

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ им. Н.Н. СЕМЕНОВА**

КРАМАРЕНКО Инга Игнатьевна

**РОЛЬ КОРРЕКЦИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ДНК (MMR) В
МЕХАНИЗМЕ ГЕНО- И ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО
ДЕЙСТВИЯ МЕТИЛНИТРОЗОМОЧЕВИНЫ В
ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА**

специальность 03.00.02 – «Биофизика»

диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2006

Оглавление

- 1. Введение**
- 2. Обзор литературы по теме**
 - 2.1. МЕХАНИЗМЫ ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ДНК В КЛЕТКЕ**
 - 2.1.1. Дорепликативная эксцизионная репарация
 - 2.1.2. Пострепликативная эксцизионная репарация
 - 2.2. O⁶-MeG ИНДУКТОР MMR И АПОПТОЗА**
 - 2.3. РАК ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА: ДЕФИЦИТ MMR, ОЦЕНКА РИСКА РАЗВИТИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ**
- 3. Собственные исследования**
 - 3.1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**
 - 3.1.1. Клетки
 - 3.1.2. Воздействия
 - 3.1.3. Оценка жизнеспособности клеток с использованием МТТ-теста
 - 3.1.4. Определение жизнеспособности по апоптотическому индексу
 - 3.1.5. Определение количества двунитевых разрывов методом ДНК-комет
 - 3.1.6. Определение мутаций в генах *MLH1* и *MSH2* в клетках Colo320HSR
 - 3.2. РЕЗУЛЬТАТЫ**
 - 3.2.1. Влияние МНМ на клетки HeLa и HCT116
 - 3.2.2. Гено- и цитотоксический эффекты МНМ на клетках Colo320HSR
 - 3.2.3. Мутации в генах *MLH1* и *MSH2* в клетках Colo320HSR
 - 3.3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ**
- 4. Выводы**
- 5. Список цитированной литературы**

Использованные сокращения:

ТК – толстый кишечник;

РТК – рак толстого кишечника;

НРТК – наследственный неполипозный рак толстого кишечника (синдром Линча);

ХР-синдром (xeroderma pigmentosum) – пигментная ксеродерма;

ППР – пострепликативная репарация;

ДР – двунитевой разрыв ДНК;

ММ (mispairs) – неправильные пары;

MMR (mismatch repair) – коррекция неспаренных оснований;

BER (base excision repair) – эксцизионная репарация оснований;

NER (nucleotide excision repair) – эксцизионная репарация нуклеотидов;

HRR (homologous recombinational repair) – репарация по механизму гомологической рекомбинации;

NHEJ (non-homologous end join) – воссоединение нехомологичных концов;

MCH – микросателлитная нестабильность, MSI (microsatellit instability);

MCC – микросателлитная стабильность;

O⁶-MeG – O⁶-метилгуанин;

O⁶-bzG – O⁶-бензилгуанин;

MGMT – метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза;

MNM – метилнитрозомочевина;

АП – апуриновый/апиримидиновый сайт;

PCNA (proliferating cell nuclear antigen) – ядерный антиген пролиферирующих клеток;

FEN-1 (flap endonuclease-1) – flap-эндонуклеаза-1;

PARP (poly(ATP-ribose)-polymerase) – поли(АТФ-рибоза)-полимераза;

SSB (single strand (DNA) binding protein) – белок, связывающий одноцепочечную ДНК;

GTBP/p160 (G : T binding protein) – белок, связывающийся с парами G : T;

MNNG (N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine) – *N*-метил-*N'*-нитро-*N*-нитрозогуанидин, метилнитрозогуанидин;

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) – метилтиазолтетразолиум;

АО – акридиновый оранжевый;

EtBr – бромистый этидий;

hMSH (human MutS homolog) – человеческий гомолог белка MutS из *E. coli*;

hMLH (human MutS homolog) – человеческий гомолог белка MutL из *E. Coli*;

hprt – ген, кодирующий гипоксантин-фосфорибозилтрансферазу;

Alk – алкилирующий агент.

1. ВВЕДЕНИЕ

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Рак толстого кишечника (РТК) является одной из самых распространенных онкопатологий в развитых странах. В России эта форма рака занимает 3-место после рака легкого и желудка. За период 1992-1995 г. зарегистрировано 40000 случаев заболевания. Смертность составила более 75%. Статистика заболевания по Европе за 1992-1995: в 130000 случаях заболевания смертельные исходы наблюдались в 75% [Александров, 2003]. В США в 2002 году было зарегистрировано 142000 случаев заболевания РТК. Кумулятивный риск заболевания РТК на протяжении жизни индивида составляет 5-6% [Grady, 2003]. 3-5 % всех случаев заболеваний приходится на наследственную (семейную) форму, которая характеризуется высоким риском заболевания (до 90% в течение жизни). Во всех случаях наследственной формы РТК в опухолевых клетках обнаруживаются свидетельства дефицита пострепликативной корректирующей репарации ДНК (MMR, mismatch repair).

Из всех известных на сегодня заболеваний, связанных с генетическими дефектами и предрасположенностью к раку, только в двух прослеживается однозначно связь с дефектами в механизмах репарации ДНК. Это наследственный неполипозный рак толстого кишечника (НРТК, синдром Линча) и пигментная ксеродерма [Jiricny, 1994; Friedberg et al., 1995; Bootsma et al., 1998]. В случае НРТК дефекты MMR проявляются в виде мутаций в генах системы MMR и/или в виде микросателлитной нестабильности (МСН). Поэтому мутации генов системы MMR и

микросателлитная нестабильность генома в опухолевых клетках стали распространенными маркерами заболевания НРТК [Vasen et al., 1999].

В то же время в многочисленных исследованиях показано, что в 30% случаев заболевания спорадическим РТК в клетках опухолей также наблюдается МСН генома [Штам и др., 2004; Boland et al., 1998]. Однако, в отличие от семейной формы заболевания, здесь МСН чаще всего ассоциирована не с мутациями в генах системы MMR, а с гиперметилированием промоторов этих генов [Veigl et al., 1998]. Сюда же можно отнести и многочисленную группу заболеваний, формирующих так называемый «спектр РТК» [Vasen et al., 1999]. Таким образом, для довольно большой группы заболеваний РТК такой показатель как мутации генов MMR не может быть исчерпывающим маркером заболевания. Мы полагаем, что в большей степени этому требованию соответствует такой показатель как функциональная активность MMR. Кроме того, разработка более-менее универсальных маркеров заболевания позволило бы выделить группы риска, прогнозировать возникновение заболевания и предупреждать его.

Как следствие дефицита MMR, в опухолевых клетках формируется мутаторный фенотип и устойчивость к цитотоксическому действию алкилирующих/метилирующих агентов [Aquilina et al., 2000]. Главным цитотоксическим повреждением при химическом метилировании ДНК является O⁶-метилгуанин (O⁶-MeG) [Kaina et al., 1993]. Две особенности отличают O⁶-MeG от других алкилированных оснований: в клетках млекопитающих он может быть репарирован только прямым деметилированием при участии метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (MGMT) [Kaina et al., 1990]; не будучи репарированным, это повреждение не блокирует репликацию и сохраняется в пострепликативный период [Kaina et al., 1997]. В этом случае образуется некорректная пара O⁶-MeG : Т, которая является субстратом для механизма коррекционной репарации

ДНК (MMR). O⁶-MeG сильно напоминает аденин, и потому полимераз в процессе синтеза вставляет комплементарный ему тимин, формируя неправильную пару O⁶-MeG : Т. В ответ иницируется MMR, начинающая процесс эксцизионного удаления тимина в дочерней цепочке ДНК. Создается тупиковая для MMR ситуация, когда в матрице присутствует неудаляемый дефект, а полимераз не может подобрать ему комплементарную пару, всякий раз в процессе ресинтеза воспроизводя пару O⁶-MeG : Т. Если клетка, содержащая в геноме такую пару, вступит в следующий цикл репликации, то неизбежной будет транзигия G : С→А : Т (последовательно: G : С + Alk → O⁶-MeG : С + I цикл репликации→ O⁶-MeG : Т + II цикл репликации → А : Т). Показано, что в опухолевых клетках эпителия ТК (дефицитных по MMR) частота таких транзигий соответствует 1 на 8 O⁶-MeG для гена *hprt* [Rasouli-Nia et al., 1994], но может быть и выше в случае, например, онкогена *K-ras* [Esteller et al., 2000; Jackson et al., 1999]. Однако вступлению во второй цикл репликации препятствует активная система MMR, которая возобновляет процесс эксцизии и последующего ресинтеза. Разрешается эта коллизия радикально: длительное существование обширной брешы в дочерней цепи ДНК делает неизбежным формирование двунитевого разрыва под действием внутриклеточных эндонуклеаз. Его появление запускает механизм апоптоза. Таким образом, эффективная система MMR иницирует программу гибели полноценных по репарации клеток, содержащих O⁶-MeG. Дефицитные по MMR опухолевые клетки при РТК сохраняют жизнеспособность. При этом они приобретают новые мутации за счет G : С → А : Т транзигий, что, с одной стороны, увеличивает вероятность их трансформации, а с другой – расширяет селективные возможности опухолевых клеток и позволяет им адаптироваться к генотоксическим воздействиям. Этот механизм может частично объяснять

их пониженную способность к апоптозу в ответ на действие алкилирующих агентов [Bedi et al., 1995]. Таким образом, в основе механизма цитотоксического действия O^6 -MeG лежат вторичные разрывы ДНК, которые формируются в ходе функционирования системы MMR [Kaina, 2003].

Как видно, активная система MMR трансформирует первичное повреждение O^6 -MeG в двунитевой разрыв ДНК. Эти вторичные разрывы, возникающие в пострепликативный период (спустя >1 цикла репликации), могут быть показателем функциональной активности MMR в клетке и маркером в оценке риска возникновения РТК у человека.

Экспериментальная проверка этого предположения составляет содержание данной диссертации.

Цель и основные задачи исследования

Цель настоящего исследования состоит в проверке на опухолевых клетках человека предположения о том, что количество вторичных двунитевых разрывов ДНК (ДР) в ответ на действие монофункционального метилирующего агента может отражать эффективность функционирования системы MMR в клетке.

В соответствии с целью исследования были поставлены следующие задачи:

1. Отобрать три линии клеток опухолей человека, которые генетически отличаются по активности коррекционной репарации ДНК.
2. Оценить чувствительность этих клеток к действию монофункционального метилирующего агента метилнитрозомочевина (МНМ) по показателю цитотоксичности.
3. Исследовать частоту гибели этих клеток по механизму апоптоза, индуцированного метилнитрозомочевинной.

4. Исследовать количество и динамику образования вторичных двунитевых разрывов в клетках под влиянием МНМ.
5. Исследовать первичную структуру генов *MLH1* и *MSH2* в линии опухолевых клеток Colo320HSR с неохарактеризованной системой коррекционной репарации с целью выявления мутаций в этих генах, приводящих к возникновению рака толстого кишечника.
6. Сопоставить эти показатели между собой и прокоррелировать их с предполагаемой активностью MMR.

Научная новизна

1. В работе предложен механизм реализации генотоксического действия монофункционального метилирующего агента метилнитрозомочевина в цитотоксический эффект через вторичные двунитевые разрывы ДНК, возникающие в результате функционирования пострепликативной MMR. Таким образом, три показателя: количество вторичных МНМ-индуцированных разрывов ДНК, цитотоксический эффект МНМ (частота отсроченного апоптоза) и эффективность MMR – представлены взаимосвязанными в одном механизме.
2. На основании этого предлагается простая процедура оценки функциональной эффективности пострепликативной репарации, MMR. Процедура апробирована на трех линиях опухолевых клеток человека, различающихся генетически по эффективности MMR. Впервые эффективность MMR этих клеток выражена количественно в виде числа вторичных двунитевых разрывов ДНК, возникающих в ответ на действие метилнитрозомочевина.
3. Впервые проведено исследование первичной структуры генов *MLH1* и *MSH2* системы MMR клеток рака сигмовидной кишки человека Colo320HSR. Обнаружена мутация-трансерсия в 520 кодоне 10-го экзона гена *MSH2*. Показано, что по эффективности MMR, выраженной в

количестве вторичных разрывов ДНК, эта линия клеток занимает промежуточное положение между линиями HeLa и HCT116, занимающих крайние позиции MMR-профицитных и MMR-дефицитных клеток.

4. Результаты проведенного исследования являются основанием для разработки простой системы тестирования MMR с целью прогноза эффективности химиотерапии, а также для оценки риска возникновения рака (используя соматические клетки человека — лимфоциты здоровых доноров и онкологических больных).

Научно-практическая значимость работы

Результаты данного исследования могут иметь фундаментальное и прикладное значение.

1. Они позволяют понять механизм реализации генотоксического сигнала алкилирующих агентов в цитотоксический эффект.
2. Оценить роль вторичных разрывов в цитотоксическом эффекте алкилирующих агентов и разработать на этой основе модельные системы для определения эффективности новых лекарственных препаратов и прогноза их использования в терапии опухолей с дефектной системой MMR.
3. Эффективный механизм MMR является фактором, противостоящим генотоксическому прессингу алкилирующих агентов эндогенного происхождения и в окружающей среде. С другой стороны, эффективная MMR является предпосылкой успешного применения противоопухолевых лекарств, включая алкилирующие соединения (поскольку дефицит MMR сочетается с устойчивостью клеток ко многим химиотерапевтическим препаратам). Результаты данного исследования помогут разработать простую систему тестирования MMR с целью прогноза эффективности химиотерапии, а также для оценки риска возникновения рака.

Положения и результаты, выносимые на защиту

1. Один из путей реализации цитотоксического эффекта метилнитрозомочевины в клетках включает в себя: образование O^6 -MeG – I-й цикл репликации – формирование неканонической пары (O^6 -MeG : T) – активизацию MMR, повторяющиеся циклы эксцизия-ресинтез в функционирующей MMR (абортивная MMR) – формирование обширной долго живущей однострессовой бреши в ДНК – трансформация бреши в ДР – инициация сигнального пути апоптоза.
2. Цепочка в полной мере реализуется только в делящихся клетках с функционирующей системой MMR (в данной работе – в клетках HeLa).
3. Клетки, дефицитные по MMR (в данной работе – клетки HCT116), проявляют устойчивость к МНМ (по показателям клеточной гибели) и не обнаруживают предшествующих апоптозу двустрессовых разрывов в ДНК.
4. Клетки аденокарциномы сигмовидной кишки Colo320HSR содержат нейтральную мутацию в 520 кодоне 10 экзона гена *MSH2*. По количеству МНМ-индуцированных вторичных разрывов клетки Colo320HSR занимают промежуточное положение между MMR-профицитными клетками HeLa и дефицитными клетками HCT116. В клетках линии Colo320HSR наблюдается пониженная способность МНМ-индуцированных ДР вызывать апоптоз.
5. Предлагаемая процедура определения количества вторичных ДР в ответ на действие МНМ может стать основой для оценки функциональной эффективности MMR в опухолевых и соматических клетках.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ ПО ТЕМЕ

2.1. МЕХАНИЗМЫ ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ДНК В КЛЕТКЕ

Геном клетки на протяжении ее существования в организме подвергается различным «запланированным» (функциональным) и случайным перестройкам. Последние происходят в результате воздействия различных химических агентов эндогенного происхождения или повреждающих факторов внешней среды. На протяжении длительного времени эти воздействия являются факторами биологической эволюции, а на протяжении индивидуальной жизни эти воздействия служат источником мутаций, канцерогенеза и гибели организма. В противовес этому в клетке сформировались механизмы, поддерживающие стабильность генома на протяжении существования клетки – механизмы репарации генома. Идентификация и описание этих механизмов является важнейшим достижением современной биологии.

На сегодня описаны 5 механизмов репарации ДНК в клетках: эксцизионная репарация оснований (base excision repair, BER), эксцизионная репарация нуклеотидов (nucleotide excision repair, NER), коррекционная репарация некорректных пар (mismatch repair, MMR), прямое восстановление поврежденных оснований и репарация двунитевых разрывов ДНК (включает репарацию по механизму гомологической рекомбинации, HRR и воссоединение негомологичных концов, NHEJ). Из всего спектра повреждений ДНК наибольшую долю составляют повреждения оснований. Они и результат их ошибочной репарации приводят к мутациям и канцерогенезу. Поэтому в обзоре рассматриваются

в основном первые три механизма репарации ДНК, объединяемых общим названием эксцизионных механизмов репарации. Следует отметить, что первые два из них (BER и NER) оперируют в основном с такими повреждениями, которые являются стопором для ДНК-полимеразы. В силу этого их функция осуществляется главным образом в дорепликативный период. Третий механизм является пострепликативной репарацией, так как он направлен на исправление ошибок ДНК-полимеразы.

2.1.1. ДОРЕПЛИКАТИВНАЯ ЭКСЦИЗИОННАЯ РЕПАРАЦИЯ

Эксцизионная репарация оснований (BER) начинается с активации специфических гликозилаз, которые, не нарушая целостности сахаро-фосфатного остова ДНК, гидролизуют N-гликозидную связь и удаляют поврежденное основание [Sakumi and Sekiguchi, 1990]. В результате образуется апуриновый/апиримидиновый сайт (АП). АП может заблокировать работу ДНК-полимераз, но часто фермент обходит АП, вставляя некомплементарный нуклеотид в синтезируемую молекулу ДНК [Goodman et al., 1994], что является причиной мутаций. В *Escherichia coli* чаще других таким нуклеотидом оказывается dATP. Это привело к постулированию, так называемого, «А-правила»: ДНК-полимераза напротив АП делает нематричную вставку в дочернюю нить в виде аденина [Strauss, 1991]. Полимеразы эукариот допускают отклонения от этого правила (обзор [Ramotar, 1997]).

АП может быть репарирован. Для этого привлекается АП-эндонуклеаза, которая делает разрыв в 5'- либо в 3'-положении от АП и удаляет сахарный остаток. Образовавшаяся брешь заполняется ДНК-полимеразой β (Рис. 1). Размер бреши варьирует в пределах нескольких нуклеотидов и определяется двумя обстоятельствами: наличием у

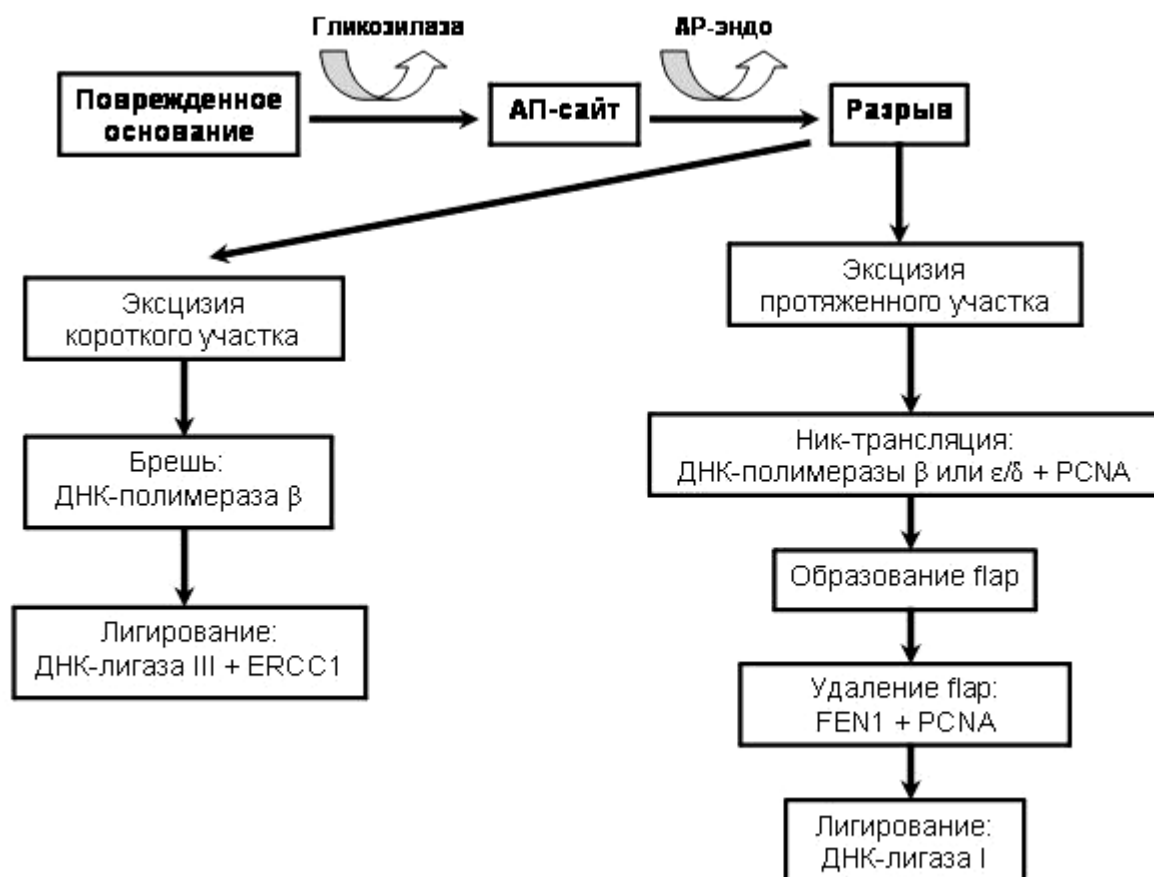


Рисунок 1. Механизм репарации поврежденного основания (BER)

АП-эндонуклеазы фосфодиэстеразной активности и участвующей в ресинтезе полимеразой. Полимераза β заполняет очень короткие бреши [Randahl, Elliott and Linn, 1988], а полимеразы δ и ϵ заполняют брешь по механизму ник-трансляции с привлечением PCNA (proliferating cell nuclear antigen) в качестве процессирующего фактора [Savio et al., 1998]. В этом случае образуется свисающий конец из нескольких нуклеотидов (flap ≤ 6 нуклеотидов [Seeberg, Eide and Bjoras, 1995]), который удаляется flap-эндонуклеазой (FEN-1) [Harrington and Lieber, 1994; Barnes et al., 1996]. Субстратный диапазон BER определяется количеством типов гликозилаз, иницирующих этот тип репарации.

