

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA EXPERIMENTÁLNÍ FYZIKY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Analýza interakcí DNA s protinádorově účinnými komplexy přechodných kovů pomocí  
viskozimetrie

Vypracovala: Nela Matulová

Studijní obor: Molekulární biofyzika

Vedoucí bakalářské práce: prof. RNDr. Viktor Brabec, DrSc.

Děkuji školiteli panu prof. Viktoru Brabcovi za vedení v bakalářské práci, paní prof. Janě Kašpárkové za odbornou a vědeckou pomoc, Mgr. Tereze Suchánkové, Mgr. Jitce Prachařové a Mgr. Janě Štěpánkové za asistenci při měření a práci v laboratoři. Také děkuji p. Petru Miklíkovi za odbornou pomoc při psaní bakalářské práce.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením prof. RNDr. Viktora Brabce, DrSc. a za použití literatury uvedené v závěru práce.

V Olomouci dne

## **Abstrakt**

Při léčbě nádorových onemocnění se již řadu let využívají platinové komplexy. Tyto farmaka jsou označovány jako cytostatika a nejčastěji používaným lékem je cisplatina. Mezi další se řadí oxaliplatin a karboplatin. V klinickém testování je nyní nový platinový komplex BBR3464. Modifikace DNA těmito komplexy a následné buněčné procesy jsou pravděpodobně příčinou jejich protinádorového účinku. Ke studiu ovlivnění struktury DNA po navázání Pt komplexů se používá řada biologických, biomedicínských a fyzikálních metod.

Tato práce se zabývá dvěma z nich, a to měřením fluorescence a viskozimetrií.

## **Abstract**

Platinum complexes have been clinically used for many years to treat human malignancies. These pharmaceuticals are designated as cytostatics and most frequently used drug of this type is cisplatin. Oxaliplatin and carboplatin belong to others. A new platinum complex BBR3464 is now clinically tested. DNA modifications by these complexes and downstream cellular processes are very likely responsible for their antitumor effects. A number of biological, biomedical and physical methods are exploited to investigate how structure of DNA is affected as a consequence of the binding of Pt complexes.

This work deals with two of them, namely by the measurement of fluorescence and by viscometry.

Klíčová slova:

Platinové komplexy, cisplatina, BBR3464, DNA, fluorescence, viskozita.

Keywords:

Platinum complexes, cisplatin, BBR3464, DNA, fluorescence, viscosity

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>3</b>
2.1	PLATINOVÉ KOMPLEXY DOSUD VYUŽÍVANÉ V KLINICKÉ PRAXI .....	3
2.1.1	Cisplatina.....	3
2.1.2	Cisplatina = významné farmakum při léčbě nádorů .....	4
2.1.3	Problémy při léčbě cytostatiky .....	5
2.1.4	Karboplatina .....	5
2.1.5	Oxaliplatina .....	6
2.2	DNA .....	8
2.2.1	Proč DNA.....	9
2.3	DNA A CISPLATINA .....	10
2.3.1	Mechanismus vazby cisplatinu na DNA .....	10
2.3.2	Aduktu vytvořené v DNA .....	11
2.4	APLIKACE CISPLATINY.....	15
2.5	POŠKOZENÍ DNA PO MODIFIKACI CISPLATINOU .....	16
2.6	PROTEINY ZABRAŇUJÍCÍ OPRAVĚ DNA A NUKLEOTIDOVÁ EXCISNÍ OPRAVA (NER)....	16
2.7	VLIV CISPLATINY NA REPLIKACI A TRANSKRIPCI DNA, APOPTÓZA .....	17
2.8	BBR3464 .....	18
2.8.1	Struktura BBR3464.....	18
2.8.2	Výzkum BBR3464.....	18
2.8.3	Obecné charakteristiky vazby vícejaderných komplexů na DNA .....	19
2.8.4	Meziřetězcové můstky .....	20
2.8.5	Mechanismus vazby na DNA.....	20
2.8.6	Výhody a nevýhody BBR3464.....	21
2.8.7	Průlom teorie .....	21
2.8.8	Pokračování ve výzkumu cytostatika BBR3464 .....	22
2.9	DIENPLATINA.....	22
<b>3</b>	<b>CÍL PRÁCE.....</b>	<b>23</b>
<b>4</b>	<b>MATERIÁLY A METODY .....</b>	<b>24</b>
4.1	CHEMIKÁLIE .....	24
4.2	PŘÍSTROJE.....	25
4.3	METODY .....	25
4.3.1	Měření fluorescence ethidium bromidu .....	25
4.3.2	Viskozimetrie .....	29
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY MĚŘENÍ: .....</b>	<b>33</b>
5.1	MĚŘENÍ FLUORESCENCE .....	33
5.2	VISKOZIMETRIE:.....	35
<b>6</b>	<b>DISKUZE A ZÁVĚR: .....</b>	<b>39</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>41</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM LITERATURY.....</b>	<b>42</b>

# 1 Úvod

Nádorová onemocnění patří mezi nejrizikovější z celosvětového hlediska. Jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí v lidské populaci. Rakovina je všeobecné označení pro více než 100 druhů karcinogenních onemocnění.

Tělo každého jedince se skládá z orgánů, tvořených buňkami, které, pokud to lidský organismu vyžaduje, se dělí a tak vytváří buňky nové. Pro zdravé lidské tělo to představuje normální stav. Jestliže se však buňky dělí i bez potřeby vzniku nových buněk, vytvoří masu tkáně, která je považována za nádor. Jedná se o nekontrolovatelný růst a šíření nádorových (abnormálních) buněk. Někdy se nádorové buňky odtrhnou od původního (primárního) nádoru a rozšiřují se do dalších orgánů v těle a to buď krví, nebo lymfatickým systémem. Když se tyto buňky dostanou na nové místo, mohou se dělit dál a vytvořit nový nádor neboli metastázi.

Platinové komplexy, zejména cisplatina, náleží do skupiny chemických látek, které prokázaly své léčebné účinky při léčbě karcinomů. Při léčbě cytostatiky však dochází nejen k ničení rychle se množících buněk nádorových, ale i k ničení přirozených rychle se množících buněk, jako jsou buňky jaterní tkáně, bílé krvinky, červené krvinky, spermie, vajíčka. Toto ničení zdravých a reprodukčních buněk je jen jeden z příkladů nežádoucích účinků cytostatik. Proto je v současné době vynakládáno velké úsilí při hledání nových protinádorově účinných komplexů kovů, které by vykazovaly lepší vlastnosti než dosud používaná cytostatika, jako jsou cisplatina a její analoga karboplatina a oxaliplatina. Mezi nové komplexy platiny, podrobující se výzkumu účinných protinádorově působících látek, se řadí také trinukleární komplex BBR3464. Farmaceutické společnosti v současné době provádějí výzkum více než 300 potenciálních preparátů, které jsou určeny k léčbě zhoubných nádorů.

Sledování změn ve struktuře a vlastnostech nukleových kyselin po vazbě protinádorově účinných komplexů vedoucích k zastavení růstu nádorů je důležité pro pochopení primární příčiny úspěchu daného léku. Tyto poznatky pak mohou být využity pro navrhování nových typů léčiv, které by mohly účinkovat proti jiným typům nádorů, než stávající používaná cytostatika, nebo snižovat nežádoucí, vedlejší účinky.

Při získávání informací o tom, jak je struktura DNA modifikována po vazbě cisplatiny a dalších platinových komplexů, může být použito řady metod. Tato práce se zbývá viskozimetrií a fluorimetrií a jejich srovnáním z hlediska využití obou metod pro získání informací o charakteru modifikací DNA, vyvolaných protinádorově účinnými sloučeninami platiny.

## 2 Teoretická část

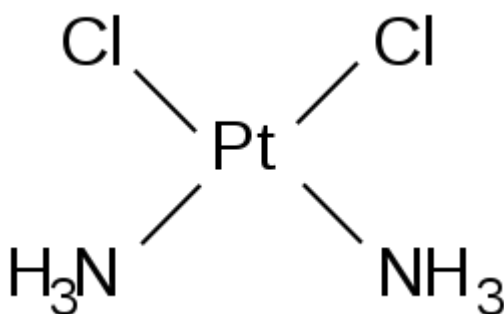
### 2.1 Platinové komplexy dosud využívané v klinické praxi

Platina je prvkem 8. vedlejší skupiny periodického systému. Konfigurace základního stavu platiny je (Xe) 4f<sup>14</sup> 5d<sup>9</sup>6s<sup>1</sup>. Komplexní sloučeniny platiny se ve vodném prostředí vyskytují ve druhém (čtyř vazebném) a čtvrtém (šesti vazebném) oxidačním stupni. Mezi nejvýznamnější platinové komplexy dosud klinicky využívané řadíme cisplatinu. Dále do této skupiny patří karboplatina a oxaliplatina.

#### 2.1.1 Cisplatina

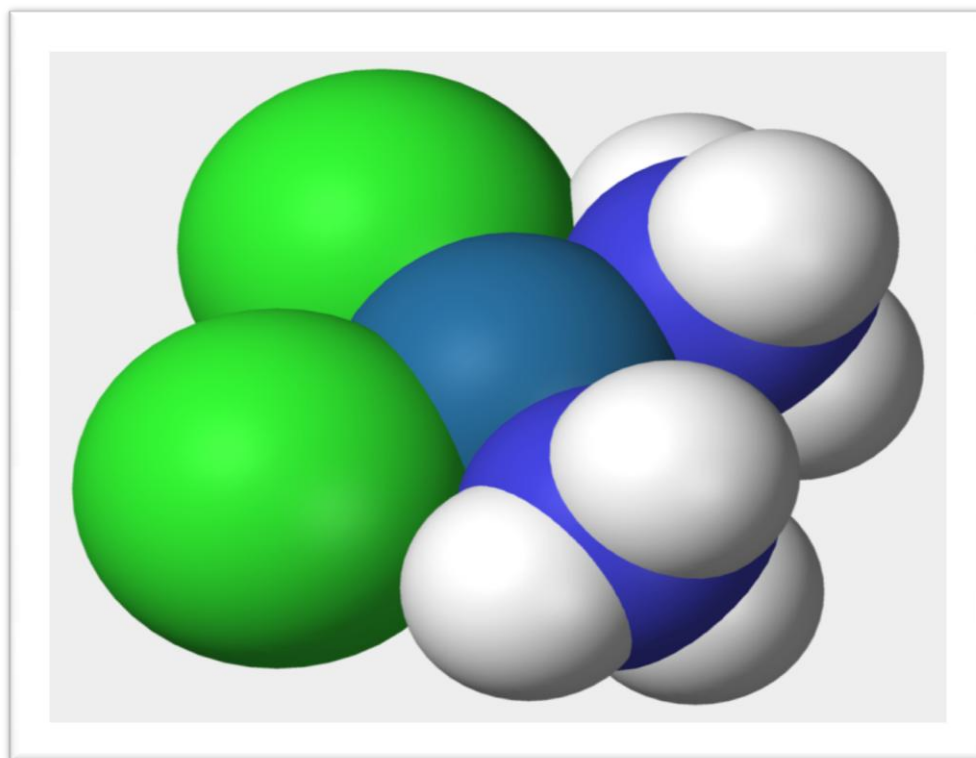
Cisplatina (Obr. 1a, 1b), neboli *cis*-diamminchloroplatnatý komplex patří mezi komplexy přechodných kovů, které jsou často elektrofilní. Kovalentně se váže k DNA a to tak, že s DNA reaguje jeho pozitivně nabitá hydrolyzovaná forma [1].

Chemická struktura je jednoduchá. Je to čistě anorganická molekula složená z 11 atomů, přičemž 6 z nich jsou nejjednodušší atomy vodíku. K centrálnímu atomu platiny v oxidačním stupni II. jsou vázány dvě skupiny NH<sub>3</sub> a dva atomy Cl. A právě chloridové skupiny představují reaktivní místa, což je podstatné pro chemickou reaktivitu cisplatinu [2].



Obr. 1a: Strukturální vzorec protinádorově aktivní cisplatinu.





Obr. 1b: 3D model cisplatiny

### 2.1.2 Cisplatina = významné farmakum při léčbě nádorů

Tato sloučenina byla poprvé syntetizována v r. 1844, ale trvalo více než jedno století, než byla objevena její schopnost potlačovat růst některých lidských zhoubných nádorů. Vedl k tomu náhodný objev prof. Barnett Rosenberga a jeho spolupracovníků v roce 1961. Zaměřili se na zkoumání vlivu elektrického pole na růstu bakterii *E. coli* [2].

Při experimentu použili platinové elektrody ponořené do roztoku s chloridem amonným. Po určitém čase došlo k zastavení buněčného dělení bakterií a k jejich filamentóznímu růstu, čímž se až třistakrát prodloužila jejich délka [3]. Později bylo prokázáno, že příčinou tohoto jevu není elektrické pole, nýbrž tetrachlordiamminplatičitý komplex vzniklý uvolněním malého množství platiny do roztoku elektrolytu. V následujících letech byl účinek cisplatiny testován na širokém spektru nádorů, což vedlo k prvním klinickým testům, při experimentech došlo k zastavení růstu buněk karcinomů a následné redukci. Poté, co cisplatina prošla klinickými zkouškami, bylo zjištěno, že působí i proti některým pokročilým nádorům.

