vznikala dlouhá filamenta odlišná od běžných, normálně se dělících, bakteriálních buněk. Později bylo zjištěno, že filamentózní růst bakterií byl zapříčiněn působením sloučenin platiny podobných cisplatině, které vznikaly během elektrolýzy. Díky tomuto zjištění Rosenberga napadlo, že sloučeniny platiny by mohly potlačovat kromě bakteriálních také dělení nádorových buněk a v konečném důsledku tedy potlačit růst nádorů (Rosenberg *et al.*, 1965; Rosenberg *et al.*, 1969). Tato hypotéza byla potvrzena až roku 1968 na jiném pracovišti při testování účinnosti cisplatiny na nádorech u myší, kdy docházelo k regresím těchto nádorů. Následovaly další výzkumy mechanismu účinků cDDP, jež se nakonec dostala až do klinických testů jako možné protinádorové léčivo. Klinické zkoušky byly zahájeny v roce 1971 a koncem 70. let se cisplatina začala používat v klinické praxi pro léčbu nádorů (Kelland, 2007).



Obr. 1 Strukturální vzorec cisplatiny.

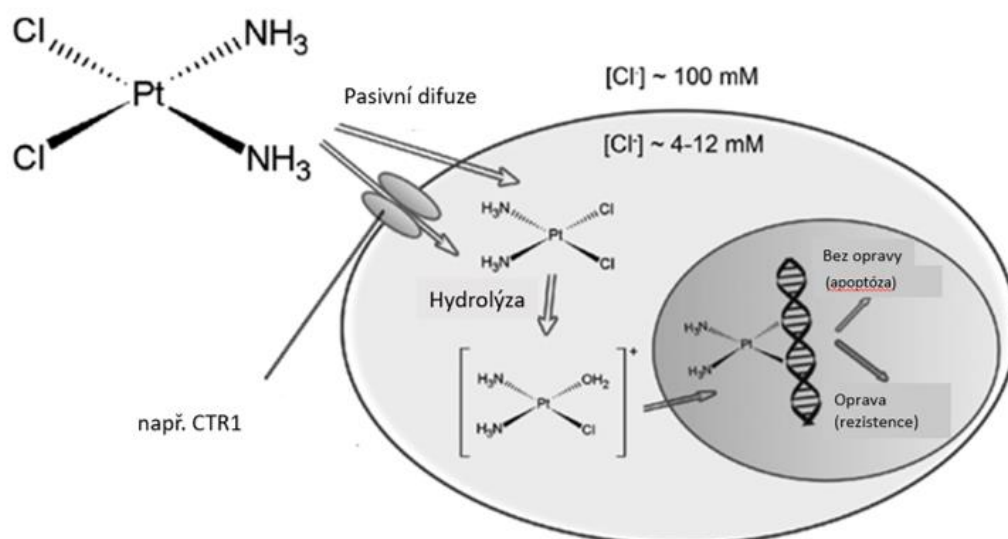
Jak už bylo řečeno, cisplatina je protinádorové léčivo široce používané k léčbě několika typů rakoviny, zejména nádorů varlat, vaječníků, hlavy a krku nebo některých plicních karcinomů. Navzdory pozoruhodné účinnosti je s jejím používáním spojeno několik nevýhod. Některé nádory vykazují opakovaným podáním získanou rezistenci k tomuto léčivu, jiné malignity jsou k léčbě cisplatinou dokonce přirozeně rezistentní. S užíváním cisplatiny je spojeno také mnoho nežádoucích vedlejších účinků na organismus pacienta. Nejčastějšími vedlejšími účinky jsou myelotoxicita (poškození kostní dřeně), nefrotoxicita (narušení funkce ledvin), ototoxicita (ztráta vnímání zvuků o vysokých frekvencích) a další jako je zvracení, nevolnost, kožní vyrážka, poškození zažívacího traktu (Astolfi *et al.*, 2013). Cisplatina totiž v těle pacienta nepůsobí cíleně, ale postihuje veškeré buňky, zejména pak ty rychle se dělící. Kromě nádorových buněk se jedná také např. o buňky kostní dřeně, vlasové cibulky, buňky střevní výstelky a další, proto dochází k vzniku výše popsaných nežádoucích vedlejších účinků.

Limitace spojené s užíváním cisplatiny byly a stále jsou podnětem pro syntézu nových látek. Návrhy těchto látek jsou založeny na několika strategiích, z nichž nejrozšířenější jsou zejména následující přístupy: i) syntetizovat nové látky na bázi platiny tzv. cytostatika druhé a třetí generace, ii) syntetizovat látky, u kterých by došlo k nahrazení centrálního atomu platiny za jiný (např. ruthenium, osmium, iridium či galium) nebo iii) syntetizovat mnohojaderné platinové komplexy. Nezbytné je také podrobně prozkoumat a popsat mechanismus účinku léčiv již používaných. Tyto poznatky mohou sloužit jako cenný teoretický základ pro syntézu nových sloučenin. S vývojem kandidátních látek je spojeno také dlouhodobé a intenzivní testování za účelem zjištění jejich výhod a nevýhod a potenciálu pro působení na rakovinné buňky.

### **Mechanismus působení cisplatiny**

Cisplatinu je pacientům podávána intravenózně. Do krevního řečiště vstupuje v relativně nereaktivní dichloroformě. Díky tomu, že v krevním řečišti je vysoká koncentrace chloridových iontů ( $\sim 100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), tak v této formě zde cisplatinu zůstává, dokud nevstoupí do buňky. Vstup cisplatinu do buňky je umožněn nejčastěji pasivní difuzí, ale existují i důkazy, že částečně může být přenesena také aktivním transportem např. transportéry pro ionty mědi CTR1 a 2 (copper transporter receptor 1 a 2). Bylo zjištěno, že v kvasinkách a v myších embryonálních fibroblastech byla snížena hladina proteinu Ctr1, což mělo za následek sníženou absorpci cisplatinu o  $\sim 80\%$  (Ishida *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2002). Naopak různé buněčné linie nadměrně exprimující protein Ctr1 akumulovaly výrazně vyšší hladiny cisplatinu (Kuo *et al.*, 2007).

Poté, co cisplatinu vstoupí do buněčné cytoplazmy, tak dochází k výměně chloridových iontů v molekule cisplatinu za vodu, protože koncentrace chloridových iontů je zde mnohonásobně nižší ( $\sim 4 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Hydrolýzou vznikají pozitivně nabitě reaktivní mono-aqua či di-aqua formy cisplatinu. Tyto formy jsou schopné interagovat s jednotlivými buněčnými komponentami a samozřejmě také s jadernou DNA, jak je znázorněno na obr. 2 (Makovec, 2019). Kromě DNA může cDDP reagovat také např. s látkami obsahujícími síru jako metalothioneniny (především glutathion), čímž může být poškozena a inaktivována.

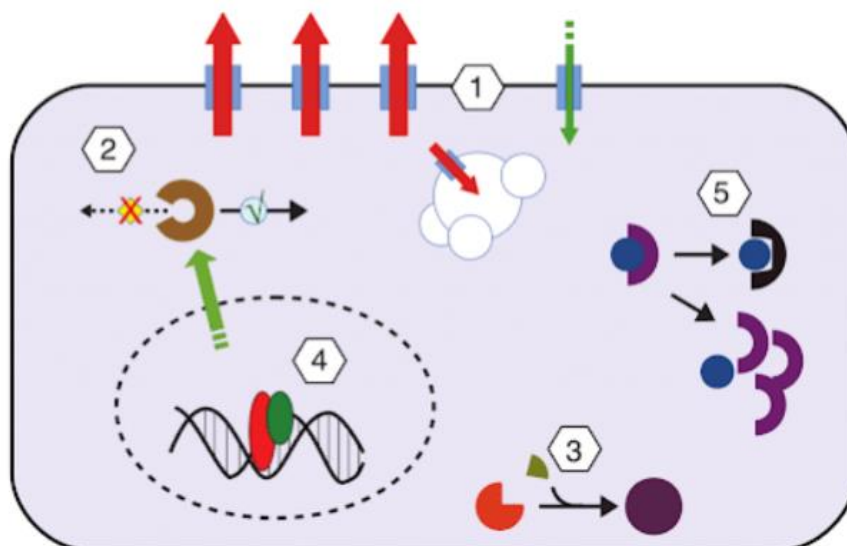


Obr. 2 Mechanismus působení cisplatinu, převzato a upraveno z Browning *et al.*, 2017.



Během podávání cDDP může docházet k vzniku rezistence nádorových buněk k léčbě. Po získání takové rezistence se tedy buňky stanou odolnými k cisplatině. Navíc může nastat i situace, kdy se některé buňky dokonce stanou křížově rezistentními i k dalším lékům, které mají podobné složení a mechanismus účinku. Problematika lékové rezistence je složitá a podmiňuje ji celá řada faktorů včetně: zrychleného efluxu léku, aktivace a deaktivace léčiva, změny farmakologického cíle léčiva, methylace DNA a další. Je tedy zřejmé, že strategie k překonání chemorezistence mají velký klinický význam (Wilson *et al.*, 2006). Buňky mají několik mechanismů k získání rezistence a tedy k zamezení cytotoxické aktivitě léčiva jak je znázorněno na obr. 3. Příkladem je snížený influx nebo zvýšený eflux dané látky (1), narušení mechanismů buněčné smrti (2), aktivace obecných detoxikačních mechanismů (3), zvýšení frekvence oprav DNA (4) a změny buněčného cyklu (5). Zvýšená aktivita efluxních pump vede k odstranění léčiva ven z buňky a může být zprostředkována např. pomocí ABC transportérů, které využívají energii z hydrolýzy ATP k přemístění substrátů přes biologické membrány. Transportéry ABC jsou schopné transportovat různé organické anionty (Filipits, 2004).

Buňky rezistentní na cisplatinu mají často zvýšené hladiny buněčného glutathionu (GSH). Předpokládá se, že GSH hraje hlavní roli v mechanismu buněčné rezistence k cisplatině. Cisplatinu má vysokou afinitu k ligandům obsahujícím síru a snadno reaguje s GSH ve vodných roztocích za „fyziologických podmínek“. Koncentrace GSH je v buňkách v  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  rozmezí, zatímco intracelulární hladiny platiny jsou v  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  rozsahu. Dá se tedy předpokládat, že GSH je hlavním buněčným cílem cisplatinu. Reakce mezi nimi vedou k inaktivaci cDDP, jež se tím pádem nedostane k svému biologickému cíli, tedy DNA v jádře nádorových buněk, a může docházet k vzniku rezistence (Kasherman *et al.*, 2009).



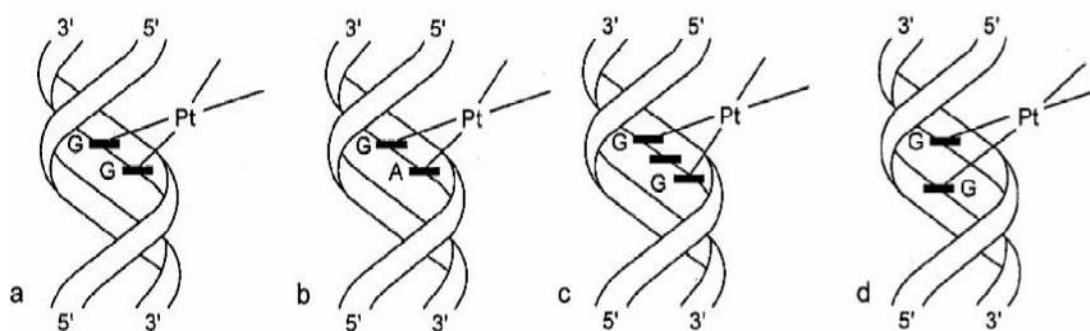
Obr. 3 Schématické znázornění mechanismů rezistence buňky vůči léčivům (převzato od Ferreida *et al.*, 2014). Snížený influx nebo zvýšený eflux dané látky (1), narušení mechanismů buněčné smrti (2), aktivace obecných detoxikačních mechanismů (3), zvýšení frekvence oprav DNA (4) a změny buněčného cyklu (5)

#### ***Aduky tvořené cisplatinou na DNA***

Úspěšnost cisplatiny je mimo jiné dána její schopností kovalentně se vázat na DNA za tvorby různých typů aduktů. Vazbou cisplatiny na DNA vznikají monofunkční adukty Pt-DNA, které se mohou uzavírat v adukty bifunkční. Takto vznikají vnitrořetězcové a meziřetězcové můstky. Vnitrořetězcové můstky vznikají mezi 2 bázemi ve stejném řetězci molekuly DNA a meziřetězcové vznikají mezi 2 bázemi v komplementárních řetězcích v molekule DNA.

Nejčastější typ můstku vzniká mezi dvěma sousedními guaniny v jednom řetězci v molekule DNA. Tento můstek je označován 1,2 – GG – IAC (odvozeno od intrastrand crosslink – vnitrořetězcový můstek) a představuje přibližně 60 % aduktů cisplatiny (obr. 4a). Další vnitrořetězcový můstek vzniká po navázání cisplatiny na sousední adenin a guanin. Tento adukt je označován jako 1,2 – AG – IAC a představuje přibližně 20 % aduktů cisplatiny (obr. 4b). Třetí typ vnitrořetězcového můstku vzniká po navázání cisplatiny na dva guaniny, které jsou od sebe oddělené jednou další bází, označuje se 1,3 – GG – IAC (obr. 4c) a tvoří přibližně 10 % aduktů cisplatiny (obr. 4b). Posledním typem je meziřetězcový můstek, který vzniká mezi dvěma guaniny v komplementárních řetězcích. Tento meziřetězcový adukt se označuje jako 1,2 – GG – IEC (odvozeno od interstrand crosslink – meziřetězcový můstek) a tvoří přibližně 5 – 10 % aduktů

cisplatiny (obr. 4d). Zmíněné procentuální zastoupení platí pro lineární DNA a může se lišit v závislosti na typu DNA (Vrána *et al.*, 1996).



Obr. 4. Grafické znázornění aduktů DNA-cisplatina. a) 1,2 – GG – IAC, b) 1,2-AG – IAC, c) 1,3 – GG – IAC, d) 1,2 – GC – IEC.

Výše popsané můstky, tedy kovalentní spojení, mohou způsobovat různé deformace DNA a také zabraňovat oddělení komplementárních řetězců např. během replikace. Pokud nejsou můstky opraveny opravnými cestami buňky, dochází ke smrti buněk. I přesto, že je cisplatina schopna vytvářet adukty na DNA a následně může docházet ke smrti buňky, tak může docházet i k vývoji chemorezistence vůči tomuto cytostatiku a následnému omezení účinnosti podobných léků indukujících vznik můstků (např. křížová rezistence u cDDP a karboplatiny), jak již bylo zmíněno výše. Jedna ze současných léčebných strategií proto kombinuje látky indukující vznik můstků a látky inhibující enzymy, které opravují můstky vznikající v molekulách DNA (Clauson *et al.*, 2013).

