

MASARYKOVA UNIVERZITA

Přírodovědecká fakulta

Ústav experimentální biologie

Oddělení mikrobiologie

Reparace plazmidové DNA v buňkách *E. coli* po působení

UV záření a cytostatik

(Diplomová práce magisterského studijního programu

Biologie oboru Obecná biologie – směr Mikrobiologie)

Adéla Illichmanová

Brno 2006

Ráda bych touto cestou poděkovala RNDr. Marii Vojtíškové CSc. za odborné vedení a čas, který mi věnovala při vypracování této diplomové práce. Zároveň bych chtěla poděkovat prof. RNDr. Viktorovi Brabcovi DrSc. za umožnění provádět tuto práci na Biofyzikálním ústavu AV ČR a Mgr. Ludmile Tvrzové Ph.D. za přístup k mikroskopu.

OBSAH

Zkratky a vysvětlivky	4
1. ÚVOD	5
2. TEORETICKÁ ČÁST	6
2.1. Význam <i>E. coli</i> při studiu reparačních procesů	6
2.2. UV záření	7
2.2.1. Poškození DNA indukovaná UV zářením	7
2.2.1.1. Cyklobutan-pyrimidinové dimery a 6-4 pyrimidin-pyrimidon fotoprodukty	8
2.2.1.2. Meziřetězcové křížové vazby	9
2.2.2. Možnosti odstranění lézí na DNA způsobených UV zářením	9
2.3. Cytostatika	10
2.4. Platinová cytostatika	10
2.4.1. Mechanismus účinku cisplatiny v buňce	11
2.4.2. Interakce cisplatiny s DNA	12
2.4.2.1. Typy DNA aduktů	12
2.4.2.2. Konformační změny na DNA po vytvoření platinových aduktů	13
2.4.3. Interakce cisplatiny s proteiny	14
2.4.4. Možnosti odstranění DNA lézí způsobených cisplatinou	15
2.4.5. Rezistence k cisplatině	16
2.5. Mechanizmy reparace poškozené DNA	16
2.6. Ochrana buňky před účinkem UV a cisplatinových aduktů	17
2.6.1. Nukleotidová excizní reparace	17
2.6.1.1. NER u <i>E. coli</i> : UvrABC systém	18
2.6.1.2. Mechanismus NER	20
2.6.1.3. Vliv topologie DNA na NER	22
2.6.2. Homologní rekombinace	22
2.6.3. SOS systém	23
2.7. Plazmid pUC19	23
2.7.1. Modifikace superhelikální DNA cisplatinou <i>in vitro</i>	24
2.7.2. Modifikace superhelikální DNA cisplatinou <i>in situ</i>	25
3. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	26
4. MATERIÁL A METODY	27
4.1. Použité mikroorganismy	27
4.2. Chemikálie	27

4.3. Kultivační média, roztoky a pufry.....	28
4.3.1. Kultivační média	28
4.3.2. Roztoky a pufry	29
4.3.2.1. Roztoky potřebné k izolaci plazmidové DNA pomocí kitu od firmy QIAGEN	29
4.3.2.2. Roztoky použité při transformaci plazmidové DNA pUC19 do buněk <i>E. coli</i> ..	30
4.3.2.3. Elektroforetický pufr pro neutrální agarózovou gelovou elektroforézu	30
4.3.2.4. Roztoky a pufry použité při alkalické denaturační elektroforéze	31
4.3.2.5. Roztoky a pufry použité při SDS-PAGE	32
4.3.2.6. Roztoky a pufry použité při EMSA	33
4.3.2.7. Ostatní roztoky a pufry	33
4.3.2.8. Elektroforetické gely.....	34
4.4. Přístroje a pomůcky.....	35
4.5. Metody	35
4.5.1. Transformace plazmidové DNA	35
4.5.2. UV test; citlivost izogenních kmenů k UV záření.....	36
4.5.3. Mikroskopie buněk <i>E. coli</i>	36
4.5.4. Izolace plazmidové DNA.....	37
4.5.4.1. Izolace plazmidové DNA pomocí kitu od firmy QIAGEN	37
4.5.4.2. Mini izolace plazmidové DNA pomocí kitu od firmy QIAGEN.....	38
4.5.4.3. Izolace plazmidové DNA fenol-chloroformovou extrakcí	38
4.5.4.4. Uvolnění plazmidové DNA z buněk za nedenaturačních podmínek	39
4.5.5. Detekce DNA topoizomerů pomocí 2D elektroforézy.....	39
4.5.6. <i>In situ</i> modifikace buněk cisplatinou	40
4.5.7. Srážení plazmidové DNA.....	40
4.5.8. Stanovení čistoty a koncentrace DNA.....	41
4.5.9. Gelová elektroforéza DNA	42
4.5.9.1. Neutrální agarózová gelová elektroforéza	42
4.5.9.2. Alkalická denaturační elektroforéza pro detekci IECL aduktů.....	43
4.5.10. Štěpení DNA restrikčními enzymy	43
4.5.11. Denaturace plazmidové DNA	43
4.5.12. SDS-PAGE proteinů.....	44
4.5.13. Metoda pro detekci změny elektroforetické pohyblivosti DNA po interakci s proteiny (EMSA)	44
5. VÝSLEDKY	46
5.1. Analýza plazmidové DNA a spektra proteinů po působení UV záření na buňky <i>E. coli</i>	46

5.1.1. Analýza plazmidové DNA pUC19 z buněk <i>E. coli</i> po <i>in vitro</i> a <i>in situ</i> ozáření UV světlem	46
5.1.2. Detekce IECL na plazmidové DNA ozářené UV světlem pomocí alkalické denaturační gelové elektroforézy	48
5.1.3. Detekce poškození na plazmidové DNA po ozáření UV světlem pomocí retardační analýzy metodou EMSA	49
5.1.4. Analýza exprese proteinů v průběhu reparace buněk po <i>in situ</i> ozáření UV světlem.	53
5.2. Sledování reparačních procesů buněk <i>E. coli</i> po působení cisplatiny.....	54
5.2.1. Mikroskopie buněk <i>E. coli</i> po <i>in situ</i> modifikaci cisplatinou.....	54
5.2.2. Růst buněk <i>E. coli</i> po <i>in situ</i> modifikaci cisplatinou a následné rekultivaci v LB médiu.....	55
5.2.3. Transformace kmenů <i>E. coli</i> WP2 a <i>E. coli</i> WP2uvrA plazmidovou DNA pUC19 modifikovanou cisplatinou.....	57
5.2.4. Sledování reparačních pochodů v buňkách <i>E. coli</i> po <i>in situ</i> modifikaci plazmidové DNA cisplatinou.....	58
5.2.4.1. Stanovení výtěžku plazmidové DNA pUC19 z buněk <i>E. coli</i> v průběhu reparačních procesů	59
5.2.4.2. Analýza plazmidové DNA pUC19 z buněk <i>E. coli</i> po <i>in situ</i> modifikaci cisplatinou a následné rekultivaci v LB médiu v průběhu <i>in vivo</i> reparace.....	60
5.2.4.3. Detekce IECL aduktů pomocí alkalické denaturační gelové elektroforézy	62
5.2.4.4. Interakce plazmidové DNA pUC19 modifikované cisplatinou s proteinem HMGB1b7.....	64
5.2.4.5. Analýza exprese proteinů v průběhu reparace modifikovaných buněk <i>E. coli</i> ..	65
6. DISKUZE.....	67
7. ZÁVĚR.....	75
8. LITERATURA.....	76

Zkratky a vysvětlivky

6-4 PP	6-4 pyrimidin-pyrimidon fotoprodukty
APS	persíran amonný
ATP	adenozin-5'-trifosfát
ATP- γ -S	adenozin 5'-(gamma-tio)trifosfát
BSA	albumin bovinního séra
cisDDP	cis-diamindichlorplatina
CPD	cyklobutan-pyrimidinové dimery
DTT	ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina
EtBr	etidium bromid
HEPES	N-2-hydroxyetylpiiperazin-N`-2-etansulfonová kyselina
IACL	vnitrořetězcová křížová vazba (intrastrand cross-link)
IECL	meziřetězcová křížová vazba (interstrand cross-link)
<i>in situ</i> modifikace	inkubace buněk z exponenciální fáze v roztoku cisplatiny
<i>in vitro</i> modifikace	modifikace izolované DNA roztokem cisplatiny
K	kontrola
kap.	kapitola
LB	kultivační médium „lysogeny broth“
MOPS	3-(N-morfolino)propan sulfonová kyselina
NER	nukleotidová excizní reparace
obr.	obrázek
oc DNA	ds DNA se zlomem v jednom řetězci (open circle)
rekultivace	kultivace <i>in situ</i> modifikovaných buněk v čerstvém LB médiu
sc DNA	superhelikální (supercoiled) DNA
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektrofoéza s dodecylsulfátem sodným
ss DNA	jednořetězcová (single strand) DNA
tab.	tabulka
TAE	tris-acetátový elektroforetický pufr
TBE	tris-borátový elektroforetický pufr
TEMED	tetrametyletylendiamin
Tris	2-amino-2-hydroxymetyl-1,3-propandiol
UV záření	ultrafialové záření
wt	divoký typ (wild type)

1. ÚVOD

Protinádorový účinek cisplatiny byl náhodně objeven v roce 1964. Od doby, kdy se začala využívat jako cytostatikum v klinické praxi, se stále hledají cesty ke zvýšení jejího terapeutického účinku.

Cytotoxický účinek cisplatiny se odvíjí od její schopnosti vytvářet kovalentní adukty na DNA. Ty ovšem mohou být z DNA odstraněny reparačními procesy buňky, především nukleotidovou excizní reparací (NER), což ve svém důsledku vede ke snížení žádaného terapeutického účinku. Proto je věnována značná pozornost studiu možností potlačení reparačních pochodů v nádorových buňkách na základě hlubšího poznání molekulárních mechanismů zúčastněných procesů a vzájemné úlohy jednotlivých reparačních systémů. Výrazný pokrok v pochopení reparačních systémů nádorových buněk byl umožněn na základě znalostí získaných dlouhodobým výzkumem těchto procesů u buněk bakteriálních, především na modelovém systému *E. coli*. Pochopíme-li, jak buňky reagují na poškození DNA, která mohou být vyvolána různými vlivy vnějšího prostředí, mohou nám tyto informace dopomoci k nalezení účinnějších látek, které mohou být využity jako protinádorová léčiva.

V rámci této diplomové práce je sledován účinek reparačních pochodů *in vivo* po působení cisplatiny nebo UV záření na modelovém systému izogenních kmenů *E. coli* s transformovaným plazmidem pUC19. Přispívá k rozšíření znalostí o mechanismu odstranění poškození na DNA, která jsou vyvolána působením UV záření a cisplatiny, na úrovni plazmidové DNA *in vivo*.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Význam *E. coli* při studiu reparačních procesů

Bakterie *Escherichia coli* je stále nejdůležitějším experimentálním organizmem při studiu DNA reparačních procesů, kterými jsou opravována poškození, vzniklá jak vlivem vnějších podmínek (např. UV záření), tak i v buňce (např. chyby při replikaci, transkripci apod.). Jedním z nejlépe charakterizovaných a prostudovaných DNA reparačních drah u *E. coli* i u vyšších organismů je nukleotidová excizní reparace (NER), odstraňující poškození na DNA způsobená účinkem UV záření nebo některých chemických látek. Současné molekulárně biologické metody umožnily určit a charakterizovat jednotlivé proteiny účastnící se oprav poškození DNA a umožnily také lépe porozumět funkci opravných mechanismů buňky (Zou a kol., 2003).

Geny kódující reparační proteiny účastnící se nukleotidové excizní opravy v eukaryotických buňkách vykazují značnou homologii s reparačními proteiny bakterií *E. coli* (Uvr proteiny) a mají také obdobné funkce. Proto nám studie reparačních procesů u *E. coli* usnadňují pochopení těchto procesů i u vyšších organismů (Van Houten, 1990).

Studium molekulární povahy nukleotidové excizní reparace u *E. coli* umožnilo vývoj nových postupů, které mohou být aplikovány na studium podobných procesů u eukaryot. Přestože díky provedeným *in vitro* experimentům se podařilo více objasnit jednotlivé kroky NER, mnoho důležitých otázek ohledně kinetiky tohoto procesu zůstává nezodpovězeno. Zejména je důležité si uvědomit, že jevy probíhající uvnitř buněk jsou mnohem komplexnější než ty, které provedeme ve sterilním prostředí laboratorní zkumavky. Porozumění reparačním procesům u *E. coli* nám slouží jako koncepční rámec pro porozumění těmto procesům u buněk lidských s ohledem na to, že reparační procesy u eukaryotických organismů, přestože jsou podobné těm u buněk prokaryotických, mají své vlastní charakteristické rysy. I když byly jednotlivé kroky nukleotidové excizní reparace u *E. coli* díky purifikovaným proteinům již popsány *in vitro*, o procesech, které probíhají přímo v buňce a o enzymologii obdobných jevů u eukaryotických buněk víme daleko méně a je třeba jejich dalšího podrobného studia (Van Houten a kol., 2005).

Pro výzkum buněčných reparačních systémů má značný přínos studium těchto procesů pomocí reparačně deficientních mutant bakterií (Janovská a Kleinwächter 1986, Janovská a kol., 2002). Tyto mutantní kmeny vykazují vůči UV záření nebo látkám jako je cisplatina zvýšenou citlivost díky tomu, že nejsou z DNA schopny vytvořené léze odstranit nebo je odstraňují s mnohem nižší efektivitou. Experimenty s mutantními kmeny *E. coli* a sledováním jejich křivek přežití již koncem 60. let jasně prokázaly význam některých proteinů při opravě lézí DNA (Roat-

Malone, 2002). Těmito experimenty bylo například umožněno zjištění klíčové role proteinů UvrA, UvrB a UvrC při nukleotidové excizní reparaci (Grossman a kol., 1998) i význam proteinu rec A nejen při homologní rekombinaci (Delmas a Matic, 2005). Velkým usnadněním současného výzkumu reparačních mechanismů buňky je možnost přípravy purifikovaných proteinů za pomoci rekombinantních technologií a definovaných médií. Při studiu mechanismů *in vivo* opravy poškození DNA po zásahu vnějších činitelů můžeme samotný proces ovlivňovat zvolením různých podmínek experimentu a můžeme tak sledovat vliv různých komponent vnějšího prostředí na průběh reparace (Van Houten a kol., 2005).

2.2. UV záření

Jak již bylo výše zmíněno, jedním z nejlépe prostudovaných reparačních mechanismů u buněk *E. coli* je oprava po působení UV záření.

Ultrafialové (UV) záření je elektromagnetické vlnění o vlnové délce $\lambda = 10\text{-}400$ nm. Podle vlnové délky rozlišujeme záření tři typy UV záření: UV-A, UV-B a UV-C (Madronich a kol., 1998).

Záření UV-C (<280 nm) má značný germicidní účinek, ale je absorbováno kyslíkem a ozonem v zemské atmosféře a není z ekologického hlediska významné. Také záření UV-B (280-315 nm) a UV-A (315-400 nm) má na organizmy značný vliv, přestože většina UV-B je pohlcena ozonovou vrstvou Země. Nepříznivé účinky na živé systémy jsou připisovány záření UV-B, které je absorbováno buněčnou DNA. Záření UV-A je v indukci poškození DNA méně efektivní, neboť není absorbováno nativní DNA, ale stále může způsobit sekundární reakce existujících DNA fotoproduktů, nebo může poškodit DNA skrze nepřímé fotosenzitivizující reakce (Sinha a Häder, 2002).

Poškození DNA způsobená UV zářením mají cytotoxický i genotoxický efekt. Ozáření buněk UV světlem vytváří fotoprodukty na genomu *E. coli*, následkem čehož některé bakterie ztratí viabilitu (schopnost tvorby kolonií), nebo zůstanou viabilní jako mutantní buňky (Burger a kol., 2002).

2.2.1. Poškození DNA indukovaná UV zářením

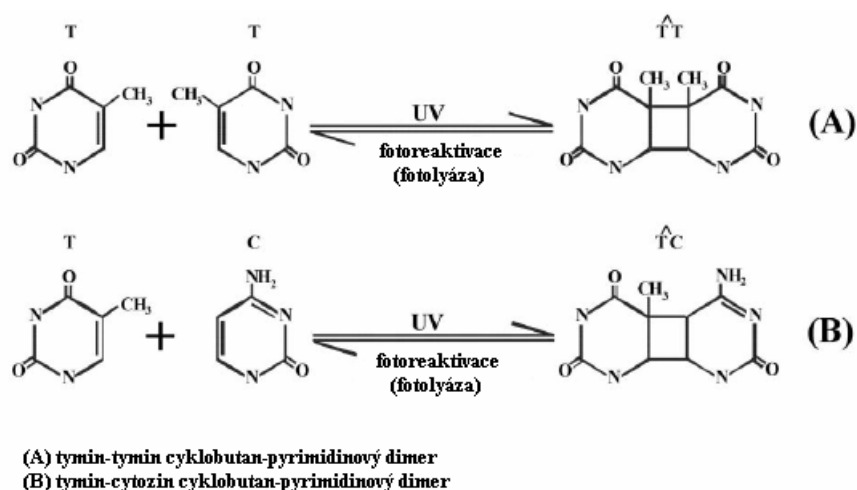
Nejčastějšími poškozeními DNA, která jsou indukována UV zářením, jsou cyklobutan-pyrimidinové dimery (CPD) (obr. 1) a 6-4 pyrimidin-pyrimidon fotoprodukty (6-4PP) a jejich Dewarovy valenční izomery (obr. 2). Po působení UV záření o vlnové délce v rozmezí 200-

290 nm se nejhojněji vyskytují CPD, které jsou pravděpodobně také nejvíce cytotoxické. 6-4PP mají také závažné mutagenní účinky, jenž mohou být pro buňku letální (Sinha a Häder, 2002). UV záření především za podmínek *in vitro* způsobuje tvorbu křížových vazeb mezi komplementárními řetězci DNA (IECL), které mohou rovněž přispívat k biologickým a patologickým jevům způsobovaným UV zářením (Nejedlý a kol., 2001).

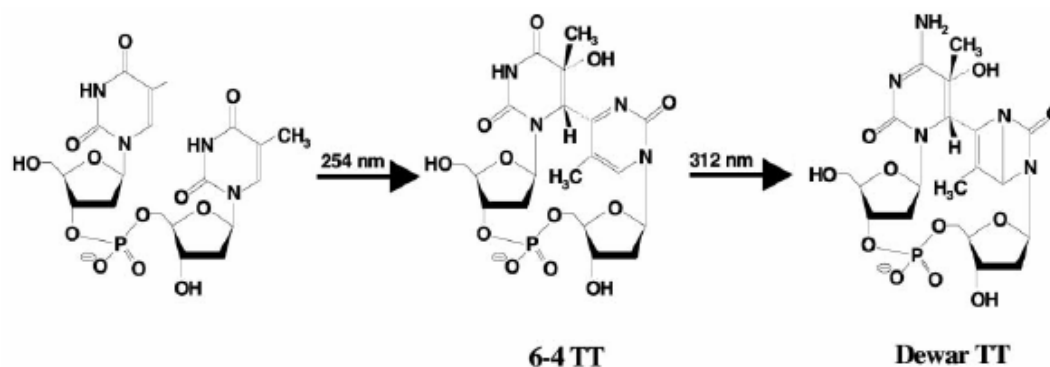
2.2.1.1. Cyklobutan-pyrimidinové dimery a 6-4 pyrimidin-pyrimidon fotoprodukty

Cyklobutan-pyrimidinové dimery (CPD) a 6-4 pyrimidin-pyrimidon fotoprodukty (6-4PP) způsobují deformaci dvoušroubovice DNA. Indukují ohyb DNA o 7-9° (u CPD) a 44° (u 6-4PP). Schopnost UV záření poškodit danou bázi je určována flexibilitou DNA. Povaha báze hraje klíčovou roli, jelikož distribuce dimerických fotoproduktů je značně závislá na geometrii pyrimidinových bází. Sekvence, které umožňují ohýbání a odvíjení DNA, jsou upřednostňovány při tvorbě poškození. Například CPD se častěji tvoří na jednořetězcové DNA a na ohebných koncích poly(dA)-(dT) úseků, ale ne v jejich neohebném centru. Tvorba CPD je méně častá, pokud dochází k ohýbání DNA směrem k menšímu žlábků (Sinha a Häder, 2002).

CPD inhibují činnost DNA polymeráz. Činnost savčí RNA polymerázy II je inhibována jak CPD, tak i 4-6PP (Mitchell a kol., 1989). Pokud nedojde k reparaci, jediný CPD stačí ke kompletní eliminaci exprese transkripční jednotky. Bylo dokázáno, že zablokovaná RNA polymeráza II zůstává navázána v místě překážky. Perzistující léze tedy mohou způsobit nejenom snížení celkové koncentrace volné RNA polymerázy, ale mohou také zamezit transkripci genů, na kterých je lokalizována. Každý CPD působí jako zablokování transkripce a replikace a jen malá část dimerů má za následek mutaci (Sinha a Häder, 2002).



Obr. 1: Tvorba cyklobutan-pyrimidinových dimerů indukovaná působením UV záření (Sinha a Häder, 2002)



Obr. 2: Tvorba 6-4 pyrimidin-pyrimidon fotoproduktů a jejich Dewarových valenčních izomerů (Sinha a Häder, 2002)

2.2.1.2. Meziřetězcové křížové vazby

Meziřetězcové křížové vazby (IECL) vznikají s mnohem nižší četností než vnitřetězcové tyminové dimery. Mechanismus vzniku IECL není dosud podrobně znám. Pyrimidinové báze jsou příliš malé na to, aby se k sobě mohly přiblížit natolik, aby mohla vzniknout křížová vazba, pokud jsou lokalizovány na opačných řetězcích DNA šroubovice. Tvorba křížových vazeb mezi komplementárními řetězci DNA vyvolaná UV zářením se zvyšuje se zvyšujícím se obsahem (A+T), avšak molekuly DNA, které jsou tvořeny výhradně AT páry, tj. (AT) $_n$ ·(AT) $_n$ a (A) $_n$ ·(T) $_n$, jsou k tvorbě meziřetězcových křížových vazeb rezistentní (Nejedlý a kol., 2001).

2.2.2. Možnosti odstranění lézí na DNA způsobených UV zářením

Léze na DNA způsobené UV zářením inhibují replikaci a transkripci a u většiny organismů jsou z genomu běžně odstraněny fotoreaktivací a nukleotidovou excizní reparací (NER). Oproti cis-syn CPD, které mají jen mírný efekt na strukturu DNA, 6-4PP indukují rozsáhlé strukturální distorze a jsou odstraňovány nukleotidovou excizní reparací rychleji než CPD (Nakajima a kol., 2004).

Předchozí studie o blízkce lokalizovaných vnitřetězcových křížových vazbách (IACL) na DNA po působení UV záření ukazují, že různé typy křížových vazeb jsou UvrABC nukleázou štěpeny ve značně odlišné míře. Například z různých UV tymin-tymin fotoproduktů odstraňuje UvrABC endonukleáza cis-syn, trans-syn, 6-4 pyrimidin-pyrimidon fotoprodukty a Dewarovy fotoprodukty v relativním poměru 1:6:9:9 v tomto pořadí. Použitím různých substrátů bylo také zjištěno, že vliv sousedících sekvencí na reparaci cis-syn tymin-tymin dimerů je relativně malá (Yang a kol., 2005).

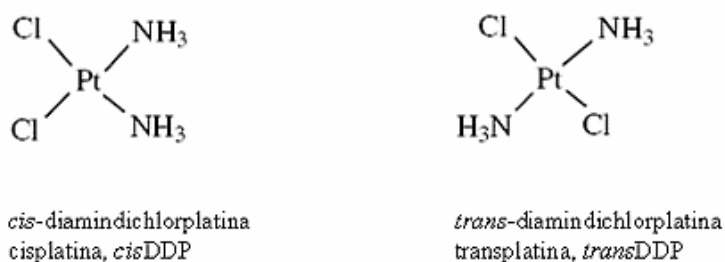
V NER deficientních buňkách nejsou poškození vyvolaná UV světlem opravena a jejich přežití po ozáření UV závisí na toleranci poškození při replikaci (Nakajima a kol., 2004).

2.3. Cytostatika

Cytostatika jsou látky, které tlumí růst a dělení buněk. Jsou široce využívána k léčbě nádorových onemocnění. Vysokou účinnost vykazují cytostatika odvozená od platiny. Dřívějšími výzkumy bylo prokázáno, že za terapeutický účinek jsou zodpovědné především léze na DNA, vznikající působením cytostatika (Kartalou a Essigmann, 2001). Ty ovšem mohou být rozpoznávány účinnými reparačními mechanizmy buňky, zejména proteiny, které aktivně působí v nukleotidové excizní opravě; stejnými proteiny, které působí při odstraňování poškození na DNA po UV záření. Nežádoucí aktivita opravných mechanismů v nádorových buňkách může vést ke snížení terapeutické účinnosti léčebných preparátů. Proto je věnována velká pozornost podrobnému studiu těchto procesů nejen na úrovni nádorových buněk, ale také na jednodušších prokaryotických modelových systémech, jako jsou např. buňky *E. coli* (Janovská a kol., 2002).

2.4. Platinová cytostatika

V šedesátých letech 20. století byl Barnettem Rosenbergem a jeho spolupracovníky náhodně objeven protirakovinný účinek *cis*-diamindichlorplatiny (obr.3). Rosenberg studoval



Obr. 3: Struktura platinových komplexů cisplatiny a transplatiny (Roat-Malone, 2002)

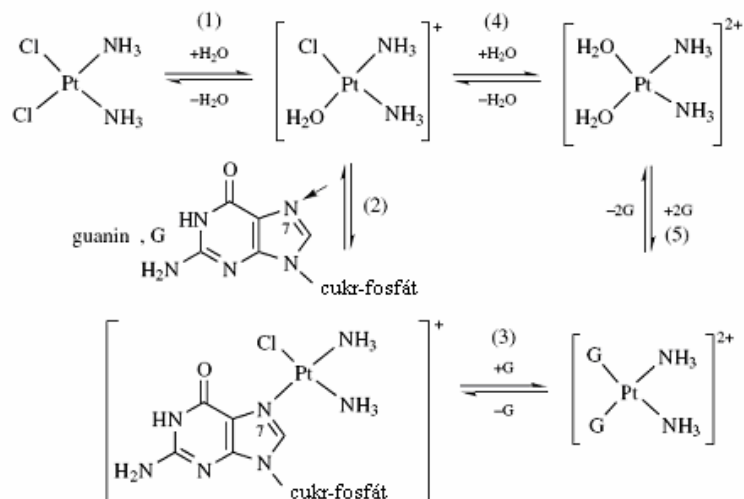
růst bakteriálních buněk v roztoku v přítomnosti elektrického pole. Pozoroval prodlužování buněk *E. coli*, fenomén známý jako filamentární růst. U *trans* izomeru diamindichlorplatiny nebyl podobný účinek pozorován. Cisplatina také efektivně potlačuje růst buněk savčích. V roce 1972 byla cisplatina poprvé testována na lidských pacientech a v roce 1979 byla jako protinádorové léčivo schválena Americkým úřadem pro potraviny a léčiva (US Food and Drug Administration,

FDA). V současnosti je využívána hlavně k léčbě rakoviny vaječníků, močového měchýře, hrdla a obzvláště k léčbě rakoviny varlat, kde bývá úspěšnost léčby vyšší než 90%. Navzdory intenzivnímu výzkumu není ještě molekulární mechanismus vedoucí k buněčné smrti nádorových buněk po léčbě cisplatinou do detailu znám (Roat-Malone, 2002; Nowosielska a kol., 2004).