Ясно, что BER с эксцизией коротких участков ДНК характеризуется низкой вероятностью ошибки и малым временем жизни брешей. Кроме того, оказалось, что BER включает в себя также редактирование ошибок, допускаемых ДНК-полимеразой. В работе [Chou and Cheng, 2002] показано, что АР эндонуклеаза1 обладает 3'→5' экзонуклеазной активностью. Эта активность в 50 раз выше в случае наличия некорректных пар (например, Т : G). Благодаря этой активности осуществляется «редактирование» вновь синтезированной цепи ДНК и исправление допущенных полимеразой ошибок. Небольшая степень эксцизии и ресинтеза, а так же коррекция вновь синтезированной цепи обеспечивает высокую точность механизма BER. Все это говорит о том, что вклад этого типа репарации в апоптоз невысок и объясняет малое количество публикаций, в которых апоптоз рассматривался на фоне функционирующей системы BER [Schreiber et al., 1995].

Эксцизионная репарация нуклеотидов (NER) характеризуется более широким набором дефектов, удаляемых этим механизмом – тиминовые димеры, фотопродукты, аддукты взаимодействия псоралена с тиминном, аддукты цисплатины и др. Универсальность NER достигается благодаря большому количеству белков, участвующих в процессах

узнавания дефекта и присоединения к нему. Репаративный комплекс NER включает в себя, по крайней мере, 16 полипептидов [Yu et al., 1999]. Большинство ферментов, входящих в систему NER человека, идентифицировано в исследованиях клеток человека с заболеванием пигментной ксеродермой (XP-синдром). Поэтому их названия часто содержат сокращение XP. Первая группа ферментов ответственна за выполнение начальных операций NER – узнавание, связывание и инцизию. В нее входят следующие белки: XPA (p31), ответственный за узнавание дефекта; RPA/HSSB (p70) осуществляет связывание комплекса с повреждением в ДНК; TFIIH/XPB/ERCC3 (p89) формирует эксцизионный комплекс, обладает хеликазной активностью; XPF/ERCC4 (p112) делает 5'-разрыв; ERCC1 (p33) взаимодействует с XPF; XPG/ERCC5 (p135) делает 3'-разрыв, обладает FEN-активностью.

Благодаря активности комплекса, формируется односторонний «flap», содержащий 27 – 29 нуклеотидов, включая поврежденный [Huang and Sancar, 1994]. Удаление flap может быть связано с этапом инцизии, в результате формируется брешь [Svoboda et al., 1993]. Ее заполнение осуществляет одна из ДНК-полимераз δ или ϵ совместно с фактором PCNA, облегчающим диссоциацию эксцизионного комплекса от ДНК [Shivji, Kenny and Wood, 1992]. Разрывы по концам вставки сшиваются ДНК-лигазой. Как видно, эксцизия протяженного участка при BER и эксцизия в NER отличаются только длиной формируемого flap – ≤ 6 и 27 – 29 нуклеотидов соответственно.

Как и в случае с BER, сигнал к апоптозу в процессе NER может генерироваться на этапе репаративного синтеза. Учитывая, что длина эксцизионной бреши больше 20 нуклеотидов, при высокой локальной плотности повреждений несколько брешей могут слиться в одну. В связи с возникновением сравнительно протяженных участков односторонней ДНК

возрастает вероятность их атаки нуклеазами и превращения в двунитевой разрыв.

Часть повреждений ДНК, индуцированных цисплатиной, является диаддуктами и формирует сшивки между соседними основаниями ДНК [Fichtinger-Schepman et al., 1985]. Репарация таких дефектов может проходить через образование временного двунитевого разрыва. Не будучи репарированными, сшивки блокируют репликацию. Такой блок может фиксировать неканонические структуры в ДНК, приводящие к «структурному стрессу». Все это приводит к индукции апоптоза цисплатиной как в пролиферирующих, так и в покоящихся клетках [Borner, Joncourt and Hotz, 1997]. Зависимость апоптоза от PARP (poly(ATP-ribose)-polymerase) свидетельствует об участии в индукции апоптоза разрывов ДНК, которые формируются в результате функционирующей в клетках эксцизионной репарации [Beneke et al., 2000].

2.1.2. ПОСТРЕПЛИКАТИВНАЯ ЭКСЦИЗИОННАЯ РЕПАРАЦИЯ

Корректирующая репарация, MMR осуществляет очень важную функцию маркировки и исправления неканонических пар оснований G : T, G : A, C : A и др., возникающих при репликации. Такие неправильные пары (mispairs, MM) возникают случайно с частотой 1/10000 как результат ошибки ДНК-полимеразы [Eger and Benkovich, 1992]. Кроме того, при репликации участков ДНК, содержащих многократно повторяющиеся последовательности из нескольких оснований (микросателлитные ДНК), фермент допускает “проскальзывание”, пропуская несколько оснований [Verma et al., 1999]. В результате нить, синтезируемая на матрице, в этом месте становится короче своего оригинала на пропущенное число

нуклеотидов. При восстановлении дуплекса это приводит к формированию в исходной цепи петли, напоминающей греческие буквы α или Ω [Allen et al., 1997]. В случае избыточной вставки нуклеотидов при репликации петля формируется во вновь синтезированной цепи. Перечисленные три вида дефектов нарушают регулярную структуру дуплекса и являются субстратом для MMR. Показано, что в *E. coli* исправлению подвергается только дочерняя нить, которую система репарации отличает от материнской по уровню метилирования оснований [Barras and Marinus, 1989]. Отдельные работы подтверждают существование такого механизма дискриминации и в клетках млекопитающих [Hare and Taylor, 1985], но универсальным признается механизм, задаваемый “географией” расположения разрывов (nicks), инициирующих репарацию в дочерней цепи вблизи MM [Modrich, 1991].

Система MMR, впервые описанная для *E. coli* в 1975 г. [Wildenberg and Meselson, 1975], позднее была обнаружена и в клетках человека [Kat et al., 1993]. Хотя MMR у высших организмов значительно сложнее, в принципе между ними очень много общего, что говорит о высоком эволюционном консерватизме механизма MMR. До обнаружения в клетках млекопитающих пострепликативной коррекции были известны 10 факторов, участвующих в пострепликативной репарации (PPR) в *Escherichia coli* [Modrich, 1991]. Они были разделены на 2 группы. Первая группа состояла из факторов, участвующих только в PPR и включала в себя 3 полипептида MutS, MutH и MutL. Вторая группа включала белки, участвующие не только в PPR – ДНК-полимераза, две 3→5 экзонуклеазы, 5→3 экзонуклеаза, хеликаза, SSB, лигаза. В 1988 в экстрактах клеток человека был обнаружен фактор, проявляющий сродство к олигонуклеотидам, содержащим неканонические (G : T)-пары [Jiricny et al., 1988]. Этот фактор был назван GTBP/p160 (G : T binding protein). Он обладал также сродством к петлям, формируемым 1-нуклеотидной

вставкой/делецией. Затем обнаружилось, что взаимодействие GTBP с G : T парами происходит только в присутствии еще одного фактора [Palombo et al., 1995]. Оба белка образовывали гетеродимер, гомологичный фактору MutS из *E. coli* и были названы *hMSH2* и *hMSH6* (human MutS homolog 2 и 6), а формируемый ими гетеродимер был назван MutS α [Drummond et al., 1995]. Вскоре был обнаружен гетеродимер MutS β , состоящий из *hMSH2* и *hMSH3* [Acharya et al., 1996]. Этот комплекс не проявлял сродства к неканоническим парам оснований в ДНК, но связывался с петлями, формируемыми более протяженными вставками/делециями – до 12 нуклеотидов. К концу 90-х были идентифицированы все продукты генов MMR в клетках человека и формируемые ими гетеродимеры [Bellacosa, 2001]. Все идентифицированные белки MMR у человека являются гомологами соответствующих белков у *E. coli*, что отражено в их названии. Важнейшими из них являются *hMSH2*, *hMSH3*, *hMSH6*; *hMLH1* и *hPMS1* и *hPMS2* (Таблица 1).

К ДНК, содержащей ММ, присоединяется один из двух гетеродимеров – MutS α (*hMSH2* - *hMSH6*) и MutS β (*hMSH2* - *hMSH3*). Каждый димер имеет свой диапазон субстратной компетенции (Рис. 2): MutS α имеет сродство к одиночным ММ, формируемым одной парой некомплементарных оснований и к петлям, образованным вставкой/делецией ≤ 12 оснований [Genschel et al., 1998]. MutS β распознает ММ, образованные двумя и более неспаренными основаниями, но не способен распознавать и репарировать вставку/делецию одного основания. Вообще механизм узнавания системой MMR протяженных вставок/делеций, насчитывающих более 20 нуклеотидов, пока неясен. Возможно, такие дефекты эффективно репарируются другими механизмами (например, рекомбинацией) [Sia et al., 1997; Seigneur et al., 1998]. Присоединившийся к ДНК гетеродимер MutS α маркирует дефект,

Факторы MMR (гетеродимеры)	Гены MMR	Хромосом. локализация	Герм. мута- ции	Сомат. мута- ции	Количество мутаций (%)
MutS α	<i>hMSH6</i>	2p16-15	+	+	30 (9 %)
MutS α / MutS β	<i>hMSH2</i>	2p22-21	+	+	125 (38 %)
MutS β	<i>hMSH3</i>	5q11-13		+	
	<i>hMLH3</i>	14q24.3			5 (2 %)
MutL α	<i>hPMS1</i>	2q31-33	+		1 (0.3 %)
MutL α / MutL β	<i>hMLH1</i>	3p21.3	+	+	164 (49 %)
MutL β	<i>hPMS2</i>	7p22	+	+	7 (2 %)
Всего: 332 (100 %)					

Таблица 1. Гены пострепликативной коррекционной репарации ДНК (MMR), несущие мутации при наследственном и спорадическом раке толстой кишки

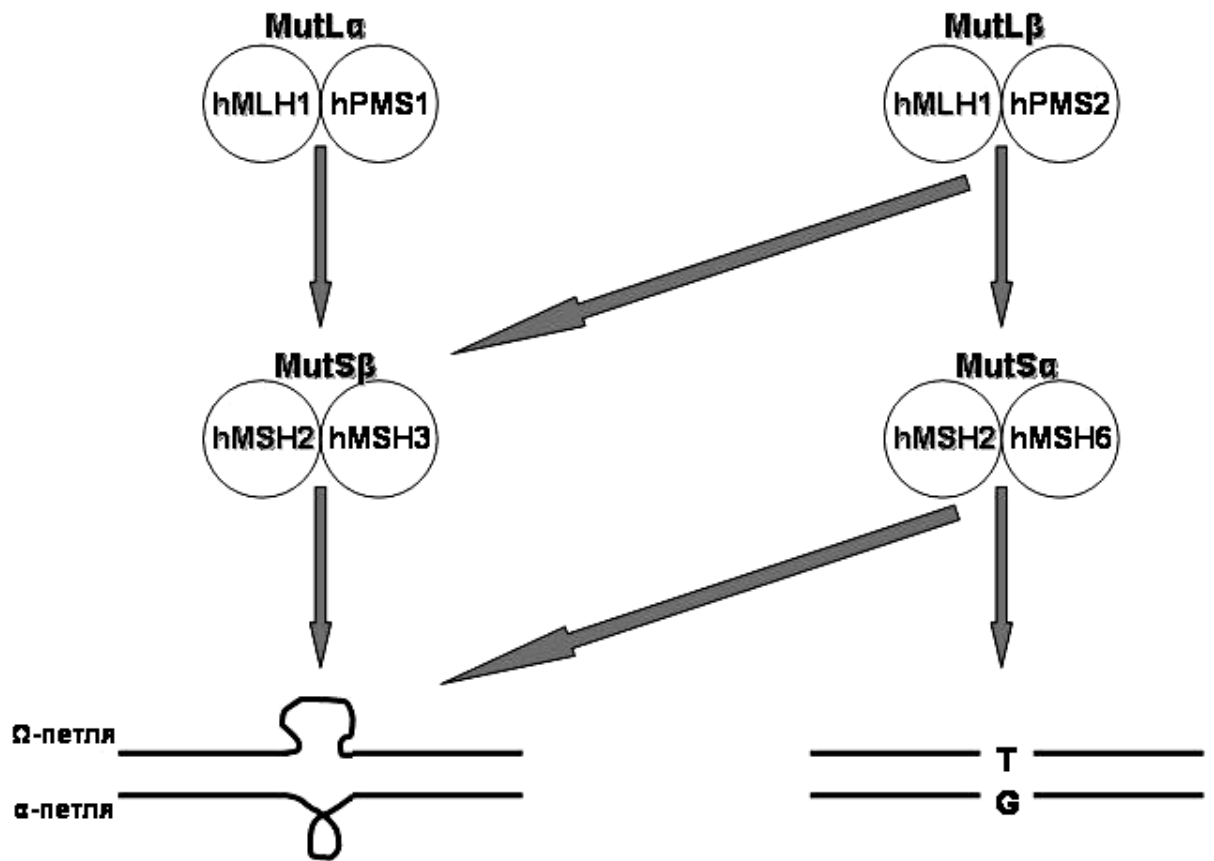


Рисунок 2. Гетеродимеры MMR и нарушения спирали ДНК, узнаваемые ими

активирует формирование и присоединение иницирующего репаративного комплекса MutL β (*hMLH1* - *hPMS2*). Эта реакция сопровождается гидролизом АТФ и требует участия PCNA [Flores-Rozas, Clark and Kolodner, 2000]. В состав репаративного комплекса входит эндонуклеаза FEN1 и хеликаза, которые удаляют из ДНК одностранный фрагмент, содержащий ММ. ДНК-полимеразы δ или ϵ заполняют брешь, а пограничные разрывы сшиваются ДНК-лигазой (Рис. 3). Как видно, такой механизм свободен от ошибок. В нормальных условиях он в 1000 раз понижает уровень спонтанных мутаций, возникающих при репликации [Aebi et al., 1996; Loeb, 1994]. Однако результат может измениться, если ММ образовался в результате генотоксического воздействия.

MMR и апоптоз. Во многих работах показано, что модифицированные основания после действия алкилирующих агентов, цисплатины, аналога пурина 2-CldA индуцировали апоптоз [Meikrantz et al., 1998; Borner, Joncourt and Hotz, 1997]. В некоторых случаях прослеживалась зависимость апоптоза от p53, но всегда он зависел от функционирования MMR. Интерес к взаимосвязи апоптоза с MMR резко возрос после того, как была обнаружена корреляция между дефицитом MMR и наследственным неполипозным раком прямой кишки у человека (HPTK) [Peltomaki, 2001; Nicolaides et al., 1994; Bocker, Ruschoff and Fishel, 1999]. Мутации в одном из семи генов, относящихся к системе MMR у человека, снижают ее эффективность и увеличивают риск некоторых злокачественных новообразований [Peltomaki, 2001].

Снижение эффективности MMR сопровождается на клеточном уровне увеличением устойчивости клеток к возникшим в их ДНК повреждениям [Karran and Hampson, 1996]. MMR-дефицитные клетки, обладая устойчивостью к цисплатине, одновременно обнаруживали снижение способности к апоптозу [Fink et al., 1996]. Мутантные клетки СНО и лимфобластные клетки человека, дефицитные по MMR,

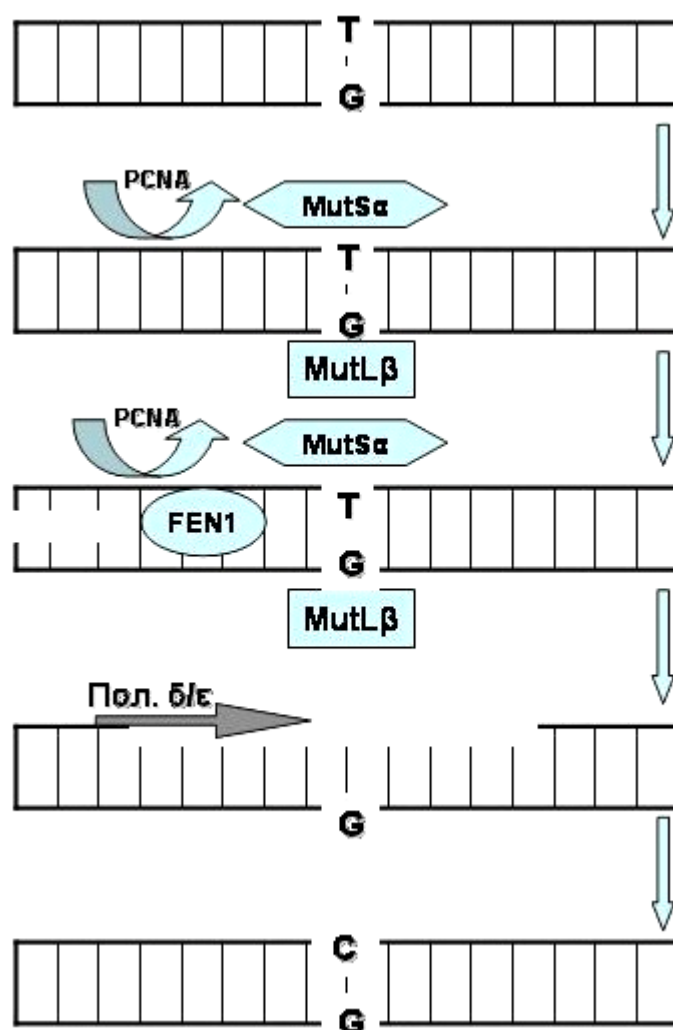


Рисунок 3. Схема репарации некорректной пары Т : G в ДНК по механизму MMR

обнаруживали снижение способности к апоптозу, индуцированному алкилирующим агентом *N*-метил-*N'*-нитро-*N*-нитрозогуанидином (MNNG), по сравнению с этими клетками дикого типа [Hickman and Samson, 1999]. В этой же работе показано, что подавление активности гетеродимера MutS α , ответственного за распознавание метилированного гуанина (O⁶-MeG) в ДНК, делает клетки нечувствительными к сигналам апоптоза. Все это говорит о том, что нормально функционирующий механизм MMR генерирует сигнал к апоптозу поврежденных клеток.

Как отмечалось ранее, важнейшая особенность MMR связана с ее корректирующей функцией: MMR оперирует только с вновь синтезированной цепью ДНК, оставляя при этом оригинал в неприкосновенности. Однако матричная нить ДНК может содержать ферментативно или химически модифицированные основания, избежавшие репарации в дорепликативный период и сохранившиеся после репликации. Примером ферментативной модификации является дезаминирование 5-МеС в CpG островках, осуществляющих эпигенетическую регуляцию активности генов. Продуктом дезаминирования 5-МеС является основание, сильно напоминающее Т (в конечном случае урацил). При синтезе полимеразы ошибочно формирует неканоническую пару – субстрат для MMR. Однако, поскольку модифицированное основание принадлежит матричной цепи, эта ситуация неразрешима для MMR.

Примером химической модификации может служить образование метилированного по O⁶ гуанина (O⁶-MeG). Пара O⁶-MeG : С не сильно искажает структуру дуплекса. Кроме того, в клетке отсутствуют O-алкилгликозилазы. Все это увеличивает вероятность избежать этим модификациям репарации в дорепликативный период.

2.2. O⁶-MeG ИНДУКТОР MMR И АПОПТОЗА

Алкилирующие агенты распространены в окружающей среде и могут формироваться *in vivo* как результат жизнедеятельности бактерий или химического нитрирования аминов [Hotchkiss, 1987]. Алкилированию могут подвергаться все 4 основания. Сайтами алкилирования в ДНК являются 8 атомов азота, 4 атома кислорода в основаниях и атом фосфора [Kaina and Christmann, 2002]. N-алкилированные основания высоко летальны, в то время как O-алкилированные основания в ДНК высоко мутагенны и канцерогенны [Kaina, Fritz and Coquerelle, 1993]. Их удаление и репарацию ДНК осуществляют два механизма, в основе которых лежат ферменты алкилгликозилазы и алкилтрансферазы. Индуцибельные гликозилазы инициируют удаление алкилированных оснований из ДНК по механизму эксцизии оснований, BER [Preuss et al., 1995]. Они гидролизуют связь между атомами 3(9)N основания и 1'C дезоксирибозы. В результате образуется АП-сайт, распознаваемый ферментом АП-эндонуклеазой. АП-сайт удаляется вместе с несколькими прилегающими к нему нуклеотидами. Образовавшаяся брешь заполняется ДНК-полимеразой [Margison et al., 2003]. Размер синтезируемой «заплатки» в результате функционирования BER не превышает 7 нуклеотидов [Seeberg, Eide and Bjoras, 1995]. У эукариот идентифицированы только N-алкилгликозилазы [Grombacher and Kaina, 1996; Tatsuka et al., 1995]. Это позволяет считать, что по механизму BER из ДНК удаляются главным образом N-алкилированные основания [Kaina et al., 2001].

Алкилтрансфераза – фермент прямого действия. Она удаляет алкильную группу, присоединяя ее к себе. В результате основание восстанавливается, молекула фермента необратимо инактивируется [Pegg, Dolan and Moschel, 1995]. Этот путь безошибочной репарации ограничен в

своих возможностях, т.к. определяется уровнем конститутивного синтеза алкилтрансфераз, который сильно варьирует в различных тканях и опухолях [Heinstler et al., 1999]. Этот механизм играет основную роль при восстановлении О-алкилированных оснований [Pegg and Byers, 1992].