### ***HMG proteiny***

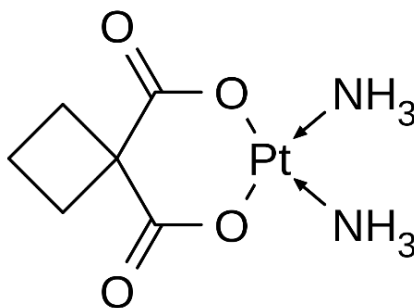
Adukty vytvořené na DNA mohou být rozpoznávány HMG proteiny (neboli High Mobility Group proteins), které mohou „stínit“ místo poškození DNA. Zpočátku se předpokládalo, že HMG proteiny podporují opravu Pt-DNA aduktů tím, že usnadňují rozpoznávání těchto míst opravnými proteiny. Později však studie využívající *in vitro* test opravy excize nukleotidů prokázala, že opravy poškození DNA za přítomnosti HMG proteinů ve skutečnosti spíše zpomalí. Bylo tedy navrženo, že proteiny HMG chrání platinové léze před přístupem opravných proteinů tím, že vytváří na DNA jakýsi „stín“. Nedochozí tedy k opravám poškozené DNA, ale buněčné smrti či mutacím (Park S. a Lippard S, 2012).

HMG proteiny jsou významné transkripční faktory, které se přednostně vážou na DNA, jež byla modifikována cisplatinou. Dělí se do 3 hlavních rodin/skupin (HMGA, HMGB a HMGB), které jsou dále členěny do podrodin. HMGB1 je považován za primární faktor, který rozpoznává adukty na DNA vytvořené cisplatinou a vykazuje vysokou afinitu k těmto místům (He *et al.*, 2014).

Molekulární mechanismus účinku cisplatiny a jejích analog je velmi rozsáhlou problematikou, proto je podrobně popsán dále v této práci (viz 2.2 Molekulární mechanismus účinku platinových metalofarmak a 2.3 Inhibice transkripce).

### 2.1.2 Karboplatina

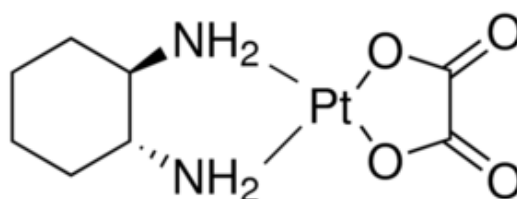
Mezi cytostatika odvozená od cisplatiny patří např. karboplatina (obr. 5), která má velmi podobný mechanismus biologického účinku. V důsledku toho, že karboplatina má nižší reaktivitu než cisplatinu, jsou během léčby touto látkou pozorovány výrazně nižší vedlejší účinky. V porovnání s cisplatinou je méně nefrotoxická i neurotoxická, zároveň je mnohem více myelotoxická (Dilruba a Kalayda, 2016; Sakaeda *et al.*, 2011). V roce 1985 byla karboplatina schválena k léčbě nádoru vaječníku ve Velké Británii a Kanadě. V roce 1988 byla následně schválena i v USA (Lebwolh a Canetta, 1998). Dále je také účinná u některých typů rakoviny prsu (Martín *et al.*, 1992), děložního hrdla (Tinker *et al.*, 2005) či rakoviny jícnu (Tinker *et al.*, 2005).



Obr. 5 Strukturní vzorec karboplatiny.

### 2.1.3 Oxaliplatina

Dalším cytostatikem používaným v klinické praxi je oxaliplatina (obr. 6). Ta se používá v kombinaci s 5-fluorouracilem a folinátem při léčbě kolorektálního karcinomu, který je vůči cisplatině necitlivý. Oxaliplatina je komplex platiny s ligandem (1R, 2R) -1,2-diaminocyklohexanu (DACH) a oxalátem jako odstupující skupinou. Oxalát významně snižuje reaktivitu oxaliplatiny a tím zmírňuje její vedlejší účinky (Wheate *et al.*, 2010). DACH ligand je lipofilnější a zvyšuje pasivní absorpci oxaliplatiny ve srovnání s cisplatinou a karboplatinou. Vyšší lipofilita je také důvodem, proč oxaliplatina využívá jiné cesty vstupu do buňky než ostatní léky. Transportéry organických kationtů OCT1 a OCT2 (organic cation transporter 1 a 2) jsou zapojeny do zprostředkování absorpce oxaliplatiny. Jejich nadměrná exprese významně zvyšuje buněčnou akumulaci oxaliplatiny, ale nikoli cisplatinu nebo karboplatinu. Buňky kolorektálního karcinomu nadměrně exprimují transportéry organických kationtů, což může vysvětlovat účinnost oxaliplatiny u tohoto konkrétního typu rakoviny (Zhang *et al.*, 2006).



Obr. 6 Strukturní vzorec oxaliplatiny.

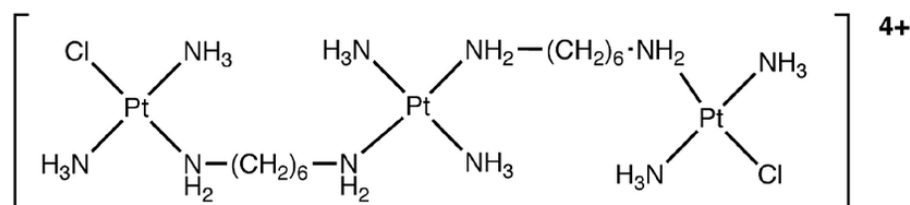
### 2.1.4 Polynukleární komplexy platiny

Polynukleární komplexy platiny představují novou třídu potenciálních protinádorových látek strukturně odlišných od cisplatinu. Tyto komplexy obsahují dvě nebo více reaktivních koordinačních sfér platiny. Ve všech případech jsou platinová koordinační centra spojena alifatickými polyaminy (Fan *et al.*, 2007; Wedlock *et al.*, 2013; Wheate a Collins, 2003).

Ve srovnání s mononukleárními sloučeninami platiny mají tyto látky často výrazně vyšší cytotoxickou aktivitu. Na rozdíl od cisplatinu a jejích analogů, která tvoří na DNA převážně 1,2-mezireťezcové můstky, se totiž mohou adukty polynukleárních komplexů rozprostírat přes několik párů bází a vytvářet mezilehlé meziřetězcové a vnitřetězcové vazby (Wheate a Collins, 2003; Qu *et al.*, 2009; Mangrum a Farrel, 2010), představující závažnější poškození DNA. Dosavadní výzkumy naznačují, že některé polynukleární komplexy platiny by mohly být účinné i v nádorech se získanou rezistencí k cisplatině

(Bugarčić *et al.*, 2012). Mezi takovéto polynukleární platinové komplexy patří např. BBR3005, C304, C305, C306 a další.

Mezi polynukleární platinové komplexy patří také např. komplex  $[\{trans\text{-PtCl(NH}_3)_2\}2\mu\text{-trans-Pt(NH}_3)_2\{\text{H}_2\text{N(CH}_2)_6\text{NH}_2\}_2]^{4+}$  neboli BBR3464, který je tvořen dvěma *trans*-[PtCl(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] jednotkami spojenými tetraaminovou jednotkou *trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>{H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH<sub>2</sub>}<sub>2</sub>]. Jedná se o trinukleární sloučeninu platiny (obr. 7). BBR3464 je považován za důležité protinádorové činidlo, protože je účinný v buňkách rezistentních k cisplatině. Kromě toho může fungovat při 10x až 1000x nižší dávce ve srovnání s úrovní použitelnou pro cisplatinu (Brabec *et al.*, 1999; Wheate a Collins, 2005). Důvody účinnosti BBR3464 při mnohem nižších dávkách ve srovnání s typickými hodnotami dávkování cisplatinu nejsou dobře známy, proto je stále intenzivně testován mechanismus biologického účinku této látky.



Obr. 7 Struktura BBR3464.

Dva platinové konce ve struktuře BBR3464 mohou být použity při tvorbě kovalentní vazby s bázemi DNA a to konkrétně s guaninovými zbytky. Mohou vznikat různé typy vazeb např. vnitřetězcové můstky nebo 1,2; 1,4; 1,6 – meziretězcový můstek. Vysoký kladný náboj BBR3464 způsobuje, že je schopen se rychle vázat na DNA, kinetika vazby je přibližně 5x rychlejší než u cisplatinu (Brabec *et al.*, 1999). S tímto komplexem je spojeno i několik nevýhod. BBR3464 je vysoce toxický i přesto, že jeho maximální dávka je 10x nižší než u cisplatinu. U pacientů může způsobovat vedlejší účinky jako je porucha krvevotvorby či alergická reakce (Kraker *et al.*, 1992).

## **2.2 Molekulární mechanismus účinku platinových metalofarmak**

Níže je popsán molekulární mechanismus účinku platinových metalofarmak používaných v klinické praxi, zejména cisplatiny, která je nejrozšířenějším z těchto léčiv a její mechanismus působení byl zkoumán v rámci mnoha studií. Zmíněna je inhibice replikace a telomerázové aktivity. Důkladně je pak popsána zejména inhibice transkripce vlivem cisplatiny, která byla testována také v praktické části této práce. Této problematice je věnována zvláštní kapitola (viz 2.3 Inhibice transkripce).

### **2.2.1 Inhibice replikace DNA**

Cisplatina a její analoga mají schopnost se vázat na molekulu DNA a vytvářet zde adukty. Tyto adukty modifikují strukturu DNA, což má za následek např. inhibici replikace. Replikace a transkripce představují životně důležité procesy nezbytné pro buněčné dělení a tvorbu proteinů. Jakékoliv jejich narušení může vést k buněčné smrti. Platinová léčiva byla podrobně studována a zjistilo se, že tyto látky cíleně inhibují replikaci a transkripci v nádorových buňkách, což má za následek jejich buněčnou smrt a represi nádoru. Následně se tohoto faktu začalo využívat ve zdravotnictví při léčbě různých typů rakoviny.

Replikace je základní buněčný proces, který zahrnuje rozvolnění dvouvláknové DNA z chromatinu, separaci duplexních řetězců a syntézu nové DNA pomocí původních vláken jako templátů. DNA polymerázy jsou integrálně zapojeny do tohoto procesu. Bylo zjištěno, že adukty cisplatiny na DNA mohou představovat překážku pro DNA polymerázu. V takových případech dochází k inhibici replikace cisplatinou. Tato může vést až k smrti rakovinných buněk v důsledku blokování jejich schopnosti syntetizovat novou DNA potřebnou pro dělení.

Replikace DNA má tedy tendenci být inhibována v přítomnosti cisplatiny a adukty Pt-DNA představují blok pro DNA polymerázu. Některé GG vnitrořetězcové můstky však mohou být DNA polymerázou obejity, než dojde k úplnému zastavení replikace. Poté může docházet k tomu, že jsou náhodné nukleotidy začleněny naproti platinové lézi (Jordan a Foncesa, 2000). Pokud nejsou taková poškození opravena buněčnými opravnými mechanismy, mohou přecházet do dalších generací. I přesto, že je cisplatina registrované léčivo, je tedy potencionálně mutagenní, protože může způsobovat dědičné změny v DNA.

### 2.2.2 Inhibice telomerázové aktivity

Cisplatina byla několikrát testována a porovnávána s dalšími látkami a jejich vlivem na telomery. Telomery jsou specializované struktury na konci chromozomů. Tyto struktury chrání chromozomy před rekombinací s jinými chromozomy, před zkracováním oblastí na chromozomu nesoucích geny nebo před degradací vlivem nukleáz. U lidí se telomery skládají z repetitivních sekvencí TTAGGG. DNA polymeráza nepochybně není schopna zcela kopírovat DNA na samotných koncích chromozomů, proto se během každého buněčného cyklu ztratí přibližně 50 nukleotidů, což má za následek postupné zkracování délky telomery. Kriticky krátké telomery způsobují stárnutí a následně buněčnou smrt (Gomez *et al.*, 2012).

Během experimentů s cisplatinou byla pozorována snížená aktivita telomerázy v lidských testikulárních nádorových buňkách, zatímco látky jako doxorubicin, bleomycin, methotrexát, melfalan a transplatina neměly žádný účinek.

#### ***Telomeráza***

Telomeráza je reverzní transkriptáza, která funguje jako klíčový enzym při stabilizaci telomer, kdy zajišťuje přidávání repetitivních sekvencí TTAGGG na konec telomery. Je to ribonukleoprotein, který využívá svou RNA složku jako templát pro syntézu opakovaní telomerových sekvencí. Skládá se z katalytické podjednotky (hTERT) a složky RNA (hRT), která působí jako templát pro přidání krátké opakující se sekvence dTTAGGGn na 3' konec telomerické DNA a z druhově specifických doplňkových proteinů.

Telomerázová aktivita je vykazována u gamet, kmenových a nádorových buněk. V lidských somatických buňkách je replikační potenciál přísně omezen a senescence následuje přibližně po 50 až 70 buněčných děleních. Naopak ve většině nádorových buněk je replikační potenciál neomezený právě díky jejich schopnosti opakovaně prodlužovat telomery pomocí telomerázy (Gomez *et al.*, 2012). Bylo navrženo, že specifický inhibitor telomerázy by mohl sloužit jako terapeutikum pro léčbu některých druhů rakoviny (Shay a Wright, 2002).

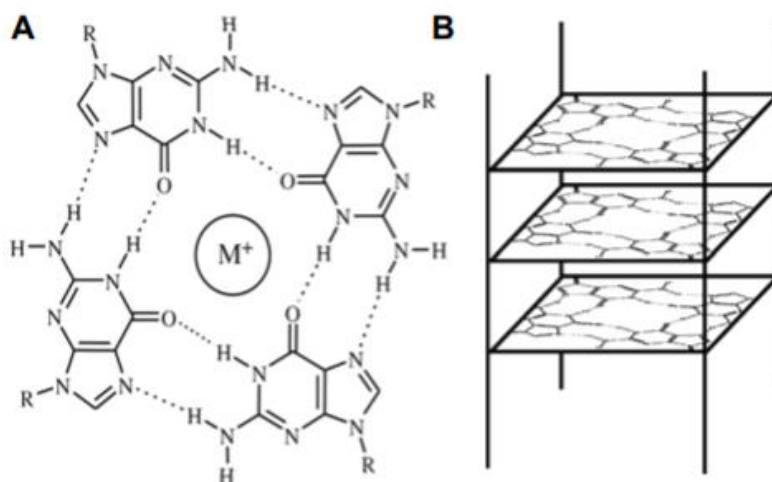
Existuje několik možností, jak může cisplatina interferovat s funkcí telomerázy. Jednou z nich je, že repetitivní sekvence TTAGGG může být zesítna pomocí meziřezcových můstků. Další možností je také interakce cisplatinu s esenciálními sulfhydrylovými skupinami v proteinové části enzymu (Burger *et al.*, 1997).



Jak již bylo zmíněno, inhibice telomerázy má možný terapeutický potenciál v léčbě rakoviny. Telomerázová aktivita může být inhibována v rakovinných buňkách, což vede ke značnému snížení buněčné životaschopnosti, kdy je indukována apoptóza, avšak pouze u rakovinných buněk, zatímco daná inhibice nemá vliv na většinu buněk normálních. Katalytická podjednotka TERT je hlavním cílem pro vývoj protirakovinových léčiv, protože v rakovinných buňkách je vysoká koncentrace TERT a naopak ve většině normálních buněk je TERT nedostatek (Andrews a Tollefsbol, 2008).

### **G-Kvadruplexy**

Dalším možným způsobem jakým lze inhibovat telomerázovou aktivitu je využití tzv. G-kvadruplexů. Nejznámějším typem sekundární struktury nukleových kyselin, DNA a RNA, jsou šroubovice a vlásenky. Existují ale i další typy sekundární struktury nukleových kyselin, mezi které patří G-kvadruplexy. Vyskytují se v DNA i RNA v oblastech bohatých na purinovou bázi guanin. V případě, že dojde ke spojení 4 guaninových bází Hoogstenovým párováním vznikne planární G-kvartet (obr. 8A). Uspořádáním několika G-kvartetů nad sebou vznikne G-kvadruplex (obr. 8B).