Jelikož cisplatina vykazuje silnou nefrotoxicitu a má přímou souvislost s výskytem některých typů nádorů, stále se hledají méně toxické a široce využitelné platinové protinádorové látky. Takovou látkou, která se již často využívá klinicky, je karboplatina [Pt(NH₃)₂(CBDCA)] (CBDCA = cyklobutan-1,1-dikarboxylátový ligand). Spektrum její aktivity je podobné spektru aktivity cisplatin, ale na rozdíl od ní vykazuje nižší nefrotoxicitu. Byla testována protinádorová aktivita tisíců nově syntetizovaných platinových komplexů a v současnosti je známo, že protinádorovou aktivitu vykazují sloučeniny Pt^{IV} (iproplatina, ormaplatina), Pt^{II} v *trans* konformaci, dinukleární Pt^{II} a trinukleární Pt^{II} (Roat-Malone, 2002). Rozšiřování spektra účinných protinádorových léčiv závisí na pochopení mechanismu účinku látek nám již známých a odhalení dalších způsobů, jak mohou tyto látky účinkovat. Velký důraz je tedy kladen na pochopení molekulárních a biochemických mechanismů, které poskytuje podklady pro studium jiných potenciálně účinných komplexů kovů (Brabec, 2002).

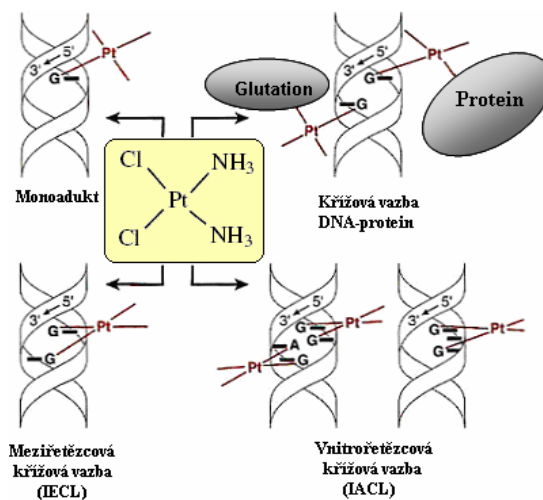
2.4.1. Mechanismus účinku cisplatin v buňce

Na počátku historie výzkumu cisplatin jakožto potenciálního protinádorového agens bylo zjištěno, že inhibuje replikaci DNA (Roat-Malone, 2002). Studie fyziologické aktivity cisplatin se proto zaměřily na její reakce s nukleovými kyselinami. Předtím než cisplatina reaguje s DNA, musí toto chemické agens vstoupit do buňky. Předpokládá se, že k tomu dochází pomocí pasivní nebo aktivní difuze, ačkoliv tento proces ještě není zcela objasněn. Je známo, že v krevním řečišti se z *cis*DDP nevyváží chloridové ionty, jelikož je zde jejich koncentrace relativně vysoká (~0,1 M). Uvnitř buňky je koncentrace Cl⁻ mnohonásobně nižší (~0,004 M) a dochází zde k hydrolytické reakci. Jelikož chloridový iont cisplatin je snáze odštěpitelný než amonný ligand, dojde ke vzniku termodynamicky stabilnější kovalentní vazby s ionty kovu; chloridový iont je nahrazen vodou (může se vyskytovat jak ligand OH⁻, tak H₂O). Monoaqua a diaqua formy platinového komplexu reagují s nukleofilními místy na bázích DNA (Roat-Malone, 2002). NMR studie prokázaly, že k vazbě dochází preferenčně na N7 atomu guaninu (Kostova, 2006). Jakmile je takováto vazba vytvořena, je termodynamicky stabilní. Sled událostí v reakci je tedy s největší pravděpodobností následující: Hydrolyza chloridového ligandu, ta je následována reakcí s dsDNA guaninovým ligandem, hydrolyza druhého chloridového iontu a vazba na druhý guanin dsDNA (reakční sekvence (1), (2), (3) na obr. 4) (Roat-Malone, 2002).



Obr. 4: Fyziologický účinek cisplatiny *in vivo* (Roat-Malone, 2002)

Předpokládá se, že jen velmi malá část (~1%) terapeuticky aplikované cisplatiny dosáhne genomové DNA. Zbytek léčiva se v buňce váže na proteiny, RNA, malé tioly a tioétery, včetně glutationu, cysteinu a metioninu (Duman a kol., 1999) (obr. 5).



Obr.5: Vazba cisplatiny na DNA a proteiny (podle Duman a kol., 1999)

2.4.2. Interakce cisplatiny s DNA

2.4.2.1. Typy DNA aduktů

S DNA cisplatina (*cis*DDP) reaguje za produkce převážně vnitrořetězcových křížových vazeb (intrastrand cross-link, IACL) mezi dvěma sousedními guaniny (65% z celkového množství),

mezi adeninem a guaninem (25%) a mezi guaniny oddělenými bází (1,3-GNG, 5-10%). Meziřetězcové křížové vazby (interstrand cross-link, IECL) tvoří přibližně 2% z celkového množství aduktů. Oproti tomu terapeuticky inaktivní transplatina (*trans*DDP) působí obvykle tvorbu aduktů mezi guaniny oddělenými bází (40%) a tvorbu meziřetězcových křížových vazeb (20%). Jak *cis*DDP, tak i *trans*DDP indukují tvorbu malého množství monoaduktů.

Vnitrořetězcové křížové vazby (IACL) mezi sousedními puriny jsou biologicky významnými adukty, jelikož účinně blokují činnost DNA polymeráz *in vitro* a *in vivo* (Nowosielska, 2004). Pro buňku jsou velmi závažné meziřetězcové adukty (IECL), které znemožňují oddělení komplementárních řetězců DNA při transkripci a replikaci (Wang a kol., 2000).

Nowosielska a Marinus ve své práci (2005) uvádí, že mezi poškození DNA vyvolaná působením *cis*DDP patří také tvorba dvouřetězcových zlomů (DSB) a mezer, které pro opravu vyžadují rekombinační mechanismy. DSB ovšem nejsou způsobeny přímo interakcí DNA s cisplatinou, ale jsou spíše důsledkem aktivity reparačních procesů, které odstraňují vytvořené léze na DNA. Dá se tedy říci, že cisplatinou může nepřímo působit i tvorba dvouřetězcových zlomů na DNA.

2.4.2.2. Konformační změny DNA po vytvoření platinových aduktů

Velká pozornost byla věnována studiu strukturálních změn DNA po navázání cisplatinového komplexu. Pomocí gelové elektroforézy bylo zjištěno, že cisplatinové adukty ohýbají a odvíjejí dvoušroubovici DNA. Strukturální změny na DNA jsou shrnuty v tab. 1.

Také adukty klinicky neúčinné transplatiny ovlivňují konformaci DNA. 1,3-adukt transplatiny ohýbá DNA helix, ale ohyb zvyšuje flexibilitu DNA. IECL vytvořená transplatinou ohýbá DNA helix naproti menšímu žlábků o 26° a odvíjí ho o 12°. (Kartalou a Essigmann, 2001).

Tab.1: Konformační změny po vytvoření cisplatinových DNA aduktů (Kartalou a Essigmann 2001)

Adukt	Výskyt (%)	Ohýbání (°)	Odvíjení (°)
Intra-1,2-d(GpG)	65	32 ^a 39/55 ^b 78 ^c 58 ^c	13 ^a 25 ^c 21 ^c
Intra-1,2-d(ApG)	25	34 ^a 55 ^c	13 ^a
Intra-1,3-d(Gp × pG)	5–10	35 ^a 20 ^c	23 ^a 19 ^c
Inter-d(G*pC)/d(G*pC)	2	45 ^a 47 ^b 20 ^c 40 ^c	79 ^a 70 ^c 87 ^c 76 ^c

^a Gelová elektroforéza

^b Rentgenová krystalografie

^c NMR spektroskopie

2.4.3. Interakce cisplatiny s proteiny

Cisplatina vykazuje značnou afinitu k donorům atomů síry (např. aminokyseliny cystein a metionin), a to ještě větší než k nukleofilním místům na DNA. Často tedy reaguje s enzymy bohatými na cystein a metionin. Jedním z takových enzymů je eukaryotická DNA-polymeráza α , která obsahuje mnoho cysteinových zbytků v DNA vazebné doméně enzymu.

DNA polymeráza I bakterií *Escherichia coli* byla zkoumána v přítomnosti cisplatiny a jejího inaktivního geometrického *trans* izomeru. Cisplatina nevykazovala inhibici enzymové aktivity. *CisDDP* naopak bránila enzymu v plnění jeho funkce, prodlužování dceřinného řetězce DNA. Byly objeveny dva mechanismy inhibice: kovalentní vazba cisplatiny na DNA polymerázu a její vazba na templátovou DNA. Selektivní preinkubace platinového činidla s polymerázou a s DNA odhalila, že k inhibici dochází především díky kovalentní vazbě na enzym (Duman a kol., 1999).

Proteiny rozpoznávající cisplatinové adukty

Mezi proteiny, které se specificky vážou na DNA modifikovanou cisplatinou, patří celá řada proteinů, které nalezneme u buněk prokaryotických i eukaryotických. Lze je rozdělit do několika skupin:

1. Proteiny s HMG (*high mobility group*) doménou:

Tyto proteiny dělíme do dvou skupin. Do první skupiny řadíme proteiny s mnohačetnými HMG doménami, které rozpoznávají DNA s malou sekvenční specifitou. Jedná se např. o HMG1, HMG2, UBF nebo mitochondriální transkripční faktor (mtTFA) Druhá skupina zahrnuje sekvenčně specifické vazebné proteiny, např. LEF1 nebo SRY.

DNA vazebný motiv HMG proteinů se skládá z přibližně 80 aminokyselin. Rozeznává ohyb na DNA, vytvořený 1,2-GG- a 1,2-AG IACL a IECL adukty cisplatiny. HMG protein se váže na *cisDDP*-DNA vazbu, ještě více zvětšuje ohyb helixu a způsobuje také jeho odvíjení (Kartalou a Essigmann, 2001; Roat-Malone, 2002). Výše uvedené proteiny jsou exprimovány v buňkách některých eukaryotických organismů, například v buňkách lidských.

2. Proteiny bez HMG domény:

Mezi proteiny bez HMG domény, které rozpoznávají cisplatinové adukty, řadíme celou řadu proteinů, např. histon H1, TATA vazebný protein (TBP), Y box vazebný protein (YB-1), fotolyázu (je známo, že buňky *E. coli*, které exprimují fotolyázu, jsou k cisplatině více rezistentní než ty, které jsou fotolyáza-deficientní), DNA reparační proteiny, T4 endonukleázu VII nebo lidský Ku autoantigen (Kartalou a Essigmann, 2001).

2.4.4. Možnosti odstranění DNA lézí způsobených cisplatinou

Platinovaná DNA je substrátem pro reparační enzymy, které z ní mohou léze odstranit. Ovšem ne vždy jsou všechny adukty odstraněny se stejnou účinností, popřípadě nejsou odstraněny vůbec (Brabec, 2002; Roat-Malone, 2002).

Nukleotidová excizní oprava (NER) odstraňuje IACL adukty, přičemž 1,3-GNG léze jsou odstraňovány 50krát rychleji než léze mezi sousedními puriny. Velký význam NER můžeme pozorovat na zvýšené citlivosti NER-deficientních mutant *E. coli* a savčích buněk k cisplatině, ovšem ne tak k transplatině. Reparační procesy spojené s transkripcí jsou efektivnější než samotná, jelikož odstranění aduktů z aktivně transkribované DNA je rychlejší než z DNA netranskribované (Nowosielska a kol., 2004).

U DNA poškozené IECL adukty jsou postiženy oba její komplementární řetězce. Mechanismus odstranění IECL aduktů spočívá pravděpodobně ve spřažení NER a homologní rekombinace. Při studiu prokaryotické NER bylo pozorováno, že při tomto způsobu opravy nejsou navozovány chyby. Mezera vytvořená UvrABC nukleázou je opravena díky rekombinaci zprostředkované proteinem recA, při níž jako donor slouží nepoškozené homologní úseky DNA (Wang a kol., 2000). Některé studie prokázaly, že buňky *recBC* (mutantní v genech pro rekombinaci) jsou k cisplatině citlivé stejně jako buňky NER-deficientní (*uvrA*) a dvojité mutantní (*uvrA recBCD* nebo *uvrA recF*) jsou senzitivnější než buňky mutantní jen v jednom genu (Zdraveski a kol., 2000). To dokazuje, že rekombinační mechanismy jsou pro přežití buňky po zásahu *cisDDP* důležité stejně jako NER (Nowosielska a kol., 2004).

Je pravděpodobné, že mechanismus odstranění IECL aduktů spočívá především ve spřažení NER, která opravu iniciuje, a homologní rekombinace. Přesto byl prokázán také mechanismus odstranění IECL, který je na rekombinaci nezávislý. Mezera vytvořená UvrABC nukleázou je zde opravena translézní syntézou. Tento způsob opravy se uplatňuje v případech, kdy je buňka deficientní v genech pro rekombinaci, nebo je nedostatek homologních donorových sekvencí (Wang a kol., 2000).

U *E. coli* cisplatinou způsobuje indukci SOS regulonu, která vede ke zvýšení hladiny DNA Pol II, DNA Pol IV, DNA Pol V, inhibitoru buněčného dělení SfiA (SulA), homologní rekombinace a DNA reparační. Protein SfiA je pravděpodobně zodpovědný za filamentární růst, který nastává po působení cisplatinou na buňky (Bhattacharya a Beck, 2002).

2.4.5. Rezistence k cisplatině

Rezistence nádorů k léčivům jako je cisplatin je důležitým faktorem limitujícím jejich užití v nádorové chemoterapii (Keller a kol., 2001). Buněčná rezistence k tomuto činidlu je způsobena mnoha faktory. Spočívá v mechanismech, které omezují tvorbu letálních *cis*DDP-DNA aduktů, mění nebo omezují transport léčiva a mechanismech, které umožňují buňce reparovat nebo tolerovat poškození na DNA.

Mezi mechanismy, které mohou přispívat k rezistenci k cisplatině, patří (1) změny v permeabilitě buněčné membrány, (2) detoxikační metabolické dráhy a (3) schopnost odstraňovat cytotoxické léze z DNA (Roat-Malone, 2002).

2.5. Mechanizmy reparace poškozené DNA

V živých soustavách často dochází k poškození DNA během replikace, rekombinace nebo působením vnějších vlivů. Proto se v buňkách vyvinuly mechanismy, které chyby v DNA odstraňují nebo opravují. Existuje několik způsobů, kterými se poškozená místa v DNA opravují (Rosypal, 2000):

1. Úplná reparace, tj. oprava poškozeného místa na původní stav

a) Fotoreaktivace: Princip přímé fotoreaktivace spočívá ve štěpení tyminových dimerů za pomoci enzymu fotolyázy, který je aktivován světlem o vlnové délce 340 – 400 nm. Kromě přímé fotoreaktivace existuje fotoreaktivace senzitivizovaná a nepřímá

b) Dealkylace: Tohoto procesu se účastní enzym O^6 -metylguanin-DNA-metyltransferáza, který se označuje též jako Ada protein. Tento enzym odstraňuje metylové skupiny z O^6 -guaninu a O^4 -tyminu a přenáší je na cystein, jenž je součástí tohoto enzymu.

2. Excizní reparace, tj. vyštěpení poškozeného místa v DNA

a) Bázová excizní oprava: Spočívá ve vyštěpení chybné báze DNA-glykozyázou za vzniku AP místa, které je odstraněno AP-endonukleázou a DNA-deoxyribofosfodiesterázou a vzniklá mezera je podle matricového řetězce zaplněna opravnou syntézou.

b) Nukleotidová excizní oprava: Proces probíhající za přítomnosti excizních nukleáz.

c) Oprava chybného párování: Do této skupiny reparačních procesů spadá oprava chybného párování uskutečňovaná DNA-polymerázou III, posun jednořetězcového zlomu a reparace chybného páru řízená metylací

3. Tolerantní oprava: Spočívá v obnově funkce DNA, aniž by z ní bylo odstraněno původní poškození. Poškození v matrici, uskutečněné zlomy a rekombinací, se obchází replikací. Zahrnuje SOS odpověď a opravu mezer v dceřinném řetězci.

2.6. Ochrana buňky před účinkem UV a cisplatinových aduktů

Z výše uvedených reparačních procesů využívá buňka k opravě aduktů způsobených UV zářením především dva mechanismy opravy, a to fotoreaktivaci a nukleotidovou excizní reparaci (NER). K opravě cisplatinových aduktů využívá hlavně NER a rekombinaci. Pro oba typy poškození je tedy společná právě nukleotidová excizní reparace.

2.6.1. Nukleotidová excizní reparace

Nukleotidová excizní reparace (NER) sestává ze série enzymatických reakcí, kterými se odstraní téměř všechny léze na DNA včetně většiny těch, které bývají odstraněny bázovou excizní reparací (BER). Poškozené nukleotidy jsou vyštěpeny jako oligonukleotidové fragmenty, jejichž velikost je obvykle stejná a není závislá na povaze poškození. Tato dráha se skládá z pěti hlavních kroků: rozpoznání poškození, incize, excize, opravná syntéza a ligace (Grossman a kol., 1998). NER rozpoznává celou řadu aduktů na DNA, mezi nimi i poškození vyvolaná chemoterapeutickými léčivy typu cisplatinu. Přehled substrátů NER bakteriálního UvrABC systému je uveden v tab. 2.

Tab. 2: Přehled substrátů NER bakteriálního UvrABC systému (Van Houten a Grossman, 2004)

Type	Lesion	UvrABC	ΔM_r
Single base modification	Thymine glycol	++	+34
	Dihydrothymine	0	+2
	Benzo[<i>a</i>]pyrene adduct	+++	+171
	Anthramycin adduct	+++	+191
	Cross-linked triple strand	+ [72]	~ + 3000
	O ⁴ -alkyl thymine	+	+14
	O ⁶ -methyl guanine	+	+14
	N ⁶ -methyl adenine	0	+14
	Psoralen adduct	+++	+185
	Base removed (AP site)	+	~ - 130
	Cross-links, intra-strand	<i>cis</i> -Pt adduct	+++
Pyrimidine dimer		++	0
6-4 photoproduct		+++	0
Cross-links, inter-strand	<i>cis</i> -Pt adduct	++	+227
	Nitrogen mustard adduct	+	+69
	Psoralen bisadduct	+++	+185
Natural bases	dsDNA	0	0
	A-tracts	0	0
	Mismatches, loops	0	0
Noncovalent modifications	Caffeine complex	-	+194
	Ditercalinium complex	++	+500

2.6.1.1. NER u *E. coli*: UvrABC systém

V posledních několika letech přispěla aplikace technik rekombinantní DNA k pokroku v charakterizaci proteinů, které zprostředkovávají jednotlivé kroky NER u *E. coli*. První tři kroky tohoto procesu jsou uskutečněny souborem tří proteinů, který se nazývá UvrABC endonukleáza. Tyto tři proteiny jsou kódovány geny *uvrA*, *uvrB* a *uvrC*.

Gen *uvrA* kóduje DNA-independentní ATPázu, která váže DNA. Bylo zjištěno, že UvrA hydrolyzuje také GTP (Grossman a kol., 1998). Velikost sekvence *uvrA* genu je 2082 bp a je překládána do proteinu UvrA o velikosti 940 aminokyselin (103 kDa) (Zou a kol., 2003). Aktivní formou UvrA proteinu je dimer. Vazebná energie ATP (nebo ATP- γ -S) způsobuje dimerizaci proteinu, kdežto hydrolyza ATP vede k monomerizaci UvrA. Navázání UvrA na nepoškozenou DNA je 10^3 - 10^4 krát slabší než specifické navázání na poškozenou DNA. Specifita pro DNA ozářenou UV je zcela zrušena díky ATP- γ -S, zatímco nespecifickým navázáním je zvýšena. Každá molekula UvrA má dva motivy zinkového prstu a jeden motiv helix-otáčka-helix (HTH) (Grossman a kol., 1998).

Sekvence genu *uvrB* kóduje 673 aminokyselin, molekulová hmotnost proteinu UvrB je 76 kDa. Purifikovaný protein nemá detekovatelnou ATPázovou aktivitu. ATPázová aktivita je pozorována jen v interakci s UvrA za přítomnosti DNA (ds a ss DNA a DNA ozářená UV světlem). Za tento dramatický nárůst aktivity vděčíme aktivaci kryptické ATPázy na zformovaném UvrA₂B-DNA komplexu (Grossman a kol., 1998). Analýza UvrA₂B komplexu ukázala, že DNA je obtočena kolem UvrB proteinu. Jedná se o úsek přibližně sedmi helikálních otáček (Verhoeven a kol., 2001). Je pravděpodobné, že UvrB se na poškození DNA váže jako dimer. Podjednotka B1 se váže na poškození a podjednotka B2 se volně váže na podjednotku B1. Pro specifickou vazbu na poškození hraje důležitou roli motiv β-vlášenky. Pro 3' incizi pomocí UvrC je třeba odstranit z komplexu druhou podjednotku UvrB, zatímco protein Cho (viz. dále) je zřejmě schopný štěpit dimerový komplex (Moolenaar a kol., 2005).

Gen *uvrC* nepatří oproti *uvrA* a *uvrB* ke skupině SOS genů. Byly popsány dva translační produkty genu *uvrC*. První začíná na ATG kodonu; získáme protein skládající se z 588 aminokyselin (Mr = 66 kDa). Druhý je zahájen GTG kodonem, 66 bp před ATG. C-terminální doména UvrC má vysoký stupeň homologie s C-terminální doménou proteinu ERCC-1, který se účastní NER u člověka. Protein UvrC se váže na jednořetězcovou DNA, a to s poměrně velkou afinitou. Mutace C-terminální oblasti způsobuje extrémní citlivost k UV a defekty v 5' incizní aktivitě. UvrC může asociovat s UvrB-DNA komplexem (Grossmann a kol., 1998).

Vlastnosti proteinů UvrA, UvrB UvrC jsou shrnuty v tab. 3.

Tab.3: Vlastnosti reparačních proteinů UvrA, UvrB a UvrC (Van Houten, 1990).

Property	Value in:		
	UvrA	UvrB	UvrC
Mol wt	103,874	76,118 ^a	66,038 ^b
No. of amino acids	940	672	588 ^b (610)
No. of Trp residues per molecule	3	0	2
Molar extinction coefficient	46,680	27,699	36,200
pI	6.5	5.0	7.3
Intrinsic metal	2 Zn	None	None
DNA binding	Yes	No ^c	Yes
Nucleotide-binding site	2	1	
ATPase ^d	125	25	
SOS regulation	Yes	Yes	No (?)
No. of molecules/cell ^e	20 (200)	200 (1,000)	10

^a Molecular weight as predicted by Arikan et al. (2). The N-terminal Met is removed in the mature protein.

^b Molecular weight as predicted by Sancar et al. (183). The UvrC protein may actually be 22 amino acids longer (132).

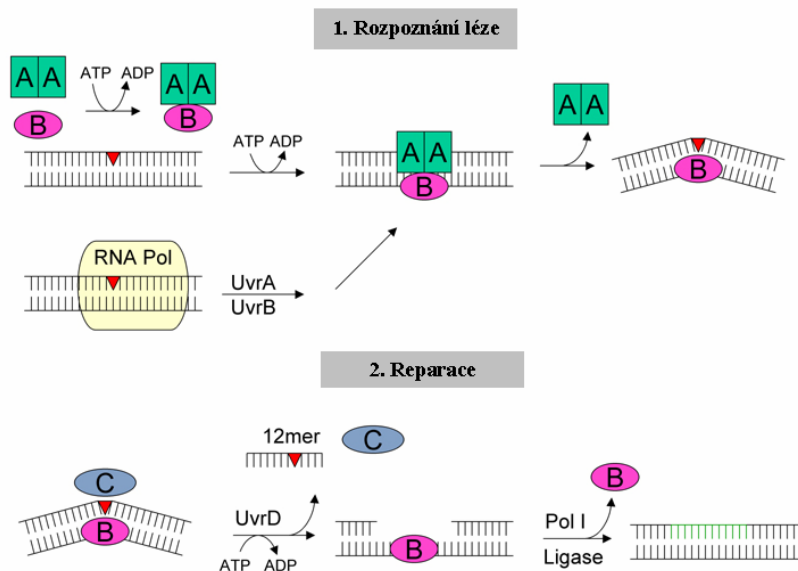
^c UvrB does bind to DNA in the presence of UvrA, but shows no affinity for DNA in the absence of UvrA (96).

^d Turnover number for UvrA and UvrB* (the 70-kDa form), respectively, in the absence of other protein subunits or DNA (33, 142).

^e The number in parentheses are those obtained after SOS induction.

2.6.1.2. Mechanismus NER

Při nukleotidové excizní reparaci (obr. 6) dojde nejdříve k rozpoznání poškozeného místa na DNA. Vazbou ATP na UvrA dojde k dimerizaci tohoto proteinu, tj. k vytvoření jeho aktivní formy. Tento dimer reaguje s proteinem UvrB za vytvoření UvrA₂B komplexu (Verhoeven a kol., 2001). Tento komplex poté vyhledá anomálie na DNA. Analýza AFM (atomic force microscopy) odhalila, že tento komplex, rozpoznávající poškození na DNA, se skládá ze dvou podjednotek UvrA a dvou podjednotek UvrB. Po lokalizaci poškozeného místa je UvrA uvolněn z komplexu a na DNA zůstává pevně navázán dimer UvrB. Kolem jedné z jeho podjednotek je obtočena DNA. Vzniká preincizní komplex a dimer UvrB je stabilizován interakcí protein-protein mezi C-terminálními doménami jeho dvou podjednotek. Ta samá C-terminální doména UvrB tvoří také důležitou vazebnou doménu pro protein UvrC. Po vazbě UvrC na UvrB-DNA komplex je jedna ze dvou podjednotek UvrB zřejmě uvolněna a poškozený řetězec je proteinem UvrC štěpen na dvou místech. Jedna incize je provedena na 4. nebo 5. fosfodiesterové vazbě od 3' konce poškození. Je katalyzována aktivním místem lokalizovaném na N-terminální části proteinu UvrC. Následuje incize 8. fosfodiesterové vazby od 5' konce poškození, katalyzovaná aktivním místem na C-terminální části UvrC. Vzniklý oligonukleotid s lézí je odstraněn helikázovou aktivitou proteinu UvrD a reparační reakce je dokončena za účasti DNA polymerázy I a DNA ligázy (Moolenaar a kol., 2005).

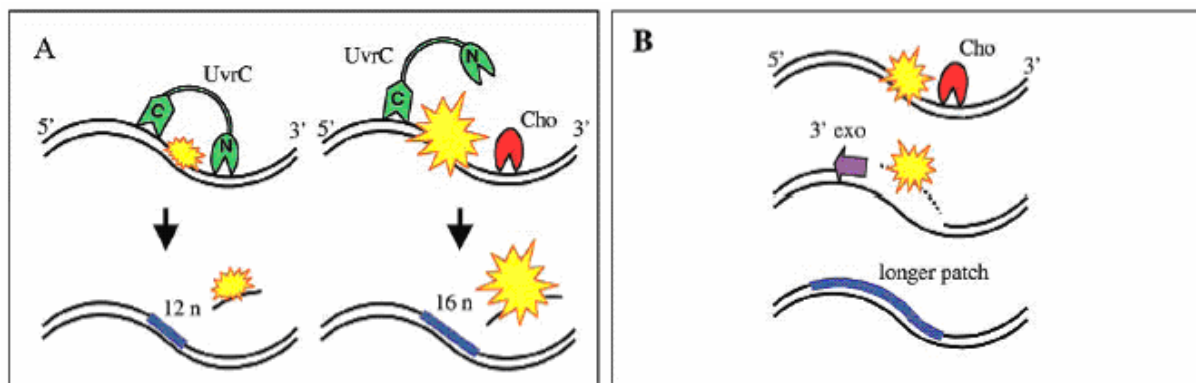


Obr. 6: Mechanismus NER (Theis, 2001)

UvrABC endonukleáza bakterie *Escherichia coli* reparuje široké spektrum DNA lézí s rozdílnou účinností. Efektivita reparace je ovlivněna povahou léze, lokální sekvencí DNA a/nebo topologií DNA. Srovnáním účinnosti incize lineárních fragmentů DNA obsahujících místně specifické cisplatinové adukty bylo zjištěno, že DNA s *cis*DDP-GG adukty je štěpena 3,5krát účinněji než DNA obsahující *cis*DDP-GCG. Míra tvorby UvrB-DNA preincizního komplexu je u obou typů lézí stejná a ve srovnání s četností incize vysoká (Visse a kol., 1994).

