

СРАВНЕНИЕ ГЕНО- И ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТОВ МЕТИЛНИТРОЗОМОЧЕВИНЫ НА ЛИНИЯХ КЛЕТОК, ПРОФИЦИТНЫХ И ДЕФИЦИТНЫХ ПО КОРРЕКЦИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ДНК (MMR)

© В. А. Тронов,^{1,*} И. И. Крамаренко,¹ Т. Д. Смирнова,² С. М. Терехов²

¹ Институт химической физики РАН и ² Медико-генетический научный центр РАМН, Москва;
* электронный адрес: tronov@chph.ras.ru

Дефицит корректирующей репарации ДНК (MMR, mismatch repair) характерен для опухолей, образующих спектр рака толстого кишечника. В результате дефицита MMR в опухолевых клетках развиваются мутаторный фенотип и устойчивость к цитотоксическому действию алкилирующих агентов. При химическом метилировании ДНК образуется Об-метилгуанин (Об-mG) — модифицированное основание, ответственное на гено- и цитотоксический эффекты алкилирующих агентов. В основе механизма цитотоксического действия Об-mG лежат вторичные разрывы ДНК, которые формируются в ходе функционирования механизма MMR. Мы предположили, что количество вторичных двухнитевых разрывов ДНК (ДР) в ответ на действие монофункционального метилирующего агента может отражать эффективность функционирования системы MMR в клетке (Тронов и др., 2005). В настоящей работе исследовали формирование вторичных ДР после действия метилирующего агента метилнитрозомочевина (МНМ) на опухолевые клетки, различающиеся по состоянию системы MMR: HeLa (MMR-профицитные клетки карциномы эндометрия), НСТ116 (MMR-дефицитные колоректальные опухолевые клетки) и Colo320 (клетки опухоли сигмовидной кишки человека с неохарактеризованной системой MMR). Количество ДР определяли с помощью метода ДНК-комет в нейтральных условиях. Цитотоксический эффект оценивали по жизнеспособности (МТТ-тест) и по апоптотическому индексу (частоте морфологически различных апоптотических клеток в терминальной фазе). Показано, что цитотоксический эффект МНМ на клетках HeLa проявлялся на 3-и сут после действия агента. Раньше этого срока (через 48 ч) в клетках обнаруживали ДР. MMR-дефицитные клетки НСТ116 были устойчивы к МНМ: в них не возникали ДР и отсутствовал апоптоз в течение 72 ч после действия МНМ. Обе линии клеток проявляли высокую чувствительность к генотоксическому действию эпопозиды, классическому индуктору нерепарируемых ДР в ДНК. Эпопозид индуцировал в клетках ДР (через 6—12 ч) и последующий апоптоз (24 ч). По уровню МНМ-индуцированной гено- и цитотоксичности клетки Colo320 занимают промежуточное положение между MMR-профицитными клетками HeLa и MMR-дефицитными НСТ116. Вместе с тем по частоте апоптоза клетки Colo320 остаются устойчивыми к возникшим ДР. Таким образом, на трех линиях опухолевых клеток мы наблюдали прямую корреляцию между количеством вторичных ДР, возникших в пострепликативный период, и эффективностью системы MMR.

Ключевые слова: разрывы ДНК, коррекционная репарация, метилнитрозомочевина, апоптоз, рак толстого кишечника.

Принятые сокращения: ДР — двухнитевые разрывы, МНМ — метилнитрозомочевина, МСН — микросателлитная нестабильность, МGMT — метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза, MMR (mismatch repair) — коррекция неспаренных оснований, РТК — рак толстого кишечника, Об-bzG — Об-бензилгуанин, Об-mG — Об-метилгуанин.

Многие механизмы репарации ДНК (прямое восстановление поврежденных оснований, репарация разрывов, эксцизионная репарация оснований и нуклеотидов) способствуют выживаемости клеток. В конечном счете на это направлены и механизмы коррекционной репарации ДНК, исправляющий некорректные пары оснований (mismatch repair, MMR) (Aquilina, Bignami, 2001; Marti et al., 2002). В связи с этой парадигмой вовлечение механизма MMR в гибель клеток, индуцированную рядом генотоксических воздействий, кажется парадоксальным (Tronov, Konstantinov, 2000). Тем не менее все более очевидно, что активно функционирующий механизм MMR

необходим для реализации летального эффекта определенных повреждений ДНК. Более того, инактивация MMR приводит к тому, что клетки приобретают устойчивость к цитотоксическому действию агентов, вызывающих образование этих повреждений. Такая устойчивость является альтернативой репарационной стратегии выживания. В ней повреждение не удаляется из ДНК, но и не приводит к гибели клетки. Чаще всего эта стратегия реализуется в опухолевых клетках (Fink et al., 1998).

Известно, что многие опухоли, образующие так называемый спектр рака толстого кишечника (РТК), характеризуются дефектной MMR (Тронов и др., 2005). Де-

фекты MMR обнаруживаются в виде мутаций в генах системы MMR и(или) микросателлитной нестабильности генома (МСН). Как следствие дефицита MMR в опухолевых клетках формируются мутаторный фенотип и устойчивость к цитотоксическому действию алкилирующих/метилирующих агентов (Aquilina et al., 2000). Главным модифицированным основанием, ответственным за гено- и цитотоксический эффекты при химическом метилировании ДНК, является Об-метилгуанин (Об-mG) (Kaina et al., 1993). В основе механизма цитотоксического действия Об-mG лежат вторичные разрывы ДНК, которые формируются в ходе функционирования системы MMR (Kaina, 2003).

Ранее мы предположили, что количество вторичных двухнитевых разрывов (ДР) ДНК в ответ на действие монофункционального метилирующего агента может отражать эффективность функционирования системы MMR в клетке (Тронов и др., 2005). Цель работы состояла в экспериментальной проверке этого предположения на опухолевых клетках человека. Для этого исследовали формирование вторичных ДР после действия метилирующего агента метилнитрозомочевина (МНМ) на опухолевые клетки, различающиеся по состоянию системы MMR: HeLa (MMR-профицитные клетки карциномы эндометрия), НСТ116 (MMR-дефицитные колоректальные опухолевые клетки) и Colo320 (клетки опухоли сигмовидной кишки человека с неохарактеризованной системой MMR). Количество ДР определяли с помощью метода ДНК-комет в нейтральных условиях. Исследования проводили на фоне подавления активности метилгуанин-трансферазы, осуществляющей прямое деметилирование гуанина. В качестве ингибитора использовали Об-бензилгуанин (Об-bzG) (Kidney, Faustman, 1995). Цитотоксический эффект оценивали по жизнеспособности (МТТ-тест) и по апоптотическому индексу (частоте морфологически различимых апоптотических клеток в терминальной фазе).