Рассмотренные здесь механизмы прямого восстановления и эксцизионного удаления алкилированных оснований активируются в дорепликативный период. Если повреждения не удаляются до репликации, и клетка вступает в S-фазу, то большинство алкилированных оснований становится стопором для полимеразы [Abbott and Saffhill, 1979]. Остановка движения репликативной вилки запускает механизм гибели клетки по апоптотическому пути. Исключением является О⁶-MeG. Его доля составляет примерно 10% из всех алкилированных оснований ДНК, образующихся при действии алкилирующих агентов [Beranek, 1990]. О⁶-MeG не препятствует движению полимеразы. В связи с этим свойством велика его роль в мутагенезе и канцерогенезе [Rasouli-Nia et al., 1994]. Считается, что увеличение спонтанного уровня содержания О⁶-MeG в гепатоцитах вследствие снижения активности метилтрансферазы приводит к развитию цирроза и гепатоклеточного рака [Major and Collier, 1998]. В ДНК эпителия области селезеночного изгиба толстого кишечника (ТК) человека обнаруживается более высокое содержание О⁶-MeG по сравнению с другими органами [Povey et al., 2000]. Эта область ТК чаще всего подвержена канцерогенезу. В работе [Povey et al., 2002] показано, что колоректальный канцерогенез у мышей, индуцированный алкилирующими агентами, сочетается со стабильно высоким содержанием О⁶-MeG в ДНК из этой области кишечника. Эти факты свидетельствуют о вкладе О⁶-MeG в инициацию РТК.

Исследования РТК привели в последнее время к формулировке гипотезы, связывающей толерантность опухолевых клеток к агентам, индуцирующим О⁶-MeG в ДНК, дефицит MMR и снижение способности

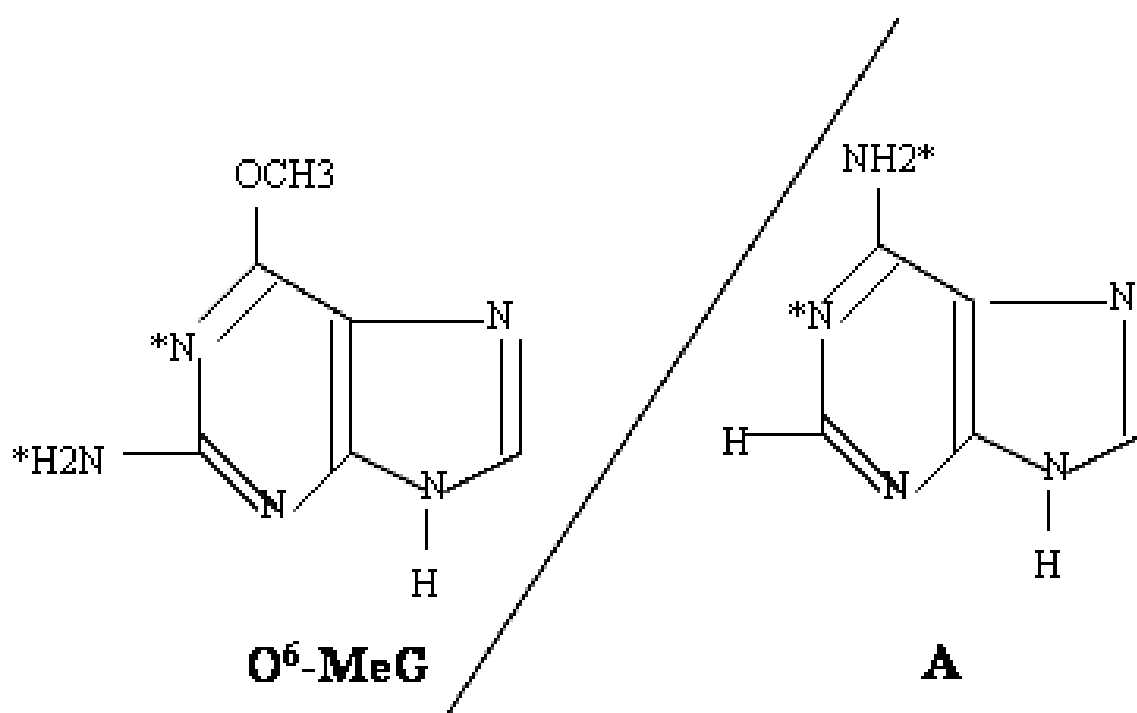


Рисунок 4. Структура аденина и продукта метилирования гуанина по O⁶

опухолевых клеток к апоптозу [Тронов, Константинов и Крамаренко, 2002; Ochs and Kaina, 2000].

O⁶-MeG сильно напоминает А (Рис. 4), и потому полимеразы в процессе синтеза вставляют комплементарный ему Т, формируя неправильную пару O⁶-MeG : Т. В ответ иницируется MMR, начинающая процесс эксцизионного удаления тимина в дочерней цепочке ДНК. Создается тупиковая для MMR ситуация, когда в матрице присутствует неудаляемый дефект, а полимеразы не могут подобрать ему комплементарную пару, всякий раз в процессе ресинтеза воспроизводя пару O⁶-MeG : Т. Если клетка, содержащая в геноме такую пару, вступит в следующий цикл репликации, то неизбежной будет транзигия G : С → А : Т (последовательно: G : С + Alk → O⁶-MeG : С + I цикл репликации → O⁶-MeG : Т + II цикл репликации → А : Т). Показано, что в опухолевых клетках эпителия ТК (дефицитных по MMR) частота таких транзигий соответствует 1 на 8 O⁶-MeG для гена *hprt* [Rasouli-Nia et al., 1994], но может быть и выше в случае, например, онкогена *K-ras* [Esteller et al., 2000; Jackson et al., 1999]. Однако вступлению во второй цикл репликации препятствует активная система MMR, которая возобновляет процесс эксцизии и последующего ресинтеза. Разрешается эта коллизия радикально: длительное существование обширной брешы в дочерней цепи ДНК делает неизбежным формирование двунитевого разрыва под действием внутриклеточных эндонуклеаз. Его появление запускает механизм апоптоза (Рис. 5). Таким образом, эффективная система MMR иницирует программу гибели полноценных по репарации клеток, содержащих O⁶-MeG. Дефицитные по MMR опухолевые клетки при РТК сохраняют жизнеспособность. При этом они приобретают новые мутации за счет G : С → А : Т транзигий, что, с одной стороны, увеличивает вероятность их трансформации, а с другой – расширяет селективные

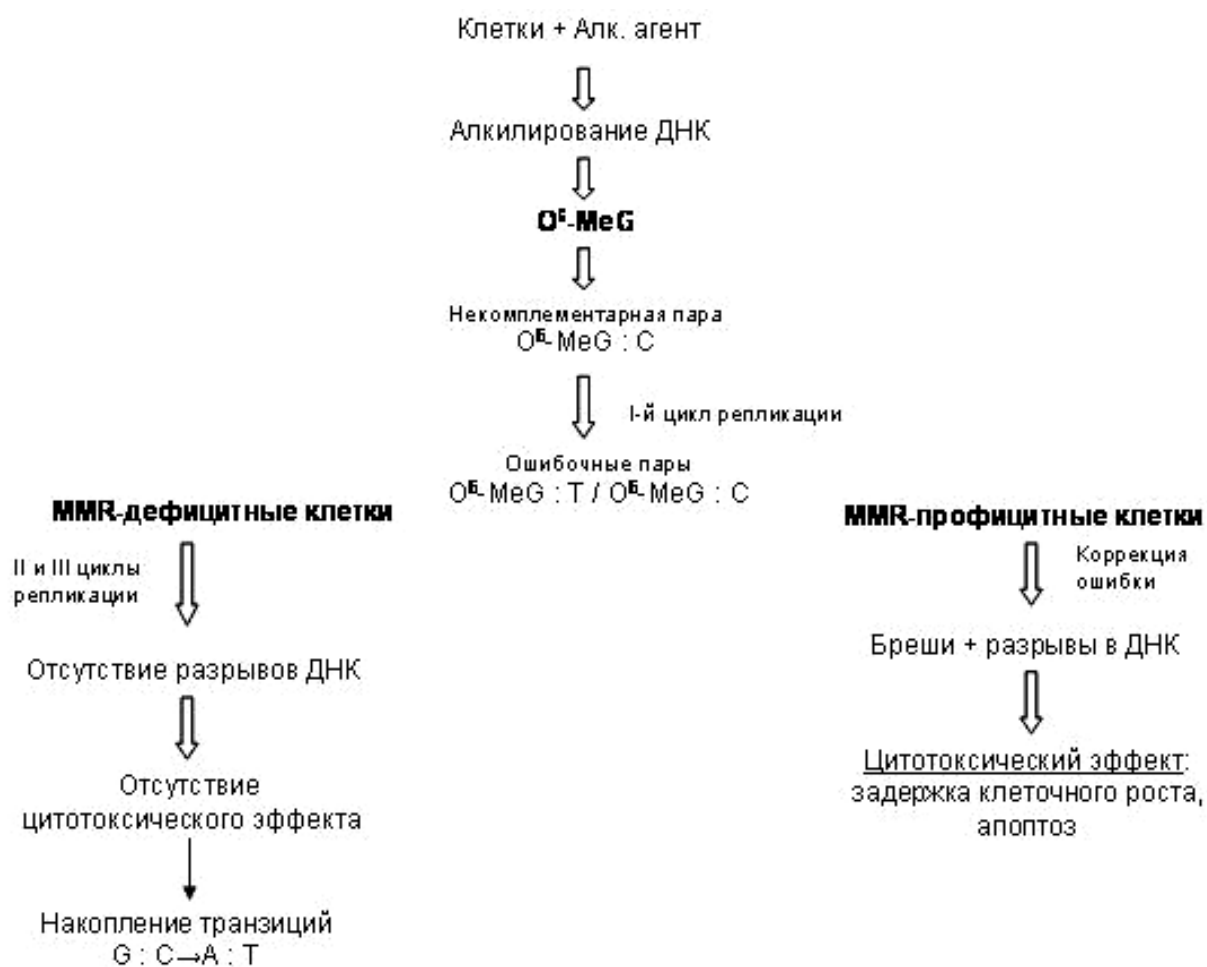


Рисунок 5. Схема ответа MMR-дефицитных и MMR-профицитных клеток на образование O⁶-метилгуанина в ДНК после действия алкилирующего агента

возможности опухолевых клеток и позволяет им адаптироваться к генотоксическим воздействиям. Этот механизм может частично объяснять их пониженную способность к апоптозу в ответ на действие алкилирующих агентов [Bedi et al., 1995].

Таким образом, как видно, активная система MMR трансформирует первичное повреждение O⁶-MeG в двунитевой разрыв ДНК. Эти вторичные разрывы, возникающие в пострепликативный период (спустя >1 цикла репликации), могут быть показателем функциональной активности MMR в клетке и маркером в оценке риска возникновения РТК у человека.

2.3. РАК ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА: ДЕФИЦИТ MMR, ОЦЕНКА РИСКА РАЗВИТИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Как уже говорилось во введении, рак толстого кишечника (РТК) является одной из наиболее распространенных онкопатологий в экономически развитых странах. Помимо наследственного неполипозного рака толстого кишечника, сходными с ним признаками обладают и опухоли других органов, образующих спектр НРТК – эндометрий, яичники, тонкий кишечник, почечные лоханки, мочеточники [Vasen et al., 1999] (Таблица 2). Эти опухоли диагностируются в раннем возрасте, наследуются как аутосомный доминантный признак, проявляют клинические признаки синдрома, молекулярным признаком которого является гермлайн-мутация (мутация, обнаруживаемая в половых клетках) одного из генов MMR, главным образом генов *MLH1* и *MSH2*. 30% мутаций *MLH1* составляют бессмысленные замены нуклеотидов [Aarnio et al., 1999]. Маркером недостаточности MMR является микросателлитная нестабильность (МСН). Опухоли НРТК-спектра характеризуются высоким уровнем МСН: более

Дефект MMR	МСН-статус ¹⁾	Заболевание/синдром ²⁾
Гермлайн-мутации гена <i>MLH1</i>	Высокий уровень	НРТК/синдром Линча 1, НРТК-спектр/синдром Линча 2
Гермлайн-мутации гена <i>MSH2</i>	Высокий уровень	НРТК, синдром Мюир-Торр
Гиперметилирование промотора <i>MLH1</i>	Высокий уровень	Спорадический РТК ⁴⁾
Мутации гена <i>mgmt</i> ³⁾	Низкий уровень	Спорадический РТК, цирроз печени, гепатоклеточный рак

Таблица 2. Связь дефектов пострепликативной коррекционной репарации ДНК (MMR) с опухолевыми заболеваниями человека и микросателлитной нестабильностью (МСН) в опухолях

¹⁾ Согласно принятому критерию, высокий уровень МСН определяется как ≥ 2 нестабильных микросателлитов из любых 5 исследованных ($\geq 40\%$ нестабильных микросателлитов в геноме). Низкий уровень МСН при тех же условиях соответствует $< 40\%$ МСН.

²⁾ Синдром Линча 1 включает в себя только наследственные колоректальные опухоли. Синдром Линча 2, помимо колоректального рака, охватывает наследственные опухоли близлежащих органов – эндометрий, яичники, тонкий кишечник, желудок, мочеточник, почечные лоханки. Синдром Мюир-Торр – наследственная неоплазия сальных желез, фенотипический вариант НРТК.

³⁾ Ген *mgmt* кодирует фермент прямого деметилирования гуанина, метилгуанин-ДНК-метилтрансферазу. Недостаточность по этому ферменту приводит к перегрузке системы MMR и слабовыраженному мутаторному фенотипу.

⁴⁾ Этими признаками могут обладать спонтанные опухоли органов, образующих «колоректальный спектр» – эндометрий, яичники, мочеточник и т.д.

40% микросателлитов нестабильны. В основном нестабильными являются микросателлиты, состоящие из моонуклеотидных повторов [Штам и др., 2004; Boland et al., 1998].

Спорадические опухоли органов НРТК-спектра обнаруживают другие молекулярные характеристики (Таблица 2). Высокий уровень МСН в них обусловлен инактивацией гена *MLH1* за счет гиперметилирования промоторов двух его аллелей [Veigl et al., 1998]. В части спорадических опухолей наблюдается низкий уровень МСН или отсутствие ее – микросателлитная стабильность (МСС). Низкий уровень МСН связан с соматической мутацией гена *mgmt*, непосредственно не относящегося к системе MMR. Этот ген кодирует фермент прямого деметилирования O⁶-MeG, O⁶-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазу. Его мутация приводит к функциональной перегрузке системы MMR и частичной инактивации гена *MLH1* [Whitehall et al., 2001].

Помимо заболеваний, представленных в таблице 2, до 50% опухолей легких, простаты и груди, не относящихся к НРТК-спектру, также обнаруживают МСН. В отличие от НРТК-спектра, МСН в них проявляется в ди-, три- и тетрануклеотидных повторах [Boland et al., 1998]. В части этих опухолей МСН может и не ассоциироваться с мутацией генов MMR. С другой стороны, измерение функции MMR in vitro в работе [Parker et al., 2002] обнаружило снижение активности *МУН*-зависимой коррекции в спорадических МСС-опухолях ТК. Ген *МУН* (human homolog of the E.coli MutY) кодирует аденин-гликозилазу Myn, которая участвует в репарации повреждений ДНК при окислительном стрессе. Myn выщепляет аденин из некорректной пары с гуанином или с модифицированным ohoG [Ma and Lee, 2004]. Последующие шаги репарации в точности соответствуют ранее описанному механизму BER. На заключительном этапе полимераза вставит новый нуклеотид и исправит ошибку. Как видно, Myn выполняет, по существу, корректирующую функцию, поскольку всегда удаляет только

аденин. Однако этот тип репарации относится к BER, а не к MMR-системе. Недавно идентифицирована герминальная мутация гена *MUTH/MUTYH*, которая определяет предрасположенность к колоректальному раку [Croitoru et al., 2004].

Что касается MMR, то она может узнавать и удалять некоторые поврежденные основания ДНК, но при двух обязательных условиях: (1) дефектное основание должно формировать некорректную пару (чтобы быть признанным), и, (2) дефектное основание должно входить во вновь синтезированную цепочку ДНК. Это возможно, если модификация основания произошла в составе нуклеотидного пула, до начала синтеза ДНК (например, *охоG*, УФ-индуцированные фотопродукты оснований), и модифицированное основание было вставлено полимеразой в ДНК при синтезе.

Отсутствие MSH при достоверном снижении функциональной активности MMR *in vitro* было показано на одной из 3 исследованных линиях клеток, полученных из клинических опухолей мочевого пузыря [Thykjaer et al., 2001]. Это говорит о том, что MSH не исчерпывает всех случаев дефицита коррекции. Не исключено также, что ферменты MMR играют роль в развитии некоторых видов МСС-рака через функции, отличные от MMR. Все это подчеркивает актуальность прямой оценки функциональной активности системы MMR у больных раком.

Для определения активности MMR используются различные показатели: выход спонтанных мутаций в репортерном гене *hprt*, частота рекомбинаций между локусом клетки и введенным вектором, содержащим отклонения от гомологии с ним, способность гомогенатов клеток удалять некомплементарные пары в модельных двунитевых олигонуклеотидах. До последнего времени эти исследования были эпизодическими. Кроме того, широко распространенные молекулярные маркеры MMR (наличие поврежденного гена и MSH) являются простым сигналом «да/нет».

В предыдущей главе обзора, мы отметили, что вторичные разрывы ДНК, возникающие в ответ на действие агентов, индуцирующих в ДНК O^6 -MeG, могут адекватно отражать активность MMR в клетке. В работе [Ochs and Kaina, 2000] показано, что в клетках CHO, полноценных по MMR, алкилирующий агент метилнитрозогуанидин (MNNG), индуцировал двунитевые разрывы в ДНК спустя 48 час после воздействия, после этого клетки подвергались апоптозу. В клетках с пониженной экспрессией *MSH2* не обнаруживали разрывов в ДНК и апоптоза после действия агента. Недавно было показано, что метилирующие агенты MNNG и темозоломид индуцировали апоптоз в лимфоцитах крови человека только после их стимуляции к пролиферации [Kaina and Christmann, 2002]. Таким образом, эффективность MMR может быть оценена в стимулированных лимфоцитах крови с помощью точных и нетрудоемких количественных методов (например, метода ДНК-комет [Cebulska-Wasilewska, 2003; McGlynn et al. 2003]). Такой подход может лечь в основу теста по оценке риска развития заболеваний, относящихся к спектру рака толстого кишечника. Данная работа является начальным этапом в разработке такого подхода.

3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1.1. КЛЕТКИ

Исследования проводили на трех линиях опухолевых клеток человека: **HeLa** (клетки карциномы эндометрия) – MMR-профицитные клетки, получены из банка клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург; **HCT116** (клетки карциномы толстого кишечника, в которых произошла делеция в 255 кодоне гена *hMLH1*, приведшая к полной инактивации кодируемого белка [Parsons et al., 1993]) – MMR-дефицитные клетки, предоставлены проф. Селивановой Г.Н., Каролинский Раковый Институт, Стокгольм; **Colo320HSR** (клетки выделены из карциномы сигмовидной кишки человека) – клетки не охарактеризованы по состоянию генов системы MMR, также были получены из банка клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург. Все клетки культивировали в среде DMEM, содержащей глютамин, эмбриональную телячью сыворотку (10%) и антибиотики, в атмосфере CO₂ (5%) при 37°C. **Лимфоциты** выделяли из цельной гепаринизированной крови здорового донора по стандартной методике [Бейум, 1980]. Кровь наслаивали на смесь фиколла-урографина ($\rho=1.078$ г/см³) и центрифугировали в течение 25 мин при комнатной температуре (1500 об/мин). Группирующиеся в интерфазном слое лимфоциты собирали и после 2-кратной отмывки в PBS суспендировали в этом же буфере. Согласно морфологическому критерию, лимфоциты составляли не менее 90%.

3.1.2. ВОЗДЕЙСТВИЯ

В качестве метилирующего агента использовали метилнитрозомочевину (МНМ), которая была синтезирована в ИХФ РАН и в кристаллическом виде хранилась в холодильнике. МНМ-обработку проводили через 24 часа после высева клеток. Препарат растворяли в питательной среде и немедленно добавляли к клеткам. Учитывая тот факт, что МНМ быстро распадается в растворе, клетки от агента не отмывали. Для подавления прямого деметилирования оснований в ДНК, использовали O⁶-бензилгуанин (O⁶-bzG, Sigma), конкурентный ингибитор метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы, который вносили в культуру за час до добавления МНМ. Для индукции двунитевых разрывов клетки обрабатывали этопозидом (VP-16, Sigma), который в виде раствора в DMSO хранили при -20°C и добавляли в культуру через сутки после высева клеток. Гамма-облучение (Co60) лимфоцитов проводили при температуре +4°C. Для подавления репарации в суспензию вносили 15 мкМ афидиколин (Sigma).

