



HAL
open science

**Signalisation moléculaire par le système de réparation
des mésappariements de l'ADN et l'agent anticancéreux
cisplatine : étude des interactions protéine
MutS-composé de lésion du cisplatine**

Yuliya Sedletska

► **To cite this version:**

Yuliya Sedletska. Signalisation moléculaire par le système de réparation des mésappariements de l'ADN et l'agent anticancéreux cisplatine : étude des interactions protéine MutS-composé de lésion du cisplatine. domain_other. Université d'Orléans, 2007. Français. NNT : . tel-00387491

HAL Id: tel-00387491

<https://theses.hal.science/tel-00387491>

Submitted on 25 May 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THESE
PRESENTEE
A L'UNIVERSITE D'ORLEANS
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'ORLEANS

Discipline: Aspect Moléculaire et Cellulaire en Biologie

PAR

Yuliya SEDLETSKA

Signalisation moléculaire par le système de réparation des mésappariements de l'ADN et
l'agent anticancéreux cisplatine : étude des interactions protéine MutS-composé de lésion du
cisplatine

Soutenue le 25 septembre 2007, au Centre de Biophysique Moléculaire d'Orléans

MEMBRES DU JURY :

Pr. Chantal PICHON	Président du jury, Université d'Orléans
Dr. Jiří KOZELKA	Rapporteur, CNRS Paris V
Dr. Jean-Marc MALINGE	Directeur de thèse, CNRS Orléans
Dr. Evelyne SAGE	Rapporteur, CNRS Orsay
Dr. Marie-Paule TEULADE-FICHO	Examinatrice, CNRS Orsay
Dr. Sophie ZINN-JUSTIN	Examinatrice, CEA Gif-sur-Yvette

Tout d'abord je voudrais remercier le Dr. Jean-Claude Beloeil et le Dr. Jean-Claude Maurizot de m'avoir admis au sein du Centre de Biophysique Moléculaire.

Je remercie le Dr. Françoise Culard pour son accueil chaleureux dans son équipe et pour ses conseils précieux.

Je voudrais aussi remercier le Dr. Patrick Midoux et son équipe de m'avoir accueillie parmi eux pour la dernière année de mon travail de thèse.

Je remercie le Dr. Evelyne Sage et le Dr. Jiri Kozelka d'avoir accepté d'être mes rapporteurs de thèse. Un grand merci au Dr. Sophie Zinn-Justin, au Dr. Marie-Paule Teulade-Fichou et au Pr. Chantal Pichon pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse ainsi que pour leur questions très intéressantes qui m'ont permis de voir mon travail sous un autre angle.

Un merci tout particulier à mon directeur de thèse le Dr. Jean-Marc Malinge de m'avoir confié ce travail. Je le remercie pour toutes les connaissances qu'il m'a apportées.

Je voudrais remercier les collaborateurs de ce travail :

- *Pr. Daniel Locker et Dr. Gilles Rautureau du CBM et Dr. François Strauss de l'Institut Jaques Monod pour les protéines HMG qu'ils ont fournis pour ce travail.*
- *Dr. Friedrich Piller et Dr. Véronique Piller pour leur assistance technique lors des dosages de radioactivité.*
- *Equipe du Dr. Alain Roussel pour leur assistance lors des expériences de DLS.*
- *Dr. Sandrine Villette pour son aide lors des expériences de dichroïsme circulaire ainsi que pour son amitié.*

Je remercie Stéphane Goffinont pour ses conseils et les dépannages qui ont été nécessaires pour ce travail.

Je voudrais aussi remercier le Dr. Mélanie Spothem-Maurizot et le Dr. Bertrand Castaing pour leur accueil plus que sympathique et pour leurs conseils et leur soutien.

Mes remerciements particuliers pour les équipes technique et informatique pour leur assistance et surtout pour leur collaboration lors du déménagement ce qui m'a permis de ne pas arrêter mon travail.

Merci beaucoup à Mme Brigitte Albert et Mme Viviane Thuillier pour l'attention apportée à mon dossier, pour leur disponibilité et leur gentillesse.

Un merci particulier pour mes amis les thésards Aurélie Gombault, Vanessa Bourgeau, Eric Mennesson, Nathalie Gillard, Déborah Demange, Oumarou Samna Soumana, Olivier Lamiable. Un petit mot de sympathie pour nos stagiaires Emilie Brimboeuf, Benoit Torti et Khadija Aziz que je remercie pour leur travail et les bons moments que nous avons passés ensemble.

Un merci tout particulier à ma mère et mes grands parents ainsi qu'à Christophe et mon amie Ahlam pour leur soutien tout le long de ces trois années.

Je tiens à remercier la Région Centre pour le financement de mon travail de thèse.

Merci à tout le personnel de CBM pour leur accueil chaleureux.

SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	2
ABREVIATIONS.....	5
INTRODUCTION.....	7

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LE SYSTEME DE REPARATION DES MESAPPARIEMENTS DE L'ADN.....	11
Introduction.....	11
a) Réparation des mésappariements.....	12
→ Fonctionnement du système de réparation des mésappariements chez <i>E. coli</i>	12
→ Fonctionnement du système de réparation des mésappariements chez l'homme.....	14
b) Contrôle des dommages de l'ADN.....	14
→ Signalisation MMR-dépendante lors du contrôle du cycle cellulaire.....	15
→ Induction de l'apoptose par les protéines du système MMR.....	17
1) Protéines du système de réparation des mésappariements d'<i>Escherichia coli</i>.....	18
a) La structure de la protéine MutS.....	18
b) La structure de la protéine MutL.....	22
c) La structure de la protéine MutH.....	23
d) Les protéines impliquées dans la réparation après la discrimination du brin néosynthétisé.....	24
2) Protéines eucaryotes du système de réparation des mésappariements.....	25
a) Les protéines homologues de MutS.....	26
b) Les protéines homologues de MutL.....	27
c) La discrimination de brin chez les eucaryotes.....	28
d) Les protéines eucaryotes impliquées dans la réparation des mésappariements après la discrimination de brin.....	30
e) Les protéines accessoires impliquées dans la réparation des mésappariements.....	30
3) Le rôle de l'ATP dans les étapes de reconnaissance et de discrimination de brin chez les procaryotes et les eucaryotes.....	31

a) Les effets de l'ATP et de l'ADP sur MutS et ses homologues eucaryotes.....	32
b) Les effets de l'ATP sur MutL.....	34
c) Les modèles proposés.....	35
→ Modèle de translocation (P. Modrich).....	35
→ Le modèle de R. D. Kolodner.....	37
→ Le modèle de R. Fishel.....	38
4) Le système MMR et la recombinaison.....	39
a) Chez <i>Escherichia coli</i>	39
b) Chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
c) Chez les eucaryotes supérieurs.....	41
II. LE CISPLATINE.....	42
Introduction.....	42
1) Lésions du cisplatine.....	43
a) Les adduits monofonctionnels.....	43
b) Les adduits bifonctionnels.....	43
2) La structure des adduits du cisplatine.....	44
3) La réplication des lésions du cisplatine.....	47
4) Protéines interagissant avec les lésions du cisplatine.....	50
a) Les protéines à boîte HMG.....	50
b) Les autres protéines.....	55
III. IMPLICATION DU SYSTEME MMR DANS LA CYTOTOXICITE DU CISPLATINE.....	58
Introduction.....	58
1) Voie apoptotique MMR-dépendante.....	59
2) Contrôle du cycle cellulaire.....	59
3) Les modèles reliant le système MMR avec la cytotoxicité du cisplatine.....	60
a) Le modèle du cycle futile.....	60
b) Le modèle d'occlusion.....	61
c) Le modèle du signal direct.....	61

TRAVAUX DE RECHERCHE

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE : L'agent anticancéreux cisplatine induit de multiples réponses dans les cellules cancéreuses: importance des voies apoptotiques.....	64
Introduction.....	64
<i>Curr. Med. Chem. – Anti-Cancer Agents</i> , 2005, 5, 251-265.....	65
RESULTATS EXPERIMENTAUX.....	80
1) Modulation des propriétés ATP-dépendantes de MutS par l'ADN contenant un composé de lésion du cisplatine (lésion du cisplatine et mésappariement).....	80
Introduction.....	80
<i>J. Mol. Biol.</i> , 2007, 369, 27-40.....	82
Conclusion.....	96
2) Des composés de lésion du cisplatine (lésion/mésappariement) sont moins bien reconnus par HMGB1 que l'adduit majoritaire du cisplatine.....	97
Introduction.....	97
Matériels et Méthodes.....	99
Résultats.....	103
Discussion.....	107
Légendes des figures.....	109
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	115
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	120

ABREVIATIONS

6-TG.....	6-thioguanine
8-oxoG.....	8-oxo-7,8-dihydroguanine
Å.....	angström
aa.....	acide aminé
ABC.....	adenine nucleotide binding cassette
ADN.....	acide désoxyribonucléique
ADP.....	adénosine-5'-diphosphate
AMPPNP.....	adénylyl-imidophosphate
ARN.....	acide ribonucléique
ATP.....	adénosine-5'-triphosphate
ATP γ S.....	adénosine 5'-O-thiotriphosphate
ATRIP.....	ATR-interacting protein
CDB.....	cassure double brin
Cisplatine.....	<i>cis</i> -diamminedichloroplatine(II)
dien-Pt.....	diéthylènechlorotriamine platine (II)
Exo.....	exonucléase
FrUrd.....	5'-fluoro-2' déoxyuridine
FU.....	5-fluorouracile
HMG.....	high mobility group protein
HTH.....	hélice-tour-hélice
ID.....	insertion-deletion mismatches
kb.....	kilo paire de bases
MLH.....	MutL homolog
MMR.....	MisMatch Repair
MMS.....	méthanesulfonate
MNNG.....	N-méthyle-N'-nitro-N-nitroguanidine
MNU.....	N-méthyle-N-nitrosourée
MSH.....	MutS homolog
MSI.....	microsatellite instability
O4-meG.....	O4-méthyle guanine
O4-meT.....	O4-méthyle thymine

O6-meG.....	O6-méthyle guanine
pb.....	paire de bases
PCNA.....	proliferating cell nuclear antigen
PMS.....	post-meiotic segregation
Pol.....	polymérase
REN.....	réparation par excision des nucléotides
RMN.....	résonance magnétique nucléaire
RPA.....	replication protein A
Sb.....	simple brin
SSRP.....	structure specific recognition protein
TBP.....	TATA-box binding protein
TMZ.....	témozolomide
UBF.....	upstream binding factor
UV.....	rayons ultraviolets
YAP.....	Yes-associated protein
YB.....	Y-box binding protein

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Au cours de la vie les cellules sont exposées en permanence à un grand nombre d'agents génotoxiques endommageant l'ADN. Ces agents peuvent être de nature physique (radiations ultraviolettes ou ionisantes) ou chimique (agents environnementaux, produits du métabolisme cellulaire). Les lésions sur l'ADN générées par ces agents peuvent mener au déclenchement de signaux conduisant, entre autres processus, à la mort cellulaire programmée ou apoptose.

Plusieurs agents génotoxiques sont utilisés en chimiothérapie anticancéreuse chez l'homme : agents électrophiles (moutarde à l'azote, cyclophosphamide, cisplatine, ...), poisons du fuseau mitotique (vincristine, vinblastine, ...), agents interagissant avec l'ADN de façon réversible (adriamycine, daunorubicine, ...). Les mécanismes d'induction d'un signal apoptotique par les agents génotoxiques ne sont pas encore totalement élucidés.

Depuis de nombreuses années notre équipe travaille sur le mécanisme d'action du cisplatine. Il est établi que le cisplatine induit la mort des cellules cancéreuses par déclenchement de l'apoptose. L'efficacité du cisplatine en chimiothérapie est limitée en raison de l'apparition d'une chimiorésistance. L'une des principales raisons de cette chimiorésistance est la perte de fonction d'une ou de plusieurs voies apoptotiques. Bien qu'il soit largement admis que l'ADN est la cible pharmacologique du cisplatine, on ne connaît pas les mécanismes reliant la formation des diverses lésions du cisplatine sur l'ADN avec le déclenchement de l'apoptose. Un enjeu important pour améliorer l'efficacité de la chimiothérapie est la recherche de stratégies permettant de stimuler ou de restaurer l'apoptose des cellules cancéreuses impliquant une connaissance approfondie des voies apoptotiques.

Il a été montré que le système de réparation des mésappariements (MMR) joue un rôle majeur dans l'induction de l'apoptose des cellules traitées par le cisplatine et que sa déficience entraîne une chimiorésistance *in vivo*. De plus, une déficience du système MMR est associée avec certains cancers colorectaux.

La découverte d'une relation entre le système MMR et la cytotoxicité du cisplatine nous a amené à étudier le fonctionnement du système MMR avec l'ADN platiné. L'hypothèse de travail de notre équipe est que le système MMR serait le senseur de dommages de l'ADN platiné. Au moins deux conditions sont nécessaires pour que le MMR puisse jouer un rôle de senseur de dommages et un rôle de déclencheur direct de signaux dans l'induction de l'apoptose : i) les protéines de ce système de réparation doivent reconnaître certains dommages de l'ADN formés par le cisplatine ; ii) cette reconnaissance doit conduire à une modification du fonctionnement du système de réparation ce qui pourrait déclencher un signal. L'identification des lésions du cisplatine reconnues par le système MMR a déjà été abordée au laboratoire. Il a

été montré que la protéine MutS du MMR d'*Escherichia coli* reconnaît l'adduit majoritaire du cisplatine avec une faible affinité mais qu'elle se fixe fortement sur des composés de lésion formés lorsqu'une base non complémentaire est incorporée en face de l'une des deux purines pontées par le résidu diammineplatine. Mon travail de thèse est consacré à l'étude des étapes ultérieures de la reconnaissance des composés de lésion en présence de nucléotide régulateur ATP. Ce travail vise à comprendre au niveau moléculaire comment un signal pourrait être déclenché par le MMR et l'ADN modifié par le cisplatine pour essayer de proposer un modèle de déclenchement de l'apoptose.

Pour comprendre si des composés de lésion du cisplatine pourraient être reconnus par les protéines du système MMR dans la cellule, nous avons étudié l'interaction de composés de lésion avec la protéine HMGB1 connue pour être impliquée dans la cytotoxicité du cisplatine en empêchant l'accessibilité d'autres protéines. A long terme, le but de ce travail est de pouvoir trouver des stratégies pour améliorer l'efficacité de la chimiothérapie par le déclenchement spécifique du signal conduisant à l'apoptose des cellules cancéreuses.

Dans ce mémoire de thèse, je ferai d'abord le point des connaissances sur le système MMR : ses protéines et son fonctionnement. Ensuite, je présenterai les principales connaissances sur le cisplatine, les déformations qu'il induit sur la structure de l'ADN, ses effets négatifs sur la réplication et la transcription ainsi que la reconnaissance des adduits de cette drogue par différentes protéines cellulaires. Enfin, je résumerai les différents travaux mettant en évidence l'implication du système MMR dans la cytotoxicité du cisplatine. Je compléterai la synthèse bibliographique par un article de revue sur le cisplatine et ses dérivés à la rédaction duquel j'ai participé, présenté dans la partie « Travaux de recherche ».

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

I. LE SYSTEME DE REPARATION DES MESAPPARIEMENTS DE L'ADN

INTRODUCTION

L'intégrité de l'information génétique dépend de la fidélité de la réplication et de l'efficacité de réparation de l'ADN. Le système de réparation des mésappariements de l'ADN (MMR – Mismatch Repair System) assure la correction des mésappariements et des délétions/insertions (ID) sur le brin néosynthétisé.

Le système MMR a été découvert chez *E. coli* par Glickman et Radman (Glickman et Radman, 1980) qui ont montré que l'inactivation des gènes *mut* (*mutS*, *mutL* et *mutH*) aboutit à une augmentation du nombre de mutations (phénotype hypermutateur). Quelques années plus tard l'équipe de P. Modrich a montré l'implication des protéines MutS, MutL et MutH dans la réparation des mésappariements (Lu et coll., 1983). Les protéines homologues de MutS et de MutL ont ensuite été décrites chez la levure et l'homme (pour revue Lage et Dietel, 1999).

Un système de réparation des mésappariements fonctionnel a pu être totalement reconstitué *in vitro* en 1989 à partir de protéines purifiées (Lahue et coll., 1989).

La réparation des mésappariements ou des ID se fait en trois étapes : i) la reconnaissance des différents mésappariements ou ID par les protéines du système MMR ; ii) discrimination de brin afin de déterminer le brin néosynthétisé du brin parental ; iii) déclenchement de la réparation.

En plus de la réparation des mésappariements et ID le système MMR participe à la réparation de certaines lésions de l'ADN. Il a été montré que lors du stress oxydatif le taux de 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoG) est plus élevé dans les cellules déficientes en protéines du système MMR (Colussi et coll., 2002 ; Russo et coll., 2004). Aujourd'hui, il est admis que le système MMR est impliqué dans la suppression de la mutagenèse induite par les UV (pour revue Young et coll., 2004).

Une corrélation a été établie entre les mutations des gènes du système MMR et l'apparition de certains cancers et principalement du cancer colorectal héréditaire sans polypose (ou syndrome de Lynch) (Leach et coll., 1993 ; Nicolaidis et coll., 1994 ; Papadopoulos et coll., 1994). De plus, les protéines du système MMR reconnaissent les O6-meG (O6-méthyle guanine) sur l'ADN formées par certains agents alkylant et l'inactivation du MMR confère une forte résistance à ces agents (de Wind et coll., 1995 ; Duckett et coll., 1996 ; Hickman et Samson, 1999). L'apparition de la résistance cellulaire suite à l'inactivation du système MMR a aussi été montrée pour différents agents anticancéreux dont le cisplatine (Duckett et coll., 1996 ;

Gong et coll., 1999).

De plus, le système MMR fonctionnel est indispensable pour le contrôle du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose dans les cellules exposées aux irradiations ionisantes (Brown et coll., 2003), ce qui suggère que le système MMR peut agir comme senseur des dommages de l'ADN (pour revue O'Brien & Brown, 2006).

On attribue, donc, deux rôles principaux aux protéines du système de réparation de mésappariements : la réparation de mésappariements et la signalisation de certains dommages de l'ADN.

b) Réparation des mésappariements

→ Fonctionnement du système de réparation des mésappariements chez *E. coli*.

Malgré le grand nombre d'études sur le système MMR bactérien le mécanisme biochimique de la réparation des mésappariements n'est pas encore complètement compris (pour revue, Jiricny, 2000).

La réparation d'un mésappariement se fait en trois étapes : la reconnaissance du mésappariement, la discrimination de brin permettant de distinguer le brin néosynthétisé du brin parental, la réparation par excision d'un long fragment d'ADN et la resynthèse et ligation (pour revue, Modrich et Lahue, 1996 ; Jiricny, 1998).

Il a été montré *in vitro* que MutS reconnaît sept des huit mésappariements avec une affinité variable (C/C étant le mésappariement non reconnu) (Su et Modrich, 1986 ; Su et coll., 1988) et les ID de moins de quatre nucléotides (Parker et Marinus, 1992). La présence d'ATP provoque le départ de MutS du mésappariement (Allen et coll., 1997). L'homodimère MutL se fixe sur MutS dans une réaction qui dépend de l'hydrolyse de l'ATP (Galio et coll., 1999 ; Joshi et Rao, 2002 ; Junop et coll., 2003). Ce complexe va alors rechercher un site d(GATC) hémiméthylé occupé par l'endonucléase MutH le plus proche en 5' ou en 3' du mésappariement (Lahue et coll., 1987 ; Au et coll., 1992). L'interaction entre MutL et MutH *via* MutS va activer de façon ATP-dépendante l'endonucléase qui va cliver le brin néosynthétisé au niveau du site d(GATC) en 5' de l'adénine non méthylée (Ban et Yang, 1998^b ; Spampinato et Modrich, 2000). Le système MMR est donc bidirectionnel (Grilley et coll., 1993 ; Cooper et coll., 1993). MutL interagit aussi avec l'ADN hélicase II (appelée aussi UvrD ou MutU) et promeut la fixation de cette protéine sur la coupure simple brin (Dao et Modrich, 1998 ; Yamaguchi et coll., 1998). Le mécanisme de réparation des mésappariements chez *E. coli* est schématisé sur la figure 1.

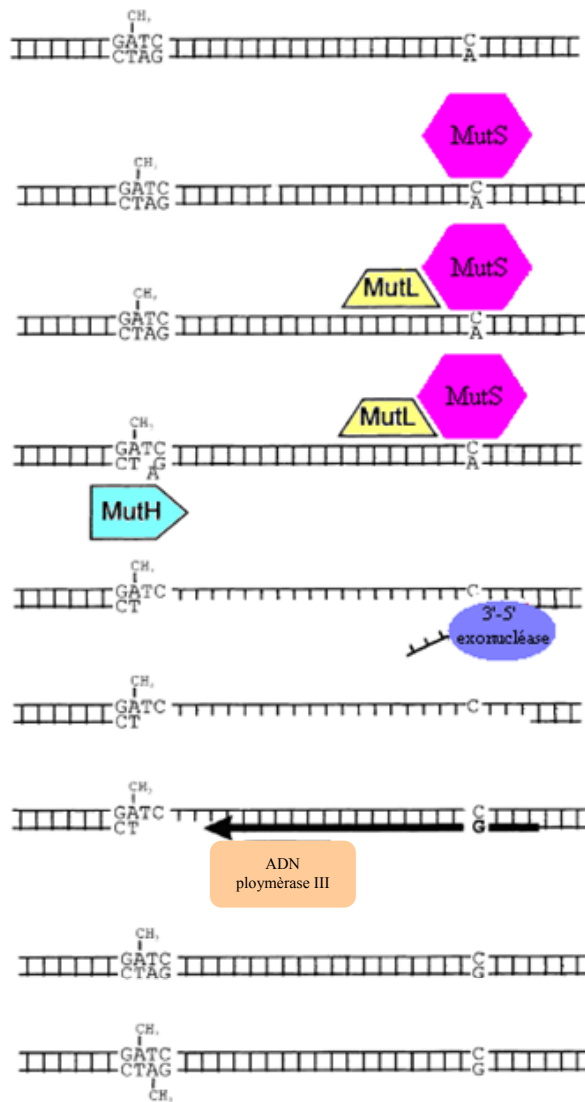


Fig. 1. Mécanisme de réparation des mésappariements chez *E. coli* (d'après Lage et Dietel, 1999). MutS est représentée en rose, MutL en jaune, MutH en turquoise, l'exonucléase en bleu et l'ADN polymérase III en ocre. La flèche indique la direction de la résynthèse du brin.

Pendant la phase d'excision, en présence de l'ADN hélicase II et des protéines Ssb (Single-strand binding protein), un long fragment d'ADN néosynthétisé (1,5 et 2 kB) (Su et coll., 1989) est dégradé par un ensemble d'exonucléases 5'→3' et 3'→5' (en fonction de l'emplacement de la coupure par rapport au mésappariement) puis resynthétisé par l'ADN polymérase III holoenzyme qui interagit avec MutS (Lopez de Saro et O'Donnell, 2001). Enfin l'ADN ligase intervient pour assurer la continuité du brin d'ADN (pour revues, Modrich et Lahue, 1996 ; Jiricny, 1998 ; Hsieh, 2001 ; Marti et coll., 2002).

→ Fonctionnement du système de réparation des mésappariements chez l'homme.

Six homologues de MutS et quatre homologues de MutL ont été caractérisés à ce jour. Tous les mésappariements sont détectés et corrigés par le système MMR (Brown et Jiricny, 1988 ; Holmes et coll., 1990 ; Acharya et coll., 1996). L'efficacité de la réparation est influencée par la nature du mésappariement et par la séquence des bases (Brown et Jiricny, 1988).

Les homologues eucaryotes de MutS et de MutL sont hétérodimériques alors que MutS et MutL sont des homodimères. Deux homologues de MutS ont un rôle essentiel dans la réparation post-réplivative (MutS α formée par les protéines MSH2 et MSH6 et MutS β comprenant MSH2 et MSH3), alors que, l'hétérodimère MSH4/MSH5 fonctionne spécifiquement pendant la méiose. Aucun homologue de MutH n'a été découvert chez les eucaryotes et le mécanisme de la discrimination de brin n'est pas compris. De même, les protéines intervenant dans les étapes d'excision, de resynthèse et de ligation ne sont pas toutes déterminées (pour revues, Modrich et Lahue, 1996 ; Jiricny, 1998 ; Marti et coll., 2002).

b) Contrôle des dommages de l'ADN

La deuxième fonction attribuée aux protéines du système MMR provient de leur implication dans la cytotoxicité de certains dommages de l'ADN. En effet, de nombreuses études montrent que les protéines MutS et MutL du système MMR sont impliquées dans la cytotoxicité de certaines drogues anticancéreuses et agents physiques endommageant l'ADN. Ainsi, *in vitro* les cellules eucaryotes déficientes pour les protéines du système MMR (hMutS α , hMutL α) manifestent une résistance aux agents alkylants (N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanine (MNNG), N-méthyl-N'-nitrouée (MNU), témozolomide (TMZ), procarbazine, méthanesulphonate (MMS), busulfane, antimétabolites (6-thioguanine, 5-fluorouracile (FU), 5'fluoro-2'deoxyuridine (FdUrd), et mercaptopurine), dérivés du platine (cisplatine et carboplatine) et anthracyclines comme doxorubicine (table 1).

De plus, le fait que MutS et ses homologues eucaryotes MutS α reconnaissent des lésions telles que les dimères de thymines et les dimères de thymines opposées à une thymine mésappariée (Wang et coll., 1999), les 8-oxoG/C et 8-oxoG/A (de Weese et coll., 1998 ; Ni et coll., 1999 ; Mazurek et coll., 2002), les O6-MeG/C, O4-MeT/A, les O6-MeG/T et O4-MeG/T (Babic et coll., 1996 ; Duckett et coll., 1996), l'adduit majoritaire intrabrin du cisplatine 1,2-d(GpG) lorsqu'une thymine est mésappariée à l'une des deux guanines pontées par le cisplatine (Yamada et coll., 1997 ; Fourrier et coll., 2003) renforce l'hypothèse que le système MMR est

un senseur général des lésions de l'ADN. Pour expliquer l'implication du système MMR dans la signalisation des dommages à l'ADN deux modèles majeurs ont été proposés. Selon le modèle, dit du « cycle futile » (chapitre III), la réparation du mésappariement est démarrée, les protéines du système MMR n'arrivent pas à le réparer et la réparation est recommencée en boucle ce qui conduit à une surcharge du système MMR et à la mort de la cellule ou l'arrêt du cycle cellulaire. Le deuxième modèle considère des protéines du système MMR comme des senseurs des dommages de l'ADN impliqués dans la formation d'un signal direct (chapitre III).

→ Signalisation MMR-dépendante lors du contrôle du cycle cellulaire

Afin d'assurer le bon enchaînement des phases lors de la division cellulaire et la « non-réplication » des dommages de l'ADN le cycle cellulaire est contrôlé en permanence. Les dommages sur l'ADN peuvent conduire au ralentissement ou même l'arrêt du cycle cellulaire. Si la réparation du dommage ne peut pas être effectuée, la cellule est éliminée (tuée).

Chaque phase du cycle cellulaire dispose d'un ou de plusieurs points de contrôle (checkpoints), qui sont assurés par certaines protéines cellulaires. Bien que les phases initiales d'activation de cascade de protéine-kinases en réponse aux dommages sur l'ADN ne soient pas bien comprises, l'implication de protéines ATM, ATR, Chk1 et Chk2 dans ce processus a été démontrée (pour revue, Zhou et Elledge 2000 ; Abraham 2001 ; Bartek et Lukas, 2003).

D'une part l'arrêt de la réplication de l'ADN mène à la génération des boucles d'ADN simple brin (sbADN) ce qui conduit au recrutement de la protéine ATRIP (ATR-interacting protein) probablement *via* la protéine RPA (Replication protein A) interagissant avec la boucle sbADN. D'autre part le dommage sur l'ADN qui conduit à la formation des cassures double brin de l'ADN (CDB) conduit à l'activation directe d'ATM et, ensuite à l'arrêt de progression de la fourche de réplication et, enfin à l'activation de ATR (ATM and Rad3-related) kinase (Kastan et Bartek, 2004). Les cibles principales du checkpoint ATM/ATR-dépendant lors de la phase G2 sont les cyclines B1 et cdc25C, connues comme régulateurs de la kinase mitotique cdc2 (Kastan et coll., 2000). L'activation de cdc2 à la fin de la phase G2 conduit à l'engagement des cellules dans la division mitotique et son inhibition, par les dommages sur l'ADN, joue un rôle clef dans la réponse cellulaire aux stress génotoxiques.

	Agents à l'origine du dommage de l'ADN	Lésions formées sur l'ADN	Références bibliographiques
Agents alkylant	N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanine (MNNG) N-méthyl-N'-nitrosourée (MNU) Témozolomide (TMZ) Procarbazine Méthanesulphonate Busulfane	O6-meG, O4-meG	Kat et coll., 1993 Branch et coll., 1993 Liu et coll., 1996 Friedman et coll., 1997 Glaab et coll., 1998 Friedman et coll., 1997
Dommages physiques	UV Irradiations ionisantes, agents oxydatifs	Dimères de thymine 8-oxoG CDB CSB	Young et coll., 2004 Lin et coll., 2000 Fritzell et coll., 1997 Davis et coll., 1998
Antimétabolites	6-thioguanine (6-TG) Mercaptopurine 5-fluorouracil (FU), 5-fluoro-2'-deoxyuridine (FdUrd)	S6-meTG Fluorodeoxyuridine	Swann et coll., 1996 Swann et coll., 1996 Carethers et coll., 1999 Meyers et coll., 2001
Dérivés du platine	Cisplatine Carboplatine	Adduits Adduits	Fink et coll., 1996 Aebi et coll. 1996
Anthracyclines	Doxorubicine	CDB	Drummond et coll., 1996
Epipodophylotoxines	Etoposide	CDB	Aebi et coll., 1997 de las Alas et coll., 1997 Lage et coll., 1999

Table 1. Principaux agents présentant une cytotoxicité plus faible sur des cellules dont le système MMR est déficient.

La cytotoxicité des agents alkylants est associée à l'arrêt MMR-dépendant des cellules en phase G2 impliquant un mécanisme de signalisation indépendant de la fonction de p53

(Hawn et coll., 1995 ; Moreland et coll., 1999 ; Aquilina et coll., 1999). Les cellules déficientes pour les protéines du système MMR ne s'arrêtent pas en phase G2 après exposition au MNNG et 6-TG et développent une résistance aux effets cytotoxiques de ces agents (Koi et coll., 1994 ; Umar et coll., 1997 ; Cejka et coll., 2003 ; Stojic et coll., 2004).

→ Induction de l'apoptose par les protéines du système MMR

La cytotoxicité des drogues dont le principe d'action repose sur la formation des lésions sur l'ADN dépend de deux processus opposés :

- la réparation de la lésion sur l'ADN,
- la signalisation *via* le système MMR.

L'apoptose est un mécanisme essentiel dans la cytotoxicité des drogues anticancéreuses. En effet la majorité des agents utilisés en chimiothérapie tue les cellules cancéreuses *via* l'apoptose. Il est bien déterminé que la réponse apoptotique aux agents alkylants est dépendante du système MMR. En effet, le système MMR fonctionnel est indispensable pour le déclenchement des voies apoptotiques p53 ou p73-dépendantes. De plus, les cellules déficientes pour les protéines homologues de MutS et MutL du système MMR perdent leur capacité d'induire l'apoptose et deviennent résistantes à l'action d'agents alkylants (Karran et Bignami, 1994).

Après l'exposition aux agents alkylants le suppresseur de tumeurs p53 est stabilisé de façon MMR-dépendante (Duckett et coll., 1996 ; Hickman et Samson, 1999). La protéine p53 fonctionnelle est une composante importante de la réponse apoptotique au MNNG et TMZ (Kaina et coll., 1997 ; Ochs et Kaina 2000 ; Roos et coll., 2004). Hickman et Samson (2004) ont montré une activation MMR-dépendante des caspases mitochondriales -2, -3, -8 et -9 en réponse au MNNG. Les résultats de cette équipe suggèrent que la signalisation déclenchée par la O6-meG engagée dans un mésappariement implique les voies de signalisation dépendant de la mitochondrie. Néanmoins, certaines équipes (Cejka et coll., 2003 ; Stojic et coll., 2004) ont montré que les agents alkylant pouvaient induire la mort cellulaire dépendante du MMR mais de nature non-apoptotique. La réponse aux agents alkylants peut donc être dépendante ou indépendante du système MMR (Stojic et coll., 2005).

L'induction de l'apoptose par le cisplatine passe par la voie de signalisation impliquant p73 modulée par les protéines du système MMR et indépendantes de p53 (Branch et coll., 2000 ; Siddik, 2003 ; Wang et Lippard, 2005). La voie de signalisation MMR-dépendante induite par le cisplatine implique les kinases c-Abl et JNK qui participent à la stabilisation de p73 (Gong et coll., 1999). La voie de signalisation impliquant p73 joue un rôle important dans

l'apoptose induite par les agents endommageant l'ADN (Flores et coll., 2002) et son dysfonctionnement conduit à l'apparition d'une résistance cellulaire (Irwin et coll., 2003). Shimodaira et coll. (2003) ont montré que PMS2 l'analogue eucaryote de MutL, peut interagir directement avec p73 en le stabilisant. Ce résultat fournit le lien direct entre le système MMR et la signalisation apoptotique et suggère que PMS2, contribue à l'intégrité du génome non pas uniquement *via* son rôle dans la réparation de l'ADN, mais aussi *via* le déclenchement de l'apoptose suite à l'endommagement de l'ADN.

5) PROTEINES DU SYSTEME DE REPARATION DES MESAPPARIEMENTS D'*Escherichia coli*.

a) La structure de la protéine MutS

MutS est une protéine homodimérique de 97 kDa par monomère (Su et Modrich, 1986) qui appartient à la superfamille des ATPases ABC (Adenine nucleotide Binding Cassette). Cette famille protéique est caractérisée par un domaine ATPasique formé lors de l'association des deux monomères.

La structure a été déterminée à partir du cristal de MutS de *Thermus aquaticus* et des co-cristaux de MutS *T. aquaticus*/insertion d'un T (Obmolova et coll., 2000) et de MutS *E. coli*/mésappariement G/T (Lamers et coll., 2000). Ces deux structures protéiques sont très similaires. Sans ADN, la protéine a une forme de U tandis qu'en présence d'un hétéroduplexe, elle prend une forme de disque ovale, avec deux larges canaux centraux, dont l'un forme le site de fixation de l'ADN (fig. 2). La surface est presque entièrement chargée négativement sauf au niveau de ce canal (Obmolova et coll., 2000).

La protéine MutS en solution est présente essentiellement sous forme dimérique, mais elle peut exister sous forme tétramérique (Su et Modrich, 1986 ; Takamatsu et coll., 1996 ; Biswas et Hsieh, 1997) et hexamérique (Bjornson et coll., 2000 ; Mendillo et coll., 2007). Dans le cas d'un dimère de MutS, chaque monomère est structuralement identique. Un monomère est formé de cinq domaines et présente une forme de virgule (fig. 3) : domaine de reconnaissance du mésappariement (I) (résidus 2à 115 chez *E. coli*), le domaine de connexion (II) (résidus 116 à 266), le domaine « core central » (III) (résidus 267 à 443 et 504 à 561), le domaine « clamp » (IV) (résidus 444 à 503) et le domaine ATPasique (V) (résidus 568 à 765). Les domaines I, II, IV et V possèdent des hélices α . Dans la partie C-terminale des domaines V se trouve un motif HTH (Hélice-Tour-Hélice) impliqué dans le contact entre les deux monomères lors de la dimérisation. Les domaines II et III de chaque monomère sont des domaines de liaison

permettant la communication entre les domaines I et V (grâce au domaine II) et IV et V (via le domaine III) (Obmolova et coll., 2000 ; Lamers et coll., 2000 ; Hsieh, 2001 ; Sixma, 2001).

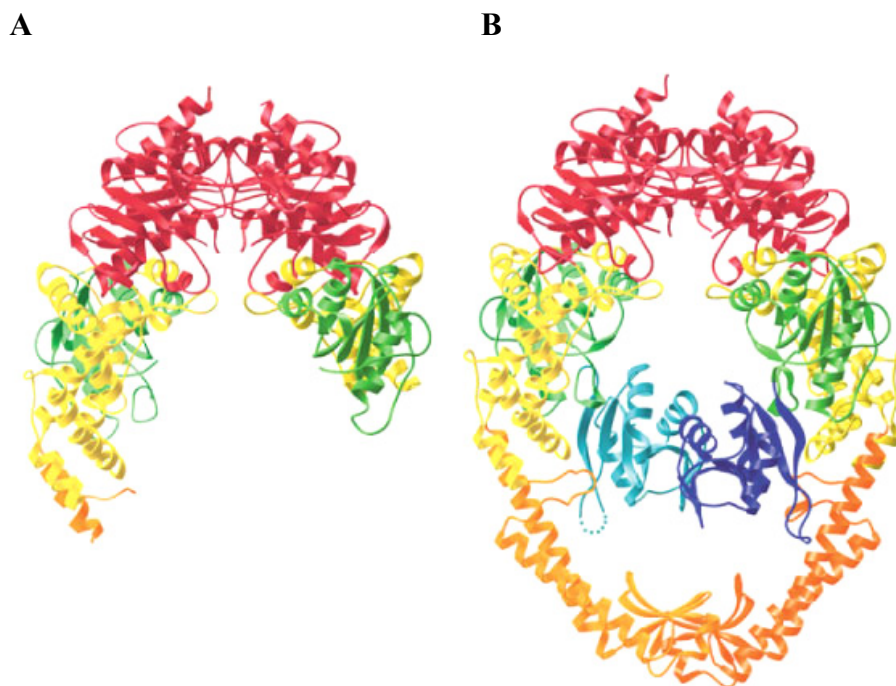


Fig. 2. Dimère de MutS *Thermus aquaticus* (Obmolova et coll., 2000). Le même dimère est cristallisé en absence d'ADN (A) et en présence d'un duplexe contenant une insertion d'une thymine (B). Les cinq domaines sont colorés en bleu (I), en vert (II), en jaune (III), en orange (IV) et en rouge (V). Sans ADN, les domaines I et IV sont trop mobiles pour être cristallisés.

La fixation de MutS sur un ADN hétéroduplexe entraîne des modifications structurales aussi bien de la protéine que de l'ADN. Les domaines I et IV des deux monomères viennent entourer l'ADN (fig. 4). La parution récente (Warren et coll., 2007) de la structure cristalline de MutSa humaine permet de démontrer les fortes similitudes structurales entre la protéine MutS d'*E. coli* et MutSa humaine.

Les interactions entre MutS et l'ADN sont asymétriques. Seul le domaine I du monomère A (IA) a un contact spécifique avec l'ADN (du côté du petit sillon) i) en intercalant une phénylalanine (Phe 36 chez MutS *E. coli* et Phe 39 chez MutS *T. aquaticus*) dont le noyau aromatique vient s'empiler avec la thymine mésappariée ii) en établissant une liaison hydrogène entre cette thymine et la chaîne latérale d'un acide glutamique (Glu38 chez MutS d'*E. coli* et Glu 41 chez MutS *T. aquaticus*).

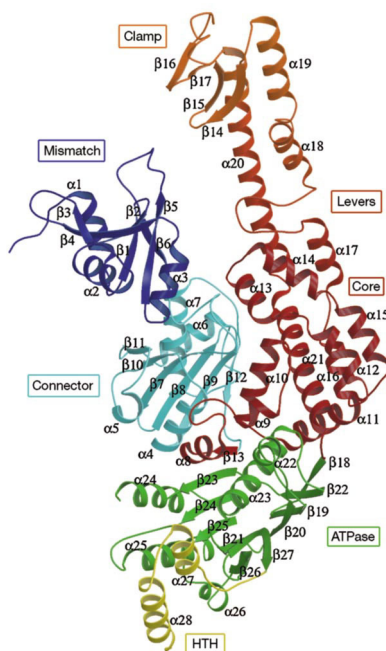


Fig. 3. Structure du monomère de MutS d'*Escherichia coli* (d'après Lamers et coll., 2000). Les cinq domaines du monomère de MutS d'*E. coli* sont colorés en bleu (I), en turquoise (II), en rouge (III), en orange (IV) en vert (V). le domaine HTH est coloré en jaune.

La mutation de cette phénylalanine empêche la fixation spécifique de MutS avec un mésappariement, ce qui confirme son rôle primordial dans la reconnaissance d'un mésappariement (Malkov et coll., 1997 ; Yamamoto et coll., 2000) tandis qu'une mutation de l'acide glutamique en alanine diminue la spécificité de la reconnaissance du mésappariement (Schofield et coll., 2001). Le domaine IV du monomère B (IV_B), opposé au domaine I_A, vient interagir avec le squelette phosphodiester du côté du grand sillon. Les domaines IVA et IB ne sont pas engagés dans la fixation spécifique de l'ADN mais participent à la stabilisation de l'ADN déformé. Le rôle de ces quatre domaines dans l'interaction de la protéine avec l'ADN explique la nécessité d'avoir une protéine dimérisée au moment de la reconnaissance d'un mésappariement ou d'un ID.

L'asymétrie de l'interaction entre chaque monomère de MutS et l'ADN conduit cette protéine à être hétérodimérique d'un point de vue structural une fois qu'elle est fixée à l'ADN. Dans la double hélice, le mésappariement G/T, qui forme une paire de bases instable, et la thymine mésappariée restent empilés avec les bases qui les entourent. L'insertion du noyau aromatique de la phénylalanine dans le petit sillon de l'ADN entraîne une courbure de l'ADN vers le grand sillon au niveau du mésappariement ou de la base non appariée (60° dans les deux cas) ainsi qu'un élargissement du petit sillon et un rétrécissement du grand sillon opposé. La thymine impliquée dans le mésappariement complexé à MutS subit une rotation, ce qui modifie

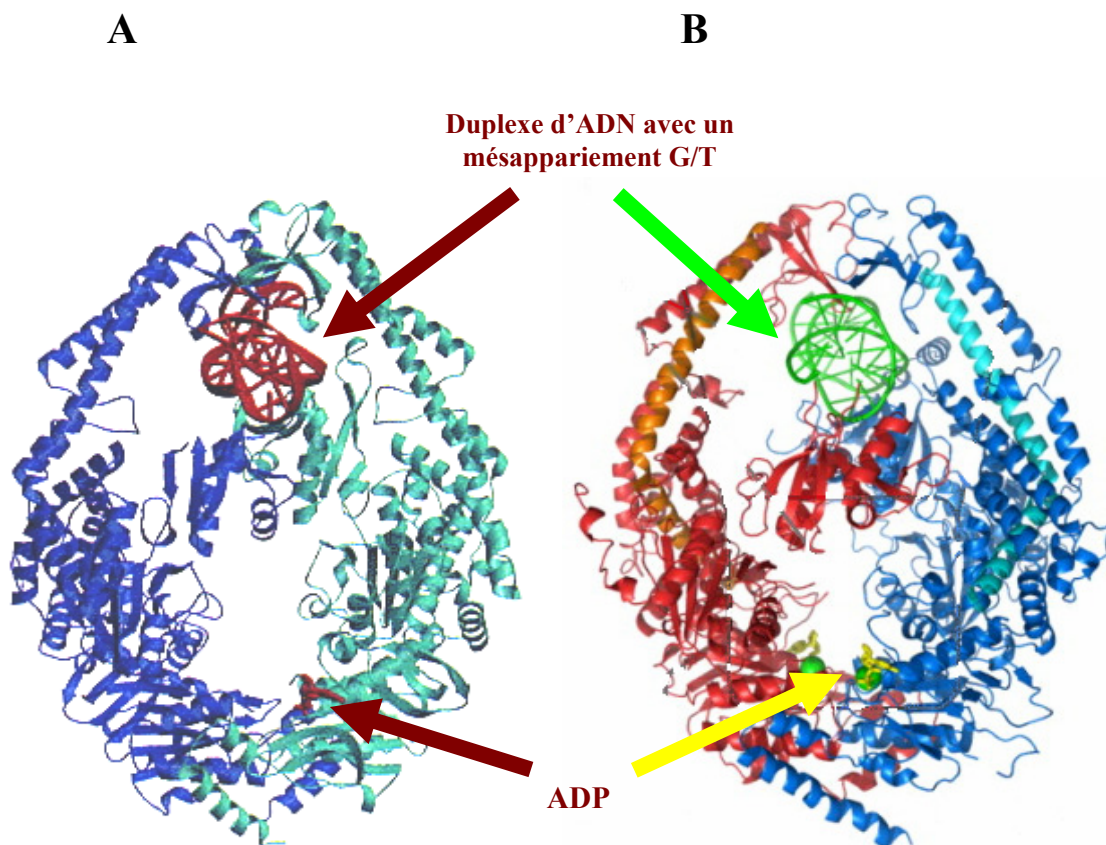


Fig. 4. Interaction de la protéine MutS d'*E. coli* (A) et MutS α avec un duplexe contenant un mésappariement G/T. A : le monomère A de MutS, dont le domaine I interagit spécifiquement avec l'ADN est représenté en vert, le monomère B en bleu. L'ADN et l'ADP (fixés respectivement dans les domaines I et V du monomère A) sont en rouge (d'après Lamers et coll., 2003). B : les sous-unités MSH6 et MSH2 de MutS α sont représentées en bleu et en rouge, respectivement, l'hélice d'ADN contenant un mésappariement G/T est représentée en vert et l'ADP en jaune (d'après Warren et coll., 2007).

la forme du mésappariement. De même, la thymine mésappariée est déplacée d'environ 3 Å vers le petit sillon et est stabilisée grâce à ses interactions avec la protéine, en particulier grâce à l'empilement de cette thymine avec la phénylalanine et à la formation d'une liaison hydrogène avec la chaîne latérale de la glutamine 41 (Hsieh, 2001 ; Sixma, 2001). La seule différence observée entre les deux protéines cristallisées est la conformation de l'ADN une fois lié à MutS. Dans le co-cristal MutS *T. aquaticus*/ADN avec insertion d'un T, l'ADN présente une conformation B tandis que dans le co-cristal MutS *E. coli*/mésappariement G/T, l'ADN prend une forme A, peut-être plus adaptée pour stabiliser l'ADN courbé au niveau du mésappariement.

b) La structure de la protéine MutL

La protéine MutL est une protéine formée de deux monomères identiques de 70 kDa chacun (Grilley et coll., 1989). Elle intervient dans le système MMR après la fixation de MutS sur un mésappariement.

L'obtention de la structure cristalline du fragment N-terminal (40 kDa) (fig. 5) de MutL d'*E. coli* (Ban et Yang, 1998^a), sans nucléotide fixé et avec une molécule d'ADP ou d'AMPPNP (adénylyl-imidiphosphate) (analogue de l'ATP non hydrolysable en présence de Mg^{2+}), a permis d'identifier un site de fixation de l'ATP/ADP (Ban et coll., 1999). La fixation de l'ATP par MutL provoque sa dimérisation (Ban et coll., 1999). Cette protéine interagit dynamiquement avec le complexe MutS/ADN pour former un complexe ternaire dans une réaction dépendant de l'ATP (Grilley et coll., 1989 ; Allen et coll., 1997 ; Habraken et coll., 1998 ; Galio et coll., 1999 ; Joshi et Rao, 2002 ; Acharya et coll., 2003). L'activité ATPasique de MutL est stimulée par l'ADN et cette hydrolyse induit la dissociation du dimère de MutL (Ban et coll., 1999). MutL se retrouve alors sous une forme ADP et monomérique. Cette protéine, comme MutS, est régulée grâce à un cycle de fixation et d'hydrolyse de l'ATP.

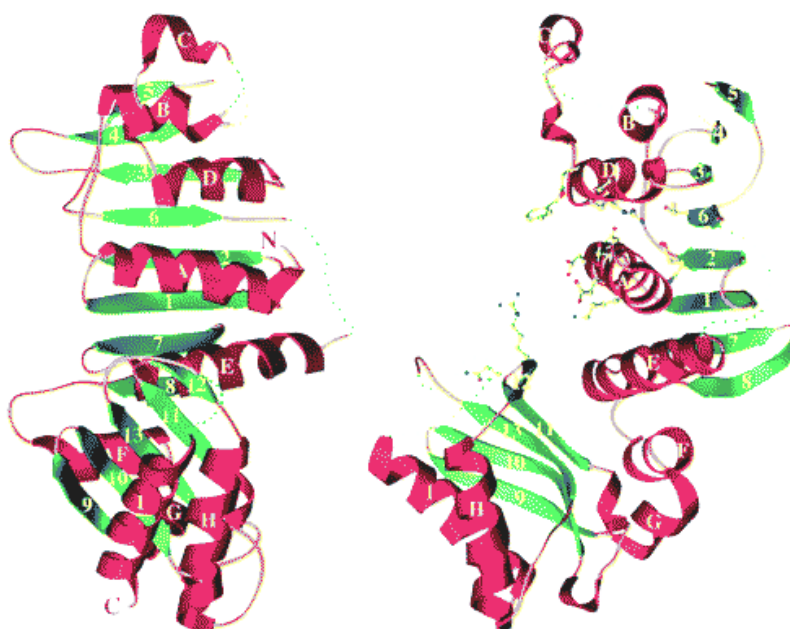


Fig. 5. Structure cristalline du fragment N-terminal de 40 kDa de la protéine MutL LN40 (résidus 1 à 349) vu sous deux angles différents (d'après Ban et Yang, 1998^a). Les hélices α sont en rouge, les feuillets β en vert et les boucles en orange.

c) La structure de la protéine MutH

MutH est une endonucléase de 28 kDa monomérique, Mg^{2+} -dépendante et séquence-spécifique (Welsh et coll., 1987). La structure du cristal de MutH révèle que la protéine est formée de deux sous-unités pouvant pivoter l'une par rapport à l'autre (fig. 6), ce qui permettrait de réguler son activité endonucléasique (Ban et Yang, 1998^b). Le site actif de MutH, localisé à l'interface des deux sous-unités, est formé par l'acide glutamique 56 (E56), l'acide aspartique 70 (D70), l'acide glutamique 77 (E77), la lysine (K79) localisés dans la sous-unité N-terminale et par la lysine 116 (K116) présente dans la seconde sous-unité.

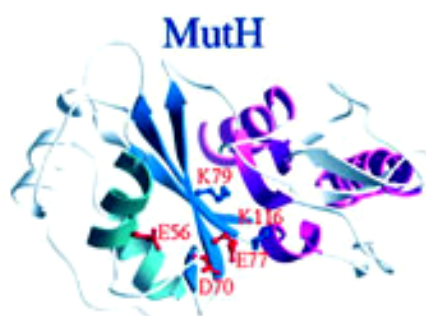


Fig. 6. Structure de l'endonucléase MutH (d'après Ban et Yang, 1998^b). Les cinq acides aminés représentés en rouge (E56, D70, E77, K79 et K116) sont indispensables à l'activité endonucléasique de MutH (Wu et coll., 2002 ; Junop et coll., 2003).

La protéine MutH clive l'ADN au niveau des séquences d(GATC) non méthylées du brin néosynthétisé (Au et coll., 1992). Cette séquence d(GATC) est méthylée sur l'atome N6 de l'adénine par la Dam méthylase juste après la réplication. Mais pendant une à trois minutes, cette séquence n'est pas méthylée sur le brin néosynthétisé (Campbell et Kleckner, 1990), ce qui permet à MutH de distinguer les deux brins et de cliver en 5' de l'adénine non méthylée du site d(GATC) (Au et coll., 1992 ; Welsh et coll., 1987).

La protéine MutL, complexée à MutS, interagit avec MutH fixée sur son site de clivage et stimule son activité endonucléasique (Hall et Matson, 1999) de façon ATP-dépendante (Ban et Yang, 1998^b ; Spampinato et Modrich, 2000). La mutation en alanine des cinq acides aminés inclus dans le site catalytique (E56, D70, E77, K79 et K116) entraîne une perte de l'activité catalytique en absence ou en présence de MutL, bien que les protéines mutées se fixent sur leur site spécifique (Wu et coll., 2002 ; Junop et coll., 2003). Il n'est pas exclu que cette perte ait pour origine une diminution de l'interaction de MutH avec MutL (Wu et coll., 2002).

d) Les protéines impliquées dans la réparation après la discrimination du brin néosynthétisé

La coupure du brin d'ADN néosynthétisé non méthylé catalysée par MutH est l'événement qui dirige les protéines impliquées dans la réparation vers le brin contenant la base mésappariée (Laengle-Rouault et coll., 1986 ; Lahue et coll., 1989). Le clivage se fait au niveau du site GATC. La réparation est possible quelque soit la position du site d(GATC) clivé par rapport a mésappariement/ID (Grilley et coll., 1993 ; Cooper et coll., 1993).

La réparation se fait en trois étapes : dégradation du fragment d'ADN à partir du site d(GATC) clivé vers le site du mésappariement, resynthèse de l'ADN et ligation (fig. 1).

- L'ADN hélicase II (UvrD) est recrutée au niveau de la coupure du brin néosynthétisé en interagissant avec MutL (Hall et coll., 1998 ; Yamaguchi et coll., 1998 ; Mechanic et coll., 2000). MutL stimule l'ouverture de la double hélice catalysée par UvrD (Dao et Modrich, 1998 ; Yamaguchi et coll., 1998 ; Mechnic et coll., 2000). Cependant, cette hélicase possède seulement une activité 3'→5' (Matson, 1986) et ne peut transloquer que sur une distance de 40 à 50 paires de bases (pb) (Ali et Lohman, 1997). Il a été proposé que MutL participe à l'ouverture de l'ADN en recrutant en continu des hélicases afin d'empêcher la réhybridation de la double hélice et pourrait aider UvrD à dérouler l'ADN dans la direction 5'→3' (Mechnic et coll., 2000).

- Le brin néosynthétisé est ensuite dégradé par une ou plusieurs exonucléases. Quatre exonucléases sont impliquées dans le système MMR selon la position de la séquence d(GATC) clivée par rapport au mésappariement. Si cette séquence se trouve du côté 3', le simple brin est dégradé par Exo I, Exo VII ou Exo X (Harris et coll., 1998 ; Viswanathan et Lovett, 1999). Exo VII possède une double activité exonucléasique et intervient aussi dans la dégradation du brin lorsque la coupure se situe en 5' du mésappariement (Lovett et Kolodner, 1989 ; Cooper et coll., 1993). RecJ est la 2^{ème} exonucléase impliquée dans la dégradation du simple brin dans le sens 5'→3' (Lovett et Kolodner, 1989 ; Harris et coll., 1998). Une seule exonucléase suffit à la dégradation du fragment de 1,5 à 2 kb contenant un mésappariement ou un ID (Viswanathan et coll., 2001 ; Su et coll., 1989).

- L'étape de resynthèse est assurée par l'ADN polymérase III holoenzyme en présence de la protéine Ssb et la ligation est catalysée par l'ADN ligase (pour revue, Harfe et Jinks-Robertson, 2000 ; Hsieh, 2001 ; Marti et coll., 2002). Le recrutement spécifique de l'ADN

polymérase III serait relié au fait que la sous-unité β de cette polymérase interagit avec MutS (Lopez de Saro et O'Donnell, 2001). Cette sous-unité est un facteur de processivité qui permet d'augmenter la fidélité de la synthèse catalysée par polymérase III. Cette interaction permet de coupler le système MMR à la machinerie répliquative.

6) PROTEINES EUCARYOTES DU SYSTEME DE REPARATION DES MESAPPARIEMENTS.

Les cellules eucaryotes possèdent plusieurs protéines homologues de MutS (protéines MSH pour MutS Homologs) et MutL (protéines MLH (MutL Homologs) et PMS (Post-Meiotic Segregation)), ce qui augmente la complexité du système de réparation des mésappariements. Ces protéines interagissent avec des protéines impliquées dans d'autres systèmes de réparation de l'ADN et interviennent dans la recombinaison et la méiose.

Des expériences biochimiques ont montré que des extraits de cellules HeLa corrigent les substrats portant un des huit mésappariements avec des degrés d'efficacité et de spécificité similaires à ceux observés chez *E. coli* (Holmes et coll., 1990 ; Thomas et coll., 1991). Ces cellules réparent faiblement les mésappariements C/C non réparés chez *E. coli*. Le mésappariement G/T est le mieux réparé. Les mésappariements A/C, C/T et A/G sont réparés efficacement tandis que les mésappariements G/G, A/A et T/T sont plus ou moins bien réparés en fonction des séquences qui les entourent (Brown et Jiricny, 1988 ; Holmes et coll., 1990). La reconnaissance des mésappariements est influencée par la séquence des bases *in vitro* et *in vivo* (Palombo et coll., 1996 ; Marsischky et Kolodner, 1999). Une cassure simple brin suffit à diriger la réparation, qu'elle soit en 3' ou en 5' du mésappariement ou de l'ID (Fang et Modrich, 1993). Les huit mésappariements et les petites ID entraînent l'excision d'un fragment d'ADN qui démarre au point de coupure et s'arrête 90-170 nucléotides après le mésappariement (pour revue, Modrich, 1997).

La discrimination de brin chez les procaryotes nécessite les protéines MutL et MutH. Si des homologues de MutL ont été caractérisés chez les eucaryotes, aucun homologue de MutH n'a été découvert.

a) Les protéines homologues de MutS

Six protéines homologues de MutS ont été caractérisées chez l'homme et la levure.

- Les protéines MSH2 (Fishel et coll., 1993), MSH3 (Habraken et coll., 1996 ; Risinger et coll., 1996) et MSH6 (Hughes et Jiricny, 1992 ; Palombo et coll., 1995) forment des hétérodimères essentiels à la réparation post-réplivative (Umar et coll., 1998). MutS α (hétérodimère MSH2/MSH6) (fig. 4B) reconnaît et répare efficacement les mésappariements et les ID de 1-2 nucléotides (Drummond et coll., 1995 ; Alani, 1996 ; Iaccarino et coll., 1996) tandis que MutS β (MSH2/MSH3) reconnaît et médie la réparation des ID de deux à huit nucléotides (New et coll., 1993 ; Habraken et coll., 1996 ; Palombo et coll., 1996 ; Risinger et coll., 1996). L'affinité de MutS α pour les mésappariements est influencée par la séquence (Marsischky et Kolodner, 1999).

• hMSH4 et hMSH5 forment un hétérodimère spécifique qui intervient au cours de la méiose et a un rôle dans la recombinaison et la ségrégation chromosomique (Ross-Macdonald et Roeder, 1994 ; Hollingsworth et coll., 1995). Ce dimère promeut l'appariement de fragments d'ADN homologues et le crossing-over pendant la méiose (Nakagawa et coll., 1999). Les protéines hMSH4 et hMSH5 sont fortement exprimées dans les tissus testiculaires et ovariens (Paquis-Flucklinger et coll., 1997 ; Her et Doggett, 1998 ; Winand et coll., 1998). Elles ont perdu une grande partie de leur domaine N-terminal et n'ont pas de rôle dans la réparation des mésappariements et des ID, ce qui confirme le rôle clé du domaine I dans la reconnaissance des mésappariements (Obmolova et coll., 2000).

• hMSH1 est le seul homologue localisé dans les mitochondries (Reenan et Kolodner, 1992). Cette protéine présente 25% d'homologie avec MutS et possède une région de 68 acides aminés en plus par rapport à hMSH2, qui lui permettrait de traverser les deux membranes mitochondriales. Tous les homologues eucaryotes de MutS fonctionnant sous forme dimérique, on suppose que MSH1 agit sous une forme homodimérique dans la mitochondrie (Reenan et Kolodner, 1992).

La protéine MSH6 utilise un motif conservé phénylalanine-X-acide glutamique présent dans le domaine N-terminal pour interagir spécifiquement avec un mésappariement (Warren, et coll., 2007) ainsi que le fait MutS, tandis que MSH3 semble utiliser un motif contenant une lysine et une arginine pour contacter le squelette phosphodiester de l'ADN (fig. 7). Ces différences pourraient être à l'origine de la reconnaissance spécifique des mésappariements et de petit ID par MutS α alors que MutS β reconnaît préférentiellement les boucles dues à une ID de plus de deux nucléotides (pour revue, Hsieh, 2001). D'autres études biochimiques et

génétiques montrent que le site de fixation des nucléotides et le motif HTH impliqué dans la dimérisation des monomères sont présents dans le domaine C-terminal des homologues eucaryotes de MutS (Alani, 1996 ; Alani et coll., 1997).