Obr. 8 A) Struktura G-kvartetu vzniklá interakcí 4 guaninových bází, B) uspořádání několika G-kvartetů za vzniku G-kvadruplexu.

Enzym telomeráza, umožňující přidávat další repetitivní sekvence na konec telomer, vyžaduje pro svou funkci jednořetězcový telomerní konec. Vzhledem k tomu, že jsou telomerní sekvence bohaté na guanin, je zřejmé, že vytvoření kvadruplexu na konci telomery by zabránilo telomeráze v dalším prodlužování telomer. S využitím malých molekul (tzv. ligandů), které specificky interagují s kvadruplexy, by bylo možné tyto

útvary dále stabilizovat a tím účinně inhibovat telomerázu. Ligandy jsou obvykle polyaromatické heterocyklické sloučeniny mezi které patří např: antrachinony, akridiny, thiaziny nebo přírodní telomerázový inhibitor telomestatin izolovaný z aktinobakterie *Streptomyces anulatus* (Špačková, 2009). G-kvadruplexové ligandy selektivně omezují pouze růst nádorových buněk, aniž by měly vliv na normální nenádorové buňky (Cao *et al.*, 2016).

## 2.3 Inhibice transkripce

Kromě toho, že cisplatina a její analoga mají schopnost se vázat na molekulu DNA, vytvářet zde adukty a tím inhibovat replikaci, tak také bylo zjištěno, že důležitou podstatou molekulárního mechanismu cisplatiny a jejích analog je, že mohou inhibovat buněčné procesy na úrovni transkripce.

### 2.3.1 Transkripce

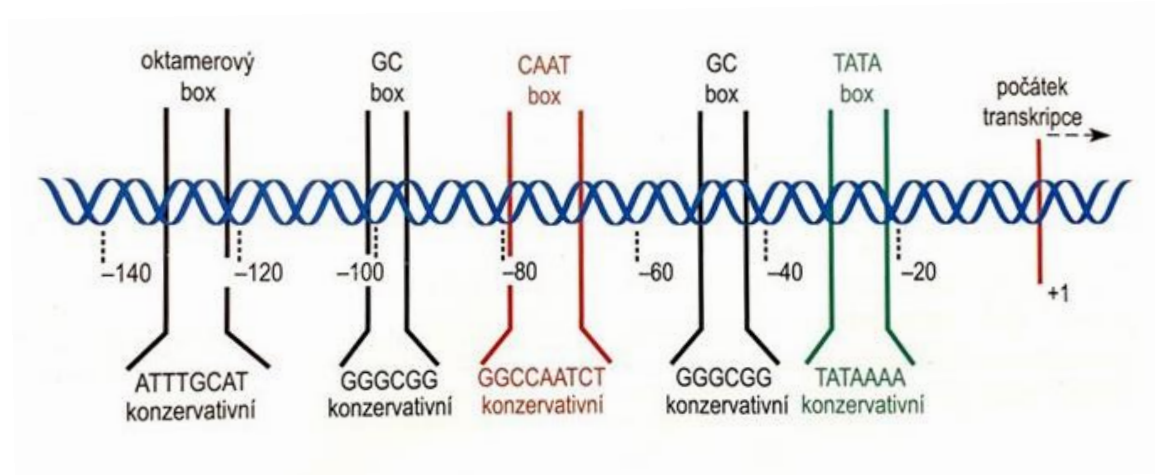
Transkripcí rozumíme proces, při kterém je genetická informace přepsána z molekuly DNA do molekuly RNA pomocí enzymu RNA-polymerázy. Transkripce spolu s replikací a translací představuje centrální dogma molekulární biologie, které popisuje přenos genetické informace do proteinu. Začíná otevřením a rozvinutím malé části dvoušroubovice DNA, čímž se obnaží báze DNA na každém DNA vláknu. Jedno vlákno je využito jako templát pro syntézu RNA. Dochází k párování nukleoidů na základě komplementarity bází. Proces syntézy RNA je podobný jak u prokaryot, tak u eukaryot. U eukaryot je tento proces ovšem složitější, protože RNA je syntetizována v jádře a následně musí být přenesena z jádra do cytoplazmy přes jadernou membránu, narozdíl od prokaryot, která neobsahují jádro, a transkripce probíhá volně v cytoplazmě. Zatímco transkripce u prokaryot zprostředkovává jediná RNA-polymeráza, u eukaryot je transkripce zprostředkována třemi RNA-polymerázami (RNA-polymeráza I, II a III). RNA-polymeráza I se vyskytuje v oblasti jádérka, kde syntetizuje ribozomální RNA kromě 5S rRNA. RNA-polymeráza II syntetizuje jadernou pre-mRNA. RNA-polymeráza III syntetizuje transferovou RNA, 5S rRNA a další malé jaderné RNA. RNA-polymeráza II a III se vyskytují v jádře.

Transkripce lze rozdělit do 3 stádií: iniciace, elongace a terminace. Iniciace vyžaduje navázání transkripčních faktorů (*viz níže*) a RNA polymerázy na promotor. Během elongace dochází k syntéze molekuly RNA ve směru 5' → 3', která vzniká připojováním ribonukleotidu k 3'OH skupině na konci řetězce. Terminace nastává, když

RNA-polymeráza II vstoupí do místa terminátoru se specifickou sekvencí. Na rozdíl od replikace vznikají jednovláknové RNA, které nezůstávají vázané k DNA templátu vodíkovými vazbami. Nově nasyntetizovaný RNA řetězec je hned za přidanými nukleotidy vytlačen a dvojitá DNA je obnovena. RNA molekuly jsou v porovnání s DNA molekulami mnohem kratší, protože se jedná pouze o kopie částí DNA. Eukaryotické RNA-polymerázy nemohou na rozdíl od těch prokaryotických iniciovat transkripci samotné. Všechny tři RNA-polymerázy vyžadují pro zahájení syntézy RNA další proteiny tzv. transkripční faktory (Snustad a Simmons, 2009; Albert *et al.*, 2008)

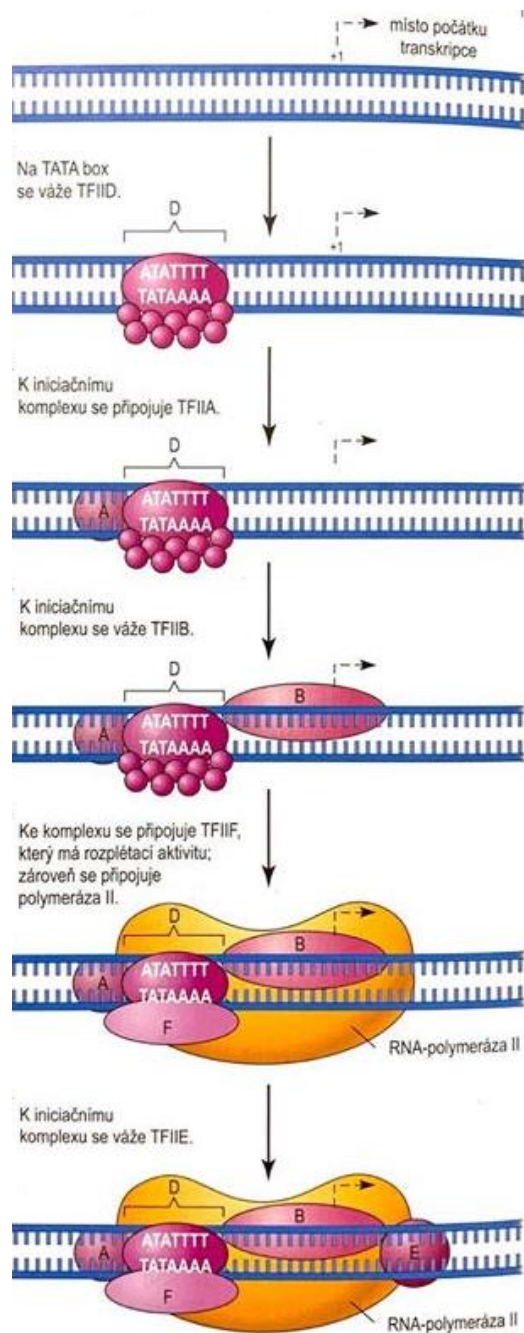
### **2.3.2 Transkripční cyklus RNA-polymerázy II**

Jak už bylo řečeno, RNA-polymeráza II zprostředkovává syntézu jaderné pre-mRNA, která je posléze překládána do sekvence aminokyselin, na jejímž základě vzniká příslušný protein. Proces transkripce lze rozdělit do 3 stádií: iniciace, elongace a terminace. Během iniciace musí nejprve RNA-polymeráza rozeznat promotor, což je sekvence na DNA, na kterou se RNA-polymeráza váže, aby mohla být zahájena transkripce. Promotor se skládá z krátkých elementů, které jsou umístěny proti směru transkripce od bodu počátku replikace (obr. 9). Počátek je označován jako +1 neboli iniciátor, který obsahuje startovací nukleotid. Element, který se nachází nejbližší k místu počátku replikace, se nazývá TATA-box. Obsahuje sekvenci TATAAAA (čteno ve směru 5' → 3' na netemplátovém řetězci) a její střed se nachází kolem místa -30. Druhý element se označuje jako CAAT-box (-80). Dalšími elementy jsou GC-box a oktamerový box. Iniciace transkripce vyžaduje spoluúčast několika transkripčních faktorů. Na účinnost iniciace mohou mít vliv ještě další transkripční a regulační sekvence zvané zesilovače nebo tlumiče. Všechny transkripční faktory se označují TFII<sub>X</sub> (odvozeno od Transcription Factor for polymerase II), kde X je písmeno, kterým se označuje konkrétní faktor.



Obr. 9 Struktura promotoru rozeznávaného RNA-polymerázou II (Snustad a Simmons, 2009).

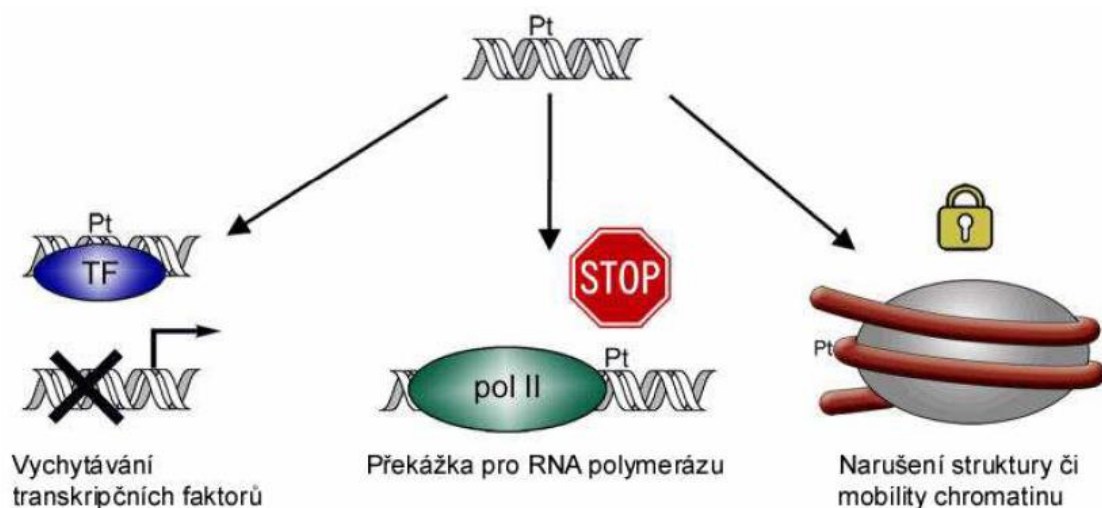
Prvním TF, který interaguje s promotorem je TFIID. Ten je složený z TATA-vazebného proteinu (TBP) a z malých proteinů asociovaných s TBP. K vytvořenému komplexu se dále připojuje TFIIA a poté TFIIB. K RNA-polymeráze se připojuje TFIIF a společně se vážou na promotor. TFIIF má dvě podjednotky, z nichž jedna má schopnost rozvinout DNA. Následně dojde k navázání TFIIE, TFIIH a TFIIG (obr. 10). TFIIH má helikázovou aktivitu a pohybuje se během elongace s RNA-polymerázou II, přičemž odvíjí vlákna v místě transkripce a tvoří transkripční bubliny. Během elongace dochází k syntéze molekuly RNA ve směru  $5' \rightarrow 3'$ , která vzniká připojováním ribonukleotidu k 3'OH skupině na konci řetězce. Terminace nastává, když RNA-polymeráza II vstoupí do místa terminátoru se specifickou sekvencí. Dojde k jejímu zastavení a uvolnění molekuly RNA a RNA-polymerázy (Snustad a Simmons, 2009; Albert *et al.*, 2008).



Obr. 10 Iniclace transkripce RNA-polymerázou II (Snustad a Simmons, 2009).

### 2.3.3 Mechanismy inhibice transkripce cisplatinou

Transkripce může být v důsledku působení cisplatiny inhibována na několika úrovních, jak je znázorněno na obr. 11. První možností je vychytávání transkripčních faktorů a tedy inhibice iniciace transkripce. Tyto faktory se podílejí na iniciaci transkripce tím, že vytváří pre-iničiační komplex, který interaguje s RNA polymerázou II, což umožňuje spuštění transkripce protein-kódujících genů.



Obr. 11 Možné mechanismy inhibice transkripce vlivem cisplatiny (vychytávání transkripčních faktorů, blokace RNA polymerázy II, narušení chromatinové struktury či mobility). Převzato a upraveno z Todd a Lippard, 2009.

Aduky vytvořené cisplatinou mohou modifikovat strukturu DNA za vzniku oblastí strukturně podobných promotorovým sekvencím. Na tyto modifikované úseky se pak vážou transkripční faktory. Nedochozí tak k vazbě těchto faktorů k původním cílovým promotorovým sekvencím a k iniciaci transkripce (Cullinane *et al.*, 1999).

Druhým způsobem, jakým může být vlivem cDDP inhibována transkripce, je blokace RNA polymerázy, kdy adukty Pt-DNA představují fyzickou bariéru na DNA a tím brání postupu RNA polymerázy podél DNA řetězce (Tornaletti *et al.*, 2003). V některých případech dochází k tomu, že se RNA polymeráza zastaví před adukty Pt-DNA, avšak poté, co je adukt odstraněn opravnými mechanismy buňky, může transkripce pokračovat (Jung a Lippard, 2003). Kromě toho, že adukty brání RNA polymeráze v postupu, tak také brání molekule DNA v rotaci, díky které je umožněn přístup do aktivního místa právě RNA polymeráze (Damsma *et al.*, 2007).

Třetí způsob, jakým adukty Pt-DNA mohou interferovat s transkripcí, je na úrovni chromatinu. Pro správné fungování transkripce je rozhodující správné umístění nukleosomů a jejich mobilita. K vazbě transkripčních faktorů dochází na místech DNA promotoru, který je charakteristicky bez nukleosomů, což umožňuje proteinům rozpoznávat a vázat se na „odhalenou“ sekvenci DNA. RNA polymeráza následně transkribuje podél templátového vlákna DNA. Následující nukleosomy po směru transkripce jsou nepřetržitě posunovány a odvíjeny pomocí komplexu remodelace chromatinu, jako je FACT (Todd a Lippard, 2009).