Od roku 1978 byla cisplatina schválena pro klinické využití. V současné době patří cisplatina mezi nejvíce využívaná cytostatika v onkologické léčbě a to zejména při léčbě nádorů varlat, prostaty, vaječníků, močového měchýře, trávicí trubice, malobuněčných nádorů plic a některých typů nádorů hlavy a krku. Mimořádnou úspěšností cisplatinu dokumentuje i to, že od roku 1983 patří mezi nejvíce prodávané cytostatikum v USA [2].

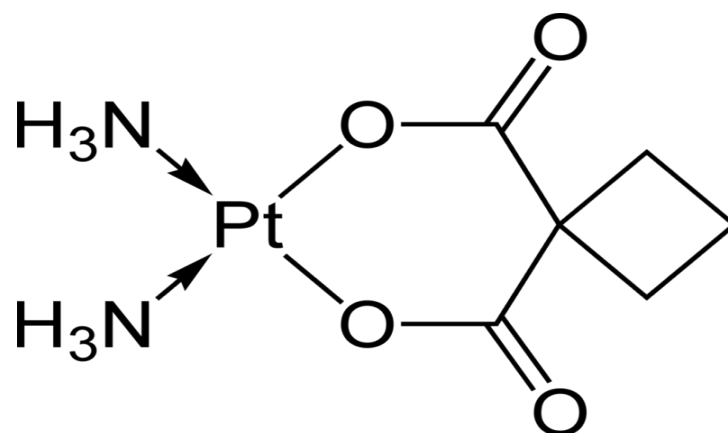
### 2.1.3 Problémy při léčbě cytostatiky

Hlavním problémem při léčbě nádorů cisplatinou je tzv. rezistence, ať už vrozená (inherentní) či získaná. Po opakovaném podávání tohoto farmaka dochází ke snížení citlivosti nádorů vůči cytostatiku. Tuto léčbu doprovázejí i nežádoucí vedlejší účinky jako je bolest hlavy či zvracení. Některé se daří vhodnou modifikací léčebného postupu tlumit, přesto představují určitá omezení. Dalším závažným problémem při aplikaci léčebných prostředků je skutečnost, že platnatý komplex je mutagenní a karcinogenní, přičemž daný rozsah těchto efektů není zcela prozkoumán [2]. Při užívání cytostatik dochází k poškození ledvin, sluchu či krvetvorby.

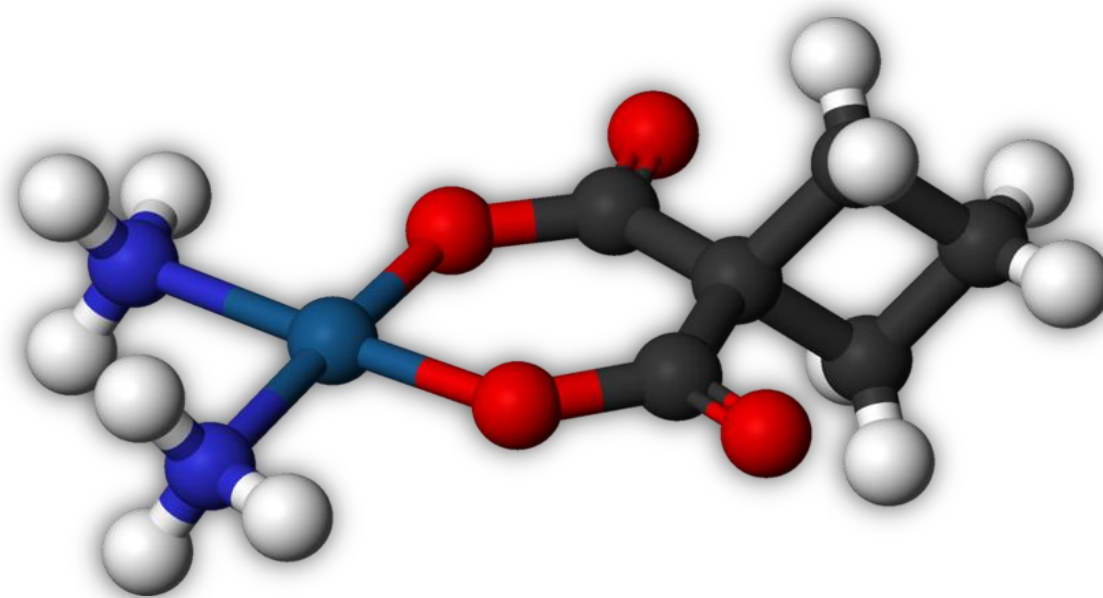
### 2.1.4 Karboplatina

Karboplatina (Obr. 2a, 2b), neboli *cis*-diammin-cyklobutandikarboxylatoplatnatý komplex je další z řady platinových komplexů. Tento komplex je analogem cisplatinu. Je běžně užíván v klinické praxi. Mezi jeho výhody se řadí nízká toxicita. Jelikož karboplatina je méně toxická než cisplatina, může se intravenózně podávat ve vyšších dávkách. Avšak karboplatina je účinná na stejné typy tumorů jako cisplatina [4].

Karboxylátový ligand, jenž je ve vodném prostředí disociován pomaleji než chloridy u cisplatinu, tvoří odstupující skupinu v karboplatině [5]. V buňkách s vyšší koncentrací nukleofilů, jako jsou například thiomočovina a glutation, byla pozorována rostoucí afinita vazby karboplatiny k DNA. Mezi takové buňky patří například buňky karcinomů prsu [6].



Obr. 2a: Strukturní vzorec karboplatiny.

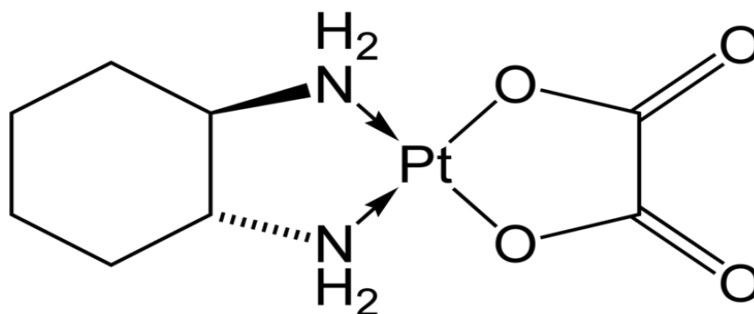


Obr. 2b: 3D model karboplatiny.

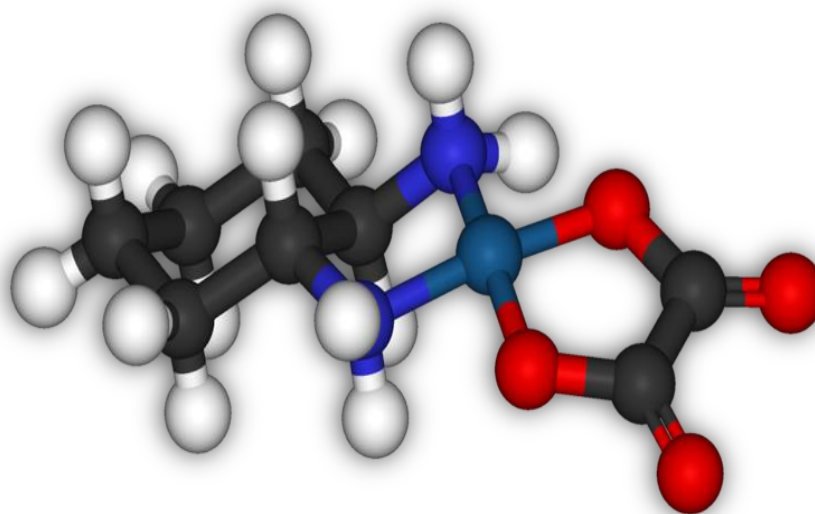
### 2.1.5 Oxaliplatina

Oxaliplatina (Obr. 3a, 3b), neboli 1R,2R-diamincyklohexanoxalátplatnatý komplex je dalším významným platinový komplex a analogem cisplatinu. Někdy se můžeme setkat s názvem Eloxatin, což je obchodní název. Při léčbě karcinomů, které jsou rezistentní pro cisplatinu, se někdy může použít právě oxaliplatiny podávané spolu s 5-fluorouracilem a kyselinou listovou [4].

Tento analog cisplatiny se podává pacientům převážně s metastatickým onemocněním, zejména u karcinomu jater v metastázovém stadiu. Nejzávažnějším nežádoucím účinkem oxaliplatiny je neurotoxicita, která je však reverzibilní [7]. Proces hydrolyzy oxaliplatiny je reaktivně specifický a tedy pomalejší než u cisplatiny. Oxaliplatinové nádory se navazují v DNA na téměř stejné místo jako, když je DNA modifikována cisplatinou. Totéž platí i o jejich spektrech aktivity [8]. Oxaliplatinové nádory vznikají se stejnou kinetikou jako nádor cisplatiny [9].



Obr. 3a: Strukturní vzorec oxaliplatiny.



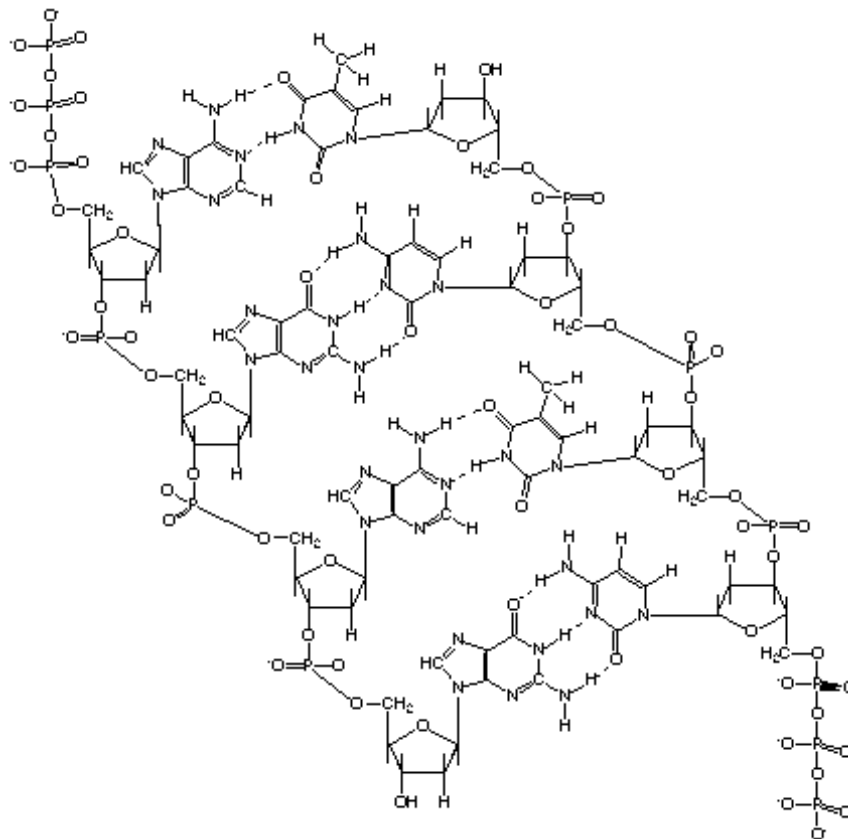
Obr. 3b: 3D model oxaliplatiny.

I přestože přímá analoga cisplatiny vykazují menší vedlejší účinky, nebyl jejich objev významným zlomem v léčbě tumorů, neboť nejsou účinná proti nejčastěji vyskytujícím se nádorům. Cisplatin patří stále mezi nenahraditelná farmaka při léčbě nádorového onemocnění.

## 2.2 DNA

DNA (Obr. 4a, 4b) je tvořena dvěma vlákny stočenými do šroubovice. Molekula DNA se skládá ze dvou polynukleotidových vláken složených ze čtyř typů nukleotidových podjednotek. Obě tato vlákna jsou nazývána řetězce DNA a jsou vzájemně spojena vodíkovými můstky mezi bázemi nukleotidů. DNA obsahuje purinové báze (adenin a guanin) a pyrimidinové báze (cytosin a thymin). Vodíkové vazby se tvoří pouze mezi určitými bázemi podle pravidla komplementarity. Spojují se vždy purinové s 8 pyrimidinovými a to tak, že guanin (G) se páruje s cytosinem (C) a adenin (A) s thyminem (T).

Nukleotidy jsou tvořeny pěti uhlíkovým sacharidem, na nějž jsou vázány dusíkaté báze a jedna nebo i více fosfátových skupin [10].



Obr. 4a: Chemická struktura DNA.



Obr. 4b: 3D model DNA.

### 2.2.1 Proč DNA

Při působení cisplatiny na eukaryotní buňky dochází k inhibici syntézy DNA, RNA i bílkovin [11]. K inhibici inkorporace (včleňování) thymidinu dochází dříve než ke snižování inkorporace uridinu a leucinu. Thymidin, uridin a leucin jsou prekurzory syntézy nukleonových kyselin a proteinů. Thymidin je prekurzor syntézy DNA, uridin je prekurzor syntézy RNA a prekurzorem pro syntézu bílkovin je leucin. (Prekurozorem nazýváme výchozí látku či částici, z nichž chemickou přeměnou vzniká produkt). Dále také k obnovení syntézy RNA a proteinů dochází již po několika hodinách, kdežto syntéza DNA zůstává potlačena.

