

## ЗАМЕДЛЕННАЯ ЭКСЦИЗИЯ ПИРИМИДИНОВЫХ ДИМЕРОВ В НЕСТИМУЛИРОВАННЫХ ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА

© С. А. Снопов,<sup>1,\*</sup> Л. Роза,<sup>2</sup> Ф. Р. де Груйл<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия, <sup>2</sup> Отдел физиологии питания, Институт питания и пищевых продуктов, Зейст, Нидерланды, и <sup>3</sup> Отдел дерматологии Медицинского центра Лейденского университета, Лейден, Нидерланды;

\* электронный адрес: snopov@mail.cytspb.rssi.ru

С целью изучения процессинга УФ-повреждений ДНК в нестимулированных лимфоцитах человека нами использована проточная флуориметрия их частично денатурированных ядер, меченных антителами, связывающими циклобутановые пиримидиновые димеры (ПД) одноцепочечной ДНК. Обнаружено, что в 1-е ч культивирования УФ-облученных клеток ПД-специфическая флуоресценция ядер не снижалась, как можно было ожидать, а усиливалась. Выяснено, что причиной увеличения связывания антител клеточными ядрами были не изменения температуры и культуральной среды, сопутствовавшие культивированию, а модификация ДНК, производимая в поврежденных клетках, по-видимому, ферментами эксцизионной репарации. Мы предполагаем, что такая модификация ДНК приводила к повышению связывания антителами участков ДНК, содержащих ПД, вследствие того что образование открытых структур в ДНК количественно опережало процесс двойной инцизии этих участков и повышало степень взаимодействия клеточных ядер с антителами, специфичными к ДНК-повреждениям. Результаты работы показывают, что ферменты эксцизионной репарации в нестимулированных лимфоцитах способны производить релаксацию хроматина и прединцизионное раскручивание УФ-поврежденных участков ДНК, в то время как эксцизия этих участков оказывается сниженной.

Ключевые слова: ультрафиолетовое излучение, повреждения ДНК, пиримидиновые димеры, эксцизионная репарация, лимфоциты.

Принятые сокращения: МЛПК — мононуклеарные лейкоциты периферической крови, оцДНК — одноцепочечная ДНК, ПД — пиримидиновые димеры, РФБ — раствор фосфатного буфера, УФИ — ультрафиолетовое излучение, УФ-С — коротковолновое ультрафиолетовое излучение (< 280 нм), 7-AAD — 7-амино-актиноцин D, D1В — гибридные клетки, продуценты антител к одноцепочечной ДНК, FITC — флуоресцеинизоцианат, НЗ — гибридные клетки, продуценты антител к пиримидиновым димерам.

УФ-излучение является одним из экологических факторов, который обладает известной генотоксической активностью. В исследованиях раков кожи, индуцируемых УФ-излучением, установлено, что задолго до появления опухолей у животных определяются нарушения противоопухолевого иммунного контроля. Эти нарушения у мышей, получавших субканцерогенные дозы УФ-облучения, подавляют их способность отторгать трансплантируемые высокоантигенные УФ-индуцированные опухоли, которые успешно отторгаются у нормальных животных (Fisher, Kripke, 2002). Экспериментальные исследования показали, что УФ-индуцированные в клетках кожи повреждения ДНК, а именно пиримидиновые димеры — ПД, у животных и человека запускают несколько последовательных звеньев подавления иммунореактивности: нарушение экспрессии генов, продукцию супрессорных цитокинов и угнетение активности антигенпрезентирующих клеток (Appelgate et al., 1989; Kripke et al., 1992, 1996; Yarosh et al., 1993; Nishigori et al., 1996; Hurks et al., 1997; Vink et al., 1997; Kibitel et al., 1998; Petit-Frere et al., 1998). Эффективная репарация по-

вреждений ДНК в клетках кожи способна предотвратить развитие таких событий и иммуносупрессию (Stege et al., 2000; Yarosh, 2002).

Считается, что при воздействии УФ-излучения на кожу повреждения ДНК могут возникать не только в клетках кожи, но и в мононуклеарных лейкоцитах периферической крови — МЛПК (Green et al., 1999). Известно, что 99 % всех циркулирующих МЛПК — это нестимулированные лимфоциты. Возможные последствия индукции данных повреждений для самих лимфоцитов и для функций иммунитета не изучены. Нестимулированные лимфоциты обладают сниженной способностью к репарации УФ-индуцированных повреждений ДНК по сравнению с фибробластами, кератиноцитами и стимулированными лимфоцитами. Было показано, что нестимулированные лимфоциты имеют сниженную способность репарировать ПД (Freeman, Ryan, 1988; Clingen et al., 1995) вследствие дефекта их эксцизии (Han et al., 1998) и уменьшенного пула деооксирибонуклеотидов (Green et al., 1994). Оставалось, однако, неясным, способны ли нестимулированные лимфоциты проводить эф-

фективную прединцизионную подготовку участков ДНК с ПД.

В настоящей работе мы пытались исследовать кинетику удаления ПД из ядер УФ-облученных нестимулированных МКПК, используя для этого моноклональные антитела к ПД с FITC-окрашиванием и цитометрией. Данный метод показал себя достаточно чувствительным для определения ПД в ядрах этих клеток после их УФ-облучения в дозе порядка 1—2 Дж/м<sup>2</sup> (Snopov et al., 1995). Вопреки нашим ожиданиям наблюдать снижение специфической ПД-флуоресценции в ядрах УФ-облученных клеток вследствие удаления этих повреждений системой эксцизионной репарации, на самом деле происходило усиление этого флуоресцентного сигнала в 1-е ч культивирования. В наших последующих экспериментах мы ставили задачу выяснить причину такого усиления. Полученные результаты привели нас к выводу о том, что повышение специфического связывания антител к ПД с ядрами нестимулированных МЛПК происходило вследствие модификации ДНК в участках, содержащих неэксцизированные ПД, которая производилась ферментами репарации в прединцизионную фазу.

### Материал и методика

Мононуклеарные лейкоциты периферической крови (МЛПК). Свежезаготовленную кровь здоровых доноров стабилизировали гепарином (Organon Technica B.V., Нидерланды) из расчета 25 Ед на 1 мл. МЛПК изолировали с помощью центрифугирования крови на градиенте плотности Фикол1-верографина (Pharmacia, Швеция) и затем дважды отмывали раствором фосфатного буфера (РФБ). Концентрации выделенных МЛПК определяли автоматическим счетчиком клеток (Sysmex, Япония).

