

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

KATEDRA BIOFYZIKY

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Stanovení sekvenční preference protinádorově účinné  
oxaliplatiny na DNA pomocí restričních endonukleáz**

Vypracoval: Ondřej Hrabina

Studijní obor: Molekulární biofyzika

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

Děkuji vedoucímu bakalářské práce Prof. RNDr. Viktoru Brabcovi, DrSc., Mgr. Tereze Muchové a Mgr. Jitce Prachařové za nedocenitelné rady a za čas, který mi věnovali při řešení dané problematiky.

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

V Olomouci dne

## Anotace

Platinová cytostatika se používají v klinické praxi již více než 40 let. V dnešní době jsou již k dispozici platinová cytostatika druhé generace, která mají sice méně vedlejších účinků, avšak na druhé straně vykazují podobné spektrum aktivity jako cisplatina. Cílem této práce bylo pomocí metody, která umožňuje sledovat inhibici štěpení DNA modifikované platinovými cytostatiky restričními endonukleázami, určit sekvenční specifitu vazby oxaliplatinu na DNA. Pro sledování fragmentů DNA byla použita elektroforéza v nativním agarózovém gelu. Výsledky ukázaly, že modifikace DNA oxaliplatinou nejvíce ovlivňuje štěpení enzymem BamHI. Enzym EcoRI byl ovlivněn méně a v případě restriktázy SspI modifikace oxaliplatinou inhibovala štěpení tímto enzymem teprve při nejvyšším stupni modifikace, ale i při vysoké úrovni modifikace byla inhibice enzymu velmi malá. Získané výsledky ukázaly, že oxaliplatina se v DNA váže preferenčně na zbytky guaninu, především v sekvenci GG, méně na izolované G. Sekvenční preference oxaliplatinu je tedy velmi podobná preferenci cisplatinu.

## **Annotation**

Platinum based drugs are being used in medicine for over than 40 years. Nowadays the second generation of platinum based drugs is available, which exhibit less side effects, but on the other hand they exhibit spectrum of activity similar to that of cisplatin. The main goal of this work was to determine sequence specificity of DNA binding of oxaliplatin. To achieve this goal we used the method, which allows observing inhibition of cleavage of platinated DNA by restriction endonucleases. The electrophoresis in native agarose gel was used to observe DNA restriction fragments. The results have shown that modification of DNA by oxaliplatin affects cutting by enzyme BamHI most effectively. The cleavage by EcoRI was affected less and in the case of restriction endonuclease SspI the effect of modification by oxaliplatin was only observable at the highest levels of platination. These results were interpreted to mean that oxaliplatin binds to DNA preferentially at guanine residues, namely in the sequence GG and less at isolated guanines, which implies that sequence preference of DNA binding of oxaliplatin is very similar to that of cisplatin.

## Seznam zkratek

**A** - adenin

**A( $\lambda$ )** – absorbance (při dané vlnové délce)

**ATP** – adenosin trifosfát

**ATPáza** – enzym, který katalyzuje hydrolýzu ATP

**C** - cytozin

**CIA** – chloroform : isoamylalkohol

**Ctrl** – protein transportující měď

**DNA** – deoxyribonukleová kyselina

**EDTA** - kyselina ethylendiamintetraoctová

**EtBr** – ethidium bromid

**G** - guanin

**HMG** – "high mobility group"

**HPLC** – vysokotlaká kapalinová chromatografie

**N7** – dusík v poloze 7 na purinovém zbytku

**pb** - pár bází

**r<sub>b</sub>** - udává počet molekul cisplatiny na jednu bázi DNA

**RNA** – ribonukleová kyselina

**T** - thymin

**TAE** – tris-acetátový pufr

**TE** – tris-EDTA pufr

**U** – jednotka restrikčního enzymu

**UV** – ultrafialový(á)

## Obsah

|   |    |
|---|----|
| 1. Přehled problematiky.....  | 1  |
| 1.1. Platinová cytostatika .....  | 1  |
| 1.1.1. Historie cisplatiny.....   | 1  |
| 1.1.2. Mechanismus účinku .....   | 2  |
| 1.1.3. DNA cílové místo působení .....  | 3  |
| 1.1.4. Platinová cytostatika druhé generace .....   | 3  |
| 1.2. Metody vhodné ke studiu sekvenční specifity vazby platinových cytostatik na DNA .....      | 6  |
| 1.2.1. Enzymatická hydrolýza DNA, analýza produktů pomocí HPLC.....                             | 6  |
| 1.2.2. Transkripční mapování aduktů .....   | 6  |
| 1.3. Inhibice štěpení DNA modifikované platinovými cytostatiky restričními endonukleázami ..... | 6  |
| 1.3.1. Restriční endonukleázy .....   | 6  |
| 1.3.2. Agarózová elektroforéza DNA.....   | 7  |
| 1.3.3. Princip metody.....  | 7  |
| 2. Cíl práce.....   | 7  |
| 3. Materiál a metody.....   | 7  |
| 3.1. Použité chemikálie .....   | 7  |
| 3.2. Metody .....   | 8  |
| 4. Výsledky a diskuze.....  | 11 |
| 5. Závěr.....   | 19 |
| 6. Seznam literatury .....  | 19 |

# 1. Přehled problematiky

## 1.1. Platinová cytostatika

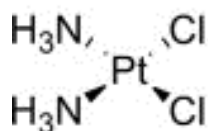
Platinová cytostatika jsou používány v klinické praxi více jak 40 let. První cytostatikum, cisplatina, může být považováno za milník v účinných protinádorových léčivech. V dnešní době již máme druhou generaci platinových cytostatik, které mají méně vedlejších účinků, ale na druhou stranu vykazují velice podobné spektrum aktivity jako cisplatina. Právě rezistence některých nádorů vůči cisplatině a jejím analogům žene dnešní výzkum k vývoji bezpečnějšího a účinnějšího na platině založeného cytostatika.

### 1.1.1. Historie cisplatiny

Protinádorové účinky cisplatiny byly objeveny před více než 40 lety v laboratoři Barnetta Rosenberga na Michiganské státní universitě ve Spojených státech. Rosenberg se zajímal o to, zda může mít elektrické pole vliv na dělení buněk. Pro první experimenty s bakteriemi *Escherichia coli* použil platinové elektrody, které byly instalovány v růstové komůrce. Když bylo pole zapnuto, bakterie se jevily jako velice dlouhá vlákna a ne jako normální krátké tyčinky. Ukázalo se, že za tento efekt není zodpovědné elektrické pole, ale produkty elektrolyzy na platinových elektrodách. Chemickou analýzou bylo zjištěno, že tyto produkty jsou dva aktivní komplexy.

První komplex byl neutrální *cis* izomer  $[Pt^{II}(NH_3)_2Cl_2]$  (Obr. 1), který byl později pojmenován *cisplatina*, a jeho čtyřmocný analog  $[Pt^{IV}(NH_3)_2Cl_4]$ . *Trans* izomer cisplatiny byl mnohem méně aktivní. Později se ukázalo, že skupina okolo Rosenberga znovuobjevila koordinační komplex platiny, který byl objeven a syntetizován roku 1845 pod názvem Peyroneův chlorid. V roce 1968, po dalších testech na bakteriích, byla *cisplatina* podána myši s nádorem sarkom – 180 a bylo pozorováno znatelné zmenšení nádoru. S potvrzujícími *in vivo* testy provedenými na Institutu Chestera Beattyho v Londýně byla *cisplatina* zařazena americkým národním institutem pro léčbu rakoviny do klinického testování. První pacienti byli *cisplatinou* léčeni v roce 1973 a americkou Federální komisí pro potraviny a léčiva byla schválena v roce 1978. (Kelland 2007)





*Obr. 1 – Cisplatina*

### 1.1.2. Mechanismus účinku

Cisplatina vstupuje do buňky jak pasivní difúzí, tak aktivním transportem. (Jung, Lippard 2007) Aktivní transport zajišťují ATPázy typu P (ATP7B), které transportují měď. Dále bylo zjištěno, že buňky, kterým chybí protein Ctr1, vykazují vyšší rezistenci vůči cisplatině a snížení množství této látky v buňce. Další studie dokázaly, že Ctr1, ATP7B, ATP7A (proteiny transportující měď) regulují množství cisplatinu a jejich analogů v buňce.

