

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΤΙΤΛΟΥ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΟΣ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΚΙΝΑΣΗΣ ΤΗΣ
ΔΕΟΞΥΚΥΤΙΔΙΝΗΣ**

ΠΑΝΤΕΛΗΣ ΧΑΤΖΗΣ

**Υπεύθυνος Καθηγητής: Παπαμαθθαϊάκης Ιωσήφ
Υπεύθυνος Ερευνητής: Ταλιανίδης Ιωάννης**

**Ηράκλειο Κρήτης
Σεπτέμβριος 1998**

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε κατά το ακαδημαϊκό έτος 1997-1998 στο εργαστήριο του κ. Ιωάννη Ταλιανίδη, στο Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας.

στον πατέρα μου

...to begin,

Ευχαριστώ

Τον Γιάννη, που ήταν μέντορας και φίλος. Words are not enough...

Την Ελένη, για την πολύτιμη βοήθεια, ειδικά στο rotation μου και στα πρώτα μου βήματα στο εργαστήριο.

Τον Άσραφ, για τη συνεργασία σε αυτή την εργασία και τα υπέροχά του σχόλια.

Τη Νίτσα, για την καλοσύνη της.

Το Θοδωρή, συνεργάτη σε αυτή την εργασία και συν-οπαδό του Θρύλου.

Την Εύη “Δεν αφήνω τίποτα να πέσει κάτω”, την οποία θα ήθελα να υιοθετήσω.

Τα παιδιά της ομάδας των θηλαστικών, που με έκαναν να νοιώσω μέλος της.

Τον κύριο Παπαματθαϊάκη, για τις συμβουλές του και τη διόρθωση αυτής της εργασίας.

Τα παιδιά της ομάδας εντόμων, εξαιτίας των οποίων βλέπω τον εαυτό μου σαν ποντίκι με φτερά δροσόφιλας.

Τους P.I.s που με τίμησαν με την εμπιστοσύνη τους.

Τους U.N.O.υς...

Όλους αυτούς που ήταν εκεί όταν χρειαζόμουν βοήθεια (Κώστας *et al.*).

Το πατρινό συνάφι, εύχομαι να είστε πάντα εδώ.

Την Ειρήνη και την Επανάσταση.

Αυτούς που δείξαν υπομονή.

Τους συγγενείς μου - όχι δεν είμαι τρελός επιστήμονας!

Τη μητέρα μου και τον αδερφό μου. Και πάλι τα λόγια δεν επαρκούν.

Τον πατέρα μου, που μας άφησε νωρίς, αλλά είναι πάντα μαζί μας.

Yo pienso, cuando me alegro
como un escolar sencillo,
en el canario amarillo,-
que tiene el ojo tan negro!

Jose Marti
de *Versos sencillos*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

- ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

- ΠΕΡΙΛΗΨΗ

- ΕΙΣΑΓΩΓΗ

- ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

- ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΑ ΣΧΕΔΙΑ - ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

- ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΟΡΟΙ	ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ
ADP	Διφωσφορική αδενοσίνη
AraA	9-β-D-αραβινοφουρανοσυλαδενοσίνη
AraC	9-β-D-αραβινοφουρανοσυλκυτοσίνη
AraG	9-β-D-αραβινοφουρανοσυλγουανυδίνη
AraT	9-β-D-αραβινοφουρανοσυλθυμιδίνη
AZT	3'-αζιδο-2',3'-διδεοξυθυμιδίνη
BSA	Αλβουμίνη βόειου ορού
CdA	2-χλωρο-2'-δεοξαδενοσίνη
CDNA	συμπληρωματικό DNA
CDP	Διφωσφορική κυτιδίνη
DATP	Τριφωσφορική δεοξαδενοσίνη
DCDP	Διφωσφορική διδεοξυκυτιδίνη
DCMP	Μονοφωσφορική δεοξυκυτιδίνη
DCK	Κινάση της δεοξυκυτιδίνης
DCTP	Τριφωσφορική δεοξυκυτιδίνη
DdC	2',3'-διδεοξυκυτιδίνη
de novo	εκ νέου
DFdC	2',2'-διφθοροδεοξυκυτιδίνη
DFdG	2',2'-διφθοροδεοξυγουανοσίνη
DGK	Κινάση της δεοξυγουανιδίνης
DGTP	Τριφωσφορική δεοξυγουανιδίνη
DN	Δεοξυνουκλεοσίδιο
DNDP	Διφωσφορικό δεοξυνουκλεοσίδιο
DNMP	Μονοφωσφορικό δεοξυνουκλεοσίδιο
DNTP	Τριφωσφορικό δεοξυνουκλεοσίδιο
D4T	2'3'-διυδρο-2',3'-διδεοξυθυμιδίνη
DTMP	Μονοφωσφορική δεοξυθυμιδίνη
DTTP	Τριφωσφορική δεοξυθυμιδίνη

DUMP	Μονοφωσφορική δεοξουριδίνη
D.A.	dCMP απαμινάση
EDTA	Αιθυλεν-διαμινο-τετραοξικό οξύ
FIAU	1-(2-δεοξυ-2-φθορο-β-D-αραβινοφουρανοσυλ)-5-ιωδοουρακίλη
G	Επιτάχυνση της βαρύτητας
GDP	Διφωσφορική γουινιδίνη
GFP: Green Fluorescent Protein	
in situ	Εν θέση
in vitro	Στο σωλήνα
KDa	Χιλιάδες Ντάλτονς
Mg	Μικρογραμμάριο
MI	Μικρόλιτρο
Medium	Μέσο
Mg	Μιλιγραμμάριο
MI	Μιλιλίτρο
NP-40: Nonidet P-40	
PBS: Phosphate Buffered Saline	
PMSF:	
poly-D-lysine	πολυ-D-λυσίνη
R.R.	Ρεδοκτάση ριβονουκλεοτιδίων
Salvage	Διάσωση
SDS: Sodium Dodecyl Sulfate	
3TC: 2'-deoxy-3'-thiacytidine	
TK1	Κινάση Θυμιδίνης 1
TK2	Κινάση Θυμιδίνης 2
T.S.	Θυμιδική συνθάση ή συνθετάση
TDP	Διφωσφορική Θυμιδίνη
TMP	Μονοφωσφορική Θυμιδίνη
UDP	Διφωσφορική Ουρακίλη
Western	

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κινάση της δεοξυκυτιδίνης (dCK) καταλύει το περιοριστικό στάδιο του μονοπατιού salvage της σύνθεσης δεοξυριβονουκλεοτιδίων στα κύτταρα θηλαστικών και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση μερικών φαρμακολογικά σημαντικών αναλόγων νουκλεοσιδίων. Χρησιμοποιώντας ένα πολύ ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει ένα καρβοξυτελικό πεππίδιο της ανθρώπινης dCK, εξετάσαμε τον ενδοκυττάριο εντοπισμό του ενζύμου με ανάλυση κατά Western βιοχημικά κλασματοποιημένων πυρηνικών και κυτταροπλασματικών κυτταρικών εκχυλισμάτων καθώς και με *in situ* ανοσοχημεία. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η dCK ήταν εντοπισμένη κυρίως στο κυτταρόπλασμα σε διάφορους κυτταρικούς τύπους. Η κυτταροπλασματική dCK ήταν περισσότερο συγκεντρωμένη στις περιοχές γύρω από τον πυρήνα και την κυτταρική μεμβράνη. Αντίθετα, μετά από υπερέκφρασή, η dCK ήταν κυρίως εντοπισμένη στον πυρήνα. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η ενδογενής dCK είναι κανονικά ένα κυτταροπλασματικό ένζυμο. Όμως, η ικανότητά της να μπαίνει στον πυρήνα κάτω από κάποιες συνθήκες δείχνει ότι υπάρχει ένας μηχανισμός συγκράτησής της στο κυτταρόπλασμα που ενδέχεται να έχει σημαντικές επιπτώσεις στη ρύθμιση του μεταβολισμού των δεοξυριβονουκλεοσιδίων.

ABSTRACT

Deoxycytidine kinase (dCK) catalyzes the rate limiting step of the deoxyribonucleoside salvage pathway in mammalian cells and plays a key role in the activation of several pharmacologically important nucleoside analogs. Using a highly specific polyclonal antibody raised against a C-terminal peptide of the human dCK, its subcellular localization was analyzed by western blots of biochemically fractionated nuclear and cytoplasmic fractions as well by in situ immunocytochemistry. Under physiological conditions dCK was found to be located mainly in the cytoplasm in several cell types. Cytoplasmic dCK was more concentrated in the perinuclear and cellular membrane area. In contrast, when dCK was overexpressed in the cells, it was mainly located in the nucleus. The results demonstrate that native dCK is normally a cytoplasmic enzyme. However, its ability to enter the nucleus under certain conditions points to the functioning of a cytoplasmic retention mechanism that may have important implications in the regulation of deoxyribonucleoside salvage.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η κινάση της δεοξυκυτιδίνης (dCK), το αντικείμενο αυτής της εργασίας, καταλύει την φωσφορυλίωση της δεοξυκυτιδίνης σε 5'-μονοφωσφορική δεοξυκυτιδίνη, η οποία είναι η περιοριστική αντίδραση στο salvage μονοπάτι της δεοξυκυτιδίνης (Bohman and Eriksson 1990, Arner and Eriksson 1995) (βλέπε παρακάτω). Μελέτες με καθαρισμένο ανθρώπινο ένζυμο έχουν δείξει ότι η dCK έχει πλατειά ειδικότητα υποστρώματος και χρησιμοποιεί σαν υποστρώματα τόσο δεοξυνουκλεοσιδία πουρινών όσο και πυριμιδών βάσεων (Arner and Eriksson 1995, Bohman and Eriksson 1988, Johansson and Karlsson 1995). εκτός από δεοξυκυτιδίνη, η ανθρώπινη dCK φωσφορυλιώνει επίσης και δεοξυαδενοσίνη και δεοξυγουανοσίνη. Επιπροσθέτως των φυσικών υποστρωμάτων, η dCK φωσφορυλιώνει και είναι έτσι υπεύθυνη για την αρχική ενεργοποίηση ενός αριθμού κλινικά σημαντικών αντικαρκινικών και αντιϊικών φαρμάκων, όπως 2-χλωρο-2'-δεοξυαδενοσίνη (CdA), 1-β-D-αραβινοφουρανοσυλκυτοσίνη (AraC), 2',2'-διφθοροδεοξυκυτιδίνη (gemcitabine) (Bohman and Eriksson 1988, Johansson and Karlsson 1995, Eriksson *et al.* 1991, Plunkett and Saunders 1991, Tallman and Hakimian 1995). Εξασθενημένη έκφραση ή ενεργότητα της dCK στο κύτταρο συνήθως οδηγεί σε αντίσταση σε αυτά τα φάρμακα, κάτι που δείχνει ότι η dCK παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό και στη φαρμακολογική δράση τους (Ullman *et al.* 1988, Ruiz van Haperen *et al.* 1994, Hershfield *et al.* 1982).

Δομικά ανάλογα νουκλεοσιδίων και βάσεων νουκλεοσιδίων όπως τα παραπάνω έχουν μελετηθεί πολύ εντατικά σαν εν δυνάμει αντικαρκινικά και αντιϊικά φάρμακα από τη δεκαετία του 1940 (Elion 1989). Τα αντικαρκινικά και αντιϊικά ανάλογα εμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό και επισκευή του κυτταρικού DNA και τον αναδιπλασιασμό του ιϊκού γενώματος. Αυτά τα θεραπευτικά ανάλογα είναι ανενεργά προφάρμακα που εξαρτώνται από ενδοκυττάρια φωσφορυλίωση για τη φαρμακολογική δράση τους (Arner and Eriksson 1995). Τα φωσφορυλιωμένα ανάλογα δε μπορούν να διασχίσουν την κυτταρική μεμβράνη, αλλά τα μη φωσφορυλιωμένα ανάλογα εισάγονται στο κύτταρο από πρωτεΐνες-μεταφορείς νουκλεοσιδίων. Φωσφορυλιώνονται κατόπιν στις τριφωσφορικές μορφές τους από κυτταρικά ή ιϊκά ένζυμα και, όντας ενεργά, εμποδίζουν είτε

άμεσα είτε έμμεσα με τον κυτταρικό ή ήικό διπλασιασμό, ή προκαλούν διαταραχές στις δεξαμενές νουκλεοτιδίων, που με τη σειρά τους παρεμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό του DNA.

Το πρώτο βήμα στην ενεργοποίηση αυτών των αναλόγων νουκλεοσιδίων σε κλινική χρήση γίνεται μέσω των κινασών δεοξυριβονουκλεοσιδίων, οι οποίες έτσι συνεισφέρουν και στην θεραπευτική χρήση και στις τοξικές παρενέργειες των αναλόγων νουκλεοσιδίων (Arner and Eriksson 1995). Κυρίως αυτή η ιδιότητα της dCK και των άλλων κινασών δεοξυριβονουκλεοσιδίων είναι υπεύθυνη για την έντονη προσπάθεια που γίνεται για τη μελέτη αυτών των ενζύμων και των ιδιοτήτων τους. Μία ανασκόπηση της διαδικασίας του αναδιπλασιασμού του DNA και του μεταβολισμού των δεοξυριβονουκλεοτιδίων, του οποίου αναπόσπαστο τμήμα αποτελούν αυτά τα ένζυμα, θα βοηθήσει στην περαιτέρω διαφώτιση της σημασίας τους.

