

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**A VESE APOPTÓTIKUS ENDONUKLEÁZAINAK
SZEREPE A BEJUTTATOTT IDEGEN DNS/RNS
LEBONTÁSÁBAN**

Buzder Tímea

Témavezető: Dr. Bánfalvi Gáspár



DEBRECENI EGYETEM
Juhász Nagy Pál Doktori Iskola
Debrecen, 2010.

1. Bevezetés

A bejuttatott DNS stabilitása a génterápiák sikerességének alapját képezi. A cytotoxikus/apoptótikus endonukleázok arról ismeretesek, hogy megemésztik az “idegen DNS/RNS-t”. Azonban, hogy melyek ezek az endonukleázok és ezen enzimek inaktiválásával növelhető-e a génbevétel sikeressége korábban nem képezte vizsgálat tárgyát.

Kutatásaim során - amit Arkansas állam orvosi egyetemének nephrológiai osztályán végeztem (University of Arkansas for Medical Sciences, Department of Internal Medicine, Division of Nephrology) – a vesében lévő két legjelentősebb pro-apoptótikus endonukleázt, a deoxyribonukleáz I-et (DNáz I) és az endonukleáz G-t (EndoG) vizsgáltuk.

Vizsgálataink alkalmával immortalizált vese tubuláris epitél sejteket (TKPTS), valamint DNáz I és EndoG knockout egerekből izolált primer vese tubuláris epitél sejteket (PTE) használtunk.

Munkánk fő célja a DNáz I és EndoG DNS inaktivációban betöltött szerepének megismerése, ezen két endonukleáz együttműködésének jobb megértése volt, valamint annak kiderítése, hogy ezeknek az enzimeknek a gátlásával növelhető-e a gén bejuttatás mértéke. Kísérleteink arra irányultak, hogy a DNáz I és az EndoG aktivitásának csökkentésével megvédjük a gazdasejtbe bejuttatni kívánt “idegen” DNS-t. A génterápiák problémájának e látszólagosan egyértelmű megközelítése, vagyis az endonukleáz enzimek sejtvédő hatásának kikapcsolása nem merült fel korábban, egy beszámolótól eltekintve, amely egy másik endonukleázzal, a DNáz gammával kapcsolatos (Wilber és mtsai., 2002).

Bár az idegen DNS apoptózist és DNáz enzimeket indukáló hatását leírták (Nur és mtsai., 2003; Stacey és mtsai., 1993), az apoptózis gátlását nem használták fel korábban a génbevitel hatékonyságának növelésére. Kísérleteink éppen ez utóbbi lehetőség kiaknázását hivatottak előmozdítani.

2. Kísérleti stratégiák

A sejtekbe transzfekcióval bejuttatott pECFP-N1 plazmid vagy fluoreszcens siRNS celluláris endonukleázok révén történő lebontását vizsgáltuk. Annak megállapítása céljából, hogy az intra-, - vagy az extracelluláris DNáz I tölt be nagyobb szerepet a bejuttatott DNS lebontásában G-aktint használtunk, valamint specifikus apoptózisgátlók hatását vizsgáltuk a génbevitel hatékonysága szempontjából.

3. Eredmények és megbeszélésük

Korábbi adataink alapján a DNáz I-et tekintjük a legjelentősebb és az EndoG-t pedig a második legjelentősebb endonukleáznak vesesejtekben (Yin és mtsai., 2007). A plazmid-, - és az idegen DNS bejuttatható a sejtekbe, de endonukleolitikus támadásnak vannak kitéve a sejten belül és kívül is. A Lipofektamin növeli a transzfekciók hatékonyságát, de nem védi a plazmid DNS-t az endonukleázok lebontásától.

A sejtekben lévő endonukleáz aktivitás magasabbnak bizonyult a sejtek által kiválasztott, médiumban megjelenő endonukleáz aktivitásnál.

Megfigyelhető, hogy a plazmid incision assay által kalkulált teljes endonukleáz aktivitás szignifikánsan magasabb volt primer PTE sejtekben, mint immortalizált TKPTS sejtben. Ez magyarázatul szolgálhat primer sejt kultúrák transzfekció elleni rezisztenciájára, amit számos esetben leírtak korábban (Stacey és mtsai., 1993; Welter és mtsai., 2004; Zhong és mtsai., 2005). Ezek a megfigyelések korrelációba hozhatók korábbi adatainkkal, miszerint vesekivonatok endonukleáz aktivitása magasabb a primer sejtekénél (Basnakian és mtsai., 2005), ami ahhoz a konklúzióhoz vezet, hogy az endonukleáz aktivitás a következő sorrendben csökken:

Vese sejt > primer sejt > immortalizált sejt.

Gének bejuttatása a vesébe és veséből izolált primer sejtekbe sokáig megoldatlan problémát jelentett a magas DNáz szintnek köszönhetően (Basnakian és mtsai., 2005; Djurovic és mtsai., 2004; Kalinowska és mtsai., 2005). Más primer sejtek transzfektálhatósága is ugyanilyen gondot jelentett, mivel a hatékonyság növelése speciális technikákat igényel a sejtek rezisztenciájának legyőzése érdekében.

A mi stratégiánk az idegen gének sejtekbe történő bejuttatására az internalizált plazmid DNS és siRNS túlélésén alapul. Ezt bizonyítja az az eredményünk, hogy a DNáz I KO és az EndoG KO sejteknek szignifikánsan magasabb a transzfekciós rátája a WT sejtekénél. Továbbá EndoG KO sejtekben a fluorescens siRNA transzfekció magasabb, mint a WT sejtekben. Ez arra utal, hogy az EndoG-nek kettős szerepe van a sejtvédekezésben: amellet, hogy lebontja az idegen DNS-t, megvédi a sejteket a DNS és RNS felvételtől.

Az extracelluláris DNáz I gátlása G-aktinnal nincs hatással a DNS transzfekció hatékonyságára jelezve, hogy az intracelluláris DNáz I az elsődleges molekuláris szereplője az idegen DNS-elleni gazdasejt védelemnek. Bár nem kérdéses, hogy az endonukleázok fontos/döntő szereppel bírnak az “idegen” és saját DNS (pl. apoptózis, nekrozis) lebontásában, mégis felmerül a kérdés, hogy egyéb sejtfaktorok részt vesznek-e az örökítőanyagok degradációjában, befolyásolva a transzfektálhatóságot.

Kísérletesen alátámasztottuk, hogy a vesében a DNáz I szükséges az EndoG indukálásához (Yin és mtsai., 2007).

Okkal gondolhatjuk, hogy ez a két endonukleáz együttműködhet a sejt védekezésében.

Az apoptózis a szervezet homeosztázisának fenntartására irányuló folyamat, számos fiziológiai esemény résztvevője. Külső jellel indukált formája sokféle lehet, de mind közül a legszélesebb körben ismert tulajdonsága a genomikus DNS lebomlása. A hasításért felelős enzimek azonosítása vita tárgyát képezi. Számos endonukleázt írtak le, mint a fragmentációért felelős enzimet, például a thymocyták Ca^{2+} - Mg^{2+} -dependens endonukleázait (Montague és mtsai., 1994; Pandey és mtsai., 1997; Peitsch és mtsai., 1993; Shiokawa és mtsai., 1994). A Mg^{2+} -dependens, Ca^{2+} -independens endonukleázok humán myeloid sejtvonalak apoptózisában vesznek részt (Kawabata és mtsai., 1997). Az endonukleázok lehetnek caspase-aktiváltak, vagy részt vehetnek caspase-independens apoptózisban (Padron-Barthe és mtsai., 2007).

Annak eldöntése, hogy egy adott endonukleáz DNS bontása mely sejt apoptózisának melyik részét teszi ki, további kísérletek tárgyát képezi. TKPTS sejteken folytatott kísérletünkkel az apoptózis fontos

részvevőinek, a nukleázok aktivitását gátoltuk és ezzel a génbevitelt könnyítettük meg.

4. Összefoglalás

Összefoglalva eredményeink tükrözik a DNáz I és EndoG sejtvédekezésben betöltött szerepét a génbejuttatás szempontjából primer tubuláris epitél sejtek esetén. A jövőben szeretnénk tisztázni, hogy a két endonukleáznak milyen a kölcsönhatása és együttműködésének természete. Az endonukleázok ideiglenes és célzott gátlása új lehetőséget nyújthat a DNS stabilitás javítására génbevétel folyamán.

Thesis of PhD dissertation

THE ROLE OF KIDNEY ENDONUCLEASES IN DEGRADATION OF FOREIGN NUCLEIC ACIDS

Tímea Buzder

Supervisor: Dr. Gáspár Bánfalvi

1. Introduction

Degradation of DNA during gene delivery is an obstacle for gene transfer and for gene therapy. DNases play a major role in degrading “foreign” DNA. However, which of the DNases are involved and whether their inactivation can improve gene delivery have not been studied.

During my research at University of Arkansas for Medical Sciences, Department of Internal Medicine, Division of Nephrology we identified the deoxyribonuclease I (DNase I) and the endonuclease G (EndoG) as the major degradative enzymes in the mouse kidney proximal tubule epithelial (TKPTS) cells. In this study, we used immortalized mouse TKPTS cells and

primary tubular epithelial (PTE) cells isolated from DNase I or EndoG knockout mice.

We aimed to understand the role of DNase I and EndoG in the inactivation of DNA, and the cooperation of these two endonucleases. We investigated whether the gene delivery can be improved by the inhibition of these enzymes.

We have attempted to protect the foreign DNA to be introduced in host cells by reducing the DNase I and EndoG activities. This seemingly obvious approach has not been used earlier due to the lack of specific inhibitors and to insufficient data, regarding the potential of DNase I and EndoG as host cell defense enzymes. There is only one report showing the role of another endonuclease, DNase gamma (DNase 1L3) in host cell defense (Wilber et al., 2002).

Although foreign DNA induced apoptosis and DNases in other studies (Stacey et al., 1993; Nur et al., 2003), the inhibition of apoptosis has not been previously used for improving the delivery of fDNA.

2. Experimental strategy

We examined the degradation of pECFP-N1 plasmid DNA or fluorescent siRNA during its uptake. To indicate whether intra- or extracellular DNase I affects DNA stability we applied inhibition of secreted DNase I by G-actin. Finally we examined whether specific inhibition of these endonucleases may improve DNA stability during gene delivery.

3. Results and discussion

Our earlier data showed that DNase I is the major endonuclease in tubular epithelial cells and EndoG is the second major degradative enzyme (Yin et al., 2007). Plasmid as foreign DNA was introduced in host cells, but it is known to be the subject to extra- and intracellular endonucleolytic attacks both outside and inside the cells. Lipofectamine increased the efficiency of transfection, but did not protect plasmid DNA from destruction by endonucleases. Cellular extracts turned out to have a much higher endonuclease activity than the nuclease excreted by the cells to the culture medium.

We have also observed that the total specific endonuclease activity measured by the plasmid incision assay was significantly higher in primary cells than in immortalized TKPTS cells. This could explain why primary cells are more resistant to transfection than immortalized cells. The resistance of primary cells to transfection was also reported by others (Stacey et al., 1993; Welter et al., 2004; Zhong et al., 2005). These observations are in correlation with our earlier data that the endonuclease activity in kidney extracts is higher than in primary cells (Basnakian et al., 2005), leading to the conclusion that endonuclease activity is decreasing in the following order: kidney cells > primary cells > immortalized cells.

So far, gene delivery to kidney and primary cells isolated from kidney was an unsolved problem due to the high DNase level (Basnakian et al., 2005; Djurovic et al., 2004; Kalinowska et al., 2005). Other primary cells could not be transfected either since the enhancement of transfection would have required special techniques to overcome cellular resistance.

Our strategy to introduce foreign genes in cells is based on the inactivation of the two major endonucleases to contribute to the survival of the internalized plasmid DNA and siRNA. That this is a viable approach has been proved by the observations that both DNase I KO and EndoG KO cells had significantly higher rate of transfection compared to WT cells. Moreover, in EndoG KO cells the rate of fluorescent siRNA transfection was also significantly higher than in WT cells. This suggests that EndoG has a dual role in host cell defense: besides degrading foreign DNA, it protects cells from both DNA and RNA uptake.

Inhibition of extracellular DNase I by G-actin did not affect the efficiency of DNA transfection indicating that only intracellular DNase I is the primary molecular player in the anti-DNA host cell defense.

Although, there is no doubt that endonucleases play an important if not decisive role in the degradation of foreign and self DNA (e.g. apoptosis, necrosis), the question arises whether cellular factors others then endo- and exonucleases are involved in the degradation of nucleic acids, their knocking out of which could

contribute to the efficiency of transfection. As foreign DNA is known to be degraded exclusively by endonucleases, primarily by DNase I and EndoG, the possibility of other degrading mechanisms is lacking a solid basis.

In our study we have confirmed that in the kidney, DNase I is necessary for EndoG induction (Yin et al., 2007). It is thus reasonable to think that there might be some cooperation between these two endonucleases during the protection of cells against the invasion of nucleic acids.

The apoptosis is a control mechanism of homeostasis reservation, participates in several physiological event. It has different forms which can be induced by external signals but the best-known feature of apoptosis is genomic DNA degradation. Not all enzymes in this process have been identified. Several endonucleases have been described to be responsible for fragmentation, such as the Ca^{2+} - Mg^{2+} -dependent endonucleases in thymocytes (Montague és mtsai., 1994; Pandey és mtsai., 1997; Peitsch és mtsai., 1993; Shiokawa és mtsai., 1994). Mg^{2+} -dependent, Ca^{2+} -independen endonucleases are involved in human myeloid cell line apoptosis (Kawabata és

mtsai., 1997). Endonucleases can be caspase-activated, or can participate in caspase-independent apoptotic pathways (Padron-Barthe és mtsai., 2007). However, it remains to be clarified which apoptotic route involves DNA degradation caused by specific endonucleases. In our experiment the specific inhibition of these apoptotic endonucleases of TKPTS cells resulted in improved gene delivery.

4. Summary

In conclusion our data reflect the importance of DNase I and EndoG in the host cell defense system against gene delivery in primary tubular epithelial cells. Future studies will shed light on the cooperative nature of these two endonucleases in destroying foreign DNA. Temporary and targeted inhibition of these endonucleases may provide new modalities to improve DNA stability during gene delivery.

Irodalomjegyzék/References

- Basnakian, A.G., Apostolov, E.O., Yin, X., Napirei, M., Mannherz, H.G., ésShah, S.V. (2005). Cisplatin nephrotoxicity is mediated by deoxyribonuclease I. *J Am Soc Nephrol*, 16(3), 697-702.
- Basnakian AG, K.G., Ueda N, Shah SV. (2005). Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. (3d ed.): *Toxicology of the Kidney*.
- Djurovic, S., Iversen, N., Jeansson, S., Hoover, F., ésChristensen, G. (2004). Comparison of nonviral transfection and adeno-associated viral transduction on cardiomyocytes. *Mol Biotechnol*, 28(1), 21-32.
- Kalinowska, M., Garncarz, W., Pietrowska, M., Garrard, W.T., ésWidlak, P. (2005). Regulation of the human apoptotic DNase/RNase endonuclease G: involvement of Hsp70 and ATP. *Apoptosis*, 10(4), 821-830.
- Kawabata, H., Anzai, N., Masutani, H., HIRAMA, T., Hishita, T., Dodo, M., Masuda, T., Yoshida, Y., ésOkuma, M. (1997). Mg²⁺- or Mn²⁺-dependent endonuclease activities of human myeloid leukemia cells capable of producing nucleosomal-size DNA fragmentation. *Biochem Biophys Res Commun*, 233(1), 133-138.
- Montague, J.W., Gaido, M.L., Frye, C., ésCidlowski, J.A. (1994). A calcium-dependent nuclease from apoptotic rat thymocytes is homologous with cyclophilin. Recombinant cyclophilins A, B, and C have nuclease activity. *J Biol Chem*, 269(29), 18877-18880.

- Nur, E.K.A., Li, T.K., Zhang, A., Qi, H., Hars, E.S., ésLiu, L.F. (2003). Single-stranded DNA induces ataxia telangiectasia mutant (ATM)/p53-dependent DNA damage and apoptotic signals. *J Biol Chem*, 278(14), 12475-12481.
- Padron-Barthe, L., Lepretre, C., Martin, E., Counis, M.F., ésTorriglia, A. (2007). Conformational modification of serpins transforms leukocyte elastase inhibitor into an endonuclease involved in apoptosis. *Mol Cell Biol*, 27(11), 4028-4036.
- Pandey, S., Walker, P.R., ésSikorska, M. (1997). Identification of a novel 97 kDa endonuclease capable of internucleosomal DNA cleavage. *Biochemistry*, 36(4), 711-720.
- Peitsch, M.C., Polzar, B., Stephan, H., Crompton, T., MacDonald, H.R., Mannherz, H.G., ésTschopp, J. (1993). Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death). *EMBO J*, 12(1), 371-377.
- Shiokawa, D., Ohyama, H., Yamada, T., Takahashi, K., ésTanuma, S. (1994). Identification of an endonuclease responsible for apoptosis in rat thymocytes. *Eur J Biochem*, 226(1), 23-30.
- Stacey, K.J., Ross, I.L., ésHume, D.A. (1993). Electroporation and DNA-dependent cell death in murine macrophages. *Immunol Cell Biol*, 71 (Pt 2), 75-85.
- Welter, J.F., Solchaga, L.A., ésStewart, M.C. (2004). High-efficiency nonviral transfection of primary chondrocytes. *Methods Mol Med*, 100, 129-146.

