

Ötvös László

A génrendszer őrzőangyala

A p53 tumor szuppresszor szerkezet hatás összefüggéseinek tanulmányozása a Wistar intézetben

A p53 jelű fehérjét sokan úgy tekintik, mint a génrendszer őrző-védő angyalát. A p53 népszerűségét jelzi, hogy a Science magazin 1993-ban az Év Molekulájának választotta. A szintén p53-nak nevezett gén egy sejtmagban található foszfoproteint kódol, amely fehérje irányítja a sejtek választát a DNS megsérülése esetén. Amikor a p53 által szabályozott ellenőrző mechanizmus működik, a DNS megsérülése a sejt szaporodási ciklusának megállását, vagy a programozott sejthalált (apoptózis) eredményezi. Az emberi rákos megbetegedések több mint felében ez a p53 által szabályozott ellenőrző mechanizmus inaktíválva van, aminek valószínűleg a p53 fehérjén ilyen esetekben található pontmutációk az okozói.

Napjainkban a p53-mal foglalkozni fölöttébb divatos dolog. A Current Contents heti cikkszemléi 50–60 p53-mal foglalkozó közleményt listáznak és p53 fedőnéven mintha grantot is könnyebb lenne szerezni, mint egyéb molekulával. Mostanra már az elmondottakból nyilvánvalóvá válhatott, hogy a Wistar intézet*, mint az amerikai rákkutatás egyik fellegvára, megkülönböztetett érdeklődést mutat a p53-mal kapcsolatos genetikai, biokémiai, immunológiai és szerkezeti kémiai kutatások iránt. A futball világbajnokság után talán megbocsátható a hasonlat, hogy a p53 csapatban az intézet szinte minden laboratóriuma helyet kap ilyen vagy olyan módon. A három középpályás, akiknek a p53 a fő kutatási területe, és a többieket is bele akarják vonni a játékba, Hildegund Ertl, Thanos Halazonetis és jómagam. A következőkben a hármunk e témába vágó munkáját foglalom össze. Mint ki fog derülni, mindhárman ugyanannak a kérdéskörnek különböző ágazatait vizsgáljuk, gyakran szorosan együttműködve.

* A Wistar intézetről és finanszírozásának módzatairól a szerző a Magyar Tudomány 1998/12-es számában adott tájékoztatást.

Molekuláris mechanizmus

A p53 mutációjával összefüggő daganatos megbetegedésekben a sejtek nem halnak el, ha DNS-t károsító anyagokat juttatunk be a szervezetbe, és ily módon a hagyományos besugárzásos vagy kemoterápiás szerek a betegség kezelésére alkalmatlannak bizonyulnak. Halazonetis kutatásainak középpontjában az a kérdés áll, hogy mi az a molekuláris mechanizmus, amelyen keresztül a sikeres rákterápiában használatos DNS károsító szerek aktiválják a nem mutálódott „wild—type” p53-at. Halazonetis arra is választ keres, hogy a p53 hogyan fejt ki egy, a DNS szint szabályozásától független funkcióját, ami a transzkripció folyamatában játszik szerepet.

A DNS megsérülése megemeli a p53 szintet a sejtekben, ezzel aktiválva a fehérjét. A megemelkedett p53 szint pedig jelentősen megnöveli a p53 DNS-hez való kötődési affinitását. Halazonetis azokat a tényezőket szeretné azonosítani, amelyek a p53 szintjének emelkedését okozzák. A p53 meghatározott DNS szekvenciákhoz kötődik, a molekula specifikus DNS-kötő középső régióján keresztül. Ugyanakkor a p53 C-terminális, erősen bázikus szakasza is köt DNS-t, ez a kapcsolat azonban a DNS szekvenciájától gyakorlatilag teljesen független. Halazonetis feltételezte, hogy a DNS megsérülése úgy növeli meg a p53-nak a DNS-hez való affinitását, hogy tulajdonképpen nem a specifikus DNS-kötő központi fragmensre hat, hanem a C-terminális, a DNS szekvenciájától független fehérjedarabon idéz elő változásokat. Ilyen változás lehet például a p53 foszforilezettségi állapotának a módosítása. Valóban, ha egyedi aminosav mutációk befolyásolják a p53 funkcióit, a változások a foszforilezettségi szintben valószínűleg ugyanolyan méretű, vagy méginkább észlelhető funkcióbeli módosulásokkal járhatnak. A fehérjén legalább 16 potenciális foszfát akceptor szerin és treonin található. Ugyan minden fehérjerégió képviselteti magát, a dologban az az izgalmas, hogy a potenciális foszforilezési helyek nincsenek egyenletesen elosztva, hanem a foszfát akceptor aminosavak száma jelentősen megemelkedett az N-terminális és a C-terminális fehérjeszakaszokon. Éppen ezek a fehérjeszakaszok azok, amelyek szerepet játszanak a p53-at érintő biológiai folyamatokban. A már említett C-terminális DNS-kötő fragmens mellett az N-terminális fehérjerész a felelős a p53-nak a transzkripcióban játszott szerepéért, valószínűleg a TATA-kötő fehérjével történő kölcsönhatásán keresztül. Visszatérve Halazonetis munkájához, azt találták, hogy amíg a nem besugárzott sejtekben mind a Ser376 és a Ser378 egyaránt foszforilezve van, addig ionizáló besugárzás hatására a Ser376-ról a foszfát csoport eltávozik. Ez a defoszforilezett p53 variáns kölcsönhat a 14-3-3 jelű fehérjecsoporttal, amely a jelátvitelben játszik szerepet foszfoszerin tartalmú fehérjékhez való kötődésén keresztül. A p53-14-3-3 kölcsönhatás megnöveli a p53-nek a DNS-hez való szekvencia-specifikus kötődését. Ily módon meg lehet magyarázni, hogy az ionizáló besugárzás hogyan aktiválja a p53-at.