Результаты, полученные на клетках HeLa и НСТ116, подтверждают наше предположение о связи уровня вторичных ДР, индуцированных метилирующим агентом МНМ, с уровнем функциональной активности системы MMR в опухолевых клетках человека. Показано, что клетки Colo320 характеризуются промежуточной чувствительностью к МНМ (между линиями HeLa и НСТ116) по количеству индуцированных вторичных ДР в ДНК. Однако в клетках Colo320 в отличие от двух других исследованных линий эти ДР не индуцировали апоптоз. Отсутствие апоптоза подтверждено морфологически и по отсутствию гиподиплоидных клеток на гистограммах распределения по содержанию ДНК в клетках. Таким образом, на трех линиях опухолевых клеток человека продемонстрирована корреляция количества вторичных ДР в клетках, индуцированных в ответ на действие МНМ, с эффективностью MMR в этих клетках. Это позволяет положительно оценивать перспективу использования данного параметра как прогностического показателя.

Материал и методика

Исследования проводили на трех линиях опухолевых клеток человека: MMR-профицитных клетках HeLa (карцинома эндометрия), MMR-дефицитных клетках НСТ116 (клетки карциномы толстого кишечника, в которых произошла делеция в 255-м кодоне гена *hMLH1*, при-

ведшая к полной инактивации белка; Parsons et al., 1993) и на клетках карциномы сигмовидной кишки человека Colo320, не охарактеризованных по состоянию генов системы MMR. Клетки HeLa и Colo320 были получены из Банка клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург), клетки НСТ116 предоставлены проф. Г. Н. Селивановой (Каролевский раковый институт, Стокгольм). Клетки культивировали в среде DMEM, содержащей глютамин, 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотиков, в атмосфере 5 % CO₂ при 37° С. МНМ синтезировали в ИХФ РАН и в кристаллическом виде хранили при 4° С. МНМ-обработку проводили через 24 ч после посева 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 Об-bzG (Sigma, США) — конкурентный ингибитор метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы, который вносили в культуру за 1 ч до добавления МНМ. Цитотоксический эффект оценивали по жизнеспособности с помощью МТТ-теста и апоптотического индекса. Использовали 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (МТТ) фирмы R&D Systems (США). МТТ-тест проводили, используя 96-луночные планшеты, согласно протоколу фирмы (www/RnDSYSTEMS.com/pdf/ta5355.pdf). Оптическую плотность регистрировали при 594 нм с помощью фотометра иммуноферментного планшетного ЭФОС 9305 (Россия). Апоптотический индекс определяли как частоту клеток с апоптотической морфологией ядра. Морфологические изменения прослеживали во флуоресцентном микроскопе после окрашивания клеток смесью красителей акридинового оранжевого и бромистого этидия, руководствуясь протоколом фирмы Merk Biosciences (Calbiochem, Швейцария). К апоптотическим относили клетки, в которых хроматин был конденсирован в высокой степени, так что в нем не прослеживали какой-либо структурной гетерогенности. Коллапсированный хроматин приобретал форму кольца, полумесяца, шара или виноградной грозди. Зеленая окраска свидетельствовала о целостности клеточных мембран. Клетки с проницаемой мембраной окрашивались в желтый или оранжевый цвет. Клетки с интактной структурой хроматина, окрашенные в желтый или оранжевый цвета, считали некротическими. В отдельных экспериментах определяли численность клеточной популяции, подсчитывая клетки в 20—50 цифровых микрофотографиях, выполненных в проходящем свете.

Генотоксический эффект оценивали по количеству ДР в геноме, определяемому с помощью метода нейтральных ДНК-комет (Singh, 2000). Суспензию клеток в PBS ($1 \cdot 10^5$ — $3 \cdot 10^5$ кл/мл) смешивали с равным объемом 1.5 %-ного раствора Low melting agarose, type IV (Sigma, США); смесь наносили на предметное стекло, которое ранее было покрыто тонким слоем 1 %-ной агарозы. Смесь 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 % Тритона X-100 и 10 % DMSO, pH 10). После лизиса клеток (в течение 12—24 ч при 4° С) слайды помещали в камеру для горизонтального электрофореза, заполненную ТАЕ-буфером, pH 8. Электрофорез проводили спустя 30 мин при 15 В/см в течение 45 мин при 4° С. По за-

вершении электрофореза слайды помещали на 10 мин в 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. Слайды дегидратировали в метаноле, подсушивали, окрашивали раствором иодистого пропидия в антифейде (5 мкг/мл, 50 мкл на 1 слайд), накрывали покровным стеклом (24 × 24 мм) и микроскопировали при длинах волн возбуждения и регистрации соответственно 490 и 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. Регистрируемые параметры ДНК-комет предварительно были прокалиброваны по количеству ДР, индуцированных в геноме покоящихся лимфоцитов человека после их гамма-облучения (Co-60) в известных дозах. Скорость образования ДР при гамма-облучении клеток была принята постоянной в диапазоне доз 0–60 Гр и равной 50 ДР на диплоидный геном после гамма-облучения в дозе 1 Гр (Holley, Chatterjee, 1996). Количество разрывов приводится в расчете на диплоидный геном лимфоцитов человека.

Результаты

Согласно сложившимся представлениям, клетки с нормальной системой MMR наиболее чувствительны к алкилирующим агентам. Поэтому условия инкубации клеток, концентрации МНМ и ингибитора метилтрансферазы О6-бзГ были нами отработаны на клетках HeLa. На рис. 1 представлены цитотоксический эффект МНМ в различных концентрациях спустя 3 сут после добавления агента в ростовую среду и влияние на него О6-бзГ. 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 увеличением концентрации МНМ (> 450 мкМ). О6-бзГ усиливает токсическое действие МНМ, снижая более чем в 2 раза ингибирующую дозу агента (ID₅₀) с 1000 до 450 мкМ. Сенсибилизирующий эффект О6-бзГ обнаруживается во всем диапазоне концентраций МНМ (от 10 мкМ до 1 мМ). Однако увеличение концентрации О6-бзГ до 20 мкМ не сопровождается возрастанием токсического эффекта МНМ. Сам О6-бзГ не обладал цитотоксичностью в пределах используемых концентраций (данные не приводятся). Эти результаты позволили нам выбрать концентрации МНМ (250 мкМ) и О6-бзГ (20 мкМ) в качестве рабочих, используя которые мы сравнивали цитотоксический эффект МНМ на клетках HeLa и НСТ116, имеющих различный MMR-статус.