3.1.3. ОЦЕНКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МТТ-ТЕСТА

Использовали 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) фирмы R&D Systems (США). МТТ-тест проводили, согласно протокола фирмы [www.RnDSystems.com/pdf/ta5355.pdf], в 96-луночных планшетах. Для определения жизнеспособности клеток мы исследовали деградацию красителя, который превращается в формазан функционально активными митохондриями. Готовили МТТ-краситель в

концентрации 5 мг/мл в PBS. Разведение красителя в среде было в диапазоне 1:10 – 1:20. Содержимое планшетов, в которых инкубировались клетки, стряхивали и вносили в каждую лунку по 100 мкл красителя в среде. Планшеты оставляли в термостате на 45 мин. Сливали краску из планшетов и добавляли по 100 мкл DMSO в каждую лунку; через 15 мин проводили измерения. Оптическую плотность по воздуху регистрировали на 594 нм с помощью иммуноферментного планшетного фотометра ЭФОС 9305 (Россия). Для каждой измеряемой точки использовали не менее 3-х повторов.

3.1.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ПО АПОПТОТИЧЕСКОМУ ИНДЕКСУ

Апоптотический индекс определяли как частоту клеток с апоптотической морфологией ядра. Морфологические изменения прослеживали во флуоресцентном микроскопе после окрашивания клеток смесью красителей акридинового оранжевого (АО) и бромистого этидия (EtBr), руководствуясь протоколом фирмы Merk Biosciences (Calbiochem, США). К 25 мкл суспензии добавляли 5 мкл водного раствора, содержащего смесь АО и EtBr (25 мкг/мл каждого) и после тщательного перемешивания микроскопировали в течение 1 ч. Использовали флуоресцентный микроскоп с длиной волны возбуждающего света 390 нм, барьерный фильтр 420-450 нм. На каждую точку просчитывали не менее 200 клеток. Следующие признаки были основными критериями классификации клеток (Рис. 6):

1) Ярко-зеленые клетки, содержащие ядро неправильной формы с неравномерно окрашенным хроматином – интактные клетки (Рис. 6, а). Зеленая окраска свидетельствовала о целостности клеточных мембран.

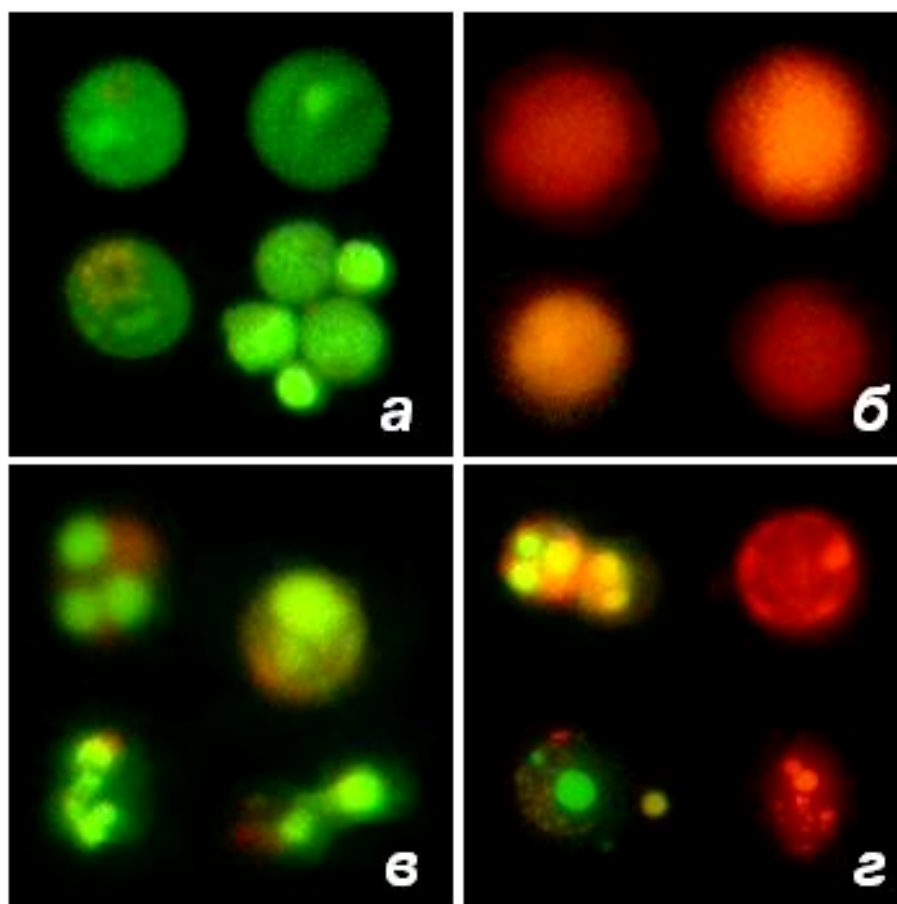


Рисунок 6. Микрофотографии клеток, полученные с помощью флуоресцентного микроскопа

Использовали смесь красителей акридинового оранжевого (АО) и бромистого этидия (EtBr)

а – intactные клетки

б – некротические клетки

в, г – апоптотические клетки

2) Клетки с интактной структурой хроматина, окрашенные в желтый или оранжевый цвета, считались некротическими. К некротическим относили также клетки увеличенного размера с неидентифицируемой структурой (Рис. 6, б).

3) Зеленые или оранжевые клетки с характерной морфологией ядра: округлое ядро, в котором хроматин был коллапсирован, т.е. в высокой степени конденсирован, так, что в нем не прослеживалась какая-либо структурная гетерогенность, – апоптотические клетки (Рис. 6, в - г). Коллапсированный хроматин приобретал также форму кольца (конденсированный по периферии), полумесяца, шара или виноградной грозди (фрагментированное ядро). Клетки с проницаемой мембраной окрашивались в желтый или оранжевый цвет. Оранжевая окраска свидетельствует о наступившей пермеабиллизации клеточной мембраны на поздних стадиях апоптоза. Во всех случаях у апоптотических клеток окраска ядра яркая и гомогенная, без малейшей внутренней структуры хроматина.

В отдельных экспериментах определяли численность клеточной популяции, подсчитывая клетки в 20 – 50 цифровых микрофотографиях, выполненных в проходящем свете.

3.1.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ДВУНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ МЕТОДОМ ДНК-КОМЕТ

История становления метода ДНК-комет насчитывает чуть больше 15 лет. К концу 80-х годов принципиальная схема метода была разработана в современном варианте [Ostling and Johanson, 1984; Ostling and Johanson, 1987; Singh, 1988]. Она включает в себя несколько последовательных процедур (Рис. 7).

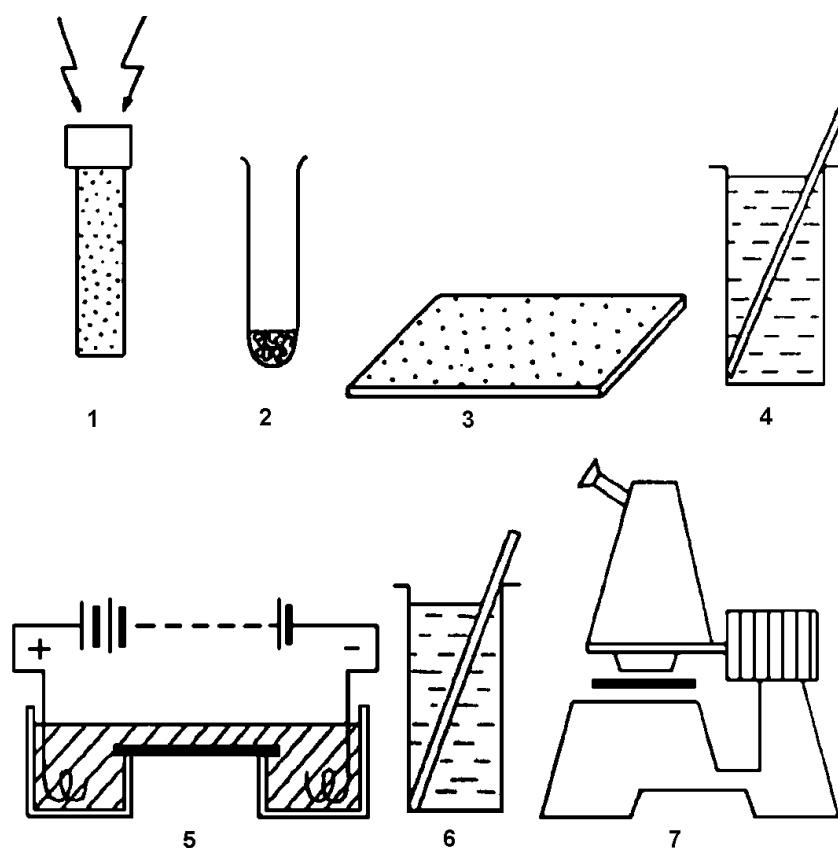


Рисунок 7. Схема операций для получения и визуализации ДНК-комет

- 1 — приготовление клеточной суспензии и обработка ее генотоксическим агентом,
- 2 — смешивание раствора агарозы с клеточной суспензией,
- 3 — получение гель-слайда на предметном стекле,
- 4 — лизис клеток, иммобилизованных в агарозном геле,
- 5 — электрофорез,
- 6 — окрашивание слайда,
- 7 — визуализация комет во флуоресцентном микроскопе.

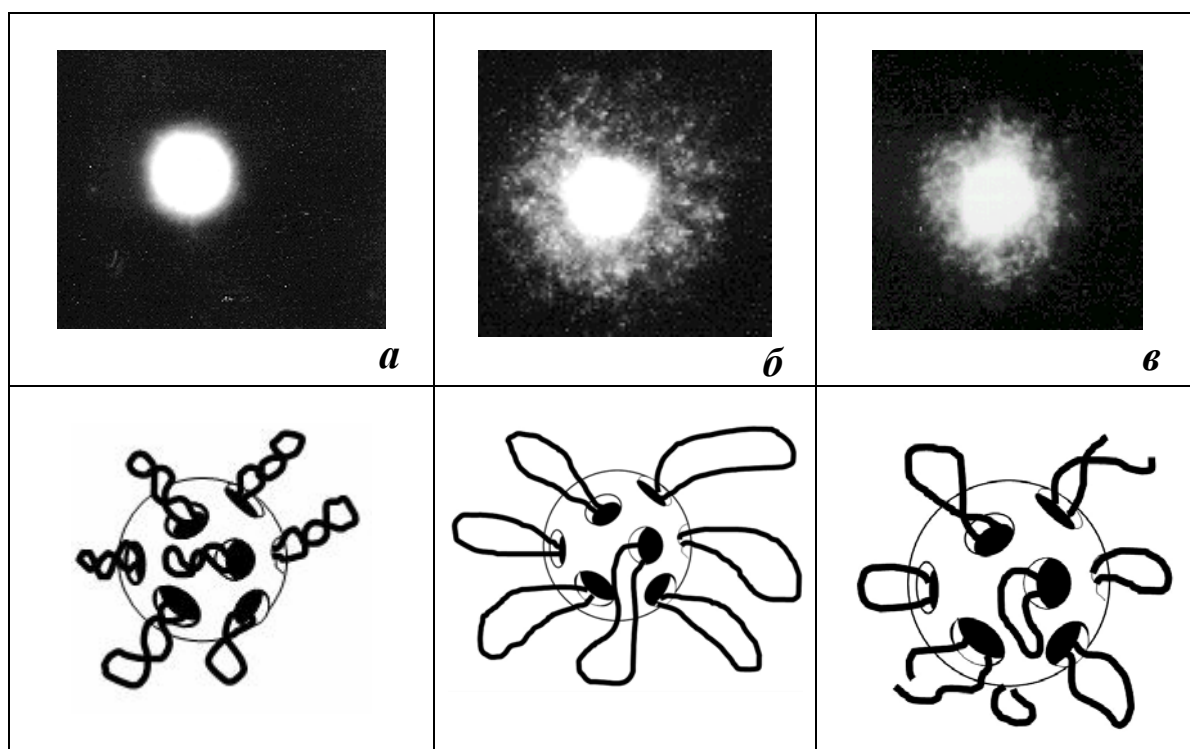


Рисунок 8. Микрофотографии и схематическое изображение нуклеоидов, формируемых из неповрежденных (*а*, *б*) и поврежденных (*в*) клеток после лизиса и окрашивания пропидием йодидом (PI)

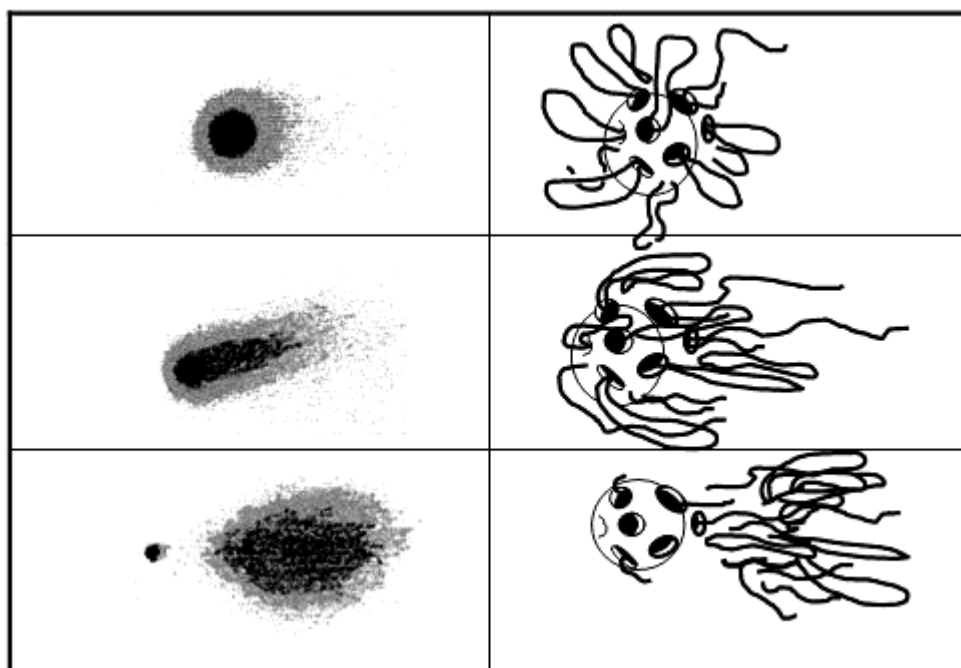


Рисунок 9. Микрофотографии и схематическое изображение комет с различным уровнем повреждения ДНК

(1-3) Суспензия клеток смешивается с агарозой, и смесь наносится тонким слоем на поверхность микроскопического стекла. (4) После застывания геля стекло погружается в лизирующий раствор, обеспечивающий лизис мембран и частичное высвобождение ДНК. В результате из каждой клетки формируются нуклеоиды, иммобилизованные в агарозе (Рис. 8). (5) В постоянном электрическом поле свободные петли (сегменты) ДНК мигрируют (вытягиваются) к аноду, придавая нуклеоиду асимметрию. Любая обработка, способствующая высвобождению ДНК из ядра клетки (разрывы, протеиназа), увеличивает миграцию ДНК (Рис. 9). (6) Стекла погружаются в нейтрализующий раствор (0.4 М Tris-HCl, pH 7.4), способствующий ренатурации, ДНК окрашивается флуоресцирующим красителем (АО, EB, DAPI, Hoechst 33342 и др.). (7) ДНК наблюдают, используя флуоресцентный микроскоп, снабженный соответствующими фильтрами.

На рисунке 10 представлены микрофотографии наблюдаемых ДНК-комет. Голова кометы представляет собой полость в агарозном геле, заполненную ДНК и сохраняющимся матриксом. По существу комета представляет собой клеточный геном, поскольку в щелочных условиях РНК распадается, и флуоресцирует только комплекс ДНК-краситель. Анализируется компьютерное изображение кометы и графическое представление индивидуальной кометы в виде профиля интенсивности флуоресценции. На профиле в общем виде без труда дискриминируются голова кометы и ее хвост (Рис. 10).

Термин “comet assay” (DNA-comet assay) был предложен канадским исследователем P.Olive [Olive et al., 1990]. В этой работе авторы использовали для анализа профиля комет интегральный параметр момент хвоста кометы mt . Он представляет собой произведение медианы хвоста кометы (X_m) и доли ДНК в нем (F_t):

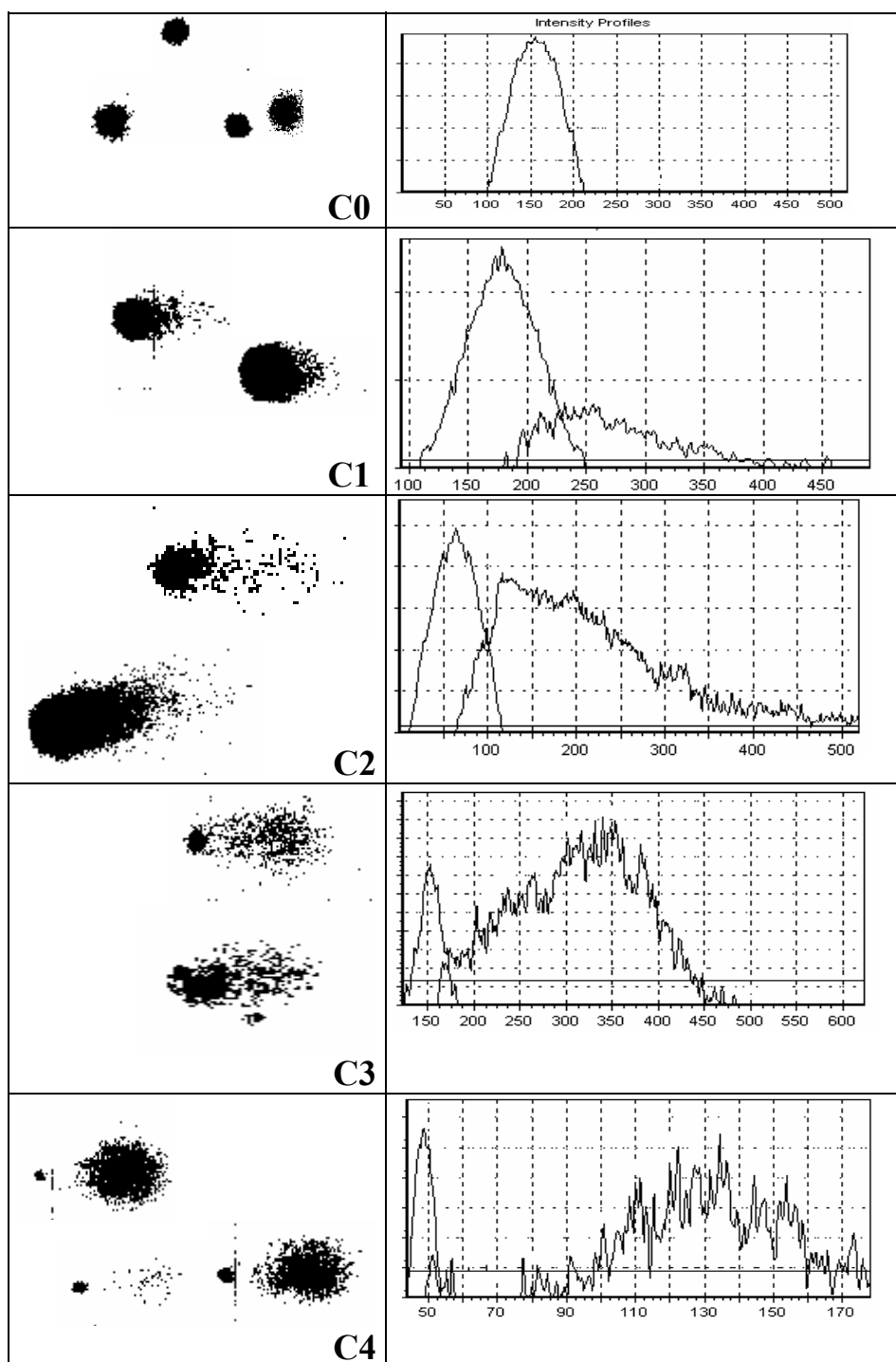


Рисунок 10. Представление комет с различной степенью повреждённости ДНК (возрастание поврежденности **C0**→**C4**) и соответствующих им профилей интенсивности флуоресценции

$mt = X_m \times F_t$, X_m – центр тяжести хвоста кометы (момент первого порядка распределения ДНК в хвосте кометы):

$X_m = [\sum(I_i \times X_i)] / (\sum I_i)$, суммирование производится в пределах хвоста L_t ,

I_i – интенсивность флуоресценции в точке i ,

X_i – расстояние от медианы головы кометы до точки i .