V nedávné době byl u *E. coli* objeven nový enzym účastnící se NER v prokaryotických buňkách. Jedná se o protein **Cho**, který je homologem proteinu UvrC. Exprese genu kódujícího tento protein je indukována poškozením DNA. Gen *cho* kóduje protein o velikosti 295 aminokyselin, který je homologní k N-koncové oblasti UvrC. Na rozdíl od UvrC však vytváří zlom pouze na 3' konci DNA, a to na deváté fosfodiesterové vazbě od poškozeného místa (tj. čtyři nukleotidy za místem štěpení proteinem UvrC) (Van Houten a kol., 2002). Exprese Cho (narozdíl od UvrC) je SOS inducibilní a předpokládá se, že incize zprostředkovaná Cho slouží jako náhradní systém reparace specifických lézí, které ze strukturního důvodu nemohou být štěpeny UvrC (Moolenaar a kol., 2005) U některých lézích je efektivita reparace vyšší než za přítomnosti UvrC. Stejně jako UvrC vyžaduje protein Cho přítomnost UvrB-DNA komplexu. Může pracovat ve spolupráci s proteinem UvrC, který štěpí DNA na 5' konci substrátu. Z DNA tak mohou být odstraněny větší léze než když reakce probíhá jen v přítomnosti UvrC (obr. 7A). Oprava DNA v nepřítomnosti UvrC probíhá zřejmě tak, že protein Cho nejdříve vytvoří zlom na 3' konci poškozeného úseku. Poté se uplatní jeho předpokládaná exonukleázová aktivita, řetězec DNA je štěpen až k místu poškození a to je poté odstraněno (obr. 7B).

Cho a UvrC se vyskytují současně u různých bakteriálních druhů (rod *Listeria*, *Clostridium*, bakterie *E. coli* a *M. tuberculosis*). Většina druhů má jen UvrC a například některá mykoplazmata nebo *Borrelia burgdorferi* disponují pouze proteinem Cho (Van Houten a kol., 2002).



Obr.7 A,B: Mechanismus účinku UvrC a Cho (A) a samotného Cho (B) proteinu (Van Houten a kol., 2002)

2.6.1.3. Vliv topologie DNA na NER

Nadšroubovicové vinutí DNA ovlivňuje aktivitu četných promotorů *in vitro* a *in vivo*. Bylo popsáno, že má vliv i na rozsah tvorby *cis*DDP-DNA křížových vazeb *in vitro*. Vliv topologie DNA na míru toxicity cisplatiny byl zkoumán na několika kmenech *E. coli* s upravenou gyrázovou aktivitou. Z výsledků studie vyplývá, že nadšroubovicové vinutí může hrát roli nepřímého modulátoru toxických účinků *cis*DDP na bakteriální buňky interferencí s reparačními procesy (Bouayadi a Salles, 2002).

K tvorbě pozitivních a negativních nadšroubovicových závitů může docházet působením helikázové aktivity UvrAB komplexu. Při zkoumání účinku inhibice topoizomeráz na NER u *E. coli in vivo* bylo reparační analýzou intracelulárního plazmidu zjištěno, že poškození DNA na pozitivních nadšroubovicích způsobené inhibicí gyrázy zůstalo neopravené, kdežto u bakterií mutantních v genu pro topoizomerázu I bylo poškození DNA opraveno. Z toho plyne, že topologie DNA ovlivňuje proces NER a odstranění pozitivních závitů gyrázou je rozhodující pro efektivitu NER u *E. coli*. Mutace v genech pro topoizomerázu I a gyrázu u *E. coli*, stejně tak jako inhibitory gyrázy (novobiocin a kyselina nalidixová), způsobují zvýšenou vnímavost k UV záření, mění stupeň excizní opravy a postreplicační opravy. Pozitivně vinutá DNA obsahující UV-indukované fotoprodukty je rezistentní k incizi UvrABC endonukleázou, kdežto negativně vinutá a relaxovaná forma DNA poškozená UV zářením je jí efektivně štěpena. V přítomnosti gyrázy *E. coli* nebo eukaryotické topoizomerázy I je schopnost incize endonukleázy UvrABC obnovena (Park a Ahn, 2000).

2.6.2. Homologní rekombinace

Homologní rekombinace je jedním z hlavních reparačních systémů buňky. Její mimořádná přesnost je nezbytná pro udržení integrity genomu. Přesnost homologní rekombinace závisí na identitě DNA sekvencí rekombinujících molekul, na aktivitě rekombinačních proteinů a aktivitě proteinů opravujících chybné párování. Iniciací rekombinace u *E. coli* závisí na aktivitě RecA proteinu, na hladině, kterou je řízena SOS odpověď. RecA je vysoce selektivní ohledně sekvenční identity pouze v počáteční fázi procesu výměny řetězců, která vyžaduje minimální délku homologie. Ta se nazývá MEPS (minimum efficient processing segment) a pokud není dodržena, rekombinace není účinná. U *E. coli* zahrnuje MEPS 23-27bp. Divergence mezi rekombinačními substráty snižuje účinnost rekombinace snížením počtu dostupných MEPS (Delmas a Matic, 2005).

2.6.3. SOS systém

SOS systém je u *E. coli* tvořen nejméně 40 geny, z nichž většina kóduje proteiny s reparačními funkcemi, např. proteiny nukleotidové excizní opravy nebo homologní rekombinace. SOS odpověď je indukována různými stresovými faktory, které mají společné to, že zvyšují intracelulární koncentraci ss DNA. Neustálá přítomnost ss DNA aktivuje proteázovou aktivitu RecA proteinu, který štěpí protein LexA, jenž působí jako SOS represor a vyvolá tím SOS odpověď. Pokud jsou léze na DNA opraveny a je obnovena schopnost replikace, SOS odpověď je reprimována (Delmas a Matic, 2005)

Vysoce přesné replikativní DNA polymerázy mohou být během replikace DNA blokovány různými poškozeními bází, což může vést k letalitě. Tři z DNA polymeráz, které vlastní *Escherichia coli* (Pol III, Pol IV a Pol V), mohou při replikaci obejít léze na templátové DNA a umožňují tím buňce přežít. Geny kódující tyto enzymy, *polB*, *dinB* a *umuCD*, náleží k stres-inducibilnímu SOS regulonu (Bjedov a kol., 2002).

2.7 Plazmid pUC19

Poškození DNA prokaryotické buňky po působení vnějších činitelů (např UV záření, a platinových derivátů) a procesy reparace lze sledovat na úrovni nejen DNA genomové, ale také na úrovni DNA plazmidů.

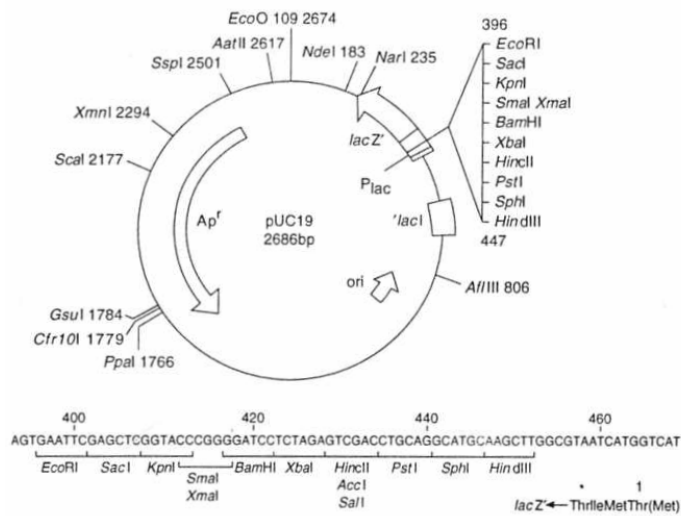
Genom prokaryotické buňky se skládá ze dvou základních složek – z jádra (nukleoid) a plazmidů. Plazmidy jsou extrachromozomální elementy, které může buňka postrádat, neboť na rozdíl od nukleoidu nenesou esenciální geny. Plazmidy se podílejí na horizontálním přenosu genů (Doškař, 2003). Představují samostatný replikon tvořený nejčastěji kružnicovou dsDNA. Jeho velikost se pohybuje od 1 kbp až po 1000 kbp. Vyskytují se u většiny Gram pozitivních a Gram negativních bakterií a některých kvasinek. Základní typy plazmidů jsou kryptické, epizomální, konjugativní a mobilizovatelné.

Molekula DNA plazmidu se může vyskytovat ve dvou formách:

1. Kovalentně uzavřená kružnice (ccc). Jedná se o DNA, která nemá volné konce ani zlom.
2. Otevřená kružnice (oc), která obsahuje zlom v jednom z řetězců (Rosypal, 2000).

Plazmid pUC19 (obr. 8) byl transformován do *E. coli* se známým genotypem pro studium účinku reparačních mechanismů buněk *E. coli* po působení UV záření a cisplatinu (Hyršová a kol., 2004). Patří mezi mnohakopiové plazmidy, replikuje se nezávisle na chromozomální DNA a obsahuje mnohočetné klonovací místo uvnitř regionu *lacZ* genu. Jako selekční marker nese gen pro rezistenci k ampicilinu. Velikost pUC19 je 2686 bp, číslo vinutí $L_k = 258$ a superhelikální

hustota $\sigma = -0,05$. Ve stupni negativního vinutí je tedy srovnatelná s nadšroubovicí vyskytující se u řady eukaryotických chromozomů *in vivo* (Serban a kol., 2002).



Obr. 8: Genetická mapa plazmidu pUC19 (Ausubel a kol., 1995)

2.7.1. Modifikace superhelikální DNA cisplatinou *in vitro*

Plazmidová DNA je vhodným modelem pro studium interakcí cisplatiny s DNA a interakcí DNA aduktů s enzymy NER. Tyto interakce byly studovány zejména *in vitro* (Beck a kol., 1985; Popoff a kol., 1987; Vrána a kol., 1996, Hyršová 2004).

Na superhelikální DNA modifikované cisplatinou za podmínek *in vitro* byly prokazovány jak IACL, tak IECL adukty. IACL adukty odvíjejí superhelikální DNA (Keck a Lippard, 1991) a mění v závislosti na stupni modifikace negativní superhelikální vinutí na pozitivní. Bylo zjištěno, že při nízkých hladinách *in vitro* modifikace plazmidové DNA cisplatinou (<1 atom Pt na 500 bp, $r_b < 0,001$) počet IECL aduktů stoupá u superhelikální DNA v porovnání s linearizovanou nebo relaxovanou DNA. Stejný efekt byl pozorován se zvyšujícím se negativním vinutím nadšroubovice nebo se snižujícím se hladinou modifikace. Taktéž byl prokázán vliv superhelicity DNA na sekvenční specifitu vazby cisplatiny. IECL adukty byly prokázány mimo jiné i pomocí alkalické denaturační elektroforózy. Byl použit plazmid pSP73 o velikosti 2464 bp a superhelikální denzitě $\sigma = -0,063$; od něj byly odvozeny molekuly DNA s různou superhelikální hustotou. Linearizace byla provedena pomocí enzymu EcoRI. Změna v superhelicitě DNA tedy nejen výrazně ovlivňuje frekvenci jednotlivých typů DNA aduktů cisplatiny, ale i sekvenční specifitu vazby cisplatiny (Vrána a kol., 1996).

2.7.2. Modifikace superhelikální DNA cisplatinou *in situ*

V nedávné době byla sledována modifikace cisplatinou na úrovni plazmidové DNA pUC19 v buňkách *E. coli* s různým genotypem ve vztahu k reparačním procesům. Bylo zjištěno (Hyršová a kol., 2004), že za podmínek *in situ* modifikace neovlivňuje genotyp hostitelského kmene významně stupeň modifikace plazmidové DNA. Přímou v buňce za klidových podmínek bylo po dlouhodobém působení cisplatinou na úrovni plazmidové DNA pUC19 detekováno v průměru 30% meziřetězcových křížových vazeb. Viabilita buněk reparačně proficientního kmene WP2 wt, která byla sledována počtem kolonií na agarových plotnách, byla obnovena, léze na DNA včetně IECL byly odstraněny a zůstala schopnost buněk opravovat poškození tohoto typu (Janovská 2003, osobní sdělení).

V současné době je velká pozornost základního výzkumu věnována studiu mechanismu reparace meziřetězcových křížových vazeb na DNA, vzniklých zejména po působení chemických látek, které by mohly potenciálně působit jako terapeutické agens při léčbě nádorových onemocnění. Je známo, že IECL jsou hůře a obtížněji odstranitelné a překonávané reparačními mechanismy buňky. Zpomalení až úplné zabránění reparace by tedy mohlo podstatně zvýšit úspěšnost léčby nádorů. Mechanismus reparace meziřetězcových křížových vazeb na DNA za podmínek *in vivo* však dosud není zcela objasněn

V této práci nás zajímalo, na základě předcházejících výsledků (Hyršová 2004), zda lze na úrovni plazmidové DNA sledovat kinetiku opravy cisplatinových IECL aduktů přímo v buňkách *E. coli* za podmínek *in vivo* s využitím kmenů s různou reparační aktivitou.

3. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Diplomová práce byla zaměřena na získání podrobnějších informací o *in vivo* mechanismu nukleotidové excizní reparační po působení cisplatinu a UV záření na modelový systém plazmidové DNA pUC19 transformované do buněk *E. coli* s normální nebo deficientní reparační kapacitou.

Za tím účelem byly stanoveny tyto dílčí úkoly:

- I.** Provést optimalizaci postupu pro získání dostatečného množství plazmidové DNA v průběhu probíhajících reparačních procesů za podmínek *in vivo* při použití kmenů *E. coli* WP2 a WP2uvrA.

- II.** Ozářit buňky *E. coli* různými dávkami UV záření nebo *in situ* modifikovat cisplatinou a
 - a)** Sledovat morfologii buněk, jejich růst a schopnost tvorby kolonií v průběhu reparační.

 - b)** Detekovat poškození DNA vzniklá působením cisplatinu a UV záření na plazmidové DNA pomocí alkalické denaturační elektroforézy a metodou vazby specifického proteinu na poškozenou DNA.

 - c)** Výše uvedenými metodami studovat dynamiku reparačních procesů na modelovém systému plazmidu pUC19 za podmínek *in vivo*.

 - d)** Porovnat účinnost reparačních pochodů při odstranění lézí na plazmidové DNA u reparačně proficientního hostitelského kmene *E. coli* WP2 wt a mutantního kmene *E. coli* WP2uvrA.

 - e)** Současně sledovat změny v topologii plazmidové DNA pUC19 v průběhu reparačních pochodů *in vivo*.

 - f)** Na úrovni buněčných lyzátů kmenů *E. coli* WP2 a WP2uvrA porovnat spektra proteinů metodou SDS–PAGE a provést analýzu se zaměřením na expresi jednotlivých proteinů komplexu UvrABC podílejících se na odstranění poškození na DNA v průběhu opravných procesů.

4. MATERIÁLY A METODY

4.1 Použité mikroorganismy

Byly použity dva izogenní kmeny *Escherichia coli* WP2 (*uvrA*⁺) a *Escherichia coli* WP2*uvrA* (*uvrA*⁻). Tyto kmeny byly odvozeny z jediného rodičovského kmene *E. coli* B/r, který je totožný s kmenem *E. coli* WP2. Do těchto kmenů byla transformována plazmidová DNA pUC19. Optimální kultivační teplota těchto kmenů je 37°C.

Kmeny byly uchovávány na agarových miskách při 4°C. Kmeny *E. coli* WP2 a *E. coli* WP2*uvrA* byly získány od E. M. Witkina (Janovská a kol., 2002).

4.2 Chemikálie

Kultivační média, roztoky a pufrы byly připraveny za pomoci těchto chemikálií:

Agar (Oxoid, Hampshire, Velká Británie)

Agaróza (Promega, Madison, USA)

Akrylamid (Sigma, St. Louis, USA)

Ampicilin (Sigma, St. Louis, USA)

BamHI, restrikční enzym (Takara, Otsu, Japonsko)

Bisakrylamid (Sigma, St. Louis, USA)

Bromfenolová modř (Sigma, St. Louis, USA)

Cisplatina (Lachema, Brno, Česká republika)

Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma, St. Louis, USA)

EcoRI, restrikční enzym (Takara, Otsu, Japonsko)

Etanol (Sigma, St. Louis, USA)

Etidium bromid (EtBr) (Sigma, St. Louis, USA)

Etylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA) (Sigma, St. Louis, USA)

EZ Blue™ Gel, barvicí roztok na proteiny (Sigma, St. Louis, USA)

Glycerol (Sigma, St. Louis, USA)

Glycin (Sigma, St. Louis, USA)

Hydroxid sodný (Sigma, St. Louis, USA)

Chlorid hořečnatý (MgCl₂) (Sigma, St. Louis, USA)

Chlorid sodný (NaCl) (Sigma, St. Louis, USA)

Chlorid vápenatý (CaCl₂) (Sigma, St. Louis, USA)

Izopropanol (Sigma, St. Louis, USA)
Kyselina octová (Sigma, St. Louis, USA)
Lyzační pufr pro proteiny, B-Per (Pierce, Rockford, USA)
Metanol (Sigma, St. Louis, USA)
Nanášecí pufr 6x nebo 10x koncentrovaný (Takara, Otsu, Japonsko)
Persíran amonný (APS) (Sigma, St. Louis, USA)
RNáza A (Sigma, St. Louis, USA)
Sacharóza (Sigma, St. Louis, USA)
Standard molekulových hmotností proteinů
(205,116; 97; 84; 66; 55; 45; 36; 29; 24; 20; 14,2; 6,5 kDa) (Sigma, St. Louis, USA)
Tetrametyletylendiamin (TEMED) (Sigma, St. Louis, USA)
Tris (hydroxymethyl)aminometan hydrochlorid (Tris HCl) (Sigma, St. Louis, USA)
Trypton (Oxoid, Hampshire, Velká Británie)
Yeast extract (Oxoid, Hampshire, Velká Británie)

4.3 Kultivační média, roztoky a pufry

4.3.1. Kultivační média

LB médium

Trypton	10 g
NaCl	10 g
Yeast extract	5 g
H ₂ O	1000 ml

Médium bylo sterilizováno v autoklávu po dobu 30 minut při teplotě 120°C a tlaku 100 kPa.

LB médium s antibiotikem

Po sterilizaci byl do ochlazeného média (50°C) před použitím přidán ampicilin ze zásobního roztoku (100 mg/ml). Koncentrace ampicilinu činila 100 µg/ml.

LB agar

Agar	20 g
LB médium	1000 ml

Médium bylo sterilizováno v autoklávu po dobu 30 minut při teplotě 120°C a tlaku 100 kPa.

LB agar s antibiotikem

Po sterilizaci byl do ochlazeného média (50°C) před použitím přidán ampicilin ze zásobního roztoku (100 mg/ml). Koncentrace ampicilinu činila 50 µg/ml.

4.3.2. Roztoky a pufry

Pro izolaci plazmidové DNA byl použit komerční kit HiSpeed™ Plasmid Purification od firmy QIAGEN, který obsahoval roztoky P1, P2, P3, QBT, QC.

4.3.2.1. Roztoky potřebné k izolaci plazmidové DNA pomocí kitu od firmy QIAGEN

Roztok P1

50 mM TrisHCl
10 mM EDTA
100 µg/ml RNáza A
pH = 8

Roztok P2

200 mM NaOH
1% SDS

Roztok P3

3 M octan draselný
pH = 5,5

Roztok QBT

750 mM NaCl
50 mM MOPS
15% izopropanol
0,15% Triton X-100

Roztok QC

1 M NaCl

50 mM TrisHCl
15% izopropanol
pH = 8,5

4.3.2.2. Roztoky použité při transformaci plazmidové DNA pUC19 do buněk *E. coli*

1 M MgCl₂

20,3 g MgCl₂·6H₂O
Doplnit destilovanou vodou do objemu 100 ml.

1 M CaCl₂

147 g CaCl₂
Doplnit destilovanou vodou do objemu 1000 ml.

4.3.2.3. Elektroforetický pufr pro neutrální agarózovou gelovou elektroforézu

TBE pufr

Příprava 10 x koncentrovaného TBE pufru:

108 g Tris báze
55 g kyseliny borité
40 ml 0,5 M EDTA
pH = 8
Destilovanou vodou doplnit do objemu 1000 ml.

10× koncentrovaný roztok byl před použitím naředěn destilovanou vodou na 1× koncentrovaný.

89 mM Tris báze
89 mM H₃BO₄
2 mM EDTA
pH = 8

TAE pufr

Příprava 50× koncentrovaného TAE pufru:

242 g Tris báze
57,1 ml ledové kyseliny octové
37,2 g Na₂EDTA·2H₂O

pH = 8,5

Destilovanou vodou doplnit do objemu 1000 ml.

50× koncentrovaný roztok byl před použitím naředěn destilovanou vodou na 1× koncentrovaný.

40 mM Tris acetát

2 mM EDTA

pH = 8,5

4.3.2.4. Roztoky a pufrы použité při alkalické denaturační elektroforéze:

0,5 M NaOH

2 g NaOH

Doplnit destilovanou vodou do objemu 100 ml

0,5 M EDTA

186,1 g EDTA

800 ml destilované vody

pH = 8

Alkalický pufr

0,03 M NaOH

1 mM EDTA

5 M NaCl

292 g NaCl

Doplnit destilovanou vodou do objemu 1000 ml.

TBE pufr

(viz. výše)

Nanášecí pufr pro alkalickou elektroforézu

Sacharóza

Bromfenolová modř

4.3.2.5. Roztoky a pufrы použité při SDS-PAGE:

10% SDS

10 g SDS

90 ml destilované vody

10% APS

100 mg persíranu amonného

1 ml deionizované vody

Elektroforetický pufr pro SDS PAGE

Příprava 10× koncentrovaného elektroforetického pufru:

30,3 g Tris báze

144 g glycinu

10 g SDS

Destilovanou vodou doplnit do objemu 1000 ml.

10× koncentrovaný elektroforetický pufr byl před použitím naředěn na 1× koncentrovaný.

Nanášecí pufr pro SDS PAGE

1,25 ml 0,5 M Tris HCl, pH = 6,8

2,5 ml glycerolu

2 ml 10% SDS

0,2 ml 0,5% (w/v) bromfenolové modři

3,55 ml deionizované vody

Fixační roztok

50% metanol

10% kyselina octová

30% Akrylamid

29,2 g akrylamidu

100 ml deionizované vody

2,67% N'N'-bis-metylen-akrylamid

0,8 g N'N'-bis-metylen- akrylamidu

100 ml deionizované vody

4.3.2.6. Roztoky a pufrы použité při EMSA:

Vázací pufr (Kašpárková a kol., 2003)

10 nM HEPES, pH = 7,5

10 mM MgCl₂

50 mM LiCl

100 mM NaCl

1 mM spermidin

0,2 mg/ml BSA

0,05% Nonidet P40

0,5 mM DTT

TBE pufr

(viz výše)

10× koncentrovaný roztok byl před použitím naředěn destilovanou vodou na 0,33× koncentrovaný.

30 mM Tris báze

30 mM H₃BO₄

0,7 mM EDTA

pH = 8

TE pufr

(viz výše)

4.3.2.7. Ostatní roztoky a pufrы:

Srážecí směs

Srážecí směs byla připravena smícháním 95% etanolu a 4 M acetátu amonného v poměru 25:1.

TE pufr

10 mM TrisHCl

1 mM EDTA
pH = 7 – 8

STE pufr

0,1 M NaCl
10 mM Tris HCl
1 mM EDTA
pH = 7-8

4.3.2.8. Elektroforetické gely:

0,8% gel pro neutrální gelovou elektroforézu

Agaróza	0,8 g
TBE pufr	100 ml

Po ochlazení na 50°C se přidá EtBr do výsledné koncentrace 0,5 µg/ml. Objem gelu se řídí velikostí elektroforetické vany.

1% gel pro neutrální gelovou elektroforézu

Agaróza	1 g
TBE pufr	100 ml

Po ochlazení na 50°C se přidá EtBr do výsledné koncentrace 0,5 µg/ml. Objem gelu se řídí velikostí elektroforetické vany.

1% gel pro alkalickou denaturační elektroforézu

Agaróza	1 g
H ₂ O	100 ml

Po ochlazení gelu na 60°C se upraví na 0,03 M NaCl a 1 mM EDTA. Objem gelu se řídí velikostí elektroforetické vany.

12% gel pro SDS-PAGE

4 ml 30% akrylamidu / 2,67% bisakrylamidu
0,1 ml 10% SDS
3,4 ml deionizované vody
2,5 ml 1,5 M TrisHCl, pH = 8,8

Po smíchání těchto složek bylo do gelu přidáno 50 μl 10 % APS a 10 μl TEMED, gel byl nalit mezi dvě skla v elektroforetické aparatuře.

4.4. Přístroje a pomůcky

Autokláv Vaposteri (BMT a.s., Brno, Česká republika)

Centrifuga 4K15 (Sigma, Německo)

Exikátor (ČSN Simex, Česká republika)

Fotoaparát (Canon, USA)

Laboratorní váhy CT600-S (Ohaus, USA)

Mikropipety 10 μl , 40 μl , 200 μl , 1000 μl , 5 ml (Labsystems, Finsko)

Mikroskop BX 50 (Olympus, Japonsko)

Mikrovlnná trouba (LG, Jižní Korea)

Minicentrifuga (Maneko, Praha, Česká republika)

Spektrofotometr UV/VIS (Beckman, Německo)

Termostat BT-120 (BMT a.s., Brno, Česká republika)

Termostat, model 111002 (Boekel Scientific, USA)

Termostat s třepačkou (LabTherm, Kühner, Švýcarsko)

Transiluminátor TFX-20M (Enprotech, Francie)

Třepačka LT2 (Kavalier a.s., Votice, Česká republika)

Vortex VX100 (Labnet, Woodbridge, USA)

Zařízení pro elektroforézu, horizontální SHU6 (Sigma, USA)

Zařízení pro elektroforézu, vertikální (BioRad, Richmond, USA)

Zdroj napětí pro elektroforézu PowerPack 300 (BioRad, Richmond, USA)

4.5. Metody

4.5.1. Transformace plazmidové DNA (Popoff a kol., 1987)

Příprava kompetentních buněk

1. Buňky byly kultivovány do exponenciální fáze a poté sklizeny.
2. Pelet byl resuspendován ve vychlazeném 0,1 M roztoku MgCl_2 a zcentrifugován.
3. MgCl_2 byl odstraněn a k buňkám byl přidán 0,1 M roztok CaCl_2 . Směs byla inkubována po dobu 1 hodiny na ledu.

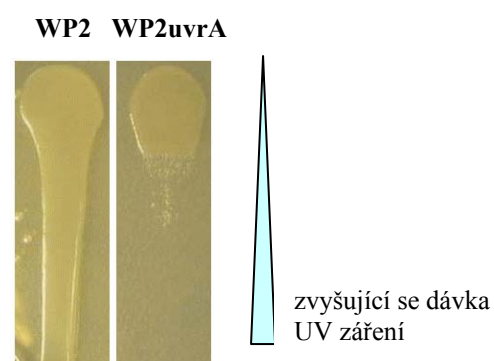
Transformace plazmidové DNA do buněk *E. coli*

1. Kompetentní buňky byly centrifugovány a pelet byl resuspendován ve vychlazeném 30 mM roztoku CaCl_2 v přítomnosti 15% glycerolu. Takto byly buňky uchovávány při teplotě -80°C .
2. Ke kompetentním buňkám o objemu 300 μl bylo přidáno 40 ng plazmidové DNA pUC19 (nemodifikované nebo modifikované 16 hodin 0,1 μM roztokem cisDDP při 37°C) a tato směs byla inkubována po dobu 1 hodiny v ledu.
3. Buňky byly poté inkubovány 2 minuty při 42°C a pak inkubovány 5 minut v ledu.
4. Poté byly buňky byly inkubovány v 5 ml LB média po dobu 3 hodin při 37°C .
5. Buňky byly naředěny 0,85% roztokem NaCl a vysety na LB agarové plotny s ampicilinem (50 $\mu\text{g/ml}$). Po kultivaci při 37°C byl zjištěn počet transformantů.