Влияние МНМ на опухолевые клетки HeLa и НСТ116. На рис. 2, а, в показана динамика жизнеспособности клеток HeLa и НСТ116 в течение 3 сут после внесения в ростовую среду 250 мкМ МНМ. Отметим два существенных факта: 1) цитотоксический эффект МНМ обнаруживается только на 3-и сут и только на MMR-полноценных клетках HeLa; 2) клетки НСТ116, дефицитные по MMR, устойчивы к воздействию МНМ (рис. 2, в). Цитотоксичность МНМ в отношении клеток HeLa выражается в апоптотической гибели клеток, обнаруживаемой тоже на 3-и сут (рис. 2, б). На клетках НСТ116 в отличие от клеток HeLa не обнаружено цитотоксиче-

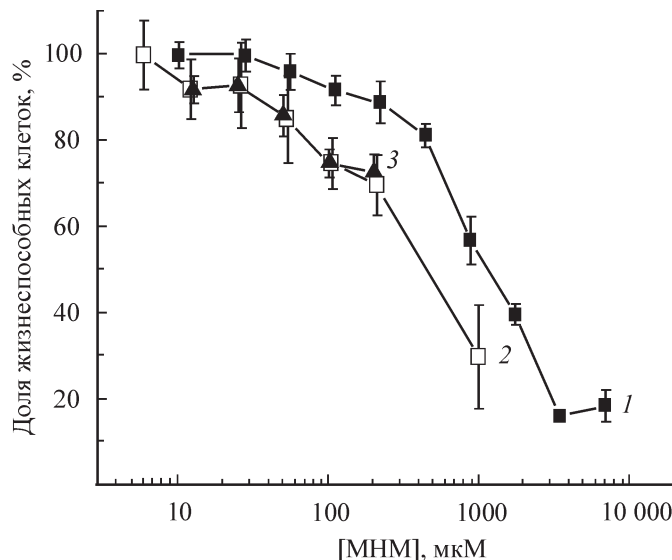


Рис. 1. Токсическое действие метилнитрозомочевины (МНМ) на клетки HeLa по данным МТТ-теста спустя 72 ч после пульс-обработки клеток МНМ в различных концентрациях.

1 — МНМ; 2, 3 — совместное действие МНМ и О6-бензилгуанина (О6-бзГ) в концентрации 10 (2) или 20 (3) 20 мкМ.

Fig. 1. Cytotoxic effect of MNM on HeLa cells from data of MTT-test, 72 h after pulse-processing with different concentrations.

1 — MNM, 2 — MNM + O6-bzG (10 μM), 3 — MNM + O6-bzG (20 μM).

ского действия агента ни по ММТ-тесту (рис. 2, в), ни по картине апоптоза в течение 3 сут после воздействия (рис. 2, з). Во всех экспериментах в инкубационной среде присутствовал ингибитор метилтрансферазы О6-бзГ (20 мкМ).

Генотоксический ответ клеток HeLa и НСТ116 принципиально различен. Как видно на рис. 3, а, образование разрывов в геноме клеток HeLa наблюдается спустя 48 ч после добавления МНМ к клеткам (250 мкМ). Числа разрывов ДНК через 72 и 48 ч не различаются. К этому времени значительная часть клеток HeLa (30 %) проявляла морфологические признаки гибели (рис. 2, б), характерные для терминальной фазы апоптоза. На этой стадии происходят также деградация ДНК и лизис части клеток (рис. 5, в, з). Устойчивость клеток НСТ116 к цитотоксическому действию МНМ коррелирует с отсутствием в ДНК этих клеток ДР (рис. 3, б). При этом обе линии клеток остаются чувствительными к генотоксическому действию индуктора ДР в ДНК этопозиду (рис. 4). Как видно, этопозид индуцирует разрывы в ДНК через несколько часов после добавления его к клеткам. Поэтому его цитотоксическое действие проявляется в более ранние сроки (24 ч), чем действие МНМ. Апоптотический индекс клеток обеих линий к этому времени составляет примерно 40 %. Во всех случаях апоптоз подтверждался также возрастанием доли гиподиплоидных клеток, которые регистрировали по снижению флуоресценции ДНК-комет (рис. 5, а, в). Изучение эффекта этопозид показывает, что ДР в клетках обеих исследованных линий запускают 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 ее распада) ассоциирован также с отсроченным появлением ДР в геноме (через 48 ч после внесе-

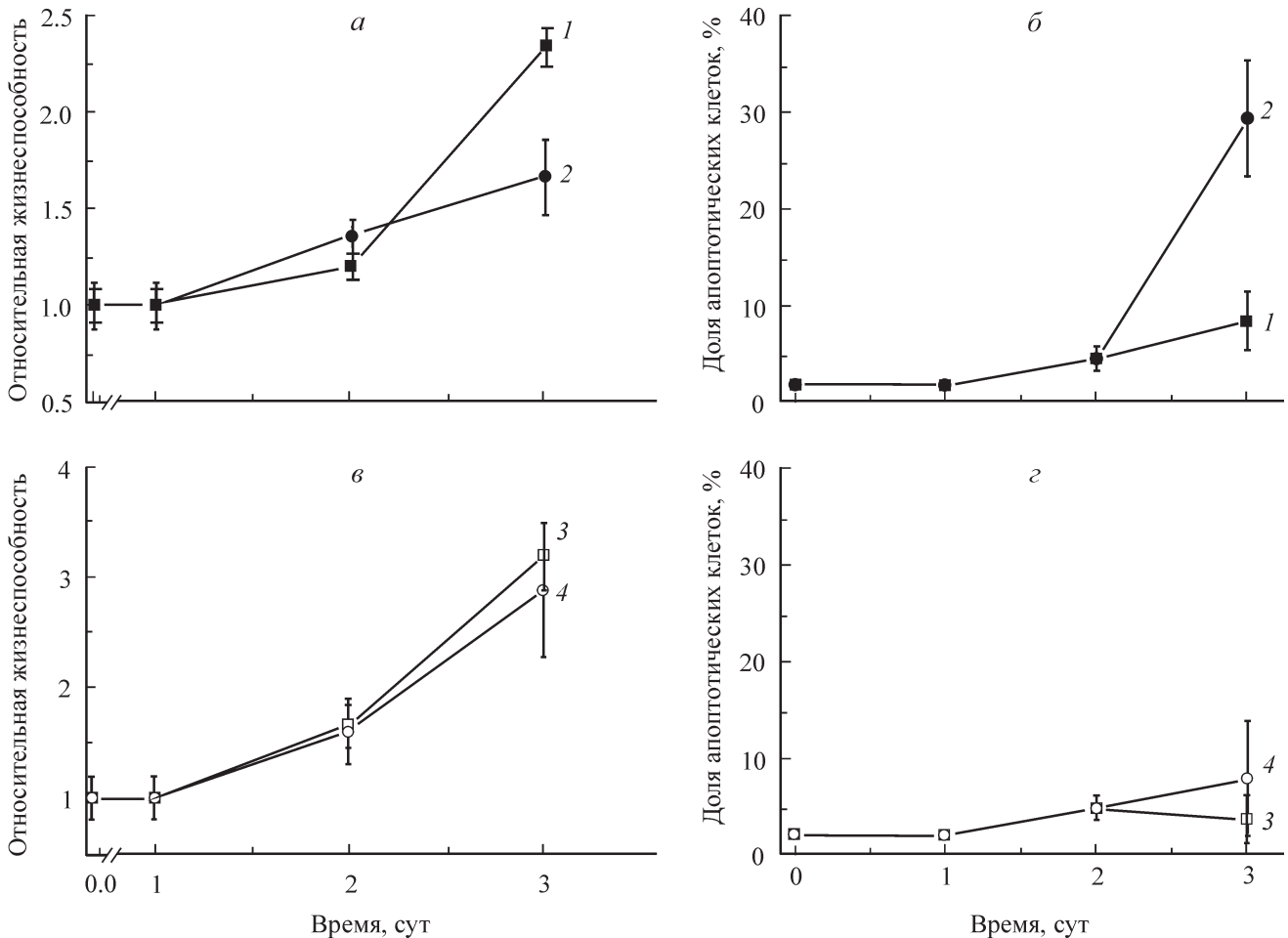


Рис. 2. Изменения во времени жизнеспособности клеток, оцененной с помощью МТТ-теста (а, в), и апоптотического индекса (б, г).