Vazbou cisplatinou na molekulu DNA tedy dochází k remodelaci chromatinu. Posttranslační modifikace histonů mění strukturu chromatinu a usnadňují vazbu jaderných faktorů, které zprostředkovávají opravu DNA, transkripci a další procesy. Cisplatinou např. silně indukuje fosforylaci histonu H3 na Ser-10. Studie prokázala, že cisplatinou stimulovaná fosforylace histonu H3 na Ser-10 se zvyšovala s inkubační dobou od 1 do 24 h a současně úroveň fosforylace histonu H3 na Ser-10 rostla se zvyšujícími se koncentracemi cisplatinou (Wang a Lippard, 2004).

#### **2.3.4 Další látky ovlivňující transkripci**

Kromě cisplatinou existuje mnoho dalších látek, které mohou mít inhibiční efekt na průběh replikace či transkripce. Těto látky lze využít ve zdravotnictví při léčbě nádorových onemocnění. Některé z těchto látek jsou přírodního původu jako aktinomycin D, triptolid,  $\alpha$ -amanitin či flavopyridol. Další z nich byly vytvořeny chemicky za účelem ovlivnění replikace a transkripce v nádorových buňkách.

##### ***Triptolid***

Triptolid (TPL) byl poprvé izolován v roce 1972 z víceleté čínské léčivé byliny *Tripterygium wilfordii* nebo révy Thunder God (Kupchan *et al.*, 1972). Kořenové extrakty byly v čínské medicíně používány k léčbě různých onemocnění, jako je lupus, nefrotický syndrom, Behçetova nemoc a revmatoidní artritida. Obsahují další účinné látky, jako jsou alkaloidy, aminokyseliny, ligniny, fenoly, polysacharidy, organické kyseliny a terpeny. TPL je nejvíce znám svými antireumatickými, antimikrobiálními, protizánětlivými, imunomodulačními a protinádorovými účinky (Ziaei a Halaby, 2016). V preklinických testech bylo zjištěno, že TPL inhibuje růst buněk různých druhů rakoviny včetně akutní myeloidní leukémie (Pigneux *et al.*, 2008), rakoviny prsu (Shao *et al.*, 2014), osteosarkomu (Jiang *et al.*, 2018), rakoviny vaječnicků (Rivard *et al.*, 2014), rakoviny prostaty (Isharwal *et al.*, 2017), neuroblastomu (Krosch *et al.*, 2013) a mnohočetné gastrointestinální rakoviny jako je rakovina žaludku a slinivky břišní (Arora *et al.*, 2017; Banerjee *et al.*, 2013).

Buněčný cyklus je pod kontrolou cyklin dependentních kináz (CDK). Cyklus může být dokončen, když jsou tyto CDK aktivovány. Porucha regulace buněčného cyklu hraje významnou roli ve výskytu a vývoji nádorů. TPL snižuje expresi cyklinů, což způsobuje zastavení buněčného cyklu a inhibuje proliferaci buněk (Noel *et al.*, 2019).

### ***$\alpha$ -amanitin***

Alfa-amanitin je známá cytotoxická látka, která se vyskytuje v některých druzích hub, včetně rodu *Amanita* (*A. phalloides*, *A. virosa* a *A. verna*). Vyznačuje se vysokou tepelnou stabilitou, dobrou rozpustností ve vodě a odolností vůči trávicím enzymům a kyselinám. U lidí se  $\alpha$ -amanitin velmi dobře vstřebává z gastrointestinálního traktu, což často způsobuje ireverzibilní multiorgánové poškození, zejména jater a ledvin (Garcia *et al.*, 2015). Jeho hlavním mechanismem účinku je blokování transkripce, které může vést k buněčné smrti. Při testech na buňkách kostní dřene myši Balb/c vykazoval  $\alpha$ -amanitin genotoxický potenciál, kdy byly pozorovány zvýšené frekvence strukturálních chromozomových aberací (Marciniak *et al.*, 2017).

### ***Flavopyridol***

Flavopyridol je syntetický flavon odvozený z rohitukinu, což je přírodní produkt izolovaný z rostliny *Dysoxylum binectariferum*, která pochází z Indie. Flavopyridol byl objeven na konci 80. let prostřednictvím výzkumného programu zkoumání přírodních produktů, které inhibovaly fosforylaci EGFR-TK (Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase). Flavopyridol je prvním inhibitorem cyklin-dependentních kináz (CDK), který byl testován v klinických studiích. Bylo prokázáno, že způsobuje zastavení buněčného cyklu, indukuje apoptózu, inhibuje angiogenezi a zesiluje účinky chemoterapie. Protinádorová aktivita flavopyridolu bylo pozorována u některých nádorů prsu při experimentech *in vitro* i *in vivo* (Tan a Swain., 2002).



### **3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

#### **3.1 Materiál**

##### **3.1.1 Biologický materiál a chemikálie**

Buňky lidského ovariálního karcinomu A2780 (European Collection of Authenticated Cell Culture)

Coelenterazin (Sigma-Aldrich)

Deionizovaná voda – byla použita k přípravě všech roztoků (dH<sub>2</sub>O)

Fetální hovězí sérum (FBS, Sigma-Aldrich)

Chloristan sodný (Sigma-Aldrich)

Lipofectamine ® 2000 Reagent (Invitrogen)

Medium RPMI 1640 (Biosera)

Opti-MEM ® (Gibco® by Life Technologies™)

pCMV-Gluc2 (velikost 5802 bp, New England Biolabs)

Penicillin 10 U·ml<sup>-1</sup>; (Sigma-Aldrich)

Streptomycin 10 µg·ml<sup>-1</sup> (Sigma-Aldrich)

Trypanová modř (Sigma-Aldrich)

Thymidin (Sigma-Aldrich)

Trypsin/EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová; Sigma-Aldrich)

##### **3.1.2 Platinové komplexy**

BBR3464 laskavě poskytl prof. N. Farrell (Department of Chemistry, Virginia Commonwealth University, Richmond, USA)

Cisplatina (Sigma-Aldrich)

##### **3.1.3 Použité roztoky**

Zásobní roztok fosfátového pufru (PBS) 10x pH 7,4:

150 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl

2 mmol·l<sup>-1</sup> KCl

10 mmol·l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

2 mmol·l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

-pH fosfátového pufru bylo upraveno pomocí 5 mol·l<sup>-1</sup> NaOH na pH 7,4

Roztok pro luciférazový test

- 1 mmol·l<sup>-1</sup> EDTA
- 600 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl
- 10 mmol·l<sup>-1</sup> TRIS/HCl pH 7,8
- 10 μmol·l<sup>-1</sup> coelenterazin (přidán těsně před měřením bioluminiscence)

Médium s 2,5 mmol·l<sup>-1</sup> thymidinem

- 1250 μl 0,02 mol·l<sup>-1</sup> thymidinu
- 8750 μl plnohodnotného média RPMI

### **3.1.4 Přístroje, pomůcky, software**

Atomový absorpční spektrofotometr (Varian AA240Z Zeeman)

Automatická počítačka buněk TC-20 (Bio-Rad)

Automatické pipety (Eppendorf)

CO<sub>2</sub> Inkubátor, model MCO-18AC-PE (Panasonic)

Digestoř Forlab (Block)

GraphPad Prism4 (GraphPadPrism Software)

Invertovaný mikroskop NIB-100 (MIKRO)

Microsoft Excel (Microsoft)

NanoDrop ND 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific)

Vodní lázeň SB-12L shaking water bath (Benchmark)

Třepačka Universal Orbital Shaker OS-20 (BOECO)

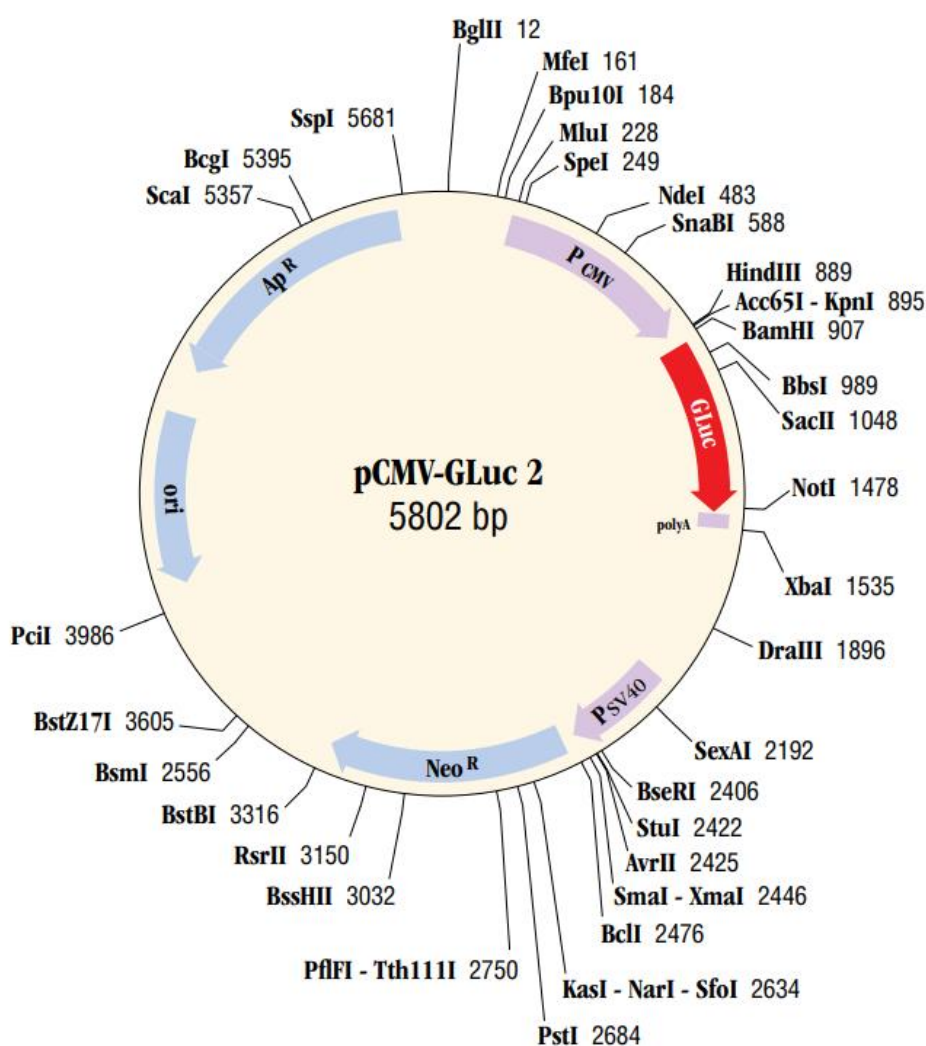
Výrobník dH<sub>2</sub>O Smart2Pure (Thermo Scientific™)

Spark® Multimode Microplate Reader (Tecan)

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Modifikace plasmidové DNA

Pro experiment byl použit pCMV-Gluc2 plasmid - savčí expresní vektor, který konstitutivně sekretuje luciferázu Gaussia (Gluc) pod kontrolou CMV promotoru. Restrikční mapa plasmidu je na obr. 12.



Obr. 12 Restrikční mapa pCMV-Gluc 2 vektoru.

Pro účely další práce byl plasmid globálně modifikován dvěma komplexy: cisplatinou a BBR3464. Komplexy byly vždy připraveny čerstvé pro každý experiment a koncentrace zásobních roztoků byla ověřena pomocí bezplatenné atomové absorpční spektrometrie (FAAS).

Plasmidová DNA ( $125 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) byla modifikována platinovými komplexy v prostředí  $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{NaClO}_4$  po dobu 24 h při  $37^\circ\text{C}$ . Dle předběžných experimentů byly zvoleny různé koncentrace uvedených komplexů odpovídající různým hodnotám  $r_i$ .

Stupeň modifikace  $r_i$  je definován jako počet atomů platiny teoreticky navázaných na jednu bázi DNA. Výpočet  $r_i$  se provádí následujícím způsobem:

$$r_i = \frac{c_{pt} * V_{pt}}{c_{DNA} * V_{DNA}}$$

$c_{pt}$  je koncentrace zásobního roztoku platinového komplexu

$V_{pt}$  je objem roztoku platinového komplexu

$c_{DNA}$  je koncentrace zásobního roztoku DNA

$V_{DNA}$  je objem DNA

Pro srovnávací účely byl stupeň modifikace DNA uvedenými látkami v naší práci dále vyjádřen jako  $r_b$ . Toto  $r_b$  představovalo počet aduktů testovaných sloučenin (cDDP je mononukleární a BBR3464 trinukleární sloučenina) skutečně navázaných na jednu bázi. Skutečné množství DNA ve vzorcích bylo stanoveno na nanodropu a koncentrace platiny pak pomocí FAAS. Výše  $r_b$  modifikovaných vzorků pak odpovídaly následujícím hodnotám:  $0$ ;  $3,75\cdot 10^{-3}$ ;  $5\cdot 10^{-3}$ ;  $7,5\cdot 10^{-3}$  a  $10\cdot 10^{-3}$ . Takto modifikovaná DNA byla následně použita pro transfekci.

### 3.2.2 Kultivace nádorových buněk

Buněčná linie A2780 (buňky lidského ovariálního karcinomu) byla rozmrazena a následně bylo nasazeno  $1,5\cdot 10^6$  buněk na T-75 láhev (TPP). Buňky byly kultivovány dle standardního protokolu v médiu RPMI 1640 s přidávkem 10% fetálního hovězího séra a antibiotik (penicilin  $10 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; streptomycin  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Buňky byly drženy při  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  za tmy v inkubátoru a buněčná linie byla pasážovaná 2x týdně následujícím způsobem:

1. Buňky byly zkontrolovány pod mikroskopem, aby se zjistilo, zda rostou přisedle (jedná se o adherentní buňky) a zda nedošlo ke kontaminaci.
2. Z kultivační láhve bylo pomocí pipety odebráno veškeré médium.
3. Buňky byly opatrně promyty PBS 1x.
4. Následně byl přidán 1 ml roztoku trypsin/EDTA a kultivační láhev byla vložena na 2 min do inkubátoru, kde došlo k oddělení buněk od kultivačního povrchu.

5. Buňky byly poté opět zkontrolovány pod mikroskopem
6. Buňky byly resuspendovány v 4 ml plnohodnotného média.
7. Buňky byly spočítány pomocí automatické počítačky (viz 3.2.3 Počítání buněk).
8. Buňky byly sazeny na novou T-75 kultivační láhev ( $10^6$  buněk v 10 ml plnohodnotného RPMI). Takto zpasážívané buňky byly vloženy do inkubátoru.

### 3.2.3 Počítání buněk

Buňky byly počítány pomocí automatické počítačky buněk TC-20 (Bio-Rad) následujícím způsobem:

1. V kroku 8 (viz 3.2.2 Kultivace nádorových buněk) byl odebrán přibližně 1 ml buněčné suspenze do prázdné mikrozkuřavky.
2. Následně bylo 10  $\mu$ l trypanové modři smícháno s 10  $\mu$ l buněčné suspenze z bodu 1.
3. Obarvené buňky byly pipetovány do speciálního sklíčka, které bylo vloženo do automatické počítačky buněk, kde byl stanoven počet živých a mrtvých buněk a určena celková viabilita buněk na základě analýzy obrazu.

Princip barvení spočívá v tom, že živé buňky, které mají neporušenou cytoplazmatickou membránu, nejsou barveny modře, protože u nich nedochází k pronikání barviva do buňky. Někdy se může stát, že barvivo je buňkou absorbováno do intracelulárního prostoru, ale následně je velmi rychle transportováno ven z buňky. Živé buňky se tedy při vizualizaci jeví jako bezbarvé. U mrtvých buněk, které mají porušenou cytoplazmatickou membránu, dochází k jejich zbarvení do modra (Crowley *et al.*, 2016).

