

## СООТНОШЕНИЕ 3' → 5'-ЭКЗОНУКЛЕАЗНОЙ И ДНК-ПОЛИМЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТЕЙ В НОРМАЛЬНЫХ И РАКОВЫХ КЛЕТКАХ ГРЫЗУНОВ И ЧЕЛОВЕКА

© Т. П. Кравецкая, Н. Л. Ронжина, В. М. Крутяков

Отделение молекулярной и радиационной биофизики Петербургского института ядерной физики им. Б. П. Константинова РАН, Гатчина;  
электронный адрес: [krut@omrb.pnpi.spb.ru](mailto:krut@omrb.pnpi.spb.ru)

Мутации в генах ДНК-полимераз или корректорских 3' → 5'-экзонуклеаз приводят к снижению точности биосинтеза ДНК по всему геному. Это сопровождается повышением вероятности мутагенеза и канцерогенеза. В настоящей работе исследованы активности 3' → 5'-экзонуклеаз и ДНК-полимераз в экстрактах нормальных и раковых клеток грызунов и человека, впервые измерены их интегральные соотношения с целью выяснения роли корректирующих экзонуклеаз в канцерогенезе. Так, в опытах на клетках, растущих в культуре, обнаружено, что в дермальных фибробластах взрослого человека величина отношения активности 3' → 5'-экзонуклеаз к ДНК-полимеразной активности (3'-экзо/пол) в несколько раз превосходит таковую величину для клеток HeLa. Аналогичная картина наблюдается и при сравнении нормальных фибробластов эмбрионов крысы и трансформированных фибробластов китайского хомячка A238. Опыты с экстрактами клеток некоторых органов здоровых крыс разного возраста показали, что в норме пролиферирующим клеткам свойственны более высокая активность 3' → 5'-экзонуклеаз и более высокое значение величины 3'-экзо/пол, чем покоящимся клеткам. Сопоставление этих данных позволяет сделать вывод о нарушении функции корректорских 3' → 5'-экзонуклеаз в патологически растущих раковых клетках.

Ключевые слова: 3' → 5'-экзонуклеазы, ДНК-полимеразы, нормальные и раковые клетки.

Принятые сокращения: КЭ — корректорские 3' → 5'-экзонуклеазы, 3'-экзо/пол — отношение активности 3' → 5'-экзонуклеаз к ДНК-полимеразной активности, МЭ — β-меркаптоэтанол, ФЛЭЧ — легочные фибробласты эмбрионов человека, MMR (mismatch repair) — система пострепликативной репарации гетеродуплексов, dNMP — дезоксинуклеозидмонофосфат.

Эукариотические ДНК-полимеразы, за исключением главной элонгирующей ДНК-полимеразы δ, ДНК-полимеразы ε, митохондриальной ДНК-полимеразы γ и специализированных ДНК-полимераз θ и σ, лишены собственной 3' → 5'-экзонуклеазной активности (Крутяков, 2006). Корректорские 3' → 5'-экзонуклеазы (КЭ), как связанные, так и не связанные ковалентно с ДНК-полимеразой, часто входят в состав комплексов с другими белками, исправляют ДНК-полимеразные ошибки, которые в отсутствие коррекции могут стать мутациями при следующем раунде репликации. Мутации в генах, в норме поддерживающих стабильность генома, в частности в генах ДНК-полимеразы θ (или) КЭ, нередко приводят к снижению точности биосинтеза ДНК по всему геному («катастрофа ошибок»), и клетка становится мутатором. Такие клетки отличаются повышенной частотой спонтанного и индуцированного мутагенеза по сравнению с клетками дикого типа, и вероятность канцерогенеза увеличивается (Крутяков, 1980; Loeb, 2001; Sarasin, 2003). В опытах на трансгенных мышах показано, что инактивация корректорской 3'-экзонуклеазной функции ДНК-полимеразы δ приводит к образованию множественных эпителиальных злокачественных опухолей (Goldsby et al., 2002). Обнаружено повышение активности репаративной ДНК-полимеразы β в злокачественных новообразованиях человека