а, б — клетки HeLa; в, г — клетки HCT116. 1, 3 — интактные клетки; 2, 4 — клетки, обработанные 250 мкМ МНМ в присутствии 20 мкМ О6-bzG.

Fig. 2. Quantitative in viability time of cells (MTT-test; а, в), and of apoptotic index (б, г) of intact cells (1, 3) and cells cultivated with MNM, 250 μM + O6-bzG, 20 μM (2, 4).

а, б — HeLa cells; в, г — HCT116 cells.

ния агента в среду). К этому времени клетки проходят более 1 цикла, о чем говорят данные МТТ-теста (рис. 2, а), а также более чем двукратное увеличение числа клеток в культуре. Тем не менее образование ДР предшествует апоптотической гибели клеток HeLa (рис. 2, б). Это позволяет связать ДР и МНМ-индуцированный апоптоз клеток HeLa как причину и следствие. В клетках HCT116, дефицитных по MMR, как видно, не возникают ДР в течение 72 ч после добавления метилирующего агента и не развивается апоптоз в ответ на действие МНМ (рис. 2, в).

Цито- и генотоксические эффекты МНМ на клетках Colo320. В отличие от клеток HCT116, являющихся почти диплоидными (Masgron et al., 2000), клетки аденокарциномы толстого кишечника Colo320 характеризуются высокой хромосомной нестабильностью и имеют анеуплоидный кариотип (Tsushimi et al., 2001). Сравнительно недавно в них продемонстрирована микросателлитная нестабильность (Kleivi et al., 2004). В совокупности эти данные позволяют ожидать в клетках Colo320 дефицита репаративной системы MMR. На рис. 6 показано цитотоксическое действие МНМ на клет-

ки Colo320. МНМ (250 мкМ) значительно снижает МТТ-показатель жизнеспособности клеток на 3-и сут после начала воздействия (рис. 6, а). Этот ответ клеток Colo320 совпадает с таковым клеток HeLa (рис. 2, а). В то же время уровень гибели клеток Colo320 в результате такой обработки слабо превышает таковой в контроле (рис. 6, б). Это говорит о том, что в данном случае снижение МТТ-показателя отражает скорее всего не гибель, а снижение скорости пролиферации клеток Colo320 в ответ на действие МНМ. Тем не менее в клетках индуцируется заметное количество ДР в ДНК (рис. 6, в). Таким образом, МНМ оказывает гено- и цитотоксическое действие на клетки Colo320, однако оно не сопровождается адекватным возрастанием частоты апоптотической гибели. Этот вывод подтверждается сравнением гистограмм распределения клеток по содержанию ДНК для контрольной популяции и популяции, обработанной МНМ, спустя 72 ч после обработки клеток (рис. 6, г, д). Хотя гистограммы распределения значительно различаются между собой, очевидно, что МНМ-обработка клеток Colo320 не приводит к образованию в них гиподиплоидных клеток, характерных для апоптоза (рис. 5, в).

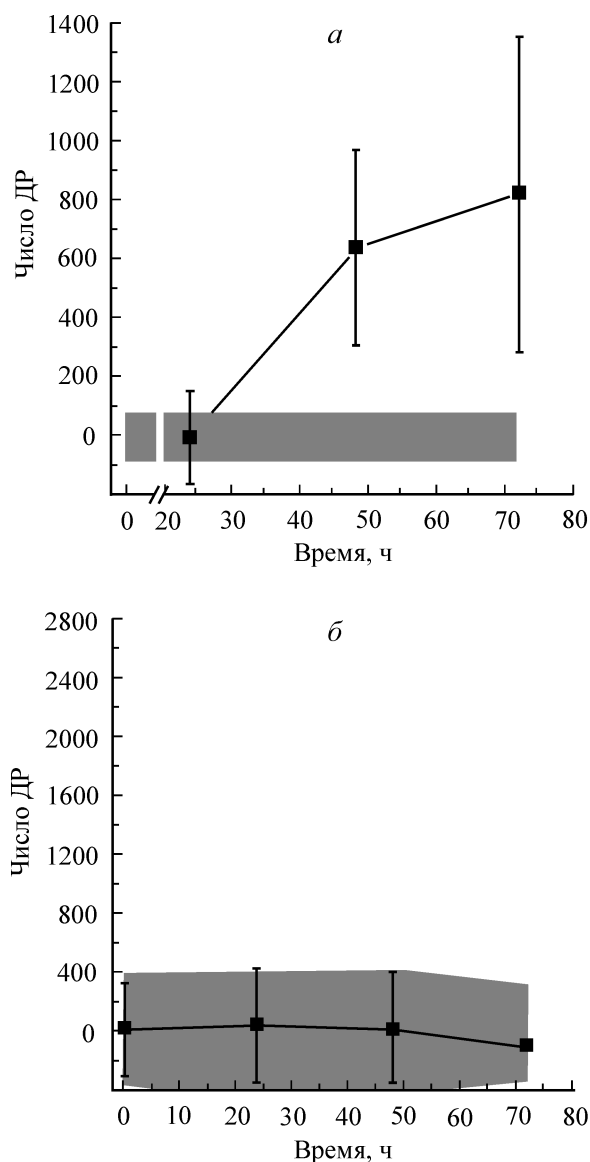


Рис. 3. Динамика накопления двухнитевых разрывов ДНК в клетках HeLa (а) и HCT116 (б) после обработки клеток МНМ (250 мкМ) и О6-bzG (20 мкМ).

Заштрихованные области — средние значения и их стандартные отклонения в контроле.

Fig. 3. Dynamics of DSB accumulation in HeLa (a) and HCT116 (b) cells after processing with MNM (250 μ M) and O6-bzG (20 μ M).

Cross-hatched region — scheduled figures \pm SD.