A p53 fehérje magnövekedett élettartama szintén befolyásolja azt a folyamatot, amelyen keresztül a DNS károsodása megemeli a p53 szintet. Amikor a DNS épségben van, a p53 gyorsan degradálódik, mert ilyenkor a p53 N-terminális szakasza kötődik az Mdm2 nevű sejtmagban található fehérjéhez. Az Mdm2-vel való kapcsolat a p53 bomlásához vezet. A DNS károsodása esetén

azonban a p53 leválik az Mdm2-ről, és ez a folyamat megemeli a p53 élettartamát. Halazonetis és munkatársai azt találták, hogy a DNS károsodása a p53 N-terminálisán egy foszforileződési folyamatot indít el, ami leválasztja a p53-at az Mdm2-ről. A foszforilezendő szerin kicserélése egy nem foszforilezhető aminosavra megakadályozza a p53 szint emelkedését a DNS károsodását követően. Mindez azt bizonyítja, hogy a p53 N-terminálisának foszforileződése egy fiziológiailag is számottevő folyamat lehet.

Immunterápiás lehetőségek

Ertl a p53 fehérjével kapcsolatos alapvető immunológiai folyamatokat és immunterápiás lehetőségeket vizsgálja. A vakcinia vírus DNS-ébe épített normális vagy mutáns p53 DNS szekvenciák segítségével a fehérje különböző variánsai állíthatók elő a természetesnél sokkal nagyobb mennyiségben. Ertl rákos egérsejteket tanulmányozott és azt találta, hogy azok az átlagosnál jóval több p53-at termelnek. Így automatikusan született az ötlet, hogy esetleg a p53-at gyártó vakciniavírus rekombinánsal immunizálva lehetséges olyan immunválaszt nyerni, amely megvéd a rákos tünetek kialakulásával szemben. Valóban, amikor egereket oltottak be a p53-vakciniavírus rekombinánsal és az egereket meg akarták fertőzni olyan rákos sejtvonalakkal, amelyek fokozott mennyiségben termeltek p53-t, az egerek 30–50 százalékos védettségi szintet mutattak a fertőzéssel szemben. Még ha az egerek egy része meg is betegedett, a beteg állatokban a tumor kifejlődése lényegesen lelassult. Egy glioma sejtvonallal szembeni védekezésben mind a citotoxikus, mind a segítő T-sejtek szerepet játszottak, csakúgy, mint a természetes ölü (NK) sejtek. Érdekes módon, a Th2 típusú segítő T-sejtekre jellemző citokinek jelenléte fontosabbnak tűnt, mint a Th1 típusúaké. Azok az egerek, amelyek ellenálltak kis mennyiségben alkalmazott rákos sejtekkel való megfertőzési kísérletnek, olyan védettségi szintet értek el, hogy később teljesen ellenállóak lettek nagymennyiségű sejttel való fertőzés ellen is. Mivel a p53 egy olyan fehérje, amely mindenkiiben megtalálható, Ertl megvizsgálta, hogy a p53-mal immunizált egerekben fejlődik-e autoimmunitás. Ilyen jellegű negatív reakciót viszont nem talált. Az egerek máj-, vese-, és csontvelőműködése teljesen normálisnak tűnt. A Wistar intézetben felismert citokin, az interleukin 12 adagolása tovább növelte az immunizálás hatékonyságát olyannyira, hogy egy olyan összetett terápia, amelyben mind a p53-mal való immunizálás, mind az interleukin 12 bejuttatása helyet kapott, sikeresen csökkentette a már kialakult tumoros elváltozások mértékét. Ezek a kutatások azért rendkívül érdekesek elméletileg, mert azt mutatják, hogy egy mindenkiiben előforduló fehérje az immunológiai védelem alapjául szolgálhat olyan esetekben, amikor ez a fehérje rákos megbetegedésekben hatványozottan termelődik. Ennek valószínűleg az a magyarázata, hogy az indukált immuneffektor folyamatok szelektíven felismerik a p53-at túltermelő tumoros sejteket, és nem érintik azokat a normális sejteket, amelyekben csak kismennyiségű, a sejtmagban koncentrált p53 fordul elő.

Egy másik immunterápiás lehetőség a rákos megbetegedésekben előforduló p53 mutációs pontok ellen irányulhat. Ertl azt is vizsgálja, hogy vajon a rákkal fertőzött egerekben termelődnek-e T-sejtek az aminosav mutációs helyek ellen. Ha ilyen immunodomináns mutációt találunk, ez alapjául szolgálhatna egy

T-sejt bázisú vakcina kifejlesztésének. Ezekben a kutatásokban én is részt veszek a teszt peptidek szintézisével. Hét olyan peptidet állítottunk elő, amelyek vagy domináns, vagy szubdomináns mutációs epitópok lehetnek. A peptidek tesztelése ennek a cikknek a megírásakor folyamatban van.

Új módszerek szintetikus peptidek felhasználásával

Ertilel való együttműködésem és a szintetikus peptidek el is vezetnek a saját p53-mal kapcsolatos kutatásaimhoz. Mint azt már korábban említettem, azt tudjuk, hogy a p53 egy többszörösen foszforilezett fehérje, de hogy valójában a feltételezett egyenkénti foszforileződési helyeken található-e foszfát csoport, és hogy egészséges és rákos sejtekben a foszforilezések helye és mértéke azonos-e, arról egyelőre fogalmunk sincsen. Más kutatócsoportok ezt a problémát úgy vizsgálják, hogy a p53-at termelő rekombináns sejtvonalakban a foszfát akceptor szerinekét és treoninokat nem foszforilezhető aminosavakra (pl. alaninra) cserélik, vagy a feltételezett foszfoaminosavakat glutaminsavval helyettesítik, és a fehérje különböző biológiai funkcióit vizsgálják. Egy alternatív stratégia szerint radióaktív foszfort építenek be a p53 molekulába, és tripszines emésztés után a foszfopeptideket analizálják kétdimenziós gélelektroforézissel. Ezek a módszerek azonban sok bizonytalan tényezőt hordoznak magukban.

Nemrégiben az SV3T3 jelű fibroblaszt sejtekben termelt egér p53 fehérje emésztése után 6, az azt megelőzően még nem ismert foszfopeptidet mutattak ki. Amikor azonban a fehérje N-terminális 154 aminosavas szegmensét vizsgálták a potenciális triptikus fragmensek közül egy sem felelt meg a 6 új foszfopeptid elektroforetikus mozgékonyosságának. Ezek után valószínű, hogy a foszfopeptidek a központilag helyet foglaló szekvencia-specifikus DNS-kötő szegmensből származnak. Igen ám, de a központilag elhelyezkedő szerinek és treoninok in vivo csak részlegesen, sok esetben csak nagyon alacsony mértékben vannak foszforilezve, és a jelzett foszfopeptidek azonosítása igen bonyolult feladat lehet. Másodsorban, ha ezek a foszfopeptidek valóban a központi DNS-kötő szegmensből származnak, azonosításuk egyes szerinek vagy treoninok mutációja után szinte lehetetlen, mivel ilyen jellegű mutációk az egész fehérjét érintő konformációs változásokat idézhetnek elő. Például annak a patkány p53-ból származó szerinnek, amelyik a humán p53-ban a Ser315-nek felel meg, alaninra való helyettesítése után egy négy aminosavval hátrébb található, különben foszforilezhető szerin foszforilezhetetlenné válik (ennek a szerinnek a sorszáma humán pozícióra nem fordítható le, ugyanis ez a humán szekvenciából hiányzik). Még ha egy specifikus szerin foszforileződése elő is segíti valamely p53 funkció elvégzését, ugyanazon szerin mutációja egyáltalán nem biztos, hogy az adott funkció megsemmisülését vonja maga után. Az elmondottak tisztán érzékeltetik, hogy új módszerekre van szükség a p53 egyes aminosavai foszforilezettségi szintjének megállapítására, és a foszforileződés egyes biológiai konzekvenciáinak tanulmányozására.

Mi ezeket az új módszereket a szintetikus foszfopeptidek felhasználásával igyekszünk kifejleszteni. A foszforilezési helyek azonosítására foszfát specifikus monoklonális ellenanyagokat kiválóan lehetne alkalmazni, de ilyen reagensek egyelőre nincsenek forgalomban. Mintegy első próbálkozásként, előállítottuk a humán p53 C-terminális 23 aminosavas fragmensét, amelyben mind a Ser378,

a protein kináz C (PKC) szubsztrát aminosav, mind a Ser392, a kazein kináz II (CKII) szubsztrát aminosav foszforilezve volt. A foszfopeptid szintézisét folytattuk egy a molekulát megtörő tripeptid fragmenssel, és a 31 D jelű, 15 aminosavból álló segítő T-sejt epitóppal. A teljes 41 aminosavas kétszeresen foszforilezett peptid tisztítása, és tömegspektrometriás jellemzése után egereket immunizáltunk vele. A lépsejteknek mielomasejtekkel való fúziója után nagyszámú monoklonális ellenanyagot kaptunk. Az ellenanyagok foszfát specifitását és érzékenységét alaposan megvizsgálva a p53—18 jelűt választottuk ki további feldolgozásra.

Enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálat (ELISA) alapján a p53—18 csak azt a p53 fehérje variánst ismerte fel, amelyet bakulovirussal fertőzött rovarsejtekben termeltünk, de azt nem, amelyet baktériumokban állítottunk elő. A bakulovirussal fertőzött rovarsejtekben termelt p53-at a p53—18 ellenanyaggal készült immunaffinitási oszlopon homogénre lehetett tisztítani. A tisztított fehérjét tripszines emésztésnek vetettük alá, a kapott fragmenseket folyadék kromatográfiával szétválasztottuk, és tömegspektrometriával analizáltuk. Bebizonyítottuk, hogy a tisztított fehérjében mind a PKC, mind a CKII szubsztrát szerin valóban foszforilezve volt. Ezzel ellentétben a baktériumokban termelt p53 foszforilezettségi szintje jóval alacsonyabb, mivel ezekből a rendszerekből az eukariotikus kinázok általában hiányoznak. A p53—18 jelű ellenanyag foszfát specifitását mutatja, hogy nem kötődik a kevésbé foszforilezett baktériumban termelt fehérje variánshoz. A szintetikus peptideket tanulmányozva, az ellenanyag foszfát specifitása még inkább meggyőző képet nyújt. A p53—18 csak a kétszeresen foszforilezett 23 aminosavas peptidet ismerte fel, de egyáltalán nem ismerte fel a nem foszforilezett vagy a csak egyszeresen foszforilezett peptideket. Érdekes módon, a nem foszforilezett peptid is felismerhetővé vált, amikor az antigént trifluoretanolban oldottuk fel, és így szárítottuk rá az ELISA lemezre. Mint azt egy független konformációs analízis alapján tudjuk, a trifluoretanol egy hélikális szerkezetet indukál a p53 C-terminálisán. A peptid szerkezetének hélikális kerék formátumú ábrázolásakor a két foszforilezendő szerin, a Ser378 és a Ser392 igen közel kerülnek egymáshoz, és valószínűleg az ellenanyag ezt a szerkezetet ismeri fel. Ezt a hipotézist támasztja alá az a tény, hogy a 14 aminosavnyi távolság, ami a két foszfoserin között van, általában túlságosan nagy ahhoz, hogy lineáris antigének esetén az ellenanyagok számára egyidejűleg felismerhető legyen (az epitópok hossza a legtöbb esetben 6—12 aminosav közé esik). Valószínű, hogy a konformációs egyensúlyhoz a foszfopeptid (és az egész fehérje foszforilezett C-terminális szakasza) hozzájárul hélikális konformerekkel is.

A p53—18 jelű ellenanyag, amely hamarosan kereskedelmi forgalomban is hozzáférhetővé válik, ez idő szerint az egyetlen foszfát specifikus p53 ellenes monoklonális ellenanyag, és úgy tűnik, hogy egy párját ritkítóan hasznos reagens kismennyiségű p53 fehérje kimutatására, és a fehérje C-terminális foszforilezettségi szintjének jellemzésére.

A p53 fehérje foszforilezett C-terminálisának immunodomináns voltát bizonyítja az a tény is, hogy rákos betegek vérsavója a kétszeresen foszforilezett peptidet lényegesen jobban ismerte fel, mint a nem foszforilezett vagy az egyszeresen foszforilezett peptideket. A p53 tumoros megbetegedésekben megemelkedett szintje anti-p53 ellenanyagok termelését indítja el, de úgy tűnik,

hogy a fehérje foszforilezett változata immunogénebb, mint a nem foszforilezett variáns. Egy esetleges alternatív lehetőség az, hogy a tumoros megbetegedésekben a foszforizettségi szint megemelkedik, és ez magyarázza meg a vérsavó foszfát specificitását. Ez utóbbi feltételezés azonban nem valószínű DNS-kötődési vizsgálataink alapján. Mint azt már említettem, a C-terminálissal kapcsolatos nonspecifikus DNS-kötődés mintegy negatív szabályozóként működik a fehérje középponti szakaszával összefüggésbe hozható szekvencia-specifikus DNS-kötődéssel szemben.

Mi azt is vizsgáltuk, hogy a PKC és a CKII szubsztrát szerinek foszforileződése hogyan befolyásolja a nem-specifikus DNS-kötődést. Ehhez 33 aminosavból álló peptideket állítottunk elő nem foszforilezve, egyszeresen foszforilezve, és kétszeresen foszforilezve. Pozitív kontrollként a teljes p53 fehérjét használtuk. A kötődés szintjének mérésére egy viszonylag új eljárást, a fluoreszcenciás polarimetriát alkalmaztuk. Ennek az az alapja, hogy ha valamilyen anyag kötődik egy oldatban található, fluorogént tartalmazó másik anyaghoz, a fluoreszcenciát hordozó anyag forgási sebessége lelassul, és a mért anizotrópia arányos a kötődés erősségével. Két oligonukleotidot szintetizáltunk, melyeknek a végére fluoreszcenciát kapcsoltunk. Mind a p53 fehérje, mind a szintetikus peptidek kötődtek mindkét jelzett oligonukleotidhoz. A peptid foszforilezése akár a Ser378-on, akár a Ser392-n számottevően gyengítette a DNS-kötődést. A kétszeres foszforilezés a kötődéshez szükséges peptid koncentráció ötszörös megnövelését tette szükségessé. Ez azt feltételezi, hogy a negatív szabályozás kevésbé számottevő, ha a fehérje C-terminálisa többszörösen foszforilezve van. Ez a következtetés összhangban van egy korábbi észrevétellel is. Ha foszforilezéssel eltávolítjuk a 421 jelű poliklonális ellenanyag (amelyik a Ser378 környékén ismeri fel a nem foszforilezett fehérjét) epitópját, akkor a p53 leállítja a sejtnövekedést, szintén azt sugallva, hogy normális állapotban a fehérje C-terminálisa erősen foszforilezett állapotban kell legyen.

Cirkuláris dikroizmus és mágneses magrezonancia spektroszkópiás vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a Ser378 foszforilezése jelentős konformációs változásokat eredményez mind a foszfoaminosav közvetlen környezetében, mind egy hosszú távú hatás révén a CKII szubsztrát hely körül is. Ennek azért van jelentősége, mert a C-terminális bázikus fragmens igen közel fekszik a tetramerizálódási folyamatban részt vevő fehérje fragmenshez, és a másodlagos szerkezet változása, különösen, hogyha az hosszabb távra is elhat, szerepet játszhat a biológiailag aktív tetramer szerkezet kialakulásában. Maga a tetramerizálódó fragmens is tartalmaz egy foszforilezhető szerint (Ser315). Következő célunk a Ser315 foszfát csoport hatásának vizsgálata a tetramerizálódó fehérjeszakasz konformációjára. Ugyancsak vizsgálni fogjuk, hogy az N-terminális szerinek foszforileződése hogyan befolyásolja a TATA-kötő fehérjével való kapcsolatot. Ennek céljából olyan komplex 42 aminosavas peptideket kell készítenünk, amelyek 2-szeresen, 3-szorosan, vagy még inkább 5-szörösen vannak foszforilezve (az N-terminális foszforilező kinázok szubsztrát aminosavain), plusz egy további fluoreszcenciát hordoznak. Ennek a kivételes szintetikus feladatnak a napokban vágunk neki.