Ο αναδιπλασιασμός του DNA στο ζωικό κύτταρο γίνεται σε δύο τοποθεσίες, στον πυρήνα και στα μιτοχόνδρια και καταλύεται από DNA πολυμεράσες (Kornberg and Baker 1992). Η πυρηνική σύνθεση και επισκευή του DNA επιτελείται στα ανθρώπινα κύτταρα από τις DNA πολυμεράσες α, δ και ε ενώ ο αναδιπλασιασμός του μιτοχονδριακού DNA καταλύεται από την DNA πολυμεράση γ. Οι πολυμεράσες χρησιμοποιούν σαν υποστρώματα τα τέσσερα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια, dATP, dCTP, dGTP και dTTP, αντλώντας την ενέργεια που απαιτείται για τον πολυμερισμό από την υδρόλυση των υψηλής ενέργειας φωσφοδιεστερικών δεσμών των α και β φωσφο-ομάδων των δεοξυριβονουκλεοτιδίων και ενσωματώνοντας τα προκύπτοντα μονοφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια στο αυξανόμενο κλώνο DNA.

Η διατήρηση μιας ισορροπημένης παροχής δεοξυριβονουκλεοτιδίων έχει πρωταρχική σημασία για τον αναδιπλασιασμό, την επισκευή και την έκφραση τόσο του πυρηνικού όσο και του μιτοχονδριακού γενώματος (Reichard 1988). Παρεμπόδιση της σύνθεσης δεοξυριβονουκλεοτιδίων ή έλλειψη ισορροπίας στις δεξαμενές προδρόμων μορίων του DNA έχει σαν αποτέλεσμα μη ομαλό αναδιπλασιασμό του DNA και αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Αντι-αυξητικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται στην αντικαρκινική θεραπεία και σαν ανοσοκατασταλτικά φάρμακα έχουν σαν στόχους τους ένζυμα κλειδιά των μονοπατιών σύνθεσης δεοξυριβονουκλεοτιδίων. Ο τρόπος δράσης δομικά τροποποιημένων δεοξυριβονουκλεοτιδίων, όπως αυτά που ενεργοποιούνται μέσω της dCK, είναι η παρεμπόδιση του αναδιπλασιασμού του DNA. Ανάλογα νουκλεοσιδίων που παρουσιάζουν έλλειψη του 3' υδροξυλίου οδηγούν στον

τερματισμό της επιμήκυνσης όταν ενσωματωθούν στο DNA, καθώς δεν μπορούν να προσδεθούν επιπλέον δεοξυριβονουκλεοτίδια στον αυξανόμενο κλώνο. Υπάρχουν ενδείξεις ότι ανάλογα νουκλεοσιδίων με ανέπαφες τις 3' υδροξυλικές ομάδες επίσης παρεμποδίζουν την επιμήκυνση της αλυσίδας, όταν πολλαπλά συνεχόμενα ανάλογα

αυτού του τύπου ενσωματώνονται σε αναδιπλασιαζόμενο DNA, παρότι δεν είναι απόλυτοι "τερματιστές" (terminators) της επιμήκυνσης (Lewis *et al.* 1996). Κάποια ανάλογα νουκλεοσιδίων επίσης παρεμποδίζουν τον αναδιπλασιασμό του DNA επεμβαίνοντας στη δράση ενζύμων κλειδιών της σύνθεσης δεοξυριβονουκλεοτιδίων και διαταράσσοντας της δεξαμενές δεοξυριβονουκλεοτιδίων.

Αυτές οι δεξαμενές συντηρούνται με σύνθεση των δεοξυριβονουκλεοτιδίων μέσα στα κύτταρα. Η ανάγκη για ενδοκυτταρική σύνθεση των δεοξυριβονουκλεοτιδίων προέρχεται από την απουσία πρωτεϊνών-μεταφορών τους στην κυτταρική μεμβράνη και την αδυναμία των δεοξυριβονουκλεοτιδίων να διαπεράσουν τη μεμβράνη με μη υποβοηθούμενη διάχυση, η οποία είναι αποτέλεσμα των αρνητικών φορτίων των φωσφορικών ομάδων. Υπάρχουν δύο ξεχωριστά μονοπάτια για τη σύνθεση δεοξυριβονουκλεοτιδίων στα ανθρώπινα κύτταρα: το μονοπάτι *de novo* και το μονοπάτι salvage (Reichard 1988) (Σχήμα 1.).

Μονοπάτι *de novo*

Στο μονοπάτι σύνθεσης *de novo*, τα κύτταρα χρησιμοποιούν μικρά μόρια όπως CO₂, αμινοξέα και βιταμίνες για τη σύνθεση ριβονουκλεοτιδίων (μονο-, δι- και τριφωσφορικών ριβονουκλεοσιδίων) (Σχήμα 2.). Τα ριβονουκλεοτίδια επίσης παράγονται από φωσφορυλίωση ριβονουκλεοσιδίων και από ελεύθερες βάσεις νουκλεοσιδίων. Τα δεοξυριβονουκλεοτίδια σχηματίζονται με την αναγωγή της 2' υδροξυλικής ομάδας του αντίστοιχου διφωσφορικού ριβονουκλεοσιδίου, σε μία μη αντιστρεπτή αντίδραση η οποία καταλύεται από τη ρεδουκτάση ριβονουκλεοτιδίων - αυτό είναι το καθοριστικό βήμα στο μονοπάτι *de novo* (Reichard 1988). Η ανθρώπινη ρεδουκτάση ριβονουκλεοτιδίων δέχεται ADP, CDP, GDP και TDP σαν υποστρώματα. Ριβονουκλεοτίδια θυμιδίνης δεν υπάρχουν φυσιολογικά σε ανθρώπινα κύτταρα και η dTTP συντίθεται *de novo* από μεθυλίωση της dUMP, η οποία παράγεται με αναγωγή UDP από τη ρεδουκτάση ριβονουκλεοτιδίων και από την απαμίνωση dCMP από την dCMP απαμινάση. Η dTMP συντίθεται από dUMP μέσω θυμιδικής συνθάσης και η

dTMP φωσφορυλιώνεται σε dTDP από τη θυμιδική κινάση (Σχήμα 4). Τα διφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοσίδια φωσφορυλιώνονται στις τριφωσφορικές μορφές τους από κινάσες διφωσφορικών νουκλεοσιδίων.

Το μονοπάτι *de novo* βρίσκεται κάτω από αυστηρό έλεγχο μέσω της αλλοστερικής ρύθμισης της ρεδουκτάσης ριβονουκλεοτιδίων και της εξαρτόμενης από τον κυτταρικό κύκλο έκφρασής της (Reichard 1988). Δράση ρεδουκτάσης ριβονουκλεοτιδίων επάγεται στην S-φάση του κυτταρικού κύκλου. Η ενεργή ρεδουκτάση αποτελείται από δύο ανόμοιες υπομονάδες: Η R1, η μεγάλη υπομονάδα, εκφράζεται τόσο στην S- όσο και στην G1-φάση του κυτταρικού κύκλου, ενώ η έκφραση της R2, της μεγάλης υπομονάδας, περιορίζεται στην S-φάση. Κύτταρα που δεν διπλασιάζονται ή είναι τελικά διαφοροποιημένα - στην G0 - δεν εκφράζουν καμία υπομονάδα (Mann *et al.* 1988, Engstroem and Rozell 1988). Έτσι, η ρεδουκτάση ριβονουκλεοτιδίων είναι ενεργή μόνο στη S-φάση, καθώς και οι δύο υπομονάδες είναι απαραίτητες για την ενζυμική της ενεργότητα. Εκτός από ρύθμιση στο επίπεδο της έκφρασης, η ρεδουκτάση ρυθμίζεται αλλοστερικά από νουκλεοτιδικούς ενεργητές που επηρεάζουν τόσο τον ρυθμό κατάλυσης όσο και την συγγένεια του ενζύμου για τα διφωσφορικά ριβονουκλεοσίδια, κάτι που έχει σαν αποτέλεσμα την ισορροπημένη παροχή δεοξυριβονουκλεοτιδίων στο κύτταρο (Reichard 1988).

Μονοπάτι salvage

Το μονοπάτι salvage είναι συμπληρωματικό στο μονοπάτι *de novo* που περιγράφηκε παραπάνω· προμηθεύει το κύτταρο με πρόδρομα μόρια για τη σύνθεση DNA και εμποδίζει την σπατάλη νουκλεοτιδίων. Το κάνει αυτό με την απ' ευθείας φωσφορυλίωση των δεοξυριβονουκλεοσιδίων σε δεοξυριβονουκλεοτίδια (Σχήμα 3.). Τα πρώτα εισέρχονται στο κύτταρο από τον εξωκυττάριο χώρο μέσω πρωτεϊνών-μεταφορέων νουκλεοσιδίων, οι οποίες υπάρχουν σε σχεδόν όλα τα ζωικά κύτταρα (Bell *et al.* 1993), ή προέρχονται από την αποφωσφορυλίωση δεοξυριβονουκλεοτιδίων. Τα δεοξυριβονουκλεοσίδια φωσφορυλιώνονται σε τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοσίδια σε τρία διαδοχικά στάδια. Η φωσφορυλίωση των δεοξυριβονουκλεοσιδίων από τις κινάσες δεοξυριβονουκλεοσιδίων είναι το πρώτο και περιοριστικό βήμα. Η αντίδραση αυτή είναι μη αντιστρεπτή, αλλά τα μονοφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοσίδια μπορούν να αποφωσφορυλιωθούν σε δεοξυριβονουκλεοσίδια από 5'-νουκλεοτιδάσες. Στα επόμενα δύο βήματα του μονοπατιού τα μονοφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοσίδια μετατρέπονται σε τριφωσφορικά από κινάσες

μονοφωσφορικών νουκλεοσιδίων και διφωσφορικών νουκλεοσιδίων αντίστοιχα, σε ελεύθερα αντιστρεπτές αντιδράσεις φωσφομεταφοράς.

Τα δεοξυριβονουκλεοτίδια είναι απαραίτητα κυρίως στην S-φάση του κυτταρικού κύκλου, όταν συντίθεται το πυρηνικό DNA. Τα δεοξυριβονουκλεοτίδια τόσο από το μονοπάτι *de novo* όσο και από το μονοπάτι salvage ενσωματώνονται στο νεοσυντιθέμενο DNA, αλλά το πρώτο μονοπάτι είναι ποσοτικά πιο σημαντικό σε κύτταρα στην S-φάση (Reichard 1988). Η παρεμπόδιση της δράσης της ρεδοκτάσης ριβονουκλεοτιδίων, του ενζύμου κλειδιού του μονοπατιού *de novo*, οδηγεί στην εξάντληση των δεξαμενών των δεοξυριβονουκλεοτιδίων και την αναχαίτηση του κυτταρικού κύκλου, ενώ σε κυτταρικές σειρές ελλιπείς σε ένζυμα κλειδιά του μονοπατιού salvage ο κυτταρικός κύκλος προχωράει κανονικά (Bianchi *et al.* 1986, Hoeglund *et al.* 1988, Bianchi *et al.* 1994). Από την άλλη πλευρά, το τελευταίο αυτό μονοπάτι φαίνεται να είναι πιο σημαντικό για τη σύνθεση δεοξυριβονουκλεοτιδίων σε κύτταρα που δεν διπλασιάζονται ή είναι τελικά διαφοροποιημένα· μερικές κινάσες νουκλεοσιδίων και νουκλεοτιδίων του μονοπατιού salvage εκφράζονται συστατικά σε όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, ενώ η ρεδοκτάση ριβονουκλεοτιδίων είναι ανενεργή σε κύτταρα σε G1/G0.

Υπάρχουν τέσσερις κύριες κινάσες δεοξυριβονουκλεοσιδίων στα κύτταρα θηλαστικών: η κινάση θυμιδίνης 1 (TK1), η κινάση θυμιδίνης 2 (TK2), η κινάση δεοξυγουανιδίνης (dGK) και η κινάση δεοξυκυτιδίνης (dCK) (Arner and Eriksson 1995). Η κινάση αδενοσίνης (AK) μπορεί επίσης να θεωρηθεί μέλος αυτής της οικογένειας ενζύμων, καθώς φωσφορυλιώνει αδενοσίνη, αν και με μικρή αποτελεσματικότητα (Hershfield *et al.* 1982). Οι κινάσες παίρνουν το όνομα τους από το υπόστρωμα που προτιμούν, αν και έχουν πλατύτερη ειδικότητα υποστρώματος από ότι υπονοεί το όνομά τους.

Η κινάση θυμιδίνης 1 είναι ένα κυτταροπλασματικό ένζυμο και φωσφορυλιώνει δεοξυθυμιδίνη και δεοξουριδίνη (Munch-Petersen *et al.* 1991) και τα αντίϊκά πυριμιδινικά ανάλογα AZT, D4T και FIAU (Furman *et al.* 1986, Ahluwaia *et al.* 1996, Wang and Eriksson 1996). Το ένζυμο εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στην S-φάση και σε χαμηλά ή μη ανιχνεύσιμα στην G1/G0, παρόμοια με τη ρεδοκτάση ριβονουκλεοτιδίων (He *et al.* 1996).