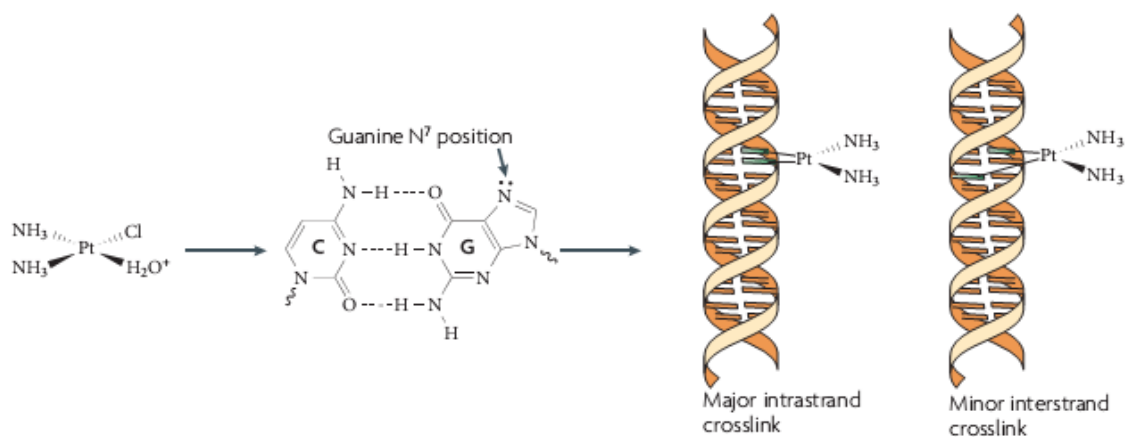
Když cisplatina vstoupí do buňky, přechází v cytoplazmě do aktivní formy. (Brabec, Kašpárková 2005a) Aktivací se rozumí odštěpení molekul chloru a jejich náhrada molekulami vody. Tento hydratovaný produkt je silně elektrofilní, což má za následek, že může reagovat s jakýmkoliv nukleofilem, včetně dusíkových atomů na zbytcích nukleových kyselin. Tento komplex dvoumocné platiny se na DNA váže ve dvou krocích. (Brabec, Kašpárková 2005b) V prvním kroku se komplex dvoumocné platiny váže koordinační vazbou na atom N7 zbytku guaninu. Ve druhém kroku se vytvoří další koordinační vazba (můstek) mezi atomem platiny a sousedním zbytkem guaninu nebo adeninu (1, 2 - GG nebo 1, 2 - AG). Tyto můstky cisplatinu inhibují jak syntézu RNA, tak DNA. Zejména díky sekvenční preferenci vazby cisplatinu na DNA dochází k inhibici DNA a RNA polymerázy přednostně v sekvencích **GG** a **AG**. Omezení použití cisplatinu v klinické praxi je spojeno mimo jiné i s inherentní a získanou rezistencí nádorových buněk vůči cisplatině.

V buňkách jsou adukty platiny odstraňovány zejména tzv. excizní nukleotidovou opravou. (Brabec 1989) Dále bylo dokázáno, že cisplatina může být odstraněna také rekombinační opravou a opravou chybného párování bází. Je důležité zmínit, že proces opravy 1, 2 - příčných vazeb je blokován adicí proteinů z rodiny HMG (high mobility group). Několik typů těchto proteinů je schopno specificky rozpoznat DNA modifikovanou cisplatinou. Konkrétně jsou to proteiny HMGB1 a HMGB2, které se podílí na regulaci transkripce. Tyto proteiny hrají nějakou roli ve formování komplexů DNA - protein nebo protein - protein nebo jako signální molekuly v geneticky

regulovaných opravách. Tyto proteiny se specificky váží na 1, 2 – GG nebo 1, 2 – AG adukty cisplatiny. (Brabec, Kašpárková 2005b)

### 1.1.3. DNA cílové místo působení

Cisplatina reaguje preferenčně se zbytky guaninu. (Brabec, Kašpárková 2005b) (obr. 2) Hlavními adukty jsou 1, 2 – GG příčná vazba a 1, 2 – AG příčná vazba. Další méně časté adukty jsou 1, 3 – GXG příčná vazba, kde za X může být dosazen adenin, cytosin a tymin, dále meziřetězcová příčná vazba a monofunkční léze. U všech aduktů je cisplatina koordinována na dusíkový atom N7 purinového zbytku. Statisticky je procentuální zastoupení 1,2 – příčné vazby vyšší než u ostatních aduktů. Analýzou DNA, která byla modifikována cisplatinou, bylo zjištěno, že zastoupení aduktu 1, 2 – GG je přibližně 65%, 1, 2 – AG 25% a 1, 3 – GXG 5 – 10%. (Jung, Lippard 2007). Dále bylo zastoupeno malé procento meziřetězcové příčné vazby a monofunkčního aduktu.

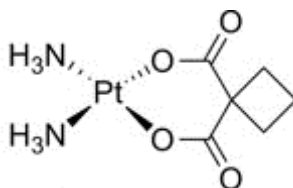


Obr. 2 – Schéma vazby cisplatiny na DNA. Převzato z Kelland 2007

### 1.1.4. Platinová cytostatika druhé generace

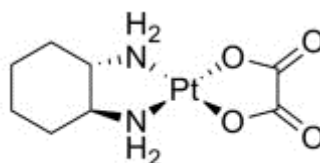
Od objevu cisplatiny byly syntetizovány tisíce jejích analogů, které byly označeny jako potenciální protinádorové léčiva. (Brabec, Kašpárková 2005a) Modifikace spočívaly v nahrazení odstupujících atomů chloru jinými odstupujícími ligandy a nahrazení neodstupujících amonných skupin jiným organickým neodstupujícím ligandem, který zůstane na svém místě. Jen několik těchto nových látek úspěšně prošly klinickými testy. Jmenovitě to jsou karboplatina, oxaliplatina, nedaplatina, lobaplatina a heptaplatina.

Karboplatina (cis-diammin-cyklobutan-dikarboxylátplatnatý komplex) (obr. 3) je méně toxická, než cisplatina. (Brabec, Kašpárková 2005a) Díky tomu je možné podat větší dávku karboplatiny než cisplatiny. Nevýhodou zůstává, že karboplatina je účinná ve stejných nádorech jako cisplatina a je také podávána nitrožilně. Cisplatina by mohla být hodnocena jako lepší analog z hlediska obecné a hematotoxicity. (Brabec, Kašpárková 2005b) Přesto karboplatina nahradila cisplatinu při léčbě několika, ale ne všech nádorů citlivých na platinu.