УФ-облучение. Изолированные МЛПК суспендировали в РФБ в концентрации  $(0.5—1.0) \cdot 10^6$  кл./мл и помещали в чашки Петри диаметром 9 см. Чашки с суспензиями облучали сверху при помощи ламп TUV (40 Вт; Philips, Нидерланды), основное излучение которых приходится на УФ-С-диапазон, в течение нескольких промежутков времени, при интенсивности облучения 0.25—0.40 Вт/м<sup>2</sup>. Интенсиметрию проводили с помощью калиброванного датчика Kirp E<sub>11</sub> (Delft, Нидерланды). Во время облучения чашки с суспензией находились или при температуре, близкой к 0 °С (на льду), или при комнатной температуре (в зависимости от задач, поставленных в нескольких сериях экспериментов). После облучения МЛПК осаждали центрифугированием при той же температуре, после чего их или немедленно подвергали фиксации, или сначала переносили в пластиковые флаконы в РФБ или среде RPMI, культивировали при 37 °С в течение различного времени и только после этого фиксировали.

Культивирование. В части опытов культивирование МЛПК проводили в СО<sub>2</sub>-инкубаторе в 6-луночных полистиреновых планшетах (Nunclon, Дания) в среде RPMI (GIBCO, Великобритания), содержащей глютамин (2 мМ), пенициллин (100 Ед/мл), стрептомицин (100 мг/мл) и 20%-ную аутологичную плазму. В других опытах культивирование облученных клеток проводили в РФБ без каких-либо из перечисленных добавок. В специальной серии опытов в РФБ добавляли новобиоцин (Sigma, США) в концентрации 0.175—0.250 мМ.

Иммуноцитометрия. Применяли процедуру, разработанную Бергом и соавторами (Berg et al., 1993) и модифицированную нами применительно к лимфоцитам (Snopov et al., 1995). МЛПК подвергали фиксации 70%-ным этанолом и выдерживали в течение 1 сут. После инкубации в растворе 0.02%-ного пепсина (Sigma) с 2 М HCl в течение 40 мин при комнатной температуре клетки отмывали 1 раз в 0.1 М растворе Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> и затем дважды в растворе РФБ, содержащем 0.5 % Tween-20 (Sigma), — 0.5 % РФБТ. Инкубацию с моноклональными антителами к ПД (супернатант гибридных клеток H3 (Roza et al., 1998), разведение 1 : 40) или антителами к одноцепочечной ДНК (супернатант гибридных клеток DB1 (Van der Schans et al., 1989), разведение 1 : 60) проводили при комнатной температуре в течение 60 мин. После нее МЛПК дважды отмывали РФБТ и инкубировали в темноте с 1%-ными FITC-конъюгированными кроличьими антимышиными антителами (Dakopats, Дания) при комнатной температуре в течение 60 мин. После еще двух отмывок в РФБТ клетки ресуспендировали в 400 мкл РФБ, содержащем 25 мкг/мл 7-амино-актиномицина D (7-AAD, Sigma), и инкубировали при 37 °С с 15 мкл 1%-ной РНКазой (Sigma) в течение 15 мин. После денатурирующей обработки клетки осаждали центрифугированием при 110 g.

Для регистрации уровней флуоресценции исследуемых ядер МЛПК использовали цитометр FACSScan (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems, США), оснащенный аргоновым лазером (длина волны 488 нм). Анализировали по  $(10—20) \cdot 10^4$  клеток, окрашенных FITC и 7-AAD. Сигнал флуоресценции FITC регистрировали в FL1-канале цитометра ( $520 \pm 15$  нм) и сохраняли после логарифмического усиления. Сигнал флуоресценции 7-AAD регистрировали в FL3-канале цитометра ( $> 651$  нм) и сохраняли после линейного усиления. Полученные данные обрабатывали с помощью программного обеспечения для FACSScan (LYSYS II, Becton-Dickinson).

Иммуоблотинг. Использовали технику точечного иммуоблотинга (Vink et al., 1994). Образцы денатурированной нагреванием ДНК вносили в ячейки размером  $7.00 \times 0.75$  мм аппарата Bio-Dot SF (Bio-Rad Laboratories B.V., Нидерланды) на нитроцеллюлозную мембрану с порами размером 0.1 мкм (Schleicher & Schuell, Германия, номер по каталогу 402096). Мембрану и подлежащие фильтры (Bio-Rad Laboratories, США, номер по каталогу 162-0161) предварительно замачивали в РФБ. После внесения ДНК ячейки промывали 0.25 мл РФБ. Для иммобилизации ДНК мембрану высушивали при 80 °С в течение 2 ч. Далее ее инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин в растворе РФТ, содержащем 0.1 % Tween (0.1 % РФБТ) и 5 % (по соотношению вес/объем) обезжиренного молока, с целью воспрепятствовать неспецифическому связыванию антител. Затем после трехкратной 10-минутной отмывки мембраны в РФБ ее инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч с супернатантом клеток H3, разведенным 1 : 200. После трехкратной отмывки 0.1%-ным РФБТ мембрану в течение 1 ч инкубировали с кроличьими антимышиными антителами, конъюгированными с пероксидазой (Dakopats), разведенными 1 : 1000 в растворе 0.1%-ного РФБТ, содержащем 0.5 % молочного порошка. После этого мембрану вновь трехкратно отмывали в 0.1%-ном РФБТ. Уровень пероксидазной активности определяли с помощью хемилуминесцентного субстрата, содержащегося в коммерческом наборе LumiGLO™ (Kir-

kegaard & Perry Laboratories, США). Меченные пероксидазой антитела катализировали окисление люминола, что приводило к свечению участков мембраны в присутствии  $H_2O_2$ . Данное свечение регистрировали на фотопленке при экспозиции в течение 20—60 с.

## Результаты

В настоящей работе мы намеревались количественно оценить кинетику возможного удаления ПД из ядер нестимулированных МЛПК после их УФ-облучения в дозах 0, 2, 4, 7, 10 и 30 Дж/м<sup>2</sup>. Облученные клетки перенесли из чашек Петри в центрифужные пробирки, осадили центрифугированием, помещали в пластиковые флаконы для культивирования в течение 0, 0.5, 1, 2, 4, 6—7, 18—24 ч и после этого фиксировали. Фиксированные клетки подвергали обработке пепсином и соляной кислотой. Обработанные таким образом клетки, содержащие частично денатурированные ядра, окрашивали сперва антителами к ПД, а затем — вторыми антителами, несущими флуоресцентную метку (рис. 1).

