

A dezoxicitidin-kináz speciális szerepe a kemoterápiás nukleozidanalógok aktiválásában és a sejtosztódás gátlásában

Staub Mária

Semmelweis Egyetem, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet, Budapest

A dezoxicitidin-kináz (dCK) központi szerepet tölt be a sejtek DNS-prekurzor-ellátásában, mivel foszforilálni képes a dC mellett a dA és dG nukleozidokat is. Emlős sejtekben a fő dTTP-forrás szintén a dC, a dCMP-dezamináz úton keresztül. A dCK széles szubsztrátspecificitásának köszönhetően foszforilálni képes egy sor dezoxinukleozid-analógot, aktivitása határozza meg az egyik legfontosabb kemoterápiás gyógyszercsoport iránti érzékenységet. A limfoid szövetekben, differenciálatlan sejtekben és tumorokban a legmagasabb a dCK aktivitása, amely a sejtciklussal nem változik. Meglepő módon viszont nő az enzim aktivitása, ha különböző sejteket, különböző DNS-szintézist gátló, DNS-t károsító genotoxikus anyagokkal, gamma-besugárással kezelünk. A megnövekedett dCK-aktivitás fokozhatja a kemoterápia iránti érzékenységet, a molekuláris mechanizmus felderítése mellett közvetlen gyakorlati alkalmazásra is van remény a jelenség felismerésével. Munkánk során az enzimaktiválódás mechanizmusát vizsgáltuk, kiderült, hogy nem emelkedett sem a dCK fehérje, sem a dCK mRNS mennyisége, a DNS-károsodás látszott a közös, fő kiváltó oknak, ami a dCK aktiválásáért felelős. A DNS-károsodás után fokozódik a sejtekben a DNS-repair, amihez a dNTP-poolokat első lépésben a dCK biztosítja. Elégtelen repair esetében a megnövekedett dATP-szint a sejteket az apoptózis irányába viszi. Az aktiválás folyamata függ a sejt kalciumkoncentrációjától, fehérjefoszforilációra utaló jelek is vannak, melyek jeltovábbító mechanizmusokra utalnak. Az „aktivált dCK” biztosan más konformációs állapotban van a sejtekben, mint a genotoxikus kezelés előtti enzim volt, csak natív körülmények között köti az anti-dCK ellenanyagot, denaturáló körülmények között nem (8-11, 22, 26, 32-34, 35, 36). *Magyar Onkológia 48:229-234, 2004*

Deoxycytidine kinase (dCK) plays a central role in the deoxynucleoside salvage processes, phosphorylating dC, dA, and dG to their monophosphates. In mammalian cells, the major source of dTTP comes also from dC via dCMP deaminase. Moreover, based on its broad substrate specificity, this enzyme is responsible for the activation of several nucleoside analogues of therapeutical importance, influencing the sensitivity of malignant tissues towards chemotherapy. The expression of dCK is highest in different lymphoid cells/tissues, in embryonic cells and in most malignant cells (2, 7, 13-15, 18). The activity of dCK is not cell cycle-regulated. In contrast to this, dCK activity was found to be elevated several fold upon short-term treatments of normal human lymphocytes with therapeutic nucleoside analogues, and other genotoxic agents as well as by DNA damaging agents including the DNA polymerase inhibitor aphidicolin, the topoisomerase II inhibitor etoposide and γ -irradiation, which might be a potentially important phenomenon with respect to the clinical practice, too. These findings indicated that the main trigger of activation could be the damaged DNA itself, and the biological relevance might be to supply the dNTPs for the enhanced DNA repair. Activation of dCK was paralleled by elevated levels of intracellular dATP, raising the possibility that dCK activation is linked to the induction of apoptosis. With regard to the mechanism of enzyme activation, no changes were found in the protein and mRNA levels of dCK upon stimulation, while the activation process was calcium dependent and comprised a protein phosphorylation step. A positive correlation was found between the enzymatic activity and the native immunoreactivity of dCK, strongly arguing that dCK undergoes a conformational change during activation, which results in the formation of a catalytically more active steric structure (8-11, 22, 26, 32-34, 35, 36). *Staub M. The special function of deoxycytidine kinase (dCK) in the activation of chemotherapeutic nucleoside analogs and in inhibition of cell proliferation. Hungarian Oncology 48:229-234, 2004*

Közlésre érkezett: 2004. augusztus 2.

Elfogadva: 2004. augusztus 13.

Levelezési cím: Dr. Staub Mária, SE Orvosi Vegytani Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet, 1088 Budapest, Puskin u. 9. Telefon/Fax: 1-266-2755/4003, e-mail: Staub@puskin.sote.hu

A szerző a közleményt Dr. Jeney András egyetemi tanár 70. születésnapjára ajánlja.