*Obr. 3 – Karboplatina*

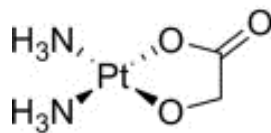
Oxaliplatina (1R,2R-diamin-cyklohexan-oxalátplatnatý komplex) (obr. 4) obdržela povolení pro použití v Asii, Evropě, a Americe. (Brabec, Kašpárková 2005b) Oxaliplatina je aktivní v kombinaci s 5- fluorouracilem a leucovorinem při léčbě rakoviny tlustého střeva. Dále se ukázalo, že oxaliplatina je méně závislá na transporteru Crt1 a mechanismus opravy chybného párování není schopen rozpoznat adukty vytvořené oxalipatinou. (Kelland 2007) Díky této schopnosti vykazuje oxaliplatina i přes menší reaktivitu s DNA stejnou nebo větší míru cytotoxicity v několika typech nádorů. (Brabec, Kašpárková 2005a) Navíc oxaliplatina potřebuje menší počet DNA lézí než cisplatina k inhibici růstu nádorových buněk. Omezením při aplikaci oxaliplatiny je její neurotoxicita a chronická neuropatie, která je závislá na zvyšujících se dávkách tohoto farmaka.



*Obr. 4 – Oxaliplatina*

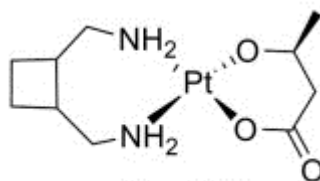
Nedaplatina (cis-diammin-glykolátplatnatý komplex) (obr. 5) je registrována v Japonsku pro léčbu rakoviny hlavy, krku, varlat, plic a jícnu. (Brabec, Kašpárková

2005b) Klinické testy ukázaly, že nedaplatina vykazuje podobné protinádorové efekty jako cisplatina, ale je méně toxická.



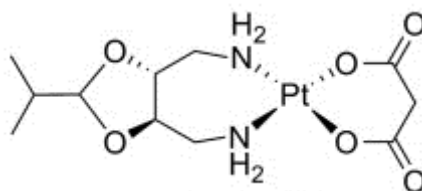
*Obr. 5 – Nedaplatina*

Lobaplatina (obr. 6) je registrovaná v Číně pro léčbu chronické myeloidní leukémie, neoperovatelné metastatické rakoviny prsu a rakoviny plic. (Boulikas a kol. 2007) V současné době se nachází ve fázi II. klinického testování v USA, EU, Brazílii a Jihoafrické republice pro léčbu nejrůznějších nádorů. Lobaplatina má aktivitu vůči velice širokému spektru nádorů a je účinná i vůči některým nádorům resistantním k cisplatině a karboplatině.



*Obr. 6 – Lobaplatina*

Heptaplatina (Obr. 7) je povolena pro léčbu rakoviny žaludku v Jižní Koreji. (Boulikas a kol. 2007) Preklinické testy naznačovaly možnost, že heptaplatina bude mít větší protinádorovou aktivitu a menší toxicitu než cisplatina. Heptaplatina je méně neurotoxická než cisplatina a zkoumá se kombinace s 5 – fluoracilem nebo paclitaxelem za účelem léčby rakoviny krku a hlavy. U pokusných myší byla zjištěna embryotoxicita.



*Obr. 7 - Heptaplatina*

## **1.2. Metody vhodné ke studiu sekvenční specifity vazby platinových cytostatik na DNA**

### **1.2.1. Enzymatická hydrolýza DNA, analýza produktů pomocí HPLC**

Princip této metody spočívá v štěpení modifikované DNA na jednotlivé nukleosidy. (Fichtinger-Schepman a kol. 1984) Tato metoda probíhá v několika fázích. V první fázi je DNA štěpena pomocí endonukleázy deoxyribonukleázy I na krátké oligonukleotidy. V další fázi jsou tyto oligonukleotidy štěpeny nukleázou P1 na monomerní nukleotidy, které jsou dále defosforylovány pomocí alkalické fosfatázy. Vzniklé nukleosidy jsou poté analyzovány pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC).

### **1.2.2. Transkripční mapování aduktů**

Syntéza RNA pomocí T7 RNA polymerázy může být využita ke zjištění sekvenční preference vazby komplexů platiny na DNA. (Malina a kol. 2001) T7 RNA polymeráza byla vybrána, protože je velice dobře prozkoumaná a je komerčně dostupná. Syntéza RNA za použití T7 RNA polymerázy na templátu DNA, který obsahuje bifunkční adukty komplexů platiny, může být předčasně zastavena v závislosti na vzdálenosti aduktů od promotorové sekvence v templátové DNA. Výsledkem syntézy RNA na modifikovaném templátu jsou fragmenty o definované délce, které indikují, kde byla syntéza RNA předčasně ukončena. (Mlčoušková a kol. 2012) Analýzou míst, kde byla syntéza RNA zastavena, je možné získat informaci o poloze aduktů komplexů platiny v sekvenci nukleotidů v DNA. Pro cisplatinu bylo dokázáno, že tato místa jsou GG a 5'-AG.

## **1.3. Inhibice štěpení DNA modifikované platinovými cytostatiky restriktivními endonukleázami**

### **1.3.1. Restriktivní endonukleázy**

Restriktivní endonukleázy jsou enzymy, které štěpí DNA pouze v jedné unikátní sekvenci. (Balcarová, Brabec 1989) Tato sekvence se nazývá rozpoznávací, jedná se o specifické pořadí čtyř až osmi bází, které jsou pro každý restriktivní enzym různé a přesně určují, kde má příslušný enzym DNA štěpit. (Klouta 2005)

### **1.3.2. Agarózová elektroforéza DNA**

Agarózová elektroforéza je separační a analytická metoda, která separuje zkoumané makromolekuly podle délky fragmentů, jejich tvaru a náboje. (Wikipedia) Molekuly DNA jsou polyanionty, tudíž se ve vnějším elektrickém poli budou pohybovat od záporného pólu k pólu kladnému. Rychlost tohoto putování je přímo úměrná velikosti intenzity elektrického pole, velikosti částic gelu a nepřímo úměrná délce fragmentu DNA.

### **1.3.3. Princip metody**

Cisplatina svou vazbou ovlivňuje vlastnosti DNA. (Balcarová a kol. 1992) Tato vazba způsobí, že restrikční enzymy, které štěpí DNA v místě vazby cisplatiny, budou inhibovány. Inhibice poroste s množstvím cisplatiny navázané na DNA. Restrikční enzym štěpí lineární DNA ve svém specifickém místě, čímž vzniknou dva kratší fragmenty. S rostoucím množstvím cisplatiny bude restrikční nukleáza stále více inhibována, a tudíž bude přibývat frakce obsahující nenaštěpenou DNA původní délky. Tuto skutečnost je možné dokázat pomocí agarózové elektroforézy. (Brabec, Balcarová 1993) Migrace fragmentů v gelu rozdělí fragmenty podle délky a po obarvení DNA příslušným barvivem a denzitometrickém zhodnocení je možné stanovit procentuální míru inhibice štěpení restrikčního enzymu způsobenou vazbou cisplatiny na DNA.

## **2. Cíl práce**

Cílem této práce je pomocí metody, který umožňuje sledovat inhibici štěpení DNA modifikované platinovými cytostatiky restrikčními endonukleázami, určit sekvenční specifitu vazby oxaliplatiny na DNA.

## **3. Materiál a metody**

### **3.1. Použité chemikálie**

Všechny chemikálie byly p. a. čistoty.

Ve všech experimentech byla použita destilovaná voda.

Plazmidová DNA pSP73 KB – 2455 pb

Izolován podle běžné procedury.

[PtCl<sub>2</sub> (*R,R*-DACH)], kde DACH = 1,2-diaminocyklohexan.

Darován prof. Giovannim Natilem, skupina bioorganické chemie na universitě v Bari, Itálie.

Restrikční endonukleáry PvuI, EcoRI, BamHI a SSpI byly od firmy New England Biolabs, Velká Británie.