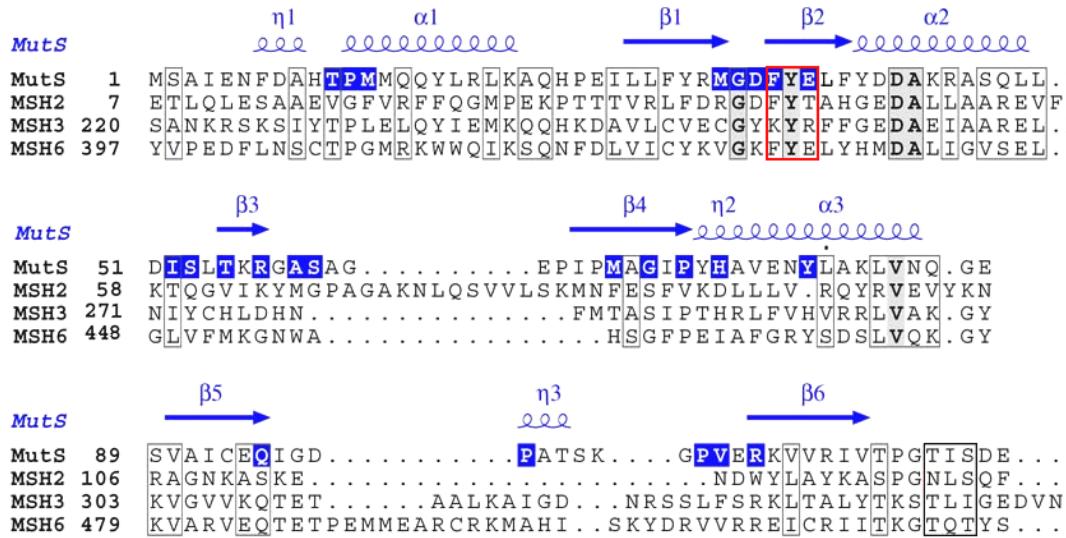


Fig. 7. Alignement des séquences primaires de la partie N-terminale des protéines MutS d'*E. coli*, hMSH2, hMSH3 et hMSH6 impliquée dans la reconnaissance du mésappariement (adaptée de Lamers et coll., 2000). Les résidus aminés impliqués dans la reconnaissance spécifique du mésappariement sont le motif F-X-E entouré en rouge (qui a disparu chez hMSH3) et le feuillet β4.

MSH3 et MSH6 correspondent au monomère de MutS bactérien impliqué dans la fixation de l'ADN et de l'ATP, alors que MSH2 assurerait le rôle du monomère impliqué dans la stabilisation du complexe nucléoprotéique (Bowers et coll., 1999 ; Dufner et coll., 2000).

b) Les protéines homologues de MutL

Quatre homologues de la protéine MutL bactérienne ont été caractérisés chez l'homme : hMLH1 (Bronner et coll., 1994), hMLH3 (Lipkin et coll., 2000), hPMS1 et hPMS2 (Nicolaïdes et coll., 1994). Comme pour les homologues de MutS, les homologues de MutL sont sous forme hétérodimérique (Wang et coll., 1999). PMS1, PMS2 et MLH3 contiennent une région de 36 acides aminés homologue qui interagit avec le même domaine de MLH1 (Kondo et coll., 2001).

MutLα, formé par MLH1 et PMS2 (Prolla et coll., 1994^a) se fixe sur MutSα et MutSβ (Prolla et coll., 1994^b ; Flores-Rozas et Kolodner, 1998). Il interagit aussi avec MSH2 lorsque MSH2 est fixé à l'ADN double brin. Cette interaction est plus forte si l'ADN contient un mésappariement et nécessite un ADN double brin de plus de 38 pb (Prolla et coll., 1994^b).

MutL α augmente l'affinité de MutS α pour les mésappariements et de MutS β pour les ID (Habraken et coll., 1998). Hall et coll. (2002) proposent que l'ATP se fixe à MLH1, provoquant une cascade d'évènements, dont l'hydrolyse de l'ATP, qui permettent la fixation d'une molécule d'ATP sur PMS1 (homologue de hPMS2 chez la levure) et la fixation de MutL α sur le complexe nucléoprotéique MutS α ou β /ADN pour déclencher la réparation.

Récemment l'équipe de P. Modrich (Kadyrov et coll., 2006) a montré que MutL α possède une activité endonucléasique. Cette activité endonucléasique est activée par le complexe MutS α /mésappariement.

Le rôle de hMutL β (hMLH1/PMS1) et de hMLH1/hMLH3 n'est pas encore clairement élucidé (pour revue, Marti et coll., 2002). La réparation par le système MMR semble dépendre essentiellement de hMutL α (Harfe et coll., 2000) dont la concentration cellulaire prédomine sur celle de hMutL β (Räschle et coll., 1999).

La plus grande homologie entre MutL bactérien et eucaryote se trouve dans la région N-terminale, au niveau du motif GHL (glycine-histidine-lysine) caractéristique de la famille des ATPases. Si une mutation touche cette région, la fonction du système MMR est abolie (Pang et coll., 1997). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, une mutation touchant l'asparagine Asn 35 ou l'acide glutamique Glu 31 de MLH1 et Asn 65 ou Glu 61 de PMS1 sont critiques pour la fixation et l'hydrolyse de l'ATP et inhibe la réparation des mésappariements *in vivo* (Tran et Liskay, 2000). La fixation de l'ATP par MutL α induit des changements de conformation de la protéine qui pourraient aider à la coordination des évènements ultérieurs (Tran et Liskay, 2000).

c) La discrimination de brin chez les eucaryotes.

Le mécanisme de discrimination du brin néosynthétisé reste incompris et ne passe sans doute pas par la méthylation. En effet, l'ADN de *Saccharomyces cerevisiae* et *Drosophila melanogaster* est peu ou pas méthylé après la réplication (Proffit et coll., 1984 ; Urieli-Shoval et coll., 1982). Chez les plantes et vertébrés, il existe un système de méthylation sur les C des motifs CG et CXG éparpillés sur l'ADN (îlots CG). Mais c'est une méthylation irrégulière qui ne s'applique pas à tous les îlots (pour revues, Modrich et Lahue, 1996 ; Jiricny, 1998).

Comme chez *E. coli*, la réparation est bidirectionnelle dans les cellules eucaryotes (Fang et Modrich, 1993). Le signal de discrimination de brin peut donc être détecté aussi bien en 5' qu'en 3' du mésappariement. La présence d'une cassure simple brin provoque l'excision d'un fragment d'ADN partant de la coupure vers le mésappariement (Holmes et coll., 1990 ; Thomas et coll., 1991 ; Fang et Modrich, 1993). Le signal de discrimination pourrait venir de brèches

présentes dans le brin néosynthétisé générées par l'ADN polymérase pendant la réplication (Jiricny, 1998).

La découverte de l'activité endonucléasique de MutL α (Kadyrov et coll., 2006) fournit une information très importante pour la compréhension du fonctionnement du système MMR chez les eucaryotes. Ce résultat suggère que MutL α serait impliquée dans la discrimination du brin néosynthétisé.

Les interactions entre les protéines du système MMR et la polymérase impliquée dans la réplication pourraient être à l'origine de la discrimination de brin. La visualisation des protéines hMSH3 et hMSH6 co-localisées avec PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) et des fragments d'ADN néosynthétisés suggèrent que le système MMR interagit avec le système de réplication (Kleczkowska et coll., 2001). Or la protéine PCNA est un facteur de processivité qui permet l'ancrage des ADN polymérases δ et ϵ sur l'ADN et l'aide à synthétiser l'ADN de façon continue (Hingorani et O'Donnell, 2000). PCNA interagit physiquement avec hMSH3 et hMSH6 (Clark et coll., 2000 ; Flores-Rozas et coll., 2000 ; Kleczkowska et coll., 2001). Kolodner et coll., montrent chez *S. cerevisiae* que la réparation des mésappariements par le système MMR est moins efficace lorsque l'interaction entre PCNA et MSH3 et MSH6 est abolie (Lau et coll., 2002). De plus, le facteur p21^{waf1} qui se fixe sur PCNA inhibe l'excision induite par le mésappariement ainsi que la réplication de l'ADN (Waga et Stillman, 1994 ; Modrich, 1997). Ces résultats suggèrent que PCNA serait impliquée dans la discrimination de brin en permettant les interactions entre le système MMR et le système de réplication.

Il faut noter que PCNA est un facteur très important dans la réparation des mésappariements chez les eucaryotes car il intervient à différentes étapes du système MMR dont l'étape de reconnaissance (voir le paragraphe suivant).

d) Les protéines eucaryotes impliquées dans la réparation des mésappariements après la discrimination de brin.

Les protéines eucaryotes intervenant dans les étapes de dégradation et de resynthèse du brin d'ADN néosynthétisé ne sont pas toutes caractérisées.

- Chez *E. coli* interviennent l'ADN hélicase II et les exonucléases pour dégrader le simple brin d'ADN.

- Deux exonucléases 5'→3' sont impliquées dans le système MMR eucaryote. L'exonucléase hExo1 interagit avec hMSH2 (Schmutte et coll., 1998 ; Tishkoff et coll., 1998) ainsi qu'avec hMSH3, hMLH1 et hMutL α (Schmutte et coll., 2001 ; Amin et coll., 2001). Bien que hExo1 ait une polarité 5'→3', l'exonucléase participe à l'excision du brin néosynthétisé débutant sur une cassure simple brin localisée aussi bien en 5' qu'en 3' du mésappariement. Dans les deux cas, l'excision requiert MutS α et MutL α (Genschel et coll., 2002). L'inactivation du gène *exo1* provoque une faible augmentation du taux de mutations, ce qui suggère que d'autres exonucléases sont impliquées dans le système MMR, comme chez *E. coli* (Tishkoff et coll., 1997). Ainsi une seconde exonucléase FEN-1 (homologue de RTH1/Rad27 chez *S. cerevisiae*) intervient dans le système MMR (Tishkoff et coll., 1997 ; Xie et coll., 2001). La dégradation des simples brins dans le sens 3'→5' serait catalysée par l'activité exonucléasique des polymérases δ et ϵ . Ces protéines seraient donc requises pour l'excision et la resynthèse (Longley et coll., 1997 ; Tran et coll., 1999).

- L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des ADN polymérases α , δ et ϵ a montré que ces trois polymérases sont impliquées dans le MMR, pol α ayant un rôle majoritaire dans la resynthèse de l'ADN (Thomas et coll., 1991).

- La ligation serait peut-être catalysée par l'ADN ligase I car cette protéine peut se complexer avec Pol δ (Hughes et coll., 1999) et PCNA (Montecucco et coll., 1998) mais aucune preuve de sa participation dans le système MMR n'a été apportée.

e) Les protéines accessoires impliquées dans la réparation des mésappariements.

Trois protéines accessoires interviennent dans le système MMR eucaryote.

- De même que chez *E. coli*, la protéine hRPA est impliquée dans la réparation des mésappariements (Umezu et coll., 1998 ; Lin et coll., 1998). Cette protéine a plusieurs rôles pendant la réparation de l'ADN. Elle se fixe sur l'ADN simple brin pour le stabiliser et le protéger de la dégradation nucléasique. Elle est impliquée dans l'excision dirigée par le mésappariement et la coupure simple brin, elle stimule l'ADN polymérase α et participe à la

resynthèse de l'ADN et à la ligation (Ramilo et coll., 2002).

- Le facteur de réplication RFC intervient dans le MMR en recrutant le facteur PCNA sur l'ADN par un processus ATP-dépendant (Kolodner et Marsischky, 1999).

- PCNA est un facteur auxiliaire des ADN polymérase δ et ϵ (Bravo et Macdonald-Bravo, 1987 ; Lee et Hurwitz, 1990 ; Eissenberg et coll., 1997) nécessaire à la réplication de l'ADN. PCNA intervient à différentes étapes de la réparation de l'ADN par le système MMR. Il est requis dans les premières étapes du système MMR et dans la resynthèse de l'ADN (Umar et coll., 1996 ; Gu et coll., 1998).

PCNA semble avoir un double rôle pendant la phase d'initiation du système MMR. Dans un premier temps, il participe à la reconnaissance du mésappariement ou de l'ID. En effet, il augmente la reconnaissance spécifique du mésappariement/ID en interagissant avec MutS α et MutS β *via* MSH3 et MSH6 (Habraken et coll., 1997, 1998 ; Clark et coll., 2000, Flores-Rozas et coll., 2000 ; Kleczkowska et coll., 2001). Les mutations de PCNA, MSH3 ou MSH6, qui suppriment les interactions entre PCNA et MutS α ou MutS β , provoquent une diminution d'activité MMR *in vivo* (Clark et coll., 2000, Flores-Rozas et coll., 2000 ; Kleczkowska et coll., 2001 ; Lau et coll., 2002). De plus, PCNA/MutS α forme un complexe stable non spécifique sur l'ADN homoduplexe. Si MutS α détecte un mésappariement, PCNA est exclu du complexe ternaire (Lau et Kolodner, 2003). Dans un second temps, PCNA interagit avec hMLH1 (Umar et coll., 1996) et déstabilise le complexe ternaire MutS α /MutL α /ADN pour provoquer le départ de MutS α /MutL α du mésappariement (Bowers et coll., 2001).

Le facteur PCNA participe à l'étape de resynthèse de l'ADN en interagissant avec les protéines du système de réplication (Gu et coll., 1998).

7) LE ROLE DE L'ATP DANS LES ETAPES DE RECONNAISSANCE ET DE DISCRIMINATION DE BRIN CHEZ LES PROCARYOTES ET LES EUCARYOTES.

La formation d'un complexe comprenant les protéines MutS et MutL semble coordonner les événements en aval de la reconnaissance du mésappariement ou de l'ID par MutS. Cette étape est contrôlée par la fixation de l'ATP et l'activité ATPasique de MutS et de MutL. Le mécanisme ATP-dépendant permettant le mouvement du complexe MutS/MutL pour signaler la présence du mésappariement et déclencher la réparation est partiellement compris.

Plusieurs modèles sont proposés pour expliquer le phénomène de la translocation en s'appuyant sur les effets de l'ATP/ADP sur la conformation des protéines MutS et MutL (ou leurs homologues eucaryotes) et sur la stabilité des complexes MutS/ADN contenant un mésappariement ou une ID.

a) Les effets de l'ATP et de l'ADP sur MutS et ses homologues eucaryotes.

Pour la protéine MutS et ses homologues eucaryotes, le site de fixation et d'hydrolyse de l'ATP est conservé à plus de 80% (Fishel et Wilson, 1997).

Les données cristallographiques sur MutS ont permis de localiser ce site ATPasique dans le domaine V, au niveau de la région d'interface des deux monomères (Obmolova et coll., Lamers et coll., 2000 ; Junop et coll., 2001). Elles ont confirmé la présence dans chaque monomère de quatre motifs N₁, N₂, N₃ et N₃' caractéristiques de la superfamille des ATPases ABC (fig. 8).

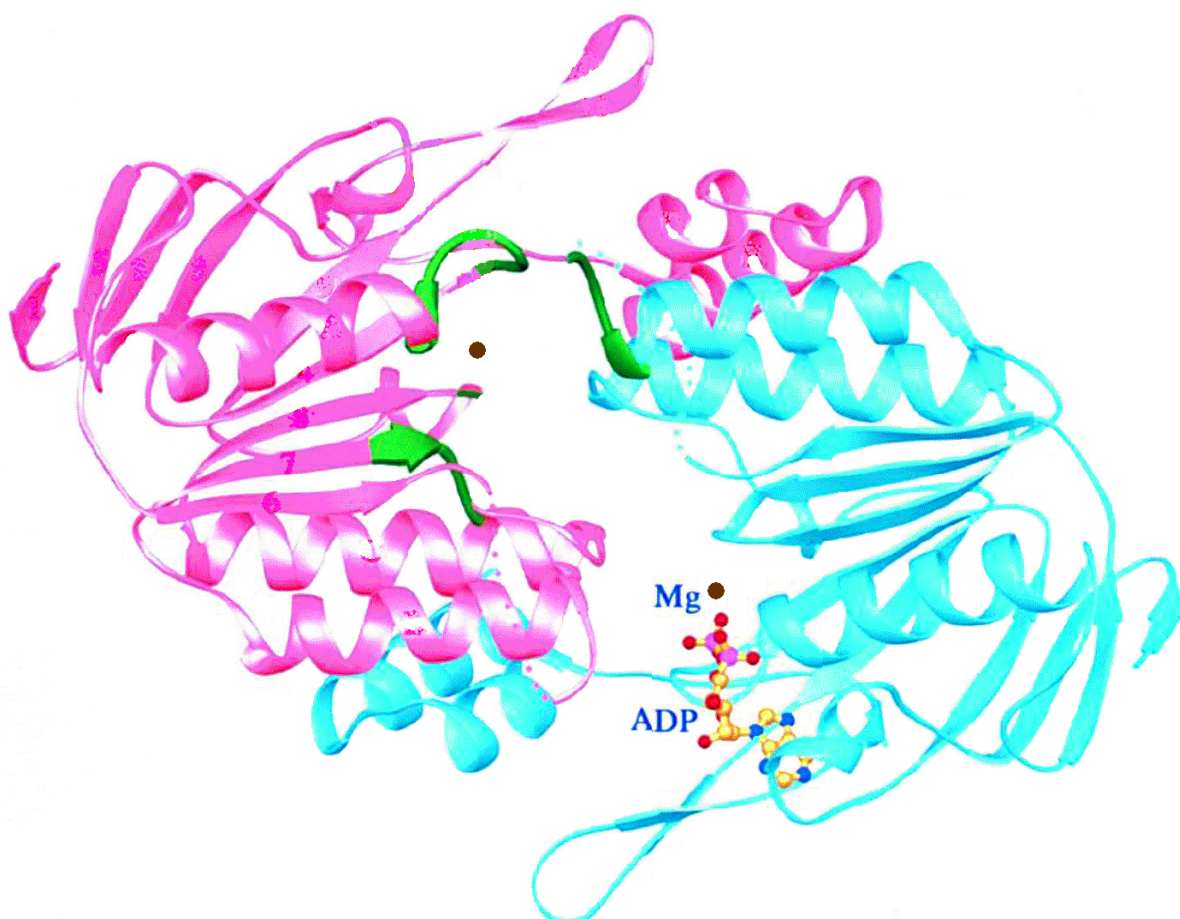


Fig. 8. Structure de l'interface des domaines V de MutS de *Thermus aquaticus* formant le domaine ATPasique en présence d'ADP (d'après Junop et coll., 2001). Le domaine V de la sous-unité interagissant spécifiquement avec l'ADN est coloré en rouge. Les motifs intervenant dans la fixation de l'ADP sont en vert, le Mg²⁺ en marron et l'ADP en jaune.

- Le motif N1 (GPNXGGKS, résidus 614 à 621 chez *E. coli*) est un motif de type Walker A contenant une boucle P responsable de la fixation du nucléotide.
- Le motif N₂ (ST, résidus 668-669) a un rôle dans l'hydrolyse de l'ATP en interagissant avec le γ -phosphate de l'ATP.
- Le motif N3 (DE, résidus 693-694) possède un motif Walker B qui est le site de fixation d'un ion Mg^{2+} et participe à la catalyse de l'ATP.
- Le motif N3' (TH, résidus 727-728) intervient dans la fixation de l'ATP.
- Deux autres motifs conservés N1' (FIA, résidus 596-598) et N' (H, résidu 760) sont impliqués dans la stabilisation de l'adénine de l'ADP (Obmolova et coll., 2000 ; Lamers et coll., 2000 ; Junop et coll., 2001).

Le site ATPasique de MutS est formé à l'interface des domaines V de chaque monomères de MutS. Dans la structure cristalline, la protéine MutS a fixé une seule molécule d'ADP. Cinq des six motifs du site actif (N₁, N₁' , N₃, N₃' et N₄) viennent d'un monomère tandis que le motif N₂ appartient au monomère opposé. Cette caractéristique renforce l'asymétrie structurale et fonctionnelle de MutS. En effet, ces cinq motifs N₁, N₁' , N₃, N₃' et N₄ appartiennent au monomère contenant la phénylalanine impliquée dans la fixation spécifique avec l'ADN.

La fixation d'une molécule d'ADP par MutS provoque de faibles changements de conformation du site de fixation du nucléotide (0.4 Å), qui se propagent et s'amplifient grâce aux domaines II et III et induisent un changement de conformation plus important du domaine de fixation de l'ADN (2.5 Å). De plus, la fixation de l'ADP augmente la mobilité des domaines I et IV (Hsieh, 2001 ; Junop et coll., 2001). Le complexe ternaire MutS/ADN/ATP n'a pas pu être cristallisé du fait de l'hydrolyse de l'ATP. L'utilisation d'analogues non hydrolysables de l'ATP n'a pas permis de résoudre ce problème, car l'ATP γ S (adénosine 5'-O-triphosphate) est hydrolysé pendant la cristallisation tandis que l'AMPPNP est légèrement contaminé par de l'ADP (Junop et coll., 2001).

Plusieurs études de mutagenèse du site ATPasique de MutS ont été réalisées pour comprendre le rôle de la fixation et de l'hydrolyse de l'ATP par MutS (Haber et Walker, 1991 ; Worth et coll., 1998 ; Junop et coll., 2001). Une mutation touchant le motif Walker B provoque une diminution de la fixation du Mg^{2+} et de l'hydrolyse de l'ATP (Junop et coll., 2001) tandis que l'inactivation par mutation de la fixation de l'ATP confère une diminution de l'efficacité de la réparation *in vivo* (Haber et Walker, 1991 ; Wu et Marinus, 1994). Il semble en fait que l'activité ATPasique de MutS soit essentielle à l'activation de MutH, ce qui explique que l'inactivation de l'hydrolyse de l'ATP par MutS aboutisse à un défaut de la réparation des

hétéroduplexes (Junop et coll., 2003).

Le recrutement de MutL par le complexe MutS/ADN contenant un mésappariement dépend de la fixation de l'ATP par MutS mais pas de l'hydrolyse du nucléotide par MutS (Grilley et coll., 1989 ; Joshi et coll., 2000 ; Acharya et coll., 2003).

On retrouve quelques résultats similaires issus des études avec les protéines eucaryotes homologues de MutS. La fixation d'une molécule d'ATP par MutS α provoque un changement de conformation de la protéine (Iaccarino et coll., 2000). L'inhibition de l'activité ATPasique de MutS α aboutit à une inhibition de l'efficacité de la réparation des hétéroduplexes dans les cellules eucaryotes (Alani et coll., 1997 ; Gradia et coll., 1997 ; Iaccarino et coll., 1998 ; Drotschmann et coll., 1999 ; Das Gupta et Kolodner, 2000), plus importante si la mutation touche le domaine V de MSH6 que le domaine V MSH2 ou MSH3 (Iaccarino et coll., 2000).

b) Les effets de l'ATP sur MutL.

La protéine MutL est une protéine homodimérique régulée par des cycles de fixation et l'hydrolyse de l'ATP (Ban et coll., 1999).

MutL se dimérise en présence d'ATP et possède une faible activité ATPasique (Ban et coll., 1999 ; Ban et Yang, 1998^a). L'AMPPN analogue non hydrolysable de l'ATP (fig. 9A), induit aussi le changement de conformation du fragment N-terminal de MutL et semble stabiliser la protéine qui ne s'agrège plus en solution (Ban et Yang, 1998^a). La fixation de MutL à l'ADN ne semble pas être influencée par la présence d'ATP alors que cette interaction nucléoprotéique stimule l'activité ATPasique de la protéine (Ban et coll., 1999), nécessaire à la formation du complexe ternaire MutS/MutL/ADN (Galio et coll., 1999).

MutL seule peut activer l'activité endonucléasique de MutH d'une façon ATP-dépendante mais le clivage de la séquence d(GATC) par l'endonucléase est stimulé lors du rajout de MutS (Ban et Yang, 1998^a). Des mutants de MutL pouvant fixer l'ATP mais présentant un défaut de l'hydrolyse du nucléotide ne peuvent plus activer MutH, même après addition de MutS (Junop et coll., 2003). Ces résultats confirment que l'activité ATPasique de MutL est essentielle à l'activation mésappariement-dépendante de MutH *via* MutS (Spampinato et Modrich, 2000 ; Junop et coll., 2003).

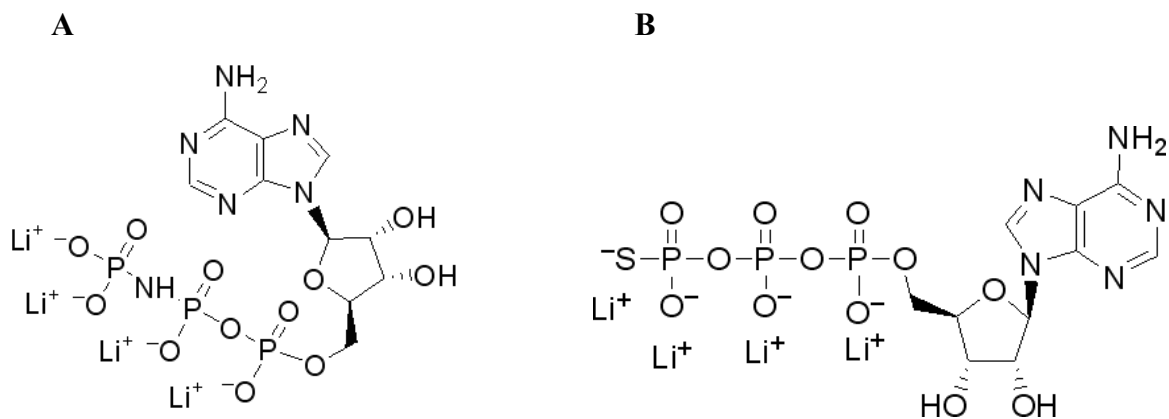


Fig. 9. Homologues non hydrolysables de l'ATP. (A) : AMPPNP. (B) : ATP γ S

Quelques résultats similaires sont trouvés avec les protéines eucaryotes. Ainsi MutL α possède une faible activité ATPasique et change de conformation lorsqu'elle fixe une molécule d'ATP (Tran et Liskay, 2000). hMLH1 et hPMS2, les deux monomères de hMutL α , possèdent chacun une faible activité ATPasique (Guarne et coll., 2001 ; Hall et coll., 2002). L'inhibition de cette activité par mutation de l'une ou l'autre des deux sous-unités de hMutL α provoquent une réduction de l'efficacité de la réparation *in vitro* (Räschle et coll., 2002). Jiricny et coll., proposent que l'interaction entre hMutL α (fixée sur le complexe hMutS α /ADN) et les protéines impliquées dans la réparation de l'ADN telles que PCNA ou EXO1 (Bowers et coll., 2001 ; Amin et coll., 2001) nécessiterait que hMutL α hydrolyse l'ATP pour déclencher la réparation (Räschle et coll., 2002).

c) Les modèles proposés.

Différents modèles sont proposés pour expliquer le déplacement de MutS et les interactions protéine/protéine ultérieures aboutissant au déclenchement de la réparation.

→ Modèle de translocation (P. Modrich)

La présence d'ATP réduit l'affinité de MutS et MutS α pour le mésappariement (Allen et coll., 1997 ; Blackwell et coll., 1998 ; Iaccarino et coll., 1996, 1998 ; Gradia et coll., 1999) et conduit à la dissociation de la protéine du mésappariement (Grilley et coll., 1989 ; Allen et coll., 1997 ; Iaccarino et coll., 1996 ; Blackwell et coll., 1998 ; Gradia et coll., 1997). L'analogue non hydrolysable ATP γ S (fig. 9B) peut provoquer le départ de MutS et de ses homologues eucaryotes, ce qui suggère que la fixation de l'ATP suffit à cette étape (Allen et coll., 1997 ; Iaccarino et coll., 1996 ; Blackwell et coll., 1998 ; Gradia et coll., 1999).

Des études par microscopie électronique permettent l'observation de structures d'ADN hétéroduplexe en forme de boucles dites oméga (Ω) en présence de MutS, MutL et d'ATP, la taille de ces boucles augmentant en fonction du temps (Allen et coll., 1997). La dissociation du mésappariement de la protéine MutS en présence d'ATP est associée à un mouvement de la protéine le long de la double hélice. Ceci est confirmé par les analyses biochimiques de l'effet de l'ATP sur l'interaction de MutS avec des hétéroduplexes dont les extrémités sont bloquées par un complexe Streptavidine/Biotine. Dans ces conditions, MutS et MutS α restent complexées à l'ADN en présence d'ATP (Blackwell et coll., 1998, 2001 ; Gradia et coll., 1999 ; Iaccarino et coll., 2000). En présence d'ATP, MutS suffit à la formation de boucles Ω mais l'ajout de MutL stimule la formation et la croissance de ces structures. Ces deux protéines sont sous forme dimérique. Elles sont situées proches l'une de l'autre et à la base de ces boucles. La présence d'un mésappariement déclenche la formation d'une boucle dépendant de l'hydrolyse de l'ATP (un homoduplexe et un duplexe contenant un mésappariement C/C, non reconnu spécifiquement par MutS, ne déclenchent pas ce processus). Le mésappariement reste à l'intérieur de la boucle dans la majorité des boucles observées (Allen et coll., 1997).

La présence d'ATP γ S ne permet pas la formation des boucles tandis qu'un excès d'AMPPNP provoque le blocage de la croissance de la boucle. Ces résultats suggèrent que le mouvement de la protéine le long de l'hélice nécessite l'hydrolyse de l'ATP qui fournirait l'énergie nécessaire à la translocation (Allen et coll., 1997 ; Blackwell et coll., 1998).

Dans le modèle proposé par P. Modrich et son équipe, MutS et MutS α n'ont pas besoin d'ADP pour reconnaître un mésappariement. La fixation de l'ATP sur la protéine déclenche la dissociation de MutS ou MutS α du mésappariement et l'hydrolyse de l'ATP fournit l'énergie pour la translocation. La formation d'une boucle Ω serait un moyen simple pour permettre à la protéine de scanner l'ADN dans les deux sens afin de chercher le signal de discrimination de brin et déclencher la réparation.

L'équipe de Modrich a montré (Bjornson & Modrich, 2003) que MutS peut exister sous la forme ADP-MutS-ATP. Il faut noter que l'ADP ne semble pas avoir le même rôle lorsque le nucléotide se fixe à MutS d'*E. coli* ou MutS α . En effet, la présence d'ADP a un faible effet négatif sur l'affinité de MutS α pour le mésappariement (Habraken et coll., 1998 ; Blackwell et coll., 1998) et promouvoit la dissociation du complexe hMutS α /hétéroduplexe (Blackwell et coll., 1998) tandis que l'ADP augmente la spécificité de la protéine MutS en réduisant l'interaction non spécifique avec l'ADN homoduplexe (Blackwell et coll., 2001). De plus, une plus forte spécificité de MutS pour un hétéroduplexe est observée en absence de nucléotide ou en présence d'ADP. Ces résultats suggèrent que MutS possède différents types

d'interactions avec l'ADN, modulés par la fixation des différents nucléotides et par l'hydrolyse de l'ATP par l'une et/ou l'autre des deux sous-unités (Blackwell et coll., 2001). Les travaux de l'équipe de T. Sixma confirment l'hypothèse d'une telle modulation en démontrant que les deux sites ATPasiques chimiquement identiques de MutS possèdent une affinité différente pour l'ADP et sont impliqués chacun à leur tour dans l'hydrolyse de l'ATP, même en absence d'ADN (Lamers et coll., 2003).

→ Le modèle de R. D. Kolodner

Un modèle basé sur la fixation et l'hydrolyse de l'ATP par les homologues eucaryotes de MutS a été proposé par R. D. Kolodner (Mazur et coll., 2006). Selon ce modèle un mésappariement peut être reconnu par hétérodimère MSH2-MSH6 et la forme MSH2(ADP)-MSH6 (fig. 10A). Le mésappariement promouvoit le recrutement de l'ATP par MSH6 et la

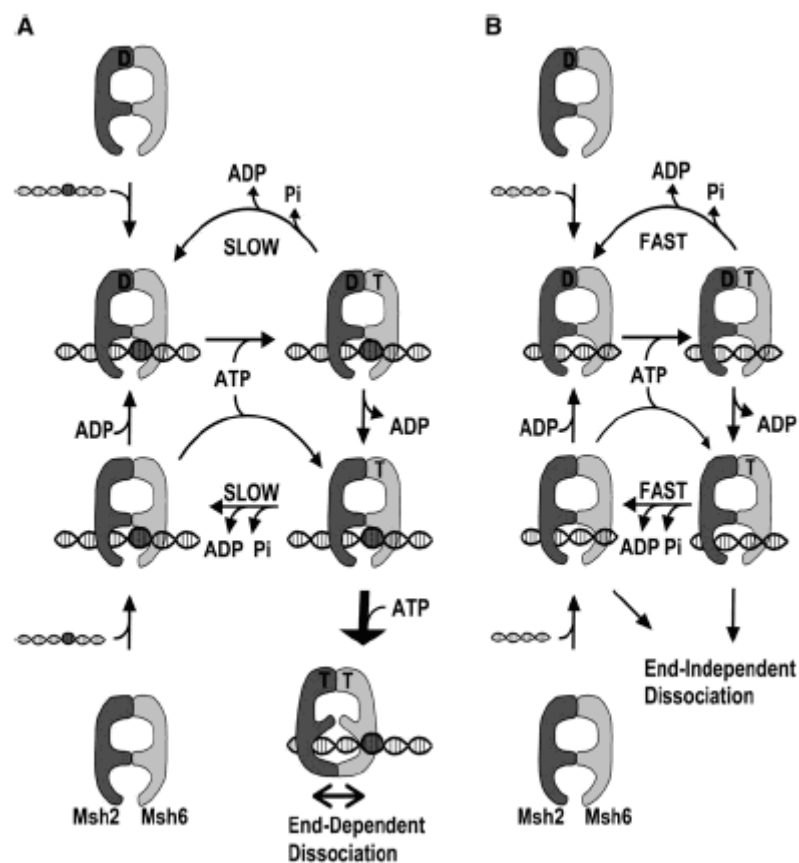


Figure 10. Modèle de fixation et d'hydrolyse de l'ATP proposé par Kolodner (d'après Mazur et coll., 2006). Le monomère MSH2 est représenté en gris foncé, MSH6 en gris clair, D et T correspondent à l'ATP et ADP respectivement. A : en présence du mésappariement ; B : en absence du mésappariement.

protéine passe à l'état MSH2(ADP)-MSH6(ATP). Ensuite l'ADP part et la protéine se charge en ATP en passant sous la forme MSH2(ATP)-MSH6(ATP). Cette forme MSH2(ATP)-MSH6(ATP) adopte un état conformationnel particulier et commence la translocation le long de l'ADN afin de déclencher la réparation.

En absence du mésappariement l'hétérodimère MSH2-MSH6 ne passe pas sous la forme MSH2(ATP)-MSH6(ATP) et ne subit donc pas les mêmes changements conformationnels et son déplacement le long de l'ADN est inhibé suite à un faible niveau d'hydrolyse de l'ATP.

→ Le modèle de R. Fishel

Selon ce modèle (Acharya et coll., 2003) en absence de l'ADN MutS est sous la forme ATP-ADP (fig. 11). Sous cette forme MutS peut reconnaître un mésappariement. La fixation de l'ADN induit des changements de conformation de MutS. Ensuite, MutS se charge en ATP et subit à nouveau des changements de conformation. La forme ATP-ATP de MutS est instable et a une très faible affinité pour l'ADN mésapparié. La fixation de deux molécules d'ATP par MutS stimule son départ du mésappariement et le début de la translocation. Selon ce modèle c'est la forme ATP-ATP de MutS qui interagit avec MutL afin de déclencher la réparation.

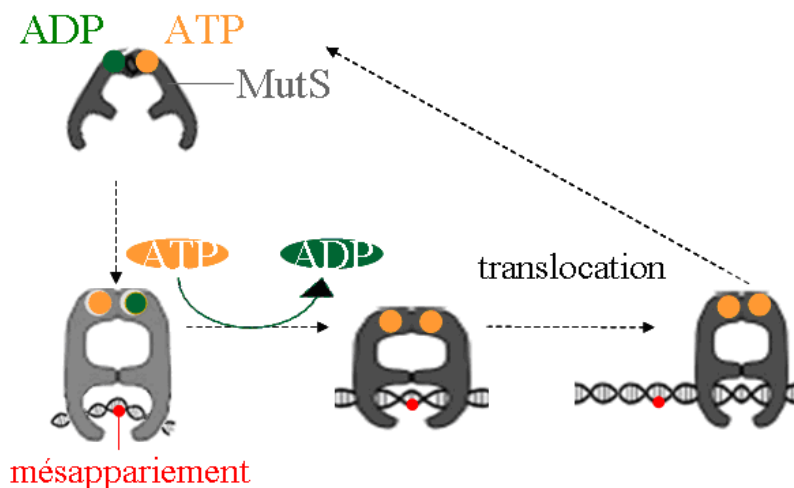


Fig. 11. Représentation schématique du mécanisme proposé par l'équipe de R. Fishel sur la modulation de l'initiation de la réparation par MutS. L'homodimère de MutS est représenté en gris, ADN – en vert ; ATP – en orange ; mésappariement en rouge.

Il a été montré que deux sites de fixation de nucléotides de l'homologue eucaryote de MutS peuvent être occupés simultanément par l'ADP et l'ATP ce qui correspond à la forme ADP-ATP de MutS (Antony et Hingorani, 2003, 2004 ; Bjornson et Modrich, 2003 ; Martik et coll., 2004 ; Mazur et coll., 2006). Selon ce modèle la forme ATP-ATP de MutS ne peut pas reconnaître de lésion. En effet il a été montré *in vitro* que MutS pré-incubée avec l'ATP ou les analogues non-hydrolysables d'ATP AMPPNP et ATP γ S a une très faible affinité pour les mésappariements (Allen et coll., 1997 ; Iaccarino et coll., 1998 ; Blackwell, et coll., 2001). Il a été montré qu'en présence de l'ATP et/ou ADN MutS subit des changements de conformation (Biswas et Vijayvargia, 2000 ; Joshi et coll., 2000).

A présent ce modèle semble être le plus admis.

8) LE SYSTEME MMR ET LA RECOMBINAISON.

Le système MMR est impliqué dans la réparation des mésappariements et ID présents dans les intermédiaires de recombinaison formés lors de l'appariement de deux séquences légèrement divergentes (recombinaison homologue) (pour revue Paques et Haber, 1999). Il est aussi impliqué dans la suppression de la recombinaison entre deux séquences divergentes.

a) Chez *Escherichia coli*.

La perte du système MMR provoque une forte augmentation du taux de recombinaison. L'ajout de MutS bloque l'échange de brin catalysé par la protéine RecA et inhibe ainsi la formation des intermédiaires de recombinaison entre des séquences divergentes de 3%. Cet effet inhibiteur est encore plus important en présence de MutL (Worth et coll., 1994). Des analyses génétiques montrent que MutS et MutL empêchent la recombinaison entre deux séquences divergentes (16% d'hétérologie) par deux mécanismes distincts. La première voie, indépendante de l'endonuclease MutH, requiert MutS, MutL, l'ADN hélicase UvrD et la nucléase RecBCD (qui appartient au système de recombinaison) (Stambuk et Radman, 1998). L'arrêt de la recombinaison se produit avant la migration de branches catalysée par les protéines RuvAB ou avant l'initiation de la synthèse d'ADN. La seconde voie requiert les fonctions d'excision de MutH. Cette voie bloque la recombinaison après le démarrage de la synthèse d'ADN et mène à la séparation des deux brins parentaux (Stambuk et Radman, 1998).

L'inhibition du système MMR aboutit à la disparition des « barrières génétiques » qui empêchent la recombinaison entre deux séquences provenant de deux espèces bactériennes (Rayssiguier et coll., 1989 ; Matic et coll., 2000).

b) Chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Des études sur des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* défectueuses au niveau de l'un des gènes du système MMR mettent en évidence le rôle de Msh2, Msh3 (Selva et coll., 1995), de Pms1 (Gendrel et Dutreix, 2001) et ceux de Mlh1 et Mlh3 (Argueso et coll., 2002) dans la recombinaison. La recombinaison entre deux espèces est possible lorsque les homologues de MutS et de MutL sont défectueux (Alani et coll., 1994 ; Selva et coll., 1995 ; Datta et coll., 1996, 1997).

Trois hypothèses sont proposées pour expliquer le rôle du système MMR dans le contrôle de la recombinaison (pour revue, Evans et Alani, 2000).

- Les mésappariements présents sur les intermédiaires de recombinaison sont reconnus par MutS α (Sugawara et coll., 1997). La protéine participe à l'arrêt de la recombinaison en facilitant le clivage de l'hétéroduplexe catalysé par le complexe endonucléasique pRad1/pRad10 (Sugawara et coll., 1997). Le clivage de l'ADN pourrait induire un signal conduisant à la destruction de l'intermédiaire.

- Le rejet de l'intermédiaire de recombinaison semble impliquer le déroulement de l'hétéroduplexe d'ADN par l'ADN hélicase Sgs1 qui interagit avec Msh2 (Myung et coll., 2001). Cette hypothèse s'appuie sur le fait que les doubles mutants *msh2/sgs1* de *S. cerevisiae* présentent un défaut dans la suppression des réarrangements entre séquences d'ADN divergentes ce qui se traduit par une augmentation importante du taux de recombinaison homéologue (Myung et coll., 2001).

- Une troisième hypothèse propose que la fixation des protéines du système MMR sur le mésappariement bloque la formation de l'intermédiaire de recombinaison, *via* des interactions avec les protéines impliquées dans la recombinaison, comme pour *E. coli* (pour revue, Evans et Alani, 2000 ; Bellacosa, 2001).

Il faut noter que l'exonucléase Exo1 chez *S. cerevisiae* possède une activité inhibant la recombinaison (Chambers et coll., 1996 ; Lewis et coll., 2002). Cette protéine, qui interagit avec Msh2, participerait au contrôle de la recombinaison (Kleczkowska et coll., 2001).

c) Chez les eucaryotes supérieurs.

Les études génétiques sur des cellules eucaryotes (cellules de souris ou HeLa) démontrent que les protéines MSH2, MLH1 et PMS2 sont impliquées dans le contrôle de la recombinaison homologue. La perte de la fonction de l'une de ces protéines entraîne une augmentation du taux de recombinaison qui prédispose la cellule à l'apparition d'un cancer (de Wind et coll., 1995 ; Ciottia et coll., 1998 ; Pichierri et coll., 2001 ; Viel et coll., 2002 ; Mohindra et coll., 2002). Les mécanismes impliqués dans le contrôle de la recombinaison dépendant du système MMR ne sont pas complètement élucidés, et les interactions des protéines de ce système avec les protéines impliquées dans la recombinaison ne sont pas établies. Cependant, des études ont montré que la protéine homologue de l'hélicase Sgs1, la protéine BLM, interagit avec MLH1 (Langland et coll., 2001 ; Pedrazzi et coll., 2001) et pourrait avoir le même rôle que Sgs (Bellacosa, 2001). Les cellules BLM⁻ peuvent réparer les mésappariements, ce qui suggère que l'interaction entre BLM et MLH1 intervient dans la recombinaison (Langland et coll., 2001).

Les études génétiques menées sur des cellules de souris mâles et femelles stériles montrent que les protéines MSH4, MSH5, MLH1 et PMS2 interviennent dans la recombinaison méiotique. En effet, dans les cellules déficientes dans l'une de ces protéines, la stérilité est due à une diminution du taux de crossing-over (Baker et coll., 1995, 1996 ; de Vries et coll., 1999 ; Kneitz et coll., 2000). Ces résultats suggèrent que le système MMR est aussi impliqué dans la régulation de la recombinaison méiotique. De plus, la mort cellulaire par apoptose est observée dans les cellules de souris Msh4⁻, Msh5⁻ et Mlh1⁻, suggérant qu'une méiose anormale induit un signal déclenchant la mort de la cellule (Nakagawa et coll., 1999).

II. LE CISPLATINE

INTRODUCTION

Le *cis*-diamminedichloroplatinum(II) ou cisplatine est un puissant agent anticancéreux. Le cisplatine est une molécule inorganique de petite taille (MW=300.06) qui possède deux atomes de chlore labiles et deux groupements ammoniac inertes en *cis* reliés à un atome de platine central (fig. 12).

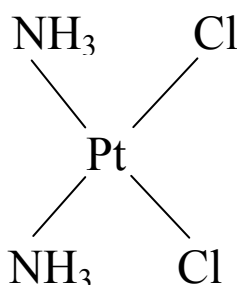


Fig. 12. Molécule de *cis*-diamminedichloroplatinum(II) ou cisplatine.

La découverte du cisplatine comme agent anticancéreux est fortuite. En effet, l'équipe de B. Rosenberg, lors de l'étude de l'influence d'un champ électrique sur la croissance de bactéries *Escherichia coli*, a observé une inhibition de la croissance due à la présence de sels de platine provenant de l'électrolyse des électrodes (Rosenberg et coll., 1965). Le cisplatine s'est avéré ensuite être très efficace pour bloquer la croissance des cellules à division rapide, telles que les cellules tumorales. Actuellement, le cisplatine est le médicament le plus utilisé en chimiothérapie humaine, notamment contre les cancers des testicules, des ovaires, de la vessie, et ce malgré les effets secondaires qu'il entraîne (nausées, vomissements, neurotoxicité) et l'émergence d'une résistance cellulaire.

De nombreuses études ont été menées pour comprendre le mécanisme d'action du cisplatine. La formation d'adduits sur l'ADN, ses effets biochimiques sur la réplication, la transcription et la réparation, ainsi que, la reconnaissance de ces adduits par des protéines cellulaires permettent de penser que l'ADN est la cible pharmacologique du cisplatine.

1) LESIONS DU CISPLATINE

La plus grande partie du cisplatine (90%) est éliminée par l'organisme (Gormley et coll., 1981) et c'est seulement 2 à 3 % du cisplatine libre qui arrive dans le cytoplasme sous forme cationique pouvant réagir avec les espèces nucléophiles présentes dans les cellules. Dans le noyau, le cisplatine réagit avec les N7 des guanines et des adénines de l'ADN pour former principalement des adduits bifonctionnels (Lepre et Lippard, 1990).

a) Les adduits monofonctionnels.

In vitro, la réaction du cisplatine avec l'ADN se fait en deux étapes. Après formation d'une liaison de coordination entre le platine et l'azote N7 d'une purine, l'adduit monofonctionnel, transitoire, va évoluer en 2-3 heures vers un adduit bifonctionnel après hydrolyse du second groupement chloro (Bancroft et coll., 1990). La nature transitoire de ce type d'adduit ne permet pas de déterminer sa structure. Les informations sont obtenues par étude des adduits des dérivés du platine tel que le diéthylènechlorotriamineplatine(II) (dien-Pt) qui ne peut former que des adduits monofonctionnels.

Les adduits monofonctionnels ne représentent que 1 à 2% des lésions formées par le cisplatine (Eastman, 1983 ; Fichtinger-Schepman et coll., 1985) et peuvent donner naissance à des pontages ADN-protéine. Aucune torsion de la double hélice n'a été détectée (Bellon et Lippard, 1990) mais la conformation de l'ADN est perturbée au niveau de la lésion. Cette dénaturation locale est influencée par la séquence environnante de la base pontée par le cisplatine (Brabec et coll., 1992, 1994).

b) Les adduits bifonctionnels.

Les pontages intrabrins formés entre deux purines présentes sur le même brin d'ADN sont les adduits majoritaires du cisplatine (pour revue, Wang et Lippard, 2005). Les adduits 1,2 se forment entre deux purines adjacentes tandis que les adduits 1,3 se forment avec deux guanines séparées par une base (fig. 13). Les pontages interbrins se font dans le site d(GC/CG) entre les deux guanines présentes chacune sur un brin d'ADN (Lemaire et coll., 1991 ; Hopkins et coll., 1991).

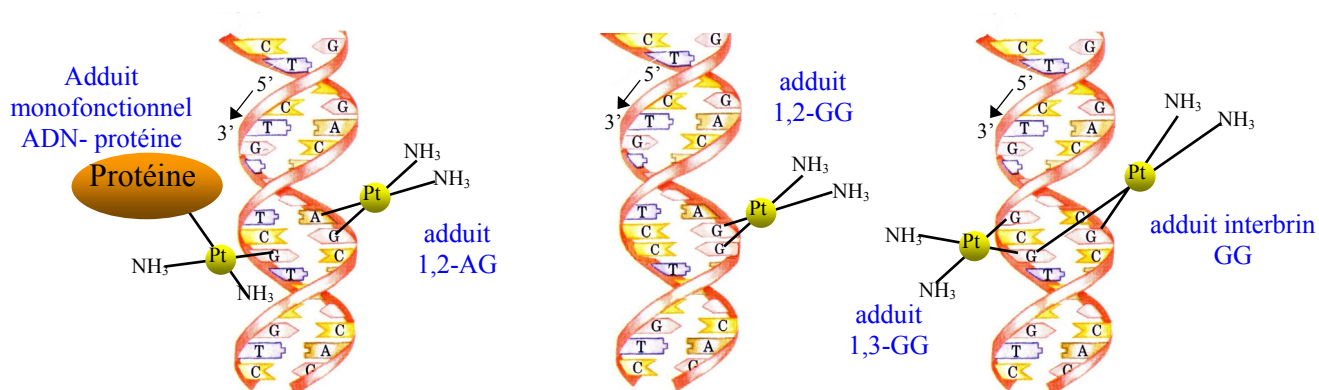


Fig. 13. Nature des adduits bifonctionnels du cisplatine formés avec l'ADN (d'après thèse de M. A. Elizondo-Riojas, 2001).

Les adduits intrabrins 1,2-d(GpG) et 1,2-d(ApG) sont les adduits majoritaires formés par le cisplatine (respectivement 65 et 25% de la totalité des adduits du cisplatine). La guanine est dix fois plus réactive avec le cisplatine que l'adénine (Caradonna et coll., 1982). Il a été montré (Monjardet-Bas et coll., 2003 ; Mantri et coll., 2007) que la préférence du cisplatine à former les adduits ApG plutôt que GpA est due à la cinétique de la platination.

Les adduits 1,3-d(GpNpG) ne représentent que 5 à 10% des adduits (Fichtinger-Schepman et coll., 1985 ; Eastman, 1987) tandis que les adduits interbrins et les adduits pontages ADN/protéine sont minoritaires (Plooy et coll., 1984 ; Roberts et Friedlos, 1987) (table II). Les études *in vivo* sur l'ADN de cellules de patients traités au cisplatine donnent les mêmes résultats (Fichtinger-Schepman et coll., 1987).

Adduit	% de la totalité des adduits	Courbure de l'ADN (en °)	Déroulement de l'ADN (en °)	Références bibliographiques
Monofonctionnel : ADN-protéine	1	0	5 (a)	Bellon et Lippard, 1990
Intrabrin 1, 2-d(GpG)	65	32-34 (a) 39-55 (b) 78 (c) 58 (c)	13 (a) 25 (c) 21 (c)	Bellon et Lippard, 1990 Takhara et coll., 1995 Gelasco et Lippard, 1998 Yang et coll., 1995
Inrabrin 1,2-d(ApG)	5-10	32-34 (a) 55 (c)	13 (a)	Bellon et Lippard, 1990 Fouchet et coll., 1997
Intrabrin 1,3-d(GpNpG)	5-10	35 (a) 20 (c)	23 (a) 19 (c)	Anin et Leng, 1990 Bellon et Lippard, 1990 van Garderen et van Houte, 1994
Interbrin d(G*pC/G*pC)	2	45 (a) 47 (b) 20 (c) 40 (c)	79 (a) 70 (b) 87 (c) 76 (c)	Malinge et coll., 1994 Coste et coll., 1999 Huang et coll., 1995 Paquet et coll., 1996

Table II. Caractérisation des adduits du cisplatine : pourcentage de chaque adduit et déformations de l'ADN engendrées (d'après Kartalou et Essigman, J. M., 2001b). Les techniques d'analyses des déformations (torsion et déroulement) sont l'électrophorèse (a), la cristallographie (b) et la RMN (c).

2) LA STRUCTURE DES ADDUITS DU CISPLATINE.

Les altérations structurales de l'ADN dues à la fixation du cisplatine ont été étudiées par trois approches différentes : gel d'électrophorèse, résonance magnétique nucléaire (RMN) et cristallographie aux rayons X.

Les études sur les duplexes contenant l'adduit majoritaire du cisplatine 1,2-d(GpG) montrent qu'ils gardent une conformation B, perturbée seulement au niveau du site de platination. La présence de l'adduit 1,2-d(GpG) induit une courbure de l'ADN vers le grand sillon, accompagnée de l'élargissement du petit sillon et du déroulement de l'hélice au niveau du site de platination (fig. 14) (Herman et coll., 1990 ; Yang et coll., 1995 ; Elizondo-Riojias et Kozelka, 2001). La paire de base G/C impliquant la guanine platinée en 5' de l'adduit est mobile du fait de l'oscillation de la cytosine entre ses deux bases voisines (Herman et coll., 1990).

L'étude par simulation de dynamique moléculaire, en accord avec les données de cristallographie et de RMN, indique que le site de platination reste rigide tandis que le reste du duplexe est flexible. Les ligands NH_3 du cisplatine interagissent avec les bases entourant l'adduit (formation de liaisons hydrogènes) et affectent la forme du petit sillon (Elizondo-Riojas et Kozelka, 2001). Les mouvements, mis en évidence dans cette étude, pourraient permettre à l'ADN platiné de s'adapter aux protéines qui se fixent sur l'adduit 1,2-d(GpG) et d'adopter une conformation de la plus faible énergie.

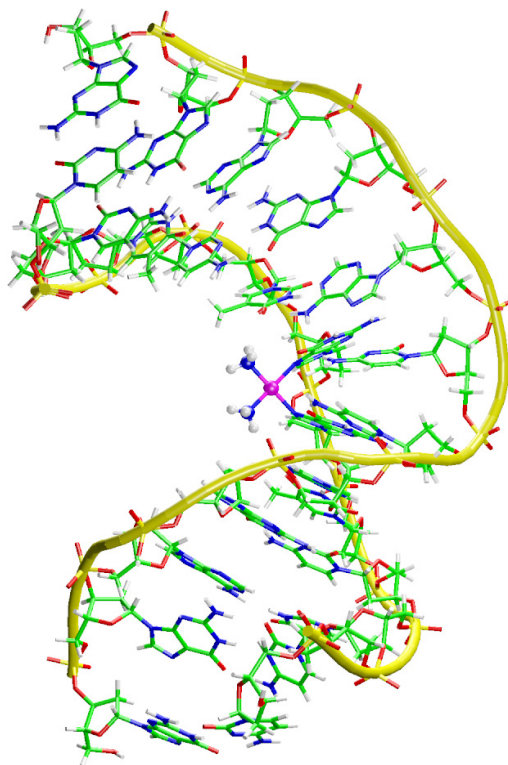


Fig. 14. Structure de l'adduit intrabrin 1,2-d(GpG) du cisplatine (d'après Gelasco et Lippard, 1998). Cette structure est obtenue par RMN.

La comparaison des structures obtenues par cristallographie et par RMN, en superposant les squelettes sucre/phosphate, révèle une similarité dans la courbure globale de l'hélice. Les différences observées pourraient venir de la cristallographie qui limiterait les degrés de courbure et de déroulement de l'ADN (Gelasco et Lippard, 1998).

La nature des bases flanquant l'adduit 1,2-d(GpG) influence les déformations induites par le pontage des deux guanines adjacentes (Elizondo-Riojas & Kozelka, 2001).

Les études sur l'adduit d(ApG) du cisplatine ont montré que l'adénine et la guanine pontées par le cisplatine sont dans deux plans pratiquement à angle droit, le plan de la guanine étant perpendiculaire au plan du cisplatine (Schröder et coll., 1996). La distorsion de la double hélice localisée au niveau du site de platination de l'adduit 1,2-d(ApG) est plus

importante que celle induite par l'adduit 1,2-d(GpG) (Fouchet et coll., 1997). L'inclinaison de l'adénine platinée A* perturbe la paire de bases A*/T (entraînant l'interruption de la liaison hydrogène entre le H3 de T et le N1 de A*) ainsi que les deux paires de bases entourant cette paire A*/T (Fouchet et coll., 1997).

Les études par RMN de l'adduit 1,3-d(GpTpG) montrent un déroulement de l'ADN et une courbure vers le grand sillon, plus prononcée du côté 5' de l'adduit (van Garderen et van Houte, 1994 ; Teuben et coll., 1999). Les paires de bases G/C en 5' de l'adduit et T/A sont dénaturées (Marrot et Leng, 1989). Cette thymine centrale est extrudée dans le petit sillon et l'adénine est empilée avec les deux cytosines flanquantes (van Garderen et van Houte, 1994 ; Teuben et coll., 1999).

Les études par RMN (Huang et coll., 1995 ; Paquet et coll., 1996) et cristallographiques (Coste et coll., 1999) de l'adduit interbrin d(G*pC/G*pC) mettent en évidence la courbure de la double hélice vers le petit sillon ainsi qu'un déroulement important de l'ADN. Les deux cytosines complémentaires sont extrahélicales et se retrouvent exposées au solvant.

3) LA REPLICATION DES LÉSIONS DU CISPLATINE.

La réplication translésionnelle des adduits intrabrin du cisplatine est nécessaire pour rendre compte de leurs propriétés mutagènes. En fonction de la nature de l'ADN polymérase impliquée, la réplication pourra être fidèle (par incorporation des bases complémentaires en face de l'adduit) ou mutagène.

Il a été montré que les différentes ADN polymérases ont une efficacité différente de passage de la lésion :

pol η humaine > pol μ humaine > pol β humaine >> pol γ humaine ~ pol ζ de levure (pour revue Chaney et coll., 2005).

Plusieurs polymérases ont été testées *in vitro*. Ainsi, il a été montré que certaines ADN polymérases (pol I, pol α , pol δ , pol ϵ , pol κ et pol λ) restent bloquées au niveau de site de platination (adduit d(GpG)) et sont donc incapables de passer les lésions du cisplatine, tandis que les autres (pol β , pol ζ , pol μ et HIV-1 RT) sont capables d'effectuer une réplication translésionnelle (table III).

Pol μ effectue la réplication translésionnelle des adduits du cisplatine avec une très faible fidélité (Havener et coll., 2003) ce qui peut résulter en un décalage du cadre de lecture.

Il a été montré *in vitro* (Vaisman et Chaney, 2000 ; Vaisman et coll., 2000) que les polymérase pol η et pol β conduisent à une mésincorporation des bases opposées à l'adduit d(GpG) du cisplatine. Cependant Basset et collaborateurs (Bassett et coll., 2004) ont montré que dans des lignées cellulaires déficientes pour pol η (pol η^-) le taux de mutations induits par le cisplatine est plus élevé que dans les lignées cellulaires proficientes en pol η (pol η^+). Ce résultat est inattendu et suggère une forte fidélité de pol η lors de la réplication translésionnelle des adduits du cisplatine *in vivo*. L'ADN polymérase mitochondriale pol γ contribue à la mutagenicité globale des adduits du cisplatine (Vaisman et coll., 1999). La polymérase pol ζ a une très faible efficacité de passage des lésions du cisplatine (Vaisman et coll., 1999).

La réplication translésionnelle comprend trois étapes : i) insertion d'un dNTP opposé à 3'G ; ii) insertion d'un dNTP opposé à 5'G ; iii) élongation à partir de 5'G de la lésion.

Chez les procaryotes les mutations observées le plus fréquemment sont localisées au niveau des séquences d(ApG) et d(GpG) (Burnouf et coll., 1987, 1990 ; Cariello et coll., 1992 ; Bradley et coll., 1993). L'adduit 1,2-d(ApG) est cinq fois plus mutagène que l'adduit 1,2-d(GpG) (Burnouf et coll., 1987 ; Yarema et coll., 1995). Les mutations sont essentiellement des transversions A→T et G→T plus souvent localisées au niveau de la purine platinée en 5' de l'adduit qu'en 3' de l'adduit (Burnouf et coll., 1987 ; Bradley et coll., 1993 ; Yarema et coll., 1994, 1995). Ces derniers résultats pourraient être reliés à la torsion de l'ADN au niveau des adduits 1,2-d(GpG) et 1,2-d(ApG), plus prononcée du côté 5' de l'adduit que du côté 3' et les déformations structurales en 5' de l'adduit (ApG) du cisplatine sont plus importantes que pour l'adduit (GpG) du cisplatine (Marrot et Leng., 1989 ; Herman et coll., 1990 ; Fouchet et coll., 1997).

Les études *in vivo* de la mutagenèse cisplatine-induite chez les eucaryotes montrent que les mutations les plus fréquentes sont des ID d'une base et des substitutions localisées au niveau des sites d(ApG), d(GpG), d(AGG) et d(AGG) et d(GAG) (de Boer et Glickman, 1989 ; Mis et Kunz, 1990 ; Bublely et coll., 1991). Contrairement aux résultats obtenus chez *E. coli*, des substitutions de bases (majoritairement des transversions G→T) sont localisées de une à quelques bases de l'adduit 1,2-d(GpG), principalement en 3' de l'adduit (Pillaire et coll., 1994 ; Chaney et Vaisman, 1999). Des délétions de fragment d'ADN induites par le cisplatine ont aussi été observées (Bublely et coll., 1991 ; Cizeau et coll., 1994).

Pour les adduits 1,3-d(GpNpG) dans les cellules eucaryotes des résultats contradictoires ont été publiés. Burnouf et collaborateurs (1987) et Mis et Kunz (1990) ont montré que cet adduit n'est pas mutagène tandis que Brouwer et collaborateurs (1981) ont montré une mutagenicité de cet adduit.