В результате в канале цитометра, регистрирующем зеленую флуоресценцию, необлученные клетки обнаруживали только незначительный уровень аутофлуоресценции, который мало менялся на всех сроках культивирования (рис. 2, *a*, нижняя кривая). В клетках, зафиксированных сразу после УФ-облучения, уровень флуоресценции оказывался значительно более высоким за счет специфического сигнала от антител к ПД, связавшихся с ядрами, и обнаруживал отчетливую дозовую зависимость (рис. 2, *a*, три верхние кривые), подтверждая чувствительность метода, достигнутую нами ранее (Snpov et al., 1995).

Довольно неожиданным для нас явилось то обстоятельство, что в 1-е ч культивирования облученных УФ клеток интенсивность ПД-специфической флуорес-

ценции ядер не снижалась, а возрастала у 13 из 16 исследованных образцов крови. Типичная динамика такого возрастания ПД-флуоресценции при культивировании облученных УФ клеток показана на рис. 2, *a* (три верхние кривые). Вслед за увеличением в первые 4 ч после облучения интенсивность ПД-флуоресценции оставалась практически неизменной на более поздних сроках наблюдений. В дальнейших экспериментах мы пытались выяснить причину такого возрастания ПД-специфического сигнала.

Мы предположили, что культивирование УФ-облученных МЛПК может каким-то образом облегчать доступ антител НЗ к ядерной ДНК. Поскольку данные антитела связывают ПД на оцДНК (Van der Schans, 1989), мы проверили, может ли перенос МЛПК из холодного РФБ в теплую культуральную среду привести к повышению доли оцДНК в ядрах этих клеток. Для сравнительной оценки оцДНК мы применили окрашивание ее при помощи антител к оцДНК после частичной денатурации ядер по протоколу, сходному с тем, что применялся нами для окрашивания ядер антителами к ПД.

Было обнаружено, что у МЛПК, фиксированных после 1 ч инкубации при 0, 20 или 37 °С, имеются существенные различия в уровне специфического флуоресцентного оцДНК-сигнала в препаратах их ядер и эти различия полностью обратимы, если клетки после инкубации при разной температуре поместить на 18 ч в среду при 37 °С (рис. 3). Эти результаты показали, что состояние ДНК — степень ее «одноцепочечности» в фиксированных клетках — зависит от температурных условий предшествующего культивирования. Чтобы избежать возможного влияния изменений температуры на ДНК, в последующих сериях опытов мы больше не охлаждали клетки до 0 °С и содержали их при постоянной комнатной температуре около 20 °С начиная с момента взятия крови, до и после УФ-облучения и при культивировании.

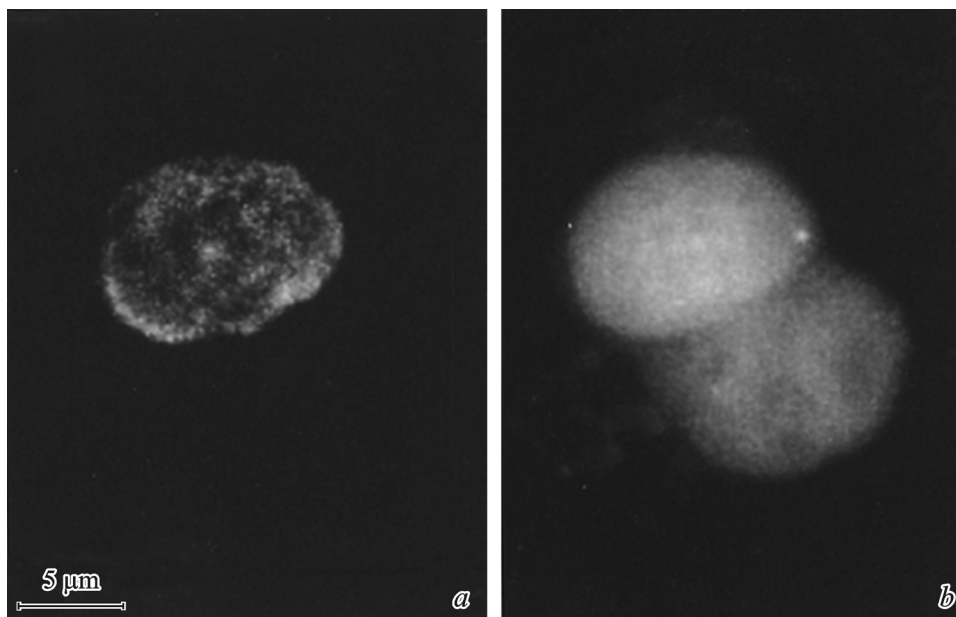


Рис. 1. Два изображения, полученные с помощью конфокального сканирующего микроскопа (Bio-Rad Lasersharp MRS-600), частично денатурированных клеточных ядер (сверху — УФ-облученного лимфоцита, снизу — необлученного лимфоцита) после окраски двумя флуоресцентными красителями.

*a* — FITC, связанного с антителами к пиримидиновым димерам; *b* — 7-AAD, интеркалированного в двухцепочечную ДНК.