Hovězí sérový albumin (BSA) - New England BioLabs, Anglie

Tris-acetátový (TAE) pufr - 50x

- 242 g Tris
- 100 ml 0,5 M Na<sub>2</sub>EDTA
- 57,1 ml ledové kyseliny octové
- do litru doplnit ultračistou vodou

Bromfenolová modř : 40% (w) sacharoza

0,25% (w) bromfenolová modř

Agaróza – firma Serva elektroforensis

Ethidium bromid – koncentrace 10 mg/ml

Serva elektroforensis Germany

## **3.2. Metody**

### **Modifikace DNA**

DNA byla inkubována s roztokem [PtCl<sub>2</sub>(*R,R*-DACH)] (dle požadovaného  $r_b$ ) při 37°C ve tmě po dobu 24 hodin. Stupeň modifikace  $r_b$  udává počet molekul komplexu platiny na jednu bázi DNA. Vzorek byl inkubován v prostředí 0,01 M NaClO<sub>4</sub>, pH 6. Podmínkou vazby oxaliplatiny na DNA je výměna odstupujícího oxalátového ligandu za báze v DNA, což je v případě oxaliplatiny velmi pomalý proces. Modifikaci DNA oxaliplatinou jsme tedy realizovali reakcí DNA s jejím analogem, komplexem [PtCl<sub>2</sub>(*R,R*-DACH)], který se od oxaliplatiny liší pouze tím, že oxalátová pomalu

odstupující skupina je nahrazena dvěma výrazně rychleji odstupujícími chloridovými skupinami.

### **Linearizace DNA**

Lineární plazmidová DNA byla použita ve všech experimentech. Plazmidová DNA byla linearizována restričním enzymem PvuI (1 U na 1 µg DNA) po dobu dvou hodin při 37°C. Jedna jednotka je definována jako množství enzymu potřebné k naštěpení 1 µg DNA za 1 hodinu při 37°C v reakční směsi o objemu 50 µl. Enzym PvuI štěpí DNA mezi bázemi thyminem a cytosinem. Kontrola linearizace byla provedena elektroforeticky v nativním agarózovém gelu.

### **Deproteinace**

Ke vzorku linearizované DNA byl přidán vychlazený fenol v poměru 1 : 1. Směs byla zvortexována a následně stočena (15 000 rpm) po dobu dvou minut. Směs se rozdělí na dvě fáze: vodnou fázi a organické rozpouštědlo. Vrchní vodnou fázi odebereme do čisté zkumavky. Ke vzorku bylo přilito CIA (chloroform: isoamylalkohol, 24 : 1) v poměru 1 : 1. Směs byla opět zvortexována a stočena. Horní fáze s DNA byla odebrána do čisté zkumavky.

### **Srážení**

Ke vzorku získaného deproteinací byla přidána 1/10 jeho objemu 3M octanu sodného (pH 5,5). Směs byla zvortexována a následně byl přidán 2,5 – 3 násobek objemu vymraženého 100% ethylalkoholu. Směs byla zvortexována a následně srážena 30 minut při – 20°C. Směs byla stočena (14 000 rpm) po dobu 30 minut při 4°C. Po stočení byl odebrán supernatant a k peletu bylo přidáno 200 µl vymraženého 80% ethylalkoholu a výsledná směs byla opět stočena (14 000 rpm) po dobu 30 minut při 4°C. Po posledním stočení byl opět odsán supernatant a pelet byl usušen v exikátoru.

### **Rozpouštění**

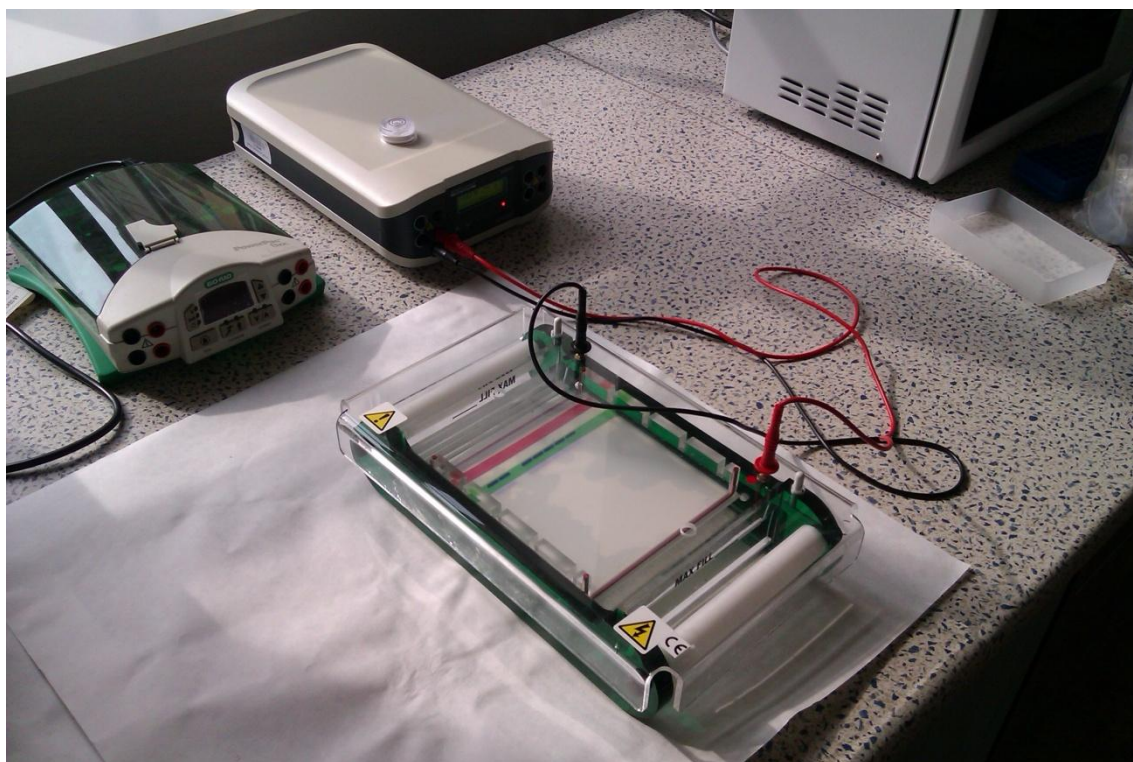
Vysušený vzorek po srážení byl rozpuštěn v TE pufru.

### **Elektroforéza v nativním agarózovém gelu**

1% (w) agarózový gel byl připraven rozvařením příslušného množství agarózy v TAE pufru. Agarózový gel byl vařen v Erlenmeyerově baňce po dobu 4 – 7 minut. Po



pomalém zchladnutí na teplotu přibližně 60°C byl gel nalit a ponechán 40 minut tuhnout. Před začátkem elektroforézy byl gel v elektroforetické vaně zalit TAE pufrem, který slouží jako elektrolyt. Pro zviditelnění čela byl ke vzorkům přidán roztok sacharózy a bromfenylové modři (1/6 objemu roztoku) a vzorky obsahující 0,25 µg DNA byly nanесeny na gel. Elektroforéza (Obr. 8) probíhala při intenzitě elektrického pole 0,8 V/cm po takovou dobu, aby barevné čelo doputovalo alespoň do poloviny délky gelu (obvykle 4 – 5 hodin). Barvení gelu bylo provedeno pomalým třepáním s vodným roztokem EtBr (c = 10 mg/ml) po dobu 20 minut. Následné odstranění přebytečného EtBr bylo provedeno pomalým třepáním v destilované vodě po dobu 30 minut. Obarvený gel byl prosvícen UV zářením a vyfocen zařízením Major science UV transluminátor. EtBr interkalovaný do DNA při ozáření emituje světlo oranžové barvy.



*Obr. 8 – Experimentální aparatura použitá pro elektroforézu*

### **Vyhodnocení experimentu**

Intenzita jednotlivých proužků na gelu byla vyhodnocena denzitometricky s využitím programu AIDA image analyzer software (Raytest, Germany).

