



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1856572 B

(45) 授权公告日 2013. 11. 06

(21) 申请号 200480027294. 1

US 20030203893 A, 2003. 10. 30, 全文.

(22) 申请日 2004. 07. 23

Massuda Edmond ET-AL. GPI 6150,

(30) 优先权数据

0317466. 1 2003. 07. 25 GB

a PARP inhibitor, down-regulates
metastasisassociated S100A4(Mts1) and
suppresses invasion of breastcancer cells

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006. 03. 21

in vitro. Cellular Molecular and Tumor

Biology44. 2003, 44867-868.

(86) PCT申请的申请数据

审查员 于娜

PCT/GB2004/003235 2004. 07. 23

(87) PCT申请的公布数据

W02005/012524 EN 2005. 02. 10

(73) 专利权人 设菲尔德大学

地址 英国设菲尔德

(72) 发明人 T·赫勒代

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 魏永良

(51) Int. Cl.

C12N 15/11 (2006. 01)

A61K 38/00 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 9524379 A, 1995. 03. 09, 全文.

权利要求书1页 说明书13页 附图20页

(54) 发明名称

抑制 PARP 活性的 RNAi 用于生产治疗癌症的
药物的用途

(57) 摘要

本发明涉及抑制介导 DNA 链断裂修复的酶的
活性的活性剂的用途,用于生产治疗介导同源重
组的基因中缺陷导致的疾病的药物。

1. 聚 ADP-核糖聚合酶 -1 抑制剂用于生产治疗同源重组缺陷癌细胞的药物的用途,其中所述癌细胞在选自 XRCC2、XRCC3 和 BRCA2 的基因中具有缺陷。

2. 根据权利要求 1 的用途,其中所述聚 ADP-核糖聚合酶 -1 抑制剂选自苯并咪唑 - 甲酰胺类、喹唑啉 -4-[3H]- 酮和异喹啉衍生物。

3. 根据权利要求 2 的用途,其中所述聚 ADP-核糖聚合酶 -1 抑制剂选自 2-(4- 羟基苯基) 苯并咪唑 -4- 甲酰胺、8- 羟基 -2- 甲基喹唑啉 -4-[3H] 酮、6(5H) 菲啶酮、3 氨基苯甲酰胺、苯并咪唑 -4- 甲酰胺类和三环内酰胺吡啶。

4. 根据前面权利要求任一项的用途,其中所述同源重组缺陷的癌细胞是同源重组中部分缺陷的。

5. 根据权利要求 1 到 3 任一项的用途,其中所述同源重组缺陷的癌细胞是同源重组中完全缺陷的。

6. 权利要求 1 要求保护的用途,其中所述缺陷是所述基因中的突变。

7. 权利要求 1 要求保护的用途,其中所述缺陷是所述基因的缺失。

8. 权利要求 1 要求保护的用途,其中所述缺陷存在于所述基因的表达中。

9. 权利要求 1-3 任一项中要求保护的用途,其中所述同源重组缺陷的癌细胞选自肺癌、结肠癌、胰腺癌、胃癌、卵巢癌、宫颈癌、乳腺癌和前列腺癌。

10. 权利要求 1-3 任一项中要求保护的用途,其中所述癌细胞在人体中。

11. 权利要求 10 要求保护的用途,其中所述同源重组缺陷的癌细胞是基因连锁的遗传性癌细胞。

12. 权利要求 11 中要求保护的用途,其中所述同源重组缺陷的癌细胞是乳腺癌细胞。

13. 权利要求 1-3 任一项中要求保护的用途,其中所述同源重组缺陷的癌细胞是 BRCA2 表达缺陷的。

14. 权利要求 13 中要求保护的用途,其中所述癌细胞部分缺乏 BRCA2 表达。

15. 权利要求 13 中要求保护的用途,其中所述癌细胞完全缺乏 BRCA2 表达。

16. 权利要求 1 要求保护的用途,其中介导同源重组的基因是肿瘤抑制基因。

17. 权利要求 16 中要求保护的用途,其中所述肿瘤抑制基因是 BRCA2。

抑制 PARP 活性的 RNAi 用于生产治疗癌症的药物的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及抑制介导 DNA 链断裂修复的酶的活性的活性剂用于治疗某些形式的癌症,尤其乳腺癌的用途。

背景技术

[0002] 已表明在哺乳动物细胞中,同源重组 (HR) 在发生在 DNA 复制叉的损伤修复中起重要的作用 (2)。从而,HR 缺陷细胞表现为生长迟缓并显示出更高水平的遗传不稳定性。认为人类癌症中由于 HR 修复的丧失导致的遗传不稳定性明显促进了这些细胞中癌的发展 (1)。

[0003] 响应 DNA 链的断裂,由聚 (ADP-核糖基)化 (PARP) 对核蛋白质的转录后修饰在 DNA 修复、程序性细胞死亡的调节以及基因组稳定性的维持中起着重要的作用。

[0004] 聚 (ADP-核糖)聚合酶 (PAPR-1) 是哺乳动物细胞中大量存在的一种核蛋白质,它利用 NAD⁺ 作为底物催化形成聚 (ADP-核糖) (PAR) 多聚体。一旦发生 DNA 损伤,PAPR-1 迅速结合 DNA 链断裂 (单链或双链) 并催化向自身 (自修饰) 和其他蛋白质加入带负电的 PAR 链 (综述见 [3,4])。认为 PAPR-1 与 DNA 链断裂的结合保护 DNA 损伤被进一步加工,直到通过 PAR 多聚体导致的积聚的负电荷使 PAPR-1 从断裂解离 (5,6)。

[0005] 虽然 PAPR-1 与一些核过程,比如染色质结构的调节、DNA 复制、DNA 修复和转录有关,但是 PAPR-1 敲除小鼠却正常发育 (7)。从这些小鼠分离的细胞表现为过度重组表型和 SCE 水平升高、微核和四倍性的遗传不稳定性 (8-10)。通过端粒缩短、染色体融合频率增加和非整倍性也可以在这些 PAPR-1 敲除小鼠中发生遗传不稳定性 (11),尽管所有这些结果在另一组 PARP-1 敲除小鼠中不能重复 (12)。在前一小鼠敲除中,PAPR-1 无效突变挽救了 SCID 小鼠中受损的 V(D)J 重组 (13)。这些结果支持 Lindahl 和同事提出的观点,即 PARP-1 有抵抗重组的保护作用 (5)。他们提出 PARP-1 与 DNA 链断裂结合防止重组机器识别并处理 DNA 损伤,或者备选地,聚 ADP-核糖基化后积累的负电荷排斥邻近重组 DNA 序列。只有后一模型与 PARP-1 的自身抑制和显性失活突变体 PARP-1 的表达、诱导 SCE、基因扩增和同源重组相一致 (HR[14-18])。

[0006] 基于 PARP 抑制剂处理的细胞或者来源于 PARP-1 或 PARP-2 敲除小鼠的细胞的研究表明,PARP-1 活性的抑制增加细胞对于 DNA 损伤剂的敏感性,并且抑制链断裂重接 (3,4,8-11,19,20,47)。

[0007] PARP-1 活性的抑制剂已经与常规抗癌剂如放射疗法和化学疗法联合使用 (21)。抑制剂与甲基化剂、拓扑异构酶毒物及离子化放射联合使用,发现它可以提高这些治疗形式的有效性。然而,我们知道此类治疗导致对非癌细胞或者“健康”细胞的伤害和死亡,并与一些令人讨厌的副作用有关。

[0008] 因此现在需要一种癌症治疗,其既有效又可以选择性地杀死癌细胞而且不必与放射治疗和化学治疗联合使用。

[0009] 本发明人令人惊奇地发现,与野生型细胞相比,同源重组 (HR) 缺陷的细胞对 PARP 抑制剂超敏感。这是令人惊奇的,因为 PARP-1 敲除小鼠正常生活,说明 PARP-1 对于生命并

不是必需的。从而,不能预期细胞将对 PARP 抑制敏感。

[0010] 根据本发明的第一个方面,提供了抑制介导 DNA 链断裂修复的酶的活性的活性剂用于生产治疗由介导同源重组的基因中遗传缺陷导致的疾病的药物的用途。

[0011] 另一个方面,本发明提供了治疗哺乳动物(包括人类)中疾病或者状况的方法,所述疾病或状况是由于介导同源重组的基因中的遗传缺陷引起的,所述方法包括对所述哺乳动物施用治疗有效量的活性剂,该活性剂抑制介导复制叉中存在的 DNA 链断裂或其它损伤的修复的酶的活性。

[0012] 在优选的方面,所述酶是 PARP。在更优选的方面,所述活性剂是 PARP 抑制剂或者对 PARP 基因特异的 RNAi 分子。

[0013] 在进一步优选的方面,所述用途是癌症的治疗。

[0014] 优选地,所述药物是药物组合物,其由 PARP 抑制剂和可药用载体或稀释剂组成。

[0015] 同源重组缺陷肿瘤对 PARP-1 抑制剂的特异敏感性意味着患者体内正常分裂的细胞将不受治疗的影响。用 PARP-1 抑制剂治疗同源重组缺陷癌细胞还有一个好处,就是它不必和常规的放射疗法或化学疗法一起施用作为联合疗法,从而避免了与这些常规形式的治疗相关的副作用。

[0016] 介导同源重组的基因中的遗传缺陷可以是由于编码与同源重组有关的蛋白质的基因中的突变、缺失或有缺陷的表达。

[0017] 另一方面,本发明还提供了 PARP-1 抑制剂用于生产在同源重组缺陷细胞中诱导程序性细胞死亡的药物的用途。

[0018] 另一方面,本发明提供了在哺乳动物的同源重组缺陷细胞中诱导程序性细胞死亡的方法,该方法包括对该哺乳动物施用治疗有效量的 PARP 抑制剂。

[0019] 通过在同源重组缺陷细胞中导致程序性细胞死亡,有可能减小或者停止哺乳动物中肿瘤的生长。

[0020] 优选地,同源重组缺陷细胞是癌细胞。

[0021] 同源重组缺陷的癌细胞可以在 HR 中部分或者完全缺陷。优选地,癌细胞在 HR 中完全缺陷。

[0022] 术语“癌”或“肿瘤”包括肺癌、结肠癌、胰腺癌、胃癌、卵巢癌、宫颈癌、乳腺癌或前列腺癌。癌还可以包括皮肤癌、肾癌、肝癌、膀胱癌或者脑癌。

[0023] 待治疗的癌可能是遗传形式的癌症,其中待治疗的患者具有患癌症的家族倾向。优选地,待治疗的癌症是基因连锁的遗传性癌症。在本发明的优选实施方案中,癌症是基因连锁的遗传性乳腺癌。

[0024] 在优选的方面,PARP-1 抑制剂可用于治疗涉及 HR 的基因的表达有缺陷的癌细胞的治疗。在同源重组中具有所提出的功能的基因包括 XRCC1、ADPRT (PARP-1)、ADPRTL2 (PARP-2)、CTPS、RPA、RPA1、RPA2、RPA3、XPD、ERCC1、XPF、MMS19、RAD51、RAD51B、RAD51C、RAD51D、DMC1、XRCC2、XRCC3、BRCA1、BRCA2、RAD52、RAD54、RAD50、MRE11、NBS1、WRN、BLM、Ku70、Ku80、ATM、ATR、chk1、chk2、FANCA、FANCB、FANCC、FANCD1、FANCD2、FANCE、FANCF、FANCG、RAD1、RAD9、FEN-1、Mus81、Eme1、DDS1、BARD(综述见(2、3、5、22-28))。

[0025] 涉及同源重组的基因可以是肿瘤抑制基因。本发明因此提供了肿瘤抑制基因表达缺陷的癌细胞的治疗。优选地,肿瘤抑制基因是 BRCA1 或 BRCA2。

[0026] 现在在西方国家乳腺癌是妇女中最常见的癌症。某些家庭有很强的乳腺癌诱因，这常常是因为在 BRCA1 或 BRCA2 的一个等位基因中的遗传突变。然而，这些患者仍然保持一个有功能的等位基因。因此，这些患者发育正常并且没有该突变造成的表型结果。但是在一个细胞中，所述功能的等位基因可能丢失，使这个细胞癌变，同时在同源重组中有缺陷。这一步对于肿瘤发生是关键的 (1)。

[0027] 本发明人已经令人惊奇地发现 BRCA2 缺陷细胞对 PARP 抑制剂 NU1025 的细胞毒性的敏感性比野生型细胞强 100 倍。

[0028] 从而，在优选方面，本发明提供了 PARP 抑制剂用于生产治疗 HR 缺陷（例如，由于 BRCA1 和 / 或 BRCA2 表达的损失）的癌细胞的药物的用途。

[0029] 待治疗的癌细胞可以在 BRCA1 或 BRCA2 表达中部分或完全缺陷。BRCA1 和 BRCA2 突变可以用多路 PCR 技术、阵列技术 (29, 30) 或者技术人员已知的其他筛选来鉴定。

[0030] 可用于本发明的 PARP 抑制剂可以选自 PARP-1、PARP-2、PARP-3、PARP-4、端锚聚合酶 1 或端锚聚合酶 2。（综述见 31）。在优选实施方案中，可用于本发明的 PARP 抑制剂是 PARP-1 活性的抑制剂。

[0031] 可用于本发明的 PARP-1 抑制剂包括苯并咪唑 - 甲酰胺类、喹唑啉 -4-[3H]- 酮和异喹啉衍生物（如 2-(4- 羟基苯基) 苯并咪唑 -4- 甲酰胺 (NU1085)、8- 羟基 -2- 甲基喹唑啉 -4-[3H] 酮 (NU1025)、6(5H) 菲啶酮、3 氨基苯甲酰胺、苯并咪唑 -4- 甲酰胺 (BZ1-6) 和三环内酰胺吡啶 (TI1-5) [32]。通过设计 [33] 或者新的 FlashPlate 测定法 [34] 可以鉴定 PARP 的其他抑制剂。

[0032] 配制成药物组合物的 PARP 抑制剂可以以对靶定癌细胞有效而方便的方式施用，例如，经口、静脉内、肌内、皮内、鼻内、局部途径等施用。可用于该药物组合物的载体或者稀释剂可以包括，但不限于盐水、缓冲盐水、葡萄糖、水、甘油、乙醇和它们的组合。

[0033] 在治疗中或是作为预防剂，活性剂可以作为可注射的组合物，例如作为无菌水性分散体施用于个体。抑制剂可以直接施用于肿瘤，或者可以通过全身施用靶向肿瘤。

[0034] 抑制剂的治疗有效量是足够实现所希望的效果的量并且可以根据疾病状况的本质和严重性以及抑制剂的效力而变。将理解除了治疗活动性疾病外，不同的浓度还可以用于预防。

[0035] 对于哺乳动物，特别是人的给药，预计活性剂的日剂量将最多 100mg/kg，例如 0.01mg/kg 到 50mg/kg 体重，通常最多 0.1、0.5、1.0、2.0、5.0、10、15、20 或 30mg/kg 体重。然而，最终，由医生决定所施用的抑制剂的量和施用频率。

[0036] 使用 PARP 抑制剂治疗癌细胞的治疗上的优点是仅用很小的剂量就可以达到治疗癌症中的治疗效果，从而减小抑制剂的全身性积累和相关的毒性作用。

[0037] 本发明的优选方面提供了一种活性剂，它是抑制性 RNA (RNAi) 分子。

[0038] 一种特异废除基因功能的技术是通过把双链 RNA，也称作抑制性 (RNAi) 导入细胞，导致与该 RNAi 分子中包括的序列互补的 mRNA 的破坏。RNAi 分子包含 RNA 的两条互补链（有义链和反义链），它们相互退火形成双链 RNA 分子。RNAi 分子通常来自待废除的基因的外显子序列或编码序列。

