Dezoxinukleozid-kinázok szerepe a DNS-repair és az apoptózis folyamatában

A kutatás célja:

Laboratóriumunkban fedezték fel, hogy limfociták különböző genotoxikus ágensekkel való kezelése, valamint gamma és UV-besugárzásuk többszörösére növeli a dezoxicitidin-kináz (dCK) aktivitását. Ugyanakkor sem a timidin-kináz 1 (TK1), sem a timidin-kináz 2 (TK2) aktivitása nem változik.

A dezoxicitidin-kináz egy széles szubsztrát-specifitású, konstitutívan expresszálódó enzim, mely a négy természetes dezoxinukleozid közül hármat, a dezoxiadenozint (dAdo), a dezoxiguanozint (dGuo) és a dezoxicitidint (dCyd) foszforilálja. Azonban a dezoxicitidilsav dezaminálása (dCMP-dezamináz), majd metilálása (timidilát-szintáz) révén timidin nukleotidok is keletkezhetnek a dCK segítségével. Ily módon a dezoxicitidin-kináz a nyugvó limfociták DNS repair-jéhez és feltehetően a génátrendeződéssel kapcsolatos DNS szintézishez mind a négy prekurzor-nukleotid utánpótlását biztosítja.
Mivel a dezoxicitidin-kináz hatékonyan foszforilálja a dezoxiadenozint és annak analógjait, a megnövekedett dCK-aktivitás nemcsak a repairt, de az apoptózis folyamatait is szolgálhatja, amelyeknek dATP-re van szükségük. Az irodalomból ismeretes, hogy az intracelluláris Ca^{2+} -ionok koncentrációjának emelkedése szintén szerepet játszik az apoptózisban. Kísérletes úton próbáltunk tisztázni az apoptózis és a nukleozid metabolizmus közötti kapcsolatot.
A 2004 – 2005-ben végzett munka eredményei alapján elsőként feltételeztük, hogy a dCK-aktivitás növekedése az enzim foszforilációjának a következménye. Ennek nyomán a feltételezés direkt bizonyítására, illetve a foszforilációt kiváltó jelátviteli mechanizmusok azonosítására tettünk kísérletet.
Orvosi szempontból különösen fontos enzim a dezoxicitidin-kináz, mivel egy sor dezoxinukleozid-analógot is aktivál, azaz hatékony nukleotiddá foszforilál, mint például a hajas sejtes leukémia kezelésre használatos cladribint (2-klór-2'-dezoxiadenozin, CdA), a még kísérleti stádiumban levő clofarabint (2-klór-2'-arabinofluoro-2'-dezoxiadenozin, CAFdA), az akut limfoid leukémia kezelésben hatékony citarabint (1-β-D-arabinofuranozil-citozin, Ara-C) és fludarabint (9-β-D-arabinofuranozil-2-fluor-adenin, Fara-A), a szolid tumorok terápiájában alkalmazott gemcitabint (2',2'-difluoro-2'-dezoxicitidin, dFdC) stb. Arra a kérdésre is választ kerestünk, hogy a dCK megemelkedett akivitása, illetve a dCK overexpressziója milyen hatással bír a sejtek nukleozid-metabolizmusára és a dezoxinukleozid-analógok hatékonyságára.

Dr. Lumniczky Katalin és munkatársai (Dr. Sáfrány Géza laboratóriuma, Országos Frédéric Joliot-Curie Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Kutatóintézet, Molekuláris és Tumor Radiobiológiai Osztály) azt mutatták ki, hogy dezoxicitidin-kináz overexpresszálása lényegesen növeli a gamma-besugárzás és/vagy gemcitabinnal történő kezelés citotoxikus és radioszenzitizáló hatását mind az általuk előállított sejtvonalak, mind az intracranialis tumorok esetében. Azonban a hatás mértekében mind a sejtvonalak, mind a tumorok között nagy eltérések mutatkoztak. Ennek egyik oka lehet a különböző sejtvonalak dNTP-pooljainak, különösen a dATP-pool eltérő méretei, illetve a foszforilált analóg és természetes nukleotid eltérő koncentrációarányai. A kutatás utolsó évében e probléma molekuláris hátterét igyekeztük kísérletesen feltérképezni.

A munka eredményei:

I. A dCK-t aktiváló anyagok és a gamma-besugárzás DNS-károsodást váltanak ki, amelynek korai szenzora a genom integritásáért felelős p53 tumor szuppresszor fehérje. Tisztázni szerettük volna, hogy a dCK aktivációjában szerepet játszik-e a p53. Ezt eldöntendő azt vizsgáltuk, hogy a p53 farmakológiai inhibitorával, a pifithrin-alfával felfüggeszthető-e a dCK-aktivitás növekedése.
A pifithrin-alfával a 2-klórdezoxiadenozinnal (CdA) kiváltott dCK-aktiválódás teljes mértékben felfüggeszthető; ez a gátlás már a pifithrin-alfa alacsony koncentrációja mellett is megfigyelhető volt (1). A p53 és a dCK aktiválódásának kapcsolatát három Burkitt-limfóma eredetű sejtvonalon is megvizsgáltuk. A CdA-val vagy etopoziddal (topoizomeráz II-inhibitor) kezelt sejtvonalak közül a vad típusú p53-at expresszáló DG-75 sejtvonalon két-háromszoros aktiválódást észleltünk, ezzel szemben a p53-at nem expresszáló BL-41 és Ramos sejteken csak minimális (50% alatti) aktiválódást sikerült kiváltani. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a p53 lényeges szerepet játszik a dCK aktiválódásának folyamatában.

II. A citoplazmatikus szabad Ca^{2+}-szintet csökkentő (nifedipin, verapamil, gadolínium-klorid, EGTA), fokozó (thapsigargin, ionomycin, strophantin), illetve az aktív Ca^{2+}-kalmodulin komplex működését gátló anyagok (klórpromazin és a W-7 inhibitor) alkalmazásával szerettük volna bizonyítani, hogy a Ca^{2+}-ionoknak a dCK működésének szabályozásában is szerepe van, és oki szerepet játszhat az enzim aktivációjában. A sejtpermeábilis Ca^{2+}-kelátor BAPTA-AM-mel (1, 2-bisz (2-amino-fenoxi) etán-N, N, N', N'-tetraacetát tetrakisz (acetoximetil-észter) a dCK aktiválódását teljes egészében ki tudtuk védeni (2, 3). A felsorolt Ca^{2+}-szint csökkentő szerek hatására viszont csak minimális mértékben csökkent a dCK-aktivitás, ami összefüggésben van azzal, hogy ezek a szerek a BAPTA-nál sokkal kevésbé csökkentik a szabad citoplazmatikus Ca^{2+}-szintet. A citoplazmatikus Ca^{2+}-koncentráció emelésével (thapsigargin, ionomycin, strophantin) azonban a dCK nem aktiválható. Ezek az eredmények azt valószínűsítik, hogy a Ca^{2+} permisszív szerepet játszik az enzimaktiválódásban. A sejtkivonatokhoz adott EGTA az enzim aktivitását nem befolyásolta, tehát a Ca^{2+} a dCK-nak nem kofaktora. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a dCK aktiválódásához vezető jelpályában egy kalciumfüggő faktor is szerepet játszhat. Az enzimaktiválódás mechanizmusával kapcsolatban azt találtuk, hogy az aktivált enzim natív immunreaktivitása fokozott a kontroll enziméhez képest, ami konformációs változást valószínűsít (2). A CdA-val stimulált limfociták enzimaktivitása jóval stabilabb a kontroll sejtekéhez képest (3).

III. Nemcsak a nukleozid-analógok, hanem a dezoxiadenozin (dAdo), a dezoxicitidin-kináz természetes szubsztrátja is hatékonyan stimulálta a dCK-t (egy adenozin-dezamináz-gátlószer, a dezoxikoformicin jelenlétében) (4). Ezt a hatást sem dezoxiguanozin, sem pirimidin-nukleozidok sem képesek kiváltani. Mi több, a dezoxicitidin (dCyd), ellentétben a ribocitidinnel, felére csökkentette a dCK aktivitását, és megakadályozta a dCK stimulálását klórdezoxiadenozinnal, aphidicolinnal, illetve tirozin-kináz-gátlószerekkel (tyrphostin A47, genistein), epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) és különböző MAP-kináz inhibitorokkal (PD 153, 035, PD 098, 059, SB 203, 580). A dezoxicitidinen kívül a 400 mM szorbitollal kiváltott hiperozmotikus sokk szintén gátolta a dCK-t és annak aktiválódását is. A dCK aktiválódásával párhuzamosan a dATP és dCTP–poolok is változtak tonzilla limfocitákban. A dezoxinukleozid trifoszfátok mennyiségét Sherman és Fyfe (Sherman and Fyfe, Analytical Biochem. 1989, 180, 222) módosított szintetikus oligonukleotid-templát módszerével határoztuk meg. Kísérleti eredményeink szerint a dCK aktiválódását a

citotoxikus dATP-pool 150-170%-os növekedése és a pirimidin-poolok 30-50%-os csökkenése kísérte. Ellentétes hatást váltott ki az ozmotikus sokk: a szorbitol 30%-al növeli a dCTP-poolt, miközben a dATP-pool mérete gyakorlatilag nem változik.
Az eredmények azt bizonyítják, hogy a dCK aktiválódásának fontos szerepe lehet a dAdo-mediálta citotoxicitásban, ami az adenozin-dezamináz-hiányban fellépő súlyos kombinált immundeficiencia szindróma (SCID) központi eleme.

IV. A dCK-aktiváció és az apoptózis mitokondriális útjának kapcsolatának kimutatása céljából rövidtávú (1-2 h) genotoxikus kezeléseket (CdA, aphidicolin, etopozid) alkalmaztuk. A kezelések hatására, a dCK aktiválódásával párhuzamosan, a sejtek kaszpáz-3-aktivitásában szignifikáns emelkedés volt megfigyelhető, de DNS-fragmentációt gélelektroforetikus módszerrel nem tudtunk kimutatni. Az apoptoszóma képződésében fontos szerepet játszó dATP-mennyiség meghatározására Sherman és Fyfe módszert alkalmaztunk. A fenti kezelések során a dCK aktiválódásával párhuzamosan a dATP-pool szelektív növekedését tapasztaltuk, ami felveti annak lehetőségét, hogy a proapoptotikus dATP keletkezésében a dCK aktiválódásának szerepe van (4).

V. A kísérleti eredményeink fényében nyomós okunk volt feltételezni, hogy a dCK aktivitás-változásának hátterében poszttranszlációs modifikáció állhat. Ennek a feltételezésnek a bizonyítására kétdimenziós elektroforézist alkalmaztunk. A humán limfocitákból immunprecipitációval tisztított dCK kétdimenziós elektroforézise során több, közel azonos molekulatömegű, de eltérő izoelektromos pontú formát azonosítottunk. Kimutattunk, hogy mind a kontroll, mind az aktivált dCK-preparátum λ-foszfoprotein-foszfatázzal történő emésztése drasztikusan csökkentette az enzimaktivitást. A dCK konformációja is megváltozik az enzimaktiválódás során: limitált tripszinolízis segítségével kimutattunk, hogy a dCK aktiválása közben olyan lokális konformáció-változás történik, amelynek során az aktivált enzim rezisztensebbé válik a tripszines emésztéssel szemben. A dCK konformáció-változását támasztja alá az a megfigyelésünk is, hogy a C-terminális peptiddel szemben termelt antitest natív immunblot során sokkal erősebb jelet ad az aktivált dCK-val, mint az ugyanolyan mennyiségű kontroll, vagy szorbitollal kezelt sejtekből preparált dCK. Mindemellett az aktivált dCK fokozott immunreaktivitása eltűnik a nyerskivonat előzetes λ-foszfoprotein-foszfatázzal történt emésztése során, miközben az enzimaktivitás is drasztikusan csökken (5).

VI. Korábbi eredményeink arra utaltak, hogy a dCK aktiválódásának kiváltó oka a DNS károsodása. A dCK konformáció-változásához és enzimaktivitásának fokozódásához vezető jelpályák feltérképezése céljából tonzilla-limfocitákat a poli(ADP-ribóz)-polimeráz inhibitor 3-aminobenzamiddal kezeltünk, amely nem befolyásolta a dCK alapaktivitását, de a CdA-val kiváltott aktiválódását sem függesztette fel (4). Az eredmény arra utal, hogy a poli(ADP-ribóz)-polimeráz, a DNS-„nick”-eket érzékelő fehérje, nem vesz részt a dCK aktiválásához vezető jelátvitelben. Ugyanakkor a receptor-tirozin-kináz inhibitorok és MAP-kináz inhibitorok által kiváltott dCK-aktiválódás azt valószínűsíti, hogy a DNS károsodásán túl a dCK aktivitása a növekedési faktor jelpályák és a MAP-kináz kaszkád révén is regulálható.

VII. A következő kísérleteinkkel arra a kérdésre kerestünk választ, hogy a dCK aktiválása, illetve az aktiválás felfüggesztése milyen hatással bír a dezoxinukleozidok metabolizmusára. Korábban azt találtuk, hogy a dCK aktiválódása a BAPTA-AM kalcium-kelátorral és a pifithrin-alfával (PFT-alfa), a p53 inhibitorával egyaránt gátolható. A további munka keretében kimutattuk, hogy az UV-fénnyel történő dCK-aktiválódás ugyancsak kalciumfüggő és pifithrin-érzékeny, míg a timidin-kináz 1 aktivitása BAPTA-AM jelenlétében stabilizálódik.

Tonzilla-limfociták ^{3}H-dezoxinukleozidokkal történő metabolikus jelzése segítségével kimutattuk, hogy mind az UV-sugárzás, mind a kalcium-kelátor jelenlétében csökken a DNS-be történő dezoxicitidin- és timidin-inkorporáció. Ugyanakkor a pifithrin-alfa szinte nullára csökkentette mind a nukleotid-, mind pedig a DNS-frakciók ^{3}H-dCyd- és ^{3}H-Thd-jelöltségét, és lényegesen gátolta a ^{3}H-klórdezoxiadenozin (CdA) felvételét (6). Az eredmények alapján feltételeztük, hogy ennek hátterében a transzmembrán nukleozid-transzport gátlása áll. Direkt méréssel bebizonyítottunk, hogy az ismert nukleozid-transzport-gátlószerhez, a dipiridamolhoz hasonlóan, a PFT-alfa is erősen gátolja a pirimidin-nukleozidok transzportját tonzilla-limfocitákban. A nukleozid-transzport gátlása az eddig elsősorban p53-inhibitorként ismert PFT-alfának egy új, általunk elsőként leírt hatása. A CdA-transzport kisebb mértékű gátlása azzal magyarázható, hogy a CdA-nak több mint a fele nem aktív transzporttal, hanem passzív diffúzióval jut be a sejtekbe. A másik lehetőséget – a foszforilációs potenciál csökkenését – nem tartottunk valószínűnek, mert a sejtekbe jutott CdA foszforilációja a PFT-alfa jelenlétében is többszöröse volt a pirimidin-nukleozidok gátlószer nélküli foszforilációjánál.

VIII. A sejtmentes kivonatokkal végzett kísérletek azt bizonyították, hogy az intakt sejtstruktúra nélkülözhetetlen az összes, korábbiakban említésre került aktiváló ágens, illetve sejtkezelés hatékonyságához. Tonzilla limfociták izozmotikus sejtlízisen alapuló frakcionálásával, majd a magi, illetve citoplazmatikus frakciók western blottal történő analízisével kimutattuk, hogy a dCK aktiválódását nem követi az enzim kompartmentalizációjának megváltozása. A dCK intracelluláris lokalizációja sokáig élénk vita tárgyát képezte. Végül tisztázódott, hogy az enzim citoplazmatikus elhelyezkedésű, legalábbis limfoid sejtvonalakban. Azonban a magi frakcióban western blottal azonosítottunk egy specifikus fehérjesávot, amelynek molekulatömege néhány kilodaltonnal több mint a citoplazmatikus elhelyezkedésű dCK-é (5). Feltételeztünk, hogy egy alternatív splicinggel keletkezett sejtmagi izoformával állunk szemben. Ennek bizonyítására a sejtmagi enzim immunaffinitás-kromatográfiával történő tisztítása és a tisztított enzim tömegspektrometriai úton történő szekvenciavizsgálata szükséges.

IX. Kísérleteink során affinitás-kromatográfiával, egy foszfoprotein-kötő oszlop (Qiagen) segítségével kimutattuk, hogy a dezoxicitidin-kináz-fehérjének legalább 30%-a foszforilált állapotban van (5). A dCK-foszforiláció direkt bizonyítása és a foszforilációs helyek azonosítása érdekében kontroll és aphidicolinnal kezelt tonzilla-limfocitákból immunprecipitáció segítségével izoláltuk a natív dCK-t. Denaturáló gélelektroforézis után a dezoxicitidin-kinázt gélből történő kivágással homogenitásig tisztítottuk. Az aktivált és a nem aktivált humán dCK-preparátumokat a rekombináns, hexahisztidinnel címkézett dCK-fehérjével együtt tömegspektroszkópiai analízisnek vetettük alá (együttműködő partner: dr. Åke Engström, BMC, Uppsala, Svédország). Mindhárom preparátumban kimutathatóak voltak a dCK-ra jellemző peptidfragmentumok, azonban a foszforilációra utaló eltéréseket nem sikerült azonosítani. A kísérlet sikertelenségét valószínűleg a sejtekből izolálható endogén dCK kis mennyisége és az általunk használt lézer deszorpciós-ionizációs tömegspektroszkópiás módszer (MALDI-ToF) nem eléggé érzékeny volta okozta. Erre a következtetésre jutottunk, miután egy brüsszeli csoportnak (C. Smal et al., J. Biol. Chem. 281, 4887-93, 2006) sikerült expresszálnia a hexahisztidin-címkét tartalmazó rekombináns dCK-t humán embrionális vesesejtekben (HEK 293T). A tisztítás után nyert nagyobb mennyiségű dCK-t analizálták egy jóval érzékenyebb nanoelektronspray ionizációs tandem tömegspektrometriás (nano ESI-MS/MS) módszerrel. Négy foszforilációs helyet azonosítottak, ezek között a legnagyobb mértékben (44%) foszforilált Ser74-nek az aktiváció folyamatában játszott kiemelkedő szerepét irányított mutagenezissel is alátámasztották. A

brüsszeli csoport munkája döntő bizonyítékot szolgáltatott a dCK foszforilációját illetően. Azonban a foszforilációért felelős protein-kináz és az idevezető jelátviteli mechanizmusok még távolról sincsenek feltérképezve. További vizsgálatokat tehát ez irányban érdemes folytatni.

X. Korábban azt találtuk, hogy tonzilla-limfocitákban az UV-fénnyel történő dCK-aktiválódás kalciumfüggő és pifithrin-érzékeny, mivel egyaránt gátolható BAPTA-AM kalcium-kelátorral és a pifithrin-alfával (PFT-alfa), a p53 inhibitorával (6). További kísérleteinkben megvizsgáltuk az UV-sugárzás és az említett vegyületek hatását az IMR-32 neuroblastoma, az Y-79 retinoblastoma és a HELA epitheliális karcinóma sejtvonalakra. Az UV-sugárzás mind a három sejtvonalban a dCK aktiválódását eredményezte, miközben a BAPTA-AM és a PFT-alfa eltérő hatást mutattak. A PFT-alfa egyik sejtvonalban sem volt képes felfüggeszteni a dCK aktiválódását, a BAPTA-AM viszont csak az IMR-32-ben bizonyult ebből a szempontból hatástalannak (7). Eredményeink valószínűleg a különböző sejtekben jelentősen eltérő szignáltranszdukciós utakra vezethetők vissza.

