

## Роль O<sup>6</sup>-алкилгуанин-ДНК алкилтрансферазы в репарации повреждений, индуцированных алкилирующими соединениями

Л. Л. Лукаш, В. Г. Манько, В. В. Лыло

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины  
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

---

*Обзор посвящен теоретическому изучению и практическому применению алкилтрансфераз, осуществляющих защиту клеток от цитотоксического и мутагенного воздействия алкилирующих соединений путем восстановления повреждений в ДНК*

---

Репарация первичных повреждений, индуцированных внешними и внутренними мутагенными факторами, является ключевым моментом мутационного процесса. В восстановлении первичных повреждений, вызванных алкилирующими соединениями, которые широко используются в производственных целях и медицине, решающую роль играет уникальный репаративный фермент O<sup>6</sup>-алкилгуанин-ДНК алкилтрансфераза (АГТ) [1].

Алкилтрансферазная активность в про- и эукариотических клетках. Наличие в клетках АГТ является важнейшим компонентом клеточной устойчивости к токсическому и мутагенному эффекту алкилирующих соединений. Этот белок можно выделить из различных источников, включая бактерии, дрожжи, клетки млекопитающих [2]. В процессе изучения белков, выделенных из нормальных и трансформированных клеток, было установлено, что происходит перенос алкильной группы из ДНК на акцепторный цистеиновый сайт, который впоследствии был локализован в структуре АГТ [3]. АГТ особенно эффективно восстанавливает O<sup>6</sup>-метилгуанин в алкилированной ДНК, перенося алкильную группу из O<sup>6</sup>-позиции гуанина на собственный цистеиновый остаток. В результате одной акции переноса молекула белка инактивируется, поскольку образовавшийся S-алкилцистеин не превращается обратно в цистеин [3, 4]. Первая

детально изученная и охарактеризованная алкилтрансфераза получена в процессе клонирования и секвенирования гена *ada* у *Escherichia coli*.

Белок с молекулярной массой (м. м.) 39 кДа состоит из двух доменов, разделенных петлей, и эта область чувствительна к протеазе [5]. Обработка трипсином в малых дозах позволяет разделить двойной домен АГТ на два активных фрагмента. С-терминальная часть с м. м. 19 кДа выполняет роль акцептора метильных остатков O<sup>6</sup>-метилгуанина, а N-терминальная часть с м. м. 20 кДа служит акцептором метильных групп метилированных фосфотриэфиров. Предполагают, что N-терминальная часть молекулы АГТ выполняет регуляторные функции, связанные с индукцией синтеза молекул этого фермента *de novo* в клетках *E. coli* при воздействии N-алкилнитрозомочевины (АНМ), характеризующейся высокой противоопухолевой активностью [6]. В геноме *E. coli* есть также другой ген — *ogt*, кодирующий способность АГТ репарировать O<sup>6</sup>-алкилгуанин или O<sup>4</sup>-алкилтимин [7, 8]. Продуктом этого гена является белок с м. м. 19 кДа, который отличается от карбоксильного терминального домена белкового продукта, кодируемого геном *ada*, но имеет и значительную гомологию (до 29 %) с этим белком. В отличие от белкового продукта гена *ada*, являющегося высокоиндуцибельным, продукт гена *ogt* не индуцируется под влиянием алкилирующих агентов, и содержание его в клетках очень низкое.

В неиндуцированных клетках ген *ogt* обеспечи-

ваает достаточную алкилтрансферазную активность [8, 9]. Значительное количество этого белка получено и очищено после субклонирования гена в мультিকопийном экспрессирующем векторе [8]. Подобные белки с алкилтрансферазной активностью выделены из бактериальных экстрактов различного происхождения, включая *Salmonella typhimurium* [9] *Bacillus subtilis* [10]. Последняя имеет два различных гена: *adaA*, чей белковый продукт соответствует метилфосфотриэфирному репарационному домену, и *adaB*, соответствующий домену, восстанавливающему O<sup>6</sup>-метилгуанин [11]. В клетках млекопитающих также были выявлены белки с алкилтрансферазной активностью [8]. Дэй и соавт. обнаружили, что некоторые линии клеток не способны поддерживать размножение аденовируса типа 5, геном которого поврежден алкилирующим агентом N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (MNNG) [12]. Этот фенотип описан как *Mer<sup>-</sup>*. Впоследствии было установлено, что такие клетки не обладали алкилтрансферазной активностью и были высокочувствительными к цитотоксическому и мутагенному действию АНМ. Клетки, отнесенные к фенотипу *Mer<sup>+</sup>*, отличались высоким уровнем активности фермента O<sup>6</sup>-алкилтрансферазы и были устойчивы к повреждающему действию АНМ. Причина появления фенотипа *Mer<sup>-</sup>* неясна, так как исходно фибробласты из опухоли пациента, которые послужили источником получения установленной клеточной линии *in vitro*, были *Mer<sup>+</sup>* [13]. Поэтому можно было предположить, что потеря алкилтрансферазной активности опухолевыми клетками является результатом длительного культивирования.

Впоследствии было установлено, что около 60 % клеточных линий, трансформированных вирусами, имеют фенотип *Mer<sup>-</sup>*. Среди клеточных линий, полученных из опухолей человека, только 20 % не содержат алкилтрансферазной активности [13]. Трансформация клеток мыши под влиянием онковирусов также приводила к потере данной активности. Однако среди линий фибробластов мыши, не подвергавшихся трансформации, были выявлены две, дефектные по АГТ [13]. Проведение специальных экспериментов по превращению клеток *Mer<sup>+</sup>* в клетки *Mer<sup>-</sup>* под влиянием вирусов SV40 и Эпштейна-Барра показало, что потеря алкилтрансферазной активности не связана ни со злокачественной трансформацией, ни с долговременным культивированием [14, 15]. Каррен и соавт. определили, что потеря алкилтрансферазной активности при культивировании двух человеческих лимфобластоидных линий сочетается с потерей тимидинкиназной и галактокиназной активности. Было

высказано предположение о том, что сочетанная экспрессия трех указанных локусов регулируется генами, расположенными на хромосоме 17 [16].

Алкилтрансферазы в различных тканях млекопитающих. Известно, что высокая противоопухолевая активность АНМ, наблюдающаяся при терапии экспериментальных опухолей у животных, не реализуется при лечении опухолей человека. Причиной низкой эффективности такого лечения является в первую очередь высокий уровень фермента АГТ. Сравнение уровней активности АГТ в нормальных и опухолевых клетках человека и мышей показало, что клетки опухолей, а также фибробласты, трансформированные вирусом SV40, отличаются высоким уровнем ферментативной активности. Нормальные клетки в большинстве случаев имеют фенотип *Mer<sup>+</sup>* [12, 17—19].

Предполагают, что утрата опухолевыми клетками способности к репарации O<sup>6</sup>-метилгуанина вызвана не мутациями, а регуляторным изменением уровня экспрессии гена, кодирующего АГТ, так как продукты активированных онкогенов прямо или опосредованно предотвращают его экспрессию [20, 21]. При трансформации нормальных Т-лимфоцитов с относительно невысоким уровнем экспрессии АГТ (31000 молекул белка на клетку) количество молекул белка существенно возрастает (до 70000—125000). Чувствительность различных лимфоидных клеток к алкилирующему агенту MNNG коррелирует с уровнем экспрессии гена для АГТ [22]. Анализ содержания АГТ в семи различных тканях крыс выявил наибольшую активность фермента в печени и наименьшую — в мозге. Высокий уровень АГТ в печени способствует быстрой репарации наиболее мутагенно опасного повреждения, индуцированного АНМ. Поэтому опухоли гораздо чаще возникают в мозге крыс, где уровень АГТ значительно ниже [23]. Воздействие алкилирующих канцерогенов вызывает увеличение алкилтрансферазной активности в печени крыс в 3 раза. Повышение активности алкилтрансфераз в печени наблюдается в ответ на частичную гепатэктомию или на различные гепатоксины и канцерогены, не являющиеся алкилирующими агентами [1, 24]. Изменение уровня активности алкилтрансфераз наблюдалось в печени и почках крыс после эндокринной стимуляции и действия интерферона [25]. Увеличение активности АГТ происходило в культуре клеток крысиных гепатом в ответ на воздействие MNNG и других алкилирующих агентов [26]. Изменение количества алкилтрансферазы наблюдалось на протяжении клеточного цикла мышечных эмбриональных фибробластов и человеческих предшественников лейкемических клеток. Мини-

мальный уровень отмечен в начале S-фазы, количество фермента увеличивалось в G<sub>2</sub>-фазе и особенно — в фазе G<sub>0</sub> [27]. Воздействие гамма-облучения приводит к повышению АГТ-активности в различных тканях организма крыс и в культурах клеток [28—30]. Предполагают, что образование разрывов в ДНК под влиянием радиации усиливает экспрессию гена АГТ [31].

Свойства алкилтрансферазы млекопитающих. Митра и соавт. определили, что человеческая алкилтрансфераза имеет м. м. около 22 кДа и состоит из 207 аминокислотных остатков. Участок белка между 106-м и 169-м остатками, содержащий последовательность цистеинового акцепторного сайта, гомологичен участку белкового продукта гена *ogt* (между 103-м и 163-м аминокислотными остатками) и белкового продукта гена *ada* (285—345 аминокислотные остатки) *B. subtilis*. Точно определено, что цистеин 145 белка человека является акцептором метильных групп [32]. Алкилтрансфераза человека не нуждается в кофакторе и имеет оптимальное значение pH 7,8 — 8,5 [32]. Каждая молекула фермента может стехиометрически связываться только с одной метильной группой O<sup>6</sup>-метилгуанина [33, 34]. Ферментативная реакция протекает очень быстро (в течение 1 с при 37 °C), и образуется S-цистеин, который практически не регенерируется [33, 34]. Эта реакция известна как «механизм самоубийства», с помощью которого клетка защищается от мутагенного и цитотоксического повреждения [35]. Алкилтрансферазы ингибируются ионами металлов, таких как Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Ag<sup>2+</sup> и Pb<sup>2+</sup>. В большинстве случаев эта инактивация может быть прервана при добавлении дитиотрептола в высокой концентрации за счет взаимодействия тиольных групп с ионами металла [34, 36, 37].