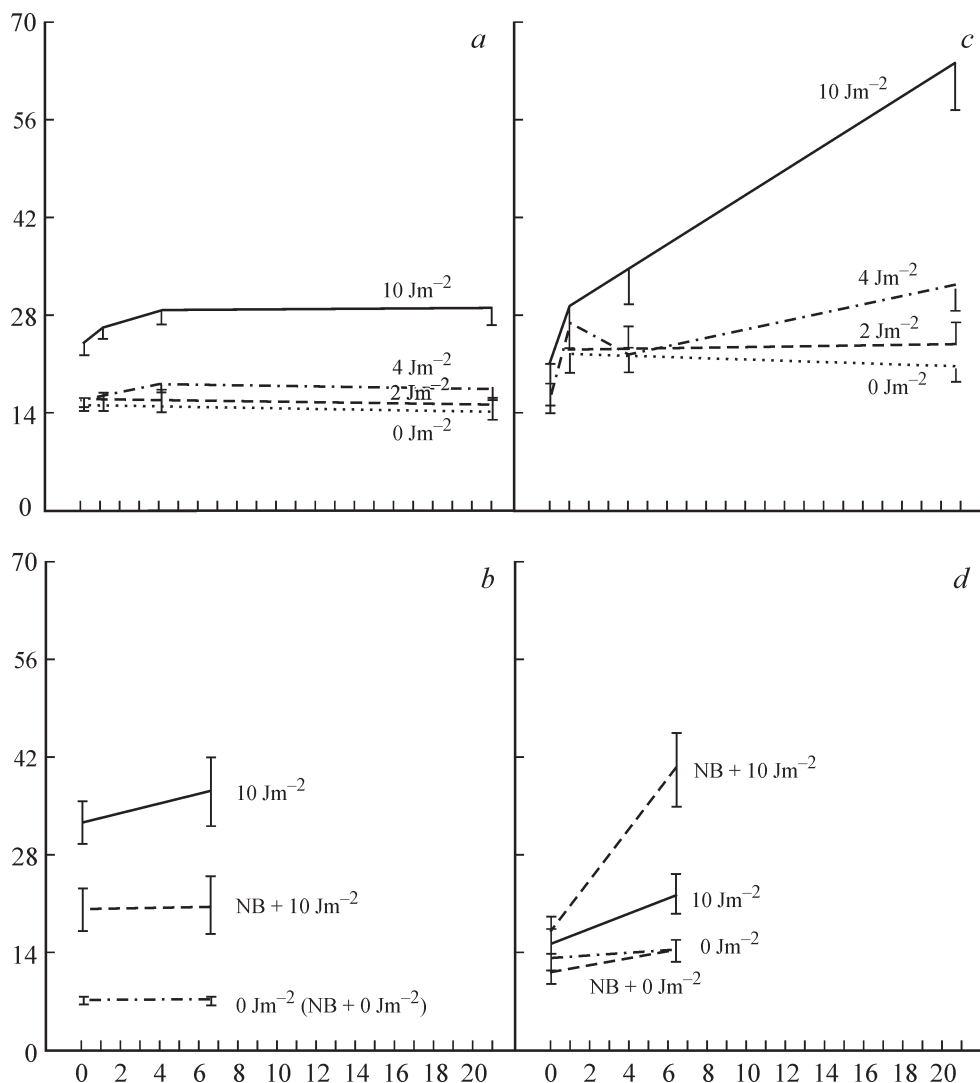


Рис. 2. Интенсивность флуоресценции меток к пиримидиновым димерам и одноцепочечной ДНК в ядрах лимфоцитов, поврежденных УФ-С-излучением.

*a* — клетки, облученные в холодном фосфатном буфере и затем культивированные в среде RPMI при 37 °С; *b* — клетки, инкубированные с новобиоцином (0.175 мМ) или без него в течение 1 ч при комнатной температуре в фосфатном буфере и затем облученные при комнатной температуре и культивированные при 37 °С. По оси абсцисс — время культивирования, ч; по оси ординат — геометрическое значение флуоресценции от ядер 10<sup>4</sup> лимфоцитов (среднее число каналов регистрации цитофлуориметра). Вертикальные отрезки — стандартное отклонение среднего значения.

Далее мы выявили, что перенос МЛПК из РФБ и культивирование в использованной нами среде RPMI с добавками также могут повлиять на состояние (степень «одноцепочечности») их ДНК. Об этом свидетельствовали изменения оцДНК-специфической флуоресценции в ядрах необлученных клеток. Интенсивность этой флуоресценции значительно возрастала после 1 ч культивирования и затем постепенно снижалась до исходного уровня (рис. 2, *c*, нижняя кривая). В облученных УФ клетках подобный первоначальный подъем оцДНК-флуоресценции сопровождался и последующим ее усилением вплоть до 21 ч наблюдения. Это дополнительное усиление оцДНК-сигнала обнаруживало зависимость от дозы УФ-облучения (рис. 2, *c*, три верхние кривые).

Для того чтобы избежать влияния смены культуральной среды на состояние (степень «одноцепочечности») ДНК ядер исследуемых клеток, в дальнейших опытах мы содержали МЛПК в РФБ начиная с приготовления их

суспензии после их выделения, до и после УФ-облучения, а также в течение всех сроков культивирования. В этих условиях необлученные и облученные УФ клетки обнаруживали гораздо меньшее усиление оцДНК-сигнала в 1-е ч культивирования (рис. 2, *d*, кривые для 0 и 10 Дж/м<sup>2</sup>). Несмотря на это, в УФ-облученных МЛПК по-прежнему выявлялось усиление ПД-флуоресценции (рис. 2, *b*, верхняя кривая). Обнаруженные изменения в специфических сигналах от ПД и оцДНК в ядрах всех изученных образцов проявляли определенную согласованность, хотя их абсолютные значения сильно варьировали в различных образцах и экспериментальных сериях и не позволили выявить достоверную корреляцию между обоими параметрами.

Обнаружив усиление специфического ПД-сигнала в ядрах облученных УФ МЛПК, мы попытались выяснить, не вносит ли свой вклад в такое усиление процесс нуклеотидной эксцизионной репарации ДНК. Для этого в суспензию клеток за 30—60 мин до их облучения мы вноси-



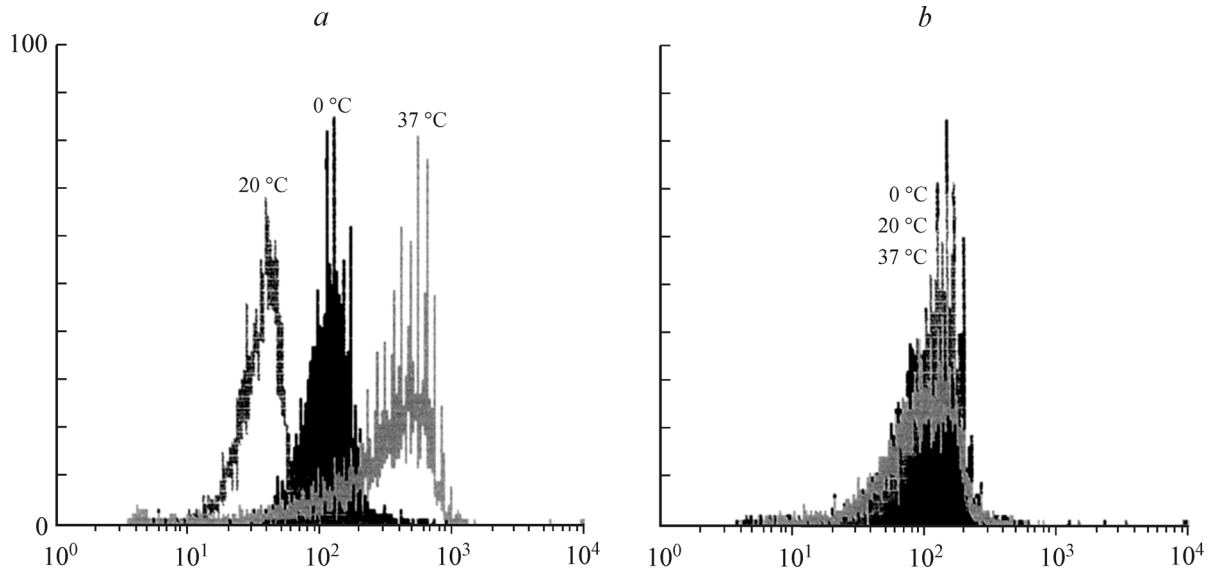


Рис. 3. Гистограммы интенсивности специфической флуоресценции меченной антителами одноцепочечной ДНК частично денатурированных ядер лимфоцитов после их инкубации при разной температуре (ее значения указаны над пиками гистограмм) и последующего культивирования в среде RPMI при 37 °C в течение 0 (a) и 17 (b) ч.