Důležité je také srovnání počtu molekul cisplatiny vázaných na jednu molekulu v buňce po aplikaci dávky cytostatika, která vyvolala v průměru jednu lézi na buňku. Rozsah vázání molekul platnatého komplexu na DNA, RNA a bílkoviny je značně rozdílný, zatímco na jednu molekulu DNA se váže v průměru 22 molekul platnatého komplexu, tak na jednu

molekulu RNA je tento rozsah 170 až 33 000 krát menší a na jednu molekulu proteinu je daný rozsah menší 33 000krát [12]. Z těchto údajů zřetelně vyplývá, že hlavním cílovým místem farmakologického působení cisplatiny je DNA, nikoli RNA či bílkoviny.

## **2.3 DNA a cisplatina**

Po proniknutí molekul cisplatiny do jádra nádorové buňky dojde k výměně reaktivních chloridových skupin za molekuly vody (Obr. 5). Dříve elektroneutrální komplex cisplatiny se stane kationtem, který reaguje s DNA.

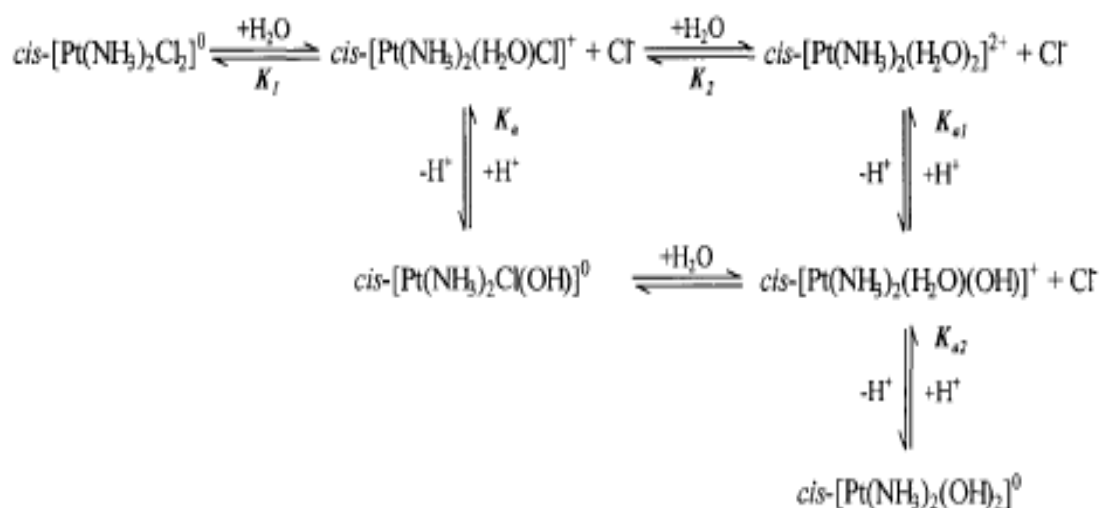
### **2.3.1 Mechanismus vazby cisplatiny na DNA**

Cisplatina má v hydrolyzované formě kladný náboj a dochází tedy k elektrostatickému přitahování mezi tímto komponentem a DNA. Cisplatina je v této reakci jako elektrofilní činidlo. V první fázi reakce se cisplatina přiblíží tak, aby, mohla reagovat s nukleofilními místy na DNA. Vazebná místa na DNA můžeme seřadit podle reaktivity s platnatými komplexy a to následovně:

**guaninN7 >> adenin N7 > cytosinN3 > adenin N1.**

Atomy dusíku v poloze N7 guaninu a adeninu jsou orientovány do prostoru velkého žlábků a jsou tedy snadno přístupné pro vytvoření vazby s komplexem, na rozdíl od dusíku v N3 cytosinu a N1 adeninu.

Cisplatina se váže na báze DNA koordinačně kovalentní vazbou a vytváří různé kovalentní můstky. Schopnost cisplatiny usmrčovovat rakovinné buňky je úzce spojena právě s tvorbou těchto kovalentních můstků.



Obr. 5: Rovnice hydrolyzy a deprotonace cisplatiny ve vodném prostředí.

### 2.3.2 Adukty vytvořené v DNA

Adukty vzniklé interakcí cisplatiny na DNA značně ovlivní sekundární strukturu nukleové kyseliny, dochází tedy ke konformačním změnám na DNA.

V DNA vytváří cisplatinu především následující typy můstků (Obr. 6) :

#### a) Vnitrořetězcový můstek 1,2 – GG a 1,2 AG

Právě 1,2 – vnitrořetězcový crosslink je jeden z nejčastějších a pravděpodobně nejdůležitějších typů aduktů. Při jeho vzniku dochází k lokálnímu odvinutí helixu DNA o 9 – 11° a také dojde k ohybu osy helixu o  $\approx 60^\circ$  směrem k velkému žlábků (Obr. 7). Značný vliv mají tyto můstky i na malý žlábek. Malý žlábek se stává daleko mělčím. Báze na deformované straně DNA jsou vrtulově zakroucené, i přes toto zakroucení jsou zachovány jejich vodíkové vazby. Atomy platiny jsou vytlačovány z prostoru guaninových oblastí a tím se vytváří sterické pnutí [14,15].



## **b) Vnitrořetězcový můstek 1,3 – GXG**

Cisplatina vytváří na DNA také 1,3 – vnitrořetězcový d(GpNpG) adukt (Obr. 8). V tomto případě se osa helixu ohýbá o  $\approx 30^\circ$  k velkému žlábků a lokální dovinutí DNA je o  $19^\circ$ .

## **c) Meziřetězcový můstek**

Tento můstek se tvoří převážně na protilehlých guaninových zbytcích sekvenci 5'-GC-3'. Ty se pak již nepárují s komplementárními cytosiny, avšak jsou ze sterických důvodů zcela vytlačeny mimo helix do vnějšího prostředí. Dané vytlačení přispívá k určitým nepravidlostem na DNA. Vzniklé deformace ovlivňují minimálně 4 okolní páry bází. Cisplatina v tomto případě také způsobuje vznik můstků na bázích v malém žlábků, což vede ke změně pravotočivé šroubovice na levotočivou [14]. Meziřetězcový můstek vede k ohybu osy helixu o  $20 - 40^\circ$  směrem k malému žlábků a odvinutí helixu o  $76 - 80^\circ$  (Obr. 9).

V menší míře dochází ke vzniku monofunkčních aduktů cisplatin s DNA. I zde se cisplatina přednostně váže na guanin a způsobuje deformaci šroubovice DNA. Velikost této deformace závisí na sekvenci v okolí monofunkčně navázané cisplatin.

Zastoupení jednotlivých typů můstků, vytvořených cisplatinou v DNA je následující:

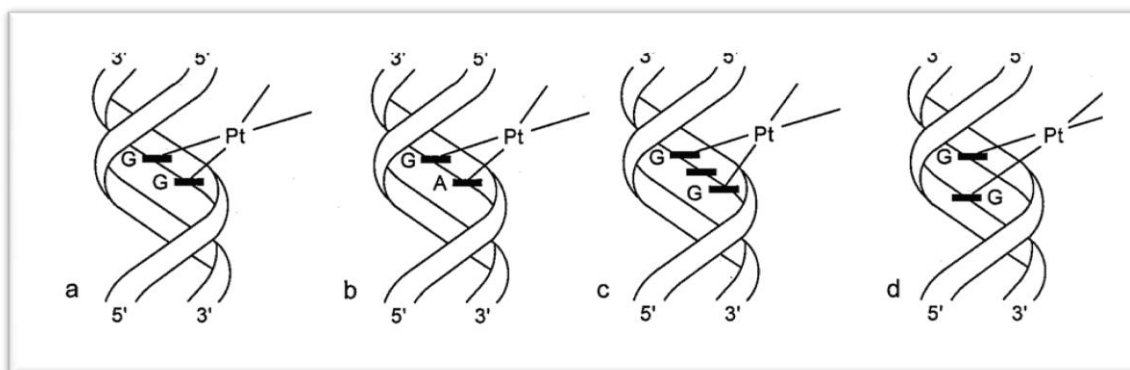
a) Vnitrořetězcové můstky:

- ▶ 1,2 - vnitrořetězcové: d(GG) - 50% (Obr. 7)  
d(AG) - 23-28%
- ▶ 1,3 – vnitrořetěztcové: 8-10 % (Obr. 8)

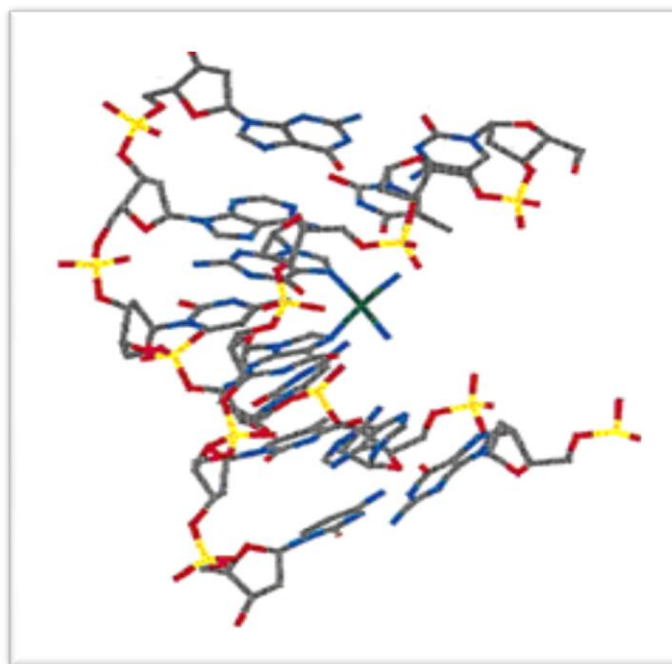
b) Meziřetězcové můstky : 5-6% (Obr. 9)

c) Monofunkční adukty: 1-2%

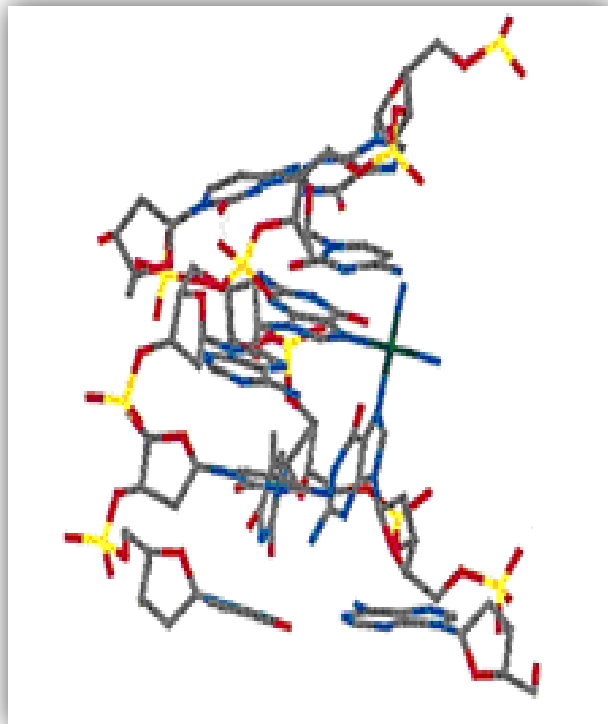
Za významné z hlediska protinádorové aktivity jsou považovány bifunkční adukty. Platnaté komplexy tvoří zřejmě i adukty mezi DNA a proteiny [17].



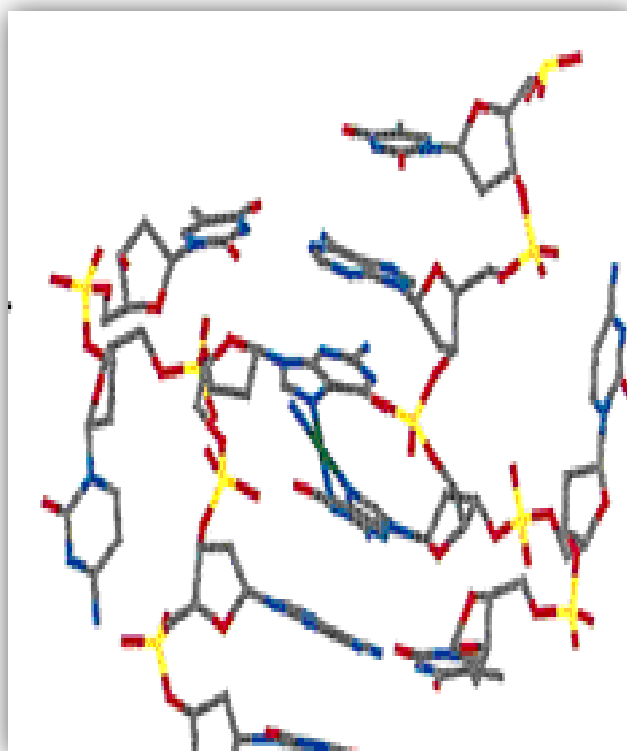
Obr. 6: Grafické znázornění aduktů cisplatiny – a) 1,2-GG-IAC, b) 1,2-AG-IAC, c) 1,3-GG-IAC, d) 1,2-GG-IEC.



Obr. 7: 1,2 – vnitrořetězcový můstek



Obr. 8: 1,3 – vnitřetězcový můstek.



Obr. 9: Meziřetězcový můstek.

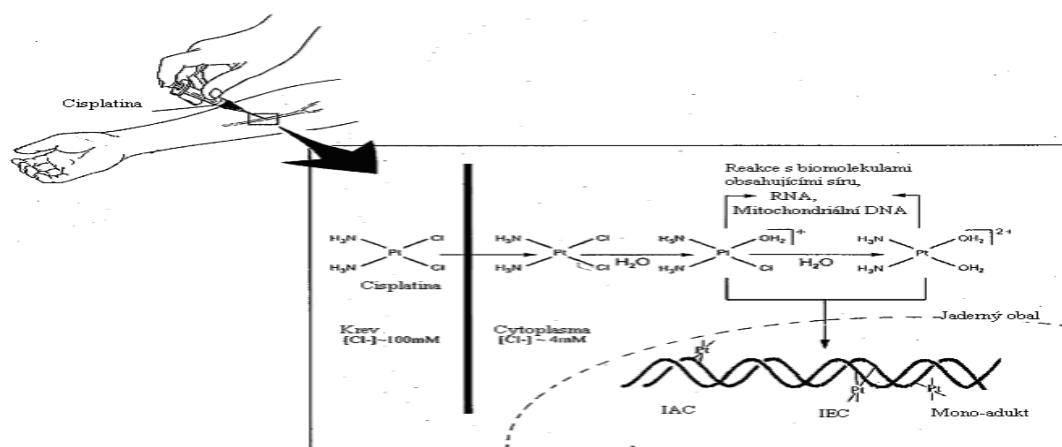
Struktura jednotlivých typů můstků byla zkoumána 2D NMR analýzou, rentgenovou kryptografií a hmotnostní spektroskopií [14, 15, 16]. Ve všech případech se cisplatina váže na N7 purinové báze.

Vazba cisplatiny na DNA způsobuje změnu její konformace v okolí vazby. Rozsah a typ distorze závisí na typu aduktu (obr. 5) [18].

## 2.4 Aplikace cisplatiny

Cisplatina je běžně podávána intravenózně (Obr. 10). V krevní plazmě je relativně vysoká koncentrace chloridových iontů (cca 100 mM), při níž (a při pH 7,4) se téměř 93% cisplatiny nachází v dichloro- nebo chloro-hydroxo formě. Ačkoliv doposud není znám přesný mechanismus přenosu cisplatiny do buněk, předpokládá se, že cisplatina proniká přes plasmatickou membránu do buňky jak pasivní difúzí, tak i aktivním transportem, např. membránový přenašeč pro ionty mědi označovaný jako CTR1 [19].

V cytoplazmatickém prostoru uvnitř buňky při stejném pH je koncentrace chloridových iontů výrazně nižší (pouze asi 4 mM) a cisplatina je v takovémto prostředí hydrolyzována asi z 33 % [19]. Z toho vyplývá, že cisplatina zůstává v krevním řečišti v nehydrolyzovaném nereaktivním stavu, který jí umožňuje pronikat pasivním transportem přes plasmatickou membránu do buňky, kde dochází k hydrolyze a cisplatina se stává kladně nabitou reaktivní molekulou.



Obr. 10: Schematický proces vstupu cisplatiny do buňky po intravenózní apl. spolu se schématem reakce cisplatiny s DNA.

## 2.5 Poškození DNA po modifikaci cisplatinou

Poškození DNA po vazbě cisplatinou má nepochybně vliv na její funkci. Zásah do procesů replikace a transkripce může mít pro buňku vážné následky [8].

Bylo prokázáno, že cisplatina zastavuje replikaci DNA *in vitro*. Váže se na sekvence  $d(G)_n$  ( $n > 1$ ) a blokuje DNA polymerázu [20]. Experimenty zabývající se posouzením vztahu mezi inhibicí replikace, cytotoxicitou a buněčným cyklem iniciovaly vznik hypotézy, že podstatou protinádorových účinků cisplatinou může být inhibice transkripce [21]. Bylo také zjištěno, že buňky vystavené působení cisplatinou prošly S fází, ve které probíhá replikace DNA, ale byly zablokovány v  $G_2$  fázi. Ukazuje se, že tato schopnost cisplatinou je různá u různých buněčných linií. U buněk s deficitním opravným systémem dochází k zablokování buněčného cyklu již při malých koncentracích cisplatinou [22].

Experimenty demonstrující schopnost cisplatinou blokovat buňky v  $G_2$  fázi vedly k závěru, že cisplatina inhibuje transkripci a poskytly také první informace o mechanismu buněčné smrti. Degradace DNA poskytla první vodítka a následující výzkum jednoznačně potvrdil, že cisplatina je schopna vyvolat v buňkách signál ke spuštění programované smrti buňky – apoptózy [23].

## 2.6 Proteiny zabraňující opravě DNA a nukleotidová excisní oprava (NER)

Důležitou vlastností můstků je schopnost zastavovat se v místech jejich vzniku replikaci DNA. Replikace DNA je klíčový proces pro dělení buňky. Při replikaci dochází k dělení buněk, kdy každá dceřiná buňka dostane plnohodnotnou genetickou informaci. Během tohoto procesu jsou před rozdělením buňky syntetizovány nové molekuly DNA.

Pokud tedy dochází k značným změnám v DNA způsobených tvorbou můstků, buňka na ně bude reagovat. Po poškození DNA cisplatinou je okamžitě aktivován proces vedoucí k jeho opravě. Mezi nejčastější opravu patří tzv. excisní nukleotidová oprava, při níž je poškozené místo vystřiženo a nahrazeno novým nepoškozeným fragmentem deoxyribonukleové kyseliny. Tato oprava je jeden z nejdůležitějších obranných mechanismů [24].

Defekt při procesu nukleotidové excisní opravy způsobuje u člověka závažnou, geneticky podmíněnou chorobu – xerodermapigmentosum (XP) [25]. Tito nemocní lidé jsou velmi citliví k UV záření, protože v organismu zdravého člověka jsou následky vzniklé působením UV zářením odstraňovány právě pomocí NER a může docházet až ke karcinomu kůže. Mechanismus NER byl nejlépe pozorován u prokaryot a to u *E.coli* jako u modelového organismu. Tento mechanismus u člověka není ještě tak dobře pochopen jako u bakterií [26].

Ve všech organismech však NER zahrnuje následující kroky:

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

## **2.7 Vliv cisplatiny na replikaci a transkripci DNA, apoptóza**

Inhibice syntézy DNA vlivem cisplatiny byla objevena velmi záhy a podpořila teorii o významu DNA v mechanismu protinádorového působení cisplatiny. Jedny z prvních experimentů potvrdily, že cisplatina zastavuje replikaci DNA *in vitro*. Tato schopnost byla však prokázána i u protinádorově neúčinné transplatiny. To znamená, že schopnost cisplatiny blokovat DNA polymerázu nemůže zcela vysvětlit její protinádorovou aktivitu [27].

Experimenty, zabývající se posouzením vztahu mezi inhibicí replikace, cytotoxicitou a buněčným cyklem umožnily formulovat hypotézu, podle které může být podstatou protinádorového účinku cisplatiny také inhibice transkripce [28].

Buňky vystavené působení cisplatiny prošly S fází, ve které probíhá syntéza DNA a zastavily se v G2 fázi. Při nižší koncentraci cisplatiny bylo zablokování v G2 fázi pouze dočasné díky buněčným reparačním systémům, při vyšší koncentraci buňky setrvaly v G2 fázi až do

spuštění apoptózy. Tyto výsledky jsou v souladu s hypotézou, že buňky setrvávají v G2 fázi v důsledku blokování transkripce genů nezbytných k proběhnutí mitózy.

Tyto výsledky a následující experimenty potvrdily, že cisplatina je schopna vyvolat v buňkách signál ke spuštění programované smrti buňky - apoptózy [29]. Apoptóza patří k přirozeným biologickým procesům a probíhá například již během embryonálního vývoje, při metamorfóze nebo při rakovinném zvrhnutí buněk. Vyznačuje se zmenšením objemu buněk, postupnou degradací buněčné membrány, kondenzací chromatinu spojenou s aktivací endogenních endonukleáz, rozpoznáním postižených buněk fagocyty a závislostí celého procesu na syntéze proteinů. Stejně projevy byly pozorovány i u buněk vystavených působení cisplatině [30].

## 2.8 BBR3464

Cílem nového bádání a studií bylo nalezení nových protinádorově účinných komplexů, které budou mít daleko širší spektrum protinádorové aktivity. Dalším požadavkem na tyto nové komplexy bylo, aby byly aktivní v tumorových buňkách, rezistentních vůči cisplatině.

Mezi tyto komplexy, které, jak se zpočátku zdálo, splňují dané podmínky, patří trojjaderný komplex BBR3464. První popis trojjaderných komplexů se datuje od roku 1993 [31].

### 2.8.1 Struktura BBR3464

BBR3464 neboli  $[\{trans\text{-PtCl}(\text{NH}_3)_2\}_2\mu\text{-}trans\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2\{\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2\}_2]^{4+}$  je komplex, který je tvořen dvěma  $trans\text{-}[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2]$  jednotkami spojenými tetraaminovou jednotkou  $trans\text{-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\{\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2\}_2]$ , která se nepodílí přímo na vazbě DNA, ale zvyšuje afinitu k DNA elektrostatickou interakcí a tvorbou vodíkových můstků [32].

### 2.8.2 Výzkum BBR3464

Tento komplex byl vyvinut ve spolupráci s partnerským pracovištěm ve Virginia Commonwealth University v Richmondu [3]. Na základě předklinických testů a to pomocí metod molekulární biofyziky a biologie byl vybrán pro klinické zkoušky. Počáteční studie prokázaly, že tento trojjaderný komplex se váže k DNA způsobem zásadně odlišným od

cisplatiny. Do 2. Fáze klinických testů vstoupil komplex BBR3464 v roce 2000. Druhá fáze klinických testů se týká převážně nádorů vaječníků a plic [33].

S vývojem trojjaderných komplexů a studiem protinádorové účinnosti BBR3464 probíhal paralelně i výzkum dvoujaderných komplexů platiny. Mezi takové komplexy patří např. BBR3537 a BBR3571.

Doposud se účinnost komplexu BBR3464 zkoušela na nádorech s mutantním p53 genem, mezi něž patří nádory vaječníků, plic, tlustého střeva a slinivky břišní [34].

Nabízí se otázka, proč má BBR3464 tak výjimečnou protinádorovou aktivitu v buňkách s mutantním genem p53? Objasnění tohoto dotazu můžeme najít v struktuře aduktů tvořenými těmito komplexy a v celkovém profilu jeho vazby na DNA. Potřebné informace o charakteru vazby vícejaderných komplexů na DNA byly získány z experimentů na globálně modifikované DNA z telecího thymu a plasmidové DNA s použitím atomové absorpční spektrometrie, diferenční pulsní polarografie, stanovení elektroforézy za denaturačních podmínek a mapování aduktů pomocí transkripčního mapování [35,36].

### **2.8.3 Obecné charakteristiky vazby vícejaderných komplexů na DNA**

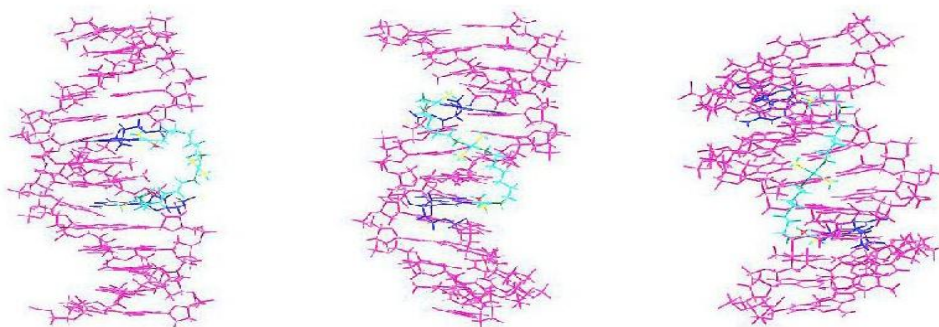
Pro reakci BBR3464 s DNA jsou charakteristické:

- a) Rychlá vazba na DNA, kterou umožňuje vysoký kladný náboj komplexu BBR3464. Proto kinetika vazby je zhruba 5x rychlejší než u cisplatiny [35].
- b) Tvorba většího množství meziřetězcových můstků ve srovnání s cisPt.
- c) Rozvíjení nadšroubovicové plastidové DNA, což je typické pro bifunkční dukty.
- d) Sekvenční specifita odlišná od cisplatiny.



## 2.8.4 Meziřetězcové můstky

Při stanovení četnosti vzniku můstků se ukázalo, že BBR3464 tvoří menší množství meziřetězcových duktů (20%), než některé jiné polynukleární komplexy (až 90%), ale nepoměrně více, než cisplatina (6%) [37]. Za sníženou schopnost komplexu BBR3464 tvořit meziřetězcové můstky (Obr. 11), ve srovnání s jinými polynukleárními komplexy, může být zodpovědný náboj centrální platinové jednotky, či velká vzdálenost mezi odstupujícími skupinami.



Obr. 11: Modely hlavních meziřetězcových a vnitřetězcových aduktů komplexu BBR3464. Vlevo 1,4-meziřetězcový můstek, uprostřed 1,5-vnitřetězcový můstek, vpravo 1,6-meziřetězcový můstek [38].

## 2.8.5 Mechanismus vazby na DNA

Mechanismus vazby komplexu BBR 3464 k DNA spočívá v počáteční elektrostatické interakci s DNA, kdy spojovací řetězec obsahující centrální Pt jednotku se naváže do malého žlábků. Pak dochází k tvorbě monofunkčního a biofunkčního aduktu, kdy centrální tetraaminová jednotka se nachází v malém žlábků nebo alespoň v jeho blízkosti. Koncové platinové jednotky se váží na N7 atomy ve velkém žlábků[35]. Tento mechanismus je obdobný i dvoujaderných komplexů.

Po interakci DNA s komplexem, se musí komplex buď částečně anebo zcela přesunout z malého žlábků do velkého žlábků. Tento přesun umožní vytvoření monofunkčního aduktu na N7 guaninu [43]. Monofunkční vazba platinového komplexu způsobuje částečné narušení párování bází u modifikovaného guaninu a u prvního páru bází na 5' straně aduktu. Platinová koordinační skupina ( $PtN_3$  rovina) není omezena monofunkční vazbou a svírá úhel  $40^\circ$  s rovinou modifikovaného guaninu[44]. Vodíkové můstky se tvoří mezi vodíky  $NH_3$  skupiny

a kyslíkem O6guaninu a taktéž s kyslíkem fosfátové kostry. Nenavázaná platinová skupina interaguje s fosfátovou kostrou duplexu elektrostatickou interakcí a také prostřednictvím vodíkových můstků, které vznikají mezi vodíky primárních aminů a kyslíky fosfátové kostry [45].

Pomocí NMR spektroskopie bylo prokázáno, že tvorbě bifunkčního duktu předchází hydrolyza druhého chloridového ligandu (rychlostní konstanta  $3.62 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ), také bylo zjištěno, že tvorba bifunkčního aduktu je 10-55 krát rychlejší (rychlostní konstanta  $2.7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ) než uzavření monofunkčního aduktu vzniklého z diaqua formy cisplatiny [46]. Avšak mechanismus tvorby bifunkčního aduktu z monofunkčního aduktu je v obou případech výrazně odlišný. U cisplatiny uzavření bifunkčního aduktu vyžaduje rotaci kolem již existující Pt-G(N7) vazby zatímco u aduktů dvojjaderných komplexů dochází k pohybu nenavázané platinové skupiny a její vazbě na dusík N7 guaninu komplementárního řetězce [45].

K výrazně rychlejší fixaci bifunkčního aduktu přispívá elektrostatická interakce nenavázané platiny. Po tvorbě bifunkčního aduktu je konformace DNA zafixována s tím, že celý komplex se nachází buď ve velkém žlábků, nebo jsou pouze koncové platinové skupiny ve velkém žlábků a spojovací řetězec je v malém žlábků.

### **2.8.6 Výhody a nevýhody BBR3464**

Obrovskou výhodou má toto cytostatikum ve své aplikaci, jelikož jej lze podávat bez prehydratce, protože není nefrotoxický. Nebyly pozorovány ani vedlejší účinky, s kterými se setkáváme u cisplatiny. Dávky podávané v klinických testech byly dokonce 20krát nižší než dávky cisplatiny, protože tento komplex je mnohem více cytotoxický.

Mezi jeho nevýhody ovšem patří to, že je i vysoce toxický ve smyslu obecné toxicity. Jeho maximální dávka je 10krát nižší než cisplatiny. U pacientů byly pozorovány nežádoucí vedlejší účinky, jako je neutropenie (porucha krvetvorby) a alergická reakce [46].

### **2.8.7 Průlom teorie**

Nová analoga BBR3464 mají amoniak či aminové skupiny namísto chloridových ligandů. Vážou se na DNA pouze nekovalentně a znamenají průlom v teorii, ve které se přepokládalo,

že pouze kovalentní interakce jsou nutné pro cytotoxicitu komplexu. Výhodou nekovalentní vazby těchto komplexů na DNA může být to, že se projeví mnohem rychleji po vstupu komplexu do buňky než kovalentní vazba s mnohem pomalejší kinetikou [47].

### **2.8.8 Pokračování ve výzkumu cystostatika BBR3464**

Poté, co se ukázalo, že hlavní překážka ve využití protinádorové aktivity dvoujaderných i trojjaderných komplexů bude vazba těchto komplexů na sérové proteiny a degradace těmito proteiny, se výzkum ubírá následujícími směry:

a) použití nosičových molekul

b) vývoj analog komplexu BBR3464, které mají místo chloridů aminové skupiny či amoniak

c) použití prekurzoru komplexu BBR3571, ze kterého se řízenou hydrolyzou uvolní vlastní komplex [48, 49].

I přes veškeré nevýhody a veškeré problémy zjištěné během výzkumu je BBR3464 prozatím jedním z nejúčinnějších komplexů, které lze použít jako farmakum v léčbě širokého spektra nádorů. Zvažuje se i využití pro léčbu nádorů mozku ( neuroblastom, astrocytom) [44]. Pokud se prokáží léčebné účinky v této oblasti, znamenalo by to velký posun u léčby těchto závažných a náročně operovatelných nádorů.

## **2.9 Dienplatina**

Dienplatina (dienPt) neboli chlorid dithylen-triamin-chloro-platnatý. Tento komplex nevykazuje protinádorovou aktivitu. Používá se např. jako modelová sloučenina pro studium monofunkční vazby cisplatiny k DNA, neboť ta se váže na DNA ve dvou krocích: první monofunkční vazba, která vede ke vzniku monofunkčních aduktů na DNA, která se teprve ve druhém kroku uzavírá v bifunkční adukty – můstky.

### 3 Cíl práce

Metoda, při níž se využívá stanovení fluorescence ethidium bromidu interkalovaného do dvoušroubovice DNA ke stanovení strukturních vlastností molekul DNA, poškozených protinádorově účinnými komplexy těžkých kovů, se využívá ve výzkumu již dlouhou dobu. Byla uveřejněna celá řada prací, kde byla tato metoda využita k charakterizaci typu poškození, které studované komplexy platiny na DNA vyvolávají[21,35,36]. Bylo prokázáno, že metoda umožňuje stanovit, zda se daný komplex váže k DNA pouze monofunkčně nebo zda vytváří bifunkční můstky. V druhém případě tato metoda také umožňuje rozlišit, zda jsou vytvářeny krátké můstky mezi sousedními bázemi či zda se tvoří můstky dlouhého dosahu.

Interkalace ethidium bromidu do DNA se neprojevuje jen zvýšenou fluorescencí molekul ethidium bromidu, ale také zvýšením viskozity DNA. Proto nás zajímalo, zda lze měření viskozity DNA po interkalaci bromidu ethidii využít ke stejnému účelu jako měření fluorescence, tj. k charakterizaci typů aduktů vytvořených na DNA komplexy platiny. Tento postup dosud nebyl v literatuře popsán.

Cílem této práce bylo tedy stanovit typ můstků, vytvořených v DNA různými komplexy platiny pomocí obou uvedených metod, výsledky porovnat a tak ověřit, zda je metoda měření viskozity DNA vhodná k danému účelu a může být vhodnou alternativou pro fluorescenční měření.

Jako modelové sloučeniny byly vybrány dienplatina, která tvoří na DNA pouze monofunkční adukty, cisplatina, která tvoří převážně můstky mezi sousedními bázemi a komplex BBR3464, který vytváří v DNA můstky dlouhého dosahu (můstky mezi bázemi ležícími od sebe ve vzdálenosti 2-6 bází).

## 4 Materiály a metody

### 4.1 Chemikálie

#### Destilovaná H<sub>2</sub>O

**NaClO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O** byl zakoupen u firmy Sigma Aldrich. Čistota je 98%. Molekulová hmotnost  $M = 140,46$ . Byl používán k přípravě 10 mM roztoku pro inkubaci DNA s komplexy platiny.

**DNA z telecího thymu** (thDNA; 42% G+C) o koncentraci  $c = 667,8 \mu\text{g/mol}$  byla připravena a charakterizována na Biofyzikálním ústavu AVČR v Brně podle protokolů publikovaných dříve [50, 51]. Průměrná molekulová hmotnost je 20 000 kDa.

**BBR3464** byl poskytnut pro tuto studii prof. N. Farellem z Department of Chemistry, Virginia Commonwealth University, Richmond, USA.

**DientPt** byla poskytnuta pro tuto studii prof. G. Natilem z Department of Pharmaceutical Chemistry, University of Bari, Bari, Itálie.

**Cisplatina** byla od firmy Sigma Aldrich.

**Ethidium bromid** (EtBr) byl zakoupen u firmy Boehringer Mannheim. Jeho molekulová hmotnost je 394,3 a koncentrace dodaného zásobního roztoku byla 10 mg/ml.

**NaCl** byl od společnosti Sigma Aldrich. Čistota je 98 %,  $M = 58,44$ . NaCl byl použit jako 4M zásobní roztok.

## 4.2 Přístroje

Bio Vortex V1 – Biosan

Centrifuga Hemle Z 100M

Termoblok – MajorScience

Spektrofluorimetr Hitachi F4500

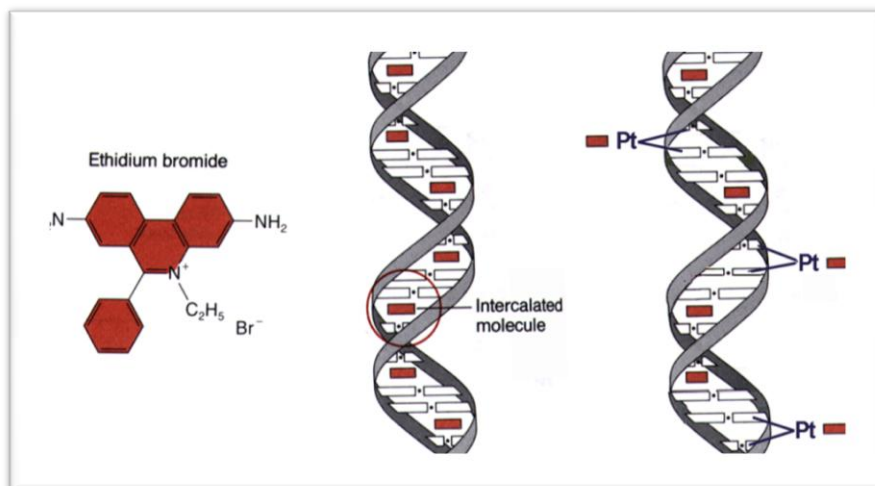
Mikroviskozimetr AMVn, - Anton PaarGmbH

## 4.3 Metody

### 4.3.1 Měření fluorescence ethidium bromidu

Měření poklesu fluorescence ethidium bromidu patří mezi metody často využívané v rámci studií struktury interakcí DNA s komplexy platiny. Fluorescence je spektrochemická analytická metoda, kdy molekulární absorpce fotonů světla určité vlnové délky vyvolává emisi fotonů o vyšší (tj. energeticky méně bohaté) vlnové délce. Emisní spektrum poskytuje informace jak pro kvalitativní a kvantitativní analýzu.

V tomto případě se měří intenzita fluorescence ethidium bromidu, interkalovaného do DNA. Ethidium bromid je molekula, jejíž fluorescence ve volném stavu v roztoku je velmi nízká, pokud však dojde k interkalaci (vmezežení) mezi báze DNA, fluorescence ethidium bromidu se markantně zvýší. Pokud však v DNA jsou přítomny bifunkční můstky, tyto můstky mohou ze sterických důvodů zabránit interkalaci ethidium bromidu mezi báze zahrnuté v tomto můstku a tím dojde ke snížení fluorescence. Princip metody je znázorněn na obrázku (Obr. 12).



Obrázek 12. Schematické znázornění principu využití ethidium bromidu jako sondy pro stanovení můstků v DNA.

Vlastní měření probíhalo na spektrofluorimetru F4500 (Hitachi, Japan). Exitační světlo o vlnové délce  $\lambda_{\text{ex}} = 546 \text{ nm}$  bylo poskytováno xenonovou lampou. Emitační fluorescence byla měřena při 590 nm. Příprava vzorků pro tuto metodu probíhala následujícím způsobem. Byl smíchán definovaný objem (viz tabulky 1, 2 a 3) tDNAz telecího thymu (zásobní roztok o koncentraci  $c = 668 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  v 10mM  $\text{NaClO}_4$ ). Poté byl přidán předem vypočtený objem zásobního roztoku komplexu platiny a vzorek doplněn 10mM roztokem  $\text{NaClO}_4$  tak, aby celkový objem vzorku byl 300  $\mu\text{l}$ . Množství 10 mM  $\text{NaClO}_4$  a cisplatiny, resp. BBR3464 nebo dienPt se liší pro každou hodnotu  $r_b$  ( $r_b$  je tzv. stupeň modifikace, tj. počet molekul komplexu vázaných na jeden nukleotid). Hodnoty  $r_b$  jsou v rozsahu od 0 až 0,1. Přesná množství roztoků použitých při přípravě vzorků jsou uvedeny v tabulkách 1, 2 a 3.

Poté takto připravené vzorky vortexujeme a centrifugujeme. Následuje inkubace, která probíhá ve tmě při teplotě 37°C po dobu 24 hodin.