Субстратная специфичность АГТ. Общеизвестно, что алкилтрансферазы наиболее быстро реагируют с аддуктами O<sup>6</sup>-позиций гуанина. Установлено также, что соответствующие белковые продукты генов *ada* и *ogt* способны переносить метильные группы с O<sup>4</sup>-метилтимина на собственный цистеиновый остаток [4, 38—42]. Существуют доказательства того, что алкилтрансферазы различного происхождения реагируют с олигодезоксинуклеотидами, содержащими O<sup>4</sup>-метилтимин [43]. Получение человеческой рекомбинантной алкилтрансферазы позволило изучить реакцию фермента с O<sup>4</sup>-метилтиминном в ДНК.

Оказалось, что скорость репарации составляет 1/5500 скорости действия человеческой и 1/200 — крысиной трансфераз по сравнению с репарацией O<sup>6</sup>-метилгуанина в ДНК [44]. Показано, что раз-

личные алкильные группы могут переноситься с помощью алкилтрансферазы из позиции O<sup>6</sup>-гуанина в ДНК. Этот ряд включает метил-, этил-, *n*-пропил-, *n*-бутил-, 2-хлорэтил-, 2-гидроксиэтил-, изопропил-, изобутил-, бензил- [38, 39, 41, 45—50] и, возможно, пиридилоксибутил [51]. С алифатическими алкильными группами скорость репарации уменьшается с увеличением размера группы. Неспособность микробных алкилтрансфераз к реакции с O<sup>6</sup>-бензилгуанином демонстрирует видовую специфичность, связанную со скоростью репарации различных субстратов. Установлено, что алкилтрансферазы бактерий и млекопитающих отличаются по их способности взаимодействовать с большими алкильными аддуктами [4, 8, 38, 41, 47]. Спратт с соавт. предположили, что активный сайт *ada* Агт более гибкий, чем человеческий Агт и *ada* Агт реагирует с O<sub>4</sub>-метилтиминном активнее, чем *h* Агт [39]. Лучшее понимание биохимической основы различий в скорости репарации дает сравнительное изучение алкилтрансфераз, содержащих точечные мутации.

Эти исследования открыли поразительные различия между человеческими и крысиными алкилтрансферазами по скорости репарации O<sup>6</sup>-этилгуанина в додекамерном субстрате [50]. Штаммы *ada<sup>-</sup>ogt<sup>-</sup> E. coli* отличались повышенной частотой спонтанных мутаций [52]. Это может происходить благодаря эндогенному алкилированию S-аденозилметионином или другими метилирующими агентами. Но при этом следует отметить, что наблюдалось увеличение частоты мутаций различных типов, а не только специфических транзиций, которые являются следствием замены гуанина на аденин при действии простых метилирующих агентов.

Специфичность репарации ДНК алкилтрансферазами. Последовательная специфичность действия алкилтрансфераз может быть изучена с применением олигодезоксирибонуклеотидных субстратов, содержащих O<sup>6</sup>-алкилгуанин в определенной последовательности [38, 50, 53—55]. Показано, что двунитчатые додекамеры способны обеспечить скорость репарации, соответствующую восстановлению высокомолекулярной ДНК. А в более поздней работе [52] указывается, что октамеры могут быть достаточны для репарации. Алкилтрансферазы млекопитающих восстанавливают O<sup>6</sup>-метилгуанин во всех исследуемых последовательностях, но есть различия в скорости репарации [4, 8, 38, 41, 54—56]. Наличие гуанина на 5'-конце O<sup>6</sup>-метилгуанина уменьшает скорость репарации [55]. А O<sup>6</sup>-метилгуанин, находящийся в последовательности -Gm6GA-, которая соответствует «горячей точке» мутации 12-го кодона *H-ras*-протоонкогена, восста-

навливается чрезвычайно медленно *ada*-алкилтрансферазой [56, 57].

Изучение трансформации клеток Rat-4 с помощью  $O^6$ -замещенных гуанинов, встроенных в кодон 12 (GGA) крысиного гена *H-ras*, показало, что наибольшая трансформирующая способность  $O^6$ -метилгуанинов проявляется в клетках, дефицитных по алкилтрансферазе [60]. При этом, когда модифицированное основание было встроено на место второго гуанинового остатка кодона 12, эффект был выражен ярче. Эти данные указывают на более эффективную репарацию алкилтрансферазой последовательности  $-m^6GGA-$  сравнительно с последовательностью  $-Gm^6GA-$  в клетках млекопитающих. Полагают, что репарационные различия обусловлены силой взаимодействия между  $5'$ -предшествующим основанием и  $O^6$ -метилгуанином [59]. Доступность  $O^6$ -алкилгуаниновых оснований в ядерной ДНК для АГТ зависит от хроматиновой структуры и активности транскрипции [61]. Наиболее быстрая репарация наблюдалась у активно транскрибированных генов [60], но нет уверенности в том, что репарация осуществлялась именно АГТ. Более 90 %  $O^6$ -метилгуанинов, образовавшихся в результате воздействия метилнитрозомочевины, восстанавливались за 2 ч, а другие репарировались очень медленно — в течение 48 ч.

В ядерных матричных ДНК постоянно происходят первичные повреждения. Практически все аддукты могут быть восстановлены *ada*-алкилтрансферазой *in vitro*, если ядерная ДНК очищена. По-видимому, упаковка ДНК в хроматиновую структуру в значительной степени влияет на ее доступность для репаративных ферментов.

Структура и функция гена АГТ. Человеческий алкилтрансферазный ген локализуется на теломерном участке длинного плеча хромосомы 10 [61]. Мышиный и человеческий алкилтрансферазные гены охарактеризованы недостаточно по сравнению с бактериальными. Ген млекопитающих, очевидно, очень больших размеров, от 145 тыс. п. н. у мышей до 170 тыс. п. н. у человека [62, 63], однако транскрибируются около 950 нуклеотидов. Ген состоит из пяти экзонов и двух очень больших интронов (около 46 и более 50 тыс. п. н.), фланкирующих экзон III [63]. Разностороннее изучение роли алкилтрансферазы как компонента клеточных защитных систем от цитотоксического, мутагенного и канцерогенного воздействий привело исследователей к формулировке трех основных положений. Во-первых, существует обратная корреляция между уровнем активности АГТ и чувствительностью клеток к воздействию метилирующих и хлорэтилирующих агентов. Во-вторых, эксперименты по

трансфекции гена АГТ в клетки показали, что экспрессия про- или эукариотической кДНК в клетках млекопитающих защищает их от вредного воздействия производных АНМ. И, в-третьих, взаимодействие клеток с веществами, истощающими алкилтрансферазную активность при воздействии на них алкилирующих агентов, вызывает увеличение числа кросс-линков, сестринских хроматидных обменов, мутаций и летальности по сравнению с контрольными клетками.

Как указывалось ранее, алкилтрансферазы играют главную роль в устойчивости клеток к химиотерапевтическим агентам, вызывающим первичные повреждения в позиции  $O^6$ -гуанина [35, 38, 65—67]. Экспрессия гена *ada* или соответствующего гена млекопитающих в клетках с фенотипом *Mer*<sup>-</sup> защищает их от летального воздействия алкилирующих соединений [4, 38]. Экспрессия алкилтрансферазы *ogt*, обладающей протекторными свойствами против  $O^4$ -алкилтимина, препятствует губительному действию этилирующих и бутилирующих агентов [68]. Низкую эффективность воздействия АНМ можно прогнозировать в опухолях с высоким уровнем экспрессии алкилтрансферазы. Корреляция между уровнем фермента и эффективностью воздействия нитрозомочевины наблюдалась в опытах на бестимусных мышах с опухолями прямой кишки, культурах клеток рабдомиосаркомы и биопсийном материале глиом человека [69—71]. Важно учесть, что высокая противоопухолевая активность алкилнитрозомочевины в модельных экспериментах на опухолях животных реализуется далеко не столь успешно при лечении человека.

Нужно подчеркнуть, что в биопсийном и хирургическом материале исходный уровень АГТ был достаточно высок, но при культивировании этих клеток их ферментативная активность снижалась [72—73]. Клетки с фенотипом *Mer*<sup>-</sup> и клетки, подвергавшиеся воздействию инактиваторов алкилтрансферазы, отличались увеличением частоты кросс-линков [4, 38, 74—78].

Антимутагенные свойства алкилтрансфераз. В то время, как некоторые ДНК-аддукты способствуют инициации мутаций,  $O^6$ -алкилгуанин и  $O^4$ -метилтимин, продуцируемые алкилирующими агентами, являются главным фактором мутаций, так как ведут к ошибочному кодированию [1, 24, 79—82]. Наиболее мутагенно опасный аддукт  $O^6$ -метилгуанин взаимодействует с тиминном вместо цитозина во время репликации ДНК и индуцирует транзиции типа GC-AT [1, 24, 79—81, 83—85]. Изучение мутагенеза в человеческих клетках показало, что MNNG продуцирует намного больше мутантов в клетках *Mer*<sup>-</sup> [4, 38]. А трансфекция

таких клеток плазмидами, содержащими ген, кодирующий АГТ, уменьшает частоту упомянутых мутаций [4, 38, 86].