По оси абсцисс — геометрическое значение специфической флуоресценции; по оси ординат — относительное число клеток.

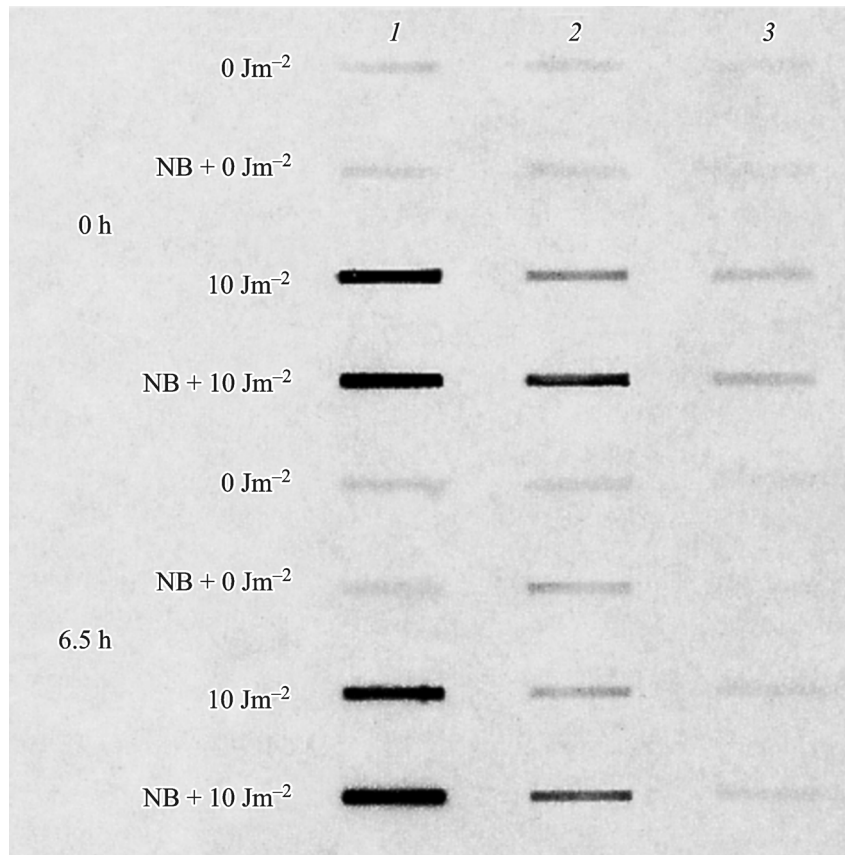


Рис. 4. Фотоотпечаток люминесценции от метки к пиримидиновым димерам в изолированной ДНК УФ-облученных лимфоцитов. Перед облучением клетки были инкубированы с новобиоцином (200 мМ) или без него в течение 1 ч в фосфатном буфере при комнатной температуре. Количество ДНК в слотах столбцов 1—3 — 900, 300 и 100 нг соответственно. Верхние 4 строки — ДНК из клеток, зафиксированных сразу (фактически через 18 мин) после облучения, время культивирования 0 ч. Нижние 4 строки — ДНК из облученных клеток, культивировавшихся в течение 6.5 ч в фосфатном буфере при 37 °C.

ли новобиоцин в субтоксических концентрациях, преследуя цель подавить начальную фазу эксцизионной репарации, поскольку новобиоцин известен как ингибитор ядерных ферментов, вовлеченных в стадии, предшествующие специфической репаративной инцизии ДНК в клетках человека (Dresler, Robinson-Hill, 1987; Wood, Stansfield, 1992; Ali-Osman et al., 1993; Thielmann et al., 1993; Rosseli et al., 1994). Мы сопоставляли влияние новобиоцина на связывание антителами ПД в изолированной ДНК и в ядрах каждого клеточного образца.

Влияние новобиоцина на связывание ПД антителами оказалось очевидным уже на первом сроке тестирования — 0 ч культивирования, т. е. сразу на момент фиксации облученных УФ клеток, который наступал приблизительно на 18-й мин после окончания облучения. (Такой промежуток времени требовался для того, чтобы собрать и перенести клеточную суспензию из чашки Петри в центрифужную пробирку, осадить клетки и убрать супернатант.) К этому моменту ПД-флуоресценция у ДНК, изолированной из МЛПК, предобработанных новобиоцином, была существенно выше, чем у ДНК, изолированной из клеток, к которым новобиоцин не добавляли (рис. 4, строки 4, 3). Причиной этого различия могло быть то, что новобиоцин действительно эффективно подавлял быструю эксцизию из ДНК той различной доли ПД, которая происходила в течение этого короткого промежутка времени после УФ-облучения в клетках, не обработанных новобиоцином. В последующем, после 6.5 ч культивирования, ПД-флуоресценция у ДНК, изолированной из УФ-облученных клеток, не обработанных новобиоцином, несколько снижалась (рис. 4, строка 7) по сравнению с уровнем до культивирования (рис. 4, строка 3), указывая на то, что еще некоторое число ПД было эксцизировано из ДНК в течение этих 6.5 ч. На процесс эксцизии этой порции ПД предобработка клеток новобиоцином, очевидно, влияла в меньшей степени, поскольку ДНК, изолированная из таких клеток, также обнаруживала небольшое снижение ПД-флуоресценции (рис. 4, строка 8) от уровня до культивирования (рис. 4, строка 4), сходное по величине с таковым у клеток, не обработанных новобиоцином.

В отличие от изолированной ДНК ядра клеток, обработанных до УФ-облучения новобиоцином, на момент фиксации имели более низкий уровень ПД-флуоресценции, чем ядра клеток, не обработанных новобиоцином (рис. 2, *b*, 0 ч). Более того, у МЛПК, обработанных новобиоцином, после 6.5 ч культивирования практически не выявлялось усиления ПД-флуоресценции их ядер в противоположность явному усилению этого сигнала в клетках, культивированных без новобиоцина (рис. 2, *b*, 6.5 ч). Следовательно, новобиоцин предотвращал повышение специфического ПД-окрашивания ядер, несмотря на то что ДНК, изолированная из клеток, обработанных новобиоцином, содержала гораздо меньше участков связывания анти-ПД антител, чем клетки, не обработанные новобиоцином.

### Обсуждение

Мы использовали иммуноокрашивание ПД в ядрах МЛПК (лимфоцитов) после их облучения УФ-С и культивирования. Вопреки нашим ожиданиям, в 1-е ч культивирования клеток, облученных УФ, специфическая ПД-флуоресценция не снижалась, а усиливалась (рис. 2,

*a, b*). Ранее Митчелл и соавторы (Mitchell et al., 1986) сообщали о подобном усилении связывания антител, специфичных к пиримидин-(6-4) пиримидон-фотопродуктам, в неденатурированной ДНК, изолированной из клеток яичника китайского хомячка, в первые несколько часов после их УФ-облучения. Мы задались целью выяснить, могут ли условия культивирования (например, изменения температуры и(или) культуральной среды) или ферменты эксцизионной репарации индуцировать такую модификацию ДНК в ядрах лимфоцитов, которая превышает уровень специфического связывания антител к поврежденной ДНК.

Имеются сообщения о том, что при изменениях температуры от 22 до 37 и от 37 до 30 °С происходят модификации структуры хроматина и синтез стрессорных протеинов (Westwood et al., 1991; Holland et al., 1993). Мы попытались выяснить, не мог ли в наших экспериментах перенос клеток из холодного фосфатного буфера в теплую среду RPMI с добавками изменять состояние (степень «однопочечности») ДНК и таким образом повлиять на связывание с ней антител. С помощью антител к оцДНК мы определили, что изменения температуры действительно могут приводить к изменениям содержания в ядрах оцДНК (рис. 2, *c*), обратимые при инкубации клеток при постоянной температуре (рис. 2, *a, b*). Наши опыты показали, что в этих ядрах имели место два типа увеличения оцДНК-сигнала. Первое — относительно резкое увеличение оцДНК-сигнала — происходило в течение первых 4 ч культивирования, было преходящим, не зависящим от УФ-облучения и ассоциированным с претерпеваемым клетками изменением культуральных условий. Второе увеличение оцДНК-сигнала развивалось постепенно в течение 21 ч, было необратимым и было индуцировано, по всей видимости, УФ-облучением клеток, поскольку обнаруживало явную зависимость от дозы облучения. Таким образом, даже если мы содержали экзаменуемые клетки при одной температуре в процессе облучения и культивирования, у них все так же обнаруживались изменения в содержании оцДНК и усиление ПД-флуоресценции клеточных ядер. Несмотря на то что наши расчеты не выявили достоверного коэффициента корреляции между возрастанием уровней этих двух флуоресцентных сигналов, мы не вправе исключать вероятность наличия такой корреляции в первые 4 ч культивирования УФ-облученных клеток. При дальнейшем культивировании увеличение оцДНК-флуоресценции также обнаруживало зависимость от дозы УФ-облучения, но также не сопровождалось сколько-нибудь отчетливым усилением ПД-окрашивания клеточных ядер. Дозозависимый характер УФ-индуцированного повышения оцДНК в клеточных ядрах в первые 4 ч культивирования и в последующие часы может свидетельствовать о том, что происходящая при этом модификация ДНК связана с действием на нее ферментов репарации.

Прямое подтверждение наличия эксцизионной репарации в УФ-облученных МЛПК было получено нами после их 6.5-часового культивирования при иммуноокрашивании ПД в изолированной ДНК, которое обнаруживало очевидное снижение числа участков, содержащих ПД (рис. 4). Это снижение, правда, не выглядело очень внушительным. На самом деле, и ранее было показано, что даже после 24 ч культивирования УФ-облученных нестимулированных МЛПК число ПД, выявляемое с помощью димер-специфической эндонуклеазы, остается на уровне 85 % от их исходного числа (Freeman, Ryan,

1988). Авторы приведенной работы не обнаружили сколько-нибудь заметного удаления ПД из ДНК в течение 6 ч после УФ-облучения, хотя авторы другого исследования выявили в этот период наличие инцизии—эксцизии у нестимулирующих лейкоцитов крови (Lankinen et al., 1996). В наших экспериментах удаление ПД также выявлялось не только через 6.5 ч, но и в гораздо более ранние сроки облучения. А именно: мы наблюдали, что обработка новобицином в субтоксических концентрациях МЛПК перед УФ-облучением приводила к тому, что ДНК, изолированная из этих клеток, связывала больше антител к ПД уже при первом тестировании через 18 мин после облучения (рис. 4, строка 4 против строки 3), так же как и через 6.5 ч (рис. 4, строка 8 против строки 7). Такое повышенное содержание в ДНК участков связывания антител к ПД являлось, очевидно, результатом ингибирования ферментов эксцизионной репарации, вследствие которого большее, чем в отсутствие новобицина, число димеров не подвергалось быстрой эксцизии и оставалось в ДНК. Известно, что новобицин ингибирует топоизомеразу II, которая участвует в раскручивании суперскрученной ДНК на стадиях, предшествующих специфической репарационной инцизии (Dresler, Robinson-Hill, 1987; Wood, Stansfield, 1992; Ali-Osman et al., 1993; Thielmann et al., 1993; Rosselli et al., 1994). Отчетливое удаление ПД из ДНК в первые 18 мин после облучения клеток, которые не обрабатывались новобицином, хорошо сочетается с имеющимися представлениями об активации нуклеотидной эксцизионной репарации ДНК сразу после ее повреждения и наличием инцизии—эксцизии уже в первые 30—60 мин после УФ-облучения. Тот факт, что одновременно с быстрым удалением ПД из изолированной ДНК мы наблюдали повышение ПД-специфического мечения частично денатурированных ядер МЛПК (рис. 2, *b*), подкрепляет предположение о связи последнего с модификацией ядерной ДНК в раннюю фазу репарации.

Необходимо заметить, что новобицин в наших экспериментах, по-видимому, не влиял на более позднее удаление части участков с ПД из изолированной ДНК в клетках, культивировавшихся в течение 6.5 ч, поскольку оно происходило как у обработанных новобицином, так и необработанных клеток в сопоставимой степени (рис. 3). Такое позднее удаление ПД из ДНК в отличие от их удаления, происходившего в 1-е мин после облучения, не сопровождалось сколько-нибудь значительными изменениями ПД-специфического мечения клеточных ядер, несмотря на существенное повышение сигнала от оцДНК в клетках, происходившего в клетках, обработанных новобицином (рис. 2, *c, d*). Данный факт еще раз указывает на то, что повышение связывания антител к ПД с ядрами имело место только в начальные фазы эксцизионной репарации.

Считается, что для эффективного распознавания повреждений ДНК системой глобальной нуклеотидной эксцизионной репарации необходимым условием является релаксация хроматина. УФ-индуцированная глобальная релаксация хроматина распространяется на все клеточное ядро и происходит при участии тумор-супрессорного белка p35 (Rubbi, Milner, 2003). Эксцизионная репарация повреждений ДНК в клетках человека начинается с того, что в участке ДНК размером около 25 нуклеотидов рядом с повреждением происходит АТФ-зависимое образование открытой структуры, при котором топоизомеразой II производится релаксация суперскрученной

структуры ДНК. За этой фазой следует двойная инцизия фрагмента с повреждением, выполняемая двумя эндонуклеазами — XPG со стороны 3'-конца от повреждения и ERCC1-XPF со стороны 5'-конца, при том что сначала надрезается 3'-конец (Matsunaga et al., 1995; Evans et al., 1997). Имеются данные в пользу того, что дефект глобальной репарации ПД в нестимулированных лимфоцитах человека является следствием в большей степени недостаточной эффективности эксцизии, чем недостаточного пула дезоксирибонуклеотидов (Han et al., 1998). Наши наблюдения позволяют предположить, что в нестимулированных лимфоцитах происходит существенно больше прединцизионного ферментативного раскрытия ПД-содержащих фрагментов, чем последующих двойной инцизии и эксцизии этих фрагментов. Преобладание такого раскрытия ДНК над процессом полной эксцизии ПД приводит к повышению связывания специфических антител к ПД в ДНК ядерных структур, устойчивых к денатурирующему воздействию пепсина и соляной кислоты.

Таким образом, иммуноокрашивание ПД и оцДНК в ядрах УФ-облученных нестимулированных МЛПК выявило предотвратимую новобицином модификацию ДНК, производимую ферментами прединцизионной фазы нуклеотидной эксцизионной репарации. Такая модификация ДНК проявлялась существенным повышением связывания антител к пиримидиновым димерам и, по всей вероятности, заключалась в прединцизионном раскрытии участков ДНК, содержащих димеры, которое опережало их эксцизию.

Работа была частично поддержана грантом № 07-13-064 Голландской организации научных исследований (NOW). Материалы, опубликованные нами ранее (Snopov et al., 2004), адаптированы и воспроизводятся с разрешения Королевского химического общества, Европейского общества по фотобиологии и Европейской фотохимической ассоциации.

#### Список литературы

- Ali-Osman F., Berger M. S., Rajagopal S., Spene A., Livingstone R. B. 1993. Topoisomerase II inhibition and altered kinetics of formation and repair of nitrosourea and cisplatin-induced DNA interstrand cross-links and cytotoxicity in human glioblastoma cells. *Cancer Res.* 53 : 5663—5668.
- Appelgate L. A., Ley R. D., Alcalay J., Kripke M. L. 1989. Identification of the molecular target for the suppression of contact hypersensitivity by ultraviolet radiation. *J. Exp. Med.* 170 : 1117—1131.
- Berg R. J. W., de Gruijl F. R., Roza L., van der Leun J. C. 1993. Flow cytometric immunofluorescence assay for quantification of cyclobutildithymine dimers in separate phases of the cell cycle. *Carcinogenesis.* 14 : 103—106.
- Clingen P. H., Arlett C. F., Cole J., Waugh A. P., Lowe J. E., Harcourt S. A., Hermanova N., Roza L., Mori T., Nikaïdo O., Green M. H. 1995. Correlation of UVC and UVB cytotoxicity with the induction of specific photoproducts in T-lymphocytes and fibroblasts from normal human donors. *Photochem. Photobiol.* 61 : 163—170.
- Dresler S. L., Robinson-Hill R. M. 1987. Direct inhibition of u.v.-induced DNA excision repair in human cells by novobiocin, coumermycin and nalidixic acid. *Carcinogenesis.* 8 : 813—817.
- Evans E., Moggs J. G., Hwang J. R., Egly J. M., Wood R. D. 1997. Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. *EMBO J.* 1 : 6559—6573.



- Fisher M. S., Kripke M. L. 2002. Systematic alteration induced in mice by ultraviolet light irradiation and its relationship to ultraviolet carcinogenesis. *Bull. World Health Organ.* 80 : 908—912.
- Freeman S. E., Ryan S. L. 1988. Excision repair of pyrimidine dimers in human peripheral blood lymphocytes: comparison between mitogen stimulated and unstimulated cells. *Mutat. Res.* 194 : 143—150.
- Green M. H., Petit-Frere C., Clingen P. H., Bentham G., Cole J., Arlett C. F. 1999. Possible effects of sunlight on human lymphocytes. *J. Epidemiol.* 9 (Suppl. 6): S48—S57.
- Green M. H., Waugh A. P., Lowe J. E., Harcourt S. A., Cole J., Arlett C. F. 1994. Effect of deoxyribonucleosides on the hypersensitivity of human peripheral blood lymphocytes to UV-B and UV-C irradiation. *Mutat. Res.* 315 : 25—32.
- Han P., Clingen P. H., Lowe J. E., Katsuya A., Arlett C. F., Green M. H. 1998. Repair of cyclobutane pyrimidine dimers in unstimulated human mononuclear cells is deficient at very low fluences of ultraviolet B and is not enhanced by addition of deoxyribonucleosides. *Mutagenesis.* 13 : 353—356.
- Holland D. B., Roberts S. G., Wood E. J., Cunliffe W. J. 1993. Cold shock induces the synthesis of stress proteins in human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 101 : 196—199.
- Hurks H. M., Out-Luiting C., Vermeer B. J., Claas F. H., Mommaas A. M. 1997. *In situ* action spectra suggest that DNA damage is involved in ultraviolet radiation-induced immunosuppression in humans. *Photochem. Photobiol.* 66 : 76—81.
- Kibitel J., Hejmadi V., Alas L., O'Connor A., Sutherland B. M., Yarosh D. B. 1998. UV-DNA damage in mouse and human cells induces the expression of tumor necrosis factor alpha. *Photochem. Photobiol.* 67 : 541—546.
- Kripke M. L., Cox P. A., Alas L. G., Yarosh D. B. 1992. Pyrimidine dimers in DNA initiate systematic immunosuppression in UV-irradiated mice. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 89 : 7516—7520.
- Kripke M. L., Cox P. A., Bucana C., Vink A. A., Alas L., Yarosh D. B. 1996. Role of DNA damage in local suppression of contact hypersensitivity in mice by UV radiation. *Exp. Dermatol.* 5 : 173—180.
- Lankinen M. H., Vilpo L. M., Vilpo J. A. 1996. UV- and gamma-irradiation-induced DNA single-strand breaks and their repair in human blood granulocytes and lymphocytes. *Mutat. Res.* 352 : 31—38.
- Matsunaga T., Mu D., Park C. H., Reardon J. T., Sankar A. 1995. Human DNA repair excision nuclease. Analysis of the roles of the subunits involved in dual incisions by using anti-XPG and anti-ERCC1 antibodies. *J. Biol. Chem.* 270 : 20 862—20 869.
- Mitchell D. L., Clarkson J. M., Adair G. M. 1986. The DNA of UV-irradiated normal and excision-deficient mammalian cells undergoes relaxation in the initial stage of DNA repair. *Mutat. Res.* 165 : 123—128.
- Nishigori C., Yarosh D. B., Ullrich S. E., Vink A. A., Bucana C. D., Roza L., Kripke M. L. 1996. Evidence that DNA damage triggers interleukin 10 cytokine production in UV-irradiated murine keratinocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 93 : 10 354—10 359.
- Petit-Frere C., Clingen P. H., Grewe M., Krutmann J., Roza L., Arlett C. F., Green M. H. 1998. Induction of interleukin-6 production by ultraviolet radiation in normal human epidermal keratinocytes and in a human keratinocyte cell line is mediated by DHA damage. *J. Invest. Dermatol.* 111 : 354—359.
- Rosselli F., Duchaud E., Averbek D., Moustacchi E. 1994. Comparison of the effects of DNA topoisomerase inhibitors on lymphoblasts from normal and Fanconi anemia donors. *Mutat. Res.* 325 : 137—144.
- Roza L., van der Wulp K. J. M., MacFarlane S. J., Lohman P. H. M., Baan R. A. 1998. Detection of cyclobutane thymine dimers in DNA of human cells with monoclonal antibodies against a thymine dimmer-containing tetranucleotide. *Photochem. Photobiol.* 48 : 627—633.
- Rubbi C. P., Milner L. 2003. p35 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage. *EMBO J.* 22 : 975—986.
- Snopov S. A., Berg R. J. W., Van Weelden H., Samoilova K. A., van der Leun J. C., de Gruijl F. R. 1995. Molecular dosimetry by flow cytometric detection of thymine dimers in mononuclear cells from extracorporeally UV-irradiated blood. *J. Photochem. Photobiol.* 28 : 33—37.
- Snopov S. A., de Gruijl F. R., Roza L., van der Leun J. C. 2004. Immunochemical study of DNA modifications in nuclei of UV-damaged lymphocytes. *Photochem. Photobiol. Sci.* 3 : 85—90.
- Stege H., Roza L., Vink A. A., Grewe M., Ruzicka T., Grether-Beck S., Krutmann J. 2000. Enzyme plus light therapy to repair DNA damage in ultraviolet-B-irradiated human skin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 97 : 1790—1795.
- Thielmann H. W., Popanda O., Gersbach H., Gilberg F. 1993. Various inhibitors of DNA topoisomerases diminish repair-specific DNA incision in UV-irradiated human fibroblasts. *Carcinogenesis.* 14 : 2341—2351.
- Van der Schans G. P., van Loon A. A. W. M., Groenendijk R. H., Baan R. A. 1989. Detection of DNA damage in cells exposed to ionizing radiation by use of anti-single-stranded DNA monoclonal antibody. *Int. J. Radiat. Biol.* 55 : 747—760.
- Vink A. A., Henegouwen B., Nikaido O., Baan R. A., Roza L. 1994. Removal of UV-B-induced DNA lesions in mouse epidermis soon after irradiation. *J. Photochem. Photobiol.* 24 : 25—31.
- Vink A. A., Moodycliff A. M., Shreedhar V., Ullrich S. E., Roza L., Yarosh D. B., Kripke M. L. 1997. The inhibition of antigen-presenting activity of dendritic cells resulting from UV irradiation of murine skin is restored by *in vitro* photorepair of cyclobutane pyrimidine dimers. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 94 : 5255—5260.
- Westwood J. T., Clos J., Wu C. 1991. Stress-induced oligomerization and chromosomal relocalization of heat-shock factor. *Nature.* 353 : 822—827.
- Wood P. J., Stansfield A. G. 1992. Inhibition of T-cell mediated cytotoxicity by Novobiocin suggests multiple pathways for both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells. *Immunology.* 76 : 460—464.
- Yarosh D. B. 2002. Enhanced DNA repair of cyclobutane pyrimidine dimers changes the biological response to UV-B radiation. *Mutat. Res.* 509 : 221—226.
- Yarosh D. B., Alas L., Kibitel J., O'Connor A., Carrier F., Fornace A. G., jr. 1993. Cyclobutane pyrimidine dimers in UV-DNA induce release of soluble mediators that activate the human immunodeficiency virus promoter. *J. Invest. Dermatol.* 100 : 790—794.



RETARDED EXCISION OF PYRIMIDINE DIMERS  
IN HUMAN UNSTIMULATED LYMPHOCYTES*Sergei A. Snopov,<sup>1,\*</sup> Len Roza,<sup>2</sup> Frank R. de Gruijl<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, Russia, <sup>2</sup> Department of Nutritional Physiology, TNO Nutrition and Food Research, Zeist, The Netherlands, and <sup>3</sup> Department of Dermatology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands

Using immuno-labelling of cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) in nuclei of peripheral lymphocytes after their UVC-irradiation and cultivation, we have found that within the first four hours of cultivation the CPD-specific fluorescent signal from cell nuclei increased. Earlier, a similar increase in binding of antibody specific for pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts to undenatured DNA isolated from UV-irradiated Chinese hamster ovary cells was reported (Mitchell et al., 1986). Our experiments showed that nucleotide excision repair enzyme might induce such of DNA modification in lymphocyte nuclei that increased specific antibody binding to DNA fragments with lesions. We suggest that enzymatic formation of open structures in DNA predominated qualitatively over dual-incision and excision of these fragments, and resulted in the enhanced exposure of the pyrimidine dimers in nuclei to specific antibodies. The results evidence that nucleotid excision repair in unstimulated human lymphocytes being deficient in dual incision and removal of UV-induced DNA lesions appear to be capable of performing chromatin relaxation and pre-incision uncoiling of DNA fragments with lesions.

---