

INVESTIGATION OF INTERACTION OF PLATINUM-BASED CYTOSTATIC DRUGS WITH DNA BY SANGER SEQUENCING

SLEDOVÁNÍ INTERAKCE PLATINOVÝCH LÉČIV S DNA POMOCÍ SANGEROVA SEKVENOVÁNÍ

Šmerková K.¹, Ryvolová M.^{1,2}, Krejčová L.¹, Adam V.^{1,2}, Kizek R.^{1,2}

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

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

E-mail: k.smerkova@centrum.cz

ABSTRACT

Platinum-based cytostatic drugs such as cisplatin, carboplatin and oxaliplatin play an important role in the battle with cancer. The mechanism of their activity is widely studied and the quantification of the drug incorporated in the DNA structure is in the center of attention. In this study we investigated the behavior of the platinum-based cytostatic drug and DNA adducts during the well established Sanger sequencing method involving capillary electrophoretic (CE) separation. Three selected platinum-based cytostatic drugs (cisplatin, carboplatin and oxaliplatin) were incubated with the DNA fragment (498 bp) to create adducts and subsequently sequenced. It was found that the fluorescence signal provided by fluorescently labeled DNA fragments decreased significantly depending on concentration of the drug. Moreover, even though four types of fluorescently labeled fragments are created during the sequencing reaction prior to the CE separation; similar decrease of the signal was observed in all of the fragment types. This suggests that cytostatic drugs do not influence the CE separation itself but the labeling sequencing reaction. Finally, the difference between three types of the cytostatic drugs was found. It follows from the results that to reach the signal decrease of 75% compared to the control DNA sample only 0.3 µg/ml of cisplatin is required. On the other hand, 7 and 75 µg/ml of oxaliplatin and carboplatin, respectively are required to reach the same effect. Our hypothesis was verified by electrochemical analysis and the highest amount of platinum was determined in the cisplatinated DNA sample followed by oxaliplatinated and carboplatinated DNA.

Key words: DNA, cytostatic drugs, cisplatin, oxaliplatin, carboplatin, DNA sequencing

Acknowledgments: The work has been supported by IGA FA MENDELU IP 19/2012.

ÚVOD

Rakovina je hlavní příčinou zdravotních problémů ve vyspělých zemích, kde je každé čtvrté úmrtí způsobeno nádorovým onemocněním (Siegel, a kol., 2012). Při léčbě nádorů se velmi často využívají jako chemoterapeutika i platinová léčiva, mezi která patří cisplatina, oxaliplatin a karboplatina (Wang a Lippard, 2005). V roce 1965 objevil Rosenberg biologické působení prvního platinového cytostatika pojmenovaného cisplatina (*cis*-Diamminedichloroplatinum(II)) (Rosenberg, a kol., 1965), která je stále jednou z nejčastěji používaných cytotoxických látek. “Druhá generace” platinových léčiv - karboplatina (*cisdiammine-1,1-cyclobutane dicarboxylate*) byla vyvinuta v 80. letech 20. století jako méně toxická alternativa cisplatin, slibující méně vážné vedlejší účinky (Go a Adjei, 1999). Cisplatina a karboplatina jsou velmi využívaná chemoterapeutika, která jsou zvláště účinná při léčbě rakoviny varlat, vaječníků, mozku, krku a plic. Nicméně cisplatina i karboplatina mají významné toxické a mutagenní účinky v buněčných kulturách a zvířecích modelových systémech (Adams, a kol., 1989, Holland, a kol., 1996). *In vivo* tvoří obě léčiva stejné Pt-DNA adukty a obecně je možné říci, že cisplatina není účinná ani na buněčné linie nebo nádory, které mají vyvinutou rezistenci ke karboplatině a naopak. Proto byla v 90. letech vyvinuta “třetí generace” – oxaliplatin (*(trans-R,R)*1,2-Diaminocyclohexaneoxalatoplatinum(II)), která nejen že umožňuje překonání rezistence k cisplatině a karboplatině (Grothey a Goldberg, 2004), ale navíc se zdá být méně mutagenní (Silva, a kol., 2005).

Již 35 let uplynulo od objevení elektroforetické metody sekvenování DNA využívající dideoxynukleotidy (Sanger, a kol., 1977). Sangerova technika sekvenování je založena na enzymatické syntéze řetězců DNA o různých délkách (Shendure, a kol., 2004). Replikace DNA probíhá až do místa inkorporace dideoxynukleotidu polymerázou, což ukončí syntézu kopií DNA (Eid, a kol., 2009). Tyto DNA produkty jsou pak elektroforeticky separovány a mohou být fluorescenčně detekovány. Sangerova metoda sekvenování je díky své přesnosti a efektivitě stále zlatým standardem ve výzkumu genomu (Guo, a kol., 2008). Analýzy Pt-DNA aduktů se běžně provádí pomocí elektrochemických metod (Dospivova, a kol., 2012, Krizkova, a kol., 2007), ale využití sekvenační reakce spojenou s gelovou kapilární elektroforézou znamená další možnost kvantifikace platinového cytostatika interkalovaného do DNA.

MATERIÁL A METODIKA

Amplifikace a izolace DNA fragmentu

Při amplifikaci byl použit *Taq* PCR kit a DNA izolovaná z bakteriofágu λ (New England BioLabs, USA). Sekvence přímého primeru byla 5'-CCTGCTCTGCCGCTTCACGC-3' a sekvence zpětného primeru byla 5'-TCCGGATAAAAACGTGCGATGACATTTGC-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).

Interakce DNA s cytostatiky

Roztok fragmentu DNA (100 $\mu\text{g/ml}$) byl smíchán s platinovými cytostatickými léčivy o různých koncentracích v poměru 1:1 (v/v) v prostředí 10 mM NaClO_4 . Byla použita tato léčiva: cisplatina (0,5 $\mu\text{g/ml}$; 1 $\mu\text{g/ml}$; 2 $\mu\text{g/ml}$; 4 $\mu\text{g/ml}$), oxaliplatin (10 $\mu\text{g/ml}$; 20 $\mu\text{g/ml}$; 30 $\mu\text{g/ml}$) a karboplatina (100 $\mu\text{g/ml}$; 150 $\mu\text{g/ml}$; 200 $\mu\text{g/ml}$; 300 $\mu\text{g/ml}$). Směs DNA s cytostatiky byla inkubována při 37°C po dobu 24 hodin (Thermomixer 5355, Eppendorf, Německo). Pro odstranění nenavázaného platinového léčiva byla následně u roztoku provedena dialýza oproti destilované vodě za použití 0,025 μm membrány (VSWP, Millipore, Irsko) po dobu 24 hodin při 6 °C.

Sekvenování platinované DNA

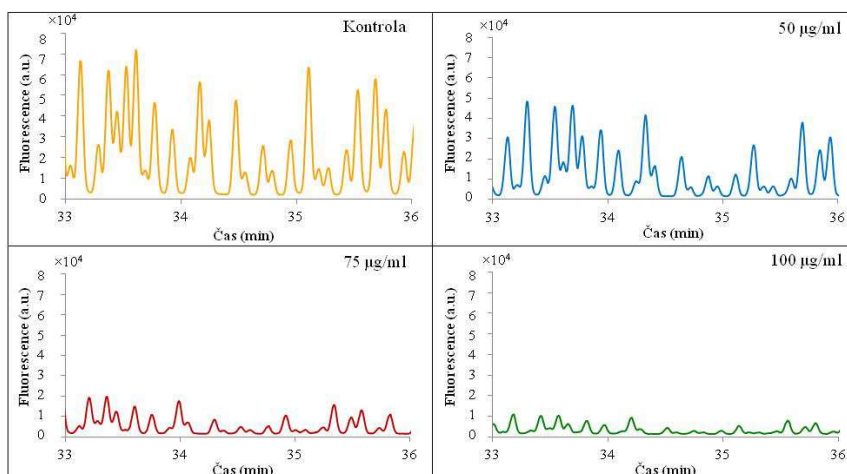
Pro přípravu sekvenáčnické směsi byl použit DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter, USA). Sekvenáčnická reakce o 30 cyklech probíhala v cykleru (Eppendorf, Německo). Podmínky reakce byly následující: 96 °C/20 s; 50 °C/20 s a 60 °C/4 minuty. Fluorescenčně značené DNA fragmenty byly purifikovány pomocí magnetizovatelných částic CleanSEQ (Beckman Coulter, USA). Sekvenování purifikovaných vzorků proběhlo na přístroji Genetic Analysis System CEQ 8000 (Beckman Coulter, USA). Po denuraci (90 °C/2 min) byly fluorescenčně značené DNA fragmenty separovány v 33 cm dlouhé kapiláře o vnitřním průměru 75 μm . Kapilára byla naplněna polyakrylamidovým denaturačním gelem. Separace probíhala 85 minut při teplotě 50 °C a napětí 4,2 kV.