(Wang et al., 1992; Dobashi et al., 1994; Matsuzaki et al., 1996), а также в опухолях мыши (Sweasy et al., 2005). В раковых клетках найдены мутантные формы этой полимеразы, проявляющие меньшую точность синтеза ДНК по сравнению с ДНК-полимеразой β дикого типа в 2 раза или более (Starcevic et al., 2004; Dalal et al., 2005; Chan et al., 2006). Суперпродукция специализированных ДНК-полимераз, склонных к ошибкам (Крутяков, 2006), таких как β, ι, κ и λ, была обнаружена в некоторых опухолях человека (Chan et al., 2006). КЭ, участвуя в исправлении ошибок ДНК-полимеразного синтеза, могут играть антимутагенную роль (Shevelev, Hubscher, 2002; Крутяков, 2004). Показано, что КЭ увеличивают до 30 раз точность работы ДНК-полимеразы α (Belyakova et al., 1993), β (Белякова и др., 2007) и δ (Шевелев и др., 2002), входя в состав комплексов с этими полимеразой. Пока неясна роль активации или инактивации КЭ в канцерогенезе. Интересны результаты, полученные на фагах, бактериях и грибах. Например, одновременная инактивация автономных (индивидуальных) 3'-экзонуклеаз I и VII у *Escherichia coli* сопровождается ростом вероятности спонтанного мутагенеза в 10—30 раз (Viswanathan, Lovett, 1998), инактивация экзонуклеазной функции субъединицы ε из холофермента ДНК-полимеразы III *E. coli* приводит к «катастрофе ошибок» и тотальному мутагенезу (Fijalkowska, Schaaper,

1996). Укорочение с 3'-конца гена автономной 3'-экзонуклеазы у базидиомицета *Ustilago maydis* увеличивает частоту спонтанного мутагенеза в 10—100 раз (Thelen et al., 1994; Onel et al., 1995). Сопоставление генетики и энзимологии бактериофага T4, у которого известны мутаторные и антимутаторные штаммы с изменением частоты спонтанного мутагенеза в обе стороны на два порядка величины по сравнению с диким типом, и эти признаки картируются в гене ДНК-полимеразы, кодирующем и 3' → 5'-экзонуклеазную активность, дало следующие результаты. В антимутаторных штаммах фага T4 наблюдается повышение в 10—20 раз величины отношения активностей 3'-экзо/пол по сравнению с диким типом, а в мутаторных штаммах, наоборот, понижение на порядок этой величины (Muzyczka et al., 1972).

В настоящей работе впервые измерена величина 3'-экзо/пол в нормальных и раковых клетках грызунов и человека с целью выяснения роли КЭ в канцерогенезе.

### Материал и методика

Клетки HeLa рака шейки матки, трансформированные фибробласты китайского хомячка линии A238, саркомы крысы линии RA235 и нормальные фибробласты эмбрионов крысы предоставлены Р. А. Пантиной (лаборатория клеточной биологии ОМРБ ПИЯФ РАН). Легочные фибробласты эмбрионов человека (ФЛЭЧ) приобретены в ГУ НИИ гриппа РАМН (Санкт-Петербург), дермальные фибробласты взрослого человека — в ООО «Центр клеточных технологий» (Институт цитологии РАН). Использовали белых беспородных крыс разного возраста, а также их эмбрионы (с 10 сут беременности — середина эмбриогенеза). Несколько самок после контакта с самцом рассаживали по отдельным клеткам, используя затем для получения эмбрионов разных сроков и новорожденных крысят, часть которых выращивали до разного возраста (0—120 сут). Масса взрослых крыс 130—160 г. Животных забивали эфирным наркозом. Как правило, в опыт брали не менее 3 животных.

Мы намеренно работали с экстрактами целых клеток, а не с отдельными клеточными компартментами и ферментами, чтобы предотвратить неизбежные и неравные потери изучаемого материала при фракционировании клеток.