Η κινάση δεοξυγουανιδίνης έχει δειχθεί ότι είναι εντοπισμένη στα μιτοχόνδρια και ότι φωσφορυλιώνει δεοξυγουανοσίνη, δεοξαδενοσίνη και δεοξυκυτιδίνη και τα αντικαρκινικά ανάλογα AraG και Cda (Wang *et al.* 1993). Το

ένζυμο εκφράζεται συστατικά σε όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (Arner and Eriksson 1995).

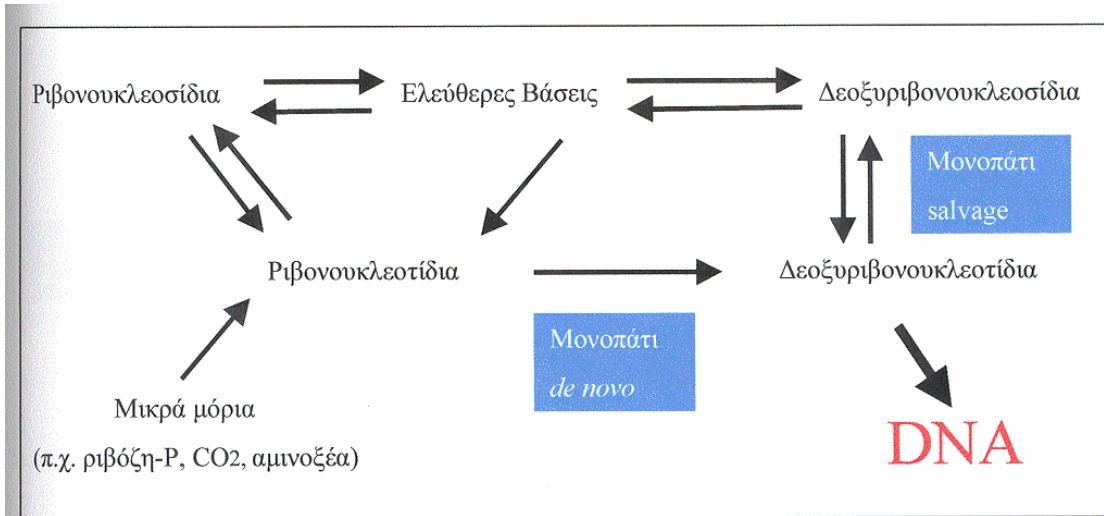
Η κινάση θυμιδίνης 2 είναι εντοπισμένη στα μιτοχόνδρια (Berk and Clayton 1973) και πιθανόν και στο κυτταρόπλασμα (Soederlund and Arner 1995). Φοσφορυλιώνει δεοξυθυμιδίνη, δεοξουριδίνη και δεοξυκυτιδίνη (Munch-Petersen *et al.* 1991) και τα αντίστοιχα ανάλογα νουκλεοσιδίων AZT και FIAU (Munch-Petersen *et al.* 1991, Wang and Eriksson 1996). Η TK2, σε αντίθεση με την TK1, εκφράζεται συστατικά σε όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (Arner and Eriksson 1995).

Η κινάση δεοξυκυτιδίνης, όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, έχει πλατειά ειδικότητα υποστρώματος: φωσφορυλιώνει δεοξυκυτιδίνη, δεοξυγουανιδίνη και δεοξαδενοσίνη και ένα μεγάλο αριθμό αντικαρκινικών και αντιϊικών αναλόγων νουκλεοσιδίων όπως AraC, AraA, AraG, Cda, dFdC, ddC και 3TC (Arner and Eriksson 1995, Bohman and Eriksson 1988, Johansson and Karlsson 1995). Η dCK εκφράζεται συστατικά σε όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, αλλά σε χαμηλά επίπεδα στους περισσότερους ιστούς, εκτός από τους λεμφοειδείς ιστούς και ειδικά τους μη ώριμους T-λεμφοβλάστες, όπου τα επίπεδα του ενζύμου είναι υψηλά (Spasokukotskaja *et al.* 1995).

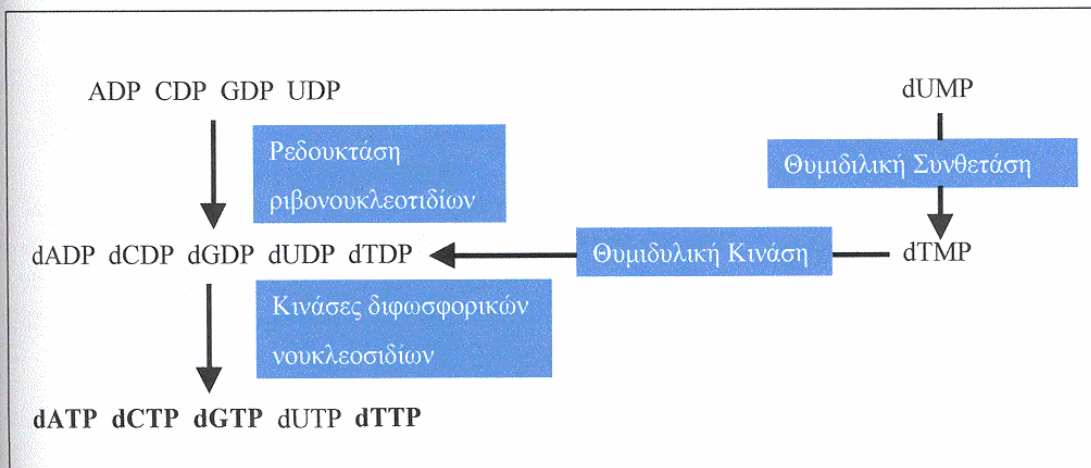
Η dCK μελετάται έντονα εδώ και χρόνια εξαιτίας του ρόλου της στην ενεργοποίηση κλινικά σημαντικών αναλόγων νουκλεοσιδίων. Η σημασία της έγκειται επίσης στο γεγονός ότι μέρος του dCTP που συντίθεται μέσω της dCK χρησιμοποιείται για τη σύνθεση λιπονουκλεοτιδίων (Spyrou and Reichard 1987, Spyrou and Reichard 1989, Spasokukotskaja *et al.* 1988, Spasokukotskaja *et al.* 1991) (Σχήμα 4.). Επίσης, το προϊόν της αντίδρασης που καταλύει η dCK, η dCMP, διοχετεύεται στο μονοπάτι σύνθεσης της dTTP· η dCMP μετατρέπεται σε dUMP μέσω του ενζύμου dCMP απαμινάσης· η dUMP με τη σειρά της μετατρέπεται σε dTMP μέσω θυμιδικής συνθάσης και τελικά σε dTTP. Είναι για αυτούς τους λόγους που η διαφώτιση εν δυνάμει ρυθμιστικών μηχανισμών που παίζουν ρόλο στην ενεργοποίηση της dCK έχει ιδιαίτερη σημασία. Παρότι πολλά είναι γνωστά για της βιοχημικές ιδιότητες της πρωτεΐνης και *in vitro* και *in vivo*, λίγες πληροφορίες υπάρχουν για τη ρύθμισή της στο μεταγραφικό και μετα-μεταγραφικό επίπεδο· παρόλο που η dCK εκφράζεται συστατικά, τα επίπεδα μεταγραφής της φαίνεται να αυξάνουν όχι μόνο σε λεμφοειδή κύτταρα, αλλά και σε κάποιους στερεούς όγκους (Spasokukotskaja *et al.* 1995). Ο μοριακός μηχανισμός πίσω από την ιστο-ειδική και εξαρτώμενη από αύξηση μεταγραφής της dCK δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστός.

Ένα άλλο επίπεδο ελέγχου της δράσης της dCK πιθανώς ενέχει ρυθμιζόμενες αλλαγές του υποκυτταρικού εντοπισμού του ενζύμου. Αυτή η υπόθεση απέκτησε βαρύτητα εξαιτίας του πρόσφατου ευρήματος ότι μία παροδικά διαμολυσμένη χιμαιρική κατασκευή GFP-dCK ήταν εντοπισμένη κυρίως στον πυρήνα· στην ίδια εργασία δείχτηκε ότι η dCK περιέχει μία ενδυνάμει αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού και ότι μία μεταλλαγή που καταστρέφει αυτή την αλληλουχία έχει σαν αποτέλεσμα τον εντοπισμό αυτής της χιμαιρικής GFP-dCK πρωτεΐνης κυρίως στο κυτταρόπλασμα. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με παλιότερα ευρήματα ότι η dCK είναι μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη (Johansson *et al.* 1997). Καθώς αυτό το εύρημα μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις στην ρύθμιση του μεταβολισμού των δεοξυριβονουκλεοτιδίων σε ότι αφορά την λειτουργική διαμερισματοποίηση των δεξαμενών δεοξυριβονουκλεοτιδίων, ο καθορισμός της πραγματικής εντόπισης της ενδογενούς dCK έχει πολύ μεγάλη σημασία.

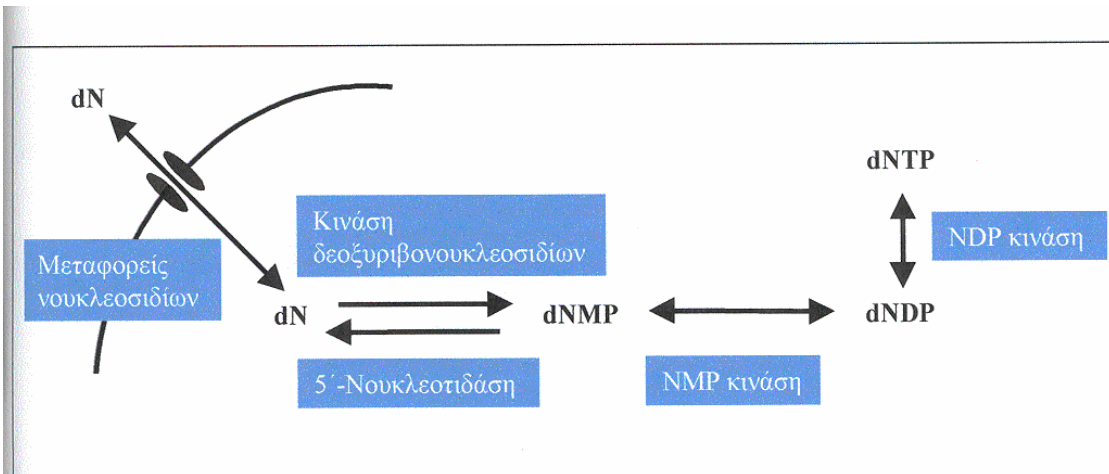
Το αντικείμενο αυτής της εργασίας ήταν η εξέταση του ενδοκυττάρου εντοπισμού της dCK σε διάφορους κυτταρικούς τύπους κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Παρουσιάζονται σημαντικές αποδείξεις ότι η dCK είναι κανονικά εντοπισμένη στο κυτταρόπλασμα. Από την άλλη πλευρά, όταν η dCK υπερεκφράζεται, βρίσκεται κυρίως στον πυρήνα, κάτι που δείχνει ότι ένας μηχανισμός συγκράτησης στο κυτταρόπλασμα ενδέχεται να λειτουργεί σαν ρυθμιστικός παράγοντας της δράσης της.



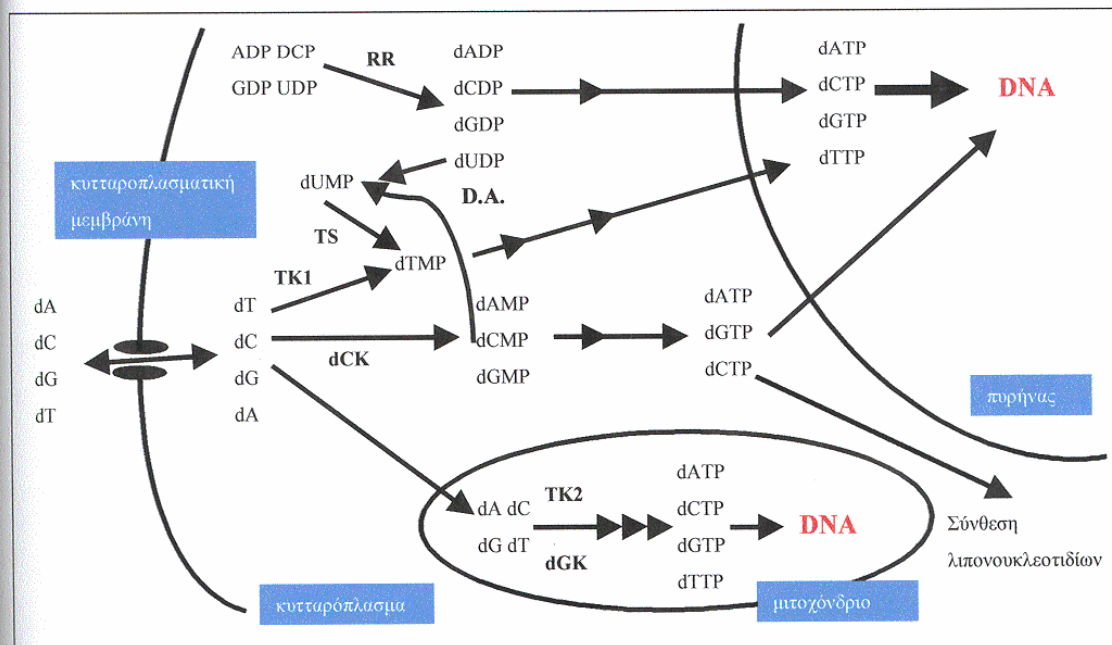
Σχήμα 1. Τα μονοπάτια *de novo* και salvage του μεταβολισμού δεοξυριβονουκλεοσιδίων



Σχήμα 2. Τα κύρια στάδια του μονοπατιού *de novo*.