Bevezetés

A rák- és vírusterápia legrégebben alkalmazott gyógyszerei kismolekulák, a DNS-replikáció gátlószerei, a legjelentősebb csoport a nukleozid-származékok vagy antimetabolitok. Napjainkban a monoklonális antitestek térhódításának lehetünk tanúi a humán terápiában, így a rákterápiában is. A monoklonális ellenanyagok felfedezése, az előállítási módszerek korszerűsítése tette lehetővé a molekuláris biológia térhódítását a biológiai tudományokban az elmúlt évtizedekben. Kiderült, hogy a makromolekulák, fehérjék nem csak kis molekulák átalakítását katalizálják, hanem egymáshoz kapcsolódva jelpályákat működtetnek, másodlagos kémiai módosításokon esnek át, új szabályozási lehetőségekre derült fény. Az utóbbi években kiderült, hogy a genetikai információ számos változáson esik át az átírás után, ebben a folyamatban a kismolekulák jelentősége újra növekedni látszik (epigenetika, iRNS stb.). A specifikusan ható kismolekulák jelentősége feltehetően újra emelkedni fog a jövőben, ezek befolyásolják a gének kifejeződését, a géntermékeket, szabályozzák a makromolekulák működését, kölcsönhatását. A kismolekulák jelentőségét támasztja alá az is, hogy a kemoterápiás és antivirális nukleozidszármazékok forgalma emelkedő tendenciát mutat a világkereskedelemben. A nukleozidanalóg gyógyszerek forgalma 30 milliárd USD volt 1998-ban, számítások szerint ez 50 milliárd USD-re emelkedik 2005-re a világon (2).

A sejtek fő nukleotidforrása az ún. de novo bioszintézis, amelyben a szénhidrát- és aminosav-

anyagcsere közttermékeiből, bonyolult és energiaigényes úton keletkeznek a ribonukleotidok, majd a ribonukleotid-reduktáz (RR) enzim segítségével a négy dezoxiribonukleotid, dNTP. A nukleotidok szintéziséhez szükséges enzimek minden osztódó, DNS-t szintetizáló S fázisú sejtben megtalálhatók. A legtöbb sejt/szövet azonban rendelkezik egy tartalék enzimmal is, amelyben a nukleinsavak lebontásából és a táplálékból származó kész nukleozidokat tudja újra hasznosítani, ez a nukleozid salvage. A salvage legfontosabb enzimeit a dezoxinukleozid-kinázok (dNK), amelyek segítségével a dezoxinukleozidokból monofoszfátok keletkeznek, egy nukleozid-trifoszfát, általában ATP felhasználásával.

A humán dezoxiribonukleozid-kinázok jellemzése és farmakológiai jelentősége

A daganat- és vírusterápiában alkalmazott gyógyszerek egyik legjelentősebb csoportját a nukleobázis- illetve nukleozidanalógok alkotják. Azok a molekulák hatékonyak a sejtosztódás gátlásában, amelyek nukleotiddá, foszforilált származékokká alakulnak a sejtekben. Ennek az átalakításnak legfontosabb enzimeit a dezoxinukleozid-kinázok. A timidinkináz-izoenzimek (TK1, TK2) különleges helyet foglalnak el a herpesvírusok gátlásában, a virális TK hatékonyan foszforilálja az Aciklovirt, a nukleotid gátolja a vírus-replikációt. A citoplazmatikus TK1 az S fázisú sejtekben fontos szerepet játszik a dNTP-pool biztosításában, míg a TK2 izoenzim a mitokondriális DNS-szintézishez szükséges. A mitokondriumokban helyezkedik el a dezoxiguanozin-kináz (dGK), amelyik szintén a mitokondriális dNTP-pool biztosításához szükséges, működésének kiesése mitokondriális betegségek okozója lehet. Az antimetabolitok aktiválása szempontjából a legjelentősebb a dezoxicitidin-kináz (dCK), ami abból adódik, hogy ennek az enzimnek a legszélesebb a szubsztrátspecifitása. A dezoxicitidinen (dC) kívül szubsztrátja még a dezoxiadenozin (dA) és dezoxiguanozin (dG) is. Ezeknek a nukleozidoknak a kémiai származékai közül a leghatékonyabban aktiválja az arabinozil-citozint (araC, Cytosar), a 2-Cl-deoxiadenozint (CdA, Cladribine), 2,2'-difluorodezoxicitidint (dFdC, Gemcitabine), továbbá az L-2'3'-dideoxi-3'-thiocitidint (3TC,

1. táblázat.
A humán
dezoxinukleozid-
kinázok

	dCK	TK1	dGK	TK2
Lokalizáció	citoplazma	citoplazma	mitokondrium	mitokondrium
Kromoszóma	4q13.3-21,1	17q25.2-25,3	16q22	2q13
Expresszió	konstitutív	S-fázisban	konstitutív	konstitutív
Természetes szubsztrátok	dC, dA, dG	dT, dU	dG, dA	dT, dU, dC
Előfordulás	limfoid sejtek, egyes tumorok	osztódó sejt	mitokondrium	mitokondrium

2. táblázat. A daganatellenes nukleozidanalógok aktiválása

Generikus név	Egyéb név	Aktiváló enzim	Támadáspont	Betegség	Forgalmi érték/év (USD/98)
Cytarabine	AraC, Cytosine arabinoside, Cytosar	dCK	DNS-polimeráz	akut leukémiák, limfómák	100 M
Gemcitabine	DFdC Gemzar	dCK	DNS-polimeráz	pankreasz-, ovárium-, tüdő-, stb. tumor	60 M
Fludarabine	FAra-A, Fludara	dCK és dGK	DNS-polimeráz RR	leukémiák	50 M
Cladribine	CdA	dCK és (dGK)	DNS-polimeráz RR	leukémiák	10 M
Floxuridine	FdU	TK1	TS	Szolid tumorok, emlő-, gasztrointesztinális	—
					220 M

Lamivudine). Az első három származék kemoterápiás, az utolsó HIV-gyógyszer. A fenti származékokon kívül a dCK aktiválja a Fludarabine, Zalcitabine, Vidarabine gyógyszerek hatóanyagait is. A dCK enzim szerkezetének megismerése óta tudjuk, hogy az enzim jobban foszforilálja az S-konformációban levő dezoxiribóz gyűrűt, ezért az utóbbi időben ezen analógok előállítására került a kémiai szintézisek előterébe (3, 31). A dezoxiribonukleozid-kinázok legfontosabb tulajdonságait az 1. táblázat összegzi.

A dezoxinukleozid-kinázok határozzák meg a legtöbb esetben a sejteknek a szer iránt mutatott érzékenységét, vagy rezisztenciáját. Érthető, hogy ezeknek az enzimeknek a genetikájával, biokémiájával széles körben foglalkoztak, „génterápiával” is próbálják bevinni a megfelelő enzimeket, így fokozni a szerek iránti érzékenységet (2, 6, 7, 13–15, 18, 21, 31, 44).

A rák- és vírusterápiában jelenleg mintegy 20 nukleozidszármazék van forgalomban, a 2. táblázat tartalmazza a legfontosabb szerek generikus és szisztémás nevét, a humán dNK-t, amelyik a foszforilációért felelős. A legnagyobb forgalmi értéket a HIV elleni nukleozidszármazékok képviselik, így az azido-timidin (AZT). A táblázatból látható, hogy nukleozidanalógok foszforilálásában a dCK enzimnek kitüntetett szerepe van.

A dCK speciális szerepe a nukleozidanalógok aktiválásában

Az arabinozil-citozint (araC) a hatvanas évek óta eredményesen használják az akut mieloid és limfoid leukémiák, valamint a krónikus mieloid leukémiák kezelésére. A sejtbe jutott araC-t a dCK nagy hatékonysággal monofoszfáttá alakítja, majd az UMP-CMP-kináz és a nukleozid-difoszfát-kináz araCTP-vé foszforilálja. Az araCTP első lépésben gátolja a DNS-polimerázokat, a DNS-be beépülve láncterminálást okoz (29, 40).

A dFdC (2',2'-difluoro-2'-dezoxicitidin, gemcitabin, gemzar), a dezoxicitidin két geminális helyzetű fluoratómmal szubsztituált származéka volt az első, szolid tumorok ellen is hatékony dC-analóg. Az eredetileg antivirális szernek szánt analógot eredményesen használják vastagbél-, petefészek-, tüdő-, emlő- és hasnyálmirigy-daganatok kezelésére. Hatásmechanizmusa rendkívül összetett. A dCK által foszforilált dFdC-t a dezoxicitidilát-dezamináz dFdUMP-vé dezaminálja, s ez a metabolit a timidilát-szintáz erősen gátolja. A gemcitabin difoszfátja a ribonukleotid-reduktáz inhibitora. A dFdC-trifoszfát gátolja a DNS- és RNS-polimerázokat, ugyanakkor az araC-hez hasonlóan hosszú kezelés alatt beépülhet a DNS-be, ami láncterminációt eredményez. A szer DNS-inkorporációját elősegíti a ribonukleotid-reduktáz gátlása, ha kevesebb endogén dCTP áll rendelkezésre, nagyobb a valószínűsége annak, hogy a polimeráz a gemcitabin-trifoszfátot építi be helyette. A dFdC az RNS-be is beépülhet, de ennek jelentősége még vitatott (27).

