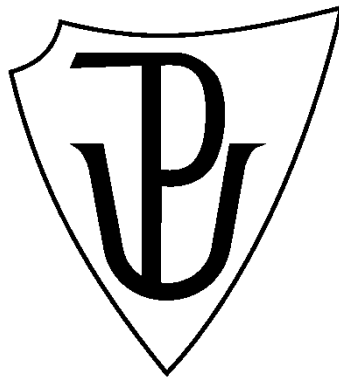


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOFYZIKY



DIPLOMOVÁ PRÁCE

VOJTĚCH NOVOHRADSKÝ

2011



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOFYZIKY

**MECHANISTICKÁ STUDIE TRANSLÉZOVÉ SYNTÉZY DNA POŠKOZENÉ
PROTINÁDOROVĚ ÚČINNÝMI KOMPLEXY KOVŮ**

*MECHANISTIC STUDY OF TRANSLATION DNA SYNTHESIS ACROSS A DAMAGE BY ANTITUMOR METAL
BASED COMPLEXES*

VEDOUcí: Prof. RNDr. Jana Kašpárková Ph.D.
ODBORNÝ DOHLED: Mgr. Tereza Suchánková
PRACOVÍŠTĚ: BIOFYZIKÁLNÍ ÚSTAV AV ČR, v. v. i.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Bc. Vojtěch Novohradský
Název diplomové práce:	Mechanistická studie translézové syntézy DNA poškozené protinádorově účinnými komplexy kovů
Thesis:	Mechanistic study of translesion DNA synthesis across a damage by antitumor metal based complexes
Univerzita; fakulta:	Univerzita Palackého v Olomouci; Přírodovědecká fakulta
Studijní program:	Fyzika
Studijní obor:	Biofyzika
Vedoucí:	Prof. RNDr. Jana Kašpárková Ph.D.
Oponent:	
Rok obhajoby:	2011
Klíčová slova:	<i>Cis</i> -diammindichloroplatnatý komplex, cisplatina, translézové polymerázy, vnitrořetězcový můstek
Key words:	<i>Cis</i> -diamminedichloroplatinum complex, cisplatin, translesion polymerases, intrastrand crosslink
Počet stran:	77

PROHLÁŠENÍ

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

V Olomouci:

.....

Vojtěch Novohradský

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji své vedoucí, prof. Janě Kašpárkové, za příkladné vedení, podporu a cenné rady během vykonávání diplomové práce. Mgr. Tereze Suchánkové děkuji za pomoc na experimentech, seznámení s laboratorní praxí a především za její skvělý pozitivní přístup k práci. Dr. Olze Novákové děkuji za rady, konzultace a pomoc při experimentu. Kolektivu Biofyzikálního ústavu AV ČR děkuji za vytvoření přátelského a motivujícího pracovního prostředí. V neposlední řadě děkuji své rodině za velkou podporu při studiu.

ABSTRAKT

Cisplatina si i po více než třiceti letech od uvedení na trh udržela své postavení mezi dostupnými chemoterapeutiky. Díky vysoké úspěšnosti při léčbě karcinomu varlat je stále téměř výhradním léčivem pro toto onemocnění. Nelze však zanedbat skutečnost, že při terapii dochází k negativnímu ovlivnění kvality života pacienta a také případně ke vzniku rezistence vůči léčivu.

Mechanismus účinku komplexu je multifaktoriální, hlavním faktorem zodpovědným za cytotoxické působení cisplatiny je její vazba na DNA a následné poškození struktury a funkce DNA. Majoritními typy tvořených aduktů jsou sekvenčně specifické AG a GG vnitrořetězcové (IAC) můstky, jejichž přítomnost v řetězci DNA způsobuje destabilizační změny dvouřetězcové struktury DNA. Změna struktury a stability duplexu DNA ovlivňuje mimo jiné činnost, DNA-dependentních DNA polymeráz, kdy DNA polymerázy účastníci se replikace nejsou schopny poškození překonat a tzv. translázově aktivní polymerázy překlenují léčivem vytvořenou překážku. V lidské buňce vykazuje vysokou procesivitu při překonávání cisplatinou vytvořených aduktů polymeráza η (éta), která vykazuje vysokou přesnost (fidelitu). Často využívaným modelem eukaryotických polymeráz při *in vitro* experimentech je prokaryotický Klenowův fragment DNA polymerázy I (*E. coli*).

Experimenty prokazující vzájemné difference mezi prokaryotickým a eukaryotickým typem translázově aktivní DNA polymerázy byly zaměřeny zejména na studium kinetiky a vlivu koncentrace enzymu při překonávání sekvenčně specifických vnitrořetězcových aduktů. Z výsledků této diplomové práce vyplývá, že Klenowův fragment rozlišuje při translázové syntéze mezi vnitrořetězcovými můstky AG a GG. Výraznější schopnost inhibovat syntézu produktu plné délky (FLP) vykazuje AG IAC můstek a vzájemné rozdíly mezi adukty jsou pak nejpatrnější při použití primeru, který svým 3' koncem nasedá až k lézi. Na rozdíl od bakteriální DNA polymerázy, lidská polymeráza η mezi oběma typy můstků nerozlišuje. Termodynamická analýza určení bodu tání oligonukleotidu potvrdila větší schopnost destabilizace dvouřetězcové struktury AG IAC můstkem ve srovnání s můstkem GG.

ABSTRACT

Cisplatin even after more than thirty years since it was introduced in the clinic maintains its leading position among anticancer chemotherapeutics. Due to great success of the treatment of testicular cancer, cisplatin continues to be almost exclusive medical drug suitable for treatment of this disease. However, it is impossible to neglect the fact that chemotherapy by cisplatin is accompanied by negative affection of the quality of life of patients and by acquired resistance.

Mechanism underlying antitumor effects of cisplatin is multifactorial. The major factor responsible for cytotoxic effects of cisplatin is its binding to DNA and subsequent damage of its structure and function. Major types of the adducts formed on DNA by cisplatin are sequence-specific GG and AG intrastrand cross-links, the presence of which in the DNA strand destabilizes double-helical structure of this nucleic acids. Change of the structure and stability of DNA affects among others activity of DNA-dependent DNA polymerases, when DNA polymerases participating in DNA replication are unable to bypass DNA damage. On the other hand, so called translesion DNA polymerases can bypass the damage induced by the drug. In human cells, high fidelity DNA polymerase η exhibits high processivity of bypassing adducts formed in DNA by cisplatin. Prokaryotic Klenow fragment of DNA polymerase I (*E. coli*) is a frequently used model of eukaryotic DNA polymerases exploited in *in vitro* experiments.

Experiments demonstrating mutual differences between prokaryotic and eukaryotic types of translesion DNA polymerase were focused in particular on studies of kinetics and effects of the concentration of the enzyme on translesion DNA synthesis across sequence-specific intrastrand cross-links of cisplatin. The results of this diploma work show that Klenow fragment distinguishes, during DNA translesion synthesis, between GG and AG intrastrand cross-links. The AG intrastrand cross-link exhibits a more pronounced efficiency to inhibit synthesis of the full-length products. The mutual differences between the adducts are most apparent in the „standing start“ experiments when the 3' end of the primer is complementary to the base preceding the lesion. In contrast to prokaryotic DNA polymerase, human DNA polymerase η does not distinguish between both types of the cross-link. Thermodynamic analysis, which was used to determine melting point of the oligonucleotide duplex confirmed greater capability of the destabilization of the double-stranded structure by the AG intrastrand cross-link in comparison with the GG intrastrand lesion.

OBSAH

Bibliografická identifikace	3
Abstrakt	5
Abstract	6
Obsah	7
1 ÚVOD	10
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	11
2.1 Objev <i>Cis</i> -diammindichloroplatnatého komplexu-cisplatiny	11
2.2 Fyzikálně chemické vlastnosti cisplatiny.....	12
2.2.1 Syntéza cisplatiny, chování ve vodě, absorpční spektrum.....	12
2.2.2 Aplikace, distribuce, farmakokinetika	13
2.3 Mechanismus účinku	13
2.3.1 Hydratace cisplatiny	13
2.3.2 Vazba cisplatiny na DNA, typy aduktů	14
2.3.3 Konformační změny DNA vyvolané adukty cisplatiny.....	16
2.4 Celulární rezistence.....	18
2.4.1 Příjem cisplatiny buňkou	18
2.4.2 Inaktivace proteiny obsahujícími thiol.....	18
2.4.3 Vazba proteinů.....	19
2.4.4 Oprava DNA.....	21
2.5 Vliv aduktů na replikaci a transkripci DNA.....	22
2.6 Eukaryontní polymerázy s translázovou aktivitou	23
2.6.1 Mechanismus syntézy translázově aktivními polymerázami	24
2.6.2 Polymerázy skupiny X.....	24
2.6.3 Polymerázy skupiny Y	26
2.6.4 Přehled translázově aktivních polymeráz	26
2.7 Prokaryontní polymerázy	29
3 CÍL PRÁCE	30
4 MATERIÁL A METODY.....	31
4.1 Použité chemikálie, oligonukleotidy a primery.....	31
4.2 Materiály	32
4.3 Metody	34

4.3.1	Aktivace cisplatiny	34
4.3.2	Modifikace oligonukleotidů	34
4.3.3	Separace modifikovaných oligonukleotidů pomocí HPLC:	34
4.3.4	Dialýza	35
4.3.5	Stanovení koncentrace modifikovaných oligonukleotidů-AS	35
4.3.6	Stanovení koncentrace cisplatiny pomocí AAS	35
4.3.7	HPLC štěpení	36
4.3.8	Značení primerů pomocí T4-polynukleotid kinázy	37
4.3.9	Hybridizace	38
4.3.10	Reakce s polymerázou η	38
4.3.10.1	Koncentrační závislosti	38
4.3.10.2	Kinetické studie	39
4.3.11	Reakce s Klenowovým fragmentem	39
4.3.11.1	Koncentrační závislosti	39
4.3.11.2	Kinetické studie	40
4.3.12	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu	40
4.3.13	Hybridizace komplementárních řetězců (dsDNA)	40
4.3.14	Cirkulární dichroismus	41
4.3.15	Měření teplotní křivky tání	41
5	VÝSLEDKY	42
5.1	Separace na HPLC	42
5.2	Kontrola modifikace oligonukleotidů	43
5.3	Stanovení koncentrace platiny ve vzorku pomocí AAS	43
5.4	HPLC štěpení	43
5.5	Polymerázové reakce-lidská Pol η	45
5.5.1	Koncentrační závislosti Pol η	45
5.5.2	Kinetické studie Pol η	48
5.6	Polymerázové reakce-prokaryontní Klenowův fragment	50
5.6.1	Koncentrační závislosti	50
5.6.2	Kinetické studie	53
5.7	Stabilita oligonukleotidů - teplotní křivky tání	56
5.8	Cirkulární dichroismus	58

6	DISKUSE	59
	<i>Hydratace cisplatiny, modifikace oligonukleotidů</i>	60
	<i>Polymerázové reakce</i>	61
	<i>Vliv vnitrořetězcových můstků na stabilitu oligonukleotidů</i>	63
	<i>Závěrečné zhodnocení, posouzení konzistence výsledků</i>	64
7	SEZNAM ZKRATEK	66
8	CITOVANÁ LITERATURA	67
9	PŘÍLOHY	76
9.1	Syntéza cisplatiny	76
9.2	3D modely konformací DNA	77

1 ÚVOD

Zdraví je nejcennější hodnota lidského bytí, o to horší je pro každého představa pozitivně diagnostikovaného onemocnění, kde úspěch léčby není nikterak zaručen. Boj s rakovinou je fenoménem moderní civilizace, na jehož léčbu se ročně vynaloží 895 miliard USD, což představuje 1,5% celosvětového HDP a je tím i celosvětově nejnákladnějším onemocněním. (1) Tyto strohé finanční sumace silně kontrastují se 7,6 miliony lidí, kteří tomuto onemocnění v roce 2010 podlely. (2)

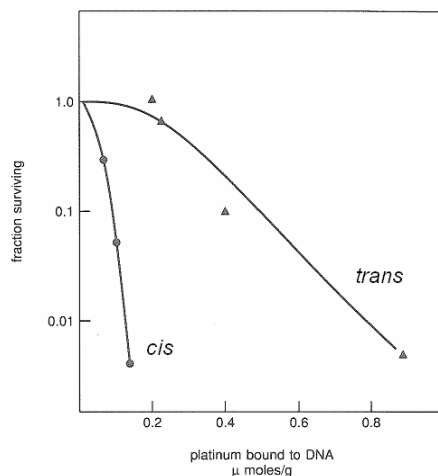
Prevence a včasná diagnostika je nejúspěšnější „vynalezenou léčbou“ do současné doby. Avšak i odpovědný přístup k vlastnímu zdraví nemusí zabránit rozvinutí tohoto život ohrožujícího onemocnění. Proto se výzkumné týmy po celém světě snaží vynalézt úspěšnou a minimálně invazivní léčbu. V současné době patří mezi zavedené metody léčby chirurgický zákrok, chemoterapie, radioterapie a kombinace všech těchto přístupů. Ne vždy je vhodné dané onemocnění léčit chirurgickou metodou, jelikož nález nemusí mít charakter solidního útvaru a samotný zákrok může ohrozit zdraví a život pacienta. V drtivé většině případů má pacient možnost chemoterapeutické léčby, která však zpravidla výrazně ovlivňuje kvalitu života a má i řadu vedlejších účinků. Chemoterapie je však jednou z nejkompexnějších a neúčinnějších metod, jak efektivně potlačit růst nejen samotného centrálního tumoru, ale taktéž nikterak výjimečných metastáz. Prvním novodobým, nejdéle a nejvíce používaným chemoterapeutikem je cisplatina. Přestože od schválení cisplatiny jako léčiva uplynulo více než 30 let, je její užívání v některých případech nenahraditelné. Po objevu tohoto komplexu nastal koncem 20. a počátkem 21. století „chemoterapeutický boom“, který zprvu vycházel z analogů známé cisplatiny. Ze stovek více či méně účinných látek si cisplatina až doposud udržela své postavení v úspěšné léčbě rakovinného onemocnění.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Objev *Cis*-diammindichloroplatnatého komplexu-cisplatiny

Předpoklad protinádorové účinnosti *cis*-diammindichloroplatnatého komplexu, byl položen roku 1961 Barnettem Rosenbergem, profesorem biofyziky Michiganské státní univerzity, a jeho týmem po experimentech s bakteriálními koloniemi *E. coli*. Při studiu vlivu elektrického pole na růst bakterií byla pozorována inhibice buněčného dělení a filamentózní prodlužování. (3) (4) Následně byly provedeny série experimentů, které měly upřesnit, zda je příčinou tohoto nestandardního chování vliv elektrického pole, který byl původně zkoumán, či složení elektrolytického roztoku. Předpokládala se elektrolytická reakce s účastí amonných a chloridových iontů ze solí v médiu spolu s platinou, která byla nanášena na povrchu elektrod. Po zkušebních syntézách mnoha komplexů na bázi platiny bylo buněčné dělení potlačeno v případě sloučeniny *cis*-(PtCl₂(NH₃)₂), dnes známé jako cisplatina. *Cis* forma vykazuje oproti svému *trans* izomeru (5) výrazně vyšší toxicitu (6) (7), což je patrné z obr. č. 2, kde byly aplikovány oba izomery do *HeLa* buněčné kultury.

Před příchodem platinových komplexů byly jako kancerostatika užívány pouze látky přírodního charakteru, či organické sloučeniny a užití léčiva s centrálním atomem těžkého kovu bylo nemyslitelné. Přes prvotní zákaz NCI (National cancer institute) došlo po rozsáhlých testech roku 1979 ke schválení cisplatiny jako léčiva pod názvem Platinol, Platinol-AQ (8) (9), v České republice pod názvem Platidiam (10).

Obr. č. 1: *Cis*platina vs. *Trans*platinaObr. č. 2: Graf vyjadřující vztah zániku *HeLa* buněčných kultur k množství navázaných platinových komplexů na DNA. Porovnání toxicity *cis* a *trans* izomerů Pt komplexu. (11)

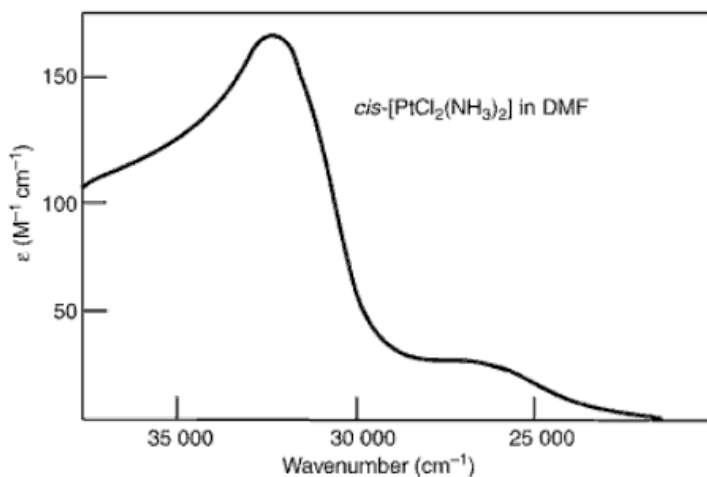
2.2 Fyzikálně chemické vlastnosti cisplatiny

2.2.1 Syntéza cisplatiny, chování ve vodě, absorpční spektrum

Cis-diammindichloroplatnatý komplex, DDP, *cis*- $[(PtCl_2(NH_3)_2)]$, neboli cisplatin je světle žlutá pevná látka. První syntézu provedl roku 1844 Peyrone et al. (12) Moderní syntéza vychází z přístupu dle Dhara et. al (13), kde se využívá trans efektu iodidových iontů, které efektivně nasměrují dvě amonné molekuly do *cis* polohy, čímž se vytvoří čtvercově planární komplex cisplatiny. (13) (14) Schematický průběh reakce je součástí přílohy č. 1.

Takto připravená sloučenina má ve vodném prostředí snahu odštěpit chloridové ionty a nahradit je hydroxidovými ionty. Ustanovení rovnováhy mezi hydrolyzovanou a nehydrolyzovanou formou je závislé na koncentraci chloridových iontů v daném médiu. (viz 2.3.1)

IČ absorpční spektrum cisplatiny v dimethylformamidu (DMF) je na obr. č. 3. DMF je polární organické rozpouštědlo s nízkou schopností donace elektronu, čímž se stává vhodným médiem pro měření absorpčních spekter komplexů na bázi přechodných kovů. (15) V oblasti IČ vykazuje DDP maxima: 27000 cm^{-1} ($25\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 32500 cm^{-1} ($170\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 35500 cm^{-1} ($110\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), kde hodnoty v závorkách jsou příslušné molární absorpční koeficienty ϵ .



Obr. č. 3: Absorpční spektrum cisplatiny v DMF (15) Hodnoty nad 38000 cm^{-1} nejsou zahrnuty z důvodu vysoké absorpce DMF.

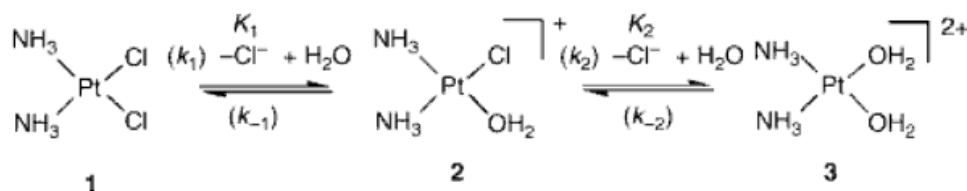
2.2.2 Aplikace, distribuce, farmakokinetika

Platinol-AQ, platidiam, tedy komerční léčivo na bázi cisplatiny, se distribuuje ve formě ihned připravené k intravenóznímu podání. Roztok léčiva obsahuje 3,3 mM účinné látky a 154 mM NaCl, při pH 3,5-4,5, které se při výrobě upravuje pomocí NaOH/HCl. Pacientovi se chemoterapeutická léčba modeluje na míru. Dávka se přepočítává na plochu těla (BAS) a obvykle se aplikuje v množství 20-140 mg/m² (16), v závislosti na typu rakovinného onemocnění a ostatních faktorech. Zpravidla se podává jako série infuzí v intervalu 3-4 týdnů (17), při maximálním dávkování 8 mg/kg/týden. (18) Po léčbě pacienta byla nejvyšší koncentrace platiny naměřena v játrech, prostatě a ledvinách, nejnižší pak ve střevech, srdci a mozku. Poločas života látky v krevní plasmě je 0,5 hodiny. Část platinových komplexů a vzniklých metabolických meziproductů je během několika hodin vylučována močí. Látka se ve tkáni v detekovatelném množství objevuje ještě 180 dní po léčbě. (16) Nejvyšší účinnost vykazuje cisplatina vůči nádorům varlat, kde se úspěšnost vyléčených případů pohybuje okolo 90%, v případě včasné diagnostikovaného onemocnění. Nasadit léčbu je taktéž možné v případě nádorů vaječníků, močového měchýře, plic, hlavy a krku, kde se recidiva taktéž minimalizuje, avšak s nižší pravděpodobností než u nádorového bujení varlat. (19) (20)

2.3 Mechanismus účinku

2.3.1 Hydratace cisplatiny

Před samotným navázáním platinového komplexu na DNA je nutné, aby proběhla jeho hydratace. Platí zde splnění určité reakční podmínky, která je primárně závislá na koncentraci chloridových aniontů. V krevní plasmě je běžná koncentrace chloridových aniontů 100 mM, hydrolyza zde prakticky neprobíhá. (21) Intracelulární koncentrace se pohybuje v rozmezí 4-23 mM Cl⁻, což poskytuje vhodné prostředí pro hydrataci cisplatiny v místech, kde se původně vyskytovaly chlory. Reakční poločas od výměny prvního chloru je 2 hodiny. (22) (23) Schematický průběh této stěžejní reakce je na obr. č. 4. Takto hydratovaná a kladně nabitá forma cisplatiny je schopná reagovat s DNA, RNA a proteiny na jejich nukleofilních místech. Vyjádřeno v číslech, se na jednu molekulu DNA váže 22 atomů platiny, oproti 1 atomu platiny vázajícího se na 1 molekulu mRNA, 30 molekul rRNA, 1500 molekul tRNA nebo 1500 molekul proteinu. (6)



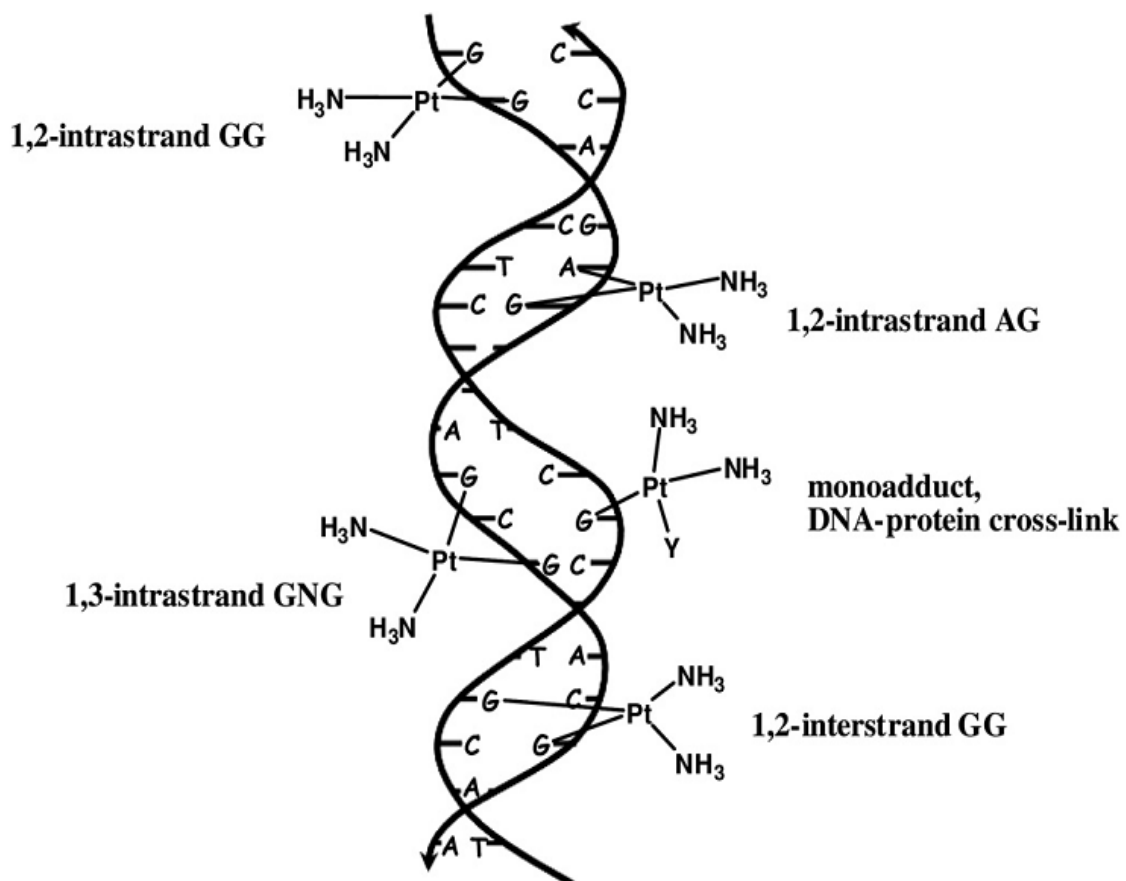
Obr. č. 4: Reakční schéma hydratace cisplatiny v intracelulárním prostoru (14)

2.3.2 Vazba cisplatiny na DNA, typy aduktů

V prostředí buňky dochází velmi snadno k hydrataci aktivovaného platinového komplexu a jeho následnému navázání na dusík N7 guaninu nebo adeninu. (24) Jedná se o vazbu (chelataci), která má zásadní vliv na lokální strukturu DNA, dochází zde ke specifickým distorzím, ohybům a rozvinutím (viz. 2.3.3). V případě, že se v blízkosti monofunkčního aduktu nachází další nukleofilní místo guaninu nebo adeninu, dojde v oblasti velkého žlábků k tvorbě bifunkčního aduktu. V závislosti na vzájemné poloze těchto vazebných míst vznikají buď vnitrořetězcové-IAC (intrastrand) nebo meziřetězcové-IEC (interstrand) můstky. (25) Vazbou DDP komplexu se lokálně poruší vodíkové můstky mezi komplementárními bázemi, což je další faktor podporující strukturálně-konformační změny na řetězci DNA. (26)

Vnitrořetězcové můstky vznikají vazbou cisplatiny na dva sousední guaniny nebo na guanin a adenin (1,2 – GG nebo 1,2 – AG), popřípadě na dva guaniny oddělené jednou bází (1,3 – GXG). Meziřetězcové můstky vytváří cisplatina po vazbě na dva guaniny v komplementárních řetězcích (5'-GC/5'-GC).