$F_t = (\sum I_i) / (\sum I_i)$ – доля ДНК в хвосте кометы:

$t \quad c$

$\sum I_i$ - содержание ДНК в хвосте кометы,

t

$\sum I_i$ - содержание ДНК в комете.

c

Помимо параметров mt и F_t используются интегральная интенсивность флуоресценции кометы $M_c = \sum I_i$ и L_c – полная длина кометы от начала головы до конца хвоста. С учетом некоторых оговорок M_c соответствует содержанию ДНК в комете (клетке), а mt - мера поврежденности ДНК в клетке:

$$mt = \sum(I_i \times X_i) / M_c$$

Мы использовали нейтральный вариант метода [Singh, 2000]. Суспензию клеток в PBS ($3-5 \times 10^5$ /мл) смешивали с равным объемом 1.5% раствора Low melting agarose, type IV (Sigma); смесь наносили на предметное стекло, которое ранее было покрыто тонким слоем 1% агарозы, накрывали покровным стеклом, и после застывания геля с иммобилизованными в нем клетками стекла погружали в сосуд, заполненный лизирующим раствором (2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 0.02 M Tris-HCl, 1 % Triton X-100, 10 % DMSO, pH 10). После лизиса в холодильнике в течение 12-24 ч слайды помещали в камеру для горизонтального электрофореза, заполненную TAE-буфером, pH 8. Электрофорез проводили спустя 30 мин при 15 В/см в течение 45 мин в холодильнике. По окончании электрофореза слайды помещали на 10 мин в

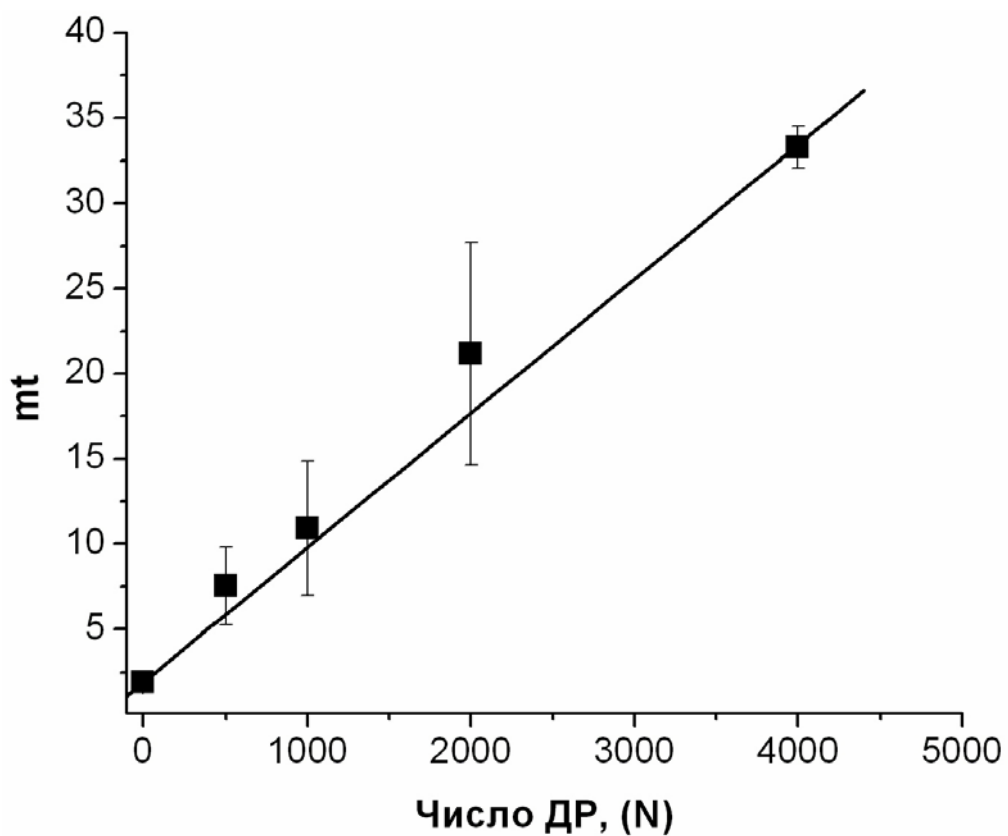


Рисунок 11. Зависимость момента хвоста кометы (mt) от числа двунитевых разрывов в ДНК (ДР) на диплоидный геном лимфоцитов человека

■ – экспериментальные данные

$$mt = 1.922 + 0.079 \times N$$

раствор, содержащий 300 мМ NaOH и 1 мМ EDTA, pH >13. Процедура завершалась нейтрализацией раствором 0.4 М Tris (pH 7.4) и высушиванием слайдов на воздухе. Высушенные слайды дегидратировали в метаноле, подсушивали, окрашивали раствором йодистого пропидия в антифейде (5 мкг/мл PI, 50 мкл на слайд), накрывали покровным стеклом (24x24 мм) и микроскопировали (возбуждение флуоресценции при 490 нм, барьерный фильтр 540 нм). Изображения комет, получаемые с помощью фотокамеры Coolpix 4500 (Nikon), анализировали с использованием программы CASP [Konca et al., 2003]. В каждом слайде анализировали не менее 100 комет (Рис. 10).

Параметр *mt* был предварительно прокалиброван по количеству двунитевых разрывов, индуцированных в геноме покоящихся лимфоцитов человека после их гамма-облучения (Co60) в известных дозах (Рис. 11). Скорость образования ДР при гамма-облучении клеток была принята постоянной в диапазоне доз 0-80 Гр и равной 50 ДР на диплоидный геном после гамма-облучения в дозе 1 Гр [Holley and Chatterjee, 1996]. Количество разрывов приводится в расчете на диплоидный геном лимфоцитов человека.

Помимо параметра *mt* для каждой кометы находили интегральную флуоресценцию кометы, которая пропорциональна количеству ДНК в клетке (Mс). По этому параметру строили гистограмму распределения клеток, из которой находили долю гиподиплоидных клеток с пониженным содержанием ДНК. Этот показатель является косвенным отражением доли апоптотических клеток.

3.1.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ *MLH1* И *MSH2* В КЛЕТКАХ Colo320HSR

Определение мутантных фрагментов ДНК генов *MLH1* [Kolodner et al., 1995] и *MSH2* [Kolodner et al., 1994] проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим электрофорезом в полиакриламидном геле и выявлением характеристик мутационной замены путем секвенирования. Работа включала в себя следующие процедуры: выделение ДНК из культуры клеток Colo320HSR; амплификацию экзонов изучаемых генов; электрофоретический анализ продуктов амплификации и идентификацию экзонов, содержащих замены нуклеотидов; секвенирование фрагментов ДНК, содержащих замены, идентификацию мутантных кодонов и мутации в нем. Для электрофоретического определения мутантных фрагментов ДНК использовали конформационно-чувствительный электрофорез, усиливающий разделение гетеродуплексов стимулированием конформационных различий. Метод обладает высокой чувствительностью, универсальностью и простотой [Karpukhin et al., 2002]. Детекция результатов электрофореза осуществлялась нерадиоактивным методом (серебрением). Выделение ДНК проводили стандартным методом [Sambrook et al., 1989]. При проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) был использован набор синтезированных олигонуклеотидных праймеров, обеспечивающих амплификацию кодирующей части генов, экзонов, с примыкающими к ним частями интронов (50 – 100 п. н.). Размер каждого амплифицированного фрагмента составлял 200 – 400 нуклеотидов. Было синтезировано 35 пар праймеров, что позволяло охватить все экзоны генов *MLH1* (19 экзонов) и *MSH2* (16 экзонов). Были определены оптимальные условия ПЦР, экспериментально отработанные для всех синтезированных праймеров, такие как температура отжига, параметры циклов амплификации, состав буфера. После амплификации пробы

инкубировали при 68,0°C в течение 50 мин. для комплементарной реассоциации синтезированных фрагментов. В результате мутантные фрагменты давали гетеродуплексы (несовершенные дуплексы, содержащие негомологии в области мутировавшего кодона) и гомологичные биспиральные фрагменты, содержащие только комплементарные цепи ДНК. В силу этого между ними имеется небольшое конформационное различие, по которому они могут быть разделены. Для разделения гомо- и гетеродуплексов использовали конформационно-чувствительный гель электрофорез (CSGE, conformation-sensitive gel electrophoresis) [Ganguly et al., 1993]. CSGE проводили с добавлением в гель слабо денатурирующих агентов этиленгликоля и формамида; за счет различий в степени денатурации гомо- и гетеродуплексов усиливается конформационное различие между ними. Таким образом, добавление мягко денатурирующих растворителей усиливает конформационные различия между совершенным дуплексом и гетеродуплексом, и тем самым увеличивает различия в скорости миграции гетеродуплексов и гомодуплексов ДНК при электрофорезе. Основными достоинствами используемого метода являются независимость от природы исследуемого фрагмента ДНК и высокая чувствительность. Другими словами, метод позволяет проводить исследование набора фрагментов ДНК в одних и тех же условиях, в то время как при использовании других способов, для каждого фрагмента нужно подбирать свои определенные условия. Разделяющий электрофорез амплифицированных экзонов генов *MLH1* и *MSH2* проводили с использованием гелей большой протяженности на аппаратах (типа Macrophor, LKB, Швеция). Для окраски геля использовали 0,2 % раствор нитрата серебра. Очистку амплифицированной ДНК для секвенирования проводили с помощью наборов Wizard (Promega, США) согласно инструкции фирмы-производителя. Секвенирование осуществляли на

автоматическом секвенаторе (IBI, США). Праймеры подбирались с помощью программы Vector NTI 9.0 (InfoMax Inc., США).

3.2. РЕЗУЛЬТАТЫ

Согласно сложившимся представлениям, клетки с нормальной системой MMR наиболее чувствительны к алкилирующим агентам. Поэтому условия инкубации клеток, концентрации МНМ и ингибитора метилтрансферазы O^6 -bzG, нами были отработаны на клетках HeLa. На рисунке 12 представлен цитотоксический эффект различных концентраций МНМ спустя 3 суток после добавления агента в ростовую среду и влияние на него O^6 -bzG. Видно, что кривая имеет два участка: область сравнительно малого изменения жизнеспособности клеток под влиянием МНМ (< 250 мкМ МНМ) и область, в которой токсический эффект быстро нарастает с ростом концентрации МНМ (> 450 мкМ). O^6 -bzG в концентрации 10 мкМ усиливает токсическое действие МНМ, снижая более чем в два раза ингибирующую дозу МНМ (50% Inhibiting Dose, ID50) с 1000 мкМ до 450 мкМ. Сенсибилизирующий эффект O^6 -bzG обнаруживается во всем диапазоне концентраций МНМ (от 10 мкМ до 1 мМ). Отметим, что увеличение концентрации O^6 -bzG до 20 мкМ не сопровождается возрастанием токсического эффекта МНМ. Сам по себе O^6 -bzG не обнаруживал цитотоксичности в пределах используемых концентраций (Рис. 13). Эти результаты позволили нам выбрать концентрации МНМ - 250 мкМ и O^6 -bzG – 20 мкМ в качестве рабочих, используя которые мы сравнивали цитотоксический эффект МНМ на клетках HeLa и HCT116, имеющих различный MMR-статус.

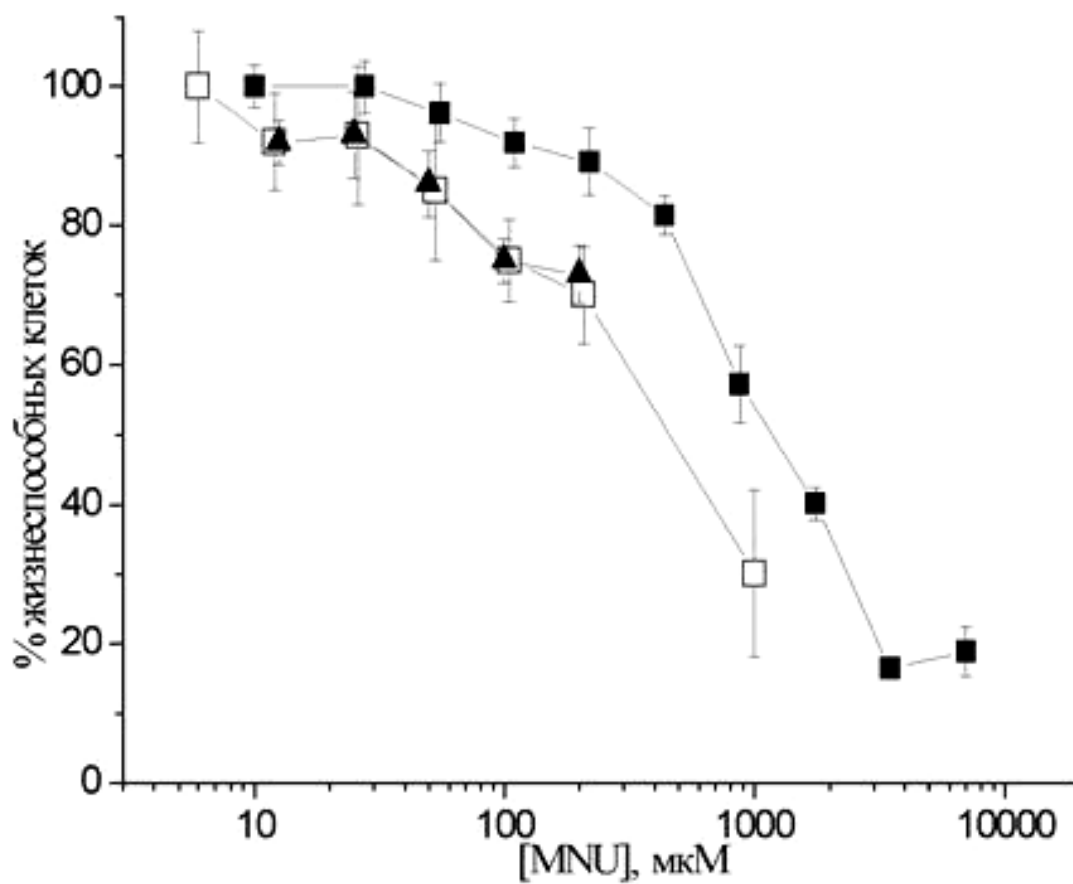


Рисунок 12. Цитотоксический эффект МНМ на клетках HeLa по данным МТТ-теста спустя 72 часа после пульс-обработки различными концентрациями МНМ

■ – МНМ, □ – МНМ + O^6 -bzG (10 мкМ), ▲ – МНМ + O^6 -bzG (20 мкМ)

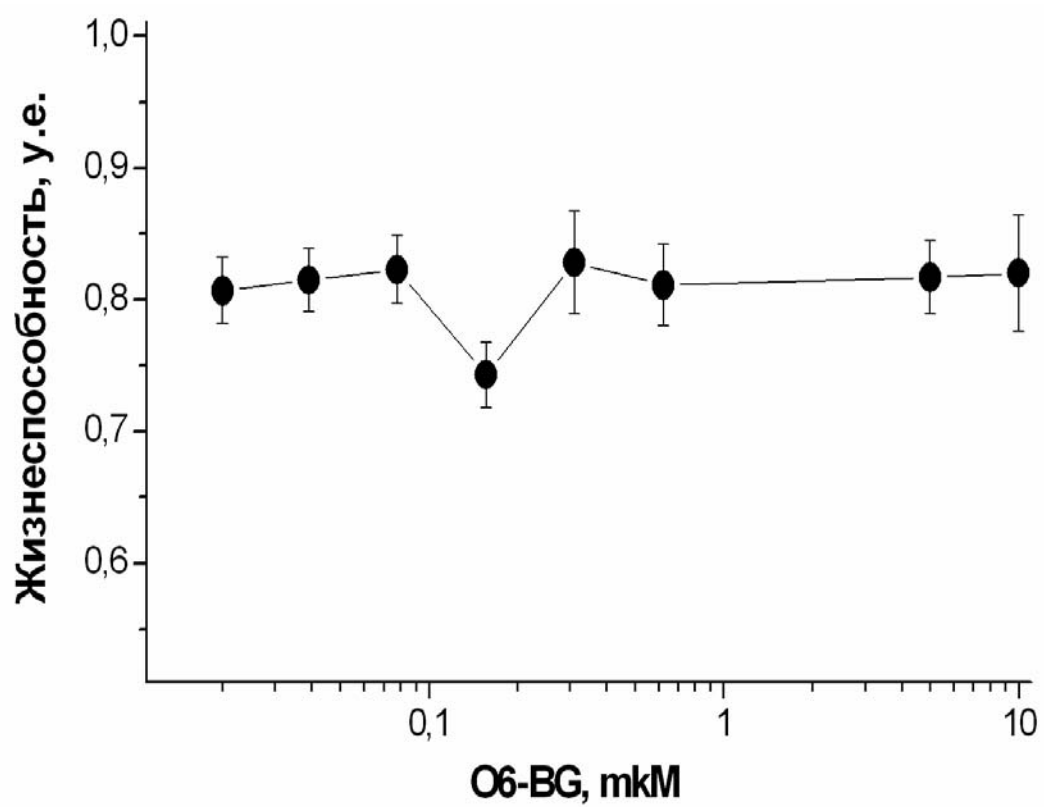


Рисунок 13. Цитотоксический эффект O⁶-bzG на клетках HeLa по данным МТТ-теста

3.2.1. ВЛИЯНИЕ МНМ НА КЛЕТКИ HeLa И HCT116

Рисунок 14 (*а* и *в*) демонстрирует динамику жизнеспособности клеток HeLa и HCT116 в течение трех суток после внесения в ростовую среду МНМ, 250 мкМ. Отметим два существенных факта: (1) цитотоксический эффект МНМ обнаруживается только на третьи сутки и только на MMR-полноценных клетках HeLa; (2) клетки HCT116, дефицитные по MMR, как видно, устойчивы к воздействию МНМ (Рис. 14, *в*). Наблюдаемая цитотоксичность МНМ на клетках HeLa включает в себя апоптоз, отмечаемый также на третьи сутки (Рис. 14, *б*). В отличие от HeLa, клетки HCT116 не обнаруживают цитотоксического действия агента по МТТ-тесту (Рис. 14, *в*) и по апоптотической гибели в течение трех суток после воздействия (Рис. 14, *г*). Во всех случаях в инкубационной среде присутствовал ингибитор метилтрансферазы O^6 -bzG (20 мкМ).

Генотоксический ответ клеток также обнаруживает принципиальные различия между линиями HeLa и HCT116. Как следует из рисунка 15, образование разрывов в геноме клеток HeLa наблюдается спустя 48 час после добавления МНМ к клеткам (250 мкМ). На срок 72 час число разрывов ДНК недостоверно отличается от их количества на 48 час. К этому времени значительная часть клеток HeLa (30%) проявляла морфологические признаки апоптоза (Рис. 14, *б*), характерные для терминальной фазы гибели клетки. На этой стадии происходит также деградация ДНК и лизис части клеток (Рис. 17, *в*, *г*). Устойчивость клеток HCT116 к цитотоксическому действию МНМ коррелирует с отсутствием в ДНК этих клеток двунитевых разрывов (Рис. 15).

При этом обе линии клеток остаются чувствительными к генотоксическому действию индуктора двунитевых разрывов в ДНК этопозиду (Рис. 16, *а*, *в*). Как видно, этопозид индуцирует разрывы в ДНК уже через несколько часов после добавления к клеткам. Как следствие

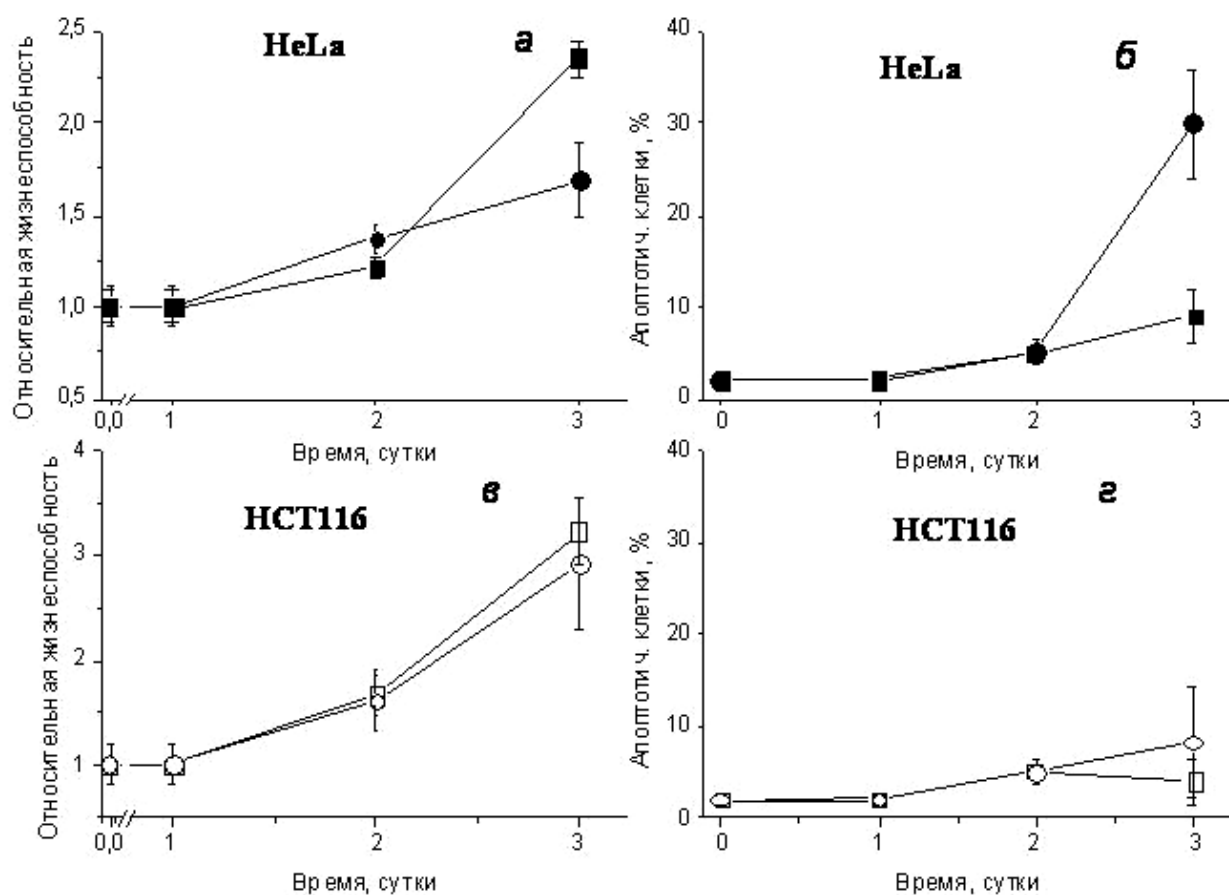


Рисунок 14. Изменение во времени жизнеспособности клеток (МТТ-тест, *а* и *в*) и апоптотического индекса (*б* и *г*)

■, □ – интактные; ●, ○ – обработанные МНМ, 250 мкМ + O⁶-bzG, 20 мкМ

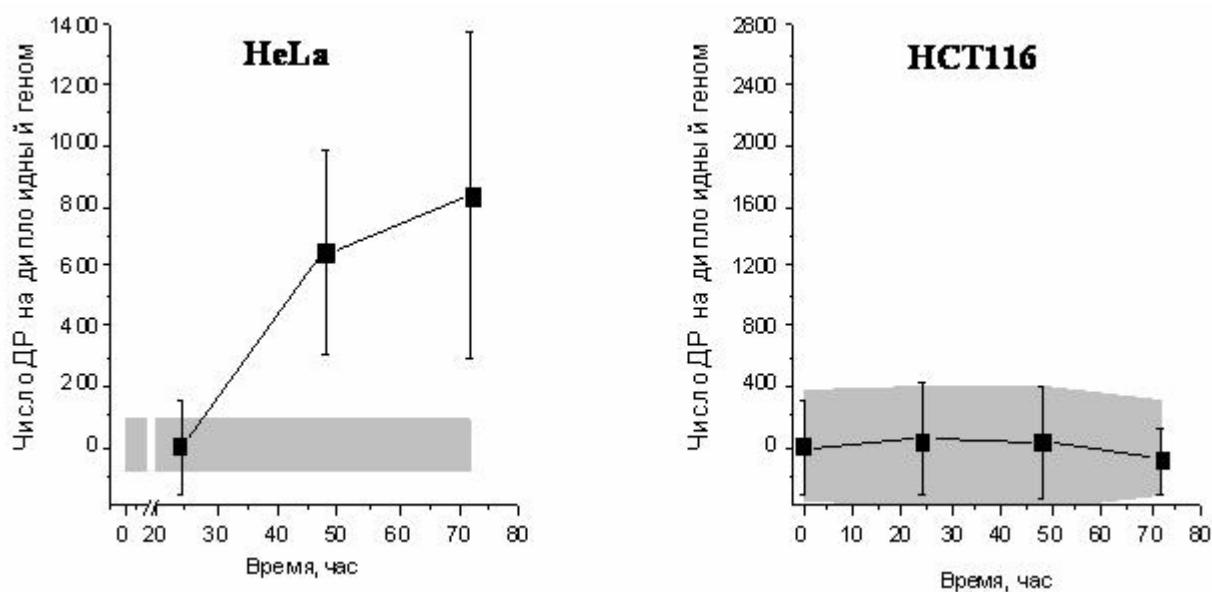


Рисунок 15. Динамика накопления двунитевых разрывов в клетках HeLa и HCT116, после обработки МНМ (250 мкМ) и O⁶-bzG (20 мкМ)

Заштрихованная полоса – контрольные значения +/- SD

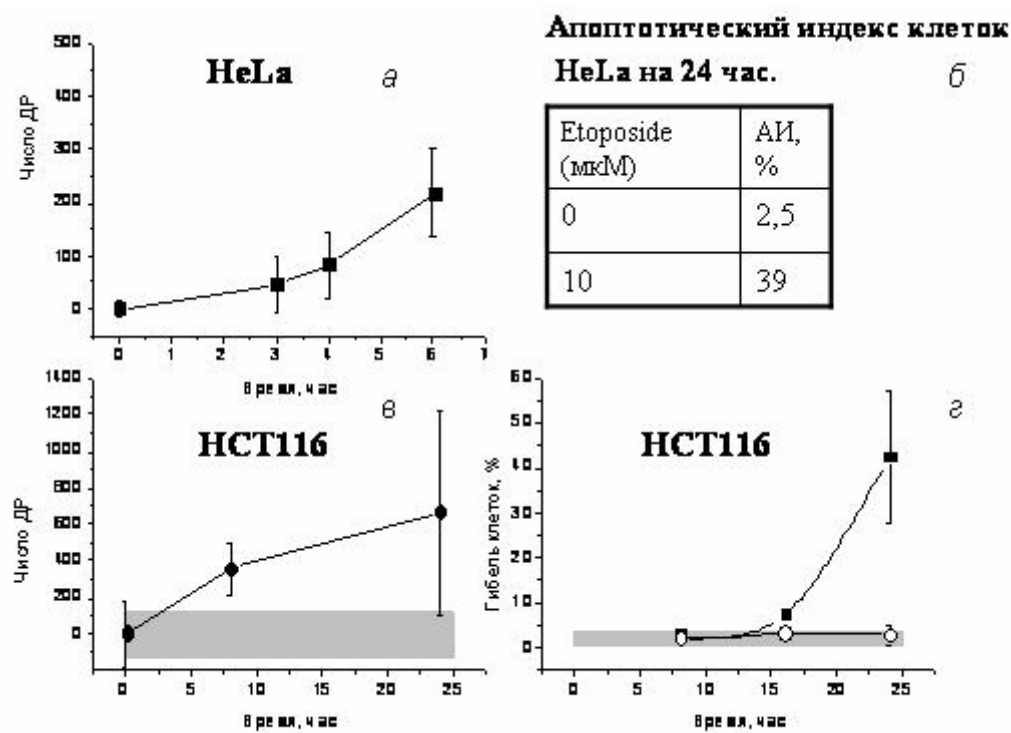


Рисунок 16. Индукция этопозидом двунитевых разрывов в клетках HeLa (a) и HCT116 (v) и последующая гибель этих клеток (б и z)

Для HCT116 представлены доли апоптотических – (■) и некротических – (○) клеток

Заштрихованные области – изменения в контроле +/-SD

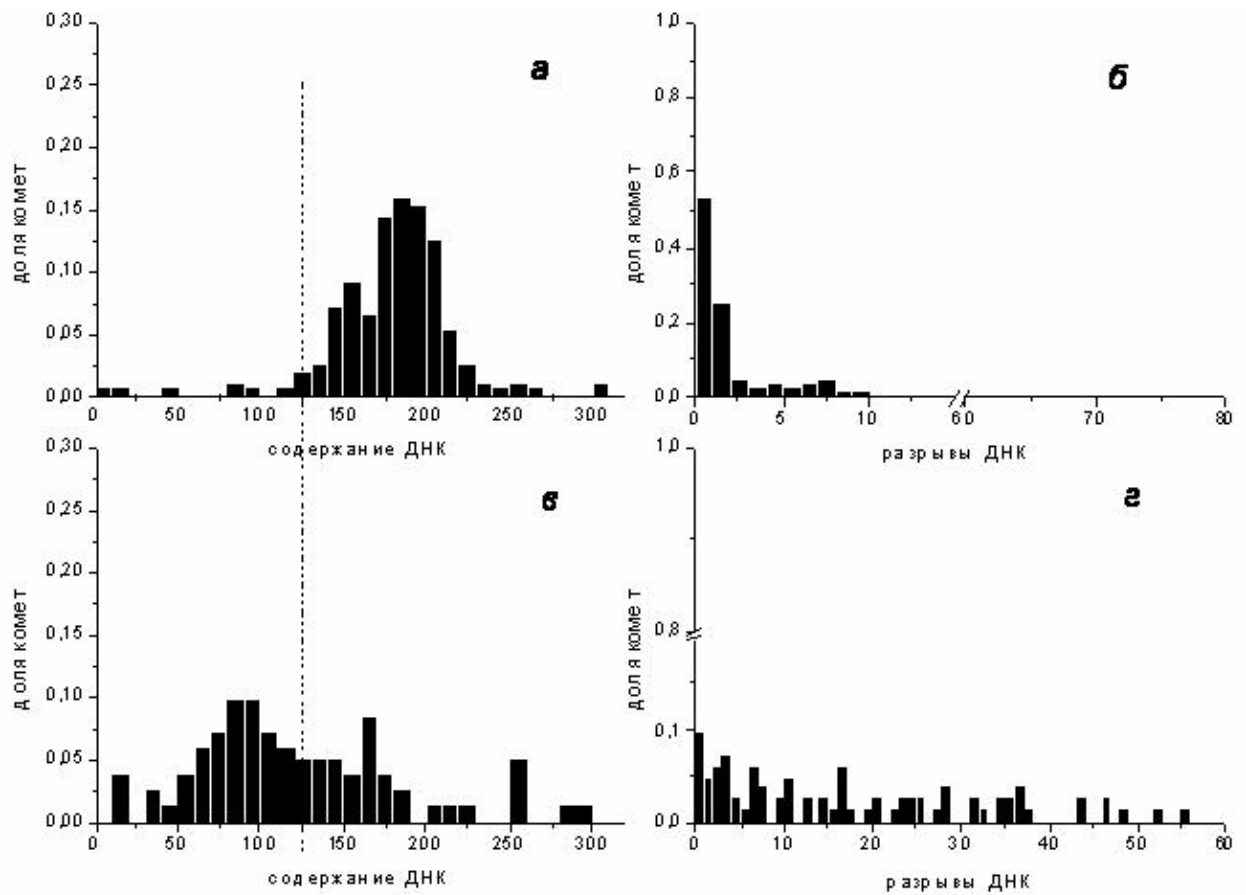


Рисунок 17. Гистограммы распределения ДНК-комет, получаемых из intactных клеток (а, б) и апоптотических клеток HeLa после обработки МНМ (в, г)

Пунктирная линия – верхняя граница содержания ДНК в гиподиплоидных клетках

этого, цитотоксический ответ клеток на действие этопозида проявляется в более ранние сроки (24 час) по сравнению с эффектом МНМ. Апоптотический индекс двух линий клеток к этому времени составляет примерно 40 % (Рис. 16, б, з). Во всех случаях апоптоз подтверждался также возрастанием доли гиподиплоидных клеток, которые регистрировали по снижению флуоресценции ДНК-комет (Рис. 17, а, в). Результат изучения эффекта этопозида показывает, что обе исследованные линии клеток сохраняют высокую чувствительность к двунитевым разрывам в ДНК. ДР запускают в них механизм апоптотической гибели независимо от MMR-статуса клеток.

Отсроченный апоптоз MMR-профицитных клеток HeLa (спустя более 1 цикла после внесения МНМ в ростовую среду и её распада) ассоциирован также с отсроченным появлением ДР в геноме (48 час после внесения агента в среду). К этому времени клетки проходят более 1 цикла, о чем говорят данные МТТ-теста (Рис. 14, а) а также более чем двукратное увеличение числа клеток в культуре. Тем не менее, образование ДР предшествует апоптотической гибели клеток HeLa (Рис. 14, б). Это позволяет связать ДР и МНМ-индуцированный апоптоз клеток HeLa как причину и следствие. В клетках НСТ116, дефицитных по MMR, как видно, не наблюдается образования ДР в течение 72 час после добавления метилирующего агента, при этом клетки не проявляют апоптотической гибели в ответ на действие МНМ (Рис. 14, з).

3.2.2. ГЕНО- И ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТЫ МНМ НА КЛЕТКАХ Colo320HSR

В отличие от клеток НСТ116, являющихся почти диплоидными [Masramon et al., 2000], клетки аденокарциномы толстого кишечника

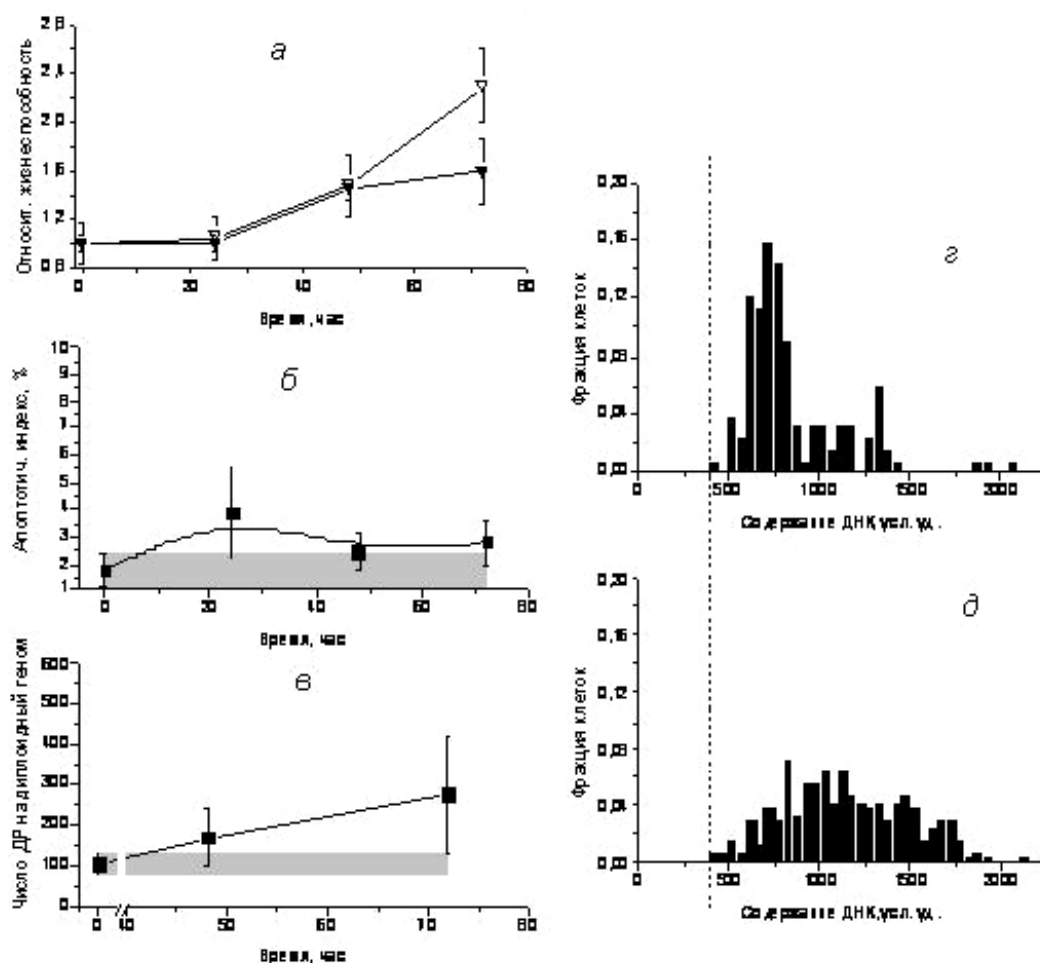


Рисунок 18. Цито- и генотоксическое действие МНМ (250 мкМ + 20 мкМ O⁶-bzG) на клетки Colo320HSR

а – динамика жизнеспособности клеток по результатам МТТ-теста, ▽ – intactные, ▼ – обработанные МНМ;
 б – изменение апоптотического индекса клеток;
 в – динамика двунитевых разрывов ДНК в клетках;
 Заштрихованная полоса – диапазон изменений в контроле;
 г и д – распределения клеток по содержанию ДНК в intactных и обработанных МНМ клетках спустя 72 часа после обработки.
 Пунктирная линия – верхняя граница содержания ДНК в гиподиплоидных клетках

Colo320HSR характеризуются высокой хромосомной нестабильностью и имеют анеуплоидный кариотип [Tsushimi et al., 2001]. Сравнительно недавно в них продемонстрирована микросателлитная стабильность [Kleivi et al., 2004]. В совокупности эти данные позволяют ожидать в клетках Colo320HSR дефицита репаративной системы MMR. Рисунок 18 демонстрирует цитотоксический эффект МНМ на клетках Colo320HSR. МНМ (250 мкМ) значительно снижает МТТ-показатель жизнеспособности клеток на третьи сутки после воздействия агентом (Рис. 18, а). Этот ответ клеток Colo320HSR на токсический стресс МНМ, совпадает с таковым клеток HeLa (Рис. 14, а). В то же время уровень гибели клеток Colo320HSR в результате такой обработки слабо превышает таковой в контроле (Рис. 18, б). Это говорит о том, что в данном случае снижение МТТ-показателя отражает, скорее всего, не гибель, а снижение скорости пролиферации клеток Colo320HSR в ответ на действие МНМ. Тем не менее, в клетках индуцируется заметное количество двунитевых разрывов ДНК (Рис. 18, в). Таким образом, МНМ оказывает гено- и цитотоксическое действие на Colo320HSR, однако оно не сопровождается адекватным возрастанием частоты апоптоза. Этот вывод подтверждает сравнение гистограмм распределения клеток по содержанию ДНК для контрольной популяции и обработанной МНМ, спустя 72 час после обработки клеток (Рис. 18, г, д). Хотя распределения значительно отличаются между собой, очевидно, что МНМ-обработка клеток Colo320HSR не приводит к образованию в них гиподиплоидных клеток, характерных для апоптоза (Рис. 17, в).

Рисунок 19 представляет итог этой части работы – количество вторичных разрывов, образовавшихся спустя 48 час после МНМ-обработки 3-х линий опухолевых клеток с различным MMR-статусом. Этот результат является количественной презентацией функциональной активности системы коррекционной репарации, MMR в этих клетках.

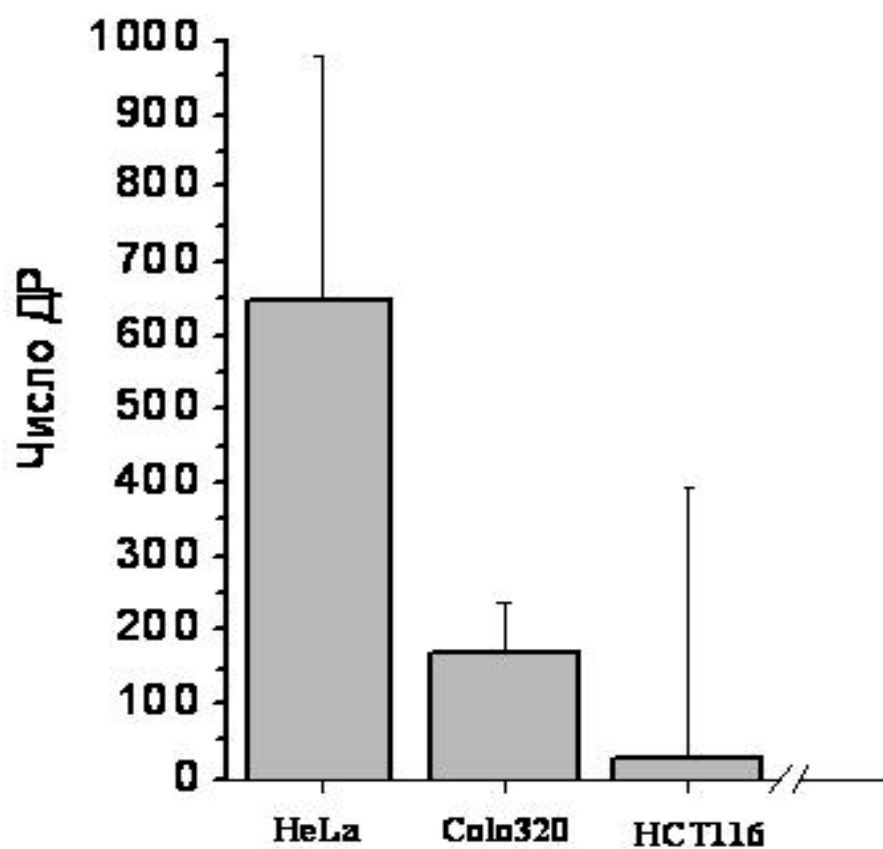


Рисунок 19. Число вторичных двунитевых разрывов, индуцированных через 48 часов после обработки клеток МНМ

3.2.3. МУТАЦИИ В ГЕНАХ *MLH1* И *MSH2* В КЛЕТКАХ Colo320HSR

Из литературных данных следует, что наибольший вклад в колоректальный канцерогенез, вносят мутации двух генов системы MMR - *MLH1* и *MSH2* (Таблицы 1 и 2). Поэтому поиск мутаций в системе MMR клеток Colo320HSR был ограничен этими двумя генами. Были исследованы все 19 экзонов гена *MLH1* и 16 экзонов гена *MSH2* исследуемых клеток. На рисунке 20 представлен фрагмент электрофореграммы продуктов ПЦР, включающий в себя полосы 4-х экзонов (8-11) гена *MSH2* MMR-профицитных клеток HeLa и MMR-дефицитных Colo320HSR (Рис. 20). Результат на клетках HeLa используется как контроль, представляющий дикий тип исследуемого гена. Как видно, полоса 10-го экзона гена *MSH2* в клетках Colo320HSR расщеплена, что свидетельствует о наличии, наряду с гомодуплексами, части копий этого фрагмента, которые содержат структурные изменения, характерные для гетеродуплексов. Последующее секвенирование этого экзона обнаружило наличие в нем мутации – трансверсии в 520 кодоне GGA→GGG (Рис. 21). Данная мутация является нейтральной, поскольку оба триплета, исходный и мутантный, кодируют аминокислоту глицин. Ни в одном из 19 экзонов второго исследованного гена *MLH1* не было обнаружено каких-либо изменений первичной структуры ДНК. Поэтому некоторое снижение активности MMR в этих клетках по сравнению с клетками HeLa (Рис. 19) не связано с мутацией в генах *MLH1* и *MSH2*.