Σχήμα 3. Το μονοπάτι salvage.



Σχήμα 4. Συνοπτική απεικόνιση των μονοπατιών salvage και *de novo*.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Παραγωγή dCK αντιορού και ανάλυση κατά Western

Συνετέθη ένα πεπτιδίιο ($\text{NH}_2\text{-YESLVEKVKFLSTL-COOH}$) που αντιστοιχεί στα αμινοξέα 246-260 της ανθρώπινης dCK πρωτεΐνης (Chottiner *et al.* 1991), συνδεδεμένη με key hole limpet hemocyanin διαμέσου maleimidobenzoyl-N-hydroxy-succinimide ester σε pH 7.0, όπως έχει περιγραφεί στο (Green *et al.* 1982). Λευκά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας ενέθησαν υποδοριακά με 0.1 mg συνδεδεμένου πεπτιδίου σε πλήρες Freund's adjuvant και ενέθησαν συμπληρωματικά πέντε φορές με 0.04 mg αντιγόνου σε μη πλήρες Freund's adjuvant σε διαστήματα δύο εβδομάδων. Συλλέγησαν αντιοροί και δοκιμάστηκαν με ανάλυση κατά Western σε πηκτώματα που περιείχαν διάφορες ποσότητες καθαρismένης, ανασυνδυασμένης, συνδεδεμένης με His-tag, ανθρώπινης dCK (Karlsson *et al.* 1994) και κυτταρικά εκχυλίσματα από την κυτταρική σειρά CCRF-CEM ή την ανθεκτική σε AraC και ελλειπή σε dCK κυτταρική σειρά CEM- (Hershfield *et al.* 1982). Για την ανοσολογική ανάλυση κατά Western, διαχωρίστηκαν πρωτεΐνες σε πήκτωμα 12% SDS-πολυακρυλαμίδης, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης, ανιχνεύτηκαν με το dCK- α αντίσωμα σε αραίωση 1:5000 και κατόπιν με επώαση με αντίσωμα συνδεδεμένο με HRP (horse raddish peroxidase) (Jackson Laboratories). Τα ανοσοσυμπλέγματα ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο ECL (enhanced chemiluminescence reaction) (Amersham). Ο πολυκλωνικός αντιορός για την πρωτεΐνη P1 (TSG23, προσφορά του C. Hoog) και το μονοκλωνικό αντίσωμα για το myc επίτοπο (υβρίδωμα 9E10, προσφορά του Ν. Τ. Κτιστάκη) χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 1:4000 και 1:1000, αντίστοιχα.

Απομόνωση των υποκυτταρικών κλασμάτων

Η παρασκευή των κυτταρικών και κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων έγιναν ουσιαστικά όπως έχουν περιγραφεί στο (Johnson *et al.* 1995), με μερικές μικρές τροποποιήσεις. Σύντομα, $1-5 \times 10^7$ κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε ισοοσμωτικό ρυθμιστικό διάλυμα λύσης που περιείχε 0.32 M σουκρόζη, 3 mM CaCl_2 , 2mM Mg-acetate, 0.1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM διθειοθρεϊτόλη, 0.5 mM PMSF και 0.5 % (v/v) NP-40. Τα εκχυλίσματα φυγοκεντρήθηκαν σε 500 g για 5 λεπτά και τα υπερκείμενα συμπληρώθηκαν με 0.22 όγκους ρυθμιστικού διαλύματος για κυτταροπλασματική εκχύλιση που

περιείχε 0.15 M HEPES, pH 7.9, 0.7 M KCl και 0.015 M MgCl₂. Μετά από φυγοκέντρηση σε 12000 g για 15 λεπτά, τα υπερκείμενα συμπληρώθηκαν με γλυκερόλη μέχρι 25 % και κρατήθηκαν στους -70 °C. Το πυρηνικό ίζημα ξεπλύθηκε μία φορά σε ισοοσμωτικό ρυθμιστικό διάλυμα λύσης χωρίς NP-40 και επαναδιαλύθηκε σε ένα τροποποιημένο ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης που περιείχε 22 % γλυκερόλη, 125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10 mM διθειοθρεϊτόλη, 1 % SDS, 0.01 % bromophenol blue, 5 mM MgCl₂ και 75 μονάδες/ml βενζονάση.

Ανοσοαφαίρεση και δοκιμή για ενζυμική δραστηριότητα

100 μl (διάλυμα 50 %) από σφαιρίδια (beads) Protein G-Sepharose (Pharmacia) επώαστηκαν με αντιορό dCK-*rep* ή με ορό πριν την ανοσοποίηση (pre-immune serum) (100 μl αντιορού για κάθε mg στεγνού πηκτώματος) για μία ώρα στους 4 °C, σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 M KCl, 1 mM NaF, 1 mM EDTA και 0.5 % NP-40. Τα σφαιρίδια ξεπλύθηκαν με περίσσεια ρυθμιστικού διαλύματος και επώαστηκαν με ακατέργαστα εκχυλίσματα από 5 x 10⁷ CCRF-CEM κύτταρα για μία ώρα. Στο τέλος της επώασης τα σφαιρίδια αφαιρέθηκαν με φυγοκέντρηση και η δράση κινάσης της δεοξυκυτιδίνης και θυμιδίνης των υπερκειμένων μετρήθηκαν με τη δοκιμή πρόσδεσης σε φίλτρο DEAE-κυτταρίνης, όπως έχει περιγραφεί στα (Spasokukotskaja *et al.* 1995, Arner *et al.* 1992).

Κυτταροκαλλιέργειες και παροδικές διαμολύνσεις

Κύτταρα A2780, HeLa και CCRF-CEM μεγάλωσαν σε Dulbecco's modified Eagle Medium και RPMI-1640 medium συμπληρωμένο με 10 % θερμικά αδραντοποιημένο ορό εμβρυϊκού μόσχου. Ο pCMV-myc-dCK φορέας έκφρασης κατασκευάστηκε με σύνδεση του NcoI-BamHI τμήματος με λεία άκρα από το φορέα pET-9d-dCK (Karlsson *et al.* 1994) στη θέση EcoRI του πλασμιδίου pCMV-myc (Stratagene). Η κατασκευή αυτή περιέχει το πλήρες ανθρώπινο dCK συμπληρωματικό DNA (cDNA) στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης με το μήκους 10 αμινοξέων myc επίτοπο κάτω από τον έλεγχο του ισχυρού υποκινητή του κυτομεγαλοϊού (CMV promoter). Αυτή η κατασκευή χρησιμοποιήθηκε για την παροδική διαμόλυνση CCRF-CEM κυττάρων με τη μέθοδο της λιποφεκτίνης (BRL) ή τη μέθοδο της συγκατακρήμνησης με φωσφορικό ασβέστιο όπως έχει περιγραφεί στα (Ktistaki *et al.* 1995, Ktistaki and Talianidis 1997). Τα διαμολυσμένα και μη διαμολυσμένα κύτταρα καθώς και φρέσκα απομονωμένα θυμοκύτταρα και σπληνοκύτταρα μεταφέρθηκαν σε γυάλινες καλυπτρίδες κατεργασμένες με 50 μg/ml poly-D-lysine και αφέθηκαν να προσκολληθούν σε

αυτές για 30 λεπτά. Τα μη προσκολλημένα κύτταρα αφαιρέθηκαν με πλύσιμο των καλυπτρίδων με PBS πριν τη μονιμοποίηση.

Ανάλυση με ανοσοφθορισμό in situ

Τα κύτταρα στις καλυπτρίδες ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS και μονιμοποιήθηκαν για 20 λεπτά με φορμαλίνη 3.7 %. Μετά τη μονιμοποίηση, οι καλυπτρίδες ξεπλύθηκαν δύο φορές με DMEM χωρίς ορό και επωάστηκαν με PBS που περιείχε 1 % αλβουμίνη βόειου ορού (BSA/PBS). Τα αντισώματα dCK-*rep*, *myc-tag* και Sp1 (PEP-2G, Santa Cruz Biotechnology) αραιώθηκαν 1:20 και 1:50 αντίστοιχα σε BSA/PBS και χρησιμοποιήθηκαν στα κύτταρα για 4 ώρες. Μετά από ξέπλυμα με BSA/PBS, τα κύτταρα επωάστηκαν για 30 λεπτά με αραιωμένα (1:100) anti-rabbit ή anti-mouse δεύτερα αντισώματα σε IgG (Pierce), συνδεδεμένα με fluorescein isothiocyanate, ξεπλύθηκαν με BSA/PBS και κατόπιν με νερό και τοποθετήθηκαν σε γυάλινες αντικειμενοφόρους πάνω σε Mowiol (Polyscience), όπως έχει περιγραφεί στα (Ktistaki *et al.* 1995, Ktistaki and Talianidis 1997). Τα φθορίζοντα σήματα παρατηρήθηκαν και φωτογραφήθηκαν σε ένα μικροσκόπιο Leitz Dialux 20 EB εφωδισμένο με οπτικά για επιφθορισμό.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αρχικά παράχθηκε πολυκλωνικό αντισώμα για ένα πεπτίδιο μήκους 15 αμινοξέων που αντιστοιχεί στην καρβοξυτελική περιοχή της ανθρώπινης dCK. Αναλύθηκαν με τη μέθοδο Western καθαρισμένη ανθρώπινη dCK, καθώς και ακατέργαστα εκχυλίσματα από κύτταρα CCRF-CEM και από την ανθεκτική σε AraC και ελλειπή σε dCK κυτταρική σειρά CEM- με αυτό το αντίσωμα. Το αντίσωμα αντέδρασε άμεσα με ανασυνδυασμένη dCK και με ένα μοναδικό είδος από τις πρωτεΐνες CCRF-CEM, που είχε μοριακό βάρος περίπου 30 kD (Εικόνα 1 A και B). Αυτή η ζώνη δεν υπήρχε στα εκχυλίσματα που παρήχθησαν από την ελλειπή σε dCK κυτταρική σειρά CEM- (Εικόνα 1 B). Παρότι μικρότερες συγκεντρώσεις αντισώματος ή μεγαλύτεροι χρόνοι έκθεσης αποκάλυπταν κάποιο μικρό θόρυβο, η ζώνη των 30 kD υπερίσχυε πάντοτε στην εικόνα. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το αντίσωμα είναι πολύ ειδικό για dCK. Περαιτέρω ενδείξεις για την ειδικότητα του αντισώματος προήλθε από μετρήσεις για τη δράση κινάσης της δεοξυκυτιδίνης σε ακατέργαστα εκχυλίσματα από κύτταρα CCRF-CEM. Όταν αυτά τα εκχυλίσματα είχαν προεπωαστεί με αντίσωμα dCK-*rep* συνδεδεμένο με Protein G-Sepharose, η *in vitro* φωσφορυλίωση της δεοξυκυτιδίνης μειώθηκε πάρα πολύ, ενώ η φωσφορυλίωση της θυμιδίνης δεν επηρεάστηκε (Εικόνα 1 Γ).

Για να μελετηθεί ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός της dCK, έγινε κατ' αρχήν βιοχημική κλασματοποίηση κυτταροπλασμάτων και πυρηνών από τρεις κυτταρικές σειρές διαφορετικής προέλευσης, όπως η κυτταρική σειρά ανθρώπινης κακοήθους T λεμφοβλαστοειδούς λευχαιμίας CCRF-CEM, η κυτταρική σειρά καρκινώματος ωοθήκης A2780 και η κυτταρική σειρά ανθρώπινου κοιλιακού καρκινώματος HeLa. Χρησιμοποιήθηκε μία διαδικασία ισοοσμωτικής λύσης με NP-40 ως εναλλακτική της κοινής υποτονικής λύσης με NP-40 για την απομόνωση άθικτων πυρηνών και την ακριβή σύγκριση της περιεκτικότητας σε dCK των πυρηνών και κυτταροπλασμάτων. Η ανάλυση κατά Western αυτών των εκχυλισμάτων έδειξε ότι το μεγαλύτερο μέρος της κυτταρικής dCK ήταν εντοπισμένη στα κυτταροπλασματικά κλάσματα, ενώ οι πυρήνες περιείχαν μόνο ένα μικρό μέρος της πρωτεΐνης (Εικόνα 2 A). Για να αποκλειστεί η πιθανότητα πιθανής διαφυγής της dCK από τους πυρήνες στο κυτταρόπλασμα κατά τη διαδικασία κλασματοποίησης εξετάστηκε η διανομή της πυρηνικής πρωτεΐνης P1

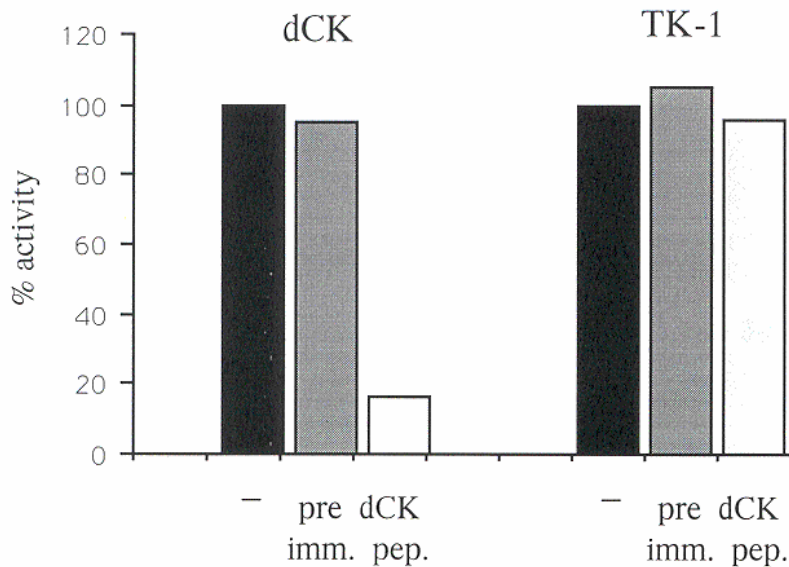
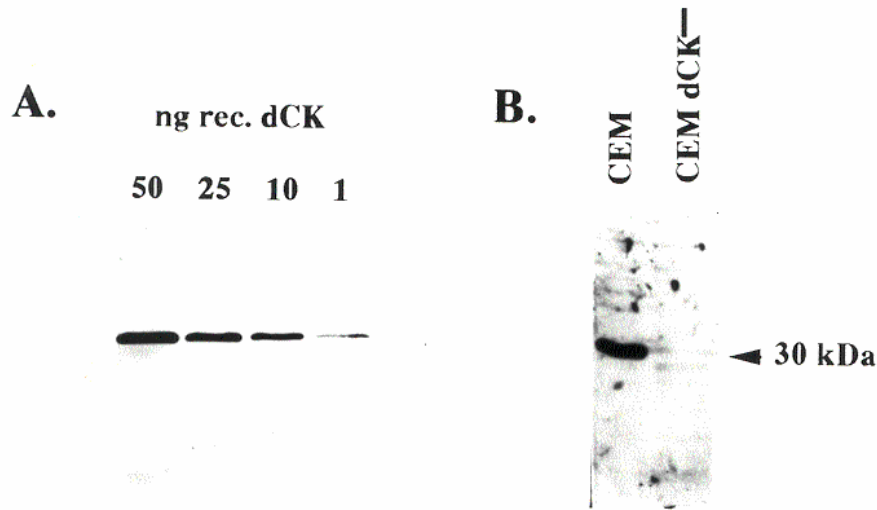
στο κύτταρο. Η P1 είναι μία πρωτεΐνη μοριακού βάρους 105 kD η οποία είναι παρούσα μόνο στον πυρήνα κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα θηλαστικών (Starborg *et al.* 1995). Η διανομή της P1 επιλέχθηκε σαν πείραμα ελέγχου γιατί είναι μία “ελεύθερη” πρωτεΐνη στον πυρήνα, μη συσχετιζόμενη με χρωματίνη ή δομικά συστατικά του πυρήνα, το οποίο την καθιστά ένα αξιόπιστο μάρτυρα για την εξέταση διαρροής πρωτεϊνών από τον πυρήνα (Starborg *et al.* 1995). Ανιχνεύθηκαν δύο έντονες ζώνες γύρω στα 105 kD στο πυρηνικό κλάσμα κυττάρων A2780 με τον αντιορό για P1 (Εικόνα 2 Β). Μόνο ίχνη αυτών των ζωνών ήταν ορατά στα κυτταροπλασματικά κλάσματα, μαζί με λίγες μη ειδικές ζώνες (Εικόνα 2 Β), ισχυρή ένδειξη ότι η πυρήνες παρέμεναν ακέραιοι σε μεγάλο βαθμό κατά τη διαδικασία κλασματοποίησης.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι η dCK είναι κυτταροπλασματική πρωτεΐνη. Αυτό έρχεται σε αντιπαράθεση με τα αποτελέσματα προηγούμενης έρευνας όπου χρησιμοποιήθηκε μία χιμαιρική dCK-GFP πρωτεΐνη, η οποία ήταν εντοπισμένη κυρίως στον πυρήνα (Johansson *et al.* 1997). Ένας πιθανός λόγος για αυτή την ασυμφωνία θα μπορούσε να είναι ότι, όταν η dCK υπερεκφράζεται τεχνητά, αλλάζει ο εντοπισμός της σε σύγκριση με τον εντοπισμό της σε κύτταρα που εκφράζουν φυσιολογικά επίπεδα της πρωτεΐνης. Για να ελεγχθεί αυτή η πιθανότητα έγινε παροδική διαμόλυνση κυττάρων CCRF-CEM, A2780 και HeLa με ένα φορέα έκφρασης που περιείχε το συμπληρωματικό DNA (cDNA) της dCK υπό τον έλεγχο του CMV υποκινητή. Έγινε επίσης τήξη (fusion) της αλληλουχίας του μήκους 10 αμινοξέων myc επιτόπου στο αμινοτελικό άκρο του cDNA της dCK για να μπορεί να παρακολουθηθεί η έκφραση της υπερεκφρασμένης από το διαγονίδιο πρωτεΐνης ανεξάρτητα από την ενδογενή dCK. Ανάλυση κατά Western χρησιμοποιώντας ένα αντίσωμα που αναγνωρίζει το myc επίτοπο έδειξε ότι η υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη ήταν εντοπισμένη κυρίως στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 2 Γ). Έτσι φαίνεται πιθανό ότι ο πυρηνικός εντοπισμός της dCK που παρατηρείται με την dCK-GFP χιμαιρική πρωτεΐνη οφείλεται στην υπερέκφρασή της στα κύτταρα.

Για να επιβεβαιωθούν αυτά τα αποτελέσματα *in situ* έγιναν πειράματα έμμεσου ανοσοφθορισμού με τις παραπάνω κυτταρικές σειρές, καθώς και με λεμφοκύτταρα από θύμο και σπλήνα ποντικού. Ένα περιφερικό πρότυπο χρώσης σαν δαχτυλίδι, χαρακτηριστικό της λεπτής κυτταροπλασματικής περιοχής των λεμφοειδών κυττάρων, ήταν ορατό στα κύτταρα CCRF-CEM, στα σπληνοκύτταρα και στα θυμοκύτταρα (Εικόνα 3 Α, Δ, Ε). Έντονη

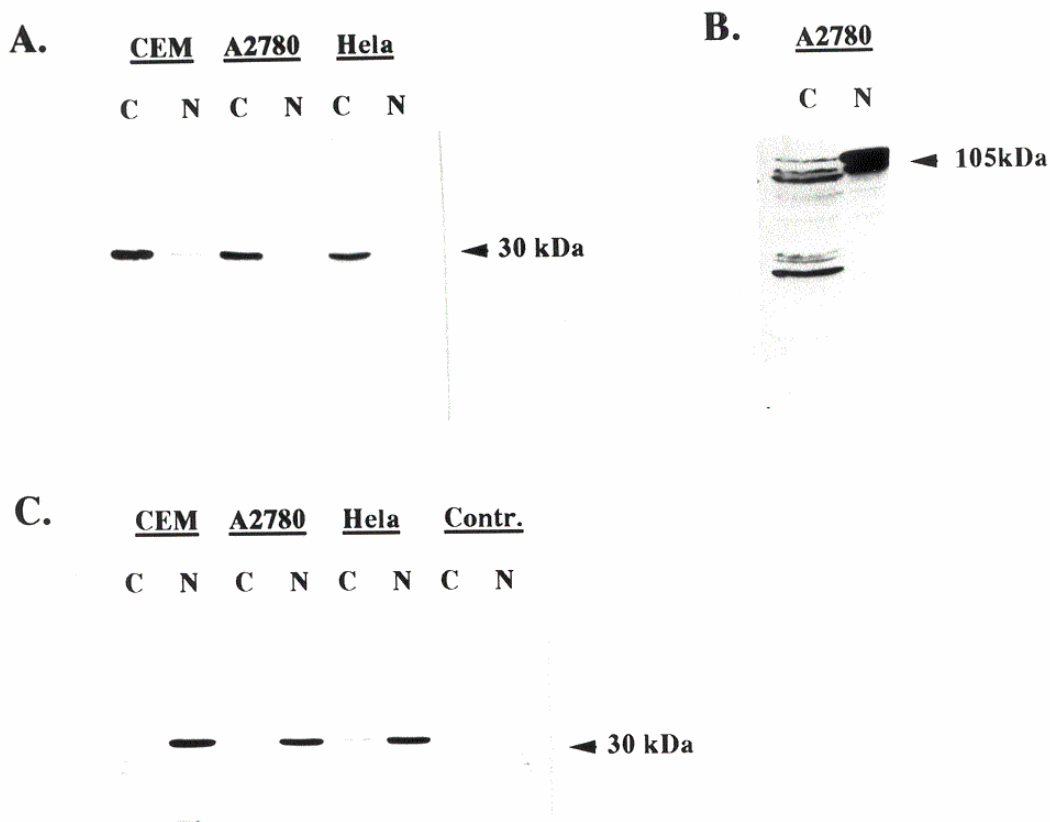
κυτταροπλασματική αλλά όχι πυρηνική χρώση ήταν ορατή στα κύτταρα A2780 και HeLa. Στους δύο τελευταίους αυτούς κυτταρικούς τύπους, και κυρίως σε κύτταρα όπου λόγω του λιγότερο έντονου σήματος η διακριτική ικανότητα ήταν μεγαλύτερη, μία ανομοιόμορφη κατανομή της dCK ήταν ορατή. Η πρωτεΐνη ήταν συγκεντρωμένη κυρίως στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και περιοχή γύρω από τον πυρήνα, κάτι που μπορεί να σχετίζεται με ξεχωριστά λειτουργικά διαμερίσματα για μεταβολισμό δεοξυνουκλεοσιδίων (βλέπε συζήτηση). Η ειδικότητα του σήματος επαληθεύτηκε από την έλλειψη ανοσοαντιδραστικότητας όταν το αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε στα κύτταρα παρουσία περίσσειας καθαρής ανασυνδυασμένης dCK πρωτεΐνης (Εικόνα 3 ΣΤ).

Ο *in situ* εντοπισμός της υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης αναλύθηκε με ανοσοχρώση των παροδικά διαμολυσμένων κυττάρων με το αντίσωμα myc-tag. Το προερχόμενο από το διαγονίδιο ένζυμο ήταν εντοπισμένο σχεδόν αποκλειστικά στον πυρήνα και στις τρεις κυτταρικές σειρές, όπως είναι φανερό από το πρότυπο χρώσης που έδωσε το αντίσωμα myc-tag (Εικόνα 4 Α, Β, Γ) και το αντίσωμα ελέγχου που αναγνωρίζει την πυρηνική πρωτεΐνη Sp1 (Εικόνα 4 Δ, Ε, ΣΤ). Η ίδια κατανομή ήταν ορατή και όταν τα κύτταρα διαμολύνθηκαν παροδικά με ένα φορέα έκφρασης χωρίς myc επίτοπο και έγινε χρώση με το αντίσωμα dCK-*rep* (τα αποτελέσματα δεν δείχνονται), κάτι που αποκλείει την πιθανότητα τεχνητής μετακίνησης της dCK από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα σαν αποτέλεσμα του μικρού myc επιτόπου στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Το συμπέρασμα από τα παραπάνω είναι ότι ο πυρηνικός εντοπισμός της dCK σε παροδικά διαμολυσμένα κύτταρα είναι αποτέλεσμα των πολύ αυξημένων ενδοκυτταρικών επιπέδων της.



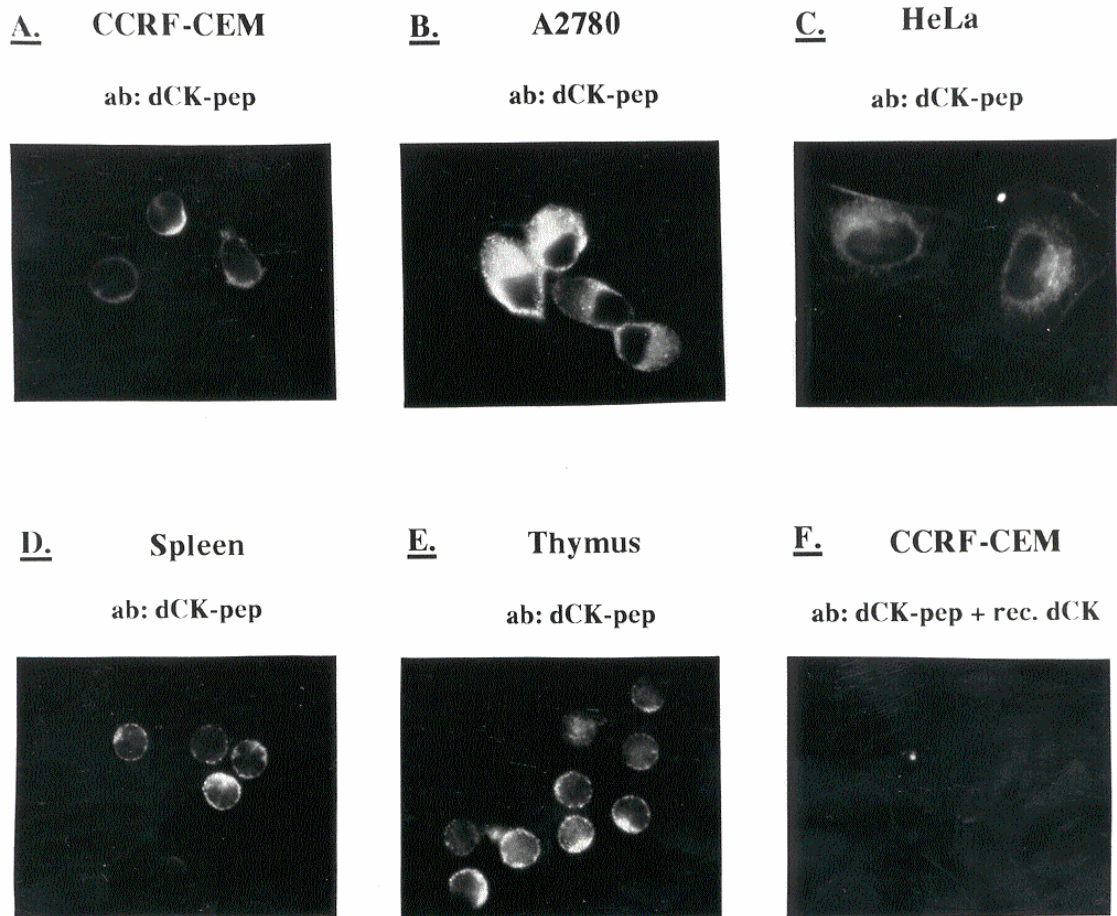
Εικόνα 1. Ειδικότητα του αντιορού dCK-per.