Výše popsané typy aduktů jsou po modifikaci DNA cisplatinou zastoupeny s různou četností. Aduktem, který se vyskytuje nejčastěji, je 1,2 – GG IAC můstek, jehož četnost je 65%. Zastoupení 1,2 – AG IAC můstku je 25 %, 1,3 – GG IAC můstku 5 – 10 % a meziřetězcový můstek 5'-GC/5'-GC se vyskytuje pouze v 6 % případů. (27) Majoritním typem aduktů jsou tedy GG, AG vnitrořetězcové můstky s četností ~90%. (28) Bylo prokázáno, že při léčbě cisplatinou, se výše uvedené typy aduktů vyskytují jak v podmínkách *in vitro*, tak i na DNA přímo ve tkáních, tumorech, bílých krvinkách, bakteriálních kulturách atd. I procentuální zastoupení aduktů je totožné. (29) Všechny typy známých aduktů jsou znázorněny na obr. č. 5.



Obr. č. 5: Grafické znázornění typických aduktů cisplatiny na DNA (26)

2.3.3 Konformační změny DNA vyvolané adukty cisplatin

Konformační změny na DNA jsou vždy charakteristickým znakem konkrétního protinádorově účinného komplexu. Vzhledem k širokému spektru cytostatických léčiv se tato část práce zabývá pouze konformačními změnami, jež vyvolává komplex cisplatin, použitý v experimentální části této práce. Dosavadní výzkum a přehled protinádorově účinných léčiv je shrnut mimo jiné v literatuře. (26) (30) Charakterizace konformačních změn DNA v nadcházejícím textu jsou graficky znázorněny na obr. č. 6.

Monofunkční adukty

Obecně lze říci, že studium monofunkčních aduktů nebylo předmětem tak intenzivního výzkumu jako u crosslinků tvořených cisplatinou. Nelze však říci, že monofunkční adukty by byly v protinádorové terapii bezvýznamné, proto by jejich hlubší studium zcela jistě přispělo k lepšímu pochopení aktivity cytostatických léčiv. Poměrně dlouho panoval předpoklad, že monofunkční adukty nezpůsobují konformační změny na DNA. Až po termodynamických studiích bylo potvrzeno, že monofunkční adukt cisplatin má negativní vliv na termostabilitu řetězce. (31) Byla taktéž prokázána přítomnost lokálních distorzí. (32) Největší změny ve struktuře jsou indukované v případě monofunkčně platinovaného guaninu, který má z obou stran pyrimidinové báze. (33)

Bifunkční vnitřetězcové adukty (IAC)

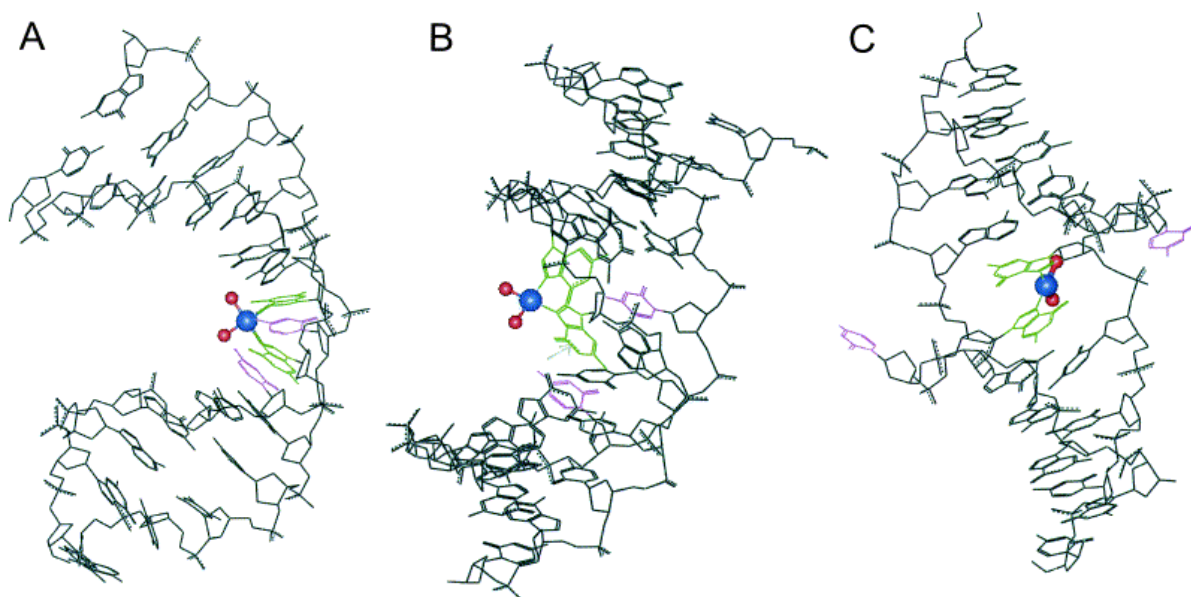
Problematika konformačních změn vyvolaných bifunkčními adukty cisplatin je poměrně dobře zmapována, ať už pomocí experimentálních metod, tak v poslední době i pomocí kvantově-chemického modelování. (34)

Konformační změny jsou nejpatrnější v případě 1,2-GG a 1,2-AG IAC můstků. Dochází k ohnutí podélné osy DNA o $26 - 50^\circ$ mezi platinou modifikovanými guaniny, lokálnímu rozvinutí o $9-11^\circ$ a v neposlední řadě také k ohybu celé šroubovice směrem k velkému žlábků. Vlivem rozšíření malého žlábků zanikají některé vodíkové můstky mezi G-C párem, distorze má rozsah 4-5 pb. Řetězec modifikovaný komplexem cisplatin vykazuje charakteristické znaky A-formy DNA, kde nejmarkantnějším rozdílem od typu B, je zvýšení počtu párů bazí na závit, a to z 10 u A-DNA na 11 v případě B-DNA. Obrázky jednotlivých konformací jsou součástí přílohy č. 2 této práce.

Málo častý 1,3 – GpG IAC můstek ohýbá helikální osu o cca 30° směrem k velkému žlábků a způsobuje lokální rozvinutí o cca 19° . Na straně, kde je navázán komplex cisplatin, je DNA lokálně denaturovaná. (33) (35)

Bifunkční adukty-cisplatinové meziřetězcové crosslinky (IEC)

Některé méně časté, avšak nezanedbatelné změny ve struktuře DNA (36) jsou způsobovány meziřetězcovými můstky mezi protilehlými guaniny v sekvenci 5'-GC/5'-GC. Vodíkové vazby mezi modifikovaným guaninem a jemu komplementárním cytosinem zanikají. Cytosiny se pak nacházejí mimo dvoušroubovici a nezapojují se do interakcí s ostatními bázemi. Rozsah vnitřetězcové distorze je 4 pb, v tomto místě se také mění konformace z pravotočivé formy na levotočivý typ Z-DNA. Geometrická změna je popsána rozvinutím o $76-80^\circ$, ohyb je udáván v rozmezí $20-40^\circ$ směrem k malému žlábkku. (37)



Obr. č. 6: 3D model změn na DNA vyvolaných cisplatinou A) 1,2 – GG IAC adukt, (B) 1,3 – GTG IAC adukt, (C) IEC adukt (38)

2.4 Celulární rezistence

Jedním z velkých úskalí úspěšného dokončení léčby je k cisplatině získaná rezistence. Během série chemoterapeutických infuzí se postupně snižuje senzitivita nádorových buněk vůči cisplatině. (39) Byly zaznamenány i případy s vrozenou rezistencí vůči tomuto léčivu. (40) Různé tkáně a orgány taktéž vykazují rozdílnou senzitivitu. U nádorů vaječníků je senzitivních 70% pacientek, (41) kdežto v případě nádorů hlavy a krku je naopak 70-80% pacientů rezistentních. (42) Statistická data se vždy vztahují k případu prvního infuzního podání cisplatinu.

Obecně lze říci, že rezistence k cisplatině je složitou, multifaktoriální odpovědí buňky na poškození, což znesnadňuje studium tohoto jevu. (27) Existují tři hlavní mechanismy, které se na vzniku rezistence podílí. Každý má na účinek léčiva větší či menší negativní vliv, dohromady tvoří kaskádu pochodů, které stojí za jevem celulární rezistence. (43) Přehled mechanismů vedoucích k rezistenci vůči cisplatině je na obrázku číslo 8.

2.4.1 Příjem cisplatinu buňkou

U mnoha filiálních linií nádorových buněk se získanou rezistencí byla zjištěna nižší intracelulární koncentrace cisplatinu oproti parentální generaci buněk. (44) Za tímto jevem stojí snížený příjem přes cytoplasmatickou membránu, kde hlavní roli v příjmu cisplatinu hrají transportéry pro měď Ctr1, primárně kontrolující intracelulární homeostázi mědi. (45) V rezistentních buňkách u rakoviny plic byla prokázána snížená exprese genů pro Ctr1. U jiných typů tumorů byl influx těmito transportéry stejný jako u parentální generace a buňky přesto byly rezistentní. (46)

2.4.2 Inaktivace proteiny obsahujícími thiol

Dalším relevantním vysvětlením celulární rezistence je inaktivace cisplatinu molekulami obsahujícími síru, jako je glutathion a metalothionein. Tripeptid glutathion při reakci glutathion-S transferázy inkorporuje cisplatinu do své struktury, znemožní jí vazbu na DNA a pomocí ATP dependentní pumpy je celý komplex exportován mimo buňku. Rezistence při zvýšené koncentraci glutathionu a GST byla prokázána u rakoviny vaječníků, močového měchýře, krku a plic. (47)

Metalothionein je nízkomolekulární, na síru bohatý peptid, který jako nukleofilní činidlo snadno reaguje s cisplatinou, čímž snižuje její toxicitu. (48)

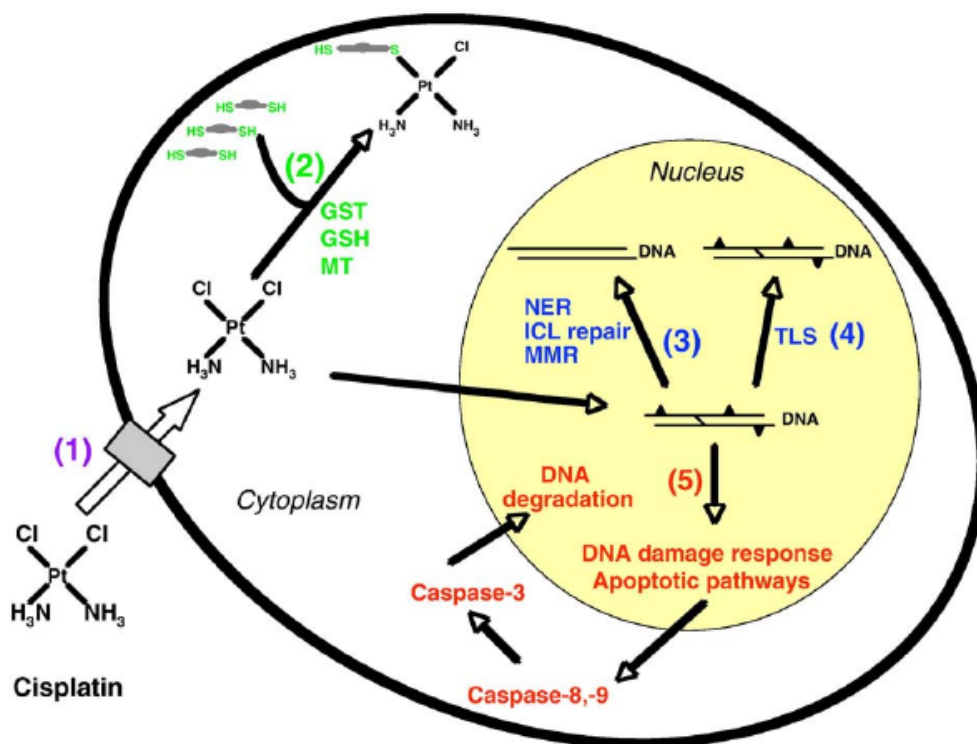
2.4.3 Vazba proteinů

Všechny cisplatinou způsobené léze indukují na DNA distorze, které mohou být rozpoznány řadou buněčných proteinů. Výčtem mezi tyto proteiny patří skupina HMG1/2 proteinů, histon H1, TATA vazebný protein (TBP) a v neposlední řadě protein opravného systému chybného párování bazí („mismatch“), MutS α . (49)

Mezi nejlépe prostudované proteiny se specifickou vazbou, na cisplatinou poškozené DNA, patří HMG. Dle evolučního vývoje a počtu domén se tyto proteiny dělí do dvou skupin. První skupina proteinů, tedy HMG1 vykazuje nízkou specifitu vazby na DNA. Oproti tomu skupina HMG2 je sekvenčně specifická. Pro obě skupiny je společný tvar písmene „L“, skládající se ze 3 α -helixů, které mají schopnost vázat se do malého žlábků a způsobit tak ohyb a rozšíření dvoušroubovice. Tato konformační změna způsobí rozšíření malého žlábků na úkor velkého žlábků a umožní tím interkalaci L-aminokyselinové domény do duplexu DNA, čímž se protein stabilizuje. (50) Vytvořené spojení (obr č. 7) zabraňuje proteinům a enzymům reparačních procesů v odstranění cisplatinového aduktu, čímž následně brání i samotné replikaci. Transkripční faktory, patřící do rodiny HMG proteinů, vazbou na cisplatinové adukty znemožňují efektivní kontrolu transkripce. (27)



Obr. č. 7: Interkalace postranního řetězce fenylalaninu-37 (šedá) HMG proteinu na lézi vytvořené cisplatinou (GG-IAC). Žlutě-platina; tmavě modrá-N z NH_3 skupiny cisplatinu; červeně-3 α helixy HMG proteinu; báze DNA: zelená-guanin, fialová-cytosin, červená-adenin, modrozelená-tymin. (51)



Obr. č. 8: Shrnutí mechanismů vedoucích k rezistenci vůči cisplatině. (49) 1) Změny v příjmu/efluxu cisplatinu transportérem CTR1. 2) Detoxikace glutathionem (GSH) pomocí glutathion-S-transferázy (GST) nebo metalothioneiny (MT) v cytoplasmě. 3) Změny v opravě DNA: schopnost odstranění cisPt aduktů mechanismem nukleotidové excisní opravy (NER), nebo opravou meziřetězcových můstků (ICL-repair; interstrand crosslink repair), snížená aktivita „mismatch“ opravného systému (MMR) vedoucí k apoptóze. 4) Zvýšená exprese translázově aktivních polymeráz (TLS) umožňujících buňce tolerovat neopravené adukty. 5) Dvě možnosti apoptózy: inhibice apoptózy snižující se expresí nebo ztrátou pro-apoptotických faktorů, nebo vzrůstající exprese anti-apoptotických faktorů.

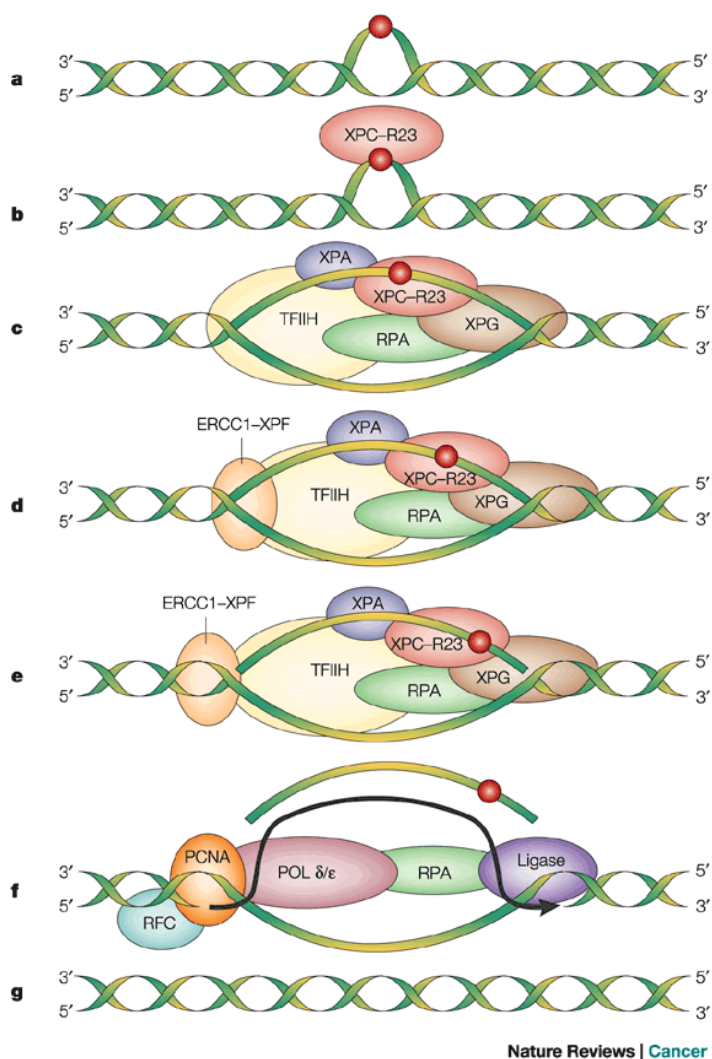
2.4.4 Oprava DNA

Na opravě DNA, poškozené cisplatinovými adukty, se největší měrou podílejí mechanismy nukleotidové excisní a „mis-match“ opravy. Opravné mechanismy svou činností participují na buněčné rezistenci. (52)

Nukleotidová excisní oprava (NER) nachází uplatnění především při opravě poškození indukovaných UV zářením (např. tvorba thyminových dimerů). Deficience genů, kodujících enzymy a proteiny účastníci se právě tohoto mechanismu, vede k fenotypovému projevu známému jako *xeroderma pigmentosum* (XP) (podrobněji 2.6.3). NER je aktivní i vůči poškozením, které vyvolávají adukty cisplatin. (53)

Reparace probíhá v několika základních krocích. Za rozpoznání poškozeného místa je zodpovědný protein XPC – HR23B (54), který spolu s XPA, RPA a TFIIH vytváří preiniciační komplex 1. (55) Vazbou XPG se komplex 1 stabilizuje a přechází tak v preiniciační komplex 2. Protein XPG provádí excizi 2-10 nukleotidů ve směru 3' a antagonisticky ve směru 5', ve vzdálenosti 20-26 nukleotidů, provádí excizi protein XPF-ERCCI. (56) (57) Po vyštěpení fragmentu dochází k disociaci zúčastněných proteinů, dosyntetizování mezery pomocí DNA polymerázy δ a ϵ , a opětovnému spojení řetězce DNA ligázou. Poslední krok je závislý na jaderném antigenu proliferujících buněk PCNA. (58) Schematický průběh nukleotidové excizní opravy je na obrázku číslo 9.

Oprava chybného párování bází, „mis-match repair“ (MMR), se podílí na cytotoxicitě cisplatin v nádorových buňkách. Porucha činnosti tohoto systému opravy může vést k rezistenci nádorových buněk vůči cisplatině. Na druhé straně, vazbou komplexu MMR na adukty cisplatin, se zvyšuje cytotoxicita léčiva aktivací signálních drah vedoucích k apoptóze. (59)



Obr. č. 9: Schematický průběh nukleotidové excizní opravy (60)

2.5 Vliv aduktů na replikaci a transkripci DNA

Cytostatický efekt protinádorově účinné cisplatiny spočívá především v inhibici replikace a transkripce DNA. Tyto procesy probíhají ve zvýšené míře právě v rychle se množících nádorových buňkách. Adukty tvořené cisplatinou na molekule DNA zabraňují DNA a RNA polymerázám, tedy důležitým enzymům výše zmíněných procesů, v jejich standartních funkcích a stojí za inhibicí těchto procesů. (33)

Cisplatinu potlačuje replikaci DNA u prokaryot i eukaryot a to jak v podmínkách *in vitro*, tak *in vivo*. (61) Největší vliv na potlačení replikace mají bifunkční adukty. U monofunkčních aduktů se uvažuje pouze zanedbatelný vliv, což je zapříčiněno jejich menším výskytem a v neposlední řadě také malou schopností zabránit replikačním enzymům v jejich činnosti. (33) Ne vždy a ne všechny polymerázy je možné na cisplatinou modifikované molekule DNA efektivně zastavit, existují totiž polymerázy schopné provést „bypass“

(přemostění), neboli translézově aktivní polymerázy (viz. 2.6). Schopnost provedení efektivního přemostění úzce souvisí s vnášením nejrůznějších mutací do nově syntetizovaného řetězce, což je jev zcela nežádoucí, vzhledem k možnosti vzniku sekundárních nádorů. Zajímavé je, že 1,2-GG IAC můstky jsou méně mutagenní než 1,2-AG IAC můstky. (62) Aduky tvořené cisplatinou nepopíratelně negativně ovlivňují replikaci, neexistuje však jediný důkaz, že by tento efekt stál za celou protinádorovou aktivitou léčiva, což vede širokou vědeckou veřejnost k názoru, že jde o mnohem komplexnější problém, než by se mohlo na první pohled zdát. (63)

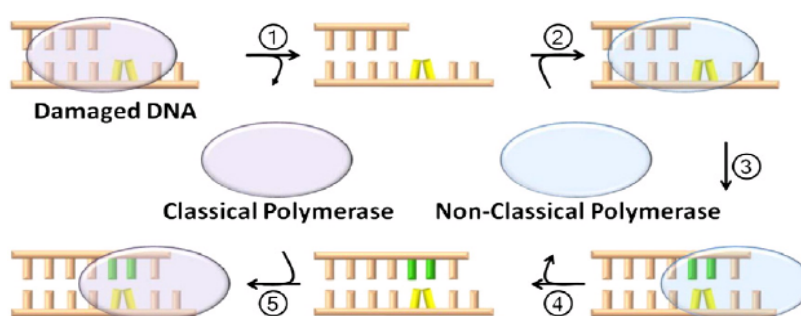
Dalším buněčným dějem, na nějž mají adukty tvořené cisplatinou vliv, je transkripce. Byl studován vliv na prokaryotické a eukaryotické RNA polymerázy, které na adukty reagují rozdílně. Bifunkční adukty mají na RNA polymerázy silný inhibiční efekt. Nejen že tvoří jakousi mechanickou překážku v postupu enzymu, ale zřejmě vyvolávají konformační změny samotného transkripčního aparátu, který poté není schopen plnit svou funkci. (64) Cisplatinovými adukty inhibovaná transkripce tedy představuje další metabolický proces, který má význam v protinádorové účinnosti cisplatinu.

2.6 Eukaryotní polymerázy s translézovou aktivitou

Klasické DNA polymerázy, využívající nepoškozeného templátu, účastníci se pochodů replikace a některých opravných procesů vykazují velkou aktivitu a fidelitu. Dosahují inkorporační schopnosti až 1000 nukleotidů za sekundu s jednou chybou na 10^6 vřazených, avšak zpravidla nejsou schopny syntetizovat přes léze, které nejsou na DNA nikterak vzácné. Léze a chyby v řetězci pak zabraňují klasickým DNA polymerázám v elongaci řetězce, vedou k zastavení replikační vidlice, což by bez přítomnosti polymeráz s translézovou a reparativní aktivitou vedlo k zániku buňky. (65) Do této doby bylo u eukaryotických buňek definováno přinejmenším 15 druhů DNA polymeráz, které se řadí do jednotlivých skupin na základě sekvenční podobnosti. (66) V této části práce je pojednáno pouze o polymerázách se schopností translézové syntézy přes Pt-DNA adukty. Pouze některé eukaryotické DNA polymerázy ze skupin X a Y vykazují efektivní aktivitu translézové syntézy přes Pt-DNA adukty. Polymerázy α , ϵ , δ jsou cisplatinovými adukty vždy zastaveny. (67) Pro pochopení mechanismů cytotoxicity a mutagenity způsobené platinovými komplexy je zcela zásadní identifikace translézově aktivních polymeráz. Z výše zmíněných skupin mají největší schopnost překlenout poškození DNA pol β a námi zkoumaná pol η . (68)

2.6.1 Mechanismus syntézy translézově aktivními polymerázami

Prvním krokem k úspěšnému překonání cisplatin, či jinak poškozeného místa na DNA, je předpoklad vzájemné výměny translézově neaktivních polymeráz za enzymy, jež tuto aktivitu mají. Následně se nově příchozí polymerázy zařadí do replikačního komplexu (krok 2), kde již mohou využít své schopnosti inkorporovat báze proti poškozenému templátu a pokračovat tak v elongaci řetězce (krok 3). Po překonání poškozeného úseku dojde k disociaci translézově aktivních polymeráz z replikačního komplexu (krok 4) a výměně za polymerázy „původní“, translézově neaktivní. (krok 5). (65) Mechanismus vzájemné výměny polymeráz není dosud zcela přesně objasněn. Celý cyklus je graficky znázorněn na obrázku číslo 10.



Obr. č. 10: Cyklus translézově aktivních polymeráz (65)

2.6.2 Polymerázy skupiny X

Ke skupině tzv. DNA-polymeráz X se řadí polymerázy β , λ , μ a terminální transferáza (Tdt). Vyskytují se u obratlovců, rostlin i hub. (69) Účastní se především opravných procesů, zejména pak bázové excizní opravy (BER), kde je jejich funkce nezastupitelná. Polymerázy dané skupiny jsou vzájemně velice podobné, např. Tdt a μ mají z 23-44% stejnou primární sekvenci. Určující je 8kDa a 31kDa doména. Jednotlivé subdomény 31kDa fragmentu byly přirovnány k částem pravé ruky, je to struktura vyskytující se u většiny polymeráz. „Palec“ je důležitý pro interakci enzymu s primerem, „dlaň“ se svými třemi konzervativními aspartátovými motivy představuje hlavní aktivní místo enzymu a „prsty“ obsahující aminokyselinové zbytky přímo interagují, „vtahují“ nukleotidy do aktivního místa enzymu. (70)

DNA-polymeráza β je prvním objeveným enzymem skupiny X. (71) Skládá se z 339 aminokyselin a je kódována v POLB locusu, oblasti p11 chromosomu 8. Vzhledem k její malé velikosti je snadné ji syntetizovat pomocí *E.Coli*, izolovat a následně ji studovat. Pol β

má minimální exonukleázovou aktivitu (72), nejvyšší procesivitu vykazuje v případě nutnosti doplnění 2-6 bazí na templátovém řetězci. (73) Z experimentů vyplývá, že struktura DNA templátu v okolí cisplatinového aduktu ovlivňuje nukleotidovou inzerční fidelitu pol β . (74) Nejčastější chybou je tvorba posunových mutací (zejména vynechání jedné báze) a vřazení chybné báze s frekvencí $5 \cdot 10^{-4}$. (75) Mimo jiné je pol β schopná provést přemostění přes thyminové dimery indukované UV zářením. (76)

DNA-polymeráza λ je 68 kDa enzym kódovaný genem POLL. Pol λ katalyzuje syntézu řetězce i tam, kde na konci 5' chybí fosfát, nebo tam kde je syntetizováno dle diskontinuálního čtecího rámce templátu. (77) Fidelita enzymu se pohybuje v rozmezí 10^{-3} - 10^{-4} . (78) Translézovou syntézu vykazuje vůči 8-oxoG a 2-hydroxy-adeninu, (79) u cisplatinou poškozeného templátu nenachází tato polymeráza uplatnění.

DNA-polymeráza μ je důležitým enzymem ve smyslu schopnosti translézové syntézy cisplatinových aduktů, s fidelitou 10^{-2} - 10^{-4} . (80) Jedná se o 53 kDa protein kódovaný genem POLM. K preferenční expresi dochází v sekundární lymfatické tkáni (lymfatické uzliny), přítomna je však ve všech tkáních. (81) Biologická funkce této polymerázy není dosud zcela jasná, ale předpokládá se, že hraje roli v diverzitě protilátek při vývoji imunoglobulinů nebo při opravě zlomů v DNA. (82) Pol μ je schopná dosyntetizovat abázické místo, (83) bypasovat thyminové dimery. (84) Účinnost translézové syntézy Pt-DNA aduktů je 14-35% v porovnání s prodlužováním řetězce nepoškozené DNA. Schopnost provést „bypass“ cis-Pt modifikovaného místa je závislá jak na struktuře templátu, tak i na sekvenci v daném okolí. Po polymerázové reakci pol μ byly v okolí aduktu detekovány 2-4 nukleotidové delece. Mechanismus syntézy při překonávání poškození, typický pro tuto polymerázu, pravděpodobně zahrnuje částečné rozvinutí platinovaného místa k vytvoření prostorově výhodnějších podmínek pro elongaci řetězce. (70)

Pro kompletní definování polymeráz skupiny X schází již jen terminální transferáza. Terminální transferáza, terminální deoxynukleotidyl transferáza (Tdt) nebo také DNA nukleotidylexotransferáza (DNNT) je specializovaná DNA polymeráza produkovaná nezralými pre-B, pre-T lymfocyty, kódována genem DNNT. (85) Tdt katalyzuje přiřazování nukleotidů k 3' konci a na rozdíl od ostatních DNA polymeráz její činnost nevyžaduje přítomnost templátového řetězce, důležitým kofaktorem je kobalt. (86) V lékařství nachází uplatnění při imunofluorescentní diagnostice akutní lymfoblastické leukémie. (87) Nepředpokládá se však její účast při translézové syntéze Pt-DNA aduktů. (88)

2.6.3 Polymerázy skupiny η

Polymeráza η , 83 kDa enzym, (89) kódovaný kvasinkovým genem RAD30 a určitými sekvencemi v lidském genu XPV, je schopen efektivní translézové syntézy přes thyminové dimery vytvořené UV zářením, stejně tak jako překonávat cis-Pt adukty. (90) Při pokusech s RAD30 deficientními kvasinkami byla prokázána zvýšená senzitivita k UV záření, ve formě rapidního nárůstu mutací, nikterak však nebyla ovlivněna senzitivita na cisplatinu. (91) Mutace v lidském genu kódujícím pol η , konkrétně hRAD30A, měla za následek fenotypový projev známý jako xeroderma pigmentosum. Lidé postižení tímto autozomálně recesivním onemocněním jsou extrémně náchylní k UV záření, které u nich vyvolává četné nádory kůže. (92) Experimenty s pol η ukázaly, že je schopna Pt-DNA translézové syntézy s daleko větší efektivitou a mnohem nižší fidelitou než všechny doposud známé eukaryotické polymerázy. (93) Efektivita translézové syntézy je pro tuto polymerázu 15-35%, oproti 4-9% v případě pol β . Při zkoumání misinkorporace vůči Pt-GG aduktu byl vypočten f_{mis} (misinkorporační index) na $2,7 \cdot 10^{-2}$ - $8 \cdot 10^{-2}$, což je hodnota 5-10krát vyšší než v případě pol β . (68) Funkce samotné polymerázy η a exprese genů tohoto enzymu musí být v organismu dobře kontrolována, kvůli prevenci syntézy mutantní DNA. (94)

2.6.4 Přehled translézově aktivních polymeráz

Ukázalo se, že existuje hned několik DNA polymeráz schopných překlenout Pt-GG a Pt-AG IAC můstky. (95) Efektivita translézově aktivních polymeráz, při překonávání poškození, klesá v pořadí: lidská pol η , lidská pol μ , lidská pol β , mnohonásobně nižší schopnost překlenout poškození pak má lidská pol γ a kvasinková pol ξ . (96) Polymeráza μ je při překonávání Pt-DNA aduktů velmi náchylná k chybám, nejčastěji indukuje vznik posunových mutací, s četností 15-20%. (97) Jiné polymerázy zpravidla misinzertují komplementární baze, což je typické zejména pro pol η a pol β . (98) Na základě frekvence nesprávné inserce existuje dělení na dvě skupiny, dle jejich přesnosti v místě Pt-DNA aduktů, na přesné a nepřesné translézově aktivní polymerázy. (99)

Polymeráza γ je lokalizována v mitochondriích, proto je nepravděpodobné, že by přispívala k mutagenním účinkům platinových aduktů. Pol ξ je schopna translézové aktivity pouze s velmi nízkou efektivitou, nepředpokládá se její významější vliv během translézové syntézy v případě Pt-DNA aduktů v podmínkách *in vivo*. (99)

Z výzkumu na lidských polymerázách vyplývá, že skutečně prokazatelnou a efektivní schopnost provést překlenutí při poškození DNA cisplatinou mají polymerázy η a β .

Translázová syntéza přes Pt-GG adukt se skládá ze tří dílčích kroků: inserce dNTP proti 3'G, inserce dNTP proti 5'G a prodloužení za 5'-G po Pt-GG aduktu. (100) Poslední studie ukázaly, že zdánlivě nejjednodušší třetí krok translázové syntézy, kde je base přiřazována až vzniklý adukt, není zcela triviální. (101) Inzertní a extenzní kinetika polymeráz η a β u Pt-GG aduktů v lokální sekvenci AGG je uvedena v tabulce č. 1. Jsou zde uvedeny parametry pro inserci proti 3'G, 5'G a extenzi na 5'A v případě DNA poškozené cisplatinou v porovnání s nepoškozeným templátem. V případě polymerázy η měla jak 3'G tak 5'G část aduktu nízký inhibiční efekt na inserci dCTP. Daleko větší inhibiční efekt byl prokázán v případě extenze proti 5'A s efektivitou translázové syntézy 0,23. Pol β je při inserci dNTP platinovým aduktem výrazně negativně ovlivněna v každém ze tří kroků a efektivita klesá až na $0,7 \cdot 10^{-4}$ - $1,1 \cdot 10^{-4}$ v porovnání s nepoškozenou DNA. (102)

Při porovnání dvou platinových komplexů, cisplatiny a oxaliplatiny, je hlavní rozdíl v extenzním kroku u pol η . Pol β při použití dvou odlišných platinových komplexů rozdílně překonává úsek proti 3'G. V podmínkách *in vivo* a normálních hodnotách exprese genů pro pol β se nepředpokládá její účast v translázové syntéze přes platinované úseky DNA. Její účast je pravděpodobná pouze za předpokladu zvýšené exprese genů v POLB lokusu, tedy jestliže se hodnota fyziologické koncentrace polymerázy β markantně zvýší. (103)

Hypotéza, že polymeráza η je schopná relativně bezchybné translázové syntézy přes Pt-DNA adukty, byla potvrzena při pokusech s mutantními lidskými fibroblasty. U pol η -mutantů se po inkorporaci cisplatiny do struktury DNA objevil typický fenotypový projev XPV, který je u těchto buněk obdobný i po vystavení UV záření. (104) U buněk standardních, tedy pol η^+ , byly frekvence mutací na zanedbatelné úrovni. Jednoznačným závěrem tohoto experimentu je fakt, že polymeráza η hraje ústřední roli při překonávání Pt-aduktů. (105) Model polymerázy η v komplexu s DNA modifikovanou cisplatinou je na obr. č. 11.

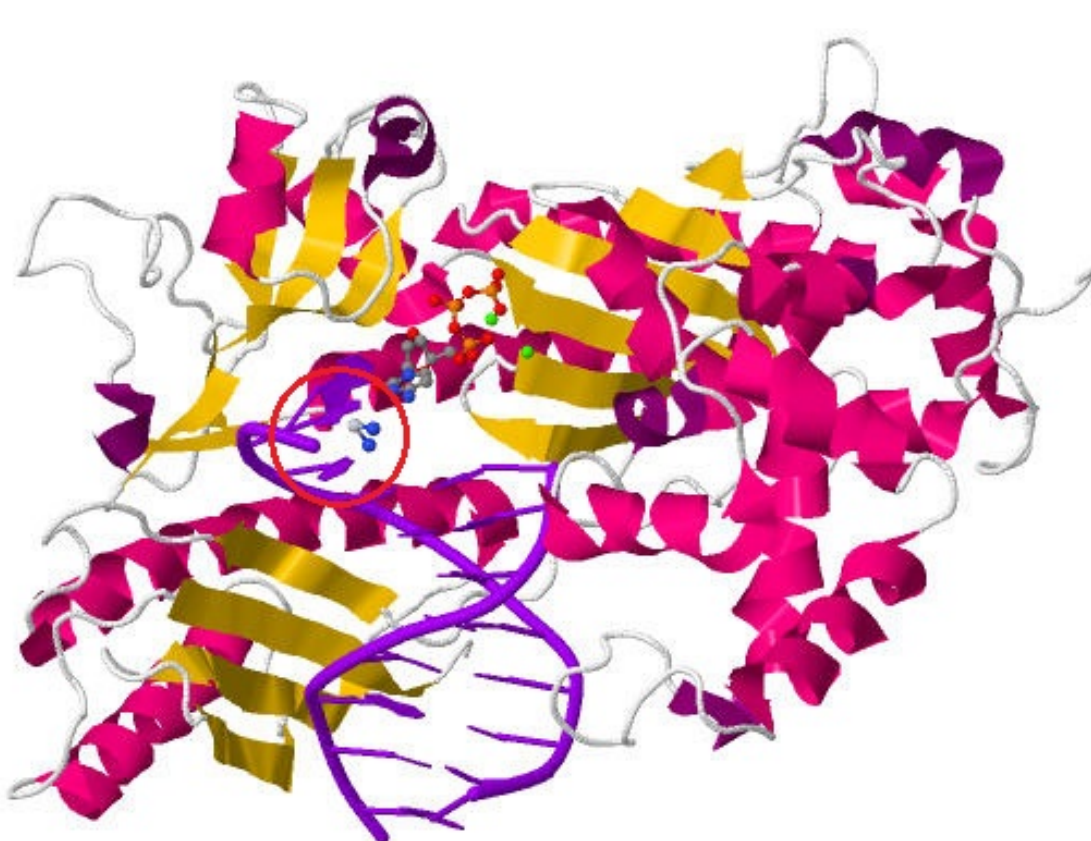
	3'G (f_{rel})	5'G (f_{rel})	5'A (f_{ext})	Celková efektivita
Kontrola	1	1	1	1
Pol η	0,9	1	0,26	0,23
Pol β	0,011	0,022	0,29	$0,7 \cdot 10^{-4}$

Tabulka č. 1: Efektivita translázové syntézy přes Pt-AGG adukt polymeráz η a β . (105)

f_{rel} zachycuje inzertní efektivitu (k_{cat}/K_m) dCTP proti 3'G a 5'G v porovnání s nemodifikovanou DNA

f_{ext} je extenzní efektivita (k_{cat}/K_m) dTTP proti 5'A v porovnání s přidáním báze na cisplatinou nemodifikované DNA

Celková efektivita translázové syntézy je vypočtena jako $f_{rel} \cdot f_{rel} \cdot f_{ext}$



Obr. č. 11: Polymeráza η v komplexu s DNA modifikovanou cisplatinou. Cisplatin je vázána ve formě 1,2 – GG IAC aduktu (v červeném kruhu). (106); úprava modelu provedena v programu: Jmol Version 12.0.18.

2.7 Prokaryontní polymerázy

U prokaryotických organismů existuje pět typů DNA polymeráz (I-V), kde polymeráza III plní hlavní replikativní funkci, ostatní se v různé míře účastní opravných mechanismů. DNA polymeráza I vykazuje velkou procesivitu při překonávání poškozených míst na DNA a taktéž se účastní excisních oprav. Proteolytickou aktivitou subtilisinu vůči DNA polymeráze I se získává experimentálně velmi využívaný enzym-Klenowův fragment. (107) Jedná se o 68kDa enzym s 5'-3' polymerázovou aktivitou, 3'-5' exonukleázovou aktivitou, postrádající 5'-3' exonukleázově aktivní doménu. Struktura Klenowova fragmentu je na obrázku číslo 12. Před příchodem termostabilních polymeráz se Klenowův fragment využíval při PCR metodách, (108) nyní se využívá především k různým *in vitro* studiím, např. vlivu léčivy vytvořených aduktů na DNA. Schopností překonávat cisplatinou vytvořené adukty je Klenowův fragment podobný DNA polymeráze β . (109)



Obr. č. 12: Klenowův fragment (*E. Coli*) v komplexu s duplexem DNA. (110) Model upraven v programu: Jmol Version 12.0.18.

3 CÍL PRÁCE

Předkládaná diplomová práce se skládá z několika dílčích teoretických a experimentálních částí:

- a) Vypracování přehledu problematiky interakce cisplatiny s DNA.
- b) Příprava a charakterizace oligonukleotidů nesoucích jeden místně specifický vnitrořetězový můstek v sekvencích GG a AG.
- c) Studium vlivu přítomnosti můstků na templátové DNA na účinnost syntézy DNA lidskou a bakteriální polymerázou.
- d) Stanovení vlivu přítomnosti vnitrořetězových můstků cisplatiny na strukturu a stabilitu DNA.
- e) Korelace získaných dat o struktuře DNA s vnitrořetězovými můstky s naměřenými údaji o vlivu můstků na DNA polymerázy, popřípadě s dalšími daty získanými z literatury. Ze získaných dat vyvodit závěr o účinnosti obou typů můstků v protinádorovém působení cisplatiny.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Použité chemikálie, oligonukleotidy a primery

Oligonukleotidy: (*VBC Biotech*)

AG: 5'-TCC TTA GTT CCT TTC TCT CTT CC-3' - 23 mer

Koncentrace: 246 pmol/ μ l

GG: 5'-TCC TTG GTT CCT TTC TCT CTT CC-3' - 23 mer

Koncentrace: 317 pmol/ μ l

Primery: (*VBC Biotech*)

Primer 1: 5'-GGA AGA GAG AAA-3'

Primer 3: 5'-GGA AGA GAG AAA GGA A-3'

Chemikálie:

Deionizovaná H₂O (vždy v MilliQ čistotě)

Cisplatina (*Sigma Aldrich*)

Akrylamid (*Promega*)

Bisakrylamid (N, N'- metylenbisakrylamid) (*Promega*)

APS (ammonium persulfat, peroxodisíran amonný) (*Carl Roth*)

TEMED (tetramethylenethylenediamin) (*Sigma Aldrich*)

TRIS (tris(hydroxymethyl)aminomethane) (*Carl Roth*)

MgCl₂ (*Sigma Aldrich*)

DTT (dithiothreitol) (*Serva feinbiochemica*)

BSA (bovine serum albumin, hovězí sérový albumin) (*Biolabs*)

Glycerol (100%) (*Sigma Aldrich*)

EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) (*Serva feinbiochemica/Biotech*)

Sephadex G50-Fine (*Sigma Aldrich*)

Enzymy:

T4-polynukleotid kináza (*New England Biolabs-Promega*)

CIP alkalická fosfatáza (*Sigma Aldrich*)

DNasa I (*New England Biolabs-Promega*)

Polymeráza η (*Lajos Haracska, Ph.D.; Institute of Genetics, Hungarian AS, Szeged*)

Klenowův fragment (3'-5' exo⁻) (*New England Biolabs-Promega*)

Roztoky:

Neutrální roztoky pro separaci na HPLC:

A: 50 mM NaCl+10 mM Tris. Cl, pH=7,4; Na 500 ml: 6,25 ml 4M NaCl + 5 ml 1M Tris. Cl

B: 1 M NaCl+10 mM Tris. Cl, pH=7,4; Na 500 ml: 125 ml 4M NaCl + 5ml 1M Tris. Cl

Roztoky použité při HPLC štěpení:

A: 0,1M octan amonný; pH=4,5 (*Sigma Aldrich*)

B: acetonitril (*Sigma Aldrich*)

Pufry:

Kinázový pufr 10x (*Promega*); složení: 200 mM imidazol-HCl (pH 6,6), 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 1 mM spermidin, 1 mM EDTA

TBE (TRIS/Boric acid/EDTA) 1x; složení: 89 mM TRIS, 89 mM kyselina boritá, 2 mM EDTA

Loading pufr-nanášecí (*Promega*)

Pufr pro reakci s polymerázou η ; složení: 80 μ l 1M TRIS, 10 μ l 1M MgCl₂, 10 μ l DTT, 20 μ l BSA, 200 μ l 100% glycerol, 680 μ l H₂O

Pufr pro reakci s klenowovým fragmentem: NEB2 (*New England Biolabs-Promega*)

Pufr pro T4 PNK (*New England Biolabs-Promega*)

Pufr pro CIP alkalickou fosfatázu (*Sigma Aldrich*)

Všechny použité chemikálie byly p. a. čistoty

4.2 Materiály

Kolona (pro HPLC separaci): mono-Q HR5/50 GL (*Amersham biosciences*)

Kolona s reverzní fází (pro HPLC štěpení): Supelco-Zr column (*Sigma Aldrich-Supelco*)

Dializační membrána: MWCO 6-8000 (*Spectrum laboratories*)

Sephadexová kolonka (*Sigma Aldrich*)

Grafitová cela-AAS: *Grafit tube atomizer 120*

Filtr nanosep: (NMWL:30k, *Pall filtron*)

Přístroje:

HPLC (*Waters 620*)

Degazér DG-1310 (*UniFlows*)

Jednopaprskový absorpční spektrometr (*Beckman DU-700*)

Atomový absorpční spektrometr (*Varian AA240Z*)

HPLC La Chrom L7100 (*Merck Hitachi*)

Speedvac-DNA mini (*Heto*)

Denzitometr: BAS 2500 (*Fujifilm*); program Image reader BAS-2500 V1.8, Aida image analyzer V3.23

Zdroj pro elektroforézu: EC3000-90 (*E-C Apparatus corporation*)

Cirkulární dichrometr (*Jasco J720 spectropolarimeter*)

4.3 Metody

4.3.1 Aktivace cisplatin

100 μl $6 \cdot 10^{-4}$ M roztoku cisplatin bylo inkubováno s 0,3 μl 0,2 M AgNO_3 . Inkubace probíhala po dobu 24 hodin ve tmě. AgNO_3 zprostředkovává hydrataci cisplatin tím, že oddisociuje vlastní dusičnou skupinu a dojde k jejímu nahrazení chlorem ze struktury cisplatin. Vznikne tak sraženina $\text{AgCl}\downarrow$, která se oddělí od takto aktivované cisplatin centrifugací (tzv. Aqua forma-viz 2.3.1). Centrifugace probíhala po dobu 20 minut při 4500 rpm. Hydratovaná forma cisplatin byla odebrána a použita k modifikaci oligonukleotidů.

4.3.2 Modifikace oligonukleotidů

Oligonukleotidy byly modifikovány s cisplatinou, ve tmě, po dobu 48 hodin při teplotě 37°C v poměru 1:1, oligonukleotid : cisplatin. Pro stanovení objemů jednotlivých komponent musela být experimentálně ověřena koncentrace oligonukleotidů pomocí měření absorbance při 260 nm, výpočtem dle Lambert-Beerova zákona: $A = \epsilon \cdot c \cdot l$. Koncentrace řetězce se specifickou sekvencí AG byla stanovena na 246 pmol/ μl . Pro řetězec se sekvencí GG je $c = 317$ pmol/ μl .

4.3.3 Separace modifikovaných oligonukleotidů pomocí HPLC:

Příprava zásobních roztoků

Na 500 ml zásobního roztoku A bylo použito: 6,25 ml 4M NaCl + 5 ml 1M Tris. Cl., pro roztok B byly objemy chemikálií: 125 ml 4M NaCl + 5ml 1M Tris. Cl. Zbytek do plného objemu byl dolit MilliQ vodou. Následně byla provedena filtrace pro odstranění potenciálních nečistot.