Инактивация алкилтрансферазы с помощью  $N^6$ -бензилгуанина ведет к увеличению количества мутаций [87]. Подобным образом модуляция алкилирующей активности у бактерий также существенно влияет на частоту мутаций, индуцированных различными алкилирующими агентами [40, 88, 89]. Присутствие алкилтрансферазы в клетках различного происхождения (бактерии, клетки млекопитающих линии СНО) приводит к снижению темпа спонтанного мутирования, так как АГТ защищает их от эндогенного метилирования [26, 90]. Интересно, что процент мутаций, не являющихся транзитами GC-AT, был больше в тех экспериментах, где мутации определяли в бифункциональной векторной плазмиде, а не в эндогенном гене [86, 87, 91—97]. Это, по-видимому, связано с тем, что экстрахромосомное состояние плазмидных молекул не позволяет осуществлять эффективную репарацию разрывов ДНК, возникающих в результате депуринизации. В целом ряде работ показано неслучайное распределение мутаций в гене HPRT и других генах-мишенях после обработки клеток MNNG или иными алкилирующими агентами [86, 87, 94—97].

Установлено, какие нуклеотидные последовательности являются «горячими точками» (hot spots): это, в частности, второй гуанин в последовательности GGR. Подобный эффект наблюдался в экспериментах по изучению мутаций в определенных генах-мишенях у кишечной палочки, когда последовательность RG оказывалась наиболее мутабельной [99—101]. Интересно, что можно провести параллель между этими результатами и мутациями в генах *K-ras* и *Ha-ras* опухолевых клеток, возникших в результате обработки алкилирующим агентом: транзиции наблюдались исключительно во втором гуанине кодона 12 (GGA) [93, 102—104]. Другие особенности, объясняющие специфичность мутагенного действия алкилирующих агентов, связаны с различиями в скорости и эффективности репарации индуцированных повреждений с помощью АГТ.

Кроме того, следует учитывать такой фактор, как неслучайное алкилирование ДНК [55, 56, 60, 105—107] или влияние окружающих последовательностей на модифицированный гуанин [84, 108]. Тот факт, что специфичность мутагенеза определяется не действием алкилтрансферазы, а другими обстоятельствами, подтверждается экспериментами, в которых инактивация фермента  $O^6$ -бензилгуанином не прекращала индукции мутаций

под действием MNNG в человеческих фибробластах [86]. Аналогично, сайты RG были склонны к мутированию в штаммах *E. coli*, дефицитных по АГТ [89]. Отмечена также некоторая склонность к мутациям нетранскрибированных нитей ДНК в клетках бактерий и млекопитающих [86, 89, 94—97]. Образование мутантов с помощью этилирующих агентов, таких как этилметансульфонат, *N*-этил-*N*-нитрозомочевина (ENU) и *N*-этил-*N'*-нитро-*N*-нитрозогуанидин, — еще более сложный мутационный процесс, чем при действии метилирующих агентов, особенно в клетках млекопитающих [82, 95, 98, 99, 109—111]. Это отражает тот факт, что этилирующие агенты продуцируют большее разнообразие первичных повреждений, связанных с ошибочным кодированием.

Обработка клеток этилирующими агентами приводит к транзитами GC-AT, а также AT-GC. Последний тип мутаций совпадает с эффектом, вызванным действием  $O^4$ -алкилтимина [1, 24, 79—81, 83, 85]. Этилирующие агенты, как и  $O^4$ -алкилтимин, образуют гораздо больше подобных первичных повреждений по сравнению с метилирующими соединениями. В результате в клетках млекопитающих возникает гораздо больше трансверсий AT-TA и AT-CG. В клетках кишечной палочки доминируют транзиции GC-AT и AT-GC, ожидаемые при образовании  $O^6$ -этилгуанина и  $O^4$ -этилтимина соответственно.

Спектр мутаций, индуцируемых этилирующими агентами, увеличивается, когда используются клетки, дефицитные по алкилтрансферазе [110—113]. С увеличением размера алкильной группы аддукты в  $O^6$ -позиции становятся лучшими субстратами для эксцизионной репарации, в частности, у *E. coli* преобладает этот тип репарации [114]. Однако алкилтрансферазная активность *ogt*, которая лучше репарирует длинную цепь алкилированного производного, чем фермент гена *ada*, играет главную роль в восстановлении первичных повреждений, индуцированных этилированием и пропилированием [59, 112].

Вклад алкилтрансферазы в репарацию  $O^6$ -замещенного гуанина в кодоне 12 гена *Ha-ras* у крыс уменьшается в ряду метилирование—этилирование—бензилирование [59]. Действие ENU на человеческие клетки приводит к гораздо более частому мутированию второго гуанина по сравнению с первым в кодоне 12 [115]. Эффект индукции репарации первичных повреждений  $O^6$ -этилгуанина и  $O^4$ -бутилгуанина из алкилированной ДНК человеческих лимфоцитов и лейкоцитарных клеток был четко выявлен в условиях, когда  $O^6$ -бензилгуанин блокировал активность алкилтрансферазы.

Восстановление бутилгуанина не коррелирует с алкилтрансферазной активностью [116].

Обнаружена значительно большая частота транзиций GC-AT в человеческих фибробластах и В-лимфобластоидных клетках *Mer<sup>-</sup>*, подвергавшихся воздействию ENU, по сравнению с клетками *Mer<sup>+</sup>*, но это не касалось частоты других мутаций, включая транзиции AT-GC. Последнее обстоятельство свидетельствует о том, что человеческая алкилтрансфераза репарирует O<sup>6</sup>-этилгуанин, но не O<sup>4</sup>-этилтимин. Предпринимались попытки оценить вклад алкилтрансферазной эксцизионной репарации в восстановление этилированных гуанина и цитозина в клетках млекопитающих. Мутации продуцировались в двух трансформированных ENU лимфобластоидных клеточных линиях, одна из которых содержала, а другая не содержала алкилтрансферазной активности. Эффект сравнивали с мутациями, которые индуцируются в клеточных линиях, полученных от пациентов с *Xeroderma pigmentosum*, характеризующегося полным отсутствием эксцизионной репарации [117].

Изучали также последствия воздействия O<sup>6</sup>-бензилгуанина на частоту мутаций [117], в результате чего пришли к следующим выводам. Отсутствие любой из систем репарации ведет к увеличению частоты мутаций типа транзиций GC-AT, что определяется образованием O<sup>6</sup>-этилгуанина. Частота транзиций AT-GC, вызванных образованием этилтимина, существенно не изменяется на этом фоне. Было высказано предположение о том, что O<sup>6</sup>-этилтимин репарируется иным путем недостаточно быстро, чтобы оказывать влияние на общую продукцию мутаций. Этот вывод проверен при исследовании потери этилированных оснований ДНК [118]. Выведение этилированных пиримидинов, включая O<sup>4</sup>-этилтимин, было очень медленным и являлось результатом воздействия алкилтрансферазы или эксцизионной репарации, тогда как для эффективного удаления O<sup>6</sup>-этилгуанина были необходимы оба пути. Вероятнее всего, две системы репарации — алкилтрансферазная и эксцизионная взаимодействуют при восстановлении O<sup>6</sup>-этилтимина, но механизмы этого взаимодействия неясны [119].

Антиопухолевая защита путем активации алкилтрансферазы. К настоящему времени на различных моделях *in vivo* и *in vitro* доказано, что репарация O<sup>6</sup>-метилгуанина защищает клетки от злокачественной трансформации. Известно, что АНМ индуцирует опухоли преимущественно в тканях с низкой алкилтрансферазной активностью [1, 24, 120—124]. Опухолообразующая способность клеток грызунов, дефицитных по АГТ, проявляется

с гораздо большей частотой, чем в нормальных клеточных линиях [125]. Воздействуя на организм обезьян ENU, определили, что особи с низким уровнем активности АГТ в слизистой желудка более чувствительны к индукции рака желудка. Животные, вследствие мутации дефицитные по АГТ, должны обладать повышенной восприимчивостью к метилирующему агенту при восстановлении ДНК *in vivo*. С другой стороны, с увеличением алкилтрансферазной активности специфических тканей можно предсказать уменьшение инициации новообразований метилирующими канцерогенами. Таким образом, развитие опухоли возможно предотвратить, если репарация происходит прежде, чем образуются точечные мутации в критических онкогенах или онкосупрессорных генах [126].

Для блокирования АГТ-активности после обработки клеток алкилирующими канцерогенами можно использовать сильный инактиватор репарации O<sup>6</sup>-бензилгуанин. Попытки сочетания таких воздействий с помощью N-метил-N-нитрозомочевины и ENU на крысах не дали сколько-нибудь значительного модулирующего эффекта [127], но это, вероятно связано с тем, что дозы нитрозомочевины и ингибитора были выбраны неудачно.

Инактивация АГТ для повышения эффективности химиотерапии. Высокая степень корреляции между активностью АГТ и чувствительностью белков к нитрозомочевине означает, что элиминация этих белков может изменять устойчивость клеток во многих случаях. Снижение опухолевой устойчивости к лекарственным воздействиям улучшает терапевтический эффект без увеличения токсичности. Существуют два метода для инактивации алкилтрансферазы. Во-первых, это применение метилирующих агентов, непрямо уменьшающих уровень алкилтрансферазной активности за счет образования O<sup>6</sup>-метилгуанинов в ДНК, при репарации которых АГТ инактивируется [128—132]. Второй метод основан на использовании прямых ингибиторов АГТ-активности, таких как O<sup>6</sup>-метилгуанин [45, 46] и O<sup>6</sup>-бензилгуанин [47]. Метилирующие агенты, в частности MNNG или стрептозотоцин, образуют достаточно O<sup>6</sup>-метилгуаниновых аддуктов в ДНК для истощения АГТ-активности *in vitro* [129]. Воздействие стрептозотоцина на клетки опухоли толстой кишки *in vivo* приводит к истощению АГТ-активности [132, 136]. Различные алкилирующие агенты — темозоломид, декарбазин и стрептозотоцин — блокируют АГТ в человеческих лимфоцитах [131, 137—139].