**Tab. 1:** Množství jednotlivých roztoků pro přípravu th DNA modifikované cisplatinou na různá  $r_b$ . A – 2 mM th DNA v 10mM NaClO<sub>4</sub>, B-10 mMNaClO<sub>4</sub>, C - 5. 10<sup>-4</sup> M cisPt v 10mM NaClO<sub>4</sub>,  $r_b$  - počet atomů platiny vázaných na jeden nukleotid.

$r_b$	A [ $\mu$ l]	B[ $\mu$ l]	C[ $\mu$ l]
0	18	282	0
0,01	18	274,5	7,5
0,02	18	267	15
0,04	18	252	30
0,06	18	237	45
0,08	18	222	60
0,1	18	207	75



**Tab. 2:** Množství jednotlivých roztoků pro přípravu th DNA modifikované dienplatinoua různá  $r_b$ . A – 2 mM th DNA v 10mM NaClO<sub>4</sub>, B-10 mMNaClO<sub>4</sub>, C - 5. 10<sup>-4</sup> M dienPtCl v 10mM NaClO<sub>4</sub>,  $r_b$  - počet atomů platiny vázáných na jeden nukleotid.

$r_b$	A [ $\mu$ l]	B [ $\mu$ l]	C [ $\mu$ l]
0	18	282	0
0,01	18	274,5	7,5
0,02	18	267	15
0,04	18	252	30
0,06	18	237	45
0,08	18	222	60
0,1	18	207	75

**Tab. 3:** Množství jednotlivých roztoků pro přípravu th DNA modifikované komplexem BBR3464 na různá  $r_b$ . A – 2 mM th DNA v 10mM NaClO<sub>4</sub>, B-10 mMNaClO<sub>4</sub>, C - 5.10<sup>-4</sup> M BBR3464 v 10mM NaClO<sub>4</sub>  $r_b$  - počet molekulBBR3464 vázáných na jeden nukleotid.

$r_b$	A [ $\mu$ l]	B [ $\mu$ l]	C [ $\mu$ l]
0	18	282	0
0,01	18	274,5	7,5
0,02	18	267	15
0,04	18	252	30
0,06	18	237	45
0,08	18	222	60
0,1	18	207	75

Po uběhnutí doby inkubace přidáme do každého vzorku 8,7 ml H<sub>2</sub>O + 1,3ml 4M NaClO<sub>4</sub> + 52 μl EtBr o koncentraci 10mg/ml. Samozřejmostí je také příprava a použití blanku. Blank je složen z 300μl 10mM NaClO<sub>4</sub> + 1ml 8,7 ml H<sub>2</sub>O + 1,3ml 4M NaClO<sub>4</sub> + 52 μl EtBr .

Následuje měření intenzity fluorescence při výše uvedených podmínkách měření. Z naměřených hodnot byla vypočítána relativní fluorescence.

$$I_{rel} = \frac{I - I_{blank}}{I_0 - I_{blank}} * 100$$

kde  $I$  = intenzita fluorescence vzorku modifikované DNA,  $I_{blank}$  = intenzita fluorescence blanku, tj. vzorku bez DNA a  $I_0$  = intenzita fluorescence vzorku obsahující nemodifikovanou DNA. Hodnota  $I_{rel}$  se vyjadřuje v procentech.

#### 4.3.2 Viskozimetrie

Viskozimetrie patří k metodám, které umožňují sledovat změny ve fyzikálních vlastnostech DNA vyvolaných chemickými a fyzikálními agens včetně komplexů platiny.

Při této metodě se vzorky připravovali stejně jako při přípravě vzorků pro měření fluorescence. Nejprve jsem pipetou nabrala dané množství 2,18 mM thDNA, které je pro každé  $r_b$  stejné, pak podle daného  $r_b$  přidáme určené množství komplexu (buď cisPt, dienPtCl nebo BBR3464). Nakonec přidáme 10 mM NaClO<sub>4</sub>. Po inkubaci 24 hodin při teplotě 37°C přidáme ke každému vzorku 52 μl EtBr. Po vortexování a centrifugaci jsou jednotlivé vzorky připraveny k měření poklesu viskozity.

Vlastní měření je založeno na měření doby rolující/padající kuličky v diagonálně upevněné skleněné kapiláře naplněné vzorkem. Smyková rychlost je ovlivňována změnami úhlu sklonu kapiláry. Tímto způsobem lze provádět stanovení látek bez ohledu na to, zda se jedná o newtonské anebo ne-newtonské kapaliny.

Dynamická viskozita  $\eta$  vzorku se vypočítá z kalibrační konstanty  $K_1$  měřicího systému, doby pádu kuličky  $t_1$  a rozdílu hustot mezi kuličkou a vzorkem podle níže uvedené rovnice. Kalibrační konstanta je pro každý úhel sklonu a každou kapiláru jiná, hodnoty jsou uvedeny v kalibračním protokolu, který je přiložen k přístroji. V našem případě byly tyto hodnoty

následující:  $K_1$  (kalibrační konstanta) = 0,00846, měřicí systém (kapilára-/průměr kuličky) = 1.6/1.500 mm.

$$\eta = K_1 \cdot (\rho_K - \rho_P) \cdot t_1$$

$\eta$ ...	dynamická viskozita vzorku [mPa.s]
$K_1$ ...	kalibrační konstanta měřicího systému [mPa.cm <sup>3</sup> /g]
$\rho_K$ ...	hustota kuličky [g/cm <sup>3</sup> ] (ocelová kulička = 7.85 g/cm <sup>3</sup> )
$\rho_P$ ...	hustota měřeného vzorku [g/cm <sup>3</sup> ]
$t_1$ ...	doba pádu kuličky [s]

Úhel sklonu měřicího systému byl nastaven tak, aby doba pádu kuličky nebyla kratší než 10 sekund. V opačném případě může v kapiláře dojít k turbulentnímu proudění, které má za následek zdánlivě vyšší hodnoty viskozity. V našem případě byl použit úhel sklonu kapiláry 50°. Hustota vzorků při teplotě měření byla stanovena na Biofyzikálním ústavu v Brně a byla 0,99820 g/cm<sup>-3</sup> (pro pufr) 1,00189 g/cm<sup>-3</sup> (pro DNA o koncentraci 150 µg/ml, použité při měření). Bylo také ověřeno, že přidání ethidium bromidu o koncentraci použité při měření ovlivnilo hustotu vzorku DNA jen velmi nepatrně a proto bylo při výpočtu zanedbáno. Měření bylo prováděno při teplotě 37°C, každé měření každého nezávisle připraveného vzorku bylo opakováno 4 x.

Relativní viskozita  $V_{rel}$  byla určena z naměřených hodnot následovně:

$$V_{rel} = \frac{\eta - \eta_{blank}}{\eta_0 - \eta_{blank}} * 100$$

kde  $\eta$  = dynamická viskozita vzorku modifikované DNA,  $\eta_{blank}$  = dynamická viskozita blanku, tj. DNA bez ethidium bromidu, a  $\eta_0$  = dynamická viskozita vzorku obsahující nemodifikovanou DNA. Hodnota  $V_{rel}$  se vyjadřuje v procentech.

Tato metoda vyžaduje co nejvyšší přesnost a pozornost. I malá chyba při nasátí roztoku do kapiláry, způsobí nepřesné měření poklesu viskozity. Tyto nepřesnosti mohou být způsobeny např. bublinkou v kapiláře, která nemusí být na první pohled viditelná, či špatným uzavřením

ventilků či zátek na kapiláře. Správnost měření poklesu viskozity nám pomáhá určit parametr tzv. chyba měření, který můžeme zjistit z viskozimetru.

Tato chyba by nikdy neměla přesáhnout hodnotu 0,2 %. Pokud je tato hodnota překročena i o jednu setinu, je lepší zopakovat aplikaci roztoku do kapiláry a provést dané měření znovu.

Přesná množství jednotlivých sloučenin použitých pro přípravu vzorků jsou uvedeny v tabulce č. 4, 5, 6.

**Tab. 4:** Množství jednotlivých roztoků pro přípravu th DNA modifikované cisplatinoua různá  $r_b$ . A = 2,18 mM th DNA v 10mM NaClO<sub>4</sub>, B = 5 · 10<sup>-4</sup> M cisPt v 10mM NaClO<sub>4</sub>, C = 10 mMNaClO<sub>4</sub> $r_b$  - počet atomů platiny vázaných na nukleotid.

$r_b$	A [ $\mu$ l]	B [ $\mu$ l]	C [ $\mu$ l]
0	17,2	0	928,8
0,01	17,2	7,4	982,1
0,02	17,2	1,48	981,3
0,04	17,2	2,96	979,8
0,06	17,2	4,45	978,4
0,08	17,2	5,93	976,9
0,01	17,2	7,41	975,4

**Tab. 5:** Množství jednotlivých roztoků pro přípravu th DNA modifikované dienPt na různá  $r_b$ . A = 2,18 mM th DNA v 10mM NaClO<sub>4</sub>, B = 5. 10<sup>-4</sup> M dienPt v 10mM NaClO<sub>4</sub>, C = 10 mMNaClO<sub>4</sub> a  $r_b$  - počet atomů platiny vázaných na nukleotid.

$r_b$	A [ $\mu$ l]	B [ $\mu$ l]	C [ $\mu$ l]
0	17,2	0	928,8
0,01	17,2	7,4	982,1
0,02	17,2	1,48	981,3
0,04	17,2	2,96	979,8
0,06	17,2	4,45	978,4
0,08	17,2	5,93	976,9
0,01	17,2	7,41	975,4

**Tab. 6:** Množství jednotlivých roztoků pro přípravu th DNA modifikované komplexem BBR3464na různá  $r_b$ . A = 2,18 mM th DNA v 10mM NaClO<sub>4</sub>, B = 5. 10<sup>-4</sup> M BBR3464 v 10mM NaClO<sub>4</sub>,C = 10 mMNaClO<sub>4</sub> a  $r_b$  - počet molekul BBR3464 vázaných na jeden nukleotid.

$r_b$	A [ $\mu$ l]	B [ $\mu$ l]	C [ $\mu$ l]
0	17,2	0	928,8
0,01	17,2	7,4	982,1
0,02	17,2	1,48	981,3
0,04	17,2	2,96	979,8
0,06	17,2	4,45	978,4
0,08	17,2	5,93	976,9
0,01	17,2	7,41	975,4

## 5 Výsledky měření:

V této kapitole jsou shrnuty výsledky, jichž bylo dosaženo v průběhu řešení bakalářské práce

### 5.1 Měření fluorescence

Fluorescence ethidium bromidu (EtBr) byla měřena pro vzorky DNA modifikované třemi různými komplexy platiny, konkrétně cisplatinou, dienplatinou a BBR3464 při  $r_b$  v rozsahu 0 až 0,1. Byly provedeny čtyři nezávislé experimenty (tj. včetně přípravy a modifikace vzorků). Hodnoty relativní fluorescence získané z těchto experimentů jsou uvedeny v tabulkách 7, 8 a 9. V obr. 13. jsou uvedeny křivky závislosti relativní fluorescence EtBr pro vzorky telecí thymové DNA modifikované cisplatinou, dienplatinou a komplexem BBR3464 na stupni modifikace ( $r_b$ ).

**Tab. 7:** Hodnoty relativní fluorescence získané pro vzorky DNA modifikované cisPt.

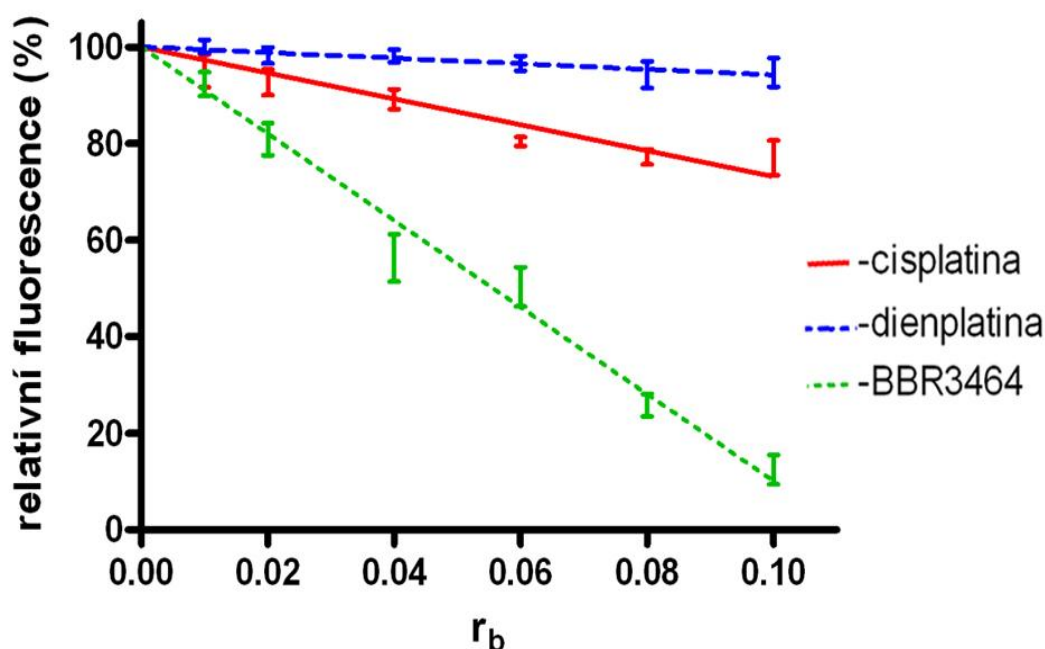
$r_b$	Relativní fluorescence $I_{rel}$ [%]					
	Měření 1	Měření 2	Měření 3	Měření 4	Průměr	Směrodatná odchylka
0,00	100	100	100	100	100	0
0,01	97,77	96,81	95,57	90,14	95,07	2,95
0,02	94,99	89,52	91,33	94,79	92,66	2,32
0,04	88,77	86,56	91,36	89,94	89,16	1,76
0,06	80,79	79,03	81,1	80,61	80,38	0,80
0,08	78,99	75,64	78,08	76,13	77,21	1,37
0,10	74,08	78,83	74	81,29	77,05	3,13

**Tab. 8:** Hodnoty relativní fluorescence získané pro vzorky DNA modifikované dienPt.

	Relativní fluorescence $I_{rel}$ [%]					
$r_b$	Měření 1	Měření 2	Měření 3	Měření 4	Průměr	Směrodatná odchylka
0,00	100	100	100	100	100,00	0,00
0,01	99,36	100	102	99	100,09	1,16
0,02	98,23	95,98	98,65	99,96	98,21	1,43
0,04	98,5	96,35	98,1	99,46	98,10	1,13
0,06	97,63	98,12	96,03	94,77	96,64	1,33
0,08	95,06	90,23	96,68	95,01	94,25	2,41
0,10	95,67	97,5	95,23	90,56	94,74	2,56

**Tab. 9:** Hodnoty relativní fluorescence získané pro vzorky DNA modifikované komplexem BBR3464

	Relativní fluorescence $I_{rel}$ [%]					
$r_b$	Měření 1	Měření 2	Měření 3	Měření 4	Průměr	Směrodatná odchylka
0,00	100	100	100	100	100,00	0,00
0,01	90,65	90,36	95,8	92,36	92,29	2,16
0,02	84,21	82,65	76,63	80,08	80,89	2,87
0,04	54,32	61,2	50,35	59,39	56,32	4,27
0,06	45,36	55,32	50,36	50,26	50,33	3,52
0,08	23,12	25	28,63	26,54	25,82	2,02
0,10	8,2	12,6	15,3	13,9	12,50	2,66



Obr. 13: Závislost relativní fluorescence EtBr pro vzorky DNA modifikované cisPt, dienPt a BBR3464 na stupni modifikace ( $r_b$ ).

Z obrázku (Obr. 13) je patrné, že vazba všech tří studovaných komplexů platiny na DNA vede ke snížení interkalace EtBr do DNA, a tím i ke snížení výsledné fluorescence. Nejzřetelnější pokles fluorescence způsobuje komplex BBR3464, naopak vazba dienplatiny na DNA vede jen k nepatrnému snížení fluorescence.

Tyto výsledky jsou v naprosté shodě s již dříve publikovanými údaji [35].

## 5.2 Viskozimetrie:

Dynamická viskozita v přítomnosti ethidium bromidu byla měřena pro vzorky DNA modifikované třemi různými komplexy platiny, konkrétně cisplatinou, dienplatinou a BBR3464 při  $r_b$  v rozsahu 0 až 0,1. Byly provedeny čtyři nezávislé experimenty (tj. včetně přípravy a modifikace vzorků). Hodnoty relativní viskozity získané z těchto experimentů jsou uvedeny v tabulkách 10, 11 a 12. V obr. 14. jsou uvedeny křivky závislosti relativní viskozity pro vzorky telecí thymové DNA modifikované cisplatinou, dienplatinou a komplexem BBR3464 na stupni modifikace ( $r_b$ ).



**Tab. 10:** Hodnoty relativní viskozity získané pro vzorky DNA modifikované cisplatinou.

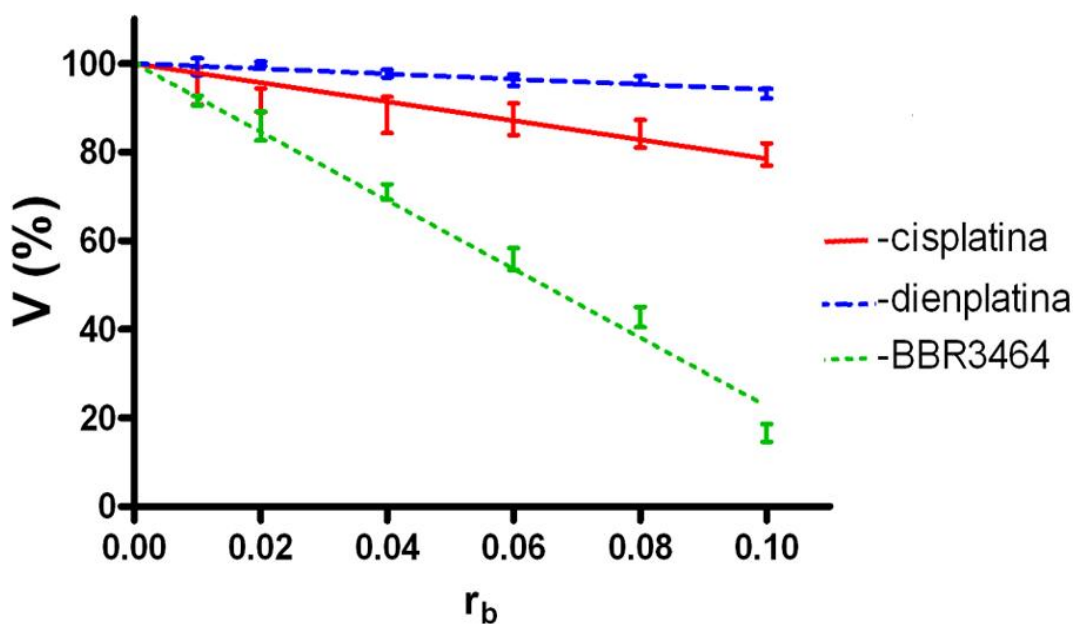
	Relativní viskozita $V_{rel}$ [%]					
$r_b$	Měření 1	Měření 2	Měření 3	Měření 4	Průměr	Směrodatná odchylka
0,00	100,00	100,00	100	100	100,00	0,00
0,01	96,51	90,00	99,78	93,346	94,91	3,63
0,02	95,45	89,45	90,16	91,87	91,73	2,32
0,04	93,28	83,64	87,11	89,46	88,37	3,51
0,06	90,62	82,50	87,02	89,42	87,39	3,11
0,08	84,26	82,25	81,51	88,49	84,13	2,71
0,10	81,96	75,94	79,99	80,08	79,49	2,20

**Tab. 11:** Hodnoty relativní viskozity získané pro vzorky DNA modifikované dienplatinou.

	Relativní fluorescence $V_{rel}$ [%]					
$r_b$	Měření 1	Měření 2	Měření 3	Měření 4	Průměr	Směrodatná odchylka
0,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
0,01	101,00	102,63	99,63	93,85	99,28	98,85
0,02	98,93	99,62	101,23	99,90	99,92	100,17
0,04	99,63	96,15	98,76	96,35	97,72	97,25
0,06	98,89	95,45	97,52	92,99	96,21	95,54
0,08	98,65	95,00	96,38	94,67	96,18	95,56
0,10	95,25	90,32	92,60	94,44	93,15	92,63

**Tab. 12:** Hodnoty relativní viskozity získané pro vzorky DNA modifikované komplexem BBR3464.

$r_b$	Relativní fluorescence $V_{rel}$ [%]					
	Měření 1	Měření 2	Měření 3	Měření 4	Průměr	Směrodatná odchylka
0,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
0,01	90,23	93,50	93,58	89,14	91,61	91,96
0,02	86,32	80,32	95,00	81,99	85,91	85,80
0,04	70,00	75,63	71,09	67,32	71,01	71,26
0,06	55,47	55,50	50,23	62,30	55,88	55,98
0,08	40,99	49,02	42,65	38,23	42,72	43,16
0,10	22,36	15,56	15,69	12,99	16,65	15,22



Obr. 14: Závislost poklesu relativní viskozity ( $V$ ) na množství molekul komplexu vázaném na jeden nukleotid ( $r_b$ ) pro jednotlivé studované komplexy.

Z obrázku (Obr. 14) je patrné, relativní viskozita DNA s ethidium bromidem se snižuje v závislosti na stupni modifikace pro všechny tři studované komplexy. Nejstrmějším poklesem se projevuje modifikace DNA komplexem BBR3464, naopak modifikace dienPt vede jen k malému poklesu relativní viskozity. Je také patrné, že závislosti jsou lineární a rozdíly ve sklonech přímek mezi jednotlivými komplexy odpovídají rozdílům zjištěným

pomocí metody měření fluorescence. Z výsledků lze tedy vyvodit, že typ aduktů a úroveň modifikace i v tomto případě ovlivnila interkalaci ethidium bromidu do DNA a to se projevilo snížením viskozity oproti kontrolní, nemodifikované DNA, kde mohly všechny molekuly ethidium bromidu být interkalovány.

## 6 Diskuze a závěr:

Metody, které byly použity, jsou jedny ze základních biologických a fyzikálních metod, kterými je možné zkoumat ovlivnění struktury DNA po navázání komplexů platiny. Pro měření poklesu fluorescence byly vzorky inkubovány 24 hodin při teplotě 37°C. Jednotlivá množství roztoků použitých při přípravě vzorků jsou uvedena v tab. 1 až 3 a získané hodnoty relativní fluorescence jsou v tab. 7 až 9. Množství zásobních roztoků použitých pro přípravu vzorků pro měření viskozity jsou v tab. 4 až 6 a získané hodnoty v tabulce 10 až 12. I zde byly vzorky inkubovány 24 hodin při teplotě 37°C. Při přípravě vzorků se muselo zachovat naprosto přesné míchání jednotlivých složek. Byla zde vyžadována velká pečlivost a rychlost. I nepatrná chyba při přípravě vzorků se pak objevila jako význačný nedostatek ve výsledcích měření.

Naměřené hodnoty relativní fluorescence i viskozity ukazují, že čím více se naváže Pt komplexu na jeden nukleotid DNA, tím větší je pokles dané veličiny. Největší pokles fluorescence i viskozity je u komplexu BBR3464.

Jak již bylo uvedeno v kapitole Výsledky, hodnoty získané pro závislost relativní fluorescence na stupni modifikace DNA velmi dobře souhlasí s již dříve publikovanými výsledky [35]. Největší vliv na intenzitu fluorescence interkalovaného ethidium bromidu má modifikace DNA komplexem BBR3464, naopak modifikace dienplatinou se projeví jen velmi malým snížením intenzity fluorescence. Modifikace DNA cisplatinou ovlivňuje fluorescenci více než dienplatina, ale podstatně méně než komplex BBR3464. To souvisí se skutečností, že dienplatina vytváří na DNA pouze monofunkční adukty, které nepředstavují výraznou sterickou zábranu pro interkalaci ethidium bromidu do DNA. Naproti tomu cisplatin vytváří v DNA převážně můstky mezi sousedními puriny, což zabraňuje interkalaci ethidium bromidu mezi tyto báze. Množství molekul ethidium bromidu interkalovaných do DNA je tedy menší a tedy i fluorescence je nižší. Komplex BBR3464 vytváří v DNA můstky dlouhého dosahu, které překrývají více bází (až 6 bází). Místa, kam se ethidium bromid nemůže interkalovat jsou tedy rozsáhlejší a tedy i snížení fluorescence je podstatně výraznější.

Ethidium bromid po interkalaci do DNA nejen zvyšuje jen svoji fluorescenci, ale také zvyšuje viskozitu DNA. Čím méně molekul ethidium bromidu je tedy do DNA interkalováno (např.

v důsledku bránění interkalaci adukty komplexu platiny), tím by viskozita daného roztoku měla být nižší. Toto se také měřením potvrdilo.

Cílem této práce bylo porovnat výsledky, získané metodou měření fluorescence s údaji, zjištěnými měřením viskozity. Ukázalo se, že přímky získané vnesením hodnot relativní fluorescence a viskozity proti stupni modifikace mají pro stejné komplexy obdobný průběh (viz obrázky 12 a 13) a jejich sklon závisí na typu aduktů, které dané komplexy v DNA vytváří. Proto lze konstatovat, že obě metody jsou komplementární a metoda měření viskozity může být při stanovení typů můstků vytvořených v DNA platinovými komplexy vhodnou alternativou dosud používané metody fluorimetrické.