#### Příklad počítání buněk:

Pro nasazení buněk na lipofekci byla použita 96jamková destička, ve které bylo potřeba 100  $\mu$ l buněčné suspenze na jamku a zároveň 10 000 buněk na jamku.

Při pokusu bylo počítáno s rezervou na 120 jamek. Celkový objem tedy činil 12 ml suspenze obsahující celkem  $1,2 \cdot 10^6$  buněk.

Automatická počítačka buněk ukázala např. hodnotu  $2 \cdot 10^6/\text{ml}$  živých buněk.

Celkově bylo po oddělení buněk od kultivačního povrchu v láhvi 5 ml buněčné suspenze (1 ml Trypsinu a 4 ml média RPMI), tudíž celkově bylo živých buněk  $10 \cdot 10^6/5 \text{ ml}$ .

$$\begin{array}{l} 10 \cdot 10^6 \text{ buněk} \dots \dots \dots 5 \text{ ml} \\ \uparrow 1,2 \cdot 10^6 \text{ buněk} \dots \dots \dots x \text{ ml} \uparrow \end{array}$$

$$x = \frac{5 \cdot (1,2 \cdot 10^6)}{10 \cdot 10^6}$$

$$x = 0,6 \text{ ml}$$

Hodnota 0,6 ml odpovídala objemu, který obsahoval 10 000 buněk potřebných pro nasazení uvedeného počtu na 120 jamek.

Bylo nutné dopočítat celkový objem pro pipetování do 120 jamek.

$$12 - 0,6 = 11,4 \text{ ml}$$

Celkově bylo použito 11,4 ml média RPMI a 0,6 ml buněčné suspenze pro přípravu 12 ml výsledné suspenze buněk využitelné pro další postup.

### 3.2.4 Synchronizace buněk a příprava kultury pro transfekci

Buňky A2780 byly nasazeny na 96-jamkovou destičku následujícím způsobem:

1. Do každé jamky v destičce bylo nasazeno 10 000 buněk na jamku v 100  $\mu\text{l}$  plnohodnotného média RPMI.
2. Následovala inkubace po dobu 24 hodin (dosažení konfluence) při 37 °C v 5% atmosféře  $\text{CO}_2$ .
3. Poté bylo odsáto médium.
4. Buňky byly promyty pomocí PSB 1x.
5. Bylo přidáno médium s 2,5  $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  thymidinem (100  $\mu\text{l}$  na jamku).
6. Následovala inkubace po dobu 19 hodin.
7. Po 19 hodinách bylo z destičky odsáto médium.
8. Buňky byly opět opláchnuty pomocí PBS 1x.
9. Po přidání plnohodnotného média RPMI následovala inkubace 12 hodin.
10. Po 12 hodinách bylo z destičky odsáto médium.
11. Buňky byly opláchnuty pomocí PBS 1x.

12. Bylo přidáno médium s  $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  thymidinem.
13. Následovala 12 hodinová inkubace.
14. Po 12 hodinách byly buňky připraveny na transfekci.

Thymidin byl využit k tomu, že buňky A2780 byly synchronizovány tzv. dvojitým thymidinovým blokem (buňky jsou tedy zastaveny v G1/S bodě).

### 3.2.5 Lipofekce buněk

Pro provedení transfekce byla zvolena metoda lipofekce s využitím komerčně dodávaného produktu Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 Reagent (Invitrogen). Ten obsahuje lipidové podjednotky, které ve vodném prostředí vytváří liposomy formující spolu s DNA, jež má být dopravena do buňky, kladný komplex. Takový komplex může splynout s plazmatickou membránou použitých buněk a tím umožnit uvolnění nukleové kyseliny do cytoplazmy. Zmíněná metoda byla zvolena, protože je obecně velmi úspěšná a vhodná pro tento typ experimentu.

Jak již bylo zmíněno výše, množství modifikované plasmidové DNA ve vzorcích bylo ověřeno na nanodropu. Z těchto vzorků byl následně odebrán takový objem, aby množství DNA odpovídalo 100 ng DNA na 1 vzorek pro transfekci. Tato hodnota byla doporučena výrobcem pro úspěšnou lipofekci. Pro každý komplex a  $r_b$  byl připraven mix pro transfekci obsahující celkem 500 ng DNA (na ošetření čtyř vzorků a jeden objem jako rezerva např. pro zohlednění chyby pipetování).

Směs pro lipofekci byla připravena ze 2 složek:

- Složka A: Vzorky byly připraveny tak, že každý vzorek obsahoval 500 ng modifikované DNA a byl doplněn na objem 62,5  $\mu\text{l}$  základním médiem Opti-MEM.
- Složka B: 60  $\mu\text{l}$  Opti-MEM + 2,5  $\mu\text{l}$  Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 Reagent

Složky A a B se následně nechaly odstát po dobu 5 minut při laboratorní teplotě a poté následovala příprava mixu pro vlastní lipofekci následujícím způsobem:

1. Složka A a B byly smíchány v poměru 1 : 1 (tedy celkem 125  $\mu\text{l}$  po smíchání) a inkubovány po dobu 30 minut, kdy začaly vznikat komplexy liposom – DNA.
2. Do směsi (125  $\mu\text{l}$ ) bylo přidáno 250  $\mu\text{l}$  média RPMI s FBS a bez obsahu ATB. Tím byl získán tzv. master mix pro další kroky.
3. Synchronizované buňky byly opláchnuty 2x v PBS 1x.

4. Do každé jamky bylo přidáno 75  $\mu$ l master mixu a směs se nechala inkubovat po dobu 2 hodin.
5. Po 2 hodinách bylo odsáto transfekční médium.
6. Buňky byly opláchnuty 2x v PBS 1x.
7. Bylo přidáno 100  $\mu$ l média RPMI s FBS, bez ATB na jamku.
8. Bylo odebráno médium pro luciferázový test.

Krok č. 8 je brán jako okamžik  $T_0$ . Od této chvíle bylo odebíráno médium každých 8 hodin po dobu 32 hodin. U každého vzorku byla okamžitě měřena luminiscence luciferázy ve vzorcích. Mezi měřeními byly desky s buňkami drženy za kultivačních podmínek. Médium odebrané pro analýzu bylo vždy nahrazeno médiem novým.

### **3.2.6 Optimalizace nového luminometru a optimalizace média pro měření**

Nejprve bylo nutné optimalizovat nový modulární reader (Spark® Multimode Microplate Reader, Tecan) pro luciferázový test. Pro tento účel byla v ovládacím programu přístroje nastavena samostatná metoda pro měření luminiscence. Také bylo nutné zjistit, zda je plnohodnotné médium RPMI, používané pro kultivaci buněk a veškeré experimenty, vhodné při měření luminiscence a nedochází k ovlivnění luminiscenčního signálu např. hlavními suplementy média, tedy fetálním hovězím sérem a použitou směsí antibiotik. Bylo provedeno několik měření se vzorky, které obsahovaly plnohodnotné médium RPMI, médium RPMI s FBS a bez antibiotik nebo médium RPMI, které neobsahovalo FBS ani antibiotika v kombinaci se směsí pro luciferázový test obsahující substrát luciferázy - coelenterazin. Měření luminiscence probíhalo i na prázdných jamkách bílé destičky (SPL), aby se zjistilo, jak velké jsou hodnoty luminiscence na pozadí.



Seznam vzorků pro optimalizaci měření luminiscence na modulárním readeru Spark:

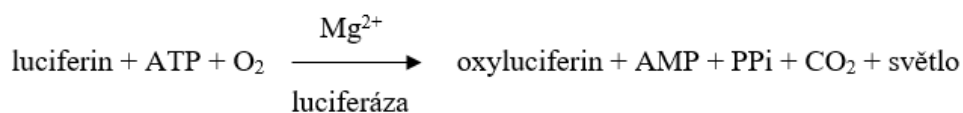
1. 25  $\mu$ l roztoku pro luciferázový test + 10  $\mu$ l plnohodnotného média RPMI
2. 35  $\mu$ l roztoku pro luciferázový test
3. 35  $\mu$ l plnohodnotného média RPMI
4. 35  $\mu$ l média RPMI bez FBS, bez ATB
5. 35  $\mu$ l média RPMI s FBS, bez ATB

### 3.2.7 Luciferázový test

Luciferáza je souhrnný název pro více enzymů s oxireduktázovou aktivitou, které při reakci se substrátem luciferinem nebo jinou látkou umožňují bioluminiscenci a dochází k produkci světla. To je produkováno jako vedlejší produkt reakce.

Luciferáza katalyzuje reakci mezi luciferinem, adenosin trifosfátem (ATP), horečnatými ionty a molekulárním kyslíkem za vzniku oxyluciferinu, anorganického pyrofosfátu, adenosin monofosfátu (AMP), oxidu uhličitého a světla. Jak reakce probíhá, je možné vidět na rovnici 1.

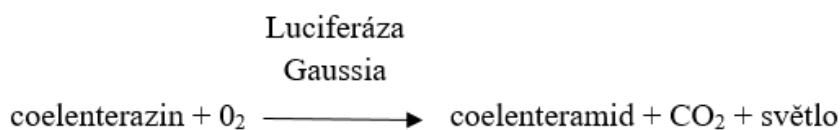
Rovnice 1 Přeměna luciferinu na oxyluciferin za vzniku bioluminiscenčního záření.



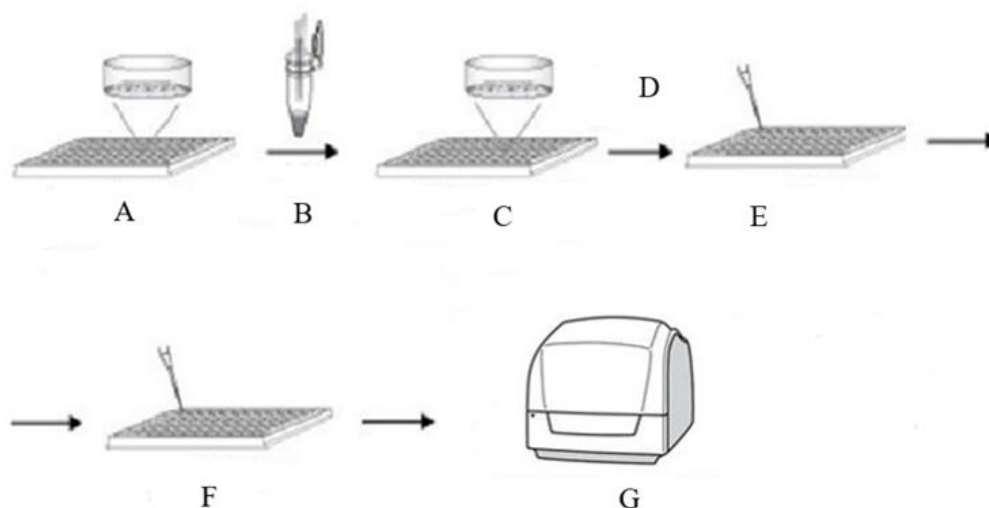
Luciferáza Gaussia je typ luciferázy, která nevyžaduje ATP a je schopna katalyzovat oxidaci substrátu coelenterazinu.

Coelenterazin je látka, která se vyskytuje v těle mořských živočichů (jako jsou medúzy či sasanky). Tato látka funguje jako substrát pro enzym luciferázu. Coelenterazin je za přítomnosti kyslíku přeměněn na coelenteramid za vzniku oxidu uhličitého a světla. Průběh uvedené reakce je znázorněn rovnicí 2.

Rovnice 2 Přeměna coelenterazinu na coelenteramid za vzniku bioluminiscenčního záření.



Luciferázový test je velice citlivá metoda, která se používá ke kvantitativnímu měření exprese luciferázy v eukaryotických buňkách nebo bakteriích obsahujících vektor kódující luciferázu, jak je schématicky znázorněno na obr. 13.



Obr. 13 Schématické znázornění jednotlivých kroků luciferázového testu. A – nasazení buněk na 96-jamkovou destičku. B – přidání transfekčního mixu. C, D – transfekce buněk pomocí plasmidu. E – odstranění transfekčního média. F – přidání roztoku pro luciferázový test. G – měření luminiscenčního signálu.

Měření probíhalo tak, že do 96-jamkové bílé destičky pro měření luminiscence (SPL) bylo napipetováno 10  $\mu\text{l}$  média odebraného z každého vzorku. Do každé jamky bylo navíc přidáno 25  $\mu\text{l}$  roztoku pro luciferázový test obsahujícího coelenterazin. Následně byla měřena luminiscence v jamkách. Vzorky byly připraveny v kvadruplikátu pro každý stupeň modifikace. Byla provedena dvě nezávislá měření.

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1 Optimalizace modulárního readeru a média pro měření

Pro optimalizaci modulárního readeru (Spark® Multimode Microplate Reader, Tecan) byla v ovládacím programu nastavena samotná metoda pro měření luminiscence. Byla provedena tři nezávislá měření luminiscence s jednotlivými vzorky a také měření v prázdných jamkách bílé destičky, aby se zjistily hodnoty luminiscence pozadí. Jednotlivé vzorky obsahovaly buď plnohodnotné médium RPMI, médium RPMI s FBS a bez antibiotik nebo médium RPMI, které neobsahovalo FBS ani antibiotika v kombinaci se směsí pro luciferázový test obsahující substrát luciferázy - coelenterazin. U plnohodnotného média RPMI bylo nutné zjistit, zda nedochází k ovlivnění luminiscenčního signálu např. hlavními suplementy média, tedy fetálním hovězím sérem a použitou směsí antibiotik. Naměřené hodnoty luminiscence pro optimalizaci modulárního readeru a plnohodnotného média RPMI pro měření jsou shrnuty v tabulce 1.

Tab. 1 Naměřené hodnoty luminiscence pro jednotlivé vzorky a prázdné jamky při optimalizaci přístroje.

	<b>Měření 1</b>	<b>Měření 2</b>	<b>Měření 3</b>	<b>Průměr</b>	<b>SD*</b>
<b>Vzorek č. 1</b>	368	384	364	372	10,6
<b>Vzorek č. 2</b>	77	90	69	78,7	10,6
<b>Vzorek č. 3</b>	66	80	90	78,7	12,1
<b>Vzorek č. 4</b>	94	84	87	88,3	5,1
<b>Vzorek č. 5</b>	91	75	106	90,7	15,5
<b>Volná jamka</b>	102	92	84	92,7	9

\*SD – směrodatná odchylka. Vzorek č. 1: 25 µl roztoku pro luciferázový test + 10 µl plnohodnotného média RPMI. Vzorek č. 2: 35 µl roztoku pro luciferázový test. Vzorek č. 3: 35 µl plnohodnotného média RPMI. Vzorek č. 4: 35 µl média RPMI bez FBS, bez ATB. Vzorek č. 5: 35 µl média RPMI s FBS, bez ATB.

Výsledky měření v tab. 1 ukázaly, že FBS nemá vliv na výsledné hodnoty při měření luminiscence. Naopak médium RPMI, které obsahovalo antibiotika, mělo vliv na hodnoty luminiscence, jak můžeme vidět z výsledků pro vzorek č. 1. Samotný luciferázový test je tedy možné provést s médiem RPMI s FBS, ale bez přídavku antibiotik. Ze zjištěných hodnot luminiscence je patrné, že antibiotika mohou ovlivnit výsledky měření, kdy mohou vykazovat zřejmě určitý dopad na štěpení coelenterazinu. Navíc mají antibiotika negativní vliv na Lipofectamine® 2000 Reagent (výrobce je doporučeno se jich v dané esěji vyvarovat), proto byly buňky pro daný experiment drženy v médiu bez jejich obsahu a práce byla prováděna za aseptických podmínek.