Polymérase	Organisme	Passage des lésions intrabrin du cisplatine	Remarques	Référence
Pol I	<i>E. coli</i>	Non		Pinto & Lippard, P.N.A.S., 1985
Pol α	<i>D. melanogaster</i> <i>B. bovis</i> (veau)	Non Non		Villani et coll., N.A.R., 1988 Villani et coll., N.A.R., 1988
Pol β	<i>B. bovis</i> (veau) <i>H. sapiens</i>	Oui Oui	Mésincorporation des bases	Hoffmann et coll., P.N.A.S., 1995 Vaisman et coll., Biochemistry, 1999
Pol γ	<i>H. sapiens</i>	Oui	Mutagénicité globale	Vaisman et coll., Biochemistry, 1999
Pol δ	<i>B. bovis</i> (veau)	Non		Hoffmann et coll., P.N.A.S., 1995
Pol ϵ	<i>H. sapiens</i> <i>B. bovis</i> (veau)	Non Non		Huang, et coll., Biochemistry, 1993 Hoffmann et coll., P.N.A.S., 1995
Pol ζ	<i>S. cerevisiae</i>	Oui	Faible efficacité	Vaisman et coll., Biochemistry, 1999
Pol η	<i>H. sapiens</i>	Oui	Forte fidélité <i>in vivo</i> Faible fidélité <i>in vitro</i>	Vaisman et coll., Biochemistry, 2000, Albertella et coll., 2005, Cancer Res.
Pol κ	<i>H. sapiens</i>	Non		Ohashi et coll., Genes Dev., 2000
Pol λ	<i>H. sapiens</i>	Non		Maga et coll., J. Biol. Chem., 2002
Pol μ	<i>H. sapiens</i>	Oui	Faible fidélité, frame-shift	Havener et coll., Biochemistry, 2003
HIV-1RT	Virus HIV	Oui		Vaisman et coll., Biochemistry, 1999

Table III. Présentation de plusieurs ADN polymérase et de leur capacité à passer les lésions du cisplatine au cours de la réplication..

4) **PROTEINES INTERAGISSANT AVEC LES LESIONS DU CISPLATINE.**

Les protéines qui interagissent avec les adduits du cisplatine (table IV) peuvent être divisées en deux groupes en fonction des motifs structuraux qu'elles portent :

- protéines à boîte HMG (HMGB1 et HMGB2, Ixr, mtTFA, tsHMG, SRY, LEF-1 et UBF)
- les autres protéines (TBP, histone H1, p53, XPE, Ku, XPA, RPA, MutS).

a) **Les protéines à boîte HMG.**

La recherche de protéines interagissant avec les adduits du cisplatine a permis d'isoler la protéine SSRP1 (Structure Specific Recognition Protein 1) (Toney et coll., 1989 ; Bruhn et coll., 1992), les humaines HMGB1 et 2 (Hughes et coll., 1992 ; Billings et coll., 1992), la protéine HMGB1 de rat (rHMG) (Pil et Lippard, 1992) et les facteurs de transcription hUBF (Treiber et coll. 1994) et Ixr1 de levure (Brown et coll., 1993 ; McA'Nulty et coll., 1996). Toutes ces protéines appartiennent à la famille des protéines à boîtes HMG (pour High-Mobility Group box protein 1). Chez les eucaryotes les protéines à boîtes HMG peuvent être classées en 3 familles i) HMGB1/2 ; ii) HMG-I(Y) ; iii) HMG-14/17 selon leur poids moléculaire, leur séquence et leurs propriétés de reconnaissance de l'ADN (Bustin, 2001).

Ces protéines peuvent être divisées en 2 classes :

- la classe 1 comprend les protéines ayant 1 boîte HMG. Elles sont exprimées dans certains types cellulaires et reconnaissent des séquences nucléotidiques particulières (HMG-D, Nhp6a).
- la classe 2 comprend les protéines ayant plusieurs boîtes HMG (HMGB1, HMGB2, Ixr, TFA, UBF, LEF-1). Elles sont exprimées dans tous les types cellulaires et reconnaissent les structures particulières de l'ADN (courbures, jonctions de Holliday, boucle...) sans ou avec une faible spécificité de séquence.

Les protéines HMGB1 et 2 (homme) sont des protéines non histones de la chromatine ; elles facilitent l'assemblage du complexe nucléo-protéique. Bien que le rôle de HMGB1 ne soit pas entièrement déterminé, il est connu que HMGB1 est impliquée dans la transcription et la recombinaison de l'ADN (pour revue Thomas et Travers, 2001) Elle est très abondante (chez l'homme : 1 protéine pour 1 kb d'ADN) et très conservée au cours de l'évolution (pour revue Ulloa et Messmer, 2006). HMGB1 possède 215 résidus organisés en 3 domaines structuraux : boîtes A et B à l'extrémité C-terminale et une queue acide chargée

Protéine		Organisme	Fonction	Lésion du cisplatine reconnue	Référence
Protéines à boîte HMG	HMGB1	<i>Homo sapiens</i>	Protéine chaperonne	d(GpG), d(ApG)	Pil et Lippard, <i>Science</i> , 1992
	HMGB2	<i>Homo sapiens</i>	Protéine chaperonne	fragments longs d'ADN	Lawrence et coll., <i>J. Biol. Chem</i> , 1993
	Ixr	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Protéine chaperonne	d(GpG), d(ApG)	Brown et coll., <i>Science</i> , 1993
	mtTFA	<i>Homo sapiens</i>	Facteur de transcription mitochondrial	d(GpG)	Chow et coll., <i>Biochemistry</i> , 1994
	tsHMG	<i>Mus musculus</i>	Protéine chaperonne	d(GpG)	Ohndorf et coll., <i>Biochemistry</i> , 1997
	SRY	<i>Homo sapiens</i> <i>Mus musculus</i>	Facteur de transcription	d(GpG) d(GpG)	Trimmer et coll., <i>Biochemistry</i> , 1998 Chow et coll., <i>Biochemistry</i> , 1994
	LEF-1	<i>Homo sapiens</i>	Facteur de transcription	d(GpG)	Chow et coll., <i>Biochemistry</i> , 1994
	UBF	<i>Homo sapiens</i>	Facteur de transcription	d(GpG)	Treiber et coll., <i>P.N.A.S.</i> , 1994

Protéine		Organisme	Fonction	Lésion du cisplatine reconnue	Référence bibliographique
Protéines sans boîte HMG	TBP	<i>Homo sapiens</i>	Facteur de transcription	d(GpTpG) d(GpG)	Vichi et coll., <i>EMBO J.</i> , 1997 Cohen et coll., <i>Biochemistry</i> , 2000
	YB-1	<i>Homo sapiens</i>	Facteur de transcription	d(GpG), d(ApG), d(GpNpG)	Ise et coll., <i>Cancer Res.</i> , 1999
	Histone H1	<i>Mus musculus</i>	Protéine de la chromatine	d(GpG)	Yaneva et coll., <i>P. N. A. S.</i> , 1997
	p53	<i>Homo sapiens</i>	Facteur de transcription	fragments longs d'ADN	Wetzel et Berberich, <i>Oncol. Res.</i> , 1998
	XPE	<i>Homo sapiens</i>	Facteur de transcription	fragments longs d'ADN	Chu et Chang, <i>Science</i> , 1988
	Ku	<i>Homo sapiens</i>	Autoantigène	fragments longs d'ADN	Turchi et Henkels, <i>J. Biol. Chem.</i> , 1996
	XPA	<i>Homo sapiens</i>	Réparation par excision	fragments longs d'ADN	Jones et Wood, <i>Biochemistry</i> , 1993
	RPA	<i>Homo sapiens</i>	Réplication de l'ADN simple brin	d(GpG), d(GpTpG)	Clugston et coll., <i>Cancer Res.</i> , 1992 Patrick et Turchi, <i>Biochemistry</i> , 1998
	AAG	<i>Homo sapiens</i>	Réparation de l'ADN	d(GpG), d(ApG) d(GpTpG)	Kartalou et coll., <i>Biochemistry</i> , 2000
	MutS	<i>Escherichia coli</i>	Réparation des mésappariements	d(GpG), composés de lésion d(GpG)	Fourrier et coll., <i>J. Biol. Chem.</i> , 2003 Duckett et coll., <i>P. N. A. S.</i> , 1996

Table IV. Présentation des protéines interagissant avec les lésions du cisplatine, leur fonction cellulaire, lésion reconnue et les références bibliographiques coresspondantes

négativement di côté N-terminal (fig. 15.) capable d'interagir *in vitro* avec l'histone H1 (pour revue Bustin et coll., 1990).



Fig. 15 Représentation schématique de HMGB1 (humaine). En noire sont représentés les boîtes A et B et en blanc la queue acide.

La charge négative de la queue acide baisse l'affinité de HMGB1 pour l'ADN *in vitro* (Jung et Lippard, 2003). Les boîtes A et B de HMGB1 sont très similaires (une forte homologie de séquences (fig. 15) mais pas identiques). La boîte A a une plus forte affinité pour l'ADN courbé que la boîte B (pour revue Jung et Lippard, 2003).

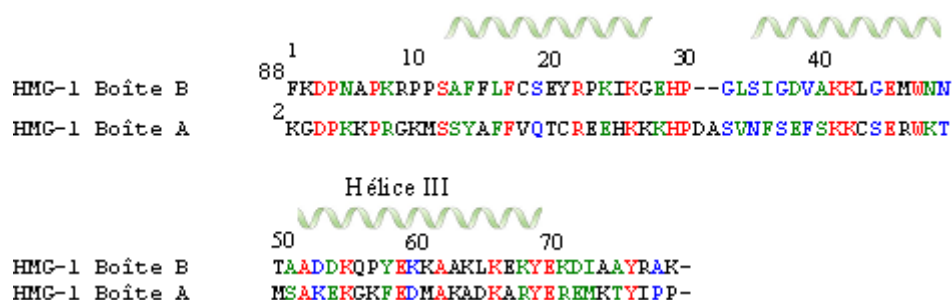


Fig. 16. Alignement de séquences de boîtes A et B de HMGB1 (homme). En rouge sont marqués les acides aminés identiques, en vert- ceux ayant une forte similitude, en bleu – ceux ayant une faible similitude. Les résidus 1 des boîtes B et A correspondent respectivement aux résidus 88 et 2 de la protéine entière. Les séquences correspondant aux hélices α sont indiquées au dessus.

En raison de l'importance des boîtes HMG dans l'interaction avec l'ADN les études structurales ont été focalisées sur les domaines individuels de HMG en interaction avec l'ADN. Weir et coll. (1993) ont montré par RMN que la boîte B possède 3 hélices α : Hélice I (résidus 13-29), Hélice II (résidus) 34-48, Hélice III (résidus 50-74) connectées par deux boucles. La boîte B de HMGB1 a une forme en L avec un angle de 80° entre les deux bras.

Les adduits majeurs du cisplatine d(GpG) et d(ApG) sont reconnus par la protéine HMGB1 (Chow et coll., 1995 ; Dunham et Lippard, 1997) avec une constante de dissociation de 120 nM pour la protéine entière et de 0.5 nM pour HMGB1 tronquée au niveau de la queue acide. L'étude structurale du complexe nucléoprotéique boîte A de HMGB1-adduit 1,2-d(GpG))

du cisplatine a montré que la chaîne aromatique de phénylalanine 37 de l'hélice II est intercalée entre deux guanines platinées (fig. 17) (Ohndorf et coll., 1999). Ce résidu joue un rôle très important dans l'affinité de la boîte A de HMGB1 pour l'ADN platiné. Puisque, l'affinité du mutant Phe37A pour le duplexe contenant la lésion d(GpG) est très fortement réduite par rapport à l'affinité de la boîte A sauvage.

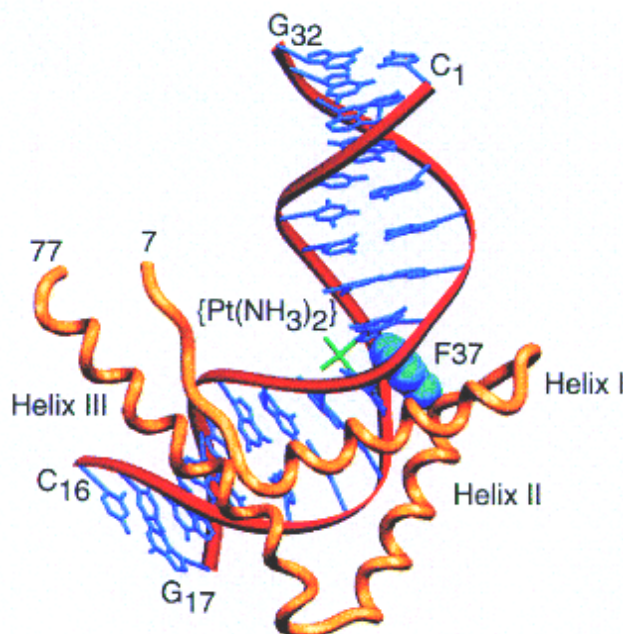


Figure. 17. Structure tertiaire du complexe boîte A de HMGB1-adduit du cisplatine d(GpG) (d'après Ohndorf et coll., 1999). La chaîne protéique est indiquée en jaune, la phénylalanine (Phe 37) intercalée comme sphères de van der Waals et l'ADN avec l'adduit du cisplatine en rouge et bleu.

En présence de l'ADN platiné HMGB1 subit des changements conformationnels sur deux régions : extrémité C-terminale de l'hélice I, extrémité N-terminale de l'hélice II et de la boucle de connexion des deux hélices, afin de permettre l'intercalation de la phénylalanine 37.

L'addition de HMGB1 dans des essais de réparation des lésions du cisplatine *in vitro* inhibe la réparation (Pil et Lippard., 1992 ; Huang, et coll., 1994). Ce résultat suggère que HMGB1 pourrait « masquer » l'adduit du cisplatine et empêcher les protéines du système de réparation par excision d'accéder à l'adduit et de le réparer. Il existe donc une hypothèse selon laquelle HMGB1 serait impliquée dans la modulation de la sensibilité des cellules cancéreuses au cisplatine (pour revue Wei et coll., 2003). Les études de relation entre le taux de HMGB1 et la cytotoxicité du cisplatine *in vivo* donnent des résultats contradictoires. Ainsi, l'hypothèse de « masquage » de la lésion est confirmée par les études de He et coll. (1995) qui ont montré que l'augmentation de taux de HMGB1 dans les cellules MCF-7 du cancer du sein est corrélée avec l'augmentation de la sensibilité au cisplatine. La même corrélation a été observée dans les

cellules du cancer du poumon (Arioka et coll., 1999). Cependant chez la levure une hypersensibilité pour le cisplatine a été observée dans les cellules déficientes pour la protéine NHP6A (80 % d'identité avec HMGB1). L'absence de différence significative de sensibilité au cisplatine a été observée dans les fibroblastes de souris déficientes en HMG (*hmg⁻/hmg⁻*) et les cellules sauvages (*hmg⁺/hmg⁺*) (Wei et coll., 2003). Cette hétérogénéité des résultats peut être expliquée par l'influence du type cellulaire sur la capacité de HMGB1 à moduler la sensibilité au cisplatine.

Mitkova et coll. (2005) ont démontré que la protéine HMGB1 tronquée (sans queue acide) perd sa faculté d'inhiber la réparation des lésions du cisplatine. Ce résultat suggère que l'inhibition de la réparation des adduits du cisplatine par HMGB1 implique la queue acide.

Enfin, la protéine HMGB1 interagit *in vitro* avec le suppresseur de tumeurs p53 impliquée dans le déclenchement de l'apoptose. HMGB1 augmente la fixation de p53 sur l'ADN et stimule son activité de transactivation. HMGB1, en se fixant fortement sur les adduits majoritaires du cisplatine, pourrait permettre l'interaction entre p53 et l'adduit et participer au déclenchement d'un signal apoptotique (Jayaraman, et coll., 1998).

Les facteurs de transcription à boîtes HMG humains comme UBF et LEF-1 sont aussi capables de reconnaître les adduits du cisplatine. Treiber et coll., (1994) ont montré que les adduits du cisplatine « piègent » UBF en le détournant de son promoteur. Une conséquence de ce « piégeage » serait la diminution de la synthèse des ARN ribosomiaux, ce qui pourrait expliquer que le cisplatine soit préférentiellement cytotoxique pour les cellules à division rapide (Treiber et coll., 1994 ; Jordan et Carmo-Fonseca, 1998). De plus, l'accessibilité des adduits du cisplatine reconnus par UBF devient impossible pour que la réparation ait lieu.

LEF-1 (Lymphoid-Enhancer binding Factor 1) est un autre facteur de transcription appartenant au groupe des protéines à boîte HMG, il reconnaît l'adduit majoritaire du cisplatine (Chow et coll., 1994).

b) Les autres protéines

Certains facteurs de transcription ne possédant pas de boîte HMG ont été décrits comme protéines reconnaissant les adduits du cisplatine (table IV).

Ainsi, le facteur de transcription TBP (TATA box-Binding Protein) fixe spécifiquement l'adduit intrabrin 1,2-d(GpG) (Cohen et coll., 2000) et 1,3-d(GpTpG) (Vichi et coll., 1997). Le « piégeage » de TBP par les adduits du cisplatine semble inhiber totalement la transcription (Vichi et coll., 1997). Un autre facteur de transcription humain, la protéine YB-1 (Y-box Binding Protein), reconnaît les adduits 1,2-d(GpG), 1,2-d(ApG), 1,3-d(GpNpG) et serait ainsi détourné de

sa séquence cible (Ise et coll., 1999). Un effet similaire a été observé avec p53 (Wetzel et Berberich., 1998).

L'ADN endommagé par le cisplatine est fortement reconnu par la protéine histone H1 (Yaneva et coll., 1997). Cependant les oligonucléotides contenant une lésion interbrin du cisplatine ne sont pas reconnus par H1 (Yaneva et coll., 2006). Cette protéine est très abondante et ubiquitaire, elle participe à la compaction de l'ADN en scellant les nucléosomes.

L'auto-antigène humain Ku est une protéine impliquée dans la réparation des CDB de l'ADN. Ku a pour propriété la reconnaissance des extrémités de l'ADN, des boucles ou des nicks (Morozov et coll., 1994) ; un autre rôle est la fixation de la sous-unité catalytique de la sérine/thréonine kinase DNA-PK (Gottlieb et Jackson, 1993). Les cellules déficientes en DNA-PK sont sensibles au cisplatine (Muller et coll., 1998) tandis que le niveau d'expression de Ku est plus élevé dans des cellules de leucémie murine résistantes au cisplatine (Frit et coll., 1999). Turchi et Henkels ont montré (1996) que Ku reconnaît l'ADN endommagé par le cisplatine mais perd sa capacité d'activer DNA-PK en inhibant la translocation ATP-dépendante de Ku le long de l'ADN (Turchi et coll., 2000).

Chez les eucaryotes, plusieurs protéines du système REN (Réparation par Excision des nucléotides) ont un rôle dans l'effet cytotoxique du cisplatine. C'est le cas des protéines XPA et XPE, impliquées dans la reconnaissance des lésions de l'ADN réparées par le système REN. Les adduits du cisplatine sont reconnus par la protéine de réparation XPE et les cellules humaines déficientes en XPE sont sensibles au cisplatine (Poll et coll., 1984) et la résistance de cellules humaines tumorales au cisplatine est corrélée à l'augmentation de l'expression de XPE induite après traitement au cisplatine (Chu et Chang, 1990 ; Vaisman et Chaney, 1995). XPA interagit avec les protéines ERCC1 (Park et Sancar, 1994), RPA (Matsuda et coll., 1995) et le complexe protéique TFIIH (Park et coll., 1995), qui interviennent dans la réparation par excision des nucléotides. Il a été montré que les cellules XPA-déficientes sont plus sensibles au cisplatine que les cellules sauvages (Poll et coll., 1984 ; Dijt et coll., 1988) et que XPA reconnaît l'ADN modifié globalement par le cisplatine (Jones et Woods, 1993).

Les adduits 1,3-d(GpTpG) sont mieux réparés par le système REN que les adduits 1,2-d(GpG). De plus, le complexe RPA/XPA se fixe mieux sur l'adduit 1,3-d(GpTpG) que RPA seule ou XPA seule (Schweizer et coll., 1999 ; Hey et coll., 2001). Cette protéine semble avoir un rôle majeur dans la reconnaissance des adduits du cisplatine réparés par le système REN. Mais le fait que RPA reconnaisse mieux un simple brin d'ADN non endommagé que l'ADN platiné (Patrick et Turchi, 1998) suggère que cette protéine protège le brin non modifié de l'excision et permet ainsi une discrimination du brin à réparer (Evans et coll., 1997 ; de Laat et coll., 1999).

Les cellules déficientes pour la protéine ERCC1 sont aussi sensibles au cisplatine (Lee et coll., 1993). De plus, l'expression de l'ARNm de ERCC1 est plus élevée dans les cellules tumorales résistantes au cisplatine, suggérant que cette protéine a un rôle dans la réparation des adduits du cisplatine (Dabholkar et coll., 1992, 1994).

In vitro, la protéine 3-méthyl-adénine DNA glycosylase (AAG) reconnaît et initie l'excision de nombreuses bases modifiées dont la 1,N6-éthètheadénine (Wyatt et coll., 1999). Cette protéine reconnaît les adduits 1,2-d(ApG) > 1,2-d(GpG) > 1,3-d(GpTpG) avec des *K_d* apparents compris entre 71 et 144 nM mais ne déclenche pas leur excision (Kartalou et coll., 2000). De plus, la présence de l'un de ces trois adduits du cisplatine semble inhiber l'excision de la 1,N6-éthètheadénine. Ainsi, la présence d'un adduit du cisplatine modifie le comportement de la protéine AAG et semble la détourner de l'une de ses cibles naturelles (Kartalou et coll., 2000). Il faut noter que la relation entre AAG et la cytotoxicité du cisplatine n'a pas été démontrée.

Le système de réparation des mésappariements (MMR) est impliqué dans la réparation des ID de bases et des mésappariements présents sur l'ADN. De nombreuses études montrent que ce système intervient dans la cytotoxicité de différentes drogues telles que le cisplatine (Fram et coll., 1985 ; Aebi et coll., 1996 ; Fink et coll., 1996), la doxorubicine (Drummond et coll., 1996), les agents alkylants (Kat et coll., 1993 ; Branch et coll., 1993). Le système MMR intervient aussi dans la reconnaissance des dimères de thymine (Mu et coll., 1997 ; Wang et coll., 1999), de 8-oxoguanine (Ni et coll., 1999 ; Mazurek et coll., 2002) et des O4-méthyle-guanine et O6-méthyle-guanine (Duckett et coll., 1996 ; Rasmussen et Samson, 1996). Il a été montré *in vitro* que la protéine MutSa (homme) (Mu et coll., 1997) et MutS (*E. coli*) (Fourrier et coll., 2003) du système MMR ont une faible affinité pour l'adduit majoritaire du cisplatine d(GpG). En revanche les deux protéines ont une forte affinité pour les composés de lésion du cisplatine (dommage de l'ADN et mésappariement) (Yamada et coll., 1997 ; Fourrier et coll., 2003) avec une préférence pour le composé de lésion G*G*/CT (voir chapitre III).

III. IMPLICATION DU SYSTEME MMR DANS LA CYTOTOXICITE DU CISPLATINE

INTRODUCTION

Le traitement des cellules tumorales par le cisplatine déclenche plusieurs événements (apoptose, arrêt du cycle cellulaire, ...) dont certains sont MMR-dépendants.

La première étude montrant l'implication du système MMR dans la modulation de sensibilité du cisplatine remonte à plus de 20 ans. Ainsi Frame coll. (1985) ont corrélé la résistance au cisplatine avec l'inactivation des gènes *mutS* et *mutL* du système MMR d'*E. coli*.

In vitro, il a été montré que des cellules déficientes pour hMutS α ou hMutL α sont résistantes au cisplatine (Aebi et coll., 1996 ; Fink et coll., 1996 ; Drummond et coll., 1996 ; Papouli et coll., 2004). Ces cellules retrouvent une sensibilité au cisplatine après la restauration du système MMR par transfert de chromosome portant les gènes fonctionnels du MMR (chromosome 3 pour hMutS α et chromosome 2 pour hMutL α) (Fink et coll., 1996). Les études de Fink et coll. (1997) *in vivo* chez la souris ont montré que l'inactivation du gène *msh2* (*msh2*⁻/*msh2*⁻) conduit à une résistance cellulaire au cisplatine. Dans les expériences *in vitro* et *in vivo* la résistance au cisplatine est deux fois plus importante pour les mutants du système MMR. Une augmentation de résistance cellulaire d'un facteur 2 est cliniquement significative (Fink et coll. 1997).

En 1996, Anthony et coll. ont décrit des lignées cellulaires résistantes au cisplatine qui dans 90% des cas montraient une instabilité des microsatellites (MSI). Ils ont montré que ces lignées étaient déficientes pour les protéines qui reconnaissent les mésappariements G:T. La corrélation entre MSI et la résistance au cisplatine a aussi été établie chez les patients avec des tumeurs métastasées (Mayer et coll., 2002). Cependant, dans certains cas une MSI ne peut pas être corrélée avec une défaillance du système MMR. En revanche, les études immunohistochimiques ont montré une baisse de l'expression d'une sous-unité de hMutL α chez les patients sous chimiothérapie avec le cisplatine (Kishi et coll., 2003).

L'ensemble de ces résultats suggère que le système de réparation des mésappariements est impliqué dans l'apparition de la résistance cellulaire au cisplatine.

1) VOIE APOPTOTIQUE MMR-DEPENDANTE

Il a été montré qu'après un traitement au cisplatine, des cellules en culture surexpriment la protéine pro-apoptotique p73 (Gong et coll., 1999 ; Catani et coll., 2002 ; Shimodaira et coll., 2003). Ce résultat est très important pour la compréhension du mécanisme de déclenchement de l'apoptose par le cisplatine car il suggère que le cisplatine peut activer des voies apoptotiques indépendantes de p53. Effectivement, Gong et coll. (1999) et Oniscu et coll. (2004) ont montré que p53 et p73 activent des voies apoptotiques différentes et que le cisplatine peut induire la voie p73-dépendante dans les cellules déficientes pour p53. Les travaux de Gong et coll., (1999) montrent qu'en réponse aux dommages à l'ADN induits par le cisplatine, p73 est régulé par la kinase oncogène c-Abl. De plus, Nehme et coll. ont montré (1997, 1999) que c-Abl n'est pas activée dans les lignées cellulaires HCT116 et HEC59, déficientes pour MLH1 et MLH2 respectivement, contrairement aux cellules où le système MMR a été restauré par transfert de chromosome avec les gènes fonctionnels de MLH1 et MLH2. L'activateur en amont de c-Abl, la tyrosine phosphatase SHP-2, est aussi stimulé après le traitement par le cisplatine (Yuan et coll., 2003). Il a été montré que lors de l'inactivation de c-Abl, p73 n'est plus activé ce qui résulte en une diminution de la cytotoxicité du cisplatine (Gong et coll., 1999 ; Tsai et Yuan, 2003). En conclusion, dans cette voie apoptotique cisplatine-dépendante, SHP-2 active c-Abl qui à son tour active p73.

La découverte de cette voie est importante car près de 50% de patients sont déficients en p53 connus pour son rôle dans l'induction de l'apoptose.

Il est important de noter que l'activation de p73 par le cisplatine ne dépend pas que de c-Abl (Maisse et coll., 2003). Ainsi, il a été montré que le cisplatine peut, de façon c-Abl indépendante (Ianari et coll., 2004) stabiliser le facteur de transcription E2F1, ce dernier est connu comme activateur de p73 (Wang et coll., 2004). Une autre voie d'activation de p73 c-Abl-indépendante implique la protéine YAP (Yes-Associated Protein) capable d'interagir avec p73 afin d'augmenter son activité transcriptionnel (Basu et coll., 2003).

1) CONTROLE DU CYCLE CELLULAIRE.

Le système MMR peut jouer un rôle dans la cytotoxicité du cisplatine *via* le contrôle du cycle cellulaire. En effet, le système MMR participe à l'inhibition de phases G1 et S du cycle cellulaire par atténuation de l'activité des cycline D1 et CDK2 et l'activation du suppresseur de

tumeurs Rb (Lan et coll., 2002). Il a été montré que Rb interagit avec c-Abl et peut bloquer son activité (Wang, 2000).

2) LES MODELES RELIANT LE SYSTEME MMR AVEC LA CYTOTOXICITE DU CISPLATINE.

Afin, d'expliquer le rôle du système MMR dans la cytotoxicité du cisplatine, plusieurs modèles ont été proposés. Les deux modèles majeurs sont le modèle du cycle futile et de la signalisation directe.

a) Le modèle du cycle futile.

Ce modèle vise à expliquer le rôle du système MMR dans la cytotoxicité d'agents alkylants (MNNG, MNU) conduisant à la formation de lésion du type O6-MetG (York & Modrich, 2006) (fig. 15).

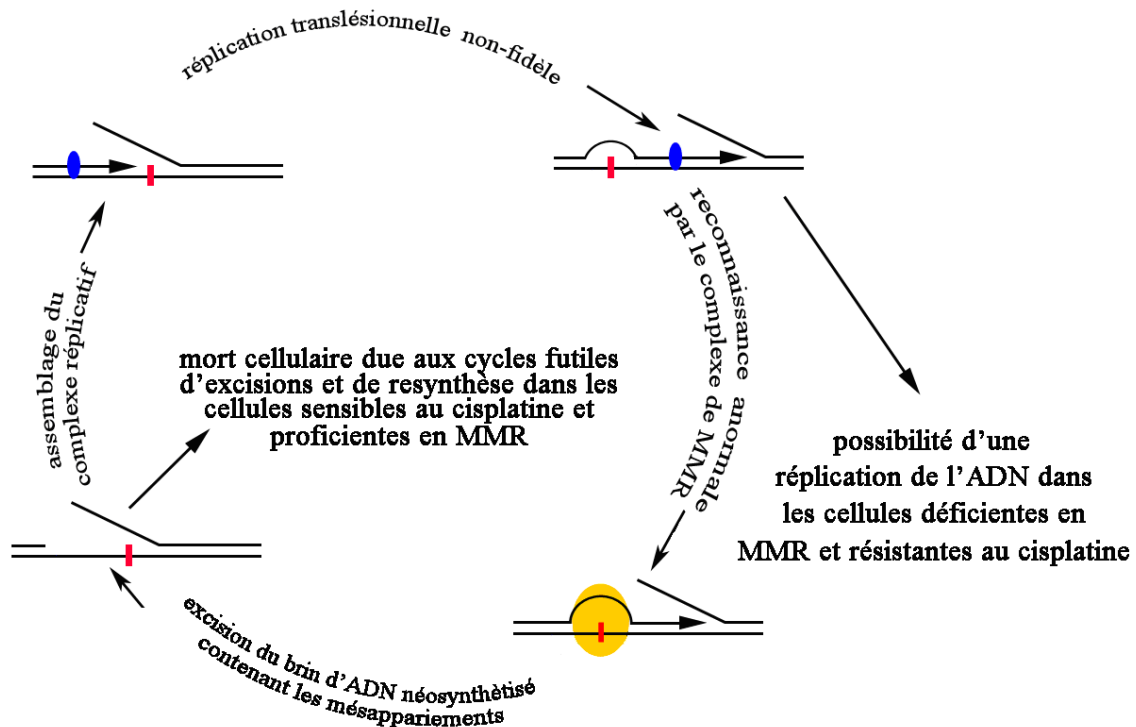


Fig. 15. Cycle futile d'excision/resynthèse de l'ADN proposé pour expliquer la contribution du système MMR à la cytotoxicité du cisplatine (d'après Vaisman et coll., 1998). La lésion du cisplatine est indiquée en rouge, système MMR en jaune, système de réplication en bleu.

Selon ce modèle les protéines du système MMR n'ont qu'une fonction : la réparation de l'ADN. Elles reconnaissent l'adduit du cisplatine présent sur le brin matrice et démarrent la réparation de la portion de brin néosynthétisé contenant la base non complémentaire en face de l'une des deux purines pontées par le cisplatine, incorporée lors de la réplication translésionnelle de l'adduit du cisplatine. Tant que l'adduit persiste sur le brin matrice, l'insertion de nouvelles bases au hasard aboutit à la formation de composé de lésion du cisplatine. Le système MMR reconnaît le mésappariement et déclenche de façon répétée la réparation pour enlever la base mésappariée dans le brin néosynthétisé. Ce cycle futile d'excision/resynthèse générerait des brèches et des cassures dans l'ADN (lésion secondaires) (Anthony et coll., 1996 ; Fink et coll., 1996 ; Drummond et coll., 1996 ; Duckett et coll., 1996). Les systèmes de réparation de l'ADN comme les systèmes de réparation par recombinaison se trouvent saturés et dans l'incapacité de réparer la totalité des cassures dont l'accumulation pourrait être un signal induisant la mort de la cellule.

Si le système MMR est défectueux, le cycle futile n'est pas déclenché. En effet, l'ADN contenant l'adduit du cisplatine sera répliqué, et la base mésappariée ne sera pas détectée et/ou enlevée par le système MMR. Il n'y a pas d'accumulation de lésions secondaires et les signaux induisant la mort cellulaire découlant du cycle futile ne sont pas générés. Les cellules deviennent résistantes au cisplatine. Ce modèle est en accord avec la corrélation faite entre la perte du système MMR et l'augmentation de la réplication translésionnelle des adduits du cisplatine.

b) Le modèle d'occlusion.

Selon le modèle d'occlusion (Vaisman et coll., 1998) la protéine MutS α serait bloquée au niveau de la lésion du cisplatine en empêchant ainsi l'accès aux autres protéines cellulaires. Suite à une telle occlusion de la lésion du cisplatine par MutS α le système de réplication de l'ADN serait bloqué et la réplication arrêtée. Cet arrêt de la réplication conduirait au déclenchement de l'apoptose.

c) Le modèle du signal direct.

Selon ce modèle les protéines du système MMR ont deux rôles distincts : la réparation de l'ADN et la signalisation des dommages de l'ADN.

La première étape est la reconnaissance des lésions du cisplatine par les protéines du système MMR. Il a été montré que la protéine MutS et son homologue eucaryote MutS α reconnaissent fortement les duplexes d'ADN contenant le composé de lésion du cisplatine G*G*/CT contrairement aux duplexes contenant la lésion intrabrin du cisplatine (Fourrier et coll., 2003 ; Duckett et coll., 1996). Cette étape est suivie par le déclenchement d'un signal apoptotique. Il a été montré que la protéine MutS α ayant fixé le duplexe contenant la lésion O6-meG peut recruter directement les protéines ATR-ATRIP (Yoshioka et coll., 2006). Même si l'interaction directe entre les protéines du système MMR et ATR et réponse à l'ADN contenant une lésion du cisplatine, n'a pas été démontrée il a été suggéré que ATR est sensible à la présence de l'ADN platiné *via* la kinase Chk1 (Zhao & Piwnicka-Worms, 2001). De plus ATM/ATR sont impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire dans les cellules traitées au cisplatine (Lin et coll., 2001).

TRAVAUX DE RECHERCHE

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE : L'agent anticancéreux cisplatine induit de multiples réponses dans les cellules cancéreuses: importance des voies apoptotiques.

L'induction de l'apoptose par le cisplatine dans les cellules tumorales est essentielle pour l'efficacité de cette molécule anticancéreuse. L'incapacité des cellules cancéreuses à déclencher l'apoptose conduit à l'apparition d'une résistance et donc à une baisse d'efficacité de la drogue. Cette résistance est multifactorielle et implique plusieurs voies.

De nombreuses études récentes suggèrent que deux protéines du système MMR jouent un rôle de détecteur des dommages de l'ADN et participent au déclenchement d'une voie apoptotique p73-dépendante. Ce déclenchement se fait via la kinase c-Abl et implique la mitochondrie et une signalisation caspase dépendante.

D'autres voies sont aussi impliquées dans la cytotoxicité du cisplatine. Par exemple la voie des MAP-kinases peut induire l'apoptose bien que la régulation complexe de cette voie conduise aussi à activer des voies de survie. A la complexité de la réponse cellulaire vient s'ajouter l'hétérogénéité des conditions expérimentales (lignées cellulaires, traitement par le cisplatine...) comme cela a été discuté dans notre revue.

Nous avons scrupuleusement reporté des résultats sur des voies cellulaires mises en jeu après un traitement par le cisplatine afin de faire le bilan des connaissances actuelles sur les mécanismes moléculaires modulant la cytotoxicité du cisplatine.

Dans cette revue nous présentons, d'abord, le cisplatine et les différents types de lésions qu'il produit sur l'ADN, les mécanismes que la cellule met en jeu pour échapper aux différents effets du cisplatine depuis la membrane jusqu'au noyau sans oublier la pharmacocinétique.

Cet article montre qu'une connaissance approfondie du mécanisme de cette drogue est synonyme d'une compréhension fine de nombreux mécanismes cellulaires complexes et variés. L'état des connaissances à l'heure actuelle permet de commencer à imaginer des stratégies qui devraient améliorer la lutte contre le cancer qui reste une maladie encore difficile à combattre.

Cisplatin Is a DNA-Damaging Antitumour Compound Triggering Multifactorial Biochemical Responses in Cancer Cells: Importance of Apoptotic Pathways

Yuliya Sedletska, Marie-Josèphe Giraud-Panis and Jean-Marc Malinge*

Centre de biophysique moléculaire, CNRS, UPR 4301 affiliated to the Université d'Orléans and to INSERM, Rue Charles Sadron, 45071 Orléans Cedex 02, France

Abstract: *cis*-Diamminedichloroplatinum(II) (cisplatin) is among the most active antitumour agent used in human chemotherapy. The purpose of this review is to give an insight in several molecular mechanisms that mediate the sensitivity of cancer cells to this drug and to show how recent progress in our knowledge on some critical molecular events should lay the foundations of a more rational approach to anticancer drug design. Cisplatin is primarily considered as a DNA-damaging anticancer drug, mainly forming different types of bifunctional adducts in its reaction with cellular DNA. We will address the question of cellular activity disruption that cisplatin could cause through binding to more sensitive region of the genome such as telomeres. Cellular mechanisms of resistance to cisplatin are multifactorial and contribute to severe limitation in the use of this drug in clinics. They include molecular events modulating the amount of drug-DNA interaction, such as a reduction in cisplatin accumulation inside cancer cells or inactivation of cisplatin by thiol-containing species. Other important mechanisms acting downstream to the initial reaction of cisplatin with DNA, include an increase in adducts repair and a decrease in induction of apoptosis. Recently accumulating evidence suggest a role of the long patch DNA mismatch repair system in sensing cisplatin-damaged DNA and in triggering cell death through a *c-Abl*- and *p73*-dependent cascade; two other important pathways have been unravelled that are the mitogen-activated protein kinase cascade and the tumor suppressor *p53*. Several of these mechanisms underlying cisplatin resistance have been exploited to design new platinum derivatives. This issue will be covered in the present review.

Key Words: Cisplatin, antitumour activity, drug resistance, apoptosis, DNA mismatch repair, telomere.

1. INTRODUCTION

Cis-Diamminedichloroplatinum(II) or cisplatin (Fig. (1)) has been discovered by Barnett Rosenberg, first as a strong inhibitor of bacterial cell growth in 1965 and some years later as a potent antitumor drug [1-4]. Nowadays, over 30 years after the description of its anticancer activity, the ongoing central role of this drug in human cancer chemotherapy attests of its importance. Cisplatin-based combination therapy is highly efficient in the treatment of testicular cancer with cure rates greater than 95% [5]. Cisplatin is actually one of the most widely used anticancer drug in the treatment of a variety of cancers such ovarian, lung, head and neck cancer [6] but its therapeutic benefit is greater for testicular cancer for yet unclear reasons.

Numerous studies have been devoted to the understanding of the mechanism of action of this drug. Soon after the discovery of the anticancer activity of cisplatin, a first intriguing observation that greatly stimulated research, was the finding that the *trans* analogue of cisplatin, *trans*-diamminedichloroplatinum(II) (transplatin) (Fig. (1)), was devoid of anticancer activity. One important challenge which emerged from this structure activity relationship was to determine at the molecular level the difference between both



Fig. (1). The parent drug *cis*-diamminedichloroplatinum (II) (cisplatin) (1) and the biologically inactive stereoisomer of cisplatin, *trans*-diamminedichloroplatinum (II) (transplatin) (2).

isomers and how it related to biological activity, with the ultimate purpose of designing novel platinum compounds with higher anticancer properties. The most striking difference between cisplatin and transplatin is their ability to form different types of DNA adducts both qualitatively and quantitatively. From this result and a wealth of other data, DNA was considered as the main pharmacological target of cisplatin. This dogma implicates that the nature of the adduct formed on DNA by a platinum compound will play a central role in the modulation of cell sensitivity to platinum-based drugs. However, the precise nature of the cisplatin adduct(s) responsible for the anticancer activity of this drug has not been unambiguously defined yet.

Despite its success in cancer chemotherapy, toxic effect including nausea and vomiting, nephrotoxicity and the emergence of drug-resistant tumour cells limited the efficiency of cisplatin. Hence, research for more effective new anticancer platinum drugs able to circumvent the problem of side effects and resistance was and still is the main purpose of

*Address correspondence to this author at Centre de biophysique moléculaire, CNRS, UPR 4301 affiliated to the Université d'Orléans and to INSERM, Rue Charles Sadron, 45071 Orléans Cedex 02, France; Tel: + 33-2-38-25-55-44; Fax: + 33-2-38-63-15-17; E-mail: malinge@cnrs-orleans.fr

drug discovery programs. After more than 30 years of research in this field, about 30 other platinum complexes have entered clinical trials and among them only two have received worldwide approval for clinical use: carboplatin (cis-diammine(1, 1-cyclobutanedicarboxylato)platinum(II)) a direct derivative of cisplatin with less toxic effect [7] and the so-called third generation platinum based drug oxaliplatin (trans-R, R-cyclohexane-1, 2-diamine)oxalatoplatinum(II) with antitumor activity against some cisplatin resistant tumours [8] (Fig. (2)). Finding new and active platinum-related compounds has proven to be a difficult task owing to the complexity and the diversity of the cellular mechanism which are responsible for the decrease sensitivity of cancer cells to the drug. When considering the problem of drug resistance, one has to distinguish between acquired or intrinsic resistance. For instance, colorectal and nonsmall cell lung cancers have intrinsic resistance while ovarian or small cell lung cancers develop acquired resistance to the drug [9]. Again this is linked to the variety of mechanisms responsible for cisplatin resistance which include reduction in cisplatin accumulation inside cancer cells or inactivation of cisplatin by thiol containing species such as glutathione and metallothioneins. These cellular mechanisms contribute to modulate the drug-target interaction and the sensitivity to the drug. In addition to these well understood problems of initial drug-induced insult, it becomes more and more evident that downstream events also play an important role. Perhaps the best studied of these cellular events nowadays is the phenomenon of cisplatin-induced apoptosis. Numerous recent data indicate that the apoptotic process contributes in

general to the cytotoxicity of many anticancer drugs [10] and particularly cisplatin.

The purpose of this review is to give an insight on several molecular mechanisms that mediate the sensitivity of cancer cells to cisplatin. Because apoptosis is often compromised in resistant cells, a particular emphasis will be given to this topic with the purpose of helping to understand how cellular injuries by cisplatin can trigger cell death.

2. CELLULAR DNA AS THE MAIN TARGET OF CISPLATIN

2.1. Cisplatin Reactivity with Genomic DNA

There is strong evidence that cellular DNA is the main target of cisplatin (reviewed in [11-14]). The reaction between DNA and cisplatin results in the formation of different types of adducts. Although these adducts block DNA replication and transcription, there is not a clear understanding of the antitumour activity of cisplatin yet. Cisplatin reacts preferentially with purine residues in DNA and mainly forms bifunctional lesions (Fig. (3)). *In vivo* and *in vitro*, the major adducts are 1, 2-intrastrand cross-links at the d(GpG) and d(ApG) sites representing about 65 and 25 % of the bound platinum, respectively. Cisplatin can also form interstrand cross-links between two guanine residues on opposite strands at the d(GpC).d(GpC) sites but these adducts are less abundant (about 1-2 %). 1, 3-intrastrand cross-links at the d(GpNpG) sites (N being a nucleoside residue) have been found (10 %), but their rate of formation

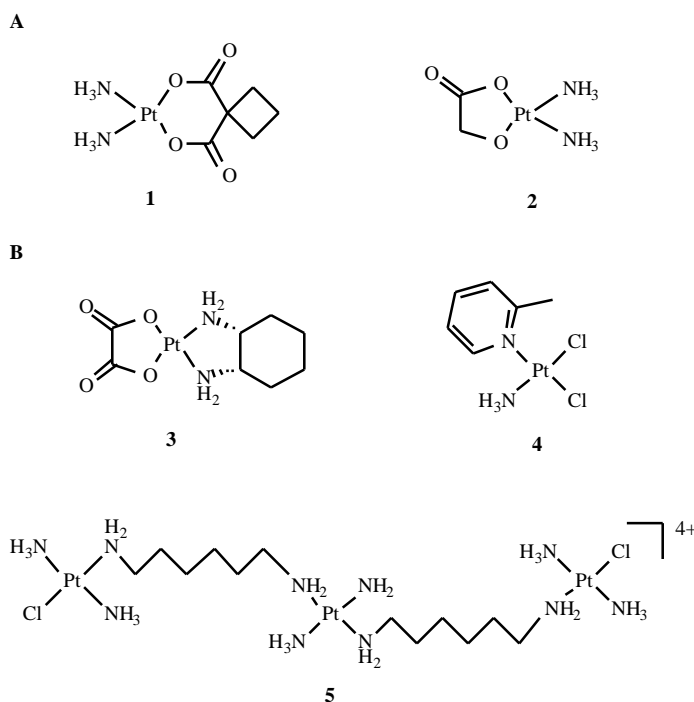


Fig. (2). Structure of second (A) and third (B) generation platinum drugs. *cis*-diammine(1, 1-cyclobutanedicarboxylato)platinum(II) (carboplatin) (1); *cis*-diammineglycolatoplatinum(II) (nedaplatin) (2); *trans*-R, R-cyclohexane-1, 2-diamine)oxalatoplatinum(II) (oxaliplatin) (3); *cis*-amminedichloro(2-methylpyridine)platinum(II) (ZD0473) (4); *trans*-{bis[*trans*-diamminechloroplatinum(II)(μ -1, 6-hexanediamine)]} diammineplatinum(II) tetranitrate (BBR3464) (5).

is very slow [15]. All of these modifications occur at the N(7) position on the purine ring. The chloride concentrations being 100 mM in blood, which is enough to suppress cisplatin hydrolysis, cisplatin can penetrate the cell membrane as a neutral species. Once inside, the chloride concentration falls to 4 mM allowing cisplatin hydrolysis to occur. Numerous studies support the view that the formation of the adducts in the reaction between DNA and cisplatin or transplatin proceeds in a two-step solvent-assisted reaction where the chloro ligands are replaced by water molecules (Fig. (3)). These hydrolysis products are recognized as highly reactive species. Conversely, it is generally accepted that once formed the intrastrand and interstrand cross-links are stable. However, it is noteworthy that several reports can be found that deal with rearrangements of the adducts [16, 17]. Some of these rearrangements could even offer the possibility of designing molecular tools as detailed in the next section of this review.

DNA damage by cisplatin is commonly recognized as an apoptotic stimulus [18, 19]. However, the nature of the adduct responsible and the amount necessary for induction of apoptosis is not well-defined yet. A vast number of studies have been performed to describe the nature of the distortions induced by the different cisplatin adducts. Their structure has been determined by a combination of electrophoresis, chemical probing, nuclear magnetic resonance, X-ray crystallography and molecular mechanic studies [20, 21]. Extensively studied, the major cisplatin 1, 2-d(GpG) intrastrand cross-link causes DNA bending towards the major groove, unwinding of the double helix and alterations of the grooves and of the puckering of the sugars [22, 23]. This structure differs significantly from that of the interstrand cross-link

which induces a larger bending and unwinding, the DNA molecule being bent in the opposite direction (towards the minor groove) [24]. The relevance of these distortions has been emphasized by the discovery of several proteins which specifically recognize the major cisplatin intrastrand cross-links. Over 20 individual proteins have been shown to recognize specifically cisplatin adducts. Most show specificity for the major cisplatin 1, 2-intrastrand cross-links (reviewed in [25-29]) rendering these lesions as critical for modulating cisplatin cytotoxicity by different mechanisms depending on the nature of the candidate DNA damage protein. The putative role of some of these proteins- such as proteins of the nonhistone chromosomal high mobility group (HMG) and repair proteins of the nucleotide excision repair or the mismatch repair systems- will be detailed further on in this review. The discovery of the diversity in distortions provoked on DNA and their importance in protein recognition influenced greatly the designing of new antitumor platinum-based drugs. Indeed, one approach that has been extensively explored is the design of platinum analogues with markedly different DNA binding and proteins recognition properties. For instance BBR3464 (Fig. (2)), a compound containing two platinum moieties linked by flexible alkyldiamine chains with a positively charged platinum unit [30], produces more interstrand cross-links in plasmid DNA than cisplatin [31] and the intrastrand cross-links it generates are not recognized by HMGB1 [32]. This compound generally shows a higher potency than cisplatin and a substantially different pattern of response in different cell lines particularly those exhibiting resistance towards cisplatin [33].

A correlation between the extent of platination on DNA and the outcome of the treatment has been found when the

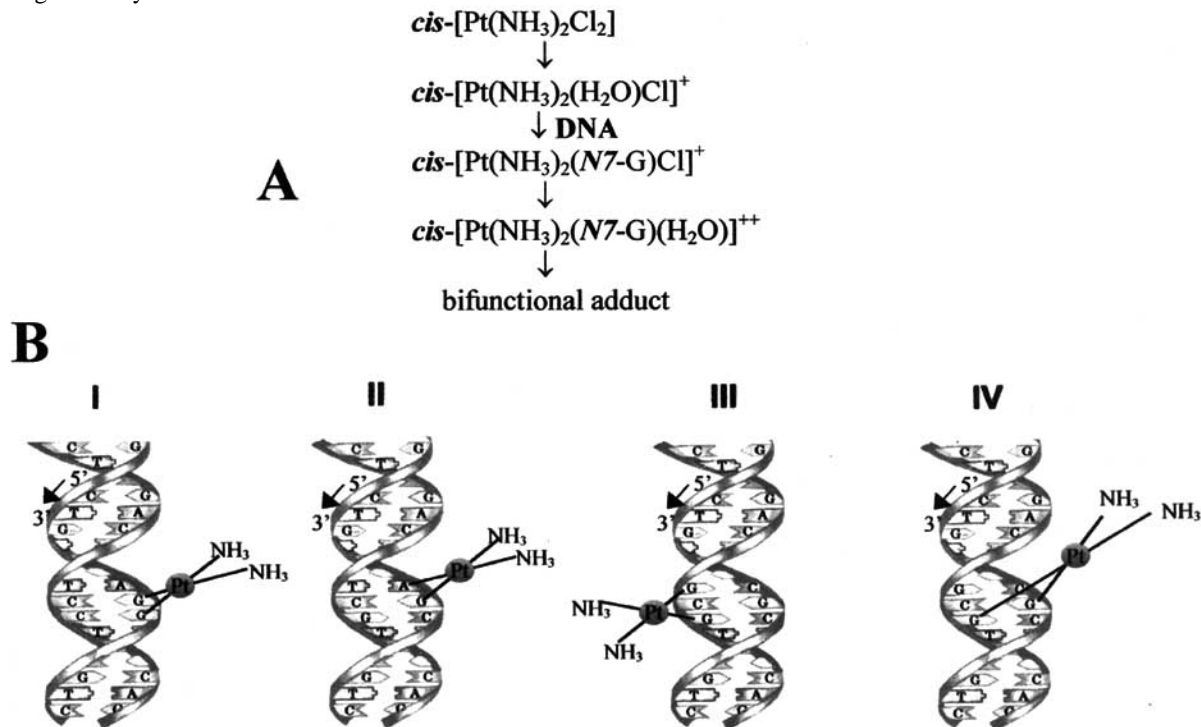


Fig. (3). (A) Main steps of the reaction between DNA and cisplatin leading to formation of bifunctional adducts (B). Nature of cisplatin bifunctional adducts. I, 2-d(GpG) intrastrand cross-link (I); 1, 2-d(ApG) intrastrand cross-link (II); 1, 3-d(GpXpG) intrastrand cross-link, X being a nucleotide residue (III); d(GpC).d(GpC) interstrand cross-link (IV).

amount of adducts was measured in leukocytes of patients [34-36] emphasizing the importance of platinum-DNA adducts in cancer chemotherapy. However, such a correlation was not always found in all tumour cells [37] underlying again the diversity and the importance of cellular responses to the drug. Nevertheless, the possibility of the amount of adducts being critical to the clinical efficiency places the general question of the cellular mechanisms which can modulate the cisplatin DNA-targeting at the heart of the problem. Of great interest is the possibility that cisplatin could target more sensitive region of the genome.

2.2. Telomere: a Potential Target for Cisplatin

Because cisplatin reacts preferentially with two adjacent guanine residues in double-stranded DNA, G-rich regions in the genome could constitute potential targets. Thus, one of the many possibilities considered are telomeres. Indeed these nucleoprotein elements located at the end of linear chromosomes present a DNA sequence particularly rich in guanines being composed of several kilobases of repetitions of a double-stranded motif (5'-TTAGGG-3') (for review see [38]). Furthermore, their importance in cell survival and their implication in cancer fully justify a growing interest for these sequences in the cisplatin field of research. Telomeres main function is to provide a cap on chromosomes termini to protect them against degradation and illicit repair [39, 40]. Telomeres of most human somatic cells progressively shorten with age through incomplete replication of chromosomes ends and degradation processes yet poorly understood. Critically short telomeres become non functional, an event that leads to genomic instability, cellular senescence and cell death through apoptosis. Thus telomeric decline constitutes a way of limiting cellular life span. This is thought to participate in the decline of tissue functions and integrity and therefore to contribute to ageing (for review see [41]). Cancer cells, however, have developed ways to bypass this telomeric attrition: telomerase activation and Alternative Lengthening of Telomeres (ALT). ALT is used by 10 to 15 % of tumours and utilizes a recombination-dependent pathway to replenish telomeres (for review see [42]). However, the major mechanism used by cancer cells for telomeric growth (85% to 90% of cases) involves telomerase activation [43]. Telomerase is a telomere specific reverse transcriptase that adds telomeric repeats to chromosomes ends. Numerous studies have been devoted to the understanding of telomerase biology and biochemistry (for review see [44]) and have revealed the uniqueness of this enzyme and its high potential as a possible target in cancer diagnosis and therapy [45]. As seen from the view point of platinum derivatives research, telomeres are connected to three different areas mainly: i) the topic of the biological target of cisplatin, ii) the study of synergistic effects between chemotherapy and telomerase inhibitors and iii) the use of platinum compounds for targeting telomeres and telomerase as a therapeutic approach.

i) The effect of cisplatin treatment on telomere function is still a subject of controversy. Telomere losses were observed in HeLa cells [46] and in yeast cells with a defective nucleotide excision repair pathway [47] when treated with the drug. Cisplatin has also been shown to increase the occurrence of sister chromatid exchange in telomere of hamster CHO cells [48] suggesting that telomeric DNA

could constitute a target for cisplatin. However, *in vitro* experiments performed on a plasmid containing 800 base pairs of human double-stranded telomeric repeats did not reveal a preferential reactivity on telomeric sequence over GG sites in random sequence DNA [49]. Alternatively, cisplatin target could be the G-rich single-stranded tail that constitutes the terminus of telomeres, although reactivity on single-stranded telomeric DNA was reported to be weak [46]. Telomeres end with a 3' single-stranded overhang of 50 to 200 nucleotides and bearing a T₂AG₃ sequence is essential for telomere dynamics and cell survival. Its removal, that can be induced by inhibition of the telomeric protein TRF2, causes cell death through massive chromosomal fusions [50]. Furthermore, this part of the telomere constitutes the substrate of the telomerase enzyme and the presence of lesions could be responsible for alterations in telomerase activity in cancer cells. This DNA can adopt quadruplex structures *in vitro* where guanines interact with each other to form G-tetrads through hydrogen-bonding [51]. Recently it has been shown that cisplatin is able to interact with these structures and to stabilize them *in vitro* [52]. However, although quadruplexes are readily formed *in vitro*, their existence *in vivo* is still controversial and the effect of cisplatin-stabilized quadruplexes on telomere biology and on telomerase activity has not been reported yet. On the other hand, several other quadruplex stabilizing compounds have been studied in the last few years and have yielded to significant telomerase inhibition (for review see [53]) suggesting that platinum-based chelates could be effective too.

Finally, cisplatin could target the telomerase enzyme itself. Indeed, telomerase contains an RNA moiety that is also rich in guanine residues. Several studies have been devoted to monitor the effect of cisplatin treatment on telomerase activity. Conflicting results have been reported depending on cell type and experimental protocol and in the case of the positive results some doubts exist on telomerase being the direct target of cisplatin [54-58] suggesting that in these cases telomeric DNA could be a better candidate.

ii) Any new anticancer drug that would eventually derive from telomere or telomerase research will probably be used as a component of a drug cocktail often containing platinum compounds. Thus, one of the subjects treated in the literature concerns synergistic effects between telomerase inhibitors and cisplatin and the possibility of reducing the occurrence of resistant tumour cells. Again, no consensus has been found on the subject. Sensitivity of mouse cells to treatment with cisplatin was reported as being independent of telomere status [59]. The opposite was proposed for melanoma cells [60] and glioblastoma human cells [61]. Short-term inhibition of telomerase did not seem to sensitize human prostate cancer cells to cisplatin although a synergistic effect could be seen after prolonged inhibition of telomerase [62]. More work is obviously needed to ascertain or invalidate the idea of a synergy between telomerase inhibition therapy and cisplatin treatment.

iii) Another topic has recently been studied that presents great potential for therapeutic use and that concerns transplatin, the clinically ineffective isomer of cisplatin. In reacting with a 5'GNG site (N being a nucleotide) containing single-stranded oligonucleotide, transplatin forms a stable *trans*-[Pt(NH₃)₂{1, 3-d(GNG)-N7-G, N7-G}] intrastrand

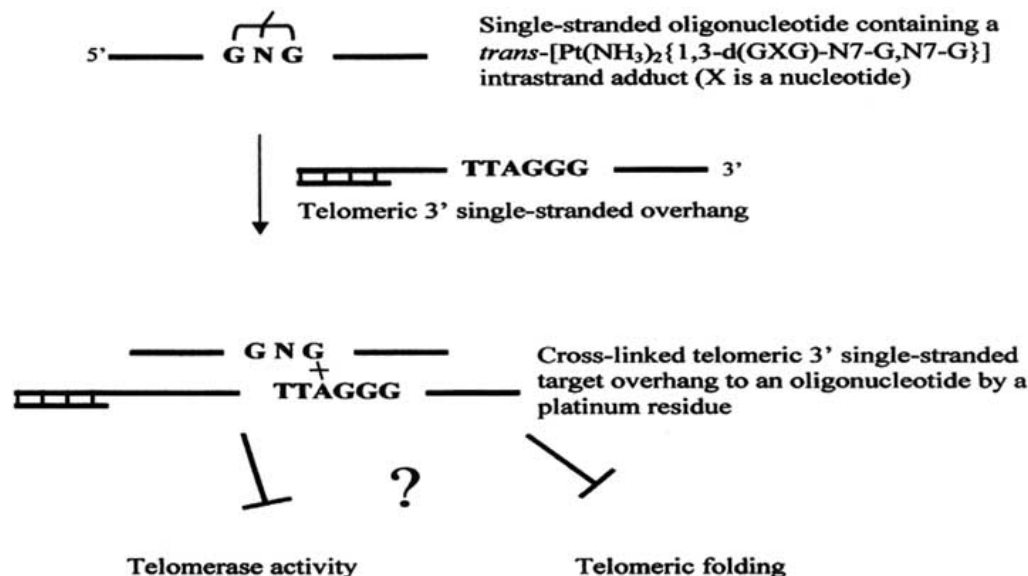


Fig. (4). A linkage isomerization reaction creates a covalent cross-link between the transplatin modified oligonucleotide and the telomeric single-stranded overhang after the formation of a double helix.

adduct. Upon pairing with the complementary strand, this chelate rearranges itself into an interstrand adduct (Fig. (4)), therefore creating a double-stranded species where the two strands are covalently linked. This isomerization reaction and more precisely the rate of this reaction depends on the nature of the platinated oligonucleotide and of the target. The rate was found to be optimal (in order of minutes) for RNA rather than DNA and for a target containing a 5'-pyrimidine/adenine doublet facing the GNG sequence (Fig. (4)) [63-65]. These platinated oligonucleotides could therefore constitute valuable tools for an antisense strategy. This idea was tested successfully on a biologically relevant target using a 2'-O-methylribonucleotide specific to the *Ha-ras* mRNA in HBL100 ras1 cells which led to inhibition of cell proliferation [66]. Although being desoxyribonucleotidic, telomeric 3' G rich single-stranded tail has been revealed as an effective target for transplatin isomerization [67]. The half-time of the reaction fell within one minute suggesting a possible use in targeting the natural telomeric 3' overhang in cells. Once formed the interstrand cross-links are stable and the double-stranded species obtained could therefore constitute a formidable obstacle to telomerase activity or telomere folding. Many experiments will have to be performed to ascertain this hypothesis but the data obtained so far seem to argue for a promising future.

3. MECHANISMS PREVENTING CISPLATIN FROM INTERACTING WITH DNA

Drug pharmacokinetics, reduced intracellular drug accumulation, increased inactivation by thiol-containing molecules are relevant mechanisms contributing to cisplatin resistance (for reviews see [68-73]). As shown in Fig. (5), these mechanisms interfere with the extent to which DNA, the target, will be damaged by the drug.

3.1. Cisplatin Pharmacokinetics

After intravenous cisplatin administrations at a dose of 100 mg/day for 5 consecutive days, a high fraction (more

than 50 %) of cisplatin in human blood is bound to plasma proteins, including albumin, transferrin and γ -globulins. It is generally thought that cisplatin toxicity is in part associated with plasmatic protein binding of cisplatin. However, it is yet unclear whether the pool of platinum-bound proteins can serve as a reservoir for future use or can be a dead end irreversibly inactivating cisplatin and leading to a severe reduction of the drug efficiency. This efficient binding of cisplatin to proteins and peptides is not surprising since platinum has a high affinity for sulfur containing ligands such as methionine and cysteine [74]. Model studies have shown that a platinum moiety bound to a methionine thioether can be transferred to the N7 of the guanine of single-stranded and double-stranded oligonucleotides [75-77] suggesting that *in vivo* Pt species might migrate from S donor ligands such as proteins to N donor ligands such as DNA bases. However, it was also suggested that Pt-methionine adducts in proteins cannot serve as reservoir of cisplatin because these adducts can be displaced by cytoplasmic glutathione, a potent detoxifiers of metals in cells [78].

Another cause of toxicity associated with cisplatin treatment is due to dose-dependent and cumulative nephrotoxicity [79, 80]. Indeed, the dose used in cancer chemotherapy is limited by the risk of acute or chronic renal failure. Several data have proposed that inactivation of critical function of kidney was due to the binding of cisplatin to specific enzymes (reviewed in [81]). More recently, the major target for cisplatin toxicity within kidney was found to be the renal proximal tubular cell. The mechanism by which cisplatin induced a cytotoxic effect in these cells depends on induction of apoptosis through activation of protein kinase C-, ERK1/2 and alterations of mitochondrial function [82]. Although there is no therapeutic treatment available yet that could decrease the cisplatin-induced apoptosis in renal cells, administration of protecting agents, usually sulfur containing ligands, can decrease substantially cisplatin nephrotoxicity by reacting quickly with cisplatin in the kidney (reviewed in [83]). Another approach to avoid cisplatin toxicity has been

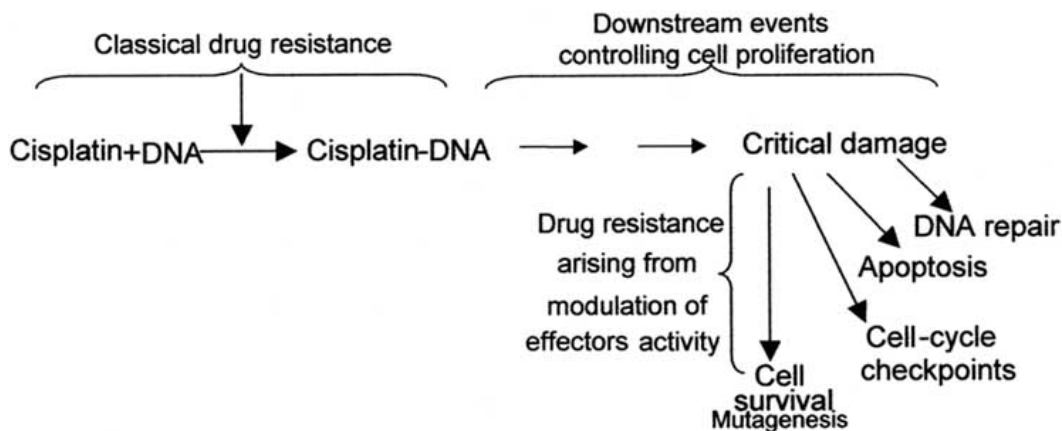


Fig. (5). General mechanism of cisplatin action. Addition of cisplatin to tumor cells results in interaction between the drug and the pharmacological DNA target; molecular events inhibiting cisplatin-DNA interaction (reduction in cisplatin accumulation inside cells, inactivation of cisplatin by thiol containing species such as glutathione) are classical drug resistance mechanisms. Other mechanisms of resistance depend on downstream events of the initial drug-induced DNA damage; for instance, defects in apoptosis and an increase in the repair activity of platinated DNA participate in desensitizing cancer cells to the drug.

focused on the development of new derivatives. Among the platinum complexes developed, carboplatin was the first to exhibit a more tolerable toxicological profile in clinical trials and in particular a substantial decreased nephrotoxicity [7]. Therefore it can be used in treatments at higher doses of 2,000 mg/day (reviewed in [84]) although a toxic effect of myelosuppression is responsible for limitation in the maximum dose that can be administered. As aforementioned, this compound is the only second-generation platinum drug which has been approved worldwide for human cancer chemotherapy. Another second-generation drug, *cis*-diammineglycolatoplatinum(II) has been approved for cancer chemotherapy in Japan (for a review see [69]). It is generally thought that for both second generation compounds, reduced binding to serum proteins and weaker nephrotoxicity as compared to cisplatin are a consequence of a slower rate of hydrolytic activation due to the nature of the leaving groups. Indeed, no difference could be seen in the nature of the adducts formed by carboplatin and cisplatin [85].

3.2. Cellular Mechanisms of Cisplatin Uptake/Efflux

The mechanism by which cisplatin enters the cells is not well understood. Cisplatin is a polar molecule and does not cross membranes easily. It has been proposed that about 50 % of the initial rate of cellular uptake is due to passive diffusion through the cell membrane and that the remaining 50 % results from facilitated diffusion through a gated channel (reviewed in [86]). A link has been reported between Cu transporters and cisplatin sensitivity when it was observed that cells engineered to express high levels of ATP7B, a 1465 amino acids copper transporting P-type ATPase protein, were resistant both to copper and cisplatin [87]. Higher levels of ATP7B mRNA in ovarian carcinoma correlated with a decrease in sensitivity to cisplatin and ovarian carcinoma cells selected *in vitro* for cisplatin resistance were also cross-resistant to Cu. These observations consistent with a possible role of this Cu transporter in cisplatin resistance were shown to be relevant in clinics; indeed increased expression of the ATP7A [88] or the ATP7B [89] transporters in tumors from patients presenting

an ovarian carcinoma was associated with poor survival. The primary role of these Cu transporters is to sequester the metal into vesicles in order to export it from the cells using the vesicular secretory pathway. Using molecularly engineered cell lines expressing or not ATP7A or ATP7B, it was recently suggested that cisplatin export could be compromised in proficient cells and therefore the sequestration step by the transporter should be related to cisplatin resistance [90]. This sequestration step could be specific of the platinum derivative used; cisplatin and carboplatin are sequestered to the same extent whereas oxaliplatin behaves differently as deduced from the higher amount of platinum reaching DNA. A genetic study on yeast and mouse showed that the Cu influx transporter CTR1 plays a major role in cisplatin cellular uptake [91]. The Ctr1P protein which has three putative transmembrane domains might serve as a channel for cisplatin entry. All the data presented indicate the importance of Cu transporter in cisplatin uptake/efflux, mechanisms that have a bearing in cisplatin resistance phenomenon. Studies establishing relationships between expression of Cu transporters, platinum derivatives accumulation and the amount of bound platinum to DNA are clearly warranted to ascertain the involvement of these proteins in resistance to the drugs.

3.3. Cisplatin and Thiol-Containing Molecules

Glutathione (gamma-glutamylcysteinylglycine, GSH) is the most abundant non-proteic intracellular thiol, present at concentrations of 0.1 to 10 mM. GSH can detoxify many exogenous toxins, including cisplatin, through the formation of GSH adducts. *In vitro*, the reaction between cisplatin and GSH yields to a high-molecular mass polymer with a 1:2 Pt:GS stoichiometry [92]. GSH does not appear to react with cisplatin bifunctional adducts but can trap transient monofunctional adducts before the ring closure that leads to bifunctional lesions. Interestingly, the long lived monofunctional species formed by transplatin could be more efficiently trapped by GSH which could explain in part the biological inactivity of transplatin. Increases in GSH content have been demonstrated in a number of cisplatin-resistant

tumor models [93] and this correlation has been also observed in clinic [94]. Beyond the formation of GS-Pt adducts, another mechanism potentially involved in drug resistance could be mediated by an increase in the elimination of these adducts through an ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump [95]. Indeed, higher expression and increased DNA copy number of members of the glutathione S-transferase family, enzymes that catalyse coupling of GSH to different substrates such as cisplatin, has been correlated with a decreased response to cisplatin therapy in head and neck cancer [96].

Besides its role in cellular cisplatin detoxification, other explanations for the effect of GSH are also of interest. Indeed, it was proposed that *in vitro* GS-Pt adduct itself could play a role in cisplatin sensitivity by inhibition of thioredoxin [97], an important 12 000 Daltons redox protein endowed with antiapoptotic effect as further mentioned and whose expression has been correlated to cisplatin resistance in some cell lines [98]. Another possible explanation for GSH-dependent cisplatin resistance is related to the role of this tripeptide in redox control of cells [99]. GSH anti-oxidant function was shown to mediate cisplatin apoptotic pathways through Bcl-2, an important apoptotic inhibitor [100] and GSH together with thioredoxin system were proposed to play a role in cisplatin resistance by scavenging intracellular toxic oxydants generated by cisplatin [101]. Therefore, the possibility that GSH-mediated cisplatin resistance may depend on others factors than cisplatin inactivation is reinforced in view of the role played by GSH as antioxydant.

Like the tripeptide GSH, the small cysteine-rich protein metallothionein is also a metal detoxifying molecule and its overexpression has been correlated with cisplatin resistance in cells [102]. Johnson Matthey Technology and the Cancer Research Campaign in the United Kingdom successfully ended the search for a platinum compound with reduced reactivity to thio ligands; cis-amminedichloro(2-methylpyridine)platinum(II) or ZD0473 (Fig. (2)) possesses a methylpyridine group inducing a steric hindrance which limits the axial approach to the platinum centre and therefore slows down ligand exchange on the square planar Pt(II) compounds. Indeed this steric hindrance leads to hydrolysis rates two to three times slower than those of cisplatin [103] and less reactivity with methionine and GSH [104]. This new generation platinum agent (third generation) entered in clinical trials in 1997 following the discovery of its activity against human tumour xenograft resistant to cisplatin [105]. It is now undergoing phase II and III clinical trials (reviewed in [84]).

4. DOWNSTREAM EVENTS CONTROLLING CELL PROLIFERATION OR DEATH

In addition to the relatively well-understood problems of initial drug-induced DNA damage, it becomes more and more evident that downstream events play an important role in cisplatin sensitivity (Fig. (5)).

4.1. Cisplatin Sensitivity and DNA Repair System

The main mechanism used for removing cisplatin intrastrand cross-links is nucleotide excision repair (NER).

NER has been elucidated at the molecular level (reviewed in [106-108]) and can be summarized by the succession of five different steps: locating damage, introducing incisions on the damaged strand on each side of a lesion, excising a single-stranded oligodesoxyribonucleotide of 24 to 32 residues, filling in the gap by repair synthesis and finally ligating the DNA strands. Because cisplatin DNA adducts are considered to be the main lesions that cause cellular death, the efficiency of removal of cisplatin by NER is expected to play an important role in drug response. Indeed, cells deficient in NER are hypersensitive to cisplatin [109, 110] and several studies have shown a relationship between clinical resistance to cisplatin and increased level of NER proteins expression. Such correlation has been established in resistant ovarian, lung and gastric cancers for which the level of ERCC1, a NER protein which performs with XPF the 5' strand incision of the damaged strand was found to be increased [111-113]. Expression level of XPA, another NER protein implicated in the recognition step of the repair process, has also been associated with cisplatin resistance in ovarian and testicular cancer cell lines [111, 114, 115]. Interestingly, the unusual sensitivity to cisplatin of testis tumour was also correlated to low level expression of the NER proteins, XPA, XPF and ERCC1 [116] reinforcing the relevance of NER status in the prediction of the efficacy of cisplatin-based chemotherapy. Another aspect of NER function, relevant to the topic of cisplatin resistance is its role in the repair of damaged DNA during transcription called transcription coupled nucleotide excision repair (TC-NER). Cisplatin is known to generate transcription blocking lesions on DNA. Indeed, inhibition of different RNA polymerases such as the T7 RNA polymerase has been observed *in vitro* [117]. TC-NER which is essential for rapid repair of transcription-blocking lesions in active genes was shown to be implicated in the removal of cisplatin adducts in rodent cells [118] and in the sensitivity of different human cells treated by cisplatin [119].

Several *in vitro* studies using cell extracts [120-122] and purified NER proteins [123] have shown that NER is significantly less efficient in repairing the major cisplatin 1, 2-intrastrand cross-links than 1, 3-intrastrand cross-linked species on naked DNA. One explanation to this differential NER activity is that the difference in the nature and the extent of DNA distortions induced by these lesions could lead to differences in damage recognition by NER proteins [121]. Another mechanism, namely the shielding model, is that 1, 2-intrastrand cross-link could be shielded by specific binding of cellular proteins, in particular HMG-box proteins such as HMGB1, impairing recognition by NER proteins [123, 124]. In agreement with this model, overexpression of HMGB1 by exposure of cells to oestrogen was found to sensitize breast tumor cells to cisplatin [125]. However, no modulation of cellular sensitivity to cisplatin was observed in mouse embryonic cells being either proficient or deficient for HMGB1, suggesting that the modulation of cisplatin cytotoxicity by HMGB1 could be cell-specific [126]. Therefore, the shielding model is an attractive mechanism which has been validated in several *in vitro* studies. More experiment are warranted at the cellular level to ascertain the role of cisplatin damage recognition protein in NER inhibition.

A recent study carried out with cell extracts has confirmed that the difference in repair activity still exists when

the cisplatin 1, 2- and 1, 3-intrastrand cross-links are present in DNA reconstituted into nucleosomes although the repair activity was significantly weaker as compared to naked DNA [127]. An important mechanism regulating the accessibility of NER to chromatin *in vivo* is the post translational modifications of histones, including phosphorylation, acetylation and methylation (for a review see [128]). It is likely that *in vivo* cross-talks could exist between the repair activity of platinated nucleosomes, the post translational modifications of histones and also the induction of apoptosis [129].

4.2. Cisplatin-Triggered Apoptotic Pathways

Resistance to apoptosis has been proposed to create a platform that is both necessary and sufficient for tumour formation [130]. Sensitivity to apoptosis is known to be fundamental for therapeutic responses of malignant cells to chemotherapy including cisplatin treatment [10]. Several apoptotic pathways triggered by cisplatin have now been identified; the study of their regulation and modulation is underway and reviewed in the next section.

4.2-a. Cisplatin-Induced Mismatch Repair-Dependent Apoptosis Pathway

The mismatch repair (MMR) system promotes genomic fidelity by repairing base-base mismatches, insertion-deletion loops and heterologies formed during replication and recombination (reviewed in [131-134]). In addition, MMR proteins function is now associated with sensitivity for several DNA-damaging anticancer agents including cisplatin [135-138]. The first evidence showing that MMR system can be a determinant of sensitivity to cisplatin came from experiments performed on Dam methylase *E. coli* mutants; these mutants which are hypersensitive to cisplatin became significantly less sensitive to the drug when MMR proteins such as MutS and MutL were mutated [139]. Such behaviour had been reported when methylating agents were used on *E. coli* [140] and on eukaryotic cells [141, 142] showing an association between defective MMR and resistance to different alkylating agents.

Several results have shown the importance of this repair system in cisplatin resistance both *in vitro* and *in vivo*. *In vitro*, resistance to cisplatin was found for several cell lines deficient in the eukaryotic counterparts of MutS and MutL, hMutS and hMutL respectively (MSH2 and MSH6 are the subunits of hMutS, MLH1 and PMS2 are those of MutL) [135, 143-147]. Restoration of MMR activity by chromosome transfer into MMR-defective human tumor cells led to an increase of sensitivity to cisplatin, arguing again for a strong involvement of the MMR system in the phenomenon of resistance [146]. *In vivo*, inactivation of MMR genes in mice such as *MSH2* causes cellular resistance to cisplatin [148]. In addition the same degree of cisplatin resistance was found in MMR deficient cancer cells both *ex vivo* and *in vivo* in mice indicating the relevance of the MMR system in sensitivity in both cases. MMR deficiency induces a relatively weak factor of resistance to cisplatin (2) [146] however it is known that even moderate increases in drug resistance can lead to therapeutic failure as a consequence to resistant disease [148]. This raises the important question as to whether loss of MMR can affect the clinical sensitivity of

tumours to cisplatin chemotherapy and, as a sideline, the problem of establishing the status of the MMR in clinical cases. Concerning the latter question, one possibility resides in a phenomenon called microsatellite instability (MSI). MSI is a consequence of mutations in non-expressed microsatellite regions and results in numerous alterations in the length of microsatellites. It is frequently associated with MMR deficiency. Both in human tumor cell lines models resistant to cisplatin [149] and in patients with metastatic germ cell tumors [150] a positive relationship between MSI and cisplatin resistance was established indicating that this marker could be used to predict the success of chemotherapy by cisplatin. However, the frequency of MSI often varies in different types of tumours and the underlying genetic defect could be unclear; hence, MSI could not be directly correlated with MMR deficiency in some cases [151]. This is a reason why other approaches such as immunohistochemistry have also been used to establish the MMR status in cancer. A recent study, based on immunohistochemical data, showed that for patients treated by cisplatin for oesophageal cancers, a reduced expression of the human MLH1 subunits of hMutL was associated with poor prognosis [152]. This is in agreement with previous studies showing the existence of a relationship between a decrease in MMR proteins expression and the frequent development of cisplatin resistance [153, 154].

The observation that loss of MMR causes cells to become resistant to cisplatin leads to the question of how this repair system participates in cisplatin cytotoxicity. Several recent data have shown that p73, a nuclear p53-related protein that is pro-apoptotic when over-expressed, accumulates in cultured cancer cells treated with cisplatin; importantly this accumulation no longer occurs when the cells are deficient in the MLH1 or PMS2 MMR proteins [155-157]. The relevance of this MMR-dependent p73 cell death pathway in cisplatin cytotoxicity is underlined by the fact that cisplatin induced apoptosis independently of the well known p53 tumor suppressor protein [155, 158]. Cisplatin is also capable of activating the oncogenic tyrosine kinase c-Abl resulting in apoptosis induction [155, 159]. Once more this activation is under the control of MMR since MLH1-defective HCT-116 cells and MSH2-defective HEC-59 cells fail to activate c-Abl upon cisplatin treatment. The underlying mechanism by which MMR proteins promote c-Abl activation remains to be determined. Interestingly, an upstream activator of c-Abl has been recently determined as the SHP-2 tyrosine phosphatase, the activity of which was increased upon cisplatin treatment [160]. The possibility that phosphatase activation was dependent upon MMR proteins has not been tested yet. Nevertheless, it is now well established that MMR controls the activation of a pathway upstream of both c-Abl and p73 (Fig. (6)). In agreement with this regulation, induction of p73 by cisplatin is no longer observed and cisplatin cytotoxicity is reduced in c-Abl deficient cells as compared to the wild type [155, 161]. In c-Abl proficient cells, kinase activity and nuclear localisation of c-Abl are promoted by cisplatin which leads to phosphorylation and stabilisation of p73 [161]. In this cisplatin-dependent pathway, p73 is a downstream effector of c-Abl. However, p73 activation by cisplatin is not exclusively dependent on c-Abl [162]; it was recently found that cisplatin can stabilise E2F1, a member of the E2F family

of transcription factors, in a c-Abl independent manner [163] and E2F1 is well known as an activator of p73 transcription [164]. It has also been reported that YAP (Yes-associated protein) can bind to p73 to enhance its transcriptional activity. This YAP protein can be phosphorylated by Akt kinase, an important mediator participating in cell survival, leading to suppression of its ability to promote p73 activity [165].

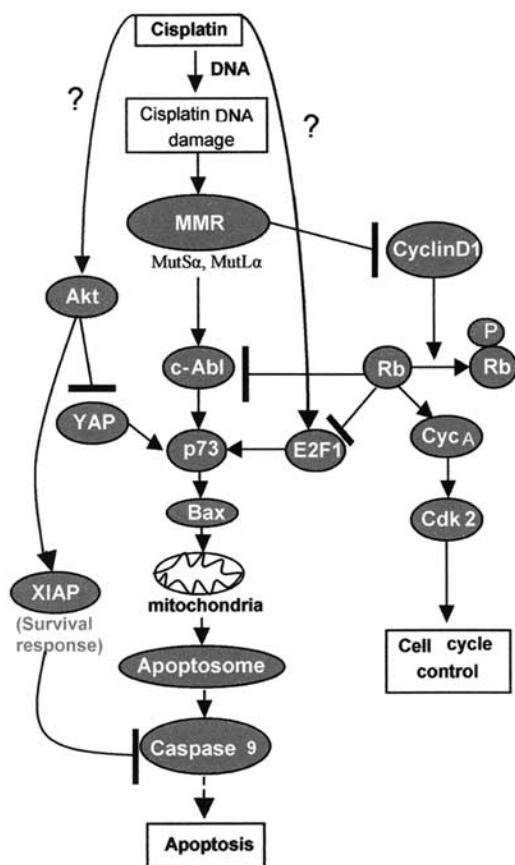


Fig. (6). Mismatch repair-dependent apoptosis and cell-cycle signalling pathways initiated by the DNA damaging drug cisplatin. The human MMR proteins MutS and MutL could sense cisplatin DNA damage and then trigger a signal by yet unknown mechanisms to downstream effectors to activate p73-dependent apoptosis. Translocation of p73 from the cytoplasm to the nucleus is not indicated on this scheme as for c-Abl. See text for details.

MMR can also play a role in cisplatin cytotoxicity through control of cell cycle checkpoints. Indeed, MMR participates to G1 and S phase cell cycle inhibitions through attenuation of cyclin D1 and CDK2 activity and activation of the retinoblastoma tumor suppressor Rb [166]. The observation that activation of Rb by cisplatin depends on MMR suggests a possible link with the c-Abl dependent pathway as described in Fig. (6). Indeed it was shown previously that Rb can block c-Abl activity through protein-protein interactions [167, 168]. All these observations suggest that MMR participates in cisplatin cytotoxicity by controlling both apoptosis and cell cycle.

The downstream events of the cisplatin-induced p73 pathway have not been clearly defined yet. However, it has

been shown that p73 mediates Bax induction after cisplatin treatment probably by transcription activation [165] and that cisplatin induces Bax and Bak expression and mitochondrial depolarisation [169]. The most likely downstream event is that cytochrome c, a central component in turning apoptosis on/off, is released in the mitochondrial membrane leading to the formation of the apoptosome that activates caspase 9 resulting in the cleavage of downstream effector caspases and finally leading to apoptosis (for reviews see [170, 171]). In agreement with this cascade of events, caspase 9 has been implicated in cisplatin induced-apoptosis [172].

On the contrary to the execution phase which has been defined at least in part, it is yet unclear how apoptotic activation is triggered, i.e. the origin of the apoptotic stimulus after cisplatin treatment. A current idea is that MMR plays a role in this initiation phase. Two lines of evidence argue for that model: first MMR is an upstream component of the apoptotic pathway as discussed above and secondly over-expression of MSH2 and MLH1 was shown to induce apoptosis [173].

Several models have been proposed to explain the link between MMR and the DNA-damage response (reviewed in [174-177]). Two models, essentially based on the biochemical functions of the MMR system, seems to be particularly attractive: the model of futile cycles and the model of direct signalling of apoptosis. In the first model, after mutagenic replication bypass of a DNA lesion, the resulting compound lesion, namely a lesion in one strand and a mismatch in the other, triggers mismatch repair; because the repair activity is restricted to the newly synthesized strand, the lesion persists in the opposite template strand. The persistence of the lesion promotes successive cycles of excision/resynthesis leading to accumulation of secondary lesions (double strand-breaks and gaps) which in turn induces cell death [175, 177, 178]. It has been shown that the repair activity of MMR is triggered by DNA substrates containing a O(6)-methylguanine (opposite a cytosine or a thymine) a modification generated by anti-cancer methylating agents [179]; this result suggests that the mechanism of MMR-dependent cytotoxicity of methylating agents could be explained by the model of futile cycles. For cisplatin, it is not yet known to our knowledge whether cisplatin DNA adducts can trigger MMR activity which is a necessary biochemical event in the futile cycle model.

In the second model, recognition of DNA damage by MMR proteins initiates a signal transduction cascade leading to activation of downstream effectors by yet unknown mechanisms. This model is based on the concept that MMR proteins could function as molecular switches [180, 181] and that modulation of the MMR activity by DNA damaging agent such as cisplatin could initiate a signal transduction to downstream effector(s).

In both models, a first necessary step is recognition of cisplatin-damage DNA. Indeed several studies using human MutS and the prokaryotic MutS protein have shown that the major cisplatin d(GpG) intrastrand cross-link is recognized although with a weak affinity [182, 183]. Two studies with hMutS and MutS have shown that cisplatin compound lesions resulting from the misincorporation of a base during translesion synthesis are better substrates for MMR binding activity [183, 184]. Cisplatin compound lesions formed with

the major cisplatin intrastrand cross-links could be critical lesions for the initiation of a signal in a MMR-dependent apoptotic response. It is clear that additional biochemical studies are warranted to ascertain both the nature of the cisplatin lesions and the molecular mechanism implicated in the apoptotic signal triggered by MMR proteins.

4.2-b. Cisplatin Apoptosis and the Mitogen-Activated Protein Kinases Pathways

The mitogen-activated protein kinases (MAPKs) have been classified into three major groups: ERKs (extracellular signal-regulated kinases), including ERK1 and ERK2; stress activated protein kinases, also called JNK (c-Jun N-terminal protein kinases), including JNK1 and JNK2; and p38 kinase [185-187]. The involvement of the MAPKs pathway in the modulation of cisplatin cytotoxicity has been recently established *in vitro* [188]. In this study, an activation of JNK and p38 was reported in a human ovarian carcinoma cell line following cisplatin treatment. Phosphorylation of JNK/p38 would result in phosphorylation of the transcription factors c-Jun and ATF2 (activating transcription factor-2) which in turn can bind to AP-1 binding sites in the promoters of multiple target genes (AP-1 being a transcription factor). This cascade of events would finally trigger apoptosis through pro-apoptotic FasL gene expression, an immediate downstream target of JNK, through the induction of caspase activity [188] (Fig. (7)). A similar result, involving cisplatin-induced apoptosis through activation of JNK and Fas, had been reported previously [189, 190]. Interestingly, in this work, an upstream component of this pathway was identified as MEKK1 a specific upstream MAP kinase kinase. In addition to activation of JNK, cisplatin can also activate, in a MEKK1-dependent manner, the protein NF B, a well-known activator of gene transcription implicated in protecting cells from apoptosis [190]. In this cascade of events, c-Jun could be a negative regulator of NF B since lack of c-Jun expression leads to activation of NF B which in turn

upregulates expression of MIAP (murine inhibitor of apoptotic protein) [187].

The activation of JNK seems to be modulated by the geometry of the platinum derivative since cisplatin induces a slow and persistent response and transplatin a rapid and transient one [191]. Sustained activation is generally associated with apoptosis whereas transient activation primarily mediates pro-survival events [192]. The susceptibility of tumour cells to cisplatin-induced apoptosis appears to depend on the balance between pro-apoptotic and anti-apoptotic signals. Thus one characteristic of cisplatin is its capability to induce cell death by modulating simultaneously different signal transduction pathways.

Another important mediator of cisplatin-induced activation of JNK/p38 is the apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) [193, 194] which belongs to the family of mitogen-activated protein kinase kinase kinase [185]. As indicated in Fig. (7), the activation of ASK1 by cisplatin is negatively regulated by a major component of the cell survival pathway called PI3K/Akt (phosphatidylinositol 3-kinase/Akt). In particular, AKT2, a serine/threonine kinase of the Akt (or PKB) family, inhibits cisplatin-induced JNK/p38 and Bax activations through phosphorylation of ASK1, hence contributing to cisplatin resistance [194]. A recent study also reported a negative regulation of ASK1 activity in cisplatin treated human pancreatic cells through an increased interaction with thioredoxin [195], a small antioxidant protein previously described as an ASK1 inhibitor [196] (not shown). Independently of the MAPK pathway, Akt is also capable of stabilizing the phosphorylated form of an anti-apoptotic protein called XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) in response to cisplatin [197]. In addition to AKT regulation, it is also of interest to note that JNK activation by cisplatin is controlled by the MAPK phosphatases CL100/MKP-1 [198] showing once more the complexity of the regulation of the JNK/p38 apoptotic pathway.

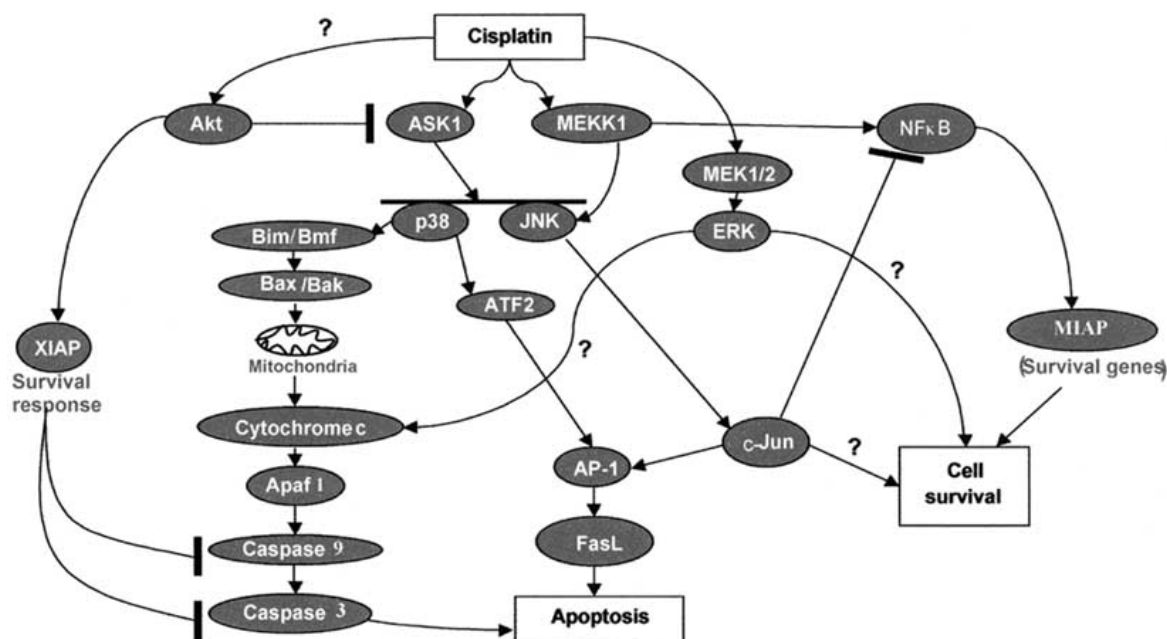


Fig. (7). The MAPKs signalling pathway induced by cisplatin showing the complex cellular control of apoptosis and survival pathways.

A recent study has also shown that activation of the p38 MAPK pathway can trigger specific phosphorylation and acetylation of histones suggesting a role of chromatin organization in cisplatin cytotoxicity probably through regulation of DNA transaction such as activation of transcription or DNA repair [129]. Finally, the last members of MAPK family, the ERKs proteins, were shown to be also involved in cisplatin-induced apoptosis. In HeLa cells and testicular germ cell tumours, cisplatin can activate the MEK/ERK signalling pathway and this activation, through downstream events such as caspase activation, finally leads to apoptosis [199]. Thus several results clearly indicate that the MAPK plays a role in cisplatin induced-apoptosis and all the data presented above argue for an involvement of these kinases in cisplatin cytotoxicity.

However several reports seem to take the opposite view, showing that, on the contrary, MAPK could also be implicated in a protective role against cisplatin cytotoxicity. In two different ovarian carcinoma cell lines, an inhibitor of the ERK pathway was found to potentiate the cytotoxic effect of cisplatin, indicating a protective role of ERK in cisplatin-mediated cell death [200]. In prostate and breast carcinoma cell lines and in two glioblastoma cell lines, the JNK/c-Jun activation by cisplatin was correlated with increased cisplatin DNA repair activity leading to increased survival following cisplatin treatment [201]. In both A2780 human ovarian and Caov-3 cell lines, cisplatin treatment was shown to activate ERK and JNK cascades leading to an increase of cell survival as confirmed from specific inhibition of either of both cascades [202]. In T98G glioblastoma cells, phosphorylation of c-Jun following cisplatin treatment was proposed to play a role in protecting cells from apoptosis [203]. In human breast carcinoma BT474, JNK but not p38 kinase nor ERK kinase was held responsible for ATF2 phosphorylation and transcriptional activation which in turn would promote cisplatin resistance [204].

Thus, the role of MAPKs pathway in the sensitivity of cancer cells treated by cisplatin is still not clearly defined as both induction of apoptosis and stimulation of resistance mechanisms have been reported. Although the reasons of such discrepancies are yet unclear, it is generally thought that it could arise from differences in cell lines and/or in the extent of cisplatin DNA damage [71, 199]. Nevertheless, these results converge with each others in indicating that MAPKs pathway plays a role in modulating cells sensitivity to cisplatin.

4.2-c. Cellular Responses to Cisplatin and the Tumor Suppressor p53

The tumor suppressor p53 protein mediates the cellular response to DNA damage largely through the transcriptional activation of numerous p53 responses genes that are involved with cell cycle control, DNA repair, and apoptosis (reviewed in [205]). Thus p53 activation induces a complex cellular response since activation of cell cycle checkpoint genes by p53 can cause cell cycle arrest associated with DNA repair and in that instance can be said to lead to enhanced cell survival. In contrast, p53 can also mediate apoptosis by both transcription-dependent and transcription-independent pathways (for a review see [206]). p53 contribution in mediating cisplatin sensitivity is not clearly

demonstrated yet, possibly because of the variety of cellular responses triggered by its activation (reviewed in [71, 207, 208]). In some studies, activation of p53 has been shown to provide protection against cisplatin [209]. In contrast increased resistance to cisplatin when disrupting normal wild type p53 function has also been observed [210]. p53 has been implicated in the apoptotic response to cisplatin [211] but recent data strongly suggest that cisplatin-induced apoptosis could rather be mediated by the p53-related protein p73 [155, 158], an idea in agreement with previous observations of a possible p53-independent cell response to cisplatin [212]. Nevertheless, several studies have shown that cisplatin induces activation of p53 through phosphorylation by ERK1/2 and HIPK2 [213, 214]. This seems to argue for a link between cisplatin and p53 although the role of this tumour suppressor in cisplatin sensitivity remains to be established. Another possible upstream component of the cisplatin-induced p53 activation pathway are the well known DNA damage checkpoint kinase proteins Ataxia telangiectasia-mutated (ATM) and ATM- and Rad3-related proteins (ATR) (reviewed in [215]). It has been suggested that ATR could respond to unreplicated form of platinated DNA arising from replication block leading to activation of kinase cascade through Chk1 and triggering a G2/M cell cycle arrest [216]. ATM/ATR have also been implicated in cell cycle control of cisplatin treated cells through regulation of the Rb/E2F cell cycle pathway [217].

As a transcription activator, p53 possesses a DNA binding domain which is essential for its activity. Several studies have proposed that the connection between p53 and cisplatin could be dependent on direct or indirect DNA interactions. For instance, it was shown that p53 can recognize more efficiently DNA containing the major cisplatin 1, 2-intrastrand cross-link but that platination of a p53-consensus DNA sequence lessened the interaction [218]. Indirect effect of p53 on the interaction of DNA binding proteins have also been described; the HMGB1 protein which exhibits high affinity and specificity for platinated DNA was shown to interact more efficiently with platinated DNA in the presence of p53 suggesting a molecular link between p53 and cisplatin activity through new mechanisms yet unknown [219]. Another study also reported a role of p53 in increasing the binding of the mitochondrial factor A to cisplatin-modified DNA, a protein implicated in apoptosis and bearing high mobility group-DNA binding boxes; this was supported by *in vitro* experiments showing binding of p53 to the mitochondrial protein [220]. Again this could be another clue for future investigations on the links between cisplatin, p53 and apoptosis.

CONCLUDING REMARKS

To date, platinum-containing drugs play a major role in the chemotherapeutic treatment of a variety of human cancers such as those of the testis and ovary (for cisplatin and carboplatin) and more recently of colorectal malignancies (with the introduction of oxaliplatin). The major problem encountered in cancer chemotherapy is still chemoresistance of cancer cells. There is no doubt that the knowledge gathered of the mechanisms underlying cellular resistance has been fruitful in the design of potent new platinum drugs. Indeed, as indicated in this review, platinum complexes have

been introduced into clinic with increased lipophilicity to combat membrane transport mediated resistance (e. g. oxaliplatin), with decreased affinity for thiol-containing species like glutathione (e. g. AMD0473) and with markedly different DNA binding properties (e. g. BBR3464). Several other promising compounds, not presented in this review because of space limitations are under study; for instance, transplatin analogs containing various inert ligands that exhibit very interesting cytotoxicity against cell lines resistant to cisplatin (reviewed in [70, 221]) and possessing new DNA interaction properties [222].

Our knowledge on cellular events downstream cisplatin damage has grown considerably in the last decade with the exciting possibility of designing new strategies to fight against chemoresistance. For instance, the antisense RNA approach has been used to perturb NER in cisplatin-resistant ovarian cancer cell lines rendering them more sensitive [223]. Pro-apoptotic gene transfer to promote death or increase killing represents also a promising strategy for cancer chemotherapy. In a recent work, an adenoviral expression system with the pro-apoptotic gene Bid was used to induce apoptosis in malignant cells. This gene therapy was shown to increase chemosensitivity to cisplatin therefore showing promise for a combined treatment [224]. Interestingly, the serine/arginine protein kinase SPRK1 was recently implicated in cisplatin sensitivity *in vitro* and its expression was shown to be correlated with good prognosis in cancer chemotherapy of nonseminomatous germ cell tumors [225]. These data suggest that SRPK1 might be used as a new promising prognostic indicator for the chemoresponsiveness of testicular cancer. Sustained efforts in defining the fundamental molecular mechanisms of the cisplatin-dependent apoptotic death pathways could help to design new platinum compounds capable of inducing cancer cells to commit suicide more efficiently. Indeed, the cell capacity to suicide itself for cancer treatment is becoming a potent strategy. In this context, the knowledge of cellular death pathways triggered by platinum compounds such as those recently introduced into clinical trials should be fruitful to provide in the future a therapeutic improvement in human cancer treatment.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was partially supported by the Ligue contre le Cancer, the Association pour la Recherche sur le Cancer and the European Cooperation in the Field of Scientific and Technical Research Network (COST D20/003/00 Action: "Biochemistry, Structural and Cellular Biology of non-Classical Antitumor Platinum Compounds"). The authors apologize to colleagues for having failed to cite their work due to space constraints.

ABBREVIATIONS

Cisplatin	=	Cis-diamminedichloroplatinum(II)
GSH	=	Glutathione
HMG	=	High mobility group
MAPK	=	Mitogen-activated protein kinase
MMR	=	Mismatch repair
NER	=	Nucleotide excision repair

REFERENCES

- [1] Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Krigas, T. *Nature* **1965**, *205*, 698.
- [2] Rosenberg, B. Van Camp, L.; Trosko, J.E.; Mansour, H.V. *Nature* **1969**, *222*, 385.
- [3] Kociba, R. J.; Sleight, S.D.; Rosenberg, B. *Cancer Chemother. Rep.* **1970**, *54*, 325.
- [4] Rosenberg, B.; Van Camp, L. *Cancer Res.* **1970**, *30*, 1799.
- [5] Einhorn, E. H. *Clin. Cancer Res.* **1997**, *3*, 2630.
- [6] Cvitkovic, E.; Misset, J. L. *N. Engl. J. Med.* **1996**, *334*, 1269.
- [7] Highley, M.S.; Calvert, A.H. In *Platinum-Based Drugs in Cancer Chemotherapy*; Kelland, L. R.; Farrell, N. P.; Eds; Humana Press: Totowa, **2000**, pp 171-194.
- [8] Raymond, E.; Faivre, S.; Chaney, S.; Woynarowski, J.; Cvitkovic, E. *Mol. Cancer Ther.* **2002**, *1*, 227.
- [9] Perez, R. P. *Eur. J. Cancer* **1998**, *34*, 1535.
- [10] Johnstone, R. W.; Ruefli, A. A.; Lowe, S. W. *Cell* **2002**, *108*, 153.
- [11] Eastman, A. *Pharmacol. Ther.* **1987**, *34*, 155.
- [12] Reedijk, J. *Inorg. Chim. Acta* **1992**, *198-200*, 873.
- [13] Comess, K. M.; Lippard, S. J. In *Molecular Aspects of Anticancer-Drug-DNA Interactions*; S. Neidle, M. Waring Eds; Macmillan: London, **1993**; pp 134-168.
- [14] Malinge, J. M.; Leng, M. In *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a leading anticancer drug*, Lippert B. Ed; Wiley-VCH: Zurich, **1999**; pp.159- 180.
- [15] Payet, D.; Gaucheron, F.; Sip, M.; Leng, M. *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 5846.
- [16] Yang, D.; van Boom, S. S.; Reedijk, J.; van Boom, J. H.; Wang, A. H. *Biochemistry* **1995**, *34*, 12912.
- [17] Perez, C.; Leng, M.; Malinge, J. M. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 896.
- [18] Henkels, K. M.; Turchi, J. J. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 4488.
- [19] Eastman, A. In *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a leading anticancer drug*; Lippert B. Ed.; Wiley-VCH:Zurich, **1999**; pp. 111-134.
- [20] Malinge, J. M.; Giraud-Panis, M. J.; Leng, M. *J. Inorg. Biochem.* **1999**, *77*, 23.
- [21] Jamieson, E. R.; Lippard, S. J. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2467.
- [22] Takahara, P. M.; Rosenzweig, A. C.; Frederick, C. A.; Lippard, S. J. *Nature* **1995**, *377*, 649.
- [23] Elizondo-Riojas, M. A.; Kozelka, J. J. *Mol. Biol.* **2001**, *314*, 1227.
- [24] Coste, F.; Malinge, J. M.; Serre, L.; Shepard, W.; Roth, M.; Leng, M.; Zelwer, C. *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 1837.
- [25] Fuentes, M. A.; Castilla, J.; Alonso, C.; Perez, J. M. *Curr. Med. Chem. Anti- Canc. Agents* **2002**, *2*, 539.
- [26] Kartalou, M.; Essigmann, J. M. *Mutat. Res.* **2001**, *478*, 1.
- [27] Zlatanova, J.; Yaneva, J.; Leuba, S. H. *FASEB J.* **1998**, *12*, 791.
- [28] Cohen, S. M.; Lippard, S. J. *Prog Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **2001**, *67*, 93.
- [29] Boulikas, T. *Anticancer Res.* **1996**, *16*, 225.
- [30] Farrell, N. In *Platinum based drugs in Cancer therapy*, Kelland, L. R., Farrell, N.P. Eds; Humana Press, Totowa, **2000**; pp. 321-338.
- [31] Brabec, V.; Kasparkova, J.; Vrana, O.; Novakova, O.; Cox, J. W.; Qu, Y.; Farrell, N. *Biochemistry* **1999**, *38*, 6781.
- [32] Zehnulova, J.; Kasparkova, J.; Farrell, N.; Brabec, V. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 22191.
- [33] Manzotti, C.; Pratesi, G.; Menta, E.; Di Domenico, R.; Cavalletti, E.; Fiebig, H. H.; Kelland, L. R.; Farrell, N.; Polizzi, D.; Supino, R.; Pezzoni, G.; Zunino, F. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 2626.
- [34] Parker, R. J.; Poirier, M. C.; Bostick-Bruton, F.; Vionnet, J.; Bohr, V. A.; Reed, E. *Basic Life Sci.* **1990**, *53*, 251.
- [35] Parker, R. J.; Vionnet, J. A.; Bostick-Bruton, F.; Reed, E. *Cancer Res.* **1993**, *53*, 242.
- [36] Reed, E.; Yuspa, S. H.; Zwelling, L. A.; Ozols, R. F.; Poirier, M. C. *J. Clin. Invest.* **1986**, *77*, 545.
- [37] Fisch, M. J.; Howard, K. L.; Einhorn, L. H.; Sledge, G. W. *Clin. Cancer Res.* **1996**, *2*, 1063.
- [38] Smogorzewska, A.; De Lange, T. *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 177.
- [39] Rhodes, D.; Fairall, L.; Simonsson, T.; Court, R.; Chapman, L. *EMBO Rep.* **2002**, *3*, 1139.
- [40] Blackburn, E. H. *Cell* **2001**, *106*, 661.
- [41] Kim Sh, S. H.; Kaminker, P.; Campisi, J. *Oncogene* **2002**, *21*, 503.
- [42] Lundblad, V. *Oncogene* **2002**, *21*, 522.
- [43] Masutomi, K.; Hahn, W. C. *Cancer Lett.* **2003**, *194*, 163.
- [44] Harrington, L. *Cancer Lett.* **2003**, *194*, 139.

- [45] Saretzki, G. *Cancer Lett.* **2003**, *194*, 209.
- [46] Ishibashi, T.; Lippard, S. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 4219.
- [47] Ishii, K.; Yang, W. L.; Cvijic, M. E.; Kikuchi, Y.; Nagata, I.; Chin, K. V. *Exp. Cell Res.* **2000**, *255*, 95.
- [48] Jin, G.; Ikushima, T. *Cytogenet Genome Res.* **2004**, *104*, 310.
- [49] Burstyn, J. N.; Heiger-Bernays, W. J.; Cohen, S. M.; Lippard, S. J. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 4237.
- [50] van Steensel, B.; Smogorzewska, A.; de Lange, T. *Cell* **1998**, *92*, 401.
- [51] Neidle, S.; Parkinson, G. N. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 275.
- [52] Redon, S.; Bombard, S.; Elizondo-Riojas, M. A.; Chottard, J. C. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 1605.
- [53] Rezler, E. M.; Bearss, D. J.; Hurley, L. H. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2002**, *2*, 415.
- [54] Zhang, R. G.; Zhang, R. P.; Wang, X. W.; Xie, H. *Cell Res.* **2002**, *12*, 55.
- [55] Mese, H.; Ueyama, Y.; Suzuki, A.; Nakayama, S.; Sasaki, A.; Hamakawa, H.; Matsumura, T. *Chemotherapy* **2001**, *47*, 136.
- [56] Burger, A. M.; Double, J. A.; Newell, D. R. *Eur. J. Cancer* **1997**, *33*, 638.
- [57] Akiyama, M.; Horiguchi-Yamada, J.; Saito, S.; Hoshi, Y.; Yamada, O.; Mizoguchi, H.; Yamada, H. *Eur. J. Cancer* **1999**, *35*, 309.
- [58] Cressey, T. R.; Tilby, M. J.; Newell, D. R. *Eur. J. Cancer* **2002**, *38*, 586.
- [59] Lee, K. H.; Rudolph, K. L.; Ju, Y. J.; Greenberg, R. A.; Cannizzaro, L.; Chin, L.; Weiler, S. R.; DePinho, R. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 3381.
- [60] Biroccio, A.; Gabellini, C.; Amodei, S.; Benassi, B.; Del Bufalo, D.; Elli, R.; Antonelli, A.; D'Incalci, M.; Zupi, G. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 632.
- [61] Kondo, Y.; Kondo, S.; Tanaka, Y.; Haqqi, T.; Barna, B. P.; Cowell, J. K. *Oncogene* **1998**, *16*, 2243.
- [62] Chen, Z.; Koeneman, K. S.; Corey, D. R. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 5917.
- [63] Brabec, V.; Leng, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 5345.
- [64] Dalbies, R.; Boudvillain, M.; Leng, M. *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 949.
- [65] Escaffre, M.; Chottard, J. C.; Bombard, S. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 5222.
- [66] Boudvillain, M.; Guerin, M.; Dalbies, R.; Saison-Behmoaras, T.; Leng, M. *Biochemistry* **1997**, *36*, 2925.
- [67] Perrier, S.; Seela, F.; Schwartz, A.; Leng, M.; Chottard, J. C. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2003**, 1641.
- [68] Desoize, B.; Madoulet, C. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2002**, *42*, 317.
- [69] Boulikas, T.; Vougiouka, M. *Oncol. Rep.* **2003**, *10*, 1663.
- [70] Fuertes, M. A.; Alonso, C.; Perez, J. M. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 645.
- [71] Siddik, Z. H. *Oncogene* **2003**, *22*, 7265.
- [72] Brabec, V. *Prog Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.* **2002**, *71*, 1.
- [73] Kartalou, M.; Essigmann, J. M. *Mutat. Res.* **2001**, *478*, 23.
- [74] Reedijk, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 3611.
- [75] Barnham, K. J.; Djuran, M. I.; Murdoch, P. d. S.; Sadler, P. J. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, *6*, 721.
- [76] Barnham, K. J.; Djuran, M. I.; Murdoch, P. d. S.; Ranford, J. D.; Sadler, P. J. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, *22*, 3721.
- [77] Teuben, J. M.; Reedijk, J. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, *5*, 463.
- [78] Peleg-Shulman, T.; Gibson, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3171.
- [79] Safirstein, R.; Winston, J.; Moel, D.; Dikman, S.; Guttenplan, J. *Int. J. Androl.* **1987**, *10*, 325.
- [80] Miura, K.; Goldstein, R. S.; Pasino, D. A.; Hook, J. B. *Toxicology* **1987**, *44*, 147.
- [81] Reedijk, J.; Teuben, M. In *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a leading anticancer drug*; Lippert, B. Ed.; Wiley-VCH: Zurich, **1999**; pp. 339-362.
- [82] Nowak, G. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 43377.
- [83] Reedijk, J. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2499.
- [84] Jakupec, M. A.; Galanski, M.; Keppler, B. K. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **2003**, *146*, 1.
- [85] Knox, R. J.; Friedlos, F.; Lydall, D. A.; Roberts, J. J. *Cancer Res.* **1986**, *46*, 1972.
- [86] Gately, D. P.; Howell, S. B. *Br. J. Cancer* **1993**, *67*, 1171.
- [87] Komatsu, M.; Sumizawa, T.; Mutoh, M.; Chen, Z. S.; Terada, K.; Furukawa, T.; Yang, X. L.; Gao, H.; Miura, N.; Sugiyama, T.; Akiyama, S. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 1312.
- [88] Samimi, G.; Varki, N. M.; Wilczynski, S.; Safaei, R.; Alberts, D. S.; Howell, S. B. *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 5853.
- [89] Nakayama, K.; Kanzaki, A.; Terada, K.; Mutoh, M.; Ogawa, K.; Sugiyama, T.; Takenoshita, S.; Itoh, K.; Yaegashi, N.; Miyazaki, K.; Neamati, N.; Takebayashi, Y. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 2804.
- [90] Samimi, G.; Katano, K.; Holzer, A. K.; Safaei, R.; Howell, S. B. *Mol. Pharmacol.* **2004**, *66*, 25.
- [91] Ishida, S.; Lee, J.; Thiele, D. J.; Herskowitz, I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *9*, 14298.
- [92] Chen, Y.; Guo, Z.; Sadler, P. J. In *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a leading anticancer drug*; Lippert B. Ed.; Wiley-VCH: Zurich, **1999**, 292-318.
- [93] Kelland, L. R. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **1993**, *15*, 191.
- [94] Britten, R. A.; Warenius, H. M.; White, R.; Peacock, J. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1992**, *22*, 769.
- [95] Ishikawa, T.; Ali-Osman, F. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 20116.
- [96] Nishimura, T.; Newkirk, K.; Sessions, R. B.; Andrews, P. A.; Trock, B. J.; Rasmussen, A. A.; Montgomery, E. A.; Bischoff, E. K.; Cullen, K. J. *Clin. Cancer Res.* **1996**, *2*, 1859.
- [97] Arner, E. S.; Nakamura, H.; Sasada, T.; Yodoi, J.; Holmgren, A.; Spyrou, G. *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *31*, 1170.
- [98] Yamada, M.; Tomida, A.; Yoshikawa, H.; Taketani, Y.; Tsuruo, T. *Clin. Cancer Res.* **1996**, *2*, 427.
- [99] Schroder, C. P.; Godwin, A. K.; O'Dwyer, P. J.; Tew, K. D.; Hamilton, T. C.; Ozols, R. F. *Cancer Invest.* **1996**, *14*, 158.
- [100] Rudin, C. M.; Yang, Z.; Schumaker, L. M.; VanderWeele, D. J.; Newkirk, K.; Egorin, M. J.; Zuhowski, E. G.; Cullen, K. J. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 312.
- [101] Sen, C. K. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *55*, 1747.
- [102] Kelley, S. L.; Basu, A.; Teicher, B. A.; Hacker, M. P.; Hamer, D. H.; Lazo, J. S. *Science* **1988**, *241*, 1813.
- [103] Chen, Y.; Guo, Z.; Parsons, S.; Sadler, P. *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 672.
- [104] Holford, J.; Sharp, S. Y.; Murrer, B. A.; Abrams, M.; Kelland, L. R. *Br. J. Cancer* **1998**, *77*, 366.
- [105] Raynaud, F. I.; Boxall, F. E.; Goddard, P. M.; Valenti, M.; Jones, M.; Murrer, B. A.; Abrams, M.; Kelland, L. R. *Clin. Cancer Res.* **1997**, *3*, 2063.
- [106] Lindahl, T.; Karran, P.; Wood, R. D. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1997**, *7*, 158.
- [107] Petit, C.; Sancar, A. *Biochimie* **1999**, *81*, 15.
- [108] Hoeijmakers, J. H. *Nature* **2001**, *411*, 366.
- [109] Plooy, A. C.; van Dijk, M.; Berends, F.; Lohman, P. H. *Cancer Res.* **1985**, *45*, 4178.
- [110] Dijt, F. J.; Fichtinger-Schepman, A. M.; Berends, F.; Reedijk, J. *Cancer Res.* **1988**, *48*, 6058.
- [111] Dabholkar, M.; Vionnet, J.; Bostick-Bruton, F.; Yu, J. J.; Reed, E. *J. Clin. Invest.* **1994**, *94*, 703.
- [112] Metzger, R.; Leichman, C. G.; Danenberg, K. D.; Danenberg, P. V.; Lenz, H. J.; Hayashi, K.; Groshen, S.; Salonga, D.; Cohen, H.; Laine, L.; Crookes, P.; Silberman, H.; Baranda, J.; Konda, B.; Leichman, L. *J. Clin. Oncol.* **1998**, *16*, 309.
- [113] Lord, R. V.; Brabender, J.; Gandara, D.; Alberola, V.; Camps, C.; Domine, M.; Cardenal, F.; Sanchez, J. M.; Gumerlock, P. H.; Taron, M.; Sanchez, J. J.; Danenberg, K. D.; Danenberg, P. V.; Rosell, R. *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8*, 2286.
- [114] States, J. C.; Reed, E. *Cancer Lett.* **1996**, *108*, 233.
- [115] Koberle, B.; Masters, J. R.; Hartley, J. A.; Wood, R. D. *Curr. Biol.* **1999**, *9*, 273.
- [116] Welsh, C.; Day, R.; McGurk, C.; Masters, J. R.; Wood, R. D.; Koberle, B. *Int. J. Cancer* **2004**, *110*, 352.
- [117] Jung, Y.; Lippard, S. J. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 52084.
- [118] May, A.; Nairn, R. S.; Okumoto, D. S.; Wassermann, K.; Stevens, T.; Jones, J. C.; Bohr, V. A. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 1650.
- [119] Furuta, T.; Ueda, T.; Aune, G.; Sarasin, A.; Kraemer, K. H.; Pommier, Y. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 4899.
- [120] Calsou, P.; Frit, P.; Salles, B. *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 6363.
- [121] Moggs, J. G.; Szymkowski, D. E.; Yamada, M.; Karran, P.; Wood, R. D. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 480.
- [122] Kasparkova, J.; Novakova, O.; Marini, V.; Najajreh, Y.; Gibson, D.; Perez, J. M.; Brabec, V. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 47516.