Οι σημειωμένες τιμές καθαρισμένης ανασυνδυασμένης dCK (A) και ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων από κύτταρα CCRF-CEM και CEM-dCK- (B) διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα 12 % SDS-πολυακρυλαμίδης, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης και δοκιμάστηκαν με το dCK-per αντίσωμα. Γ. Σε ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα κυττάρων CCRF-CEM έγινε ανοσοεξάντληση με επώαση με μη ανοσοποιημένο ορό (pre imm.) και με dCK-per αντιορό μη συνδεδεμένο (-) και συνδεδεμένο με protein G-Sepharose και δοκιμάστηκαν για ενεργότητα dCK και TK. Οι τιμές 100 % αντιπροσωπεύουν τις ενεργότητες που ανιχνεύτηκαν σε εκχυλίσματα στα οποία έχει γίνει ανοσοεξάντληση με αντιορό μη συνδεδεμένο με protein G-Sepharose.

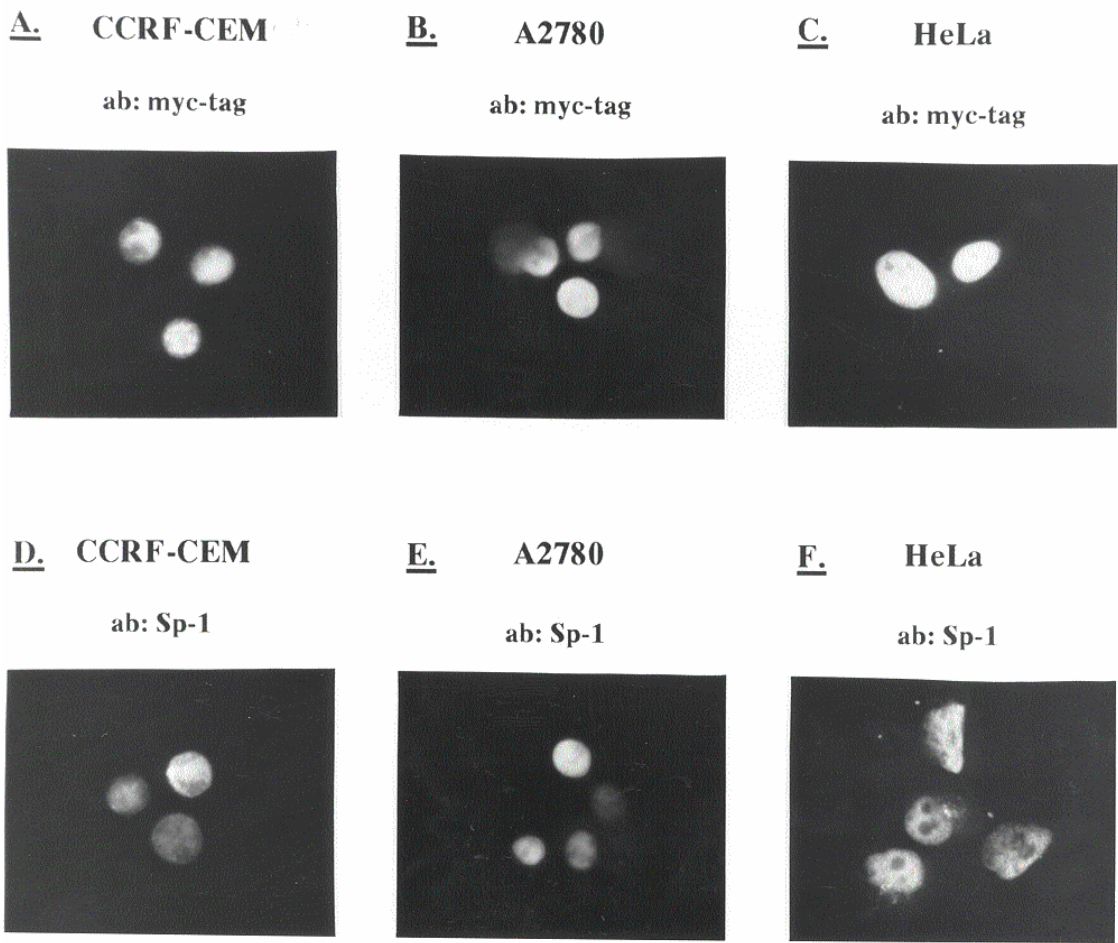


Εικόνα 2. Κατανομή της dCK σε βιοχημικά κλασματοποιημένα κυτταρικά διαμερίσματα.

A. Κυτταροπλασματικά (C) και πυρηνικά (N) εκχυλίσματα από κύτταρα CCRF-CEM (CEM), A2780 και HeLa παρήχθησαν και αναλύθηκαν κατά Western με το dCK-*rep* αντιγόνο. B. Ανάλυση κατά Western κυτταροπλασματικών (C) και πυρηνικών (N) εκχυλισμάτων από κύτταρα A2780 με το αντίσωμα που αναγνωρίζει την πυρηνική πρωτεΐνη P1. Γ. Σε κύτταρα CCRF-CEM (CEM), A2780 και HeLa έγινε παροδική διαμόλυνση με το πλασμίδιο pCMV-myc-dCK, παρήχθησαν κυτταροπλασματικά (C) και πυρηνικά (N) εκχυλίσματα τα οποία αναλύθηκαν κατά Western χρησιμοποιώντας το αντίσωμα myc-tag. Οι σειρές ελέγχου αντιπροσωπεύουν εκχυλίσματα από μη διαμολυσμένα κύτταρα A2780 (Contr.)



Εικόνα 3. Η ενδογενής dCK εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Κύτταρα CCRF-CEM (A και F), A2780 (B), HeLa (C), πρωτογενή σπληνοκύτταρα (D) και πρωτογενή θυμοκύτταρα (E) μονιμοποιήθηκαν σε γυάλινες καλυπτρίδες και δοκιμάστηκαν με το αντίσωμα dCK-pep. Στην φωτογραφία F 10 µg καθαρής ανασυνδυασμένης dCK προστέθηκαν στην ανοσοαντίδραση. Οι φωτογραφίες αντιπροσωπεύουν μεγέθυνση x800 για τα κύτταρα CCRF-CEM, A2780 και HeLa και x1600 για τα σπληνοκύτταρα και θυμοκύτταρα.



Εικόνα 4. Η εξωγενής υπερεκφρασμένη dCK εντοπίζεται στον πυρήνα. Κύτταρα CCRF-CEM (A), A2780 (B) και HeLa (C) διαμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο pCMV-myc-dCK και δοκιμάστηκαν με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει το myc επίτοπο. Σε παράλληλες καλυπτρίδες τα ίδια κύτταρα δοκιμάστηκαν με αντίσωμα που αναγνωρίζει την ενδογενή πυρηνική πρωτεΐνη Sp1 (φωτογραφίες D, E και F).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στα κύτταρα θηλαστικών, τα δεοξυριβονουκλεοτίδια που είναι απαραίτητα για τον αναδιπλασιασμό και την επιδιόρθωση του DNA συντίθενται κυρίως μέσω του μονοπατιού *de novo*, το οποίο περιλαμβάνει αναγωγή διφωσφορικών ριβονουκλεοτιδίων από το ένζυμο ρεδοκτάση ριβονουκλεοτιδίων, ή μέσω της απ' ευθείας φωσφορυλίωσης δεοξυριβονουκλεοτιδίων που εισάγονται από τον εξωκυττάριο χώρο ή προέρχονται από αποφωσφορυλίωση δεοξυριβονουκλεοτιδίων (Reichard 1988). Ένα παλιότερο μοντέλο που είχε προταθεί για να εξηγήσει τη λειτουργική σχέση μεταξύ του μεταβολισμού των πρόδρομων μορίων των δεοξυριβονουκλεοτιδίων και του αναδιπλασιασμού του DNA πρότεινε φυσικό συσχετισμό της DNA πολυμεράσης α με μερικά ένζυμα κλειδιά του μεταβολισμού δεοξυριβονουκλεοτιδίων (Reddy and Pardee 1983). Το “μοντέλο ρεπλιτάσης” αυτό έχει από τότε αμφισβητηθεί εξαιτίας διαφόρων παρατηρήσεων, όπως το εύρημα ότι τα ένζυμα που πιστευόταν ότι είναι συστατικά του πολυενζυμικού συμπλέγματος της ρεπλιτάσης ήταν εντοπισμένα σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα (Engstroem *et al.* 1984, Engstroem and Rozell 1988). Επίσης, κινητικά πειράματα ενσωμάτωσης ισοτόπων δείχνουν ότι μάλλον τα πρόδρομα μόρια δεν διοχετεύονται απ' ευθείας στα σημεία που γίνεται αναδιπλασιασμός του DNA (Bianchi *et al.* 1997). Αυτές οι μελέτες οδήγησαν στην καθιέρωση της άποψης ότι προηγείται η σύνθεση των δεοξυριβονουκλεοτιδίων στο κυτταρόπλασμα και έπεται η μεταφορά τους στον πυρήνα και η συμμετοχή τους στον αναδιπλασιασμό και την επιδιόρθωση του DNA. Το πρόσφατο εύρημα ότι η χιμαιρική GFP-dCK πρωτεΐνη ήταν εντοπισμένη στο κυτταρόπλασμα προκάλεσε το εύλογο ερώτημα μήπως υπήρχε μια ενδιαφέρουσα εξαίρεση στον παραπάνω κανόνα (Johansson *et al.* 1997). Πάντως, η πιθανότητα ότι η dCK είναι αποκλειστικά πυρηνική πρωτεΐνη δημιούργησε διάφορες ερωτήσεις. Παρότι ο πυρηνικός αυτός εντοπισμός θα ευνοούσε την απ' ευθείας παροχή δεοξυκυτιδίνης για τον αναδιπλασιασμό του DNA, κάνει δύσκολη την εξήγηση δεδομένων που έχουν προκύψει από κινητικά πειράματα ενσωμάτωσης ισοτόπων. Αυτές οι μελέτες προτείνουν την ύπαρξη δύο δεξαμενών δεοξυκυτιδίνης: μία που σημαίνεται κυρίως από το μονοπάτι *de novo* και χρησιμοποιούνται απ' ευθείας στον αναδιπλασιασμό του DNA και μία που σημαίνεται από δεοξυκυτιδίνη και χρησιμοποιείται κυρίως για τη σύνθεση

λιπονουκλεοτιδίων (Spyrou and Reichard 1987, Spyrou and Reichard 1989, Spasokukotskaja *et al.* 1988, Spasokukotskaja *et al.*

1991). Παρότι αυτή η δεύτερη “κυτταροπλασματική” δεξαμενή δεοξυκυτιδίνης είναι σε ταχύτερη ισορροπία με αυτή που προέρχεται από τη σύνθεση *de novo* και μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά για τη σύνθεση του DNA (Bianchi *et al.* 1997, Spyrou and Reichard 1987, Spyrou and Reichard 1989, Spasokukotskaja *et al.* 1988, Spasokukotskaja *et al.* 1991), είναι δύσκολο να φανταστεί κανείς γιατί η δεξαμενή από σύνθεση *de novo*, η οποία είναι η κύρια πηγή πρόδρομων μορίων για τη σύνθεση πυρηνικού DNA, συντηρείται από κυτταροπλασματικά ένζυμα όπως η ρεδοκτάση ριβονουκλεοτιδίων, ενώ η δεξαμενή από το salvage μονοπάτι, η οποία πρέπει να έρθει σε ισορροπία πρώτα με τη δεξαμενή *de novo* για να χρησιμοποιηθεί στον αναδιπλασιασμό του DNA, να δομείται από ένζυμα εντοπισμένα στον πυρήνα. Επιπροσθέτως, μια πυρηνικά εντοπισμένη dCK σαν το ρυθμο-περιοριστικό ένζυμο της παροχής δεοξυκυτιδίνης για τη σύνθεση λιπονουκλεοτιδίων έρχεται σε αντιδιαστολή με την ταχύτερη σήμανση αυτών των πρόδρομων μορίων φωσφολιπιδίων σε κινητικά πειράματα ενσωμάτωσης ισοτόπων, ακόμη και αν υποθέσει κανείς ότι η ροή δεοξυκυτιδίνης διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης είναι ελεύθερη (Spyrou and Reichard 1987, Spyrou and Reichard 1989, Spasokukotskaja *et al.* 1988, Spasokukotskaja *et al.* 1991).