Бесклеточные экстракты получали на холоде, используя стеклянный гомогенизатор Даунса и экстрагирующий раствор (5-кратный объем раствора по отношению к массе ткани, или на 10 млн клеток — 1 мл раствора), содержащий 10 мМ ЭДТА, 1%-ный Тритон X-100, 30 мМ буфер Трис-НСl, pH 7.4, 10 мМ β-меркаптоэтанол (МЭ). Через 1 ч к полученному лизату добавляли NaCl до 0.3 М, ингибитор сериновых протеаз фенилметилсульфонилфторид до 0.1 мМ и экстрагировали еще в течение 1 ч. Полученный после 30 мин центрифугирования (8000 об/мин) супернатант использовали в качестве экстракта, хранили его в 50 %-ном глицерине при температуре от -10 до -20 °С. Перед измерением ферментативной активности экстракт разводили 20 мМ буфером Трис-НСl, pH 8.0, до концентрации белка ~2.5 мг/мл. Концентрацию белка определяли по методу, предложенному Брэдфордом (Bradford, 1976), концентрацию ДНК — дифениламинным методом (Бартон, 1970). Свойства использованных реактивов и характеристика препаратов ДНК, равномерно меченной радиоактивными нуклеотидами и меченной толь-

ко по 3'-концам, описаны ранее (Belyakova et al., 1993). Препараты меченой ДНК предоставлены О. К. Легиной.

Экзонуклеазную и полимеразную активности измеряли при 37 °С в параллельных опытах в одинаковом объеме (150 мкл) и с одинаковым количеством экстракта (5, 10 или 20 мкл). Инкубационная смесь для ДНК-полимеразной реакции содержала 30 мМ буфер Трис-НСl, pH 7.4, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 100 мМ NaCl, 5 мМ МЭ, 20 мкМ dATP, dCTP и dGTP, 1 мкМ [<sup>3</sup>H]-ТТР и 70 мкг/мл активированной ДНК-матрицы (лососевой ДНК). Состав инкубационной смеси для нуклеазной реакции: 25 мМ буфер Трис-НСl, pH 7.4, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ МЭ, меченая однострессовая ДНК (4 мкг/мл). После инкубации пробы обрабатывали, как описано ранее (Белякова и др., 1980; Belyakova et al., 1993). Для определения 3' → 5'-экзонуклеазной активности на фоне эндонуклеаз, находящихся в экстракте, использовали параллельно два субстрата: 3'-[<sup>3</sup>H]-ДНК и равномерно меченную [<sup>14</sup>C]-ДНК. Анализ становится возможным благодаря тому, что 3' → 5'-экзонуклеаза имеет 10-кратное преимущество над эндонуклеазой при выщеплении меченых нуклеотидов из 3'-меченой ДНК по сравнению с равномерно меченой ДНК при прочих равных условиях. Кроме того, проводили измерения в присутствии и в отсутствие 0.2 М NaCl, которая подавляет эндонуклеазную активность (Шевелев и др., 1998).

Концентрации лимитирующих субстратов составляли 0.1 константы Михаэлиса, т. е. 4 мкг/мл 3'-[<sup>3</sup>H]-ДНК для экзонуклеазы и 1 мкМ [<sup>3</sup>H]-ТТР для ДНК-полимеразы.

Для расчетов использовали данные, полученные на начальных скоростях ферментативной реакции. Величину 3'-экзо/пол определяли как отношение количества выщепленных из ДНК нуклеотидов (пмоль) к количеству включенных в ДНК нуклеотидов (пмоль) за соответствующее время. При измерении ферментативных активностей концентрация белка экстракта в пробе составляла 80—160 мкг/мл, эндогенной ДНК 1.5—2 мкг/мл.

### Результаты и обсуждение

Рис. 1, а, б приведен в качестве примера и отражает зависимость ДНК-полимеразной активности (включение [<sup>3</sup>H]-ТМР в кислотонерастворимую фракцию ДНК) и 3' → 5'-экзонуклеазной активности (переход меченых dNMP из 3'-[<sup>3</sup>H]-ДНК в кислоторастворимую фракцию) от концентрации экстракта в пробе и времени инкубации для клеток HeLa и саркомы крыс RA235. Для всех клеток и тканей мы брали в расчет данные, где наблюдается линейная зависимость по этим параметрам, т. е. начальная скорость ферментативных реакций. Это дает возможность сравнивать результаты, полученные на разных объектах. Эндогенный синтез ДНК без добавления в инкубационную среду экзогенной активированной ДНК не был нами отмечен.

Как видно из данных табл. 1, величина 3'-экзо/пол в экстракте нормальных дермальных фибробластов взрослого человека в 4.5 раза выше, чем в экстракте клеточной линии человеческой эпителиальной карциномы HeLa (рак шейки матки). ФЛЭЧ незначительно (всего в 1.5 раза) превышают этот показатель по сравнению с клетками HeLa. Что касается грызунов, то в нормальных фибробластах эмбрионов крысы величина 3'-экзо/пол в 1.8 раза больше, чем в клетках саркомы крысы RA235, и в 8.3 раза выше, чем в трансформированных фибробластах китайского хомячка A238. Таким образом, в опытах с клеточ-

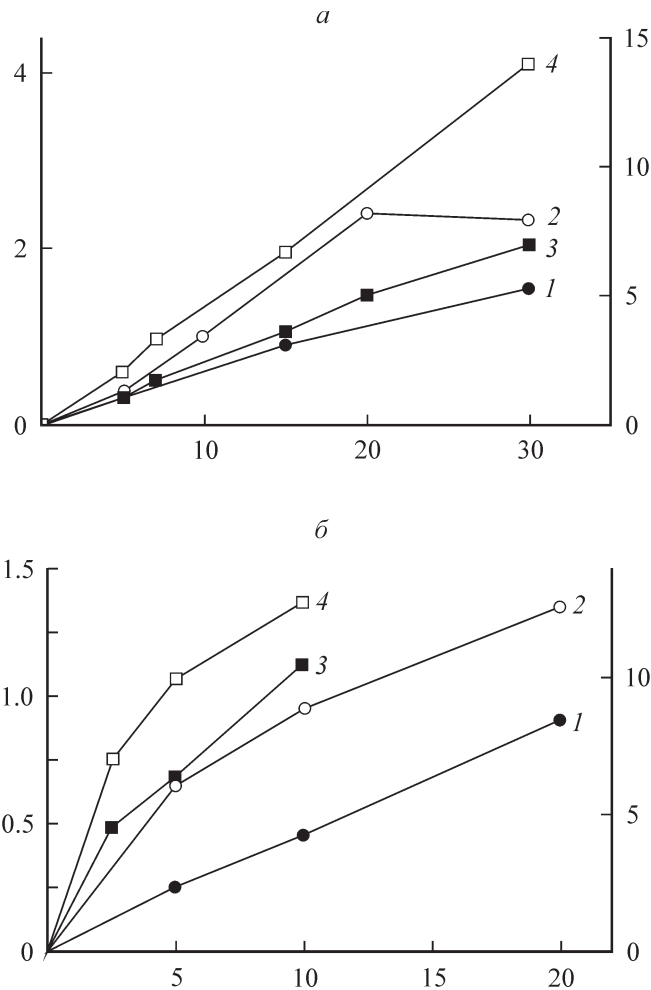


Рис. 1. ДНК-полимеразная и  $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазная активность в экстракте клеток HeLa (а) и саркомы крыс RA 235 (б).

По оси абсцисс — время инкубации, мин. По оси ординат: слева — включение  $[^3\text{H}]\text{-TMP}$  в кислотонерастворимую фракцию ДНК, распад/мин  $\times 10^{-3}$ ; справа — выщепление dNMP из  $3'\text{-}[^3\text{H}]\text{-ДНК}$  в кислоторастворимую фракцию ДНК, распад/мин  $\times 10^{-3}$ ; ДНК-полимеразная активность при концентрации белка в инкубационной среде 80 (1) или 160 (2) мкг/мл и  $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазная активность соответственно 3, 4.

ными культурами наблюдается достоверное уменьшение величины  $3'$ -экзо/пол в раковых и трансформированных клетках, которые мы исследовали, по сравнению с нормальными клетками.

Кроме того, мы измерили интегральные соотношения  $3'$ -экзо/пол в экстрактах клеток различных органов здоровых взрослых крыс — самца и беременной самки (табл. 2), пол животных не влиял на эти показатели. В быстро пролиферирующих тканях, где идет активная репликация, а именно в селезенке, величина  $3'$ -экзо/пол в 5.8 раза превышает таковую для печени, имеющей потенциальную способность к репликации, и в 15 раз — для сердца и мозга, клетки которых практически не способны к репликации.

На рис. 2 представлена удельная  $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазная активность в бесклеточных экстрактах (цитозоль + ядерный экстракт) некоторых органов крысы в зависимости от возраста. Видно, что примерно в последней трети эмбриогенеза ( $-7$  сут) селезенка, печень, сердце и головной мозг имеют одинаковые показатели, но уже в последней четверти эмбриогенеза ( $-4$  сут) в селезенке отмеча-

Таблица 1

Соотношение  $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазной и ДНК-полимеразной активностей ( $3'$ -экзо/пол) в экстрактах нормальных и раковых клеток грызунов и человека, растущих в культуре

Клетки	$3'$ -экзо/пол
HeLa	$13 \pm 1$
Легочные фибробласты эмбрионов человека	$19 \pm 4$
Дермальные фибробласты взрослого человека	$58 \pm 4$
Трансформированные фибробласты китайского хомячка A238	$7 \pm 1$
Саркома крысы RA235	$32 \pm 2$
Нормальные фибробласты эмбрионов крысы	$58 \pm 6$

ся заметное повышение  $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазной активности, и она продолжает возрастать по сравнению с таковой активностью в других органах в течение всего срока наблюдения (до 120 сут). В головном мозге эта активность держится на уровне эмбрионов и возрастает у новорожденных и молодых крысят, но к моменту взросления (после 30 сут) значительно снижается.

Таким образом, в норме пролиферирующим тканям свойственны в несколько раз более высокая  $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазная активность (рис. 2) и более высокое значение величины  $3'$ -экзо/пол (табл. 2), чем покоящимся клеткам. Сравнение данных табл. 1 и 2 наводит на мысль о том, что в быстро размножающихся раковых клетках нарушена функция КЭ. Действительно, чем быстрее размножаются клетки (например, селезенки), тем выше  $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазная активность и соответственно величина  $3'$ -экзо/пол в здоровых клетках. Для раковых клеток также характерен быстрый рост, однако величина  $3'$ -экзо/пол существенно ниже. Чем выше репликативный статус клетки, тем быстрее идут обменные процессы, биосинтез ДНК и белка, и возможные неточности ДНК-полимеразного синтеза нуждаются в коррекции, т. е. интенсивному росту клеток должен соответствовать определенный уровень величины  $3'$ -экзо/пол.

Возможно, высокое соотношение  $3'$ -экзо/пол в пролиферирующих здоровых тканях обеспечивает нормальную пролиферацию. При патологически бурном росте мутаторных клеток не хватает активности КЭ, что выражается в более низком значении  $3'$ -экзо/пол, тогда как в нормальных дифференцированных клетках аналогичное значение  $3'$ -экзо/пол может быть достаточным для того, чтобы поддерживать точный синтез ДНК. Если в процессе репликации ДНК ошибка синтеза не удалена КЭ, образуется гете-

Таблица 2

Соотношение  $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазной и ДНК-полимеразной активностей ( $3'$ -экзо/пол) в экстрактах клеток некоторых органов взрослых крыс

Органы	$3'$ -экзо/пол
Печень	$13 \pm 1$
Селезенка	$75 \pm 7$
Сердце	$5 \pm 2$
Головной мозг	$5 \pm 1$



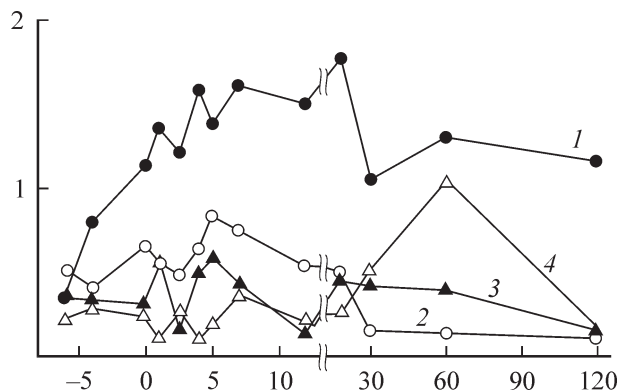


Рис. 2. Удельная активность 3' → 5'-экзонуклеазы в экстрактах органов крысы.

По оси абсцисс — возраст крысы, сут; по оси ординат — выщепление меченых нуклеотидов из однонитивой 3'-[<sup>3</sup>H]-ДНК за 1 мин на 1 мкг белка экстракта, %. 1 — селезенка, 2 — головной мозг, 3 — сердце, 4 — печень.