- Wilber, A., Lu, M., ésSchneider, M.C. (2002). Deoxyribonuclease I-like III is an inducible macrophage barrier to liposomal transfection. *Mol Ther*, 6(1), 35-42.
- Yin, X., Apostolov, E.O., Shah, S.V., Wang, X., Bogdanov, K.V., Buzder, T., Stewart, A.G., ésBasnakian, A.G. (2007). Induction of renal endonuclease G by cisplatin is reduced in DNase I-deficient mice. *J Am Soc Nephrol*, 18(9), 2544-2553.
- Zhong, Z., Feijen, J., Lok, M.C., Hennink, W.E., Christensen, L.V., Yockman, J.W., Kim, Y.H., ésKim, S.W. (2005). Low molecular weight linear polyethylenimine-b-poly(ethylene glycol)-b-polyethylenimine triblock copolymers: synthesis, characterization, and in vitro gene transfer properties. *Biomacromolecules*, 6(6), 3440-3448.

Publikációs lista/Publication list

1. **Buzder T**, Yin X, Wang X, Banfalvi G, Basnakian AG.. Uptake of Foreign Nucleic Acids in Kidney Tubular Epithelial Cells Deficient in Proapoptotic Endonucleases, *DNA and Cell Biology*, 2009; Manuscript accepted for publication. DOI: 10.1089/dna.2008.0850
IF: 1,861
2. Yin X, Apostolov EO, Shah SV, Wang X, Bogdanov KV, **Buzder T**, Stewart AG, Basnakian AG. Induction of Renal Endonuclease G by Cisplatin Is Reduced in DNase I-Deficient Mice Yin et al. *J Am Soc Nephrol*.2007; 18: 2544-2553. IF: 7,371

3. Basnakian AG, Apostolov EO, Wang X, Yin X, **Buzder T**, Stewart AG, Shah SV (2006) Inactivation of endonuclease G protects tubular epithelium from cisplatin and ceramide injuries. Proceedings of the 29th ASN Annual Meeting, San Diego, CA, Nov 14-19, 2006, J Am Soc Nephrol 17, 709A

IF: 7,371

4. **Buzder T**, Yin X, Wang X, Banfalvi G, Basnakian AG. (2006) Deoxyribonuclease I and endonuclease G are host defense enzymes responsible for inactivation of foreign DNA in kidney tubular epithelial cells. 9th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, Baltimore, May 31- June 4, 2006, Molecular Therapy Abstract Supplement, S201, abstract #523

IF:5,841

5. **Buzder T**, Yin X, Wang X, Apostolov EO, Stewart AG, Banfalvi G, Shah SV, Basnakian AG. Apoptotic endonucleases DNase I and EndoG destroy foreign DNA delivered to kidney tubular epithelial cells. Proceedings of the 30th ASN Annual Meeting, San Francisco, CA, Oct 31 – Nov 5, 2007, J Am Soc Nephrol 18, 665A.

IF: 7,371

6. Basnakian AG, Apostolov EO, Wang X, **Buzder T**, Yin X, Stewart AG, Banfalvi G, Shah SV (2007) Enzymatic DNA damage: the point of no return in toxic cell death. 2nd BioNanoTox Meeting, Little Rock, AR, April 26-27, 2007

7. Walker RB, **Buzder T.**, Walker DE, Abbey Y, Chidambaram M, Yin Y, Apostolov EO, Sorenson JRJ, Basnakian AG (2007) Zinc chelates of aminothiols as potential radioprotectors. 2nd BioNanoTox Meeting, Little Rock, AR, April 26-27, 2007

8. Basnakian AG, Shah SV, **Buzder T**, Apostolov EO. Detection and quantification of genotoxic DNA strand breaks *in vivo*: an update. Proceedings of the 6th Annual Conference of the International Society for the Prevention of Tobacco Induced Diseases, Little Rock, AR, Nov 2-4, 2007, 44-45.

9. Walker RW, Abbey Y, Walker DE, Everette JD, Chidambaram M, Apostolov EO, **Buzder T**, Basnakian AG. Zinc chelates as cytoprotective agents. Proceedings of the 6th Annual Conference of the International Society for the Prevention of Tobacco Induced Diseases, Little Rock, AR, Nov 2-4, 2007, #P23, p.79

10. **Buzder T**, Yin X, Banfalvi G, Basnakian AG (2007) Inactivation of transfected DNA in kidney tubular epithelial cells by cytotoxic endonucleases. 2nd BioNanoTox Meeting, Little Rock, AR, April 26-27, 2007

11. Basnakian AG, Apostolov EO, Yin X, Wang X, Mikhailova MV, **Buzder T**, Shah SV. EndoG and DNase I cooperatively mediate kidney failure induced by rhabdomyolysis in mice. Proceedings of the World Congress of Nephrology, Milan, Italy, May 22-26, 2009 abstract #M153