- [123] Zamble, D. B.; Mu, D.; Reardon, J. T.; Sancar, A.; Lippard, S. J. *Biochemistry* **1996**, *35*, 10004.
- [124] Huang, J. C.; Zamble, D. B.; Reardon, J. T.; Lippard, S. J.; Sancar, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 10394.
- [125] He, Q.; Liang, C. H.; Lippard, S. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 5768.
- [126] Wei, M.; Burenkova, O.; Lippard, S. J. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 1769.
- [127] Wang, D.; Hara, R.; Singh, G.; Sancar, A.; Lippard, S. J. *Biochemistry* **2003**, *42*, 6747.
- [128] McLaughlin, F.; Finn, P.; La Thangue, N. B. *Drug Discov. Today* **2003**, *8*, 793.
- [129] Wang, D.; Lippard, S. J. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 20622.
- [130] Green, D. R.; Evan, G. I. *Cancer Cell* **2002**, *1*, 19.
- [131] Modrich, P.; Lahue, R. *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 101.
- [132] Fishel, R. *Nat. Med.* **1999**, *5*, 1239.
- [133] Hsieh, P. *Mutat. Res.* **2001**, *486*, 71.
- [134] Jiricny, J. *EMBO J.* **1998**, *17*, 6427.
- [135] Papouli, E.; Cejka, P.; Jiricny, J. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 3391.
- [136] Fedier, A.; Fink, D. *Int. J. Oncol.* **2004**, *24*, 1039.
- [137] Stojic, L.; Brun, R.; Jiricny, J. *DNA Repair (Amst.)* **2004**, *3*, 1091.
- [138] Bignami, M.; Casorelli, I.; Karran, P. *Eur. J. Cancer* **2003**, *39*, 2142.
- [139] Fram, R. J.; Cusick, P. S.; Wilson, J. M.; Marinus, M. G. *Mol. Pharmacol.* **1985**, *28*, 51.
- [140] Karran, P.; Marinus, M. G. *Nature* **1982**, *296*, 868.
- [141] Kat, A.; Thilly, W. G.; Fang, W. H.; Longley, M. J.; Li, G. M.; Modrich, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 6424.
- [142] Koi, M.; Umar, A.; Chauhan, D. P.; Cherian, S. P.; Carethers, J. M.; Kunkel, T. A.; Boland, C. R. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 4308.
- [143] Fink, D.; Howell, S. *Int. J. Oncol.* **1997**.
- [144] Aebi, S.; Fink, D.; Gordon, R.; Kim, H. K.; Zheng, H.; Fink, J. L.; Howell, S. B. *Clin. Cancer Res.* **1997**, *3*, 1763.
- [145] Aebi, S.; Kurdi-Haidar, B.; Gordon, R.; Cenni, B.; Zheng, H.; Fink, D.; Christen, R. D.; Boland, C. R.; Koi, M.; Fishel, R.; Howell, S. B. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 3087.
- [146] Fink, D.; Nebel, S.; Aebi, S.; Zheng, H.; Cenni, B.; Nehme, A.; Christen, R. D.; Howell, S. B. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 4881.
- [147] Drummond, J. T.; Anthony, A.; Brown, R.; Modrich, P. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 19645.
- [148] Fink, D.; Zheng, H.; Nebel, S.; Norris, P. S.; Aebi, S.; Lin, T. P.; Nehme, A.; Christen, R. D.; Haas, M.; MacLeod, C. L.; Howell, S. B. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 1841.
- [149] Anthony, D. A.; McIlwrath, A. J.; Gallagher, W. M.; Edlin, A. R.; Brown, R. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 1374.
- [150] Mayer, F.; Gillis, A. J.; Dinjens, W.; Oosterhuis, J. W.; Bokemeyer, C.; Looijenga, L. H. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 2758.
- [151] Claij, N.; te Riele, H. *Exp. Cell Res.* **1999**, *246*, 1.
- [152] Kishi, K.; Doki, Y.; Yano, M.; Yasuda, T.; Fujiwara, Y.; Takiguchi, S.; Kim, S.; Higuchi, I.; Monden, M. *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 4368.
- [153] Brown, R.; Hirst, G. L.; Gallagher, W. M.; McIlwrath, A. J.; Margison, G. P.; van der Zee, A. G.; Anthony, D. A. *Oncogene* **1997**, *15*, 45.
- [154] Samimi, G.; Fink, D.; Varki, N. M.; Husain, A.; Hoskins, W. J.; Alberts, D. S.; Howell, S. B. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 1415.
- [155] Gong, J. G.; Costanzo, A.; Yang, H. Q.; Melino, G.; Kaelin, W. G., Jr.; Levvero, M.; Wang, J. Y. *Nature* **1999**, *399*, 806.
- [156] Catani, M. V.; Costanzo, A.; Savini, I.; Levvero, M.; de Laurenzi, V.; Wang, J. Y.; Melino, G.; Avigliano, L. *Biochem. J.* **2002**, *364*, 441.
- [157] Shimodaira, H.; Yoshioka-Yamashita, A.; Kolodner, R. D.; Wang, J. Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 2420.
- [158] Oniscu, A.; Sphyris, N.; Morris, R. G.; Bader, S.; Harrison, D. J. *J. Clin. Pathol.* **2004**, *57*, 492.
- [159] Nehme, A.; Baskaran, R.; Aebi, S.; Fink, D.; Nebel, S.; Cenni, B.; Wang, J. Y.; Howell, S. B.; Christen, R. D. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 3253.
- [160] Yuan, L.; Yu, W. M.; Yuan, Z.; Haudenschild, C. C.; Qu, C. K. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 15208.
- [161] Tsai, K. K.; Yuan, Z. M. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 3418.
- [162] Maise, C.; Guerrieri, P.; Melino, G. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *66*, 1555.
- [163] Ianari, A.; Gallo, R.; Palma, M.; Alesse, E.; Gulino, A. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 30830.
- [164] Wang, J. Y.; Ki, S. W. *Biochem. Soc. Trans.* **2001**, *29*, 666.
- [165] Basu, S.; Totty, N. F.; Irwin, M. S.; Sudol, M.; Downward, J. *Mol. Cell* **2003**, *11*, 11.
- [166] Lan, Z.; Sever-Chroneos, Z.; Strobeck, M. W.; Park, C. H.; Baskaran, R.; Edelmann, W.; Leone, G.; Knudsen, E. S. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 8372.
- [167] Wang, J. Y. *Oncogene* **2000**, *19*, 5643.
- [168] Zhu, J.; Wang, J. Y. *Curr. Top Dev. Biol.* **2004**, *59*, 165.
- [169] Viktorsson, K.; Ekedahl, J.; Lindebro, M. C.; Lewensohn, R.; Zhivotovsky, B.; Linder, S.; Shoshan, M. C. *Exp. Cell Res.* **2003**, *289*, 256.
- [170] Kim, R.; Tanabe, K.; Uchida, Y.; Emi, M.; Inoue, H.; Toge, T. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2002**, *50*, 343.
- [171] Adams, J. M. *Genes Dev.* **2003**, *17*, 2481.
- [172] Mueller, T.; Voigt, W.; Simon, H.; Fruehauf, A.; Bulankin, A.; Grothey, A.; Schmolli, H. *J. Cancer Res.* **2003**, *63*, 513.
- [173] Zhang, H.; Richards, B.; Wilson, T.; Lloyd, M.; Cranston, A.; Thorburn, A.; Fishel, R.; Meuth, M. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 3021.
- [174] Brown, R. In *Platinum-based drugs in cancer therapy* Kelland, L.R.; Farrell, N.P. Eds.; Humana Press: Totowa, **2000**; pp 115-128.
- [175] Fink, D.; Aebi, S.; Howell, S. B. *Clin. Cancer Res.* **1998**, *4*, 1.
- [176] Fishel, R. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 7369.
- [177] Karran, P. *Carcinogenesis* **2001**, *22*, 1931.
- [178] Vaisman, A.; Varchenko, M.; Umar, A.; Kunkel, T. A.; Risinger, J. I.; Barrett, J. C.; Hamilton, T. C.; Chaney, S. G. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 3579.
- [179] Duckett, D. R.; Bronstein, S. M.; Taya, Y.; Modrich, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 12384.
- [180] Fishel, R. *Genes Dev.* **1998**, *12*, 2096.
- [181] Berardini, M.; Mazurek, A.; Fishel, R. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 27851.
- [182] Duckett, D. R.; Drummond, J. T.; Murchie, A. I.; Reardon, J. T.; Sancar, A.; Lilley, D. M.; Modrich, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 6443.
- [183] Fourrier, L.; Brooks, P.; Malinge, J. M. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 21267.
- [184] Yamada, M.; O'Regan, E.; Brown, R.; Karran, P. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 491.
- [185] Chang, L.; Karin, M. *Nature* **2001**, *410*, 37.
- [186] Yang, S. H.; Sharrocks, A. D.; Whitmarsh, A. J. *Gene* **2003**, *320*, 3.
- [187] Kumar, S.; Boehm, J.; Lee, J. C. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 717.
- [188] Mansouri, A.; Ridgway, L. D.; Korapati, A. L.; Zhang, Q.; Tian, L.; Wang, Y.; Siddik, Z. H.; Mills, G. B.; Claret, F. X. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 19245.
- [189] Sanchez-Perez, I.; Perona, R. *FEBS Lett.* **1999**, *453*, 151.
- [190] Sanchez-Perez, I.; Benitah, S. A.; Martinez-Gomariz, M.; Lacal, J. C.; Perona, R. *Mol. Biol. Cell* **2002**, *13*, 2933.
- [191] Sanchez-Perez, I.; Murguía, J. R.; Perona, R. *Oncogene* **1998**, *16*, 533.
- [192] Chen, Y. R.; Wang, X.; Templeton, D.; Davis, R. J.; Tan, T. H. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 31929.
- [193] Chen, Z.; Seimiya, H.; Naito, M.; Mashima, T.; Kizaki, A.; Dan, S.; Imaizumi, M.; Ichijo, H.; Miyazono, K.; Tsuruo, T. *Oncogene* **1999**, *18*, 173.
- [194] Yuan, Z. Q.; Feldman, R. I.; Sussman, G. E.; Coppola, D.; Nicosia, S. V.; Cheng, J. Q. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 23432.
- [195] Arnold, N. B.; Ketterer, K.; Kleeff, J.; Friess, H.; Buchler, M. W.; Korc, M. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 3599.
- [196] Saitoh, M.; Nishitoh, H.; Fujii, M.; Takeda, K.; Tobiume, K.; Sawada, Y.; Kawabata, M.; Miyazono, K.; Ichijo, H. *Embo J.* **1998**, *17*, 2596.
- [197] Dan, H. C.; Sun, M.; Kaneko, S.; Feldman, R. I.; Nicosia, S. V.; Wang, H. G.; Tsang, B. K.; Cheng, J. Q. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 5405.
- [198] Sanchez-Perez, I.; Martinez-Gomariz, M.; Williams, D.; Keyse, S. M.; Perona, R. *Oncogene* **2000**, *19*, 5142.
- [199] Wang, X.; Martindale, J. L.; Holbrook, N. J. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 39435.
- [200] Persons, D. L.; Yazlovitskaya, E. M.; Cui, W.; Pelling, J. C. *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 1007.
- [201] Potapova, O.; Haghghi, A.; Bost, F.; Liu, C.; Birrer, M. J.; Gjerset, R.; Mercola, D. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 14041.
- [202] Hayakawa, J.; Ohmichi, M.; Kurachi, H.; Ikegami, H.; Kimura, A.; Matsuoka, T.; Jikihara, H.; Mercola, D.; Murata, Y. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 31648.

- [203] Potapova, O.; Basu, S.; Mercola, D.; Holbrook, N. J. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 28546.
- [204] Hayakawa, J.; Depatie, C.; Ohmichi, M.; Mercola, D. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 20582.
- [205] Oren, M. *Cell Death Differ.* **2003**, *10*, 431.
- [206] Caelles, C.; Helmsberg, A.; Karin, M. *Nature* **1994**, *370*, 220.
- [207] Zamble, D. B.; Lippard, S. J. In *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a leading anticancer drug*; Lippert B. Ed.; Wiley-VCH: Zurich, **1999**, pp. 73-110.
- [208] Manic, S.; Gatti, L.; Carenini, N.; Fumagalli, G.; Zunino, F.; Perego, P. *Curr. Cancer Drug Targets* **2003**, *3*, 21.
- [209] Sorenson, C. M.; Barry, M. A.; Eastman, A. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 749.
- [210] Vasey, P. A.; Jones, N. A.; Jenkins, S.; Dive, C.; Brown, R. *Mol. Pharmacol.* **1996**, *50*, 1536.
- [211] Gallagher, W. M.; Cairney, M.; Schott, B.; Roninson, I. B.; Brown, R. *Oncogene* **1997**, *14*, 185.
- [212] Zamble, D. B.; Jacks, T.; Lippard, S. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 6163.
- [213] Persons, D. L.; Yazlovitskaya, E. M.; Pelling, J. C. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 35778.
- [214] Di Stefano, V.; Rinaldo, C.; Sacchi, A.; Soddu, S.; D'Orazi, G. *Exp. Cell Res.* **2004**, *293*, 311.
- [215] Goodarzi, A. A.; Block, W. D.; Lees-Miller, S. P. *Prog. Cell Cycle Res.* **2003**, *5*, 393.
- [216] Zhao, H.; Piwnica-Worms, H. *Mol. Cell Biol.* **2001**, *21*, 4129.
- [217] Lin, W. C.; Lin, F. T.; Nevins, J. R. *Genes Dev.* **2001**, *15*, 1833.
- [218] Kasparkova, J.; Pospisilova, S.; Brabec, V. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 16064.
- [219] Imamura, T.; Izumi, H.; Nagatani, G.; Ise, T.; Nomoto, M.; Iwamoto, Y.; Kohno, K. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 7534.
- [220] Yoshida, Y.; Izumi, H.; Torigoe, T.; Ishiguchi, H.; Itoh, H.; Kang, D.; Kohno, K. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 3729.
- [221] Natile, G.; Coluccia, M. *Met. Ions Biol. Syst.* **2004**, *42*, 209.
- [222] Kasparkova, J.; Marini, V.; Najajreh, Y.; Gibson, D.; Brabec, V. *Biochemistry* **2003**, *42*, 6321.
- [223] Selvakumaran, M.; Pisarcik, D. A.; Bao, R.; Yeung, A. T.; Hamilton, T. C. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 1311.
- [224] Fukazawa, T.; Walter, B.; Owen-Schaub, L. B. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 25428.
- [225] Schenk, P. W.; Stoop, H.; Bokemeyer, C.; Mayer, F.; Stoter, G.; Oosterhuis, J. W.; Wiemer, E.; Looijenga, L. H.; Nooter, K. *Neoplasia* **2004**, *6*, 297.

RESULTATS EXPERIMENTAUX**1) Modulation des propriétés ATP-dépendantes de MutS par l'ADN contenant un composé de lésion du cisplatine (lésion du cisplatine et mésappariement).*****INTRODUCTION***

La fonction du système MMR est associée à la sensibilité des cellules à l'agent anticancéreux le cisplatine. Ainsi la relation entre inactivation du système MMR et l'apparition de la résistance cellulaire a été établie *in vitro* et *in vivo* (Drummond et coll., 1996 ; Vaisman et coll., 1998). Le système MMR semble jouer le rôle d'interrupteur de la voie apoptotique p-73 dépendante (Gong et coll., 1999 ; Shimodaira et coll., 2003). La sensibilité des cellules cancéreuses au cisplatine et leur capacité d'induire l'apoptose suite à un traitement au cisplatine est extrêmement importante pour l'efficacité de cette molécule. Il est donc important de comprendre le mécanisme moléculaire mis en jeu par les protéines du système MMR pour déclencher l'apoptose cisplatine-induite.

Le but de cette étude est d'élucider le mécanisme moléculaire de fonctionnement de MutS en présence du composé de lésion afin de comprendre comment un signal pourrait être formé par MMR.

Les études antérieures du laboratoire ont montré que la protéine MutS d'*E. coli* a une forte affinité pour les composés de lésion du cisplatine, contrairement à la lésion intrabrin avec une préférence pour le composé de lésion G*G*/CT (Fourrier et coll., 2003). Une forte affinité pour ce composé de lésion a aussi été trouvée pour la protéine MutS α humaine (Duckett et coll., 1996). Dans ce complexe ADN à composé de lésion-MutS, on pense que l'ADN mésapparié joue le rôle d'un cofacteur qui régule le déclenchement du processus permettant le départ de la protéine avant la translocation. Le départ de MutS d'un mésappariement est régulé par la fixation et/ou l'hydrolyse de l'ATP. Il a été montré que le composé de lésion G*G*/TC rend la protéine insensible à l'ATP en empêchant ainsi son départ du composé de lésion (Salsbury et coll., 2006).

Notre hypothèse de travail est que le composé de lésion du cisplatine pourrait moduler le fonctionnement de MutS ; l'ADN platiné pourrait être alors un cofacteur ne permettant pas une initiation de réparation normale MutS dépendante. Ce scénario serait en faveur d'un mécanisme de signalisation directe des lésions du cisplatine par le système MMR (voir chapitre III). Dans notre étude nous avons choisi de décrire les propriétés biochimiques ATP-

dépendantes de MutS en interaction avec le composé de lésion G*G*/CT du cisplatine. En absence d'étude similaire avec l'homologue humain de MutS (MSH2-MSH6), notre étude pourra servir pour proposer un modèle de signalisation du système MMR eucaryote étant donné que MutS et hMSH2-MSH6 partagent de nombreuses propriétés biochimiques ATP-dépendantes.

Nous avons étudié l'effet du nucléotide régulateur ATP et de son homologue non-hydrolysable AMPPNP sur le fonctionnement de MutS fixée sur un duplexe d'ADN contenant un composé de lésion G*G*/CT. Nous avons utilisé le gel de retardement électrophorétique pour obtenir les constantes de dissociation de MutS en présence du composé de lésion et de l'ATP. La cinétique de décrochage de MutS du composé de lésion sous l'effet des nucléotides régulateurs a été étudiée en temps réel par la technique de résonance plasmonique de surface. Une étude a été consacrée à l'analyse de l'effet du composé de lésion sur l'activité ATPasique de MutS. Les changements de conformation de MutS en présence de l'ATP et/ou duplexe d'ADN contenant le composé de lésion ont été étudiés par la protéolyse limitée et comparés aux états conformationnels adoptés par MutS en présence d'un duplexe d'ADN contenant un mésappariement. Nous avons aussi analysé la courbure de la double hélice d'ADN induite par le composé de lésion.

Modulation of MutS ATP-dependent Functional Activities by DNA containing a Cisplatin Compound Lesion (Base Damage and Mismatch)

Yuliya Sedletska, Laurence Fourrier and Jean-Marc Malinge*

Centre de Biophysique
Moléculaire, CNRS
Rue Charles Sadron
45071 Orléans Cedex 02
France

DNA damage-dependent signaling by the DNA mismatch repair (MMR) system is thought to mediate cytotoxicity of the anti-tumor drug cisplatin through molecular mechanisms that could differ from those required for normal mismatch repair. The present study investigated whether ATP-dependent biochemical properties of *Escherichia coli* MutS protein differ when the protein interacts with a DNA oligonucleotide containing a GT mismatch *versus* a unique site specifically placed cisplatin compound lesion, a cisplatin 1,2-d(GpG) intrastrand cross-link with a mispaired thymine opposite the 3' platinated guanine. MutS exhibited substantial affinity for this compound lesion in hydrolytic and in non-hydrolytic conditions of ATP, contrasting with the normal nucleotide inhibition effect of mispair binding. The cisplatin compound lesion was also shown to stimulate poorly MutS ATPase activity to approach the hydrolysis rate induced by nonspecific DNA. Moreover, MutS undergoes distinct conformation changes in the presence of the compound lesion and ATP under hydrolytic conditions as shown by limited proteolysis. In the absence of MutS, the cisplatin compound lesion was shown to induce a 39° rigid bending of the DNA double helix contrasting with an unbent state for DNA containing a GT mispair. Furthermore, an unbent DNA substrate containing a monofunctional adduct mimicking a cisplatin residue failed to form a persistent nucleoprotein complex with MutS in the presence of adenine nucleotide. We propose that DNA bending could play a role in MutS biochemical modulations induced by a compound lesion and that cisplatin DNA damage signaling by the MMR system could be modulated in a direct mode.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: cisplatin; DNA mismatch repair; MutS; DNA bending; surface plasmon resonance spectroscopy

*Corresponding author

Introduction

DNA mismatch repair (MMR), which is evolutionarily conserved across prokaryotes and eukaryotes, plays a crucial role in maintaining the genomic integrity of the cell. This repair pathway corrects mispaired and unpaired bases that arise from replication and recombination errors.^{1–3} In addition, the MMR system plays a role as a DNA damage sensor as proposed more recently.^{4–7} Importantly, MMR function is associated with sensitivity for several DNA-damaging anticancer agents such as *cis*-diamminedichloroplatinum(II) (cisplatin),^{8,9} a powerful anticancer agent used in human chemotherapy.¹⁰ A relationship between the loss of a functional MMR pathway and cellular resistance to cisplatin cytotoxicity has been established both

Present address: L. Fourrier, University of Sherbrooke, Département de Médecine Nucléaire et de Radiobiologie, 12 Avenue Nord, Fleurimont, Canada.

Abbreviations used: AMPPNP, adenosine 5'-(β , γ -imino)triphosphate; cisplatin, *cis*-diamminedichloroplatinum(II); dien-Pt, diethylenetriaminechloroplatinum(II); EMSA, electrophoretic mobility shift assay; MMR, DNA mismatch repair; RU, response unit; SPR, surface plasmon resonance.

E-mail address of the corresponding author:
malinge@cnrs-orleans.fr

in vitro and *in vivo*.^{11–14} Accumulating data support the view that MMR acts as an upstream component of a cisplatin-induced apoptotic pathway mediated by the tumor suppressor p73.^{15,16}

Because the sensitivity of cancer cells to apoptosis is known to be fundamental for therapeutic responses, it is of great interest to understand mechanistically how MMR proteins participate in signaling cisplatin damage to trigger cell death. The most abundant lesion generated by cisplatin is 1,2-d(GpG) intrastrand cross-link formed by the cross-linking of a platinum residue with the N-7 atom of two adjacent guanine residues.^{17,18} This lesion can give rise to another form of lesion called a compound lesion, namely an intrastrand adduct in one strand and a mismatch in the other. Such compound lesions arise from the misincorporation of a base opposite either platinated guanine of the 1,2-intrastrand cross-link during replication bypass that occurs by specialized DNA polymerases.¹⁹ Cisplatin damage signaling requires the human MMR protein hMutS α and hMutL α (human Msh2 and Msh6 are the subunits of hMutS α and human Mlh1 and Pms2 are those of hMutL α).^{11–14} Evidence that MMR functions as a direct sensor of cisplatin DNA damage arises from interaction studies with hMutS α or *Escherichia coli* MutS protein and cisplatin-modified DNA. Both proteins have been shown to exhibit *in vitro* a weak affinity for the major 1,2-d(GpG) cisplatin intrastrand cross-link contrasting with the marked preference exhibited for numerous cisplatin compound lesions.^{20–22} On the basis of these interaction studies, compound lesions were identified as more plausible critical lesions for MMR-mediated cisplatin cytotoxicity; however, it remains to determine whether this type of lesion activates normal MMR activity or triggers other downstream events following the recognition step.

Two models have been mainly proposed to explain the role of MMR proteins in DNA-damage response. The futile cycling model proposes that repetitive repair attempts are triggered at a mispaired base opposite a persistent lesion, resulting in the accumulation of strand breaks, which further activate cell death.²³ The direct signaling model is based on the concept that MMR proteins have two separated roles, one in the repair of mismatches and the other in the DNA damage response.^{5,24} Such a concept is supported by recent data suggesting that human MMR proteins can act as direct sensors of methylation DNA damage.²⁵ Although no direct evidence for either of these models exists for cisplatin, the likelihood of the direct signaling model has been increased by two genetic studies showing that murine MutS α mutants are still capable of inducing cisplatin-mediated apoptosis whereas they have lost the function of mismatch repair.^{26,27} These data are consistent with the idea that cisplatin-modified DNA could be associated with yet undefined MMR-dependent biochemical activities necessary for the signaling function.

The in-depth understanding of normal mismatch repair has allowed the identification of critical bio-

chemical events especially those associated with the initiation of mismatch repair, which depends essentially on MutS and its eukaryotic counterpart MutS α . These proteins contain Walker A and Walker B motifs and have been shown to both bind and hydrolyse ATP.^{1–3} In near physiological conditions the most populated species are likely represented by proteins with one subunit occupied by ATP and the other by ADP.^{28,29} It is not well understood how ATP hydrolysis and/or binding affect the interaction of these proteins with DNA heteroduplex but loss of affinity under steady-state conditions as well as rapid dissociation of pre-bound proteins induced by the adenine nucleotide are well known biochemical properties.² Another important ATP-dependent event is the conformational changes undergone by the proteins upon DNA binding in the absence and presence of ATP.^{30–32}

Interestingly, MutS was found previously to be partially insensitive to ATP-dependent DNA release with a cisplatin compound lesion in which a thymine residue was opposite the 5'-platinated guanine of a cisplatin 1,2-d(GpG) intrastrand cross-link.³³ It is of great interest to gain more data on new MutS functions associated with various cisplatin compound lesions especially those which are preferentially recognized by MMR binding activities. For this purpose, we chose to study a compound lesion, which has been shown to be preferentially bound by both hMutS α ²¹ and MutS²² among others, strengthening the likelihood of its role in MMR transactions. We studied here whether such a compound lesion, i.e. a mispaired thymine opposite the 3' platinated guanine of the major cisplatin intrastrand cross-link, could modulate or not important steps of *E. coli* MutS-dependent DNA mismatch repair initiation such as ATP-dependent DNA binding decrease, DNA-dependent increase of ATP hydrolysis and conformational changes upon DNA binding in the presence of ATP. We identified for the first time several ATP-dependent properties of MutS specifically associated with a cisplatin compound lesion which are distinguishable from those exhibited with a mispaired base. Interestingly, our data suggest that the rigid DNA bending induced by a cisplatin compound lesion could impose unique MutS conformational changes that have a bearing on relevant biochemical properties of the protein. Our observations are discussed in the context of the existing models linking MMR function with cisplatin damage signaling.

Results

MutS exhibits substantial affinity for DNA substrate containing a 3'-T cisplatin compound lesion in the presence of ATP or a non-hydrolyzable triphosphate analog

Here we chose to study MutS binding in the presence of adenine nucleotide with a compound

lesion in which a thymine residue was opposite the 3'-platinated guanine (3'-T cisplatin compound lesion) because (i) it is the best recognized compound lesion by both MutS and hMutS α ^{21,22} and (ii) a compound lesion with a 5' mispaired thymine was already reported to decrease the ATP-dependent DNA release of MutS in non-hydrolytic conditions of ATP.³³

We used electrophoretic mobility shift assay (EMSA) to determine MutS–DNA complex apparent dissociation constants (K_d) by evaluating the extent of complex formation as a function of MutS concentration using site specifically cisplatin-modified and unplatinated 24-mer duplexes (Figure 1). As reported in our previous work²² and as shown in Figure 2 and Table 1, MutS bound more efficiently to the radiolabeled duplex G*G*/CT bearing a 3'-T cisplatin compound lesion ($K_d=9(\pm 1.8)$ nM) as compared to the radiolabeled heteroduplex GG/CT ($K_d=24(\pm 4.3)$ nM). Under these conditions, no gel-shifted complexes were detectable with the homoduplex GG/CC, revealing the specific nature of MutS interactions (results not shown). We also confirmed that tagged MutS protein yielded the same results as untagged protein for the experiments presented throughout this study. First, we studied the effect of adenine nucleotide in non-

hydrolytic conditions, i.e. in the presence of ATP without magnesium (ATP–Mg²⁺) and in the presence of the non-hydrolyzable nucleotide analog AMPPNP. Consistent with previous studies,³⁴ we found that ATP–Mg²⁺ and AMPPNP significantly reduced the binding of MutS to the duplex GG/CT (Figure 2(a)), with affinities decreased by 12 and 21-fold, respectively (Table 1). When the duplex GG/CT was replaced by the duplex G*G*/CT containing a 3'-T cisplatin compound lesion, the effect of ATP–Mg²⁺ and AMPPNP on MutS affinity decrease was significantly lowered as shown by the difference in the binding curves of Figure 2(a) and (b); the K_d values with the duplex G*G*/CT were found to be 22(± 3.3) and 20(± 3) nM with ATP–Mg²⁺ and AMPPNP, respectively, indicating a slight decrease in affinity as compared to the binding of MutS in the absence of nucleotide ($K_d=9(\pm 1.8)$ nM). Our binding data together with those reported for a 5'-T cisplatin compound lesion³³ are qualitatively similar; hence it can be deduced that in first approximation the persistent binding of MutS to these compound lesions is independent of the position of the mispaired thymine opposite the adduct.

Importantly, we do not know whether the persistent binding of MutS to a compound lesion occurs

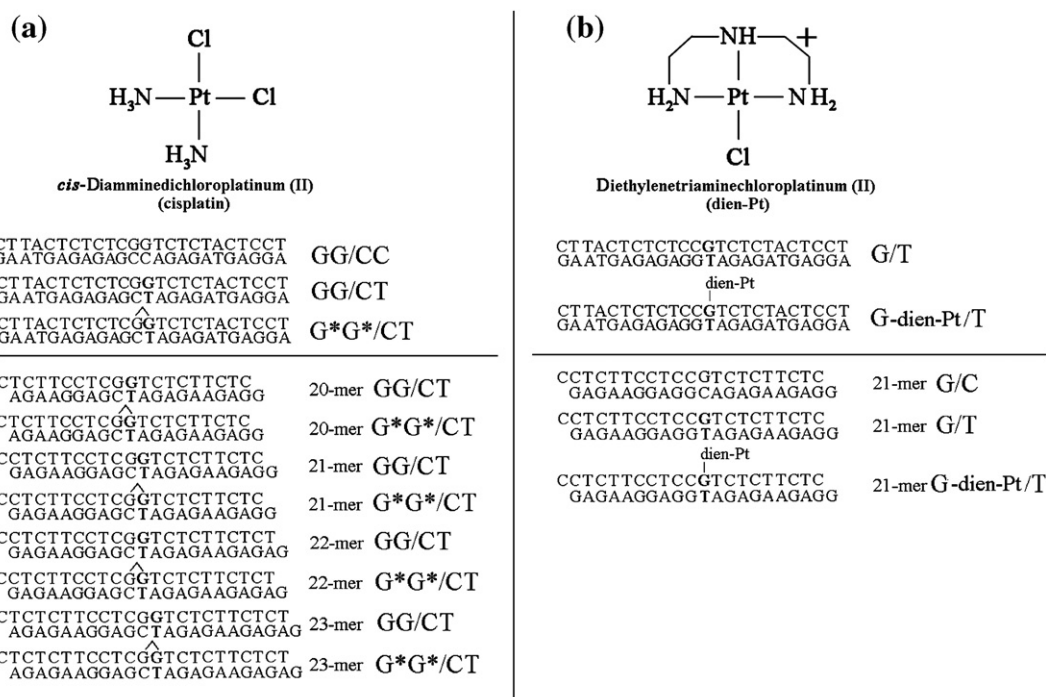


Figure 1. Cisplatin and dien-Pt chemical structures and sequences of platinated and unplatinated oligonucleotide duplexes with or without a GT mismatch used here and their abbreviations. (a) Each duplex contains a central d(GpG) platinated site within the pyrimidine-rich upper strand with or without a cisplatin 1,2-d(GpG) intrastrand cross-link (denoted by G*G*); 24-mer duplexes used for interaction studies with MutS and cohesive ends duplexes of various lengths (20 mer–23 mer) used in bending experiments are presented in the upper and lower panel, respectively. (b) Only one high affinity platinum site guanosine residue is present within the upper strand of duplexes in order to contain a monofunctional adduct of dien-Pt when indicated. In the upper panel are presented 24-mer duplexes used for interaction studies with MutS and in the lower panel are shown 21-mer duplexes used in bending experiments. The presence of a GT mispair is indicated in bold for all platinated and unplatinated heteroduplexes.

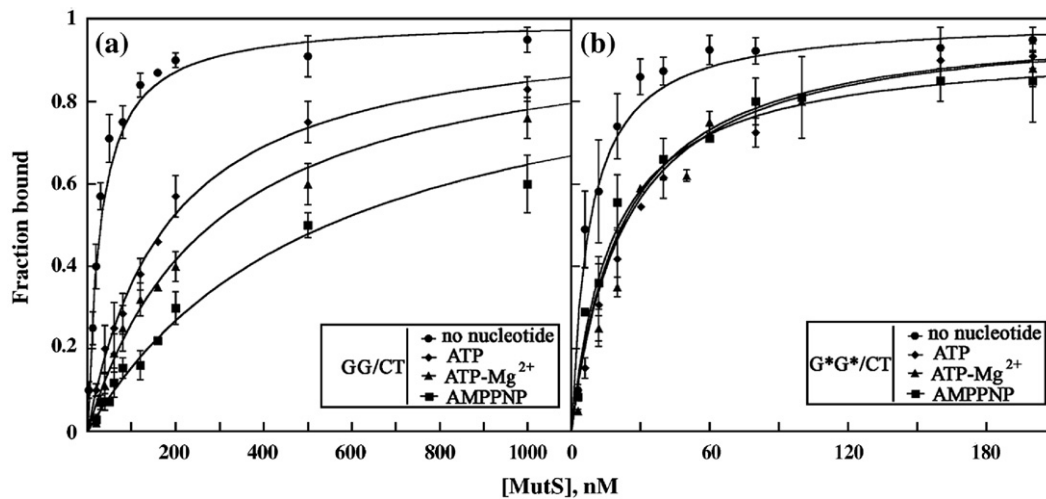


Figure 2. Differential adenine nucleotides effect on MutS binding to DNA substrates containing a GT mispair *versus* Fia 3'-T cisplatin compound lesion under steady-state conditions. Titration of (5'-³²P)-end-labeled DNA substrates was carried out with increasing concentration of MutS in the absence or presence of 1 mM adenine nucleotides as indicated. The fraction of bound DNA substrate containing a GT mispair (a) or a 3'-T cisplatin compound lesion (b) was quantitated from EMSA as described in Materials and Methods and plotted as a function of MutS concentration as indicated (note that the x scale in (a) is not the same as in (b)); data were fitted to a square hyperbola using non-linear least-squares analysis. Data points and error bars represent the average and standard deviation (respectively) from at least three experiments.

in physiological conditions of ATP hydrolysis by MutS. For that purpose, we next carried out the same experiment as described above in the presence of 1 mM ATP under conditions permissive for ATP hydrolysis. In these experimental conditions, MutS exhibited a significantly lower affinity for the heteroduplex GG/CT ($K_d = 173(\pm 38)$ nM), in agreement with previous studies.^{31,34,35} In contrast to what we observed with the duplex GG/CT (Figure 2(a) and (b)), MutS still exhibited a significant affinity for the same duplex bearing a 3'-T cisplatin compound lesion as indicated by the K_d value of $23(\pm 4.1)$ nM (Table 1). Thus, MutS affinity was reduced by 7.5-fold with a GT mispair whereas it was reduced by only 2.5-fold with a cisplatin compound lesion under hydrolytic conditions of ATP, showing that this lesion significantly diminished the nucleotide effect on MutS dissociation. The same data were obtained when we performed an order of addition wherein ATP or AMPPNP was added to preformed MutS-DNA complexes or when added

concomitantly with MutS and DNA (data not shown). Altogether these data indicate that the ability of MutS to retain its binding capacity to a 3'-T cisplatin compound lesion in the presence of ATP is independent of the ATPase activity of the protein under steady-state binding conditions.

Surface plasmon resonance (SPR) analysis of the differential recognition of a cisplatin compound lesion by MutS as compared to a GT mismatch in the presence of adenine nucleotides

SPR spectroscopy has been used successfully to study the effect of nucleotide on MutS interaction with DNA under steady-state conditions;³⁴ we used this approach here to gain information on the dynamics of MutS binding to a cisplatin compound lesion in the presence of adenine nucleotides. The duplexes used for SPR experiments were the same as those used in EMSA except that a biotin residue was added to the 3' end of the unadducted purine-rich strand for binding to the Biacore streptavidine chip. In the absence of nucleotide (Figure 3(a)), the binding level of MutS to the heteroduplex GG/CT was much higher as compared with that of the perfectly paired duplex showing again the specific nature of the interactions studied here. The association step of MutS binding to G*G*/CT containing a 3'-T cisplatin compound lesion is more rapid as compared to the heteroduplex GG/CT as described²² and consequently the plateau level of the platinated heteroduplex (590 response units (RU)) is more elevated than that of the heteroduplex (520 RU; data not shown). In the presence of ATP under hydrolytic conditions and of the non-hydrolyzable analog AMPPNP (Figure 3(b) and (c)), binding of

Table 1. Distinct adenine nucleotides-dependence of MutS interaction with 24-mer DNA substrates containing a GT mismatch *versus* a 3'-T cisplatin compound lesion

Nucleotide	K_d CG/CT (nM)	K_d C*G*/CT (nM)
None	24(± 4.3)	9(± 1.8)
ATP	173(± 38)	23(± 4.1)
ATP-Mg ²⁺	280(± 59)	22(± 3.3)
AMPPNP	514(± 120)	20(± 3)

Dissociation constants (K_d) were determined for MutS complexes formed with DNA substrates containing a GT mismatch or a 3'-T cisplatin compound lesion by EMSA from binding curves shown in Figure 2 (see Materials and Methods) in the presence or absence of adenine nucleotides as indicated.

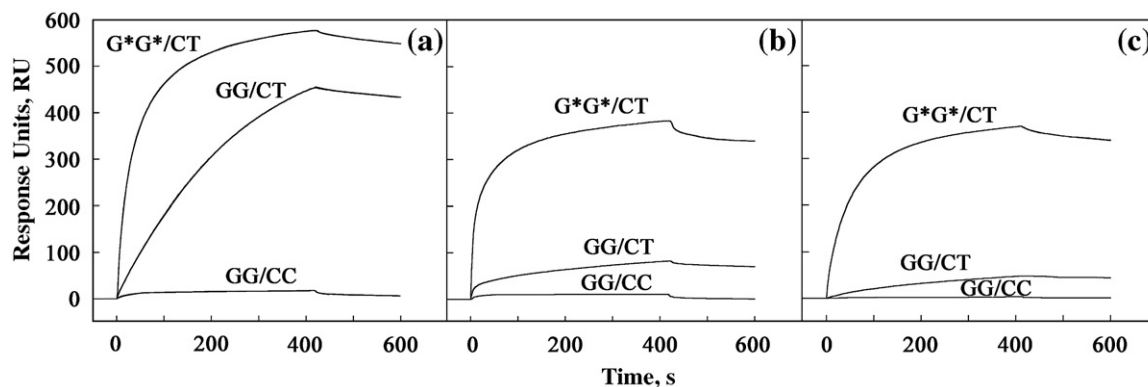


Figure 3. SPR analysis of nucleotides effect on MutS interaction with matched DNA duplex and DNA substrates containing a GT mispair or a 3'-T cisplatin compound lesion. Kinetograms of binding phase of MutS (25 nM) interacting with the indicated immobilized 24-mer duplexes GG/CC (52 RU), GG/CT (50 RU) and G*G*/CT (47 RU) under steady-state in the absence of nucleotide (a) and in the presence of 1 mM ATP (b) or AMPPNP (c). Following the binding phase, the chip was washed with buffer lacking adenine nucleotide as described in Materials and Methods.

MutS to the heteroduplex is significantly reduced with a more drastic effect observed in the presence of AMPPNP with plateau levels of 81 and 46 RU respectively and the binding of MutS to homoduplex becomes negligible (18 RU) in agreement with previously published SPR experiments.³⁴ In contrast, the effect of ATP and AMPPNP is significantly weaker when MutS interacts with the platinated heteroduplex G*G*/CT as shown by the plateau levels (380 and 368 RU, respectively), showing an insensitivity of the protein to nucleotide in agreement with the above data from EMSA. It was not possible to determine the association rate for the DNA substrates in the presence of adenine nucleotides due to a complex type of interaction. However, it is possible to deduce that the variations in the association rate are mainly responsible for the higher steady-state level of complexes with DNA containing a cisplatin compound lesion in the presence of nucleotides because the dissociation rates of MutS from the platinated and unplatinated duplexes in the absence or presence of ATP or AMPPNP were found to be very similar ($\approx 3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$).

We next studied the effect of nucleotides on DNA-MutS complexes under non-equilibrium binding conditions which were used previously for analysis of direct MutS dissociation upon ATP challenge.^{1,2} To study the ATP and AMPPNP-dependent dissociation kinetics of MutS pre-bound to DNA containing a cisplatin compound lesion or a GT mispair by SPR spectroscopy, MutS was injected in the absence of the nucleotide, as described in the legend to Figure 3(a). The kinetics of dissociation was then monitored for 5 min after injection of buffer with or without 1 mM nucleotide. As shown in Figure 4, MutS slowly dissociates with a half-life of about 30 min for both platinated and unplatinated DNA heteroduplexes in the presence of the buffer containing no nucleotide. In contrast, MutS dissociated rapidly from the 24-mer duplex GG/CT containing a GT mispair in the presence of ATP ($t_{1/2} \approx 2$ s) and of AMPPNP ($t_{1/2} \approx 18$ s). These data are in good agreement with previous results.^{22,34,36-38} Interest-

ingly, the dissociation rate of MutS from the 3'-T cisplatin compound lesion-containing DNA substrate is slower both in the presence of ATP ($t_{1/2} \approx 8$ s) and AMPPNP ($t_{1/2} \approx 40$ s) compared to protein release from the mispair. In addition, dissociation of MutS from the cisplatin compound lesion reaches a stable plateau at 10% of protein bound as compared to near complete dissociation with mismatched DNA in the presence of ATP. These data support the conclusion that MutS forms a more stable

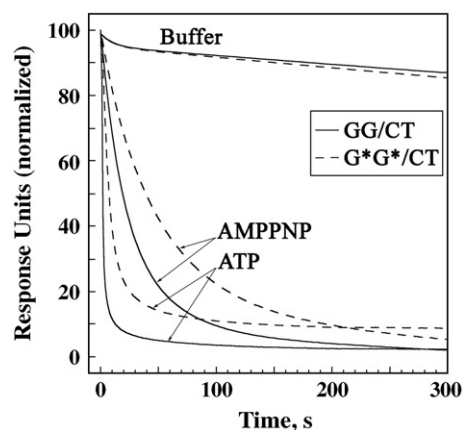


Figure 4. ATP and AMPPNP-dependent dissociation kinetics of pre-bound MutS from DNA substrates containing a GT mispair or a 3'-T cisplatin compound lesion monitored by SPR. MutS was bound on the derivatized chip in the absence of nucleotide as described in the legend to Figure 3(a) until maximum binding value was obtained. At time zero, the chip was washed with buffer alone or with buffer containing 1 mM ATP or AMPPNP and the dissociation was monitored over 5 min. The rate constants for MutS dissociation from GG/CT and G*G*/CT duplexes were determined as described in Materials and Methods and are respectively $3.9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ and $3.3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1} (\pm 10^{-6})$ in the absence of nucleotide, $3.4 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1} (\pm 10^{-2})$ and $8.8 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1} (\pm 2 \times 10^{-3})$ in the presence of ATP and $3.8 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1} (\pm 6 \times 10^{-4})$ and $1.6 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1} (\pm 2 \times 10^{-4})$ in the presence of AMPPNP.

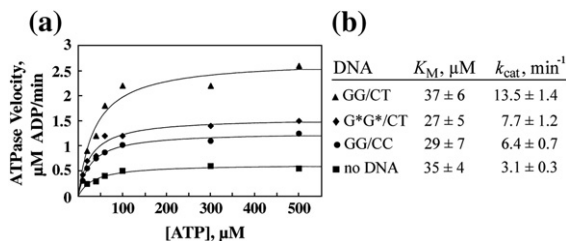


Figure 5. Mismatch and cisplatin compound lesion-dependent activation of the MutS steady-state ATPase activity. (a) Kinetic analysis of ATP hydrolysis by MutS was performed without DNA (squares), with GG/CC homoduplex (circles), with GG/CT heteroduplex (triangles) and with G*G*/CT duplex bearing a 3'-T cisplatin compound lesion (diamonds). Assays were performed with MutS (90 nM), 24-mer DNA substrates (500 nM) and various ATP concentrations as indicated. The velocity of the reaction is plotted as a function of ATP concentration, and the curves were fitted to the Michaelis–Menten equation. (b) Kinetic parameters derived from primary data shown in (a) with standard deviation values derived from triplicate determinations.

complex with a DNA substrate containing a 3'-T cisplatin compound lesion versus a GT mismatch in the presence of ATP and AMPPNP.

Stimulation of MutS ATPase activity is differentially modulated in the presence of a 3'-T cisplatin compound lesion versus a GT mismatch

Binding to a GT mismatch by prokaryotic MutS proteins has been shown to stimulate their intrinsic ATPase activity, possibly through cycles of release off and rebinding to a mismatch.^{37,39} Since binding of *E. coli* MutS to a cisplatin compound lesion is retained in the presence of ATP, we examined whether a cisplatin compound lesion-containing substrate could differentially stimulate the intrinsic ATPase activity of MutS. First we determined the kinetic parameters of MutS ATP hydrolysis in the absence of DNA. As shown in Figure 5(a) and (b), the ATP hydrolytic rate obeys Michaelis–Menten kinetics with a maximal hydrolysis rate (k_{cat}) of $3.1(\pm 0.3)$ ADP min^{-1} and a K_M of $35(\pm 4)$ μM . These parameters are in good agreement with those reported for MutS.^{35,36,39} Next we examined the effect of DNA substrates on the ATPase activity of the protein. The heteroduplex GG/CT and the homoduplex GG/CC increased the low steady-state ATPase activity of MutS by about four- and twofold, respectively, in agreement with previous data.^{36,39} Notably, we found that the activation of MutS ATPase is significantly weaker in the presence of the platinated heteroduplex G*G*/CT as compared to the heteroduplex GG/CT. Indeed, examination of the kinetic parameters of ATP hydrolysis indicates that k_{cat} is increased by only 2.5-fold in the presence of G*G*/CT and thus becomes slightly more elevated (1.2-fold) than that induced by the homoduplex DNA substrate GG/CC (Figure 5(b)). Thus, MutS binding to DNA substrate containing a

3'-T cisplatin compound lesion significantly suppressed the steady-state ATPase activity increase that is normally induced by a specific mismatched DNA substrate.

MutS binding to cisplatin-modified heteroduplex brings about distinct conformational changes in the presence and absence of ATP as compared to heteroduplex

An ATP-induced decrease of mismatched-DNA binding affinity is thought to be dependent on MutS conformational changes induced by nucleotide binding.^{1–3} In light of our binding data presented above, it could be anticipated that a distinct conformational state is adopted by MutS when it is bound to DNA bearing a 3'-T cisplatin compound lesion in the presence of ATP. Evidence demonstrating that MutS bound to mismatched DNA undergoes conformational changes upon nucleotide binding came essentially from limited proteolysis studies.^{31,40} In the next experiment, MutS was subjected to limited proteolysis with trypsin either in the absence or in the presence of DNA substrates and ATP under hydrolytic conditions, the reaction mixtures were loaded on an SDS-denaturing polyacrylamide gel and the separated protein fragments were revealed by direct staining. As shown in Figure 6, when MutS alone was subjected to partial proteolysis with trypsin the starting band 1 yielded one fragment of smaller size in our assay conditions (band 6). In the absence of ATP but in the presence of the duplex GG/CT, the proteolysis showed less degradation as judged by the appearance of the starting band 1 (95 kDa) together with two hardly

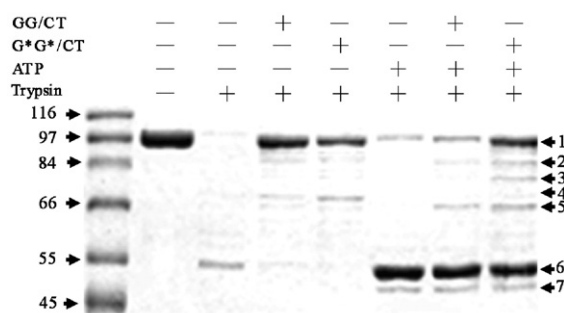


Figure 6. MutS undergoes distinct conformational changes following the binding of a GT mismatch versus a 3'-T cisplatin compound lesion. Conformational changes in MutS were detected by limited proteolytic digest of MutS with trypsin in the conditions described under Materials and Methods. Proteolysis was carried out following the formation of nucleoprotein complexes in the presence of the indicated DNA substrates with or without 1 mM ATP under hydrolytic conditions. The characteristic diagnostic bands 1 to 7 arising from MutS proteolysis and separated on SDS-PAGE are indicated by arrows as shown on the right. The positions of the molecular mass markers are indicated by arrows on the left of the Figure in kDa.

detectable bands referred to bands 2 and 4. This result suggests that mismatch binding holds the MutS protein in a more closed conformation consistent with previous data.^{30,31,40} Interestingly, when MutS was incubated with the platinated duplex, band 1 was decreased whereas band 4 increased, indicating a different pattern from that obtained with the heteroduplex. These findings indicate that in the absence of nucleotide, MutS adopted distinct conformations upon 3'-T cisplatin compound *versus* GT mispair binding.

We next compared the band patterns arising from trypsin digestion of MutS bound to DNA substrates containing a GT mispair *versus* a 3'-T cisplatin compound lesion in the presence of ATP under hydrolytic conditions. First, we checked that when MutS alone bound ATP it gave rise to a modification in the band pattern as compared to that in the absence of ATP (intensification of bands 1 and 6, appearance of band 7). This is in qualitative agreement with previous proteolysis data showing ATP-dependent MutS conformational changes.^{31,40} Addition of DNA cofactors gave rise to new band patterns, which differ significantly according to the nature of the DNA substrates. Indeed, in the presence of the heteroduplex GG/CT, two new bands were observed (bands 2 and 5), with the band 2 being hardly detectable. In the presence of G*G*/CT, three new bands of equal intensities are formed (bands 2, 3 and 5) with band 3 being specifically formed in the presence of a 3'-T cisplatin compound lesion. Moreover, we also observed that bands 1, 2 and 5 are significantly more intense when MutS is bound to duplex G*G*/CT in the presence of ATP. These findings strongly suggest that the persistent binding of MutS to a 3'-T cisplatin compound lesion in the presence of ATP relates to conformational changes in the protein.

A 3'-T cisplatin compound lesion induces a bending of the DNA double helix

Bending is thought to facilitate the initial recognition of mismatches by MutS and the flexibility of bent DNA substrates specifically recognized by MutS was proposed to help to drive conformational changes in MutS after the recognition step (1). Cisplatin 1,2-d(GpG) intrastrand cross-link induces rigid directional bending within homoduplex DNA⁴¹ but it is yet unknown whether the presence of a mismatched thymine opposite the 3' platinated guanine could introduce or not a flexibility. For this purpose, we used gel electrophoresis of multimers obtained by ligation of oligonucleotide duplexes containing a single site specifically placed cisplatin compound lesion. Indeed, bending is commonly determined from retardation in the electrophoretic mobility of platinated multimers as compared to the mobility of non-adducted multimers of the same length.⁴² As shown in the lower panel of Figure 1(a), the oligonucleotide sequences have been chosen to provide double-stranded oligo-

nucleotides with non-self-complementary ends (one nucleotide overhang); after (5'-³²P) end-labeling by kinase, the radioactive cisplatin-modified and unplatinated heteroduplexes are ligated into multimers by ligase and then loaded onto a non-denaturing polyacrylamide gel. A gel of the ligation products of the duplexes 20–23 mer GG/CT and 20–23 mer G*G*/CT bearing a 3'-T cisplatin compound lesion is presented in Figure 7(a). We observed that the unplatinated multimers containing a GT mismatch have normal electrophoretic mobility as compared to the position of standard DNA mass markers consistent with the fact that GT mismatch is known to induce no DNA bending.^{43,44} Interestingly, the multimers containing a 3'-T cisplatin compound lesion (lanes Pt) migrate more slowly than the corresponding unplatinated multimers (lanes no Pt) indicating either flexibility or bending of the platinated double helix. In Figure 7(b), the K factor (ratio of apparent length to the true sequence length) is plotted *versus* sequence length of the platinated multimers. The maximum retardation (steepest slope) is obtained for multimers of the

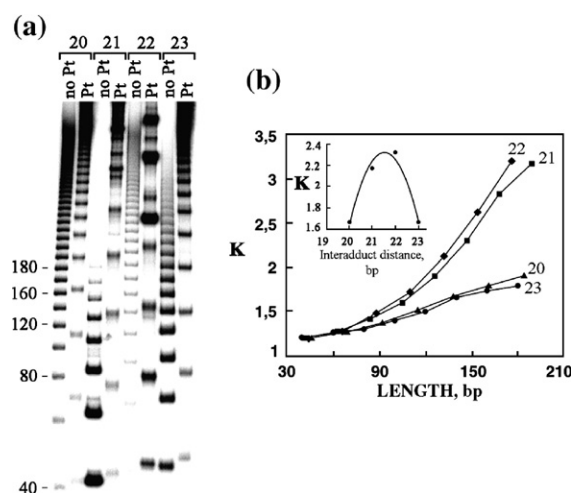


Figure 7. The 3'-T cisplatin compound lesion induces a rigid bending of the DNA double helix. (a) Gel electrophoretic mobility of the ligation products of the 20-mer to 23-mer GG/CT and G*G*/CT duplexes on 8% polyacrylamide gel. Unplatinated multimers, lane no Pt; platinated multimers, lane Pt. The preparation of (5'-³²P)-end-labeled ligation products (multimers) was described in Materials and Methods; the positions of DNA molecular mass markers of normal mobility are indicated on the right of the Figure in kDa. (b) Variation of the relative mobility *K* *versus* sequence length curves for the multimers of ligated 20-mer to 23-mer G*G*/CT duplexes, denoted, respectively, 20, 21, 22 and 23. Inset: variation of the relative mobility *K* *versus* interplatinum distance (bp) for the platinated multimers with a total length of 140 bp. The curve represents the best fit of the experimental points to the equation $K = ax^2 + bx + c$ (56) where x is the interplatinum distance. Application of equation (1) to the 110 and 132 bp multimers of the ligated 22-mer G*G*/CT leads to a curvature of 1.08. The average bend angle per helix turn, calculated by multiplying the relative curvature by the absolute value of a tract of six adenine residues (18°), is about 39(±2)° (see Materials and Methods).

22-mer G*G*/CT duplex. This result suggests that 3'-T cisplatin compound lesion induced a directed bend rather than flexibility because flexibility is not expected to display phase dependence.⁴⁵ In the inset of Figure 7(b), the K factor is plotted as a function of the inter-adduct distance (bp) for platinated multimers of 140 bp in length. The resulting bell-shaped pattern is characteristic for rigid bending^{41,42} and indicates that no DNA flexibility was induced by a 3'-T cisplatin compound lesion. As described under the legend to Figure 7, the bending value induced by the cisplatin compound lesion was found to be $39(\pm 2)^\circ$; this important bending is higher than the bending value of 32° induced by the major cisplatin intrastrand cross-link within homoduplex DNA (data not shown).⁴¹

A platinum monofunctional adduct opposite a mismatch thymine does not induce bending nor form a persistent complex with MutS in the presence of AMPPNP

To try to assess a role for DNA bending in the persistent binding of MutS to the compound lesion, we investigated MutS interaction with a GT heteroduplex modified by chloro(diethylenetriamine) platinum (II) (dien-Pt), a biologically inactive platinum compound (Figure 1(b)). Interestingly, dien-Pt reacts with the N-7 atom of guanine residues as cisplatin does but in contrast to it, it forms a monofunctional and not a bifunctional adduct. This platinum derivative does not induce bending within homoduplex DNA⁴² and was used previously in biophysical studies to mimic the two positive charges, the steric hindrance and the major groove position of the cisplatin residue.⁴⁶

First, we checked that a monofunctional adduct of dien-Pt at a guanine residue does not induce bending in the context of an heteroduplex DNA containing a thymine opposite the monofunctionally adducted guanine. For this purpose, we determined whether retardation in electrophoretic mobility occurred for multimers of a 21-mer GT heteroduplex modified by dien-Pt as compared to the normal mobility of multimers of a 21-mer homoduplex. Multimers were obtained by ligation of the starting duplexes 21-mer G/C, 21-mer G/T and 21-mer G-dien-Pt/T (shown in the lower panel of Figure 1(b)) and were then loaded onto a non-denaturing polyacrylamide gel as described above. As shown in Figure 8(a), multimers of 21-mer G/C duplex (normal mobility) showed the same electrophoretic mobility as multimers of the 21-mer G/T duplex unmodified or modified by dien-Pt (lanes 2 and 3) as exemplified by the co-migration of the bands indicated by a triangle corresponding to 105 bp platinated and unplatinated multimers. This observation shows that a monofunctional adduct of dien-Pt does not induce DNA bending when it is opposite a mismatched thymine.

Next, we determined whether the loss of MutS binding induced by AMPPNP was differentially modulated in the presence of cisplatin- versus dien-

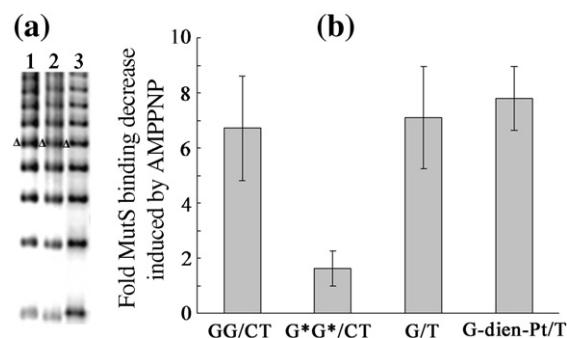


Figure 8. MutS supports normal AMPPNP-dependent DNA release with an unbent duplex bearing a monofunctional adduct of dien-Pt opposite a mismatched thymine. (a) Electrophoretic mobility of the ligation products of various duplexes: lane 1, 21-mer G/C; lane 2, 21-mer G/T; lane 3, 21-mer G-dien-Pt/T. The triangles indicate the migration of multimers of 105 bp in length (5-mer) showing identical electrophoretic mobility for the ligated products of lanes 1, 2 and 3. (b) Histograms showing the AMPPNP effect on MutS binding to bent and unbent DNA substrates. A fixed concentration of MutS (30 nM) was used to determine the amount of specific DNA-protein complex in the absence or presence of 1 mM AMPPNP as described under EMSA using the (5'-³²P)-end-labeled 24-mer duplexes GG/CT, G*G*/CT, G/T and G-dien-Pt/T. The Y axis represents the fold decrease in MutS binding to DNA substrates of interest in the presence of AMPPNP as compared to binding in the absence of adenine nucleotide.

Pt-modified GT heteroduplex. For that purpose, we designed a 24-mer GT heteroduplex of the same length as that used for MutS interaction studies with cisplatin-modified duplexes and containing a unique guanine residue within the pyrimidine-rich strand allowing the formation of a monofunctional dien-Pt adduct (upper panel of Figure 1(b)). Direct binding of MutS to the (5'-³²P)-labeled 24-mer duplexes GG/CT, G/T, G*G*/CT and G-dien-Pt/T was analyzed at a fixed concentration of MutS protein in the absence or presence of 1 mM AMPPNP by EMSA under the same equilibrium binding conditions as described above (results not shown) and the binding data are presented in Figure 8(b). AMPPNP-induced release of DNA is severely decreased in the presence of a 3'-T cisplatin compound as compared to the corresponding unplatinated heteroduplex, in agreement with our above data; in contrast such a difference is no longer observed when cisplatin was replaced by dien-Pt as deduced from the same MutS binding decrease induced by AMPPNP with the heteroduplexes G/T and G-dien-Pt/T. The distinct response of MutS to AMPPNP in the presence of unbent (dien-Pt-modified) versus bent (cisplatin-modified) DNA heteroduplex is consistent with the idea that a rigid bending could play a role in stabilizing the ternary complex that forms with MutS and cisplatin-modified heteroduplex in the presence of nucleotide triphosphate. Our observation also suggests that the platinum residue itself plays no role in

the persistent MutS binding with a 3'-T cisplatin compound lesion.

Discussion

Here, we have shown for the first time that the interaction of MutS with a cisplatin compound lesion modulated several important biochemical properties of MutS that are required to maintain normal MMR.

Under steady-state conditions, MutS exhibited a high binding affinity for 3'-T cisplatin compound lesion in the presence of ATP under hydrolytic conditions whereas MutS affinity for a GT mispair was significantly decreased. MutS also formed an unusual stable complex with such a lesion in non-hydrolytic conditions of ATP and in the presence of non-hydrolyzable AMPPNP analog (Figures 2 and 3), suggesting that the formation of this complex does not require ATP hydrolysis. Moreover, in conditions where MutS pre-bound to GT mispaired DNA dissociates rapidly upon ATP addition in hydrolytic conditions, MutS was found to dissociate four times more slowly from a 3'-T cisplatin compound lesion, as determined by SPR experiment (Figure 4). Interestingly, a fourfold decrease in the kinetics of ATP-induced MutS dissociation was reported by SPR analysis when a GT mismatched DNA with a free end was double-end blocked to trap the ATP-MutS species.³⁸ The same decrease in the dissociation rate of MutS reported in this experiment and in our assay suggests that MutS release from a 3'-T cisplatin compound lesion is significantly inhibited upon ATP challenge; moreover, these previous data have shown that ATP-MutS species finally dissociate from double end-blocked DNA as a consequence of the continuous flow inherent to the SPR procedure,³⁸ which could explain why the amount of stable MutS complex with the compound lesion in the presence of ATP was not as high as that formed under our steady-state experimental conditions. A similar decrease in the rate of MutS release from the compound lesion was also observed when ATP was replaced by AMPPNP suggesting that MutS ATPase activity is not required for the formation of a more stable complex. In addition to modulation of MutS-DNA interactions induced by a 3'-T cisplatin compound lesion in the presence of nucleotides triphosphate, another important difference in MutS properties conferred by the presence of the lesion within DNA substrate is a significant decrease in its ATPase activity as compared to a GT mismatch-containing DNA substrate (Figure 5). The results presented here also show that a distinct conformational state was adopted by MutS when it bound to the cisplatin compound lesion in the presence of ATP. Such a conformational state is different from that adopted by MutS with the platinated DNA substrate in the absence of nucleotide triphosphate (Figure 6). Our results reveal that MutS activity is modulated but not totally inhibited by the presence of the com-

pound lesion. For instance, MutS binding to a 3'-T cisplatin compound lesion is not completely insensitive to the presence of ATP or AMPPNP, since the affinity for the compound lesion is decreased by about two times (Table 1). The rate of MutS ATPase activity is higher than that of the protein alone and approaches the ATPase activity level measured in the presence of homoduplex DNA, suggesting that the MutS dynamics of release-rebinding to the compound lesion is partially defective. When bound to the compound lesion, MutS adopts distinct conformations in the absence or in the presence of ATP, once again showing that the protein can undergo ATP-dependent conformation changes. Recent data have shown that mutants in the ATP binding site of the yeast Msh2-Msh6 complex in interaction with a GT DNA substrate exhibited altered biochemical properties similar to those observed when MutS is bound to the compound lesion. Indeed two mutant complexes form an unusually stable complex with mismatched base-pairs in the presence of ATP⁴⁷ and had a lower ATPase activity in the presence of mispaired bases.⁴⁸ Interestingly, these mutants are also defective for ATP binding in the Msh2 site. Thus, it is tempting to speculate that the unusual biochemical properties of MutS interacting with the compound lesion could arise from a defect in ATP binding which impedes the formation of an ATP-ATP bound state of MutS and then leads to the formation of a more stable nucleoprotein complex. However, it is not possible to exclude from our data that an ATP-ATP bound species could display significant affinity for platinated DNA. Indeed, when AMPPNP or ATP without Mg²⁺ is present in our binding assays, two equivalents of AMPPNP or ATP may be able to bind to MutS. AMPPNP is known to be a competitor of the MutS-ADP binding site,²⁸ suggesting that MutS may bind two AMPPNP molecules as previously discussed.¹ In addition, *Thermus aquaticus* MutS was found to bind two non-hydrolyzable ATP molecules.³⁷ If two equivalents of nucleotide triphosphate can bind to MutS, this nucleotide bound species could enable significant binding to cisplatin compound lesion under non-hydrolytic conditions. Such a proposal contrasts with the generally well accepted view that a mispair is not specifically recognized in the presence of non-hydrolyzable ATP analogs, as reported in studies with MutS and yeast MutS α .^{36,49} However, we note here that MutS is capable of weakly binding a mispair in the presence of AMPPNP and ATP in non-hydrolytic conditions (Figure 2), indicating that the protein can still contact the DNA double helix. Work is in progress to analyze the nucleotide-bound form of MutS interacting with a 3'-T cisplatin compound lesion.

Another point addressed here deals with the possible relevance of DNA bending in the unusual MutS properties. We showed that a 3'-T cisplatin compound lesion induced bending of the double helix (Figure 7). The rigid bending induced by the cisplatin compound lesion contrasts with the unbent double helix containing a GT mismatch. The rigidity of the bent structure induced by

cisplatin should considerably limit the malleability of the double helix upon MutS binding contrasting with the induced fit mode of binding that was deduced from the crystal structure of MutS–GT heteroduplex complex in which the double helix is kinked by 60°. ^{30,50} This supports the view that the bent platinated double helix could impose some unusual MutS conformation changes in agreement with those observed by trypsin digestion in the absence of nucleotide (Figure 6). Interestingly, a recent study proposed that rigid pre-bent DNA substrates are good substrates for MutS but should be refractory to repair because they cannot become unbent. ⁵¹ Our data are consistent with such a model because firstly MutS exhibits high affinity for pre-bent DNA substrate containing a 3'-T cisplatin compound lesion, ²² secondly we found that such a platinated substrate modulated several ATP-dependent biochemical properties of MutS, and thirdly in contrast to bent cisplatin-modified heteroduplex, MutS does not remain bound to unbent dien-Pt-modified heteroduplex in the presence of AMPPNP (Figure 8). Although one cannot exclude a role for DNA distortions induced at the nucleotide level by a 3'-T cisplatin compound lesion, these observations suggest that DNA bending induced by the lesion could participate in stabilizing a dysfunctional MutS–damage DNA complex in the presence of adenine nucleotide which could form a dead-end intermediate refractory for MMR. Such an attractive hypothesis predicts that further MutS-dependent MMR biochemical events such as translocation of MutS along DNA should be impaired by the lesion.

Our data may also provide an explanation at the molecular level for two recent results showing in mouse lines that mutations in the ATP binding site of Msh2 ²⁶ and Msh6 ²⁷ suppress the normal MMR activity but do not disrupt the ability to trigger an MMR-dependent apoptotic response to cisplatin-damaged DNA. Notably, these mutants have lost the property to leave a mispaired base in the presence of ATP, suggesting that they could also form a long-lived intermediate species with cisplatin-modified DNA as MutS does with a cisplatin compound lesion. The formation of such an unusual stable nucleoprotein intermediate could be viewed as a new MMR function devoted to cisplatin-DNA damage signaling. Altogether these observations support the concept of direct signaling and reduce the likelihood of the futile cycle model. However, the persistent binding of MutS with a cisplatin compound lesion is also consistent with the occluding model which is based on a tight binding of a protein to damaged bases. ^{6,12,52,53} Because a cisplatin compound lesion arises from the translesional replication of a primary cisplatin lesion, the binding of MutS or Msh2–Msh6 could block other processes than replication such as transcription and repair, leading to cell death.

The present data reinforce the potential role of cisplatin compound lesions in MMR-dependent signaling. Because MMR-dependent recruitment of

proteins at sites of alkylation DNA damage was shown recently, ²⁵ it is now of great interest to study MMR-dependent assembly of yet unknown eukaryotic cellular factors with DNA containing a cisplatin compound lesion in order to improve our knowledge on the cisplatin-dependent signaling mechanisms and more importantly to help to design strategies for increasing chemotherapeutic efficacy in human cancer.

Materials and Methods

Materials

Single-stranded 21 to 24-mer oligonucleotides and biotinylated 24-mer oligonucleotides were purchased from Eurogentec; [γ -³²P]ATP was from Amersham Biosciences; T4 polynucleotide kinase, T4 DNA ligase and bovin serum albumin (BSA) were obtained from New England Biolabs. Solutions of 40% (w/v) acrylamide and 2% (w/v) bisacrylamide were from Bio-Rad. Cisplatin, protease inhibitors mixture and trypsin were purchased from Sigma. Dien-Pt was kindly provided by Dr P. Sadler. ATP and AMPPNP were from Roche. Surfactant P-20 and streptavidine-coated SA sensor chips were purchased from BIAcore AB (Uppsala, Sweden).

Protein purification

Hexameric histidine-tagged MutS protein was prepared as described with minor modifications. ²² The host strain was BL21 (λ DE3) (Novagen) and the expression vector pTX412 were kindly provided by Dr M. E. Winkler. Transformants were grown at 37 °C with shaking to an A_{600} of 0.5 and induced at 25 °C by addition of isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside at a final concentration of 250 μ M for 5 h. After centrifugation, the cells were resuspended in a sonication buffer (20 mM Tris–HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 30 mM imidazole, 10% (v/v) glycerol and 5 mM β -mercaptoethanol) supplemented with protease inhibitors mixture, frozen at –20 °C, and then sonicated. All purification steps were performed at 4 °C. The lysate obtained after centrifugation of the extract was applied to a nickel agarose column (Qiagen) and MutS was eluted with buffer containing 100 mM imidazole at a flow rate of 1 ml/min. After extensive overnight dialysis MutS was stored at –70 °C in a buffer containing 20 mM Tris–HCl (pH 7.5), 350 mM NaCl, 20 mM β -mercaptoethanol and 10% glycerol. Protein concentration was determined by using the Bradford reagent (Bio-Rad) using BSA as a standard. The final concentration of the protein expressed in terms of dimer was 16 μ M. The purity was estimated as >95% using Coomassie staining of a SDS–acrylamide gel.

Untagged MutS protein was obtained by incubating hexameric histidine-tagged MutS with biotinylated thrombin (Novagen) for 1 h at 10 °C. The cleavage reaction mixture was then incubated with nickel and streptavidine agarose resin and untagged MutS was batched-eluted. Amicon Ultra-15 (Millipore) was used to concentrate and equilibrate the protein in 20 mM Tris–HCl (pH 7.5), 350 mM NaCl, 20 mM β -mercaptoethanol and 10% glycerol to 45 μ M. As described, thrombin cleavage removes the hexameric histidine affinity tag without

obvious cleavage at internal sites and does not alter MutS biochemical properties.⁵⁴

DNA purification and platination

The sequences of the oligonucleotides are shown in Figure 1. Single-stranded oligonucleotides were purified by strong anion exchange HPLC (Mono Q column, Amersham Biosciences) with a 30-min linear gradient of 0.2M–0.8 M NaCl, 10 mM NaOH (pH 12) and a flow rate of 1 ml/min. The oligonucleotide solution was neutralized by adding glacial acetic acid and Tris–HCl (pH 7.5) to a final concentration of 10 mM and 100 mM, respectively, followed by desalting by passage through a C18 cartridge (Millipore). Single-stranded oligonucleotides with a 3'-biotin label were purified on a 24% denaturing polyacrylamide gel. The preparation and purification of oligonucleotides containing a single 1,2-d(GpG) cisplatin cross-link or a monofunctional adduct of dien–Pt were as described (42).

(5'-³²P)-end-labeled 24-mer duplexes GG/CT, G*G*/CT, G/T and G–dien–Pt/T were prepared after labeling of the 24-mer single-stranded purine-rich strands with T4 polynucleotide kinase and [γ -³²P]ATP as described.²² Unlabeled 24-mer duplexes with or without a cisplatin d(GpG) intrastrand adduct used in MutS ATPase assays and in limited proteolysis experiments were prepared by annealing equimolar amounts of the two appropriate complementary strands at concentrations of 10 μ M to yield duplexes GG/CC, GG/CT and G*G*/CT shown in Figure 1.

Electrophoretic mobility shift assays (EMSA)

Reactions (20 μ l) contained 20 mM Tris–HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, with or without 5 mM MgCl₂ as indicated, 1 mM dithiothreitol, 80 μ g/ml of BSA, 2% glycerol, 2 nM (5'-³²P)-end-labeled 24-mer heteroduplex GG/CT or G*G*/CT, 100 nM unlabeled 24-mer homoduplex and MutS at various concentrations as indicated. Reactions were incubated for 20 min on ice followed by the addition of 1 mM ATP or AMPPNP as indicated. After 10 min of incubation on ice, gel loading buffer was added, and the reaction mixture was loaded on a 6% native polyacrylamide gel (37.5:1, acrylamide/bisacrylamide (w/w); 45 mM Tris borate, 0.5 mM EDTA (pH 8.3)). Gels were electrophoresed for 1 h at 4 °C and 13 V/cm, dried, and exposed to an Amersham Biosciences PhosphorImager screen overnight. The fraction bound (radioactivity of the bound complex/total radioactivity) was determined by ImageQuant 5.1 software (Amersham Biosciences) and was plotted as a function of the protein concentration. Binding data were fitted to a square hyperbola using non-linear least-squares analysis with Origin 6.0 software (Microcal, Northampton, MA) to determine the apparent dissociation constant (K_d) of MutS for DNA substrates.

Surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy

24-mer oligonucleotides used for SPR were the same as those presented in Figure 1 with the exception that the non-adducted purine-rich strand oligonucleotides have a 3'-biotin. Biotinylated duplexes GG/CC, GG/CT and G*G*/CT were prepared as described.²² SPR measurements were performed on a BIAcore 3000 at 20 °C using a

streptavidin-coated chip. Platinated and unplatinated biotinylated duplexes were bound to the streptavidin-coated SA sensor chip by injecting 40 μ l of 630 mM NaCl, 10 mM Tris–HCl (pH 7.5), 3 mM EDTA, 2% glycerol, 0.005% surfactant P-20, and 1 nM biotinylated duplexes GG/CC, GG/CT or G*G*/CT at a flow rate of 10 μ l/min. The protein MutS was injected at a flow rate of 20 μ l/min in running buffer (20 mM Tris–HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 0.005% (v/v) surfactant P-20, 2% glycerol). Under steady-state binding conditions, adenine nucleotide effects on the interaction of MutS with DNA substrates were monitored after pre-incubation of the protein with indicated nucleotides (1 mM) at 10 °C for 5 min in the running buffer prior to interaction analysis. Following the binding phase, the chip was washed with buffer lacking adenine nucleotide. The ATP and AMPPNP-dependent dissociation kinetics shown in Figure 4 were obtained by injection at 20 μ l/min of buffer containing 1 mM ATP or AMPPNP immediately after injection of MutS at the same flow rate in the absence of nucleotide. Dissociation, which was biphasic, was fit to a sum of two exponentials⁵⁵ using Origin 6.0 software. The rate constants which represent the dissociation of the major species (70%–97%) were used to deduce the half-time of dissociation ($t_{1/2}$) from GG/CT and G*G*/CT duplexes in the presence and absence of nucleotide. Two washes of 10 μ l of running buffer containing 0.04% SDS were used to regenerate the surface after each injection of MutS.

ATPase assays

ATPase activity was carried out as described.³⁶ MutS at 90 nM (dimer concentration) was assayed at 30 °C in the absence of DNA for 0–20 min with 40 nM ((γ -³²P) 110 TBq/mmol) and additional cold ATP from 0–500 μ M in a total volume of 20 μ l. The assay buffer consisted of 20 mM Tris–HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 80 μ g/ml of BSA and 2% glycerol. For reactions in the presence of DNA substrates, MutS was assayed as above in the presence of 500 nM DNA at the indicated ATP concentrations. Aliquots (1.5 μ l) were quenched with 3 μ l of buffer (50% (v/v) formamide, 3 mM EDTA (pH 8.0)) and loaded on a 15% non-denaturing polyacrylamide gel (19:1 acrylamide/bisacrylamide (w/w); 20 mM EDTA, 400 mM Tris–HCl (pH 8.5)). Gels were run at 20 V/cm and 4 °C for 40 min and exposed to a PhosphorImager screen for quantification as described above. The extent of ATP hydrolysis was determined by quantitating the amount of liberated labeled inorganic phosphate. Initial steady-state rates of ATP hydrolysis (ATPase velocity expressed in μ M ADP/min) were determined by least-squares analysis of the linear portion of time-dependent hydrolysis curve. As deduced from a DNA concentration-dependent ATPase assay performed in experimental conditions as described above, near maximum MutS ATPase activity was found to be reached in the presence of 500 nM of the DNA substrates GG/CC, GG/CT or G*G*/CT (not shown).

Limited proteolysis experiments

A total of 4.6 μ g of MutS protein was digested with 240 ng of trypsin in 20 mM Tris–HCl (pH 7.5), 105 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, and 3% glycerol for 30 min at 35 °C in a total volume of 10 μ l. Where

indicated, the reactions were supplemented with ATP (1 mM) and/or 24-mer cisplatin-modified or unplatinated GT heteroduplex (28 pmol). The reactions were stopped by the addition of 5 μ l of buffer containing 0.1 M Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 0.2 M dithiothreitol and 20% glycerol followed by heating at 90 °C for 3 min, and aliquots were loaded on 7.5% SDS-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and the proteolytic fragments were revealed by EZBlue gel staining reagent (Sigma). Proteolysis was carried out with BSA in the same experimental conditions as described above to check that trypsin activity was insensitive to the presence of ATP and it was also verified that trypsin was free of DNase activity.

Preparation of multimers from platinated and unplatinated DNA duplexes and bending measurement

Sequences used to study DNA bending and their abbreviations are shown in the bottom part of Figure 1(a) and (b). Each platinated and unplatinated double-stranded oligonucleotide with cohesive ends was prepared by annealing equimolar amounts of the two appropriate complementary strands at concentrations of 50–100 μ M as described above. Ligation reaction of duplexes into multimers was carried out as described.⁴² Briefly, the duplex (0.3 nmol) was 5' -end-labeled by incubation with 1 μ l of [γ -³²P]ATP (110 TBq/mmol) and 1 μ l of T4 polynucleotide kinase for 30 min at 37 °C in 10 μ l with standard kinase buffer. Then 1 μ l of 20 mM ATP and 1 μ l of kinase were added to the mixture for further 30 min incubation to complete oligonucleotide phosphorylation. The phosphorylated labeled duplex was ligated into multimers by adding to the reaction mixture 1 μ l of T4 DNA ligase and 1.5 μ l of ligase buffer. After 2 h of incubation at room temperature, an aliquot was loaded onto a 8% polyacrylamide gel (29:1, acrylamide/bisacrylamide, 90 mM Tris-borate, 1 mM EDTA (pH 8.3)) and run at 16 V/cm at room temperature for 5 h. After drying, the gel was exposed to a PhosphorImager screen as above. As carried out for other platinum adducts,⁵⁶ the value of the bend angle was calculated from the empirical relation given by the equation:⁵⁷

$$K - 1 = (9.6 \times 10^{-5} L^2 - 0.47)(RC)^2 \quad (1)$$

where L represents the length in base-pairs (bp) of a particular multimer with the relative mobility K and RC is the curvature relative to DNA bending at the tract of six adenine residues which was previously shown to induce a bending angle value of 18°.⁵⁸

Acknowledgements

We express our thanks to Alain Gervais for technical assistance and to M. E. Winkler and P. J. Sadler for the gift of the MutS expression vector and dien-Pt, respectively. This work was supported in part by the Ligue contre le Cancer Région Centre, Association pour la Recherche sur le Cancer, COST Chemistry Actions D8 and D39 and Electricité

de France. Y.S. was supported by a grant from the Région Centre.

References

- Kunkel, T. A. & Erie, D. A. (2005). DNA mismatch repair. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 681–710.
- Iyer, R. R., Pluciennik, A., Burdett, V. & Modrich, P. (2006). DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chem. Rev.* **106**, 302–323.
- Jiricny, J. (2006). The multifaceted mismatch-repair system. *Nature Mol. Cell. Biol.* **7**, 335–346.
- Kat, A., Thilly, W. G., Fang, W.-H., Longley, M. J., Li, G.-M. & Modrich, P. (1993). An alkylation-tolerant, mutator human cell line is deficient in strand-specific mismatch repair. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **90**, 6424–6428.
- Fishel, R. (1999). Signaling mismatch repair in cancer. *Nature Med.* **5**, 1239–1241.
- Li, G.-M. (1999). The role of mismatch repair in DNA damage-induced apoptosis. *Oncol. Res.* **11**, 393–400.
- Papouli, E., Cejka, P. & Jiricny, J. (2004). Dependence of the cytotoxicity of DNA-damaging agents on the mismatch repair status of human cells. *Cancer Res.* **64**, 3391–3394.
- Fink, D., Aebi, S. & Howell, S. B. (1998). The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clin. Cancer Res.* **4**, 1–6.
- O'Brien, V. & Brown, R. (2006). Signalling cell cycle arrest and cell death through the MMR system. *Carcinogenesis*, **27**, 682–692.
- Einhorn, E. H. (1997). Testicular cancer: an oncological success story. *Clin. Cancer Res.* **3**, 2630–2632.
- Drummond, J. T., Anthoney, A., Brown, R. & Modrich, P. (1996). Cisplatin and adriamycin resistance are associated with MutL α and mismatch repair deficiency in an ovarian tumor cell line. *J. Biol. Chem.* **271**, 19645–19648.
- Vaisman, A., Varchenko, M., Umar, A., Kunkel, T. A., Risinger, J. I., Barrett, J. C. *et al.* (1998). The role of hMLH1, hMSH3, and hMSH6 defects in cisplatin and oxaliplatin resistance: correlation with replicative bypass of platinum-DNA adducts. *Cancer Res.* **58**, 3579–3585.
- Brown, R., Hirst, G. L., Gallagher, W. M., McIlwrath, A. J., Margison, G. P., van der Zee, A. G. & Anthoney, D. A. (1997). hMLH1 expression and cellular responses of ovarian tumour cells to treatment with cytotoxic anticancer agents. *Oncogene*, **15**, 45–52.
- Fink, D., Zheng, H., Nebel, S., Norris, P. S., Aebi, S., Lin, T. P. *et al.* (1997). *In vitro* and *in vivo* resistance to cisplatin in cells that have lost DNA mismatch repair. *Cancer Res.* **15**, 1841–1845.
- Gong, J. G., Costanzo, A., Yang, H.-Q., Melino, G., Kaelin, W. G., Jr, Levrero, M. & Wang, J. Y. (1999). The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature*, **399**, 806–809.
- Shimodaira, H., Yoshioka-Yamashita, A., Kolodner, R. D. & Wang, J. Y. (2003). Interaction of mismatch repair protein PMS2 and the p53-related transcription factor p73 in apoptosis response to cisplatin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 2420–2425.
- Wang, D. & Lippard, S. J. (2005). Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Rev. Drug Discov.* **4**, 307–320.

18. Sedletska, Y., Giraud-Panis, M.-J. & Malinge, J.-M. (2005). Cisplatin is a DNA-damaging antitumour compound triggering multifactorial biochemical responses in cancer cells: importance of apoptotic pathways. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*, **5**, 251–265.
19. Chaney, S. G., Campbell, S. L., Bassett, E. & Wu, Y. (2005). Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **53**, 3–11.
20. Duckett, D. R., Drummond, J. T., Murchie, A. I., Reardon, J. T., Sancar, A., Lilley, D. M. & Modrich, P. (1996). Human MutS α recognizes damaged DNA base pairs containing O⁶-methylguanine, O⁴-methylthymine, or the cisplatin-d(GpG) adduct. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 6443–6447.
21. Yamada, M., O'Regan, E., Brown, R. & Karran, P. (1997). Selective recognition of a cisplatin-DNA adduct by human mismatch repair proteins. *Nucl. Acids Res.* **25**, 491–496.
22. Fourrier, L., Brooks, P. & Malinge, J.-M. (2003). Binding discrimination of MutS to a set of lesions and compound lesions (base damage and mismatch) reveals its potential role as a cisplatin-damaged DNA sensing protein. *J. Biol. Chem.* **278**, 21267–21275.
23. Karran, P. (2001). Mechanisms of tolerance to DNA damaging therapeutic drugs. *Carcinogenesis*, **22**, 1931–1937.
24. Wang, J. Y. & Edelman, W. (2006). Mismatch repair proteins as sensors of alkylation DNA damage. *Cancer Cell*, **9**, 417–418.
25. Yoshioka, K.-i., Yoshioka, Y. & Hsieh, P. (2006). ATR kinase activation mediated by MutS α and MutL α in response to cytotoxic O⁶-methylguanine adducts. *Mol. Cell*, **22**, 501–510.
26. Lin, D. P., Wang, Y., Scherer, S. J., Clark, A. B., Yang, K., Avdievich, E. *et al.* (2004). An Msh2 point mutation uncouples DNA mismatch repair and apoptosis. *Cancer Res.* **64**, 517–522.
27. Yang, G., Scherer, S. J., Shell, S. S., Yang, K., Kim, M., Lipkin, M. *et al.* (2004). Dominant effects of an Msh6 missense mutation on DNA repair and cancer susceptibility. *Cancer Cell*, **6**, 139–150.
28. Bjornson, K. P. & Modrich, P. (2003). Differential and simultaneous adenosine di- and triphosphate binding by MutS. *J. Biol. Chem.* **278**, 18557–18562.
29. Martik, D., Baitinger, C. & Modrich, P. (2004). Differential specificities and simultaneous occupancy of human MutS α nucleotide binding sites. *J. Biol. Chem.* **279**, 28402–28410.
30. Obmolova, G., Ban, C., Hsieh, P. & Yang, W. (2000). Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA. *Nature*, **407**, 703–710.
31. Joshi, A., Sen, S. & Rao, B. J. (2000). ATP-hydrolysis-dependent conformational switch modulates the stability of MutS-mismatch complexes. *Nucl. Acids Res.* **28**, 853–861.
32. Iaccarino, I., Marra, G., Dufner, P. & Jiricny, J. (2000). Mutation in the magnesium binding site of hMSH6 disables the hMutS α sliding clamp from translocating along DNA. *J. Biol. Chem.* **275**, 2080–2086.
33. Salisbury, F. R., Jr, Clodfelter, J. E., Gentry, M. B., Hollis, T. & Scarpinato, K. D. (2006). The molecular mechanism of DNA damage recognition by MutS homologs and its consequences for cell death response. *Nucl. Acids Res.* **34**, 2173–2185.
34. Blackwell, L. J., Bjornson, K. P., Allen, D. J. & Modrich, P. (2001). Distinct MutS DNA-binding modes that are differentially modulated by ATP binding and hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **276**, 34339–34347.
35. Worth, L., Jr, Bader, T., Yang, J. & Clark, S. (1998). Role of MutS ATPase activity in MutS,L-dependent block of *in vitro* strand transfer. *J. Biol. Chem.* **273**, 23176–23182.
36. Acharya, S., Foster, P. L., Brooks, P. & Fishel, R. (2003). The coordinated functions of the *E. coli* MutS and MutL proteins in mismatch repair. *Mol. Cell*, **12**, 233–246.
37. Antony, E. & Hingorani, M. M. (2004). Asymmetric ATP binding and hydrolysis activity of the *Thermus aquaticus* MutS dimer is key to modulation of its interactions with mismatched DNA. *Biochemistry*, **43**, 13115–13128.
38. Lebbink, J. H. G., Dubravka, G., Natrajan, G., Fish, A., Winterwerp, H. H. K., Sixma, T. K. & de Wind, N. (2006). Dual role of MutS glutamate 38 in DNA mismatch discrimination and in the authorization of repair. *EMBO J.* **25**, 409–419.
39. Bjornson, K. P., Allen, D. J. & Modrich, P. (2000). Modulation of MutS ATP hydrolysis by DNA cofactors. *Biochemistry*, **39**, 3176–3183.
40. Biswas, I. & Vijayvargia, R. (2000). Heteroduplex DNA and ATP induced conformational changes of a MutS mismatch repair protein from *Thermus aquaticus*. *Biochem. J.* **347**, 881–886.
41. Bellon, S. F. & Lippard, S. J. (1989). Bending studies of DNA site-specifically modified by cisplatin, transplatin and *cis*- [Pt (NH₃)₂ (N³-cytosine)Cl]⁺. *Biophys. Chem.* **35**, 179–188.
42. Malinge, J.-M., Schwartz, A. & Leng, M. (2000). Gel electrophoresis and bending in cisplatin-modified linear DNA. In *DNA-protein Interactions* (Travers, A. & Buckle, M., eds), pp. 25–35, Oxford University Press Inc, New York.
43. Bhattacharyya, A. & Lilley, D. M. (1989). Single base mismatches in DNA. Long- and short-range structure probed by analysis of axis trajectory and local chemical reactivity. *J. Mol. Biol.* **209**, 583–597.
44. Isaacs, R. J., Rayens, W. S. & Spielmann, H. P. (2002). Structural differences in the NOE-derived structure of G-T mismatched DNA relative to normal DNA are correlated with differences in (13)C relaxation-based internal dynamics. *J. Mol. Biol.* **319**, 191–207.
45. Koo, H. S., Wu, H. M. & Crothers, D. M. (1986). DNA bending at adenine. thymine tracts. *Nature*, **320**, 501–506.
46. Brabec, V., Reedijk, J. & Leng, M. (1992). Sequence-dependent distortions induced in DNA by monofunctional platinum(II) binding. *Biochemistry*, **31**, 12397–12402.
47. Hess, M. T., Gupta, R. D. & Kolodner, R. D. (2002). Dominant *Saccharomyces cerevisiae* msh6 mutations cause increased mispair binding and decreased dissociation from mispairs by Msh2-Msh6 in the presence of ATP. *J. Biol. Chem.* **277**, 25545–25553.
48. Hess, M. T., Mendillo, M. L., Mazur, D. J. & Kolodner, R. D. (2006). Biochemical basis for dominant mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* MSH6 gene. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **103**, 558–563.
49. Mendillo, M. L., Mazur, D. J. & Kolodner, R. D. (2005). Analysis of the interaction between the *Saccharomyces cerevisiae* MSH2-MSH6 and MLH1-PMS1 complexes with DNA using a reversible DNA end-blocking system. *J. Biol. Chem.* **280**, 22245–22257.
50. Lamers, M. H., Perrakis, A., Enzlin, J. H., Winterwerp, H. H., de Wind, N. & Sixma, T. K. (2000). The crystal structure of DNA mismatch repair protein MutS binding to a G/T mismatch. *Nature*, **407**, 711–717.

51. Wang, H., Yang, Y., Schofield, M. J., Du, C., Fridman, Y., Lee, S. D. *et al.* (2003). DNA bending and unbending by MutS govern mismatch recognition and specificity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 14822–14827.
52. Fishel, R. (2001). The selection for mismatch repair defects in hereditary nonpolyposis colorectal cancer: revising the mutator hypothesis. *Cancer Res.* **61**, 7369–7374.
53. Modrich, P. (1997). Strand-specific mismatch repair in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 24727–24730.
54. Feng, G. & Winkler, M. E. (1995). Single-step purifications of His6-MutH, His6-MutL and His6-MutS repair proteins of *Escherichia coli* K-12. *Biotechniques*, **19**, 956–965.
55. Blackwell, L. J., Martik, D., Bjornson, K. P., Bjornson, E. S. & Modrich, P. (1998). Nucleotide-promoted release of hMutS α from heteroduplex DNA is consistent with an ATP-dependent translocation mechanism. *J. Biol. Chem.* **273**, 32055–32062.
56. Malinge, J.-M., Pérez, C. & Leng, M. (1994). Base sequence-independent distortions induced by inter-strand cross-links in *cis*-diamminedichloroplatinum (II)-modified DNA. *Nucl. Acids Res.* **22**, 3834–3839.
57. Koo, H.-S. & Crothers, D. M. (1988). Calibration of DNA curvature and a unified description of sequence-directed bending. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **85**, 1763–1767.
58. Koo, H.-S., Drak, J., Rice, J. A. & Crothers, D. M. (1990). Determination of the extent of DNA bending by an adenine-thymine tract. *Biochemistry*, **29**, 4227–4234.

Edited by J. Karn

(Received 20 November 2006; received in revised form 3 February 2007; accepted 12 February 2007)
Available online 22 February 2007

CONCLUSION

Dans cette étude nous avons mis en évidence les changements fonctionnels de MutS— en interaction avec un composé de lésion du cisplatine. Par une étude *in vitro* nous avons montré que le composé de lésion du cisplatine module les propriétés biochimiques et le fonctionnement de MutS d'*E. coli*. Ainsi, en présence du composé de lésion étudié l'activité ATPasique est ralentie. De plus, MutS garde son affinité pour le composé de lésion en présence de l'ATP contrairement à ce qui était trouvé avec l'ADN non-platiné. Par digestion protéolytique limitée dans le temps nous avons montré que l'ADN contenant le composé de lésion induit un état conformationnel particulier de MutS en absence et en présence de l'ATP.

Ces résultats nous permettent de proposer notre modèle de signalisation MMR-dépendante – Dead End Intermediate (fig. 17).

Selon ce modèle, après la détection du composé de lésion du cisplatine, MutS adopte un état conformationnel particulier en formant un intermédiaire stable qui persiste même après le chargement de la protéine en ATP. Cet intermédiaire stable reste « bloqué » sur le composé de lésion et n'est plus capable de transloquer le long de l'ADN. On pense, donc, que cet intermédiaire formé, pourrait être à l'origine d'un signal direct.

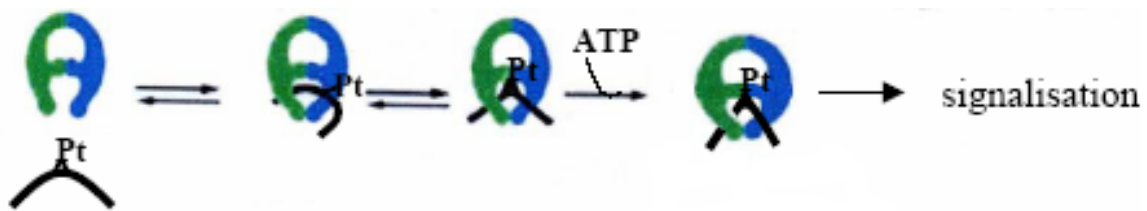


Fig. 17. Représentation schématique du modèle Dead End Intermediate. Le dimère de MutS est représenté en bleu et vert, l'hélice d'ADN avec le composé de lésion en noir.

2) Des composés de lésion du cisplatine (lésion/mésappariement) sont moins bien reconnus par HMGB1 que l'adduit majoritaire du cisplatine.

INTRODUCTION

Le *cis*-diamminedichloroplatinum(II) (cisplatine) est une puissante drogue utilisée en chimiothérapie anticancéreuse. La cible pharmacologique principale du cisplatine est l'ADN. Le cisplatine endommage la molécule d'ADN en formant majoritairement des adduits intrabrin au niveau des N7 de deux guanines adjacentes (pour revue, Wang et Lippard, 2005). Après une réplication translésionnelle, cette lésion peut donner naissance à des composés de lésion (une lésion plus un mésappariement), par incorporation d'une base mésappariée en face d'une des 2 guanines platinée.

Les déformations de la double hélice d'ADN engendrées par l'adduit intrabrin sont reconnues par plusieurs protéines cellulaires (pour revue, Sedletska et coll., 2005). Les composés de lésion du cisplatine (CL) sont spécifiquement reconnus *in vitro* par la protéine MutS du système de réparation des mésappariements (MMR) et son homologue eucaryote (MutS α) (Fourrier et coll., 2003 ; Yamada et coll., 1997;). Une relation a été établie *in vitro* et *in vivo* entre la déficience du système MMR et l'apparition d'une résistance cellulaire au cisplatine (Drummond et coll., 1996 ; Vaisman et coll., 1998 ; Fink et coll., 1997). Des études récentes ont montré que des duplexes d'ADN contenant un CL avec une thymine mésappariée à la guanine platinée en 3' ou en 5' modulent les propriétés biochimiques de MutS ce qui suggère qu'ils peuvent jouer un rôle dans la signalisation des dommages de l'ADN induits par le cisplatine (Salsbury et coll., 2006 ; Sedletska et coll., 2007). Des expériences de réparation *in vitro* montrent que l'ADN-glycosylase bactérienne MutY ne peut pas réparer les mésappariements G/A des CL du cisplatine (Fourrier et coll., 2003) ce qui suggère que la reconnaissance d'un mésappariement est inhibée par le CL du cisplatine. La reconnaissance des CL par d'autres protéines cellulaires n'a pas encore été étudiée. Parmi les protéines cellulaires pouvant se fixer à des CL, HMGB1 est une protéine candidate car elle reconnaît spécifiquement l'ADN courbé et comme nous l'avons montré précédemment, le CL où une thymine est opposée à la guanine platinée en 3' induit une courbure rigide de l'ADN (Sedletska et coll., 2007).

Des études *in vitro* ont montré que la reconnaissance de la lésion intrabrin d(GpG) du cisplatine par les protéines du système de réparation par excision est inhibée par la protéine chaperonne HMGB1 (Pil et Lippard., 1992 ; Huag, et coll., 1994). La protéine HMGB1 qui

participe à l'assemblage de la chromatine est très abondante chez l'homme (1 protéine pour 1 kb) ; elle est composée de deux domaines de reconnaissance de l'ADN (boîtes A et B) et une queue acide en C-terminal chargée négativement (pour revue Ulloa et Messmer, 2006). Il a déjà été montré que HMGB1 reconnaît les duplexes d'ADN contenant l'adduit majoritaire du cisplatine d(GpG) (Chow et coll., 1995 ; Dunham et Lippard, 1997). La reconnaissance de l'ADN comportant la lésion intrabrin du cisplatine se fait *via* la boîte A de HMGB1 et la queue acide diminue fortement l'affinité de HMGB1 pour l'ADN en raison des charges négatives (Jung & Lippard., 2003). A l'heure actuelle on ne sait pas si HMGB1 reconnaît les CL.

La reconnaissance des CL par HMGB1 pourrait « masquer » cette lésion et empêcher les protéines du système de réparation d'accéder à l'adduit et de le réparer. Le but de notre étude est de déterminer si les CL sont reconnus par HMGB1 et de définir le CL le moins reconnu. Afin d'étudier la reconnaissance des CL par HMGB1, nous avons utilisé la technique de retardement de migration électrophorétique. Pour vérifier si HMGB1 peut moduler la fixation du système MMR sur un CL, nous avons aussi réalisé des expériences de compétition entre MutS et HMGB1 par résonance plasmonique de surface. Nous avons montré que HMGB1 reconnaît les CL avec une affinité plus faible que la lésion intrabrin. Des expériences de compétition entre MutS et HMGB1 ont montré que MutS reconnaît un CL même pour un rapport MutS : HMGB1 de 1/50.

D'autre part, nous montrons, que les CL induisant la courbure la plus forte sont les moins reconnus suggérant que le mésappariement joue un rôle dans le mécanisme de reconnaissance des CL par HMGB1.

MATERIELS ET METHODES

Matériels.

Les oligonucléotides simple brin (sb) de 21-24 bases et les oligonucléotides sb de 24-bases biotinylés ont été fournis par Eurogentec ; le [γ - 32 P]ATP a été fourni par Amersham Biosciences ; la kinase T4, l'ADN ligase T4 et le sérumalbumine de veau (BSA) proviennent de chez New England BioLabs. L'acrylamide et bisacrylamide ont été fournis par Biorad. Le cisplatine et la spermidine proviennent de chez Sigma. Les colonnes HQ et HS ont été fournies par Pharmacia. Le surfactant P-20 et les puces-streptavidine (SA) proviennent de chez BIAcore AB (Upssala, Suède).

Purification des protéines.

La protéine HMGB1 entière de rat a été gracieusement fournie par le Dr. François Strauss d'Institut Jaques Monod.

La protéine HMGB1-AB de rat a été produite dans des cellules BL21 (λ DE3) d'*E. coli*. Les cellules transformées sont incubées à 37°C sous agitation jusqu'à obtention d'une absorbance de 0.6 à 600 nm et l'induction est déclenchée par l'ajout de 1-thio- β -D-galactopyranoside à une concentration finale de 0.3 mM pendant 2 heures à 37°C. Après centrifugation les culots cellulaires sont repris dans le tampon contenant 20mM Tris (pH 7.4), 0.2 M NaCl, 1mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF et soniqués. Toutes les étapes de purification se font à 4°C. Le lysat est séparé des débris cellulaires par la centrifugation de 20 minutes à 10000 rpm. Le surnageant est amené à 45 % de sulfate d'ammonium et agité 20 minutes. Après l'augmentation de la concentration de persulfate d'ammonium à 75 % l'agitation est poursuivie pendant 20 minutes. Ensuite les tubes sont centrifugés et le culot est repris dans un tampon phosphate 20 mM pH 7 et déposé sur une colonne échangeuse d'anions HQ de Biocad. Après le passage sur la colonne l'extrait non-retenu est collecté et déposé sur la colonne échangeuse de cations HS de Biocad. La protéine est éluée en 500 mM NaCl. Ensuite la protéine est concentrée par centrifugation dans des unités de filtration Amicon puis elle est déposée sur une colonne Sephadex G-50 et éluée avec le tampon phosphate 20 mM (pH 7). La protéine est récupérée et dialysée contre 2 mM β -mercaptoéthanol et lyophilisée. Le lyophilisat est stocké à -70 °C et repris dans le tampon de stockage de HMGB1-AB (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1mM EDTA, 2 mM β -mercaptoéthanol) avant l'utilisation.

La protéine MutS étiquetée avec une queue de six histidines a été préparée selon le protocole décrit précédemment (Fourrier et coll., 2003).

Purification et platination de l'ADN.

La séquence des oligonucléotides utilisés dans cette étude est présentée sur la Figure 1. Les oligonucléotides non-biotinylés simple brin (sb) utilisés pour les gels de retardement électrophorétique ont été purifiés par HPLC (High Pressure Liquide Chromatography) selon le protocole décrit préalablement (Fourrier et coll., 2003). Les oligonucléotides sb biotinylés en 3' ont été purifiés sur un gel dénaturant 24% acrylamide/bisacrylamide 19 :1, 7 M urée, 90 mM Tris borate, 1 mM EDTA. La préparation et la purification des oligonucléotides contenant une lésion du cisplatine 1,2-d(GpG) a été effectuée comme décrit préalablement (Malinge et coll., 2000).

Les oligonucléotides sb purifiés ont été radio-marqués selon le protocole décrit dans Fourrier et coll., 2003. Le brin radiomarqué est hybridé avec son brin complémentaire par ajout de quantités équimolaires d'oligonucléotides sb dans 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 60 mM NaCl, 0.1 mM EDTA à 80°C suivi d'un refroidissement lent à 4°C.

L'hybridation de brin biotinylé se fait selon le protocole décrit ci-dessus dans un rapport molaire des brins 2 :1 brin non biothinylé: brin biotinylé.

Gel de retardement électrophorétique

Le brin radiomarqué de 24 pb (2nM) est incubé dans un volume final de 20 µl avec des quantités croissantes de HMGB1 dans 10 mM HEPES (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 50 mM LiCl, 100 mM NaCl, 1 mM spermidine, 0.2 mg/ml BSA, 0.05% Nonidet. Après 30 minutes d'incubation dans la glace 2 µl de Ficoll 10% est ajouté et la réaction chargée sur un gel natif de 8% polyacrylamide (29 :1, acrylamide:bisacrylamide, 45 mM Tris borate, 0.5 mM EDTA). Après 30 minutes de migration sous 13 V/cm à 4°C les gels sont séchés, puis placés sous un écran PhosphoImager visualisés sur un PhosphoImager Storm 860 et la fraction d'ADN complexé par la protéine est déterminée à l'aide du logiciel ImageQuant 5.1 (Amersham Bioscience). Les constantes de dissociation ont été obtenues à l'aide de logiciel Origin 6.0 (Microcal, Northampton, MA).

Préparation de multimères platinés et non platinés.

La séquence des oligonucléotides utilisés dans les expériences de détermination de la courbure et du déroulement de l'ADN est indiquée sur la figure 1a. Les duplexes d'ADN avec les extrémités cohésives ont été préparés par hybridation de quantités équimolaires des deux brins complémentaires à des concentrations de 50-100 μM selon le protocole décrit ci-dessus. Pour la ligation des duplexes, nous avons utilisé le protocole précédemment décrit (Malinge et coll., 2000). Brièvement, 0.3 nmole de brins d'ADN est incubé avec 1 μl d'ATP[γ - ^{32}P] (110TBq/mmmole) et 1 μl de kinase T4 pendant 45 minutes à 37°C dans le tampon 70 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM MgCl_2 , 5 mM dithiothreitol dans 10 μl final. Ensuite 1 μl de 20 mM ATP et 1 μl de kinase sont ajoutés au mélange et l'incubation est poursuivie pendant 30 minutes pour phosphoryler toutes les extrémités 5' -OH. La solution de duplexe phosphorylé est évaporé à 7 μl puis est ligaturé en multimères par addition de 1 μl d'ADN ligase T4 et 2 μl de tampon de ligase 10X (500 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM MgCl_2 , 10 mM ATP, 100 mM dithiothreitol, 250 $\mu\text{g/ml}$ BSA) dans 11 μl final. Après trois heures d'incubation à température ambiante les produits de ligation sont chargés sur un gel natif de 8% de polyacrylamide (29 :1, acrylamide :bisacrylamide (w/w), 90 mM Tris-borate, 1 mM EDTA (pH 8.3)) et séparés sous 16 V/cm à température ambiante pendant 5h. Après séchage, les gels sont placés sous écran PhosphoImager comme décrit ci-dessus. La valeur de courbure est calculée d'après l'équation de Koo (Koo et coll., 1988) :

$$K-1 = (9.6 \times 10^{-5}L^2 - 0.47)(RC)^2$$

où L représente la longueur en pb d'un monomère avec une mobilité relative K et RC est la courbure relative de l'ADN contenant un tract de 6 adenines qui été déterminée à 18 degrés (Koo, et coll., 1990).

Résonance plasmonique de surface.

Les oligonucléotides de 24pb biotinylés ont été fixés (50 RU) sur une puce SA de biacore *via* les interactions biotine-stréptavidine, par injection d'une solution 100 nM de duplexes d'ADN GG/CC et G*G*/CT à 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ dans 10 mM Tris (pH 7.5), 630 mM NaCl, 3mM EDTA, 2% glycérol. Les protéines HMGB1 et MutS sont injectées à un débit de 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ dans le tampon de fixation contenant 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM dithiothreitol, 0.005% surfactant P-20, 2% glycérol. Dans les expériences de compétition les protéines sont d'abord mélangées et préincubées pendant 10 minutes à 4°C et

ensuite injectées sur la puce. Les régénérations de la surface de la puce sont effectuées par injection de 10 μ l de tampon de course contenant 0.04% de SDS après chaque injection de protéine.

RESULTATS

Les composés de lésion du cisplatine sont moins bien reconnus par la protéine HMGB1 que la lésion intrabrin 1,2 d(GpG) du cisplatine.

L'accessibilité des lésions et des CL aux protéines de système de réparation peut être modulée par d'autres protéines cellulaires comme la protéine HMGB1. En effet, des études antérieures *in vitro* ont montré que la lésion intrabrin du cisplatine d(GpG) est reconnue par la protéine HMGB1 (Chow et coll., 1995 ; Dunham et Lippard, 1997). Plusieurs études indiquent qu'en se fixant sur les duplexes d'ADN contenant cette lésion HMGB1 pourrait masquer la lésion et empêcher les protéines du système de réparation par excision d'accéder et de réparer celle-ci *in vitro* (Pil et coll., 1992 ; Huang, et coll., 1994). On ne sait pas si HMGB1 reconnaît des CL du cisplatine et si MMR pourrait reconnaître un CL en présence de HMGB1.

Nous avons utilisé la technique de retardement de migration électrophorétique pour déterminer les constantes de dissociation (K_d) des complexes HMGB1-ADN. Les duplexes d'ADN 24-mers contenant chacun un CL unique sont incubés avec des concentrations croissantes de protéine HMGB1 (fig. 1B). Ensuite les complexes ADN-HMGB1 sont séparés dans un gel de polyacrylamide 8%. Sur la figure 2 sont présentés les gels de titration de HMGB1 avec les duplexes contenant la lésion intrabrin du cisplatine (G*G*/CC) et les duplexes G*G*/CG et G*G*/GC contenant les CL. On observe que l'homoduplexe platiné (G*G*/CC) est mieux reconnu par HMGB1 que les CL G*G*/CG et G*G*/GC. Les CL 3'G et 5'G sont environ 5 et 2 fois moins bien reconnus par HMGB1 que la lésion intrabrin. Comme montré dans le tableau 1, tous les CL du cisplatine sont moins bien reconnus par HMGB1 que la lésion intrabrin. Il faut noter que la détermination des constantes de dissociation de la protéine HMGB1 et des duplexes d'ADN contenant les CL est plus difficile en raison d'une affinité proche de celle pour l'ADN non spécifique. Un autre résultat intéressant est que la position du mésappariement opposé au site de platination joue un rôle dans la reconnaissance du composé de lésion par HMGB1. En effet, on observe que les CL 5' semblent mieux reconnus que les CL 3'.

Contrairement à la lésion intrabrin majoritaire, nos résultats montrent que certains composés ont une spécificité de reconnaissance très faible indiquant que les CL sont de faibles substrats pour HMGB1.

HMGB1-AB montre une préférence pour les duplexes d'ADN contenant un CL avec la base mésappariée opposé à la guanine platinée en 5'.

Les CL du cisplatine étant moins bien reconnus par HMGB1 que l'homoduplexe platiné et étant donné que la queue acide de HMGB1 diminue l'affinité de cette protéine pour l'ADN, nous avons choisi d'utiliser la protéine tronquée HMGB1-AB pour déterminer son affinité pour différents CL (fig. 1C) comme cela a été fait dans de nombreuses études d'interaction avec l'ADN platiné (Jung & Lippard, 2003).

Les duplexes platinés 24-mers (fig. 1B) contenant un CL unique ont été incubés avec la protéine HMGB1-AB, et ensuite, séparés dans un gel d'acrylamide natif. Les résultats des titrations avec des concentrations croissantes de HMGB1-AB en présence d'homoduplexe platiné (G*G*/CC) et de deux composés de lésion G*G*/CT et G*G*/TC sont présentés sur la figure 3. On remarque que l'homoduplexe platiné est mieux reconnu par HMGB1-AB que les deux CL. De plus, HMGB1-AB a une préférence significative pour le duplexe contenant le CL G*G*/TC par rapport au duplexe contenant le CL G*G*/CT. Les constantes de dissociation obtenues dans les expériences de titration sont présentées dans le tableau 1. On observe que la constante de dissociation de HMGB1-AB est de 3.5 (± 1.2) nM pour la lésion intrabrin du cisplatine (G*G*/CC) ce qui est supérieur à la valeur rapportée dans la littérature (Lippard & Jung, 2003) ; cela peut s'expliquer par la différence des séquences des duplexes d'ADN et par la longueur plus importante de la protéine HMGB1-AB tronquée utilisée dans notre étude. La spécificité de la protéine HMGB1-AB est environ 46 (K_d du duplexe GG/CC : K_d du duplexe G*G*/CC). En accord avec les résultats obtenus ci-dessus avec la protéine HMGB1 entière, l'affinité de HMGB1-AB pour les duplexes contenant un CL est moins forte que pour l'homoduplexe platiné G*G*/CC. Ainsi, le K_d de HMGB1-AB en présence du duplexe G*G*/CT est environ 15 fois plus grand que le K_d de HMGB1-AB pour l'homoduplexe platiné G*G*/CC et la spécificité de HMGB1-AB pour le duplexe G*G*/CT est de 3 (fig. 4). Le CL du cisplatine le mieux reconnu par HMGB1-AB est le CL 5'G avec un K_d de 3.8 (± 1.2) nM, ce qui est en accord avec les résultats obtenus avec la protéine entière. De plus, sur les figures 4 et 5 on voit que l'affinité de HMGB1-AB pour les CL dépend de la position du mésappariement opposé à l'adduit d(GpG). Ainsi, les CL 3' sont moins bien reconnus que les CL 5'. Un effet similaire de la position du mésappariement sur la reconnaissance des composés de lésion par HMGB1-AB est observé pour les CL avec les adénines et guanines mésappariées en face des guanines platinées. Il faut noter, que le duplexe G*G*/GC est le mieux reconnu par HMGB1-AB et l'affinité de la protéine pour ce duplexe est de 3.8 (± 1.2) nM ce qui est proche du K_d déterminé avec le duplexe G*G*/CC.

Les CL avec une base mésappariée opposée à la guanine platinée située en 3' de l'adduit intrabrin 1,2d(GpG) induisent une courbure plus importante que lorsque la base mésappariée est située en 5'.

Comme il a été montré dans le chapitre précédent, l'affinité de HMGB1 et de sa forme tronquée HMGB1-AB pour les CL du cisplatine est plus faible que pour la lésion intrabrin et, de plus, cette reconnaissance dépend de la position du mésappariement au sein du CL.

Des études antérieures ont montré que l'adduit intrabrin du cisplatine 1,2d(GpG) (Bellon et Lippard, 1990) et le CL 3'T (Sedletska et coll., 2007) induisent une courbure rigide de l'ADN. Bien que la courbure du duplexe G*G*/CT soit plus forte, sa reconnaissance est beaucoup plus faible. Pour vérifier si HMGB1 reconnaît moins bien des duplexes platinés ayant une courbure plus forte quand ils contiennent une base mésappariée, nous avons déterminé la courbure induite par les différents CL. Nous avons d'abord comparé le retardement électrophorétique de multimères formés après ligation des duplexes platinés de 21 paires de bases (pb) contenant un CL. En effet, nous avons trouvé précédemment que le retard de migration maximum était obtenu avec un duplexe platiné de 21 pb lorsque le CL a une thymine mésappariée en 3' de la guanine platinée de l'adduit intrabrin 1,2 d(GpG).

Sur la Fig. 5, nous voyons que les multimères ayant un CL dont la base mésappariée est située en face de la guanine platinée en 3' de l'adduit migrent plus lentement que les composés dont la base mésappariée est située en face de la guanine platinée en 5'. Ce résultat suggère que la courbure induite par des CL dont la base mésappariée est en 3' est plus forte que ceux dont la base mésappariée est en 5'. Afin de vérifier ce résultat, nous avons déterminé la valeur de la courbure en utilisant des multimères de duplexes platinés de 20, 21, 22 et 23 pb (données non montrées), afin de vérifier que nous déterminons bien la courbure maximum pour chaque CL. Cette étude nous a permis aussi de déduire la valeur du déroulement induit par chaque CL (non montré).

On peut noter que le déroulement de l'ADN comportant des CL est différent de celui contenant l'adduit intrabrin GpG du cisplatine. Le déroulement de la lésion intrabrin est de 17 degrés tandis que le déroulement des CL varie entre 16 et 24 degrés. D'autre part, on voit que le déroulement des CL 3' (19-24 degrés) est plus important que le déroulement des CL 5' (16-18 degrés) correspondant. Nos résultats indiquent que les déformations de la double hélice d'ADN au niveau global sont plus prononcées pour les CL dont la base mésappariée est située en 3'. Contrairement à ce qui est généralement admis sur la relation entre la courbure de l'ADN et la reconnaissance par HMGB1, les CL ont la particularité d'être mieux reconnus

lorsque la courbure de l'ADN est plus faible. Ce résultat suggère que les déformations autres que la courbure jouent un rôle dans la reconnaissance comme des déformations au niveau nucléotidique ou le déroulement.

MutS reconnaît préférentiellement un CL en présence de HMGB1.

Pour réaliser les expériences de compétition entre MutS et HMGB1 nous avons utilisé la technologie de résonance plasmonique de surface. Les duplexes utilisés dans cette expérience sont les mêmes que ceux utilisés pour les gels de retardement électrophorétique, la seule différence étant le marquage en 3' par une biotine, qui permet leur fixation sur la puce SA. MutS et HMGB1 sont injectée à des concentrations qui permettent de fixer tous les duplexes contenant le CL du cisplatine fixés sur la surface de la puce, ce qui correspond à 20 nM pour MutS et 500 nM pour HMGB1. Les signaux obtenus correspondent à 86 RU pour 500 nM de HMGB1 et 560 RU pour 20 nM de MutS ce qui est en accord avec l'estimation théorique du signal attendu d'après les poids moléculaires des protéines. L'injection simultanée de deux protéines nous permettra d'avoir un signal qui sera donc différent en fonction de la protéine fixée. Ainsi, si c'est HMGB1 qui est la protéine préférentiellement fixée sur la puce on devrait avoir un signal proche de signal obtenu lors de l'injection de HMGB1 seule (86 RU environ). Or, lorsque les protéines sont co-injectées sur la surface de la puce on observe un signal de 487 RU ce que est proche du signal observé lors de l'injection de 20 nM de MutS. Ce résultat montre que dans nos conditions expérimentales lors d'une compétition MutS-HMGB1 MutS se fixe préférentiellement.

Cette expérience suggère que lors d'une compétition entre MutS et HMGB1 *in vivo*, des CL du cisplatine seront reconnus préférentiellement par MutS.

DISCUSSION

Dans ce travail nous montrons, que la protéine HMGB1 (Chow et coll., 1995 ; Dunham et Lippard, 1997) a une affinité pour les CL du cisplatine (lésion et mésappariement) beaucoup plus faible que pour l'adduit intrabrin du cisplatine 1,2d(GpG).

Contrairement au duplexe contenant la lésion intrabrin du cisplatine, HMGB1 a une faible affinité pour les duplexes contenant les CL du cisplatine (fig. 2 et tableau 1). La spécificité de reconnaissance de HMGB1 pour des duplexes contenant les CL est faible puisque l'affinité est proche de la reconnaissance pour l'ADN non-spécifique (tableau 1) tandis que la spécificité de HMGB1 pour la lésion intrabrin est d'environ 10 fois. On voit clairement que les CL du cisplatine sont moins bien reconnus par la protéine HMGB1 que la lésion intrabrin. De plus, les CL moins bien reconnus par HMGB1 sont 3'T, 3'A et 3'G ce qui montre une préférence de HMGB1 pour les CL avec un mésappariement en 5'. Afin d'étudier plus en détails l'interaction entre l'ADN contenant un CL du cisplatine et HMGB1, nous avons effectué une étude fine avec la protéine HMGB1-AB dépourvue de la queue acide. Cette protéine ayant une forte affinité pour la lésion intrabrin du cisplatine ($K_d = 3.5 \pm 1.2$ nM) a une affinité sensiblement plus faible pour les CL du cisplatine ce qui rejoint le résultat obtenu avec la protéine HMGB1 entière. Le CL G*G*/GC étant le mieux reconnu par HMGB1-AB et HMGB1 entière. L'importance de la position du mésappariement au sein de CL pour la reconnaissance des CL par HMGB1 est confirmée dans les études fines avec la protéine HMGB1-AB. En effet les CL' 3 sont moins bien reconnus par HMGB1-AB que les CL 5'.

Il est logique que les CL les plus accessibles pour MutS sont ceux qui sont le moins bien reconnus par HMGB1. On remarque que le CL 3'T le moins bien reconnu par HMGB1 est le CL le mieux reconnu par la protéine MutS du système de réparation des mésappariements (Fourrier et coll., 2003) alors que la lésion intrabrin est très faiblement reconnue par cette protéine (Fourrier et coll., 2003). De plus, il a été montré antérieurement, que les duplexes contenant les CL 3'T et 5'T modulent les propriétés biochimiques de MutS et seraient donc capables d'induire un signal apoptotique direct cisplatine-dépendant (Salsbury et coll., 2006 ; Sedletska et coll., 2007). Une faible reconnaissance de ce CL par HMGB1 suggère qu'il pourra être reconnu par la protéine MutS lors d'une compétition MutS-HMGB1. Cette hypothèse est confirmée par les expériences de compétition *in vitro* entre MutS et HMGB1. En effet, en présence de duplexe G*G*/CT, MutS se fixe

préférentiellement sur le CL. Il faut noter que le K_d de HMGB1 en présence du duplexe G*G*/CT est au moins 5 fois plus fort qu'en présence de la lésion intrabrin du cisplatine 1,2 d(GpG). Ce résultat ainsi que celui obtenu dans l'expérience de compétition suggèrent que la protéine HMGB1 se fixera de préférence sur les lésions intrabrin du cisplatine tandis que les CL du cisplatine seront préférentiellement reconnus par le système MMR.

L'affinité de HMGB1 pour la lésion intrabrin du cisplatine ainsi que la modulation de la diminution de sensibilité au cisplatine de cellules *HMGB1*⁻ suggère que l'accessibilité de l'adduit intrabrin est inhibée *in vivo* par le système de réparation. On sait que des cellules déficientes pour le système MMR, deviennent aussi résistantes au cisplatine. Dans ces cellules on s'attend pourtant à ce que HMGB1 protège la lésion intrabrin qui reste inaccessible au système MMR et donc à ce que les cellules gardent la même sensibilité. Ces résultats suggèrent que l'adduit intrabrin n'est pas impliqué dans la réponse MMR dépendante. Cela suggère que les CL sont eux impliqués dans la réponse MMR dépendante et qu'ils restent accessibles aux protéines MMR même en présence de HMGB1. Dans le cas où les CL seraient recouverts par HMGB1 *in vivo*, on devrait s'attendre à une accessibilité des protéines MMR dans les cellules *HMGB1*⁻, et donc à une augmentation de la sensibilité au cisplatine. Or, on observe une résistance des cellules *HMGB1*⁻ traitées par le cisplatine. L'ensemble de ces observations sont en accord avec nos résultats montrant que HMGB1 a une faible affinité pour la plupart des CL étudiés.

La préférence de HMGB1 pour les duplexes contenant un CL 5' moins courbé que les CL 3' suggère que la courbure n'est pas le seul facteur favorisant la reconnaissance des CL du cisplatine par HMGB1. On peut supposer que les CL avec un mésappariement opposé au site de platination en position 5' induisent des perturbations structurales de la double hélice d'ADN particulières qui favorisent leur reconnaissance par la protéine HMGB1. Jung et Lippard ont déjà utilisé le mutant F37A (phénylalanine 37 intercalée dans l'hélice d'ADN lors de la reconnaissance de la lésion intrabrin du cisplatine par HMGB1 est remplacée par alanine) de HMGB1 (Jung et Lippard, 2003) pour les études d'interactions entre les domaines de HMGB1 et l'ADN platiné. On peut envisager l'utilisation de cette protéine pour étudier le mécanisme impliqué dans la reconnaissance des CL3' et CL5' du cisplatine.

En conclusion, dans ce travail nous montrons qu'en présence de HMGB1 des CL du cisplatine pourraient être reconnus par MutS.

LEGENDES DES FIGURES

Protein	Unplatinated and platinated duplexes	Kd, nM
HMGB1	G*G*/CC	121 ± 5.5
	G*G*/CT	> 700
	G*G*/TC	> 500
	G*G*/CA	> 1000
	G*G*/AC	≈ 400 ± 100
	G*G*/CG	≈ 600 ± 120
	G*G*/GC	≈ 200 ± 50
	GG/CC	> 1500
HMGB1-AB	G*G*/CC	3.5 ± 1.2
	G*G*/CT	51.2 ± 4.8
	G*G*/TC	13.6 ± 1
	G*G*/CA	21.6 ± 3
	G*G*/AC	8.9 ± 1.5
	G*G*/CG	22.3 ± 4.1
	G*G*/GC	3.8 ± 1.2
	GG/CC	≈ 160 ± 50

Table I : reconnaissance des composés de lésion du cisplatine par HMGB1 et HMGB1-AB. Les constantes de dissociation (Kd) de HMGB1 et HMGB1-AB ont été déterminées en utilisant des duplexes d'ADN de 24-mers contenant un CL unique ou une lésion 1,2 d(GpG)

Platinated duplexes	Bending, degrees	Unwinding, degrees
G*G*/CC	32	17
G*G*/CT	39	19
G*G*/TC	26	17
G*G*/CA	38	20
G*G*/AC	30	16
G*G*/CG	40	24
G*G*/GC	34	18

Table II : Courbure de l'hélice d'ADN double brin induite par les composés de lésion du cisplatine. Les valeurs de courbure et de déroulement ont été déterminées par observation de retardement de migration électrophorétique des multimères contenant les composés de lésion (voir Matériels et Méthodes).

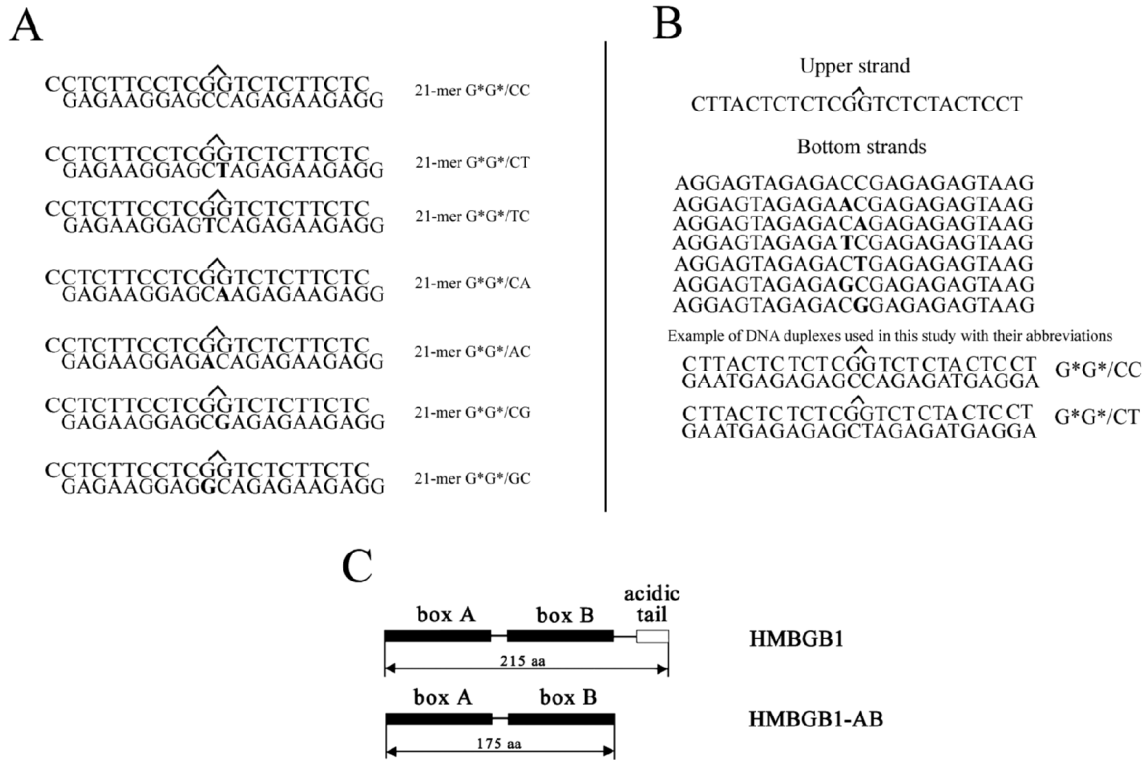


Fig. 1. A, duplexes d'ADN de 21-mer utilisés pour la comparaison de la courbure induite par les CL, le mésappariement est indiqué en gras ; B, séquences des oligonucléotides utilisés dans les expériences d'interaction avec la protéine HMGB1 entière et HMGB1-AB. Le brin riche en pyrimidine (en haut) contenant le site de platination est hybridé avec le brin complémentaire riche en purines contenant ou non un mésappariement (en gras) ; C, représentation schématique de la structure de HMGB1 et HMGB1-AB.