Postup izolace

Po 10-ti minutovém promytí kolony neutrálním roztokem dle tabulky č.2-initial, byl spuštěn test gradientu bez oligonukleotidů. Následně se provedl předběžný nástřik GG, AG aduktů pro kontrolu retenčního času a vhodné volby gradientu, při průtoku 1 ml/min. Dle rostoucích hodnot absorbance při 260 nm byly postupně odebírány vzorky GG-cisPt, GG, v dalším nástřiku pak AG-cisPt, AG. Odběr byl prováděn na základě předchozích testů s modifikovanými oligonukleotidy, kde se dalo vyzorovat přibližný retenční čas a jímát separované varianty aduktů k následnému dialyzačnímu přečištění.

Čas (min)	% roztoku A	% roztoku B
Initial	80	20
5	80	20
35	20	80
38	0	100
40	0	100
45	80	20

Tabulka č. 2: Nastavení gradientu pro eluci modifikovaných oligonukleotidů

4.3.4 Dialýza

Dialýza představuje druhý krok v přečištění, resp. odsolení modifikovaných oligonukleotidů. Současně se odstraní nenavázané komplexy, které se zde mohou vyskytovat. Vzhledem k molekulové hmotnosti 6849 g/mol oligonukleotidu se specifickou sekvencí GG, resp. 6833 g/mol oligonukleotidu AG, byly vybrány dialyzační membrány MWCO 6-8000 (*Spectrum laboratories*). Membrány byly před plněním převařeny v destilované vodě. Samotná dialýza byla prováděna proti deionizované vodě (v MilliQ čistotě), při teplotě 4-6°C, ve třech cyklech po 1 hodině.

4.3.5 Stanovení koncentrace modifikovaných oligonukleotidů-AS

Koncentrace modifikovaných řetězců byla stanovena nejdříve pomocí absorpční spektrometrie, následně byl tento výsledek porovnán s výsledky měření na atomovém absorpčním spektrometru. Při vlnové délce 260 nm a hodnotě absorbance 0,0749, byla dle Lambert-Beerova zákona vypočtena koncentrace $4,281 \cdot 10^{-7} \text{M}$ pro AG-cisPt oligonukleotid. U GG-cisPt, byla absorbance 0,192 a tedy koncentrace $c = 1,089 \cdot 10^{-6} \text{M}$.

4.3.6 Stanovení koncentrace cisplatinu pomocí AAS

Pro účely přesného stanovení kvantity platiny je vhodnou metodou bezplamenová atomová absorpční spektrometrie. Tato metoda využívá monochromatického záření platinové výbojky s dutou katodou. Atomizaci zajišťuje rovnoměrně žhavená grafitová cela, kam je injektován vzorek. Celé měření je prováděno v atmosféře inertního plynu. Měření bylo realizováno na přístroji *Varian AA240Z* s grafitovou celou *Grafite tube atomizer 120*.

4.3.7 HPLC štěpení

Enzymatické štěpení oligonukleotidů slouží k charakterizaci aduktu a kontrolu modifikace cisplatinou. Celkový objem reakční směsi činil v případě modifikovaných oligonukleotidů 40 μl (2 analytické nástřiky do HPLC smyčky), nemodifikované byly štěpeny v reakčním objemu 80 μl (4 preparativní nástřiky). 1500 μl štěpícího mixu obsahovalo 0,5M octan sodný, 0,1M síran zinečnatý, 0,3M chlorid sodný, 0,1M chlorid hořečnatý a 972,5 μl H_2O . Obsah reakční směsi je v tabulce číslo 3. Štěpení jednotlivých oligonukleotidů bylo odstartováno přidáním 12 μl DNasy 1. Po 24 hodinách od startu štěpení bylo ke každému vzorku přidáno 0,5 μl alkalické fosfatázy (AP/CIP) o aktivitě 5U. Reakce s AP probíhala po dobu 4 hodin. Tris/HCl byl přidán současně s AP v množství dle tabulky číslo 3. Veškeré štěpící reakce probíhaly při teplotě 37°C. Štěpení bylo ukončeno zahřátím na 80°C po dobu 1 minuty. Hydrolitické enzymy štěpící reakce byly separovány filtry nanosep NMWL:30k (*Pall filtron*) pomocí centrifugace při 14000 rpm po dobu 10 minut.

Analýza produktů štěpení byla prováděna na přístroji La Chrom L7100 (*Merck Hitachi*) při použití zirkonové kolony Supelco-Zr column (*Sigma Aldrich-Supelco*) s předkolonou. Detekce byla nastavena na hodnotu 254 nm. Jako mobilní fáze bylo užito 0,1M octanu amonného (pH~4,5). Růstem gradientu acetonitrilu docházelo postupně k eluci jednotlivých nukleotidů z kolony na základě jejich hydrofobicity.

	Objem oligonukleotidu [μl]	Štěpící MIX [μl]	H_2O [μl]	Tris/HCl [μl]
AG	4,6	8	67,4	9,2
GG	3,6	8	68,4	9,2
AG-cisPt	18	4	18	5,2
GG-cisPt	22	4	14	5,2

Tabulka č. 3: Složení reakčního média pro enzymatické štěpení

4.3.8 Značení primerů pomocí T4-polynukleotid kinázy

Bakteriofágová T4-polynukleotid kináza katalyzuje přenos γ -fosfátu z ATP na 5'-konec DNA (popř. RNA) (111) Vnesení je možné pouze za předpokladu, že 5'-konec je defosforylovaný, což je v případě námi zkoumaných syntetických primerů zabezpečeno. Reakční médium obsahovalo radioaktivně značený ATP*, kde na pozici γ byl radionuklid ^{32}P , (γ - ^{32}P)ATP. Jedná se o β -zářič s poločasem rozpadu 14,262 dní. Prostřednictvím T4-polynukleotid kinázy byl radionuklid fosforu vnesen do řetězce, a tím byl primer označen. Kinázová reakce probíhala při teplotě 37°C po dobu 35 minut. Objemy jednotlivých komponent a složení reakčního média jsou uvedeny v tabulce č. 4. Nezareagovaný ATP* byl oddělen na kolonce se Sephadexem G50-Fine. Centrifugace usnadňující průchod vzorku skrze kolonu probíhala 4 minuty při 2500 rpm (1600 g) a teplotě 20°C. Po odstranění volného ATP byly primery vysušeny ve Speedvacu (*DNA mini-HeTo*), a do obou médií bylo přidáno 10 μl H_2O . Zahřátím na 90°C po dobu 5 minut a následným vložením do ledu je zabezpečeno vzájemné oddělení řetězců primerů.

<i>Látka (koncentrace)</i>	<i>Objem [μl]</i>
Kinázový pufr	1
ATP ($3,3 \cdot 10^{-6}\text{M}$)	2
ATP*	2
T4-polynukleotid kináza	2
H_2O	90
1. Médium: Primer 1	1,7
2. Médium: Primer 3	1,3

Tabulka č. 4: Složení reakčního média pro značení T4-polynukleotid kinázou

4.3.9 Hybridizace

K jednotlivým variantám cisplatinou nemodifikovaných templátů bylo přidáno 8 μl H_2O , 1 μl NaClO_4 a 1 μl příslušného primeru (1 nebo 3). Oligonukleotidy modifikované cisplatinou byly nejdříve vysušeny na přístroji SpeedVac, výchozí objem byl 72 μl pro templát AG-cisPt a 27 μl v případě templátu GG-cisPt. Po vysušení se k modifikovaným templátům přidala stejná množství primeru, H_2O a NaClO_4 jako v případě nemodifikovaných oligonukleotidů. Koncentrace templátu : koncentraci primeru byla 3:1 (30 pmol:10 pmol). Takto připravená směs se po 10 minut inkubovala při 60°C, následně se nechala zchladnout na laboratorní teplotu a poté byla přes noc uložena do lednice.

4.3.10 Reakce s polymerázou η

Polymeráza η byla vybrána k experimentům pro její schopnost translázové syntézy přes platinové adukty na DNA. Pomocí této polymerázy lze sledovat například mutační aktivitu aduktů vytvořených cisplatinou, (112) studovat vliv koncentrace a kinetiky na schopnost translázové syntézy. (113)

4.3.10.1 Koncentrační závislosti

Výchozí koncentrace zásobního roztoku polymerázy η byla 500 nM, pro samotnou polymerázovou reakci byly zvoleny koncentrace 25 $\text{fmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 100 $\text{fmol}\cdot\text{L}^{-1}$ a 0 $\text{fmol}\cdot\text{L}^{-1}$ jako kontrola. Reakční médium pro každou jednotlivou reakci mělo objem 10 μl . Byl zvolen základní mix, který obsahoval 0,7 μl příslušného templátu s primerem, 17,5 μl pufru pro pol η , 3,5 μl 1 μM dNTP a 6,3 μl H_2O . Množství reakčního mixu v každé reakci bylo 8 μl . Po přidání pol η probíhala reakce při teplotě 30°C po dobu 20 minut. Množství přidaného enzymu je v tabulce číslo 5. Inaktivace enzymu a zastavení reakce bylo provedeno zahřátím na 90°C po dobu 1 minuty a přidáním nanášecího (loading) pufru s formamidem. Výsledek reakce byl zkoumán pomocí elektroforézy v 24% polyakrylamidovém (PAA) denaturačním gelu.

	C [$\text{fmol}\cdot\text{L}^{-1}$]	Pol $\eta^{(1)}$ [μl]	H_2O [μl]	MIX [μl]
Vzorek	0	0	2	8
	2,5	0,5	1,5	8
	10	2	0	8

Tabulka č. 5: Objemy složek reakce pro dosažení potřebné koncentrace;

⁽¹⁾ 10x zředěná polymeráza η z výchozího 500 nM roztoku

4.3.10.2 Kinetické studie

Po analýze výsledků koncentrační závislosti byla zvolena vhodná koncentrace polymerázy η k časovým reakcím. Optimální je $25 \text{ fmol}\cdot\text{L}^{-1}$ koncentrace, s vyššími koncentracemi enzymu se postupně potlačuje kvantifikovatelný vliv aduktu a translézová syntéza probíhá velmi silně, snižuje se tím možnost pozorovat rozdíly mezi GG a AG adukty na translézovou syntézu.

Experiment byl proveden pro oba oligonukleotidy hybridizované s radioaktivně značeným primerem 1 i primerem 3. Reakce probíhala při teplotě 30°C po dobu 1, 5, 10, 20, 40 minut. Objem hybridizovaného templátu činil vždy $1 \mu\text{l}$. Reakce byla odstartována přidáním $49 \mu\text{l}$ zásobního mixu, který byl připraven z $25 \mu\text{l}$ pufru pro pol η , $5 \mu\text{l}$ $1 \mu\text{M}$ dNTP, $215 \mu\text{l}$ H_2O , $0,5 \mu\text{l}$ 250 nM polymerázy η . Výsledná koncentrace dNTP v celé směsi byla $100 \mu\text{M}$, koncentrace pol η byla $25 \text{ fmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Reakce byla zastavena $5 \mu\text{l}$ nanášecího pufru a zahřátím na 90°C po dobu 1 minuty. Následně byly všechny vzorky analyzovány pomocí elektroforézy v 24% polyakrylamidovém denaturačním gelu, tak jako v případě měření koncentračních závislostí.

4.3.11 Reakce s Klenowovým fragmentem

Z prokaryontních DNA polymeráz byl vybrán k *in vitro* studiím Klenowův fragment, tedy enzym bez 3'-5' exonukleázové aktivity (exo⁻). Výsledky koncentračních a kinetických studií slouží především ke srovnání vůči eukaryotické polymeráze η . Výchozí aktivita enzymu byla $5000 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$, kde 1U odpovídá přeměně $1 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$, tedy 16,67 nanokatalů. (114)

4.3.11.1 Koncentrační závislosti

Množství enzymu bylo voleno v koncentracích odpovídajících aktivitám 1U; 0,5U; 0,1U; 0,05U. V každé reakci byl $1 \mu\text{l}$ templátu s příslušným primerem (1 nebo 3), $5 \mu\text{l}$ 10x pufru NEB2, $1,25 \mu\text{l}$ 1mM směsi dNTP a $37,8 \mu\text{l}$ H_2O při celkovém reakčním objemu $50 \mu\text{l}$. Reakce byla odstartována přidáním $1 \mu\text{l}$ Klenowova fragmentu v příslušném ředění výchozího enzymu: 5x (1U), 10x (0,5U), 50x (0,1U), 100x (0,05U). Reakce probíhala při teplotě 25°C po dobu 5 minut. Reakce byla ukončena přidáním $5 \mu\text{l}$ loading pufru a zahřátím na 90°C po dobu 1 minuty. Produkty reakce byly analyzovány elektroforézou ve 24% denaturačním PAA gelu.

4.3.11.2 Kinetické studie

Reakční časy při kinetických experimentech byly voleny stejně jako v případě reakcí s polymerázou η , tedy 1, 5, 10, 20 a 40 minut. Každá reakce obsahovala 1 μ l templátu hybridizovaného s příslušným primerem (1 nebo 3), 5 μ l 10x pufru NEB2, 1,25 μ l 1mM směsi dNTP a 42 μ l H₂O při celkovém reakčním objemu 50 μ l. Množství enzymu odpovídalo 0,1U, tedy 1 μ l 10x zředěného výchozího enzymu. Reakce probíhala po dobu výše definovaných časů, při teplotě 25°C. Reakce byla ukončena přidáním 5 μ l nanášecího pufru a zahřátím na 90°C po dobu 1 minuty. Produkty reakce byly analyzovány elektroforézou ve 24% denaturačním PAA gelu.

4.3.12 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Elektroforetické metody využívají k dělení látek jejich odlišnou pohyblivost ve stejnosměrném elektrickém poli, kde se nabitě molekuly separují na základě rozdílných elektroforetických mobilit. Volba poréznosti gelu odpovídala užití pro elektroforetické dělení krátkých oligonukleotidů, v našem případě 23-merů. Na takto krátké oligonukleotidy je vhodné použít 24% polyakrylamidový gel s malou velikostí pórů, kde poměr akrylamidu:bisakrylamidu je 19:1. Základem pro přípravu gelu je silně endergonní reakce 60 ml 40 % PAA gelu s 50 g 8% močoviny a 5 ml 20% TBE. Na horní sklo byl nanesen 1% roztok silanu v CCl₄. Dělicí gel je složený z 50 ml 24% PAA, 30 μ l TEMED, 60 μ l AP. TEMED (tetramethylenethylenediamin) spolu s AP (ammonium persulfat) katalyzují polymeraci akrylamidu. (115) Elektroforetický zdroj byl nastaven na napětí 3000 V, proud 200 mA a výkon 35W.

4.3.13 Hybridizace komplementárních řetězců (dsDNA)

Pro měření spekter cirkulárního dichroismu a teploty tání bylo třeba nejprve stávající cisplatinou modifikované a nedomodifikované (kontrola) řetězce hybridizovat s komplementárními řetězci, vytvořit duplex (dsDNA). Koncentrace řetězce komplementárního k oligonukleotidu se specifickou AG sekvencí byla $5,57 \cdot 10^{-7}$ M, řetězec se sekvencí komplementární k GG měl koncentraci $5,70 \cdot 10^{-7}$ M, při celkovém objemu separátních vzorků 400 μ l. Vzájemný poměr hybridizovaných řetězců byl 1:1. Reakce probíhala po dobu 10 minut při 60°C, následně se nechala zchladnout na laboratorní teplotu a byla uložena přes noc do lednice.

4.3.14 Cirkulární dichroismus

Metoda měření cirkulárního dichroismu (CD) slouží k pozorování strukturních změn DNA, v tomto případě vyvolaných adukty cisplatiny. Opticky aktivní látky vyvolávají stáčení roviny polarizovaného světla. Levotočivá a pravotočivá složka rovinně polarizovaného světla je vlivem optické aktivity oligonukleotidu absorbována s jistou diferencí a rovinná polarizace tak přechází v eliptickou. Cirkulární dichroismus je definován jako rozdíl extinkčního koeficientu pro levo- a pravo-točivou složku kruhově polarizovaného světla ($\Delta\varepsilon = \varepsilon_R + \varepsilon_L$). (116) Měření CD spekter probíhalo na přístroji JASCO J720 při teplotě 22°C v prostředí 0,3M NaCl, 0,1M EDTA a 10mM Tris-Cl. Každé měření bylo zaznamenáváno po 6-ti akumulacích, při rozlišení 0,5 nm a rychlosti snímání 200 nm/min.

4.3.15 Měření teplotní křivky tání

Teplotní křivka tání se zaznamenává proměřováním absorbance vzorku při 260 nm, v krocích definovaných zvyšující se teplotou. Měření probíhalo od 20 do 99°C s krokem 0,5°C/min. Teplotní křivka tání byla proměřena na přístroji *Beckman DU-700* v křemenných kyvetách s optickou dráhou 1 cm. Medium pro měření T_m obsahovalo 0,3M NaCl, 0,1M EDTA, 10mM Tris-Cl. Koncentrace oligonukleotidů při měření T_m byly: AG=8,83·10⁻⁷M, GG=9,03·10⁻⁷M, AG-cisPt=8,84·10⁻⁷M, GG-cisPt=8,38·10⁻⁷M. Denuraci dvouřetězcového oligonukleotidu lze pozorovat jako nárůst absorbance při měřené vlnové délce. V případě cisplatinou modifikovaných oligonukleotidů lze očekávat snížení teploty tání, oproti nemodifikovaným vzorkům, vlivem lokální distorze. Inflexní bod křivky- T_m , udává, kdy je polovina molekul dvouřetězcového oligonukleotidu denaturována. Tento konkrétní bod se vyhodnocuje první derivací naměřené křivky. Teoreticky lze teplotu tání vypočítat dle rovnice Marmura-Dotyho (rovnice číslo 1), či dle programu viz. (117). Dle teploty tání je možné určit míru destabilizace dvouřetězce. Hlavní faktory ovlivňující stabilitu oligonukleotidu jsou: stabilizace kladným nábojem-kompence vzájemného elektrostatického odpuzování negativně nabitých fosfátových skupin řetězců, stabilizace kovalentní vazbou meziřetězcových (IEC) můstků, destabilizace oligonukleotidu vlivem cisplatinou vytvořené distorze.

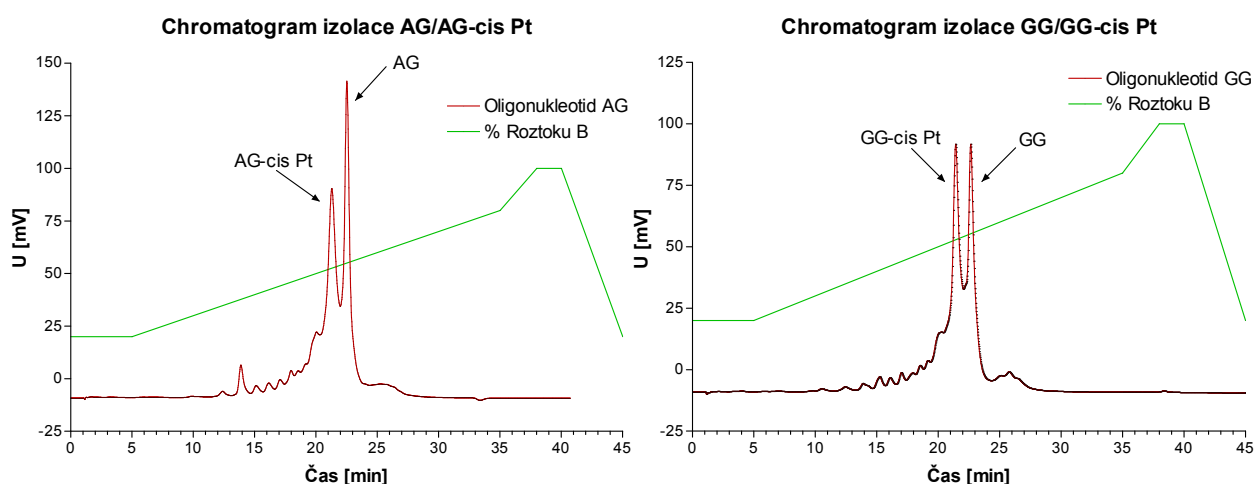
$$\text{Rovnice č. 1 (Marmura-Dotyho): } T_m = 41,1 XG + C + 16,6 \log[Na^+] + 81,5$$

5 VÝSLEDKY

5.1 Separace na HPLC

Izolaci modifikovaných oligonukleotidů předcházely kroky viz. 4.3.1; 4.3.2. S rostoucím gradientem (% roztoku B), se v retenčních časech na základě zvyšující se osmolarity mobilní fáze, postupně eluovaly cisplatinou modifikované/nemodifikované oligonukleotidy. Retenční čas pro modifikovaný oligonukleotid se specifickou AG sekvencí byl od 20,50 minuty do 21,75 minuty od nástřiku vzorku na kolonu (mono-Q HR5/50 GL (*Amersham biosciences*)). Eluce nemodifikovaného oligonukleotidu probíhala od 22,25 do 23,00 minuty. Chromatogram číslo 1 znázorňuje průběh separace AG oligonukleotidu.

Separace oligonukleotidu se specifickou GG sekvencí probíhala analogicky jako v předchozím případě. Retenční čas modifikovaného oligonukleotidu byl od 20,75 minuty do 21,50 minuty. Nemodifikovaný oligonukleotid byl odebíráán od 22,25 do 23,00 minuty. Chromatogram číslo 2 představuje záznam separace.



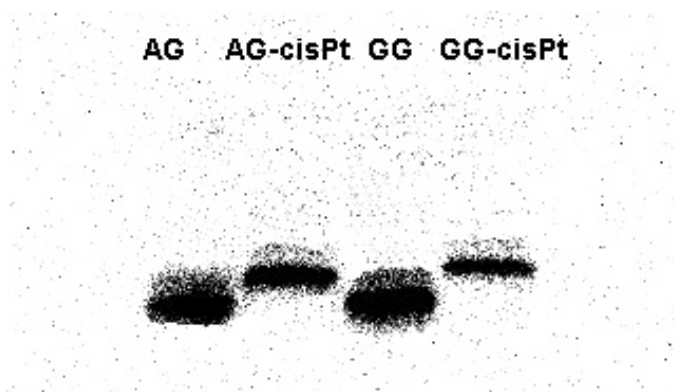
Chromatogram č. 1-vlevo: Separace oligonukleotidu se specifickou AG sekvencí

Chromatogram č. 2-vpravo: Separace oligonukleotidu se specifickou GG sekvencí

Červená křivka-nastříknutý vzorek, zelená křivka-zvyšující se osmotický gradient.

5.2 Kontrola modifikace oligonukleotidů

Pomocí elektroforézy v 24% PAA gelu byla ověřena modifikace separovaných oligonukleotidů. Princip pozorování rozdílných elektroforetických mobilit spočívá v kompenzaci záporného náboje fosfátové kostry oligonukleotidu vazbou cisplatinou. Modifikovaný oligonukleotid poté putuje směrem k anodě pomaleji. Autoradiografický snímek gelu je na obrázku číslo 13.



Obr. č. 13: Autoradiografický záznam 24% PAA gelu pro kontrolu modifikace oligonukleotidů

5.3 Stanovení koncentrace platiny ve vzorku pomocí AAS

Bezplamenovou atomovou absorpční spektrometrií byl stanoven poměr platiny obsažené ve vzorku vůči templátovému řetězci. V případě oligonukleotidu se specifickou AG sekvencí byl poměr 1,27:1 (Pt:oligo). Oligonukleotid se specifickou GG sekvencí byl modifikován cisplatinou v poměru 1,33 ku 1.