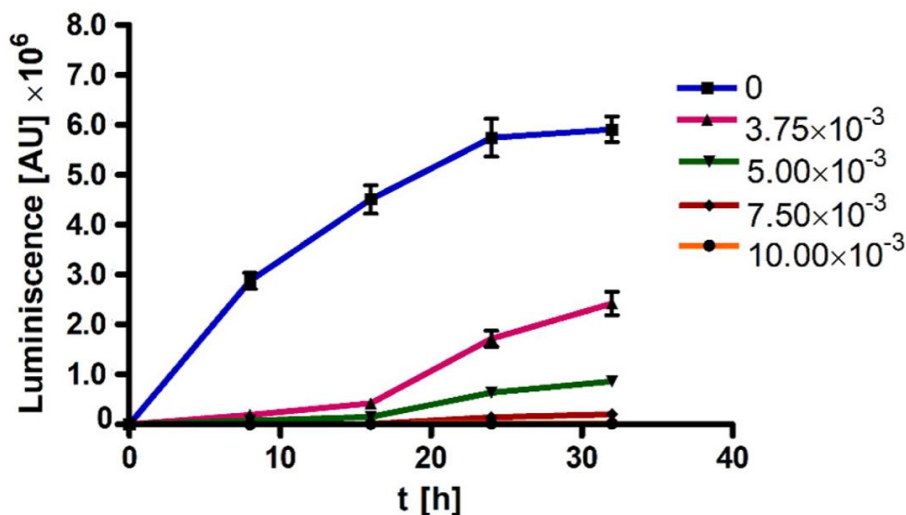
U ostatních testovaných vzorků byly naměřené hodnoty srovnatelné se signálem luminiscence pro prázdné jamky, tedy pozadí. Hodnoty luminiscence v prázdných jamkách byly v každém experimentu od naměřených hodnot odečteny.

## **4.2 Výsledky luciferázového testu**

Cílem luciferázového testu bylo zjistit, jaký vliv mají cisplatina a komplex BBR3464 na inhibici transkripce v lidských nádorových buňkách. Oba komplexy se vážou na molekulu DNA, kde vytváří různé typy aduktů, takže se očekává, že i inhibice transkripce bude probíhat u každého komplexu v jiné míře.

Pro luciferázový test byl zvolen plasmid pCMV-Gluc2 - savčí expresní vektor, který konstitutivně sekretuje luciferázu Gaussia pod kontrolou CMV promotoru. Tento plasmid byl pro účel práce modifikován cisplatinou nebo komplexem BBR3464. Byly provedeny série měření pro jednotlivé stupně modifikace  $r_b$ : 0;  $3,75 \cdot 10^{-3}$ ;  $5 \cdot 10^{-3}$ ;  $7,5 \cdot 10^{-3}$  a  $10 \cdot 10^{-3}$  pro každý komplex. Měření luminiscence luciferázy sekretované do média probíhalo po dobu 32 hodin a to každých 8 hodin od počátku měření.

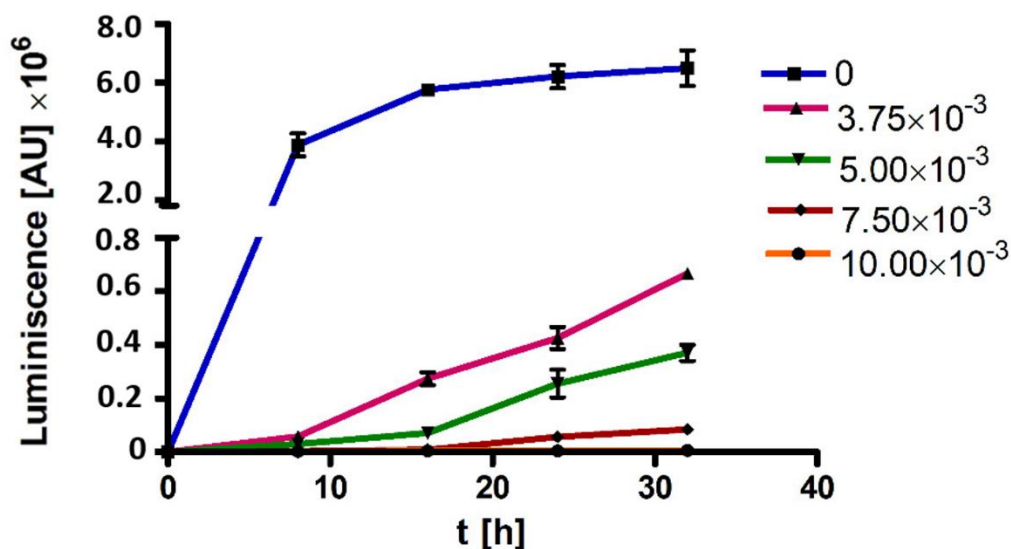
Ze získaných hodnot luminiscence byl nejprve sestaven graf závislosti luminiscence na čase pro cisplatinu (graf 1.)



Graf 1. Reprezentativní znázornění závislosti luminiscence na čase pro cisplatinu. Výsledky představují průměr měření provedeného v kvadruplikátu.

Výsledky z grafu 1 jasně ukázaly, že se vzrůstajícím stupněm modifikace klesá hodnota luminiscence u všech vzorků. Čím vyšší je stupeň modifikace DNA cisplatinou, tím více vzniká zřejmě aduktů na plasmidové DNA. Tyto adukty pak mohou mít vliv na expresi enzymu luciferáza Gaussia, která je u více modifikovaných vzorků tvořena v menším množství. Tento fakt pak odráží snížená úroveň štěpení coelenterazinu na coelenteramid produkující luminiscenční signál v závislosti na stupni modifikace DNA. Při nejvyšším stupni modifikace tedy  $10 \cdot 10^{-3}$  se hodnota luminiscence rovnala prakticky 0. Při nulovém stupni modifikace byla naopak hodnota luminiscence nejvyšší ve všech časech měření, protože v tomto vzorku nebyla plasmidová DNA modifikována cisplatinou a docházelo zde tedy k nejvyšší expresi luciferázy, která byla následně sekretována do kultivačního média. Enzym pak tedy nejvíce štěpil substrát coelenterazin a ve vzorcích nemodifikované DNA byly tím pádem detekovány vysoké hodnoty luminiscence. Každých 8 hodin se hodnoty luminiscence zvyšovaly pro každý stupeň modifikace, kdy docházelo k postupnému množení nádorových buněk nebo opravám aduktů.

Komplex BBR3464 je polynukleární sloučenina, jež tvoří na DNA jiné typy aduktů než cisplatina a mohla by tedy inhibovat transkripci více. Pro porovnání rozdílů byl tedy sestaven reprezentativní graf závislosti luminiscence na čase také pro BBR3464 (graf 2).

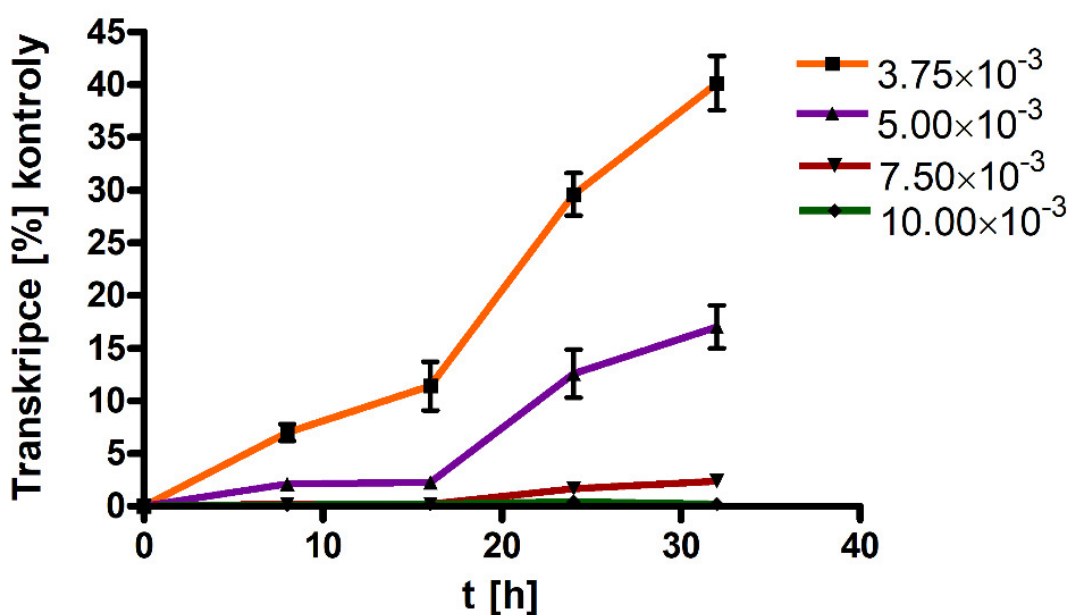


Graf 2. Reprezentativní znázornění závislosti luminiscence na čase pro BBR3464. Výsledky představují průměr měření provedeného v kvadruplikátu.

Výsledky z grafu 2 ukázaly, že se vzrůstajícím stupněm modifikace klesá hodnota luminiscence. Pro komplex BBR3464 také platí jako u cisplatinu, že čím vyšší je stupeň modifikace, tak dochází k vlivu aduktů na expresi enzymu luciferáza Gaussia a tedy tím pádem nedochází k přeměně coelenterazinu na coelenteramid. U komplexu BBR3464 to může být způsobené tím, že vzniká jiný typ aduktů způsobující závažnější blok pro RNA polymerázu. Při nejvyšším stupni modifikace tedy  $10 \cdot 10^{-3}$  se hodnota luminiscence rovnala prakticky 0. Při nulovém stupni modifikace byla hodnota luminiscence nejvyšší, protože v tomto vzorku nebyl plasmid modifikován komplexem BBR3464 a stejně jako u cisplatinu docházelo k nejvýznamnější produkci enzymu a tedy k přeměně coelenterazinu na coelenteramid, proto byly zřejmě detekovány vysoké hodnoty luminiscence. V porovnání s výsledky pro cisplatinu v grafu 1 je patrné, že hodnoty luminiscence pro BBR3464 byly mnohonásobně nižší než hodnoty luminiscence pro cisplatinu. Z toho vyplývá, že komplex BBR3464 pravděpodobně vazbou na plasmidovou DNA vytvářel takové adukty, které měly za následek mnohonásobně vyšší inhibici transkripce a tím pádem nižší hodnoty luminiscence v porovnání s cisplatinou. Když např. porovnáme stupeň modifikace  $5 \cdot 10^{-3}$  v čase 24 h pro oba

komplexy, tak hodnota luminiscence pro cisplatinu přibližně odpovídá  $1 \cdot 10^6$ , pro komplex BBR3464 je to přibližně  $0,3 \cdot 10^6$ . To odpovídá přibližně 3,3x vyšší inhibici pro komplex BBR3464 v porovnání s cisplatinou. Každých 8 hodin se hodnoty luminiscence zvyšovaly pro každý stupeň modifikace. Luminiscence stoupala, protože docházelo k postupnému množení nádorových buněk.

Ze získaných hodnot luminiscence pro všechna měření, byla pro každé  $r_b$  vyjádřena úroveň transkripce v % kontroly. Byl sestaven graf závislosti transkripce (v % kontroly) na čase pro cisplatinu (graf 3).

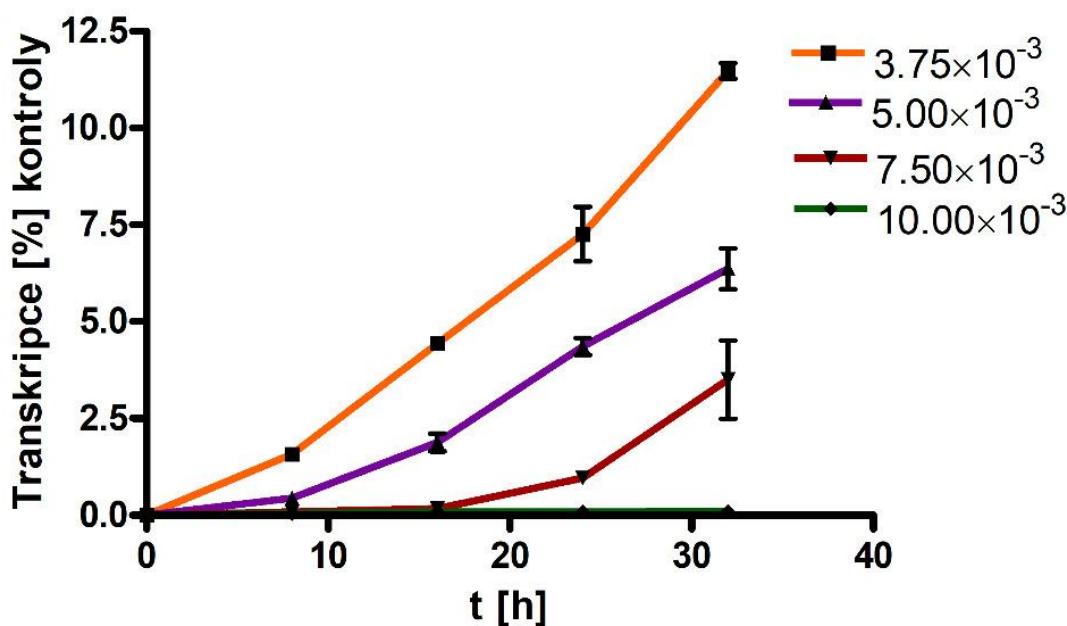


Graf 3. Závislost transkripce (v % kontroly) na čase pro cisplatinu. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr dvou nezávislých měření provedených v kvadruplikátu.

Z výsledků z grafu 3 je patrné, že se vzrůstajícím stupněm modifikace DNA cisplatinou klesá hodnota transkripce. Pro nejmenší  $r_b$   $3,75 \cdot 10^{-3}$  byly hodnoty transkripce nejvyšší ze všech stupňů modifikací protože, zde pravděpodobně docházelo k tvorbě nejmenšího počtu aduktů a transkripce zde byla tedy inhibována nejméně. Pro nejvyšší  $r_b$   $10 \cdot 10^{-3}$  byla hodnota transkripce rovna nule. Tento stupeň modifikace měl za následek úplnou inhibici transkripce.

Zároveň je pozorovatelné, že při každém následujícím měření po 8 hodinách se hodnoty transkripce (v % kontroly) postupně zvyšovaly pro každý stupeň modifikace. Tento efekt mohl být způsoben tím, že postupně docházelo k opravám poškození na DNA opravnými buněčnými mechanismy.

Pro porovnání byl sestaven graf závislosti transkripce (v % kontroly) na čase pro BBR3464.