## **Určení koncentrace DNA pomocí absorpční spektroskopie**

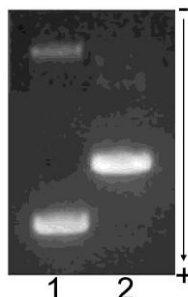
Nukleové kyseliny absorbují specificky UV-záření prostřednictvím konjugovaných elektronů, které se nacházejí nad a pod rovinou heterocyklických bází ve struktuře DNA a RNA. Charakteristické uspořádání elektronů vede k tomu, že je různě intenzivně absorbována energie fotonů různých vlnových délek. Pokud změříme absorbanci ( $A$ ) čistého vodného roztoku nukleových kyselin při různých vlnových délkách pomocí spektrofotometru a výsledek vyneseme do grafu, ve kterém je na ose  $x$  vlnová délka v nanometrech a na ose  $y$  intenzita absorpce, získáme charakteristickou křivku s typickým vrcholem při 260 nm. Absorbance vzorku přitom přímo závisí na množství nukleových kyselin v roztoku. Hodnotu absorbance při 260 nm ( $A_{260}$ ) můžeme využít k výpočtu koncentrace rozpuštěné nukleové kyseliny. Pokud má ovšem křivka jiný průběh, znamená to, že roztok obsahuje kromě nukleových kyselin také jiné příměsi absorbující UV, nejčastěji bílkoviny. Nejsnáze to lze posoudit podle poměru absorbancí při 260 a 280 nm, protože bílkoviny zvyšují  $A_{280}$  výrazněji než  $A_{260}$ . Pokud je vzorek znečištěn bílkovinami, které díky aromatickým aminokyselinám fenylalaninu a tyrosinu více absorbují při 280 nm, křivka se při 280 nm zvedá a poměr  $A_{260}/A_{280}$  klesá pod 2,0. Pro běžné použití v molekulární genetice postačí, když se čistota vzorku nukleových kyselin, vyjádřená poměrem  $A_{260}/A_{280}$  pohybuje mezi 1,8 a 2,0.

## **4. Výsledky a diskuze**

### **Příprava lineární DNA**

Pro provedení experimentů charakterizovaných v kapitole cíl práce je nezbytné použít lineární plazmidovou DNA. Plazmidová DNA, která byla izolována standardními procedurami, je kruhová, a proto je třeba lineární DNA pro další experimenty předem připravit. K tomuto účelu byla zvolena restriktáza PvuI, která štěpí cukrfofátovou vazbu DNA v sekvenci 5' CGAT $\nabla$ CG...3', kde symbol  $\nabla$  označuje místo rozštěpení. Linearizace byla provedena přidáním 20 U restriktázy PvuI k 250  $\mu$ g DNA pSP73KB v 1x NEB pufru 3 podle protokolu doporučeného dodavatelem enzymu. Reakční směs byla inkubována po dobu dvou hodin při 37°C. Poté byla provedena kontrola linearizace elektroforézou v nativním agarózovém gelu (viz Materiál a metody). Kontrolou bylo

ověřeno, že původní cirkulární DNA byla zcela naštěpena za vzniku jednoho lineárního vlákna, jak je vidět na Obr. 9



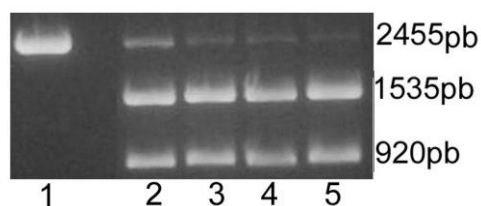
Obr. 9 – Kontrola linearizace DNA. Dráhy: dráha 1 – cirkulární DNA, dráha 2 – lineární DNA naštěpená enzymem *PvuI*

Poté, co bylo ověřeno, že veškerá cirkulární DNA byla rozštěpena a je v lineární formě, byl vzorek deproteinován, jak je popsáno v kapitole Materiál a metody, aby byly odstraněny veškeré molekuly enzymu. Tento krok je nezbytný pro další experimenty, protože komplexní sloučeniny platiny se váží k nukleofilním sloučeninám a mohou tedy reagovat i s bílkovinami (především s atomy síry a dusíku).

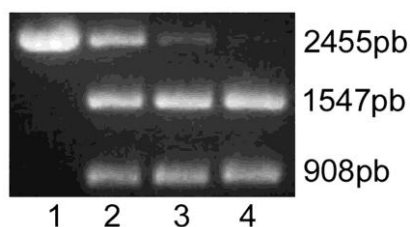
Po deproteinaci byla připravená DNA přesrážena, promyta a rozpuštěna v 0.01M NaClO<sub>4</sub>. Koncentrace DNA byla stanovena spektrofotometricky měřením absorbance při 260 nm. Celkem bylo získáno 151 µg lineární plazmidové DNA, výtěžek byl tedy 62 %. Čistota vzorku byla ověřena stanovením poměru absorbancí při 260 nm a 280 nm (A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>). Hodnota tohoto poměru byla 1,85. Vzorek tedy nebyl znečištěn příměsí bílkovin a mohl být použit k dalším experimentům.

### **Stanovení účinnosti restrikčního enzymu**

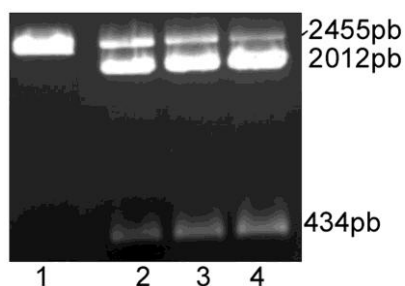
Pro získání srovnatelných výsledků pro jednotlivé restrikční enzymy je nutné zjistit optimální množství enzymu. Množstvím je myšlen počet jednotek enzymu, který je potřeba k DNA přidat, aby bylo naštěpeno přibližně 80 % DNA, tzn. nenaštěpené frakce zůstane přibližně 20 %. Jedna jednotka enzymu je definována jako množství enzymu, které za 1 hodinu při 37 °C naštěpí 1 µg DNA v celkovém objemu 50 µl. Výsledky pro jednotlivé restrikční enzymy jsou zobrazeny na Obr. 10 – 12



Obr. 10 – Optimalizace koncentrace enzymu *Bam*HI. Dráhy: dráha 1 – kontrola (lineární DNA), dráha 2 – 1 jednotka enzymu, dráha 3 – 3 jednotky enzymu, dráha 4 – 5 jednotek enzymu, dráha 5 – 7 jednotek enzymu

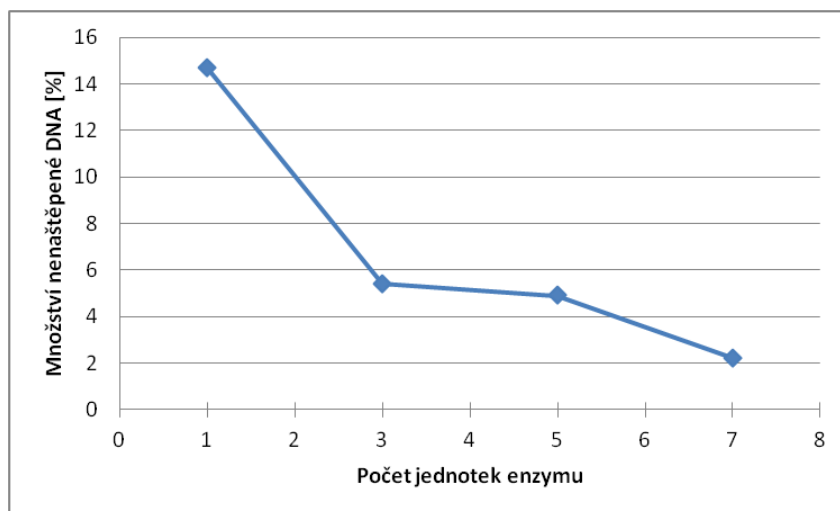


Obr. 11 – Optimalizace koncentrace enzymu *Eco*RI. Dráhy: dráha 1 – kontrola (lineární DNA), dráha 2 – 1 jednotka enzymu, dráha 3 – 3 jednotky enzymu, dráha 4 – 5 jednotek enzymu

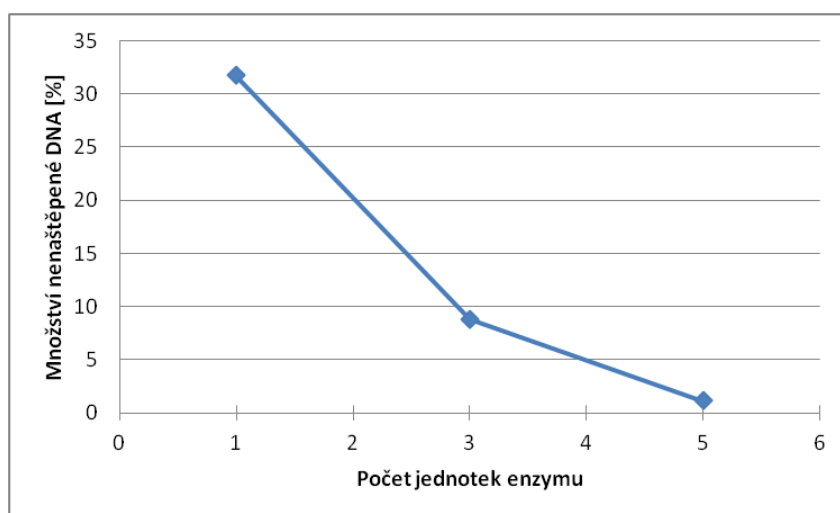


Obr. 12 – Optimalizace koncentrace enzymu *Ssp*I. Dráhy: dráha 1 – kontrola (lineární DNA), dráha 2 – 1 jednotka enzymu, dráha 3 – 3 jednotky enzymu, dráha 4 – 5 jednotek enzymu

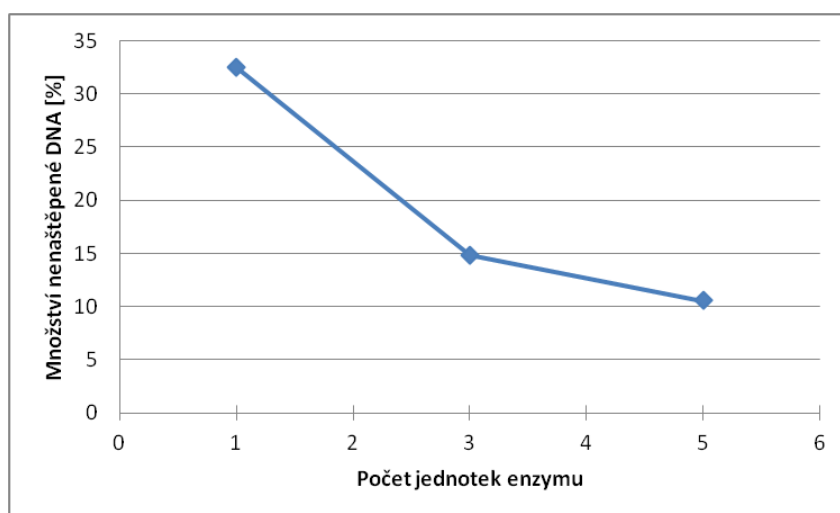
Vyhodnocením námi získaného elektroforetogramu Viz grafy 1 - 3 bylo určeno optimální množství všech tří testovaných restrikčních enzymů mezi 1 a 3 jednotkami. Pro experimenty s DNA modifikovanou komplexem *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(*R,R*-DACH)] byly proto použity vždy 2 jednotky příslušného restrikčního enzymu.



Graf 1 – Závislost množství nenaštěpené DNA na počtu jednotek enzymu BamHI



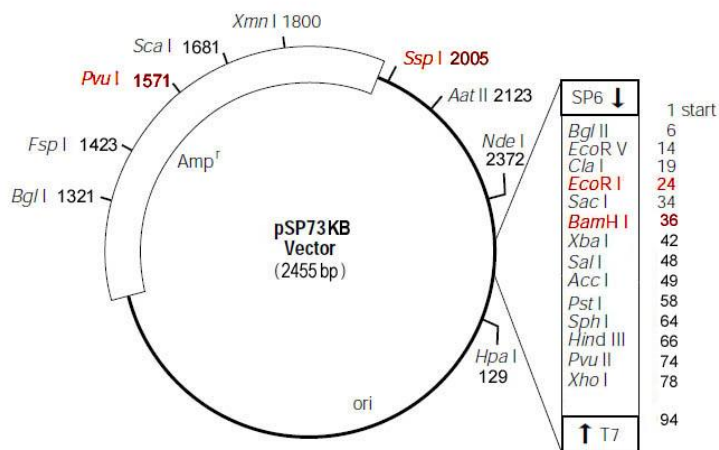
Graf 2 – Závislost množství nenaštěpené DNA na počtu jednotek enzymu EcoRI



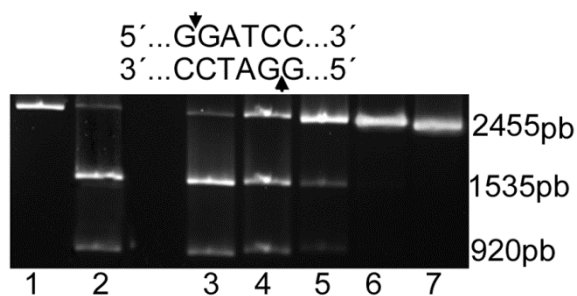
Graf 3 – Závislost množství nenaštěpené DNA na množství enzymu SspI

## Štěpení modifikované DNA

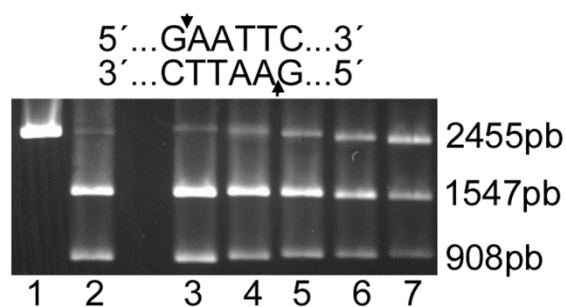
Pro stanovení sekvenční preference vazby oxaliplatinu na DNA byly použity tři restriktivní endonukleázy. Každý z námi použitých restriktivních enzymů štěpí DNA v jiném místě. BamHI štěpí DNA mezi dvěma guaniny, EcoRI mezi guaninem a adeninem a SspI mezi thyminem a adeninem. Na základě znalosti o velikosti inhibice a štěpicích místech jednotlivých restriktivních enzymů jsme schopni určit sekvenční preferenci námi použitého komplexu platiny. Důležité je také to, že použitý plazmid pSP73KB obsahuje pouze jediné štěpicí místo pro každou ze zvolených restriktáz, a to na pozici 45 pro BamHI, 24 pro EcoRI a 2014 pro SspI (viz restriktivní mapa plazmidu pSP73 KB na obrázku 13). Štěpením lineárního plazmidu kteroukoli z použitých restriktáz tak vzniknou vždy dva kratší fragmenty, které migrují v gelu díky své menší velikosti ve srovnání s celou, nenaštěpenou DNA rychleji, a jejich vznik tak může být na elektroforetickém gelu snadno sledován. Lineární plazmidová DNA byla nejprve modifikována postupem uvedeným v sekci Materiál a metody studovaným komplexem na různé úrovně modifikace tak, že obsahovala 1, 3, 5 nebo 7 molekul komplexu na 100 bází ( $r_b = 0.01, 0.03, 0.05$  a  $0.07$ ). Poté byly vzorky inkubovány s příslušným restriktivním enzymem a výsledky analyzovány na agarosovém gelu. Výsledky štěpení DNA modifikované  $[PtCl_2(R,R-DACH)]$  jednotlivými restriktivními enzymy jsou prezentovány na Obr. 14 – 16.