[0039] 优选地，所述 RNAi 分子来源于核酸分子，其包含选自如下的核酸序列：

[0040] a) 如图 9、10、11、12、13 或 14 中序列代表的核酸序列或其片段；

[0041] b) 核酸序列, 其与图 9、10、11、12、13 或 14 的核酸序列杂交或者编码 PARP 的基因;

[0042] c) 核酸序列, 其包含在 a) 和 b) 中定义的核酸序列由于遗传密码简并性得到的序列。

[0043] 最近的研究提示来源于编码序列的 100-1000bp 的 RNAi 分子是基因表达的有效抑制剂。令人惊奇的是, 仅需要几个 RNAi 分子来阻断基因表达, 这暗示着它的机制是催化性的。作用位点似乎在细胞核, 因为在细胞的细胞质中几乎检测不到 (如果有) RNAi, 表明 RNAi 分子在 mRNA 合成或加工期间发挥其作用。

[0044] 更优选地, 所述 RNAi 分子的长度为 10 个核苷酸碱基 (nb) 到 1000nb。甚至更优选地, 所述 RNAi 分子的长度为 10nb、20nb、30nb、40nb、50nb、60nb、70nb、80nb、90nb 或者 100nb。甚至更优选地, 所述 RNAi 分子的长度为 21nb。

[0045] 甚至更优选地, 所述 RNAi 分子包含核酸序列 aaa agc cau ggu gga guauga (PARP-1)。

[0046] 甚至更优选地, 所述 RNAi 分子由核酸序列 aag acc aau cuc ucc aguuca ac 组成 (PARP-2)。

[0047] 甚至更优选地, 所述 RNAi 分子由核酸序列 aag acc aac auc gag aacaac 组成 (PARP-3)。

[0048] RNAi 分子可以包含经修饰的核苷酸碱基。

[0049] 本发明的各个方面的优选特征做必要的修正可用于各个其它方面。

[0050] 现在仅用举例的方式, 参考所附的附图描述本发明, 其中:

[0051] 图 1 是曲线图, 其表明 HR 缺陷细胞对 PARP-1 的抑制导致的细胞毒性超敏感。中国仓鼠细胞系 AA8 (野生型)、irsISF (HR 缺陷型 [4])、CXR3 (与 XRCC3 互补的 irsISF [2])、V79 (野生型)、irsI (HR 缺陷型 [5]) 或 irsIX2.2 (与 XRCC2 互补的 irsI [1]) 暴露于 3-AB (A)、ISQ (B) 或 NU1025 (C) 时的集落生长晕。显示了至少三次实验的平均值 (符号) 和标准差 (条线)。使用集落生长晕测定法;

[0052] 图 2 为曲线图, 其显示了在 wt V79 细胞、BRCA2 缺陷的 VC-8 细胞和与功能性 BRCA2 基因互补的 VC-8 细胞 (VC-8#13, VC-8+B2) 中 PARP 抑制剂 NU1025 存在下的细胞生存力;

[0053] 图 3 是柱状图, 其显示用 NU1025 孵育 72 小时后程序性细胞死亡的细胞的百分数;

[0054] 图 4(a) 用 siRNA 转染 48 小时后从 MCF-7 (p53wt) 或 MDA-MB-231 (p53^{mut}) 乳腺癌细胞分离的蛋白质裂解物的蛋白质印迹分析。(b) siRNA 处理的 MCF-7 细胞的集落生长晕或 (c) 暴露于 PARP 抑制剂 NU1025 后 MDA-MB-231 细胞的集落生长晕。显示了至少三次实验的平均值 (符号) 和标准差 (条线)。

[0055] 图 5. BRCA2 缺陷细胞不能修复由 PARP 抑制剂在复制叉处形成的重组损伤。通过脉冲凝胶电泳显示用 NU1025 (0.1mM) 处理 24 小时后 BRCA2 完整或缺陷的细胞。2mM 羟基脲用作阳性对照。(b) 未处理的 V-C8+B2 细胞和 V-C8 细胞中 γ H2Ax 转化灶的显示。(c) 用 NU1025 (10 μ M) 处理 24 小时后在 V-C8+B2 和 V-C8 细胞中显示的含有 γ H2Ax 转化灶或 (c) RAD51 转化灶 (d) 的细胞数。显示了至少三次实验的平均值 (符号) 和标准差 (条线)。(e) 所提出的在 BRCA2 缺陷细胞中诱导的细胞死亡的模型。

[0056] 图 6. PARP-1 而不是 PARP-2 对于预防重组损伤的形成中是重要的, 在 BRCA2 缺乏时引起细胞死亡。(a) 从 BRCA2、PARP-1 和 PARP-2 以所示组合处理 48 小时的 SW480SN. 3

细胞分离的 RNA 进行的 RT-PCR。(b)BRCA2、PARP-1 和 PARP-2 的 48 小时耗竭后产克隆细胞存活。显示了至少三次实验的平均值(符号)和标准差(条线)。两个星号和三个星号分别指斯氏 t 检验中 $p < 0.01$ 和 $p < 0.001$ 的统计学显著性。(c) 用不同 siRNA 处理的 SW480SN.3 细胞中 PARP-1 的蛋白质印迹。

[0057] 图 7. (a) 未处理的和 (b) 用胸苷处理的 V79 细胞 (5mM 处理 24 小时) 的 PAR 多聚体的显示。(c) 羟基脲 (0.2mM) 和胸苷 (5mM) 处理后含有 > 10 个 PARP 活性位点的细胞百分数。对每次处理和实验计数至少 300 个细胞核。(d) 用羟基脲 (e) 或胸苷与 NU1025 (10 μ M) 共处理后 V-C8+B2 细胞的存活。(f) 用 MMS、羟基脲 (0.5mM) 或者胸苷 (10mM) 处理后, 通过游离 NAD(P)H¹ 的水平测量 PARP 的活性。描绘了从至少 3 次实验得到的平均值(符号)和标准差(误差线)。

[0058] 图 8. (a) 未处理的 V-C8 细胞和 (b) V-C8+B2 细胞中 PAR 多聚体的显示。(c) 未处理的 V-C8 细胞和 V-C8+B2 细胞中含有 > 10 个 PARP 活性位点的细胞百分数的定量 (d) 未处理的 V-C8 和 V-C8+B2 细胞中测量的 NAD(P)H 水平。3 个星号表示在斯氏 t 检验中 $p < 0.001$ 。(e) 24 小时胸苷 (5mM) 处理后 V79 细胞中 RAD51 和 PARP 活性位点的显示。(f) PARP 和 HR 在停止的复制叉中的作用的模型。

[0059] 图 9. 人 PARP-1 的 cDNA 序列;

[0060] 图 10. 人 PARP-2 的 cDNA 序列;

[0061] 图 11. 人 PARP-3 的 cDNA 序列;

[0062] 图 12. 人端锚聚合酶 1 的 cDNA 序列;

[0063] 图 13 人端锚聚合酶 2 的 mRNA 序列;

[0064] 图 14. 人 VPARP 的 mRNA 序列。

[0065] 材料和方法

[0066] PARP 抑制剂对 HR 缺陷细胞:XRCC2、XRCC3 或 BRCA2 的细胞

[0067] 毒性

[0068] 细胞培养

[0069] irsI、irsIX2.1 和 V79-4 细胞系由 John Thacker 赠送 [40], AA8、irsISF 和 CXR3 细胞系由 Larry Thompson 提供 [41]。

[0070] VC-8、VC-8+B2、VC-8#13 由 Malgorzata Zdzienicka 赠送 [42]。该研究中所有的细胞系均在 37C 含 5% CO₂ 的大气下, 在用 Dulbecco' s modified Eagle' s Medium (DMEM) 培养基中生长, 培养基中加入 10% 胎牛血清和青霉素 (100U/ml) 和硫酸链霉素 (100 μ g/ml)。

[0071] 毒性测定 - 集落生长晕测定

[0072] 在培养皿中铺上 500 个悬浮在培养基中的细胞, 4 小时后加入 3-AB、ISQ 或 NU1025。ISQ 和 NU1025 溶解在 DMSO 中, 在处理培养基中的终浓度是 0.2%。7-12 天后, 当可以观测到细胞集落时, 将这些集落固定并用溶于甲醇的亚甲基兰染色 (4g/L) 染色。随后计数多于 50 个细胞组成的集落。

[0073] 程序性细胞死亡实验

[0074] 将 0.25×10^6 个细胞加入培养皿中, 培养 4 小时后用 NU1025 处理。72 小时后, 细胞用胰酶消化并重悬于含有来自那个样品的任何悬浮细胞的培养基。细胞经离

心沉淀和重新悬浮后根据生产商的方案用 FITC 缀合的膜联蛋白 V 和碘化丙锭 (PI) (ApoTarget, Biosource International) 进行程序性细胞死亡分析。通过流式细胞术 (Becton-Dickenson FACSsort, 488nm 激光) 分析样品, 通过结合 FITC 缀合的膜联蛋白 V 的活细胞 (PI 阴性) 的分数确定程序性细胞死亡细胞的百分数。

[0075] 免疫荧光

[0076] 将细胞铺在盖玻片上, 4 小时后如上述处理 24 小时。处理后, 除去培养基, 盖玻片用 PBS 在 37℃ 洗涤并如别处所述的进行固定 [2]。用于该研究的一级抗体和稀释液为: 兔多克隆抗 PAR (Trevigen; 1 : 500); 羊多克隆抗 Rad51 (C-20, Santa Cruz; 1 : 200); 兔多克隆抗 Rad51 (H-92, Santa Cruz; 1 : 1000)。二级抗体为 Cy-3 缀合的山羊抗兔 IgG 抗体 (Zymed; 1 : 500), Alexa555 山羊抗兔 F(ab')₂ IgG 抗体 (Molecular Probes; 1 : 500), Alexa 546 驴抗山羊 IgG 抗体 (Molecular Probes; 1 : 500) 和 Alexa 488 驴抗山羊 IgG 抗体 (Molecular Probes; 1 : 500)。抗体用含有 3% 牛血清白蛋白的 PBS 稀释。DNA 用 1 μg/ml To Pro (Molecular Probes) 染色。用 Zeiss LSM 510 倒置共聚焦显微镜, 使用 63X/NA 1.4 油浸物镜和 488、546 和 630nm 的获取图像。通过焦点最大投影, 从相隔 0.50 μm 和 1.0 μm 切片厚度的光学切片获得图像。图像用 Adobe PhotoShop (Abacus 公司) 处理。每张载玻片上计数至少 300 个细胞核, 并将含有 10 个以上 RAD51 转化灶或 PARP 活性位点的那些细胞核分类为阳性。

[0077] PARP 活性测定

[0078] 用水溶性的四唑盐 (5mM WST-8) 通过它还原成黄色甲臯染料来监测 NAD(P)H 的量 [43]。将 5000 个细胞以至少一式三份铺在 96 孔板的孔中并在 100 μl 正常培养基中 37℃ 培养 4 小时。随后加入含有 WST-8 的 CK8 缓冲液 (Dojindo Molecular Technology, Gaithersburg, USA), 用或不用所指出浓度的 DNA 损伤剂处理。通过每 30 分钟测量可见吸收 (OD₄₅₀) 确定 NAD(P)H 存在下 WST-8 的还原。还制备了只含有培养基和 CK8 缓冲液的培养基空白。NAD(P)H 水平的变化可以通过比较含经 DNA 损伤剂处理的细胞的孔的吸收和仅用 DMSO 处理的细胞的孔的吸收来计算。或者, 在 CK8 缓冲液中孵育 4 小时后计算不同细胞系中 NAD(P)H 的相对水平。

[0079] 用 Halldorsson 等人 [44] 的方法的改进方法 (在别处有详细 [45]) 测定通透细胞中 NU1025 抑制 PARP-1 活性的能力。简言之: 300 μL NU1025 处理的通透细胞在 26℃ 与寡核苷酸 (终浓度 2.5 μg/mL) 和 75 μM NAD⁺[³²P]NAD (Amersham Pharmacia, Amersham, UK) 孵育, 总体积是 400 μL。5 分钟后, 加入冰预冷的 10% TCA, 10% Na Ppi 后 60 分钟以终止反应, 之后用 Whatman GF/C 滤器 (LabSales, Maidstone, UK) 过滤, 用 1% TCA 1% NaPpi 冲洗 6 次, 让其干燥并测量掺入的放射性来测定 PARP-1 活性。参考 [³²P]NAD 标准, 数据表示为掺入的 pmol NAD/10⁶ 个细胞。

[0080] 脉冲凝胶电泳

[0081] 将 1.5 × 10⁶ 个细胞铺在 100mm 的培养皿中, 贴壁 4 小时。暴露于药物 18 小时, 之后用胰酶消化细胞。每个 1% 琼脂糖加样孔 (insert) 中融解 10⁶ 个细胞。如别处描述 (8) 的孵育这些加样孔, 并通过脉冲凝胶电泳 24 小时分离 (BioRad; 120° 角度, 60 到 240 转换时间, 4V/cm)。将凝胶随后用溴化乙锭染色用于分析。

[0082] siRNA 处理

[0083] 购买预先设计好的 BRCA2 SMART 库和乱序 siRNAs (Dharmacon, Lafayette, CO)。将 10000 个细胞接种在 6 孔板中, 并放置过夜, 之后用 Oligofectamine Reagent (Invitrogen) 根据生产商的使用手册用 100nM siRNA 转染。细胞在正常生长培养基中培养 48 小时后, 用胰酶消化, 重新铺板后进行毒性测定。使用针对 BRCA2 的抗体 (Oncogene, Nottingham, UK), 通过用 siRNA 处理过的蛋白质提取物的蛋白质印迹 (如前述 [46]) 来证实 BRCA2 的抑制。

[0084] 实施例

[0085] 同源重组缺陷细胞对 PARP-1 抑制有超敏感性

[0086] 为了研究 HR 参与对 PARP-1 抑制的细胞应答, 研究了 PARP-1 抑制剂对 HR 修复缺陷细胞系存活的影响。我们发现 HR 中缺陷的细胞 (即, XRCC3 缺陷的 irsISF 或 XRCC2 缺陷的 irsI [见表 1]) 对 3-氨基苯甲酰胺 (3-AB) 的毒性效应非常敏感, 对另外两种更有效的 PARP-1 抑制剂: 1,5-二羟基异喹啉 (ISQ; [37]) 或 8-羟基-2-甲基喹啉 (NU1025 [38, 39]) 也非常敏感 (图 1)。irsISF 细胞对 3-AB、ISQ 或 NU1025 的敏感性可以通过导入含有功能 XRCC3 基因 (CXR3) 的粘粒来校正。类似地, irsI 细胞对 3-AB、ISQ 或 NU1025 的敏感性可以通过导入含有功能 XRCC2 基因的粘粒来校正 (irsIX2.2)。

[0087] BRCA2 缺陷的细胞对 PARP-1 抑制超敏感

[0088] 研究了在 PARP-1 的抑制剂存在下 BRCA2 缺陷细胞 (VC8) 和野生型细胞 (V79Z) 的存活。发现 VC8 细胞对 NU1025 的毒性效应非常敏感 (图 2)。VC8 细胞的敏感性可以通过在 13 号染色体 (VC8#13) 上或者过表达载体 (VC8+B2) 上导入功能 BRCA2 基因来校正。结果表明对 PARP-1 抑制剂的敏感性是 BRCA2 功能丧失的直接的结果。

[0089] 为了研究是否 PARP-1 的抑制引发了 BRCA2 缺陷中程序性细胞死亡, 研究了暴露于 NU1025 72 小时后程序性细胞死亡的水平。发现 NU1025 仅在 VC8 细胞中引发程序性细胞死亡, 表明 BRCA2 缺陷细胞中 PARP-1 活性的丧失引发了这种死亡 (图 3)。

[0090] BRCA2 缺陷的乳腺癌细胞对 PARP-1 抑制超敏感

[0091] 检查了当耗竭 BRCA2 时, MCF7 (野生型 p53) 和 MDA-MB-231 (突变型 p53) 乳腺癌细胞系是否表现出对 NU1025 相似的敏感性。发现只有用 BRCA2 siRNA 混合物耗竭 BRCA2 时, PARP-1 抑制剂才能很大程度的降低 MCF7 和 MDA-MB-231 细胞的存活 (图 4)。这表明 BRCA2 耗竭的乳腺癌细胞对 PARP 抑制剂敏感性, 其与 p53 状态无关。

[0092] 不存在 DNA 双链断裂 (DSB) 但是存在 γ H2Ax 时 BRCA2 缺陷细胞因 PARP-1 抑制而死亡

[0093] 已知 HR 与 DNA 复制中 DSB 和其它损伤的修复有关 [2]。为了确定 BRCA2 缺陷细胞的敏感性是否是 NU1025 处理后不能修复 DSB 的结果, 在用高毒性水平的 NU1025 处理后, 测量 V79 和 V-C8 细胞中 DSB 的积累。发现用从经处理的细胞得到的 DNA 的脉冲凝胶电泳分析没有检测到 DSB (图 5A), 说明在 HR 缺陷细胞中, PARP 抑制后积累低水平的 DSB 或其它重组底物, 这引发 γ H2Ax (图 5B)。BRCA2 缺陷细胞在诱导了这些重组损伤后死亡的原因可能是因为不能修复这些损伤。为了验证这一说法, 测定了 BRCA2 缺陷的 V-C8 细胞和 BRCA2 互补的细胞响应 NU1025 形成 RAD51 转化灶的能力。经 NU1025 处理后, 在 V-C8+B2 细胞中确实诱导了 RAD51 转化灶 (在 t 检验中 $p < 0.05$ 时统计学显著的; 图 5D)。这表明重组的损伤引起这些细胞中重组修复, 使这些细胞存活下来。相比, BRCA2 缺陷的 V-C8 细胞对不能响应 NU1025 形成 RAD51 转化灶 (图 5D), 说明没有 HR, 这将使得重组损伤未被修复并从

而导致细胞死亡。

[0094] PARP-1 而不是 PARP-2 在预防重组损伤形成中是重要的

[0095] 在哺乳动物细胞核中存在着两种主要的 PARP :PARP-1 和 PARP-2。所有报道的 PARP 抑制剂都能抑制这两种 PARP。为了区分哪种 PARP 造成所述效应,我们使用 siRNA 耗竭人细胞中的 PARP-1 和 / 或 PARP-2 和 BRCA2 来测试没有 PARP-1 和 / 或 PARP-2 是否导致有毒损害的积累 (图 6a)。我们发现当从细胞同时耗竭 PARP-1 和 BRCA2 时,产克隆细胞存活显著下降 (图 6b)。耗竭 PARP-2 和 BRCA2 对产克隆细胞存活无影响并且耗竭 PARP-2、PARP-1 和 BRCA2 不导致额外的毒性。这些结果提示,在人细胞中 PARP-1 而不是 PARP-2 负责减轻毒性重组损害。在 PARP-1 和 BRCA2 共同耗竭的细胞中克隆化效率仅减小到对照的 60%,然而没有 HR 缺陷的细胞在用 PARP 抑制剂处理后幸存下来。这可能与 siRNA 对大量 PARP-1 蛋白质的不完全耗竭有关 (图 6c),这可以足够在一些细胞中保持 PARP-1 功能。

[0096] PARP-1 受到复制抑制剂活化

[0097] HR 也与停止的复制叉上发生的损伤修复有关,其可能不包括可检测的 DSB。为了测试 PARP 是否在复制叉中有作用,检查了用延缓或者阻止 DNA 复制叉的试剂 (胸苷或羟基脲) 处理的细胞中的 PARP 活化。胸苷消耗细胞的 dCTP 并减慢复制叉的速度但不导致 DSB。羟基脲耗竭几种 dNTP 并且阻断复制叉,伴随着在复制叉处形成 DSB[2]。这两种试剂都能有效地诱导 HR[2]。用胸苷或羟基脲处理 24 小时的 V79 仓鼠细胞对 PAR 多聚体染色。这揭示了含有 PARP 活性位点的细胞数目的显著增加 (图 7C)。该结果提示在停止的复制叉处 PARP 的功能。并且还显示用 NU1025 抑制 PARP 增强了对 V-C8+B2 细胞中胸苷或羟基脲的敏感性 (图 7D, E)。该结果提示 PARP 活性在停止的复制叉的修复中是重要的或者备选地,它防止具有停止的复制叉的细胞中死亡的诱导。

[0098] PARP 在 DNA 单链断裂 (SSB) 处被快速活化,并且吸引 DNA 修复酶 [3-6]。甲基甲磺酸 (MMS) 导致 DNA 的烷基化,其通过碱基切除修复得到修复。PARP 被这个修复过程中形成的 SSB 中间产物快速活化,它耗竭 NAD(P)H 水平 (图 7F)。我们发现在胸苷或羟基脲处理后,PARP 的活化和 NAD(P)H 水平的降低都慢得多。这种 PARP 活化的减慢可以通过是胸苷和羟基脲的间接作用和细胞进入细胞周期 S 期后积累停止的复制叉需要的时间来解释。

[0099] PARP-1 和 HR 在停止的复制叉中具有单独的作用

[0100] 测定了未处理的 BRCA2 缺陷的 V-C8 细胞中 PARP 活性位点的数目。发现和 V-C8+B2 细胞相比更多 V-C8 细胞含有 PARP 活性位点 (图 8A、B、C)。而且 V-C8 细胞中游离 NAD(P)H 水平低于校正的细胞的水平 (图 8D),可能是由于增加的 PARP 活性。重要的是,这些 PARP 活性位点不与 RAD51 转化灶重叠 (图 8E)。

[0101] 此处的结果提示 PARP 和 HR 在保护或挽救停止的复制叉方面中具有单独的作用 (图 8F)。PARP 活性的丧失可以通过增加的 HR 来弥补,而 HR 的丧失可以通过增加的 PARP 活性来弥补。然而,这两条通路的同时丧失导致停止的复制叉的积累以至细胞死亡,正如 PARP 被抑制的 BRCA2 缺陷细胞一样。

[0102] 如图 8F 中概述的模型中所示,PARP 和 HR 在停止的复制叉处有互补作用。(i) 当遇到 DNA 模板的障碍物时,复制叉可能停止。另外,由于缺乏 dNTPs 或其它 DNA 复制辅因子,复制叉也会暂时停止。(ii) PARP 结合停止的复制叉或者其它复制相关的损伤,引发 PAR 多聚化。所得带负电的 PAR 多聚体可以通过正常情况下处理复制叉的蛋白质 (例如,解离

酶) 保护停止的复制叉,直到当可以利用 dNTPs 或其它辅因子时,可以自发恢复复制叉。备选地,PAR 多聚体或 PARP 可以通过其他方式吸引蛋白质来分解复制叉。(iii) 在缺乏 PARP 活性的情况下,HR 可以作为修复停止的复制叉的替代途径。该补偿模型解释了在 PARP 缺陷细胞(即 V-C8)中发现的 HR 和 RAD51 转化灶的升高的水平 3-5。在在 PARP 和 HR 都不存在时,自发复制阻断/损害反而是致命的

[0103] 表 1. 研究中用到的细胞系的基因型和来源

细胞系	基因型	缺陷	来源	参考文献
AA8	Wt	Wt	CHO	[41]
irs1SF	<i>XRCC3</i> ⁻	<i>XRCC3</i> ⁻ , HR 中缺陷	AA8	[41]
CXR3	<i>XRCC3</i> ⁻ + <i>hXRCC3</i>	Wt	irs1SF	[41]
V79-4	Wt	Wt	V79	[40]
irs1	<i>XRCC2</i> ⁻	<i>XRCC2</i> ⁻ , HR 中缺陷	V79-4	[40]
irs1X2.2	<i>XRCC2</i> ⁻ + <i>hXRCC2</i>	Wt	irs1	[40]
V79-Z	Wt	Wt	V79	[42]
VC8	<i>BRCA2</i> ⁻	<i>BRCA2</i> ⁻ , HR 中缺陷	V79-Z	[42]
VC8#13	<i>BRCA2</i> ⁻ + <i>hBRCA2</i>	Wt	VC8	[42]
VC8+B2	<i>BRCA2</i> ⁻ + <i>hBRCA2</i>	Wt	VC8	[42]

[0104] 参考文献

[0105] A.R.Venkitaraman Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2, Cell 108(2002)171-182.

[0106] C.Lundin, K.Erixon, C.Arnaudeau, N.Schultz, D.Jenssen, M.Meuth and T.Helleday Different roles for nonhomologous end joining and homologous recombination following replication arrest in mammalian cells, Mol Cell Biol 22(2002)5869-5878.

[0107] D.D' Amours, S.Desnoyers, I.D' Silva and G.G.Poirier Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions, Biochem J 342(1999)249-268.

- [0108] Z. Herceg and Z. Q. Wang Functions of poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death, *Mutat Res* 477(2001)97-110.
- [0109] T. Lindahl, M. S. Satoh, G. G. Poirier and A. Klungland Post-translational modification of poly(ADP-ribose)polymerase induced by DNA strand breaks, *Trends Biochem Sci* 20(1995)405-411.
- [0110] M. S. Satoh and T. Lindahl Role of poly(ADP-ribose)formation in DNA repair, *Nature* 356(1992)356-358.
- [0111] S. Shall and G. de Murcia Poly(ADP-ribose)polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model?, *Mutat Res* 460(2000)1-15.
- [0112] Z. Q. Wang, L. Stingl, C. Morrison, M. Jantsch, M. Los, K. Schulze-Osthoff and E. F. Wagner PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis, *Genes Dev* 11(1997)2347-2358.
- [0113] C. M. Simbulan-Rosenthal, B. R. Haddad, D. S. Rosenthal, Z. Weaver, A. Colemain, R. Luo, H. M. Young, Z. Q. Wang, T. Ried and M. E. Smulson Chromosomal aberrations in PARP(-/-) mice: genome stabilization in immortalized cells by reintroduction of poly(ADP-ribose)polymerase cDNA, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(1999)13191-13196.
- [0114] J. M. de Murcia, C. Niedergang, C. Trucco, M. Ricoul, B. Dutrillaux, M. Mark, F. J. Oliver, M. Masson, A. Dierich, M. LeMeur, C. Walztinger, P. Chambon and G. de Murcia Requirement of poly(ADP-ribose)polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(1997)7303-7307.
- [0115] F. d'Adda di Fagagna, M. P. Hande, W. M. Tong, P. M. Lansdorp, Z. Q. Wang and S. P. Jackson Functions of poly(ADP-ribose)polymerase in controlling telomere length and chromosomal stability, *Nat Genet* 23(1999)76-80.
- [0116] E. Samper, F. A. Goytisolo, J. Menissier-de Murcia, E. Gonzalez-Suarez, J. C. Cigudosa, G. de Murcia and M. A. Blasco Normal telomere length and chromosomal end capping in poly(ADP-ribose)polymerase-deficient mice and primary cells despite increased chromosomal instability, *J Cell Biol* 154(2001)49-60.
- [0117] C. Morrison, G. C. Smith, L. Stingl, S. P. Jackson, E. F. Wagner and Z. Q. Wang Genetic interaction between PARP and DNA-PK in V(D)J recombination and tumorigenesis, *Nat Genet* 17(1997)479-482.
- [0118] V. Schreiber, D. Hunting, C. Trucco, B. Gowans, D. Grunwald, G. De Murcia and J. M. De Murcia A dominant-negative mutant of human poly(ADP-ribose)polymerase affects cell recovery, apoptosis, and sister chromatid exchange following DNA damage, *Proc Natl Acad Sci USA* 92(1995)4753-4757.
- [0119] J. H. Kuppers M. Muller and A. Burkle Trans-dominant inhibition of poly(ADP-ribosyl)ation potentiates carcinogen induced gene amplification in SV40-transformed Chinese hamster cells, *Cancer Res* 56(1996)2715-2717.
- [0120] J. Magnusson and C. Ramel Inhibitor of poly(ADP-ribose) transferase potentiates the recombinogenic but not the mutagenic action

of alkylating agents in somatic cells in vivo in *Drosophila melanogaster*, *Mutagenesis* 5(1990)511-514.

[0121] A. S. Waldman and B. C. Waldman Stimulation of intrachromosomal homologous recombination in mammalian cells by an inhibitor of poly(ADP-ribosylation), *Nucleic Acids Res* 19(1991)5943-5947.

[0122] A. Semionov, D. Cournoyer and T. Y. Chow Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase stimulates extrachromosomal homologous recombination in mouse Ltk-fibroblasts, *Nucleic Acids Res* 27(1999)4526-4531.

[0123] F. Dantzer, V. Schreiber, C. Niedergang, C. Trucco, E. Flatter, G. De LaRubia, J. Olivet, V. Rolli, J. Menissier-de Murcia and G. de Murcia Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in base excision repair, *Biochimie* 81(1999)69-75.

[0124] F. Dantzer, G. de La Rubia, J. Menissier-De Marcia, Z. Hostomsky, G. de Murcia and V. Schreiber Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1, *Biochemistry* 39(2000)7559-7569.

[0125] L. Tentori, I. Portarena and G. Graziani Potential clinical applications of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors, *Pharmacol Res* 45(2002)73-85.

[0126] T. Lindahl and R. D. Wood Quality control by DNA repair, *Science* 286(1999)1897-1905.

[0127] K. W. Caldecott DNA single-strand break repair and spinocerebellar ataxia, *Cell* 112(2003)7-10.

[0128] D. D'Amours and S. P. Jackson The Mre11 complex: at the crossroads of DNA repair and checkpoint signalling, *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(2002)317-327.

[0129] A. D. D'Andrea and M. Grompe The Fanconi anaemia/BRCA pathway, *Nat Rev Cancer* 3(2003)23-34.

[0130] S. P. Jackson Sensing and repairing DNA double-strand breaks, *Carcinogenesis* 23(2002)687-696.

[0131] R. Kanaar, J. H. Hoeijmakers and D. C. van Gent Molecular mechanisms of DNA double strand break repair, *Trends Cell Biol* 8(1998)483-489.

[0132] D. C. van Gent, J. H. Hoeijmakers and R. Kanaar Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection, *Nat Rev Genet* 2(2001)196-206.

[0133] S. L. Neuhausen and E. A. Ostrander Mutation testing of early-onset breast cancer genes BRCA1 and BRCA2, *Genet Test* 1(1997)75-83.

[0134] G. Kuperstein, W. D. Foulkes, P. Ghadirian, J. Hakimi and S. A. Narod A rapid fluorescent multiplexed-PCR analysis (FMPPA) for founder mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes, *Clin Genet* 57(2000)213-220.

[0135] A. Chiarugi Poly(ADP-ribose) polymerase: killer or conspirator? The 'suicide hypothesis' revisited, *Trends Pharmacol Sci* 23(2002)122-129.

[0136] C. R. Calabrese, M. A. Batey, H. D. Thomas, B. W. Durkacz, L. Z. Wang, S. Kyle, D. Skalitzy, J. Li, C. Zhang, T. Boritzki, K. Maegley, A. H. Calvert, Z. Hostomsky,

D. R. Newell and N. J. Curtin Identification of Potent Nontoxic Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 Inhibitors: Chemopotentiation and Pharmacological Studies, Clin Cancer Res 9(2003)2711-2718.

[0137] D. Ferraris, Y. S. Ko, T. Pahutski, R. P. Ficco, L. Serdyuk, C. Alemu, C. Bradford, T. Chiou, R. Hoover, S. Huang, S. Lautar, S. Liang, Q. Lin, M. X. Lu, M. Mooney, L. Morgan, Y. Qian, S. Tran, L. R. Williams, Q. Y. Wu, J. Zhang, Y. Zou and V. Kalish Design and synthesis of poly ADP-ribose polymerase-1 inhibitors. 2. Biological evaluation of aza-5[H]-phenanthridin-6-ones as potent, aqueous-soluble compounds for the treatment of ischemic injuries, J Med Chem 46(2003)3138-3151.

[0138] K. J. Dillon, G. C. Smith and N. M. Martin A FlashPlate assay for the identification of PARP-1 inhibitors, J Biomol Screen 8(2003)347-352.

[0139] A. J. Pierce, R. D. Johnson, L. H. Thompson and M. Jasin XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells, Genes Dev 13(1999)2633-2638.

[0140] R. D. Johnson, N. Liu and M. Jasin Mammalian XRCC2 promotes the repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination, Nature 401(1999)397-399.

[0141] G. M. Shah, D. Poirier, S. Desnoyers, S. Saint-Martin, J. C. Hoflack, P. Rong, M. ApSimon, J. B. Kirkland and G. G. Poirier Complete inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase activity prevents the recovery of C3H10T1/2 cells from oxidative stress, Biochim Biophys Acta 1312(1996)1-7.

[0142] R. J. Griffin, S. Srinivasan, K. Bowman, A. H. Calvert, N. J. Curtin, D. R. Newell, L. C. Pemberton and B. T. Golding Resistance-modifying agents. 5. Synthesis and biological properties of quinazolinone inhibitors of the DNA repair enzyme poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), J Med Chem 41(1998)5247-5256.

[0143] S. Boulton, L. C. Pemberton, J. K. Porteous, N. J. Curtin, R. J. Griffin, B. T. Golding and B. W. Durkacz Potentiation of temozolomide-induced cytotoxicity: a comparative study of the biological effects of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors, Br J Cancer 72(1995)849-856.

[0144] C. S. Griffin, P. J. Simpson, C. R. Wilson and J. Thacker Mammalian recombination-repair genes XRCC2 and XRCC3 promote correct chromosome segregation, Nat Cell Biol 2(2000)757-761.

[0145] R. S. Tebbs, Y. Zhao, J. D. Tucker, J. B. Scheerer, M. J. Siciliano, M. Hwang, N. Liu, R. J. Legerski and L. H. Thompson Correction of chromosomal instability and sensitivity to diverse mutagens by a cloned cDNA of the XRCC3 DNA repair gene, Proc Natl Acad Sci U S A 92(1995)6354-6358.

[0146] M. Kraakman-van der Zwet, W. J. Overkamp, R. E. van Lange, J. Essers, A. van Duijn-Goedhart, I. Wiggers, S. Swaminathan, P. P. van Buul, A. Errami, R. T. Tan, N. G. Jaspers, S. K. Sharan, R. Kanaar and M. Z. Zdzienicka Brca2(XRCC11) deficiency results in radioresistant DNA synthesis and a higher frequency of spontaneous

deletions, *Mol Cell Biol* 22(2002)669–679.

[0147] J. Nakamura, S. Asakura, S. D. Hester, G. de Murcia, K. W. Caldecott and J. A. Swenberg Quantitation of intracellular NAD(P)H can monitor an imbalance of DNA single strand break repair in base excision repair deficient cells in realtime, *Nucleic Acids Res* 31(2003)e104.

[0148] H. Halldorsson, D. A. Gray and S. Shall Poly(ADP-ribose)polymerase activity in nucleotide permeable cells, *FEBS Lett* 85(1978)349–352.

[0149] K. Grube, J. H. Kupper and A. Burkle Direct stimulation of poly(ADP ribose) polymerase in permeabilized cells by double-stranded DNA oligomers, *Anal Biochem* 193(1991)236–239.

[0150] C. Lundin, N. Schultz, C. Arnaudeau, A. Mohindra, L. T. Hansen and T. Helleday RAD51 is Involved in Repair of Damage Associated with DNA Replication in Mammalian Cells, *J Mol Biol* 328(2003)521–535.

[0151] Schreider et al., *Journal of Biological Chemistry* 277 : 23028–23036 (2002).

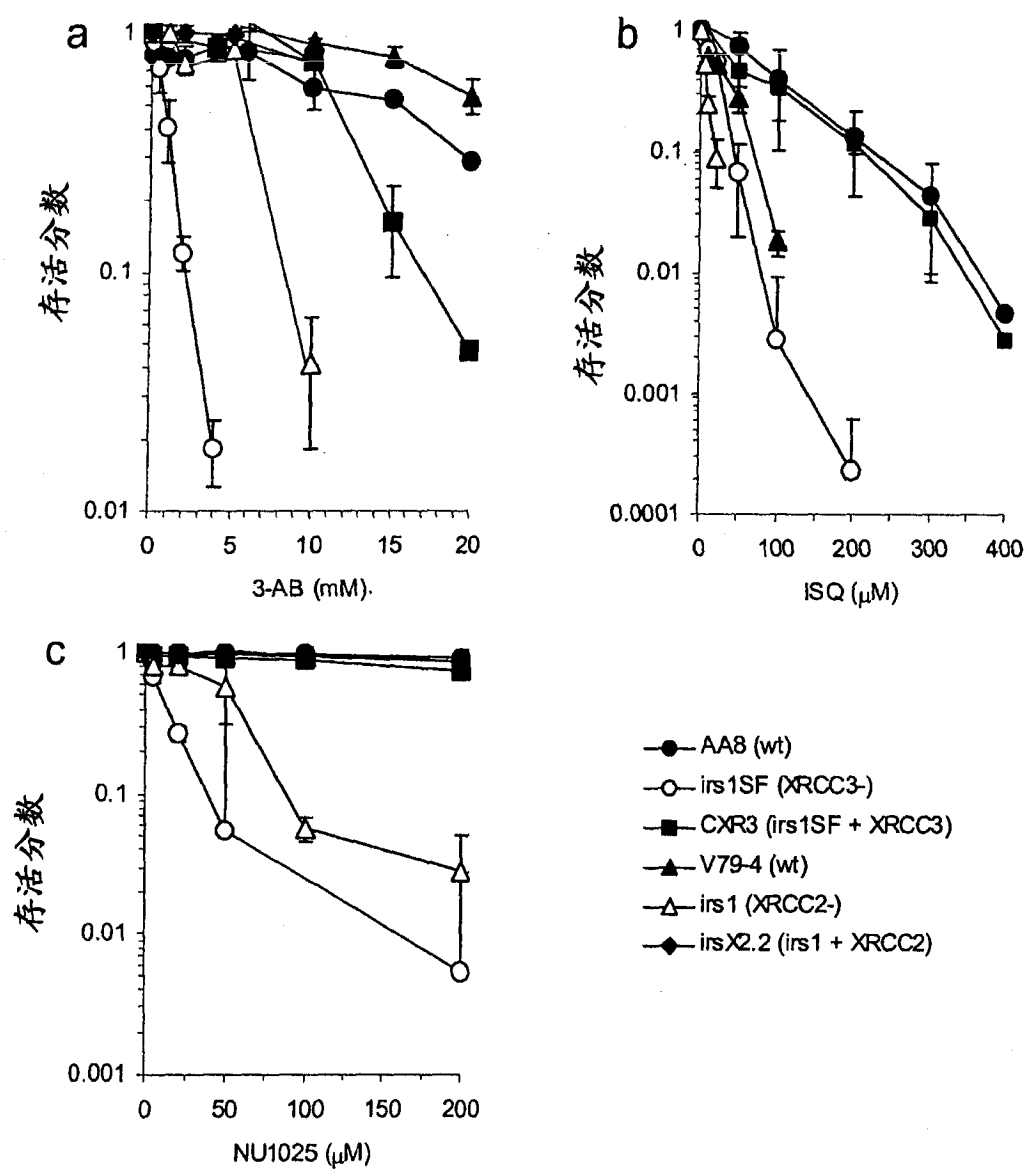


图 1

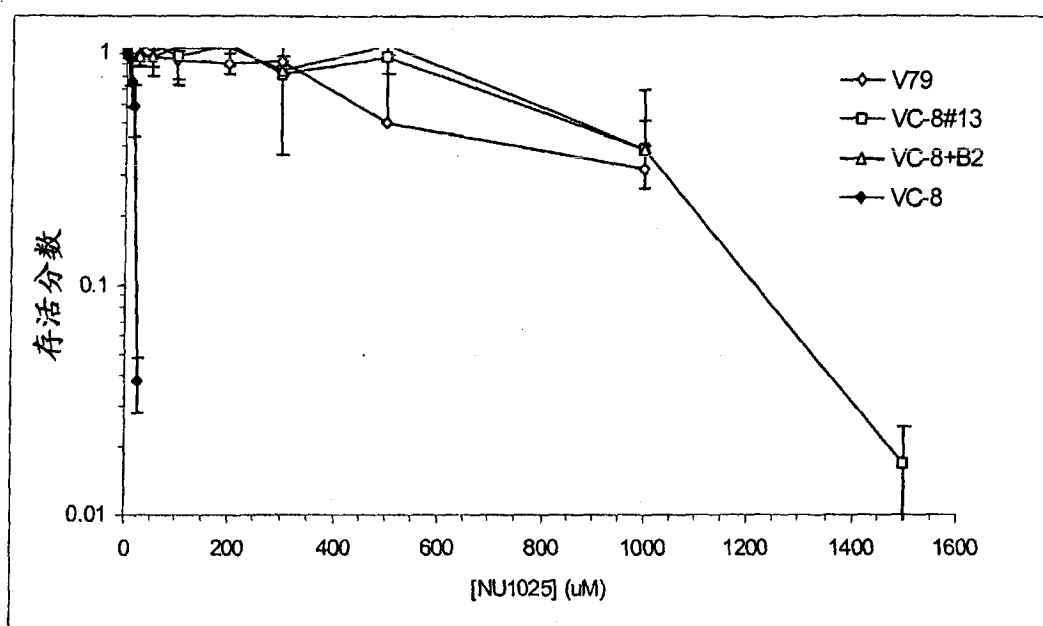


图 2

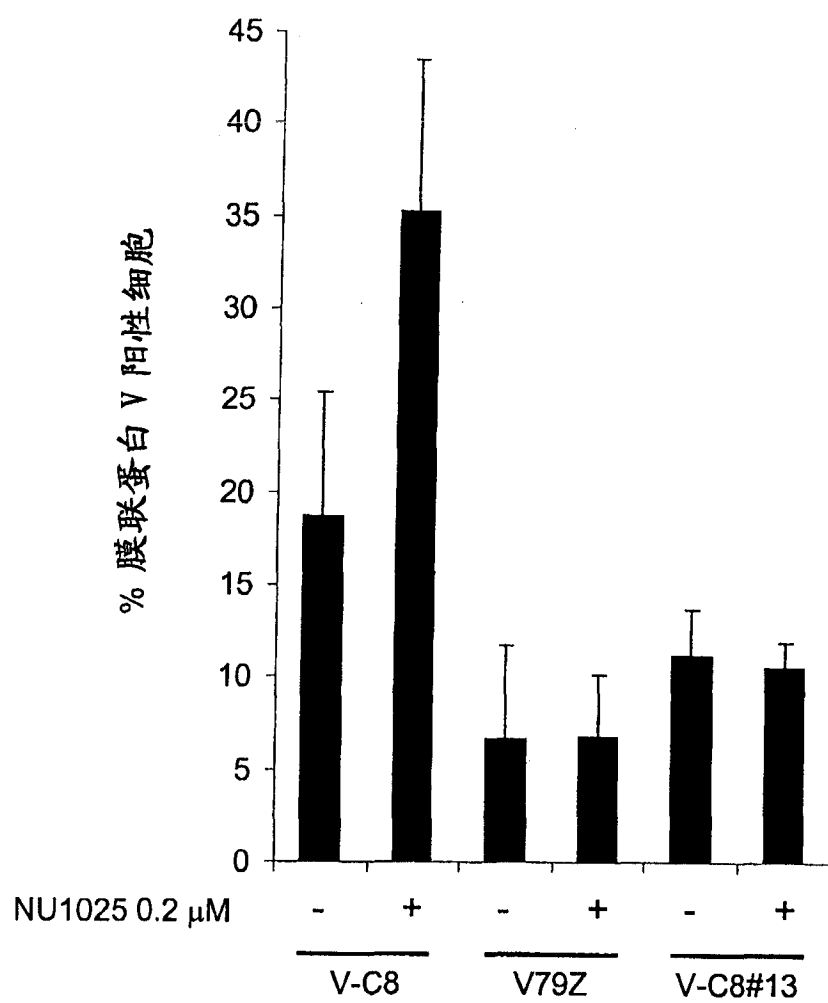


图 3

图 4

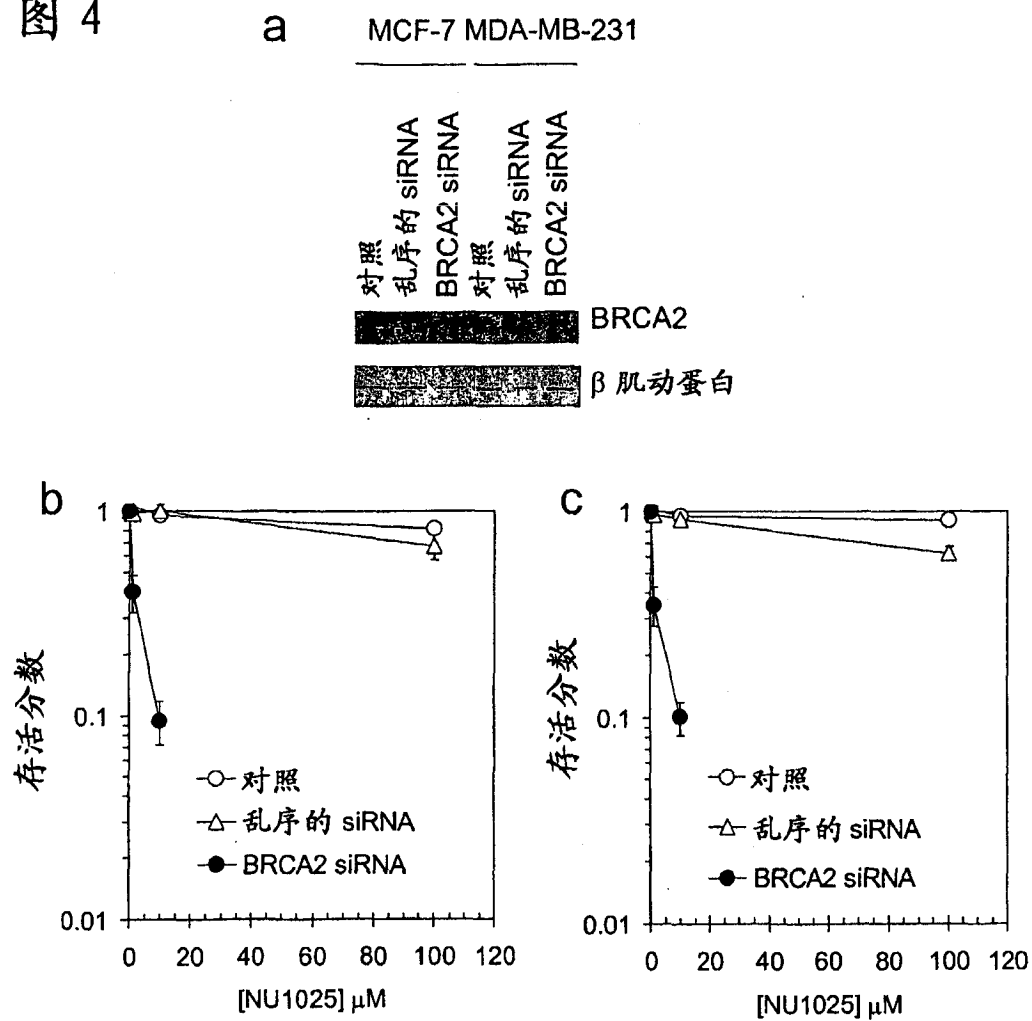
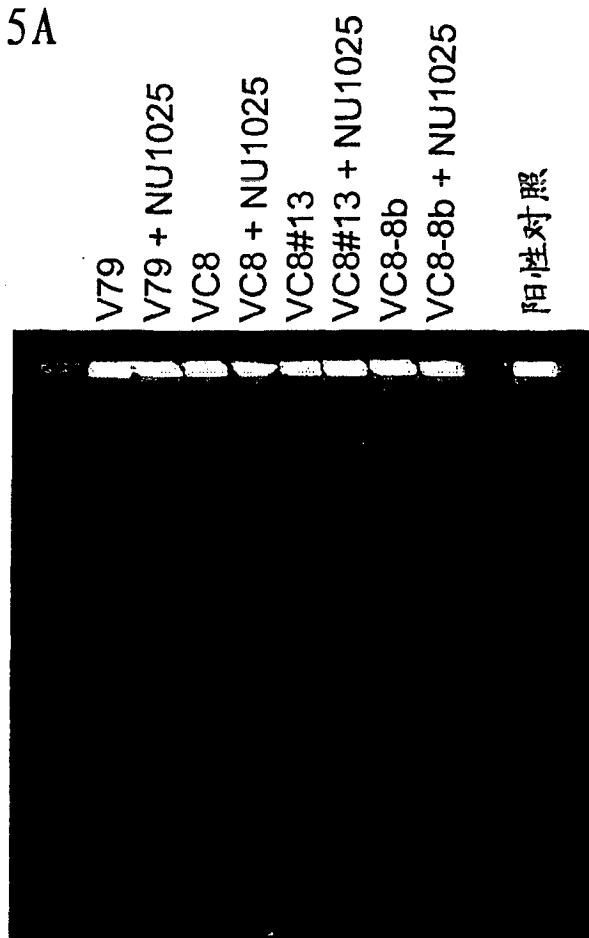


图 5A



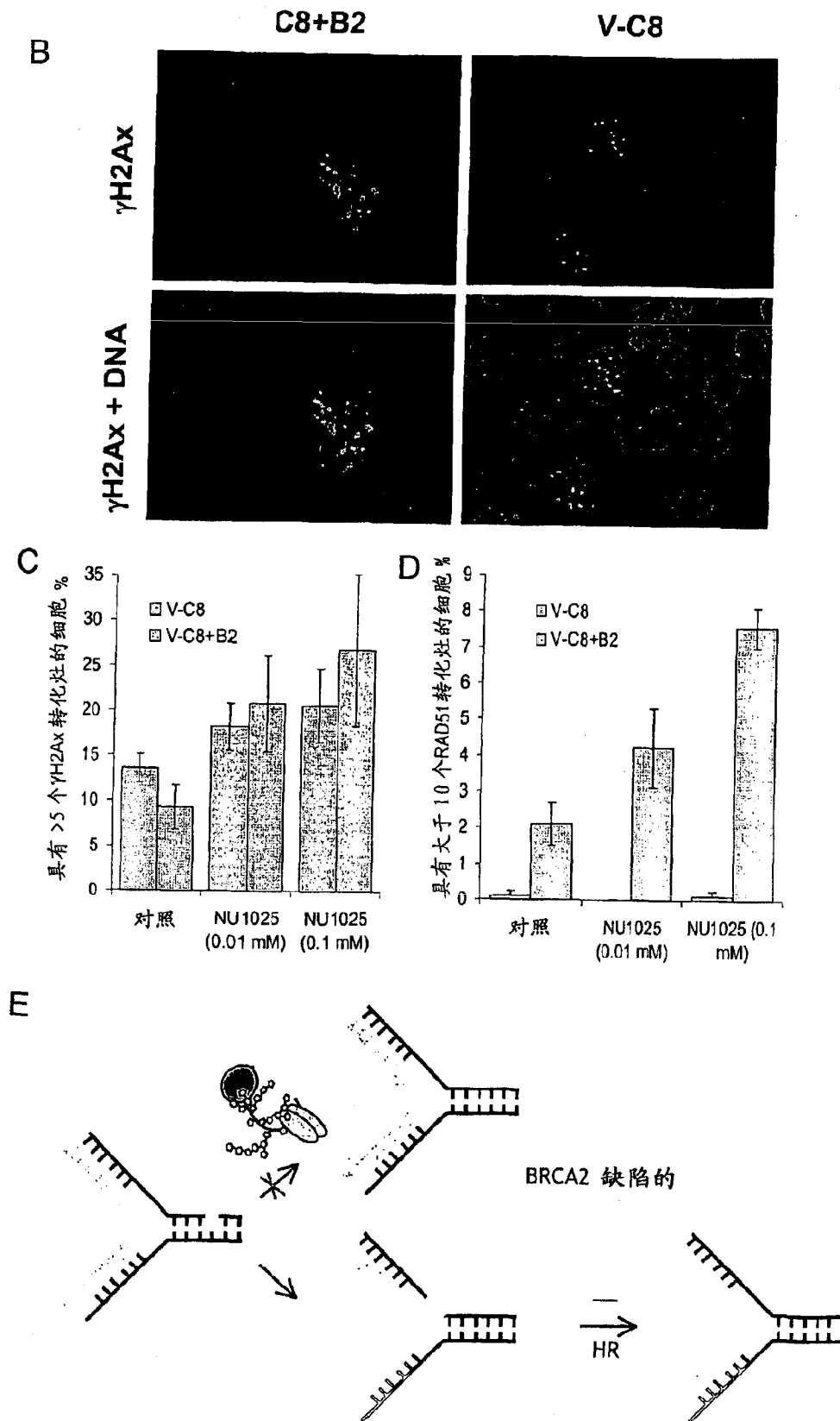


图 5

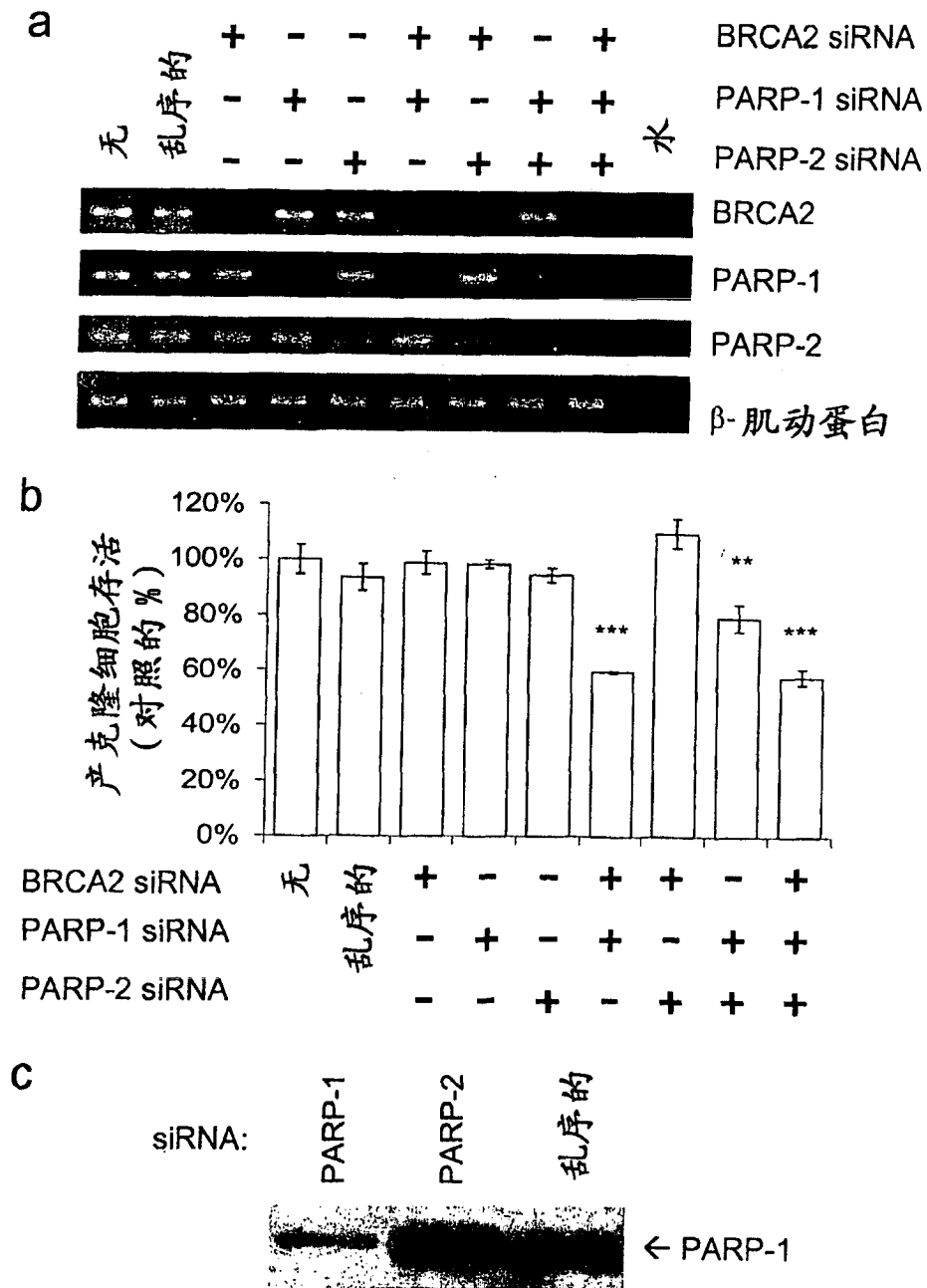


图 6

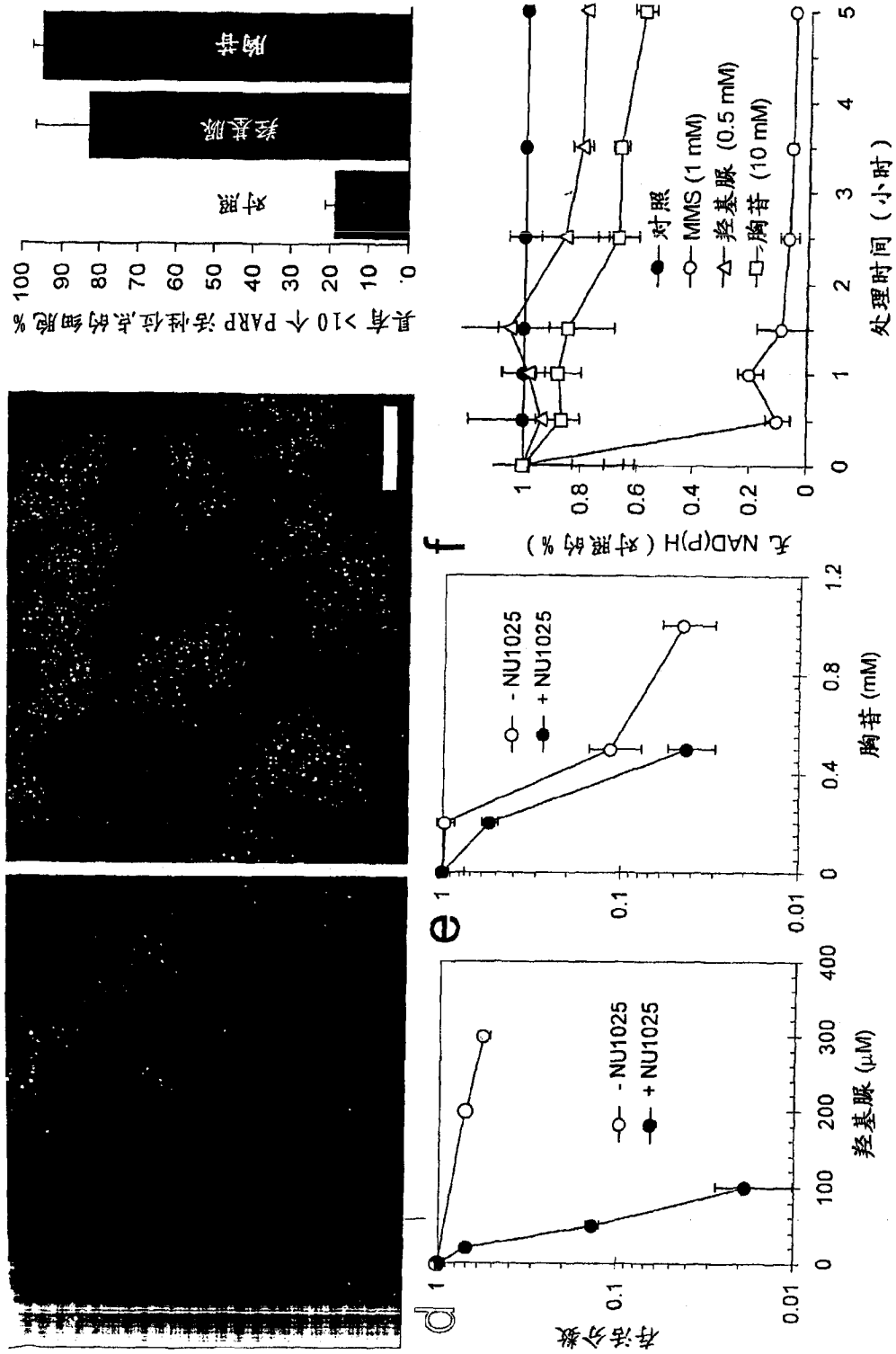


图 7

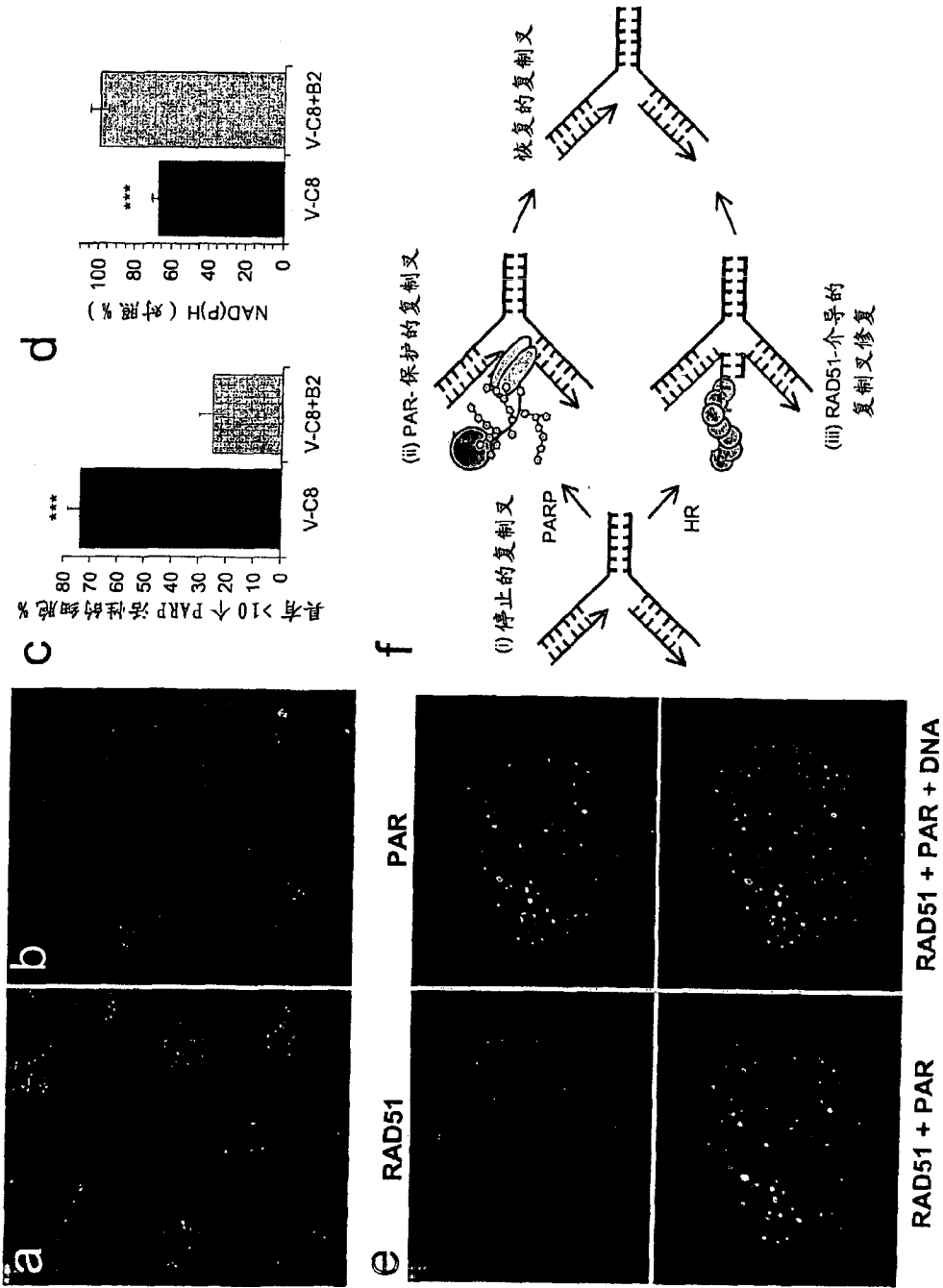


图 8

1 cgcccgccca gccccggggg cagggaaagc cttaaattacg gaattaccgc gagcaaggag
61 cgcggaatcg gggagcgctc ggagctagct ggatcctcta ggcaggatgg tgatgggaat
121 ctttgcaaat tgatcttct gtttgaaagt gaagtactta cctcagcagc agaagaaaaa
181 gctacaaact gacatlaagg aaaatggcgg aaagtittcc ttctgtaa atcctcagtg
241 cacacatata atcttagata atgctgatgt tctgagtcag taccaactga attctatcca
301 aaagaaccac gticatatg caaaccaga tttatatgg aaatctatca gagaaaagag
361 actcttggat gtaaagaatt atgacctta taagccctg gacatcacac cacctctga
421 tcagaaggcg agcagttctg aagtgaaac agaaggtcta tggccggaca gtgccacaga
481 ggaggaagac actgtggaac tcaatgagtt tggatgacag aatgttgaaa ttctcatct
541 tctcaagat ttgaagttg caaaatataa cacctggag aaagtgggaa tggagggagg
601 ccaggaagct gtggtgggtg agcttcagtg ttcgcgggac tccagggact gtccttctc
661 gatacctca cacttctcc tggatgatgg catggagact agaagacagt ttgctataaa
721 gaaaacctct gaagatgcaa gtgaatactt tgaataatc atgaagaac tgaagaaca
781 aggatttcta ctaagagaac attcacacc tgaagcaacc caatagcat ctgaacaatt
841 gcaagcattg cttttggagg aagtcagaa tcaagcact ctgagccaag aggtgagcga
901 tttagtagag atgatttggg cagaggccct gggccaccig gaacacatgc ttctcaagcc
961 agtgaacagg attagcctca acgatgtgag caaggcagag gggattctcc ttctagtaaa
1021 ggcagcactg aaaaatggag aaacagcaga gcaattgcaa aagatgatga cagagttta
1081 cagactgata cctcaciaag gcacaatgcc caaagaagtg aacctgggac tattggctaa
1141 gaaagcagac ctctgccagc taataagaga catggttaat gtctgtgaaa ctaatttgc
1201 caaacccaac ccaccatccc tggccaaata ccgagcttg aggtgcaaaa ttgagcatgt
1261 tgaacagaat actgaagaat ttctcagggt tagaaaagag gttttgcaga atcatcacag
1321 taagagccca gtggatgtct tgcagatatt tagagttggc agagtgaatg aaaccacaga
1381 gttttgagc aaacttggtg atgtgaggcc ctgttgcat ggttctctg taaaaacat
1441 cgtgggaatc ttgtgtcag ggtgtcttt acccaaagta gtggaagatc gtggtgtgca
1501 aagaacagac gtcggaacc ttggaagtgg gatttattc agtgattcgc tcagtacaag
1561 tatcaagtac tcacaccgg gagagacaga tggcaccaga ctctgtctca ttgtgacgt
1621 agccctcgga aagtgtatgg acttacatga gaaggacttt tcttaactg aagcaccac
1681 aggtacgac agtgtcatg gagttcaca aacagcctct gtcaccacag actttgagga
1741 tgatgaattt gttgtctata aaaccaatca ggttaaatg aaatatatta ttaaatttc
1801 catgcttga gatcagataa aggactttca tctagtgtat catactgaat tagaggaata
1861 cagacctgag tttcaaat ttcaaaagg tgaagattac cagttaccag atgcaaaaac
1921 ttccagcagc accaaggccg gcctccagga tgcttctggg aacttggtc ctctggagga
1981 tgtccacatc aaaggagaa tcatagacac ttagcccag gtcattgtt ttacacata
2041 cacaataaaa agtcacgtgc cactgagc aaaatatac ttcttgg atgacaaggc
2101 cgctgtgtgt ggcttgaag ccttcataa tgggaagcac atagttggag agattaaaga
2161 gaaggaagaa gccagcaag agtacctaga agcgtgacc cagggccatg gcgctacct
2221 gatgagtcag gatgtccgg acgttttac tgaagtgtt ggaaactac ccctaaggc
2281 taaggttct ataaaaatta cctacatcac agaactcagc atcctgggca ctgttggtgt
2341 cttttcatg cccgccacc tagcaccctg gcaacaggac aaggcttga atgaaaacct
2401 tcaggataca gtagagaaga ttgtataaa agaaatagga acaagcaaa gcttctctt
2461 gactatgtct attgagatgc cgtacgtgat tgaattcatt ttcatgata ctcatgaact
2521 gaaacaaaag cgcacagact gcaagctgt cattagcacc atggaaggca gctccttaga
2581 cagcagtgga tttctctcc acatcggtt gtctgtgcc tatctccaa gaatgtgggt
2641 tgaaaaacat ccagaaaaag aaagcgagc ttgcatgctt gctttcaac ccgactcga
2701 tctgcacctc cctgacctag ccaatgagag cgaagtgaat attgtcttg actgctccag
2761 ttccatggag ggtgtgacat tctgcaagc caaggaaac gccttgcag cgctgtctt

图 9

2821 ggtgggtgag aagcagaaag taaatattat ccagttcggc acaggttaca aggagctatt
2881 ttcgtatcct aagcataca caagcaatac cgcggcagca gatttcalca tctctgccac
2941 acctaccatg gggaacacag acttctggaa aacctccga tatcttagct tattgtacce
3001 tgctcgaggg tcacggaaca tctcctgggt gtctgatggg cacctccagg atgagagcct
3061 gacattacag ctctgtaaga ggagccgccc gcacaccagg ttattcgctt gcggtatcgg
3121 ttctacagca aatcgtcacg tcttaaggat ttgtcccag tgtggtgccg gagtattga
3181 atattttaat gcaaaatcca agcatagttg gagaaaacag atagaagacc aaatgaccag
3241 gctatgttct ccgagttgcc actctgtctc cgtcaaatgg cagcaactca atccagatgc
3301 gcccagagcc ctgcaggccc cagcccaggt gccatccttg tticgcaatg atcgactcct
3361 tgtctatgga ttcatctctc actgcacaca ggcaactctg tgtgcactaa ttcaagagaa
3421 agaattttgt acaatgggtg cgactactga gttcagaag acaactggaa ctatgatcca
3481 caagctggca gcccagagtc taatcagaga ttatgaagat ggcattcttc acgaaaatga
3541 aaccagtcac gagatgaaaa aacaaacctt gaaatctctg attattaaac tcagtaaaga
3601 aaactctctc ataacacaaat ttacaagctt tgtggcagtt gagaaaaggg atgagaatga
3661 gtcacctttt cctgatattc caaaagtctc tgaacttatt gccaaagaag atgtagactt
3721 cctgccctac atgagctggc agggggaacc ccaagaagcc gtcaggaacc agtctctttt
3781 agcatctctt gagtggccag aattacgttt atccaaacga aaacatagga aaattccatt
3841 ttccaaaaga aaaatggaat tatctcagcc agaagtttct gaagatttg aagaggatgc
3901 cttaggttga ctaccagctt tcacatcaa tttggaacgt ggacgtgtgg aaaagctatt
3961 ggatttaagt tggacagagt catgtaaac aacagcaact gaaccactat ttaagaaagt
4021 cagtccatgg gaaacatcta ctctagctt ttctctatt ttggctcgg ccgttggttc
4081 ctatcttacc ccgactacce gcgtcacag tctgtctcc ttgtctttg cctcatatcg
4141 tcaggtagct agtttcgggt cagctgtctc tccagacag ttgatgcat ctcaattcag
4201 ccaaggccct gtgcctggca cttgtgtga ctggatccca cagtcggcgt cttgtccac
4261 aggacctccc cagaaccac ctctgcacc ctattgtggc attgttttt caggagctc
4321 attaagctct gcacagtcg ctccactgca acatctgga ggctttacta ccaggccttc
4381 tgctggcacc ttccctgagc tggattctcc ccagcttcat ttctctctc ctacagaccc
4441 tgatcccatc agaggttttg ggtcttatca tccctctgct tactctcctt tcatttca
4501 acctccgca gcctctttga ctgccaacct taggctgcca atggcctctg ctttacctga
4561 ggctctttgc agtcagtcac ggactacccc agtagatctc tgtctctag aagaatcagt
4621 aggcagctc gaaggaagtc gatgtcctgt cttgtcttt caaagtctg acacagaag
4681 tgatgagcta tcagaagtac ttcaagacag ctgctttta caaataaaat gtgatacaa
4741 agatgacagt atcccgtgct tctggaagt aaaagaagag gatgaaatag tgtgcacaca
4801 aactggcag gatgctgtgc cttggacaga actcctcagt ctacagacag aggatgctt
4861 ctggaacctt acaccagaac tgggacttat attaaatctt aatacaaatg gtttgcacg
4921 cttcttaaa caaaaaggca ttcaatctct aggtgtaaaa ggaagagaat gtctcctgga
4981 cctaattgcc acaatgctgg tactacagtt tattcgacc aggttgaaa aagagggaat
5041 agtgttcaaa tcaatgatga aaatggatga ccttctatt tccaggaata ttccctgggc
5101 tttgaggca ataaagcaag caagtgaatg ggtaagaaga actgaaggac agtaccatc
5161 tatctgccc cggcttgaac tggggaacga ctgggactct gccaccaagc agttgctggg
5221 actccagccc ataagcactg tgtccctct tcatagagtc ctccattaca gtcaaggcta
5281 agtcaaatga aactgaattt taaactttt gcattgctt atgtagaaaa taatcaaatg
5341 ataatagata cttataatga aacttcatc aggtttcatt cagtgtagca attactgtct
5401 ttaaaaatta agtggaagaa gaattacttt aatcaactaa caagcaataa taaaatgaaa
5461 cttaaaat

1 ctagaattca gcggccgctg aattctagc ggcgccggcg cgacggagca ccggcgccgg
61 cagggcgaga gcattaatg aaagcaaaag agttaataat ggcaacacgg ctccagaaga
121 ctctccctt gccaaagaaa ctctagatg ccagagacag gagtcgaaa agatgcctgt
181 ggctggagga aaagctaata aggacaggac agaagacaag caagatggta tgccaggaag
241 gtcattggcc agcaaaagg tctctgaatc tgtgaaggcc ttgctgttaa agggcaaac
301 tctgtggac ccagagtga cagccaagg ggggaaggct catgtgtatt gtgaaggaaa
361 tgatgtctat gatgtatgc taaatcagac caatctccag ttcaacaaca acaagtacta
421 tctgattcag ctattagaag atgatgccca gaggaacttc agtgtttga tgagatggg
481 ccgagtggg aaatgggac agcacagcct ggtggttgt tcaggcaatc tcaacaaggc
541 caaggaaatc ttccagaaga aatcctga caaacgaaa aacaattggg aagatcgaga
601 aaagtttgag aaggtgcctg gaaaatatga tatgtacag atggactatg ccaccaatac
661 tcaggatgaa gaggaacaa aaaaagagga atctcttaa tctccttga agccagagtc
721 acagctagat ctccgggtac aggagttaat aaagtgatc tgtaattgtc aggccatgga
781 agaaatgatg atggaatga agtataatc caagaaagg ccacttggga agctgacagt
841 ggcacaaatc aaggcaggtt accagtctt taagaagatt gaggattgta ttcgggctgg
901 ccagcatgga cgagcttca tggaagcatg caatgaatc tacaccagga ttccgcatga
961 ctttgactc cgtactcct cactaatcc gacacagaag gaactgtcag aaaaaatac
1021 attactagag gcttgggag acatigaaat tgcattaaag ctggtgaaa cagagctaca
1081 aagccagaa caccattgg accaacata tagaaaccta cattgtgcct tgcgccctt
1141 tgaccatgaa agttacgagt tcaaagtgt tcccagtac ctacaatcta cccatgctc
1201 cacacacagc gactatacca tgaccttgc ggatttgtt gaagtggaga aggatggta
1261 gaaagaagcc ttcagagagg acctcataa caggatgctt ctatggcatg gtccaggat
1321 gagtaactgg gtgggaatc tgagccatg gcttgaatt gccaccctg aagctccat
1381 cacaggttac atgttggga aaggaatcta cttgtctgac atgtctcca agagtgccaa
1441 ttactgctt gctctgcc taaagaatac aggactgtc ctctatcag aggtagctt
1501 aggtcagtgt aatgaactac tagaggccaa tctaaggcc gaaggattgc ttcaaggtaa
1561 acatagcacc aaggggctgg gcaagatggc tccagttct gccacttcg tcacctgaa
1621 tgggagtaca gtgccattag gaccagcaag tgacacagga attctgaatc cagatggta
1681 taccctcaac tacaatgaat atattgtata taacccaac caggtccgta tgcggtacct
1741 tttaaagggt cagtttaatt tcttcagct gtggtgaatg ttgatcttaa ataaaccaga
1801 gatctgatc tcaagcaaga aaataagcag tgtgtactt gtgaattttg tgatatatta
1861 tgtaataaaa actgtacagg tctaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa

图 10

1 tgggactggt cgcctgactc ggccctgccc agcctctgct tcacccact ggtggccaaa
61 tagccgatgt ctaatccccc acacaagctc atccccggcc tctgggattg ttgggaattc
121 tctccctaatt tcacgcctga ggctcatgga gatttgctag acctgggact gccttgggag
181 gcgcacacaa ccaggccggg tggcagccag gacctctccc atgtccctgc tttcttggc
241 catggctcca aagccgaagc cctgggtaca gactgagggc cctgagaaga agaagggccg
301 gcaggcagga agggaggagg accccttccg ctccaccgt gaggccctca aggccatacc
361 cgcagagaag cgcataatcc gcgtggatcc aacatgtcca ctcagcagca accccgggac
421 ccaggtgtat gaggactaca actgcaccct gaaccagacc aacatcgaga acaacaacaa
481 caagtctac atcatccagc tgtccaaga cagcaaccgc tcttcacct gctggaaccg
541 ctggggccgt gtgggagagg tcggccagtc aaagatcaac cacttcacaa ggctagaaga
601 tgcaaagaag gactttgaga agaaatttcg ggaaaagacc aagaacaact gggcagagcg
661 ggaccacttt gtgtctcacc cgggcaagta cacacttacc gaagtacagg cagaggatga
721 ggcccaggaa gctgtggtga aggtggacag agggccagtg aggactgtga ctaagcgggt
781 gcagccctgc tccctggacc cagccacgca gaagctatc actaacatct tcagcaagga
841 gatgttcaag aacaccatgg cctcatgga cctggatgtg aagaagatgc ccctgggaaa
901 gctgagcaag caacagattg cacgggggtt cgaggccttg gaggcgctgg aggaggccct
961 gaaaggcccc acgatggtg gccaaagcct ggaggagctg tctcactact ttacaccgt
1021 catccgcac aacttcggcc acagccagcc ccgcccac aattccctg agcttctgca
1081 ggccaagaag gacatgctgc tgggtctggc ggacatcgag ctggcccagg ccctgcaggc
1141 agtctctgag caggagaaga cgttgaggga ggtgccacac ccctggacc gagactacca
1201 gcttctcaag tgccagctgc agctgctaga ctctggagca cctgagtaca aggtgataca
1261 gacctactta gaacagactg gcagcaacca caggtgccct acacttcaac acatctggaa
1321 agtaaaccaa gaaggggagg aagacagatt ccaggccac tccaaactgg gtaatcggaa
1381 gctgctgtgg catggcacca acatggccgt ggtggccgcc atctcacta gtgggtccg
1441 catcatgcca cattctggtg ggctgttg caagggcatc tacttgcct cagagaacag
1501 caagtcagct ggatatgta ttggcatgaa gtgtggggcc caccatgtcg gctacatgtt
1561 cctgggtgag gtggccctgg gcagagagca ccatacaac acggacaacc ccagcttgaa
1621 gagccacct cctggctcg acagtgtcat tgcccaggc cacaccgagc ctgatccgac
1681 ccaggacact gatttgagc tggatggcca gcaagtgggt gtgcccagg gccagcctgt
1741 gccctgcca gattcagca gtccacatt ctccagagc gattacctca tctaccagga
1801 gagccagtgt cgctgcgt acctgctgga ggtccacct tgagtcccc ccctgtccc
1861 cgggtgctc caaggtgga ctgtatct caatcatct gccatctct ggtacccta
1921 tatcactcct ttttcaag aatacaatac gttgtgtta actatagta ccatgctgta
1981 caagatccct gaacttatgc ctctaactg aaatttcta tctttgaca catctgcca
2041 gtccctctcc tcccagcca tggtaaccag catttgactc ttacttga taaggcagc
2101 tttataggt tccatgta agtgagatca tgcagtgtt gtcttctgt gcctggctta
2161 ttactcag cataatgtgc accgggttca ccatgttt cataaatgac aagattcct
2221 cctttaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa

图 11

```

1  cgaagatggc  ggcgtcgcgt  cgctctcagc  atcatcacca  ccatcatcaa  caacagctcc
61  agcccgcgcc  aggggcttca  gcgcgcgcgc  cgccacctcc  tccccactc  agccctggcc
121  tggccccggg  gaccacccca  gcctctccca  cggccagcgg  cctggcccc  ttcgcctccc
181  cgcggcacgg  cctagcgcgt  ccggaggggg  atggcagtcg  ggatccgccc  gacaggcccc
241  gatccccgga  cccgggtgac  ggtaccagct  gttgcagtac  caccagcaca  atctgtaccg
301  tcgcgcgcgc  tcccgtggtc  ccagcggttt  ctacttcate  tgccgctggg  tgcgtccca
361  acccagccgg  cagtggcagt  aacaattcac  cgctgtcctc  ttcttcccc  acttcttctt
421  catcttcttc  tccatcctcc  cctggatcga  gcttggcgga  gagccccgag  gcggccggag
481  ttagcagcac  agcaccactg  gggcctgggg  cagcaggacc  tgggacaggg  gtcccagcag
541  tgagcggggc  cctacgggaa  ctgctggagg  cctgtcgcaa  tggggacgtg  tcccgggtaa
601  agaggctggt  ggacgcggca  aacgtaaatg  caaaggacat  ggcggccgg  aagtcttctc
661  ccctgcactt  cgctgcaggt  ttgggaagg  aggatgttgt  agaactta  ctacagatgg
721  gtgctaattg  ccacgctcgt  gatgatggag  gtctcatccc  gcttcataat  gctgttctt
781  ttggccatgc  tgaggttgtg  agtctgttat  tgtgccaagg  agctgatcca  aatgccaggg
841  ataactggaa  ctatacacct  ctgcatgaag  ctgctattaa  agggaagatc  gatgtgtgca
901  ttgtgtgct  gcagcacgga  gctgacccaa  acattcgga  cactgatggg  aaatcagccc
961  tggacctggc  agatccttca  gcaaaagctg  tccttacagg  tgaatacaag  aaagacgaac
1021  tcctagaagc  tgctaggagt  ggtaatgaag  aaaaactaat  ggctttactg  actcctctaa
1081  atgtgaattg  ccatgcaagt  gatgggcgaa  agtcgactcc  ttacatcta  gcagcgggct
1141  acaacagagt  tcgaatagtt  cagcttcttc  ttcagcatgg  tgctgatgtt  catgcaaaag
1201  acaaagggtg  acttgtgcct  ctccataatg  catgttcata  tggacattat  gaagtccag
1261  aactgctact  aaagcatgga  gcttgtgtta  atgccatgga  tctctggcag  ttactccac
1321  tgcacgaggc  tgcttccaag  aacgctgtag  aagctgtctc  ttgttactt  agccatggcg
1381  ctgactcctac  gttagtcaac  tgccatggca  aaagtgtctg  ggatatggct  ccaactccgg
1441  agcttaggga  gagattgact  tatgaattta  aaggtcattc  ttactacaa  gcagccagag
1501  aagcagactt  agctaaagt  aaaaaaacac  tcgctctgga  aatcattaat  ttcaaaacac
1561  cgcagtctca  tgaacacgca  ctgcactgtg  ctgtggcctc  tctgcacccc  aaacgtaaac
1621  aagtgcacga  attgttactt  agaaaaggag  caaatgttaa  tgaaaaaaat  aaagatttca
1681  tgactccctc  gcatgttgca  gccgaaagag  ccataatga  tgcatggaa  gttctgcata
1741  agcatggcgc  caagatgaat  gcaactggca  cccttgggtc  gactgctttg  catagagccg
1801  ccctagcagg  ccacctgcag  acctgcccgc  tccctgtgag  ttacggctct  gaccctcca
1861  tcactctcct  acaaggcttc  acagcagcac  agatgggcaa  tgaagcagtg  cagcagattc
1921  tgagtgtgag  ttacggctct  gaccctcca  tcatctcctt  acaaggcttc  acagcagcac
1981  agatgggcaa  tgaagcagtg  cagcagattc  tgagtgggtc  ttcgtagata  gtgatcattc
2041  tacttcagcc  ttaattggtg  tcttgagacg  ggaagattta  gaaggaaatc  tatccagcat
2101  gtcttctact  tcaacatgaa  gagtacacct  atacgtactt  ctgatgttga  ttatcgactc
2161  ttagaggcat  ctaaaagctg  agacttgga  actgtgaagc  aactttgcag  ctctcaaaat
2221  gtgaattgta  gagacttaga  gggccggcat  tccacgcctc  tacacttcgc  agcaggctac
2281  aacagagtac  acctatacgt  actctgtatg  ttgattatcg  actcttagag  gcatctaaag
2341  ctggagactt  ggaaactgtg  aagcaacttt  gcagctctca  aaatgtgaat  tgtagagact
2401  tagagggccg  gcattccacg  cccttacact  tcgcagcagg  ctacaaccgc  gtgtctgttg
2461  tagagtacct  gctacaccac  ggtgccgatg  tccatgccaa  agacaagggt  ggcttgggtg
2521  cccttccata  tgctgttcca  tatggacact  atgaggtggc  tgagctttta  gtaaggcatg
2581  gggcttctgt  caatgtggcg  gacttatgga  aatttacccc  tctccatgaa  ctcagcagta
2641  aaggaaagta  tgaatctgc  aagctccttt  taaaacatgg  agcagatcca  actaaaaaga
2701  acagagatgg  aaatacacct  ttggatttgg  taaaggaagg  agacacagat  attcaggact
2761  tactgaaagg  ggatgctgct  ttgttggatg  ctgccaagaa  gggctgcctg  gcaagagtgc
2821  agaagctctg  taccacagag  aatatcaact  gcagagacac  ccagggcaga  aattcaaccc
2881  ctctgcacct  ggcagcaggc  tataataacc  tggaagtage  tgaatatctt  ctagagcatg
2941  gagctgatgt  taatgcccag  gacaagggtg  gtttaattcc  tcttcataat  gcggcatctt
3001  atgggcatgt  tgacatagcg  gctttattga  taaaatacaa  cacgtgtgta  aatgcaacag
3061  ataagtgggc  gtttactccc  ctccatgaag  cagcccagaa  aggaaggacg  cagctgtgcg
3121  ccctcctcct  agcgcagtgt  gcagacccca  ccatgaagaa  ccagggaaggc  cagacgcctc
3181  tggatctggc  aacagctgac  gatatcagag  ctttgcgtgat  agatgccatg  cccccaggg
3241  ccttacctac  ctgttttaaa  cctcaggcta  ctgtagttag  tgccctctctg  atctcaccag
3301  catccacccc  ctctgcctc  tcggctgcca  gcagcataga  caacctcact  ggccttttag
3361  cagagtttgg  cgtaggagga  gcctccaatg  caggggatgg  cgccgcggga  acagaaagga
3421  aggaaggaga  agttgctggt  cttgacatga  atatcagcca  atttctaaaa  agccttggcc
3481  ttgaacacct  tcgggatatc  tttgaaacag  aacagattac  actagatgtg  ttggctgata
3541  tgggtcatga  agagtggaaa  gaaataggca  tcaatgcata  tgggcaccgc  caaaaattaa
3601  tcaaaggagt  agaaagactc  ttagggtggc  aacaaggcac  caatccttat  ttgacttttc
3661  actgtgttaa  tcagggaacg  attttgcgtg  atcttgcctc  agaagataaa  gaatatcagt
3721  cagtggaaag  agagatgcaa  agtactattc  gagaacacag  agatgggtgt  aatgctggcg
3781  gcactctcaa  cagatacaat  gtcattcgaa  ttcaaaaagt  tgtcaacaag  aagttgaggg
3841  agcggttctg  ccaccgacag  aaggaaagtgt  ctgaggagaa  tcacaacct  cacaatgagc

```

图 12

```
3901 gcatgttggt tcatggttct cctttcatta atgccattat tcataaaggg tttgatgagc
3961 gacatgcata cataggagga atgtttgggg ccgggattta ttttgctgaa aactcctcaa
4021 aaagcaacca atatgtttat ggaattggag gaggaacagg ctgccctaca cacaaggaca
4081 ggtcatgcta tatatgtcac agacaaatgc tcttctgtag agtgaccctt gggaaatcct
4141 ttctgcagtt tagcaccatg aaaatggccc acgcgcctcc agggcaccac tcagtcatgt
4201 gtagaccgag cgtcaatggg ctggcatatg ctgaatatgt catctacaga ggagaacagg
4261 catacccaga gtatcttata acttaccaga tcatgaagcc agaagccctt tcccagaccg
4321 caacagccgc agagcagaag acctagtga tgcctgctgg tgaaggccag atcagatttc
4381 aacctgggac tggattacag aggattgttt ctaataacaa catcaatatt ctagaagtcc
4441 ctgacagcct agaaataagc tgtttgtctt ctataaagca ttgctatagt g
```

1 cgcgccgct cgctagccga aacctgccca gccggtgcc gccactgcg cacgcgcggg
61 acgacgtcac gtgcgctccc ggggctggac ggagctggca ggaggggcct tgccagctc
121 cgccgcccgc tcgttcagg acccgacgg cggattcgc ctgcctccgc cgccgcggg
181 cagccggggg gcaggagcc cagcgagggg cgcgcgtggg cgcggccatg ggactgcgc
241 ggatccggtg acagcaggga gccaaaggc ccgggccctg agcgcgtctt ctccggggg
301 cctcgccctc ctgctcgcg gcccggggct cctgctccg ttgctggcg tgttgcggc
361 tgtggcggcg gccaggatca tgcgggtcg ccgctgcgc gccgggggag cggcctgcg
421 gagcgccgc gccgagggc tggagccgg cggcgagag ctgttcgagg cgtgccgca
481 cggggacgtg gaacgagtca agaggctgt gacgcctgag aaggtgaaca gccgcgacac
541 gccgggcagg aaatccacc cgctgcact cgcgcagggt ttggggcga aagacgtagt
601 tgaatattg ctccagaat gtgcaaatg ccaagcacg gatgatggg gccttattc
661 tctcataat gcctgctt ttggtcatg tgaagtagt aatctctt tgcgacatg
721 tgcagacccc aatgctcag ataattgaa ttatactct ctccatgaag ctgcaattaa
781 aggaagatt gatgttgca ttgtctgtt acagcatgga gctgagccaa ccatccgaa
841 tacagatgga aggacagcat tggatttagc agatccatc gccaaagcag tgcctactg
901 tgaatataag aaagatgaac tcttagaa tgcaggagt ggcaatgaag aaaaaatgat
961 ggtctactc acaccattaa atgtcaact ccacgcaagt gatggcagaa agtcaactc
1021 attacattg gcagcaggat ataacagagt aaagattga cagctgttac tgcaacatg
1081 agctgatgt catgctaaag ataaaggta tctggtacca ttacacaatg cctgttcta
1141 tggctattat gaagtaactg aacttttgg caagcatggt gcctgtgtaa atgcaatgga
1201 ctgtggcaa ttcactctc tcatgaggc agcttctaag aacagggtt aagtatgtc
1261 tcttctcta agttatggt cagacccaac actgctcaat tgcacaata aaagtctat
1321 agactgggt cccacaccac agttaaaga aagattagca tatgaattt aaggccactc
1381 gttgctgca gctgcacgag aagctgatg tactcgaatc aaaaaacatc tctcttgga
1441 aatggtgaat ttcaagcatc ctcaaacaca tgaacagca ttgcatgtg ctgctgcatc
1501 tccatatacc aaaagaaagc aaatatgta actgttgta agaaaaggag caaacatcaa
1561 tgaaaagact aaagaattct tgactcctc gcacgtggca tctgagaaag ctcataatga
1621 tgtgttgaa gtagtggtga aacatgaagc aaaggtaat gctctggata atcttggtca
1681 gacttctca cacagagctg catattgtg tcatctaca acctgccgc tactctgag
1741 ctatgggtg gatcctaaca ttataccct tcagggtt actgcttac agatgggaa
1801 tgaaaatga cagcaactc tccaagagg tatctcata gtaattcag aggcagacag
1861 acaattgtg gaagctgca aggctggaga tgcgaaact gtaaaaaaac tgtgtactg
1921 tcagagtgc aactgcagag acattgaag gcgtcagtct acaccactc atttgcagc
1981 tgggtataac agagtgtcc tgggtgaata tctgtacag catggagctg atgtgcatg
2041 taaagataa ggaggcctg taccttgca caatgcatg tcttatggac attatgaat
2101 tgcagaact ctgtttaa atggagcagt agttaatga gctgattat ggaaattac
2161 acctttacat gaagcagcag caaaaggaaa atatgaaat tgcaactc tgcctcagca
2221 tgggtcagac cctacaaaa aaacagga tggaaatac ctttggatc ttgttaaaga
2281 tggagataca gatattcaag atctgcttag gggagatgca gcttgcctag atgctgcaa
2341 gaagggtgt ttgacagag tgaagaagt gtctctcct gataatgtaa attgccgca
2401 taccaaggc agacattcaa cactttaca tttagcagc ggtataata attagaagt
2461 tgcagagtat ttgttaca acggagctga tgtgaatgcc caagacaaag gaggacttat
2521 tctttacat aatgcagcat ctacgggca ttagatgta gcagctctac taataaagta
2581 taatgcatg gtcaatgca cggacaaat ggcttcaca ctttgcacg aagcagccca
2641 aaagggacga acacagctt gtgcttgtt gtagcccat ggagctgacc cgactctaa
2701 aaatcaggaa ggacaaacac ctttagatt agtttcagca gatgatgca gcgtcttct
2761 gacagcagc atgccccat ctgctctgcc ctctgttac aagctcaag tgcataatg