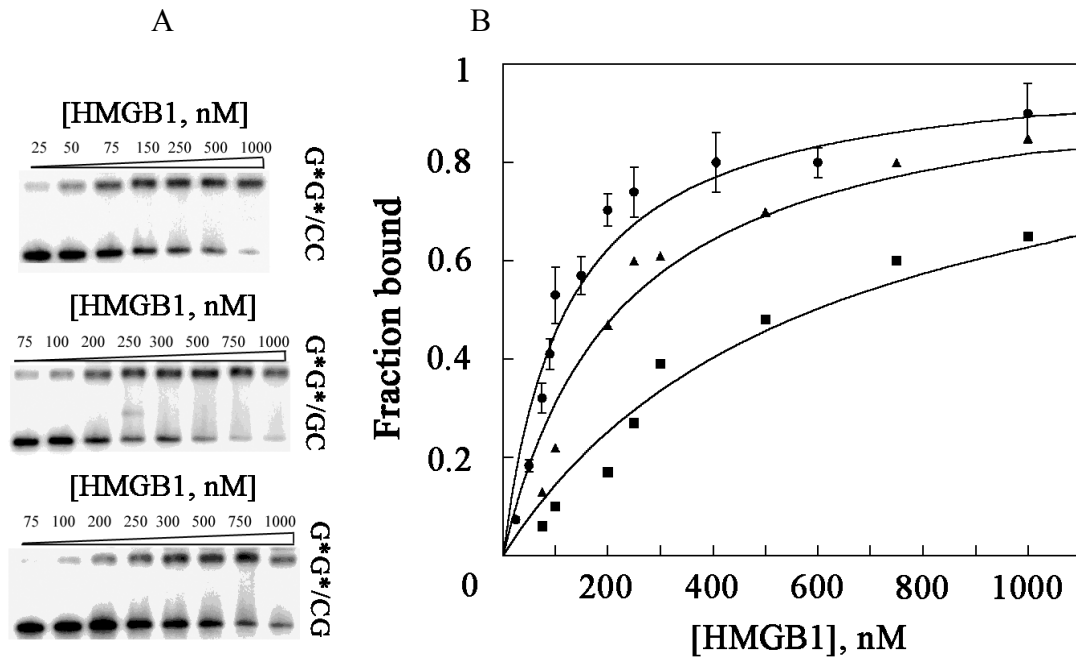


Figure 2 : Reconnaissance de l'adduit intrabrin du cisplatine et des duplexes contenant les CL G*G*/CG et G*G*/GC par HMGB1 entière. (A) Expériences de titration de l'homoduplexe platiné G*G*/CC (●), des hétéroduplexes platinés G*G*/GC (▲), G*G*/CG (■) avec des concentrations croissantes de HMGB1 entière. (B) le lissage correspondant aux résultats obtenus par gel.

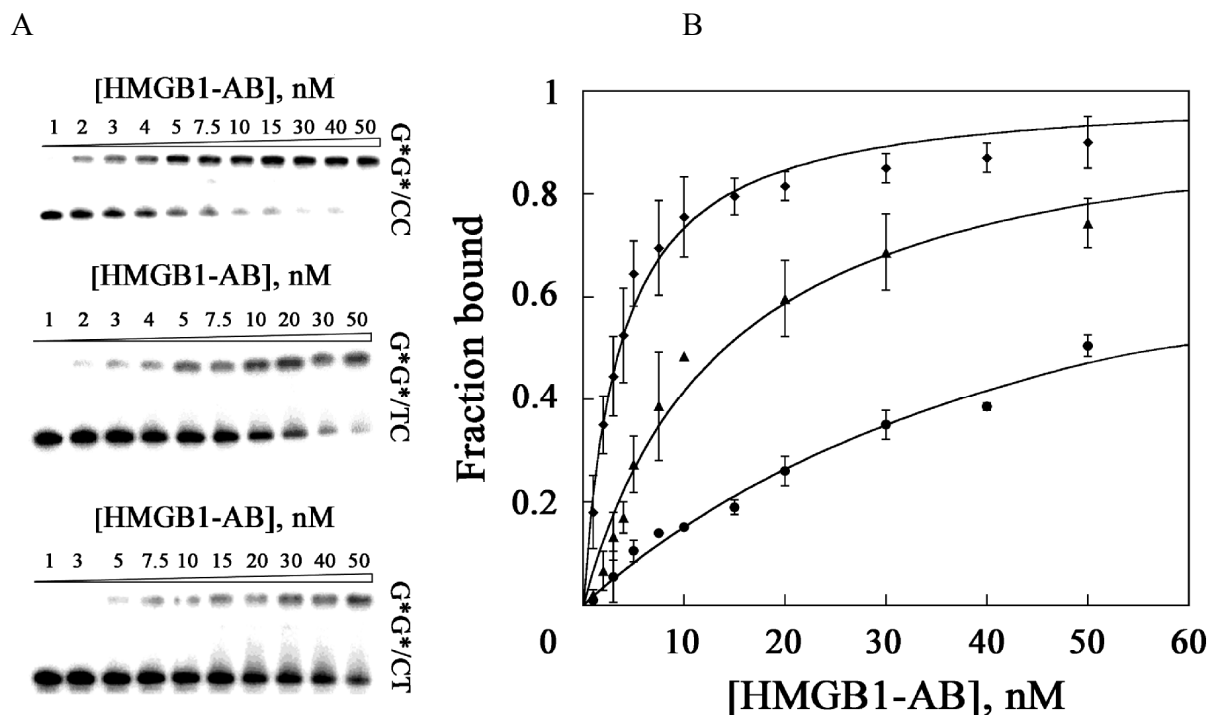


Figure 3 : La reconnaissance différentielle de la lésion intrabrin du cisplatine (GpG) et de 2 composés de lésion par HMGB1-AB. (A) Expériences de titration de l'homoduplexe platiné G*G*/CC (◆), des hétéroduplexes platinés G*G*/CT (●), G*G*/TC (▲) avec des concentrations croissantes de HMGB1-AB (comme indiqué). (B) Le lissage correspondant aux résultats obtenus par gel.

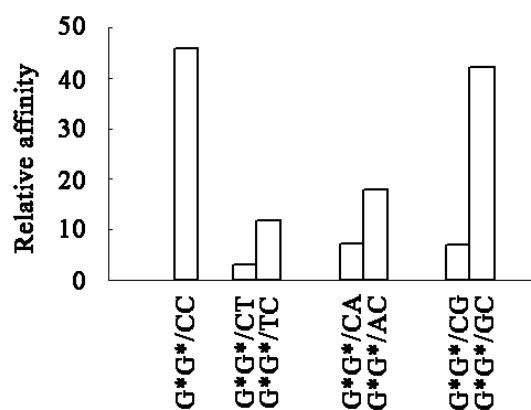


Figure 4 : HMGB1-AB reconnaît avec plus d'affinité les duplexes avec une base mésappariée opposée à la guanine platinée en 5' que les duplexes avec une base mésappariée opposée à la guanine platinée en 3'. L'histogramme montre les affinités relatives de HMGB1-AB pour les duplexes contenant la lésion intrabrin ou les CL du cisplatine.

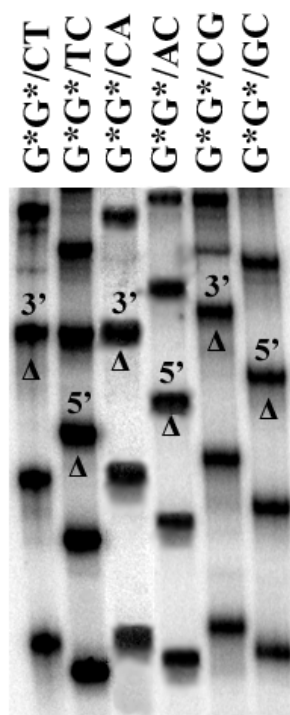


Figure 5 : Gel d'électrophorèse des produits de ligation de duplexes 21-mères contenant 6 CL du cisplatine. La préparation des multimères radiomarqués a été décrite dans Matériels et Méthodes. Les triangles indiquent la migration de multimères de 105 paires de base (5-mers) et la position du mésappariement (5' ou 3') au sein du composé de lésion est marquée au dessus.

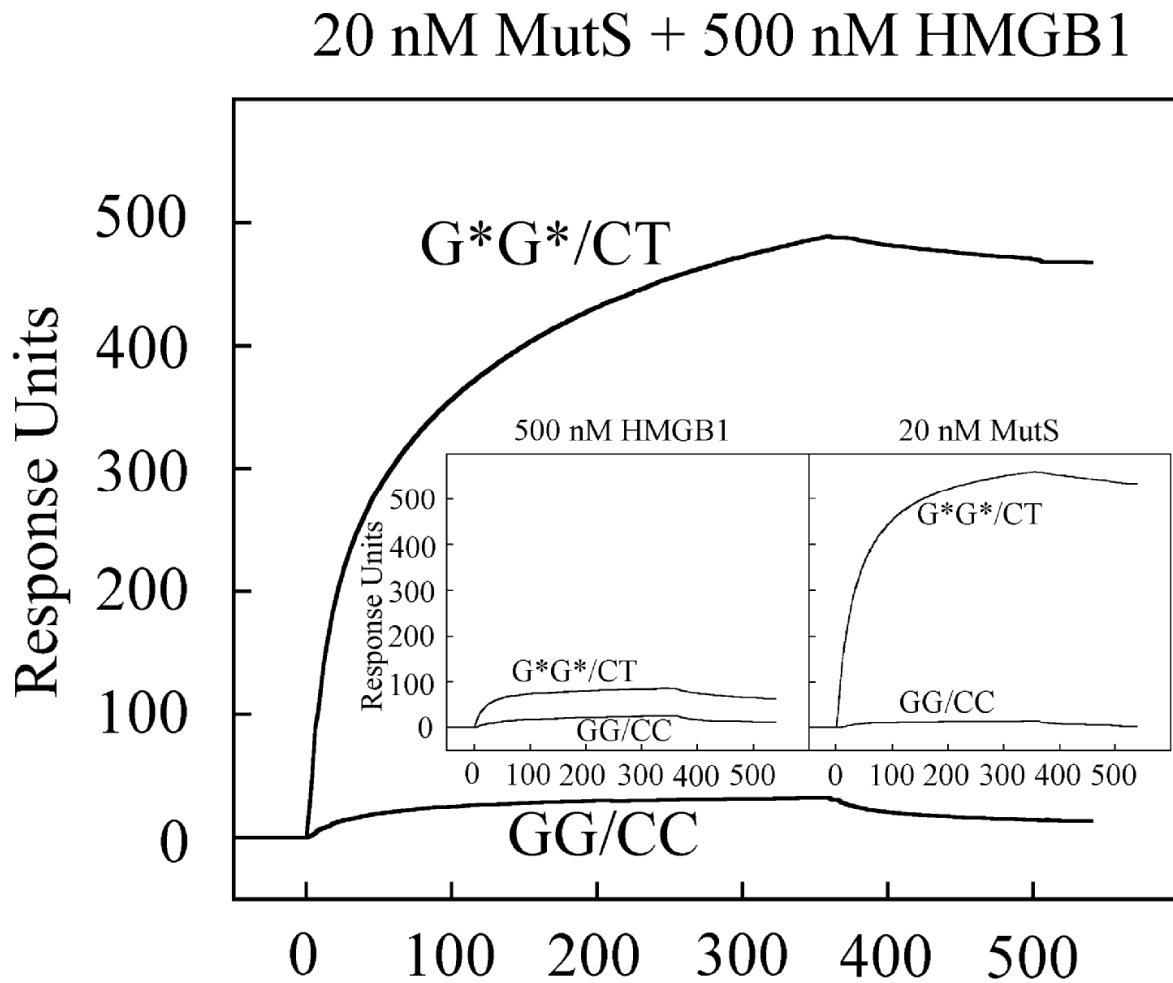


Figure 6. Compétition entre MutS et HMGB1 par résonance plasmonique de surface. Le mélange contenant 20 nM MutS et 500 nM HMGB1 a été injecté sur la surface d'une puce avec les duplexes G*/G*/CT et G*/G*/CC (50 RU) préfixés. Dans l'insert sont présentés les sensogrammes de reconnaissance de duplexe G*/G*/CT et GG/CC par 500 nM de HMGB1 et 20 nM de MutS.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les dommages de l'ADN créés par le cisplatine déclenchent une réponse cellulaire très complexe en induisant nombreuses réponses cellulaires dont l'inhibition de la transcription de l'ADN, la mort cellulaire par nécrose, l'arrêt du cycle cellulaire, la survie cellulaire avec la mutagenèse ou l'apoptose dépendant du système MMR (fig. 18).

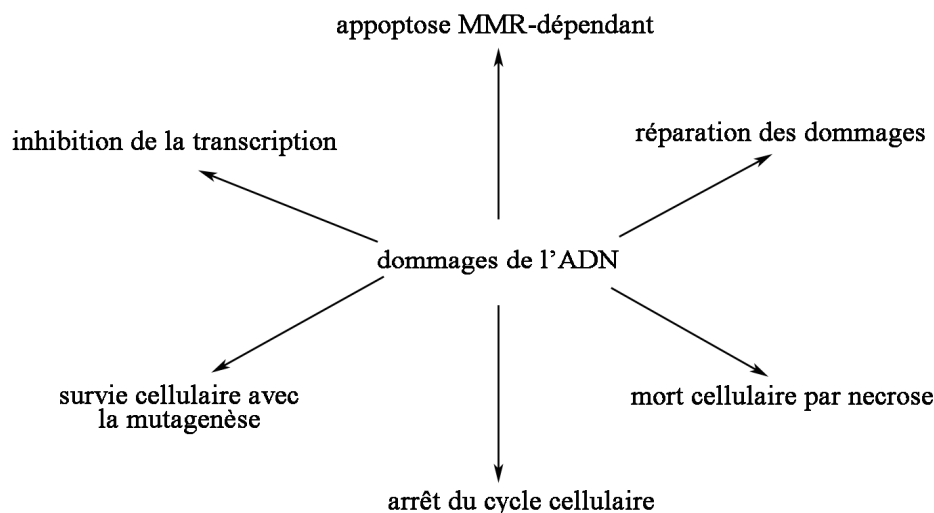


Fig. 18 Présentation schématique des voies déclenchées par les dommages de l'ADN induit par le cisplatine.

L'induction de l'apoptose par les lésions du cisplatine sur l'ADN est la voie la plus importante pour la cytotoxicité de cette drogue. Il est établi que la déficience du système de réparation des mésappariements dans les cellules entraîne une chimiorésistance lors du traitement par le cisplatine, ce qui compromet le succès de la chimiothérapie dans la majorité des cas. Cette relation entre le système MMR et l'efficacité du cisplatine a conduit notre équipe à l'étude au niveau moléculaire du fonctionnement du système MMR en présence des lésions du cisplatine. Il a été montré que le composé de lésion avec une thymine opposée en 3' à la guanine platinée est celui le mieux reconnu par MutS (Fourrier et coll., 2003). Une forte affinité pour ce composé de lésion a aussi été trouvée pour MutS α homologue eucaryote de MutS (Yamada et coll., 1997).

Dans mon travail de thèse nous nous sommes intéressés au fonctionnement de MutS d'*E. coli* en présence du composé de lésion G*G*/CT le mieux reconnu par cette protéine.

Nous avons pu montrer que le composé de lésion G*G*/CT module les propriétés biochimiques de MutS en inhibant son activité ATPasique et empêche son départ de l'ADN en présence de l'ATP ou de son homologue non-hydrolysable. Cette modulation du

fonctionnement de MutS par le composé de lésion est accompagnée par une conformation particulière de MutS, non-detectable en présence de l'ADN mésapparié non-platiné. Ce travail permet de suggérer l'implication de MutS dans la formation d'un signal direct. Il serait extrêmement intéressant d'obtenir une structure cristalline de MutS en présence du composé de lésion afin de mieux comprendre la base structurale du mécanisme moléculaire de modulation de fonctionnement de MutS par le composé de lésion. Cette lourde expérience de cristallisation ne peut pas être réalisée au laboratoire pour le moment, mais pourrait se faire en collaboration avec des équipes extérieures.

Il serait également très intéressant d'étudier la formation des complexes ternaires entre ADN-MutS-MutL et leur stabilisation par le composé de lésion. Ce travail est en cours et les premiers résultats obtenus suggèrent que le complexe nucléoprotéique-composé de lésion-MutS pourrait recruter MutL en présence de l'ATP.

Les études préliminaires du fonctionnement de MutS en présence des autres composés de lésion effectuées au cours de mon travail de thèse ne permettent pas parler d'un mécanisme unique pour tous les composés de lésion. En effet, nous trouvons que seuls les composés de lésion G*G*/CT et G*G*/CG sont capables de piéger MutS et seront, donc, potentiellement impliqués dans la formation d'un signal par la protéine MutS. Il faut noter, que ces deux composés de lésion sont les moins bien reconnus par la protéine chaperonne HMGB1 ce qui suggère que dans les conditions de compétition entre MutS et HMGB1 *in vivo* MutS serait la protéine prioritaire. En effet, dans les conditions de compétition *in vitro* MutS se fixe préférentiellement sur le duplexe d'ADN contenant le composé de lésion G*G*/CT en présence de fortes concentrations de HMGB1. Il serait, donc, intéressant d'effectuer l'expérience de compétition en présence du composé de lésion G*G*/CG. Les études de reconnaissance des composés de lésion du cisplatine par HMGB1 de rat nous ont permis de montrer que l'affinité de HMGB1 pour les composés de lésion est très proche de la reconnaissance non-spécifique de l'ADN. Cette faible reconnaissance des composés de lésion par HMGB1 semble ne pas être due uniquement à la courbure mais aussi à un autre paramètre de nature probablement structurale, induit par les composés de lésion dans l'hélice d'ADN. Ce résultat suggère que HMGB1 pourrait avoir un mécanisme de reconnaissance de l'ADN autre que celui impliquant la courbure de l'ADN et il s'agirait donc d'un mécanisme à présent inconnu. En ce moment nous réalisons au laboratoire les études des spectres dichroïques des composés de lésion afin de mettre en évidence l'existence des différences structurales entre les composés de lésion. Il serait aussi envisageable de faire les études structurales sur l'ADN contenant les composés de lésion par cristallographie ou RMN.

Il serait intéressant d'analyser toutes les protéines pouvant fixer les composés de lésion. Cette étude pourrait se faire en injectant des extraits cellulaires sur une puce de Biacore ayant sur sa surface les duplexes d'ADN contenant les composés de lésion. Il serait également très intéressant d'étudier l'effet de la longueur d'oligonucléotides sur la stabilisation du complexe MutS-composé de lésion en présence de l'ATP.

Enfin, malgré les preuves indirectes, l'existence des composés de lésion *in vivo* n'a jamais été démontrée. Le travail sur la production des anticorps contre les composés de lésion du cisplatine est actuellement en cours au laboratoire.

L'analyse des résultats connus à présent et des résultats obtenus au cours de mon travail de thèse permettent de proposer un modèle du mécanisme de la cytotoxicité du cisplatine.

Selon ce modèle (fig. 19) la protéine HMGB1 serait la première à intervenir en se fixant sur les lésions intrabrin du cisplatine en les protégeant de la réparation par le système de réparation par excision. Un certain nombre de ces lésions sera répliqué. Lors de la réplication translésionnelle de ces lésions, des composés de lésion apparaissent et ils seront reconnus par la protéine MutS du système MMR qui serait à l'origine d'un signal apoptotique direct. Dans les cellules déficientes pour la protéine HMGB1 les adduits intrabrin du cisplatine seront éliminés par le système NER et la formation des composés de lésion n'aura pas lieu ce qui conduirait à l'apparition de la résistance cellulaire au cisplatine. En effet, les cellules déficientes pour HMGB1 sont résistantes au cisplatine. Ce modèle explique aussi l'apparition de la résistance dans les cellules déficientes pour le système MMR. Ainsi, même si la protection des lésions du cisplatine par HMGB1 (qui reste fonctionnelle) conduit à la formation des composés de lésion le signal ne pourra pas être formé en absence du système MMR fonctionnel. Il serait donc intéressant d'analyser l'effet du cisplatine sur les cellules « *MMR*, *HMGB1* ». A notre connaissance aucune étude n'a été menée sur les cellules double mutants.

L'ensemble des résultats présentés dans ce travail de thèse sont en faveur d'une importance des composés de lésion dans le déclenchement d'un signal par le système MMR. La compréhension du fonctionnement de ce système avec les composés de lésion du cisplatine permettra d'améliorer l'efficacité du cisplatine en stimulant spécifiquement la voie conduisant au déclenchement du signal apoptotique.

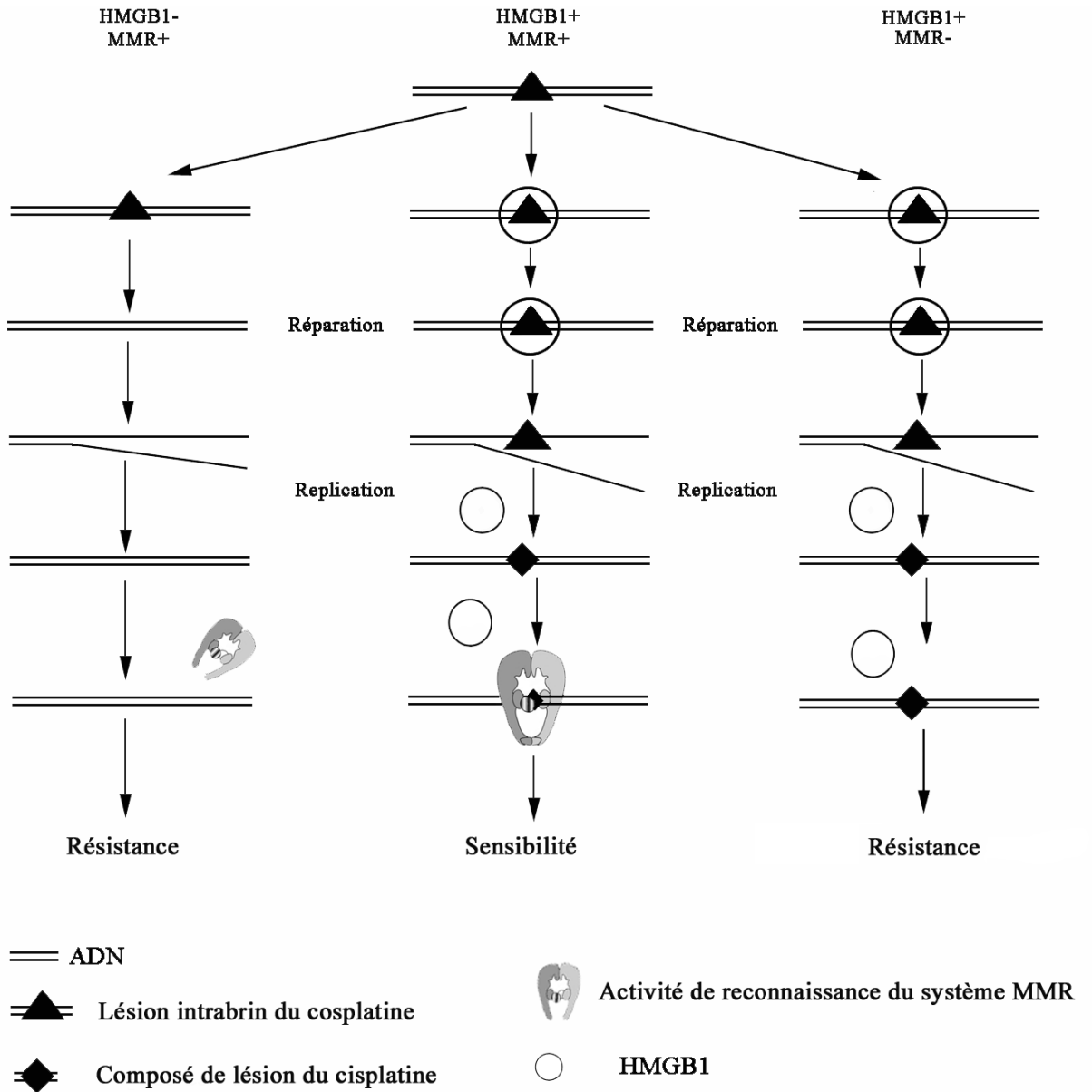


Fig. 19. Présentation schématique du fonctionnement en cascade des protéines HMGB1 et MMR expliquant l'apparition de la résistance cellulaire eu cisplatine.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Albertella, M. R., Green, C. M., Lehmann, A. R. & O'Connor, M. J. (2005): A role for polymerase η in the cellular tolerance to cisplatin-induced damage. **Cancer Res** 65, 9799-9806.
2. Abraham, R. T. (2001): Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. **Genes Dev** 15, 2177-2196.
3. Acharya, S., Foster, P. L., Brooks, P. & Fishel, R. (2003): The coordinated functions of the *E. coli* MutS and MutL proteins in mismatch repair. **Mol Cell** 12, 233-246.
4. Acharya, S., Wilson, T., Gradia, S., Kane, M. F., Guerrette, S., Marsischky, G. T., Kolodner, R. D. & Fishel, R. (1996): hMSH2 forms specific mispair-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. **Proc Natl Acad Sci USA** 93, 3629-3634.
5. Aebi, S., Kurdi-Haidar, B., Gordon, R., Cenni, B., Zheng, H., Fink, D., Christen, R. D., Boland, C. R., Koi, M., Fishel, R. & Howel, S. B. (1996): Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin. **Cancer Res** 56, 3087-3090.
6. Aebi, S., Fink, D., Gordon, R., Kim, H. K., Zheng, H., Fink, J. L. & Howell, S. B. (1997): Resistance to cytotoxic drugs in DNA mismatch repair-deficient cells. **Clin Cancer Res** 3, 1763-1767.
7. Alani, E. (1996): The *Saccharomyces cerevisiae* Msh2 and Msh6 proteins form a complex that specifically binds to duplex oligonucleotides containing mismatched DNA base pairs. **Mol Cell Biol** 16, 5604-5615.
8. Alani, E., Reenan, R. A. & Kolodner, R. D. (1994): Interaction between mismatch repair and genetic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics** 137, 19-39.
9. Alani, E., Sokolsky, T., Studamire, B., Miret, J. J. & Lahue, R. S. (1997): Genetic and biochemical analysis of Msh2p-Msh6p: role of ATP hydrolysis and Msh2p-Msh6p subunit interactions in mismatch base pair recognition. **Mol Cell Biol** 17, 2436-2447.
10. Ali, J. A. & Lohman, T. M. (1997): Kinetic measurement of the step size of DNA unwinding by *Escherichia coli* UvrD helicase. **Science** 275, 377-380.
11. Allen, D. J., Makhov, A., Grilley, M., Taylor, J., Thresher, R., Modrich, P. & Griffith JD. (1997): MutS mediates heteroduplex loop formation by a translocation mechanism. **EMBO** 16, 4467-4476.
12. Amin, N. S., Nguyen, M. N., Oh, S. & Kolodner, R. D. (2001): exo1-Dependent mutator mutations: model system for studying functional interactions in mismatch repair. **Mol Cell Biol** 21, 5142-5155.

13. Anin, M. F. & Leng, M. (1990): Distortions induced in double-stranded oligonucleotides by the binding of *cis*- or *trans*-diammine-dichloroplatinum(II) to the d(GTG) sequence. **Nucleic Acids Res** 18, 4395-4400.
14. Anthoney, D. A., McIlwrath, A. J., Gallagher, W. M., Edlin, A. R. & Brown, R. (1996): Microsatellite instability, apoptosis, and loss of p53 function in drug-resistant tumor cells. **Cancer Res** 56, 1374-1381.
15. Antony, E. & Hingorani, M. M. (2003) : Mismatch recognition-coupled stabilization of Msh2-Msh6 in an ATP-bound state at the initiation of DNA repair. **Biochemistry** 42, 7682-7693.
16. Antony, E. & Hingorani, M. M. (2004): Asymmetric ATP binding and hydrolysis activity of the *Thermus aquaticus* MutS dimer is key to modulation of its interactions with mismatched DNA. **Biochemistry** 43, 13115-1328.
17. Aquilina, G., Crescenzi, M. & Bignami, M. (1999): Mismatch repair, G(2)/M cell cycle arrest and lethality after DNA damage. **Carcinogenesis** 20, 2317-2326.
18. Argueso, J. L., Smith, D., Yi, J., Waase, M., Sarin, S. & Alani, E. (2002): Analysis of conditional mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* MLH1 gene in mismatch repair and in meiotic crossing over. **Genetics** 160, 909-921.
19. Arioka, H., Nishio, K., Ishida, T., Fukumoto, H., Fukuoka, K., Nomoto, T., Kurokawa, H., Yokote, H., Abe, S. & Saijo, N. (1999): Enhancement of cisplatin sensitivity in high mobility group 2 cDNA-transfected human lung cancer cells. **Jpn J Cancer Res** 90, 108-115.
20. Au K. G., Welsh K. & Modrich P. (1992): Initiation of methyl-directed mismatch repair. **J Biol Chem** 267, 12142-12178.
21. Babic, I., Andrew, C. E. & Jirik, F. R. (1996): MutS interaction with mismatch and alkylated base containing DNA molecules detected by optical biosensor. **Mutat Res** 372, 87-96.
22. Baker, S. M., Bronner, C. E., Zhang, L., Plug, A. W., Robatzek, M., Warren, G., Elliott, E. A., Yu, J., Ashley, T., Arnheim, N., Flavell, R. A. & Liskay, R. M. (1995): Male mice defective in the DNA mismatch repair gene PMS2 exhibit abnormal chromosome synapsis in meiosis. **Cell** 82, 309-319.
23. Baker, S. M., Plug, A. W., Prolla, T. A., Bronner, C. E., Harris, A. C., Yao, X., Christie, D. M., Monell, C., Arnheim, N., Bradley, A., Ashley, T. & Liskay, R. M. (1996): Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. **Nat Genet** 13, 336-342.
24. Ban, C., Junop, M. & Yang, W. (1999): Transformation of MutL by ATP binding and hydrolysis: a switch in DNA mismatch repair. **Cell** 97, 85-97.

25. Ban, C., Yang, W. (1998)a: Crystal structure and ATPase activity of MutL: implications for DNA repair and mutagenesis. **Cell** 95, 541-552.
26. Ban, C. & Yang, W. (1998)b: Structural basis for MutH activation in *E. coli* mismatch repair and relationship of MutH to restriction endonucleases. **EMBO J** 17, 1526-1534.
27. Bancroft, D. P., Lepre, C. A. & Lippard, S. J. (1990): Platinum-195 NMR kinetic and mechanistic studies of *cis*- and *trans*-diamminedichloroplatinum (II) binding to DNA. **J Am Chem Soc** 112, 6860-6871.
28. Bartek, J. & Lukas, J. (2003): Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. **Cancer Cell** 3, 421-419.
29. Bassett, E., King, N. M., Bryant, M. F., Hector, S., Pendyala, L., Chaney, S.G. & Cordeiro-Stone, M. (2004): The role of DNA polymerase eta in translesion synthesis past platinum-DNA adducts in human fibroblasts. **Cancer Res** 64, 6469-6475.
30. Basu, S., Totty, N. F., Irwin, M. S., Sudol, M. & Downward, J. (2003): Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. **Mol Cell** 11, 11-23.
31. Bellacosa, A. (2001) : Role of MED1 (MBD4) Gene in DNA repair and human cancer. **J Cell Physiol** 187, 137-144.
32. Bellon S. F. & Lippard, S. J. (1990) : Bending studies of DNA site-specifically modified by cisplatin, *trans*-diamminedichloroplatinum(II) and *cis*-[Pt(NH₃)₂(N₃-cytosine)Cl]⁺. **Biophys Chem** 35, 179-188.
33. Berardini, M., Mazurek, A. & Fishel, R. (2000): The effect of O⁶-methylguanine DNA adducts on the adenosine nucleotide switch functions of hMSH2-hMSH6 and hMSH2-hMSH3. **J Biol Chem** 275, 27851-27857.
34. Bishop, D. K., Williamson, M. S., Fogel, S. & Kolodner, R. D. (1987): The role of heteroduplex correction in gene conversion in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature** 328, 362-364.
35. Billings, P. C., Davis, R. J., Engelsberg, B. N., Skov, K. A. & Hughes, E. N. (1992): Characterization of high mobility group protein binding to cisplatin-damaged DNA. **Biochem Biophys Res Commun** 188, 1286-1294.
36. Biswas, I. & Hsieh, P. (1997): Interaction of MutS protein with the major and minor grooves of a heteroduplex DNA. **J Biol Chem** 272, 13355-13364.
37. Biswas, I. & Vijayvargia, R. (2000): Heteroduplex DNA and ATP induced conformational changes of a MutS mismatch repair protein from *Thermus aquaticus*. **Biochem J** 347 Pt 3, 881-886.

38. Bjornson, K. P., Allen, D. J. & Modrich, P. (2000): Modulation of MutS ATP hydrolysis by DNA cofactors. **Biochemistry** 39, 3176-3183.
39. Bjornson, K. P. & Modrich, P. (2003): Differential and simultaneous adenosine di- and triphosphate binding by MutS. **J Biol Chem** 278, 18557-18562.
40. Blackwell, L. J., Bjornson, K. P., Allen, D. J. & Modrich, P. (2001): Distinct MutS DNA-binding modes that are differentially modulated by ATP binding and hydrolysis. **J Biol Chem** 276, 34339-34347.
41. Blackwell, L. J., Martik, D., Bjornson, K. P., Bjornson, E. S. & Modrich, P. (1998): Nucleotide-promoted release of hMutS α from heteroduplex DNA is consistent with an ATP-dependent translocation mechanism. **J Biol Chem** 273, 32055-32062.
42. Bowers, J., Sokolsky, T., Quach, T. & Alani, E. (1999): A mutation in the MSH6 subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* MSH2-MSH6 complex disrupts mismatch recognition. **J Biol Chem** 274, 16115-16125.
43. Bowers, J., Tran, P. T., Joshi, A., Liskay, R. M. & Alani, E. (2001): MSH-MLH complexes formed at a DNA mismatch are disrupted by the PCNA sliding clamp. **J Mol Biol** 306, 957-968.
44. Brabec, V., Boudny, V. & Balcarova, Z. (1994): Monofunctional adducts of platinum(II) produce in DNA a sequence-dependent local denaturation. **Biochemistry** 33, 1316-1322.
45. Brabec, V., Reedijk, J. & Leng, M. (1992): Sequence-dependent distortions induced in DNA by monofunctional platinum(II) binding. **Biochemistry** 31, 12397-12402.
46. Bradley, L. J., Yarema, K. J., Lippard, S. J. & Essigmann, J. M. (1993): Mutagenicity and genotoxicity of the major DNA adduct of the antitumor drug *cis*-diamminedichloroplatinum(II). **Biochemistry** 32, 982-988.
47. Branch, P., Aquilina, G., Bignami, M. & Karran, P. (1993): Defective mismatch binding and a mutator phenotype in cells tolerant to DNA damage. **Nature** 362, 652-654.
48. Branch, P., Masson, M., Aquilina, G., Bignami, M. & Karran, P. (2000): Spontaneous development of drug resistance: mismatch repair and p53 defects in resistance to cisplatin in human tumor cells. **Oncogene** 19, 3138-3145.
49. Bravo, R. & Macdonald-Bravo, H. (1987): Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. **J Cell Biol** 105, 1549-1554.
50. Bronner, C. E., Baker, S. M., Morrison, P. T., Warren, G., Smith, L. G., Lescoe, M. K., Kane, M., Earabino, C., Lipford, J., Lindblom, A., et al. (1994): Mutation in the DNA

mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. **Nature** 368, 258-261.

51. Brouwer, J., van de Putte, P., Fichtinger-Schepman, A. M. & Reedijk, J. (1981): Base-pair substitution hotspots in GAG and GCG nucleotide sequences in *Escherichia coli* K-12 induced by *cis*-diamminedichloroplatinum (II). **Proc Natl Acad Sci USA** 78, 7010-7014.
52. Brown, J., Brown, T. & Fox, K. R. (2001): Affinity of mismatch-binding protein MutS for heteroduplexes containing different mismatches. **Biochem J** 354, 627-633.
53. Brown, T. C. & Jiricny J. (1988): Different base/base mispairs are corrected with different efficiencies and specificities in monkey kidney cells. **Cell** 54, 705-711.
54. Brown, S. J., Kellett, P. J. & Lippard, S. J. (1993): Ixr1, a yeast protein that binds to platinated DNA and confers sensitivity to cisplatin. **Science** 261, 603-605.
55. Brown K. D., Rathi A., Kamath R., Beardsley D. I., Zhan Q., Mannino J. L. & Baskaran R. (2003): The mismatch repair system is required for S-phase checkpoint activation. **Nat Genet** 33, 80-84.
56. Bubley, G. J., Ashburner, B. P. & Teicher, B. A. (1991): Spectrum of *cis*-diamminedichloroplatinum(II)-induced mutations in a shuttle vector propagated in human cells. **Mol Carcinog** 4, 397-406.
57. Bustin, M. (2001): Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins. **Trends Biochem Sci** 26, 152-153.
58. Bustin, M., Lehn, D. A. & Landsman, D. (1990): Structural features of the HMG chromosomal proteins and their genes. **Biochim Biophys Acta** 1049, 231-243.
59. Burnouf D., Duanen M. & Fuchs, R. P. (1987): Spectrum of cisplatin-induced mutations in *Escherichia coli*. **Proc Natl Acad Sci USA** 84, 3758-3762.
60. Burnouf, D., Gauthier, C., Chottard, J. C. & Fuchs, R. P. (1990): Single d(ApG)/*cis*-diamminedichloroplatinum(II) adduct-induced mutagenesis in *Escherichia coli*. **Proc Natl Acad Sci USA** 87, 6087-6091.
61. Caradonna, J. P., Mippard, S. J., Gait, M. J. & Singh, M. (1982) : The antitumor drug *cis*-dichlorodiammineplatinum (II) forms an intrastrand d(GpG) crosslink upon reaction with [d(ApApGpCpCpT)]². **J Am Chem Soc** 104, 5793-5795.
62. Carethers, J. M., Chauhan, D. P., Fink, D., Nebel, S., Bresalier, R. S., Howell, S. B. & Boland, C. R. (1999): Mismatch repair proficiency and *in vitro* response to 5-fluorouracil. **Gastroenterology** 117, 123-131.

63. Cariello, N. F., Swenberg, J. A. & Skopek, T. R. (1992): *In vitro* mutational specificity of cisplatin in the human hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase gene. **Cancer Res** 52, 2866-2873.
64. Catani, M. V., Costanzo, A., Savini, I., Levrero, M., de Laurenzi, V., Wang, J. Y., Melino, G. & Avigliano, L. (2002): Ascorbate up-regulates MLH1 (Mut L homologue-1) and p73: implications for the cellular response to DNA damage. **Biochem J** 364 Pt 2, 441-447.
65. Cejka, P., Marra, G., Hemmerle, C., Cannavo, E., Storchova, Z. & Jiricny, J. (2003): Differential killing of mismatch repair-deficient and -proficient cells: towards the therapy of tumors with microsatellite instability. **Cancer Res** 63, 8113-8117.
66. Chambers, S. R., Hunter, N., Louis, E. J. & Borts, R. H. (1996): The mismatch repair system reduces meiotic homeologous recombination and stimulates recombination-dependent chromosome loss. **Mol Cell Biol** 16, 6110-6120.
67. Chaney, S. G., Campbell, S. L., Bassett, E. & Wu, Y. (2005): Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts. **Crit Rev Oncol Hematol** 53, 3-11.
68. Chaney, S. G. & Vaisman, A. (1999): Specificity of platinum-DNA adduct repair. **J Inorg Biochem** 77, 71-81.
69. Chow, C. S., Barnes, C. M. & Lippard, S. J. (1995): A single HMG domain in high-mobility group 1 protein binds to DNAs as small as 20 base pairs containing the major cisplatin adduct. **Biochemistry** 34, 2956-2964.
70. Chow, C. S., Whitehead, J. P. & Lippard, S. J. (1994): HMG domain proteins induce sharp bends in cisplatin-modified DNA. **Biochemistry** 33, 15124-15130.
71. Chu, G. & Chang, E. (1988): *Xeroderma pigmentosum* group E cells lack a nuclear factor that binds to damaged DNA. **Science** 242, 564-567.
72. Ciotta, C., Ceccotti, S., Aquilina, G., Humbert, O., Palombo, F., Jiricny, J. & Bignami, M. (1998): Increased somatic recombination in methylation tolerant human cells with defective DNA mismatch repair. **J Mol Biol** 276, 705-719.
73. Cizeau, J., Decoville, M., Leng, M. & Locker, D. (1994): Deletions induced in the white and vermilion genes of *Drosophila melanogaster* by the antitumor drug cis-dichlorodiammineplatinum(II). **Mutat Res** 311, 31-38.
74. Clark, A. B., Valle, F., Drotschmann, K., Gary, R. K. & Kunkel, T. A. (2000): Functional interaction of proliferating cell nuclear antigen with MSH2-MSH6 and MSH2-MSH3 complexes. **J Biol Chem** 275, 36498-36501.

75. Clugston, C. K., McLaughlin, K., Kenny, M. .K. & Brown, R. (1992): Binding of human single-stranded DNA binding protein to DNA damaged by the anticancer drug *cis*-diamminedichloroplatinum (II). **Cancer Res** 52, 6375-6379.
76. Cohen, S. M., Jamieson, E. R. & Lippard, S. J. (2000) : Enhanced binding of the TATA-binding protein to TATA boxes containing flanking cisplatin 1,2-cross-links. **Biochemistry** 39, 8259-8265.
77. Colussi, C., Parlanti, E., Degan, P., Aquilina, G., Barnes, D., Macpherson, P., Karran, P., Crescenzi, M., Dogliotti, E. & Bignami M. (2002): The mammalian mismatch repair pathway removes DNA-8-oxoGMP incorporated from the oxidized dNTP pool. **Curr Biol** 12, 912-918.
78. Coste, F., Malinge, J.-M., Serre, L., Shepard, W., Roth, M., Leng, M. & Zelwer, C. (1999): Crystal structure of a double-stranded DNA containing a cisplatin interstrand cross-link at 1.63 Å resolution: hydration at the platinated site. **Nucleic Acids Res** 27, 1837-1846.
79. Cooper, D. L, Lahue, R. S. & Modrich, P. (1993): Methyl-directed mismatch repair is bidirectional. **J Biol Chem** 268, 11823-11829.
80. Dabholkar, M., Bostick-Bruton, F., Weber, C., Bohr, V. A., Egwuagu, C. & Reed, E. (1992): ERCC1 and ERCC2 expression in malignant tissues from ovarian cancer patients. **J Natl Cancer Inst** 84, 1512-1517.
81. Dabholkar, M., Vionnet, J., Bostick-Bruton, F., Yu, J. J. & Reed, E. (1994): Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy. **J Clin Invest** 94, 703-708.
82. Dao, V. & Modrich, P. (1998): Mismatch-, MutS-, MutL-, and helicase II-dependent unwinding from the single-strand break of an incised heteroduplex. **J Biol Chem** 273, 9202-9207.
83. Das Gupta, R. & Kolodner, R. D. (2000): Novel dominant mutations in *Saccharomyces cerevisiae* MSH6. **Nat Genet** 24, 53-56.
84. Datta, A., Adjiri, A., New, L., Crouse, G. F. & Jinks Robertson, S. (1996): Mitotic crossovers between diverged sequences are regulated by mismatch repair proteins in *Saccaromyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol** 16, 1085-1093.
85. Datta, A., Hendrix, M., Lipsitch, M. & Jinks-Robertson, S. (1997): Dual roles for DNA sequence identity and the mismatch repair system in the regulation of mitotic crossing-over in yeast. **Proc Natl Acad Sci USA** 94, 9757-9762.
86. Davis, T. W., Wilson-Van Patten, C., Meyers, M., Kunugi, K. A., Cuthill, S., Reznikoff, C., Garces, C., Boland, C. R., Kinsella, T. J., Fishel, R. & Boothman D. A. (1998):

Defective expression of the DNA mismatch repair protein, MLH1, alters G2-M cell cycle checkpoint arrest following ionizing radiation. **Cancer Res** 58, 767-778.

87. de Boer, J. G. & Glickman, B. W. (1989): Sequence specificity of mutation induced by the anti-tumor drug cisplatin in the CHO aprt gene. **Carcinogenesis** 10, 1363-1367.

88. de Laat, W. L., Jaspers, N. G. & Hoeijmakers, J. H. (1999): Molecular mechanism of nucleotide excision repair. **Genes Dev** 13, 768-785.

89. de las Alas, M. M., Aebi, S., Fink, D., Howell, S. B. & Los, G. (1997): Loss of DNA mismatch repair: effects on the rate of mutation to drug resistance. **J Natl Cancer Inst** 15, 1537-1541.

90. de Vries, S. S., Baart, E. B., Dekker, M., Siezen, A., de Rooij, D. G., de Boer, P. & te Riele, H. (1999): Mouse MutS-like protein Msh5 is required for proper chromosome synapsis in male and female meiosis. **Genes Dev** 13, 523-531.

91. de Weese, T. L., Shipman, J. M., Larrier, N. A., Buckley, N. M., Kidd, L. R., Groopman, J. D., Cutler, R. G., te Riele, H. & Nelson, W. G. (1998): Mouse embryonic stem cells carrying one or two defective Msh2 alleles respond abnormally to oxidative stress inflicted by low-level radiation. **Proc Natl Acad Sci USA** 95, 11915-11920.

92. de Wind, N., Dekker, M., Berns, A., Radman, M. & te Riele, H. (1995): Inactivation of the mouse Msh2 gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer. **Cell** 82, 321-330.

93. Dijt, F. J., Fichtinger-Schepman, A. M., Berends, F. & Reedijk, J. (1988): Formation and repair of cisplatin-induced adducts to DNA in cultured normal and repair-deficient human fibroblasts. **Cancer Res** 48; 6058-6062.

94. Drotschmann, K., Clark, A. B., Tran, H. T., Resnick, M. A., Gordenin, D. A. & Kunkel, T. A. (1999): Mutator phenotypes of yeast strains heterozygous for mutations in the MSH2 gene. **Proc Natl Acad Sci USA** 96, 2970-2975.

95. Drummond, J. T., Anthony, A., Brown, R. & Modrich, P. (1996): Cisplatin and adriamycin resistance are associated with MutL α and mismatch repair deficiency in an ovarian tumor cell line. **J Biol Chem** 271, 19645-19648.

96. Drummond, J. T., Li, G. M., Longley, M. J. & Modrich, P. (1995): Isolation of an hMSH2-p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cells. **Science** 268, 1909-1912.

97. Duckett, D. R., Drummond, J. T., Murchie, A. I., Reardon, J. T., Sancar, A., Lilley, D. M. & Modrich, P. (1996): Human MutS α recognizes damaged DNA base pairs containing

O6-methylguanine, O4-methylthymine, or the cisplatin-d(GpG) adduct. **Proc Natl Acad Sci USA** 93, 6443-6447.

98. Dunham, S. U. & Lippard, S. J. (1997): DNA sequence context and protein composition modulate HMG-domain protein recognition of cisplatin-modified DNA. **Biochemistry** 36, 11428-11436.

99. Dufner, P., Marra, G., Raschle, M. & Jiricny, J. (2000): Mismatch recognition and DNA-dependent stimulation of the ATPase activity of hMutS α is abolished by a single mutation in the hMSH6 subunit. **J Biol Chem** 275, 36550-3665.

100. Eastman, A. (1983): Characterization of the adducts produced in DNA by *cis*-diamminedichloroplatinum(II) and *cis*-dichloro(ethylenediamine)platinum(II). **Biochemistry** 22, 3927-3933.

101. Eastman, A. (1987): Glutathione-mediated activation of anticancer platinum(IV) complexes. **Biochem Pharmacol** 36, 4177-4178.

102. Eissenberg, J. C., Ayagari, R., Gomes, X. V. & Burgers, P. M. (1997): Mutations in yeast proliferating cell nuclear antigen define distinct sites for interaction with DNA polymerase δ and DNA polymerase ϵ . **Mol Cell Biol** 17, 6367-6378.

103. Elizondo-Riojas, M. A. & Kozelka, J. (2001): Unrestrained 5 ns molecular dynamics simulation of a cisplatin-DNA 1,2-GG adduct provides a rationale for the NMR features and reveals increased conformational flexibility at the platinum binding site. **J Mol Biol** 314, 1227-1243.

104. Evans, E. & Alani, E. (2000): Roles for mismatch repair factors in regulating genetic recombination. **Mol Cell Biol** 20, 7839-7844.

105. Evans, E., Moggs, J. G., Hwang, J. R., Egly, J.-M. & Wood, R. D. (1997): Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. **EMBO J** 16, 6559-6573.

106. Fang, W. H. & Modrich, P. (1993): Human strand-specific mismatch repair occurs by a bidirectional mechanism similar to that of the bacterial reaction. **J Biol Chem** 268, 11838-11844.

107. Fichtinger-Schepman, A. M., van der Veer, J. L., den Hartog, J. H., Lohman, P. H. & Reedijk, J. (1985): Adducts of the antitumor drug *cis*-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation. **Biochemistry** 24, 707-713.

108. Fichtinger-Schepman, A. M., van Oosterom, A. T., Lohman, P. H. & Berends, F. (1987): *cis*-Diamminedichloroplatinum(II)-induced DNA adducts in peripheral leukocytes from seven cancer patients: quantitative immunochemical detection of the adduct induction

- and removal after a single dose of *cis*-diamminedichloroplatinum(II). **Cancer Res** 47, 3000-3004.
109. Fink, D., Nebel, S., Aebi, S., Zheng, H., Cenni, B., Nehme, A., Christen, R. D. & Howell, S. B. (1996): The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. **Cancer Res** 56, 4881-4886.
110. Fink, D., Zheng, H., Nebel, S., Norris, P. S., Aebi, S., Lin, T. P., Nehme, A., Christen, R. D., Haas, M., MacLeod, C. L. & Howell, S. B. (1997): *In vitro* and *in vivo* resistance to cisplatin in cells that have lost DNA mismatch repair. **Cancer Res** 57, 1841-1845.
111. Fishel, R. (1998) : Mismatch repair, molecular switches, and signal transduction. **Genes Dev** 12, 2096-2101.
112. Fishel, R., Lescoe, M. K., Rao, M. R., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Garber, J., Kane, M. & Kolodner, R. (1993): The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. **Cell** 75, 1027-1038.
113. Fishel, R. & Wilson, T. (1997): MutS homologs in mammalian cells. **Curr Opin Genet Dev** 7, 105-113.
114. Flores, E. R., Tsai, K. Y., Crowley, D., Sengupta, S., Yang, A., McKeon, F. & Jacks, T. (2002): p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. **Nature** 416, 560-564.
115. Flores-Rozas, H., Clark, D. & Kolodner, R. D. (2000): Proliferating cell nuclear antigen and Msh2p-Msh6p interact to form an active mispair recognition complex. **Nat Genet** 26, 375-378.
116. Flores-Rozas, H. & Kolodner, R. D. (1998): The *Saccharomyces cerevisiae* MLH3 gene functions in MSH3-dependent suppression of frameshift mutations. **Proc Natl Acad Sci USA** 95, 12404-12409.
117. Fouchet, M. H., Gauthier, C., Guittet, E., Girault, J. P., Igolen, J. & Chottard, J. C. (1997): Synthesis and characterization of a d(ApG) platinated nonanucleotide duplex. **Biochem Biophys Res Commun** 182, 555-560.
118. Fourier, L., Brooks, P., Malinge, J.-M. (2003): Binding discrimination of MutS to a set of lesions and compound lesions (base damage and mismatch) reveals its potential role as a cisplatin-damaged DNA sensing protein. **J Biol Chem** 278, 21267-21275.
119. Fram, R. J., Cusick, P. S., Wilson, J. M. & Marinus, M. G. (1985): Mismatch repair of *cis*-diamminedichloroplatinum(II)-induced DNA damage. **Mol Pharmacol** 28, 51-55.
120. Friedman, H. S., Johnson, S. P., Dong, Q., Schold, S. C., Rasheed, B. K., Bigner, S. H., Ali-Osman, F., Dolan, E., Colvin, O. M., Houghton, P., Germain, G., Drummond, J. T., Keir,

- S., Marcelli, S., Bigner, D. D. & Modrich, P. (1997): Methylator resistance mediated by mismatch repair deficiency in a glioblastoma multiforme xenograft. **Cancer Res** 57, 2933-2936.
121. Frit, P., Canitrot, Y., Muller, C., Foray, N., Calsou, P., Marangoni, E., Bourhis, J. & Salles, B. (1999): Cross-resistance to ionizing radiation in a murine leukemic cell line resistant to *cis*-dichlorodiammineplatinum(II): role of Ku autoantigen. **Mol Pharmacol** 56, 141-146.
122. Fritzell, J. A., Narayanan, L., Baker, S. M., Bronner, C. E., Andrew, S. E., Prolla, T. A., Bradley, A., Jirik, F. R., Liskay, R. M. & Glazer, P. M. (1997): Role of DNA mismatch repair in the cytotoxicity of ionizing radiation. **Cancer Res** 57, 5143-5147.
123. Galio, L., Bouquet, C. & Brooks, P. (1999): ATP hydrolysis-dependent formation of a dynamic ternary nucleoprotein complex with MutS and MutL. **Nucleic Acids Res** 27, 2325-2331.
124. Gelasco, A. & Lippard, S. J. (1998): NMR solution structure of a DNA dodecamer duplex containing a *cis*-diammineplatinum(II) d(GpG) intrastrand cross-link, the major adduct of the anticancer drug cisplatin. **Biochemistry** 37, 9230-9239.
125. Gendrel, C. G. & Dutreix, M. (2001): (CA/TG) microsatellite sequences escape the inhibition of recombination by mismatch repair in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics** 159, 1539-1545.
126. Genschel, J., Bazemore, L. R. & Modrich, P. (2002): Human exonuclease I is required for 5' and 3' mismatch repair. **J Biol Chem** 277, 13302-13311.
127. Glaab, W. E., Risinger, J. I., Umar, A., Barrett, J. C., Kunkel, T. A. & Tindall, K. R. (1998): Cellular resistance and hypermutability in mismatch repair-deficient human cancer cell lines following treatment with methyl methanesulfonate. **Mutat Res** 398, 197-207.
128. Glickman, B. W. & Radman, M. (1980): *Escherichia coli* mutator mutants deficient in methylation-instructed DNA mismatch correction. **Proc Natl Acad Sci USA** 77, 1063-1067.
129. Gong, J. G., Gonstabzo, A., Yang, H. Q., Melinon G., Kaelin, W. G. Jr, Levrero, M. & Wang, J. Y. (1999): The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. **Nature** 399, 806-809.
130. Gottlieb, T. M. & Jackson, S. P. (1993): The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. **Cell** 72, 131-142.
131. Gradia, S., Acharya, S. & Fishel, R. (1997): The human mismatch recognition complex hMSH2-hMSH6 functions as a novel molecular switch. **Cell** 91, 995-1005.

132. Gradia, S., Subramanian, D., Wilson, T., Acharya, S., Makhov, A., Griffith, J. & Fishel, R. (1999): hMSH2-hMSH6 forms a hydrolysis-independent sliding clamp on mismatched DNA. **Mol Cell** 3, 255-261.
133. Grilley, M., Griffith, J. & Modrich, P. (1993): Bidirectional excision in methyl-directed mismatch repair. **J Biol Chem** 268, 11830-11837.
134. Grilley, M., Welsh, K. M., Su, S. S. & Modrich, P. (1989): Isolation and characterization of the *Escherichia coli* mutL gene product. **J Biol Chem** 264, 1000-1004.
135. Gormley, P. E., Gangji, D., Wood, J. H. & Poplack, D. G. (1981): Pharmacokinetic study of cerebrospinal fluid penetration of *cis*-diamminedichloroplatinum (II). **Cancer Chemother Pharmacol** 5, 257-260.
136. Gu, L., Hong, Y., McCulloch, S., Watanabe, H. & Li, G. M. (1998): ATP-dependent interaction of human mismatch repair proteins and dual role of PCNA in mismatch repair. **Nucleic Acids Res** 26, 1173-1178.
137. Guarne, A., Junop, M. S. & Yang, W. (2001): Structure and function of the N-terminal 40 kDa fragment of human PMS2: a monomeric GHL ATPase. **EMBO J** 20, 5521-5531.
138. Haber, L. T. & Walker, G. C. (1991): Altering the conserved nucleotide binding motif in the *Salmonella typhimurium* MutS mismatch repair protein affects both its ATPase and mismatch binding activities. **EMBO J** 10, 2707-2715.
139. Habraken, Y., Sung, P., Prakash, S. & Prakash, L. (1996): Transcription factor TFIIH and DNA endonuclease Rad2 constitute yeast nucleotide excision repair factor 3: implications for nucleotide excision repair and Cockayne syndrome. **Proc Natl Acad Sci USA** 93, 10718-10722.
140. Habraken, Y., Sung, P., Prakash, L. & Prakash, S. (1997): Enhancement of MSH2-MSH3-mediated mismatch recognition by the yeast MLH1-PMS1 complex. **Curr Biol** 7, 790-793.
141. Habraken, Y., Sung, P., Prakash, L. & Prakash, S. (1998): ATP-dependent assembly of a ternary complex consisting of a DNA mismatch and the yeast MSH2-MSH6 and MLH1-PMS1 protein complexes. **J Biol Chem** 273, 9837-9841.
142. Hall, M. C., Jordan, J. R. & Matson, S. W. (1998): Evidence for a physical interaction between the *Escherichia coli* methyl-directed mismatch repair proteins MutL and UvrD. **EMBO J** 17, 1535-1541.
143. Hall, M. C. & Matson, S. W. (1999): Helicase motifs: the engine that powers DNA unwinding. **Mol Microbiol** 34, 867-877.

144. Hall, M. C., Shcherbakova, P. V. & Kunkel, T. A. (2002): Differential ATP binding and intrinsic ATP hydrolysis by amino-terminal domains of the yeast Mlh1 and Pms1 proteins. **J Biol Chem** 277, 3673-3679.
145. Harfe, B. D. & Jinks-Robertson, S. (2000): Sequence composition and context effects on the generation and repair of frameshift intermediates in mononucleotide runs in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics** 156, 571-578.
146. Harris, R. S., Ross, K. J., Lombardo, M. J. & Rosenberg, S. M. (1998): Mismatch repair in *Escherichia coli* cells lacking single-strand exonucleases ExoI, ExoVII, and RecJ. **J Bacteriol** 180, 989-993.
147. Havener, J. M., Nick McElhinny, S. A., Bassett, E., Gauger, M., Ramsden, D. A. & Chaney, S. G. (2003): Translesion synthesis past platinum DNA adducts by human DNA polymerase mu. **Biochemistry** 42, 1777-1788.
148. Hawn, M. T., Umar, A., Carethers, J. M., Marra, G., Kunkel, T. A., Boland, C. R. & Koi, M. (1995): Evidence for a connection between the mismatch repair system and the G2 cell cycle checkpoint. **Cancer Res** 55, 3721-3725.
149. He, Z., Henricksen, L. A., Wold, M. S. & Ingles, C. J. (1995): RPA involvement in the damage-recognition and incision steps of nucleotide excision repair. **Nature** 374, 566-569.
150. Her, C. & Doggett, N. A. (1998): Cloning, structural characterization, and chromosomal localization of the human orthologue of *Saccharomyces cerevisiae* MSH5 gene. **Genomics** 52, 50-61.
151. Herman, F., Kozelka, J., Stoven, V., Guittet, E., Girault, J. P., Huynh-Dinh, T., Igolen, J., Lallemand, J. Y. & Chottard, J. C. (1990): A d(GpG)-platinated decanucleotide duplex is kinked. An extended NMR and molecular mechanics study. **Eur J Biochem** 194, 119-133.
152. Hey, T., Lipps, G. & Krauss, G. (2001): Binding of XPA and RPA to damaged DNA investigated by fluorescence anisotropy. **Biochemistry** 40, 2901-2910.
153. Hickman, M. J. & Samson, L. D. (1999) Role of DNA mismatch repair and p53 in signaling induction of apoptosis by alkylating agents. **Proc Natl Acad Sci USA** 96, 10764-10769.
154. Hickman, M. J. & Samson, L. D. (2004): Apoptotic signaling in response to a single type of DNA lesion, O(6)-methylguanine. **Mol Cell** 14, 105-116.
155. Hingorani, M. M. & O'Donnell, M. (2000): Sliding clamps: a (tail)ored fit. **Curr Biol** 13, 25-29.