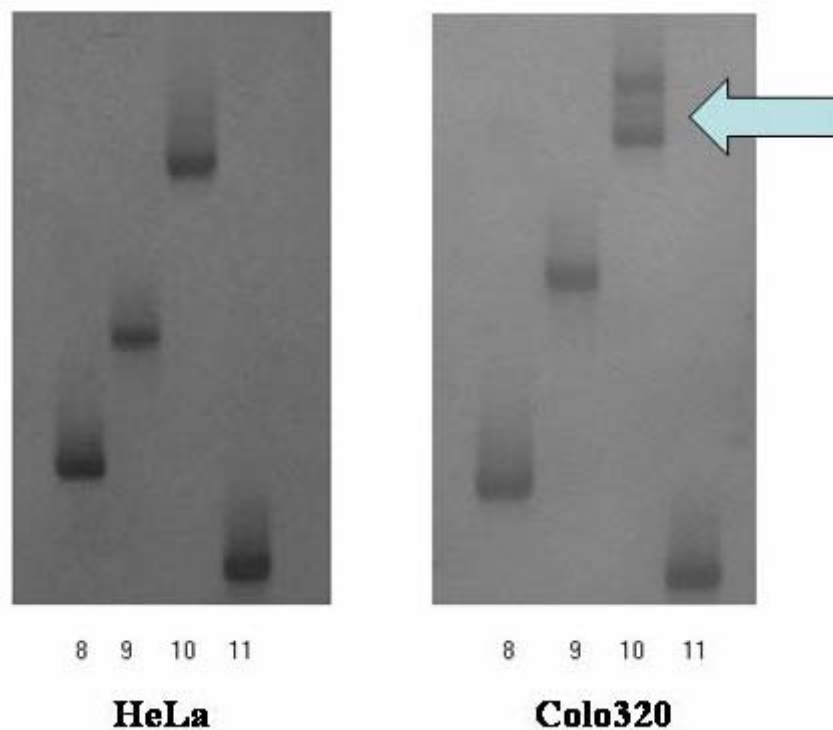


Рисунок 20. Электрофоретическое разделение методом CSGE амплифицированных фрагментов ДНК гена *MSH2* клеток HeLa и Colo320HSR

Представлены полосы 4-х экзонов (8-11) гена
Стрелкой отмечено расщепление полосы 10-го экзона гена *MSH2* в клетках Colo320HSR

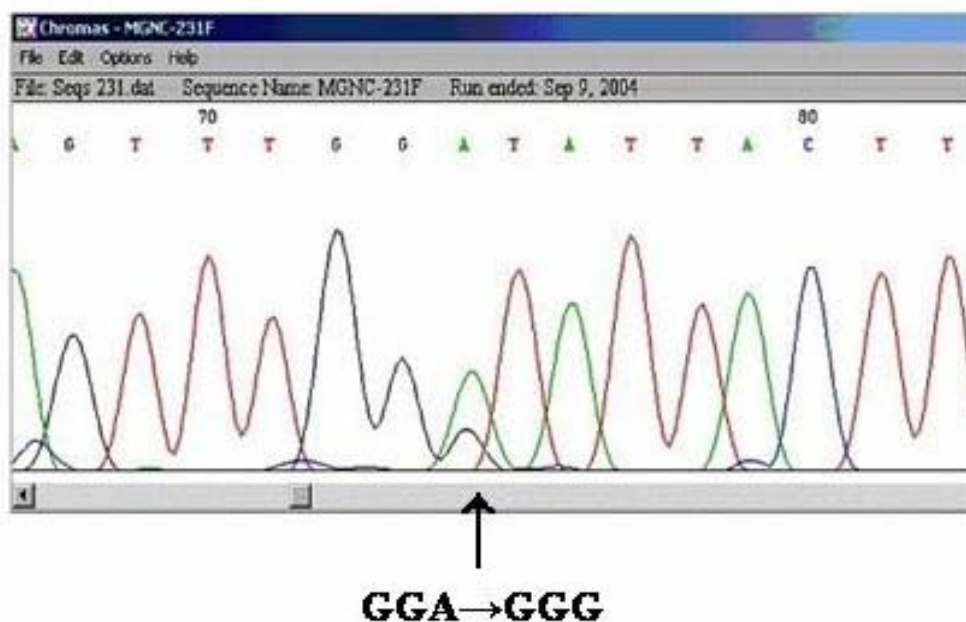


Рисунок 21. Фрагмент хроматограммы 10 экзона гена *MSH2* клеток Colo320HSR

Стрелкой указана мутация в 520 кодоне (трансверсия GGA→GGG)

3.3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

МНМ – монофункциональный алкилирующий агент, используемый в химиотерапии опухолей [Mehta, 2000; Дементьева, Корман, 2001; Горбачева, 2003]. Цитотоксичность МНМ выражается в двух формах: в форме клеточной гибели и в форме подавления роста клеток. На клетках СНО показано, что первая форма цитотоксичности индуцируется при концентрациях МНМ выше 5 mM и наблюдается через 24 ч после добавления МНМ в культуру [Mizumoto and Farber, 1995]. Сигналом, запускающим клеточную гибель, было снижение уровней NAD и АТР в клетках. Дорепликативная эксцизионная репарация истощала энергетику клетки и приводила ее к некрозу. Ингибиторы репарации защищали клетки от этой формы цитотоксичности [Buschfort et al., 1997]. Вторая форма цитотоксичности МНМ наблюдалась при низких, терапевтических концентрациях (<5 mM) и в более поздние сроки (спустя >2 цикла репликации). Эта цитотоксичность определялась степенью алкилирования гуанина и способностью клеток к его репарации (т.е. активностью MGMT) [Mizumoto and Farber, 1995]. Данный механизм цитотоксичности МНМ являлся предметом наших исследований и определил выбор действующих концентраций агента (<1 mM) и время наблюдения эффекта (>48 час).

Наблюдаемое снижение жизнеспособности клеток HeLa в результате действия МНМ может быть связано как со снижением метаболической активности клеток, так и с задержкой пролиферации по механизму «cell cycle checkpoint». В ответ на возникший стресс, в том числе и на повреждение генома, такая задержка неизбежна и необходима для его репарации. Если репарация невозможна или затруднена, то возникает конфликт между сигналом, побуждающим клетку к делению и сигналом, тормозящим клеточный цикл. Результатом этого конфликта является

каскад реакций, завершающийся апоптозом. Сравнение динамики жизнеспособности (Рис. 14, *а*) а также оценка численности клеток HeLa свидетельствуют о том, что в течение первых 48 час заметной задержки деления клеток, обработанных МНМ, не происходит. Расхождение кривых для интактных и МНМ-обработанных клеток наблюдается после 48 час. Аналогичный ход отмечается и для кривых, описывающих динамику апоптоза этих клеток (Рис. 14, *б*). Это говорит о том, что цитотоксический эффект МНМ на клетках HeLa обусловлен главным образом их апоптотической гибелью.

Апоптозу предшествует процесс, формирующий ДР в МНМ-обработанных клетках (Рис. 15). Тот факт, что ДР в ДНК, как и последующий апоптоз MMR-профицитных клеток HeLa, обнаруживаются спустя 1-2 цикла репликации после воздействия метилирующим агентом, позволяет исключить возможность индукции ДР в результате таких эксцизионных механизмов репарации как BER и NER, поскольку они, скорее всего, осуществляют свою функцию в дорепликативный период и оперируют с такими модификациями оснований, которые препятствуют нормальному ходу репликации. В случае действия МНМ, таковыми являются в основном N-метилированные основания [Tatsuka et al., 1995; Grombacher and Kaina, 1996]. «Пострепликативные» ДР появляются и не в результате прямого действия агента на ДНК, в силу их отсроченности от момента обработки. Таким образом, полученные нами результаты говорят в пользу того, что ДР формируются в ходе функционирования пострепликативной коррекции, MMR. Важным повреждением, возникающим при действии МНМ, является O⁶-MeG [Bignami et al., 2000]. O⁶-MeG не может быть репарирован механизмом BER, поскольку он не узнается ни одной из известных ДНК-гликозилаз. В связи с отсутствием в клетке O-специфичных алкил-гликозилаз, репарация O⁶-MeG может осуществляться главным образом прямым деметилированием

метилтрансферазой [Pegg and Byers, 1992]. В условиях подавления ее активности ингибитором O⁶-bzG клетки, содержащие в геноме O⁶-MeG, вступают в цикл. При этом O⁶-MeG не является стопором для ДНК-полимеразы, которая узнает в нем аденин, в силу их структурного сходства, но в то же время он не комплементарен ни одному из 4 оснований ДНК. Формируются некорректные пары O⁶-MeG : C и O⁶-MeG : T, являющиеся субстратом для MMR. Безуспешные циклы эксцизия-ресинтез во время коррекционной репарации приводят к появлению ДР в области, прилегающей к O⁶-MeG. Вероятность такой трансформации безразрывного дефекта O⁶-MeG в разрыв возрастает в связи с тем, что размер эксцизионной бреши при функционировании MMR может превышать 1000 пар нуклеотидов [Bellacosa et al., 1999]. Таким образом, в MMR-профицитных клетках HeLa обнаруживаются признаки гено- и цитотоксичности МНМ, проявляющиеся спустя не менее 2 клеточных циклов.

Одновременно наши результаты показывают, что в отличие от HeLa, MMR-дефицитные клетки HCT116 обнаруживают устойчивость к МНМ по всем использованным нами показателям гено- и цитотоксичности (Рис. 14, в, г; Рис. 15). Исследования с этопозидом показали, что эта устойчивость, по-видимому, связана не с пониженной способностью клеток HCT116 к апоптозу вообще. Как видно, их чувствительность к этопозиду и к ДР, индуцированным агентом, примерно такая же, как и у MMR-полноценных клеток HeLa (Рис. 16).

Приведенные ранее литературные данные о генетической нестабильности клеток Colo320HSR указывают на то, что в них может быть понижена активность MMR. Однако, подобно MMR-профицитным клеткам HeLa, клетки Colo320HSR снижали свою жизнеспособность и накапливали разрывы в ДНК в ответ на МНМ-воздействие (Рис. 18, а, в). С другой стороны, образовавшиеся разрывы не индуцировали в клетках Colo320HSR

увеличение частоты апоптоза (Рис. 18, б, з, д). Таким образом, клетки Colo320HSR проявляют двойное поведение в ответ на МНМ – подобно MMR-профицитным клеткам, накапливают разрывы в ДНК, но, подобно MMR-дефицитным клеткам, обнаруживают толерантность к возникшим повреждениям. Во многих опухолевых клетках обнаруживается один из нескольких механизмов, позволяющих им избежать апоптоза – повышенная экспрессия транскрипционного фактора NFκB, обладающего антиапоптотической активностью [Payne et al., 1998]; повышенная экспрессия белка bcl-2, защищающего митохондрии [Yang et al., 1997]; повышенная экспрессия ингибиторов каспаз [Wang et al., 1998]; мутации в гене p53 [Hollstein et al., 1994]. Поэтому апоптотический индекс опухолевых клеток вряд ли находится в строгой корреляции с функциональной активностью их системы MMR, что и подтверждают результаты нашего исследования Colo320HSR.

Известно, что клетки Colo320HSR характеризуются двумя особенностями: анеуплоидным кариотипом, то есть, высокой хромосомной нестабильностью [Tsushimi et al., 2001] и повышенной экспрессией гена *C-MYC*, связанной с его 40-кратной амплификацией в этой линии клеток [Bolzan et al., 2000]. Хромосомная нестабильность, как известно, сочетается с высоким уровнем спонтанных разрывов в ДНК. Поэтому можно предположить, что в этой линии опухолевых клеток ген *p53* мутирован или ингибирован за счет гиперметиличирования (в отличие от другой линии исследованных нами клеток HCT116). Недостаточная активность *p53* может явиться причиной снижения частоты апоптоза в ответ на повреждение ДНК (в том числе и на двунитевые разрывы). С другой стороны, повышенный уровень экспрессии *C-MYC*, стимулирующего клеточную пролиферацию, способствует преодолению клеткой «DNA damage checkpoint» и позволяет клеткам входить в цикл с имеющимися в ДНК повреждениями (в том числе и разрывами). В результате формируется

фенотип с высокой хромосомной нестабильностью. В работе [Partlin et al., 2003] повышенная экспрессия *C-MYC* увеличивала частоту мутации, связанной со сдвигом рамки считывания, локуса *HPRT* у дрожжей, одновременно с этим наблюдалось частичное подавление активности MMR. Поэтому мы полагаем, что повышенная экспрессия *C-MYC* в клетках Colo320HSR способствует также и некоторому снижению функциональной активности MMR в этих клетках по сравнению с MMR-профицитными клетками HeLa (Рис. 19). Хотя нельзя исключить и другие механизмы – мутации в других генах системы MMR, гиперметилическое метилирование промоторов генов MMR.

В заключение отметим одно важное следствие из полученных в работе результатов, касающееся возможности использования показателя эффективности MMR. На сегодняшний день используются 5 основных маркеров MMR в клетке.

1. Мутации в генах системы MMR [см. на сайте <http://www.nfdht.nl>].
2. Микросателлитная нестабильность, MSI (microsatellit instability) [Boland et al., 1998].
3. Наличие гомологичных рекомбинаций в *Rb*-локусе клеток-мишеней [Claij and Te Riele, 2002].
4. Уровень экспрессии белков системы MMR (главным образом *hMSH2* и *hMLH2*) [Jass, Young and Leggett, 2000; Povey et al., 2002].
5. Способность экстрактов клеток-мишеней удалять из модельных полинуклеотидов содержащийся в них O⁶-метилгуанин или заранее сконструированную некорректную пару оснований [Parsons et al., 1995].

Каждый из приведенных показателей обладает известными недостатками. Так мутации в генах MMR могут быть определены только в опухолевых клетках. В соматических клетках гены MMR мутируют только при наследственных заболеваниях (синдром Линча, семейный

аденоматозный полипоз толстой кишки [Lynch et al., 1988; Fearnhead, Britton and Bodmer, 2001]). Причем, соматические клетки характеризуются гетерозиготностью по наследственной мутации, и пока не ясно отражается ли это на эффективности функционирования MMR [Baida et al., 2003].

Как и мутации, МСН определяется только в опухолевых клетках. Хотя МСН характеризуется высоким и низким уровнями, этот показатель не является вполне количественным показателем.

Для оценки гомологичных рекомбинаций в *Rb*-локусе используется ДНК-конструкт, несущий ген устойчивости к неомицину/путомицину – репортерный ген, фланкированный последовательностями, почти гомологичными *Rb*-локусу; частота дивергенций в гомологах не превышала 1%. Но уже этих негомологий было достаточно, чтобы клетки, полноценные по MMR не пропускали такую рекомбинацию. Хотя в рекомбинации принимают участие многие гены MMR, ключевая роль в ней принадлежит *PMS1* и *PMS2*, двум генам системы MMR, частота мутаций которых при раке не превышает 2% [Тронов и др., 2005].

Что касается уровня экспрессии белков системы MMR, то следует иметь в виду, что существует множество примеров, показывающих, что сверхэкспрессия некоторых генов репарации, приводя к нарушению внутреннего ферментативного баланса механизма репарации, сопровождается повышением выхода спонтанных мутаций [Zi-Qiang Zhou et al., 2001].

Последний из перечисленных методов наиболее адекватно отражает функционирование MMR в целом. Однако в этом случае используемый модельный полинуклеотид должен быть предварительно никирован. Это обстоятельство делает сомнительным сам тест, т.к. *in vivo* никирование осуществляется самой системой MMR. Другими словами, в данном тесте исключается важнейший момент репарации - узнавание дефекта [Duckett et al., 1999].

Таким образом, 4 из приведенных показателей являются маркерами заболевания, но не могут быть использованы для оценки риска спонтанного возникновения заболевания. Мы полагаем, что в качестве такового можно было бы использовать показатель снижения функциональной активности MMR. Это снижение может быть вызвано не только мутацией в одном из генов репарации, но и другими причинами (например, перегрузкой системы репарации, гиперметилованием промоторов генов репарации, повышенной экспрессией белков, взаимодействующих с компонентами MMR и др.). Разработка неинвазивного способа оценки эффективности функционирования MMR позволила бы выделить группу риска (индивидуумов, не несущих генетических дефектов, но нуждающихся в специальных профилактических мерах). Ранее в работах [Kaina, 2003; Тронов и др., 2002] была предложена модель реализации цитотоксического эффекта алкилирующих агентов на MMR-полноценных клетках. Необходимыми элементами этой модели были активная пролиферация и участие полноценной системы MMR. Важно подчеркнуть, что показателем активности MMR в этой модели предполагались вторичные разрывы ДНК, возникающие в результате функционирования системы MMR в ответ на действие алкилирующего агента (Рис 5). В нашей работе эта модель получила экспериментальное подтверждение на опухолевых клетках, обработанных метилнитрозомочевинной.

4. ВЫВОДЫ

1. Показано, что цитотоксический эффект МНМ на клетках HeLa проявлялся на 3 сутки после действия агента.
2. Раньше этого срока (за 24 часа) в клетках обнаружены двунитевые разрывы в ДНК.
3. MMR-дефицитные клетки HCT116 устойчивы к МНМ: в них не возникают двунитевые разрывы, и отсутствует апоптоз в течение 72 час после действия МНМ.
4. Обе линии клеток проявляли высокую чувствительность к генотоксическому действию этопозиды, классическому индуктору нерепарируемых двунитевых разрывов в ДНК. Этопозид индуцирует в клетках двунитевые разрывы (через 6 – 12 час) и последующий апоптоз (через 24 час).
5. По уровню МНМ-индуцированной гено- и цитотоксичности клетки Colo320HSR занимают промежуточное положение между MMR-профицитными клетками HeLa и MMR-дефицитными HCT116. Вместе с тем, по частоте апоптоза клетки Colo320HSR остаются толерантными к возникшим в их ДНК двунитевым разрывам.
6. Впервые в клетках Colo320HSR обнаружена нейтральная мутация в гене *MSH2* (трансверсия GGA→GGG в 520 кодоне 10 экзона).
7. Впервые на трех линиях опухолевых клеток показана прямая корреляция между количеством вторичных двунитевых разрывов, возникших в пострепликативный период, и эффективностью системы MMR.

5. СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Александров В.Б. Рак прямой кишки.-М.: Вузовская книга, 2003.
- Бейум А. Выделение лимфоцитов, гранулоцитов и макрофагов. В кн. Лимфоциты: выделение, фракционирование и характеристика. Под ред. Дж. Б. Натвига, П. Перлманна, Х. Вигзелля: пер. с англ. – М.: Медицина, 1980, С. 9-19.
- Горбачева Л.Б. Молекулярные механизмы резистентности N–алкил-N-нитрозомочевины // Биол. мембраны.-2003.-Т. 20.-С. 256-264.
- Дементьева Н.П., Корман Д.Б. Нитрозометилмочевина – 30 лет изучения и применения для лечения онкологических больных // Вопросы онкологии.-2001.-Т. 47.-С. 655-661.
- Тронов В.А., Константинов Е.М., Крамаренко И.И. Роль эксцизионных механизмов репарации ДНК в индукции апоптоза // Биохимия.-2002.-Т. 67.-С. 882-889.
- Тронов В.А., Крамаренко И.И., Смирнова Т.Б., Терехов С.М. Корректирующая репарация ДНК участвует в индукции апоптоза клеток HeLa, обработанных алкилирующим агентом метилнитрозомочевинной // Цитология.-2003.-Т. 45.-С. 937-938.
- Тронов В.А., Крамаренко И.И., Карпухин А.В. Рак толстого кишечника: дефицит репарации, нестабильность генома, устойчивость к апоптозу, оценка риска заболевания // Вопросы онкологии.-2005.-Т. 51.-С. 159-166.
- Штам Т.А., Вострюхина О.А., Гуляев В.В., и др. Генетические повреждения в ходе прогрессии наследственного неполипозного рака толстой кишки // ДАН.-2004.-Т. 395.-С. 126-131.

- Aarnio M., Sankila R., Pukkala E., et al. Cancer risk in mutation carriers of DNA mismatch repair genes // *Int. J. Cancer*.-1999.-Vol. 81.-P. 214-218.
- Abbott P.J., Saffhill R. DNA synthesis with methylated poly dC–dG templates: evidence for a competitive nature to miscoding by O6-methylguanine // *Biochim. Biophys. Acta*.-1979.-Vol. 562.-P. 51–61.
- Acharya S., Wilson T., Gradia S., et al. hMSH2 forms specific mispair-binding complexes with hMSH3 and hMSH6 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.-1996.-Vol. 93.-P. 13629-13634.
- Aebi S., Kurdi-Haidar B., Gordon R., et al. Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin // *Cancer Res*.-1996.-Vol. 56.-P. 3087-3090.
- Allen D.J., Makhov A., Grilley M., et al. MutS mediates heteroduplex loop formation by a translocation mechanism // *EMBO J*.-1997.-Vol. 16.-P. 4467-4476.
- Aquilina G., Ceccotti S., Martinelli S., et al. Mismatch Repair and p53 Independently Affect Sensitivity to *N*-(2-chloroethyl)-*N**-cyclohexyl-*N*-nitrosourea // *Clin. Cancer Res*.-2000.-Vol. 6.-P. 671–680.
- Baida A., Lopez A., Marcos R., Velazquez A. Germline mutations at microsatellite loci in homozygous and heterozygous mutants for mismatch repair and PCNA genes in *Drosophila* // *DNA Repair (Amst)*.-2003.-Vol. 2.-P. 827-833.
- Barnes C.J., Wahl A.F., Shen B., et al. Mechanism of Tracking and Cleavage of Adduct-damaged DNA Substrates by the Mammalian 5' to 3' -Exonuclease/Endonuclease RAD2 Homologue 1 or Flap Endonuclease 1 // *J. Biol. Chem*.-1996.-Vol. 271.-P. 29624-29631.
- Barras F., Marinus M.G. The great GATC: DNA methylation in *E. coli* // *Trends Genet*.-1989.-Vol. 5.-P. 139-143.