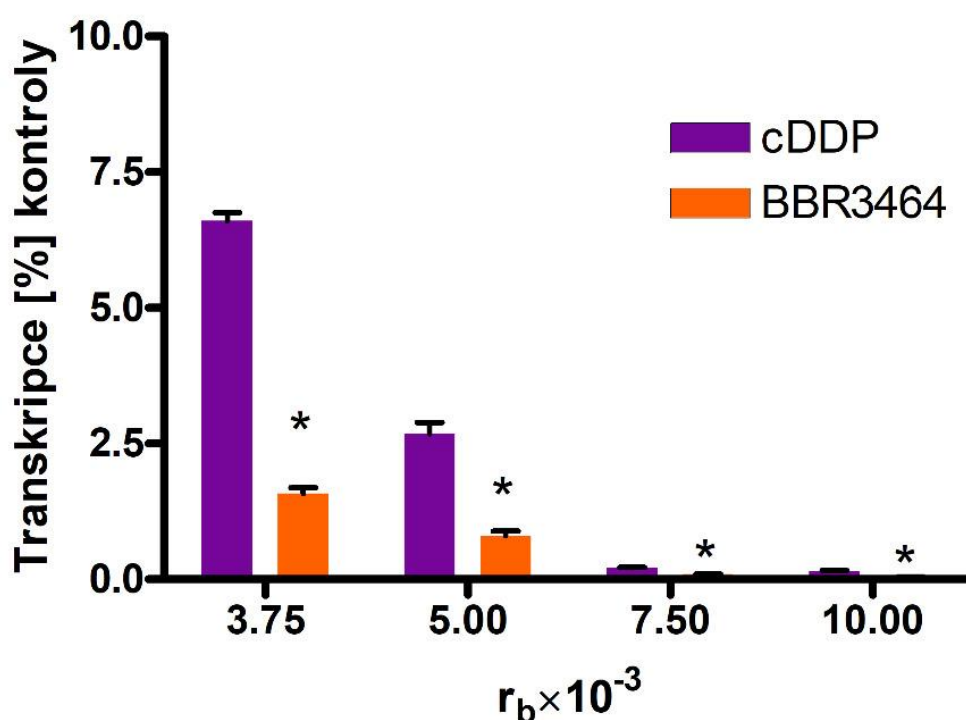
Graf 4 Závislost transkripce (v % kontroly) na čase pro BBR3464. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr dvou nezávislých měření provedených v kvadruplikátu.

Z grafu 4 pro BBR3464 je patrné, že výsledky jsou obdobné jako výsledky pro cisplatinu, avšak v jiném řádu. Platí, že se vzrůstajícím stupněm modifikace klesá hodnota transkripce. Pro nejmenší  $r_b$   $3,75 \cdot 10^{-3}$  byly hodnoty transkripce nejvyšší ze všech stupňů modifikací, protože zřejmě docházelo k tvorbě nejmenšího počtu aduktů a transkripce tak byla inhibována nejméně. Pro nejvyšší  $r_b$   $10 \cdot 10^{-3}$  byla hodnota transkripce rovna nula. Tento stupeň modifikace, měl za následek úplnou inhibici transkripce.



Zároveň je také jako u cisplatinu pozorovatelné, že při každém následujícím měření po 8 hodinách se hodnoty transkripce (v % kontroly) postupně zvyšovaly pro každý stupeň modifikace. To je způsobené zřejmě tím, že postupně docházelo k opravám poškození na DNA opravnými buněčnými mechanismy. Postupné zvyšování transkripce v čase mohla mít za následek také dočasná transfekce, což je pozorovatelné jak u cisplatinu v grafu 3 a u komplexu BBR3464 v grafu 4.

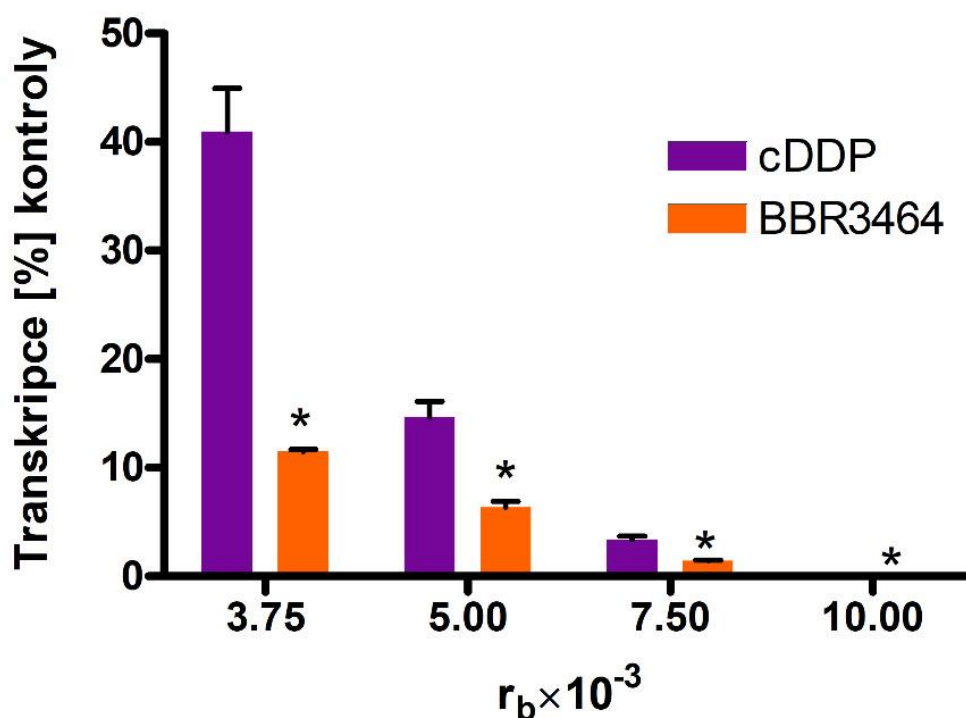
Pro srovnávací účely byl vytvořen graf závislosti transkripce (v % kontroly) na stupni modifikace pro oba komplexy v čase 8 h.



Graf 5. Závislost transkripce (v % kontroly) na stupni modifikace v čase 8 h.. Body představují průměr z 2 nezávislých měření provedených v kvadruplikátu a úsečka představuje směrodatnou odchylku. Hvězdička označuje signifikantní odlišnost hodnot naměřených pro BBR3464 od cisplatinu (Studentův t-test;  $P < 0,05$ ).

Z grafu 5, kde byla porovnána míra transkripce v závislosti na stupni modifikace po 8 hod pro oba komplexy, vyplývá, že komplex BBR3464 měl za následek větší inhibici transkripce než cisplatinu pro všechny stupně modifikace. Pro oba komplexy platí, že se vzrůstajícím stupněm modifikace klesá míra transkripce. Pro stupně modifikace  $7,5 \cdot 10^{-3}$  a  $10 \cdot 10^{-3}$  byly hodnoty transkripce prakticky nulové.

Dále byl pro porovnání vytvořen graf závislosti transkripce (v % kontroly) na stupni modifikace pro oba komplexy v čase 32 h.



Graf 6. Závislost transkripce (v % kontroly) na stupni modifikace v čase 32 h.. Body představují průměr z 2 nezávislých měření provedených v kvadruplikátu a úsečka představuje směrodatnou odchylku. Hvězdička označuje signifikantní odlišnost hodnot naměřených pro BBR3464 od cisplatinu (Studentův t-test;  $P < 0,05$ ).

Z grafu 6, kde byla porovnána míra transkripce v závislosti na stupni modifikace po 32 h pro oba komplexy, vyplývá, že komplex BBR3464 měl za následek větší inhibici transkripce než cisplatinu pro všechny stupně modifikace. Pro oba komplexy platí, že se vzrůstajícím stupněm modifikace klesá míra transkripce. Míra transkripce je v tomto grafu v porovnání s grafem 5 mnohonásobně vyšší. Po 32 hodinách už pravděpodobně došlo k opravám některých lézí na DNA opravnými buněčnými mechanismy, což je jasně viditelné u stupně modifikace  $3,75 \cdot 10^{-3}$ ;  $5 \cdot 10^{-3}$  a  $7,5 \cdot 10^{-3}$ . U nejnižšího stupně modifikace tedy  $3,75 \cdot 10^{-3}$  dosahovala inhibice transkripce v porovnání s komplexem BBR3464 přibližně 4násobně větších hodnot. U stupně modifikace  $5 \cdot 10^{-3}$  dosahovala inhibice transkripce v porovnání s komplexem BBR3464 přibližně 3násobně větších hodnot. U stupně modifikace  $7,5 \cdot 10^{-3}$  byla hodnota transkripce pro komplex BBR3464 stále prakticky nulová. Naopak u tohoto stupně modifikace byla inhibice transkripce

cisplatinou 2násobná. U nejvyššího stupně modifikace tedy  $10 \cdot 10^{-3}$  byla transkripce po 32 hodinách inhibována jak u cisplatiny, tak u komplexu BBR3464. V tomto případě byly adukty zřejmě velmi efektivními inhibitory transkripce.

## 5. DISKUZE

Tato diplomová práce byla zaměřena na studium inhibice transkripce vybranými protinádorově účinnými komplexy platiny v lidských nádorových buňkách A2780 s využitím luciferázového reportérového testu, jakož to velice citlivé a neinvazivní metody, která se využívá ke kvantitativnímu měření exprese luciferázy v eukaryotických buňkách či bakteriích obsahujících vektor kódující luciferázu.

Jako modelová sloučenina pro tuto práci byla zvolena cisplatina. Ta snadno tvoří adukty na DNA a její mechanismus účinku a procentuální zastoupení aduktů tvořených na DNA jsou již dobře známy, jak již bylo několikrát publikováno (Rehm *et al.*, 2018; Todd a Lippard, 2009; Jordan a Carmo-Fonseca, 2000; Ang *et al.*, 2010). Také v naší práci bylo potvrzeno, že cisplatina inhibuje transkripci, kdy efektivita inhibice stoupá se vzrůstajícím stupněm modifikace DNA. Tyto výsledky jsou ve shodě s daty publikovanými v odborné literatuře (Zhu *et al.*, 2012).

Struktura platinových komplexů má také často vliv na výslednou funkci těchto látek, jak již bylo také dříve prokázáno. Cisplatina je velmi efektivním léčivem, avšak má své nevýhody a omezení, proto jsou pro využití v protinádorové terapii studovány také strukturálně odlišné látky a je podrobně zkoumán jejich mechanismus účinku. Jak již bylo zmíněno, tato práce byla zaměřena na studium inhibice transkripce v nádorových buňkách. Uvedený experiment byl proveden také s polynukleárním komplexem BBR3464. Tento komplex je trinukleární sloučeninou platiny a je považován za důležité protinádorové činidlo, protože je účinné v buňkách rezistentních na cisplatinu. Další výhodou je, že může fungovat při 10x až 1000x nižší dávce ve srovnání s úrovní použitelnou pro cisplatinu (Brabec *et al.*, 1999; Wheate a Collins, 2005). Jedním z úkolů předkládané práce bylo potvrdit, zda je inhibice transkripce jedním z klíčových mechanismů biologického účinku komplexu BBR3464. Byla provedena série měření s využitím luciferázového reportérového testu. Cílem měření bylo zhodnotit, zda komplex BBR3464 inhibuje transkripci v rakovinných buňkách A2780 více či méně než dosud v klinické praxi používaná cisplatina.

Výsledky ukázaly, že BBR3464 má mnohonásobně větší účinek na inhibici transkripce v nádorových buňkách než cisplatina pro stejné stupně modifikace. Větší účinek na inhibici transkripce je pravděpodobně způsoben právě strukturou komplexu BBR3464. Struktura je v porovnání s cisplatinou složitější a BBR3464 vytváří pravděpodobně jiné typy aduktů než cisplatina. Tyto adukty pak zřejmě představují větší

blok pro RNA polymerázu nebo jsou méně rozpoznávány či opravovány buněčnými opravnými mechanismy než adukty, které byly na DNA vytvořeny cisplatinou.

Dále existují zmínky, že u DNA po ošetření komplexem BBR3464 dochází k tomu, že DNA se stává kompaktnější. Dochází k blízkému kontaktu řetězců, což má pravděpodobně za následek větší inhibici transkripce, jak již bylo dokázáno pomocí mikroskopie atomových sil (Banerjee *et al.*, 2010). To bylo následně znova potvrzeno a také porováno s cisplatinou, kde DNA vykazovala větší kompaktnost po ošetření komplexem BBR3464 než po modifikaci cisplatinou (Banerjee *et al.*, 2012).

Při měření v čase po 8 hodinách bylo pozorovatelné, že míra transkripce se postupně zvyšovala, protože zde pravděpodobně docházelo k opravám poškození na DNA opravnými buněčnými mechanismy. Tento jev byl pozorovatelný u cisplatiny i u komplexu BBR3464 (Zhu *et al.*, 2012). Postupné zvyšování transkripce v čase mohla mít za následek také dočasná transfekce (Rybakovski *et al.*, 2019). Tento jev byl pozorovatelný u cisplatiny i u komplexu BBR3464.

## 6. ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce byla zkoumána inhibice transkripce indukovaná vybranými protinádorově účinnými komplexy platiny, konkrétně cisplatinou a polynukleárním komplexem BBR3464, v lidských nádorových buňkách A2780. Ze získaných výsledků vyplývá, že komplex BBR3464 inhiboval transkripci mnohonásobně více než cisplatinou. To mohlo být způsobeno například tvorbou jiného typu aduktů komplexem BBR3464 na DNA. Dané adukty mohou mít v porovnání s cisplatinou větší vliv na inhibici transkripce nebo být složitěji opravovány buněčnými mechanismy. Zároveň bylo zjištěno, že během měření postupně docházelo k zvyšování transkripce, což bylo pravděpodobně způsobeno tím, že některé adukty vytvořené cisplatinou nebo komplexem BBR3464 byly postupně opraveny opravnými buněčnými mechanismy nebo to také mohlo být způsobeno dočasnou transfekcí. Inhibice transkripce je tedy také důležitým aspektem aktivity BBR3464. Pro prokázání přesného mechanismu inhibice by bylo třeba dalších studií.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K., Walter P. (2008): *How Cells Read the Genome: From DNA to Protein*. In: *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed., Garland Science, New York, 1601

Andrews L. G., Tollefsbol T. O. (2008): Methods of telomerase inhibition. *Methods in Molecular Biology* **405**, 1-8

Ang W. H., Myint M. N. Z., Lippard S. J. (2010): Transcription Inhibition by Platinum-DNA Cross-Links in Live Mammalian Cells. *Journal of the American Chemical Society* **132(21)**, 7429-7435

Arora N., Alsaied O., Dauer P., Majumber K., Modi S., Giri B., Dudeja V., Banerjee S., Hoff D., Saluja A. (2018): Downregulation of Sp1 by Minnelide leads to decrease in HSP70 and decrease in tumor burden of gastric cancer. *PLOS one* **12(2)**, e0171827

Astolfi L., Ghiselli S., Guaran V., Chicca M., Simoni E., Olivetto E., Lelli G., Martini A. (2013): Correlation of adverse effects of cisplatin administration in patients affected by solid tumours: A retrospective evaluation. *Ontology reports* **29**, 1285-1292

Banerjee T., Dubey P., Mukhopadhyay R. (2010): Compacting effect of BBR3464, a new-generation trisplatinum anticancer agent on DNA. *Biochimie* **92**, 846-851

Banerjee T., Dubey P., Mukhopadhyay R. (2012): DNA compaction by mononuclear platinum cancer drug cisplatin and the trisplatinum anticancer agent BBR3464: Differences and similarities. *Biochimie* **94**, 494-502

Banerjee S., Sanqwan V., McGinn O., Chugh R., Dudeja V., Vickers S. M., Saluja A. K. (2013): Triptolide-induced cell death in pancreatic cancer is mediated by O-GlcNAc modification of transcription factor Sp1. *Journal of Biological Chemistry* **288(47)**, 33927-38

Brabec V., Kasparkova J., Vrana O., Novakova O., Cox J. W., Qu Y., Farrell N. (1999): DNA modification by a novel bifunctional trinuclear platinum phase I anticancer agent. *Biochemistry* **39**, 6781-6790