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται σε αυτή την εργασία δείχνουν ότι η dCK είναι εντοπισμένη κυρίως στο κυτταρόπλασμα, ένας εντοπισμός που βρίσκεται σε μεγαλύτερη συμφωνία με προηγούμενες μεταβολικές μελέτες. Αυτό το συμπέρασμα βασίζεται σε δύο ανεξάρτητες προσεγγίσεις, στη χρησιμοποίηση δηλαδή βιοχημικής κλασματοποίησης κυττάρων και πειραμάτων *in situ* ανοσοφθορισμού. Κυτταροπλασματικός εντοπισμός της dCK παρατηρήθηκε σε τρεις κυτταρικούς τύπους διαφορετικής προέλευσης, καθώς και σε πρωτογενή θυμοκύτταρα και σπληνοκύτταρα. Σε προσκολλόμενα κύτταρα, όπως A2780 και HeLa, όπου η ενδοπλασματική διανομή μπορούσε να διακριθεί καλύτερα, παρατηρήθηκε πυκνότερη χρώση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και της περιοχής γύρω από την πυρηνική μεμβράνη. Αυτός ο εντοπισμός οδηγεί και στην υπόθεση ότι αυτή η ανόμοια κατανομή της dCK, εάν είναι πραγματική, μπορεί και να έχει λειτουργική σημασία, αντιστοιχώντας σε διαμερισματοποίηση η οποία σχετίζεται με παροχή δεοξυκυτιδίνης για σύνθεση πρόδρομων μορίων φωσφολιπιδίων (η dCK στην κυτταρική μεμβράνη) και για αναδιπλασιασμό του DNA (η dCK στην πυρηνική μεμβράνη). Μία άλλη πιθανότητα είναι ότι μπορεί να αντιπροσωπεύει ανεξάρτητα διαμερίσματα για την φωσφορυλίωση εξωγενούς δεοξυκυτιδίνης αμέσως μετά τη μεταφορά της στο κύτταρο και δεοξυκυτιδίνης

προερχόμενης από τη διάσπαση ενδογενούς δεοξυκυτιδίνης, αντίστοιχα. Για να επιλυθεί η αντίφαση που

δημιουργήθηκε από τον πυρηνικό εντοπισμό της χιμαιρικής GFP-dCK πρωτεΐνης και την κυτταροπλασματική εντόπιση της ενδογενούς dCK, διερευνήθηκε εάν το πρώτο είναι αποτέλεσμα της υπερέκφρασης της χιμαιρικής πρωτεΐνης στα κύτταρα. Βρέθηκε ότι αυτό πράγματι συμβαίνει, καθώς παροδική διαμόλυνση με ένα φορέα έκφρασης που κωδικοποιεί το cDNA της ανθρώπινης dCK, το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της dCK κατά μερικές τάξεις μεγέθους, προκαλεί τον εντοπισμό της πρωτεΐνης στον πυρήνα σε όλους τους κυτταρικούς τύπους που εξετάστηκαν. Αυτό το εύρημα δείχνει ότι η dCK έχει τη δυνατότητα να εισέρχεται στον πυρήνα. Περαιτέρω ενδείξεις για αυτή την ιδέα δόθηκαν από την ταυτοποίηση μιας consensus αλληλουχίας πυρηνικής εισαγωγής στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης, του οποίου η μεταλλαγή εμποδίζει την είσοδο στον πυρήνα ακόμη και της υπερεκφρασμένης χιμαιρικής GFP-dCK πρωτεΐνης (Johansson *et al.* 1997).

Το σύνολο όλων των παραπάνω ευρημάτων οδηγεί στην πρόταση της ύπαρξης ενός μηχανισμού κυτταροπλασματικής συγκράτησης για την dCK, η οποία μπορεί να περιλαμβάνει τη δράση μιας άλλης πρωτεΐνης σε σύμπλεγμα με τη dCK, που την κρατάει στο κυτταρόπλασμα. Όταν η dCK υπερεκφράζεται και εξαιτίας των οριακών ποσοτήτων της πρωτεΐνης που κρατάει την dCK στο κυτταρόπλασμα, η πλειονότητα των μορίων της dCK θα περιέχει προσιτές αλληλουχίες πυρηνικού εντοπισμού προς αναγνώριση από το μηχανισμό πυρηνικής μεταφοράς. Μία ανάλογη κατάσταση έχει περιγραφεί για τον πυρηνικό μεταγραφικό παράγοντα NFκB, του οποίου η ρύθμιση περιλαμβάνει φωσφορυλίωση επαγόμενη από κυτοκίνες του ζευγαριού του, IκB, που το κρατάει στο κυτταρόπλασμα. Η φωσφορυλίωση αυτή οδηγεί στη διάσπαση του συμπλέγματος NFκB/IκB και στη μετακίνηση των ενεργών NFκB υπομονάδων στον πυρήνα (Gosh and Baltimore 1990, Beg and Baldwin 1993). Ένα εναλλακτικό μοντέλο περιλαμβάνει μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της ίδιας της dCK, οι οποίες μπορεί να είναι απαραίτητες για είσοδο στον πυρήνα, σε αναλογία με αυτό που ισχύει για τους μεταγραφικούς παράγοντες που ενέχονται στα μονοπάτια σηματοδότησης μέσω ιντερφερόνης (Darnell *et al.* 1994). Παρότι σε αυτό το σημείο ο πραγματικός μηχανισμός που κρατάει την dCK στο κυτταρόπλασμα δεν είναι γνωστός, τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται εδώ αφήνουν ανοιχτή την πιθανότητα ότι, κάτω από κάποιες φυσιολογικές συνθήκες, η μεταφορά του ενζύμου μεταξύ υποκυττάρων διαμερισμάτων μπορεί να ενέχεται στη ρύθμιση της λειτουργίας του και συνεπώς στην παροχή δεοξυριβονουκλεοτιδίων για διαφορετικές βιολογικές διαδικασίες.

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΑ ΣΧΕΔΙΑ-ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Ο στόχος αυτής της εργασίας ήταν ο καθορισμός της ενδοκυττάριας εντόπισης της ανθρώπινης κινάσης της δεοξυκυτιδίνης. Το ενδιαφέρον για αυτή την εργασία γεννήθηκε από το πρόσφατο εύρημα ότι μία χιμαιρική κατασκευή GFP-dCK, μετά από παροδική διαμόλυνση σε κύτταρα, ήταν εντοπισμένη στον πυρήνα (Johansson *et al.* 1997). Στην ίδια δημοσίευση είχε αναφερθεί η ύπαρξη μίας εν δυνάμει αλληλουχίας πυρηνικού εντοπισμού στο αμινοτελικό άκρο της dCK, μεταλλαγή της οποίας οδηγούσε σε κυτταροπλασματικό εντοπισμό της υπερεκφρασμένης χιμαιρικής GFP-dCK πρωτεΐνης. Το αποτέλεσμα αυτό παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, μια και μέχρι τότε πιστευόταν ότι η dCK είναι κυτταροπλασματική πρωτεΐνη. Η παρούσα εργασία, παρότι επιβεβαιώνει αυτή την ιδέα, αφήνει ανοιχτά πολλά ερωτήματα. Αφενός, η διαχωριστική ικανότητα των πειραμάτων που έγιναν δεν είναι τέτοια που να αποκλείει μια πυρηνική εντόπιση της πρωτεΐνης· μέρος της ενδέχεται να βρίσκεται στον πυρήνα των κυττάρων που δοκιμάστηκαν. Εναλλακτικά, ακόμη και αν αυτό δεν ισχύει, τίποτε δεν αποκλείει την πιθανότητα το ένζυμο να εντοπίζεται στον πυρήνα σε άλλους τύπους κυττάρων που δε χρησιμοποιήθηκαν εδώ ή κάτω από άλλες συνθήκες. Σε αυτό συνηγορεί και το γεγονός ότι η dCK περιέχει μια λειτουργική και εξελικτικά συντηρημένη αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού, η οποία έχει τη δυνατότητα να οδηγεί την πρωτεΐνη στον πυρήνα, σε συνθήκες υπερέκφρασής της. Το τελευταίο αποτέλεσμα εξηγήθηκε με την υπόθεση ότι υπάρχει ένας μηχανισμός συγκράτησης της dCK στο κυτταρόπλασμα, και ότι αυτός ο μηχανισμός είναι κορεσμένος και δεν επαρκεί για να συγκρατήσει την υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη στο κυτταρόπλασμα. Θα μπορούσε όμως να φανταστεί κανείς και συνθήκες εκτός από υπερέκφραση, κάτω από τις οποίες ο μηχανισμός που συγκρατεί την dCK στο κυτταρόπλασμα ανενεργοποιείται και η πρωτεΐνη εισέρχεται στον πυρήνα. Αυτό θα μπορούσε να συμβαίνει σε συνθήκες εκτεταμένων βλαβών στο πυρηνικό DNA. Η μεγάλη ανάγκη για την παροχή δεοξυριβονουκλεοτιδίων για την επισκευή του DNA θα μπορούσε σε αυτές τις περιπτώσεις να καλύπτεται από την dCK και άλλα ένζυμα του salvage μονοπατιού της σύνθεσης δεοξυριβονουκλεοτιδίων, ειδικά επειδή μέσω του μονοπατιού αυτού η παραγωγή προδρομων μορίων για τη σύνθεση DNA είναι ιδιαίτερα ταχεία.

Το πρώτο στάδιο για την εύρεση απαντήσεων σε αυτά τα ερωτήματα είναι η επαλήθευση της ύπαρξης του πιθανολογούμενου μηχανισμού κατακράτησης της dCK

στο κυτταρόπλασμα. Οι δύο πιθανοί εναλλακτικοί μηχανισμοί που έχουν προταθεί σε αυτή την εργασία είναι η ύπαρξη μιας πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα που, σε σύμπλεγμα με την dCK, την κρατά εντοπισμένη εκεί ή/και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της dCK, όπως φωσφορυλίωση μέσω κάποιου μονοπατιού μετάδοσης μηνυμάτων, που θα έχει το ίδιο αποτέλεσμα. Η ύπαρξη του πρώτου μηχανισμού είναι πιο πιθανή, καθώς πειράματα προς τη δεύτερη πρόταση έχουν ήδη γίνει, χωρίς όμως αποτέλεσμα. Πιο συγκεκριμένα, σε κύτταρα των τριών κυτταρικών σειρών CCRF-CEM, A2780 και HeLa έγινε χορήγηση φαρμάκων, όπως forskolin, PMA, staurosporin, genistein και okadic acid, που ενεργοποιούν ή παρεμποδίζουν φωσφορυλίωση πρωτεϊνών στο κύτταρο, χωρίς να γίνουν ορατές σημαντικές αλλαγές στην εντόπιση ούτε της ενδογενούς ούτε της εξωγενούς υπερεκφρασμένης dCK, όπως διαπιστώθηκε μετά από πειράματα ανοσοφθορισμού. Η πιθανότητα ότι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της dCK, όπως φωσφορυλίωση, ενέχονται στον μηχανισμό συγκράτησής της στο κυτταρόπλασμα πρέπει ίσως να διερευνηθεί περισσότερο, θα δοθεί όμως περισσότερη βαρύτητα στην ιδέα ότι η παραμονή της στο κυτταρόπλασμα οφείλεται στην αλληλεπίδρασή της με άλλη πρωτεΐνη.

Διάφορες τεχνικές υπάρχουν για να διερευνηθεί η ύπαρξη ενός τέτοιου μηχανισμού: ραδιοσήμανση κυττάρων με ³⁵S-μεθειονίνη, ανοσοκατακρήμνηση σε εκχυλισμάτα τους με το dCK-*rep* αντίσωμα και ανάλυση των πρωτεϊνών που κατεβάζει το αντίσωμα σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμίδης, ακολουθούμενη από αυτοραδιογραφία. Η παρουσία άλλης πρωτεΐνης/πρωτεϊνών εκτός από την dCK στην αυτοραδιογραφία δίνει βάρος στην υπόθεση ύπαρξης του προτεινόμενου μηχανισμού. Παραλλαγή αυτής της τεχνικής αποτελεί η κατακρήμνηση κυτταρικών εκχυλισμάτων ραδιοσημασμένων με ³⁵S-μεθειονίνη κυττάρων με GST-dCK.