4.5.2. UV test; citlivost izogenních kmenů *E. coli* k UV záření

(Park a Ahn, 2000)

1. 10 μl bakteriální kultury, která pocházela z exponenciální fáze, bylo naneseno na LB agarovou plotnu.
2. Kapka byla rozetřena k protilehlému okraji plotny.
3. Plotna byla vystavena různým dávkám UV záření od jednoho okraje k protilehlému.
4. Poté byla plotna ihned přemístěna do termostatu a inkubována při 37°C přes noc.
5. Druhý den byla sledována hustota nárůstu kolonií u jednotlivých izogenních kmenů *E. coli*.



Obr. 9: Test citlivosti izogenních kmenů *E. coli* WP2 a *E. coli* WP2uvrA k UV záření

4.5.3. Mikroskopie buněk *E. coli*

Byla provedena mikroskopie nativního nebarveného preparátu buněk *E. coli* za použití Nomarského diferenciálního interferenčního kontrastu při zvětšení 1000x (zvětšení okuláru: 10x,

zvětšení objektivu 100x). K pořízení mikroskopických snímků nativních preparátů buněk *E. coli* byl využit program analýzy obrazu LUCIA.

1. Sediment buněk z 1 ml bakteriální kultury kmene *E. coli* WP2(pUC19), nemodifikované a modifikované 50 μ M roztokem cisplatinu, byl resuspendován ve fyziologickém roztoku.
2. Na odmaštěné podložní skličko byla pomocí mikropipety přenesena kapka bakteriální suspenze a překryta krycím sklíčkem.
3. Následovala mikroskopie nativního preparátu buněk při zvětšení 1000 \times .

4.5.4. Izolace plazmidové DNA

Pro izolaci plazmidové DNA byl využit komerční kit HiSpeed™ Plasmid Purification od firmy QIAGEN. Podle množství bakteriální kultury byly využity kity pro maxi nebo midi izolaci. Tento komerční kit využívá při izolaci plazmidové DNA principu alkalické denaturace.

4.5.4.1. Izolace plazmidové DNA pomocí kitu od firmy QIAGEN

(HiSpeed™ Plasmid Purification, Maxi Kit) Níže uvedené hodnoty jsou uvedeny pro maxi izolaci.

1. Do 50 ml sterilního LB média s ampicilinem (100 μ g/ml) bylo naočkováno několik kolonií *E. coli* WP2 (pUC19) nebo *E. coli* WP2uvrA (pUC19) a kultivováno přes noc za stálého třepání (140 rpm) při 37°C.
2. 10 ml přes noc narostlé kultury bylo naočkováno do 250 ml LB média s ampicilinem (100 μ g/ml) a kultivováno při 37°C za stálého třepání (140 rpm) přes noc.
3. Kultura byla centrifugována 10 minut při teplotě 4°C při 6500 \times g, supernatant byl odstraněn a sediment promyt v STE pufru, poté následovala opět centrifugace po dobu 10 min při teplotě 4°C při 6500 \times g.
4. Sediment byl resuspendován v 10 ml roztoku P1, do něhož byla přidána RNáza A (100 μ g/ml).
5. Bylo přidáno 10 ml roztoku P2, suspenze byla opatrně promíchána a inkubována po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. Během inkubace byla připravena QIA kolona.
6. K lyzátu buněk bylo přidáno 10 ml vychlazeného roztoku P3 a opatrně promícháno.
7. Vzniklá směs byla přemístěna do QIA kolony a inkubována při laboratorní teplotě po dobu 10 minut. Během inkubace byla HiSpeed Maxi Tip kolona aktivována QBT roztokem.
8. Filtrací lyzátu buněk přes QIA kolonu byla získána čirá směs obsahující plazmidovou DNA
9. Čirá směs byla přemístěna do aktivované HiSpeed Maxi Tip kolony a ponechána protéct

přes filtr, kde byla zachycena plazmidová DNA.

10. HiSpeed Maxi Tip kolona byla promyta 60 ml roztoku QC.
11. Plazmidová DNA byla eluována 15 ml roztoku QF do připravené erlenmayerovy baňky a poté precipitována přidavkem 10,5 ml izopropanolu při laboratorní teplotě po dobu 5 min. Během inkubace byl odstraněn píst z 30 ml stříkačky a na ústí nasazen QIA precipitátor.
12. Směs plazmidové DNA s izopropanolem byla přemístěna do 30 ml stříkačky s nasazeným precipitátorem. Pístem byla protlačena přes precipitátor, kde byla zachycena jen plazmidová DNA. Plazmidová DNA zachycená v precipitátoru byla promyta 70% etanolem.
13. Precipitátor byl nasazen na ústí 5 ml stříkačky, do ní byl napipetován 1 ml TE pufru, do stříkačky byl vložen píst a plazmidová DNA zachycena do eppendorfovy zkumavky.

4.5.4.2. Mini izolace plazmidové DNA pomocí kitu od firmy QIAGEN

(HiSpeed™ Plasmid Purification, Mini Kit)

1. Pro mini izolaci byl použit pelet pocházející z maximálně 5 ml bakteriální suspenze.
2. Pelet buněk byl resuspendován v 0,3 ml roztoku P1. Poté bylo přidáno 0,3 ml roztoku P2, suspenze byla opatrně promíchána a inkubována po dobu 5 minut při pokojové teplotě.
3. Bylo přidáno 0,3 ml vychlazeného roztoku P3, suspenze byla opatrně promíchána a inkubována na ledu po dobu 5 minut.
4. Lyzát buněk byl centrifugován po dobu 10 minut při $12000 \times g$.
5. Aplikací 1 ml QBT roztoku na QIAGEN-tip kolonu byla tato kolona aktivována.
6. Supernatant byl přenesen do aktivované QIAGEN kolony a byl přefiltrován přes filtr, kde byla zachycena plazmidová DNA. Poté byla kolona promyta 4 x 1 ml roztoku QC.
7. DNA byla eluována 0,8 ml roztoku QF.
8. Byla provedena precipitace DNA přidavkem 0,56 ml izopropanolu. Poté byla provedena centrifugace po dobu 30 minut při $12000 \times g$.
9. Poté byla DNA promyta 1 ml 70 % ethanolu, po odstranění supernatantu byl sediment vysušen a rozpuštěn v odpovídajícím pufru.

4.5.4.3. Izolace plazmidové DNA fenol-chloroformovou extrakcí (Chowdhury, 1991)

1. K 0,5 ml bakteriální kultury *E. coli* narostlé přes noc v LB médiu bylo přidáno 0,5 ml směsi fenol-chloroform-izoamylalkohol (25:24:1).
2. Směs byla promíchána 1 minutu na Vortexu.
3. Směs byla centrifugována 5 minut při $12000 \times g$.

4. Bylo odebráno 0,45 ml svrchní vodní fáze, která byla smíchána s 0,5 ml izopropanolu
5. Směs byla krátce promíchána a centrifugována 5 minut při $12000 \times g$.
6. Byl odstraněn supernatant a k sedimentu bylo opatrně přidáno 0,5 ml 70% EtOH, který byl vzápětí odstraněn. Toto promytí bylo ještě jednou zopakováno.
7. Sediment DNA byl vysušen a rozpuštěn v odpovídajícím pufru.

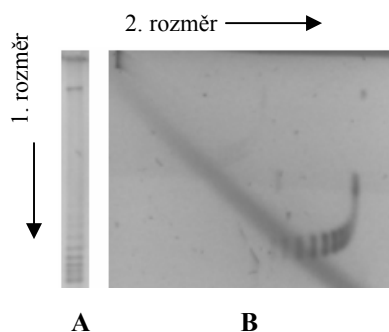
4.5.4.4. Uvolnění plazmidové DNA z buněk za nenedaturačních podmínek

1. K sedimentu buněk z 1 ml bakteriální kultury bylo přidáno 50 μ l lyzačního pufru Sigma .
2. Do suspenze byl přidán SDS tak, aby jeho koncentrace činila 0,1%.
3. Suspenze byla zmrazena na -70°C a poté rozmrazena; tento krok byl proveden celkem 3 \times .
4. Suspenze byla centrifugována 15 minut při $15000 \times g$.
5. Viskózní supernatant byl přepipetován do nové zkumavky a byl k němu přidán 1 μ l EDTA.
6. Suspenze byla 3 \times protažena injekční stříkačkou, aby byla zbavena viskozity.
7. Analýza byla provedena elektroforeticky

4.5.5. Detekce DNA topoizomerů pomocí 2D elektroforézy

Dvourozměrná agarózová gelová elektroforéza byla použita u vzorku sc DNA pUC19 izolované z buněk *E. coli* WP2(pUC19) inkubovaných ve sterilní vodě po dobu 18 hodin (obr. 10.A) pro ověření, že se u proužků na elektroforetickém gelu jedná o jednotlivé topoizomery této plazmidové DNA a ne o fragmenty DNA chromozomální.

Plazmidová DNA byla analyzována na 1,5% agarózovém gelu ve dvourozměrném uspořádání. Pro elektroforézu v prvním rozměru byl použit pufr TAE. Elektroforéza probíhala 24 hodin při 4°C a 4,6 V/cm. V druhém rozměru byl do celkového pufru přidán 10 $\mu\text{g/ml}$ chloroquin, elektroforéza probíhala 19 hodin při 4,1 V/cm, 4°C (obr. 10.B)



Obr. 10: (A) Plazmidová DNA pUC19 z buněk inkubovaných ve vodě, (B) 2D agarózová gelová elektroforéza plazmidové DNA pUC19 z buněk inkubovaných ve vodě. Šipka označuje směr elektroforetické separace.

4.5.6. *In situ* modifikace buněk cisplatinou

1. Do 20 ml sterilního LB média s ampicilinem (100 µg/ml) bylo naočkováno několik kolonií kmene *E. coli* WP2 (pUC19) a *E. coli* WP2uvrA (pUC19) a kultivováno přes noc za stálého třepání (140 rpm) při 37°C.
2. 20 ml přes noc narostlého inokula bylo rozděleno na 4×5 ml, naočkováno do 4×250 ml LB média s ampicilinem (100 µg/ml) a kultivováno při 37°C za stálého třepání (140 rpm) po dobu 4 hodin do exponenciální fáze ($OD_{600} = 0,6$).
3. Kultura buněk byla centrifugována po dobu 10 min při teplotě 10°C při 2600 × g a poté byl odstraněn supernatant.
4. Sediment byl dvakrát promyt sterilní miliQ vodou a suspenze buněk centrifugována po dobu 10 min při teplotě 10°C při 2600 × g.
5. K sedimentu buněk bylo přidáno 18 ml sterilní miliQ vody. Suspenze byla rozdělena do čtyř ekvivalentů, ke kterým byl přidán roztok cisplatin tak, aby výsledná koncentrace cisplatin činila 10 µM nebo 50 µM.
6. Buňky byly v roztoku cisplatin inkubovány při 37°C, po dobu 18 hodin při 50 rpm bez přístupu světla.
7. Po inkubaci byla buněčná suspenze centrifugována 10 min při teplotě 10°C a při 2600 × g a poté byl sediment dvakrát promyt sterilní miliQ vodou.

Jako kontrolní vzorek byla použita stejně připravená buněčná suspenze inkubovaná bez cisplatin.

4.5.7. Srážení plazmidové DNA

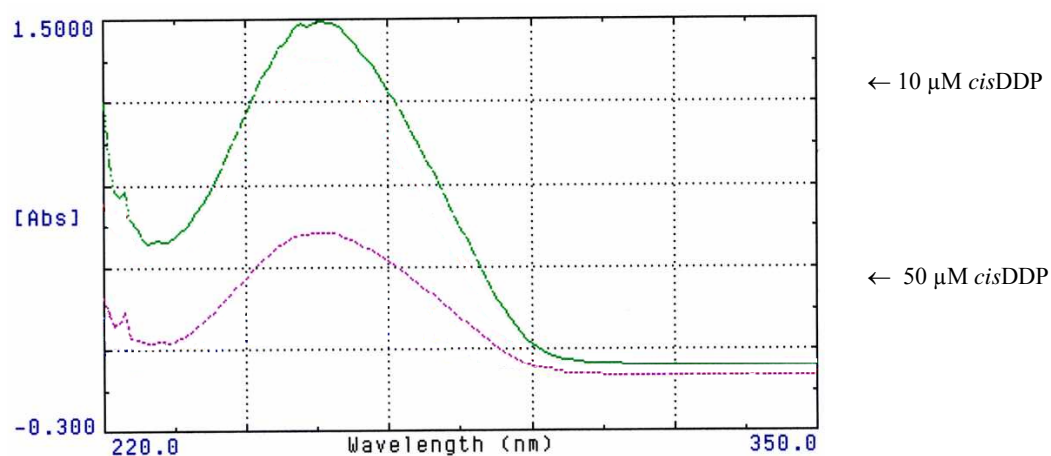
1. Pomocí mikropipety byl změřen objem roztoku DNA.
2. Ke vzorku obsahujícímu plazmidovou DNA bylo přidáno 2,5 objemu vychlazené srážecí směsi, směs byla promíchána.
3. Směs byla krátce centrifugována a poté inkubována při teplotě -70°C po dobu dvou hodin.
4. Směs byla centrifugována po dobu 15 minut při teplotě 5°C při 15000 × g.
5. Supernatant byl pomocí mikropipety odstraněn, k sedimentu byl přidán 1 objem 80 % etanolu.
6. Směs byla centrifugována po dobu 15 min při teplotě 5°C při 15000 × g.

7. Supernatant byl pomocí mikropipety opatrně odstraněn.
8. Sediment byl sušen ve vakuu v exikátoru po dobu 15 minut.
9. DNA byla rozpuštěna v příslušném množství TE pufru, vodě nebo alkalickém pufru dle následného experimentálního protokolu.

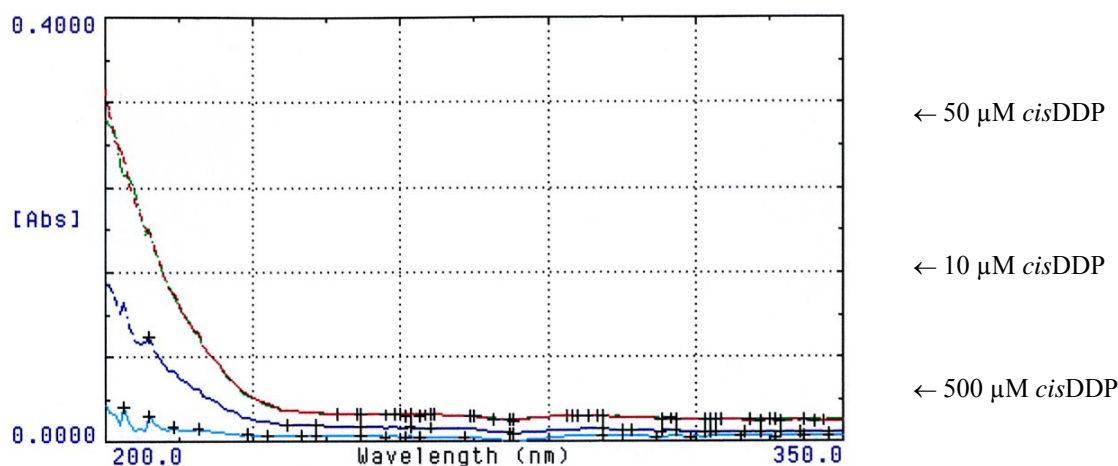
4.5.8. Stanovení čistoty a koncentrace DNA

Stanovení koncentrace DNA bylo provedeno spektrofotometrickým měřením vzorků na spektrofotometru Beckman v UV oblasti 260 nm. Pro absorbanci $A_{260} = 1$ platí, že koncentrace dsDNA je 50 $\mu\text{g/ml}$, při použití kyvety o délce optické dráhy $l = 1$ cm.

Pro stanovení čistoty DNA bylo využito poměru naměřené absorbance při 260 nm a absorbance při 280 nm. Pokud je tato hodnota rovna 1,80 – 1,85, je čistota DNA vyhovující. UV absorpční spektra plazmidové DNA pUC19 z buněk *E. coli* WP2 (pUC19) po *in situ* modifikaci cisplatinou jsou uvedena na obr.11. Kontrolní UV absorpční spektrum roztoku cisplatiny při $A_{260} - A_{280}$ je uvedeno na obr.12.



Obr.11 : UV absorpční spektrum plazmidové DNA pUC19 izolované z buněk *E. coli* WP2 (pUC19) po *in situ* modifikaci 10 μM a 50 μM roztokem cisplatiny po dobu 18 hodin. Index A_{260}/A_{280} byl stanoven 1,78 u buněk *E. coli* WP2 (pUC19) po *in situ* modifikaci 10 μM roztokem cisDDP a 1,90 u buněk *E. coli* WP2 (pUC19) po *in situ* modifikaci 50 μM roztokem cisDDP.



Obr.12: UV absorpční spektrum 50 μM , 10 μM a 500 μM roztoku cisplatiny.

4.5.9. Gelová elektroforéza DNA

4.5.9.1. Neutrální agarózová gelová elektroforéza

Pro analýzu plazmidové DNA byl připraven 1 % agarózový gel v TBE pufru (vana pro analytický gel: délka 19 cm, šířka 11,5 cm). Navážka činila 1,2 g agarózy na 120 ml TBE pufru. Gel byl rozvařen v mikrovlnné troubě za občasného míchání. Po ochlazení přibližně na 50°C byl nalit do předem připravené formy s hřebínkem a ponechán k zatuhnutí ve vodorovné poloze alespoň po dobu jedné hodiny. Po zatuhnutí byla forma s gelem přenesena do elektroforetické vany obsahující TBE pufr. Po odstranění hřebínku byly nanášeny vzorky pomocí mikropipety. Vzorky byly připravovány v celkovém objemu 15 μl , obsahujícím 2 μl nanášecího pufru a požadované množství DNA. Vzorek byl v případě potřeby doplněn miliQ vodou do celkového objemu 15 μl . Elektroforéza byla prováděna při konstantním napětí 1,5 V/cm při teplotě 4°C po dobu 15 hodin v submerzním uspořádání. Poté byl gel obarven v lázni s EtBr (0,5 $\mu\text{g/ml}$) a prohlížen na transiluminátoru. Pro dokumentaci byl gel vyfotografován.

Pro kontrolu vzorků (např. po linearizaci) byla používána elektroforetická vana o délce 10 cm a šířce 7cm. Byl připraven 1% agarózový gel v TBE pufru (viz. výše). Po jeho ochlazení na 50°C byl přidán EtBr (0,5 $\mu\text{g/ml}$), gel byl nalit do formy a ponechán k zatuhnutí ve vodorovné poloze po dobu jedné hodiny. Příprava vzorků a nanášení na gel byla provedena stejným způsobem jako u analytického gelu, elektroforéza byla však prováděna při napětí 8 V/cm při laboratorní teplotě po dobu 1,5 hodiny v submerzním uspořádání. Gel byl prohlížen na transiluminátoru, neboť již obsahoval EtBr. Pro dokumentaci byl gel vyfotografován.

4.5.9.2. Alkalická denaturační elektroforéza pro detekci IECL aduktů

Alkalická denaturační elektroforéza umožňuje oddělit molekuly s IECL adukty od molekul bez nich na základě rozdílné pohyblivosti molekul ss DNA od molekul, které jsou IECL adukty kovalentně spojeny. Přítomnost IECL aduktů cisplatiny na DNA se projeví sníženou elektroforetickou pohyblivostí DNA v porovnání s DNA bez IECL aduktů cisplatiny.

Byl připraven 1% agarózový gel ve vodě. Navážka činila 1,2 g agarózy na 120 ml destilované vody. Gel byl rozvařen v mikrovlnné troubě za občasného promíchávání. Po ochlazení na 60°C se upravil na 0,03 M NaCl a 1 mM EDTA. Gel byl promíchán, nalit do gelové formy a ponechán k zatuhnutí ve vodorovné poloze po dobu dvou hodin. Poté byl gel přelit alkalickým pufrem a ekvilibrován přes noc při 4°C. Druhý den byl přenesen do elektroforetické vany a zalit čerstvě připraveným alkalickým pufrem.

Vzorky DNA byly rozpuštěny v 18 µl alkalického pufru a po přidání 2 µl nanášecího pufru byly naneseny na připravený gel. Elektroforéza byla prováděna při napětí 3,5 V/cm při teplotě 4°C po dobu 16 hodin v submerzním uspořádání.

Po skončení elektroforézy byl gel neutralizován po dobu 2 x 15 min v TBE pufru za mírného třepání. Poté byl barven v lázni s EtBr (0,5 µg/ml) po dobu nejméně 15 min. Obarvený gel byl prohlížen na trasiluminátoru a vyfotografován pro dokumentaci.

4.5.10. Štěpení DNA restrikčními enzymy

Ke štěpení byl použit restrikční enzym EcoRI (G/AATTC) od firmy TAKARA o aktivitě 15 U/µl. U enzymu EcoRI je optimální teplota pro štěpení 37°C.

1. Do zkumavky byla připravena reakční směs o celkovém objemu 100 µl. Obsahovala DNA, 10 µl 10× koncentrovaného štěpícího pufru a 15 U EcoRI. Do výsledného objemu 100 µl byla směs doplněna sterilní miliQ vodou.
2. Štěpící směs byla promíchána, krátce centrifugována a inkubována po dobu 2 hodin při teplotě 37°C.
3. Kontrola štěpení byla provedena pomocí gelové elektroforézy.

4.5.11. Denaturace plazmidové DNA

Vzorek byl inkubován při 95°C po dobu 5 min., poté byl rychle ochlazen a krátce centrifugován.

4.5.12. SDS-PAGE proteinů

Příprava vzorků proteinů pro SDS-PAGE

1. K sedimentu buněk z 1 ml bakteriální kultury byl přidán lyzační puf B-Per od firmy Pierce. Směs byla inkubována po dobu 10 minut při laboratorní teplotě.
2. Vzorky byly centrifugovány po dobu 30 minut při $15000 \times g$ a teplotě 4°C .
3. Supernatant obsahující proteiny byl přemístěn do nových zkumavek.
4. 10 μl vzorku bylo smícháno s SDS nanášecím pufrem a inkubováno při 95°C po dobu 5 minut.
5. Poté byly vzorky nanесeny na 12 % SDS polyakrylamidový gel.

Provedení SDS PAGE

Po zpolymerizování gelu z něj byl odstraněn hřebínek, starty byly vyčištěny destilovanou vodou. Gel byl přenesen do vertikální elektroforézy a do jednotlivých komůrek byly nanесeny vzorky včetně velikostního standardu molekulové hmotnosti. Gel byl zalit příslušným pufrem v elektroforetické aparatuře. Elektroforéza probíhala při konstantním proudu 10 mA po dobu 6 hodin. Po skončení elektroforézy byl nejprve gel inkubován 3 x 5 minut v destilované vodě na třepačce a poté následovala inkubace po dobu 15 minut ve fixačním roztoku. Po fixaci se gel nechal opět promýt 15 minut ve vodě a následně byl inkubován v lázni s barvicím roztokem na proteiny (EZ Blue™ Gel) od firmy SIGMA po dobu nejméně 15 minut do obarvení separovaných proteinů.

4.5.13. Metoda pro detekci změny elektroforetické pohyblivosti DNA po interakci s proteiny (EMSA)

Princip metody EMSA (Electrophoretic mobility shift assay) spočívá v různé pohyblivosti volné DNA, která migruje na gelu rychleji, naopak DNA v komplexu s proteiny je v gelu bržděna. Lze vyjádřit rozdíl mezi pohyblivostí volné DNA a DNA v komplexu s proteinem analýzou vzdáleností od startu obou vzorků.

Příprava vzorků pro EMSA

1. Vzorky DNA byly linearizovány enzymem EcoRI, deproteinovány, přesráženy a rozpuštěny v TE pufru.
2. Ke vzorkům bylo přidáno odpovídající množství vázacího pufru (složení viz. kap. 4.3.2.6.)
3. Bylo přidáno odpovídající množství proteinu HMGB1b7.
4. Vzorky byly inkubovány v ledu 1 hodinu.

Provedení EMSA s DNA pUC19 (v agarózovém gelu)

1. Byl připraven 1% agarózový gel v 0,33× TBE pufru.
2. Po ochlazení na cca 50°C se gel nalil do formy (11,5 × 19 cm) a nechal ztuhnout.
3. Ke vzorkům DNA po reakci s proteinem se přidal nanášecí pufr s Oranž G.
4. Gel byl vložen do elektroforetické vany, převrstven pufrům 0,33× TBE a po vyjmutí hřebínku na něj byly nanесeny vzorky.
5. Elektroforéza probíhala při 50-100 V po dobu 5 hodin při teplotě 4°C.
6. Gel byl barven ponořením do roztoku 0,5 µg/ml EtBr na 30 minut, pozadí bylo odbarveno ponořením do destilované vody na 1 hodinu.

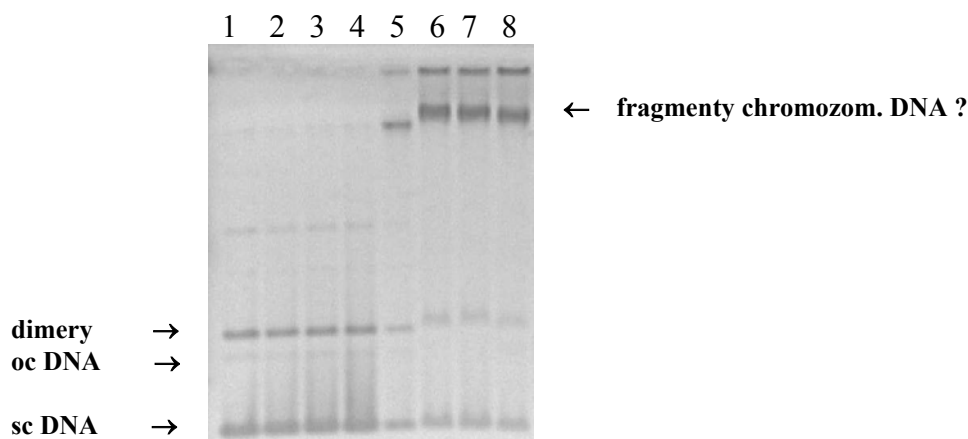
5. VÝSLEDKY

5.1. Analýza plazmidové DNA a spektra proteinů po působení UV záření na buňky *E. coli*

5.1.1. Analýza plazmidové DNA pUC19 z buněk *E. coli* po *in vitro* a *in situ* ozáření UV světlem

Pro ozáření UV světlem *in vitro* byla plazmidová DNA nejprve izolována z 1 ml bakteriální kultury *E. coli* WP2 (pUC19) fenol-chloroformovou extrakcí (kap. 4.5.4.3.), následně byly připraveny vzorky této DNA UV ozáření dávkou 0,12; 0,36 a 0,60 kJ/m² (obr. 13 linie 1–4) a analyzovány agarózovou elektroforézou. Výsledky byly porovnány s plazmidovou DNA připravenou z buněk ozářených UV za podmínek *in situ* (obr. 13 linie 5–8). V tomto případě byla plazmidová DNA izolována z jednoho ml UV světlem ozářené buněčné kultury *E. coli* WP2 (pUC19). Dávky UV byly stejné i za podmínek *in situ*, a to 0,12; 0,36 a 0,60 kJ/m². Připravená plazmidová DNA pUC19 po *in situ* ozáření byla podrobena agarózové elektroforéze.

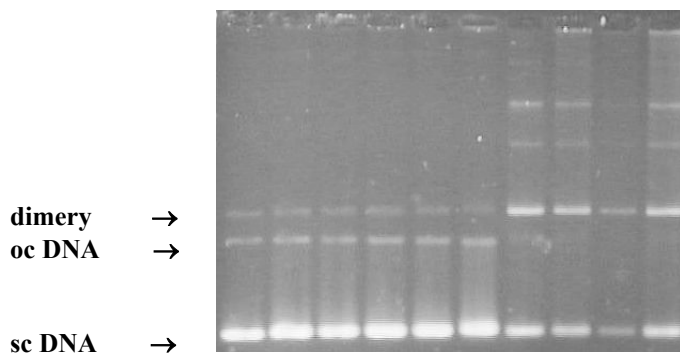
Výsledky analýzy ukazují (obr. 13), že při použití uvedených dávek UV záření nebyla pozorována výraznější změna v topologii vinutí superhelikální plazmidové DNA pUC19 ozářené *in vitro* a *in situ*. U plazmidové DNA izolované z neozářených buněk a následně ozářené UV *in vitro* pozorujeme převládající superhelikální (sc) formu, malé množství otevřené kruhové (oc) a dimerní formy. Přibližně stejné zastoupení jednotlivých forem bylo pozorováno u vzorků plazmidové DNA izolované z *in situ* ozářených buněk (obr. 13, linie 5–8), u kterých se navíc na elektroforeogramu objevil pomalu migrující výrazný proužek pravděpodobně přináležící fragmentům chromozomální DNA a svědčící o zachycení možných ranných fází reparačních pochodů představovaných vzájemnou interakcí specifických proteinů s ozářenou DNA, které nebyly odstraněny v průběhu miniizolace plazmidové DNA metodou fenol-chloroformové extrakce.