- Bedi A., Pasricha P.J., Akhtar A.J., et al. Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer // *Cancer Res.*-1995.-Vol. 55.-P. 1811-1816.
- Bellacosa A. Functional interactions and signaling properties of mammalian DNA mismatch repair proteins // *Cell Death and Differentiation.*-2001.-Vol. 8.-P. 1076-1092.
- Bellacosa A., Cicchillitti L., Schepis F., et al. MED1, a novel human methyl-CpG-binding endonuclease, interacts with DNA mismatch repair protein MLH1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*-1999.-Vol. 96.-P. 3969-3974.
- Beneke R., Geisen C., Zevnik B., et al. DNA excision repair and DNA damage-induced apoptosis are linked to Poly(ADP-ribosylation) but have different requirements for p53 // *Mol. Cell Biol.*-2000.-Vol. 20.-P. 6695-6703.
- Beranek D.T. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents // *Mutat. Res.*-1990.-Vol. 231.-P. 11-30.
- Bignami M., O'Driscoll M., Aquilina G., Karran P. Unmasking a killer: DNA O6-methylguanine and the cytotoxicity of methylating agents // *Mutat. Res.*-2000.-Vol. 462.-P. 71-82.
- Bocker T., Ruschoff J., Fishel R. Molecular diagnostics of cancer predisposition: hereditary non-polyposis colorectal carcinoma and mismatch repair defects // *Biochim. Biophys. Acta.*-1999.-Vol. 1423.-P. 1-10.
- Boland C.R., Thibodeau S.N., Hamilton S.R., et al. A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the

determination of microsatellite instability in colorectal cancer // *Cancer Res.*-1998.-Vol. 58.-P. 5248-5257.

- Bolzan A.D., Paez G.L., Bianchi M.S., Bianchi N.O. Analysis of telomeric repeats and telomerase activity in human colon carcinoma cells with gene amplification // *Cancer Genet. Cytogenet.*-2000.-Vol. 120.-P. 166-170.
- Bootsma D., Kraemer K.H., Cleaver J.E., Hoeijmakers J.H.J. Nucleotide excision repair syndromes: xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome, and trichothiodystrophy. In: Vogelstein, B., Kinzler, K.W. (Eds.) *The Genetic Basis of Human Cancer* // McGraw Hill, New York,-1998.-Chapter 13.-P. 245-274.
- Borner M.M., Joncourt F., Hotz M.A. Similarity of apoptosis induction by 2-chlorodeoxyadenosine and cisplatin in human mononuclear blood cells // *Br. J. Cancer.*-1997.-Vol. 76.-P. 1448-1454.
- Buschfort C., Muller M.R., Seeber S., et al. DNA excision repair profiles of normal and leukemic human lymphocytes: functional analysis at the single-cell level // *Cancer Res.*-1997.-Vol. 57.-P. 651-658.
- Cebulska-Wasilewska A. Response to challenging dose of X-rays as a predictive assay for molecular epidemiology // *Mutat. Res.*-2003.-Vol. 544.-P. 289-297.
- Chou K.-M., Cheng Y.-C. An nucleolytic activity of human apurinic/apyrimidinic endonuclease on 3' mispaired DNA // *Nature.*-2002.-Vol. 415.-P. 655-659.
- Claij N., Te Riele H. Methylation tolerance in mismatch repair proficient cells with low MSH2 protein level // *Oncogene.*-2002.-Vol. 21.-P. 2873-2879.
- Croitoru M.E., Cleary S.P., Di Nicola N., et al. Association between biallelic and monoallelic germline MYH gene mutations and colorectal cancer risk // *J. Natl. Cancer Inst.*-2004.-Vol. 96.-P. 1631-1634.

- Drummond J.T., Li G.M., Longley M.J., Modrich P. Isolation of an hMSH2-p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cells // *Science*.-1995.-Vol. 268.-P. 1909-1912.
- Duckett D.R., Bronstein S.M., Taya Y., Modrich P. hMutS α - and hMutL α -dependent phosphorylation of p53 in response to DNA methylator damage // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.-1999.-Vol. 96.-P. 12384–12388.
- Eger B.T., Benkovich S.J. Minimal kinetic mechanism for misincorporation by DNA polymerase I (Klenow fragment) // *Biochemistry*.-1992.-Vol. 31.-P. 9227-9236.
- Esteller M., Toyota M., Sanchez-Cespedes M., et al. Inactivation of the DNA repair genes O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis // *Cancer Res*.-2000.-Vol. 60.-P. 2368-2371.
- Fearnhead N.S., Britton M.P., Bodmer W.F. The ABC of APC // *Hum. Mol. Genet*.-2001.-Vol. 10.-P. 721-733.
- Fichtinger-Schepman A.M., van der Veer J.L., Den Hartog J.H., et al. Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation // *Biochemistry*.-1985.-Vol. 24.-P. 707-713.
- Fink D., Nebel S., Aebi S., et al. The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance // *Cancer Res*.-1996.-Vol. 56.-P. 4881-4886.
- Flores-Rozas H., Clark D., Kolodner R.D. Proliferating cell nuclear antigen and Msh2p-Msh6p interact to form an active mispair recognition complex // *Nat. Genet*.-2000.-Vol. 26.-P. 375-378.
- Friedberg E.C., Walker C., Siede W. DNA Repair and Mutagenesis // ASM Press, Washington DC.-1995.
- Ganguly A., Rock M.J., Prockop D.J. Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-

stranded PCR products and DNA fragments: evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*-1993.-Vol. 90.-P. 10325-10329.

- Genschel J., Littman S.J., Drummond J.T., Modrich P. Isolation of MutSbeta from human cells and comparison of the mismatch repair specificities of MutSbeta and MutSalpha // *J. Biol. Chem.*-1998.-Vol. 273.-P. 19895-19901.
- Goodman M.F., Cai H., Bloom L.B., Eritja R. Nucleotide insertion and primer extension at abasic template sites in different sequence contexts // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*-1994.-Vol. 726.-P. 132-142.
- Grady W.M. Genetic testing for high-risk colon cancer patients // *Gastroenterology.*-2003.-Vol. 124.-P. 1574-1594.
- Grombacher T., Kaina B. Isolation and analysis of inducibility of the rat N-methylpurine-DNA glycosylase promoter // *DNA Cell Biol.*-1996.-Vol. 15.-P. 581-588.
- Harrington J.J., Lieber M.R. The characterization of a mammalian DNA structure-specific endonuclease // *EMBO J.*-1994.-Vol. 13.-P. 1235-1246.
- Hare J.T., Taylor J.H. One role for DNA methylation in vertebrate cells is strand discrimination in mismatch repair // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*-1985.-Vol. 82.-P. 7350-7354.
- Heinstler J., Tanner B., Moller L., et al. Activity of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in relation to p53 status and therapeutic response in ovarian cancers // *Br. J. Cancer.*-1999.-Vol. 78.-P. 1128-1133.
- Hickman M.J., Samson L.D. Role of DNA mismatch repair and p53 in signaling induction of apoptosis by alkylating agents // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*-1999.-Vol. 96.-P. 10764-10769.

- Holley W.R., Chatterjee A. Clusters of DNA induced by ionizing radiation: formation of short DNA fragments. I. Theoretical modeling // *Radiat. Res.*-1996.-Vol. 145.-P. 188-199.
- Hollstein M., Rice K., Greenblatt M.S., et al. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell-lines // *Nucl. Acids Res.*-1994.-Vol. 22.-P. 3551-3555.
- Hotchkiss J.H. A review of current literature on N-nitroso compounds in foods // *Adv. Food Res.*-1987.-Vol. 31.-P. 53-115.
- Huang J.C., Sancar A. Determination of minimum substrate size for human excinuclease // *J. Biol. Chem.*-1994.-Vol. 269.-P. 19034-19040.
- Jackson P.E., Cooper D.P., O'Connor P.J., Povey A.C. The relationship between 1,2-dimethylhydrazine dose and the induction of colon tumours: tumour development in female SWR mice does not require a K-ras mutational event // *Carcinogenesis*.-1999.-Vol. 20.-P. 509-513.
- Jass J.R., Young J., Leggett B.A. Hyperplastic polyps and DNA microsatellite unstable cancers of the colorectum // *Histopathology*.-2000.-Vol. 37.-P. 295-301.
- Jiricny J. Colon cancer and DNA repair: have mismatches met their match? // *Trends Genet.*-1994.-Vol. 10.-P. 164-168.
- Jiricny J., Hughes M., Corman N., Rudkin B.B. A human 200-kDa protein binds selectively to DNA fragments containing G.T mismatches // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.-1988.-Vol. 85.-P. 8860-8864.
- Kaina B., Lohrer H., Karin M., Herrlich P. Overexpressed human metallothionein IIA gene protects Chinese hamster ovary cells from killing by alkylating agents // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.-1990.-Vol. 87.-P. 2710-2714.
- Kaina B., Fritz G., Coquerelle T. Contribution of O6-alkylguanine and N-alkylpurines to the formation of sister chromatid exchange, chromosomal

aberrations and gene mutations: new insights gained from studies of genetically engineered mammalian cell lines // *Envir. Mol. Mutagen.*-1993.-Vol. 22.-P. 283-292.

- Kaina B., Ziouta A., Ochs K., Coquerelle T. Chromosomal instability, reproductive cell death and apoptosis induced by O6-methylguanine in Mex-, Mex+ and methylation-tolerant mismatch repair compromised cells: facts and models // *Mutat. Res.*-1997.-Vol. 381.-P. 227-241.
- Kaina B., Ochs K., Grosch S., et al. BER, MGMT, and MMR in defense against alkylation-induced genotoxicity and apoptosis // *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*-2001.-Vol. 68.-P. 41-54.
- Kaina B., Christmann M. DNA repair in resistance to alkylating cancer drugs // *Int. J. Clin. Pharm. Ther.*-2002.-Vol. 40.-P. 354-367.
- Kaina B. DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling // *Biochem. Pharmacol.*-2003.-Vol. 66.-P. 1547-1554.
- Karpukhin A.V., Pospekhova N.I., Lubchenko L.N., et al. Frequencies of single-nucleotide polymorphisms and mutations in the BRCA1 gene in patients with hereditary breast or ovarian cancer // *Dokl. Biol. Sci.*-2002.-Vol. 383.-P. 144-146.
- Karran P., Hampson R. Genomic instability and tolerance to alkylating agents // *Cancer Surv.*-1996.-Vol. 28.-P. 69-85.
- Kat A., Thilly W.G., Fang W.H., et al. An alkylation-tolerant, mutator human cell line is deficient in strand-specific mismatch repair // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*-1993.-Vol. 90.-P. 6424-6428.
- Kleivi K., Teixeira M.R., Eknaes M., et al. Genome signatures of colon carcinoma cell lines // *Cancer Genet. Cytogenet.*-2004.-Vol. 155.-P. 119-131.

- Kolodner R.D., Hall N.R., Lipford J., et al. Structure of the human MSH2 locus and analysis of two Muir-Torre kindreds for msh2 mutations // Genomics.-1994.-Vol. 24.-P. 516-526.
- Kolodner R.D., Hall N.R., Lipford J., et al. Structure of the human MLH1 locus and analysis of a large hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma kindred for mlh1 mutations // Cancer Res.-1995.-Vol. 55.-P. 242-248.
- Konca K., Lankoff A., Banasik A., et al. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay // Mutat. Res.-2003.-Vol. 534.-P. 15-20.
- Loeb L.A. Microsatellite instability: marker of a mutator phenotype in cancer // Cancer Res.-1994.-Vol. 54.-P. 5059-5063.
- Lynch H.T., Lanspa S.J., Boman B.M., et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer -Lynch syndromes I and II // Gastroenterol. Clin. North Am.-1988.-Vol. 17.-P. 679-712.
- Ma H. and Lee H.M. Englander EWN-terminus of the rat adenine glycosylase MYH affects excision rates and processing of MYH-generated abasic sites // Nucleic Acids Res.-2004.-Vol. 32.-P. 4332-4339.
- Major G.N., Collier G.D. Repair of DNA lesion O6-methylguanine in hepatocellular carcinogenesis // J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.-1998.-Vol. 5.-P. 355-366.
- Margison G.P., Povey A.C., Kaina B., Santibanez Koref M.F. Variability and regulation of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase // Carcinogenesis.-2003.-Vol. 24.-P. 625-635.
- Masramon L., Ribas M., Cifuentes P., et al. Cytogenetic characterization of two colon cell lines by using conventional G-banding, comparative genomic hybridization, and whole chromosome painting // Cancer Genet. Cytogenet.-2000.-Vol. 121.-P. 17-21.

- McGlynn A.P., Wasson G.R., O'Reilly S., et al. Detection of replicated integrity in small colonic biopsies using the BrdUrd comet assay // Br. J. Cancer.-2003.-Vol. 88.-P. 895-901.
- Mehta R.G. Experimental basis for the prevention of breast cancer // Eur. J. Cancer.-2000.-Vol. 36.-P. 1275-1282.
- Meikrantz W., Bergom M.A., Memisoglu A., Samson L. O6-alkylguanine DNA lesions trigger apoptosis // Carcinogenesis.-1998.-Vol. 19.-P. 369-372.
- Mizumoto K., Farber J.I. Growth inhibition and cell killing by N-methyl-N-nitrosourea: metabolic alterations that accompany poly(ADP-ribosylation) // Arch. Biochem. Biophys.-1995.-Vol. 319.-P. 512-518.
- Modrich P. Mechanisms and biological effects of mismatch repair // Annu. Rev. Genet.-1991.-Vol. 25.-P. 229-253.
- Nicolaides N.C., Papadoulou N., Liu B., et al. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer // Nature.-1994.-Vol. 371.-P. 75-80.
- Ochs K., Kaina B. Apoptosis induced by DNA damage O6-methylguanine is BCL-2 and caspase-9/3 regulated and Fas/caspase-8 independent // Cancer Res.-2000.-Vol. 60.-P. 5815-5824.
- Olive P.L., Banath J.P., Durand R.E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay // Radiat. Res.-1990.-Vol. 122.-P. 86-94.
- Ostling O., Johanson K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells // Biochem. Biophys. Res. Commun.-1984.-Vol. 123.-P. 291-298.
- Ostling O., Johanson K.J. Bleomycin, in contrast to gamma irradiation, induces extreme variation of DNA strand breakage from cell to cell // Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.-1987.-Vol. 52.-P. 683-691.

- Palombo F., Gallinari P., Iaccarino I., et al. GTBP, a 160-kilodalton protein essential for mismatch-binding activity in human cells // *Science*.-1995.-Vol. 268.-P. 1912-1914.
- Parker A.R., O'Meally R.N., Oliver D.H., et al. 8-Hydroxyguanosine Repair Is Defective in Some Microsatellite Stable Colorectal Cancer Cells // *Cancer Res*.-2002.-Vol. 62.-P. 7230-7233.
- Parsons R., Li G.M., Longley M.J., et al. Hypermutable and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells // *Cell*.-1993.-Vol. 75.-P. 1227-1236.
- Parsons R., Li G.M., Longley M.J., et al. Mismatch repair deficiency in phenotypically normal human cells // *Science*.-1995.-Vol. 268.-P. 738-740.
- Partlin M.M., Homer E., Robinson H., et al. Interactions of the DNA mismatch repair proteins MLH1 and MSH2 with c-MYC and MAX // *Oncogene*.-2003.-Vol. 22.-P. 819-825.
- Payne C.M., Crowley C., Washo-Stultz D., et al. The stress-response proteins poly(ADP-ribose) polymerase and NF-kappaB protect against bile salt-induced apoptosis // *Cell Death Differ*.-1998.-Vol. 5.-P. 623-636.
- Pegg A.E., Byers T.L. Repair of DNA containing O6-alkylguanine // *FASEB J*.-1992.-Vol. 6.-P. 2302-2310.
- Pegg A.E., Dolan M.E., Moschel R.C. Structure, function, and inhibition of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase // *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol*.-1995.-Vol. 51.-P. 167-223.
- Peltomaki P. DNA mismatch repair and cancer // *Mutat. Res*.-2001.-Vol. 488.-P. 77-85.
- Povey A.C., Hall C.N., Badawi A.F., et al. Elevated levels of the pro-carcinogenic adduct, O(6)-methylguanine, in normal DNA from the cancer prone regions of the large bowel // *Gut*.-2000.-Vol. 47.-P. 362-365.

- Povey A.C., Badawi A.F., Cooper D.P., et al. DNA alkylation and repair in the large bowel: animal and human studies // J. Nutr.-2002.-Vol. 132.-P. 3518S-3521S.
- Preuss I., Eberhagen I., Haas S., et al. O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity in breast and brain tumors // Int. J. Cancer.-1995.-Vol. 61.-P. 321-326.
- Ramotar D. The apurinic-apyrimidinic endonuclease IV family of DNA repair enzymes // Biochem. Cell Biol.-1997.-Vol. 75.-P. 327-336.
- Randahl H., Elliott G.C., Linn S. DNA-repair reactions by purified HeLa DNA polymerases and exonucleases // J. Biol. Chem.-1988.-Vol. 263.-P. 12228-12234.
- Rasouli-Nia A., Sibghat-Ullah, Mirzayans R., et al. On the quantitative relationship between O6-methylguanine residues in genomic DNA and production of sister-chromatid exchanges, mutations and lethal events in a Mer- human tumor cell line // Mutat. Res.-1994.-Vol. 314.-P. 99-113.
- Sakumi K., Sekiguchi M. Structures and functions of DNA glycosylases // Mutat. Res.-1990.-Vol. 236.-P. 161-172.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual // Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, NY.-1989.
- Savio M., Stivala L.A., Bianchi L., et al. Involvement of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in DNA repair induced by alkylating agents and oxidative damage in human fibroblasts // Carcinogenesis.-1998.-Vol. 19.-P. 591-596.
- Schreiber V., Huntin D., Trucco C., et al. A dominant-negative mutant of human poly(ADP-ribose) polymerase affects cell recovery, apoptosis, and sister chromatid exchange following DNA damage // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.-1995.-Vol. 92.-P. 4753-4757.

- Seeberg E., Eide L., Bjoras M. The base excision repair pathway // Trends Biochem. Sci.-1995.-Vol. 20.-P. 391-397.
- Seigneur M., Bidnenko V., Ehrlich S.D., Michel B. RuvAB acts at arrested replication forks // Cell.-1998.-Vol. 95.-P. 419-430.
- Shivji K.K., Kenny M.K., Wood R.D. Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair // Cell.-1992.-Vol. 69.-P. 367-374.
- Sia E.A., Kokoska R.J., Dominska M., et al. Microsatellite instability in yeast: dependence on repeat unit size and DNA mismatch repair genes // Mol. Cell Biol.-1997.-Vol. 17.-P. 2851-2858.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells // Exp. Cell Res.-1988.-Vol. 175.-P. 184-191.
- Singh N.P. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis // Mutat. Res.-2000.-Vol. 455.-P. 111-127.
- Strauss B.S. The “A rule” of mutagen specificity: a consequence of DNA polymerase bypass of non-instructional lesions? // Bioessays.-1991.-Vol. 13.-P. 79-84.
- Svoboda D.L., Taylor J.S., Hearst J.E., Sancar A. DNA repair by eukaryotic nucleotide excision nuclease. Removal of thymine dimer and psoralen monoadduct by HeLa cell-free extract and of thymine dimer by *Xenopus laevis* oocytes // J. Biol. Chem.-1993.-Vol. 268.-P. 1931-1936.
- Tatsuka M., Ibeanu G.C., Izumi T., et al. Structural organization of the mouse DNA repair gene, N-methylpurine-DNA glycosylase // DNA Cell Biol.-1995.-Vol. 14.-P. 37-45.
- Thykjaer T., Christensen M., Clark A.B., et al. Functional analysis of the mismatch repair system in bladder cancer // Br. J. Cancer.-2001.-Vol. 85.-P. 568-575.

- Tsushimi T., Noshima S., Oga A., et al. DNA amplification and chromosomal translocations are accompanied by chromosomal instability: analysis of seven human colon cancer cell lines by comparative genomic hybridization and spectral karyotyping // *Cancer Genet. Cytogenet.*-2001.-Vol. 126.-P. 34-38.
- Vasen H.F.A., Meklin J.-P., Meera Khan P., et al. The International Collaborative Group on hereditary non-polyposis colorectal cancer // *Dis. Colon Rectum.*-1991.-Vol. 34.-P. 424-425.
- Vasen H.F.A., Watson P., Mecklin J.-P., et al. New clinical criteria for HNPCC (Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC // *Gastroenterology.*-1999.-Vol. 116.-P. 1453-1456.
- Veigl M.L., Kasturi L., Olechnowicz J., et al. Biallelic inactivation of *hMLH1* by epigenetic silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*-1998.-Vol. 95.-P. 8698-8702.
- Verma L., Kane M.F., Brassett C., et al. Mononucleotide microsatellite instability and germline MSH6 mutation analysis in early onset colorectal cancer // *J. Med. Genet.*-1999.-Vol. 36.-P. 678-682.
- Wang C.Y., Mayo M.W., Korneluk R.G., et al. NF-B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation // *Science.*-1998.-Vol. 281.-P. 1680-1683.
- Whitehall V.L., Walsh M.D., Young J., et al. Methylation of O-6-methylguanine DNA methyltransferase characterizes a subset of colorectal cancer with low-level DNA microsatellite instability // *Cancer Res.*-2001.-Vol. 61.-P. 827-830.
- Wildenberg J., Meselson M. Mismatch repair in heteroduplex DNA // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*-1975.-Vol. 72.-P. 2202-2206.

- Yang J., Liu X., Bhalla K., et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome C from mitochondria blocked // Science.-1997.-Vol. 275.-P. 1129-1132.
- Yu Z., Chen J., Ford B.N., et al. Human DNA repair systems: an overview // Environ Mol. Mutagen.-1999.-Vol. 33.-P. 3-20.
- Zhou Z.-Q., Manguino D., Kewitt K., et al. Spontaneous hepatocellular carcinoma is reduced in transgenic mice overexpressing human O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.-2001.-Vol. 98.-P. 12566-12571.