Browning, R. J., Reardon, P. J. T., Parhizkar, M., Pedley, R. B., Edirisinghe, M., Knowles, J. C., & Stride, E. (2017): Drug Delivery Strategies for Platinum-Based Chemotherapy. *ACS Nano* **11(9)**, 8560–8578

Bugarčić Ž. D., Bogojeski J., Petrović B., Hochreuther S., Van E. R. (2012): Mechanistic studies on the reactions of platinum(II) complexes with nitrogen- and sulfur-donor biomolecules. *Dalton Trans*, **41**, 12329-12345

Burger A. M., Double J. A., Newell D. R. (1997): Inhibition of telomerase activity by cisplatin in human testicular cancer cells. *European Journal of Cancer* **33(4)**, 638-644

- Cai Y., Kandula V., Kosuru R., Ye X., Irwin M. G., Xia Z. (2017): Decoding telomere protein Rap1: Its telomeric and nontelomeric functions and potential implications in diabetic cardiomyopathy. *Cell Cycle* 16(19), 1765-1773
- Cao Q., Li Y., Freisinger E., Qin P. Z., Sigel R. K. O., Mao Z-W. (2016): G-quadruplex DNA targeted metal complexes acting as potential anticancer drugs. *Inorganic Chemistry Frontiers* 4(1), 10-32
- Clauson C., Scharer O. D., Niedernhofer O. D. (2013): Advances in Understanding the Complex Mechanisms of DNA Interstrand Cross-Link Repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5(10), a012732
- Crowley L. C., Marfell b. J., Christensen M. E., Waterhouse N. J. (2016): Measuring Cell Death by Trypan Blue Uptake and Light Microscopy. *Cold Spring Harbor Protocols* 7, 643-646
- Cullinane C., Mazur S. J., Essigmann J. M., Phillips D. R., Bohr V. A. (1999): Inhibition of RNA Polymerase II Transcription in Human Cell Extracts by Cisplatin DNA Damage. *Biochemistry* 38, 6204-6212.
- Damsma G. E., Brueckner F., Alt A., Carell T., Cramer P. (2007): Mechanism of transcriptional stalling at cisplatin-damaged DNA. *Nature Structural Molecular Biology* 14(12), 1137-33.
- Dilruba S., Kalayda G. V. (2016): Platinum-based drugs: past, present and future. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 77, 1103-1124
- Fan D., Yang X., Wang X., Zhang S., Mao J., Ding J., Lin L., Guo Z. (2007): A dinuclear monofunctional platinum(II) complex with an aromatic linker shows low reactivity towards glutathione but high DNA binding ability and antitumor activity. *J. Biol. Inorg. Chem* 12, 655-665
- Ferreida R. J., Ferreida M. J., Santos D. J. V. A. (2014): Reversing cancer multidrug resistance: insight into the efflux by ABC transports from *in silico* studies. *Computational Molecular Science* 5(1), 27-55
- Filipits M. (2004): Mechanism of cancer: multigrug resistance. *Drug Discovery Today: Disease Mechanism* 1(2), 229-234
- Fu D., Collins K. (2007): Purification of Human Telomerase Complexes Identifies Factors Involved in Telomerase Biogenesis and Telomere Length Regulation. *Molecular Cell* 28(5), 773-785
- Furuta T., Ueda T., Aune G., Sarasin A., Kraemer H. K., Pommier Y. (2002): Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant os cisplatin sensitivity of human cells. *Cancer Research* 62(17), 4899-902
- Garcia, J., Costa, V. M., Carvalho, A., Baptista, P., Pinho, P. G., Lourdes Bastos, M., Carvalho, F. (2015): Amanita phalloides poisoning: mechanisms of toxicity and treatment. *Food Chemical Toxicology* 86, 41-55



He. Y., Ding Yin., Wang D., Zhang W., Chen W., Liu X., Qin W., Qian X., Chen H., Guo Z. (2014): HMGB1 bound to cisplatin-DNA adducts undergoes extensive acetylation and phosphorylation *in vivo*. *Chemical Science* **6**, 2074-2078

Homez D. E., Armando R. G., Farina H. G., Menna P. L., Cerrudo C. S., Ghiringhelli P. D., Alonso D. F. (2012): Telomere structure and telomerase in health and disease. *International Journal of Oncology* **41**(5), 1561-1569

Isharwal S., Modi S., Arora N., Uhlrich III C., Giri B., Barlass U., Soubra A., Chugh R., Dehm S. M., Dudeja V., Saluja A., Banerjee S., Konety B. (2017): Minnelide Inhibits Androgen Dependent, Castration Resistant Prostate Cancer Growth by Decreasing Expression of Androgen Receptor Full Length and Splice Variants. *The prostate* **77**(6), 584-596

Ishida S., Lee J., Thiele D. J., Herskowitz I. (2002): Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(22), 14298-302

Jiang C., Huang S., Gao P., Chen D. (2018): Triptolide inhibits the growth of osteosarcoma by regulating microRNA-181a via targeting PTEN gene *in vivo* and *in vitro*. *Tumour Biology* **39**(4).

Jordan P., Carmo-Fonseca M. (2000): Molecular mechanism involved in cisplatin cytotoxicity. *Cellular and Molecular Life Sciences* **57.**, 1229-1235

Jung Y., Lippard S. (2003): Multiple States of Stalled T7 RNA Polymerase at DNA Lesions Generated by Platinum Anticancer Agents. *The Journal of Biological Chemistry* **278**(52), 52084-52092.

Kasherman Y., Sturup S., Gibson D. (2009): Is glutathione the Major Cellular Target of Cisplatin? A study of the Interactions of Cisplatin with Cancer Cell Extracts. *Journal of Medicinal Chemistry* **54**(14), 4319-4328

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

Kunkel A. T., Erie A. D. (2005): DNA Mismatch Repair. *Annual Review of Biochemistry* **74**, 681-710

Kraker, A. J., Hoeschele, J. D., Elliott, W. L., Showalter, H. D. H., Sercel, A. D., Farrell, N. (1992): Anticancer Activity in Murine and Human Tumor Cell Lines of Bis(platinum) Complexes Incorporating Straight-Chain Aliphatic Diamine Linker Groups, *J. Med. Chem* **35**, 4526-4532

Krosch T. C. K., Sangwan V., Banerjee S., Mujumdar N., Dudeja V., Saluja A. K., Vickers S. M. (2013): Triptolide-mediated cell death in neuroblastoma occurs by both apoptosis and autophagy pathways and results in inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B activity. *The American Journal of Surgery* **205**(4), 387-396

Kuo M. T., Chen H. H. W., Song I. S., SavRj N., Ishikawa T. (2007): The role of copper transporter in cisplatin resistance. *Cancer Metastasis Reviews* **26**(1), 71-83

- Kupchan S. M., Court W. A., Dailey GR. Jr., Gilmore C. J., Bryan R. F. (1972): Triptolide and triptodiolide, novel antileukemic diterpenoid triepoxides from *Tripterygium wilfordii*. *Journal of the American Chemical Society* 94(20), 7194-5
- Lin X., Okuda T., Holzer A., Howell S. B. (2002): the copper transporter CTR1 regulated cisplatin uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Pharmacology* 62(5), 1154-9
- Lebwohl D., Canetta R. (1998): Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *European Journal of Cancer* 34(10), 1522-34
- Makovec T. (2019): Cisplatin and Beyond: Molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer therapy. *Radiology and Oncology* 53(2), 148-158
- Mangrum J. B., Farrell N. P. (2010): Excursions in polynuclear platinum DNA binding. *Chem. Commun* 46, 6640-6650
- Marciniak B., Łopaczyńska D., Ferenc T. (2017): Evaluation of the genotoxicity of alpha-amanitin in mice bone marrow cells, *Toxicol* 137, 1-6
- Martín M., Díaz-Rubio E., Santabárbara P., López Vega J. M., Lenaz E. A. (1992): Carboplatin: an active drug in metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 10(3), 433-7
- Noel P., Hoff D. D., Saluja A. K., Velagapudi M., Borazanci E., Han. H. (2019): Triptolide and its derivatives as cancer therapies. *Trends in Pharmacological Sciences* 40(5), 327-341
- Park S., Lippard S. J. (2012): Binding interaction of HMGB4 with cisplatin-modified DNA. *Biochemistry* 51, 6728-6737
- Pigneux A., Mahon F. X., Uhalde M., Jeanneteau M., Macombe F., Milpied N., Rieffers J., Belloc F. (2008): Triptolide cooperates with chemotherapy to induce apoptosis in acute myeloid leukemia cells. *Experimental Hematology* 36, 1648-1659
- Qu Y., Tran M. C., Farrell N. P. (2009): Structural consequences of a 3'→3'DNA interstrand cross-link by a trinuclear platinum complex: unique formation of two such cross-links in a 10-mer duplex. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* volume 14, 969-977
- Rivard C., Geller M., Schnetter E., Saluja M., Vogel R. I., Saluja A., Ramakrishnan S. (2014): Inhibition of epithelial ovarian cancer by Minnelide, a water-soluble pro-drug. *Gynecologic Oncology* 135(2), 318-324
- Rehm T., Rothmund, M., Bär A., Dietel T., Kempe R., Kostrhunova H., Brabec V., Kasparkova J., and Schobert R. (2018): N,N-Dialkylbenzimidazol-2-ylidene platinum complexes – effects of alkyl residues and ancillary cis-ligands on anticancer activity. *Dalton Transaction* 47, 17367-17381
- Rosenberg B., Camp V. L., Krigas T. (1965): Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* 205, 698-699

- Rosenberg B., Camp V. L., Trosko J. E., Mansour V. H. (1969): Platinum Compounds: A new class of potent antitumor agents. *Nature* **222**, 385-386
- Rybakovski E., Valenzano M. C., DiGuilio K. M., Buleza N. B., Moskalenko D. V., Harty R. N., Mullin J. M. (2019): Improving Transient Transfection Efficiency in a Differentiated, Polar Epithelial Cell Layer. *Journal of Biomolecular Techniques* **30(2)**, 19-24
- Sakaeda T., Madoyama K., Okuno Y. (2011): Adverse Event Profiles of Platinum Agents: Data Mining of the Public Version of the FDA Adverse Event Reporting System, AERS, and Reproducibility of Clinical Observations. *International Journal of Medical Sciences* **8(6)**, 487-491
- Shao H., Ma J., Guo T., Hu R. (2014): Triptolide induces apoptosis of breast cancer cells via a mechanism associated with the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine* **8(2)**, 505-508
- Shay J. W., Wright W. E. (2002): Telomerase: A target for cancer therapeutics. *Cancer Cell* **2(4)**, 257-265
- Schmitt F., Donnelly K., Muenzner J., Rehm T., Novohradsky V., Brabec V., Kasparikova J., Albrecht M., Schober R., Mueller T. (2016): Effects of histidin-2-ylidene vs. imidazol-2-ylidene ligands on the anticancer antivasculature activity of complex of ruthenium, iridium, platinum and gold. *Journal of Inorganic Biochemistry* **163**, 221-228
- Snustad D. P., Simmons M. J. (2009): *Transkripce a úpravy RNA*. In: *Genetika* (Relichova J.), Masarykova Univerzita, Brno, 297-302
- Sun C., Luo X., Gou Y., Hu L., Wang K., Li C., Xiang Z., Zhang P., Kong X., Zhang C., Yang Q., Li J., Xiao L., Li Y., Chen Q. (2014): TCAB1: a potential target for diagnosis and therapy of head and neck carcinomas. *Molecular Cancer* **13(1)**, 180
- Špačková N. (2009): Tři je málo, pět je moc aneb seznamte se k kvadruplexy. *Živa* **3**, 98-100
- Tan A. R., Swain S. M. (2002): Review of flavopiridol, a cyclin-dependent kinase inhibitor, as breast cancer therapy. *Seminars in Oncology* **29(3)**, 77-85
- Tinker A. V., Bhagat K., Swenerton K. D., Hoskins P. J. (2005): Carboplatin and paclitaxel for advanced and recurrent cervical carcinoma: the British Columbian Cancer Agency experience. *Gynecologic Oncology* **98(1)**, 54-58
- Tinker A. V., Bhagat K., Swenerton K. D., Hoskins P. J. (2007): A Phase II Study of Paclitaxel, Carboplatin and Radiation with or without Surgery for Esophageal cancer. *Journal of Thoracic Oncology* **2(2)**, 153-157
- Todd R. C., Lippard S. J. (2009): Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds. *Metallomics* **1(4)**, 280-291

- Tornaletti S., Patrick S. M., Turchi J. J., Hanawalt P. C. (2003): Behavior of T7 RNA Polymerase and Mammalian RNA Polymerase II at Site-specific Cisplatin Adducts in the Template DNA. *The Journal of Biological Chemistry* 278(37), 35791-35797
- Venteicher A. S., Meng Z., Mason P. J., Veenstra T. D., Artandi S. E. (2009): Identification of ATPases pontin and reptin as telomerase components essential for holoenzyme assembly. *Cell*, 132(6), 945-957
- Vrana O., Boudny V., Brabec V. (1996): Superhelical torsion controls DNA interstrand cross-linking by antitumor cis-diamminedichloroplatinum (II). *Nucleic Acids Research* 24(20), 3918-3925
- Walker J. R., Zhu X. D. (2012): Post-translational modifications of TRF1 and TRF2 and their roles in telomere maintenance. *Mechanisms of Aging and Development* 133(6), 421-34
- Wedlock L. E., Kilburn M. R., Liu R., Shaw J. A., Berners-Price S. J., Farrell N. P. (2013): NanoSIMS multi-element imaging reveals internalisation and nucleolar targeting for a highly-charged polynuclear platinum compound. *Chem. Commun* 49, 6944-6946
- Wang D., Lippard S. J. (2004): Cisplatin induces post-translation modification of histones H3 and H4. *Journal of Biological Chemistry* 279(20), 20622-20625
- Wetzel C. C., Berberich J. S. (2001): p53 binds to cisplatin-damaged DNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Gene Structure and Expression* 1517(3), 392-397
- Wheate N. J., Collins J. G. (2005): Multi-nuclear platinum drugs: a new paradigm in chemotherapy. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* 5, 267-279
- Wheate N. J., Collins J. G. (2003): Multi-nuclear platinum complexes as anti-cancer drugs. *Coordination Chemistry Reviews* 241 (1), 133-145
- Wheate N. J., Walker S., Craig G. E., Oun R. (2010): The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Transaction* 39(35), 8113-8127
- Wilson T. R., Longley D. B., Johnston P. G. (2006): Chemoresistance in solid tumours. *Annals of Oncology* 17(10), 315-324
- Ziaei S., Halaby R. (2016): Immunosuppressive, anti-inflammatory and anti-cancer properties of triptolide: A mini review. *Avicenna Journal of Phytomedicine* 6(2), 149-164
- Zhang S., Lovejoy K. S., Shima J. E., Laqpacan L. L., Shu Y., Lapuk A., Chen Y., Komori T., Gray J. W., Chen X., Lippard S. J., Giacomini K., M. (2006): Organic Cation Transporters Are Determinants of Oxaloplatin Cytotoxicity. *Cancer Research* 66(17), 8847-57
- Zhu G., Myint M., And W. H., Song L., Lippard S. J. (2012): Monofunctional Platinum-DNA Adducts Are Strong Inhibitors of Transcription and Substrates for Nucleotide Excision Repair in Live Mammalian Cells. *Cancer research* 72(3), 790-800
- Zvereva M. I., Shcherbakova D. M., Dontsova O. A. (2010): Telomerase :Structure, function and activity regulation. *Biochemistry* 75(13), 1563-1583