图 13

2821 tgtgagaagc ccaggagcca ctgcagatgc tctctcttca ggtccatcta gcccatcaag
2881 cttttctgca gccagcagtc ttgacaactt atctgggagt ttttcagaac tgtcttcagt
2941 agttagtcca agtggaaacag aggggtgcttc cagtttgag aaaaaggagg ttccaggagt
3001 agattttagc ataactcaat tcgtaaggaa tcttggaact gagcacctaa tggatatatt
3061 tgagagagaa cagatcactt tggatgtatt agttgagatg gggcacaagg agctgaagga
3121 gattggaatc aatgcttatg gacataggca caaactaatt aaaggagtcg agagacttat
3181 ctccggacaa caaggtctta acccataatt aactttgaac acctctggtg gtggaacaat
3241 tcttatagat ctgtctcctg atgataaaga gtttcagtct gtggaggaag agatgcaaag
3301 tacagttcga gagcacagag atggaggtca tgcagggtga atcttcaaca gatacaatat
3361 tctcaagatt cagaagggtt gtaacaagaa actatgggaa agatacactc accggagaaa
3421 agaagtttct gaagaaaacc acaacctatgc caatgaacga atgctatttc atgggtctcc
3481 ttttgtaat gcaattatcc acaaggctt tgatgaaagg catgctaca taggtggtat
3541 gtttgagct ggcaattatt ttgtgaaa ctcttccaaa agcaatcaat atgtatatgg
3601 aattggagga ggtactgggt gtccagtcca caaagacaga tcttgttaca ttgccacag
3661 gcagctgctc tttgccggg taaccttggg aaagcttctc ctgcagtcca gtgcaatgaa
3721 aatggacat tctctccag gtcactcact agtactggt aggccagtg taaatggcct
3781 agcattagct gaatagtta ttacagagg agaacaggct tatcctgagt atttaattac
3841 ttaccagatt atgaggcctg aaggatggt cgatggataa atagttatt taagaaacta
3901 attccactga acctaaaac atcaaagcag cagtggcctc tacgtttac tctttgctg
3961 aaaaaaaatc atctgccc caggcctgtg gcaaaaggat aaaaatgtga acgaagttta
4021 acattctgac ttgataaagc tttaataatg tacagtgtt tctaatatt tctgtttt
4081 tcagcacttt aacagatgcc attccagggt aaactgggt gtctgtacta aattataaac
4141 agagttaact tgaaccttt atagtattg cattgattct acaaaactgt aatgccctca
4201 acagaactaa tttaactaat acaatactgt gtctttaa acacagcatt tacactgaat
4261 acaatttcat ttgtaaaact gtaataaga gttttgtac tagccagta ttatttaca
4321 ttgctttga atataaatct gttttagaac tgcagcgggt tacaaaatt ttcatatgt
4381 attgttcac tatacttcat ctacatcgt catgattgag tgatctttac attgattcc
4441 agaggctatg ttcagttgtt agttgggaaa gattgagta tcagatttaa ttgccgag
4501 ggagccitta tctgtcatta gaaatcttc tcatttaaga acttatgaat atgctgaaga
4561 tttaattgt gatactttg tatgtatgag acacattcca aagagctcta actatgatag
4621 gtctgatta ctaagaagc ttcttactg gctcaatt ctactttca tgttgaaaa
4681 tttctgcag tcttctgtg aaaattagag caaagtctc ctgttttta gagaaactaa
4741 atcttctgt tgaacaatta ttgtgttctt tcatggaac ataagtagga tgttaacatt
4801 tccagggtgg gaagggtaat cctaaatcat tcccaatct attctaatta ccttaaatct
4861 aaaggggaaa aaaaaatca caaacaggac tgggtagtt tttatcctaa gtatatttt
4921 tctgttctt ttacttgggt ttattgtctg tatttatagc caatctatc atcatgggt
4981 aacttaacc agaactataa aatgtagtgt ttccagtcct ctccaggcct cctgaatggg
5041 caagtgcagt gaaacagggt ctctctgctc ctgggtttc tctccatgat gttatgccc
5101 attgaaaata tctgtcagt ttgtgcacca tatggtgacc acgctgtgc tcagtttggc
5161 agctatagaa ggaatgctg tccataaaa tgcctccct atttctaata taacactctt
5221 tccaggaag catgttaag catctgtta cagagacata catccattat ggcttgcaa
5281 tctctttat ttgtgactc tagctccct caaagtcag gaaagatct tactactta
5341 atgaggacat tccccatcac tgtctgtacc agttcacct tattttacgt ttattcagt
5401 ctgtaaatc actggccctt tgcagtaact tgtacataaa gtgctagaaa atcatgttc
5461 ttgtctgag taagagtaa tcagagtaag tgcatttctg gagttgttc tgtgatgaa
5521 attatgatca ttatttaaga agtcaaatcc tgaactgaa gtgctttta tacagctctc
5581 taataattac aaatatccga aagtcattc ttggaacaca agtggagtat gccaaattt
5641 atatgaatt ttacagatt ctaagcttc aggtttata attagaagat aatgagagaa
5701 ttaatgggt ttatattac attatctc aactatgtag cccatattac tcacctatg
5761 agtgaatcig gaattgctt tcatgtgaaa tcatgtgtt ctatgagtt acaactatgc

5821 aaactgtgtt atttatcta aaccattgct taatgagtgt gttttccat gaatgaatat
5881 accgtgggtc atatgttagc atggcagcat ttcagatag cttttgttt gttgggaagt
5941 tggggttttg gggggagggg gagtattagt acgttgcag gaatagccta cttataatg
6001 atgggaatgc ttttctttt gttttgggat tttttttt gaagtgaaat ttaactttt
6061 gtgccagtag tactattata cccatcttca gtgtcttact tgtactgtat caaatccat
6121 accctcattt aattcttaat aaaactgttc acttgtaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
6181 aaaaaaaaaa

1 cgcccgccca gccccggggg cagggaaagc ctaaattacg gaattaccgc gagcaaggag
61 cgcggaatcg gggagcgtcc ggagctagct ggatcctcta ggcaggatgg tgaigggaat
121 ctttgcaaat tgtatcttct gttgaaagt gaagtactta cctcagcagc agaagaaaaa
181 gctacaaact gacattaagg aaaatggcgg aaagttttcc ttttcttaa atcctcagt
241 cacacatata atcttagata atgctgatgt tctgagtcag taccaactga attctatcca
301 aaagaaccac gtatcattg caaaccaga tttatatagg aaatctatca gagaaaagag
361 actcttggat gtaagaatt atgacctta taagcccctg gacatcacac cacctcciga
421 tcagaaggcg agcagttctg aagtgaaac agaaggtcta tgcccgaca gtgccacaga
481 ggaggaagac actgtggaac tcaactgagtt tggatgcag aatgtgaaa ttctcatct
541 tctcaagat ttgaagtgg caaatataa cacctggag aaagtgggaa tggagggagg
601 ccaggaagct gtggtggtgg agcttcagt ttcgccggac tccagggact gtccttct
661 gatctctca cacttctcc tggatgatgg catggagact agaagacagt ttgctataa
721 gaaaacctct gaagatgcaa gtgaatacti tgaattac attgaagaac tgaagaaca
781 aggatttcta ctaagagaac attcacacc tgaagcaacc caattagcat ctgaacaatt
841 gcaagcattg ctttggagg aagtcagaa ttaagcaact ctgagccaag aggtgagcga
901 tttagtagag atgatttggg cagaggccct gggccaccig gaacacatgc ttctaaagc
961 agtgaacagg attagctca acgatgtgag caaggcagag gggattctcc ttctagtaa
1021 ggcagcactg aaaaatggag aaacagcaga gcaatigcaa aagatgatga cagagtitta
1081 cagactgata cctcacaaag gcacaatgcc caaagaagt aacctgggac tattggctaa
1141 gaaagcagac ctctgccagc taataagaga catggttaat gtcgtgaaa ctaattgtc
1201 caaaccaac ccaccatccc tggccaaata ccgagcttg aggtgcaaaa ttgagcatgt
1261 tgaacagaat actgaagaat tticagggt tagaaaagag gtttgcaga atcatcacag
1321 taagagccca gtggatgtct tgcagatatt tagagttggc agagtgaatg aaaccacaga
1381 gttttgagc aaacttggta atgtgaggcc ctgttgcat ggttctctg taaaaacat
1441 cgtgggaatc ttgtgtcag ggttctttt acccaaagta gtggaagatc gtggtgtgca
1501 aagaacagac gtcggaaacc ttggaagtgg gatttattc agtgatcgc tcagtacaag
1561 tatcaagtac tcacaccgg gagagacaga tggcaccaga ctctgtctca ttgtgacgt
1621 agccctcgga aagtgtatgg acitacatga gaaggactt ccttaacig aagcaccacc
1681 aggctacgac agtgtgcatg gagtttaca aacagcctct gtcaccacag actttgagga
1741 tgaatgaatt gtgtctata aaaccaatca ggttaaatg aaatatatta taaatttc
1801 catgcttga gatcagataa aggacttca tctagtgtat catactgaat tagaggaata
1861 cagacctgag tttcaaatt ttcaaagg tgaagattac cagttaccag atgcaaaaac
1921 ttcagcagc accaaggccg gcctccagga tgcctctggg aacttggttc ctctggagga
1981 gtccacatc aaaggagaa tcatagacac ttagccag gtcattgtt ttacacata
2041 cacaataaa agtcacgtgc ccattgaggc aaaatatac tttcttgg atgacaaggc
2101 cgtgtgtgt ggttcgaag ccttcatca tgggaagcac atagttggag agattaaaga
2161 gaaggaagaa gccagcaag agtacctaga agccgtgacc cagggccatg gcgttacct
2221 gatgagtcag gatgtccgg acgttttac tgaagtgtt ggaaacttac cccctaaggc
2281 taaggttct ataaaaatta cctacatcac agaactcagc atcctgggca ctgttggtg
2341 cttttcatg cccgccacc tagcacctg gcaacaggac aaggcttga atgaaaacct
2401 tcaggataca gtagagaaga ttgtataaa agaaatagga acaaagcaa gcttctctt
2461 gactatgtct attgagatgc cgtatgtgat tgaattcatt ttacatgata cacatgaact
2521 gaaacaaaag cgcacagact gcaaagctgt cattagcacc atggaaggca gctccttaga
2581 cagcagtgga tttctctcc acatcggtt gtctgtgcc tatctccaa gaatgtggg
2641 tgaaaaacat ccagaaaaag aaagcgaggc ttgcatgctt gctttcaac ccgatctga
2701 gtctgacct cctgacctag ccagtgagag cgaagtgatt attgtctg actgtccag

图 14

2761 ttccatggag ggtgtgacat tcttgcaagc caagcaaatc accttgcacg cgctgtcctt
2821 ggtgggtgag aagcagaaag taaatattat ccagttcggc acaggttaca aggagctatt
2881 ttcgtatcct aagcatatca caagcaatac cacggcagca gattcatca tctctgccac
2941 acctaccatg gggaacacag acttctggaa aacactccga tatcttagct tattgtacce
3001 tgctcgaggg tcacggaaca tctctctggt gtctgatggg cacctccagg atgagagcct
3061 gacattacag ctctgaaga ggagccgccc gcacaccagg ttattcgctt gcggtatcgg
3121 ttctacagca aatcgtcacg tcttaaggat ttgtcccag tgtggtgccg gagtatttga
3181 atattttaat gcaaaatcca agcatagtgt gagaaaacag atagaagacc aatgaccag
3241 gctatgttct ccgagttgcc actctgtctc cgtcaaatgg cagcaactca atccagatgc
3301 gcccagggcc ctgcaggccc cagcccaggt gccatccttg ttctgcaatg atcgactcct
3361 tgtctatgga ttcattctc actgcacaca agcaactctg tgtgactaa ttcaagagaa
3421 agaattttgt acaatggtgt cgactactga gcttcagaag acaactggaa ctatgatcca
3481 caagctggca gcccagctc taatcagaga ttatgaagat ggcattcttc acgaaaatga
3541 aaccagtcac gagatgaaaa aacaaacctt gaaatctctg attattaaac tcagtaaaga
3601 aaactctctc ataacacaat ttacaagctt tgtggcagtt gagaaaaggg atgagaatga
3661 gtgcctttt cctgatattc caaaagtctc tgaacttatt gccaaagaag atgtagactt
3721 cctgccctac atgagctggc agggggagcc ccaagaagcc gtcaggaacc agtctctttt
3781 agcatctctt gagtggccag aattacgttt atccaaacga aaacatagga aaattccatt
3841 ttccaaaaga aaaaaggaaat tatctcagcc agaagtttct gaagattttg aagaggatgg
3901 cttaggtgta ctaccagctt tcacatcaa ttiggaacgt ggaggtgtgg aaaagctatt
3961 ggatttaagt tggacagagt catgtaaac aacagcaact gaaccactat ttaagaaagt
4021 cagtccatgg gaaacatcta ctctagctt ttctctatt ttggtccgg ccgttggttc
4081 ctatcttacc ccgactacc gcgctcacag tctgtctcc ttgtctttg cctcatatcg
4141 tcaggtagct agtttcggtt cagctgtctc tccagacag ttgatgcat ctcaattcag
4201 ccaaggccct gtgcctggca ctgtgtga ctggatccca cagtcggcgt ctgtccac
4261 aggacctccc cagaaccac ctctgcacc ctattgtggc attgttttt caggagctc
4321 attagctct gcacagtctg ctccactgca acatcctgga ggctttacta ccaggccttc
4381 tgctggcacc ttccctgagc tggattctcc ccagttcat ttctcttc ctacagacc
4441 tgatcccatc agaggtttg ggtcttaca tccctctgt tactctcctt ttattttca
4501 acctccgca gcctctttga ctgccaacct taggctgcca atggcctctg ctttacctga
4561 ggctctttgc agtcagtcgc ggactacccc agtagatctc tgtctctag aagaatcagt
4621 aggcagtctc gaaggaagtc gatgtctgt ctttgctttt caaagttctg acacagaaag
4681 tgatgagcta tcagaagtac ttcaagacag ctgcttttta caaataaagt gtgatacaaa
4741 agatgacagt atcccgtgct ttctggaatt aaaagaagag gatgaaatag tgtgcacaca
4801 acactggcag gatgtgtgc cttggacaga actcctcagt ctacagacag aggatggctt
4861 ctggaaactt acaccagaac tgggacttat attaaatctt aatacaaatg gttgcacag
4921 ctttcttaaa caaaaaggca ttcaatctt aggtgtaaaa ggaagagaat gtctcctgga
4981 cctaattgcc acaatgctgg tactacagtt tattgcacc aggttggaag aagagggaat
5041 agtgttcaaa tctatgatga aaatggatga cccttctatt tccaggaata ttccctgggc
5101 ttttaggca ataaagcaag caagtgaatg gtaagaaga actgaaggac agtaccatc
5161 tatctgccc cggcttgaac tggggaacga ctgggactct gccaccaagc agttgctggg
5221 actccagccc ataagcactg tgtccctct tcatagagtc ctccattaca gtcaaggcta
5281 agtcaaatga aactgaattt taaactttt gcatgcttct atgtagaaaa taatcaaatg
5341 ataatagata attataatga aacttcatta aggttcatt cagtgtagca attactgtct
5401 ttaaaaatta agtggagaa gaattactt aatcaactaa caagcaataa taaaatgaaa
5461 cttaaaataa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa