

## STUDY COVALENT INTERACTIONS FRAGMENT $\Lambda$ DNA WITH CISPLATIN

### STUDIUM KOVALENTNÍCH INTERAKCÍ FRAGMENTU $\Lambda$ DNA S CISPLATINOU

Nejdl L.<sup>1</sup>, Sochor J.<sup>1, 2</sup>, Jílková E.<sup>1</sup>, Šmerková K.<sup>1</sup>, Ryvolová M.<sup>1, 2</sup>, Adam V.<sup>1, 2</sup>, Kizek R.<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

<sup>2</sup>Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Technická 3058/10, 616 00 Brno, Czech Republic

E-mail: LukasNejd@gmail.com

---

#### ABSTRACT

This work was focused on monitoring of covalent cisplatin bonding with lambda DNA fragment. The PCR fragment with a length of 498 bp and 100  $\mu$ M cisplatin infusion solution was used. Interactions of DNA fragment were observed electrophoretically and spectrophotometrically. Experiments show, that during denaturation, cisplatin significantly reduces the melting temperature of DNA fragment. The average melting temperature was determined to 71 °C. After addition of cisplatin (100  $\mu$ M), temperature decreased by 15 °C on average.

**Key words:** DNA, cytostatic drugs, cisplatin, temperature melting, spectrophotometry, electrophoresis, electrochemistry

**Acknowledgments:** This work was supported by NanoBioTECell Czech Science Foundation P102/11/1068, IGA TP 6/2012 and CYTORES Czech Science Foundation P301/10/1068.

## ÚVOD

Cisplatin je jedním z nejběžnějších cytostatik využívaných při chemoterapii především nádorových onemocnění (Wang a Lippard, 2005). Úspěšnost komplexů platiny v protinádorové terapii je dána jejich schopností vázat se koordinační vazbou k bázím DNA za tvorby různých typů kovalentních vazeb (Chang, a kol., 2012). Právě vznik těchto vazeb má za následek ovlivnění sekundární struktury DNA a tím blokadu důležitých buněčných procesů jako je replikace či transkripce (Theile, a kol., 2012). Nejčastěji se vyskytující vazbou, která se v DNA vytváří, je vazba spojující dvě bezprostředně sousedící báze v jednom řetězci DNA, přednostně zbytky guaninu (Pierceall, a kol., 2012). Tyto změny vedou k nemožnosti dělení buněk. Další změny jsou pak rozpoznávány vazbou proteinů k DNA, která je modifikována cisplatinou, a tak zprostředkovávají protinádorový efekt tohoto léčiva (Davidson, a kol., 2012, Farnebo, a kol., 2009). Vstup cisplatin do buňky je umožněn zejména pasivní difúzí, ale existují i důkazy, že z části může být přenesena také aktivním transportem pomocí transportního systému Ctr1, který kontroluje homeostázi mědi (Mitchell, a kol., 2007, Oehlsen, a kol., 2005, Summa, a kol., 2007, Williams, a kol., 2007). Přestože v souvislosti s tímto protinádorovým léčivem bylo již vypracováno mnoho studií (Dospivova, a kol., 2012, Krizkova, a kol., 2007, Kukacka, a kol., 2008, Stejskal, a kol., 2007), stále není znám přesný mechanismus účinku tohoto léčiva.

Cílem našeho experimentu bylo studovat interakce cisplatin s DNA, naší snahou bylo určit, jakým způsobem je vlivem různých koncentrací cisplatin ovlivněna teplota tání DNA.

## MATERIÁL A METODIKA

### Amplifikace a izolace DNA fragmentu

Při amplifikaci byl použit Taq PCR kit a DNA (New England BioLabs, USA). Sekvence přímého primeru byla 5'-CCTGCTCTGCCGCTTCACGC-3' a sekvence zpětného primeru byla 5'-TCCGGATAAAAACGTCGATGACATTTGC-3' (Sigma-Aldrich, USA). PCR probíhala za těchto podmínek: počáteční denaturace při 95 °C/120 s; 25 cyklů denaturace při 95 °C/15 s, annealing při 64 °C/15 s, extenze při 72 °C/45 s a závěrečná extenze při 72 °C /5 min. Vzniklý fragment o délce 498 bp byl purifikován od zbytku PCR směsi pomocí MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, Germany). Koncentrace DNA byla zjištěna spektrofotometricky (Specord 210, Analytic Jena, Německo).

### Příprava vzorku (PCR-DNA s cisplatinou)

Fragment DNA o koncentraci 5 μM byl smíchán s cisplatinou 100 μM, poté se odstranila kovalentně nenavázaná cisplatin pomocí kolonky (Amicon Ultra – 0,5 ml 3K) a centrifugy (5417R, Ependorf) při 14000 RPM po dobu 10 min. Následně byl vzorek doplněn ACS vodou do

původního objemu (200  $\mu$ l) před centrifugací. Takto připravený vzorek byl zkoumán pomocí gelové elektroforézy a spektrofotometrie.

### Agarózová gelová elektroforéza

Byl připraven 1% agarózový gel (Mercury, USA), který byl nařezán na úzké proužky, jež obsahovaly 3 jamky, následně byl přenesen do elektroforetické vany, která obsahovala TAE pufr. Vzorky byly připraveny s 5% (v/v) bromfenolovou modří a 3% glycerolem. Vzorky byly napípetovány v 5  $\mu$ l alikvotech do gelu. DNA žebříček (New England BioLabs, USA) byl veliký od 0.1-1.5 kbp a byl použit pro pozorování velikosti analyzovaného DNA fragmentu. Elektroforéza (Bio-rad, USA) probíhala při 100 V a 6 °C po dobu 60 minut. Po separaci byl gel barven roztokem gel greenem (5  $\mu$ l na 100 ml gelu). Proužky byly vizualizovány pomocí gelového projektoru při vlnové délce 312 nm (Vilber-Lourmant, France).

### Spektrofotometrické stanovení

Interakce PCR-DNA s cisplatinou (100  $\mu$ M) byla sledována za pomoci spektrofotometru (SPECORD S600, Analytic Jena, Německo) s detektorem z diodového pole. Nejprve byl proveden sken DNA a DNA s přidanou cisplatinou (100  $\mu$ M) v rozsahu  $\lambda = 200 - 400$  nm, poté se vzorky denaturovaly. Denaturace probíhala v plně automatizovaném systému, který se skládal ze spektrofotometru (SPECORD S600, Analytic Jena, Německo), termostatu Peltier (Analytic Jena, Německo) řízeném počítačem a křemenných kyvet o optické dráze 1 cm. Při denuraci byla zaznamenávána absorbance při 260 nm každých 180 sekund v rozmezí teplot 23-89 °C (23, 26, 29, 32, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 78, 81, 84, 87 a 89 °C).

## VÝSLEDKY A DISKUZE

DNA fragment (498 bp) byl smíchán s roztokem cisplatiny (Ebwe) o koncentraci 100  $\mu$ M. Poté byl napípetován do kolony (Amicon Ultra – 0,5 ml 3K) a odstředěn centrifugou (5417R, Eppendorf). Takto pročištěný vzorek byl podroben spektrofotometrickému a elektroforetickému zkoumání. Fragments DNA a DNA-cis-Pt byly elektroforeticky separovány na 1% agarosovém gelu. Kontrolní fragment DNA měl velikost 498 párů bazí. Komplex DNA s navázanou cis-Pt způsobil zpomalení separace fragmentu. Z tohoto důvodu se objevuje v oblasti, ve které je DNA o velikosti 600 párů bazí (obr. C). Interakci fragmentu DNA s cisplatinou dokazuje také spektrofotometrický záznam (obr. B), kde došlo k poklesu signálu (b), z důvodu navázání cisplatin (13,3  $\mu$ g/ml) na fragment DNA. Koncentrace navázané platiny byla zjištěna elektrochemicky. Dále bylo prokázáno, že cisplatin významným způsobem snižuje teplotu tání při denuraci fragmentu DNA. Oddělení vodíkových vazeb (denaturace DNA) bylo sledováno pomocí hyperchromního efektu. Vlivem interakce elektronů v párových bazích roztoky dsDNA absorbují UV světlo (při 260 nm) méně, než stejná koncentrace bazí v mononukleotidech nebo v jednořetězcové DNA. Při zahřívání roztoku dsDNA, pak při určité teplotě absorbance náhle stoupne. Teplota, při které vzestup absorbance dosáhne své poloviny, se nazývá bod tání DNA ( $T_m$ ). Absorbance jednotlivých teplot při

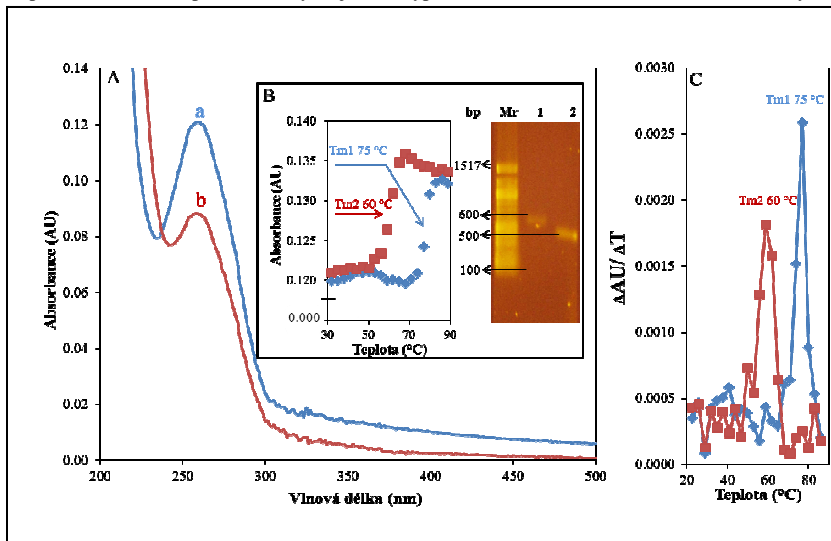
denaturaci byly zaneseny do grafu (obr. D), kde vytvořily typickou esovitou křivku, po derivaci hodnot jsme získali inflexní body (obr. C), které odpovídají  $T_m$  zkoumané DNA.

Průměrná teplota tání fragmentu DNA byla stanovena na 73 °C, po přidání cisplatiny (100  $\mu\text{M}$ ) teplota klesla v průměru o 15 °C, jak je vidět na obrázku 1B a 1C. Vliv délky interakce (0, 10, 20, 30, 40, 50 a 60 min.) cisplatiny (100  $\mu\text{M}$ ) na změnu denaturační teploty ( $T_m$ ) fragmentu DNA nebyl prokázán, ale se zvyšující se koncentrací cisplatiny došlo k poklesu  $T_m$ . (Obr. 2). Se zvyšující se aplikovanou dávkou cisplatiny se zvyšovalo navázané množství cisplatiny na fragment DNA. Hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 1.

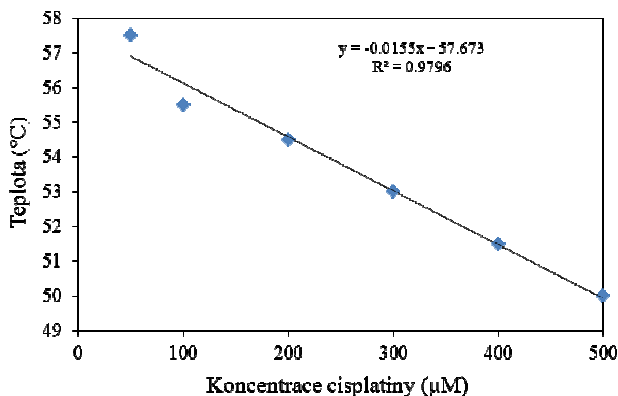
Tab. 1. Aplikovaná a navázaná cisplatina na fragment DNA

aplikovaná cisplatina (mM)	50	100	200	300	400	500
navázaná cisplatina (mM)	7,8	22,1	44,6	67,8	93,4	102,2

Obr. A) Spektrofotometrický záznam fragmentu DNA (a) a fragmentu DNA s cisplatinou (b) v rozsahu vlnových délek  $\lambda = 200 - 500 \text{ nm}$ . B) Denaturace fragmentu DNA s vyznačenou teplotou tání fragmentu DNA ( $T_{m1} = 75 \text{ °C}$ ) a fragmentu DNA s cisplatinou ( $T_{m2} = 60 \text{ °C}$ ), dále elektroforetická separace DNA s cis-Pt (1 = 600 bp) a fragmentu DNA (2 = 500 bp) na 1% agarosovém gelu. C) Grafické znázornění teploty tání fragmentu DNA ( $T_{m1}$ ) a fragmentu DNA s cisplatinou ( $T_{m2}$ ). Teplota ( $T_m$ ) byla zjištěna výpočtem inflexního bodu z denaturační křivky



Obr. 2. Závislost teploty denaturace ( $T_m$ ) fragmentu DNA na koncentraci cisplatinu. Teplota klesá v průměru o 1,5 °C v závislosti na aplikované koncentraci cisplatinu (50, 100, 200, 300, 400 a 500  $\mu\text{M}$ ).



## ZÁVĚR

Teplota, při níž hybridizace probíhá, je pro výsledek PCR kritická a musí být vhodně nastavena pro použitý pár primerů. V našem experimentu bylo prokázáno, že cisplatin ovlivňuje teplotu tání bez ohledu na délku interakce s fragmentem DNA. Se zvyšující se koncentrací cisplatinu byla u DNA zaznamenána snižující se teplota tání.

## LITERATURA

Davidson D., Grenier J., Martinez-Marignac V., Amrein L., Shawi M., Tokars M., Aloyz R., Panasci L. (2012): Effects of the novel DNA dependent protein kinase inhibitor, IC486241, on the DNA damage response to doxorubicin and cisplatin in breast cancer cells. *Investigational New Drugs*, 30(4): 1736-1742.

Dospivova D., Smerkova K., Ryvolova M., Hynek D., Adam V., Kopel P., Stiborova M., Eckschlager T., Hubalek J., Kizek R. (2012): Catalytic Electrochemical Analysis of Platinum in Pt-DNA Adducts. *International Journal of Electrochemical Science*, 7(4): 3072-3088.

Farnebo L., Jedlinski A., Ansell A., Vainikka L., Thunell L. K., Grenman R., Johansson A. C., Roberg K. (2009): Proteins and single nucleotide polymorphisms involved in apoptosis, growth control, and DNA repair predict cisplatin sensitivity in head and neck cancer cell lines. *International Journal of Molecular Medicine*, 24(4): 549-556.

Chang C. L., Lando D. Y., Fridman A. S., Hu C. K. (2012): Thermal stability of DNA with interstrand crosslinks. *Biopolymers*, 97(10): 807-817.

Krizkova S., Adam V., Petrova J., Zitka O., Stejskal K., Zehnalek J., Sures B., Trnkova L., Beklova M., Kizek R. (2007): A suggestion of electrochemical biosensor for study of platinum(II)-DNA interactions. *Electroanalysis*, 19(2-3): 331-338.

Kukacka J., Vajtr D., Fabrik I., Adam V., Prusa R., Kizek R. (2008): Effect of Cisplatin on Metallothionein Level in Rats. *Tumor Biology*, 29(60-60).

Mitchell C., Kabolizadeh P., Ryan J., Roberts J. D., Yacoub A., Curiel D. T., Fisher P. B., Hagan M. P., Farrell N. P., Grant S., Dent P. (2007): Low-dose BBR3610 toxicity in colon cancer cells is p53-independent and enhanced by inhibition of epidermal growth factor receptor (ERBB1)-Phosphatidyl inositol 3 kinase signaling. *Molecular Pharmacology*, 72(3): 704-714.

Oehlsen M. E., Hegmans A., Qu Y., Farrell N. (2005): Effects of geometric isomerism in dinuclear antitumor platinum complexes on their interactions with N-acetyl-L-methionine. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 10(5): 433-442.

Pierceall W. E., Olausson K. A., Rousseau V., Brambilla E., Sprott K. M., Andre F., Pignon J. P., Le Chevalier T., Pirker R., Jiang C., Filipits M., Chen Y., Kutok J. L., Weaver D. T., Ward B. E., Soria J. C. (2012): Cisplatin benefit is predicted by immunohistochemical analysis of DNA repair proteins in squamous cell carcinoma but not adenocarcinoma: theranostic modeling by NSCLC constituent histological subclasses. *Annals of Oncology*, 23(9): 2245-2252.

Stejskal K., Diopan V., Adam V., Beklova M., Havel L., Kizek R. (2007): Affecting of various plant models by cisplatin. *Listy Cukrovarnicke a Reparske*, 123(9-10): 328-329.

Summa N., Maigut J., Puchta R., Van Eldik R. (2007): Possible biotransformation reactions of polynuclear Pt(II) complexes. *Inorganic Chemistry*, 46(6): 2094-2104.

Theile D., Detering J. C., Herold-Mende C., Dyckhoff G., Haefeli W. E., Weiss J., Burhenne J. (2012): Cellular Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Relationship of Platinum Cytostatics in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Evaluated by Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 341(1): 51-58.

Wang D., Lippard S. J. (2005): Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(4): 307-320.

Williams J. W., Qu Y., Bulluss G. H., Alvorado E., Farrell N. P. (2007): Dinuclear platinum complexes with biological relevance based on the 1,2-diaminocyclohexane carrier ligand. *Inorganic Chemistry*, 46(15): 5820-5822.