Обсуждение

МНМ — монофункциональный алкилирующий агент, используемый в химиотерапии опухолей (Mehta, 2000; Дементьева, Корман, 2001; Горбачева, 2003). Цитотоксичность МНМ выражается двояко: в клеточной гибели и в подавлении роста клеток. Гибель клеток СНО индуцируется при концентрациях МНМ выше 5 мМ и наблюдается через 24 ч после добавления МНМ в культуру (Mizumoto, Farber, 1995). Сигналом, запускающим клеточную гибель, было снижение уровней НАД и АТФ в клетках. Дорепликативная эксцизионная репарация ис-

тощала энергетику клетки и приводила ее к некрозу, а ингибиторы репарации защищали клетки от токсического действия МНМ (Buschfort et al., 1997). Подавление роста клеток при действии МНМ наблюдалось при низких (терапевтических) концентрациях агента (< 5 мМ) и в более поздние сроки (более чем через 2 цикла репликации). Эта цитотоксичность определялась степенью алкилирования гуанина и способностью клеток к его репарации, т. е. активностью MGMT (Mizumoto, Farber, 1995). Данный механизм цитотоксичности МНМ являлся предметом наших исследований и определил выбор действующих концентраций агента (менее 1 мМ) и времени наблюдения эффекта (более 48 ч).

Наблюдаемое снижение жизнеспособности клеток HeLa в результате действия МНМ может быть связано как со снижением метаболической активности клеток,

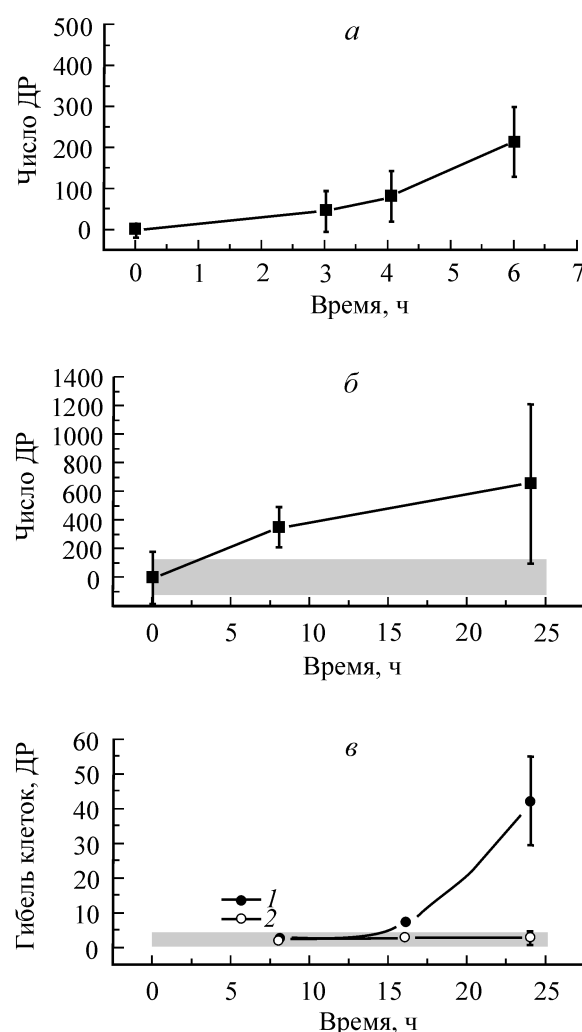


Рис. 4. Индукция этопозидом двухнитевых разрывов ДНК в клетках HeLa (а) и HCT116 (б) и последующая гибель клеток HCT116 (в).

1 — доля апоптотических клеток, 2 — доля некротических клеток. Заштрихованные области — средние значения в контроле и их стандартные отклонения.

Fig. 4. Etoposid induction of DSB in HeLa (a) and HCT116 (b) cells, and the following death of these cells (b, c).

Parts of apoptotic (1) and necrotic (2) cells for HCT116. Cross-hatched region — changes in control \pm SD.

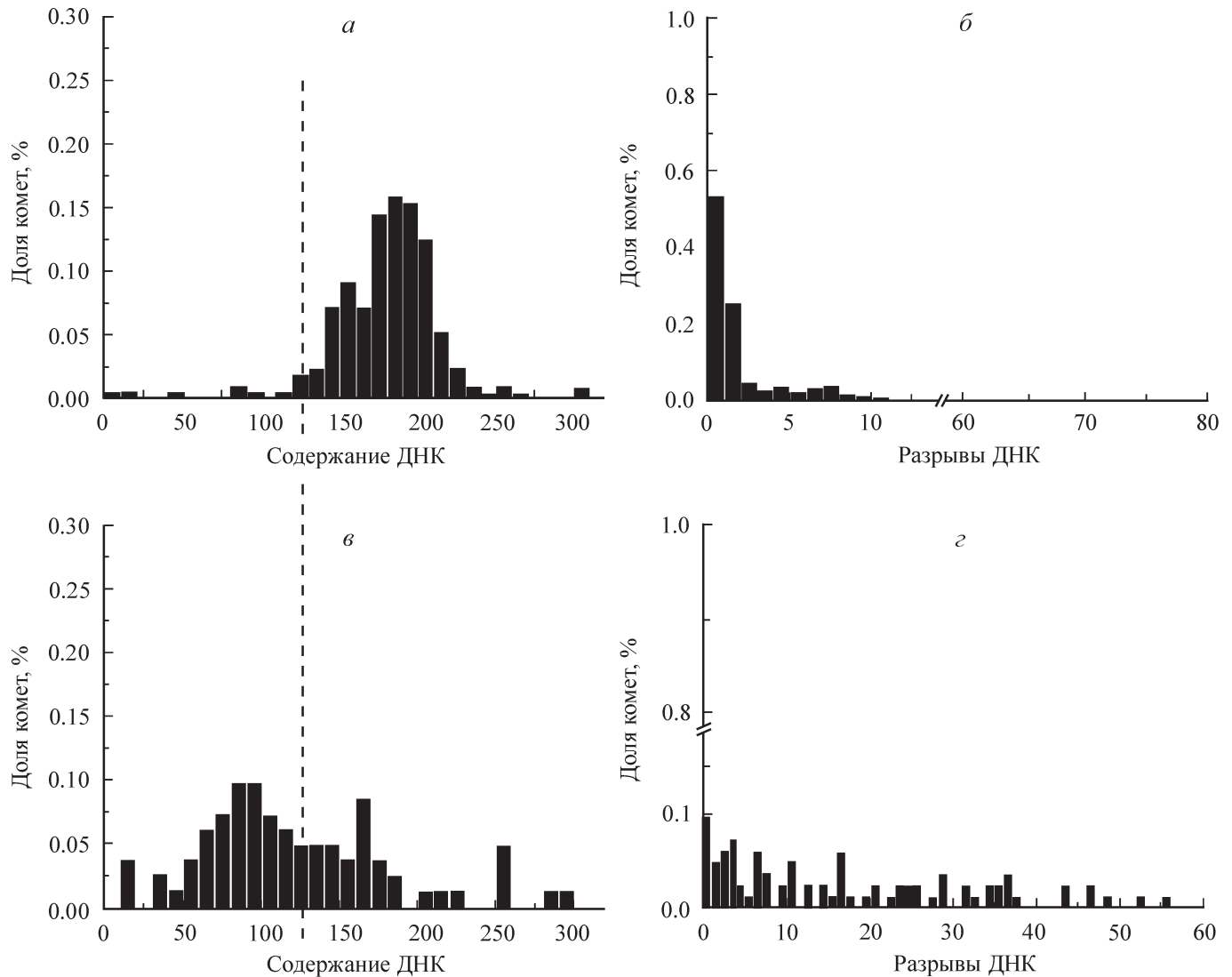


Рис. 5. Гистограммы распределения ДНК-комет по содержанию ДНК и числу двухнитевых разрывов, получаемых из интактных клеток HeLa (*a*, *б*) и апоптотических клеток после обработки их MNM (*в*, *г*).

Штриховая линия — верхняя граница гиподиплоидных клеток на гистограммах.

Fig. 5. Histograms of DNA-comet distribution derivable from intact HeLa (*a*, *б*) cells and apoptotic cells after processing with MNM (*в*, *г*).

Dotted line — upper limits of hypodiploid cells on histogram.

так и с задержкой пролиферации в сверхчных точках клеточного цикла. Такая задержка неизбежна и необходима для репарации повреждений в ответ на возникший стресс. Если репарация невозможна или затруднена, то активируется цепь реакций, завершающаяся апоптозом. Сравнение динамики жизнеспособности клеток (рис. 2, *a*), а также оценка численности клеток HeLa свидетельствуют о том, что в течение первых 48 ч заметной задержки деления клеток, обработанных MNM, не происходит. Расхождение кривых для интактных и обработанных MNM клеток наблюдается позже. Кривые, описывающие динамику апоптоза этих клеток, имеют аналогичный ход (рис. 2, *б*). Это говорит о том, что цитотоксический эффект MNM на клетках HeLa обусловлен главным образом их апоптотической гибелью. Апоптозу предшествует процесс, формирующий ДР в клетках, обработанных MNM (рис. 3, *a*). 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 (base excision repair) и NER (nucleotide excision repair), поскольку они, скорее всего, осуществляют свою функцию в дорепликативный период и оперируют с такими модификациями оснований, которые препятствуют нормальному ходу репликации. В случае действия MNM таковыми являются в основном N-метилированные основания (Tatsuka et al., 1995; Grombacher, Kaina, 1996). Отсроченность появления «пострепликативных» ДР от момента обработки клеток MNM можно принять как аргумент в пользу того, что образование ДР не является результатом прямого взаимодействия MNM с ДНК.

Таким образом, полученные нами результаты говорят в пользу того, что ДР формируются в ходе функционирования пострепликативной коррекции MMR. Важ-

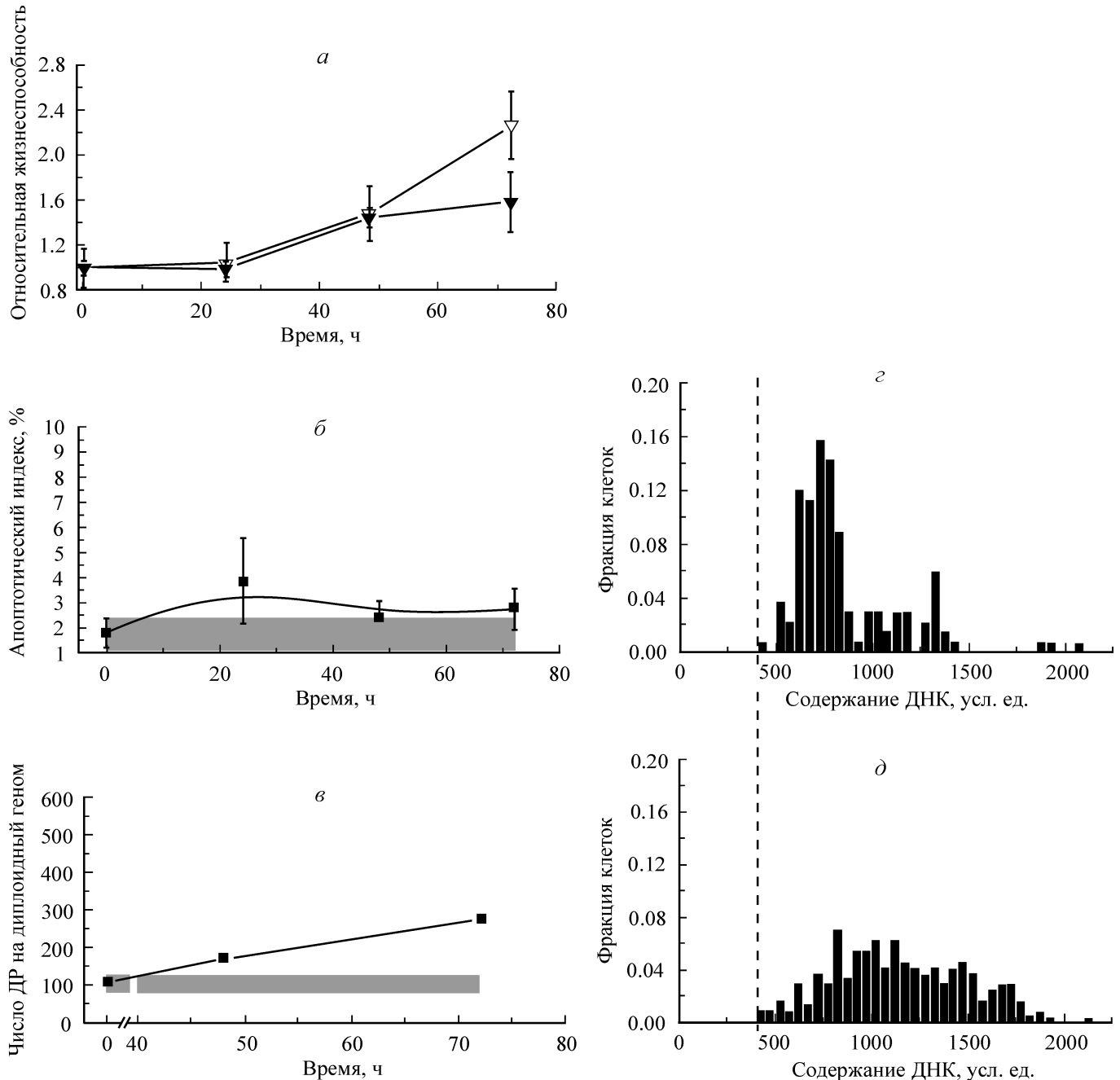


Рис. 6. Совместное цито- и генотоксическое действие 250 мкМ МНМ и 20 мкМ О6-bzG на клетки Colo320.

a — динамика жизнеспособности клеток по результатам МТТ-теста; *b* — изменение апоптотического индекса клеток; *c* — динамика двухнитевых разрывов ДНК в клетках; *заштрихованные области* — диапазон изменений в контроле. *з, д* — распределения клеток по содержанию ДНК в интактных клетках и в клетках через 72 ч после обработки МНМ соответственно; *штриховая линия* — то же, что и на рис. 5.

Fig. 6. Cyto- and genotoxic effect of MNM (250 μ M + 20 μ M O6-bzG) on Colo320 cells.

a — dynamics of DNA double breaks in cells; *b* — apoptotic index (percent of apoptotic cells); *c* — number of DNA double strand breaks. *Cross-hatched regions* — size of changes in control. *z, d* — cell distribution by DNA content in intact and MNM processed cells 72 h after manipulation.

ным повреждением ДНК, возникающим при действии МНМ, является О6-мГ (Bignami et al., 2000). О6-мГ не может быть репарирован механизмом BER, поскольку он не узнается ни одной из известных ДНК-гликозилаз. В связи с отсутствием в клетке О-специфичных алкилгликозилаз репарация О6-мГ может осуществляться главным образом прямым деметилированием метилтрансферазой (Pegg, Wyers, 1992). При подавлении ее актив-

ности ингибитором О6-bzG клетки, содержащие в геноме О6-мГ, вступают в цикл. При этом О6-мГ 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 четырех оснований ДНК. Формируются некорректные пары О6-мГ/С и О6-мГ/Т, являющиеся субстратом для MMR. Безуспешные циклы эксцизия—ресинтез во время коррекции

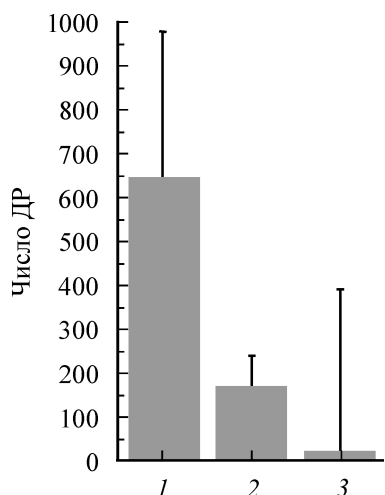


Рис. 7. Число вторичных двухнитевых разрывов ДНК, индуцированных через 48 ч после обработки клеток МНМ.

Клетки: 1 — HeLa, 2 — Colo320, 3 — HCT116.

Fig. 7. Number of DSB, induced 48 h after MNM processing of HeLa (1), Colo320 (2), and HCT116 (3) cells.

онной репарации приводят к появлению ДР в области, прилегающей к O6-mG. Вероятность такой трансформации безразрывного дефекта O6-mG 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.

Наши результаты показывают, что в отличие от HeLa MMR-дефицитные клетки HCT116 устойчивы к МНМ по всем использованным нами показателям гено- и цитотоксичности (рис. 2, в, г; 3, б). Исследования с этопозидом свидетельствуют о том, что эта устойчивость, по-видимому, связана не с пониженной способностью клеток HCT116 к апоптозу вообще. Их чувствительность к этопозиду и к ДР, индуцированным агентом, примерно такая же, как и у MMR-полноценных клеток HeLa (рис. 4).

Приведенные ранее литературные данные о генетической нестабильности клеток Colo320 указывают на то, что в них может быть понижена активность MMR. Однако подобно MMR-профицитным клеткам HeLa, клетки Colo320 снижали свою жизнеспособность и накапливали разрывы в ДНК в ответ на МНМ-воздействие (рис. 6, а, в). С другой стороны, образовавшиеся разрывы не индуцировали в клетках Colo320 увеличения частоты апоптоза (рис. 6, б, г, д). У многих опухолевых клеток существует механизм (один из нескольких), позволяющий им избежать апоптоза. Таким механизмом могут быть повышенная экспрессия транскрипционного фактора NFKB, обладающего антиапоптотической активностью (Paune et al., 1998), повышенная экспрессия белка bcl-2, защищающего митохондрии (Yang et al., 1997), повышенная экспрессия ингибиторов каспаз (Wang et al., 1998) или 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 исследования клеток Colo320.

Рис. 7 представляет итог проведенной работы — количество вторичных разрывов, образовавшихся спустя 48 ч после МНМ-обработки трех линий опухолевых клеток с различным MMR-статусом. Этот результат является количественной презентацией функциональной активности системы коррекционной репарации в этих клетках.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 04-04-48453).

Список литературы

- Горбачева Л. Б. 2003. Молекулярные механизмы резистентности N-алкил-N-нитрозомочевина. Биол. мембраны. 20 (2) : 256—264.
- Дементьева Н. П., Корман Д. Б. 2001. Нитрозометилочевина — 30 лет изучения и применения для лечения онкологических больных. Вопр. онкол. 47 (6) : 655—661.
- Тронов В. А., Крамаренко И. И., Карпухин А. В. 2005. Рак толстого кишечника: дефицит репарации, нестабильность генома, устойчивость к апоптозу, оценка риска заболевания. Вопр. онкол. 51 (2) : 159—166.
- Aquilina G., Bignami M. 2001. Mismatch repair in correction of replication errors and processing of DNA damage. J. Cell. Physiol. 187 : 145—154.
- Aquilina G., Ceccotti S., Martinelli S., Soddu S., Crescenzi M., Branch P., Karran P., Bignami M. 2000. Mismatch repair and p53 independently affect sensitivity to N-(2-chloroethyl)-N*-cyclohexyl-N-nitrosourea. Clin. Cancer Res. 6 : 671—680.
- Bellocosa A., Cicchillitti L., Schepis F., Riccio A., Yeung A. T., Matsumoto Y., Golemis E. A., Genuardi M., Neri G. 1999. MED1, a novel human methyl-CpG-binding endonuclease, interacts with DNA mismatch repair protein MLH1. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 96 : 3969—3974.
- Bignami M., O'Driscoll M., Aquilina G., Karran P. 2000. Unmasking a killer: DNA O6-methylguanine and the cytotoxicity of methylating agents. Mutat. Res. 462 : 71—82.
- Buschfort C., Muller M. R., Seeber S., Rajewsky M. F., Thoma-le J. 1997. DNA excision repair profiles of normal and leukemic human lymphocytes: functional analysis at the single-cell level. Cancer Res. 57 : 651—658.
- Fink D., Aebi S., Howell S. B. 1998. The role of DNA mismatch repair in drug resistance. Clin. Cancer Res. 4 : 1—6.
- Grombacher T., Kaina B. 1996. Isolation and analysis of inducibility of the rat N-methylpurine-DNA glycosylase promoter. DNA Cell Biol. 15 : 581—588.
- Holley W. R., Chatterjee A. 1996. Clusters of DNA induced by ionizing radiation: formation of short DNA fragments. I. Theoretical modeling. Radiat. Res. 145 : 188—199.
- Hollstein M., Rice K., Greenblatt M. S., Soussi T., Fuchs R., Sorlie T., Hovig E., Smithsorensen B., Montesano R., Harris C. C. 1994. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell-lines. Nucl. Acids Res. 22 : 3551—3555.
- Kaina B. 2003. DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling. Biochem. Pharmacol. 66 : 1547—1554.
- Kaina B., Fritz G., Coquerelle T. 1993. Contribution of O6-alkylguanine and N-alkylpurines to the formation of sister chromatid exchanges, chromosomal aberrations, and gene mutations: new insights gained from studies of genetically engineered mammalian cell lines. Environ. Mol. Mutagen. 22 : 283—292.
- Kidney J. K., Faustman E. M. 1995. Modulation of nitrosourea toxicity in rodent embryonic cells by O6-benzylguanine, a depletor of O6-methylguanine-DNA methyltransferase. Toxicol. Appl. Pharmacol. 133 : 1—11.
- Kleivi K., Teixel M. R., Eknaes M., Diep C. B., Jakobsen K. S., Hamelin R., Lothe R. A. 2004. Genome signatures of colon carcinoma cell lines. Cancer Genet. Cytogenet. 155 : 119—131.

- Konca K., Lankoff A., Banasik A., Lisowska H., Kuszewski T., Gozd S., Koza Z., Wojcik A. 2003. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. *Mutat. Res.* 534 : 15—20.
- Marti T. M., Kunz C., Fleck O. 2002. DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways. *J. Cell. Physiol.* 191 : 28—41.
- Masramon L., Ribas M., Cifuentes P., Arribas R., Garcia F., Egozcue J., Peinado M. A., Miro R. 2000. Cytogenetic characterization of two colon cell lines by using conventional G-banding, comparative genomic hybridization, and whole chromosome painting. *Cancer Genet. Cytogenet.* 121 : 17—21.
- Mehta R. G. 2000. Experimental basis for the prevention of breast cancer. *Eur. J. Cancer.* 36 : 1275—1282.
- Mizumoto K., Farber J. I. 1995. Growth inhibition and cell killing by N-methyl-N-nitrosourea: metabolic alterations that accompany poly(ADP-ribosylation). *Arch. Biochem. Biophys.* 319 : 512—518.
- Parsons R., Li G. M., Longley M. J., Fang W. H., Papadopoulos N., Jen J., de la Chapelle A., Kinzler K. W., Vogelstein B., Modrich P. 1993. Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER + tumor cells. *Cell.* 75 : 1227—1236.
- Payne C. M., Crowley C., Washo-Stultz D., Briehl M., Bernstein H., Bernstein C., Beard S., Holubec H., Warneke J. 1998. The stress-response proteins poly(ADP-ribose) polymerase and NF-kappaB protect against bile salt induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 5 : 623—636.
- Pegg A. E., Byers T. L. 1992. Repair of DNA containing O6-alkylguanine. *FASEB J.* 6 : 2302—2310.
- Singh N. P. 2000. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutat. Res.* 455 : 111—127.
- Tatsuka M., Ibeanu G. C., Izumi T., Narayan S., Rainana C. V., Kim N. K., Kang W., Roy G., Mitra S. 1995. Structural organization of the mouse DNA repair gene, N-methylpurine-DNA glykosylase. *DNA Cell Biol.* 14 : 37—45.
- Tronov B. A., Konstantinov E. M. 2000. Hydrogen peroxide-induced DNA repair and death of resting human blood lymphocytes. *Biochemistry.* 65 : 1279—1286.
- Tsushimi T., Noshima S., Oga A., Esato K., Sasaki K. 2001. 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.* 126 : 34—38.
- Wang C. Y., Mayo M. W., Korneluk R. G., Goeddel D. V., Baldwin A. S., Jr. 1998. NF-kB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 to suppress caspase-8 activation. *Science.* 281 : 1680—1683.
- Yang J., Liu X., Bhalla K., Kim C. N., Ibrado A. M., Cai J., Peng T.-L., Jones D. P., Wang X. 1997. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome C from mitochondria blocked. *Science.* 275 : 1129—1132.

Поступила 28 III 2005

COMPARISON OF GENO- AND CYTOTOXICITY OF METHYLNITROSOUREA ON MMR-PROFICIENT AND MMR-DEFICIENT HUMAN TUMOR CELL LINES

© V. A. Tronov,^{1,*} I. I. Kramarenko,¹ T. D. Smirnova,² S. M. Terekhov²¹ Institute of Chemical Physics RAS, and ² Research Center of Medical Genetics RAMS, Moscow;

* e-mail: tronov@chph.ras.ru

Deficient mismatch repair (MMR) is identified as a mutation of one of four major MMR genes and(or) microsatellite instability. These genomic changes are used as markers of MMR status of the heredity nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) spectrum tumors — familial and sporadic tumors of colon and extracolonic cancers fulfilling Amsterdam clinical criteria II. MMR-deficiency results in mutator phenotype and resistance to geno- and cytotoxicity of alkylating agents. The main cytotoxic damage to DNA in response to chemical methylation is O6-methylguanine (O6-mG). The secondary DNA strand breaks, which are formed during the MMR functioning, are proposed to be required for methylation induced cytotoxicity. We have assumed that the secondary double strand breaks (DSB) upon DNA methylation are able to represent functional efficiency of MMR in cells. The purpose of the paper was to test this assumption on human tumor cells differing in MMR-status and pulse-treated with methyl nitrosourea (MNU). We used 3 cell lines: HeLa (MMR-competent endometrial tumor cells), HCT116 (MMR-deficient colorectal carcinoma cells), and Colo320 (sigmoid intestine tumor cells with uncharacterized MMR status). DSBs were evaluated with neutral comet assay. Cytotoxicity/viability was evaluated with MTT-assay and apoptotic index (frequency of morphologically determined apoptotic cells). We show that 1) cytotoxic effect of MNU (250 µM) on HeLa cells was exhibited 3 days after pulse-treatment of cells with MNU; 2) DSBs occurred 48 h after the drug treatment but prior to the onset of apoptosis of HeLa cells; 3) MMR-deficient HCT116 cells were resistant to the drug: no decreased viability, DSBs and apoptosis were observed during 3 days after cell treatment. Both cell lines exhibited high sensitivity to etoposide, classical inducer of unrepairable DSBs and p53. Etoposide has been found to induce DSBs in 6—12 h, which was followed by apoptosis (in 24 h). Colo320 cells exhibited intermediate position between HeLa and HCT116 cell lines in regard to sensitivity to MNU according to MTT-assay and the number of secondary DSBs formed in MNU-treated cells. Nevertheless, in contrast to HeLa cells, these breaks did not induce apoptosis in Colo320 cells. Our data confirm the assumption about cause/effect relationship between secondary DNA double strand breaks, induced by monofunctional methylating agent MNU, and functioning of MMR in human tumor cells.