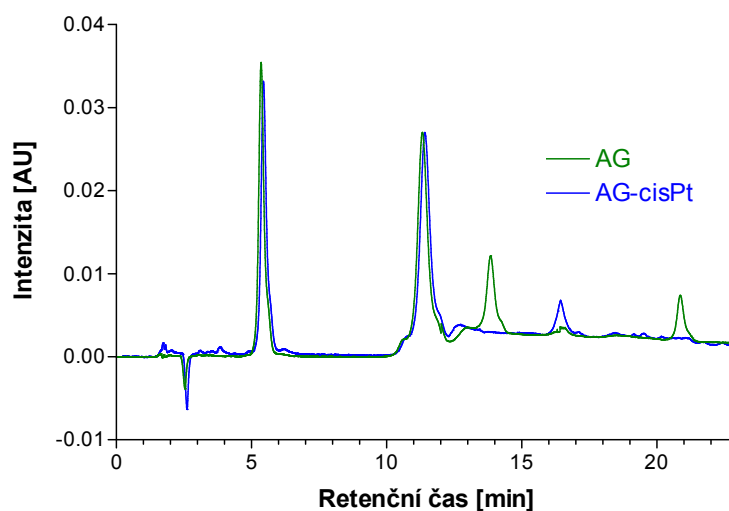
5.4 HPLC štěpení

Analýza produktů štěpící reakce potvrdila modifikaci oligonukleotidů cisplatinou. Objem každého z nastříkaných vzorků činil 20 μ l, při 0,05 OD. Retenční časy nukleotidů jsou v tabulce číslo 6. Chromatogram číslo 3 znázorňuje průběh separace štěpeného oligonukleotidu se specifickou AG sekvencí. Oligonukleotid se specifickou GG sekvencí je znázorněn na chromatogramu číslo 4. V obou chromatogramech je porovnán modifikovaný a nemodifikovaný oligonukleotid. Pro exaktní pozorování byly chromatogramy normalizovány na stejnou hodnotu absorbance thymidinu, který slouží jako vnitřní kontrola.

AG oligonukleotid	C	T	G	A
Retenční čas [min]	5,40 ($\pm 0,04$)	11,37 ($\pm 0,04$)	13,83 ($\pm 0,02$)	20,75 ($\pm 0,10$)
GG oligonukleotid	C	T	G	
Retenční čas [min]	5,12 ($\pm 0,00$)	10,53 ($\pm 0,00$)	13,32 ($\pm 0,32$)	

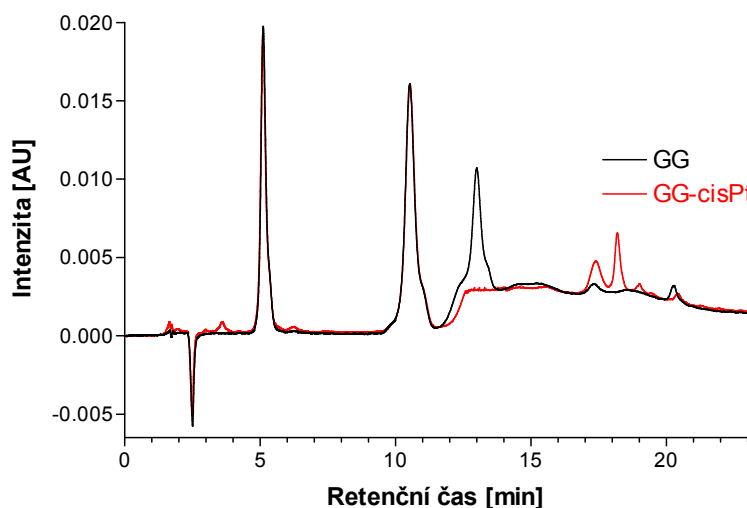
Tabulka č. 6: Retenční časy jednotlivýchází naštěpeného oligonukleotidu; hodnoty v závorce jsou průměrné odchylky vypočtené na základě dvou nástrůků.

HPLC chromatogram; AG/AG-cisPt štěpení



Chromatogram č. 3: Analýza produktů enzymatického štěpení cisplatinou nemodifikovaného/modifikovaného oligonukleotidu se specifickou AG sekvencí

HPLC chromatogram; GG/GG-cisPt štěpení



Chromatogram č. 4: Analýza produktů enzymatického štěpení oligonukleotidu se specifickou GG sekvencí

5.5 Polymerázové reakce-lidská Pol η

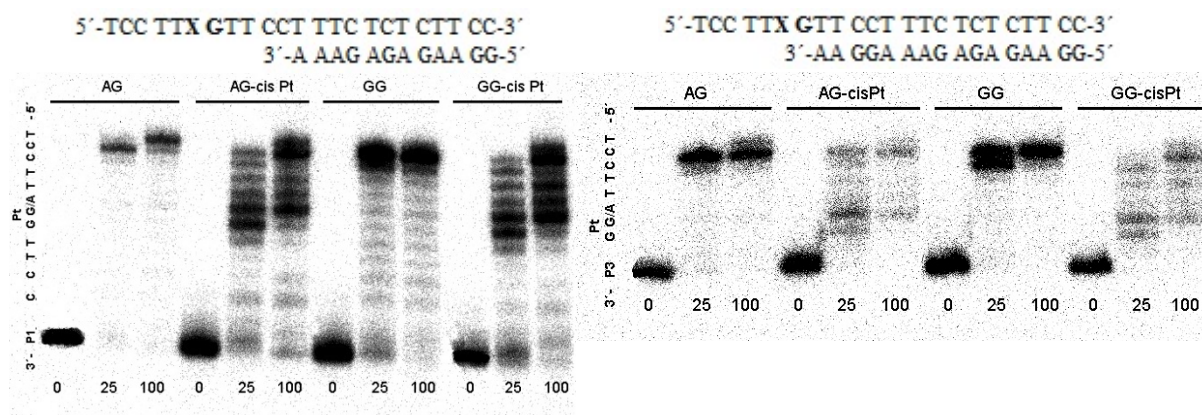
Všechny reakce provedené s polymerázou η byly prováděny v *in vitro* podmínkách, s následnou analýzou pomocí elektroforézy v 24% PAA gelu, autoradiografickým vyvoláním a denzitometrickým vyhodnocením.

5.5.1 Koncentrační závislosti Pol η

Předmětem tohoto experimentu bylo pozorovat, jaký vliv má koncentrace lidské polymerázy η při překonávání aduktů vytvořených modifikací oligonukleotidů cisplatinou. Zároveň lze z výsledků tohoto experimentu a analýzou dat stanovit optimální koncentraci enzymu k následným reakcím, ve kterých by mohla mít nevhodně zvolená koncentrace negativní vliv. Reakce probíhala vždy po dobu 20 minut při 30°C.

Experimenty provedené s primerem 1 jsou na obrázku číslo 14, popřípadě grafu číslo 3. Denzitometrický záznam gelu po reakci typu „standing start“ (primer 3) je na obrázku číslo 15, jemu odpovídá graf číslo 4. Translázová syntéza byla vyhodnocena jako denzitometrická sumace všech produktů počínaje lézí, vztažená ku všem bandům před lézí.

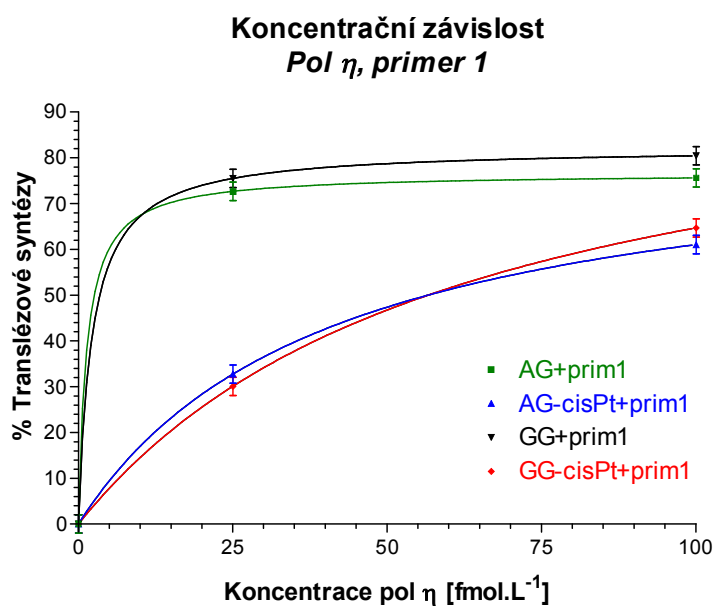
Z obou grafů je velmi patrný vliv přítomné léze při porovnání s nemodifikovaným oligonukleotidem. Efektivita polymerázové reakce je v případě modifikace cisplatinou, výrazně negativně ovlivněna. S rostoucí koncentrací enzymu se však vlivy modifikace na translázovou syntézu minimalizují. Při použití 25 fmol·L⁻¹ koncentrace polymerázy η a primeru 1 je syntéza u modifikovaného AG oligonukleotidu o 40%, respektive 45% v případě GG, nižší než u nemodifikovaného. Při použití 100 fmol·L⁻¹ koncentrace enzymu se procentuální rozdíl translázové syntézy snižuje na 14%-AG, respektive 16%-GG. Při hybridizaci templátu s primerem 3 dochází k celkovému nárůstu translázové syntézy. Při číselném porovnání primerů se syntéza v průměru o 14% zvýší při použití „standing start“ primeru 3. Výchozí výsledky sloužící ke koncentračním analýzám jsou obsahem tabulky číslo 7.



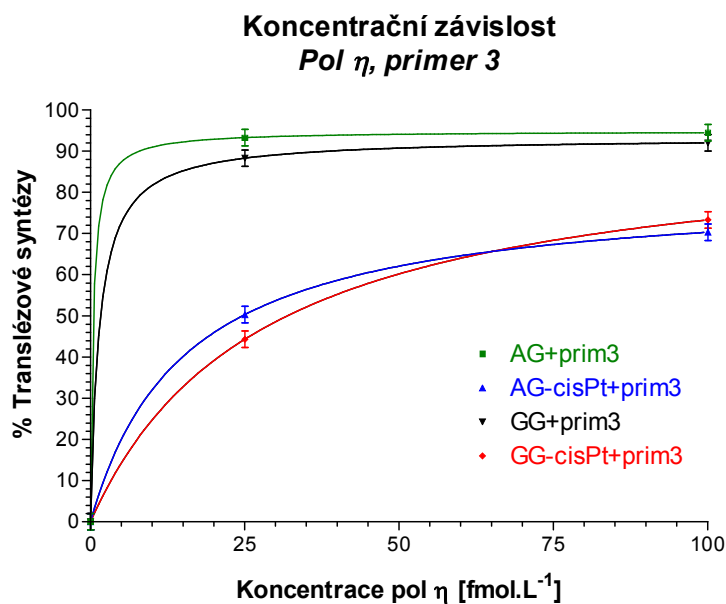
Obr. č. 14, 15: Autoradiograficky vyvolané snímky 24% PAA gelů k vyhodnocení koncentračních experimentů. Levá část obrázku-sekvence oligonukleotidu; sekvence nad obrázkem- $X=A$ nebo G ; horní část-zkoumaný oligonukleotid (nemodifikovaný/modifikovaný cisplatinou); spodní část-koncentrace polymerázy η [fmol·L⁻¹].

Obr. č. 14-vlevo: Experiment proveden s primerem 1 („running start“)

Obr. č. 15-vpravo: Experiment proveden s primerem 3 („standing start“)



Graf č. 3: Závislost transléznové syntézy na koncentraci pol η při použití primeru 1



Graf č. 4: Závislost translázové syntézy na koncentraci pol η při použití primeru 3

Koncentrace [fmol·L ⁻¹]	AG		GG		AG-cisPt		GG-cisPt	
	25	100	25	100	25	100	25	100
Primer 1	72,66	75,60	75,49	80,43	32,74	61,04	30,08	64,69
Primer 3	93,24	94,44	88,25	91,97	50,28	70,28	44,30	73,29

Tabulka č. 7: Výsledky studií koncentračních závislostí pol η ; číselné hodnoty odpovídají % translázové polymerázové syntézy při dané koncentraci enzymu, použitému templátu a primeru; tabulka je zjednodušena vynecháním hodnot pro nulovou koncentraci enzymu, kde % translázové syntézy bylo vždy 0.

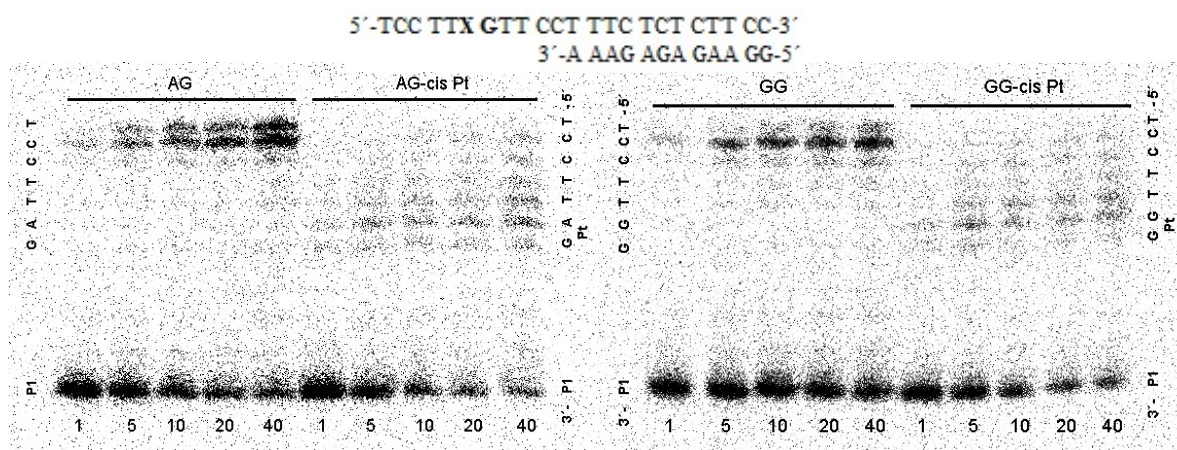
5.5.2 Kinetické studie Pol η

Z předchozího experimentu vyplývá, že pro studium kinetiky polymerázy η při překonávání AG a GG vnitrořetězcových můstků je nejvhodnější použít $25 \text{ fmol} \cdot \text{L}^{-1}$ koncentraci enzymu. Experiment byl prováděn pro časy 1, 5, 10, 20, 40 minut při 30°C . Reakce byly provedeny s cisplatinou modifikovanými, a pro kontrolu, i s nemodifikovanými oligonukleotidy. Produkt plné délky byl vyhodnocen jako denzitometrická sumace 23-meru ku všem ostatním „bandům“ v dané dráze. Veškeré níže uvedené výsledky jsou brány jako limitní hodnoty, jež vycházejí z trendu křivky příslušné reakce.

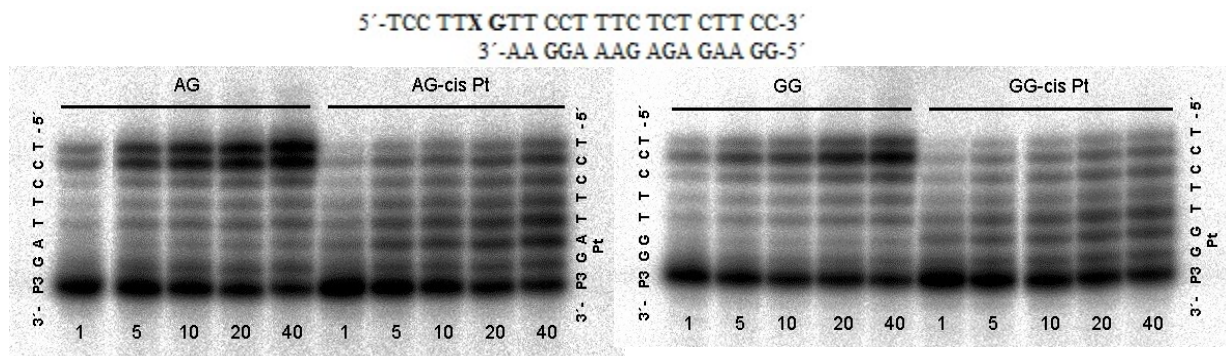
Experiment provedený s **primerem 1** demonstruje obrázek číslo 16 a jemu odpovídající graf číslo 5. Po modifikaci cisplatinou klesá procento FLP (full length produkt) u oligonukleotidu se specifickou AG sekvencí z 46% na 9%, syntéza je tedy inhibována přibližně o 35%. Vytvořený GG IAC můstek inhibuje syntézu produktu plné délky z výchozích 32% na 11%.

Výsledek kinetických studií s **primerem 3** je patrný z obrázku číslo 17, popřípadě grafu číslo 6. Při vazbě cisplatinu na sekvenci AG je syntéza produktu plné délky inhibována z 39% na 5%, tedy o 34%. Modifikace oligonukleotidu se specifickou GG sekvencí snižuje procento tvorby produktu plné délky z 35% na 2%, tedy o 33%. Výrazný rozdíl v inhibici syntézy FLP, při porovnání kontrol vůči modifikovaným řetězcům zde není patrný.

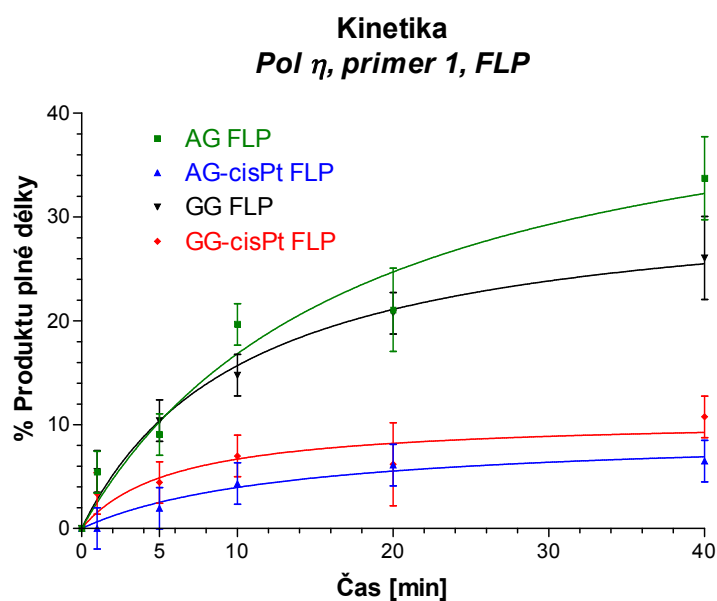
Tabulka číslo 8 shrnuje výsledky kinetických studií při použití obou typů primerů.



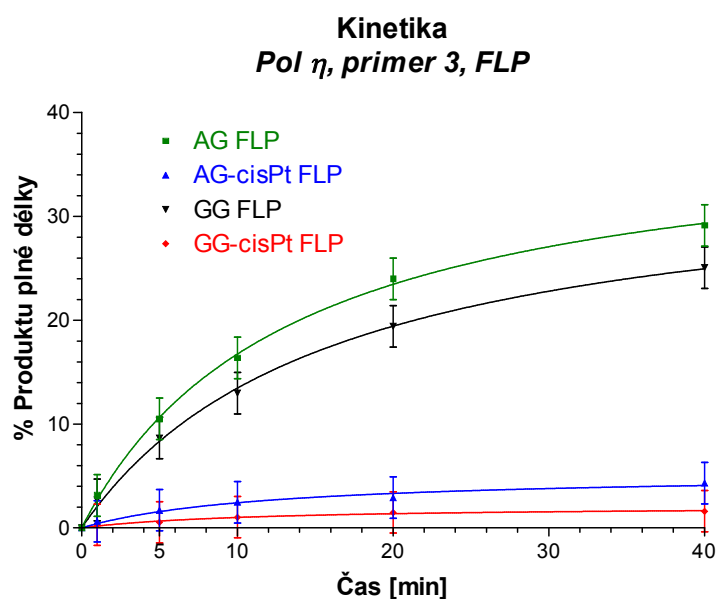
Obr. č. 16: Autoradiografický záznam 24% PAA gelu pro kinetiku cisplatinou nemodifikovaného/modifikovaného oligonukleotidu se specifickou AG sekvencí-vlevo, GG sekvencí-vpravo; experiment proveden s primerem 1; časy [min] jsou uvedeny uvedeny vždy v dolní části obrázku, sekvence-po boku, použitý oligonukleotid-nahoře



Obr. č. 17: Autoradiografický záznam 24% PAA gelu pro kinetiku cisplatinou nemodifikovaného/modifikovaného oligonukleotidu se specifickou AG sekvencí-vlevo, GG sekvencí-vpravo; experiment proveden s primerem 3



Graf č. 5: Kinetické porovnání cisplatinou vytvořených IAC můstků při použití primeru 1



Graf č. 6: Kinetické porovnání cisplatinou vytvořených IAC můstků při použití primeru 3

	Čas [min]	AG	AG-cisPt	GG	GG-cisPt
Primer 1	1	5,42	0,00	5,49	3,37
	5	9,05	1,94	10,38	4,43
	10	19,65	4,33	14,76	6,98
	20	21,05	6,11	20,72	6,18
	40	33,72	6,49	26,04	10,75
Primer 3	1	3,12	0,63	2,69	0,29
	5	10,50	1,69	8,66	0,53
	10	16,37	2,47	12,97	1,02
	20	23,98	2,91	19,41	1,48
	40	29,12	4,31	25,05	1,60

Tabulka č. 8: Výchozí výsledky sloužící k vyhodnocení kinetických studií

5.6 Polymerázové reakce-prokaryontní Klenowův fragment

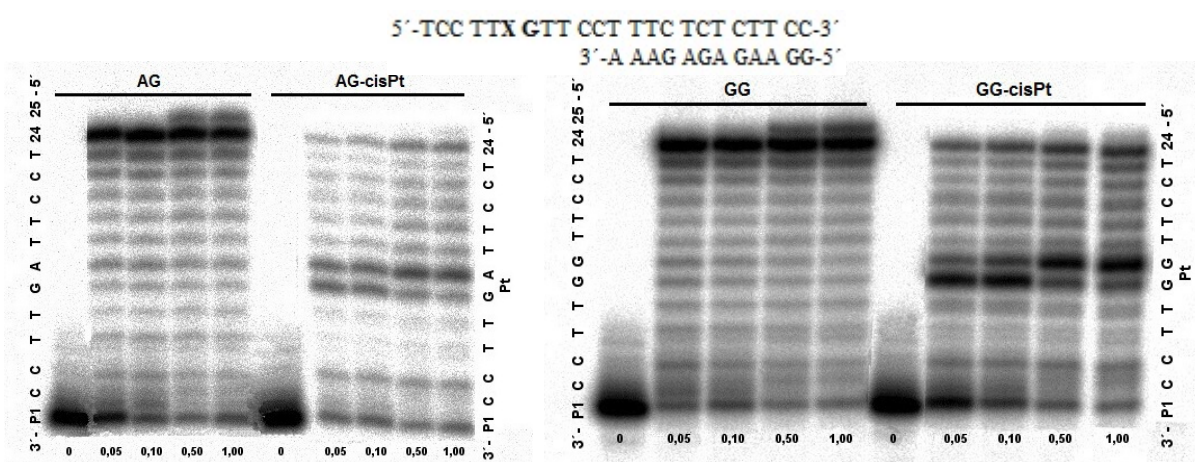
5.6.1 Koncentrační závislosti

Experimenty založené na studiu vlivu vzrůstající koncentrace, resp. aktivity Klenowova fragmentu, na translázovou syntézu ukazují, že při zvolených aktivitách dochází již od 0,5 U enzymu k maximální generaci produktu plné délky. Za FLP byl považován produkt o délce 23 bp a více, pakliže se vyskytuje.

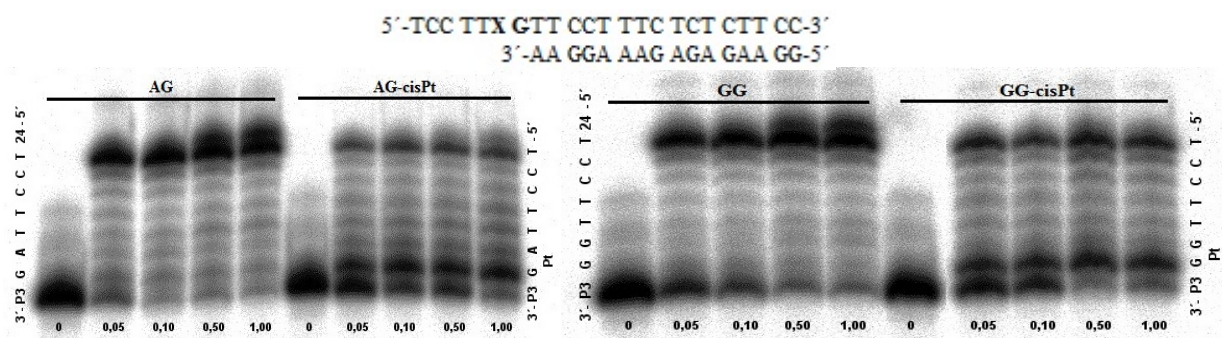
Z obrázku číslo 18, popřípadě grafu číslo 7 je patrné, že cisplatinou modifikované oligonukleotidy s **primerem 1** vykazují výrazně nižší celkové množství produktu plné délky. Z analýzy PAA gelu po elektroforetickém dělení vyplývá, že Klenowův fragment je schopen syntetizovat i navzdory nepřítomnosti templátového řetězce, na což poukazuje přítomnost řetězců o délce 24 bp v případě cisplatinou modifikovaných oligonukleotidů a až 25 bp u nemodifikovaných vzorků. Přítomnost dvou bází za rozsah templátu (25 bp), je patrná od aktivity 0,5 U enzymu, delší řetězce nebyly zaznamenány. Maximální procento produktu plné délky vykazují reakce Klenowova fragmentu s oligonukleotidem se specifickou GG sekvencí-70%, dále pak AG-69%. U modifikovaných templátů se procento FLP blíží 22% v případě GG-cisPt a pouhých 13% u AG-cisPt. Veškeré výše uvedené hodnoty pro %FLP jsou uvedeny v limitních hodnotách pro maximální užití aktivity enzymu a při použití primeru 1. V případě modifikace cisplatinou dochází k poklesu produktu plné délky přibližně o 50%.

Průběh experimentu při použití **primeru 3** demonstruje obrázek číslo 19 a jemu odpovídající graf číslo 8. Po modifikaci cisplatinou dochází v případě oligonukleotidu se specifickou AG sekvencí k větší inhibici tvorby produktu plné délky než u GG oligonukleotidu. Po modifikaci GG oligonukleotidu dochází k poklesu syntézy produktu plné délky o 42%, a to z 80% na 38%. Cisplatinou po vazbě na oligonukleotid se specifickou AG sekvencí inhibuje tvorbu FLP o 58%, konkrétně z 80% až na 22%. Vzájemně se vytvořené AG a GG vnitřetězcové můstky liší o 16% ve schopnosti inhibice syntézy produktu plné délky Klenowovým fragmentem. Při použití primeru 3 byl detekován FLP o maximální délce 24 bp, tedy o 1 bazi méně než při použití primeru 1, avšak celkové procento tvorby FLP u primeru 3 je o přibližně 10% vyšší. U cisplatinou modifikovaných řetězců hybridizovaných s primerem 3 se vyskytl FLP o maximální délce 23 bp, což je o 1 bazi méně než u primeru 1. V tomto případě tedy nebyla zaznamenána syntéza komplementárního řetězce nad rámec templátového.

Tabulka číslo 9 obsahuje výsledky koncentračních závislostí provedených s Klenowovým fragmentem.

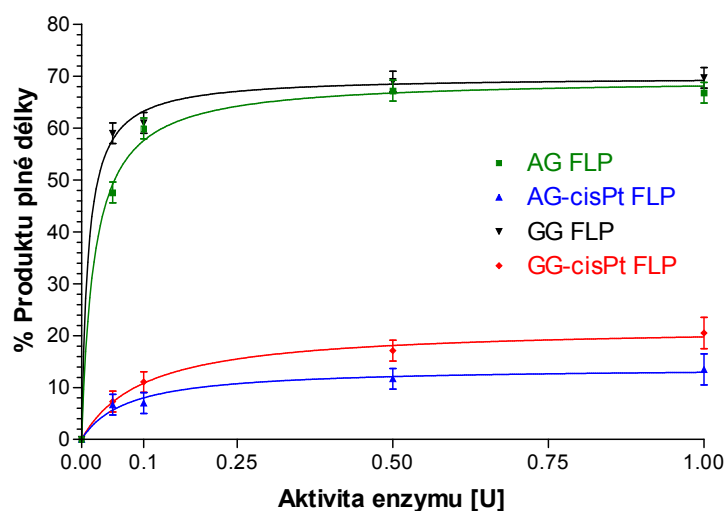


Obr. č. 18: 24% PAA gel-Analýza produktů koncentračních experimentů Klenowova fragmentu s primerem 1 („running start“). Sekvence je uvedena vždy po boku obrázku, aktivita enzymu [U] je popsána v dolní části obrázku.



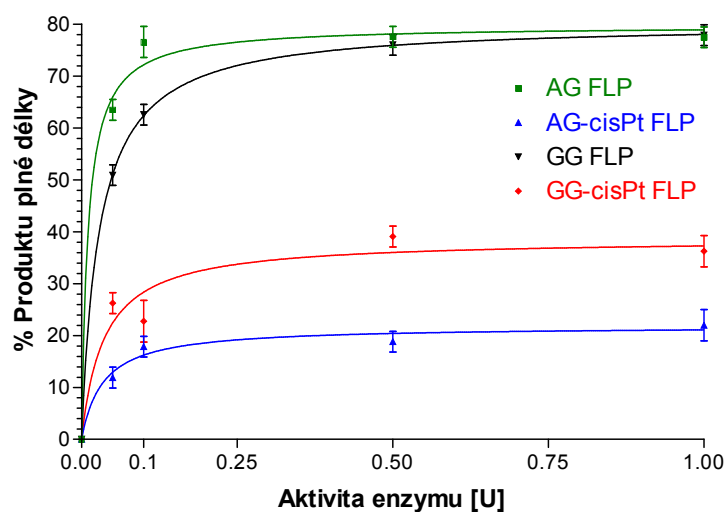
Obr. č. 19: 24% PAA gel- Analýza produktů koncentračních experimentů Klenowova fragmentu s primerem 3 („standing start“).

Koncentrační závislost Klenowův fragment, primer 1, FLP



Graf č. 7: Výsledek denzitometrické analýzy PAA gelu k vyhodnocení koncentračních experimentů pro oligonukleotidy hybridizované s primerem 1.

Koncentrační závislost Klenowův fragment, primer 3, FLP



Graf č. 8: Výsledek denzitometrické analýzy PAA gelu k vyhodnocení koncentračních experimentů pro oligonukleotidy hybridizované s primerem 3.

	Aktivita [U]	AG	AG-cisPt	GG	GG-cisPt
Primer 1	0,05	47,57	6,69	58,99	7,29
	0,10	59,94	7,01	60,98	11,06
	0,50	67,19	11,68	68,95	17,10
	1,00	66,79	13,48	69,67	20,50
Primer 3	0,05	63,48	11,90	50,90	26,25
	0,10	76,55	17,85	62,54	22,75
	0,50	77,54	18,81	75,99	39,06
	1,00	77,47	21,98	77,87	36,25

Tabulka č. 9: Shrnutí výsledků koncentrační závislosti s Klenowovým fragmentem; kontrolní vzorky bez přítomného enzymu jsou pro zjednodušení tabulky vynechány (% FLP vždy 0).

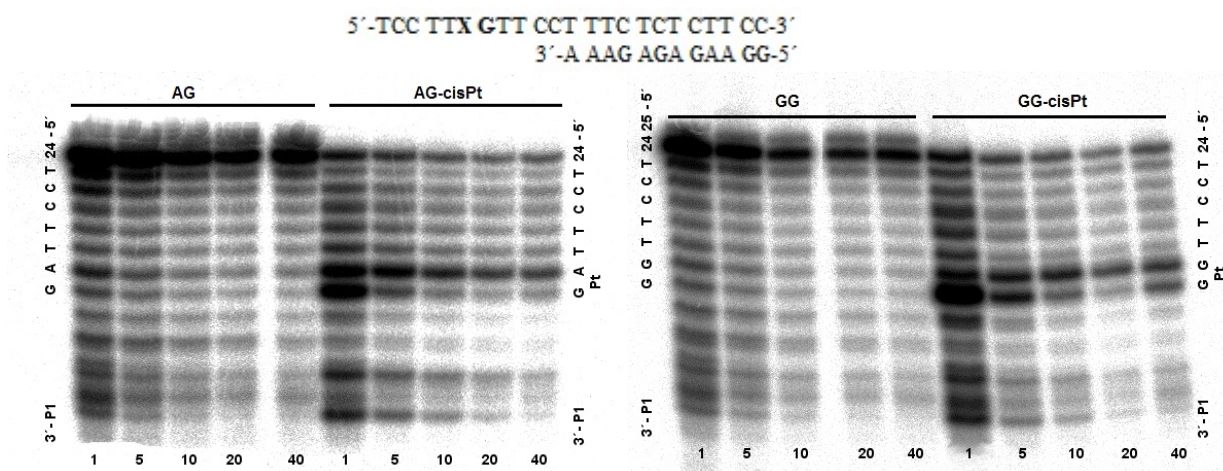
5.6.2 Kinetické studie

Z výsledků koncentračních závislostí vyplývá, že pro kinetické studie je vhodné použít množství Klenowova fragmentu odpovídající aktivitě 0,1U. Za těchto podmínek je dobře patrný vliv léze na průběh translázové syntézy, resp. na procentuální zastoupení produktu plné délky.

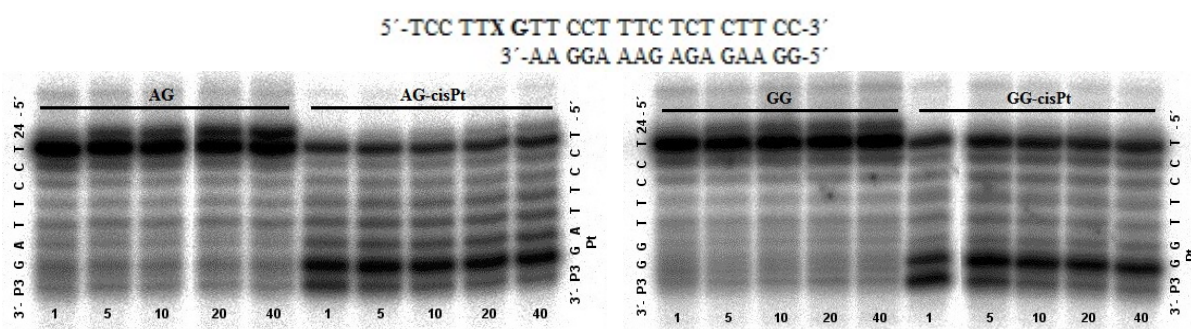
Experiment s **primerem 1** byl vyhodnocen na základě obrázku číslo 20, následnou denzitometrickou analýzou byl získán graf číslo 9. Již po první minutě experimentu s primerem 1 se u nemodifikovaných templátů %FLP přibližuje limitní hodnotě 70%. Naproti tomu %FLP u cisplatinou modifikovaných oligonukleotidů se po první minutě experimentu blíží polovině maximální limitní hodnoty produktu plné délky-19% AG-cisPt, 23% GG-cisPt. Kontrolní vzorky bez přítomné cisplatiny vykazují procento produktu plné délky v množství 77%. Polymerázová reakce je inhibována adukty cisplatinou o přibližně 55% při použití primeru 1, avšak vzájemný rozdíl mezi AG a GG IAC můstky nebyl při použití primeru typu „running start“ zaznamenán.

Výsledky kinetických studií provedených s **primerem 3** jsou na obrázku číslo 21, resp. grafu číslo 10. Po modifikaci cisplatinou klesá procento syntézy FLP z 80% na 24% u AG oligonukleotidu, v případě tvorby GG IAC můstku je syntéza produktu plné délky inhibována na 37% z 85%. Při použití primeru 3 je také patrnější rozdíl mezi jednotlivými typy vnitřetězcových můstků. Syntéza produktu plné délky je o 8% nižší při vytvoření AG IAC můstku než v případě GG IAC můstku.

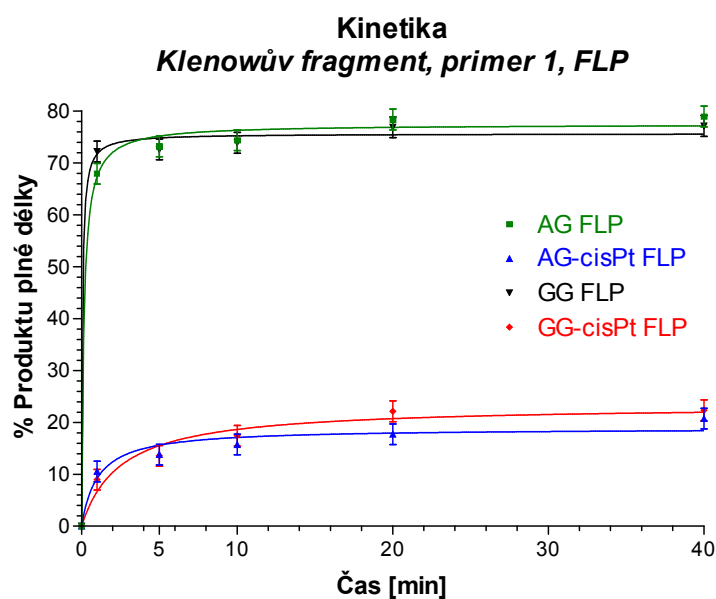
Tabulka číslo 10 shrnuje výsledky kinetických studií s Klenowovým fragmentem při použití obou typů primerů.



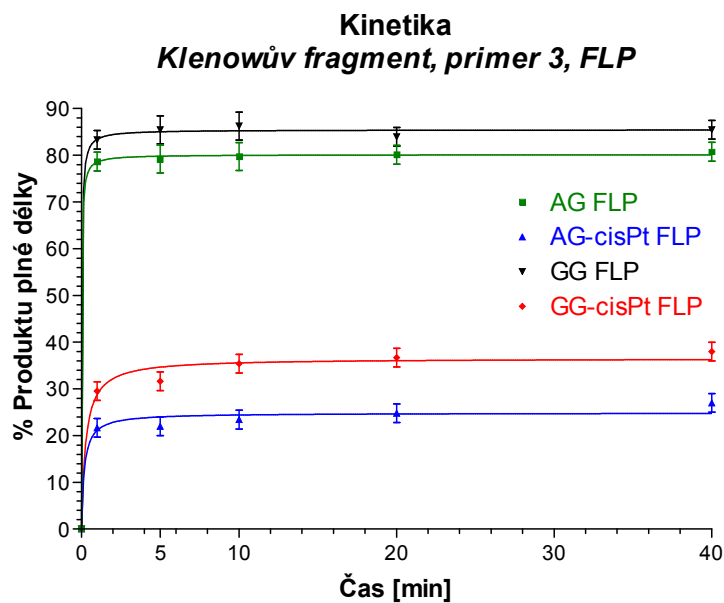
Obr. č. 20: 24% PAA gel k vyhodnocení kinetických studií pro vzorky hybridizované s primerem 1. Reakční časy jsou uvedeny v dolní části obrázku, sekvence uvedena po boku.



Obr. č. 21: 24% PAA gel k vyhodnocení kinetických studií při použití primeru 3.



Graf č. 9: Výsledek denzitometrického vyhodnocení PAA gelu pro kinetiku Klenowova fragmentu a oligonukleotidů hybridizovaných s primerem 1 „running start“.



Graf č. 10: Výsledek kinetických studií při použití Klenowova fragmentu a primeru 3 „standing start“.

	Čas [min]	AG	AG-cisPt	GG	GG-cisPt
Primer 1	1	67,90	10,53	72,19	8,95
	5	73,18	13,78	72,58	13,55
	10	74,35	15,74	73,86	17,42
	20	78,34	17,71	76,85	22,13
	40	78,92	20,72	77,11	22,32
Primer 3	1	78,64	21,66	83,29	29,53
	5	79,18	21,99	85,43	31,64
	10	79,71	23,42	86,24	35,41
	20	80,10	24,80	83,93	36,70
	40	80,74	26,99	85,47	37,99

Tabulka č. 10: Přehled výsledků kinetických studií s Klenowovým fragmentem

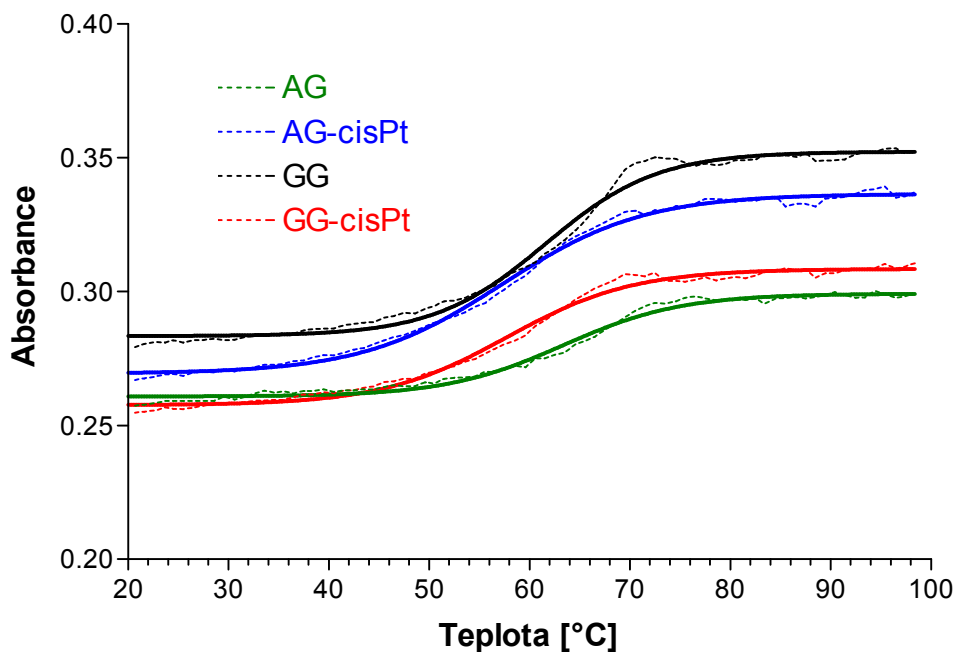
5.7 Stabilita oligonukleotidů - teplotní křivky tání

Teplotní křivka tání je záznamem absorbance při 260 nm, proložená analytickou křivkou-Boltzmanovou sigmoidou-viz graf číslo 11. První derivací teoretické křivky-graf číslo 12, byla vypočtena teplota tání T_m . Teoreticky byla vypočtena hodnota T_m i dle programu *oligoCalc* (117) a je uvedena spolu s experimentálně získanými výsledky v tabulce číslo 11. Stabilita oligonukleotidů byla prováděna v prostředí 0,3M NaCl. Experimentálně zjištěná teplota tání je pro nemodifikovaný AG oligonukleotid 63,43°C, po modifikaci cisplatinou klesla hodnota T_m na 57,37°C. Oligonukleotid se specifickou GG sekvencí bez modifikace vykazuje teplotu tání 61,59°C, po modifikaci klesá T_m na 57,43°C. Pokles teploty tání oligonukleotidů po modifikaci cisplatinou svědčí o změnách vedoucích k teplotní destabilizaci vlivem vytvoření IAC aduktu. V případě AG IAC můstku je destabilizační charakter výraznější ($\Delta T_m = -6^\circ\text{C}$) než u GG IAC můstku ($\Delta T_m = -4^\circ\text{C}$).

	AG	AG-cisPt	GG	GG-cisPt
Teoretická hodnota T_m [°C]	60,90	-	62,47	-
Experimentální hodnota T_m [°C]	63,43	57,37	61,59	57,43
ΔT [°C]		-6,06		-4,16

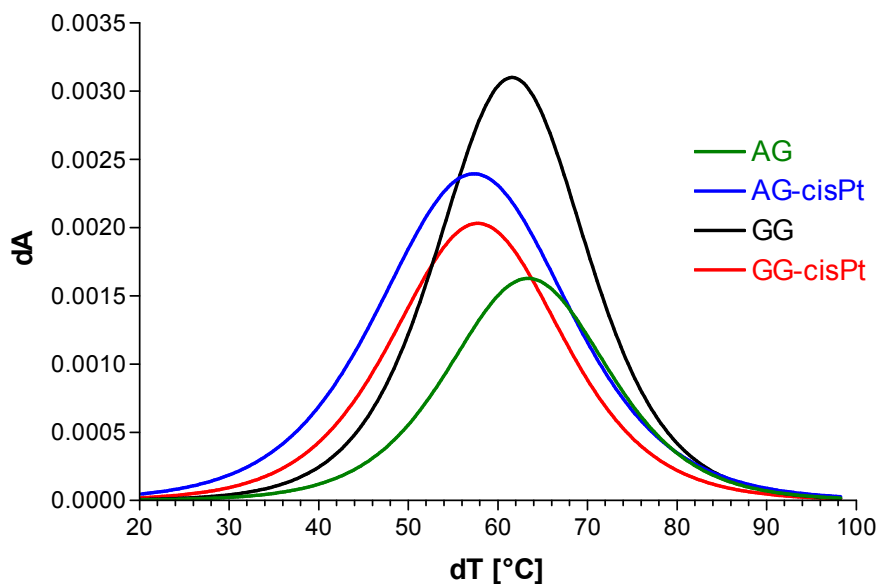
Tabulka č. 11: Hodnoty teploty tání; experimentální výsledky získány analýzou maxim grafu č. 12; ΔT je rozdíl teplot tání příslušného cisplatinou modifikovaného a nemodifikovaného oligonukleotidu ($\Delta T = T_{m_{cisPt\ vzorku}} - T_{m_{kontroly}}$).

Teplotní křivky tání (c NaCl~0,3M)



Graf č. 11: Teplotní křivky tání proložené Boltzmanovou sigmoidou

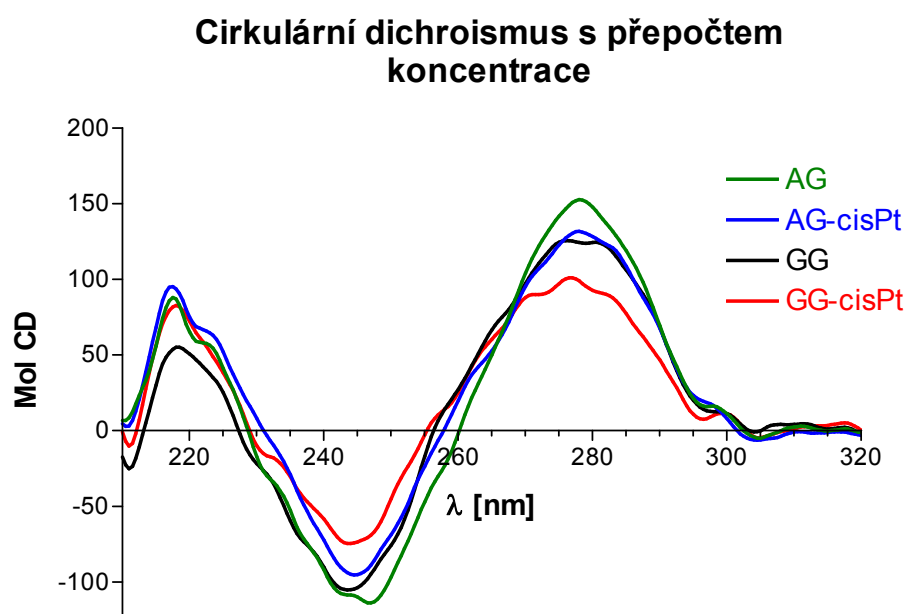
Určení teploty tání; 1. derivace



Graf č. 12: První derivace Boltzmanových sigmoid k určení hodnoty teploty tání

5.8 Cirkulární dichroismus

Ze spektrech cirkulárního dichroismu je patrný pokles v pozitivním pásu (260-300 nm) u obou oligonukleotidů po modifikaci cisplatinou. Negativní pás (230-260 nm) vykazuje po modifikaci naopak nárůst směrem ke kladnějším hodnotám extinkčních koeficientů, což svědčí o částečném rozvinutí dvouřetězcové struktury. Graf číslo 13 je vytvořen na základě přepočtu koncentrací pro jednotlivé vzorky. CD spektra doplňují analýzu teploty tání (viz 5.7) a potvrzují destabilizační charakter vnitřetězcových můstků cisplatinu na oligonukleotidech o délce 23 bp.



Graf č. 13: CD spektra oligonukleotidů nesoucích místně specifický můstek cisplatinu v sekvenci AG nebo GG

6 DISKUSE

Předkládaná diplomová práce se skládá z několika teoretických a experimentálních celků. Teoretická část je propracována od dílčích faktů, jako je objev, struktura a základní vlastnosti cisplatin, přes chování této sloučeniny v lidském organismu a vazby na DNA. Práce taktéž shrnuje dosavadní poznatky o translázově aktivních polymerázách, jelikož právě tyto enzymy a jejich specifické vlastnosti jsou předmětem experimentálních studií zadané práce. Stěžejní, experimentální část je chronologicky členěna od počátečních kroků-příprava a charakterizace cisplatinou vytvořených aduktů, přes polymerázové reakce prováděné s lidskou polymerázou η a prokaryontním Klenowovým fragmentem DNA pol I (*Escherichia coli*), až po experimenty studující vliv IAC můstků na stabilitu a strukturu oligonukleotidů. Zhodnocením a praktickým významem získaných výsledků se zabývá následující text, diskuse.

Cílem této diplomové práce bylo studovat vliv přítomnosti vnitřetězcových můstků v sekvenci GG a AG na účinnost syntézy DNA. K tomu byly zvoleny dvě různé DNA-dependentní DNA polymerázy, a to lidská polymeráza η a bakteriální DNA polymeráza I, konkrétně Klenowův fragment DNA pol I (*E. coli*) s odstraněnou exonukleázovou aktivitou ve směru 3'-5' (exo⁻). Vnitřetězcové můstky jsou majoritním typem poškození, které cisplatin v DNA vytváří, celkem představují 85-90% všech aduktů (27). Z tohoto důvodu, a také díky skutečnosti, že protinádorově neúčinný trans-izomer diammindichloroplatnatého komplexu tyto typy můstků nevytváří, jsou vnitřetězcové můstky mezi sousedními bazemi považovány za hlavní adukty zodpovědné za protinádorový účinek cisplatin i jejich přímých derivátů. Proto byly vnitřetězcové můstky mezi sousedními purinovými bazemi velmi často a podrobně studovány a v současné době existuje celá řada studií, zabývajících se změnou struktury DNA a biologickou odpovědí vyvolanou vznikem IAC můstku cisplatin. V naprosté většině těchto prací byl však studován výhradně můstek mezi dvěma sousedními guaniny a získané výsledky byly pak zobecněny pro oba typy vnitřetězcových můstků. Existuje jen velmi málo prací, ve kterých se autoři zabývají studiem fyzikálních a biologických vlastností můstku mezi adeninem a guaninem, srovnáním vlastností a účinku obou typů aduktů (118) (64). Přesto výsledky, uveřejněné v těchto několika pracech napovídají, že by vlastnosti AG a GG můstku mohly být odlišné, stejně jako biologická odpověď na jejich vznik, a že tedy doposud běžné zobecňování a nerozlišování mezi oběma typy aduktů nemusí být správné. Proto si i tato diplomová práce klade za cíl rozšířit poznatky

o tom, do jaké míry jsou tyto můstky shodné či odlišné z hlediska vlivu jejich přítomnosti na syntézu DNA.

Hydratace cisplatiny, modifikace oligonukleotidů

Při *in vitro* studiích vazby *cis*-diammindichloroplatinatého komplexu na oligonukleotid je nutno zajistit podmínky, jež vedou k vytvoření tzv. aqua-formy cisplatiny. Po hydrataci je již možná tvorba kovalentních můstků na studovaném oligonukleotidu, a to několika způsoby popsanými v odd. 2.3.2. Veškeré prováděné experimenty se omezují na studium bifunkčních aduktů, konkrétně AG a GG vnitrořetězcových můstků. Vytvoření takto konkrétního typu aduktu vychází jednak ze známých vlastností vazebných preferencí cisplatiny (119), dále pak použitím oligonukleotidu se specifickou sekvencí podporující tuto preferenci. Ani při vytvoření ideálních podmínek nelze předpokládat modifikaci všech řetězců, tudíž i vazbu všech molekul komplexu na oligonukleotid. Pro maximalizaci výtěžku cisplatinou modifikovaných oligonukleotidů bylo užito HPLC s následným dializačním přečištěním od přítomných solí.

Charakterizace aduktů

Charakterizace vytvořených aduktů je prioritním úkolem pro průkaznost a relevanci výsledků. Platinace vzorku byla potvrzena pomocí bezplamenové atomové absorpční spektrometrie, kde kvantita platiny ku oligonukleotidu činila 1,27:1 v případě oligonukleotidu se specifickou AG sekvencí, respektive 1,33:1 u GG oligonukleotidu. Podobná odchylka od očekávané hodnoty jeden atom platiny na jeden oligonukleotidový řetězec byla již pozorována dříve pro obdobné i jiné platinované oligonukleotidy (120) (121). Důvodem pro tento rozdíl od očekávané teoretické hodnoty je skutečnost, že pro stanovení koncentrace DNA byl využit teoreticky vypočítaný absorpční koeficient, který nezahrnuje příspěvek *cis*-diamminplatnatého zbytku ani jeho vliv na „stacking“ interakce bazí. Nicméně získané hodnoty jsou v dobré shodě s již dříve publikovanými údaji (1,17-1,36:1), což naznačuje, že připravené oligonukleotidy nesoucí místně specifický adukt jsou srovnatelné kvality jako ty, jež byly využity při experimentech publikovaných v renomovaných odborných časopisech.

Přítomnost komplexu platiny je patrná i na základě elektroforetického dělení, kde vlivem kompenzace záporného náboje fosfátové kostry amonnými skupinami ze struktury navázaného platinového komplexu, dochází ke snížení elektroforetické mobility. Z obrázku č. 13 odd. 5.2 je patrné, že vzorky oligonukleotidů modifikovaných cisplatinou a separovaných

na HPLC neobsahovaly žádné detekovatelné množství nezreagovaného oligonukleotidu, což se projevilo přítomností jen jednoho proužku na elektroforeogramu, který migroval pomaleji než kontrolní, nemodifikované vzorky. Tento experiment prokázal, že vzorky jsou dostatečné čistoty, aby mohly být použity v dalších experimentech.

Správnost vytvoření IAC můstku na předem určené sekvenci bylo možné kontrolovat až na základě HPLC štěpení. Při kontrolní HPLC separaci nemodifikovaného řetězce je na chromatogramu patrná přítomnost všech čtyř bazí, respektive tří v případě GG oligonukleotidu a to i v kvantitativním zastoupení, které odpovídá dodavatelem deklarované sekvenci. Úplný pokles píků, retenčním časem charakteristických pro adenin a guanin, svědčí o vytvoření AG IAC můstku. Vnitrořetězcový GG adukt byl dokázán na základě poklesu píku charakteristického pro nemodifikované guaniny.

Výše uvedenými experimenty byla potvrzena platinace vzorku, vazba komplexu cisplatinu k oligonukleotidu a vytvoření sekvence specifických AG a GG IAC můstku.

Polymerázové reakce

Po kompletní charakterizaci oligonukleotidů s místně specifickými adukty bylo možné přistoupit k experimentům s lidskou polymerázou η a prokaryontním Klenowovým fragmentem pol I (*E. coli*). Enzymatické reakce byly navrženy s cílem prokázat vliv a případné vzájemné rozdíly mezi jednotlivými typy bifunkčních aduktů na translázovou syntézu, zjistit vhodnost užívání prokaryontních polymeráz, jakožto modelových enzymů při *in vitro* experimentech a studovat vliv užití primerů o různé vzdálenosti od přítomné léze na polymerázovou reakci.

Při koncentračních studiích s polymerázou η bylo zjištěno, že vzrůstající koncentrace enzymu výrazně pozitivně ovlivňuje průběh translázové syntézy a tím i tvorbu produktu plné délky (FLP). Při koncentraci pol η $25 \text{ fmol}\cdot\text{L}^{-1}$ je translázová syntéza cisplatinovými adukty inhibována o 40%. Při nárůstu koncentrace na $100 \text{ fmol}\cdot\text{L}^{-1}$ je syntéza inhibována pouze o 14%. V tomto experimentu však nebyl pozorován relevantní rozdíl mezi AG a GG IAC můstky. Minimalizace vlivu léze s rostoucí koncentrací enzymu je v dobrém souladu s literaturou, kde bylo užito polymerázy β (100) i polymerázy η (122).

Klenowův fragment vykazuje vyšší citlivost vůči studovaným bifunkčním aduktům oproti polymeráze η , na což poukazují výsledky koncentračních experimentů. Při použití primeru typu „standing start“, tedy naléhajícího svým 3' koncem až k lézi, je syntéza produktu plné délky v případě GG IAC můstku inhibována o 42%. AG IAC můstek potlačuje

syntézu FLP až o 58%. Při vzájemném porovnání tedy AG IAC můstek vykazuje o 16% účinnější inhibici polymerázové reakce. Dalším zajímavým, nicméně z literatury známým jevem je schopnost Klenowova fragmentu syntetizovat i navzdory nepřítomnosti templátového řetězce. (123) Pro tento fakt svědčí detekce syntetizovaných FLP o délce 25 bp (+2) při použití „running start“ primeru a 24 bp (+1) v případě „standing start“ primeru. Syntéza za použití primeru nasedajícího až k samotnému aduktu představuje pro Klenowův fragment evidentní komplikaci, jelikož hned první nukleotid je inkorporován proti poškozenému místu. I „volný“ prostor před IAC aduktem tedy ovlivňuje průběh polymerázové reakce. (124)

Kinetika polymerázových reakcí byla sledována v časech 1, 5, 10, 20 a 40 minut s množstvím enzymu, který na základě koncentračních analýz poskytoval nejprokazatelnější výsledky vlivu aduktů na průběh polymerázové reakce.

Lidská polymeráza η neposkytovala při zohlednění chyby měření žádné relevantní difference mezi zkoumanými vnitrořetězcovými můstky. Kontrolní cisplatinou nemodifikované vzorky nevykazovaly po elektroforetickém dělení přítomnost produktů plné délky nad rámec templátového řetězce (23 bp).

Naproti tomu Klenowův fragment stejně tak jako při koncentračních studiích syntetizoval i 2 bp přes rozsah templátového řetězce, avšak pouze u cisplatinou nemodifikovaných vzorků a při použití „running start“ primeru. Vzorky s přítomnými IAC můstky obsahovaly FLP o délce 24 bp (+1). Při studiu kinetiky reakcí typu „standing start“ se v souladu s koncentračními experimenty Klenowova fragmentu projeví vzájemné difference mezi AG a GG IAC můstky. Po zohlednění chyby experimentu (směrodatné odchylky) je prokazatelně vnitrořetězcový AG můstek v inhibici syntézy FLP úspěšnější.

Výsledky polymerázových reakcí potvrzují vhodnost užívání Klenowova fragmentu, jakožto modelového enzymu pro *in vitro* experimenty studia vlivu cisplatinou vytvořených bifunkčních aduktů typu AG IAC a GG IAC, především v reakcích typu „running start“. Prokaryontní Klenowův fragment polymerázy I (*E. coli*) tedy poskytuje kvalitativně shodné výsledky ve srovnání se strukturně i evolučně vyspělejší lidskou polymerázou η . (125) Výjimkou je situace, kdy enzym jako první přisyntetizovává nukleotid komplementární k poškozenému místu. V tomto případě se Klenowův fragment DNA polymerázy I jeví jako citlivější a přítomnost AG nebo GG můstku se projeví rozdílně.

Vliv vnitrořetězcových můstků na stabilitu oligonukleotidů

Pro oba studované enzymy, DNA pol η i Klenowův fragment DNA pol I, představuje cisplatinou vytvořený adukt sterickou zábranu, která je způsobena distorzí standardní dvouřetězcové konformace. Pozorovaný rozdíl mezi působením AG a GG můstku na syntézu katalyzovanou bakteriální polymerázou nemůže být zapříčiněn rozdílnou velikostí AG a GG IAC aduktů, vzhledem k vazbě stejného komplexu-cisplatinu. Bylo proto zajímavé zjistit, jak se liší strukturní a termodynamické vlastnosti DNA po vniku GG a AG můstku.

Jak již bylo zmíněno výše, struktura DNA nesoucí vnitrořetězcový můstek AG byla věnována jen malá pozornost, zatímco existují desítky prací popisujících strukturu DNA s GG aduktem, kde tato struktura byla studována pomocí celé řady metod, jako je rentgenová krystalografie (126), NMR (127) a mnohé další. Nicméně lze v literatuře najít několik prací, kde se autoři věnovali studiu strukturních parametrů DNA s oběma typy můstků. Bylo zjištěno, že ohyb, vyvolaný vznikem můstku, je jak pro AG, tak i pro GG můstek identický ($32-34^\circ$) (128) (120). Totéž platí i pro úhel, o jaký se dvoušroubovice DNA po vzniku můstku odvine (13°) (121). Pro syntézu nového řetězce DNA je však kromě struktury (ohyb a rozvinutí dvoušroubovice) důležitá také stabilita dvoušroubovice. Bylo ukázáno, že pyrimidinové báze v těsném okolí platinového komplexu, především C v sekvenci GG/CC a T v sekvenci AC/TC vykazují rozdílnou reaktivitu s chemickými sondami struktury DNA, což napovídá o rozdílnosti distorzí DNA vyvolaných AG a GG můstkem. (129) Proto jsme se pokusili porovnat termální stabilitu DNA nesoucí vnitrořetězcový můstek GG a AG.

Změnu stability dvouřetězcového oligonukleotidu ovlivněnou vytvořením IAC můstku lze dobře postihnout metodou měření teplotních křivek tání. Záznamem absorbance při 260 nm lze z inflexních bodů denaturačních křivek vypočítat teplotu T_m , která napovídá o destabilizujících, popřípadě stabilizujících vlivech aduktů. Hlavními faktory, které přispívají ke stabilitě dvouřetězcového uspořádání oligonukleotidu je přítomnost kladného náboje a meziřetězcové (IEC) můstky, které však v tomto případě nebyly zkoumány. Naopak destabilizační efekt vyvolávají strukturní distorze způsobené například vnitrořetězcovými (IAC) můstky. (130)

Vlastní měření teplotních křivek tání při 0,3M koncentraci NaCl potvrdilo destabilizační charakter obou typů studovaných IAC můstků. Navíc na základě teplotní stability bylo zjištěno, že AG IAC adukt má oproti GG IAC aduktu výraznější denaturační charakter. Polovina molekul cisplatinou nemodifikovaných oligonukleotidů (hodnota T_m) se specifickou AG sekvencí denaturovala při 63°C a po vytvoření AG IAC můstků tato teplota

klesla na 57°C. Destabilizační efekt se v případě AG můstku projevil poklesem teploty tání o -6°C. Cisplatinou vytvořený adukt na GG sekvenci vyvolal snížení hodnoty T_m o -4°C, a to z kontrolních 61°C na 57°C po modifikaci. Při vzájemném porovnání tedy AG IAC můstek destabilizuje dvouřetězcové uspořádání oligonukleotidu více než GG můstek. Hlavní podíl na destabilizaci struktury má lokální rozvinutí (33), jež lze pozorovat pomocí metody cirkulárního dichroismu, kde nárůst v negativním pásu po modifikaci cisplatinou potvrzuje částečné rozvinutí a pokles v pozitivním pásu svědčí o denaturačních změnách. (131)

Závěrečné zhodnocení, posouzení konzistence výsledků

Výsledky reakcí s lidskou polymerázou η a prokaryontním Klenowovým fragmentem (*E. coli*) svědčí o malé schopnosti DNA polymeráz, studovaných v této práci, rozlišovat mezi AG a GG můstkem. Oba můstky inhibují syntézu DNA přibližně stejně efektivně, s výjimkou Klenowova fragmentu v uspořádání „standing start“, kde se projevil rozdíl a AG můstek byl poněkud účinnější v blokaci syntézy DNA než GG můstek. Na průběhu polymerázové reakce se významnou měrou podílí vzdálenost léze od konce primeru, kde větší „volný“ prostor nahrává snadnější elongaci řetězce.

Z literatury je známo, že AG můstek je rozpoznáván některými buněčnými proteiny odlišně od GG můstku. Např. bylo uveřejněno, že AG můstek je přibližně o 30% účinněji odstraňován z DNA nukleotidovou excisní opravou než GG můstek (132) Také bylo prokázáno, že AG můstek výrazně účinněji inhibuje eukaryontní i prokaryontní RNA polymerázu. (64) (118)

Na základě experimentů studujících vliv můstků na stabilitu oligonukleotidů jsme zjistili, že AG IAC můstek má na dvouřetězcové uspořádání výraznější destabilizační vliv než GG můstek. Tyto fakta lze tedy shrnout tak, že zatímco pro opravné procesy DNA je důležitá stabilita dvoušroubovice DNA, při syntéze DNA zřejmě tento faktor nehraje podstatnou roli a uplatňuje se jen vliv struktury DNA a samotného aduktu (ohyb a sterická zábrana), která je pro oba můstky stejná. To souvisí s tím, že při opravě DNA nukleotidovou excisní opravou musí dojít k odvinutí dvoušroubovice a vytvoření jednořetězcové DNA, což je zřejmě usnadněno v případě AG můstku díky větší destabilizaci dvouřetězce. Proto se tento typ můstku opravuje účinněji. Naproti tomu vlastní syntéza nového řetězce DNA polymerázou probíhá na již odvinutém templátovém řetězci, čili templátová DNA je v tomto kroku již jednořetězcová. Proto zřejmě nehraje stabilita dvoušroubovice v tomto procesu zásadní roli.

Z tohoto hlediska by mohlo být v budoucnu zajímavé studovat vliv obou typů můstků například na funkci helikáz, kde by se naměřené rozdíly mohly projevit.

7 SEZNAM ZKRATEK

HeLa – Buněčná linie odvozená od karcinomu děložního čípku (**Henrietta Lacks**- pacientka z níž byla poprvé tato kolonie v r. 1951 izolována) (11)

BAS – **B**ody **s**urface **a**rea, slouží k výpočtu vhodné dávky chemoterapeutika

IAC – **I**ntrastrand **c**rosslink; vnitřetězcový můstek

IEC – **I**nterstrand **c**rosslink; mezřetězcový můstek

Tdt – Terminální transferáza

f_{mis} – Misinkorporační index; stanovuje se jako poměr chybně vřazené báze ku správné (komplementární) bázi

GST – **G**lutathion-**S** transferáza

NER – **N**ucleotide **e**xcision **r**epair; nukleotidová excizní oprava

MMR - **M**is-**m**atch **r**epair; oprava chybného párování bazí

XP – *Xeroderma pigmentosum*, onemocnění projevující se zvýšenou senzitivitou vůči UV záření; četná tvorba nádorů kůže; **XPV** – **X**eroderma **p**igmentosum **v**ariant

PCNA – **P**roliferating **c**ell **n**uclear **a**ntigen; jaderný antigen proliferujících buněk

8-OxoG – **8-Oxoguanin** (8-hydroxyguanin, 8-oxo-Gua); jeden z nejčastějších typů lezí na DNA vzniklý působením reaktivních forem kyslíku. Zpravidla má za následek chybné párování s adeninem. Oprava 8 OxoG probíhá pomocí DNA glykosylázy OGG1. (133)

TATA – Krátká sekvence nukleotidů **A** a **T** rozpoznávaná transkripčními faktory (TFIID). Navázání TFIID způsobí lokální ohyb DNA a umožní navázání ostatních transkripčních faktorů na promotor. (134)

TBP – **T**ATA **b**inding **p**rotein

HMG – **H**igh **m**obility **g**roup **p**rotein

CTR1 – **C**opper **t**ransporter **1**; transmembránový transportní protein primárně transportující ionty mědi (135)

Tm – **M**elting **t**emperature; teplota tání dvouřetězcového oligonukleotidu

CD – **C**irkulární **d**ichroismus

AP – **A**lkaline **p**hosphatase (EC 3.1.3.1); Alkalická fosfatáza-hydrolitický enzym působící na fosfátové skupiny, např. ke štěpení fosfátové kostry oligonukleotidu

OD – **O**ptical **d**ensity; optická hustota

dsDNA – duplex; **D**ouble **s**tranded **D**NA

FLP – **F**ull **l**ength **p**roduct; produkt plné délky při polymerázové reakci

Loading buffer – Pufř sloužící k nanesení vzorku na polyakrylamidový gel

8 CITOVANÁ LITERATURA

1. American cancer society: The global economic cost of cancer. 2008.
2. American cancer society: Cancer facts and figures. 2010.
3. **Rosenberg, B., Camp, L. and Krigas, T.** Inhibition of division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*. 1965, 205, pp. 698-699.
4. **Rosenberg, B.** Platinum complexes for the treatment of cancer. *Interdisc. Sci. Rev.* 1978, 3, pp. 134-147.
5. **Kasparkova, J., et al.** Biophysical studies on the stability of DNA intrastrand cross-links of transplatin. *Biophysical journal*. 2008, 95, pp. 4361-4371.
6. **Pascoe, J. M. and Roberts, J. J.** Interactions between mammalian cell DNA and inorganic platinum compounds. I. DNA interstrand cross-linking and cytotoxic properties of platinum(II) compounds. *Biochem Pharmacol.* 1974, 23, p. 1345.
7. **Barton, J. K. and Lippard, S. J.** *Metal Ions in Biol.* 1980, 1, p. 31.
8. **Rosenberg, B.** Platinum coordination complexes in cancer chemotherapy. *Naturwissenschaften*. 1973, 60, p. 399.
9. —. *Metal Ions Biol. Syst.* 1980, 11, p. 127.
10. **Bursová, Vendula.** Kalorimetrická analýza interakcí DNA s protinádorově účinnými komplexy platiny. *Diplomová práce*. 2001, p. 8.
11. **Rahbari, R., Sheahan, T. and Modes, V.** A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification. *Biotechniques*. 2009, 46, pp. 277–284.
12. **Lippard, S. J.** New chemistry of an old molecule: cis-[Pt(NH₃)₂Cl₂]. *Science*. 1982, 218, pp. 1075-1082.
13. **Dhara, S. C.** A rapid method for the synthesis of cis-[Pt(NH₃)₂Cl₂]. *Indian J. Chem.* 1970, 8, pp. 193–196.
14. **Alderen, R. A., Hall, M. D. and Hambley, T. W.** The Discovery and Development of Cisplatin. *J. Chem. Ed.* 2006, 83, pp. 728–734.
15. **Patterson, H.** Luminescence, absorption, MCD, and NQR study of the cis and trans isomers of dichlorodiammineplatinum(II). *Inorg. Chem.* 1981, 20, pp. 2297-2301.
16. **Dobrowiak, J. C.** *Metals in medicine*. 2009, 1, p. 80.
17. **Guo, Z. J. and Sadler, P. J.** Metals in medicine. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999, 38, pp. 1513-1531.
18. Data from JYANT technologies, Inc. *JYANT pharmaceuticals*. 2009.
19. **Lebwohl, D. and Canetta, R.** Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *Eur. J. Cancer*. 1998, 34, pp. 1522-1534.

20. **Galanski, M.** Recent development of the fields in anticancer platinum complexes. *Recent pat. anticancer drug discovery*. 2006, 1, pp. 285-295.
21. **Jennerwein, M. and Andrews, P. A.** Effect of intracellular chloride on the cellular pharmacodynamics of cis-diamminedichloroplatinum(II). *Drug Metab. Dispos.* 1995, 23, pp. 178-184.
22. **Bancroft, D. P., Lepre, C. A. and Lippard, S. J.** Pt-195 NMR kinetic and mechanistic studies of cis-diamminedichloroplatinum and trans-diamminedichloroplatinum(II) binding to DNA. *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, pp. 6860-6871.
23. **Johnson, N. P., Hoeschele, J. D. and Rahn, R. O.** Kinetic analysis of the in vitro binding of radioactive cis- and trans-dichlorodiammineplatinum(II) to DNA. *Chem.-Biol. Interactions*. 1980, 30, pp. 151-169.
24. **Reedink, J.** Why does cisplatin reach guanine-N7 with competing S-donor ligands available in the cell? *Chem. Rev.* 1999, 99, pp. 2499-2510.
25. **Caradoma, J. P., et al.** The anti tumor drug cis-dichlorodiammineplatinum forms an intrastrand d(GpG) crosslink upon reaction with d[ApGpGpCpCpT]₂. *Journal Am. Chem. Soc.* 1982, 104, pp. 5793-5795.
26. **Pizzaro, M. A. and Sadler, P. J.** Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes. *Biochimie*. 2009, 91, pp. 1198-1211.
27. **Suchánková, Tereza.** Interakce nových asymetrických komplexů platiny s azolovými a izopropylaminovými ligandy s DNA. Vztah k biologické aktivitě. *Diplomová Práce*. 2008.
28. **Eastman, A.** The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. *Pharmacol. Ther.* 1987, 34, pp. 155-166.
29. **Leng, M. and Brabec, V.** DNA adducts of cisplatin, transplatin and platinum intercalating drugs. *International agency for research on cancer*. 1994, pp. 339-348.
30. **Rijt, S. H. and Sadler, P. J.** Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. *Drug discovery today*. 2009, 14, pp. 1089-1097.
31. **Brabec, V., Boudny, V. and Balcarova, Z.** Monofunctional adducts of platinum(II) produce in DNA a sequence-dependent local denaturations. *Biochemistry*. 1994, 32, pp. 1316-1322.
32. **Brabec, V., Reedijk, J. and Leng, M.** Sequence-dependent distortions induced in DNA by monofunctional platinum(II) binding. *Biochemistry*. 1992, 31, pp. 397-412.
33. **Brabec, V.** DNA modifications by antitumor platinum and ruthenium compounds: Their recognition and repair. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*. 2002, 71, p. 8.
34. **Chojnacki, H., et al.** In silico approach to cisplatin toxicity. Quantum chemical studies on platinum(II)-cysteine systems. *J. Mol. Model.* 2009, 15, pp. 659-664.

35. **Teuben, J. M., et al.** Solution structure of a DNA duplex containing a cis-diammineplatinum(II) 1,3-d(GTG) intrastrand cross-link, a major adduct in cells treated with the anticancer drug carboplatin. *Biochemistry*. 1999, 38, pp. 305-312.
36. **Brabec, V.** Chemistry and structural biology of 1,2-interstrand adducts of cisplatin. *Platinum-based drugs in cancer therapy*. 2000, pp. 37-61.
37. **Gelasco, A. and Lippard, S. J.** Anticancer activity of cisplatin and related complexes. *Metallopharmaceuticals*. 1999, 1, pp. 1-43.
38. **Kartalou, M. and Essigmann, J. M.** Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. *Mutation Res*. 2001, 478, pp. 1-21.
39. **Rabik, C. A. and Dolan, M. E.** Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Anti-tumour treatment*. 2007, 33, pp. 9-23.
40. **Barton, C., et al.** Involvement of both intrinsic and extrinsic pathways in IFN- γ -induced apoptosis that are enhanced with cisplatin. *European Journal of Cancer*. 2005, 41, pp. 1474-1486.
41. **Tewari, K. S. and Monk, B. J.** Gynecologic oncology group trials of chemotherapy for metastatic and recurrent cervical cancer. *Curr. Oncol. Rep*. 2005, 7, pp. 419-434.
42. **Jacobs, C. et al.** A phase III randomized study comparing cisplatin and fluorouracil as single agents and in combination for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *J. Clin. Oncol*. 1992, 10, pp. 257-263.
43. **Brabec, V. and Kasparkova, J.** Modifications of DNA by platinum complexes: Relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs. *Drug resistance updates*. 2005, 8, pp. 131-146.
44. **Melish, K. J., Kelland, L. R. and Harrap, K. R.** In vitro drug chemosensitivity of human cervical squamous cell carcinoma cell lines with intrinsic and acquired resistance to cisplatin. *Br. J. Cancer*. 1993, 68, pp. 240-250.
45. **Kuo, M. T., et al.** The roles of copper transporters in cisplatin resistance. *Cancer metastasis Rev*. 2007, 26, pp. 71-83.
46. **Yoshizawa, K., et al.** Copper efflux transporter (ATP7B) contributes to the acquisition of cisplatin resistance in human oral squamous cell lines. *Oncol. rep*. 2007, 18, pp. 987-991.
47. **Jansen, B. A. J., Brouwer, J. and Reedijk, J.** Glutathione induces cellular resistance against cationic dinuclear platinum anticancer drugs. *J. Inorg. Biochem*. 2002, 89, pp. 197-202.
48. **Surowiak, P., et al.** Nuclear metallothionein expression correlates with cisplatin resistance of ovarian cancer cells and poor clinical outcome. *Virchows Arch*. 2007, 450, pp. 279-285.
49. **Köberle, B., et al.** Cisplatin resistance: Preclinical findings and clinical implications. *Biochimica et Biophysica acta*. 2010, x, pp. 1-11.
50. **Kartalou, M. and Essigmann, J. M.** Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. *Mutation Res*. 2001, 478, pp. 1-21.

51. **Jones, Ch. and Thornback, J. R.** Medicinal Applications of Coordination Chemistry. *Royal society of chemistry*. 2007.
52. **Johnson, S. W., et al.** Relationship between platinum-DNA adduct formation and removal and cisplatin cytotoxicity in cisplatin-sensitive and cisplatin resistant human ovarian-cancer cells. *Cancer Res.* 1994, 54, pp. 5911-5916.
53. **Shuck, S. C., Short, E. A. and Turchi, J. J.** Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology. *Cell Res.* 2008, 18, pp. 64-72.
54. **Aboussekhra, A., et al.** Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell.* 1995, 80, pp. 859-868.
55. **Mu, D., Hsu, D. S. and Sancar, A.** Reaction mechanism of human DNA repair excision nuclease. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, pp. 8285-8294.
56. **Matsunaga, T. and al., et.** Human DNA repair excision nuclease. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, pp. 20862-20869.
57. **Sijbers, A. M., et al.** Xeroderma pigmentosum group F caused caused by a defect in a stucture-specific DNA repair endonuclease. *Cell.* 1996, 86, pp. 811-822.
58. **Jamieson, E. R. and Lippard, S. J.** Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts. *Chem. Rev.* 1999, 99, pp. 2467-2498.
59. **Heringová, Pavla.** Biofyzikální analýza mechanismu protinádorového působení nových metalofarmak. *Disertační práce.* 2007, p. 21.
60. **Friedberg, E. C.** How nucleotide excission repair protects against cancer. *Nature reviews cancer.* 2001, 1, pp. 22-33.
61. **Comess, K. M., et al.** Replication inhibition and translesion synthesis on templates containing site-specifically placed cis-diamminedichloroplatinum(II) DNA adducts. *Biochemistry.* 1992, 31, pp. 3975-3990.
62. **Pinto, A. L. and Lippard, S. J.** Sequence-dependent termination of in vitro DNA synthesis by cis- and trans-diamminedichloroplatinum(II). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1985, 82, pp. 4616-4620.
63. **Allday, M. J., et al.** DNA damage in human B cells can induce apoptosis, proceeding from G1/S when p53 is tranactivation defective. *EMBO J.* 1995, 14, pp. 4994-5005.
64. **Corda, Y., et al.** Spectrum of DNA-platinum adduct recognition by prokaryotic and eukaryotic DNA-dependent RNA polymerases. *Biochemistry.* 1993, 32, pp. 8582-8588.
65. **Washington, T. M., et al.** Variations on a theme: Eukaryotic Y-family DNA polymerases. *Biochimica et Biophysica acta.* 2010, 1804, pp. 1113-1123.
66. **Hübscher, U., Maga, G. and Spadari, S.** Eukaryotic DNA polymerases. *Annual review of biochemistry.* 2002, 71, pp. 133-163.

67. **Villani, G., Hübscher, U. and Butour, J. L.** Sites of termination of in vitro DNA synthesis on cis-diamminedichloroplatinum(II) treated single-stranded DNA: a comparison between E. Coli DNA polymerase I and Eukaryotic DNA polymerase alpha. *Nucl. acid res.* 1988, 16, pp. 4407-4418.
68. **Vaisman, A., et al.** Effect of DNA polymerases and high mobility group protein 1 on the carrier ligand specificity for translesion synthesis past platinum-DNA adducts. *Biochemistry.* 1999, 38, pp. 11026-11039.
69. **Uchiyama, Y., et al.** Distribution and roles of X-family DNA polymerases in eukaryotes. *Biochimie.* 2009, 91, pp. 165-170.
70. **Yamtich, J. and Sweasy, J. B.** DNA polymerase family X: Function structure and cellular roles. *Biochimica et biophysica acta.* 2010, 1804, pp. 1136-1150.
71. **Chang, L. M. and Bollum, F. J.** Low molecular weight deoxyribonucleic acid polymerase in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 1971, 246, pp. 5835-5837.
72. **Beard, W. A. and Wilson, S. H.** Structure and mechanism of DNA polymerase beta. *Chem. rev.* 2006, 106, pp. 361-382.
73. **Pelletier, H., et al.** Crystal structures of human DNA polymerase beta complexed with DNA: implications for catalytic mechanism, processivity, and fidelity. *Biochemistry.* 1996, 35, pp. 12742-12761.
74. **Vaisman, A. and Chaney, S. G.** *J. Biol. Chem.* 2000, 275, pp. 13017-13025.
75. **Kunkel, T. A.** The mutational specificity of DNA polymerase-beta during in vitro DNA synthesis. Production of frameshift, base substitution and deletion mutations. *J. Biol. Chem.* 1985, 260, pp. 5787-5796.
76. **Servant, L., et al.** A role for DNA polymerase beta in mutagenic UV lesion bypass. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, pp. 50046-50053.
77. **McElhinny, S. A., et al.** A gradient of template dependence defines distinct biological roles for family-X polymerases in nonhomologous end joining. *Mol. Cell.* 2005, 19, pp. 357-366.
78. **Fiala, K. A., Gawad, W. and Suo, Z.** Pre-steady-state kinetic studies of the fidelity and mechanism of polymerization catalyzed by truncated human DNA polymerase and β and β' . *Biochemistry.* 2004, 43, pp. 6751-6762.
79. **Crespan, E., Hübscher, U. and Maga, G.** Error-free bypass of 2-hydroxyadenine by human DNA polymerase lambda with proliferating cell nuclear antigen and replication protein A in different sequence contexts. *Nucleic Acids Res.* 2007, 35, pp. 5173-5181.
80. **Dominguez, O., Ruiz, J. F. and Lain, T.** DNA polymerase mu (pol mu) homologous to TdT, could act as a DNA mutator in eucaryotic cells. *Embo J.* 2000, 19, pp. 1731-1742.

81. **Aoufouchi, S., Flatter, E. and Dahan, A.** Two novel human and mouse DNA polymerases of the polX family. *Nucl. acids res.* 2000, 28, pp. 3684-3693.
82. **Zhang, Y., et al.** Highly frequent frameshift DNA synthesis by human DNA polymerase μ . *Mol. Cell Biol.* 2001, 21, pp. 7995-8006.
83. **Zhang, Y. X., et al.** Lesion bypass activities of human DNA polymerase μ . *J. Biol. Chem.* 2002, 277, pp. 44582-44587.
84. **McElhinny, S. A., et al.** A gradient of template dependence defines distinct biological roles for family X polymerases in nonhomologous end joining. *Mol. Cell.* 2005, 19, pp. 357-366.
85. **Isobe, M., et al.** Chromosome localization of the gene for human terminal deoxynucleotidyltransferase to region 10q23-q25. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1985, 82, pp. 5836-5840.
86. **Kubota, T., Maezawa, S. and Koiwai, K.** Identification of functional domains in TdIF1 and its inhibitory mechanism for TdT activity. *Genes cells.* 2007, 12, pp. 941-959.
87. **Faber, J., et al.** Terminal deoxynucleotidyl transferase-negative acute lymphoblastic leukemia. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2000, 124, pp. 92-97.
88. **Yamashita, N., Shimazaki, N. and Ibe, S.** Terminal deoxynucleotidyltransferase directly interacts with a novel nuclear protein that is homologous to p65. *Genes Cells.* 2001, 6, pp. 641-652.
89. **Tanioka, M., et al.** Molecular analysis of DNA polymerase eta gene in Japanese patients diagnosed as xeroderma pigmentosum variant type. *J. Invest. Dermatol.* 2007, 127, pp. 1745-1751.
90. **Masutani, C., Kusumoto, R. and Yamada, A.** The XPV (Xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta. *Nature.* 1999, 399, pp. 700-704.
91. **Grossmann, K. F., et al.** S. Cerevisiae has three pathways for DNA crosslink repair. *Mutat. Res.* 2001, 487, pp. 73-83.
92. **Johnson, R. E., et al.** hRAD30 mutations in the variant form of xeroderma pigmentosum. *Science.* 1999, 285, pp. 263-265.
93. **Vaisman, A., et al.** Efficient translesion replication past oxaliplatin and cisplatin GpG adducts by human DNA polymerase eta. *Biochemistry.* 2000, 39, pp. 4575-4580.
94. **Matsuda, T., et al.** Error rate and specificity of human and murine DNA polymerase η . *J. Mol. Biol.* 2001, 312, pp. 335-346.
95. **Bassett, E., et al.** Efficiency of extension of mismatched primer termini across from cisplatin and oxaliplatin adducts by human DNA polymerases beta and eta in vitro. *Biochemistry.* 2003, 42, pp. 14197-14206.

96. **Havener, J. M., et al.** Translesion synthesis past platinum DNA adducts by human DNA polymerase mu. *Biochemistry*. 2003, 42, pp. 1777-1788.
97. **Boer, J. G. and Glickman, B. W.** Mutations recovered in the Chinese hamster aprt gene after exposure to carboplatin: a comparison with cisplatin. *Carcinogenesis*. 1992, 13, pp. 15-17.
98. **Bassett, E., Vaisman, A. and Tropea, K. A.** Frameshifts and deletions during in vitro translesion synthesis past Pt-DNA adducts by DNA polymerases beta and eta. *DNA repair*. 2002, 1, pp. 1003-1016.
99. **Vaisman, A., Lim, S. E. and Patrick, S. M.** Effect on DNA polymerases and high mobility group protein 1 on the carrier ligand specificity for translesion synthesis past platinum-DNA adducts. *Biochemistry*. 1999, 38, pp. 11026-11039.
100. **Vaisman, A. and Chaney, S. G.** The efficiency and fidelity of translesion synthesis past cisplatin and oxaliplatin GpG adducts by human DNA polymerase beta. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, pp. 13017-13025.
101. **Masutani, C., et al.** Mechanisms of accurate translesion synthesis by human DNA polymerase eta. *EMBO J.* 2000, 19, pp. 3100-3109.
102. **Matsuda, T., et al.** Low fidelity DNA synthesis by human polymerase-eta. *Nature*. 2000, 404, pp. 1011-1013.
103. **Bergoglio, V., Canitrot, Y. and Hogarth, L.** Enhanced expression and activity of DNA polymerase beta in human ovarian tumor cells: impact on sensitivity towards tumor agents. *Oncogene*. 2001, 20, pp. 6181-6187.
104. **Maher, V. M., et al.** Frequency of ultraviolet light-induced mutations is higher in xeroderma pigmentosum variant cells than in normal human cells. *Nature*. 1976, 261, pp. 593-595.
105. **Chaney, S. G., et al.** Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts. *Critical reviews in oncology/Hematology*. 2005, 53, pp. 3-11.
106. **Alt, A., et al.** Bypass of DNA lesions generated during anticancer treatment with cisplatin by DNA polymerase eta. *Science*. 2007, 318, pp. 967-970.
107. **Klenow, H. and Henningsen, I.** Selective Elimination of the Exonuclease Activity of the Deoxyribonucleic Acid Polymerase from Escherichia coli B by Limited Proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1970, 65, pp. 168-175.
108. **Saiki, R. K.** Enzymatic Amplification of β -globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science*. 1985, 230, pp. 1350-1354.
109. **Hess, T. M., Schwitter, U. and Petretta, M.** DNA synthesis arrest at C4'-modified deoxyribose residues. *Biochemistry*. 1997, 36, pp. 2332-2337.

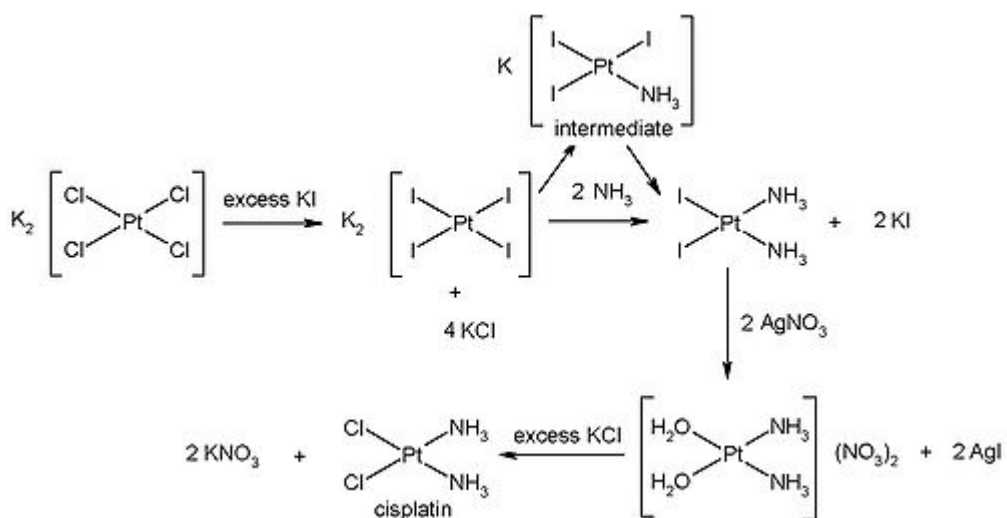
110. **Beese, L. S., Derbyshire, V. and Steitz, T. A.** Structure of DNA polymerase I Klenow fragment bound to duplex DNA. *Science*. 1993, 260, pp. 352-355.
111. **Richardson, C. C.** Polynucleotide kinase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4. *Procedures in nucleic acid research*. 1971, 2, p. 815.
112. **Bassett, E., et al.** The role of DNA polymerase eta in translesion synthesis past platinum-DNA adducts in human fibroblasts. *Cancer research*. 2004, 64, pp. 6469-6475.
113. **Vaisman, A., et al.** Efficient translesion replication past oxaliplatin and cisplatin GpG adducts by human DNA polymerase eta. *Biochemistry*. 2000, 39, pp. 4575-4580.
114. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB) "Units of Enzyme Activity". *Eur. J. Biochem*. 1979, 97, pp. 319-320.
115. **Brody, J. R. and Kern, S. E.** History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis(1):1-13. *Anal Biochem*. 2004, 333 (1), pp. 1-13.
116. **Hofr, C.** Absorpční spektroskopie při biologické analýze molekul. *Masarykova univerzita Brno*. 2007.
117. **Kibbe, W. A.** OligoCalc: An online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res*. 2007, 35.
118. **Corda, Y., Job, C. and Anin, M. F.** Transcription by Eucaryotic and Procaryotic RNA Polymerases of DNA Modified at a d(GG) or a d(AG) Site by the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II). *Biochemistry*. 1991, 30, pp. 222-230.
119. **Hemminki, K. and Thilly, W. G.** Binding of cisplatin to specific sequences of human DNA in vitro. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1988, 202, pp. 133-138.
120. **Bellon, S. F. and Lippard, S. J.** Bending studies of DNA site-specifically modified by cisplatin, trans-diamminedichloroplatinum(II) and cis-[Pt(NH₃)₂(N₃-cytosine)Cl]⁺. *Biophysical Chemistry*. 1990, 35, pp. 179-188.
121. **Bellon, S. F., Coleman, J. H. and Lippard, S. J.** DNA unwinding produced by site-specific intrastrand cross-links of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II). *Biochemistry*. 1991, 30, pp. 8026-8035.
122. **Chijiwa, S., Masutani, Ch. and Hanaoka, F.** Polymerization by DNA polymerase eta is blocked by cis-diamminedichloroplatinum(II) 1,3-d(GpTpG) cross-link: Implications for cytotoxic effects in nucleotide excision repair-negative tumor cells. *Carcinogenesis*. 2010, 31, pp. 388-393.
123. **Benkovic, S. J. and Cameron, C. E.** Kinetic analysis of nucleotide incorporation and misincorporation by Klenow fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I. *Methods in enzymology*. 1995, 262, pp. 257-269.

124. **Kolocheva, T. I., Levina, A. S. and Nevinsky, G. A.** Recognition of the primers containing different modified nucleotide units by Klenow fragment of DNA polymerase I from *E. coli*. *Biochimie*. 1996, 78, pp. 201-203.
125. **Joyce, M. C.** Can DNA polymerase I (Klenow fragment) serve as a model for other polymerases? *Current Opinion in Structural Biology*. 1991, 1, pp. 123-129.
126. **Takahara, P. M., et al.** Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin. *Nature*. 1995, 377, pp. 649-652.
127. **Huang, H. F., et al.** Solution structure of a cisplatin-induced DNA intrastrand cross-link. *Science*. 1995, 270, pp. 1842-1845.
128. **Rice, J. A., et al.** The major adduct of the antitumour drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with the DNA bends the duplex by ~40° toward the major groove. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1988, 85, pp. 4158-4161.
129. **Schwartz, A., Marrot, L. and Leng, M.** Conformation of DNA modified at a d(GG) or a d(AG) site by the antitumour drug cis-diamminedichloroplatinum(II). *Biochemistry (USA)*. 1989, 28, pp. 7975-7978.
130. **Brabec, V., Stehlíková, K. and Malina, J.** Thermodynamic properties of damaged DNA and its recognition by xeroderma pigmentosum group A protein and replication protein A. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2006, 446, pp. 1-10.
131. **Pilch, D.S., Dunham, S. U. and Jamieson, E. R.** DNA sequence context modulates the impact of a cisplatin 1,2-d(GpG) intrastrand cross-link on the conformational and thermodynamic properties of duplex DNA. *J. Mol. Biol.* 2000, 296, pp. 803-812.
132. **Zamble, D. B., et al.** Repair of cisplatin-DNA adducts by the mammalian excision nuclease. *Biochemistry*. 1996, 35, pp. 10004-10013.
133. **Kanvah, S. et al.** Oxidation of DNA: Damage to nucleobases. *Acc. Chem. Res.* 2010, 43, pp. 280-287.
134. **Alberts, B.** *Základy buněčné biologie. Espero Publishing.* 2005.
135. **Kuo, Y. M., Zhou, B. and Cosco, D.** The copper transporter CTR1 provides an essential function in mammalian embryonic development. *Medical sciences*. 2001, 98, pp. 6836-6841.
136. **Zhuang, Z. and Ai, Y.** Processivity factor of DNA polymerase and its expanding role in normal and translesion DNA synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010, 1804, pp. 1081-1093.

9 PŘÍLOHY

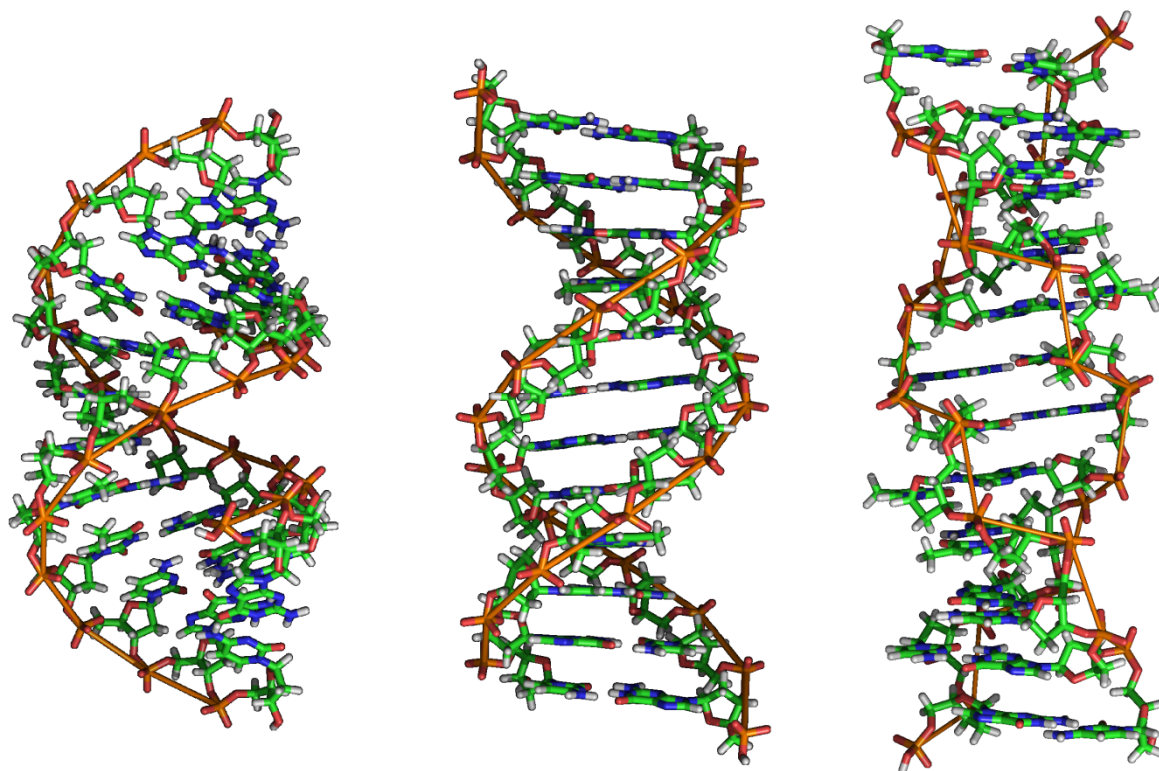
9.1 Syntéza cisplatiny

Výchozí sloučeninou pro syntézu je tetrachlorplatnan draselný $K_2(PtCl_4)$. Do reakce se přidává amoniak, který se nejdříve naváže do jakékoli ekvivalentní pozice na místo původního chloru. Druhý amoniak se nyní musí navázat do cis polohy. Tuto preferenční vazbu zajišťuje silnější trans efekt chlorů oproti amoniaku. Trans efekt alkalických kovů klesá v pořadí $I^- > Br^- > Cl^-$. Pro větší čistotu a výtěžnost *cis* izomeru se do reakčního média přidává $(PtI_4)^{2-}$. Následuje konverze z $PtI_2(NH_3)_2$ na $PtCl_2(NH_3)_2$ spolu s vedlejším produktem dusičnanem draselným. (13) (14)



Schematická úkazka sledu reakcí v případě syntézy cisplatiny dle Dhara et al. (13)

9.2 3D modely konformací DNA



Obr. č. 22: Konformační typy DNA v pořadí zleva: A-DNA, B-DNA, Z-DNA (převzato z cs.wikipedia.org – model určen ke globálnímu použití)