Изучение комбинированного действия метилирующих агентов (стрептозотоцин или декарбазин с 1,3-бис-(2-хлорэтил)-1-нитрозомочевина (BCNU))

показало, что истощение АГТ в периферических кровяных мононуклеарных клетках необходимо для продуцирования чувствительности к BCNU. Клинические испытания стрептозотоцина и BCNU на карциномах дали обнадеживающие результаты [140, 141]. При условии их сочетанного действия максимальная толерантная доза алкилирующего агента уменьшается до 50 % [141].

Декарбазин в комбинации с фофемустинном был эффективен против злокачественной меланомы [142]. Исследование образцов человеческого опухолевого материала, проводившееся на «голых» мышах, показало, что, хотя истощение алкилтрансферазной активности может быть продемонстрировано на тканях и опухолях с применением метилирующих агентов, снижение дозы не является результатом увеличения силы терапевтического воздействия BCNU [68, 143]. Дозы метилирующих агентов, вызывающие наибольшее истощение АГТ-активности, полностью токсичны еще до добавления BCNU. При усилении токсичности следует учитывать мутагенные и канцерогенные свойства метилирующих агентов [1, 24]. Эти свойства могут ограничивать клиническое применение метилирующих агентов в комбинации с BCNU.

Альтернативный метод истощения алкилтрансферазной активности подразумевает использование  $O^6$ -алкилгуанинов. Первым алкилгуанином, применяемым для инактивации алкилтрансфераз, был свободный  $O^6$ -метилгуанин [45, 46, 133—135].

Воздействие на клетки или клеточные экстракты миллимолярных количеств  $O^6$ -метилгуанина через определенное время приводит к потере алкилтрансферазной активности и последующему увеличению чувствительности опухолевых клеток к алкилирующим агентам [35, 38]. Хотя результат выглядит обнадеживающе и максимальная редукция активности может достигать значения 85 %, все же постоянно обнаруживается 15—20 % активности АГТ, очевидно, благодаря медленному протеканию процесса инактивации [144]. По этой причине, вероятно, не наблюдалось терапевтического эффекта сочетанного действия BCNU с  $O^6$ -метилгуанином при лечении экспериментальных мышей, зараженных человеческими ксенографтами [144]. Проблема с применением  $O^6$ -метилгуанина состоит также в низкой растворимости, слабом сродстве свободных молекул к АГТ, плохой проникающей способности и отсутствии селективности алкилтрансферазной редукции, что требует очень высоких доз  $O^6$ -метилгуанина.

$O^6$ -бензилгуанин оказался более перспективным для истощения АГТ-активности в терапевтических целях [48]. Инактивация молекул АГТ в

дефицитных по этому ферменту клетках делает их более чувствительными к цитотоксическому влиянию алкилирующих агентов, применяемых в химиотерапии [48, 145—151].

Существует корреляция между степенью «усиления» и уровнем АГТ-активности: отсутствие или небольшое усиление наблюдается в дефицитных клетках, а выраженное усиление — в клетках с высоким уровнем активности АГТ. Усиления не наблюдалось, когда алкилирующие агенты (цисплатин и мелфалан) не продуцировали первичных повреждений гуанина в позиции 6 [145]. Применение  $O^6$ -бензилгуанина увеличивает цитотоксичность BCNU в опухолевых клетках мозга [152]. Глутатион может защищать клетки от этих воздействий. Для определения влияния глутатиона и АГТ на устойчивость клеток к BCNU добавляли ингибитор синтеза глутатиона и  $O^6$ -бензилгуанин в культуру клеток, экспрессирующих высокий уровень глутатион-S-трансферазы. Воздействие  $O^6$ -бензилгуанина приводило к значительному увеличению чувствительности клеток к BCNU, тогда как добавление 1-бутионин-сульфоксамина давало незначительное увеличение чувствительности. Это подтверждает тот факт, что алкилтрансферазные белки играют главную роль в устойчивости клеток к BCNU.

Увеличение цитотоксичности BCNU, достигаемое за счет  $O^6$ -бензилгуанина, влечет за собой увеличение внутринитчатых кросс-линков [77]. АГТ-активность в тканях и опухолях грызунов истощается при воздействии  $O^6$ -бензилгуанина в дозе 10 мг на 1 кг веса, хотя реально необходимы более высокие дозы для эффективного повышения чувствительности клеток к хлорэтилнитрозомочевине [127, 133]. Лечение  $O^6$ -бензилгуанином «голых мышей» с опухолью до воздействия на них 1-(2-хлорэтил)-3-(4-метилциклогексил)-1-нитрозомочевины и BCNU вело к значительному ингибированию опухолевого роста по сравнению с воздействием только хлорэтилнитрозомочевины [77, 152]. Сочетанное воздействие BCNU и  $O^6$ -бензилгуанина, приводящее к увеличению токсичности по отношению к опухоли, проявляется в подавлении развития клеток костного мозга, снижении количества лимфоцитов в селезенке и в других эффектах [153]. При этом опухоли, содержащие повышенный уровень АГТ, значительно быстрее подавлялись комбинированному лечению по сравнению с применением одного BCNU [77, 154—156]. Это улучшение терапевтического эффекта BCNU при комбинированном применении с  $O^6$ -бензилгуанином создает и дополнительную трудность, которая заключается в том, что ингибитор репарации не

является опухолеспецифическим усилителем и увеличивает общую токсичность алкилирующих агентов. По мнению Пегга [1], предложившего O<sup>6</sup>-бензилгуанин для химиотерапии рака, борьба с этим явлением состоит в синтезе новых алкилтрансферазных ингибиторов, действующих избирательно на определенные виды новообразований. В настоящее время существуют около 60 соединений, обладающих свойствами АГТ-ингибиторов [157], и исследования в этом направлении могут привести к выявлению их опухолевой специфичности.

Таким образом, в данном обзоре рассмотрено современное состояние вопроса по теоретическому изучению и практическому применению уникальной репаративной системы алкилтрансфераз, восстанавливающих наиболее мутагенно опасные повреждения в ДНК, индуцируемые алкилирующими соединениями.

L. L. Lukash, V. G. Man'ko, V. V. Lylo

Role of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase in repairing lesions, induced by alkylating compounds

Summary

*The state of the problem concerning both the theoretical study and the practical application of alkyltransferase that protects cells from cytotoxic and alkylating agents by means of repairing DNA lesions has been reviewed*

Л. Л. Лукаш, В. Г. Манько, В. В. Лыло

Роль O<sup>6</sup>-алкилгуанин-ДНК алкилтрансферазы в репарації ушкоджень, індукованих алкілюючими сполуками

Резюме

*В огляді розглянуто стан питання щодо теоретичного вивчення і практичного застосування алкілтрансфераз, які здійснюють захист клітин від цитотоксичного та мутагенного впливу алкілюючих сполук шляхом відновлення ушкоджень в ДНК.*

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Pegg A. E. Alkylation and subsequent repair of DNA after exposure to dimethylnitrosoamine and carcinogenesis // *Rev. Biochem. and Toxicol.*—1983.—5, N 1.—P. 83—133.
2. Goodtzova K., Crone T. M., Pegg A. E. Activation of human O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase by DNA // *Biochemistry.*—1994.—33, N 28.—P. 8385—8390.
3. Lindahl T., Sedgwick B., Sekiguchi M., Nakabeppu Y. Regulation and expression of the adaptive response to alkylating agents // *Ann. Rev. Biochem.*—1988.—57.—P. 133—159.
4. Pegg A. E., Byers T. L. Repair of DNA containing O<sup>6</sup>-alkylguanine // *FASEB J.*—1992.—6.—P. 2302—2310.
5. McCarthy T. V., Lindahl T. Methyl phosphotriesters in alkylated DNA are repaired by the Ada regulatory protein of E. coli // *Nucl. Acids Res.*—1985.—13, N 8.—P. 2683—2698.
6. Горбачева Л. Б., Кукушкина Т. В. Роль O<sup>6</sup>-алкилгуанин-ДНК алкилтрансферазы в реализации противоопухолевой

активности N-нитрозомочевины // *Хим. фарм. журн.*—1989.—4.—С. 389—394.