Obr.13: Gelová elektroforéza plazmidové DNA pUC19 z buněk *E. coli* WP2 (pUC19) po *in vitro* a *in situ* ozáření UV světlem dávkou 0,12 kJ/m², 0,36 kJ/m² a 0,60 kJ/m². (1) Kontrolní sc DNA pUC19 ; (2) DNA pUC19 po *in vitro* ozáření UV světlem v dávce 0,12 kJ/m²; (3) 0,36 kJ/m² a (4) 0,60 kJ/m²; (5) kontrolní sc DNA pUC19; (6) DNA pUC19 z buněk *E. coli* WP2 (pUC19) po *in situ* ozáření UV světlem v dávce 0,12 kJ/m²; (7) 0,36 kJ/m² a (8) 0,60 kJ/m². Podmínky elektroforézy: viz. kap. 4.5.9.1.

V následujících experimentech byla dávka UV záření zvýšena a plazmidová DNA pUC19 byla ozařována *in vitro* zvyšujícími se dávkami 0; 0,6; 1,2 ; 1,8 ; 2,4 a 4,8 kJ/m². V případě ozařování *in situ* byly buňky reparačně proficientního kmene *E. coli* WP2 nesoucího plazmid pUC19 kultivovány do exponenciální fáze a poté ozářeny UV světlem pouze jednou dávkou (2,4 kJ/m²). Takto ozářené buňky byly přeneseny do čerstvého LB média a rekultivovány po dobu 0, 60, 90 a 120 minut. Plazmidová DNA byla izolována z 1 ml husté buněčné suspenze pomocí kytu od firmy QIAGEN (viz. kap. 4.5.4.1.). Vzorky DNA pUC19 ozářené UV *in vitro* byly analyzovány gelovou elektroforézou (obr. 14 linie 1-6). Nebyly u nich pozorovány výrazné změny v topologii vinutí superhelikální formy. U vzorků DNA pUC19 izolované z buněk ozářených UV *in situ* bylo pozorováno větší zastoupení dimerní formy (obr. 14 linie 7). Agarózová elektroforéza preparátů plazmidové DNA pUC19 z rekultivovaných buněk také neprokázala výrazné kvalitativní změny (obr. 14, linie 8–10), také nebyla pozorována oc forma, z preparátu zřejmě odstraněná metodou přípravy plazmidové DNA alkalickou lyzí (kap. 4.5.4.1.). V důsledku probíhajících reparačních pochodů i na úrovni chromozomální DNA pozorujeme na elektroforeogramu (obr. 14 linie 8 – 10) slabý „závoj“ různě dlouhých fragmentů postupující od startů směrem ke kladnému pólu.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Obr.14: Gelová elektroforéza plazmidové DNA pUC19 z buněk *E. coli* WP2 (pUC19) po *in vitro* a *in situ* ozáření UV světlem. (1) kontrolní sc DNA pUC19; (2) DNA pUC19 po *in vitro* ozáření UV světlem o dávce 0,6 kJ/m²; (3) 1,2 kJ/m²; (4) 1,8 kJ/m²; (5) 2,4 kJ/m² a (6) 4,8 kJ/m². (7) sc DNA pUC19 z buněk *E. coli* WP2 (pUC19) po *in situ* ozáření UV světlem o dávce 2,4 kJ/m² a následné rekultivaci v LB médiu po dobu 0 min; (8) 60 min; (9) 90 min. a (10) 120 min. Podmínky elektroforézy: viz. kap. 4.5.9.1.

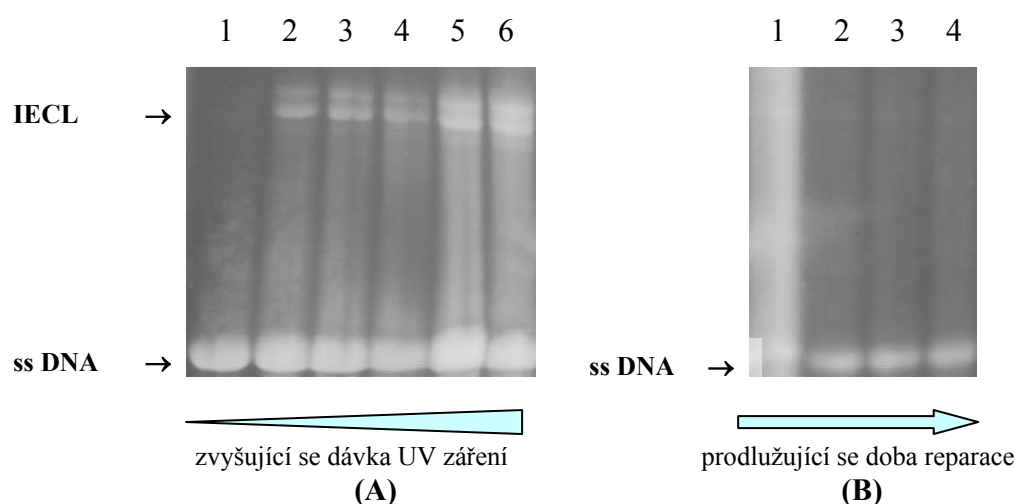
Přítomnost DNA aduktů na *in vitro* a *in situ* UV ozářené plazmidové DNA pUC19 získané z kmene *E. coli* WP2 (pUC19) byla prokázána pomocí alkalické denaturační gelové elektroforézy (kap. 4.5.9.2.) a pomocí elektroforetické metody umožňující retardační analýzu komplexu proteinu vázajícího se na poškozenou DNA ve srovnání s DNA volnou (kap. 4.5.13.).

5.1.2. Detekce IECL na plazmidové DNA ozářené UV světlem pomocí alkalické denaturační gelové elektroforézy

Plazmidová DNA pUC19 ozářená *in vitro* dávkami 0; 0,6; 1,2 ; 1,8 ; 2,4 a 4,8 kJ/m² a plazmidová DNA z buněk ozářených *in situ* dávkou 2,4 kJ/m² a rekultivovaných v čerstvém LB médiu po dobu 0, 60, 90 a 120 minut byla nejdříve linearizována restričním enzymem EcoRI. Inhibice restričního štěpení EcoRI v důsledku vytvoření IACL aduktů v místě štěpení nebyla pozorována. Po přesrážení a rozpuštění vzorků DNA pUC19 v alkalickém pufru byly vzorky naneseny na alkalický denaturační gel. Na alkalickém denaturačním gelu vykazují molekuly DNA pUC19 s IECL adukty sníženou elektroforetickou pohyblivost oproti jednořetězcové denaturované DNA.

IECL adukty po působení UV záření *in vitro* byly prokázány již u dávky UV záření 0,6 kJ/m² (obr.15A linie 2 -6). Se zvyšující se dávkou UV záření se zvyšuje i množství IECL.

U plazmidové DNA z buněk ozářených *in situ* (obr.15 B) UV světlem o dávce 2,4 kJ/m² nebyly IECL adukty detekovány, tudíž ani rekultivace a navození reparace buňkou hostitele kmene WP2 nemohla prokázat odstranění tohoto typu DNA lézí. Bylo ukázáno, že v buňkách ozářených dávkou 2,4 kJ/m² na úrovni plazmidové DNA nevznikají žádné detekovatelné meziřetězcové křížové vazby (obr. 15 B, linie 1) na rozdíl od podmínek *in vitro* (obr. 15 A, linie 5).



Obr.15: Alkalická denaturační elektroforéza (A) linearizované DNA pUC19 po *in vitro* ozáření UV světlem. (1) Kontrolní DNA pUC19 po štěpení enzymem EcoRI; (2) DNA pUC19 z buněk *E. coli* WP2 (pUC19) po *in vitro* ozáření UV světlem dávkou 0,6 kJ/m²; (3) 1,2 kJ/m²; (4) 1,8 kJ/m²; (5) 2,4 kJ/m² a (6) 4,8 kJ/m². (B) Alkalická denaturační elektroforéza DNA pUC19 z buněk *E. coli* WP2 (pUC19) ozářených *in situ* UV světlem (2,4 kJ/m²) a rekultivovaných v LB médiu (1) 0; (2) 60; (3) 90 a (4) 120 minut. Podmínky elektroforézy: viz. kap. 4.5.9.2.

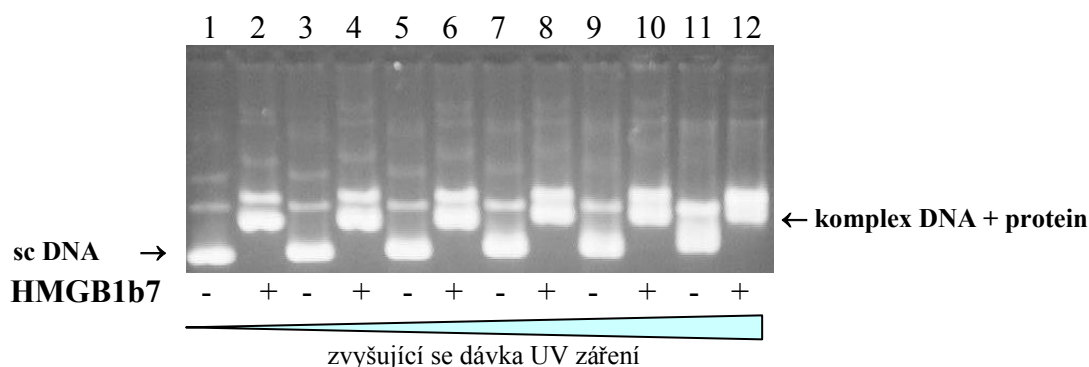
5.1.3. Detekce poškození na plazmidové DNA po ozáření UV světlem pomocí retardační analýzy metodou EMSA

Pro detekci poškození na plazmidové DNA způsobené UV zářením byl v tomto případě použit protein HMGB1b7, který je schopen se vázat na poškozenou DNA. Vazba proteinu HMGB1b7 k místu poškození DNA je pozorována zpomalením vytvořeného komplexu v gelu, oproti volné (nepoškozené) DNA.

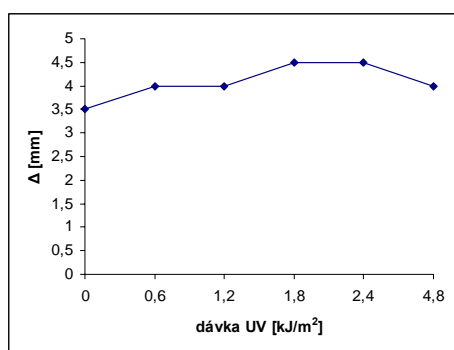
Pomocí metody EMSA (kap.4.5.13.) byla analyzována plazmidová DNA pUC19 po ozáření UV světlem *in vitro* dávkami 0; 0,6; 1,2; 1,8; 2,4 a 4,8 kJ/m² a plazmidová DNA pUC19 z buněk *E. coli* WP2 (pUC19) *in situ* ozářených UV světlem o dávce 2,4 kJ/m² a rekultivovaných v LB médiu po dobu 0, 60, 90 a 120 minut. Vzorky plazmidové DNA byly stejné jako při analýze IECL aduktů (kap. 5.1.2). Interakce proteinu HMGB1b7 s plazmidovou DNA ozářenou UV světlem byla sledována jak na úrovni superhelikální DNA, tak na linearizovaných vzorcích DNA.

Nejprve byla sledována interakce proteinu HMGB1b7 se superhelikální DNA plazmidu pUC19 v závislosti na zvyšující se dávce UV záření pomocí modifikované metody agaróžové elektroforézy. Při interakci ozářené i neozářené se formy plazmidové DNA, s proteinem HMGB1b7 je na elektroforetickém gelu viditelný posun proužků vzorků DNA s proteinem oproti vzorkům, které protein neobsahovaly (obr.16). Protein HMGB1b7 reaguje s distorzemi na DNA v důsledku již samotného superhelikálního vinutí (obr. 16 linie 1,2), a tudíž pozorovaný příspěvek

dávky UV záření je poměrně malý (obr. 16, 17). Přesto bylo u plazmidové DNA ozářené *in vitro* pozorováno, že zpoždění příslušného proužku na gelu po vazbě s proteinem se zvětšuje se zvyšující se dávkou UV záření a tvorbou více poškození na DNA (obr. 16 linie 4, 6, 8, 10). Při dávce UV záření 4,8 kJ/m² hodnota mírně klesá (obr.16 linie 12, obr. 17), pravděpodobně v důsledku snížené dostupnosti vazebných míst pro protein na superhelikální DNA ozářené UV světlem. Extrapolací lze vyvodit, že množství DNA aduktů rozpoznávaných proteinem HMGB1b7 je úměrné rozdílu vzdálenosti mezi proužky na elektroforetickém gelu u vzorků inkubovaných bez proteinu a s proteinem (obr.17).



Obr.16: Interakce proteinu HMGB1b7 s plazmidovou sc DNA pUC19 z buněk *E. coli* WP2 (pUC19) po *in vitro* ozáření UV světlem. (1) sc DNA pUC19 neozářená (2) po inkubaci s proteinem HMGB1b7. (3) Dávka UV 0,6 kJ/m², bez inkubace a (4) po inkubaci s HMGB1b7. (5) Dávka UV 1,2 kJ/m², bez inkubace a (6) po inkubaci s HMGB1b7. (7) Dávka UV 1,8 kJ/m², bez inkubace a (8) po inkubaci s HMGB1b7. (9) Dávka UV 2,4 kJ/m², bez inkubace a (10) po inkubaci s HMGB1b7. (11) Dávka UV 4,8 kJ/m², bez inkubace a (12) po inkubaci s HMGB1b7. Množství HMGB1b7 proteinu: 160 ng v objemu 20 µl reakční směsi. DNA v množství 200 ng. Ostatní podmínky reakce a elektroforézy viz. kap. 4.5.13.

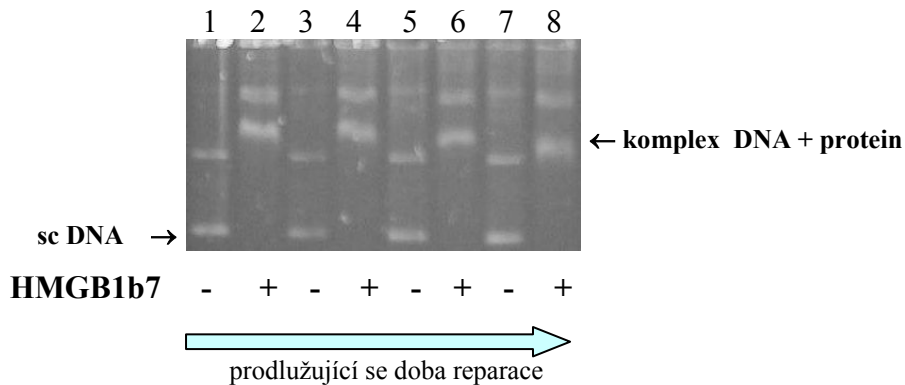


Δ ... změna pohyblivosti DNA na gelu po vazbě na protein

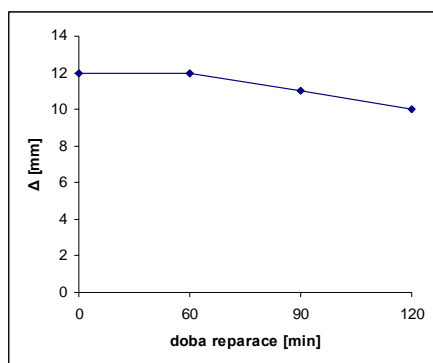
Obr.17: Grafické vyjádření změny pohyblivosti komplexu proteinu HMGB1b7 se superhelikální DNA v závislosti na dávce UV záření. Údaje z agarózové elektroforézy - obr. 16.

Analýza plazmidové DNA izolované z buněk WP2 po ozáření dávkou 2,4 kJ/m² a následné rekultivaci v LB médiu pomocí vazby HMGB1b7 proteinu byla provedena také pomocí retardace příslušného komplexu na agarózovém gelu. Do experimentu bylo vzato pouze 50 ng izolované

plazmidové DNA při zachování stejného množství proteinu (160 ng), tudíž byl zvýšen poměr protein : DNA. To se projevilo zvýšenou retardací na gelu a dovolilo přesněji určit i malé změny v elektroforetické pohyblivosti komplexu. Výsledek ozáření plazmidové DNA, připravené z buněk *E. coli* WP2, UV světlem *in situ* a jejich rekultivace v LB médiu je uveden na obr. 18. Lze pozorovat, že s prodlužující se dobou kultivace, tudíž působením reparačních procesů v buňkách příslušného kmene WP2, se posun mezi proužky na gelu zmenšuje (obr.18 linie 4, 6, 8, a obr. 19). Počet DNA aduktů, na které se váže protein HMGB1b7, se tedy snižuje.



Obr.18: Interakce proteinu HMGB1b7 s plazmidovou sc DNA pUC19 z buněk *E. coli* WP2 (pUC19) po *in situ* ozáření buněk UV světlem (dávka $2,4 \text{ kJ/m}^2$) a rekultivaci v LB médiu. (1) DNA pUC19 z buněk *E. coli* WP2 (pUC19) UV *in situ* ozáření UV $2,4 \text{ kJ/m}^2$ a rekultivaci v LB médiu po dobu 0 min bez HMGB1b7 a (2) s HMGB1b7; (3) reinkubace 60 min, bez HMGB1b7 a (4) s HMGB1b7. (5) rekultivace 90 min, bez HMGB1b7 a (6) s HMGB1b7. Rekultivace 120 min, bez HMGB1b7 a (8) s HMGB1b7. Množství HMGB1b7 proteinu: 160 ng v objemu 20 μl reakční směsi, DNA v množství 50 ng. Ostatní podmínky vazebné reakce a elektroforézy viz. kap. 4.5.13.

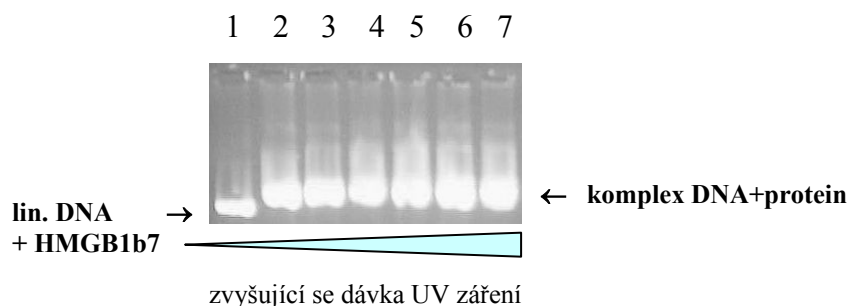


Δ ... změna pohyblivosti DNA na gelu po vazbě na protein

Obr.19: Grafické vyjádření změny pohyblivosti komplexu proteinu HMGB1b7 se superhelikální DNA izolovanou z buněk kmene WP2 ozářených UV $2,4 \text{ kJ/m}^2$ v závislosti na době rekultivace v LB médiu. Údaje z agarózové elektroforézy - obr. 18.

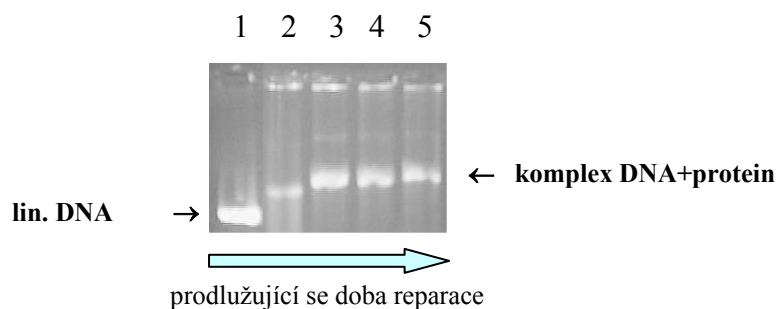
Aby byl vyloučen vliv superhelikálního vinutí při vazbě proteinu HMGB1b7 na DNA, ozářenou UV světlem, byla nejprve připravena UV světlem ozářená lineární forma plazmidové DNA pUC19. Při interakci linearizované plazmidové DNA pUC19 s proteinem HMGB1b7 lze na

agarózovém gelu sledovat slabý posun proužků, který se zvyšující se dávkou UV záření mírně zvětšuje (obr. 20). Méně výrazný posun linearizované DNA v závislosti na dávce UV záření pravděpodobně souvisí s velikostí molekuly DNA plazmidu pUC19 (2686 bp) a aplikací metody EMSA na tento typ relativně velkých molekul.



Obr.20: Interakce proteinu HMGB1b7 s linearizovanou plazmidovou DNA pUC19 po *in vitro* ozáření UV světlem. (1) Kontrolní neozářená sc DNA pUC19 po štěpení EcoRI. DNA pUC19 z buněk *E. coli* WP2 (pUC19) po *in vitro* ozáření UV světlem a inkubaci s proteinem HMGB1b7, dávka UV (2) 0 kJ/m²; (3) 0,6 kJ/m²; (4) 1,2 kJ/m²; (5) 1,8 kJ/m²; (6) 2,4 kJ/m² a (7) 4,8 kJ/m². Množství HMGB1b7 proteinu: 160 ng v objemu 20 μ l reakční směsi, DNA v množství 250 ng. Ostatní podmínky vazebné reakce a elektroforézy viz. kap. 4.5.13.

Sledování procesu reparace v buňkách WP2 po ozáření UV na modelovém objektu plazmidové DNA pUC19 kultivací buněk po UV ozáření bylo provedeno také na linearizované formě DNA pUC19, a to sledováním interakce s proteinem HMGB1b7 na gelové elektroforéze (obr. 21). Na úrovni linearizované DNA po inkubaci s proteinem HMGB1b7 nebyly pozorovány výrazné změny v pohyblivosti komplexu svědčící o probíhajících reparačních procesech v UV světlem ozářených bakteriálních buňkách. Dávka UV záření 2,4 kJ/m² je pro reprodukovatelné zachycení změn na úrovni plazmidové DNA zřejmě poměrně nízká a z tohoto experimentu nelze jednoznačně sledovat průběh reparace na plazmidové DNA za podmínek *in vivo*.



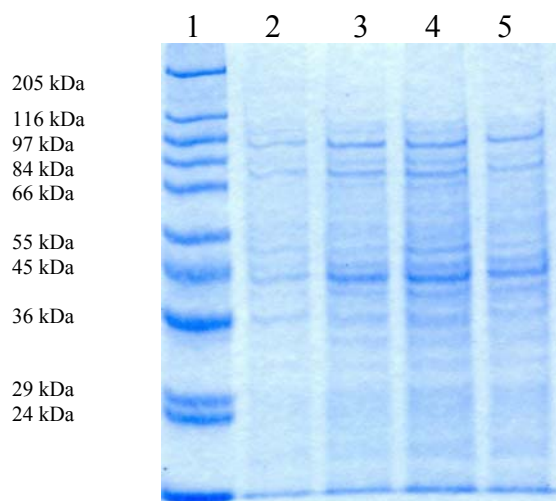
Obr.21: Interakce proteinu HMGB1b7 s linearizovanou plazmidovou DNA pUC19 z buněk *E. coli* WP2 (pUC19) po *in situ* ozáření UV světlem (2,4 kJ/m²) a rekultivaci v LB médiu. (1) Kontrolní neozářená sc DNA pUC19 po štěpení EcoRI. (2) Neozářená DNA pUC19 +HMGB1b7. (3) HMGB1b7+ DNA pUC19 z buněk *E. coli* WP2 (pUC19) po *in situ* ozáření UV (2,4 kJ/m²) a rekultivaci v LB médiu po dobu 0 min; (4) 60 min a (5) 120 min. Množství HMGB1b7 proteinu:

160 ng v objemu 20 μ l reakční směsi, DNA: v množství 80 ng. Ostatní podmínky vazebné reakce a elektroforézy viz. kap. 4.5.13.

5.1.4. Analýza exprese proteinů v průběhu reparace buněk po *in situ* ozáření UV světlem

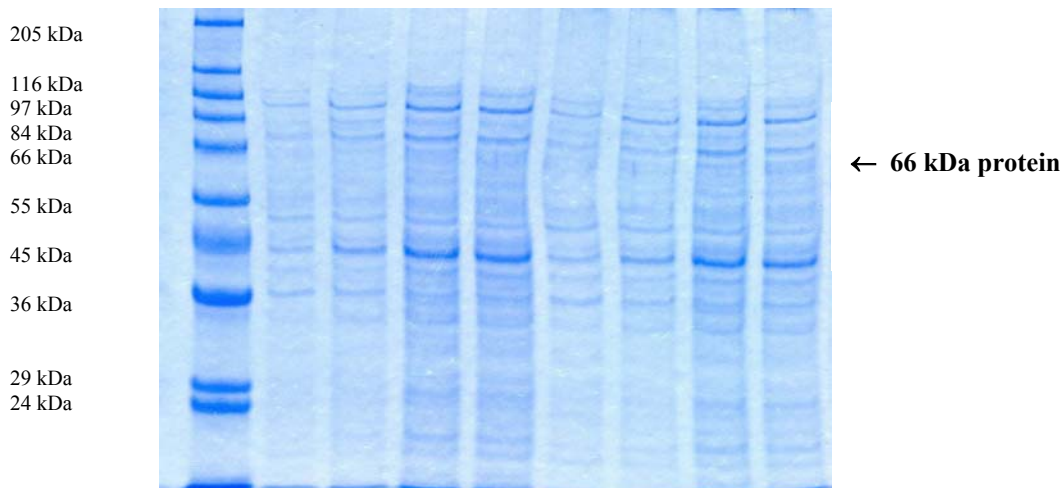
V následujících experimentech byla sledována možnost zachycení exprese některých reparačně důležitých proteinů v buněčných lyzátech UV světlem ozářených buněk *E. coli* v průběhu reparačních procesů na DNA.

U buněk *E. coli* WP2 (pUC19) inkubovaných v LB médiu do exponenciální fáze a poté buďto rekultivovaných v čerstvém LB médiu po dobu 0, 60, 120 a 180 minut nebo ozářených UV světlem dávkou 1,2 kJ/m² nebo 2,4 kJ/m² a rekultivovaných v čerstvém LB médiu po dobu 0, 60, 120 a 180 minut byla po lyzi provedena analýza celkových proteinů pomocí jednorozměrné denaturační SDS-PAGE (kap.4.5.12.). Spektrum proteinů u buněk ozářených UV světlem (obr. 23) je bohatší než u buněk neozářených (obr. 22), ačkoliv tato změna není příliš výrazná. Ve spektru proteinů buněk ozářených UV světlem se objevuje velmi slabý proužek v oblasti přibližně 66 kDa (obr. 23 linie 4, 5, 8, 9) v čase rekultivace nejméně 120 minut, který se neobjevuje u buněk neozářených (obr. 22, linie 5). Pravděpodobně se jedná o protein svou velikostí odpovídající proteinu UvrC (66 kDa).



Obr.22: Kontrolní SDS-PAGE lyzátů z buněk *E. coli* WP2 (pUC19) kultivovaných v LB médiu do exponenciální fáze, poté rekultivovaných v čerstvém LB médiu po dobu 0, 60, 120 a 180 minut. (1) standard molekulových hmotností; (2) vzorek z kmene *E. coli* WP2 (pUC19) rekultivovaný po dobu 0 min., (3) 60 min., (4) 120 min. a (5) 180 min. Podmínky SDS-PAGE: viz. kap. 4.5.12.