родуплекс, который затем может быть устранен системой пострепликативной репарации «mismatch repair» (MMR), состоящей из продуктов четырех генов — *hMSH2*, *hMSH6*, *hMLH1* и *PMS2*. Мутации в любом гене MMR являются причиной наследственного колоректального рака, дефекты MMR приводят к значительному увеличению уровня спонтанных мутаций в различных организмах от бактерий до человека и обнаружены во многих случаях спорадических раков (Hsieh, Yamane, 2008).

Следовательно, система пострепликативной репарации MMR и КЭ дополняют друг друга в процессе биосинтеза ДНК в клетках. Под действием различных мутагенных факторов возрастает репаративный синтез ДНК (Крутяков и др., 1985) и вероятность «ошибок» при репликации ДНК увеличивается. Можно предположить, что при канцерогенезе дефекты MMR приводят к тому, что клетки нуждаются в более высоком уровне 3'-экзо/пол и КЭ.

### Список литературы

- Бартон К. 1970. Определение концентрации ДНК с помощью дефениламина. В кн.: Методы исследования нуклеиновых кислот. М.: Мир. 7—10.
- Белякова Н. В., Кравецкая Т. П., Легина О. К., Ронжина Н. Л., Шевелев И. В., Крутяков В. М. 2007. Комплекс репаративной ДНК-полимеразы β с автономной 3' → 5'-экзонуклеазой проявляет повышенную точность синтеза ДНК. Изв. РАН. Сер. биол. 5 : 517—523.
- Белякова Н. В., Нарыжный С. Н., Крутяков В. М. 1980. Механизм активирующего действия АТР на репаративный синтез ДНК в хроматине. Молекуляр. биол. 14 (3) : 586—594.
- Крутяков В. М. 1980. Надежность синтеза ДНК в связи с проблемами мутагенеза, канцерогенеза и клеточного старения. В кн.: Повреждения и репарация ДНК. Пушино: Научный центр биологических исследований АН СССР. 95—107.
- Крутяков В. М. 2004. Антимутагенная роль автономных 3' → 5'-экзонуклеаз. Молекуляр. биол. 38 (5) : 823—833.
- Крутяков В. М. 2006. Эукариотические ДНК-полимеразы, склонные к ошибкам: предполагаемая роль в репликации, репарации и мутагенезе. Молекуляр. биол. 40 (1) : 3—11.
- Крутяков В. М., Белякова Н. В., Кравецкая Т. П., Нарыжный С. Н. 1985. Ферментативные и структурные механизмы репарации ДНК в выделенном хроматине млекопитающих. Изв. АН СССР. Сер. биол. 4 : 562—571.
- Шевелев И. В., Белякова Н. В., Кравецкая Т. П., Крутяков В. М. 2002. Корректорская роль автономных 3'-5'-экзонук-

леаз в составе мультиферментных ДНК-полимеразных комплексов млекопитающих. Молекуляр. биол. 36 (6) : 1054—1061.

Шевелев И. В., Легина О. К., Тутавев К. Ю., Крутяков В. М. 1998. Сильное ингибирование активности эндонуклеаз при физиологических значениях ионной силы. Молекуляр. биол. 12 (4) : 741—744.

Belyakova N. V., Kleiner N. E., Kravetskaya T. P., Legina O. K., Naryzhny S. N., Perrino F. W., Shevelev I. V., Krutyakov V. M. 1993. Proofreading 3' → 5'-exonucleases isolated from rat liver nuclei. Eur. J. Biochem. 217 : 493—500.

Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 : 248—254.

Chan K. K., Zhang Q. M., Dianov G. L. 2006. Base excision repair fidelity in normal and cancer cells. Mutagenesis. 21 : 173—178.

Dalal S., Hile S., Eckert K. A., Sun K. W., Starcevic D., Sweasy J. B. 2005. Prostate-cancer-associated 1260M variant of DNA polymerase β is a sequence-specific mutator. Biochemistry. 44 : 15 664—15 673.

Dobashi Y., Shuin T., Tsuruga H., Uemura H., Torigoe S., Kubota Y. 1994. DNA polymerase β gene mutation in human prostate cancer. Cancer Res. 54 : 2827—2829.

Fijalkowska I. J., Schaaper R. M. 1996. Mutants in the ExoI motif of *Escherichia coli* dna Q: defective proofreading and inviability due error catastrophe. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 93 : 2856—2861.

Goldsby R. E., Hays L. E., Chen X., Olmsted E. A., Slayton W. B., Spangrude G. J., Preston B. D. 2002. High incidence of epithelial cancers in mice deficient for DNA polymerase δ proofreading. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 99 : 15 560—15 565.

Hsieh P., Yamane K. 2008. DNA mismatch repair; molecular mechanism, cancer and ageing. Mech. Ageing Dev. 129 : 391—407.

Loeb L. A. 2001. A mutator phenotype in cancer. Cancer Res. 61 : 3230—3239.

Matsuzaki J., Dobashi Y., Miyamoto H., Ikeda I., Fujinami K., Shuin T., Kubota Y. 1996. DNA polymerase β gene mutations in human bladder cancer. Mol. Carcinog. 15 : 38—43.

Muzyczka N., Poland R. L., Bessman M. J. 1972. Studies of the biochemical bases of spontaneous mutations. I. A comparison of the DNA polymerases of mutator, antimutator and wild type strains of bacteriophage T4. J. Biol. Chem. 247 : 7116—7122.

Onel K., Thelen M. P., Ferguson D. O., Bennett R. L., Holloman W. R. 1995. Mutation avoidance and DNA repair proficiency in *Ustilago maydis* are differentially lost with progressive truncation of the REC1 gene product. Cell Biol. 15 : 5329—5338.

Sarasin A. 2003. An overview of mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis. Mutat. Res. 544 : 99—106.

Starcevic D., Hubscher U. 2002. The 3' → 5'-exonucleases. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 3 : 364—376.

Starcevic D., Dalal S., Sweasy J. B. 2004. Is there a link between DNA polymerase β and cancer? Cell Cycle. 3 : 998—1001.

Sweasy J. B., Lang T., Starcevic D., Sun K. W., Lai C. C., DiMaio D., Dalal S. 2005. Expression of DNA polymerase β cancer-associated variants in mouse cells results in cellular transformation. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 102 : 14 350—14 355.

Thelen M. P., Onel K., Holloman W. K. 1994. The REC1 gene of *Ustilago maydis* involved in the cellular response to DNA damage, encodes an exonuclease. J. Biol. Chem. 269 : 747—754.

Viswanathan M., Lovett S. T. 1998. Single-strand DNA-specific exonucleases in *Escherichia coli*. Roles in repair and mutation avoidance. Genetics. 149 : 7—16.

Wang L., Patel U., Gosh L., Banerjee S. 1992. DNA polymerase β mutations in human colorectal cancer. Cancer. Res. 52 : 4824—4827.

Поступила 20 V 2009

## RATIO OF 3' → 5'-EXONUCLEASE AND DNA-POLYMERASE ACTIVITIES IN NORMAL AND CANCER CELLS OF RODENTS AND HUMANS

*T. P. Kravetskaya, N. L. Ronzhina, V. M. Krutyakov*

B. P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute RAS,  
Division of Molecular and Radiation Biophysics, Gatchina;  
e-mail: krut@omrb.pnpi.spb.ru

Mutations in the genes of corrective 3' → 5'-exonucleases as well as in DNA polymerases lead to decrease in DNA biosynthesis accuracy all over genome. This is accompanied by the increase in mutagenesis and carcinogenesis probabilities. In this work, the activities of 3' → 5'-exonucleases and DNA polymerases were studied in the extracts from normal and cancer cells of rodents and humans, and we are the first to measure their integral ratios. As example, in cultivated dermal fibroblasts of an adult human, the value of the ratio of activities of 3' → 5'-exonucleases to DNA polymerase activity (3'-exo/pol) surpassed several folds the such a value for He-La cells. Similar picture was observed during the comparison of normal fibroblasts of rat embryos and transformed fibroblasts of Chinese hamster A238. Experiments with cell-free extracts of some organs from healthy rats of various ages have shown that normal proliferating cells demonstrate higher 3' → 5'-exonuclease activity and higher values of 3'-exo/pol that quiescent cells. Comparison of these data suggests a violation of the function of corrective 3' → 5'-exonucleases in abnormally growing cancer cells.

Key words: 3' → 5'-exonucleases, normal cells, cancer cells.

---