## 7 Seznam zkratk

1,2-GG	vnitrořetězcový můstek
1,2 AG	vnitrořetězcovýmůstek
1,3d(GpNpG)	vnitrořetězcovýmůstek
A	adenin
BBR3464	[{trans-PtCl(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> } <sub>2</sub> μ-trans-Pt(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> {H <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> NH <sub>2</sub> } <sub>2</sub> ] <sup>4+</sup>
c	koncentrace
C	cytosin
cisplatina, cisPt	cis-[(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> Pt]
CTR1	membránový přenašeč pro ionty mědi
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dienPt	[PtCl(dien)]Cl, chlorid dithylentriaminchloroplatnatý
EtBr	ethidium bromid
G	guanin
Karboplatina	diammin-cyklobutandikarboxylatoplatnatý komplex
NMR	nukleární rentgenová rezonance
NER	nukleotidová excisní oprava
Oxaliplatina	1R,2R diamincyklohexanoxalátoplatnatý komplex
r <sub>b</sub>	množství molekul komplexu navázaných na jeden nukleotid
RNA	ribonukleonová kyselina
T	thymin
thDNA	thymová DNA
XP	xerodermapigmentosum

## 8 Seznam literatury

- [1]. Brabec V., *Molekulární aspekty mechanismu protinádorového působení cisplatiny*, Biophysical Chemistry 1989, s. 42-43.
- [2]. Brabec V., *Nové možnosti v léčbě zhoubných nádorů sloučeninami platiny a ruthenia*, Živa, 4/1998, s. 148 – 149.
- [3]. Kašpárková J., Brabec V., *Platinové komplexy: Od poškození k léčbě rakoviny*, Bulletin Akademie věd České republiky 10/2001.
- [4]. Brabec, V.; Kasparkova, J., *DNA Interactions of Platinum Anticancer Drugs. Recent Advances and Mechanisms of Action*, Met. Compd.Cancer Chemother. 2005, p. 187–218.
- [5]. Blommaert, F.A., et col., *Formation of DNA adducts by the anticancer drugs carboplatin, Different nukleotide semence preferences in vitro and in cells*. Biochemistry,1995, 34(26), p. 8547-8480.
- [6]. Natarajan, G., R. Malathi and E. Holler, *Increased DNA binding activity of cis 1,1-cyclobutanedicarboxylatodiammineplatinum (II) ( Carboplatin) in the presence oftheoryrevisited*. Biochem. Pharmacol, 1995,58(10), p. 1625-1629.
- [7]. Farmakoterapie, [online], č. 8, [cit. 15. 3. 2008], 2005, Dostupné na [www](http://www.farmakoterapie.cz/cz/Clanek/292,ISSN1801-7509):
- <http://www.farmakoterapie.cz/cz/Clanek/292,ISSN1801-7509>.
- [8]. Woynarowski, J.M., Chapman, W.G., Napier, C., Herziger, M.C.S., and Juniewicz, P., *Sequence- and Region-Specificity of Oxaliplatin Adducts in Naked and Cellular DNA*, Mol. Pharamcol , 1998, p. 54, 770.
- [9]. Reardon, J.T., Vaisman, A., Chaney, S.G., and Sancar, A., *Efficient Nucleotide Excision Repair of Cisplatin, Oxaliplatin and JM216 Platinum Intrastrand DNA Diadducts*, Cancer Res, 1999, p.59, 3968
- [10]. Albert et col., *Základy buněčné biologie*, 2005, s. 185-186.
- [11]. Howle, J. A., Gale, G. R., Harder, H. C., and Rosenberg B., Biochem. Pharmacol. 1970, p. 19, 2757
- [12]. Pascoe, J. M. and Roberts, J. J., Biochem. Pharmacol., 1974, p 23, (9), 1345 and 1359
- [13]. Holler, E.,Keppler, B. K. *In Metal Complexes in CancerChemotherapy*, VCH, Weinheim, 1993, p.37-71.
- [14]. Jamieson E. R., LippardS.J., *Recognition and of Cisplaton – DNA adducts*, Chem. Rev. 1999, p. 99, 2467-2498.

- [15]. Gelasco, A., Lippard, S.J., *NMR Solution structure of a DNA dodecamer duplex containing a cis – diammineplatinum (II) d(GpG) intrastrand cross-link, the Major adducts of the anticancer drug cisplatin*, *Biochemistry*, 1998, p. 37, 9230 – 9239.
- [16]. Rajesh, G., Jennifer, L. B., Margaret, M. S., Stephen, F.R., *Identification of bifunctional GA and AG intrastrand crosslink formed between cisplatin and DNA*, *Inorg. Biochem.*, 2005, p.99, 552 – 559.
- [17]. Vrána, O., Boudný, V., Brabec, V., *Nucleic Acids Res.*, 1996, p.24, 3918-3925
- [18]. Malinge, J. M., Pérez, C., Leng, M., *Nucleic Acids Res.*, 1994, p.22, 3834-3839
- [19]. Ishida, S., Lee, J., Thiele, D. J. and Herskowitz, I., *Resistance to the anticancer drug cisplatin due to defects in the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals*. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 2002 USA 99: p.14298-14302.
- [20]. Žaludová, R., Žáková, A., Kašpárková, J., Balcarová, Z., Kleinwachter, V., Vrána, O., Farrell, N., Brabec, V. ,*Eur.*, *DNA interactions of bifunctional dinuclear platinum (II) antitumor agents.*, *J. Biochem.*, 1997,p.246, 508-517.
- [21]. Kašpárková, J., Nováková, O., Vrána, O., Farrell, N., Brabec, V., *DNA modifications by a novel bifunctional trinuclear platinum phase I anticancer agent*, *Biochemistry*, 1999,38, p.10997-11005.
- [22]. Fichtinger-Schepman, A. M. J., van der Veer, J. L., den Hartly, J. H. J.,Lohman, P. H. M., Reedijk, J., *Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation*, *Biochemistry*, 1998, 24, p.707-713.
- [23]. Vrána, O., Boudný, V., Brabec, V., *Superhelical torsion controls DNA interstrand cross-linking by antitumor cis-diamminedichloroplatinum (II)*, *Nucleic Acids Res.* 1996, 24, p. 3918-3925
- [24]. Wang, C. M., Chen, C. L., Robertson, H. M., Fahrbach, S. E., *A New Member of the GM130 Golgin Subfamily Is Expressed in the Optic Lobe Anlagen of the Metamorphosing Brain of Manduca Sexta*, *Journal of Insect Science*, 2003
- [25]. Pil P.M., Lippard S. J.,*Specific binding of chromosomal protein-HMG1 to DNA damaged by the anticancer drug cisplatin*. *Science*, 1992. 256: p. 234-237.
- [26]. Suchánková T., *Interakce nových asymetrických komplexů platiny s azolovými a izopropylaminovými ligandy s DNA. Vztah k biologické aktivitě*, 2008.
- [27]. Pinto, A. L. et Lippard, S. J., Suo, Z., Lippard, S. & Johnson, K., *Proc. Natl. Acad. Sei.*, *Biochemistry*, 1999, 198538, 715-26.
- [28]. Sorenson, C. M. & Eastman A., *Influence of cisdiamminedichloroplatinum(II) on DNA synthesis and cell cycle progression in excision repair proficient and deficient Chinese*



- hamster ovary cells*, *Cancer Res.*, 1988, 48, 6703-6707.
- [29]. Sorenson, C.M., Barry, M.A. & Eastman, A., *Analysis of events associated with cell cycle arrest at g2 phase and cell death induced by cisplatin*, *Journal National*, 1990, 82, p. 749-755.
- [30]. Allday, M. J., Inman, G. J., Crawford, D. H. & Farrell, P. J., *EMBO J.*, 1995, 14, 4994-5005.
- [31]. Qu, Y., Appleton, T. G., Hoeschele, J. D., Farrell, N., *Cisplatin as Synthone. Synthesis and Characterization of Triplatinum Complexes Containing Three cis-Pt(amine)<sub>2</sub> Units Linked in a Linear Fashion*, *Inorg. Chem.* 1993, 32, p. 2591-2593.
- [32]. Farrell, N., Qu, Y., Feng, L., Van Houten, B., *Comparison of chemical reactivity, cytotoxicity, interstrand cross-linking and DNA sequence specificity of bis(platinum) complexes containing monodentate or bidentate coordination spheres with their monomeric analogues*, *Biochemistry*. 1990 Oct 16, 41, p. 9522-9531
- [33]. Kraker, A.J ., Hoeschele, J .D ., Elliott, W.L., Showalter, H.D .H , Sercel, A.D . and Farrell, N., *Anticancer Activity in Murine and Human Tumor Cell Lines of Bis(platinum) Complexes Incorporating Straight-Chain Aliphatic Diamine Linker Groups*, *J. Med. Chem.*, 1992, 35, p.4526.
- [34]. Farrell, N., *Interactions of Metal Ions with Nucleotides, Nucleic Acids, and Their Constituents*, *Met. Ions Biol. Syst.*, 1996, 32, 603.
- [35]. Brabec, V., Kašpárková, J., Vrána, O., Nováková, O., Cox, J.W., Qu, Y., Farrell, N., *DNA modifications by a novel bifunctional trinuclear platinum phase I anticancer agent*, *Biochemistry*, 1999, p. 6781-6790.
- [36]. McGregor, T. D., Kašpárková, J., Nepelchová, K., Nováková, O., Peňázová, H., Vrána O., Brabec, V., Farrell, N. J., *A comparison of DNA binding profiles of dinuclear platinum compounds with polyamine linkers and the trinuclear platinum phase II clinical agent BBR3464*, *Biol. Inorg. Chem.*, 2002, 7, p. 397.
- [37]. Lemaire, M. A., Schwartz, A., Rahmouni, A. R., Leng, M., *Interstrand cross-links are preferentially formed at the d(GC) sites in the reaction between cis-diamminedichloroplatinum (II) and DNA*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1982 p. 88.
- [38]. Farrell, N., Sigel, A., Sigel, H., Fontis Media S.A., *Metal Complexes in Tumor Diagnosis and as Anticancer Agents*, *Metal Ions in Biological Systems*, vol. 42, 2004, p. 252.
- [39]. Hegmans, A., Berners-Price, S. J., Davies, M. S., Thomas, D. S., Humphreys, A.S., Farrell, N., *Long Range 1,4 and 1,6-Interstrand Cross-Links Formed by a Trinuclear Platinum Complex. Minor Groove Preassociation Affects Kinetics and Mechanism of*

- Cross-Link Formation as Well as Adduct Structure*, J. Am. Chem. Soc., 2004, 126 (7), p. 2166.
- [40]. Johnson, N. P., Hoeschele, J. D., Rahn, R. O., *Kinetic analysis of the in vitro binding of radioactive cis- and trans-dichlorodiammineplatinum(II) to DNA*, Chem.-Biol. Interact., 1980, 30, p. 151.
- [41]. Berners-Price, S. J., Barnham, K. J., Frey, U., Sadler, P. J., *Kinetic analysis of the stepwise platinumation of single- and double-stranded GG oligonucleotides with cisplatin and [PtCl(H<sub>2</sub>O)(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>*, Chem. Eur. J., 1996, 2, p. 1283-1291.
- [42]. Davies, M. S., Thomas, D. S., Hegmans, A., Berners-Price, S. J., Farrell, N., *Kinetic and Equilibria Studies of the Aquation of the Trinuclear Platinum Phase II Anticancer Agent* [*trans*-PtCl(NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]<sub>2</sub>]<sub>2</sub>{μ*trans*-Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sub>6</sub>NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>]<sup>4+</sup> (BBR346 4), Inorg. Chem., 2002, 41, p. 1101-1109
- [43]. Barnham, K. J., Berners-Price, S. J., Frenkiel, T. A., Sadler, P. J., *Platination pathways for reactions of cisplatin with GG single-stranded and double-stranded decamer oligonucleotides*, Angew. Chem., Int. Ed., 1995, 34, p. 1874-1877.
- [44]. Cox, J. W., Berners-Price, S. J., Davies, M. S., Qu, Y., Farrell, N., *Kinetic Analysis of the Stepwise Formation of a Long-Range DNA Interstrand Cross-link by a Dinuclear Platinum Antitumor Complex: Evidence for Aquated Intermediates and Formation of Both Kinetically and Thermodynamically Controlled Conformers*, J. Am. Chem. Soc., 2001, 123, p. 1316-1326.
- [45]. Reeder, F., Guo, Z., Murdoch, P. del S., Corazza, A., Hambley, T. W., Berners-Price, S. J., Chottard, J. C., Sadler, P. J., *Structural transitions of a GG-platinated DNA duplex induced by pH, temperature and Box A of high-mobility-group protein 1*, Eur. J. Biochem., 1997, p.243, p. 782-791.
- [46]. Kraker, A. J., Hoeschele, J. D., Elliott, W. L., Showalter, H. D. H., Sercel, A. D., Farrell, N., *Anticancer Activity in Murine and Human Tumor Cell Lines of Bis(platinum) Complexes Incorporating Straight-Chain Aliphatic Diamine Linker Groups*, J. Med. Chem., 1992, 35, p. 4526-4532.
- [47]. Harris, A.L., Ryan, J. J., Farrell, N., *Biological consequences of trinuclear platinum complexes: comparison of [[trans-PtCl(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>μ-(trans-Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-*

- NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>4+</sup> (BBR 3464) with its noncovalent congeners, Mol. Pharmacol., 2006, 69(2), p. 666-672.*
- [48]. Boulikas, T., Vougiouka, M., *Cisplatin and platinum drugs at the molecular level*, Oncol. Reports, 2003, 10, p. 1663-1682
- [49]. Sadler, P. J., Muncie, C., Shipman, M. A., *Biological Inorganic Chemistry: Structure and Reactivity*, chapter VIII: Metals in Medicine, ed. Bertini, I., Stiefel, E.I., Gray, H.B., Valentine, J.S., University Science Books, 2006.
- [50]. Brabec V., Palecek E., *The influence of salts and pH on polarographic currents produced by denatured DNA*. Biophysik, 6/1970, p.290-300.
- [51]. Brabec V., Palecek E., *Interaction of nucleic acids with electrically charged surfaces. II. Conformational changes in double-helical polynucleotides*. Biophys. Chem. 1976, 4: p.76-92.