1 2 3 4 5 6 7 8 9



Obr.23: SDS-PAGE lyzátů z buněk *E. coli* WP2 (pUC19) po *in situ* ozáření UV světlem dávkou $1,2 \text{ kJ/m}^2$ a $2,4 \text{ kJ/m}^2$, poté rekvivovaných v čerstvém LB médiu po dobu 0, 60, 120 a 180 minut. (1) standard molekulových hmotností; vzorky lyzátů z kmene *E. coli* WP2 (pUC19) po *in situ* UV $1,2 \text{ kJ/m}^2$ a rekvivaci (2) 0; (3) 60; (4) 120 a (5) 180 minut a po *in situ* ozáření UV $2,4 \text{ kJ/m}^2$ a následné rekvivaci po dobu (6) 0; (7) 60, (8) 120 a (9) 180 minut. Podmínky SDS-PAGE: viz. kap. 4.5.12.

Předcházející výsledková část prokázala zejména metodické možnosti i jejich omezení při studiu průběhu reparačních procesů v reparačně proficientních buňkách kmene *E. coli* WP2 na úrovni plazmidové DNA za podmínek *in vivo*. Ve výše uvedených experimentech UV záření sloužilo jako původní a přirozený zdroj poškození DNA a indukce reparačních procesů, zachraňujících jak poškozenou chromozomální, tak i plazmidovou DNA. Po předcházející sérii experimentů a získání praktických zkušeností bylo přistoupeno ke studiu *in vivo* reparačních mechanismů plazmidové DNA po působení cisplatin s využitím kmene WP2 a jeho mutanty WP2uvrA.

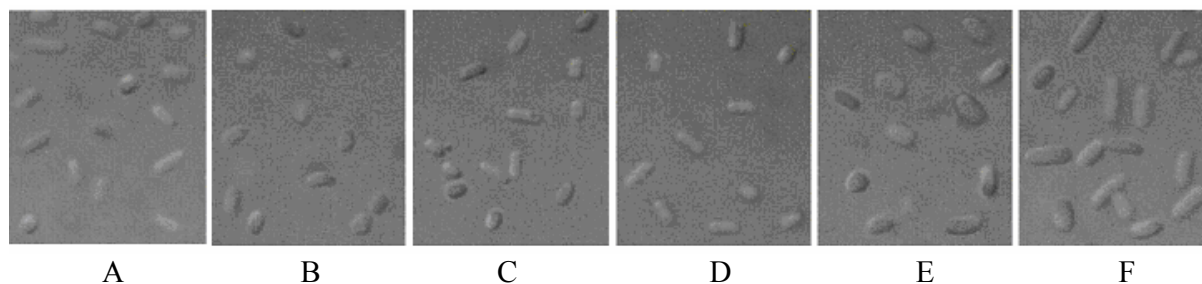
5.2. Sledování reparačních procesů buněk *E. coli* po působení cisplatin

5.2.1. Mikroskopie buněk *E. coli* po *in situ* modifikaci cisplatinou

Buňky *E. coli* WP2 (pUC19) byly modifikovány $50 \mu\text{M}$ roztokem cisplatin po dobu 18 hodin (kap. 4.5.6.). Po modifikaci byla cisplatin odmyta a buňky byly rekvivovány v čerstvém LB médiu po dobu 0; 30; 60; 90 a 120 minut. Poté byla provedena mikroskopie nativního nebarveného preparátu při použití kontrastu dle Nomarského (kap. 4.5.3). Mikroskopie byla prováděna i u buněk nemodifikovaných, inkubovaných 18 hodin ve sterilní destilované vodě za účelem pozorování morfologie buněk *E. coli* WP2 (pUC19) po dlouhodobé modifikaci $50 \mu\text{M}$ vodným roztokem cisplatin a sledování, zda dochází k morfologickým změnám v prvních dvou hodinách kultivace po modifikaci, tedy v době, kdy je aktivita reparačních procesů vysoká a současně nejméně 1% cisplatin je inkorporováno v interním prostředí buňky.

Pohyb buněk byl zaznamenán u buněk nemodifikovaných i u buněk modifikovaných a rekvivovaných, a to ve všech časových intervalech. Mezi nemodifikovanými buňkami a

buňkami modifikovanými, které nepodstoupily rekultivaci v LB médiu (0 minut), nebyl patrný větší rozdíl v morfologii (obr. 24 A,B). Přibližně po 90 minutách rekultivace modifikovaných buněk v LB médiu lze pozorovat pouze morfologické změny představující přípravu buněk na dělení. Na základě studia morfologie buněk reparačně proficientního kmene WP2 modifikovaných cisplatinou byla naznačena optimální doba přibližně do 2 hod. pro intenzivní reparační buněčné procesy.



Obr.24: Morfologie buněk *E. coli* WP2 (pUC19) *in situ* modifikovaných cisplatinou v průběhu reparační *in vivo*. (A) Buňky nemodifikované. Buňky modifikované *in situ* 50 µM roztokem cisplatinou a rekultivované v LB médiu po dobu (B) 0; (C) 30; (D) 60; (E) 90 a (F) 120 minut. Zvětšení 10×100.

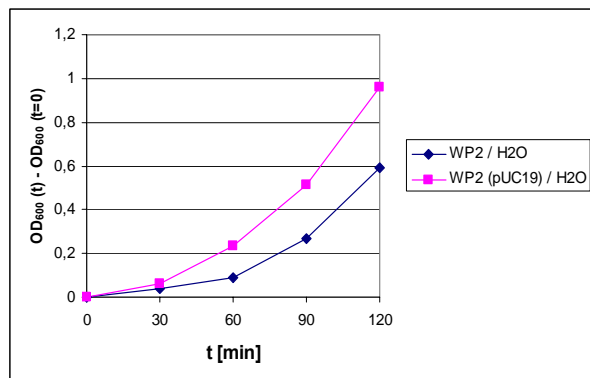
5.2.2. Růst buněk *E. coli* po *in situ* modifikaci cisplatinou a následné rekultivaci v LB médiu

Buňky *E. coli* WP2 a *E. coli* WP2 (pUC19) z 250 ml exponenciální kultury byly 18 hodin inkubovány v 10 µM nebo 50 µM roztoku cisplatin. Po odstranění roztoku cisplatinou a promytí buněčného sedimentu byly rekultivovány v čerstvém LB médiu po dobu 0, 30, 60, 90 a 120 minut. Byl hodnocen počet životaschopných buněk (CFU/ml) kultivací na agarových plotnách bezprostředně po *in situ* modifikaci (0 a 30 min) a v časových intervalech 0, 30, 60, 90 a 120 minut rekultivace byly také odebírány vzorky pro měření hustoty zákalu při $\lambda = 600$ nm. Z těchto hodnot byly sestaveny růstové křivky (obr. 25 B). Jako kontrola slouží buňky *E. coli* WP2 a *E. coli* WP2 (pUC19) z 250 ml exponenciální kultury inkubované 18 hodin ve vodném prostředí bez cisplatinou a rekultivované v LB médiu (obr. 25 A). Srovnávány byly také růstové křivky *E. coli* WP2 (pUC19) a WP2uvrA (pUC19) po *in situ* modifikaci 50 µM roztokem cisplatinou a rekultivaci v LB médiu (obr. 25 C).

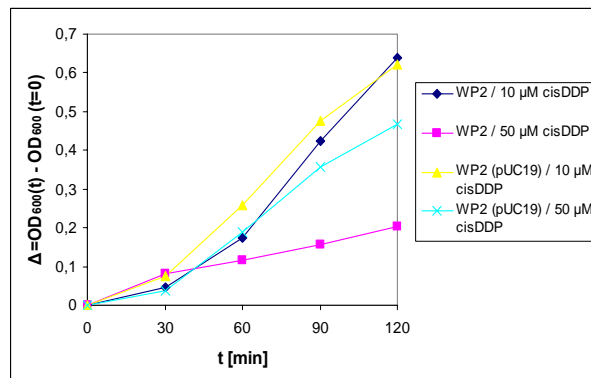
Pro ověření, zda nedochází ke ztrátě plazmidu v průběhu modifikace a reparační, byly buňky *E. coli* WP2 (pUC19) vysety jak na agarové plotny s ampicilinem (50 µg/ml), tak na plotny bez ampicilinu. Počty kolonií na agarových plotnách byly téměř shodné, ke ztrátě plazmidu tedy nedocházelo.

Buňky inkubované ve vodě a *in situ* modifikované buňky byly životaschopné a přibližně po dvou hodinách rekultivace v LB médiu schopny růstu (obr. 25 A, B, C).

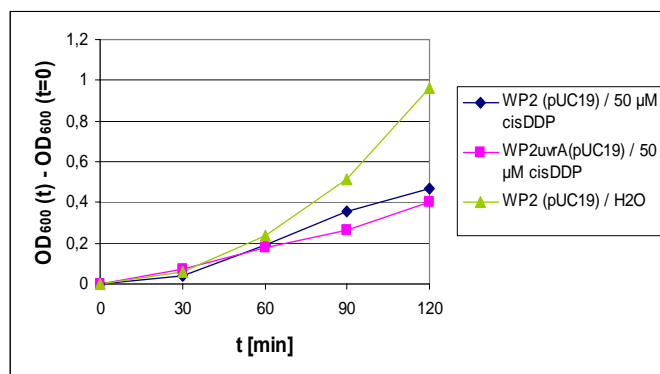
Byl hodnocen počet životaschopných buněk bezprostředně po *in situ* modifikaci cisplatinou (10 a 50 μM) a po 30 minutách rekultivace v LB médiu (obr. 26). Buňky po modifikaci 50 μM roztokem cisplatinou vykazují nižší životaschopnost než buňky modifikované 10 μM roztokem cisplatinou.



(A)

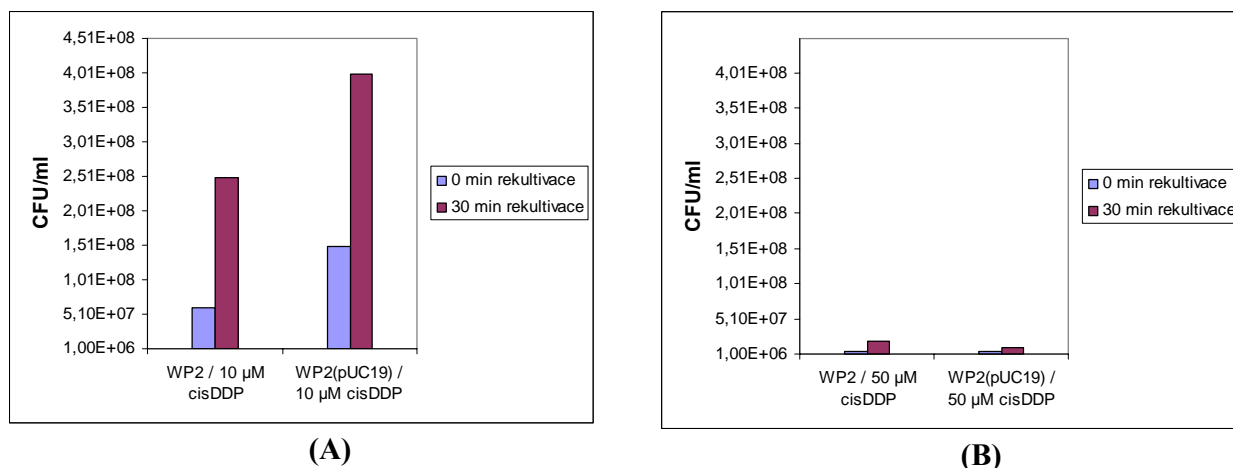


(B)



(C)

Obr. 25: Růstové křivky buněk *E. coli* WP2 a *E. coli* WP2 (pUC19) (A) po 18 h inkubaci ve vodě a rekultivaci v LB médiu, (B) po modifikaci 10 μM a 50 μM roztokem cisplatinou a rekultivaci v LB médiu, (C) *E. coli* WP2 (pUC19) po 18 h inkubaci ve vodě, *E. coli* WP2 (pUC19) a *E. coli* WP2uvrA (pUC19) po modifikaci 50 μM roztokem cisplatinou a rekultivaci v LB médiu.



Obr. 26: Počet životaschopných buněk *E. coli* WP2 a WP2 (pUC19) po *in situ* modifikaci (A) 10 µM a (B) 50 µM roztokem cisplatinu a rekvitaci v LB médiu.

5.2.3. Transformace kmenů *E. coli* WP2 a *E. coli* WP2uvrA plazmidovou DNA pUC19 modifikovanou cisplatinou

Jednou z experimentálních možností pro sledování reparace lézí na plazmidové DNA po působení cisplatinu je možnost transformace *in vitro* poškozené DNA do příslušných bakteriálních buněk a sledování účinnosti transformace.

Kompetentní buňky *E. coli* WP2 a *E. coli* WP2uvrA byly transformovány (kap. 4.5.1.) plazmidovou DNA pUC19 *in vitro* globálně modifikovanou 0,1 µM *cis*DDP po dobu 16 hodin a kontrolní nemodifikovanou DNA pUC19. Po transformaci byly buňky kultivovány v LB médiu po dobu 1; 6,5 a 20 hodin, vysety na LB agarové plotny s ampicilinem (50 µg/ml) a kultivovány přes noc při 37°C. Poté byla stanovena účinnost transformace buněk transformovaných modifikovanou a nativní plazmidovou DNA.

U obou kmenů transformovaných nativní plazmidovou DNA pUC19 byla transformace úspěšná již po 1 hodině kultivace v LB médiu. U buněk transformovaných DNA modifikovanou se transformanti objevují až po 6,5 hodinách kultivace. Účinnost transformace byla vyšší u deficientního kmene *E. coli* WP2uvrA (tab. 4).

Tab. 4: Transformace kmenů *E. coli* WP2 a WP2uvrA plazmidovou DNA pUC19 nemodifikovanou a globálně modifikovanou 0,1 μM roztokem cisplatiny.

Kmeny <i>E. coli</i>	Účinnost transformace [poč. transformantů / μg DNA]		
	1 hod *)	6,5 hod	20 hod
WP2 / M **)	-	2·10 ³	mnoho
WP2 / N ***)	5,75·10 ³	mnoho	mnoho
WP2uvrA / M	-	12,5·10 ³	mnoho
WP2uvrA / N	138·10 ³	mnoho	mnoho

*) doba kultivace transformovaných buněk

**) buňky transformované modifikovanou DNA (0,1 μM *cis*DDP)

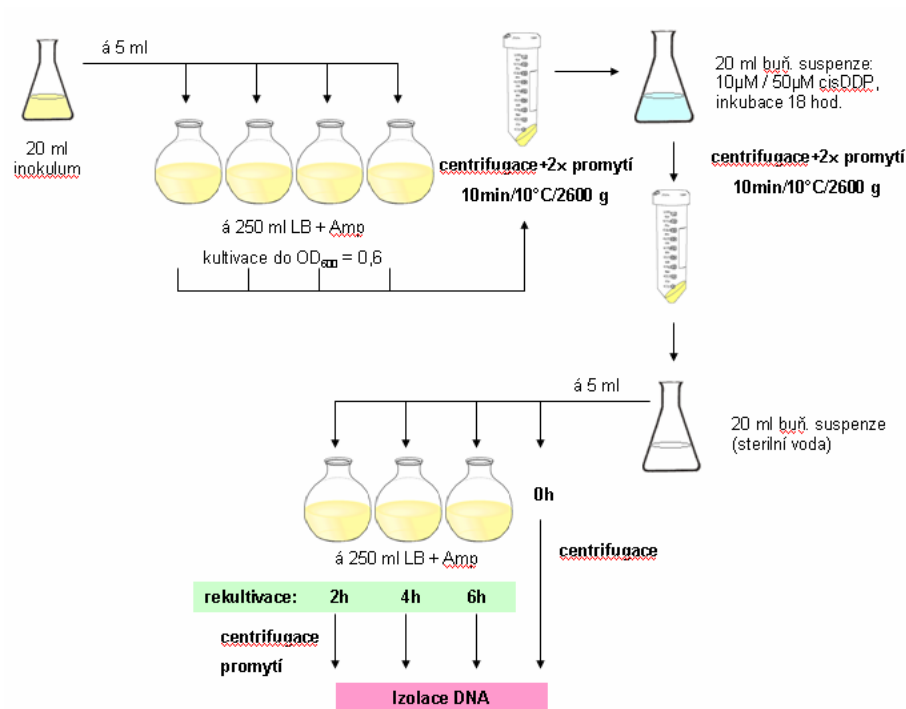
***) buňky transformované nemodifikovanou DNA

5.2.4. Sledování reparačních pochodů v buňkách *E. coli* po *in situ* modifikaci plazmidové DNA cisplatinou

V předcházející práci (Hyršová, 2004) bylo ukázáno, že po *in situ* modifikaci a následné rekultivaci v čerstvém LB médiu dochází v buňkách, zejména reparačně proficientního kmene *E. coli* WP2, k bouřlivé aktivitě proteinů a konvenčními metodami se z malého množství buněk nepodařilo získat dostatečné množství plazmidové DNA. Bylo vyzkoušeno několik postupů pro miniizolaci plazmidové DNA, většinou byl ale výtěžek plazmidové DNA z buněk po *in situ* modifikaci velmi nízký. Na základě získaných experimentálních zkušeností byl navržen postup, který pracuje se srovnatelným počtem buněk v průběhu reparačního procesu a současně jím lze získat dostatečné množství izolované plazmidové DNA využitím speciálního High speed kitu (QIAGEN) na bázi chromatografických kolon se zachováním reprodukovatelnosti izolačního postupu.

Pro získání dostatečného množství plazmidové DNA z buněk *E. coli* WP2 (pUC19) a *E. coli* WP2uvrA (pUC19) v průběhu reparační a sledování DNA reparačních procesů *in vivo* byla optimalizována metoda rekultivace buněk po *in situ* modifikaci. Schéma této metody je znázorněno na obr. 27.

Buňky po *in situ* modifikaci cisplatinou (kap. 4.5.6.) byly důkladně promyty, resuspendovány ve 20 ml sterilní miliQ vody a rozděleny na stejné objemové ekvivalenty o objemu 5 ml. Jeden podíl suspenze sloužil pro kontrolu izolace plazmidové DNA po *in situ* modifikaci a další 5 ml podíly buněčné suspenze byly použity jako inokulum pro rekultivaci buněk v čerstvém LB médiu s ampicilinem (100 μg/ml) a kultivovovány při 37°C za stálého třepání (140 rpm) po dobu 2, 4 a 6 hodin (resp. 30, 60, 90 a 120 minut). Buňky byly poté centrifugovány, promyty a byla z nich izolována DNA pomocí výše zmíněného kitu od firmy QIAGEN.



Obr. 27: Schéma *in situ* modifikace buněk cisplatinou a následné rekultivace v LB médiu pro přípravu plazmidové DNA.

5.2.4.1. Stanovení výtěžku plazmidové DNA pUC19 z buněk *E. coli* v průběhu reparačních procesů

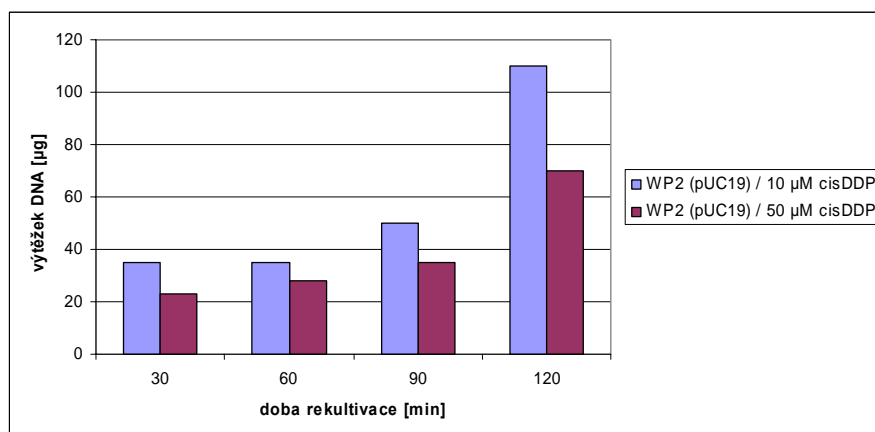
Z buněk *E. coli* WP2 (pUC19) po *in situ* modifikaci 10 μ M a 50 μ M roztokem cisplatinou a následné rekultivaci v LB médiu byla izolována plazmidová DNA pUC19 a byl stanoven její výtěžek.

Plazmidová DNA byla izolována z 250 ml bakteriální kultury kmene *E. coli* WP2 (pUC19). Buňky byly kultivovány do exponenciální fáze, poté promyty ve vodě a inkubovány v 10 a 50 μ M roztoku cisplatinou po dobu 18 hodin. Následně byla odmyta cisplatinou a buňky byly rekultivovány v čerstvém LB médiu po dobu 30, 60, 90 a 120 minut. Z buněk byla izolována plazmidová DNA pUC19 pomocí kitu od firmy QIAGEN a spektrofotometricky byl stanoven její výtěžek (kap. 4.5.8.).

U obou koncentrací cisplatinou lze po 120 minutách rekultivace pozorovat zvýšené množství plazmidové DNA. Replikace plazmidové DNA začíná u buněk inkubovaných v obou koncentracích cisplatinou po přibližně stejné době. Množství izolované plazmidové DNA bylo nižší u buněk inkubovaných v 50 μ M roztoku cisplatinou.

Tab.5: Výtěžek plazmidové DNA pUC19 izolované z buněk kmene *E. coli* WP2 (pUC19) po modifikaci 10 μM a 50 μM roztokem cisplatin (18 hodin) a následné rekultivaci v LB médiu po dobu 30, 60, 90 a 120 minut. Izolace byla prováděna z 250 ml bakteriální kultury.

kmen	koncentrace cisplatin [$\mu\text{M/l}$]	VÝTĚŽEK PLAZMIDOVÉ DNA			
		doba rekultivace [min]			
		30	60	90	120
<i>E. coli</i> WP2 (pUC19)	10	35 μg	35 μg	50 μg	110 μg
	50	23 μg	28 μg	35 μg	70 μg



Obr. 28: Výtěžek plazmidové DNA pUC19 izolované z buněk kmene *E. coli* WP2 (pUC19) po modifikaci 10 μM a 50 μM roztokem cisplatin (18 hodin) a následné rekultivaci v LB médiu po dobu 30, 60, 90 a 120 minut. Izolace byla prováděna z 250 ml bakteriální kultury.

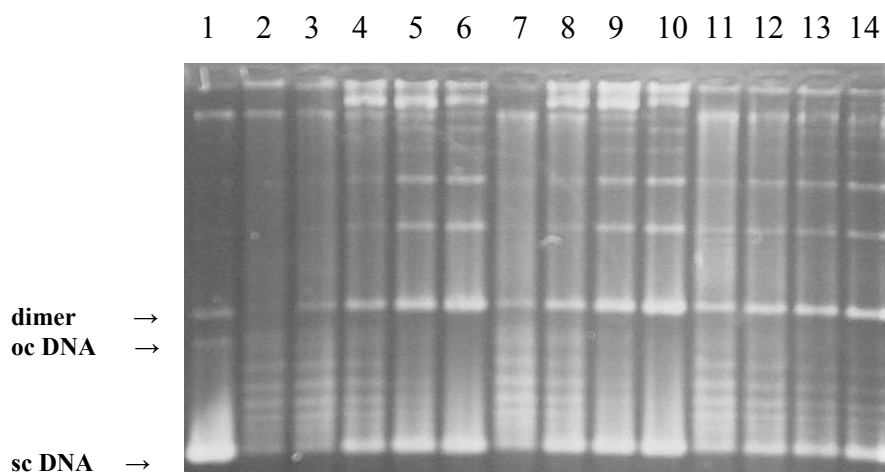
5.2.4.2. Analýza plazmidové DNA pUC19 z buněk *E. coli* po *in situ* modifikaci cisplatinou a následné rekultivaci v LB médiu v průběhu *in vivo* reparače

Buňky kmenů *E. coli* WP2 (pUC19) a *E. coli* WP2uvrA (pUC19) z 250 ml exponenciální kultury byly modifikovány 50 μM roztokem cisplatin po dobu 18 hodin a následně rekultivovány v čerstvém LB médiu po dobu 0, 2, 4 a 6 hodin. Byla z nich izolována plazmidová DNA pomocí kitu od firmy QIAGEN.

Kvalitativní analýza plazmidové DNA pUC19 byla sledována na 1% agarózovém gelu. U všech vzorků izolované DNA pUC19 modifikované *in situ* je přítomna sc a dimerní forma plazmidu (obr. 29). U vzorků modifikovaných 50 μM roztokem cisplatin za podmínek *in situ* bylo na gelu pozorováno odvíjení superhelikální plazmidové DNA, které bylo rezistentní vůči teplotní denaturaci (obr.29 linie 7, 8, 9, 10), je tedy zřejmé, že se nejedná o fragmenty DNA obsahující otevřené konce, ale o topoizomery superhelikální DNA. Byla provedena kontrolní inkubace buněk *E. coli* WP2 (pUC19) ve vodě bez přítomnosti cisplatin, aby bylo ukázáno, že k odvíjení superhelikálních otáček plazmidové DNA pUC19 nedochází intracelulárním

působením cisplatinou, ale důsledkem inkubace v hypotonickém prostředí a dlouhodobého hladovění buněk. Topoizomery superhelikální DNA pUC19 byly pozorovány i po inkubaci těchto buněk ve vodném prostředí bez přítomnosti cisplatinou (obr. 29 linie 2) a byly potvrzeny dvourozměrnou elektroforézou v přítomnosti chloroquinu (kap. 4.5.5.). Z toho plyne, že distribuce topoizomerů DNA pUC19 souvisí s inkubací buněk *E. coli* WP2 (pUC19) a *E. coli* WP2uvrA (pUC19) ve vodném hypotonickém prostředí a není výsledkem účinku samotné cisplatinou na plazmidovou DNA.

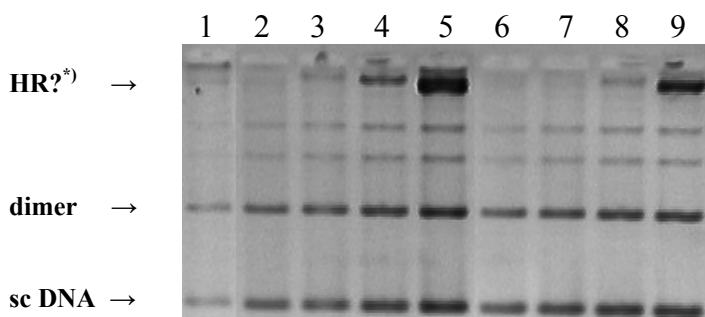
Z obr. 29 je dále patrné, že s prodlužující se dobou rekultivace buněk v LB médiu po modifikaci cisplatinou dochází k opětovnému návratu plazmidové DNA ke kompaktní sc formě, a to mnohem výrazněji u proficientního kmene WP2 (pUC19) (linie 3-6 a 11-14). U reparačně deficientního kmene WP2uvrA (pUC19) lze odvíjení sc plazmidové DNA pozorovat ještě po 6 hodinách rekultivace, zatímco u WP2 (pUC19) v tomto čase topoizomery již nejsou patrné. Je tím demonstrována odlišná dynamika buněčných procesů kmene WP2 ve srovnání s mutaním kmenem WP2uvrA.



Obr. 29: Gelová elektroforéza plazmidové DNA pUC19 z buněk *E. coli* WP2 (pUC19) bez denaturace a po denaturaci DNA a z buněk *E. coli* WP2uvrA (pUC19) modifikovaných *in situ* 50 μ M roztokem cisDDP po dobu 18 hodin a následně rekultivovaných v LB médiu. (1) sc DNA pUC19 z WP100 (pUC19); (2) pUC19 z buněk *E. coli* WP2 (pUC19) inkubovaných 18 hod. v H₂O; (3) DNA pUC19 z *E. coli* WP2 (pUC19) po modifikaci 50 μ M cisDDP a rekultivaci 0h; (4) 2h; (5) 4h a (6) 6h. (7) Denaturovaná DNA pUC19 z *E. coli* WP2 (pUC19) po modifikaci 50 μ M cisDDP a rekultivaci 0h; (8) 2h; (9) 4h a (10) 6h. (11) DNA pUC19 z *E. coli* WP2uvrA (pUC19) po modifikaci 50 μ M cisDDP a rekultivaci 0h; (12) 2h; (13) 4h a (14) 6h. Podmínky elektroforézy: viz. kap. 4.5.9.1., pro větší rozlišení dobarveno SYBR Green.

Na gelu s plazmidovou DNA pUC19 izolovanou z buněk *E. coli* WP2 (pUC19) po inkubaci v 10 μ M a 50 μ M roztoku cisplatinou a rekultivovaných v LB médiu sledujeme více či méně výrazný proužek těsně u startů (obr. 30). Proužek je výraznější u plazmidové DNA z buněk

inkubovaných v 10 μM roztoku cisplatinu a jeho intenzita vzrůstá s prodlužující se dobou rekultivace. Nevyskytuje se u DNA z buněk kmene WP2 (pUC19) bezprostředně po modifikaci a u DNA z buněk deficientního kmene WP2uvrA (pUC19) (obr. 29). Tento proužek se vyskytuje zřejmě v souvislosti s aktivitou proteinu RecA, tj. následkem homologní rekombinace.



*) HR = homologní rekombinace

Obr. 30: Gelová elektroforéza plazmidové DNA pUC19 z buněk *E. coli* WP2 (pUC19) modifikovaných v 10 μM a 50 μM roztoku cisDDP po dobu 18 hodin a rekultivovaných v LB médiu po dobu 30, 60, 90 a 120 minut. (1) Kontrolní DNA pUC19 z buněk *E. coli* WP2 (pUC19) inkubovaných 18 hodin ve vodě. (2) DNA pUC19 z buněk *E. coli* WP2 (pUC19) modifikovaných 10 μM cisDDP a rekultivovaných v LB médiu po dobu 30; (3) 60; (4) 90 a (5) 120 minut. (6) DNA pUC19 z buněk *E. coli* WP2 (pUC19) modifikovaných 50 μM cisDDP a rekultivovaných v LB médiu po dobu 30; (7) 60; (8) 90 a (9) 120 minut. Podmínky elektroforézy: viz. kap. 4.5.9.1.

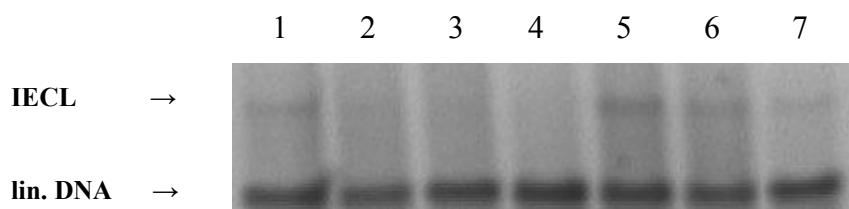
5.2.4.3. Detekce IECL aduktů pomocí alkalické denaturační gelové elektroforézy

Za pomoci alkalické denaturační elektroforézy byla zjišťována přítomnost IECL aduktů cisplatinu na plazmidové DNA izolované z buněk *E. coli* WP2 (pUC19) a *E. coli* WP2uvrA (pUC19) modifikovaných za podmínek *in situ* 50 μM roztokem cisplatinu po dobu 18 hodin (kap. 4.5.6.) a rekultivovaných v čerstvém LB médiu po dobu 0, 2, 4 a 6 hodin.

Plazmidová DNA byla nejdříve linearizována restričním enzymem EcoRI. Inhibice restričního štěpení EcoRI v důsledku *in situ* modifikace a vytvoření IACL aduktů v místě štěpení nebyla pozorována. Po přesrážení a rozpuštění vzorků DNA pUC19 v alkalickém pufru byly vzorky naneseny na alkalický denaturační gel (obr. 31). Na alkalickém denaturačním gelu vykazují molekuly DNA pUC19 s IECL adukty sníženou elektroforetickou pohyblivost.

IECL adukty cisplatinu byly prokázány u obou kmenů (obr. 31), s prodlužující se dobou rekultivace v LB médiu se snižuje množství IECL aduktů na plazmidové DNA. Procentuální zastoupení IECL aduktů bylo stanoveno denzitometricky. U kmene WP2 (pUC19) dosahuje procentuální zastoupení IECL aduktů bezprostředně po modifikaci 32% (viz. tab.6, obr.32), u kmene WP2uvrA (pUC19) je to 39%, tudíž přibližně stejné množství u obou kmenů.

U reparačně proficientního kmene WP2 (pUC19) se s prodlužující se dobou reaktivace výrazně snižuje množství IECL aduktů následkem reparačních procesů v buňkách. Po 6 hodinách reaktivace již nebyly detekovány žádné IECL adukty. Oproti tomu u deficientního kmene WP2uvrA byla po 6 hodinách reaktivace detekována 32 % IECL aduktů, což je jen o 7% méně než bezprostředně po inkubaci v roztoku cisplatinu.

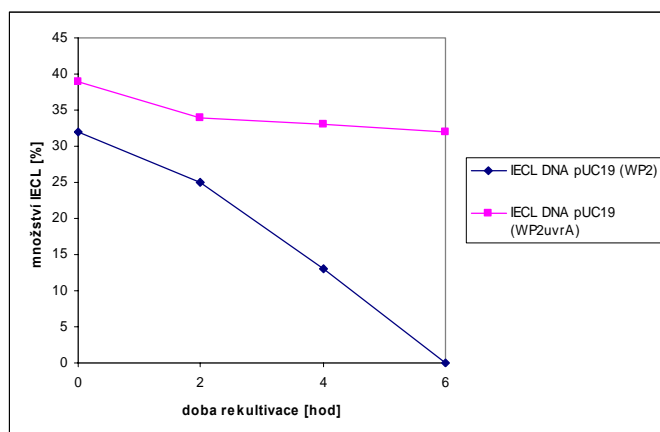


Obr. 31: Alkalická denaturační elektroforéza linearizované plazmidové DNA pUC19 z buněk *E. coli* WP2 (pUC19) a *E. coli* WP2uvrA (pUC19) po *in situ* modifikaci 50 µM cisDDP po dobu 18 hodin a reaktivaci v LB médiu. (1) DNA pUC19 z *E. coli* WP2 (pUC19) po *in situ* modifikaci 50 µM cisDDP a reaktivaci po dobu 0h; (2) 2h; (3) 4h a (4) 6h. (5) DNA pUC19 z *E. coli* WP2uvrA (pUC19) po *in situ* modifikaci 50 µM cisDDP a reaktivaci po dobu 0h; (6) 2h a (7) 6h. Podmínky elektroforézy: viz. kap. 4.5.9.2.

Tab. 6: Množství IECL aduktů cisDDP na plazmidové DNA v hostitelských kmenech *E. coli* WP2 a *E. coli* WP2uvrA po *in situ* modifikaci cisplatinou a následné reaktivaci v LB médiu.

čas (hod)	IECL DNA pUC19 (WP2)	IECL DNA pUC19 (WP2uvrA)
0	32%	39%
2	25%	34%
4	13%	33% ^{*)}
6	<1%	32%

^{*)} odečteno z grafu



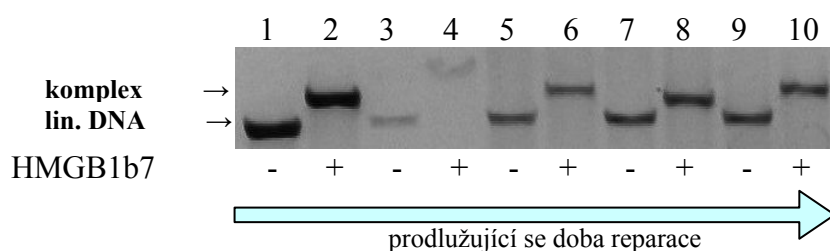
Obr. 32: Množství IECL aduktů cisDDP na plazmidové DNA v hostitelských kmenech *E. coli* WP2 a *E. coli* WP2uvrA po *in situ* modifikaci cisplatinou a následné reaktivaci v LB médiu.

5.2.4.4. Interakce plazmidové DNA pUC19 modifikované cisplatinou s proteinem HMGB1b7

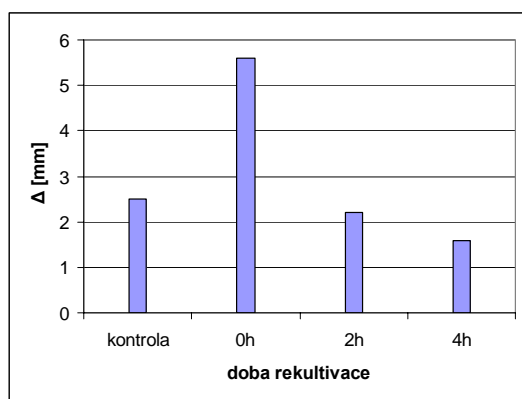
Pomocí gelové retardační analýzy (metoda EMSA, kap. 4.5.13.) byla zkoumána lineární forma plazmidové DNA pUC19 izolované z buněk *E. coli* WP2 (pUC19), které byly modifikovány *in situ* (kap. 4.5.6.) 50 μ M roztokem cisplatinou po dobu 18 hodin a rekvivovány v čerstvém LB médiu po dobu 0, 2, 4 a 6 hodin. K linearizaci byl použit restriční enzym EcoRI. Inhibice restričního štěpení EcoRI nebyla pozorována. Vzorky linearizované DNA byly rozpuštěny ve TE pufru, k nim bylo přidáno příslušné množství vázacího pufru a proteinu HMGB1b7. Takto připravené vzorky byly inkubovány v ledu po dobu 1 hodiny a naneseny na agarózový gel. Na agarózovém gelu vykazuje komplex DNA pUC19 s proteinem HMGB1b7 sníženou elektroforetickou pohyblivost (obr. 33).

Protein HMGB1b7 rozeznává distorze ve dvoušroubovici DNA a přednostně se váže na místa poškození na DNA po platinaci. Množství poškození na DNA je reflektováno stupněm vazby proteinu na DNA a je úměrné rozdílu vzdálenosti mezi proužky na elektroforetickém gelu u vzorku inkubovaného s proteinem HMGB1b7 (komplexu) a bez proteinu HMGB1b7 (volné DNA).

Největší zpomalení (retardaci) komplexu na gelu lze pozorovat bezprostředně po modifikaci (obr. 33 linie 3 a 4). Vzdálenost mezi proužky vzorků DNA inkubované bez proteinu HMGB1b7 a s proteinem se snižuje s prodlužující se dobou rekvivace, tudíž ubývá strukturně změněných míst na DNA rozeznávaných proteinem HMGB1b7. Zmenšující se rozdíl v elektroforetické pohyblivost, tj. v množství DNA aduktů, je znázorněno na obr. 34.



Obr.33: Interakce proteinu HMGB1b7 s linearizovanou plazmidovou DNA pUC19 z buněk *E. coli* WP2 (pUC19) po *in situ* modifikaci 50 μ M cisDDP po dobu 18 hodin a rekvivaci v LB médiu po dobu 0, 2, 4 a 6 hodin; vzorky bez přidání a po přidání proteinu HMGB1b7 (dále b7). (1) Nemodifikovaná DNA pUC19 z *E. coli* WP2 (pUC19) bez b7 a (2) s b7; (3) DNA pUC19 z *E. coli* WP2 (pUC19) po rekvivaci 0 h bez b7 a (4) s b7. (5) DNA pUC19 z *E. coli* WP2 (pUC19) po rekvivaci 2 h bez b7 a (6) s b7. (7) DNA pUC19 z *E. coli* WP2 (pUC19) po rekvivaci 4 h bez b7 a (8) s b7. (9) DNA pUC19 z *E. coli* WP2 (pUC19) po rekvivaci 6 h bez b7 a (10) s b7. Množství proteinu HMGB1b7: 160 ng v objemu 20 μ l reakční směsi, DNA v množství 100 ng, u linie 3 a 4 80 ng. Ostatní podmínky vazebné reakce a elektroforézy viz. kap. 4.5.13.

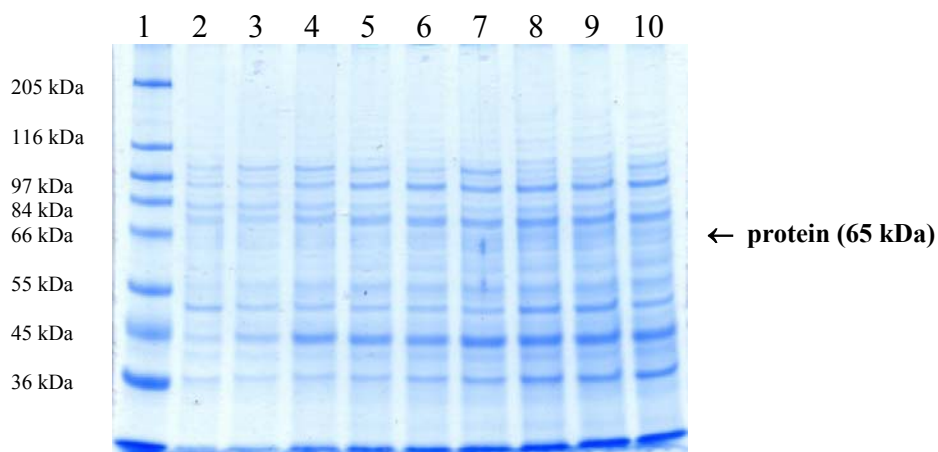


Δ ... změna pohyblivosti DNA na gelu po vazbě na protein

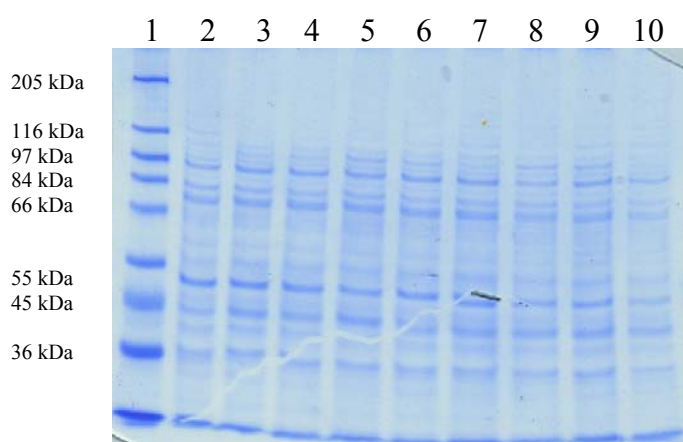
Obr. 34: Změna elektroforetické pohyblivosti plazmidové DNA z buněk v průběhu reparace po vazbě na protein (DNA pUC19 z buněk *E. coli* WP2 (pUC19) *in situ* modifikovaných *cis*DDP a rekvltivovaných v LB médiu). Údaje z agarózové elektroforézy: obr. 33.

5.2.4.5. Analýza exprese proteinů v průběhu reparace modifikovaných buněk *E. coli*

Buňky *E. coli* WP2 (pUC19) a *E. coli* WP2uvrA (pUC19) modifikované 50 μ M roztokem cisplatinu po dobu 18 hodin za podmínek *in situ* byly rekvltivovány v čerstvém LB médiu po dobu 0, 60, 120, 180, 210, 240, 270, 300 a 360 minut. Z 900 μ l bakteriální kultury z uvedených časů byl připraven lyzát proteinů a provedena SDS-PAGE (kap. 4.5.12.). U vzorků pocházejících z buněk *E. coli* WP2 (pUC19) rekvltivovaných v LB médiu (obr. 35A) se objevuje proužek, který chybí u vzorků izolovaných z buněk *E. coli* WP2uvrA (pUC19) (obr. 35B). Jeho velikost byla stanovena na cca 65 kDa. To přibližně odpovídá velikosti proteinu UvrC ($M_r = 66$ kDa).



A



B

Obr. 35 A,B : SDS-PAGE lyzátů z buněk kmenů *E. coli* WP2 (pUC19) a *E. coli* WP2uvrA (pUC19), které byly *in situ* modifikovány 50 μ M *cis*DDP po dobu 18 hodin a následně reaktivovány v LB médiu po dobu 0, 60, 120, 180, 210, 240, 270, 300 a 360 minut. **(A)** (1) Standard molekulových hmotností ; (2) vzorek z buněk kmene *E. coli* WP2 (pUC19) modifikovaných *cis*DDP a reaktivovaných v LB médiu 0 ; (3) 60; (4) 120; (5) 180; (6) 210; (7) 240; (8) 270; (9) 300 a (10) 360 minut. **(B)** (1) Standard molekulových hmotností ; (2) vzorek z buněk kmene *E. coli* WP2uvrA (pUC19) modifikovaných *cis*DDP a reaktivovaných v LB médiu 0 ; (3) 60; (4) 120; (5) 180; (6) 210; (7) 240; (8) 270; (9) 300 a (10) 360 minut.

6. DISKUZE

Tato diplomová práce je zaměřena na studium reparačních procesů v buňkách izogenních kmenů *E. coli* po působení UV záření a cisplatiny s využitím modelového systému plazmidové DNA pUC19, která byla do buněk transformována. Plazmid pUC19 byl zvolen díky podobnosti jeho čísla vinutí ($Lk_0 = 258$) a superhelikální denzity ($\sigma = -0,055$) s eukaryotickou chromozomální DNA *in vivo* (Serban a kol., 2002). Genotyp jednotlivých kmenů byl kontrolován pomocí UV testu (kap. 4.5.2.).

Experimenty, které se zabývaly sledováním reparační plazmidové DNA po působení UV záření, sloužily především pro ověření a optimalizaci metod vhodných ke studiu reparačních procesů na úrovni plazmidové DNA pUC19 po působení cisplatiny za podmínek *in vivo*.

Pro experimenty sledující reparaci *in vivo* bylo nezbytné získat dostatečné množství plazmidové DNA z buněk *in situ* modifikovaných cisplatinou v průběhu rekultivace v LB médiu. Nároky na množství preparátu plazmidové DNA pUC19 souviselo s dalšími analytickými postupy pro detekci poškození způsobených cisplatinou za podmínek *in situ* a následné monitorování reparačních procesů probíhajících v buňce na úrovni plazmidové DNA.

Úvodní experimenty, využívající UV záření jako zdroj poškození DNA, v sobě spojovaly několik výhod. Jednak využití UV záření jako přirozený zdroj poškození DNA a induktor exprese UvrABC endonukleázy v buňkách *E. coli* (Grossman a kol., 1998), jednak využití při ověření nároků na množství plazmidové DNA pro další analýzy (kap. 4.5.9.2., 4.5.13.). Třetí výhoda spočívala v možnosti pokračovat v experimentech přímo po ozáření plazmidové DNA UV světlem za podmínek *in vitro* bez dalších purifikačních kroků odstraňujících nezreagované chemické agens. Izolace plazmidové DNA z malého množství buněk ozářených UV světlem byla prováděna několika způsoby s cílem zachytit v průběhu reparační přechod superhelikální DNA do formy otevřené kruhové po působení UvrABC endonukleázy za podmínek *in vivo*.

Ukázalo se, že fenol-chloroformová extrakce plazmidové DNA (kap. 4.5.4.3.) a stejně tak i příprava za nenedenuračních podmínek (kap. 4.5.4.4.) jsou metody ne příliš vhodné pro účely tohoto výzkumu, neboť množství plazmidové DNA připravené z 1 ml buněk není dostatečné pro další analýzy. Převedení těchto izolačních postupů do větších objemů by také bylo poměrně problematické a obtížně reprodukovatelné. V dalších experimentech bylo použito pro získání a purifikaci plazmidové DNA komerčních kitů od firmy QIAGEN (kap. 4.5.4.1. a 4.5.4.2.) (www.qiagen.com), které umožňují rychlou a reprodukovatelnou přípravu preparátů plazmidové DNA především z nativních buněk. Pro naše účely, tedy pro účely práce s buňkami po ozáření UV světlem nebo modifikaci cisplatinou, nesou tyto kity také určité nevýhody. Ty spočívají především v tom, že pro získání plazmidové DNA z buněčných lyzátů využívají metodu

založenou na principu alkalické lyze (Maniatis, 1982), při které je z preparátu odstraněna nejen chromozomální DNA, ale také plazmidová DNA obsahující přerušeni fosfodiesterové vazby jakožto důsledek aktivity reparačních procesů a odstraní také intracelulární komplexy protein-DNA vzniklé díky působení cisplatinou (obr. 5). Výtěžnost plazmidové DNA po *in situ* modifikaci cisplatinou je proto ve srovnání s přípravou plazmidové DNA z buněk normálních při zachování stejných objemů buněčné suspenze podstatně nižší (obr. 28, tab. 5), a to jednak díky ztrátám plazmidové DNA v důsledku *in vivo* štěpení komplexem UvrABC endonukleázy v buňkách reparačně proficientního kmene WP2, jednak díky tvorbě komplexu protein-DNA indukované cisplatinou (Brabec, 2002). Při inkubaci buněk s cisplatinou se toto činidlo váže jak na DNA, tak i na proteiny, tudíž při inkubaci v roztoku o vyšší koncentraci cisplatinou dochází také ke vzniku většího množství komplexů DNA-protein. Ty jsou v purifikačních krocích při izolaci plazmidové DNA odstraněny. Pro maximální eliminaci ztrát při zachování reprodukovatelnosti bylo navrženo schéma postupu izolace plazmidové DNA, která byla poté využita v experimentech sledujících *in vivo* reparaci v buňce hostitele (kap. 5.2.4.). Uvedený postup, který používá stejné objemy buněk *in situ* modifikovaných cisplatinou jako inokulum pro rekultivaci, byl použit k získání preparátů plazmidové DNA pUC19 pro následující analýzy.

Pro detekci meziřetězcových křížových vazeb (IECL) indukovaných působením UV záření nebo cisplatinou na plazmidovou DNA pUC19 byla použita alkalická denaturační elektroforéza (kap. 4.5.9.2.). U plazmidové DNA *in vitro* ozářené UV světlem (Nejedlý a kol., 2001) byly IECL adukty pozorovány již při dávce $0,6 \text{ kJm}^{-2}$ (obr. 15 A), kdežto ve vzorcích plazmidové DNA z buněk *in situ* ozářených dávkou $2,4 \text{ kJm}^{-2}$ IECL detekovány nebyly (obr. 15 B, linie 1). Ve srovnání s množstvím IECL v plazmidové DNA pUC19 ozářené UV světlem *in vitro* stejnou dávkou (obr. 15 A, linie 5) byl prokázán výrazný protekční vliv prostředí buňky před vnějšími stresovými faktory prostředí. Pokud IECL po ozáření $2,4 \text{ kJm}^{-2}$ na plazmidové DNA pUC19 za podmínek *in situ* vznikají, pak v množství, které je pod hranicí detekovatelnosti této metody. IECL na plazmidové DNA pUC19 tudíž nebylo možné detekovat ani v preparátech získaných rekultivací ozářených buněk hostitele WP2 (obr. 15B, linie 2-4).

Další metodou používanou pro detekci poškození na DNA po zásahu vnějších činitelů (UV záření, cisplatinou) je elektroforetická metoda EMSA (kap. 4.5.13), tj. metoda retardační analýzy, která využívá specifické vazby proteinů na DNA (Laniel a kol., 2000). V této práci byl při aplikaci metody EMSA použit rekombinantní protein HMGB1b7 připravený v laboratoři molekulární biofyziky a farmakologie na BFU AV ČR, u kterého bylo již dříve za podmínek *in vitro* experimentů prokázáno, že rozpoznává cisplatinové adukty na DNA a váže se na místa poškození (Kašpárková a kol., 2003). Z výše uvedených důvodů nás zajímalo, zda bude protein HMGB1b7 rozpoznávat také plazmidovou DNA ozářenou UV světlem a zda může být použit jako

citlivý nástroj detekce poškození DNA. Bylo potvrzeno, že protein HMGB1b7 za podmínek uspořádání metody EMSA citlivě rozpoznává báze nespárované v důsledku superhelikálního vinutí plazmidové DNA a dokáže reagovat i s dlouhou (2686 bp) lineární plazmidovou DNA, zcela v soulase s již dříve publikovanými výsledky (Štros a Muselíková, 2000). Protein HMGB1b7 se váže jak na sc formu plazmidové DNA, tak na formu linearizovanou (obr. 16, linie 2; obr. 20, linie 2). Přesto nás zajímalo, zda bude tento protein preferovat poškození na DNA po ozáření UV světlem. Ukázalo se, že se zvyšující se dávkou UV záření, které působí na plazmidovou DNA pUC19 za podmínek *in vitro*, se zvyšuje retardace komplexu protein-scDNA, a to až do dávky $2,4 \text{ kJm}^{-2}$ (obr. 16, linie 2, 4, 6, 8, 10). Při dávce UV záření $4,8 \text{ kJm}^{-2}$ retardace komplexu nebyla již tak významná (obr. 16, linie 12). Metoda retardační analýzy je ovlivnitelná mnoha faktory (Laniel a kol., 2000) a zejména uspořádání agarózové elektroforézy s méně citlivým barvením EtBr oproti radioaktivně značené DNA se často ukázalo být limitujícím faktorem. Přesto i za těchto experimentálních podmínek protein HMGB1b7 citlivě reagoval s DNA ozářenou UV světlem. Z výsledků těchto experimentů však nelze usuzovat se kterými typy DNA aduktů vzniklých po UV záření (kap. 2.2.1.) reagoval.

Ve výsledcích dalšího experimentu (obr. 18 a 19) byla pomocí vazby proteinu HMGB1b7 na plazmidovou DNA pUC19 připravenou z ozářených buněk rekultivovaných v LB médiu poprvé detekována reparace po UV záření za podmínek *in vivo*, a to tím, že s prodlužující se dobou rekultivace se snižovala vazba tohoto proteinu na plazmidovou DNA (obr. 19). Dle výsledků těchto experimentů lze soudit, že při využití proteinu HMGB1b7 nebo některých dalších proteinů (např. proteinu XPA účastníceho se NER u eukaryot) a případně při využití značené DNA, by bylo možné elegantně monitorovat úbytek poškození na DNA v průběhu reparačních pochodů probíhajících v buňkách.

Aby byl eliminován vliv superhelikálního vinutí při interakci proteinu s DNA, vzorky plazmidové DNA byly linearizovány pomocí enzymu EcoRI. U plazmidové DNA *in vitro* ozářené dávkami 0; 0,6; 1,2; 1,8; 2,4 a $4,8 \text{ kJm}^{-2}$ se při zvyšování dávky UV záření množství DNA aduktů zvyšuje (obr. 20). Při ozáření $4,8 \text{ kJm}^{-2}$ je dávka UV záření již tak vysoká, že množství DNA aduktů inhibuje aktivitu proteinu HMGB1b7 (obr. 20, linie 7) stejně jako ve vzorcích se superhelikální DNA (obr. 16, linie 12). U plazmidové DNA z buněk ozářených *in situ* dávkou $2,4 \text{ kJm}^{-2}$ a rekultivovaných v čerstvém kultivačním médiu se snižuje retardace komplexu protein-DNA, tudíž se dá usuzovat, že se množství DNA aduktů snižuje s prodlužující se dobou rekultivace (obr. 18). To by mohlo být odrazem probíhajících reparačních procesů v buňce. O aktivitě a expresi reparačních proteinů by mohla svědčit i analýza spekter proteinů z lyzátů buněk ozářených UV světlem (obr. 22 a 23) metodou SDS-PAGE. Porovnáním výsledků elektroforeogramů lze pozorovat, že spektra proteinů buněk ozářených $1,2 \text{ kJm}^{-2}$ a $2,4 \text{ kJm}^{-2}$ jsou

bohatší a výraznější než spektra proteinů z buněk neozařených. Ve spektru proteinů buněk ozářených UV světlem, zejména dávkou $2,4 \text{ kJm}^{-2}$, se objevuje slabý proužek proteinu v oblasti mol. hmotnosti přibližně 66 kDa. Mohlo by se jednat o protein UvrC, jehož velikost je právě 66 kDa. Změny ve spektru proteinů neozařených a ozářených buněk nejsou tak výrazné patrně díky poměrně nízkým dávkám UV záření, které byly v experimentu použity, a které pravděpodobně nejsou dostatečnými induktory exprese reparačních proteinů u reparačně proficientního kmene *E. coli* WP2 (pUC19) v soulase s tím, že na plazmidové DNA pUC19 po *in situ* dávce $2,4 \text{ kJm}^{-2}$ nebyly detekovány žádné IECL (obr. 15 B). Použití vyšších dávek UV záření na buňky by však mělo značně negativní vliv na jejich životaschopnost.

Zaměření této části práce prokázalo možnost studia reparace plazmidové DNA pUC19 za podmínek *in vivo* a možnost využití metody retardační analýzy ve spojení s proteinem HMGB1b7 pro detekci změn na DNA vzniklých v důsledku zásahu vnějších činitelů (UV záření).

V procesu *in vivo* reparace po *in situ* modifikaci cisplatinou a následné rekultivaci byla sledována morfologie buněk *E. coli* WP2 (pUC19). Buňky byly modifikovány $50 \mu\text{M}$ roztokem cisplatinou a mikroskopicky byl sledován jejich růst v průběhu prvních dvou hodin rekultivace v čerstvém LB médiu, tedy v době, kdy v buňkách intenzivně probíhají reparační procesy. Bylo zjištěno, že buňky po modifikaci cisplatinou jsou pohyblivé, životaschopné a do dvou hodin jsou schopny vyrovnat se se stresem způsobeným modifikací cisplatinou a inkubací v hypotonickém prostředí (obr. 24). Z mnoha dřívějších prací je známo, že buňky *E. coli* kultivované v roztoku cisplatinou tvoří filamenta (Roat-Malone, 2002). Bylo také prokázáno (Hyršová, 2004), že prodloužený růst vykazují i buňky *E. coli* WP2 a *E. coli* WP100 (*uvrA*⁻, *recA*⁻), a že vliv na prodloužení buněk má i transformace plazmidem pUC19.

Byly též sledovány růstové křivky kmenů *E. coli* WP2 a *E. coli* WP2 (pUC19) po *in situ* modifikaci dvěma různými koncentracemi cisplatinou ($10 \mu\text{M}$ a $50 \mu\text{M}$). Srovnávány byly rovněž kmeny WP2 (pUC19) a WP2uvrA (pUC19) po *in situ* modifikaci $50 \mu\text{M}$ roztokem cisplatinou. *In situ* modifikované buňky byly ve všech případech životaschopné a přibližně po dvou hodinách inkubace v čerstvém LB médiu schopny růstu (obr. 25 A, B, C). Modifikace *in situ* v $50 \mu\text{M}$ roztoku cisplatinou působí na buňky v průběhu rekultivace více inhibičně a naopak nižší, $10 \mu\text{M}$ koncentrace cisplatinou, nevykazovala na buňky výraznější inhibiční účinek. Buňky kmenů WP2 a WP2uvrA s transformovaným plazmidem pUC19 se jevily „aktivnější“ a snáze se vyrovnávaly se stresovými podmínkami *in situ* modifikace cisplatinou ve srovnání s kmeny bez plazmidu (obr. 25). Otázkou zůstává, jak se transformace plazmidu pUC19 celkově projeví na funkci buněk v kmenech *recA*⁺. V této a v práci Hyršová 2004 bylo pozorováno, že kmen WP2uvrA (pUC19) má vyšší transformační aktivitu a po modifikaci $50 \mu\text{M}$ roztokem cisplatinou je jeho růst

srovnatelný s kmenem WP2 (pUC19). Mutace v genu *uvrA* se tudíž neprojevila na celkové viabilitě tohoto kmene, geneticky odvozeného od kmene WP2 wt.

Sledování životaschopnosti buněk kmenů WP2 a WP2 $uvrA$ po *in situ* modifikaci 10 a 50 μM roztokem cisplatinou (čas 0 min) a po 30 minutách rekultivace v LB médiu pozorováním tvorby kolonií na agarových plotnách prokázalo, že buňky po modifikaci 50 μM roztokem cisplatinou (obr. 26 B) vykazují nižší životaschopnost než buňky po modifikaci cisplatinou o nižší koncentraci. To odpovídá větší míře poškození, kterou buňce způsobí vyšší koncentrace tohoto činidla. Zajímavé bylo zjištění, že buňky transformované plazmidem pUC19 při obou použitých koncentracích cisplatinou *in situ* vykazovaly po 30 minutách rekultivace podstatně vyšší viabilitu než buňky bez plazmidu. Z předložených výsledků vyplývá, že je nutné věnovat pozornost změnám ve funkci buněk po transformaci plazmidy. Zdá se, že už samotná přítomnost plazmidové DNA v buňce může výrazně ovlivnit některé fyziologické funkce hostitelské buňky.

Jako jeden z přístupů k monitorování reparace DNA v buňkách se nabízela možnost sledování změn na plazmidové DNA globálně modifikované cisplatinou a transformované do buněk WP2 wt a reparačně deficientních buněk WP2 $uvrA$. Zvolení tohoto přístupu vycházelo z předpokladu, že kmen deficientní v genu kódujícím reparační protein UvrA se bude hůře vyrovnávat s transformací plazmidovou DNA poškozenou cisplatinou, která zde nebude reparována, a bude možné sledovat rozdíly mezi reparačními procesy u *uvrA* proficientního a deficientního kmene. Nižší účinnost transformace plazmidové DNA u kmenů deficientních v některých genech pro reparační proteiny prokázali např. Popoff a kol. (1986). V našem případě byla plazmidová DNA globálně modifikována 0,1 μM roztokem cisplatinou a transformována do hostitelských kmenů *E. coli* WP2 a *E. coli* WP2 $uvrA$. Překvapivě byla účinnost transformace vyšší u *uvrA* deficientního kmene (tab. 4), což by mohlo svědčit o aktivitě náhradních reparačních drah v případě deficiencie exprese základního reparačního proteinu UvrA. Výsledek může být ale částečně zkreslen tím, že při globální modifikaci DNA mohou zůstat některé molekuly DNA plazmidu nemodifikovány.

Po našich zkušenostech a prvních experimentech bylo navrženo jako metodicky přesnější sledování reparace transformací pouze na takové plazmidové DNA, která by nesla jeden definovaný adukt cisplatinou na specifické sekvenci, jež by byla vklonována do plazmidu pUC19. Tento postup by zaručil, že by všechny plazmidové molekuly byly modifikované a účinek transformace lépe interpretovatelný; růst kolonií po transformaci současně s expresí proteinu modifikovaného genu by pak jednoznačně svědčili o opravě DNA aduktu buňkou hostitele. V důsledku obtížnosti interpretace výsledků transformace plazmidovou DNA globálně modifikovanou cisplatinou, ve smyslu sledování reparačních pochodů v buňce, bylo od dalších experimentů zatím upuštěno. Zatím zůstává nezodpovězena otázka příčin zvýšené účinnosti

transformace u mutantního kmene WP2uvrA ve srovnání s WP2 vzhledem k tomu, že se jedná o izogenní kmeny.

Pro sledování reparačních procesů v buňkách *E. coli* byla optimalizována metoda *in situ* modifikace buněk cisplatinou a jejich následná rekultivace v čerstvém médiu (kap. 5.2.4.). V průběhu rekultivace byly odebírány vzorky buněk pro sledování změn, které při reparaci nastaly, jednak na úrovni plazmidové DNA, jednak ve spektru proteinů. Díky této metodě lze získat dostatečné množství plazmidové DNA pro následné analýzy.

Hodnota výtěžku plazmidové DNA po *in situ* modifikaci a v průběhu reparace buňkou hostitele prokázala, že již po 120 minutách rekultivace se zvyšuje množství plazmidové DNA (obr. 28), čili i za podmínek *in vivo* je většina poškození DNA odstraněna a nastává nejen replikace plazmidové DNA, ale také DNA chromozomální, která začíná u buněk modifikovaných v obou koncentracích cisplatinou po přibližně stejné době. Množství izolované plazmidové DNA bylo nižší u buněk modifikovaných v 50 μ M roztoku cisplatinou, k čemuž by mohlo docházet v důsledku většího množství biomakromolekul intracelulárně atakovaných cisplatinou. Dochází zde ke vzniku zejména různých vazeb protein-DNA, a tedy větších ztrát v průběhu izolace. Cisplatinu se v buňce váže jak na DNA, tak na proteiny, tudíž při inkubaci v jejím roztoku o vyšší koncentraci dochází také ke vzniku většího množství DNA-protein aduktů (obr. 5), které jsou při izolaci odstraněny. Pro naše účely by byla pravděpodobně nejvhodnější klasická příprava plazmidové DNA v izopyknickém gradientu CsCl v přítomnosti interkalační látky etidium bromidu (Maniatis, 1982). Tím by bylo možno získat z gradientu i ty molekuly, např. protein-DNA nebo molekuly s jedním přerušením řetězce apod., které jsou následkem alkalické lyze z preparátu odstraněny.

U plazmidové DNA pUC19 izolované z buněk *E. coli* WP2 (pUC19) a *E. coli* WP2uvrA (pUC19), které byly *in situ* modifikovány 50 μ M roztokem cisplatinou po dobu 18 hodin, bylo pozorováno rozvíjení superhelikální DNA a přítomnost topoizomerů (obr. 29, linie 3-6, 11-14). Kontrolní experimenty prokázaly, že existence topoizomerů v preparátech plazmidové DNA není způsobena intracelulární přítomností cisplatinou, ale že se jedná o důsledek inkubace buněk v hypotonickém prostředí v průběhu modifikace (obr. 29, linie 2). Topoizomery zůstaly stabilní i po tepelné denaturaci (obr. 29, linie 7-10), nejedná se tedy o fragmenty DNA obsahující otevřené konce, ale o odvinutou superhelikální DNA. Je všeobecně známo, že odvíjení superhelikální plazmidové DNA *in vitro* je ovlivněno teplotou, iontovou silou a negativním vinutím DNA (Sinden R.R., 1994) a rovněž bylo prokázáno, že dochází k odvíjení superhelikálních otáček plazmidové DNA po modifikaci cisplatinou za podmínek *in vitro* (Beck a kol., 1985; Popoff a kol., 1987; Vrána a kol., 1996). V této práci je ukázáno, že k odvíjení plazmidové DNA nedochází primárně v důsledku intracelulární modifikace cisplatinou. Ta může pouze přispívat

k odvíjení, ke kterému dochází v důsledku hladovění buňky, tudíž v důsledku deficitu ATP, který je nutný pro aktivní činnost příslušných topoizomeráz. Stupeň odvíjení plazmidové DNA za podmínek *in vitro* silně závisí na stupni modifikace (Vrána a kol., 1996). V této práci je prokázáno odvíjení superhelikálních otáček plazmidové DNA za podmínek *in situ* především v důsledku stresových podmínek. Rekultivací buněk, i nemodifikovaných, v čerstvém LB médiu dochází k opětovnému zavinutí plazmidové DNA do sc formy. Tím bylo ukázáno, že odvíjení a zavinutí plazmidové DNA souvisí především s hladověním buněk během několikahodinové inkubace v hypotonickém prostředí. Na druhou stranu se ale zavinutí plazmidové DNA u buněk *in situ* modifikovaných cisplatinou v průběhu rekultivace projevilo mnohem výrazněji u kmene WP2 (pUC19) než u deficientního kmene WP2uvrA (pUC19), kde lze topoizomery plazmidové DNA pozorovat ještě po 6 hodinách rekultivace (obr. 29, linie 14). U WP2 (pUC19) v tomto čase topoizomery již patrně nejsou. (obr. 29, linie 6). Odlišná kinetika zavíjení sc DNA může pravděpodobně úzce souviset s rychlostí reparace lézí DNA u kmene WP2 wt. Na rozdíl od mutantního kmene WP2 uvrA zřejmě adukty cisplatin perzistující na odvinuté plazmidové DNA brání činnosti topoizomeráz při zavinutí DNA. Dynamika změn v topologii superhelikální plazmidové DNA v buňkách po působení různých stresových faktorů není ještě dostatečně prostudována a toto je jedno z prvních pozorování.

Při analýze vzorků plazmidové DNA izolované z buněk *E. coli* WP2 (pUC19) po modifikaci 10 μ M a 50 μ M roztokem cisplatin za podmínek *in situ* pozorujeme na gelu poměrně výrazný proužek DNA těsně u startů (obr. 30). Proužek je výraznější u plazmidové DNA z buněk inkubovaných v 10 μ M roztoku cisplatin a jeho intenzita vzrůstá s prodlužující se dobou rekultivace. Nevyskytuje se u DNA z buněk kmene WP2(pUC19) bezprostředně po modifikaci a u DNA z buněk deficientního kmene WP2uvrA (pUC19) (obr. 29). Tento proužek může představovat důsledek reparačních pochodů v buňce v průběhu rekultivace a může zřejmě souviset s aktivitou proteinu RecA, tj. s probíhající homologní rekombinací, účastníci se zejména reparace meziřetězcových křížových vazeb na DNA (Delmas a Matic, 2005) způsobených v našem případě cisplatinou.

IECL adukty cisplatin na plazmidové DNA, která byla izolovaná z buněk *E. coli* WP2 (pUC19) a *E. coli* WP2uvrA (pUC19), byly prokázány u obou kmenů (obr. 31). S prodlužující se dobou reparace se snižuje množství IECL aduktů na plazmidové DNA. U kmene WP2 (pUC19) dosahuje procentuální zastoupení IECL aduktů bezprostředně po modifikaci 32% (viz. tab.6), u kmene WP2uvrA (pUC19) je to 39%, tudíž přibližně stejné množství u obou kmenů. U WP2 (pUC19) se ovšem s prodlužující se dobou kultivace výrazně snižuje množství IECL aduktů následkem reparačních procesů v buňkách. Po 6 hodinách rekultivace již nebyly detekovány žádné IECL adukty. Oproti tomu u deficientního kmene WP2uvrA byly po 6 hodinách rekultivace

detekovány 32 % IECL aduktů, což je jen o 7% méně než bezprostředně po inkubaci v roztoku cisplatinu. Dokazuje to poměrně značný rozdíl v dynamice odstranění IECL aduktů cisplatinu na plazmidové DNA u *uvrA* proficientního a deficientního kmene (obr. 32).

Pro srovnání a kontrolu byly DNA adukty vzniklé po působení cisplatinu u *E. coli* WP2 (pUC19) detekovány také pomocí metody EMSA. Z výsledku experimentu (obr. 34) je zřejmé, že největší množství aduktů na plazmidové DNA pUC19 pozorujeme bezprostředně po modifikaci a jejich množství se v průběhu reparace snižuje.

U vzorků buněk *E. coli* WP2 (pUC19) a *E. coli* WP2uvrA (pUC19) bylo sledováno spektrum proteinů během rekultivace, tedy v době intenzivně probíhajících reparačních pochodů, a to pomocí SDS-PAGE. U vzorků z kmene *E. coli* WP2 (pUC19) (obr. 35 A) byl detekován protein, který se neobjevil u vzorků z kmene WP2uvrA (pUC19) (obr. 35 B). Jeho velikost je přibližně 65 kDa (stejně jako při analýze spekter po působení UV záření), což by mohlo odpovídat přítomnosti UvrC proteinu (66 kDa) (zda se jedná skutečně o expresi proteinu UvrC, by bylo nutné potvrdit imunoblotingem s příslušnou protilátkou). Znamenalo by to, že při procesu nukleotidové excizní reparace u buněk *in situ* modifikovaných cisplatinou dochází již v první hodině reparace k expresi proteinu UvrC. Tuto domněnku podporuje fakt, že tento protein nevidíme ve vzorcích DNA z *uvrA* deficientních buněk a protein UvrC je, jak známo z literatury (Grossman a kol., 1998), exprimován jen v přítomnosti komplexu UvrA₂B.

V této práci bylo ukázáno, že na vhodně zvoleném modelovém objektu plazmidové DNA lze zachytit dynamický proces nukleotidové excizní reparace a současně poodhalit vzájemné souvislosti mezi jednotlivými reparačními drahami při opravě poškození zniklých v buňce po působení UV záření i po modifikaci cisplatinou. Otevřely se tak možnosti pro sledování oprav za podmínek *in vivo* i pro nové typy léčebných preparátů, interagujících s DNA zejména způsobem tvorby meziřetězcových křížových vazeb, sledováním jejich kinetiky. I když se jedná o výzkum nových látek pro nádorovou terapii lidských buněk, ukazuje se, že vhodně zvoleným prokaryotickým modelovým systémem za využití superhelikální plazmidové DNA lze za podmínek *in vivo* odhalit dynamiku reparačních procesů, které byly dosud studovány především za podmínek *in vitro* pomocí rekonstituovaných reparačních procesů s proteiny připravenými rekombinantní technologií. Získané výsledky opravňují konstatovat, že v rámci této práce byla naznačena experimentální cesta pro významné studium negativních účinků reparačních procesů při hledání cest pro účinnou nádorovou terapii založenou na chemických látkách interagujících především s DNA.

7. ZÁVĚR

1. Byla vyvinuta a optimalizována metodika pro monitorování reparace DNA *in vivo* v buňkách *E. coli* po působení cisplatinu na úrovni plazmidové DNA. Reparační procesy byly sledovány na plazmidové DNA pUC19 po působení UV záření a cisplatinu na buňky *E. coli* za podmínek modifikace *in situ* a následné rekultivace v LB médiu.

2. Buňky *E. coli* WP2 a *E. coli* WP2uvrA s transformovaným plazmidem pUC19 i bez něj jsou po *in situ* modifikaci cisplatinou životaschopné a přibližně po dvou hodinách rekultivace se začínají dělit.

3. Pomocí metody navržené ke sledování dynamiky reparačních procesů *in vivo* byla zjištěna kinetika reparace poškození na DNA vzniklých působením cisplatinu.

4. U kmene WP2uvrA bylo pozorováno výrazné zpomalení při odstraňování IECL ve srovnání s kmenem WP2 wt. U kmene WP2 (pUC19) dosahuje procentuální zastoupení IECL aduktů na plazmidové DNA bezprostředně po modifikaci 32% a během prvních dvou hodin reparace došlo k odstranění jejich naprosté většiny, zatímco u kmene WP2uvrA (pUC19) bylo po modifikaci detekováno 39% IECL a během 6 hodin reparace došlo ke snížení tohoto množství jen o 7%.

5. Sledováním exprese proteinů byl u buněk *E. coli* WP2 v průběhu reparace po modifikaci cisplatinou detekován protein o velikosti cca 65 kDa, který svou velikostí odpovídá reparačnímu proteinu UvrC. U buněk *E. coli* WP2uvrA tento protein detekován nebyl. Tím byl potvrzen význam proteinu UvrA pro zdárný průběh nukleotidové excizní reparace.

8. LITERATURA

Ausubel a kol. (1995): Short protocols in molecular biology, kap. 1.5, str. 1-13. John Wiley & Sons., USA.

Beck D. J., Popoff S., Sancar A., Rupp W. D. (1985): Reactions of the UvrABC excision nuclease with DNA damaged by diamminedichlorplatinum(II). *Nucleic Acids Research* 13 (20): 7395-7412.

Bhattacharya R., Beck D. J. (2002): Survival and SOS induction in cisplatin-treated *Escherichia coli* deficient in Pol II, RecBCD and RecFOR functions. *DNA Repair* 1 (11): 955-966.

Bjedov I., Lecointre G., Tenailon O., Vaury C., Radman M., Taddei F., Deamur E., Matic I. (2002): Polymorphism of genes encoding SOS polymerases in natural populations of *Escherichia coli*. *DNA Repair* 2 (4): 417-426.

Bouayadi K., Salles B. (1995): Influence of DNA supercoiling on cisplatin toxicity in *Escherichia coli* K-12. *Mutation Research Letters* 348 (1): 25-31.

Brabec, V. (2002) DNA modifications by antitumor platinum and ruthenium compounds: their recognition and repair. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 71: 1-68.

Burger A., Raymer J., Bockrath R. (2002): DNA damage-processing in *E. coli*: on-going protein synthesis is required for fixation of UV-induced lethality and mutation. *DNA Repair* 1 (10): 821-831.

Chowdhury K. (1991): One step "miniprep" method for the isolation of plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 19 (10): 2792.

Delmas S., Matic I. (2005): Cellular response to horizontally transferred DNA in *Escherichia coli* is tuned by DNA repair systems. *DNA Repair* 4: 221-229.

Doškař J. (2003): Prokaryotický genom. *Informační listy* 26: 26-31.

Duman R. K., Heath R. T., Bose R. N. (1999): Inhibition of *Escherichia coli* DNA polymerase-I by the anti-cancer drug cis-diamminedichlorplatinum(II): what roles do polymerases play in cis-platin-induced cytotoxicity? *FEBS Letters* 455: (49-54).

Grossman L., Lin C., Ahn Y. (1998): Nucleotide excision repair in *Escherichia coli*. *DNA Damage and Repair* 1: 11-27.

Hyršová M. (2004): DNA excizní reparace v *Escherichia coli* po působení cytostatik. 78 stran. Diplomová práce obhájená na PřF MU Brno.

Hyršová M., Janovská E., Brabec V., Vojtíšková M. (2005): Interaction of plasmid DNA pUC19 with cisplatin in *E. coli* cells and possibilities of the reparation. *Scripta medica (Brno)* 77 (5-6): 315-326.

Janovská E. a Kleinwächter V. (1986): Inactivation effect of platinum(II) compounds on strains of *Escherichia coli*. *Studia Biophysica* 114 (1-3): 187-192.

- Janovská E., Nováková O., Natile G., Brabec V.** (2002): Differential genotoxic effects of antitumor trans-[PtCl₂(E-iminoether)₂] and cisplatin in *Escherichia coli*. *Journal of Inorganic Biochemistry* 90 (34): 155-158.
- Kartalou M., Essigmann J. M.** (2001): Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. *Mutation Research* 478: 1-21.
- Kašpárková J., Delalande O., Štros M., Elizondo-Riojas M. A., Vojtíšková M., Kozelka J., Brabec V.** (2003): Recognition of DNA interstrand cross-link of antitumor cisplatin by HMGB1 protein. *Biochemistry* 42 (5): 1234-44.
- Keck M. V., Lippard S. J.** (1991): Unwinding of supercoiled DNA by platinum-ethidium and related complexes *Journal of American Chemical Society* 114 (9): 3386-3390.
- Keller K. L., Overbeck-Carrick T. L., Beck D. J.** (2001): Survival and induction of SOS in *Escherichia coli* treated with cisplatin, UV-irradiation, or mitomycin C are dependent on the function of the RecBC and RecFOR pathways of homologous recombination. *Mutation Research* 486 (1): 21-29.
- Kostova I.** (2006): Platinum complexes as anticancer agents. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery* 1: 1-22.
- Laniel M. A., Beliveau A., Guerin S.L.** (2000): „Electrophoretic Shift Assays for the Analysis of DNA-Protein Interactions“. In *Methods in Molecular Biology* 148: DNA-Protein Interactions: Principles and Protocols, 2nd ed. Ed. T. Moss, Humana Press Inc., Totowa, NJ: str. 13-30.
- Madronich S., McKenzie R. L., Björn L. O. a Caldwell M. M.** (1998): Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 46: 5–19.
- Maniatis T.** (1982): *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Mitchell D. L., Vaughan J. E. a Nairn R. S.** (1989): Inhibition of transient gene expression in Chinese hamster ovary cells by cyclobutane dimers and (6-4) photoproducts in transfected ultraviolet-irradiated plasmid DNA. *Plasmid* 21 (1): 21-30.
- Moolenaar G. F., Schut M., Goosen N.** (2005): Binding of the UvrB dimer to non damaged DNA: Residues Y92 and Y93 influence the stability of both subunits. *DNA Repair* 4: 699-713.
- Nakajima S., Lan L., Kanno S., Takao M., Yamamoto K., Eker A. P. M., Yasui A.** (2004): UV light-induced DNA damage and tolerance for the survival of nucleotide excision repair-deficient human cells. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (45): 46674-46677.
- Nejedlý K., Kittner R., Pospíšilová Š., Kypr J.** (2001): Crosslinking of the complementary strands of DNA by UV light: dependence on the UV irradiated DNA. *Biochimica et Biophysica Acta* 1517: 365-375.
- Nowosielska A., Calmann M. A., Zdraveski Z., Essigmann J. M., Marinus M. G.** (2004): Spontaneous and cisplatin-induced recombination in *Escherichia coli*. *DNA Repair* 3: 719-728.

- Nowosielska A., Marinus M. G.** (2005): Cisplatin induces DNA double strand break formation in *Escherichia coli* *dam* mutants. *DNA Repair* 4: 773-781.
- Park J., Ahn B.** (2000): Effect of DNA topology on plasmid repair *in vivo*. *FEBS Letters* 476: 174-178.
- Popoff S. C., Beck D. J., Rupp W. D.** (1987): Repair of plasmid DNA damaged *in vitro* with cis- or trans-diamminedichloroplatinum(II) in *Escherichia coli*. *Mutation Research* 183: 129-137.
- Roat-Malone R. M.** (2002): *Bioinorganic Chemistry: A short Course*, kap. 7, str. 265-335. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken (New Jersey).
- Rosypal S.** (2000): Úvod do molekulární biologie I. a III. díl. Brno (vlastním nákladem).
- Serban D., Benevides J. M., Thomas G. J.** (2002): DNA secondary structure and Raman markers of supercoiling in *Escherichia coli* plasmid pUC19. *Biochemistry* 41: 847-853.
- Sinden R.R** (1994): *DNA Structure and Function*, Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Tokyo, Toronto, Kap. 3, str. 95–131.
- Sinha R.S., Häder D. P.** (2002): UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochemical and Photobiological Sciences* 1: 225-236.
- Štros M., Muselíková E.** (2000): A role of basic residues and the putative intercalating phenylalanine of the HMG-1 box B in DNA supercoiling and binding to four-way DNA junctions. *Journal of Biological Chemistry* 275: 35699–35707.
- Theis K.** (2001): Nucleotide excision repair by UvrA, UvrB and UvrC [online] Vytvořeno 12/2001. Dostupné z: <http://brahms.bio.sunysb.edu/karsten/uvrabc.html>.
- Van Houten B.** (1990): Nucleotide excision repair in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews* 54 (1): 18-51.
- Van Houten B., Eisen J. A., Hanawalt P. C.** (2002): A cut above: Discovery of an alternative excision repair pathway in bacteria. *PNAS* 99 (5): 2581-2583.
- Van Houten B. a Grossman L.** (2004): Nucleotide excision repair, bacterial: The UvrABCD system. In *Encyclopedia of biological chemistry* (Lenarz W. J., Lane M. D., ed.), sv. III, str. 134-142. Academic Press, Incorporated.
- Van Houten B., Croteau C. L., Della Vecchia M. J., Wang H., Kisker C.** (2005): ‘Close-fitting sleeves’: DNA damage recognition by the UvrABC nuclease system. *Mutation Research* 577: 92-117.
- Verhoeven E. E. A., Wyman C., Moolenaar G. F., Hoeijmakers J. H. J., Goosen N.** (2001): Architecture of nucleotide excision repair complexes: DNA is wrapped by UvrB before and after damage recognition. *The EMBO Journal* 20 (3): 601-611.
- Visse R., van Gool A. J., Moolenaar G. F., de Ruijter M., van de Putte P.** (1994): The actual incision determines the efficiency of repair of cisplatin damaged DNA by the *Escherichia coli* UvrABC endonuclease. *Biochemistry* 33: 1804-1811.

Vrána O., Boudný V., Brabec V. (1996) Superhelical torsion controls DNA interstrand crosslinking by antitumor *cis*-diamminedichloroplatinum (II). *Nucleic Acids Research* 24 (20): 3918-3925.

Wang X., Peterson C. A., Zheng H., Nairn R. S., Legerski R. J., Li L. (2000): Involvement of nucleotide excision repair in a recombination-independent and error-prone pathway of DNA interstrand cross-link repair. *Molecular and Cellular Biology* 21 (3): 713-720.

Yang Z., Colis L. C., Basu A. K., Zou Y. (2005): Recognition and Incision of γ -radiation-induced cross-linked guanine-thymine tandem lesion G [8,5-Me]T by UvrABC Nuclease. *Chemical Research in Toxicology* 18 (9).

Zdraveski Z. Z., Mello J. A., Marinus M. G., Essigmann J. M. (2000): Multiple pathways of recombination define cellular responses to cisplatin. *Chemistry and Biology* 7 (1): 39-50.

Zou Y., Shell S. M., Utzat C. D., Luo C., Yang Z., Geacintov N. E., Basu A. K. (2003): Effects of DNA adduct structure and sequence context on strand opening of repair intermediates and incision by UvrABC Nuclease. *Biochemistry* 42: 12654-12661.