VÝSLEDKY A DISKUZE

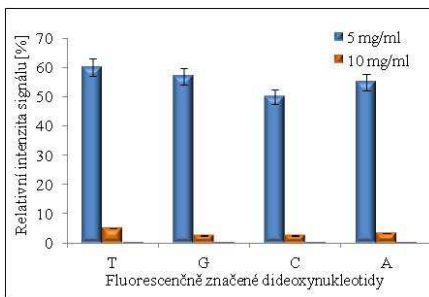
DNA fragment (498 bp) byl amplifikován pomocí reakce PCR a po dosažení požadované koncentrace byl inkubován s vybranými cytostatiky – cisplatinou, karboplatinou a oxaliplatinou o různých koncentracích. Takto vytvořené adukty byly podrobeny sekvenační reakci, která umožňuje fluorescenční značení DNA, a následně byly separovány pomocí kapilární elektroforézy s laserem indukovanou fluorescenční detekcí (CE-LIF). V porovnání s kontrolní DNA (bez navázaného cytostatika) byl pozorován výrazný pokles signálu guaninu v závislosti na koncentraci použitého cytostatika. Jak je vidět na příkladu karboplatiny (Obr. 1) při aplikaci 50 $\mu\text{g/ml}$ karboplatiny klesl průměrný signál guaninu o 50 % a při aplikaci 100 $\mu\text{g/ml}$ byl pokles signálu až o 80 %.

Bylo zjištěno, že cytostatika vázaná do DNA mají stejný vliv na CE-LIF signály všech DNA amplikonů nezávisle na druhu jejich fluorescenčního značení. Jinými slovy, nezáleží na typu fluorescenčně značeného dideoxynukleotidu, který ukončuje příslušný amplikon (Obr. 2). Takto získaná data naznačují, že začlenění platinového cytostatika nemá vliv na samotnou separaci pomocí CE-LIF, ale spíše na sekvenční reakci. S největší pravděpodobností dochází díky přítomnosti cytostatika ve struktuře DNA k omezení funkce polymerázy a tím ke vzniku nižšího počtu všech typů fluorescenčně značených amplikonů což odpovídá následnému snížení CE-LIF signálu.

Obr. 1: Výřez CE-LIF elektroferogramu DNA modifikované karboplatinou. Pokles fluorescenčního signálu guaninu po aplikaci různých koncentrací karboplatiny.



Obr 2: Relativní intenzita signálu fluorescenčně značených fragmentů s migračním čase 33-36 minut ukončených různými dideoxynukleotidy po aplikaci různého množství oxaliplatinu (15 $\mu\text{g/ml}$ oxaliplatinu vykazuje intenzitu signálu 0,1 %).



Pro zjištění vlivu jednotlivých druhů cytostatik, byly vytvořeny DNA adukty s cisplatinou, oxaliplatinou a karboplatinou. Z výsledků vyplývá, že koncentrace aplikovaných cytostatik potřebných k dosažení stejného vlivu na inhibici sekvenační reakce se výrazně liší. Pro snížení průměrné intenzity fluorescence o 75 % oproti kontrolnímu vzorku neplatinované DNA bylo potřeba použít karboplatinu o koncentraci 75 $\mu\text{g/ml}$, oxaliplatinu o koncentraci 7 $\mu\text{g/ml}$ a cisplatinu o koncentraci pouhých 0,3 $\mu\text{g/ml}$. Z toho lze jasně vidět schopnost jednotlivých platinových cytostatik tvořit adukty s DNA. Tyto závěry byly potvrzeny i pomocí elektrochemické analýzy použité pro stanovení platiny ve vzorcích DNA. Bylo ověřeno, že největší množství platiny bylo nalezeno ve vzorku cisplatinované DNA a nejmenší množství bylo stanoveno v karboplatinované DNA.