156. Hoffmann, J. S., Pillaire, M. J., Maga, G., Podust, V., Hubscher, U. & Villani, G. (1995): DNA polymerase β bypasses *in vitro* a single d(GpG)-cisplatin adduct placed on codon 13 of the HRAS gene. **Proc Natl Acad Sci USA** 92, 5356-5360.
157. Hollingworth, N. M., Ponte, L. & Halsay, C. (1995): MSH5, a novel MutS homolog, facilitates meiotic reciprocal recombination between homologs in *Saccharomyces cerevisiae* but not mismatch repair. **Genes Dev** 9, 1728-1739.
158. Holmes, J. Jr., Clark, S. & Modrich P. (1990): Strand-specific mismatch correction in nuclear extracts of human and *Drosophila melanogaster* cell lines. **Proc Natl Acad Sci USA** 87, 5837-5841.
159. Hopkins, P. B., Millard, J. T., Woo, J., Weidner, M. F., M. F., Kirchner, J. J., Sigmasson, S. T. & Rauche, S. (1991): Sequence preferences of DANN intrastrand cross-linking agents: Importance of minimal DNA structural reorganization on the cross-linking reactions of mechlorethamine, cisplatin and mitomycin C. **Tetrahedron** 47, 2475-2489.
160. Hsieh, P (2001): Molecular mechanism of DNA mismatch repair. **Mutation Res** 486, 71-87.
161. Huang, L., Turchi, J. J., Wahl, A. F. & Bambara, R. A. (1993): Effects of the anticancer drug *cis*-diamminedichloroplatinum(II) on the activities of calf thymus DNA polymerase ϵ . **Biochemistry** 32, 841-848.
162. Huang, J. C., Zamble, D. B., Reardon, J. T., Lippard, S. J. & Sancar, A. (1994): HMG-domain proteins specifically inhibit the repair of the major DNA adduct of the anticancer drug cisplatin by human excision nuclease. **Proc Natl Acad Sci USA** 91, 10394-10398.
163. Huang, H., Zhu, L., Reid, B. R., Drobny, G. P. & Hopkins, P. B. (1995): Solution structure of a cisplatin-induced DNA interstrand cross-link. **Science** 270, 1842-1845.
164. Hughes, E. N., Engelsberg, B. N. & Billings, P. C. (1992): Purification of nuclear proteins that bind to cisplatin-damaged DNA. Identity with high mobility group proteins 1 and 2. **J Biol Chem** 267, 13520-13527.
165. Hughes, M. J. & Jiricny, J. (1992): The purification of a human mismatch-binding protein and identification of its associated ATPase and helicase activities. **J Biol Chem** 267, 23876-23882.
166. Hughes, P., Tratner, I., Ducoux, M., Piard, K. & Baldacci, G. (1999): Isolation and identification of the third subunit of mammalian DNA polymerase δ by PCNA-affinity chromatography of mouse FM3A cell extracts. **Nucleic Acids Res** 27, 2108-2114.

167. Iaccarino, I., Marra, G., Dufner, P. & Jiricny, J. (2000) : Mutation in the magnesium binding site of hMSH6 disables the hMutS α sliding clamp from translocating along DNA. **J Biol Chem** 275, 2080-2086.
168. Iaccarino, I., Marra, G., Palombo, F. & Jiricny, J. (1998) : hMSH2 and hMSH6 play distinct roles in mismatch binding and contribute differently to the ATPase activity of hMutS α . **EMBO J** 17, 2677-2686.
169. Iaccarino, I., Palombo, F., Drummond, J., Totty, N. F., Hsuan, J. J., Modrich, P., Jiricny, J. (1996): MSH6, a *Saccharomyces cerevisiae* protein that binds to mismatches as a heterodimer with MSH2. **Curr Biol** 6, 484-486.
170. Ianari, A., Gallo, R., Palma, M., Alesse, E. & Gulino, A. Specific role for p300/CREB-binding protein-associated factor activity in E2F1 stabilization in response to DNA damage. **J Biol Chem** 279, 30830-30835.
171. Irwin, M. S., Kondo, K., Marin, M. C., Cheng, L. S., Hahn, W. C. & Kaelin, W. G. Jr. (2003): Chemosensitivity linked to p73 function. **Cancer Cell** 3, 403-410.
172. Ise, T., Nagatani, G., Imamura, T., Kato, K., Takano, H., Nomoto, M., Izumi, H., Ohmori, H., Okamoto, T., Ohga, T., Uchiumi, T., Kuwano, M. & Kohno, K. (1999): Transcription factor Y-box binding protein 1 binds preferentially to cisplatin-modified DNA and interacts with proliferating cell nuclear antigen. **Cancer Res** 59, 342-346.
173. Iyer, R. R., Pluciennik, A., Burdett, V. & Modrich, P. (2006). DNA mismatch repair: functions and mechanisms. **Chem Rev** 106, 302-323.
174. Jayaraman, L., Moorthy, N. C., Murthy, K. G., Manley, J. L., Bustin, M. & Prives, C. (1998): High mobility group protein-1 (HMG-1) is a unique activator of p53. **Genes Dev** 12, 462-472.
175. Jiricny, J. (1998): Eukaryotic mismatch repair: an update. **Mutat Res** 409, 107-121.
176. Jiricny, J. (2000): Mismatch repair: the praying hands of fidelity. **Curr Biol** 10, 788-790.
177. Jones, C. J. & Wood, R. D. (1993): Preferential binding of the xeroderma pigmentosum group A complementing protein to damaged DNA. **Biochemistry** 32, 12096-12104.
178. Jordan, P. & Carmo-Fonseca, M. (1998): Cisplatin inhibits synthesis of ribosomal RNA *in vivo*. **Nucleic Acids Res** 26, 2831-2836.
179. Joshi A. & Rao B. J.(2002): ATP hydrolysis induces expansion of MutS contacts on heteroduplex: a case for MutS treadmilling? **Biochemistry** 41, 3654-3666.
180. Joshi, A., Sen, S. & Rao, B. J. (2000): ATP-hydrolysis-dependent conformational switch modulates the stability of MutS-mismatch complexes. **Nucleic Acids Res** 28, 853-861.

181. Jung, Y. & Lippard, S. J. (2003): Nature of full-length HMGB1 binding to cisplatin-modified DNA. **Biochemistry** 42, 2664-2671.
182. Junop, M. S., Obmolova, G., Rausch, K., Hsieh, P. & Yang, W. (2001): Composite active site of an ABC ATPase: MutS uses ATP to verify mismatch recognition and authorize DNA repair. **Mol Cell** 7, 1-12.
183. Junop M. S., Yang W., Funchain P., Clendenin W. & Miller J. H. (2003): *In vitro* and *in vivo* studies of MutS, MutL and MutH mutants: correlation of mismatch repair and DNA recombination. **DNA Repair (Amst)** 2, 387-405.
184. Kadyrov, F. A., Dzantiev, L., Constantin, N. & Modrich, P. (2006): Endonucleolytic function of MutL α in human mismatch repair. **Cell** 126, 297-308.
185. Kaina, B., Ziouta, A., Ochs, K. & Coquerelle, T. (1997): Chromosomal instability, reproductive cell death and apoptosis induced by O6-methylguanine in Mex-, Mex+ and methylation-tolerant mismatch repair compromised cells: facts and models. **Mutat Res** 381, 227-241.
186. Karran, P. & Bignami, M. (1994): DNA damage tolerance, mismatch repair and genome instability. **Bioessays** 16, 833-839.
187. Kartalou, M., Samson, L. D. & Essigmann, J. M. (2000): Cisplatin adducts inhibit 1,N(6)-ethenoadenine repair by interacting with the human 3-methyladenine DNA glycosylase. **Biochemistry** 39, 8032-8038.
188. Kastan, M. B., Bartek, J. (2004): Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature** 18, 316-323.
189. Kastan, M. B., Lim, D. S., Kim, S. T., Xu, B. & Canman, C. (2000): Multiple signaling pathways involving ATM. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 65, 521-526.
190. Kat, A., Thilly, W. G., Fang, W. H., Longley, M. J., Li, G. M. & Modrich, P. (1993): An alkylation-tolerant, mutator human cell line is deficient in strand-specific mismatch repair. **Proc Natl Acad Sci USA** 90, 6424-6428.
191. Kishi, K., Doki, Y., Yano, M., Yasuda, T., Fujiwara, Y., Takiguchi, S., Kim, S., Higuchi, I. & Monden, M. (2003): Reduced MLH1 expression after chemotherapy is an indicator for poor prognosis in esophageal cancers. **Clin Cancer Res** 9, 4368-4375.
192. Kleczkowska, H. E., Marra, G., Lettieri, T. & Jiricny, J. (2001): hMSH3 and hMSH6 interact with PCNA and colocalize with it to replication foci. **Genes Dev** 15, 724-736.
193. Kneitz, B., Cohen, P. E., Avdievich, E., Zhu, L., Kane, M. F., Hou, H. Jr., Kolodner, R. D., Kucherlapati, R., Pollard, J. W. & Edelman, W. (2000): MutS homolog 4 localization to meiotic chromosomes is required for chromosome pairing during meiosis in male and female mice. **Genes Dev** 14, 1085-1097.

194. Koi, M., Umar, A., Chauhan, D. P., Cherian, S. P., Carethers, J. M., Kunkel, T. A. & Boland, C. R. (1994): Human chromosome 3 corrects mismatch repair deficiency and microsatellite instability and reduces N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine tolerance in colon tumor cells with homozygous hMLH1 mutation. **Cancer Res** 54, 4308-4312.
195. Kondo, E., Horii, A. & Fukushige, S. (2001): The interacting domains of three MutL heterodimers in man: hMLH1 interacts with 36 homologous amino acid residues within hMLH3, hPMS1 and hPMS2. **Nucleic Acids Res** 29, 1695-1702.
196. Koo, H. S., Wu, H. M. & Crothers, D. M. (1986): DNA bending at adenin.thymin tracts. **Nature**, 320, 501-506.
197. Laengle-Rouault, F., Maenhaut-Michel, G. & Radman M. (1986): GATC sequence and mismatch repair in *Escherichia coli*. **EMBO J** 5, 2009-2013.
198. Lage, H., Christmann, M., Kern, M. A., Dietel, M., Pick, M., Kaina, B. & Schadendorf D. (1999): Expression of DNA repair proteins hMSH2, hMSH6, hMLH1, O6-methylguanine-DNA methyltransferase and N-methylpurine-DNA glycosylase in melanoma cells with acquired drug resistance. **Int J Cancer** 80, 744-750.
199. Lage, H & Dietel, M. (1999): Involvement of the DNA mismatch repair system in antineoplastic drug resistance. **J Cancer Clin Oncol** 125, 156-165.
200. Lahue R. S., Su S. S. & Modrich P. (1987) : Requirement for d(GATC) sequences in *Escherichia coli* mutHLS mismatch correction. **Proc Natl Acad Sci USA** 84, 1482-1486.
201. Lahue, R. S., Au K. G. & Modrich, P. (1989) : DNA mismatch correction in a defined system. **Science** 245, 160-164.
202. Lamers, M. H., Perrakis, A., Enzlin, J. H., Winterwerp, H. H., de Wind, N. & Sixma, T. K. (2000): The crystal structure of DNA mismatch repair protein MutS binding to a G x T mismatch. **Nature** 407, 711-717.
203. Lamers, M. H., Winterwerp, H. H. & Sixma, T. K. (2003): The alternating ATPase domains of MutS control DNA mismatch repair. **EMBO J** 22, 746-756.
204. Lan, Z., Sever-Chroneos, Z., Strobeck, M. W., Park, C. H., Baskaran, R., Edelmann, W., Leone, G., Knudsen, E. S. (2002): DNA damage invokes mismatch repair-dependent cyclin D1 attenuation and retinoblastoma signaling pathways to inhibit CDK2. **J Biol Chem** 277, 8372-8381.
205. Langland, G., Kordich, J., Creaney, J., Goss, K. H., Lillard-Wetherell, K., Bebenek, K., Kunkel, T. A. & Groden, J. (2001): The Bloom's syndrome protein (BLM) interacts with MLH1 but is not required for DNA mismatch repair. **J Biol Chem** 276, 30031-30035.

206. Lau, P. J., Flores-Rozas, H. & Kolodner, R. D. (2002): Isolation and characterization of new proliferating cell nuclear antigen (POL30) mutator mutants that are defective in DNA mismatch repair. **Mol Cell Biol** 22, 6669-6680.
207. Lau, P. J. & Kolodner, R. D. (2003): Transfer of the MSH2.MSH6 complex from proliferating cell nuclear antigen to mispaired bases in DNA. **J Biol Chem** 278, 14-17.
208. Lawrence, D. L., Engelsberg, B. N., Farid, R. S., Hughes, E. N. & Billings, P. C. (1993): Localization of the binding region of high mobility group protein 2 to cisplatin-damaged DNA. **J Biol Chem** 268, 23940-23945.
209. Leach, F. S., Nicolaides, N. C., Papadopoulos, N., Liu, B., Jen, J., Parsons, R., Peltomaki, P., Sistonen, P., Aaltonen, L. A., Nystrom-Lahti, M., et al. (1993): Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Cell** 75, 1215-1263.
210. Lee, S. H. & Hurwitz, J. (1990): Mechanism of elongation of primed DNA by DNA polymerase δ , proliferating cell nuclear antigen, and activator 1. **Proc Natl Acad Sci USA** 87, 5672-5676.
211. Lee, K. B., Parker, R. J., Bohr, V., Cornelison, T. & Reed, E. (1993): Cisplatin sensitivity/resistance in UV repair-deficient Chinese hamster ovary cells of complementation groups 1 and 3. **Carcinogenesis** 14, 2177-2180.
212. Lemaire, M. A., Schwartz, A., Rahmouni, A. R. & Leng, M. (1991): Interstrand cross-links are preferentially formed at the d(GC) sites in the reaction between *cis*-diamminedichloroplatinum (II) and DNA. **Proc Natl Acad Sci USA** 88, 1982-1985.
213. Lepre, C. A. & Lippard, S. J. (1990): Interaction of platinum antitumor compounds with DNA. **Nucleic Acids and Mol Biol** 4, 9-38.
214. Lewis, L. K., Karthikeyan, G., Westmoreland, J. W. & Resnick, M. A. (2002): Differential suppression of DNA repair deficiencies of Yeast rad50, mre11 and xrs2 mutants by EXO1 and TLC1 (the RNA component of telomerase). **Genetics** 160, 49-62.
215. Li, L., Elledge, S. J., Peterson, C. A., Bales, E. S. & Legerski, R. J. (1994): Specific association between the human DNA repair proteins XPA and ERCC1. **Proc Natl Acad Sci USA** 91, 5012-5016.
216. Lin, W. C., Lin, F. T. & Nevins, J. R. (2001): Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation. **Genes Dev** 15, 1833-1844.
217. Lin, X., Ramamurthi, K., Mishima, M., Kondo, A., Christen, R. D. & Howell, S. B. (2000): P53 modulates the effect of loss of DNA mismatch repair on the sensitivity of human colon cancer cells to the cytotoxic and mutagenic effects of cisplatin. **Cancer Res** 61, 1508-1516.

218. Lin, Y. L., Shivji, M. K., Chen, C., Kolodner, R., Wood, R. D. & Dutta, A. (1998): The evolutionarily conserved zinc finger motif in the largest subunit of human replication protein A is required for DNA replication and mismatch repair but not for nucleotide excision repair. **J Biol Chem** 273, 1453-1461.
219. Lipkin, S. M., Wang, V., Jacoby, R., Banerjee-Basu, S., Baxevanis, A. D., Lynch, H. T., Elliott, R. M. & Collins, F. S. (2000): *MLH3*: a DNA mismatch repair gene associated with mammalian microsatellite instability. **Nat Genet** 24, 27-35.
220. Liu, L., Markowitz, S. & Gerson, S. L. (1996): Mismatch repair mutations override alkyltransferase in conferring resistance to temozolomide but not to 1,3-bis(2-chloroethyl)nitrosourea. **Cancer Res** 56, 5375-5379.
221. Longley, M. J., Pierce, A. J. & Modrich, P. (1997): DNA polymerase δ is required for human mismatch repair *in vitro*. **J Biol Chem** 272, 10917-10921.
222. Lopez de Saro, F. J. & O'Donnell, M. (2001) : Interaction of the β sliding clamp with MutS, ligase, and DNA polymerase I. **Proc Natl Acad Sci USA** 98, 8376-8380.
223. Lovett, S. T. & Kolodner, R. D. (1989): Identification and purification of a single-stranded-DNA-specific exonuclease encoded by the *recJ* gene of *Escherichia coli*. **Proc Natl Acad Sci USA** 86, 2627-2631.
224. Lu, A. L., Clark, S & Modrich, P. (1983): Methyl-directed repair of DNA base-pair mismatches *in vitro*. **Proc Natl Acad Sci USA** 80, 4639-4643.
225. Maisse, C., Guerrieri, P., Melino, G (2003): p73 and p63 protein stability: the way to regulate function? **Biochem Pharmacol** 66, 1555-1561.
226. Mayer, F., Gillis, A. J., Dinjens, W., Oosterhuis, J. W., Bokemeyer, C. & Looijenga, L. H. (2002): Microsatellite instability of germ cell tumors is associated with resistance to systemic treatment. **Cancer Res** 62, 2758-2760.
227. McA'Nulty, M. M., Whitehead, J. P. & Lippard, S. J. (1996): Binding of Ixr1, a yeast HMG-domain protein, to cisplatin-DNA adducts *in vitro* and *in vivo*. **Biochemistry** 35, 6089-6099.
228. Maga, G., Villani, G., Ramadan, K., Shevelev, I., Tanguy Le Gac, N., Blanco, L., Blanca, G., Spadari, S. & Hubscher, U. (2002) : Human DNA polymerase lambda functionally and physically interacts with proliferating cell nuclear antigen in normal and translesion DNA synthesis. **J Biol Chem** 277, 48434-48440.
229. Malinge, J.-M., Perez, C. & Leng, M. (1994): Base sequence-independent distortions induced by interstrand cross-links in *cis*-diamminedichloroplatinum (II)-modified DNA. **Nucleic Acids Res** 22, 3834-3839.

230. Malkov, V. A., Biswas, I., Camerini-Otero, R. D. & Hsieh P. (1997): Photocross-linking of the NH₂-terminal region of *Taq* MutS protein to the major groove of a heteroduplex DNA. **J Biol Chem** 272, 23811-23817.
231. Mantri, Y., Lippard, S. J. & Baik, M. H. (2007): Bifunctional Binding of Cisplatin to DNA: Why Does Cisplatin Form 1,2-Intrastrand Cross-Links with AG But Not with GA? **J Am Chem Soc** 129, 5023-5030.
232. Marrot, L. & Leng, M. (1989): Chemical probes of the conformation of DNA modified by *cis*-diamminedichloroplatinum(II). **Biochemistry** 28, 1454-1461.
233. Marsischky, G. T. & Kolodner, R. D. (1999): Biochemical characterization of the interaction between the *Saccharomyces cerevisiae* MSH2-MSH6 complex and mispaired bases in DNA. **J Biol Chem** 274, 26668-26682.
234. Marti, T. M., Kunz, C. & Fleck, O. (2002): Repair of damaged and mismatched DNA by the XPC homologues Rhp41 and Rhp42 of fission yeast. **Genetics** 164, 457-467.
235. Martik, D., Baitinger, C. & Modrich, P. (2004): Differential specificities and simultaneous occupancy of human MutS α nucleotide binding sites. **J Biol Chem** 279, 28402-28410.
236. Matic, I., Taddei, F. & Radman, M. (2000): No genetic barriers between *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli* in SOS-induced mismatch repair-deficient cells. **J Bacteriol** 182, 5922-5924.
237. Matson, S. W. (1986): *Escherichia coli* DNA helicase II (uvrD gene product) catalyzes the unwinding of DNA.RNA hybrids *in vitro*. **Proc Natl Acad Sci USA** 86, 4430-4434.
238. Matsuda, T., Saijo, M., Kuraoka, I., Kobayashi, T., Nakatsu, Y., Nagai, A., Enjoji, T., Masutani, C., Sugawara, K., Hanaoka, F., et al. (1995): DNA repair protein XPA binds replication protein A (RPA). **J Biol Chem** 270, 4152-4157.
239. Mazur, D. J., Mendillo, M. L. & Kolodner, R. D. (2006): Inhibition of Msh6 ATPase activity by mispaired DNA induces a Msh2(ATP)-Msh6(ATP) state capable of hydrolysis-independent movement along DNA. **Mol Cell** 22, 39-49.
240. Mazurek, A., Bernardini, M. & Fishel, R. (2002): Activation of human MutS homologs by 8-oxo-guanine DNA damage. **J Biol Chem** 277, 8260-8266.
241. Mechanic, L. E., Frankel, B. A. & Matson, S. W. (2000): *Escherichia coli* MutL loads DNA helicase II onto DNA. **J Biol Chem** 275, 38337-38346.
242. Mendillo, M. L., Putnam, C. D. & Kolodner, R. D. (2007): *Escherichia coli* MutS tetramerization domain structure reveals that stable dimers but not tetramers are essential for DNA mismatch repair *in vivo*. **J Biol Chem** 282, 16345-16354.

243. Meyers, M., Wagner, M. W., Hwang, H. S., Kinsella, T. J. & Boothman, D. A. (2001): Role of the hMLH1 DNA mismatch repair protein in fluoropyrimidine-mediated cell death and cell cycle responses. **Cancer Res** 61, 5193-5201.
244. Mis, J. R. & Kunz, B. A. (1990): Analysis of mutations induced in the SUP4-o gene of *Saccharomyces cerevisiae* by *cis*-diamminedichloroplatinum(II). **Carcinogenesis** 11, 633-638.
245. Mitkova, E., Ugrinova, I., Pashev, I. G. & Pasheva, E. A. (2005): The inhibitory effect of HMGB-1 protein on the repair of cisplatin-damaged DNA is accomplished through the acidic domain. **Biochemistry** 44, 5893-5898.
246. Modrich, P. (1997): Strand-specific mismatch repair in mammalian cells. **J Biol Chem** 272, 24727-24730.
247. Modrich, P. & Lahue, R. S. (1996): Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination and cancer biology. **Annu Rev Biochem** 65, 101-133.
248. Mohindra, A., Hays, L. E., Phillips, E. N., Preston, B. D., Helleday, T. & Meuth, M. (2002): Defects in homologous recombination repair in mismatch-repair-deficient tumour cell lines. **Hum Mol Genet** 11, 2189-2200.
249. Monjardet-Bas, V., Bombard, S., Chottard, J. C. & Kozelka, J. (2003) : GA and AG sequences of DNA react with cisplatin at comparable rates. **Chemistry** 9, 4739-4745.
250. Montecucco, A., Rossi, R., Levin, D. S., Gary, R., Park, M. S., Motycka, T. A., Ciarrocchi, G., Villa, A., Biamonti, G. & Tomkinson, A. E. (1998): DNA ligase I is recruited to sites of DNA replication by an interaction with proliferating cell nuclear antigen: identification of a common targeting mechanism for the assembly of replication factories. **EMBO J** 17, 3786-3795.
251. Moreland, N. J., Illand, M., Kim, Y. T., Paul, J. & Brown, R. (1999): Modulation of drug resistance mediated by loss of mismatch repair by the DNA polymerase inhibitor aphidicolin. **Cancer Res** 59, 2102-2106.
252. Morozov, V. E., Falzon, M., Anderson, C. W. & Kuff, E. L. (1994): DNA-dependent protein kinase is activated by nicks and larger single-stranded gaps. **J Biol Chem** 269, 16684-16688.
253. Mu, D., Tursun, M., Duckett, D. R., Drummond, J. T., Modrich, P. & Sancar, A. (1997): Recognition and repair of compound DNA lesions (base damage and mismatch) by human mismatch repair and excision repair systems. **Mol Cell Biol** 17, 760-769.
254. Muller, C., Calsou, P., Frit, P., Cayrol, C., Carter, T. & Salles, B. (1998): UV sensitivity and impaired nucleotide excision repair in DNA-dependent protein kinase mutant cells. **Nucleic Acids Res** 26, 1382-1389.

255. Myung, K., Datta, A., Chen, C. & Kolodner, R. D. (2001) SGS1, the *Saccharomyces cerevisiae* homologue of BLM and WRN, suppresses genome instability and homeologous recombination. **Nat Genet** 27, 113-116.
256. Nakagawa, T., Datta, A. & Kolodner, R. D. (1999): Multiple functions of MutS- and MutL-related heterocomplexes. **Proc Natl Acad Sci USA** 96, 14186-14188.
257. Nehme, A., Baskaran, R., Nebel, S., Fink, D., Howell, S. B., Wang, J. Y. & Christen, R. D. (1999): Induction of JNK and c-Abl signalling by cisplatin and oxaliplatin in mismatch repair-proficient and -deficient cells. **Br J Cancer** 79, 1104-1110.
258. Nehme, A., Baskaran, R., Aebi, S., Fink, D., Nebel, S., Cenni, B., Wang, J. Y., Howell, S. B. & Christen, R. D. (1997): Differential induction of c-Jun NH2-terminal kinase and c-Abl kinase in DNA mismatch repair-proficient and -deficient cells exposed to cisplatin. **Cancer Res** 57, 3253-3257.
259. New, L., Liu, K. & Crouse, G. F. (1993): The yeast gene MSH3 defines a new class of eukaryotic MutS homologues. **Mol Gen Genet** 239, 97-108.
260. Ni, T. T., Marsischky, G. T. & Kolodner, R. D. (1999): MSH2 and MSH6 are required for removal of adenine misincorporated opposite 8-oxo-guanine in *S. cerevisiae*. **Mol Cell** 4, 439-444.
261. Nicolaïdes, N. C., Papadopoulos, N., Liu, B., Wei, Y.F., Carter, K. C., Ruben, S. M., Rosen, C. A., Haseltine, W. A., Fleischmann, R. D., Fraser, C. M. et al. (1994): Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. **Nature** 371, 75-80.
262. Obmolova, G., Ban, C., Hsieh, P. & Yang, W. (2000): Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA. **Nature** 407, 703-710.
263. O'Brien, V. & Brown, R. (2006): Signalling cell cycle arrest and cell death through the MMR System. **Carcinogenesis** 27, 682-692.
264. Ochs, K. & Kaina, B. (2000): Apoptosis induced by DNA damage O6-methylguanine is Bcl-2 and caspase-9/3 regulated and Fas/caspase-8 independent. **Cancer Res** 60, 5815-5824.
265. Ohashi, E., Ogi, T., Kusumoto, R., Iwai, S., Masutani, C., Hanaoka, F. & Ohmori, H. (2000): Error-prone bypass of certain DNA lesions by the human DNA polymerase kappa. **Genes Dev** 14, 1589-1594.
266. Ohndorf, U. M., Rould, M. A., He, Q., Pabo, C. O. & Lippard, S. J. (1999): Basis for recognition of cisplatin-modified DNA by high-mobility-group proteins. **Nature** 399, 708-712.

267. Ohndorf, U. M., Whitehead, J. P., Raju, N. L. & Lippard, S. J. (1997): Binding of tsHMG, a mouse testis-specific HMG-domain protein, to cisplatin-DNA adducts. **Biochemistry** 36, 14807-14815.
268. Oniscu, A., Sphyris, N., Morris, R. G., Bader, S. & Harrison, D. J. (2004): p73 α is a candidate effector in the p53 independent apoptosis pathway of cisplatin damaged primary murine colonocytes. **J Clin Pathol**, 492-498.
269. Palombo, F., Gallinari, P., Iaccarino, I., Lettieri, T., Hughes, M., D'Arrigo, A., Truong, O., Hsuan, J. J. & Jiricny, J. (1995): GTBP, a 160-kilodalton protein essential for mismatch-binding activity in human cells. **Science** 268, 1912-1914.
270. Palombo, F., Iaccarino, I., Nakajima, E., Ikejima, M., Shimada, T. & Jiricny, J. (1996): hMutS β , a heterodimer of hMSH2 and hMSH3, binds to insertion/deletion loops in DNA. **Curr Biol** 6, 1181-1184.
271. Pang, Q., Prolla, T. A. & Liskay, R. M. (1997): Functional domains of the *Saccharomyces cerevisiae* Mlh1p and Pms1p DNA mismatch repair proteins and their relevance to human hereditary nonpolyposis colorectal cancer-associated mutations. **Mol Cell Biol** 17, 4465-4473.
272. Papadopoulos, N., Nicolaides, N. C., Wei, Y. F., Ruben, S. M., Carter, K. C., Rosen, C. A., Haseltine, W. A., Fleischmann, R. D., Fraser, C. M., Adams, M. D., et al. (1994) Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. **Science** 263, 1625-1629.
273. Papouli, E., Cejka, P. & Jiricny, J. (2004) : Dependence of the cytotoxicity of DNA-damaging agents on the mismatch repair status of human cells. **Cancer Res** 64, 3391-3394.
274. Paques, F. & Haber, J. E. (1999): Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol Mol Biol Rev** 63, 349-404.
275. Park, C. H. & Sancar, A. (1994): Formation of a ternary complex by human XPA, ERCC1, and ERCC4(XPF) excision repair proteins. **Proc Natl Acad Sci USA** 91, 5017-5021.
276. Park, C. H., Mu, D., Reardon, J. T. & Sancar, A. (1995): The general transcription-repair factor TFIIH is recruited to the excision repair complex by the XPA protein independent of the TFIIIE transcription factor. **J Biol Chem** 270, 4896-4902.
277. Parker B. O. & Marinus M. G. (1992): Repair of DNA heteroduplexes containing small heterologous sequences in *Escherichia coli*. **Proc Natl Acad Sci USA** 89, 1730-1734.
278. Parkinson, J. A., Chen, Y., del Socorro Murdoch, P., Guo, Z., Berners-Price, S. J., Brown, T. & Sadler, P. J. (2000): Sequence-dependent bending of DNA induced by cisplatin: NMR structures of an A.T-rich 14-mer duplex. **Chemistry** 6, 3636-3644.

279. Paquet, F., Perez, C., Leng, M., Lancelot, G. & Malinge, J.-M. (1996) : NMR solution structure of a DNA decamer containing an interstrand cross-link of the antitumor drug *cis*-diamminedichloroplatinum (II). **J Biomol Struct Dyn** 14, 67-77.
280. Paquis-Flucklinger, V., Santucci-Darmanin, S., Paul, R., Saunieres, A., Turc-Carel, C. & Desnuelle, C. (1997): Cloning and expression analysis of a meiosis-specific MutS homolog: the human MSH4 gene. **Genomics** 4, 188-194.
281. Patrick, S. M. & Turchi, J. J. (1998): Human replication protein A preferentially binds cisplatin-damaged duplex DNA *in vitro*. **Biochemistry** 37, 8808-8815.
282. Pedrazzi, G., Perrera, C., Blaser, H., Kuster, P., Marra, G., Davies, S. L., Ryu, G. H., Freire, R., Hickson, I. D., Jiricny, J. & Stagljar, I. (2001) : Direct association of Bloom's syndrome gene product with the human mismatch repair protein MLH1. **Nucleic Acids Res** 29, 4378-4386.
283. Pichierri, P., Franchitto, A., Piergentili, R., Colussi, C. & Palitti, F. (2001) : Hypersensitivity to camptothecin in MSH2 deficient cells is correlated with a role for MSH2 protein in recombinational repair. **Carcinogenesis** 22, 1781-1787.
284. Pil, P. M. & Lippard, S. J. (1992): Specific binding of chromosomal protein HMG1 to DNA damaged by the anticancer drug cisplatin. **Science** 256, 234-237.
285. Pillaire, M. J., Margot, A., Villani, G., Sarasin, A., Defais, M. & Gentil, A. (1994) : Mutagenesis in monkey cells of a vector containing a single d(GPG) *cis*-diamminedichloroplatinum(II) adduct placed on codon 13 of the human H-ras proto-oncogene. **Nucleic Acids Res** 22, 2519-2524.
286. Pinto, A. L. & Lippard, S. J. (1985): Sequence-dependent termination of *in vitro* DNA synthesis by *cis*- and *trans*-diamminedichloroplatinum (II). **Proc Natl Acad Sci USA** 82, 4616-4619.
287. Plooy, A. C., van Dijk, M. & Lohman, P. H. (1984): Induction and repair of DNA cross-links in chinese hamster ovary cells treated with various platinum coordination compounds in relation to platinum binding to DNA, cytotoxicity, mutagenicity, and antitumor activity. **Cancer Res** 44, 2043-2051.
288. Poll, E. H., Abrahams, P. J., Arwert, F. & Eriksson, A. W. (1984): Host-cell reactivation of *cis*-diamminedichloroplatinum(II)-treated SV40 DNA in normal human, Fanconi anemia and xeroderma pigmentosum fibroblasts. **Mutat Res** 132, 181-187.
289. Proffit, J. H., Davie, K. R., Swinton, D. & Hattman, S. (1984): 5-Methylcytosine is not detectable in *Saccharomyces cerevisiae* DNA. **Mol Cell Biol** 4, 985-988.

290. Prolla, T. A., Christie, D. M. & Liskay, R. M. (1994)a : Dual requirement in yeast DNA mismatch repair for MLH1 and PMS1, two homologs of the bacterial *mutL* gene. **Mol Cell Biol** 14, 407-415.
291. Prolla, T. A., Pang, Q., Alani, E., Kolodner, R. D. & Liskay, R. M. (1994)b: MLH1, PMS1, and MSH2 interactions during the initiation of DNA mismatch repair in yeast. **Science** 265, 1091-1093.
292. Ramilo, C., Gu, L., Guo, S., Zhang, X., Patrick, S. M., Turchi, J. J. & Li, G. M. (2002): Partial reconstitution of human DNA mismatch repair *in vitro*: characterization of the role of human replication protein A. **Mol Cell Biol** 22, 2037-2046.
293. Raschle, M., Dufner, P., Marra, G. & Jiricny, J. (2002): Mutations within the hMLH1 and hPMS2 subunits of the human MutL α mismatch repair factor affect its ATPase activity, but not its ability to interact with hMutS α . **J Biol Chem** 277, 21810-21820.
294. Räschle, M., Marra, G., Nystrom-Lahti, M., Schar, P. & Jiricny, J. (1999): Identification of hMutL β , a heterodimer of hMLH1 and hPMS1. **J Biol Chem** 274, 32368-32375.
295. Rasmussen, L. J. & Samson, L. (1996): The *Escherichia coli* MutS DNA mismatch binding protein specifically binds O(6)-methylguanine DNA lesions. **Carcinogenesis** 17, 2085-2088.
296. Rayssiguier, C., Thaler, D. S. & Radman, M. (1989): The barrier to recombination between *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is disrupted in mismatch-repair mutants. **Nature** 342, 396-401.
297. Reenan, R. A. & Kolodner, R. D. (1992): Characterization of insertion mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* MSH1 and MSH2 genes: evidence for separate mitochondrial and nuclear functions. **Genetics** 132, 975-985.
298. Risinger, J. I., Umar, A., Boyd, J., Berchuck, A., Kunkel, T. A. & Barrett, J. C. (1996): Mutation of MSH3 in endometrial cancer and evidence for its functional role in heteroduplex repair. **Nat Genet** 14, 102-105.
299. Risinger, J. I., Umar, A., Glaab, W. E., Tindall, K. R., Kunkel, T. A. & Barrett, J. C. (1998): Single gene complementation of the hPMS2 defect in HEC-1-A endometrial carcinoma cells. **Cancer Res** 58, 2978-2981.
300. Roberts, J. J. & Friedlos, F. (1987): Quantitative estimation of cisplatin-induced DNA interstrand cross-links and their repair in mammalian cells: relationship to toxicity. **Pharmacol Ther** 34, 215-246.
301. Roongta V. A., Jones C. R. & Gorenstein D. G. (1990): Effect of distortions in the deoxyribose phosphate backbone conformation of duplex oligodeoxyribonucleotide

- dodecamers containing GT, GG, GA, AC, and GU base-pair mismatches on ³¹P NMR spectra. **Biochemistry** 29, 5245-5258.
- 302.** Roos, W., Baumgartner, M. & Kaina, B. (2004): Apoptosis triggered by DNA damage O6-methylguanine in human lymphocytes requires DNA replication and is mediated by p53 and Fas/CD95/Apo-1. **Oncogene** 23, 359-367.
- 303.** Ross-Macdonald, P. & Roeder, G. S. (1994): Mutation of a meiosis-specific MutS homolog decreases crossing over but not mismatch correction. **Cell** 79, 1069-1080.
- 304.** Rosenberg G. B., Vancamp, L., Krigas, T. (1965): Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from platinum electrode. **Nature** 205,698-699.
- 305.** Russo, M. T., Blasi, M. F., Chiera, F., Fortini, P., Degan, P., Macpherson, P., Furuichi, M., Nakabeppu, Y., Karran, P., Aquilina, G. & Bignami, M. (2004) : The oxidized deoxynucleoside triphosphate pool is a significant contributor to genetic instability in mismatch repair-deficient cells. **Mol Cell Biol** 24, 465-474.
- 306.** Salsbury, F. R. Jr., Clodfelter, J. E., Gentry, M. B., Hollis, T. & Scarpinato, K. D. (2006): The molecular mechanism of DNA damage recognition by MutS homologs and its consequences for cell death response. **Nucleic Acids Res** 34, 2173-2185.
- 307.** Schofield, M. J., Nayak, S., Scott, T. H., Du, C. & Hsieh, P. (2001): Interaction of *Escherichia coli* MutS and MutL at a DNA mismatch. **J Biol Chem** 276, 28291-29299.
- 308.** Schroder, G., Kozelka, J., Sabat, M., Fouchet, M. H., Beyerle-Pfnur, R. & Lippert, B. (1996): Model of the Second Most Abundant Cisplatin-DNA Cross-Link: X-ray Crystal Structure and Conformational Analysis of *cis*-[(NH₃)₂Pt(9-MeA-N7)(9-EtGH-N7)](NO₃).2H₂O (9-MeA = 9-Methyladenine; 9-EtGH = 9-Ethylguanine). **Inorg Chem** 35, 1647-1652.
- 309.** Schmutte, C., Marinescu, R. C., Sadoff, M. M., Guerrette, S., Overhauser, J. & Fishel, R. (1998) : Human exonuclease I interacts with the mismatch repair protein hMSH2. **Cancer Res** 58, 4537-4342.
- 310.** Schmutte, C., Sadoff, M. M., Shim, K. S., Acharya, S. & Fishel, R. (2001) : The interaction of DNA mismatch repair proteins with human exonuclease I. **J Biol Chem** 276, 33011-33018.
- 311.** Schweizer, U., Hey, T., Lipps, G. & Krauss, G. (1999) : Photocrosslinking locates a binding site for the large subunit of human replication protein A to the damaged strand of cisplatin-modified DNA. **Nucleic Acids Res** 27, 3183-3189.

312. Sedletska, Y., Fourrier, L. & Malinge, J.-M. (2007): Modulation of MutS ATP-dependent functional activities by DNA containing a cisplatin compound lesion (base damage and mismatch). **J Mol Biol** 369, 27-40.
313. Sedletska, Y., Giraud-Panis, M.-J. & Malinge, J.-M. (2005): Cisplatin is a DNA-damaging antitumour compound triggering multifactorial biochemical responses in cancer cells: importance of apoptotic pathways. **Curr Med Chem Anticancer Agents** 5, 251-265.
314. Selva, E. M., New, L., Crouse, G. F. & Lahue, R. S. (1995): Mismatch correction acts as a barrier to homeologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics** 139, 1175-1188.
315. Shimodaira, H., Yoshioka-Yamashita, A., Kolodner, R. D. & Wang, J. Y. (2003): Interaction of mismatch repair protein PMS2 and the p53-related transcription factor p73 in apoptosis response to cisplatin. **Proc Natl Acad Sci USA** 100, 2420-2425.
316. Siddik, Z. H. (2003): Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. **Oncogene** 22, 7265-7279.
317. Sixma, T. K. (2001): DNA mismatch repair: MutS structures bound to mismatches. **Curr Opin Struct Biol** 11, 47-52.
318. Smith, B. T., Grossman, A. D. & Walker, G. C. (2001): Visualization of mismatch repair in bacterial cells. **Mol Cell** 8, 1197-1206.
319. Spampinato, C. & Modrich, P. (2000) The MutL ATPase is required for mismatch repair. **J Biol Chem**. 275, 9863-9869.
320. Stambuk, S. & Radman, M. (1998): Mechanism and control of interspecies recombination in *Escherichia coli*. I. Mismatch repair, methylation, recombination and replication functions. **Genetics** 150, 533-542.
321. Stojic, L., Cejka, P. & Jiricny, J. (2005): High doses of SN1 type methylating agents activate DNA damage signaling cascades that are largely independent of mismatch repair. **Cell Cycle** 4, 473-477.
322. Stojic, L., Mojas, N., Cejka, P., Di Pietro, M., Ferrari, S., Marra, G. & Jiricny, J. (2004): Mismatch repair-dependent G2 checkpoint induced by low doses of SN1 type methylating agents requires the ATR kinase. **Genes Dev** 18, 1331-1344.
323. Su, S. S. & Modrich, P. (1986): *Escherichia coli* MutS-encoded protein binds to mismatched DNA base pairs. **Proc Natl Acad Sci USA** 83, 5057-5061.
324. Su, S. S., Grilley, M., Thresher, R., Griffith, J. & Modrich, P. (1989): Gap formation is associated with methyl-directed mismatch correction under conditions of restricted DNA syntheses. **Genome** 31, 104-111.

325. Su, S. S., Lahue, R. S., Au, K. G. & Modrich, P. (1988): Mismatch specificity of methyl-directed DNA mismatch correction *in vitro*. **J Biol Chem** 263, 6829-6835.
326. Sugawara, N., Pâques, F., Colaiácovo, M. & Haber, J. E. (1997): Role of *Saccharomyces cerevisiae* Msh2 and Msh3 repair proteins in double-strand break-induced recombination. **Proc Natl Acad Sci USA** 94, 9214-9219.
327. Swann, P. F., Waters, T. R., Moulton, D. C., Xu, Y. Z., Zheng, Q., Edwards, M. & Mace, R. (1996): Role of postreplicative DNA mismatch repair in the cytotoxic action of thioguanine. **Science** 273, 1109-1111.
328. Takahara, P. M., Rosenzweig, A. C., Frederick, C. A. & Lippard, S. J. (1995): Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin. **Nature** 377, 649-652.
329. Takamatsu, S., Kato, R. & Kuramitsu, S. (1996): Mismatch DNA recognition protein from an extremely thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus* HB8. **Nucleic Acids Res** 24, 640-647.
330. Teuben, J. M., Bauer, C., Wang, A. H. & Reedijk, J. (1999): Solution structure of a DNA duplex containing a *cis*-diammineplatinum(II) 1,3-d(GTG) intrastrand cross-link, a major adduct in cells treated with the anticancer drug carboplatin. **Biochemistry** 38, 12305-12312.
331. Thomas, D. C., Roberts, J. D. & Kunkel T. A. (1991): Heteroduplex repair in extracts of human HeLa cells. **J Biol Chem** 266, 3744-3751.
332. Thomas, J. O. & Travers, A. A. (2001): HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins. **Trends Biochem Sci** 26, 167-174.
333. Tishkoff, D. X., Filosi, N., Gaida, G. M. & Kolodner, R. D. (1997): A novel mutation avoidance mechanism dependent on *S. cerevisiae* RAD27 is distinct from DNA mismatch repair. **Cell** 88, 253-263.
334. Tishkoff, D. X., Amin, N. S., Viars, C. S., Arden, K. C. & Kolodner, R. D. (1998): Identification of a human gene encoding a homologue of *Saccharomyces cerevisiae* EXO1, an exonuclease implicated in mismatch repair and recombination. **Cancer Res** 58, 5027-5031.
335. Toney, J. H., Donahue, B. A., Kellett, P. J., Bruhn, S. L., Essigmann, J. M. & Lippard, S. J. (1989): Isolation of cDNAs encoding a human protein that binds selectively to DNA modified by the anticancer drug *cis*-diamminedichloroplatinum(II). **Proc Natl Acad Sci USA** 86, 8328-8332.
336. Tran, H. T., Gordenin, D. A. & Resnick, M. A. (1999): The 3'→5' exonucleases of DNA polymerases δ and ϵ and the 5'→3' exonuclease Exo1 have major roles in postreplication mutation avoidance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol** 19, 2000-2007.

337. Tran, P. T. & Liskay, R. M. (2000): Functional studies on the candidate ATPase domains of *Saccharomyces cerevisiae* MutLa. **Mol Cell Biol** 20, 6390-6398.
338. Treiber, D. K., Zhai, X., Jantzen, H. M. & Essigmann, J. M. (1994): Cisplatin-DNA adducts are molecular decoys for the ribosomal RNA transcription factor hUBF (human upstream binding factor). **Proc Natl Acad Sci USA** 91, 5672-5676.
339. Trimmer, E. E., Zamble, D. B., Lippard, S. J. & Essigmann, J. M. (1998): Human testis-determining factor SRY binds to the major DNA adduct of cisplatin and a putative target sequence with comparable affinities. **Biochemistry** 37, 352-362.
340. Tsai, K. K., Yuan & Z. M. (2003): c-Abl stabilizes p73 by a phosphorylation-augmented interaction. **Cancer Res** 63, 3418-3424.
341. Turchi, J. J., Henkels, K. M. & Zhou, Y. (2000): Cisplatin-DNA adducts inhibit translocation of the Ku subunits of DNA-PK. **Nucleic Acids Res** 28, 4634-4641.
342. Turchi, J. J. & Henkels, K. (1996): Human Ku autoantigen binds cisplatin-damaged DNA but fails to stimulate human DNA-activated protein kinase. **J Biol Chem** 271, 13861-13867.
343. Ulloa, L. & Messmer, B. (2006): High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: friend and foe. **Cytokine Growth Factor Rev** 17, 189-201.
344. Umar, A., Buermeyer, A. B., Simon, J. A., Thomas, D. C., Clark, A. B., Liskay, R. M. & Kunkel, T. A. (1996): Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis. **Cell** 87, 65-73.
345. Umar, A., Koi, M., Risinger, J. I., Glaab, W. E., Tindall, K. R., Kolodner, R. D., Boland, C. R., Barrett, J. C. & Kunkel, T. A. (1997): Correction of hypermutability, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine resistance, and defective DNA mismatch repair by introducing chromosome 2 into human tumor cells with mutations in MSH2 and MSH6. **Cancer Res** 57, 3949-3955.
346. Umar, A., Risinger, J. I., Glaab, W. E., Tindall, K. R., Barrett, J. C. & Kunkel, T. A. (1998): Functional overlap in mismatch repair by human MSH3 and MSH6. **Genetics** 148, 1637-1646.
347. Umezū, K., Sugawara, N., Chen, C., Haber, J. E. & Kolodner, R. D. (1998): Genetic analysis of yeast RPA1 reveals its multiple functions in DNA metabolism. **Genetics** 148, 989-1005.
348. Urieli-Shoval, S., Gruenbaum, Y., Sedat, J. & Razin, A. (1982): The absence of detectable methylated bases in *Drosophila melanogaster* DNA. **FEBS Lett** 146, 148-152.

349. Vaisman, A. & Chaney, S. G. (1995): Induction of UV-damage recognition protein by cisplatin treatment. **Biochemistry** 34, 105-114.
350. Vaisman, A. & Chaney, S. G. (2000): The efficiency and fidelity of translesion synthesis past cisplatin and oxaliplatin GpG adducts by human DNA polymerase β . **J Biol Chem** 275, 13017-13025.
351. Vaisman, A., Lim, S. E., Patrick, S. M., Copeland, W. C., Hinkle, D. C., Turchi, J. J & Chaney, S. G. (1999): Effect of DNA polymerases and high mobility group protein 1 on the carrier ligand specificity for translesion synthesis past platinum-DNA adducts. **Biochemistry** 38, 11026-11039.
352. Vaisman, A., Masutani, C., Hanaoka, F. & Chaney, S. G. (2000): Efficient translesion replication past oxaliplatin and cisplatin GpG adducts by human DNA polymerase ϵ . **Biochemistry** 39, 4575-4580.
353. Vaisman, A., Varchenko, M., Umar, A., Kunkel, T. A., Risinger, J. I., Barrett, J. C., Hamilton, T. C. & Chaney, S. G. (1998): The role of hMLH1, hMSH3, and hMSH6 defects in cisplatin and oxaliplatin resistance: correlation with replicative bypass of platinum-DNA adducts. **Cancer Res** 58, 3579-3585.
354. van Garderen, C. J. & van Houte, L. P. (1994): The solution structure of a DNA duplex containing the *cis*-Pt(NH₃)₂[d(-GTG-)-N7(G),N7(G)] adduct, as determined with high-field NMR and molecular mechanics/dynamics. **Eur J Biochem** 225, 1169-1179.
355. Vichi, P., Coin, F., Renaud, J. P., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J. H., Moras, D. & Egly, J.-M. (1997): Cisplatin- and UV-damaged DNA lure the basal transcription factor TFIID/TBP. **EMBO J** 16, 7444-74456.
356. Viel, A., Petronzelli, F., Della Puppa, L., Lucci-Cordisco, E., Fornasarig, M., Pucciarelli, S., Rovella, V., Quaia, M., Ponz de Leon, M., Boiocchi, M. & Genuardi, M. (2002): Different molecular mechanisms underlie genomic deletions in the MLH1 Gene. **Hum Mutat** 20, 368-374.
357. Villani, G., Hubscher, U. & Butour, J. L. (1988) : Sites of termination of *in vitro* DNA synthesis on *cis*-diamminedichloroplatinum(II) treated single-stranded DNA: a comparison between *E. coli* DNA polymerase I and eucaryotic DNA polymerases α . **Nucleic Acids Res** 16, 4407-4418.
358. Viswanathan, M. & Lovett, S. T. (1999): Exonuclease X of *Escherichia coli*. A novel 3'→5' DNase and DNA superfamily member involved in DNA repair. **J Biol Chem** 274, 30094-300100.

359. Viswanathan, M., Burdett, V., Baitinger, C., Modrich, P. & Lovett S. T. (2001): Redundant exonuclease involvement in *Escherichia coli* methyl-directed mismatch repair. **J Biol Chem** 276, 31053-31058.
360. Waga, S. & Stillman, B. (1994): Anatomy of a DNA replication fork revealed by reconstitution of SV40 DNA replication *in vitro*. **Nature** 369, 207-212.
361. Wang, H., Lawrence, C. W., Li, G. M. & Hays, J. B. (1999): Specific binding of human MSH2.MSH6 mismatch-repair protein heterodimers to DNA incorporating thymine- or uracil-containing UV light photoproducts opposite mismatched bases. **J Biol Chem** 274, 16894-16900.
362. Wang, J. Y. Regulation of cell death by the Abl tyrosine kinase. **Oncogene**. 19, 5643-5650.
363. Wang, B., Liu, K., Lin, F. T. & Lin, W. C. (2004): A role for 14-3-3 tau in E2F1 stabilization and DNA damage-induced apoptosis. **J Biol Chem** 279, 54140-54152.
364. Wang, D. & Lippard, S. J. (2005): Cellular processing of platinum anticancer drugs. **Nat Rev Drug Discov** 4, 307-320.
365. Warren, J. J., Pohlhaus, T. J., Changela, A., Iyer, R. R., Modrich, P. L. & Beese, L. S. (2007): Structure of the human MutSa DNA lesion recognition complex. **Mol Cell** 26, 579-592.
366. Watanabe, T., Huang, H., Nakamura, M., Wischhusen, J., Weller, M., Kleihues, P. & Ohgaki, H. (2002): Methylation of the *p73* gene in gliomas. **Acta Neuropathol (Berl)** 104, 357-362.
367. Webster G. D., Sanderson M. R., Skelly J. V., Neidle S., Swann P. F., Li B. F. & Tickle I. J. (1990): Crystal structure and sequence-dependent conformation of the A.G mispaired oligonucleotide d(CGCAAGCTGGCG). **Proc Natl Acad Sci USA** 87, 6693-6697.
368. Wei, M., Burenkova, O. & Lippard, S J. (2003): Cisplatin sensitivity in *Hmbg1*^{-/-} and *Hmbg1*^{+/+} mouse cells. **J Biol Chem** 278, 1769-1773.
369. Weir, H. M., Kraulis, P. J., Hill, C. S., Raine, A. R., Laue, E. D. & Thomas, J. O. (1993): Structure of the HMG box motif in the B-domain of HMG1. **EMBO J** 12, 1311-1319.
370. Welsh, K. M., Lu, A. L., Clark, S. & Modrich, P. (1987): Isolation and characterization of the *Escherichia coli mutH* gene product. **J Biol Chem** 262, 15624-15629.
371. Wetzel, C. C. & Berberich, S. J. (1998): DNA binding activities of p53 protein following cisplatin damage of ovarian cells. **Oncol Res** 10, 151-161.
372. Wilson, T., Guerrette, S. & Fishel, R. (1999) : Dissociation of mismatch recognition and ATPase activity by hMSH2-hMSH3. **J Biol Chem** 274, 21659-21664.

373. Winand, N. J., Panzer, J. A. & Kolodner, R. D. (1998): Cloning and characterization of the human and *Caenorhabditis elegans* homologs of the *Saccharomyces cerevisiae* *MSH5* gene. **Genomics** 53, 69-80.
374. Worth, L. Jr., Bader, T., Yang, J. & Clark, S. (1998): Role of MutS ATPase activity in MutS,L-dependent block of *in vitro* strand transfer. **J Biol Chem** 273, 23176-23182.
375. Worth, L., Clark, S., Radman, M. & Modrich, P. (1994): Mismatch repair proteins MutS and MutL inhibit RecA-catalyzed strand transfer between diverged DNAs. **Proc Natl Acad Sci USA** 91, 3238-3241.
376. Wu, T. H., Loh, T. & Marinus, M. G. (2002): The function of Asp70, Glu77 and Lys79 in the *Escherichia coli* MutH protein. **Nucleic Acids Res** 30, 818-822.
377. Wu, T. H. & Marinus, M. G. (1994): Dominant negative mutator mutations in the mutS gene of *Escherichia coli*. **J Bacteriol** 176, 5393-5400.
378. Wyatt, M. D., Allan, J. M., Lau, A. Y., Ellenberger, T. E. & Samson, L. D. (1999): 3-methyladenine DNA glycosylases: structure, function, and biological importance. **Bioessays** 21, 668-676.
379. Xie, Y., Liu, Y., Argueso, J. L., Henricksen, L. A., Kao, H. I., Bambara, R. A. & Alani, E. (2001): Identification of *rad27* mutations that confer differential defects in mutation avoidance, repeat tract instability, and flap cleavage. **Mol Cell Biol** 21, 4889-4899.
380. Yamada, M., O'Regan, E., Brown, R. & Karran, P. (1997): Selective recognition of a cisplatin-DNA adduct by human mismatch repair proteins. **Nucleic Acids Res** 25, 491-496.
381. Yamamoto, A., Schofield, M. J., Biswas, I. & Hsieh, P. (2000): Requirement for Phe36 for DNA binding and mismatch repair by *Escherichia coli* MutS protein. **Nucleic Acids Res** 28, 3564-3569.
382. Yamaguchi, M., Dao, V. & Modrich, P. (1998): MutS and MutL activate DNA helicase II in a mismatch-dependent manner. **J Biol Chem** 273, 9197-9201.
383. Yaneva, J., Leuba, S. H., van Holde, K. & Zlatanova, J. (1997): The major chromatin protein histone H1 binds preferentially to *cis*-platinum-damaged DNA. **Proc Natl Acad Sci USA** 94, 13448-13451.
384. Yaneva, J. N., Paneva, E. G., Zacharieva, S. I. & Zlatanova, J. S. (2006): Linker histones do not interact with DNA containing a single interstrand cross-link created by cisplatin. **Z Naturforsch [C]** 61, 879-883.
385. Yang, D., van Boom, S. S., Reedijk, J., van Boom, J. H. & Wang, A. H. (1995): Structure and isomerization of an intrastrand cisplatin-cross-linked octamer DNA duplex by NMR analysis. **Biochemistry** 34, 12912-12920.

386. Yang, W. (2000) : Structure and function of mismatch repair proteins. **Mutat Res** 460, 245-256.
387. Yarema, K. J., Lippard, S. J. & Essigmann, J. M. (1995) : Mutagenic and genotoxic effects of DNA adducts formed by the anticancer drug *cis*-diamminedichloroplatinum(II). **Nucleic Acids Res** 23, 4066-4072.
388. Yarema, K. J., Wilson, J. M., Lippard, S. J. & Essigmann, J. M. (1994): Effects of DNA adduct structure and distribution on the mutagenicity and genotoxicity of two platinum anticancer drugs. **J Mol Biol** 236, 1034-1048.
389. York, S. J. & Modrich, P. (2006): Mismatch repair-dependent iterative excision at irreparable O6-methylguanine lesions in human nuclear extracts. **J Biol Chem** 281, 22674-22683.
390. Yoshioka, K., Yoshioka, Y. & Hsieh, P. (2006): ATR kinase activation mediated by MutS α and MutL α in response to cytotoxic O6-methylguanine adducts. **Mol Cell** 22, 501-510.
391. Young, L. C., Thulien, K. J., Campbell, M. R., Tron, V. A. & Andrew, S. E. (2004): DNA mismatch repair proteins promote apoptosis and suppress tumorigenesis in response to UVB irradiation: an *in vivo* study. **Carcinogenesis** 25, 1821-1827.
392. Yuan, L., Yu, W. M., Yuann Z., Haudenschild, C. C. & Qu, C. K. (2003): Role of SHP-2 tyrosine phosphatase in the DNA damage-induced cell death response. **J Biol Chem** 278: 15208-15216.
393. Yuan, F., Gu, L., Guo, S., Wang, C. & Li, G. M. (2004): Evidence for involvement of HMGB1 protein in human DNA mismatch repair. **J Biol Chem** 279, 20935-20940.
394. Zhao, H. & Piwnica-Worms, H. (2001): ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. **Mol Cell Biol** 21, 4129-4139.
395. Zhou, B. B. & Elledge, S. J. (2000): The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. **Nature** 408, 433-439.

Signalisation moléculaire par le système de réparation des mésappariements de l'ADN et l'agent anticancéreux cisplatine : étude des interactions protéine MutS-composé de lésion du cisplatine.

Le système de réparation des mésappariements de l'ADN (MMR) est impliqué dans la cytotoxicité de l'agent anticancéreux cisplatine en activant une voie apoptotique. La déficience de ce système de réparation est reliée *in vivo* à une chimiorésistance des cellules cancéreuses au cisplatine. Afin de définir le lien entre la cytotoxicité du cisplatine et le fonctionnement du système MMR, nous avons étudié l'interaction de la protéine MutS du système MMR bactérien avec un composé de lésion du cisplatine (formé lorsqu'une base non complémentaire est incorporée en face de l'une des deux guanines platinées appartenant à l'adduit intrabrin d(GpG)).

Mon travail a porté essentiellement sur i) une étude des propriétés biochimiques ATP-dépendantes de MutS en présence d'un composé de lésion du cisplatine ii) une étude d'interaction entre plusieurs composés de lésion du cisplatine et la protéine HMGB1 qui est bien connue comme pouvant inhiber l'accessibilité des lésions majoritaires du cisplatine à des protéines de réparation.

Notre étude a été réalisée par des techniques de biologie moléculaire, de biochimie et de spectroscopie (résonance plasmonique de surface). Nous montrons qu'un composé de lésion du cisplatine module les propriétés ATP-dépendantes de MutS, un résultat inattendu étant qu'il inhibe le relargage de MutS de l'ADN. Un composé de lésion pourrait donc jouer un rôle dans la signalisation MMR-dépendante en modulant les stades précoces de l'initiation de la réparation ce qui est en accord avec le modèle dit « de signalisation directe MMR-dépendante ».

Mots-clés : système de réparation des mésappariements, ADN, protéine MutS, cisplatine, drogue anticancéreuse, ATP, protéine HMGB, interaction ADN-protéine.

Molecular signalling by the mismatch repair system and the anticancer agent cisplatin: interaction studies of MutS with a cisplatin compound lesion.

The DNA mismatch repair (MMR) system participates in the cytotoxicity of the anticancer agent cisplatin by triggering an apoptotic pathway and a deficiency is associated *in vivo* with cisplatin resistance in cancer cells. To determine at the molecular level how MMR proteins can signal cisplatin DNA damage, we have studied the interaction of the MutS bacterial protein and a cisplatin compound lesion (i.e. a d(GpG) cisplatin intrastrand cross-link on one strand and a mismatched base opposite one of the platinated guanines).

My work was mainly devoted to i) a study of biochemical ATP-dependent properties of MutS in the presence of DNA containing a unique cisplatin compound lesion ii) an interaction study of a set of cisplatin compound lesions with the HMGB1 rat protein that is well known as being capable to inhibit repair proteins accessibility to cisplatin lesions.

Our study was performed by techniques from molecular biology, biochemistry and spectroscopy (surface plasmon resonance). We showed that a cisplatin compound lesion modulates several ATP-dependent properties of MutS, one unexpected property being the inhibition of MutS release from DNA. Our data suggest that a cisplatin compound lesions can participate to MMR-dependent signalling by modulation of repair initiation steps and are in agreement with the model of "MMR-dependent direct signalling".

Keywords : mismatch repair system, DNA, MutS protein, cisplatin, anticancer drug, ATP, HMGB protein, interaction DNA-protein.

Discipline : Aspect Moléculaire et Cellulaire en Biologie

Centre de Biophysique Moléculaire
CNRS UPR 4301
Rue Charles Sadron
45071 Orléans cedex 2 (France)