7. Potter P. M., Wilkinson M. C., Fitton J., Carr F. J., Brennan J., Cooper D. P., Margison G. P. Characterization and nucleotide sequence of *ogt*, the O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase gene of *E. coli* // *Nucl. Acids Res.*—1987.—15, N 28.—P. 9171—9193.
8. Wilkinson M. C., Potter P. M., Cawkwell L., Georgiadis P., Patel D., Swann P. F., Margison G. P. Purification of the *E. coli ogt* gene product to homogeneity and its rate of action on O<sup>6</sup>-methylguanine, O<sup>6</sup>-alkylguanine and O<sup>4</sup>-methylthymine in dodecadeoxyribonucleotides // *Nucl. Acids Res.*—1989.—17, N 21.—P. 8475—8484.
9. Rebeck G. W., Smith C. M., Goad D. L., Samson L. Characterization of the major DNA repair methyltransferase activity in unadapted *Escherichia coli* and identification of a similar activity in *Salmonella typhimurium* // *J. Bacteriol.*—1989.—171, N 13.—P. 4563—4568.
10. Kodama K., Nakabeppu Y., Sekiguchi M. Cloning and expression of *Bacillus subtilis* methyltransferase gene in *Escherichia coli ada*-cells // *Mutat. Res.*—1989.—218, N 1.—P. 153—163.
11. Pegg A. E., Dollan M. E., Moschel R. C. Structure, function and inhibition of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase // *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*—1995.—51.—P. 167—223.
12. Day R. S. III, Ziolkowski C. H. J., Scudiero D. A., Meyer S. A., Lubiniecky A. S., Girardi A. J., Galloway S. M., Bynum G. D. Defective repair of alkylated DNA by human tumour and SV-40-transformed human cell strains // *Nature.*—1980.—288.—P. 724—727.
13. Yarosh D. B. The role of O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase in cell survival, mutagenesis and carcinogenesis // *Mutat. Res.*—1985.—145, N 1.—P. 1—16.
14. Arita J., Tachibana K., Takebe H., Tatsumi K. Predominance of *Mex*<sup>r</sup> cells in newly established human lymphoblastoid cell lines // *Carcinogenesis.*—1989.—10, N 7.—P. 2067—2073.
15. Green M. N. L., Lowe J. E., Petit-Frere C., Karran P., Hall J., Kataoka H. Properties of N-methyl-N-nitrosourea-resistant, *Mex*<sup>r</sup> derivatives of SV-40-immortalized human fibroblast cell lines // *Carcinogenesis.*—1989.—10, N 3.—P. 893—898.
16. Karren P., Lindahl T., Griffin B. Adaptive response to alkylating agents involves altering *in situ* of O<sup>6</sup>-methylguanine // *Nature.*—1979.—280.—P. 76—78.
17. Brennan J., Margison G. P. Reduction of the toxicity and mutagenicity of alkylating agent in mammalian cells harboring the *Escherichia coli* alkyltransferase gene // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1986.—83, N 17.—P. 6292—6297.
18. Sklar R., Strauss B. Removal of O<sup>6</sup>-methylguanine from DNA of normal and xeroderma pigmentosum-derived lymphoblastoid lines // *Nature.*—1981.—289.—P. 417—420.
19. Yarosh D. B., Footer R. C., Mitra S., Day R. S. Repair of O<sup>6</sup>-methylguanine in DNA by demethylation is lacking in *Mer*<sup>r</sup> human tumor cell strains // *Carcinogenesis.*—1983.—4, N 1.—P. 199—205.
20. Yagi T., Yarosh D. B., Day R. S. III. Comparison of repair of O<sup>6</sup>-methylguanine produced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in mouse and human cells // *Carcinogenesis.*—1984.—5, N 5.—P. 593—601.
21. Yagi T., Day R. S. III. Differential sensitivities of transformed and untransformed murine cells lines to DNA cross-linking agents relative to repair of O<sup>6</sup>-methylguanine // *Mutat. Res.*—1987.—184, N 2.—P. 223—229.
22. Cohen A., Leung C. O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase activity and sensitivity to N-methyl-N-nitro-nitrosoguanidine during human T-lymphocyte differentiation // *Carcinogenesis.*—1986.—7, N 11.—P. 1877—1881.



23. Goth R., Rajewsky M. F. Persistence of O<sup>6</sup>-ethylguanine in rat brain DNA: correlation with nervous system-specific carcinogenesis by ethylnitrosourea // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1974.—71, N 3.—P. 639—643.
24. Saffhill R., Margison G. P., O'Connor P. J. Mechanism of carcinogenesis, included by alkylating agents // Biochim. et biophys. acta.—1985.—823, N 1.—P. 111—145.
25. Bertini R., Coccia P., Pagani P., Marinello C., Salmons M., D'Incalci M. Interferon induced increase O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase in the rat liver // Carcinogenesis.—1990.—11, N 1.—P. 181—183.
26. Frosia G., Laval F. The O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase activity of rat hepatoma cells is increased after a single exposure to alkylating agents // Carcinogenesis.—1987.—8, N 1.—P. 91—95.
27. Coccia P., Sen S., Erba E., Pagani P., Marinello C., D'Incalci M. O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase content in synchronised human cancer cells // Cancer Chemoter. Pharmacol.—1992.—30, N 1.—P. 77—82.
28. Habraken Y., Laval F. Malignant transformation of human fibroblasts correlates with increased activity of receptor-bound plasminogen activator // Cancer Res.—1991.—51, N 4.—P. 1217—1221.
29. Chan C. L., Wu Z., Eastman A., Bresnik E. Irradiation-induced expression of O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase in mammalian cells // Cancer Res.—1992.—52, N 7.—P. 1804—1810.
30. Wilson R. E., Hoey B., Margison G. P. Ionizing radiation induces O-6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase messenger RNA and activity in mouse tissues // Carcinogenesis.—1993.—14, N 4.—P. 679—684.
31. Fritz G., Kaina K. Stress factors affecting expression of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase mRNA rat hepatoma cells // Biochim. et biophys. acta.—1992.—1171, N 1.—P. 35—41.
32. Mitra G., Pauly G. T., Kurman R., Pei G. K., Hughes S. H., Moschel R. C., Barbacid M. Molecular analysis of O<sup>6</sup>-substituted guanine-induced mutagenesis of ras oncogenes // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1989.—86, N 28.—P. 8650—8654.
33. Olsson M., Lindahl T. T. Repair of alkylated DNA in *Escherichia coli* methyl group transfer from O<sup>6</sup>-methylguanine to a protein cysteine residue // J. Biol. Chem.—1980.—255, N 15.—P. 10569—10572.
34. Yarosh D. B., Barnes D., Erickson L. C. Transfection of DNA from a chloroethylnitrosourea-resistant tumor cell line (*MER*<sup>r</sup>) to a sensitive tumor cell line (*MER*<sup>s</sup>) results in a tumor cell line resistant to MNNG and CNU that has increased O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase levels and reduced levels of DNA interstrand cross-linking // Carcinogenesis.—1986.—7, N 9.—P. 1603—1607.
35. Kyrtopoulos S. A. O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase: influence on susceptibility to the genetic effects of alkylating agents // Toxic. Lett.—1998.—102—103.—P. 53—57.
36. Scicchitano D. A., Pegg A. E. Inhibition of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase by metals // Mutat. Res.—1987.—192, N 1.—P. 207—209.
37. Bhattacharyya D., Boulden A. M., Foote R. S., Mitra S. Effect of polyvalent metal ions on the reactivity of human O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase // Carcinogenesis.—1988.—9, N 3.—P. 683—685.
38. Pegg A. E. Mammalian O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase: regulation and importance in response to alkylation carcinogenic and therapeutic agents // Cancer Res.—1990.—50, N 25.—P. 6119—6122.
39. Spratt T. E., Wu J. D., Levy D. E., Kanugula S., Pegg A. E. Reaction and binding oligodeoxynucleotides containing analogues of O<sup>6</sup>-methylguanine with wild-type and mutant human O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase // Biochemistry.—1999.—38, N 9.—P. 6801—6806.
40. Samson L. The suicidal DNA repair methyltransferase of microbes // Mol. Microbiol.—1992.—6, N 7.—P. 825—833.
41. Graves B. J., Li B. F. L., Swann P. F. Repair of O<sup>6</sup>-methylguanine, O<sup>6</sup>-ethylguanine, O<sup>6</sup>-isopropylguanine and O<sup>4</sup>-methylthymine in synthetic oligonucleotides by *Escherichia coli* *ada* gene O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase // Carcinogenesis.—1989.—10.—P. 661—666.
42. Brent T. P., Dolan M. E., Fraenkel-Conrat H., Hall J., Karran P., Laval F., Margison G. P. Repair of O<sup>6</sup>-alkylpyrimidines in mammalian cells: A present consensus // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1988.—85, N 6.—P. 1759—1763.
43. Sassanfar M., Dosanjh M. K., Essigmann J. M., Samson L. Relative efficiencies of the bacterial yeast, and human DNA methyltransferases for repair of O<sup>6</sup>-methylguanine and O<sup>4</sup>-methylthymine-suggestive evidence for O<sup>4</sup>-methylthymine repair by eukaryotic methyltransferases // J. Biol. Chem.—1991.—266, N 5.—P. 2767—2772.
44. Elder P. H., Margison G. P., Rafferty J. A. Differential inactivation of mammalian and *Escherichia coli* O-6-alkylguanine-DNA alkyltransferases by O-6-benzylguanine // Biochem. J.—1994.—298 (FEB 15)—P. 231—236.
45. Dolan M. E., Morimoto K., Pegg A. E. Reduction of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in HeLa cells treated with O<sup>6</sup>-alkylguanines // Cancer Res.—1985.—45, N 12.—P. 6413—6418.
46. Karran P. Possible depletion of a DNA repair enzyme in human lymphoma cells by subversive repair // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1985.—82, N 16.—P. 5285—5290.
47. Morimoto K., Dolan M. E., Scicchitano D., Pegg A. E. Repair of O<sup>6</sup>-propylguanine and O<sup>6</sup>-butylguanine in DNA by O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase from rat liver and *E. coli* // Carcinogenesis.—1985.—6, N 4.—P. 1027—1031.
48. Dolan M. E., Moschel R. S., Pegg A. E. Depletion of mammalian O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity by O<sup>6</sup>-benzylguanine provides a means to evaluate the role of this protein in protection against carcinogenic and therapeutic alkylating agents // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1990.—87, N 14.—P. 5368—5372.
49. Wilkinson M. C., Potter P. M., Cawkwell L., Georgiadis P., Patel D., Swann P. F., Margison G. P. Purification of the *E. coli* *ogt* gene product to homogeneity and its rate of action on O<sup>6</sup>-methylguanine, O<sup>6</sup>-ethylguanine and O<sup>4</sup>-methylthymine in dodecadeoxyribonucleotides // Nucl. Acids Res.—1989.—17, N 21.—P. 8475—8485.
50. Liem L. K., Lim A., Li B. F. L. Specificities of human, rat and *E. coli* O-6-methylguanine-DNA methyltransferases towards the repair of O-6-methyl and O-6-ethylguanine in DNA // Nucl. Acids Res.—1994.—22, N 9.—P. 1613—1620.
51. Peterson L. A., Liu X. K., Hecht S. S. Pyridyloxobutyl DNA adducts inhibit the repair of O(6)-methylguanine // Cancer Res.—1993.—53, N 12.—P. 2780—2785.
52. Mackay W. J., Han S., Samson L. D. DNA alkylation repair limits spontaneous base substitution mutations in *Escherichia coli* // J. Bacteriol.—1994.—176, N 11.—P. 3224—3231.
53. Liem L. K., Wong C. W., Lim A., Li B. F. L. Factors influencing the repair of the mutagenic lesion O<sup>6</sup>-methylguanine in DNA by human O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase // J. Mol. Biol.—1993.—231, N 4.—P. 950—959.
54. Scicchitano D., Jones R. A., Kuzmich S., Goffney B., Lasko D. D., Essigmann J. M., Pegg A. E. Repair of oligonucleotides containing O<sup>6</sup>-methylguanine by O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase // Carcinogenesis.—1986.—7, N 5.—P. 1383—1386.

55. Dolan M. E., Oplinger M., Pegg A. E. Sequence specificity of guanine alkylation and repair // *Carcinogenesis*.—1988.—9, N 7.—P. 2139—2143.
56. Topal M. D. DNA repair, oncogenes and carcinogenesis // *Carcinogenesis*.—1988.—9, N 5.—P. 691—697.
57. Georgiadis P., Smith C. A., Swann P. Nitrosamine-induced cancer. Selective repair and conformational differences between O<sup>6</sup>-methylguanine residues in different positions in and around Codon 12 of rat *H-ras* // *Cancer Res.*—1991.—51, N 21.—P. 5843—5850.
58. Wong C., Tan N., Li B. F. L. Structure related properties of the mutagenic lesion O-6-methylguanine in DNA // *J. Mol. Biol.*—1992.—228, N 4.—P. 1137—1146.
59. Bishop R. E., Dunn L. L., Pauly G. T., Dolan M. E., Moschel R. C. The role of O-6-alkylguanine-DNA alkyltransferase in protecting Rat4 cells against the mutagenic effects of O-6-substituted guanine residues incorporated in codon-12 of the *H-ras* gene // *Carcinogenesis*.—1993.—14, N 4.—P. 593—598.
60. Thomale J., Hochleitner K., Rajewsky M. F. Differential formation and repair of the mutagenic DNA alkylation product O<sup>6</sup>-ethylguanine in transcribed and nontranscribed genes of the rat // *J. Biol. Chem.*—1994.—269, N 3.—P. 1681—1686.
61. Natarajan A. T., Vermeulen S., Darroudi F., Valentine M. B., Brent T. P., Mitra S., Tano K. Chromosomal localization of human O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene by *in situ* hybridization // *Mutagenesis*.—1992.—7, N 1.—P. 83—87.
62. Shiraishi A., Sakumi K., Nakatsu Y., Hayakawa H., Sekiguchi M. Isolation and characterization of cDNA and genomic sequences for mouse O-6-methylguanine-DNA methyltransferase // *Carcinogenesis*.—1992.—13, N 2.—P. 289—297.
63. Nakatsu Y., Hattori K., Hayakawa H., Shimizu K., Sekiguchi M. Organization and expression of the human gene for O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase // *Mutat. Res.*—1993.—293, N 2.—P. 119—132.
64. Musarrat J., Wilson A., Issa H. A., Wani A. O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity levels in normal, benign and malignant human female breast // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—208, N 2.—P. 688—696.
65. Belanich M., Pastor M., Randall T., Guerra D., Kibitel J., Alas L., Li B., Citron M., Wasserman P., White A., Eyre H., Jaecle K., Schulman S., Rector D., Prados M., Coons S., Shapiro W., Yarosh D. Retrospective study of the correlation between the DNA repair protein alkyltransferase and survival of brain tumor patients treated with carmustine // *Cancer Res.*—1996.—56, N 3.—P. 783—788.
66. Baer J. C., Freeman A. A., Newlands E. S., Watson A. J., Rafferty J. A., Margison G. P. Depletion of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase correlates with potentiation of temozolomide and CCNU toxicity in human tumour cells // *Brit. J. Cancer.*—1993.—67, N 6.—P. 1299—1302.
67. Mitchell R. B., Dolan M. E. Effect of temozolomide and decarbazine on O-6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity and sensitivity of human tumor cells and xenografts to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea // *Cancer Chemother. Pharmacol.*—1993.—32, N 1.—P. 59—63.
68. Harris L. C., Margison G. P. Expression in mammalian cells of the *Escherichia coli* O-6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase gene *Ogt* reduces the toxicity of alkyl nitrosoureas // *Brit. J. Cancer.*—1993.—67, N 6.—P. 1196—1202.
69. Erikson L. C., Laurent G., Sharkey N. A., Kohn K. W. DNA cross-linking and monoadduct repair in nitrosourea-treated human tumour cells // *Nature.*—1980.—288.—P. 727—729.
70. Brent T. P., Houghton P. J., Houghton J. A. O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity correlates with the therapeutic response of human rhabdomyosarcoma xenografts to 1-(chloroethyl)-3-(trans-4-methylcyclohexyl)-1-nitrosourea // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1985.—82, N 9.—P. 2985—2990.
71. Aida T., Bodell W. J. Cellular resistance to chloroethylnitrosoureas, nitrogen mustard and *cis*-diaminedichloroplatinum (II) in human gliaderived cell lines // *Cancer Res.*—1987.—47, N 5.—P. 1361—1367.
72. Laval F., Laval J. Adaptive response in mammalian cells. Cross-reactivity of different pretreatment on cytotoxicity as contrasted to mutagenicity // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1984.—81, N 4.—P. 1062—1067.
73. Myrnes B., Giercksky K. E., Krokan H. Interindividual variation in the activity of O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase and uracil-DNA glycosylase in human organs // *Carcinogenesis*.—1983.—4, N 12.—P. 1565—1571.
74. Ludlum D. B. DNA alkylation by the haloethylnitrosoureas. Nature of modifications produced and their enzymatic repair or removal // *Mutat. Res.*—233, N 1—2.—P. 117—127.
75. Brent T. P. Isolation and purification of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase from human leukemic cells. Prevention of chloroethylnitrosourea-induced cross-links by purified enzyme // *Pharmacol. Ther.*—1985.—31, N 1.—P. 121—141.
76. Gouzaga P. E., Potter P. M., Niu T., Yu D., Ludlum D. B., Rafferty J. A., Margison G. P., Brent T. P. Identification of the cross-link between human O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase and chloroethylnitrosourea-treated DNA // *Cancer Res.*—1992.—52, N 21.—P. 6052—6059.
77. Mitchell R. B., Moschel R. S., Dolan M. E. Effect of O<sup>6</sup>-benzylguanine on the sensitivity of human tumor xenografts to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and on DNA interstrand cross-link formation // *Cancer Res.*—1992.—52, N 5.—P. 1171—1175.
78. Erickson L. C., Bradley M. O., Dacore J. M., Ewig R. A. G., Kohn K. W. DNA cross-linking and cytotoxicity in normal and transformed human cells treated with antitumor nitrosoureas // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1980.—77, N 1.—P. 467—472.
79. Singer B., Essigmann J. M. Site specific mutagenesis—retrospective and prospective // *Carcinogenesis*.—1991.—12, N 6.—P. 949—957.
80. Moschel R. S., Hudgins W. R., Dipple A. Reactivity effects on site selectivity in nucleoside alkylation: a model for the factors influencing the sites of carcinogen-nucleic acid interactions // *J. Org. Chem.*—1986.—51, N 22.—P. 4180—4185.
81. Loechler E. L. A violation of the Swain-Scott principle, and not S(N)1 versus S(N)2 reaction mechanisms, explains why carcinogenic alkylating agents can form different proportions of adducts at oxygen versus nitrogen in DNA // *Chem. Res. Toxicol.*—1994.—7, N 3.—P. 277—281.
82. Jansen J. G., deGroot A. J. L., van Teijlingen C. M. M., Lohman P. H. M., Mohu G. R., Vrieling H., VanZeeland A. A. Formation and persistence of DNA adducts in pouch skin fibroblasts and liver tissue of rats exposed *in vivo* to the monofunctional alkylating agents N-methyl-N-nitrosourea or N-ethyl-N-nitrosourea // *Mutat. Res.*—1994.—307, N 1.—P. 95—107.
83. Singer B., Dosanjh M. K. Site-directed mutagenesis for quantitation of base interaction at defined sites // *Mutat. Res.*—1990.—233, N 1—2.—P. 45—53.
84. Tan H. B., Swann F. S., Chance E. M. Kinetic analysis of the coding properties of O-6-methylguanine in DNA: The crucial role of the conformation of the phosphodiester bond // *Biochemistry.*—1994.—33, N 17.—P. 5335—5347.
85. Swann P. F. Why do O-6-alkylguanine and O-4-alkylguanine miscode. The relationship between the structure of DNA containing O-6-alkylguanine and O-4-alkylthymine and the mutagenic properties of these bases // *Mutat. Res.*—1990.—233, N 1—2.—P. 81—95.

86. Yang J. L., Hsieh F. P., Lee P. C., Tseng H. J. R. Strand- and sequence-specific attenuation of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced G-C to A-T transitions by expression of human O-6-methylguanine-DNA methyltransferase in Chinese hamster ovary cells // *Cancer Res.*—1994.—54, N 14.—P. 3857—3864.
87. Lukash L. L., Boldt J., Pegg A. E., Dolan M. E., Maher V. M., McCormick J. J. Effect of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase on the frequency and spectrum of mutations induced by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine in the HPRT gene of diploid human fibroblasts // *Mutat. Res.*—1991.—250, N 2.—P. 397—409.
88. Rebeck G. W., Samson L. Increased spontaneous mutation and alkylation sensitivity of *Escherichia coli* strains lacking the *ogt* O<sup>6</sup>-methylguanine DNA repair methyltransferase // *J. Bacteriol.*—1991.—173, N 6.—P. 2068—2076.
89. Roldan-Arjona T., Luque-Romero F. L., Arisa R. R., Jurado J., Pueyo C. Influence of DNA repair by *ada* and *ogt* alkyltransferases on the mutational specificity of alkylating agents // *Mol. Carcinogen.*—1994.—9, N 4.—P. 200—210.
90. Aquilina G., Biondo R., Dogliotti E., Meuth M., Bignami D. Expression of the endogenous O-6-methylguanine-DNA methyltransferase protects Chinese hamster ovary cells from spontaneous G:C to A:T transitions // *Cancer Res.*—1992.—54, N 23.—P. 6471—6475.
91. Skilpi M. O., Waters L. C., Kraerman K. H., Preston R. J., Mitra S. N-methyl-N-nitrosourea-induced mutations in a shuttle plasmid replicated in human cells // *Mol. Carcinogen.*—1990.—3, N 1.—P. 30—37.
92. Dunn W. C., Tano K., Horesovsky G. J., Preston R. J., Mitra S. The role of O<sup>6</sup>-alkylguanine in cell killing and mutagenesis in Chinese hamster ovary cells // *Carcinogenesis.*—1991.—12, N 1.—P. 83—91.
93. Moriwaki S., Yagi T., Nishigori C., Imamura S., Takebe H. Analysis of N-methyl-N-nitrosourea-induced mutations in shuttle vector plasmid propagated in mouse O-6-methylguanine-DNA methyltransferase-deficient cells in comparison with proficient cells // *Cancer Res.*—1991.—57, N 23.—P. 6219—6224.
94. Palombo F., Kohfeldt E., Calcagnile A., Nehls P., Dogliotti E. N-methyl-N-nitrosourea-induced mutations in human cells. Effect of the transcriptional activity of the target gene // *J. Mol. Biol.*—1992.—223, N 3.—P. 587—594.
95. Cariello N. F., Skorek N. F. Analysis of mutations occurring at the human *hprt* locus // *J. Mol. Biol.*—1993.—231, N 1.—P. 41—57.
96. Yang J. L., Lin J. G., Hu M. C., Wu C. W. Mutagenicity and mutational spectrum of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in the *hprt* gene in G1-S and late S-phase of diploid human fibroblasts // *Cancer Res.*—1993.—53, N 12.—P. 2865.
97. Akagi T., Hiromatsee K., Iyeharaogawa H., Kimura H., Kato T. Specificity of mutations induced by N-methyl-N-nitrosourea in cDNA of the *hprt* gene // *Carcinogenesis.*—1993.—14, N 4.—P. 725—731.
98. Jansen J. G., Mohn G. R., Vrieling N., Van Teijlingen C. M. M., Lohman P. H. H. Molecular analysis of *hprt* gene mutations in skin fibroblasts of rats exposed *in vitro* to N-methyl-N-nitrosourea or N-ethyl-N-nitrosourea // *Cancer Res.*—1994.—54, N 9.—P. 2478—2486.
99. Begnini R., Palombo F., Dogliotti E. Multivariate statistical analysis of mutational spectra of alkylating agents // *Mutat. Res.*—1992.—267, N 1.—P. 77—89.
100. Jiao J. L., Glickman B. W., Anderson M. W., Zielinska M. Mutational specificity of N-nitrosodimethylamine — comparison between *in vivo* and *in vitro* assays // *Mutat. Res.*—1993.—301, N 1.—P. 27—32.
101. Arisa R. R., Roldanarjona T., Hera C., Pueyo C. A method for selection of forward mutations in *supF* gene carried by shuttle-vector plasmids // *Carcinogenesis.*—1993.—14, N 2.—P. 303—306.
102. Belinsky S. A., Deverlux T. R., Maronpot R. R., Stoner G. D., Anderson M. W. Relationship between the formation of pro-mutagenic adducts and the activation of the *K-ras* proto-oncogene in lung tumors from A/J mice treated with nitrosamines // *Cancer Res.*—1989.—49, N 19.—P. 5305—5312.
103. Wang Y., You M., Reynolds S. N., Stoner G., Anderson M. W. Mutational activation of the cellular *Harvey ras* oncogene in rat esophageal papillomas induced by methylbenzylnitrosamine // *Cancer Res.*—1990.—50, N 5.—P. 1591—1596.
104. Zarbl H., Sukumar S., Arthur A. V., Martin-Zanca D., Barbacid M. Direct mutagenesis of *Ha-ras-1* oncogenes by N-nitroso-N-methylurea during initiation of mammary carcinogenesis in rats // *Nature.*—1985.—315.—P. 382—386.
105. Richardson F. C., Richardson K. K. Sequence-dependent formation of alkyl DNA adducts — a review of methods, results and biological correlates // *Mutat. Res.*—1990.—233, N 1—2.—P. 127.
106. Shoukry S., Anderson M. W., Glickman B. W. Use of fluorescently tagged DNA and an automated DNA sequencer for the comparison of the sequence selectivity of SN1 and SN2 alkylating agents // *Carcinogenesis.*—1993.—14, N 1.—P. 155—158.
107. Basic-Zaninovic T., Palombo F., Bignati M., Dogliotti E. Fidelity of replication of the leading and lagging DNA strands opposite N-methyl-N-nitrosourea-induced DNA damage in human cells // *Nucl. Acids Res.*—1992.—20, N 24.—P. 6543—6555.
108. Dosanjh M. K., Galeros G., Goodman M. F., Singer B. Kinetics of extension of O-6-methylguanine paired with cytosine or thymine in defined oligonucleotide sequences // *Biochemistry.*—1991.—30, N 49.—P. 11595—11600.
109. Harbach P. R., Filipunas A. L., Wang Y., Aarok C. S. DNA sequence analysis of spontaneous and N-ethyl-N-nitrosourea-induced *hprt* mutations arising *in vivo* in cynomolgus monkey T-lymphocytes // *Environ. Mol. Mutagen.*—1992.—20.—P. 96—106.
110. Yang J. L., Lee P. C., Lin S. R., Lin J. G. Comparison of mutation spectra induced by N-ethyl-N-nitrosourea in *hprt* gene of Mer(+) and Mer(-) diploid human fibroblasts // *Carcinogenesis.*—1994.—15, N 5.—P. 939—947.
111. Bronstein M. S., Cochran J. E., Craft T. R., Swenberg J. A., Skopek T. R. Toxicity and mutation spectra of N-ethyl-N-nitrosourea in human cell lines with different DNA repair phenotypes // *Cancer Res.*—1991.—51, N 19.—P. 5188—5197.
112. Abril N., Hera C., Alejandre E., Rafferty J. A., Margison G. P., Pueyo C. Effect of *ogt* expression on mutation induction by methylmethanesulphonate, ethylmethanesulphonate and propylmethanesulphonate in *Escherichia coli* K12 strains // *Mol. and Gen. Genet.*—1994.—242, N 6.—P. 744—749.
113. Abril N., Roldanarjona T., Priltoalomo M. J., VanZeeland A. A., Pueyo C. Mutagenesis and DNA repair for alkylation damages in *Escherichia coli* K-12 // *Environ. Mol. Mutagen.*—1992.—19, N 4.—P. 288—297.
114. Samson L., Thomale J., Rajewsky M. F. Alternative pathways for *in vivo* repair of O<sup>6</sup>-alkylguanine and O<sup>4</sup>-alkylthymine in *Escherichia coli*: the adaptive response and nucleotide excision repair // *EMBO J.*—1988.—7, N 7.—P. 2261—2269.
115. Pourzand C., Cerutti P. Mutagenesis of *H-ras* Codon-11 and Codon-12 in human fibroblasts by N-ethyl-N-nitrosourea // *Carcinogenesis.*—1993.—14, N 10.—P. 2193.
116. Thomale J., Seiler F., Muller M. R., Seeber S., Rajewsky M.