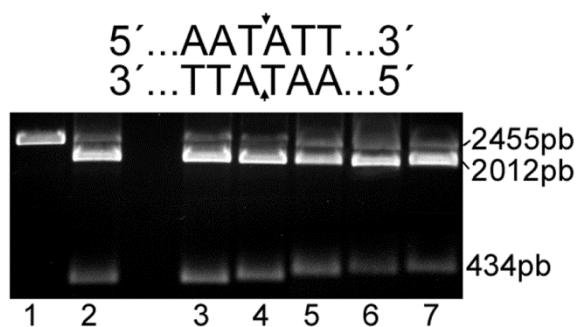
Obr. 13 – Restriktivní mapa plazmidu pSP73 KB



Obr. 14 – Štěpení DNA restričním enzymem BamHI. Dráhy: dráha 1 – kontrola (lineární DNA), dráha 2 – kontrola 2 (nemodifikovaná DNA naštěpená BamHI), dráha 3 –  $r_b = 0$ , dráha 4 –  $r_b = 0,01$ , dráha 5 –  $r_b = 0,03$ , dráha 6 –  $r_b = 0,05$ , dráha 7 –  $r_b = 0,07$



Obr. 15 – Štěpení DNA restričním enzymem EcoRI. Dráhy: dráha 1 – kontrola (lineární DNA), dráha 2 – kontrola 2 (nemodifikovaná DNA naštěpená EcoRI), dráha 3 –  $r_b = 0$ , dráha 4 –  $r_b = 0,01$ , dráha 5 –  $r_b = 0,03$ , dráha 6 –  $r_b = 0,05$ , dráha 7 –  $r_b = 0,07$



Obr. 16 – Štěpení DNA restričním enzymem SspI. Dráhy: dráha 1 – kontrola (lineární DNA), dráha 2 – kontrola 2 (nemodifikovaná DNA naštěpená SspI), dráha 3 –  $r_b = 0$ , dráha 4 –  $r_b = 0,01$ , dráha 5 –  $r_b = 0,03$ , dráha 6 –  $r_b = 0,05$ , dráha 7 –  $r_b = 0,07$

Poměrné intenzity jednotlivých proužků v gelech byly vyhodnoceny pomocí programu Aida Image Analyzer a získané výsledky jsou shrnuty v tabulkách (Tab. 1 –

3). Pro každý ze tří zvolených restričních enzymů byly provedeny dva nezávislé experimenty.

| Dráha | 1. Měření |         |        | 2. Měření |         |        |
|-------|-----------|---------|--------|-----------|---------|--------|
|       | 2455 pb   | 1535 pb | 920 pb | 2455 pb   | 1535 pb | 920 pb |
| 1     | 100,0%    | 0,0%    | 22,7%  | 100,0%    | 0,0%    | 0,0%   |
| 2     | 22,6%     | 54,7%   | 32,6%  | 16,6%     | 55,2%   | 28,2%  |
| 3     | 23,7%     | 43,7%   | 25,6%  | 18,6%     | 41,9%   | 39,5%  |
| 4     | 39,5%     | 34,9%   | 17,7%  | 35,2%     | 34,9%   | 29,9%  |
| 5     | 57,0%     | 25,3%   | 69,0%  | 55,3%     | 25,8%   | 19,8%  |
| 6     | 79,4%     | 13,6%   | 32,0%  | 86,3%     | 8,0%    | 5,7%   |
| 7     | 91,0%     | 58,0%   | 15,0%  | 96,4%     | 2,6%    | 1,0%   |

*Tab. 1 – Procentuální zastoupení jednotlivých fragmentů enzymu BamHI*

| Dráha | 1. Měření |         |        | 2. Měření |         |        |
|-------|-----------|---------|--------|-----------|---------|--------|
|       | 2455 pb   | 1547 pb | 908 pb | 2455 pb   | 1547 pb | 908 pb |
| 1     | 100,0%    | 0,0%    | 0,0%   | 100,0%    | 0,0%    | 0,0%   |
| 2     | 0,0%      | 66,5%   | 33,5%  | 0,0%      | 61,9%   | 38,1%  |
| 3     | 5,6%      | 61,0%   | 33,4%  | 0,9%      | 62,2%   | 36,9%  |
| 4     | 11,3%     | 59,2%   | 29,5%  | 4,3%      | 63,1%   | 32,6%  |
| 5     | 19,5%     | 54,7%   | 25,9%  | 14,4%     | 57,4%   | 28,3%  |
| 6     | 28,7%     | 47,6%   | 23,8%  | 24,8%     | 49,2%   | 26,0%  |
| 7     | 48,0%     | 35,9%   | 16,1%  | 48,2%     | 35,2%   | 16,6%  |

*Tab. 2 – Procentuální zastoupení jednotlivých fragmentů enzymu EcoRI*

| Dráha | 1. Měření |         |        | 2. Měření |         |        |
|-------|-----------|---------|--------|-----------|---------|--------|
|       | 2455 pb   | 2012 pb | 434 pb | 2455 pb   | 2012 pb | 434 pb |
| 1     | 100,0%    | 0,0%    | 0,0%   | 100,0%    | 0,0%    | 0,0%   |
| 2     | 41,6%     | 49,2%   | 9,2%   | 41,6%     | 49,2%   | 9,2%   |
| 3     | 8,9%      | 71,2%   | 19,9%  | 8,9%      | 71,2%   | 19,9%  |
| 4     | 9,3%      | 71,7%   | 19,0%  | 9,3%      | 71,7%   | 18,9%  |
| 5     | 11,3%     | 70,4%   | 18,3%  | 11,3%     | 70,4%   | 18,3%  |
| 6     | 9,0%      | 72,4%   | 18,6%  | 9,0%      | 72,4%   | 18,6%  |
| 7     | 13,1%     | 70,6%   | 16,3%  | 13,1%     | 70,6%   | 16,3%  |

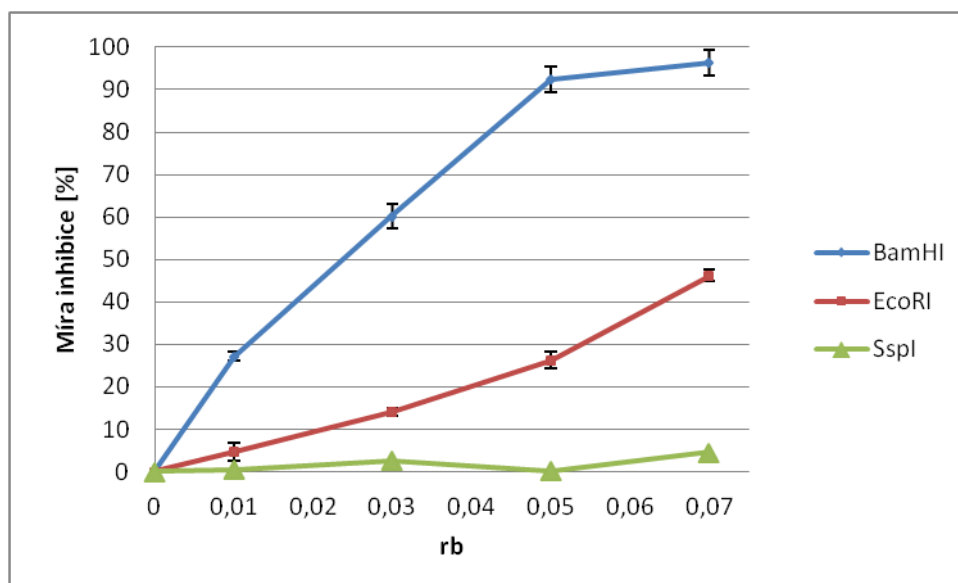
*Tab. 3 – Procentuální zastoupení jednotlivých fragmentů enzymu SspI*

Výsledky získané denzitometrickou analýzou elektroforetogramů (Obr. 14 – 16) byly pomocí vztahu



$$Inhibice = \left(1 - \frac{a+b}{c+d}\right) * 100\% \quad (1)$$

kde a = procentuální zastoupení prvního naštěpeného fragmentu pro dané  $r_b$ , b = procentuální zastoupení druhého naštěpeného fragmentu pro dané  $r_b$ , c = procentuální zastoupení prvního naštěpeného fragmentu pro  $r_b = 0$ , d = procentuální zastoupení prvního naštěpeného fragmentu pro  $r_b = 0$ , převedeny na inhibici v procentech. Hodnoty pro jednotlivé restriční enzymy jsou vyneseny v grafu 4.



Graf 4 – Výsledky štěpení DNA modifikované  $[PtCl_2(R,R-DACH)]$ . Body v grafu znázorňují hodnoty inhibice vypočítané jako průměr ze dvou nezávislých experimentů, úsečky znázorňují odchylku od průměru. V případě enzymu SspI jsou úsečky vyjadřující odchylku menší než velikost zobrazených bodů.

Výsledky ukazují, že modifikace DNA komplexem  $[PtCl_2(R,R-DACH)]$  nejvíce ovlivňuje štěpení enzymem BamHI. Enzym EcoRI byl ovlivněn méně a v případě restriktázy SspI se modifikace komplexem  $[PtCl_2(R,R-DACH)]$  projevila až při nejvyšším stupni modifikace, ale i při takto vysokém  $r_b$  byla inhibice enzymu velmi malá. Restriční endonukleáza, která byla inhibována nejvíce (BamHI), štěpí DNA v mezi dvěma sousedními guaninovými bázemi. Méně inhibovaná restriktáza EcoRI štěpí DNA mezi guaninem a sousedním adeninem. Z toho lze usoudit, že modifikace DNA komplexem  $[PtCl_2(R,R-DACH)]$  nejvíce inhibuje štěpení v těch sekvencích DNA, kde

se nachází guaninové zbytky, s větší preferencí pro sekvence GG oproti sekvenci 5'-GA. Tyto výsledky ukazují, že komplex [PtCl<sub>2</sub>(R,R-DACH)] se váže na DNA nejčastěji na dva sousední guaniny a méně často, i když také významně, na jeden guanin.

Naproti tomu restriční enzym SspI, štěpící DNA v sekvenci 5'-TA, nebyl ovlivněn téměř vůbec, což svědčí o tom, že komplex [PtCl<sub>2</sub>(R,R-DACH)] se na tato místa v DNA neváže, a proto štěpení touto restriktázou neinhibuje. Mírný inhibiční efekt bylo možno pozorovat až při relativně vysokém stupni modifikace DNA ( $r_b=0,07$ ), což může být způsobeno efektem, který byl již popsán dříve pro cisplatinu (Balcarová 1989) a který spočívá v tom, že přítomnost aduktu platinového komplexu inhibuje lineární difúzi enzymu po DNA a může tedy ovlivnit rychlost, s jakou se enzym dostane ke své specifické štěpící sekvenci i tehdy, není-li adukt umístěn přímo v této specifické sekvenci. Sekvenční preference, určená z výsledků v této práci pro komplex [PtCl<sub>2</sub>(R,R-DACH)] je tedy GG > GA >> TA.

## 5. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo pomocí metody, která umožňuje sledovat inhibici štěpení DNA modifikované platinovými cytostatiky restričními endonukleázami, určit sekvenční specifitu vazby oxaliplatiny na DNA. Získané výsledky ukázaly, že oxaliplatina se v DNA váže preferenčně na zbytky guaninu, především v sekvenci GG, méně na izolované G. Sekvenční preference oxaliplatiny je tedy velmi podobná preferenci cisplatinu.

## 6. Seznam literatury

- Mlcouskova, J., Kasparikova, J., Suchankova, T., Komeda, S. and Brabec, V. (2012) DNA conformation and repair of polymeric natural DNA damaged by antitumor azolato-bridged dinuclear Pt<sup>II</sup> complex. *J Inorg Biochem*, **114**, 15-23.
- Boulikas, T., Pantos, A., Bellis, E. Christofis, P. (2007) Designing platinum compounds in cancer: structures and mechanism. *Cancer Therapy*, **5**, 537 – 583
- Jung, Y. and Lippard, S.J. (2007) Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. *Chem Rev*, **107**, 1387-1407.
- Kelland, L. (2007) The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Rev Cancer*, **7**, 573-584.

- Brabec, V. and Kasparkova, J. (2005) DNA interactions of platinum anticancer drugs. Recent advances and mechanisms of action. In Perez-Martin, J.-M., Fuentes, M. A. and Alonso, C. (eds.), *Metal Compounds in Cancer Chemotherapy*. Research Signpost, Trivandrum, Kerala (India), pp. 187-218.
- Brabec, V. and Kasparkova, J. (2005) Platinum-based drugs. In Gielen, M. and Tiekink, E. R. T. (eds.), *Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents: The Use of Metals in Medicine*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, pp. 489-506.
- KLOUDA, Pavel. *Základy Biochemie*. Druhé, přepracované vydání. Ostrava: Pavel Klouda, 2005, 80 - 81. ISBN 80-86369-11-0.
- Malina, J., Novakova, O., Keppler, B.K., Alessio, E. and Brabec, V. (2001) Biophysical analysis of natural, double-helical DNA modified by anticancer heterocyclic complexes of ruthenium(III) in cell-free media. *J Biol Inorg Chem*, **6**, 435-445.
- Brabec, V. and Balcarová, Z. (1993) Restriction enzyme cleavage of DNA modified by platinum(II) complexes. *Eur J Biochem*, **216**, 183-187.
- Balcarova, Z., Mrazek, J., Kleinwächter, V. and Brabec, V. (1992) Cleavage by restriction enzymes of DNA modified with the antitumour drug cis-diamminedichloroplatinum(II). *Gen Physiol Biophys*, **11**, 579-588.
- Brabec V. (1990) Molekulární aspekty mechanismu protinádorového působení cisplatiny. *Biologické listy*, 55, 42 – 58
- Balcarova, Z. and Brabec, V. (1989) Agarose gel electrophoresis of fragments produced by digestion with restriction enzymes of pHC624 DNA modified by antitumor drug cisplatin. *Studia biophysica*, **130**, 59-62.
- Fichtinger-Schepman, A. M., van der Veer, J. L., den Hartog, J. H. J., Lohman, P. H. M., Reedijk, J. (1984) Adducts of the antitumdrug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formativ, identification and quantification. *Biochemistry*, 24, 707 – 713.
- Gel electrophoresis. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-2013, 25 April 2013 [cit. 2013-04-28]. Dostupné z: [http://en.wikipedia.org/wiki/Gel\\_electrophoresis](http://en.wikipedia.org/wiki/Gel_electrophoresis)