A 2-klór-2'-dezoxiadenozint (CdA, Cladribine) 1972-ben szintetizálták, és már ebben az évben kiderült antileukémiás hatása. A CdA egyedülálló

tulajdonsága, hogy osztódó és nyugvó sejtekre egyaránt toxikus. Osztódó sejtekben legfontosabb hatása a DNS-szintézis leállítására, amit a ribonukleotid-reduktáz és a DNS-polimerázok gátlása révén ér el (5). A CdA-kezelés során a sejt metilációs reakciói sem működhetnek tökéletesen, mivel a CdATP a transzmetilációs ciklus egyik enzimét, az S-adenozil-homocisztein-hidrolázt is gátolja, aminek következtében az SAM/SAH arány jelentősen csökken (27, 42). Nyugvó sejtekben a CdATP a hibajavító DNS-polimerázok gátlása révén DNS-lánctöréseket okoz, ennek következtében a poli(ADP-ribóz)-polimeráz enzim aktiválódik, s a kiterjedt ADP-riboziláció a NAD koenzim mennyiségének kritikus csökkenéséhez vezet, ami az ATP-szintézis gátlásán keresztül a sejt pusztulását, apoptózist eredményez (2, 13, 15).

A CdA ma a hajas sejt leukémia elsőként választandó gyógyszere; a betegek több mint 95%-a kedvezően reagál erre a kezelésre. A CdA ezen kívül az akut és krónikus mieloid leukémia, a krónikus limfoid leukémia és a rosszul differenciált non-Hodgkin-limfómák kezelésében is hatékonyan bizonyult, sőt az autoimmun betegségek terépiájában is helyet kapott. Az arabinozil-fluoradenint (FaraA, fludarabin) már a klinikai gyakorlatban is használják a CLL kezelésére. A dCK a felsorolt tumorelles szerek kivételével számos olyan nukleozidanalógot is képes foszforilálni, amelyek a humán immundeficiencia- és a hepatitis-B vírusok replikációját gátolják, mint pl. a 2',3'-didezoxicitidin és az arabinozil-adenin (2, 13, 15).

A dezoxicitidin-kináz aktiválása

A DNS-replikáció, rekombináció és hibajavítás finoman szabályozott reakciói akkor működhetnek tökéletesen, ha a dezoxiribonukleotid-prekurzor folyamatossá utánpótlása biztosított. Az osztódó sejtek dNTP-igényét az S-fázis-specifikus ribonukleotid-reduktáz fedezi, nyugvó sejtekben azonban – így a limfoid szövetek és a központi idegrendszer sejtjeiben – a nukleozid-mentő reakciók kerülnek előtérbe. Mint láttuk a 2. táblázatban, a dNK-k prominens képviselője a dCK, amely széles szubsztrátspecificitásánál fogva a névadó dC-n és a két purin-dezoxinukleozidon túl a leukémiák, szolid tumorok és retrovirális fertőzések kemoterápiájában használt nukleozidanalógok széles skáláját is nagy hatékonysággal foszforilálja. A dCK-hiányos és nukleozidanalógokra rezisztens daganatok kemoterápiás érzékenysége drámai módon javítható a vad típusú dCK cDNS-ének bevitelével. Nemrégiben fejlesztették ki a dCK egy genetikailag módosított változatát, amelynek katalitikus aktivitása sokszorosán meghaladja a vad típusú enzimét, és génterápiás felhasználásához is nagy reményeket fűznek (17). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a dCK aktivitása – sok más egyéb faktor mellett – a kemoterápia hatékonyságát döntő módon meghatározza.

Az enzim aktiválásának körülményeire és molekuláris mechanizmusára irányuló kutatásoknak a klinikai gyakorlat szempontjából is je-

lentsége és létjogosultsága van, különös tekintettel arra, hogy a dCK aktivitása citosztatikumokkal és gamma-besugárással jelentősen fokozható (1. ábra) (26).

Munkacsoportunk kimutatta, hogy perifériás vér, laboratóriumi sejtvonalak és gyermek tonszila limfocita-kultúráinak rövidtávú CdA-kezelése a sejtek dC-foszforylációs kapacitásának jelentős emelkedéséhez vezet, amelynek hátterében egyértelműen a dCK aktiválódása áll (9, 32, 33). Nem fokozza a CdA-kezelés a másik három dNK, a TK1 és a mitokondriális TK2 és dGK aktivitását, továbbá az 5'-nukleotidáz és a dCMP-dezamináz aktivitását sem (8, 23, 24). Az a tény, hogy a dCMP-dezamináz aktivitása még a stimulált dCK aktivitását is több mint egy nagyságrenddel meghaladja, a dezoxicitidin-nukleotidok timin-nukleotidokká való átalakulási útvonalának nagy kapacitását támasztja alá. Ez a megfigyelés összhangban van azzal az eredményünkkel, hogy a dCK által foszforylált dC 75%-a timin-nukleotidok szintézi-

sére fordítódik (41). Az általunk vizsgált sejtek dCK-aktivitása szinte minden esetben jelentősen meghaladta a TK-izoenzimek összaktivitását (8-11, 22-26, 32-36, 38, 41), tehát a dCK a „salvage” timidilát-szintézisben legalább akkora szerepet játszik, mint a két TK-izoenzim. Ennek élettani jelentőségét az a kísérleti eredményünk is alátámasztja, hogy a timin-dezoxinukleotidok szintjének csökkenéséhez vezető dT-5'-TS-kezelés a dezoxicitidin-kináz aktivitásának jelentős növekedését eredményezi (26). Feltételezhetjük, hogy a timin-nukleotidok hiányát is a dCK aktivitásának emelkedése hivatott kompenzálni.

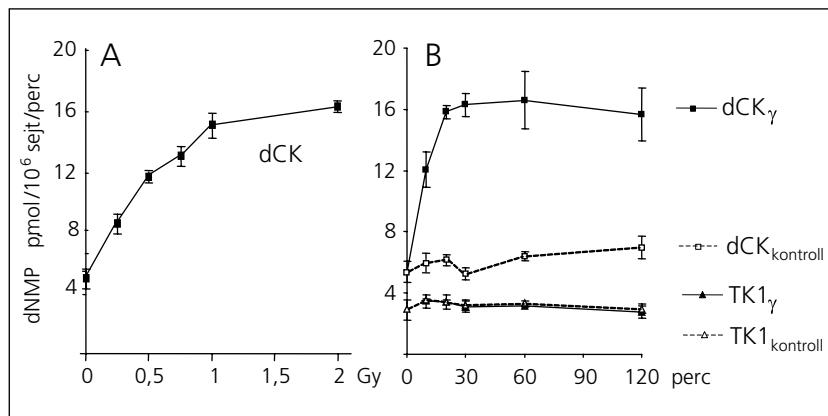
Az akut mieloid leukémiában szenvedő Down-szindrómás gyerekek sokkal jobban reagáltak az araC-kezelésre, mint a nem Down-szindrómás társaik (42). A fokozott araC-érzékenység hátterét kutatva azt találták, hogy a Down-szindrómában és egyidejűleg AML-ban szenvedő betegekből izolált mieloblasztokban a 21-es kromoszómán lokalizált gének közül a cisztationin- β -szintáz mRNS-szintje 12-szer volt magasabb, mint a leukémiás, de nem Down-kóros mieloblasztokban mérhető érték (42).

Kiderült, hogy primerlimfocita-kultúrák kétórás CdA-, illetve aphidicolin-kezelése után a sejtkivonatokban már számottevő kaszpáz-3-aktivitás mérhető, ami arra utal, hogy a sejtekben aktiválódott az apoptotikus program. Mivel ezzel párhuzamosan a dCK is aktiválódik, önként adódik a kérdés, hogy az emelkedett enzimaktivitásnak a DNS-hibajavításban feltételezett szerepén túl vajon az apoptózis szempontjából is van-e valamilyen szerepe. A dCK a citoplazmában található, a dA-t hatékonyan foszforylálja. Meghatároztuk a különböző citotoxikus szerekekkel kezelt sejtek dATP-pooljait, és a kontroll sejtekhez képest szelektív és szignifikáns emelkedést tapasztaltunk (24). A dCK azonban nemcsak a természetes dA, hanem annak analógjai foszforylációja miatt is proapoptotikus hatású, hiszen a dATP szubsztituált származékairól (CdATP, araATP, FaraATP) bebizonyosodott, hogy az apoptozóma képződése során a dATP-t kitűnően helyettesíthetik.

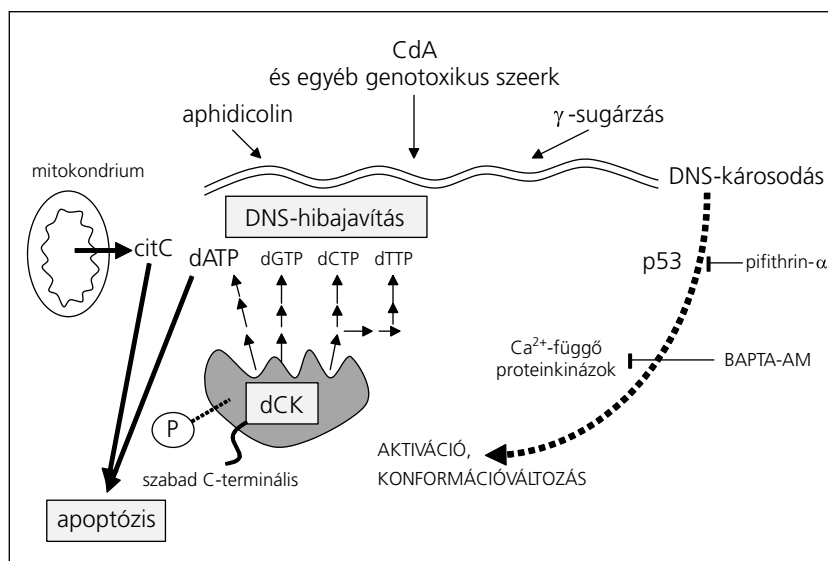
A kilencvenes években több kutatócsoport is kimutatta, hogy a p53 fehérje mutációjával vagy deléciójával párosult krónikus limfoid leukémiák nagyon rosszul reagálnak a purinnukleozid-analógokkal végzett kemoterápiára. Ennek nyomán kiderült, hogy a purinanalógok a p53 fehérjét aktiválni képesek timocitákban és CLL-sejtekben egyaránt.

Az is kiderült, hogy a p53 a citoplazmában, közvetlen fehérje-fehérje kölcsönhatások révén, a nukleotid-anyagcsere egyik kulcsenzimének működését szabályozhatja. A ribonukleotid-reduktáz p53R2 és R2 jelű alegységeihez kötődik és ezáltal a citoplazmában szekvesztrálja azt, UV-besugárzás hatására ez a kölcsönhatás megszűnik. Figyelemreméltó, hogy a dCK a ribonukleotid-reduktázhoz hasonlóan valamennyi dNTP utánpótlását biztosíthatja, UV-fény hatására aktiválódik (43), továbbá sejtmagi lokalizációs szignállal rendelkezik és túltermeltetése esetén a sejtmagba is képes belépni (20, 21). Mivel egy fehérje foszforylációja

1. ábra. Gamma-sugárzás hatása humán limfociták dCK- és TK1-aktivitására. A különböző dózissal besugarazott, illetve kontroll sejteket 37°C-on inkubáltuk, majd nyerskivonataikból dCK- és TK1-aktivitásokat mértünk. (A): dCK-aktivitás növekvő dózissal besugarzást és 50 perc inkubálást követően, (B): az utóinkubálási idő függvényében mért kinázaktivitások a kontroll ($dCK_{kontroll}$ és $TK1_{kontroll}$), valamint az 1 Gy dózissal besugarazott sejtek (dCK_{γ} és $TK1_{\gamma}$) nyerskivonataiban



2. ábra. A dCK-aktiválódás mechanizmusa



gyakran vezet a fehérje-fehérje kölcsönhatások felbomlásához és a kérdéses protein sejten belüli lokalizációjának megváltozásához, feltételezzük, hogy a dCK szabályozásában egy efféle mechanizmus is szerepet játszik (1., 2. ábra).

Kísérleti eredményeinket áttekintve leszögezhetjük, hogy a dCK egy olyan Janus-arcú enzim, amelynek aktiválódása a genom integritásának helyreállítását és a sejt aktív pusztulását egyaránt elősegítheti. Érdekes kettősség, hogy a DNS károsodásakor fellépő dCK-aktiválódás a túlélés és a programozott sejthalál szempontjából egyaránt hasznos lehet, hiszen a hibajavító folyamatok számára *bona fide* dezoxinukleotidokat szolgáltat, míg kijavíthatatlan károsodás esetén a dATP termelésével közreműködik az apoptózisban, így járulván hozzá a malignus transzformáció elkerüléséhez. A citotoxikus nukleozidanalógok, a DNS-lánctörések progresszív és öngyilkos enzimaktiválódást eredményeznek, hiszen a magasabb katalitikus aktivitású enzim egyre több és több toxikus molekulát aktiválhat, ami előbb-utóbb apoptózist eredményez, amit a 2. ábrán feltüntetett mechanizmussal képzelünk el.

Irodalom

1. Anglana M, Apiou F, Bensimon A, Debatisse M. Dynamics of DNA replication in mammalian somatic cells: nucleotide pool modulates origin choice and interorigin spacing. *Cell* 114:385-394, 2003
2. Arnér ES, Eriksson S. Mammalian deoxyribonucleoside kinases. *Pharmacol Ther* 67:155-186, 1995
3. Beausejour CM, Tremblay G, Momparler RL. Potential of ribozymes against deoxycytidine kinase to confer drug resistance to cytosine nucleoside analogs. *Biochem Biophys Res Commun* 278:569-575, 2000
4. Carson DA, Kaye J, Seegmiller JE. Lymphospecific toxicity in adenosine deaminase deficiency: possible role of nucleoside kinase(s). *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5677-5681, 1997
5. Ceruti S, Franceschi C, Barbieri D, et al. Apoptosis induced by 2-chloro-adenosine and 2-chloro-2'-deoxyadenosine in a human astrocytoma cell line: differential mechanisms and possible clinical relevance. *J Neurosci Res* 60:388-400, 2000
6. Chen EH, Johnson EE, Vetter SM, Mitchell BS. Characterization of the deoxycytidine kinase promoter in human lymphoblast cell lines. *J Clin Invest* 95:1660-1668, 1995
7. Chottiner EG, Shewach DS, Datta NS, et al. Cloning and expression of human deoxycytidine kinase cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:1531-1535, 1991
8. Csapó Z, Keszler G, Sáfrány G, et al. Activation of deoxycytidine kinase by gamma-irradiation and inactivation by hyperosmotic shock in human lymphocytes. *Biochem Pharmacol* 65:2031-2039, 2003
9. Csapó Z, Keszler G, Sasvári-Székely M, et al. Similar changes were induced by Cladribine and by Gemcitabine, in the deoxyuridine salvage, during short-term treatments. *Adv Exp Med Biol* 431:525-529, 1998
10. Csapó Z, Sasvári-Székely M, Spasokoukotskaja T, Staub M. Modulation of human deoxycytidine kinase activity as a response to cellular stress induced by NaF. *Acta Biochim Pol* 48:251-256, 2001
11. Demeter A, Abonyi M, Look KY, et al. Differences in thermostability of thymidine kinase isoenzymes in normal ovary and ovarian carcinoma. *Anticancer Res* 21:353-358, 2001
12. Dieter P, Fitzke E, Duyster J. BAPTA induces a decrease of intracellular free calcium and a translocation and inactivation of protein kinase C in macrophages. *Biol Chem Hoppe Seyler* 374:171-174, 1993
13. Eriksson S, Arnér ES, Spasokoukotskaja T, et al. Prospective and levels of deoxynucleoside kinases in normal and tumor cells: Implications for chemotherapy. *Adv Enzyme Regul* 34:13-45, 1994
14. Eriksson S, Munch-Petersen B, Johansson K, Eklund H. Structure and function of cellular deoxyribonucleoside kinases. *Cell Mol Life Sci* 59:1327-1346, 2002
15. Eriksson S, Wang L. The role of the cellular deoxynucleoside kinases in activation of nucleoside analogs used in chemotherapy. *Recent Advances in Nucleosides: Chemistry and Chemotherapy* ed. C.K. Chu 2002, p. 455-475
16. Galmarini CM, Thomas X, Calvo F, et al. Potential mechanisms of resistance to cytarabine in AML patients. *Leuk Res* 26:621-629, 2002
17. Galmarini CM, Thomas X, Graham K, et al. Deoxycytidine kinase and cN-II nucleotidase expression in blast cells predict survival in acute myeloid leukaemia patients treated with cytarabine. *Br J Haematol* 122:53-60, 2003
18. Ge Y, Jensen TL, Matherly LH, Taub JW. Physical and functional interactions between USF and SP1 proteins regulate human deoxycytidine kinase promoter activity. *J Biol Chem* 278:49901-49910, 2003
19. Hapke DM, Stegmann AP, Mitchell BS. Retroviral transfer of deoxycytidine kinase into tumor cell lines enhances nucleoside toxicity. *Cancer Res* 56:2343-2347, 1996
20. Hatzis P, Al-Madhoon AS, Jullig M, et al. The intracellular localization of deoxycytidine kinase. *J Biol Chem* 273:30239-30243, 1998
21. Johansson M, Brismar S, Karlsson A. Human deoxycytidine kinase is located in the cell nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:11941-11945, 1997
22. Keszler G, Csapó Z, Spasokoukotskaja T, et al. Hyperthermy increases the phosphorylation of deoxycytidine in the membrane phospholipid precursors and decreases its incorporation into DNA. *Adv Exp Med Biol* 486:333-337, 2000
23. Keszler G, Spasokoukotskaja T, Csapó Z, et al. Activation of deoxycytidine kinase in lymphocytes is calcium dependent and involves a conformational change detectable by native immunostaining. *Biochem Pharmacol* 67:947-955, 2004
24. Keszler G, Spasokoukotskaja T, Csapó Z, et al. Selective increase of dATP pools upon activation of deoxycytidine kinase in lymphocytes: implications in apoptosis. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2004 (nyomtatás alatt)
25. Keszler G, Spasokoukotskaja T, Virga S, et al. Stimulation of deoxycytidine kinase results in prolonged maintenance of the enzyme activity. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2004 (elfogadva)
26. Keszler G, Szikla K, Kazimierczuk Z, et al. Selective activation of deoxycytidine kinase by thymidine-5'-thiosulphate and release by deoxycytidine in human lymphocytes. *Biochem Pharmacol* 65:563-571, 2003
27. Kralovanszky J, Kovcs I, Orosz Z, Jeney A. Prognostic significance of thymidylate biosynthetic enzymes in human colorectal tumors. *Oncology Basel* 62:167-174, 2002
28. Kroep JR, Loves WJ, van der Wilt CL, et al. Pretreatment deoxycytidine kinase levels predict in vivo gemcitabine sensitivity. *Mol Cancer Ther* 1:371-376, 2002
29. Magnusson G, Narkhammar M, Reichard P, et al. Replication of polyoma DNA. Effects of hydroxyurea and arabinosyl-cytosine. *Cold Spring Harbor Symp on Quantitative Biology* 39:227-333, 1974
30. Mansson E, Liliemark E, Soderhall S, et al. Real-time quantitative PCR assays for deoxycytidine kinase, deoxyguanosine kinase and 5'-nucleotidase measurement in cell lines and in patients with leukemia. *Leukemia* 16:386-392, 2002
31. Sabini E, Ort S, Monnerjahn C, et al. Structure of human dCK suggests strategies to improve anticancer and antiviral therapy. *Nat Struct Biol* 10:513-519, 2003
32. Sasvári-Székely M, Piróth Z, Kazimierczuk Z, Staub M. A novel effect of the new antileukemic drug, 2-chloro-2'-deoxyadenosine, in human lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 203:1378-1384, 1994

33. Sasvári-Székely M, Spasokoukotskaja T, Szőke M, et al. Activation of deoxycytidine kinase during inhibition of DNA synthesis by 2-chloro-2'-deoxyadenosine (Cladribine) in human lymphocytes. *Biochem Pharmacol* 56:1175-1179, 1998
34. Spasokoukotskaja T, Csapó Z, Sasvári-Székely M, et al. Effect of phosphorylation on deoxycytidine kinase activity. *Adv Exp Med Biol* 486:281-285, 2002
35. Spasokoukotskaja T, Sasvári-Székely M, Keszler G, et al. Treatment of normal and malignant cells with nucleoside analogues and etoposide enhances deoxycytidine kinase activity. *Eur J Cancer* 35:1862-1867, 1999
36. Spasokoukotskaja T, Sasvári-Székely M, Taljanidisz J, Staub M. Compartmentation of dCTP pools disappears after hydroxyurea or araC treatment in lymphocytes. *FEBS Letters* 297:151-154, 1992
37. Staub M, Antoni F. Az arabinozil-citozin sejtproliferáció gátlásának mechanizmusa. *Magyar Onkológia* 29:27-40, 1985
38. Staub M, Spasokoukotskaja T, Benczur M, Antoni F. DNA synthesis and nucleoside metabolism in human tonsillar lymphocyte subpopulations. *Acta Otolaryngologica (Stockholm)* 454:118-124, 1987
39. Stegmann AP, Honders WH, Willemze R, et al. Transfection of wild-type deoxycytidine kinase (dck) cDNA into an Ara-C and DAC-resistant rat leukemic cell line of clonal origin fully restore drug sensitivity. *Blood* 85:1188-1194, 1995
40. Szondy Z. The 2-chlorodeoxyadenosine-induced cell death signalling pathway in human thymocytes is different from that induced by 2-chloroadenosine. *Biochem J* 311:585-588, 1995
41. Szyfter K, Sasvári-Székely M, Spasokoukotskaja T, et al. Pyrimidine salvage enzymes in human tonsil lymphocytes: II. Purification and properties of deoxycytidine kinase. *Acta Biochim Biophys Acad Sci Hung* 20:173-182, 1985
42. Taub JW, Huang X, Ge Y, et al. Cystathione-beta-synthase cDNA transfection alters the sensitivity and metabolism of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine in CCRF-CEM leukemia cells in vitro and in vivo: a model of leukemia in Down syndrome. *Cancer Res* 60:6421-6426, 2000
43. Van Den Neste E, Smal C, Cardoen S, et al. Activation of deoxycytidine kinase by UV-C-irradiation in chronic lymphocytic leukemia B-lymphocytes. *Biochem Pharmacol* 65:573-580, 2003
44. Veuger MJ, Heemskerk MH, Honders MW, et al. Functional role of alternatively spliced deoxycytidine kinase in sensitivity to cytarabine of acute myeloid leukemic cells. *Blood* 99:1373-1380, 2002
45. Wang LM, Kucera GL. Deoxycytidine kinase is phosphorylated in vitro by protein kinase C alpha. *Biochim Biophys Acta* 1224:161-167, 1994
46. Xu YZ, Huang P, and Plunkett W. Functional compartmentation of dCTP pools. *J Biol Chem* 270:631-663, 1995