- F. Repair of O(6)-alkylguanines in the nuclear DNA of human lymphocytes and leukaemic cells-analysis at the single-cell level // *Brit. J. Cancer.*—1994.—69, N 4.—P. 698—706.
117. Bronstein S. M., Hooth M. J., Swenberg J. A., Skopek T. R. Modulation of ethylnitrosourea-induced toxicity and mutagenicity in human cells by O-6-benzylguanine // *Cancer Res.*—1992.—52, N 14.—P. 3852—3857.
  118. Bronstein S. M., Skopek M. J., Swenberg J. A. Efficient repair of O<sup>6</sup>-ethylguanine, but not O<sup>4</sup>-ethylthymine or O<sup>2</sup>-ethylthymine is dependent upon O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase and nucleotide excision repair activities in human cells // *Cancer Res.*—1992.—52, N 8.—P. 2008—2011.
  119. Goldmacher V. S. Efficient repair of O<sup>6</sup>-ethylguanine, but not O<sup>4</sup>-ethylthymine or O<sup>2</sup>-ethylthymine, is dependent upon O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase and nucleotide excision repair activities in human cells // *Cancer Res.*—1992.—52, N 12.—P. 6893.
  120. Fong L. Y. Y., Jensen D. E., Magee P. N. DNA methyl-adduct dosimetry and O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity determinations in rat mammary carcinogenesis by procarbazine and N-methylnitrosourea // *Carcinogenesis.*—1990.—11, N 3.—P. 411—419.
  121. Belinsky S. A., Deverlux T. R., Anderson M. W. Role DNA methylation in the activation of pulmonary neoplasia by nitrosamines // *Mutat. Res.*—1990.—233, N 1—2.—P. 105—117.
  122. Peterson L. A., Hecht S. O<sup>6</sup>-methylguanine is a critical determinant of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butano-ne tumorigenesis in A/J mouse lung // *Cancer Res.*—1991.—51, N 20.—P. 5557—5564.
  123. Fong L. Y. Y., Beville R. F., Thurmon J. C., Magle P. N. DNA adduct dosimetry and DNA repair in rats and pigs given repeated doses of procarbazine under conditions of carcinogenesis and human cancer chemotherapy respectively // *Carcinogenesis.*—1992.—13, N 11.—P. 2153—2161.
  124. Loktionova N. A., Beniashvili D. S., Sartania M. S., Zabeshinski M. A., Kazanova O. J., Petrov A. S., Likhachev A. J. Individual levels of activity of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase in monkey gastric mucosa during chronic exposure to a gastrocarcinogen-N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine // *Biochimie.*—1993.—75, N 9.—P. 821—825.
  125. Thomale J., Huh N., Nehls P., Eberle G., Rajewsky M. F. Repair of O<sup>6</sup>-ethylguanine in DNA protects rat 208F cells from tumorigenic conversion by N-ethyl-N-nitrosourea // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1990.—87, N 24.—P. 9883—9887.
  126. Gerson S. L., Zaidi N. H., Dumenco L. L., Allay E., Fan Y., Liu L., O'Connor P. J. Alkyltransferase transgenic mice: Probes of chemical carcinogenesis // *Mutat. Res.*—1994.—307, N 2.—P. 541—557.
  127. Lijinsky W., Pegg A. E., Anver M. R., Moschel R. C. Effects of inhibition of O-6-alkylguanine-DNA alkyltransferase in rats on carcinogenesis by methylnitrosourea and ethylnitrosourea // *Jap. J. Cancer Res.*—1994.—85, N 3.—P. 226—231.
  128. Liu L. L., Allay E., Dumenco L. L., Gerson S. L. Rapid repair of O-6-methylguanine-DNA adducts protects transgenic mice from N-methylnitrosourea-induced thymic lymphomas // *Cancer Res.*—1994.—54, N 17.—P. 4648—4653.
  129. Zlotogorsky C., Erikson L. C. Pretreatment of normal human fibroblasts and human colon carcinoma cells with MNNG allows chloroethylnitrosourea to produce DNA interstrand cross-links not observed in cells treated with chloroethylnitrosourea alone // *Carcinogenesis.*—1983.—4, N 3.—P. 759—763.
  130. Zeller W. J., Berger M. R., Henne T., Weber E. More than additive toxicity of the combination of 1-methyl-1-nitrosourea plus 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea in the rat // *Cancer Res.*—1986.—46, N 4, pt 1.—P. 1714—1717.
  131. Gerson S. L. Modulation of human lymphocyte O-6-alkyl-guanine-DNA alkyltransferase by streptozotocin *in vivo* // *Cancer Res.*—1989.—49, N 11.—P. 3134—3143.
  132. Meer L., Schold S. C., Kleihues P. Inhibition of the hepatic O-6-alkylguanine-DNA alkyltransferase *in vivo* by pretreatment with antineoplastic agents // *Biochem. Pharmacol.*—1989.—38, N 6.—P. 929—935.
  133. Yarosh D. B., Hurst-Calderone S., Babich M. A., Day III R. S. Inactivation of O<sup>4</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase and sensitization of human tumor cells to killing by chloroethylnitrosourea by O<sup>6</sup>-methylguanine as a free base // *Cancer Res.*—1986.—46, N 4, pt 1.—P. 1663—1669.
  134. Dolan C. D., Corsico C. D., Pegg A. E. Exposure of HeLa to O<sup>6</sup>-alkylguanines increases sensitivity to the cytotoxic effects of alkylating agents // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1985.—132, N 1.—P. 178—186.
  135. Karran P., Williams S. A. The cytotoxic and mutagenic effects of alkylating agents of human lymphoid cells are caused by different DNA lesions // *Carcinogenesis.*—1985.—6, N 4.—P. 789—792.
  136. Pieper R. O., Futscher B. W., Dong Q., Erickson L. C. Effect of streptozotocin/bis-chloroethylnitrosourea combination therapy on O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase activity and mRNA levels in HT-29 cells *in vitro* // *Cancer Res.*—1991.—51, N 6.—P. 1581.
  137. Lee S. M., Thatcher N., Margison G. P. O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase depletion and regeneration in human peripheral lymphocytes following dacarbazine and fotemustine // *Cancer Res.*—1991.—51, N 2.—P. 619—624.
  138. Lee S. M., Thatcher N., Crowther D., Margison G. P. Inactivation of O-6-alkylguanine-DNA alkyltransferase in human peripheral blood mononucleas cells by temozolomide // *Brit. J. Cancer.*—1994.—69, N 3.—P. 452—457.
  139. Mitchell R. B., Dolan M. E., Janisch L., Vogelzang N. J., Ratain M. J., Sehlisky R. L. Sequential therapy with dacarbazine and carmustine // *Cancer Chemother. Pharmacol.*—1994.—34, N 6.—P. 509—515.
  140. Panella T. J., Smith D. C., Schold S. C., Rogers M. P., Winer E. P., Fine R. L., Crawford J. Modulation of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase-mediated carmustine resistance using streptozotocin: A phase I trial // *Cancer Res.*—1992.—52, N 9.—P. 2456—2459.
  141. Micetich K. C., Futscher B., Koch D., Fisher R. J., Erickson L. C. Phase-I study of streptozotocin-sequenced and carmustine sequenced administration in patients with advanced cancer // *J. Nat. Cancer Inst.*—1992.—256, N 4.—P. 256—262.
  142. Avril M. F., Bonnetterre J., Delaunay M., Grosshans E., Fumolean P. Combination chemotherapy of decarbazine and fotemustine in disseminated malignant melanoma-experience of the French study group // *Cancer Chemother. Pharmacol.*—1990.—27, N 2.—P. 81—85.
  143. Marathi U. K., Dolan M. E., Erickson L. C. Anti-neoplastic activity of sequenced administration of O-6-benzylguanine, streptozotocin, and 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea *in vitro* and *in vivo* // *Biochem. Pharmacol.*—1994.—48, N 11.—P. 2127—2135.
  144. Dolan M. E., Larkin G. L., English H. F., Pegg A. E. Depletion of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in mammalian tissues and human tumor xenografts in nude mice by treatment with O<sup>6</sup>-methylguanine // *Cancer Chemother. Pharmacol.*—1989.—25, N 2.—P. 103—109.
  145. Dolan M. E., Mitchell R. B., Mummert C., Moschel R. S., Pegg A. E. Effect of O<sup>6</sup>-Benzylguanine analogues on sensitivity of human tumor cells to the cytotoxic effects of alkylating agents // *Cancer Res.*—1991.—1, N 13.—P. 3367—3373.
  146. Chen J. M., Zhang Y. P., Sui J. L., Moschel R. S., Ikenaga M. Modulation of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase-

- mediated 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea resistance by O-6-benzylguanine *in vitro* and *in vivo* // *Anticancer Res.*—1993.—13, N 3.—P. 801—806.
147. *Chen J. M., Zhang Y. P., Moschel R. S., Ikenaga M.* Depletion of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase and potentiation of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea antitumor activity by O-6-benzylguanine *in vitro* // *Carcinogenesis.*—1993.—14, N 5.—P. 1057—1060.
148. *Marathi U. K., Kroes R. A., Dolan M. E., Erickson L. C.* Prolonged depletion of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase activity following exposure to O-6-benzylguanine with without streptozotocin enhances 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea sensitivity *in vitro* // *Cancer Res.*—1993.—53, N 18.—P. 4281—4287.
149. *Marathi U. K., Dolan M. E., Erickson L. C.* Extended depletion of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase activity following O-6-benzyl-2'-deoxyguanosine or O-6-benzylguanine combined with streptozotocin treatment enhances 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea cytotoxicity // *Cancer Res.*—1994.—54, N 16.—P. 4371—4376.
150. *Muller M. R., Thomale J., Lensing C., Rajewsky M. F., Seeber S.* Chemosensitisation to alkylating agents by pentoxifylline. O<sup>6</sup>-benzylguanine and ethacrynic acid in haematological malignancies // *Anticancer Res.*—1993.—13, N 6a.—P. 2155—2160.
151. *Gerson S. L., Berger S. J., Varnes M. E., Donovan C.* Combined depletion of O-6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and glutathione to modulate nitrosourea resistance in breast cancer // *Biochem. Pharmacol.*—1994.—48, N 3.—P. 543—549.
152. *Sarkar A., Dolan M. E., Gonzalez G. G., Marton L. J., Pegg A. E., Deen D. F.* The effect of O-6-benzylguanine and hypoxia on the cytotoxicity of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea in nitrosourea-resistant Sf-763 cells // *Cancer Chemother. Pharmacol.*—1993.—32, N 6.—P. 477—482.
153. *Dolan M. E., Pegg A. E., Biser N. D., Moschel R. S., English H. F.* Effect of O<sup>6</sup>-benzylguanine on the response to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea in the Dunning-R3327G model of prostatic cancer // *Cancer Chemother. Pharmacol.*—1993.—32, N 3.—P. 221—225.
154. *Friedman H. S., Dolan M. E., Moschel R. S., Pegg A. E., Felker G. M.* Enhancement of nitrosourea activity in medulloblastoma and glioblastoma multiforme // *J. Nat. Cancer Inst.*—1992.—84, N 5.—P. 1926—1931.
155. *Friedman H. S., Dolan M. E., Moschel R. S., Pegg A. E., Felker G. M.* Enhancement of nitrosourea activity in medulloblastoma and glioblastoma multiforme. (Corrections) // *J. Nat. Cancer Inst.*—1994.—86, N 13.—P. 1027—1028.
156. *Felker G. M., Friedman H. S., Dolan M. E., Moschel R. C., Schold C.* Treatment of subcutaneous and intracranial brain tumor xenografts with O-6-benzylguanine and 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea // *Cancer Chemother. Pharmacol.*—1993.—32, N 6.—P. 471—477.
157. *McElhinney R. S., Donnelly D. J., McCormick J. E., Kelly J., Watson A. J., Rafferty A., Elder R. H., Middleton M. R., Willington M. A., McMurry T. B., Margison G. P.* Inactivation of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase. 1. Novel O<sup>6</sup>-(heteroaryl-methyl)guanines having rings in the side chain // *J. Med. Chem.*—1998.—41, N 26.—P. 5265—5271.

УДК 575.224.6:577.152.2  
Надійшла до редакції 17.08.2000