XI . Arra a kérdésre is választ kerestünk, hogy a dCK megemelkedett akivitása, illetve a dCK overexpressziója milyen hatással bír a sejtek nukleozid-metabolizmusára.
A fent említett kezelések során a dCK aktiválódásával párhuzamosan a dATP és dCTP-poolok is változnak tonzilla-limfocitákban. Kísérleti eredményeink azt mutatják, hogy a dCK aktiválódását a citotoxikus dATP-pool 150-170%-os növekedése és a pirimidin-poolok 30-50%-os csökkenése kíséri (1, 4). Feltételezésünk szerint a proapoptotikus dATP keletkezésében a dCK aktiválódásának szerepe lehet.
A dCK overexpressziójának hatását vizsgáltuk a Dr. Lumniczky Katalinnal kooperációban végzett kísérletekben. Dr. Lumniczky munkacsoportjának Dr. Sáfrány Géza laboratóriumában (Országos Frédéric Joliot-Curie Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Kutatóintézet, Molekuláris és Tumor Radiobiologiai Osztály) egy adenovirális vektor segítségével sikerült a humán dCK génjét transzfektálni az egér Gl261, a patkány C6 és a humán U373 glioma sejtvonalakba, illetve intracranialis tumorokat hoztak létre C57BL/6 egerekben és Wistar patkányokban. A dezoxicitidin-kináz overexpresszálása lényegesen növelte a gamma-besugárzás és/vagy gemcitabinnal történő kezelés citotoxikus és radioszenzitizáló hatását mind az előállított sejtvonalak, mind pedig a tumor esetében. Azonban a hatás mértékében mind a sejvonalak, mind a tumorok között nagy eltérések mutatkoztak (8). Mérsékelt hatás volt megfigyelhető a Gl261 sejtvonalban, miközben a dCK overexpresszálása a C6 és U373 sejtvonalakban lényegesen kifejezettebb radioszenzitizáló hatást eredményezett. Ennek egyik oka lehet a különböző sejtvonalak dNTP-pooljainak, különösen a dATP-pool eltérő méretei, illetve eltérések a dCK-transzdukció effektivitásban. A dATP, dGTP és a pirimidin-nukleotid-poolok mennyiségét, illetve a kezelések hatására bekövetkezett változását az előző kísérletekben is használt DNS-polimeráz-reakcióval, szintetikus oligonukleotid-templáttal (Sherman és Fyfe) határoztuk meg. Mint a poolok méreteiben, mint a poolok arányaiban többszörös különbségek mutatkoztak a sejtvonalak között (9). A dNTP-pool mennyisége a Gl261 sejtvonalban volt a legkisebb, és egyik kezelés sem váltott ki lényeges poolnövekedest. Ez a sejtvonal azonban érzékeny volt a dCK overexpresszálására, így csak szuboptimális transzdukciós rátát lehetett alkalmazni (20 MOI), ami relatíve alacsony (4 nmol/óra/mg protein) dCK-aktivitást eredményezett. Nagyobb dNTP-poolokkal, bár relatíve alacsony bazális dCK-aktivitással rendelkezett az U373 humán glioma-sejtvonal, azonban a dCK-val overexpresszált U373-sejtekben gemcitabinkezelés hatására a dATP-pool közel négyszeresére, a dCTP-pool több mint kétszeresére nőtt, illetve a dCK aktivitásában közel 15-szörös növekedés mutatkozott. Eredményeink szerint a legnagyobb dNTP-poollal a C6 patkány glioma sejtek rendelkeznek. Bár a bazális dCK-aktivitás ebben a sejtvonalban volt a

legkisebb, a dCK túltermelése ezt több mint 40-szeresére növelte. Ezzel párhuzamosan drasztikusan, 7-8-szorosára nőttek (a dGTP kivételével) a dNTP-poolok is (az eredmények kéziratban).

Az osztódó sejtekben a dezoxinukleotidok utánpótlását főleg a *de novo* szintézis biztosítja, a dezoxicitidin-kináz pedig a gemcitabin aktiválásának sebesség-meghatározó lépését katalizálja. Így a természetes dNTP-poolok nagysága a *de novo* reakcióutak regulációjától függ, miközben a citotoxikus dFdCDP és dFdCTP nukleozid-analógok mennyisége a sejtek dCK-aktivitásának függvénye. Így a dCK aktivitásában és a dNTP-poolok méreteiben megfigyelt különbségek eltérő dFdCTP/dCTP arányt eredményeznek, ami feltételezésünk szerint oki szerepet játszik a gemcitabin radioszenzitizáló hatásában tapasztalt, sejttípustól függő eltérésekben.