ZÁVĚR

S použitím metody Sangerova sekvenování byl pozorován vliv platinových cytostatik na DNA. Bylo zjištěno, že intenzita signálu klesá se vzrůstajícím obsahem cytostatika a že tento vliv je patrný stejnou měrou pro všechny typy fluorescenčně značených ampikonů. Z toho lze usuzovat, že dochází k inhibici sekvenační reakce. Na základě těchto výsledků lze usoudit, že metodu Sangerova sekvenování spojenou s CE-LIF analýzou lze použít pro kvantifikaci platinového cytostatika interkalovaného do struktury DNA.

LITERATURA

- Adams M., Kerby I. J., Rucker I., Evans A., Johansen K., Franks C. R. (1989): A comparison of the toxicity and efficacy of cisplatin and carboplatin advanced ovarian-cancer *Acta Oncologica*, 28(1): 57-60.
- 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. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 7(4): 3072-3088.
- Eid J., Fehr A., Gray J., Luong K., Lyle J., Otto G., Peluso P., Rank D., Baybayan P., Bettman B., Bibillo A., Bjornson K., Chaudhuri B., Christians F., Cicero R., Clark S., Dalal R., Dewinter A., Dixon J., Foquet M., Gaertner A., Hardenbol P., Heiner C., Hester K., Holden D., Kearns G., Kong X. X., Kuse R., Lacroix Y., Lin S., Lundquist P., Ma C. C., Marks P., Maxham M., Murphy D., Park I., Pham T., Phillips M., Roy J., Sebra R., Shen G., Sorenson J., Tomaney A., Travers K., Trulson M., Vieceli J., Wegener J., Wu D., Yang A., Zaccarin D., Zhao P., Zhong F., Korlach J., Turner S. (2009): Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules. *Science*, 323(5910): 133-138.
- Go R. S., Adjei A. A. (1999): Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. *J. Clin. Oncol.*, 17(1): 409-422.
- Grothey A., Goldberg R. M. (2004): A review of oxaliplatin and its clinical use in colorectal cancer. *Expert Opin. Pharmaco.*, 5(10): 2159-2170.
- Guo J., Xu N., Li Z. M., Zhang S. L., Wu J., Kim D. H., Marma M. S., Meng Q. L., Cao H. Y., Li X. X., Shi S. D., Yu L., Kalachikov S., Russo J. J., Turro N. J., Ju J. Y. (2008): Four-color DNA sequencing with 3'-O-modified nucleotide reversible terminators and chemically cleavable fluorescent dideoxynucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(27): 9145-9150.
- Holland H. K., Dix S. P., Geller R. B., Devine S. M., Heffner L. T., Connaghan D. G., Hillyer C. D., Hughes L. L., Miller R. L., Moore M. R., Winton E. F., Wingard J. R. (1996): Minimal toxicity and mortality in high-risk breast cancer patients receiving high-dose cyclophosphamide, thiotepa, and carboplatin plus autologous marrow stem-cell transplantation and comprehensive supportive care. *Journal of Clinical Oncology*, 14(4): 1156-1164.
- Krizkova S., Adam V., Petrlova 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.
- Rosenberg B., Van Camp L., Krigas T. (1965): Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*, 205(698-699).
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12): 5463-5467.

MENDELNET 2012

Shendure J., Mitra R. D., Varma C., Church G. M. (2004): Advanced sequencing technologies: Methods and goals. *Nature Reviews Genetics*, 5(5): 335-344.

Siegel R., Naishadham D., Jemal A. (2012): *Cancer Statistics, 2012*. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*, 62(1): 10-29.

Silva M. J., Costa P., Dias A., Valente M., Louro H., Boavida M. G. (2005): Comparative analysis of the mutagenic activity of oxaliplatin and cisplatin in the Hprt gene of CHO cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 46(2): 104-115.

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