Η κλωνοποίηση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την dCK μπορεί να γίνει μέσω του συστήματος των δύο υβριδίων, με δόλωμα (bait) την dCK. Πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την dCK σε αυτό το σύστημα μπορούν να εξεταστούν περαιτέρω για δράση συγκράτησης της dCK στο κυτταρόπλασμα με *in situ* ανοσοφθορισμό σε κυτταρικές σειρές παροδικά διαμολυσμένες με myc-dCK και την πρωτεΐνη υπό μελέτη. Μόνη της η υπερεκφρασμένη dCK εντοπίζεται στον πυρήνα, μαζί με την πρωτεΐνη υπό μελέτη και εάν η τελευταία ενέχεται στον μηχανισμό συγκράτησης της dCK στο κυτταρόπλασμα, θα πρέπει να οδηγήσει την dCK εκεί.

Εάν τα παραπάνω πειράματα δώσουν απάντηση ως προς την ύπαρξη του προτεινόμενου μηχανισμού, το επόμενο βήμα θα είναι η διερεύνηση των πιθανών συνθηκών κάτω από τις οποίες ο εντοπισμός της dCK υπόκειται σε ρυθμιστικές αλλαγές (π.χ. φωσφορυλίωση, μεθυλίωση, κτλ.), η μελέτη δηλαδή ενός ρυθμιστικού

μηχανισμού με πολύ μεγάλη σημασία για την παροχή δεοξυριβονουκλεοτιδίων για διάφορες βιολογικές διεργασίες στο κύτταρο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ahluwalia**, G. S., Gao, W-Y., Mitsuya, H. and Johns, D. G. (1996) 2',3'-didehydro-3'-deoxythymidine: Regulation of its metabolic activation by modulators of thymidine-5'-triphosphate biosynthesis. *Mol. Pharmacol.* **50**, 160-165.
- Arner**, E. S. J., and Eriksson, S. (1995) Mammalian deoxyribonucleoside kinases. *Pharmacol. Ther.* **67**, 155-186.
- Arner**, E. S. J., Spasokukotskaja, T., and Eriksson, S. (1992) Selective assays for thymidine kinase 1 and 2 and deoxycytidine kinase and their activities in extracts from human cells and tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **188**, 712-718.
- Beg**, A. A., and Baldwin, A. S. Jr. (1993) The I kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors. *Genes & Dev.* **7**, 2064-2070.
- Belt**, J. A., Marina, N. M., Phelps, D. A. and Crawford, C. R. (1993) Nucleoside transport in normal and neoplastic cells. *Advan. Enzyme Regul.* **33**, 235-252.
- Berk**, A. J. and Clayton, D. A. (1973) A genetically distinct thymidine kinase in mammalian mitochondria; exclusive labeling of mitochondrial deoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* **248**, 2722-2729.
- Bianchi**, V., Pontis, E. and Reichard, P. (1986) Changes of deoxyribonucleoside triphosphate pools induced by hydroxyurea and their relation to DNA synthesis. *J. Biol. Chem.* **261**, 16037-16042.
- Bianchi**, V., Ferraro, P., Borella, S., Bonvini, P. and Reichard, P. (1994) Effects of mutational loss of nucleoside kinases on deoxyadenosine 5'-phosphate/deoxyadenosine substrate cycle in cultured CEM and V79 cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 16677-16683.
- Bianchi**, V., Borella, S., Rampazzo, C., Ferraro, P., Calderazzo, F., Bianchi, L. C., Skog, S., and Reichard, P. (1997) Cell- cycle-dependent metabolism of pyrimidine deoxyribonucleoside triphosphates in CEM cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 16118-16124.
- Bohman**, C., and Eriksson, S. (1988) Deoxycytidine kinase from human leukemic spleen: Preparation and characteristics of homogenous enzyme. *Biochemistry* **27**, 4258-4265.

Bohman, C., and Eriksson, S. (1990) Mammalian deoxyribonucleoside kinases.
Biochem. (Life Sci. Adv.) **9**, 11-35.

- Chen**, E. H., Johnson, E. E., Vetter, S. M., and Mitchell, B. S. (1995) Characterization of the deoxycytidine promoter in human lymphoblast cell lines. *J. Clin. Invest.* **95**, 1660-1668.
- Chottiner**, E. G., Shewach, D. S., Datta, N. S., Ashcraft, E., Gribbin, D., Ginsburg, D., Fox, I. H., and Mitchell, B. S. (1991) Cloning and expression of human deoxycytidine kinase cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 1531-1535.
- Darnell**, J. E. Jr., Kerr, I. M., and Stark, G. R. (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264**, 1415-1421.
- Elion**, G. B. (1989) The purine path to chemotherapy. *Science* **244**, 41-47.
- Engstrom**, Y., Rozell, B., Hanson, H. A., Stemme, S., and Thelander, L. (1984) Localization of ribonucleotide reductase in mammalian cells. *EMBO J.* **3**, 863-867.
- Engstrom**, Y., and Rozell, B. (1988) Immunocytochemical evidence for the cytoplasmic localization and differential expression during the cell cycle of the M1 and M2 subunits of mammalian ribonucleoside reductase. *EMBO J.* **7**, 1615-1620.
- Eriksson**, S., Kierdaszuk, B., Munch-Petersen, B., Oberg, B., and Johansson, N. G. (1991) Comparison of the substrate specificities of human thymidine kinase 1 and 2 and deoxycytidine kinase toward antiviral and cytostatic nucleoside analogs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **176**, 586-592.
- Furman**, P. A., Fyfe, J. A., St. Clair, M. H., Weinhold, K., Rideout, J. L., Freeman, G. A., Lehrman, S. N., Bolognesi, D. P., Broder, S., Mitsuya, H. and Barry, D. W. (1986) Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 8333-8337.
- Ghosh**, S., and Baltimore, D. (1990) Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B. *Nature* **344**, 678-682.
- Green**, N., Alexander, H., Olson, A., Alexander, S., Shinnick, T. M., Sutcliffe, J. G., and
- He**, Q., Skog, S., Wang, N., Eriksson, S. and Tribukait, B. (1996) Characterization of a peptide antibody against a C-terminal part of human and mouse cytosolic thymidine kinase, which is a marker for cell proliferation. *Euro. J. Cell. Biol.* **70**, 117-124.

Hershfield, M. S., Fetter, J. E., Small, W. C., Bagnara, A. S., Williams, S. R., Ullman, B., Martin, D. W. Jr., Wasson, D. B., and Carson, D. A. (1982) Effects of mutational loss of adenosine kinase and deoxycytidine kinase on deoxyATP

- accumulation and deoxyadenosine toxicity in cultured CEM T-lymphoblastoid cells. *J. Biol. Chem.* **257**, 6380-6386.
- Hoeglund**, L., Pontis, E. and Reichard, P. (1988) Effects of deoxycytidine and thymidine kinase deficiency on substrate cycles between deoxyribonucleosides and their 5'-phosphates. *Cancer Res.* **48**, 3681-3687.
- Johansson**, M., and Karlsson, A. (1995) Differences in kinetic properties of pure recombinant human and mouse deoxycytidine kinase. *Biochem. Pharmacol.* **50**, 163-168.
- Johansson**, M., Brismar, S., and Karlsson, A. (1997) Human deoxycytidine kinase is located in the cell nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 11941-11945.
- Johansson**, M. (1997) Cloning and characterization of human deoxyribonucleoside kinases. Phosphorylation of anti-cancer and anti-viral nucleoside analogs. Doctoral Thesis. Karolinska Institute. Stockholm.
- Johnson**, D. R., Levanat, S., and Bale, A. E. (1995) Direct molecular analysis of archival tumor tissue for loss of heterozygosity. *BioTechniques* **19**, 190-192.
- Karlsson**, A., Johansson, M., and Eriksson, S. (1994) Cloning and expression of mouse deoxycytidine kinase; pure recombinant mouse and human enzymes show differences in substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **269**, 24374-24378.
- Kornberg**, A. and Baker, T. A. (1992) DNA replication, 2nd edition (W. H. Freeman & Company, New York).
- Ktistaki**, E., Ktistakis, N. T., Papadogeorgaki, E., and Talianidis, I. (1995) Recruitment of hepatocyte nuclear factor 4 into specific intranuclear compartments depends on tyrosine phosphorylation that affects its DNA-binding and transactivation potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 9876-9880.
- Ktistaki**, E., and Talianidis, I. (1997) Chichen ovalbumin upstream promoter transcription factors act as auxiliary cofactors for hepatocyte nuclear factor 4 and enhance hepatic gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2790-2797.
- Lewis**, W., Levine, E. S., Griniuviene, B., Tankersley, K. O., Colacino, J. M., Sommadossi, J-P., Watanbe, K. A. and Perrino, F. W. (1996) Fialdurine and its metabolites inhibit DNA polymerase γ at sites of multiple adjacent analog incorporation, decrease mt DNA abundance, and cause mitochondrial structural defects in cultured hepatoblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 3592-3597.

Mann, G. J., Musgrove, E. A., Fox, R. M. and Thelander, L. (1988)
Ribonucleoside reductase M1 subunit in cellular proliferation, quiescence, and differentiation. *Cancer Res.* **48**, 5151-5156.

- Munch-Petersen**, B., Cloos, L., Tyrsted, G. and Eriksson, S. (1991) Diverging substrate specificity of pure human thymidine kinases 1 and 2 against antiviral dideoxynucleosides. *J. Biol. Chem.* **266**, 9032-9038.
- Plunkett**, W., and Saunders, P. P. (1991) Metabolism and action of purine nucleoside analogs. *Pharmacol. Ther.* **49**, 239-268.
- Reddy**, G. P. V., and Pardee, A. B. (1983) Multienzyme complex for metabolic channeling in mammalian DNA replication. *Nature* **303**, 86-88.
- Reichard**, P. (1988) Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Ann. Rev. Biochem.* **57**, 349-374.
- Richel**, D. J., Colly, L. P., Arentsen-Honders, M. W., Starrenburg, C. W. J., and Wilemze, R. (1990) Deoxycytidine kinase, thymidine kinase and cytidine deaminase and the formation of Ara-CTP in leukemic cells in different phases of the cell cycle. *Leuk. Res.* **14**, 363-369.
- Ruiz van Haperen**, V. W. T., Veerman, G., Eriksson, S., Boven, E., Stegmann, A. P. A., Hermsen, M., Vermorken, J. B., Pinedo, H. M., and Peters, G. J. (1994) Development and molecular characterization of a 2',2'-difluorodeoxycytidine-resistant variant of the human ovarian carcinoma cell line A2780. *Cancer Res.* **54**, 4138-4143.
- Soederlund**, J. F. C. and Arner, E. S. J. (1995) Mitochondrial versus cytosolic activities of deoxyribonucleoside salvage enzymes. *Adv. Exp. Med. Biol.* **370**, 201-204.
- Song**, J. J., Walker, S., Chen, E., Johnson, E. E., Sychala, J., Gribbin, T., and Mitchell, B. S. (1993) Genomic structure and chromosomal localization of the human deoxycytidine kinase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 431-434.
- Spasokukotskaja**, T., Spyrou, G., and Staub, M. (1988) Deoxycytidine is salvaged not only into DNA but also into phospholipid precursors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **155**, 923-929.
- Spasokukotskaja**, T., Taljanidisz, J., Sasvari-Szekely, M., and Staub, M. (1991) Deoxycytidine is salvaged not only into DNA but also into phospholipid precursors. III. dCOP-diacylglycerol formation in tonsillar lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **174**, 680-687.
- Spasokukotskaja**, T., Arner, E. S. J., Brosjo, O., Gunven, P., Juliusson, G., Liliemark, J., and Eriksson, S. (1995) Expression of deoxycytidine kinase and phosphorylation of 2'-chlorodeoxyadenosine in human normal and tumour cells and tissues. *Eur. J. Cancer* **31**, 202-208.

- Spyrou**, G., and Reichard, P. (1987) Compartmentation of dCTP pools. Evidence from deoxyliponucleotide synthesis. *J. Biol. Chem.* **262**, 16425-16432.
- Spyrou**, G., and Reichard, P. (1989) Intracellular compartmentation of deoxycytidine nucleotide pools in S phase mouse 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **264**, 960-964.
- Starborg**, M., Brundell, E., Gell, K., Larsson, C., White, I., Daneholt, B., and Hoog, C. (1995) A murine replication protein accumulates temporarily in the heterochromatic regions of nuclei prior to initiation of DNA replication. *J. Cell Sci.* **108**, 927-934.
- Tallman**, M. S., and Hakimian, D. (1995) Purine nucleoside analogs: Emerging roles in indolent lymphoproliferative disorders. *Blood* **86**, 2463-2474.
- Ullman**, B., Coons, T., Rockwell, S., and McCartan, K. (1988) Genetic analysis of 2',3'-dideoxycytidine incorporation into cultured human T lymphoblasts. *J. Biol. Chem.* **263**, 12391-12396.
- Wang**, L., Karlsson, A., Arner, E. S. J. and Eriksson, S. (1993) Substrate specificity of the mitochondrial 2'-deoxyguanosine kinase; efficient phosphorylation of 2'-chlorodeoxyadenosine. *J. Biol. Chem.* **268**, 22847-22852.
- Wang**, L. and Eriksson, S. (1996) Phosphorylation of the anti-hepatitis B nucleoside analog 1-(2'-deoxy-2'-fluoro-1- β -D-arabinofuranosyl)-5-iodouracil (FIAU) by human cytosolic and mitochondrial thymidine kinase and implications for cytotoxicity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 1555-1557.
- Wang**, L. (1997) Mitochondrial Deoxyribonucleoside Salvage Enzymes. Cloning and Characterization of deoxyguanosine kinase and thymidine kinase. Doctoral Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala.