



Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra"
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)
Granada

Caracterización de la NTP pirofosfatasa humana DCTPP1 y su papel en la homeostasis intracelular de nucleótidos

Cristina E. Requena Torres
Tesis Doctoral
Diciembre 2014

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Cristina E. Requena Torres
ISBN: 978-84-1117-276-9
URI: <http://hdl.handle.net/10481/74022>

**Caracterización de la NTP pirofosfatasa humana
DCTPP1 y su papel en la homeostasis intracelular
de nucleótidos**

Memoria presentada por la Licenciada
Cristina E. Requena Torres para optar
al grado de Doctor en
Bioquímica y Biología Molecular

Granada, Diciembre de 2014

Cristina E. Requena Torres

ÍNDICE

A.	INTRODUCCIÓN.....	13
A.1.	METABOLISMO DE PIRIMIDINAS.....	13
A.1.1.	<i>Síntesis de novo de nucleótidos pirimidínicos</i>	<i>14</i>
A.1.2.	<i>Vía de recuperación de nucleótidos de pirimidina</i>	<i>18</i>
A.1.3.	<i>Catabolismo de nucleótidos de pirimidina</i>	<i>19</i>
A.1.4.	<i>Regulación del metabolismo de pirimidinas</i>	<i>21</i>
A.1.5.	<i>Metabolismo de nucleótidos mitocondrial.....</i>	<i>26</i>
A.1.6.	<i>Defectos en el metabolismo de pirimidinas</i>	<i>29</i>
A.2.	NTP-PIROFOSFATASAS.....	31
A.2.1.	<i>Función house-cleaning: eliminación de nucleótidos no canónicos</i>	<i>31</i>
A.2.2.	<i>Tipos de NTP-pirofosfatasa.....</i>	<i>34</i>
A.3.	ANÁLOGOS DE CITIDINA EMPLEADOS COMO FÁRMACOS ANTITUMORALES Y ANTIVIRALES	45
B.	OBJETIVOS	51
C.	MATERIALES Y MÉTODOS	54
C.1.	MATERIALES.....	54
C.1.1.	<i>Líneas celulares</i>	<i>54</i>
C.1.1.1.	<i>Células humanas.....</i>	<i>54</i>
C.1.1.2.	<i>Bacterias.....</i>	<i>54</i>
C.1.2.	<i>Medios de cultivo</i>	<i>55</i>
C.1.3.	<i>Compuestos.....</i>	<i>58</i>
C.1.4.	<i>Tampones y soluciones.....</i>	<i>59</i>

C.1.5.	<i>Material para biología molecular</i>	59
C.1.5.1.	Vectores	59
C.1.5.2.	Oligonucleótidos	60
C.1.6.	<i>Software</i>	61
C.1.6.1.	Programas informáticos	61
C.1.6.2.	Bases de datos.....	61
C.2.	MÉTODOS	62
C.2.1.	<i>Cultivo y manipulación de células</i>	62
C.2.1.1.	Cultivo de las líneas celulares humanas	62
C.2.1.2.	Criopreservación y descongelación	62
C.2.1.3.	Ensayos de proliferación celular y sensibilidad a fármacos.....	63
C.2.1.4.	Obtención de extractos celulares.....	64
C.2.2.	<i>Técnicas para el estudio de la proteína</i>	64
C.2.2.1.	Clonación de la secuencia codificante de DCTPP1 en pET28a.....	65
C.2.2.2.	Expresión de DCTPP1 en <i>E. coli</i>	65
C.2.2.3.	Purificación de DCTPP1 recombinante.....	66
C.2.2.4.	Obtención del mutante DCTPP1-E63Q.....	67
C.2.2.5.	Análisis el estado de oligomerización de DCTPP1 mediante <i>crosslinking</i>	68
C.2.2.6.	Caracterización cinética.....	68
C.2.3.	<i>Técnicas inmunológicas</i>	71
C.2.3.1.	Generación de anticuerpos anti-DCTPP1	71
C.2.3.2.	Western blot.....	72
C.2.3.3.	Microscopía de fluorescencia.....	72

C.2.4.	<i>Técnicas para el estudio de DCTPP1 en cultivos celulares</i>	74
C.2.4.1.	Silenciamiento génico mediante siRNA	74
C.2.4.2.	Análisis del ciclo celular mediante FACS.....	75
C.2.4.3.	Sincronización del ciclo celular	76
C.2.4.4.	Cuantificación de los niveles intracelulares de nucleótidos	77
C.2.4.5.	Determinación de los niveles de metilación global	79
D.	RESULTADOS	81
D.1.	EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE HUMANA DCTPP1	81
D.1.1.	<i>Construcción del vector de expresión de DCTPP1</i>	81
D.1.2.	<i>Expresión de DCTPP1 en el sistema heterólogo Escherichia coli</i>	82
D.1.3.	<i>Purificación de la proteína recombinante DCTPP1</i>	83
D.1.4.	<i>Identificación de DCTPP1 mediante Huella de Masas Peptídicas</i>	84
D.1.5.	<i>Determinación de la masa molecular de DCTPP1 mediante MALDI TOFF-TOFF</i>	85
D.1.6.	<i>Análisis el estado de oligomerización de DCTPP1 mediante Crosslinking</i>	86
D.2.	CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE DCTPP1.....	88
D.2.1.	<i>Actividad nucleósido trifosfato hidrolasa</i>	88
D.2.2.	<i>Efecto de las condiciones de reacción sobre la actividad específica de DCTPP1</i>	90
D.2.3.	<i>Determinación de los parámetros cinéticos de DCTPP1</i>	93
D.2.4.	<i>Estudio de la especificidad de sustrato de DCTPP1</i>	94
D.2.5.	<i>Inhibición competitiva de DCTPP1 por PPI y dCDP</i>	96
D.3.	ELIMINACIÓN DE LA COLA DE HISTIDINAS DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	98
D.4.	GENERACIÓN DEL MUTANTE DCTPP1-E63Q, PURIFICACIÓN Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	101

D.5.	LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE DCTPP1	103
D.5.1.	<i>Obtención de anticuerpos policlonales frente a la proteína recombinante DCTPP1</i> 103	
D.5.2.	<i>Análisis por microscopía de inmunofluorescencia.....</i>	104
D.6.	DISTRIBUCIÓN DE DCTPP1 A LO LARGO DEL CICLO CELULAR	107
D.6.1.	<i>Análisis de los niveles de expresión de DCTPP1 mediante FACS.....</i>	107
D.6.2.	<i>Localización subcelular de DCTPP1 en función del ciclo.....</i>	108
D.7.	PAPEL DE DCTPP1 EN EL METABOLISMO DE NUCLEÓTIDOS EN CÉLULAS HUMANAS.	110
D.7.1.	<i>Disminución de la expresión de DCTPP1 mediante siRNA.....</i>	110
D.7.2.	<i>DCTPP1 regula el pool de nucleótidos intracelular.....</i>	112
D.7.3.	<i>Modulación de la expresión de DCTPP1 en respuesta al suplemento con desoxicitidina.</i>	113
D.7.4.	<i>Regulación coordinada de la expresión de DCTPP1 y enzimas del metabolismo de pirimidinas.</i>	114
D.8.	PAPEL DE DCTPP1 EN LA ELIMINACIÓN DE NUCLEÓTIDOS MODIFICADOS DEL MEDIO INTRACELULAR. .	119
D.8.1.	<i>Sensibilidad de células deficientes en DCTPP1 a análogos derivados de citidina ...</i>	119
D.8.2.	<i>Papel protector de DCTPP1 frente a la acción de análogos de nucleósidos con acción antitumoral.</i>	121
D.8.3.	<i>Contribución de DCTPP1 al nivel de metilación global del DNA en respuesta a agentes metilantes y desmetilantes</i>	123
D.8.4.	<i>Estudio del efecto de aza-dCyd en células deficientes en dUTPasa.....</i>	124
D.8.5.	<i>Papel de DCTPP1 y la dUTPasa en la formación de foci de γH2AX en respuesta a aza- dCyd.</i>	128
E.	DISCUSIÓN	131
E.1.	PROPIEDADES CINÉTICAS DE DCTPP1	132

E.1.1.	<i>DCTPP1 es una NTP pirofosfatasa con capacidad para hidrolizar el dCTP.....</i>	132
E.1.2.	<i>Base estructural de la actividad y especificidad de sustrato.....</i>	133
E.1.3.	<i>Regulación de la actividad de DCTPP1</i>	136
E.2.	DCTPP1 CONTRIBUYE A LA HOMEOSTASIS INTRACELULAR DE NUCLEÓTIDOS DE PIRIMIDINA 137	
E.3.	DCTPP1 SE LOCALIZA DE FORMA UBÍCUA EN LA CÉLULA	140
E.4.	FUNCIÓN <i>HOUSE-CLEANING</i> DE DCTPP1	143
E.4.1.	<i>Eliminación de análogos derivados de citidina del medio intracelular</i>	143
E.4.2.	<i>Las nucleotidohidrolasas DCTPP1 y dUTPasa como factores de resistencia al agente antitumoral decitabina</i>	147
F.	CONCLUSIONES	153
G.	BIBLIOGRAFÍA	156

ABREVIATURAS

A. Absorbancia.
AE. Actividad específica.
Amp. Ampicilina.
AMP. Adenosina monofosfato.
ATCasa. Aspartato transcarbamilasa
ATP. Adenosina trifosfato.
APC. Aloficocianina
BSA. Albúmina sérica bovina.
Br. Bromo.
°C. Grados centígrados.
ca. Carboxil.
cDNA. DNA complementario.
Ci. Curio.
CDA. Citidina desaminasa.
cdN. Desoxinucleotidasa citosólica.
CDP. Citidina difosfato.
cm. Centímetro.
CMP. Citidina monofosfato.
CMPK. UMP/CMP quinasa.
col. Colaboradores.
c.p.m. Cuentas por minuto.
CPS. Carbamil fosfato sintetasa
CTP. Citidina trifosfato.
CTPS. CTP sintetasa
CTS. Citidina trifosfato sintasa.
Da. Dalton.
DAPI. diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol.
dATP. Desoxiadenosina trifosfato.
dCDP. Desoxicitidina difosfato.
dCK. Desoxicitidina quinasa.
dCMP. Desoxicitidina monofosfato.
DCTD. dCMP desaminasa.
dCTP. Desoxicitidina trifosfato.
DCTPP1. dCTP pirofosfatasa 1.
dGTP. Desoxiguanosina trifosfato.
DHF. Dihidrofolato.
DHFR. Dihidrofolato reductasa.
DHOasa. Dihidroorotasa
DHODH. Dihidroorotato deshidrogenasa.
DIC. Contraste interdiferencial.
dITP. Desoxiinosina trifosfato.
DNA. Ácido desoxirribonucleico.
DNAsa I. Desoxirribonucleasa I.
dNTP. Desoxinucleósido 5'- trifosfato.

D.O. Densidad óptica.
DTT. Ditionitrosol.
dTDP. Desoxitimidina difosfato.
dTMP. Desoxitimidina monofosfato.
dTTP. Desoxitimidina trifosfato.
dU. Desoxiuridina.
dUDP. Desoxiuridina difosfato.
dUMP. Desoxiuridina monofosfato.
dUTP. Desoxiuridina trifosfato.
dUTPasa. Desoxiuridina 5' trifosfato hidrolasa.
dUMP. Desoxiuridina monofosfato.
dXTP. Desoxixantocina trifosfato.
EDTA. Ácido etilén diamino tetraacético.
FITC. Fluoresceína.
fo. Formil.
h. Hidroxi.
hme. Hidroximetil.
IgG. Inmunoglobulina G.
IMP. Inosina monofosfato.
ITP. Inosina trifosfato.
IPTG. Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido.
kb. Kilobase.
kDa. Kilodalton.
 k_{cat} . Constante catalítica.
 K_{ip} . Constante de inhibición por producto.
 K_m . Constante de Michaelis.
M. Molar.
mdN. Desoxinucleotidasa mitocondrial.
me. Metil.
MEM. Medio Mínimo Esencial.
mg. Miligramo.
min. Minuto.
ml. Mililitro.
mM. Milimolar.
MNGIE. Encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial.
mRNA. Ácido ribonucleico mensajero.
 μ Ci. Microcurio.
 μ l. Microlitro.
 μ M. Micromolar.
NADPH. Nicotiamida adenina dinucleótido fosfato.
NDK. Nucleósido difosfato quinasa.
ng. Nanogramo.
nM. Nanomolar.
ODC. Orotidina monofosfato descarboxilasa.
OPT. Orotato fosforribosil transferasa.

PBS. Tampón fosfato salino.
PCR. Reacción en cadena de la DNA polimerasa.
pb. Pares de bases.
pmol. Picomol.
PPi. Pirofosfato.
PRPP. Fosforribosil pirofosfato.
PRT. Fosforribosil transferasa.
RNA. Ácido ribonucleico.
siRNA. Pequeños RNAs de interferencia.
RNR. Ribonucleótido reductasa.
s. Segundo
SDS. Dodecil sulfato sódico.
SDS-PAGE. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida.
TCA. Ácido tricloroacético.
THF. Tetrahidrofolato.
TMPK. Timidilato quinasa.
TK. Timidina kinasa.
Tris. Tris(hidroximetil)-amino metano.
TS. Timidilato sintasa.
TP. Timidina fosforilasa.
UCK. Uridina citidina quinasa.
UPRT. Uridina fosforribosil transferasa.
UDP. Uridina difosfato.
UMP. Uridina monofosfato.
UPasa. Uridina fosforilasa.
UTP. Uridina trifosfato.
V. Voltio.
 V_{\max} . Velocidad máxima.
XTP. Xantosina trifosfato.

INTRODUCCIÓN

A. INTRODUCCIÓN

A.1. METABOLISMO DE PIRIMIDINAS

Los nucleótidos desempeñan un papel central en el almacenamiento y expresión de la información genética al servir como precursores de los ácidos nucleicos. Por otro lado, llevan a cabo una gran variedad de funciones en el metabolismo celular, actuando como moneda de cambio en las transacciones energéticas, como intermediarios esenciales en la respuesta celular a hormonas u otros estímulos externos y como cofactores enzimáticos. Además de estas funciones, los nucleótidos de pirimidinas tienen un papel crucial en la formación del ácido fosfatídico activado, CDP-diacilglicerol, para el posterior ensamblaje de la membrana plasmática, así como en la formación de UDP-azúcares para la glicosilación de proteínas y la síntesis de glucógeno (Evans and Guy 2004).

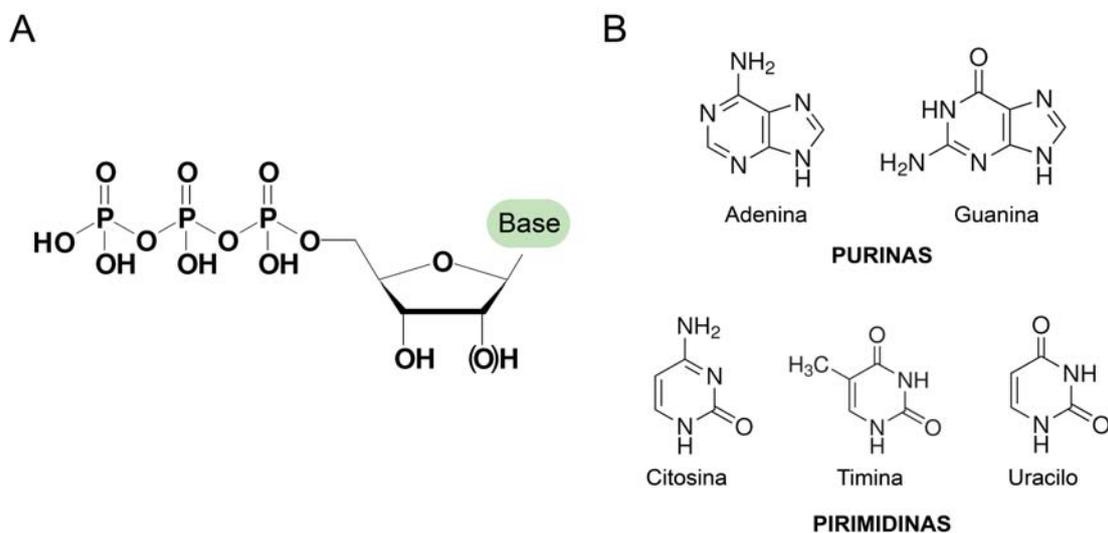


Figura A.1. **A**, Estructura de un (desoxi)ribonucleósido trifosfato con sus tres componentes característicos: una base nitrogenada, un azúcar y tres residuos de fosfato; **B**, Estructura de las bases nitrogenadas más comunes en el DNA. Son compuestos heterocíclicos derivados de purina: adenina y guanina; o derivados de pirimidina: citosina, timina y uracilo.

Tanto las purinas como las pirimidinas presentes en la célula pueden proceder de dos fuentes distintas: síntesis *de novo* o vía de recuperación. En la primera, los nucleótidos se sintetizan a partir de otras moléculas: aminoácidos, ribosa-5-P, HCO_3^- y NH_3^+ procedente de la glutamina. En la vía de recuperación se reciclan las bases y nucleósidos libres producidos por la degradación de los ácidos nucleicos o importados del exterior celular. Ambas vías se encuentran interconectadas y estrictamente reguladas. La relevancia de la contribución de cada una de estas vías depende del tipo celular y del estado del desarrollo, pero en general, la actividad de la vía *de novo* es baja en células diferenciadas sin una división activa, siendo en estos casos el salvamento la principal fuente de nucleótidos. Por otro lado, la biosíntesis de nucleótidos es indispensable en células en proliferación, donde es necesario cubrir la alta demanda de precursores requerida para la síntesis del DNA.

A.1.1. Síntesis *de novo* de nucleótidos pirimidínicos

La síntesis *de novo* asegura la disponibilidad de nucleótidos para las diversas funciones celulares en las que son requeridos. En este proceso, el anillo de pirimidinas se sintetiza previamente a partir de glutamina, aspartato y bicarbonato, y posteriormente se une a la ribosa-5P (Evans and Guy 2004). El primer paso es la formación de carbamil-P citosólico, a partir de bicarbonato, de un grupo amino procedente de la glutamina y de dos moléculas de ATP (Figura A.2). Esta primera reacción, catalizada por la carbamil fosfato sintetasa II (CPS II), es el paso limitante en la biosíntesis de pirimidinas y controla el flujo de esta vía. El resto del anillo de pirimidina es donado por el aspartato en una reacción catalizada por la aspartato transcarbamilasa. Posteriormente, la dihidroorotasa cataliza el cierre del anillo aromático generando dihidroorotato. Estas tres primeras reacciones son catalizadas por una única proteína trifuncional, conocida por el acrónimo de CAD. Estas tres actividades enzimáticas unidas físicamente en un único polipéptido de 243 KDa se asocian formando hexámeros u oligómeros de mayor tamaño (Lee, Kelly et al. 1985), dando lugar

a complejos que exceden los 1,4 MDa, lo que supone alrededor de la mitad del tamaño del ribosoma. En este polipéptido reside también una actividad glutaminasa (GLN) que genera amonio por hidrólisis de la glutamina, quedando éste disponible para la reacción catalizada por la CPSII.

La dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH) es la enzima encargada de oxidar el dihidroorotato para producir orotato. Esta enzima, a diferencia del resto de la ruta que es esencialmente citosólica, se encuentra asociada a la membrana mitocondrial interna, orientada hacia el espacio intermembrana. La DHODH es una flavoproteína que cataliza la reducción de ubiquinona en paralelo a la oxidación de dihidroorotato a orotato, acoplando de esta manera la biosíntesis de pirimidinas con la cadena respiratoria mitocondrial.

Los dos últimos pasos de la biosíntesis *de novo* de pirimidinas están catalizados por la proteína bifuncional UMP sintasa. En primer lugar, su actividad orotato fosforribosil transferasa (OPRT) cataliza la transferencia de fosforribosil pirofosfato (PRPP) al orotato para dar OMP. A continuación, la actividad OMP descarboxilasa es la encargada de formar finalmente el UMP, a partir del cual derivan los nucleótidos de pirimidina requeridos por la célula.

A partir de este punto, actúan una serie de quinasas dependientes de ATP para dar lugar a la formación de los nucleósidos difosfato y trifosfato. El UMP es fosforilado a UDP por la UMP/CMP quinasa (CMPK). Esta enzima tiene también como sustratos a CMP y dCMP. La fosforilación de los nucleósidos difosfato ((d)NDP) es llevada a cabo por una única enzima, la nucleósido difosfato quinasa (NDK). Esta enzima es capaz de utilizar tanto purinas como pirimidinas y fosforilar tanto ribonucleótidos como desoxirribonucleótidos.

Una vez formado el UTP, la CTP sintetasa (CTPS) cataliza la transferencia de un grupo amino desde la glutamina a la posición C-4 de la base, dando lugar a CTP. Esta reacción es el paso limitante en la síntesis de nucleótidos de citosina y representa otro punto importante de control de la ruta.

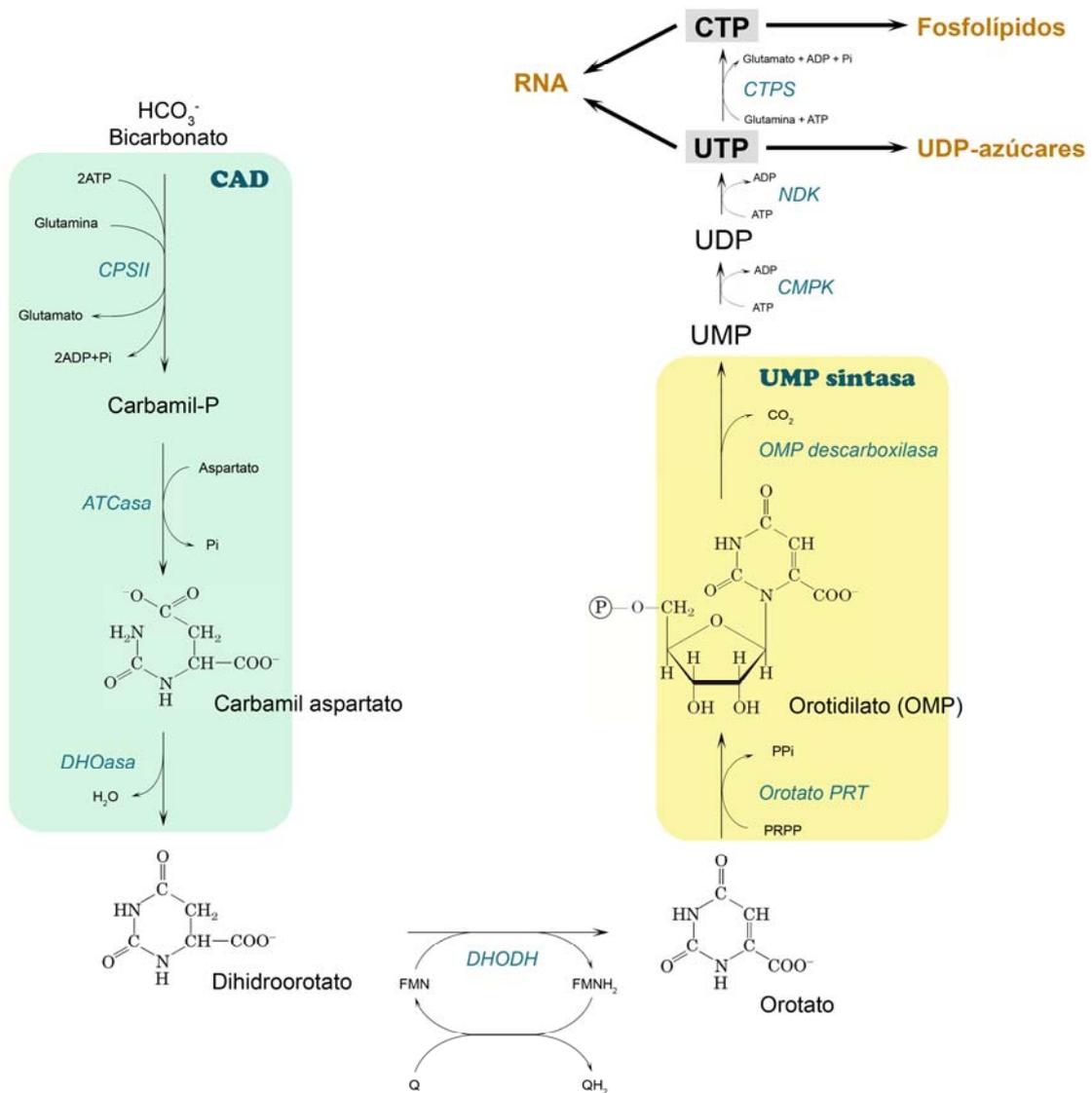


Figura A.2. Síntesis *de novo* de pirimidinas: biosíntesis de UTP y CTP vía orotidilato. Recuadrado en azul se muestran las reacciones llevadas a cabo por CAD y en amarillo las que catalizan la UMP sintasa. CPSII: carbamil fosfato sintetasa II; ATCasa: aspartato transcarbamilasa; DHOasa: dihidroorotasa; DHODH: dihidroorotato deshidrogenasa; Orotato PRT: orotato fosforribosil transferasa; CMPK: UMP/CMP quinasa; NDK: nucleósido difosfato quinasa; CTPS: CTP sintetasa.

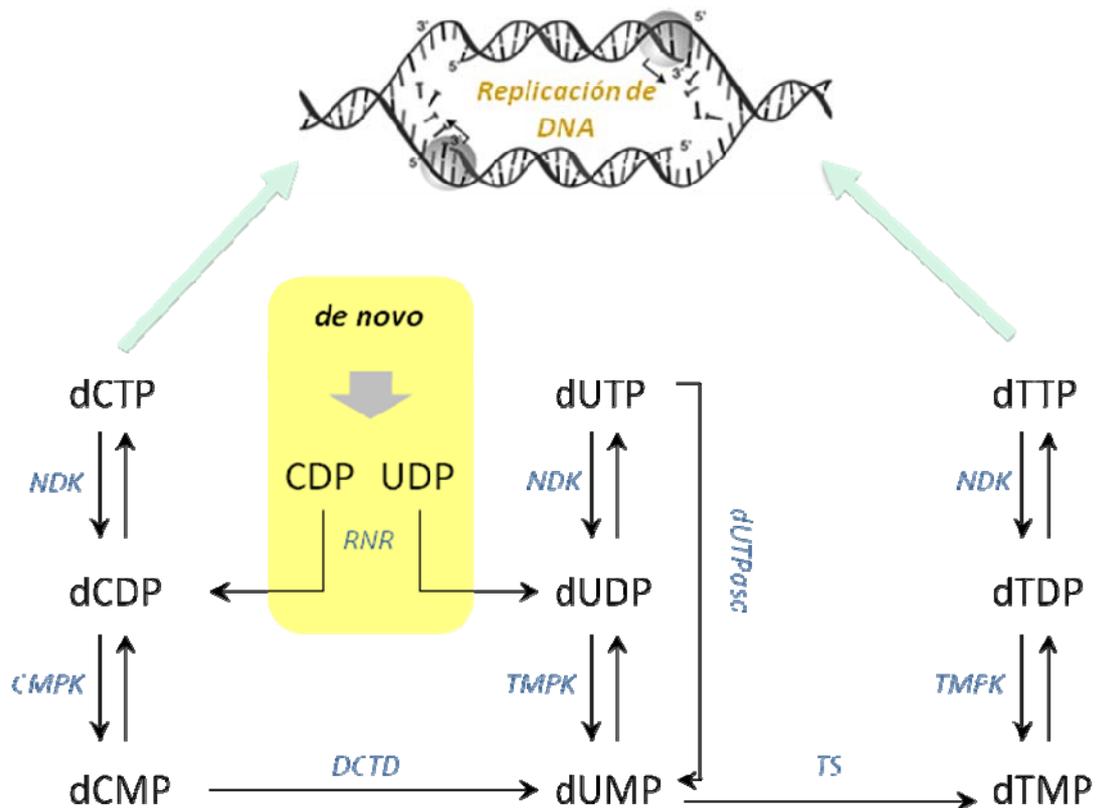


Figura A.3. Síntesis de desoxirribonucleótidos a partir de UDP y CDP por la acción de la ribonucleótido reductasa (RNR). NDK: nucleósido difosfato quinasa; CMPK: UMP/CMP quinasa; DCTD: dCMP desaminasa; TMPK: timidilato quinasa; TS: timidilato sintasa.

Otra enzima clave de la biosíntesis de nucleótidos es la ribonucleótido reductasa (RNR) (Figura A.3), que cataliza la reducción del átomo de carbono en posición 2' de la ribosa para producir el derivado 2'-desoxi. Tanto el UDP como el CDP son sustratos de esta enzima, resultando en dUDP y dCDP, respectivamente. La fosforilación posterior por la NDK da lugar a las formas trifosfato utilizadas por la DNA polimerasa. Por otro lado, la síntesis de nucleótidos de timidina ocurre de manera diferente, ya que no es sustrato de la ribonucleótido reductasa. En este caso, el precursor es el timidilato (dTMP) obtenido de la metilación de dUMP por la timidilato sintasa (TS). La dUTPasa proporciona el dUMP, sustrato de la TS, a través de la hidrólisis eficiente y

Otra vía de recuperación consiste en la fosforilación de nucleósidos por quinasas específicas (Figura A.4 panel B): la timidina quinasa 1 (TK1), responsable del reciclado de timidina (Thd) y desoxiuridina (dUrd); la uridina citidina quinasa (UCK), que cataliza la fosforilación de uridina (Urd) y citidina (Cyd); y la desoxicitidina quinasa (dCK) que recupera desoxicitidina (dCyd). Además, tanto citidina como desoxicitidina son desaminadas por la citidina desaminasa (CDA) generando los correspondientes nucleótidos de uracilo, los cuales pueden recuperarse a través de la UCK o la TK1, respectivamente.

A diferencia de la recuperación de purinas que tiene lugar preferentemente a partir de las bases, en humanos la recuperación de pirimidinas ocurre principalmente a nivel de nucleósidos (Loffler, Fairbanks et al. 2005) y en condiciones normales, la uridina es la principal pirimidina circulante en humanos (Balestri, Barsotti et al. 2007). La captación de pirimidinas de la dieta también difiere de la de purinas. Las purinas se degradan hasta ácido úrico antes de pasar a la circulación, mientras que las pirimidinas se absorben directamente a través de transportadores de nucleósidos de pirimidina. En humanos, el orotato, también presente en la dieta, es igualmente recuperado formando UMP por la UMPS, aunque generalmente a bajos niveles.

A.1.3. Catabolismo de nucleótidos de pirimidina

Junto a la síntesis de nucleótidos existen actividades catabólicas que limitan la recuperación mediada por las quinasas. Los dNMPs producidos por fosforilación son reconvertidos a desoxirribonucleósidos (dN) por las 5'-desoxirribonucleotidasas. Ambas actividades crean los conocidos "ciclos de sustrato", con el objetivo de regular y modular el *pool* de dNTPs (Rampazzo, Miazzi et al. 2010). Cuando la fase catabólica de este ciclo es más activa, los dN pueden ser excretados a través de la membrana plasmática disminuyendo así el *pool* intracelular. Se han caracterizado cinco 5'-nucleotidasas citosólicas (cN-IA,

cN-IB, cN-II, cN-III o UMP hidrolasa, y cdN), que tienen en general una amplia especificidad de sustrato.

Una segunda clase de enzimas catabólicas que compiten de igual manera con las quinazas, son las nucleósido fosforilasas. Estas enzimas se encargan de hidrolizar el nucleósido, generando como productos la base y la ribosa-1P. En este grupo se encuentran la timidina fosforilasa (TP), que hidroliza timidina y desoxiuridina; y a la uridina fosforilasa (UPasa) que actúa sobre la uridina. Para eliminar citidina o desoxicitidina, estas deben ser previamente desaminadas por la CDA (Figura A.5 panel A).

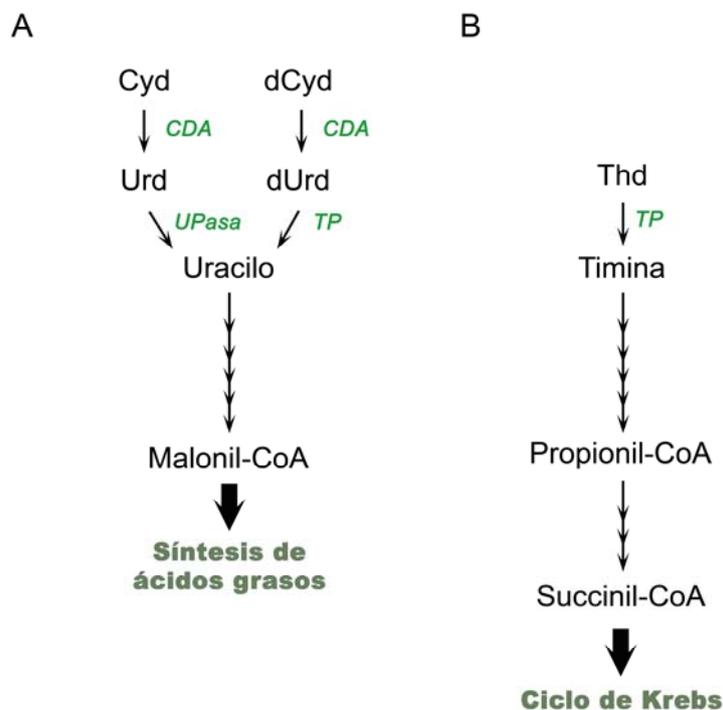


Figura A.5. Catabolismo de pirimidinas. CDA: citidina desaminasa; UPasa: uridina fosforilasa; TP: timidina fosforilasa.

La uridina no reciclada es transportada al hígado para ser degradada (Loffler, Fairbanks et al. 2005). Mientras que el esqueleto cíclico de las purinas no se puede romper y se elimina como ácido úrico, las bases de pirimidinas se degradan completamente hasta intermediarios metabólicos glucogénicos y/o

cetogénicos (Figura A.5 paneles A y B). Esta vía es iniciada principalmente por la UPasa-1 en hígado, y por una segunda uridina fosforilasa, la UPasa-2, expresada predominantemente en riñón. Por el contrario, la expresión de TP se distribuye uniformemente entre los distintos tejidos. Un ejemplo de la importancia de estas enzimas podemos verlo en el efecto de inhibidores de la timidina fosforilasa, como el 5-bromouracilo (5-BU), que provoca un aumento en el *pool* de dTTP (Rampazzo, Miazzi et al. 2010),

A.1.4. Regulación del metabolismo de pirimidinas

Las vías del metabolismo de nucleótidos constituyen una compleja red donde reacciones biosintéticas y catabólicas se encargan de mantener una cantidad apropiada de dNTPs para su utilización como precursores en la síntesis y reparación de DNA. En condiciones normales, el *pool* de dNTPs es asimétrico pues contiene una mayor concentración de dATP y dTTP que de dCTP, siendo dGTP el menos abundante. El mantenimiento de estas concentraciones relativas es un factor crítico. Para ello, existen a lo largo de la ruta diferentes puntos de control. La apropiada regulación del metabolismo de pirimidinas permite por un lado, evitar un desequilibrio del *pool* de nucleótidos que provocaría errores durante su incorporación al DNA por la DNA polimerasa; y por otro, aumentar la concentración de dNTPs cuando es necesario, es decir, durante la fase de duplicación del genoma o en respuesta a daños en el DNA para su reparación.

Durante la fase de síntesis de DNA, se requiere un aporte superior de dNTPs por lo que su producción se activa, llegando a niveles 20 veces superiores a los existentes durante la fase G1 (Hakansson, Hofer et al. 2006). En células de mamífero, el incremento de nucleótidos durante la fase S es debido principalmente a la acción de la RNR cuya función es proporcionar los desoxirribinucleótidos a partir del *pool* de ribonucleótidos. La actividad ribonucleótido reductasa está sujeta a varios mecanismos de regulación:

transcripcional, alostérica, post-traducciona l etc. (Niida, Shimada et al. 2010). Esta enzima forma heterotetrámeros, con dos subunidades grandes, R1, y dos pequeñas, R2. La transcripción de ambos genes se activa justo antes y durante la fase S temprana (Bjorklund, Skog et al. 1990) (Johansson, Hjortsberg et al. 1998) (Chabes, Bjorklund et al. 2004). Ambas subunidades son necesarias para la actividad reductasa. R1 contiene el sitio catalítico para la reducción de la ribosa, mientras que la subunidad R2 presenta un radical libre tirosilo esencial para el proceso catalítico (Nordlund and Reichard 2006). Una vez que la replicación del DNA se ha completado, cesa la activación transcripcional de los genes R1 y R2 y además, comienza una rápida degradación de la subunidad R2 (Chabes, Pflieger et al. 2003). La RNR de células de mamífero posee un segundo tipo de subunidad pequeña con función catalítica similar a R2, denominada p53R2. Esta es constitutivamente expresada a niveles bajos a lo largo de todo el ciclo celular si bien su expresión es inducible por p53 en respuesta a daños en el genoma (Hakansson, Hofer et al. 2006). A diferencia de la subunidad R2, p53R2 es activa también en células no proliferativas quiescentes y postmitóticas donde, junto con la subunidad R1, juega un papel esencial en el aporte de dNTPs para la síntesis del DNA mitocondrial y la reparación del genoma (Pontarin, Ferraro et al. 2012).

Otras enzimas involucradas en la síntesis de nucleótidos de pirimidina aumentan su actividad durante la fase S del ciclo celular. Es el caso de CAD (Huang and Graves 2003; Sigoillot, Berkowski et al. 2003), NDK (Keim, Hailat et al. 1992), TS (Le Francois, Maroun et al. 2007), DCTD (Gelbard, Kim et al. 1969), dCK (Hengstschlager, Denk et al. 1993; Fyrberg, Mirzaee et al. 2006), TK (Sherley and Kelly 1988), y de la isoforma nuclear de la dUTPasa (Ladner and Caradonna 1997). El aumento en la actividad de estas enzimas asegura el mayor requerimiento de nucleótidos durante la fase de síntesis de DNA.

La actividad de muchas de estas enzimas se modula mediante regulación alostérica. Este tipo de regulación permite mantener la concentración apropiada de cada uno de los cuatro dNTPs en respuesta a cambios en la composición y

tamaño del *pool* (Figura A.1.6). El punto central de regulación alostérica es de nuevo la RNR. Esta enzima tiene una cinética altamente compleja, pudiendo unir como efectores tanto dNTPs como NTPs. La subunidad grande R1 contiene dos sitios de regulación: sitio de actividad o sitio *a*, y sitio de especificidad o sitio *s*. El primero se encarga de regular la cantidad total de nucleótidos a través de la razón dATP/ATP; el dATP actúa como inhibidor de la RNR mientras que el ATP la activa. El sitio alostérico de especificidad, controla el equilibrio de los dNTPs y ajusta la actividad para mantener la concentración apropiada de todos ellos. Cuando el dATP o el ATP se unen a este sitio, la enzima acepta UDP o CDP en el sitio catalítico. Cuando se une dTTP entra GDP en el sitio catalítico. Y por último, la unión de dGTP favorece la reducción de ADP (Niida, Shimada et al. 2010; Hofer, Crona et al. 2012). El sitio *s* no une eficientemente dCTP y la regulación de este nucleótido se ejerce a nivel de la dCMP desaminasa. Esta enzima se activa por dCTP e inhibe por dTTP. De esta manera, altos niveles de ATP y bajos de dATP activan a la RNR a través del sitio de regulación *a*, favoreciéndose la reducción de CDP y UDP por la unión del ATP al sitio *s*. El aumento en los niveles de dCTP activa la enzima dCMP desaminasa (DCTD), incrementando la producción de dTTP. Cuando el dTTP formado alcanza niveles elevados, éste nucleótido actúa entonces como inhibidor alósterico de la DCTD (Maley and Maley 1968). A la vez, el dTTP favorece la reducción de GDP y el aumento de dGTP, el cual a su vez activa la reducción de ADP. Finalmente, el aumento de dATP inhibe la RNR a través de la unión al sitio de regulación *a*.

Los otros puntos clave de regulación alostérica de la ruta de síntesis de pirimidinas se encuentran en los primeros pasos de la síntesis de *ново* y en la vía de recuperación. El primer punto de control se encuentra en la enzima CAD, controlada también a nivel transcripcional y post-transcripcional. Esta enzima se activa por fosforilación en respuesta a factores de crecimiento, que al mismo tiempo activan su transcripción. CAD se activa alostéricamente por PRPP e inhibe por UTP. La fosforilación favorece la activación de CAD por PRPP y disminuye la inhibición por UTP (Huang and Graves 2003). El siguiente punto de control se encuentra en la CTP sintetasa, que regula el tamaño del *pool* de

CTP y UTP, además de ayudar a la coordinación de la producción de pirimidinas y purinas. Esta enzima se activa alostéricamente por GTP e inhibe por su producto final, CTP.

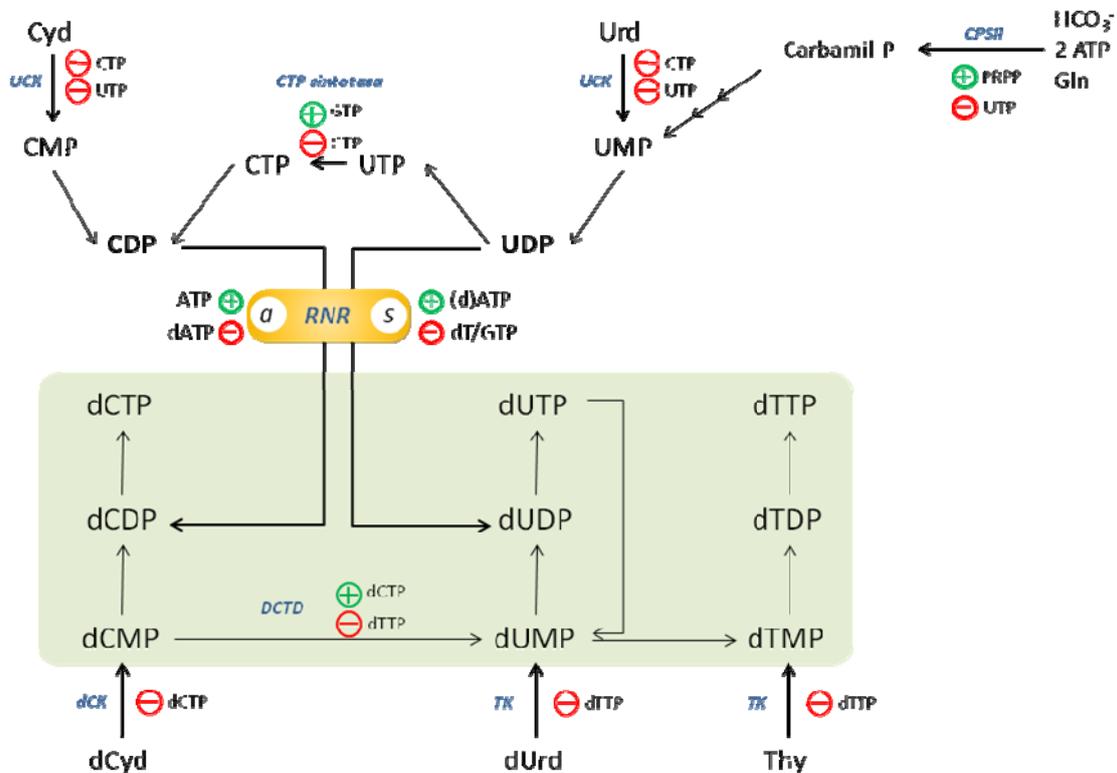


Figura A.6. Regulación alostérica del metabolismo de pirimidinas. UCK: uridina citidina quinasa; CPSII: carbamil fosfato sintetasa II; RNR: ribonucleótido reductasa; DCTD: dCMP desaminasa; dCK: desoxicititina quinasa; TK: timidina quinasa.

En la vía de recuperación de pirimidinas encontramos que las principales quinastas se regulan alostéricamente por sus productos finales, modulando así su actividad en función de la necesidad de nucleótidos trifosfato de la célula en ese momento. Así, TK es inhibida por dTTP (Ives, Morse et al. 1963), dCK por dCTP (Ives and Durham 1970), y UCK por UTP y CTP (Liacouras and Anderson 1977).

Una vez completada la replicación de DNA, no hay una demanda tan elevada de dNTPs. En este momento se reducen los niveles de las enzimas

previamente sobreexpresadas, al tiempo que se promueve la degradación de algunas ellas, como es el caso de la subunidad R2 de la RNR antes mencionada, de la TK1 y de la TMPK. Estas proteínas son degradadas por proteólisis mediada por APC/C - Cdh1 después de mitosis y antes de entrar en G1 (Chabes, Pflieger et al. 2003; Ke, Kuo et al. 2005; Hu and Chang 2007). La actividad de TK1 también se regula por fosforilación al entrar en mitosis. Una vez que se ha completado la replicación de DNA, la timidina quinasa es fosforilada por Cdk1, perturbando su estructura tetramérica activa y disminuyendo su afinidad por la timidina (Chang, Huang et al. 1994) (Li, Lu et al. 2004).

Otro mecanismo a través del cual la célula disminuye los niveles de dNTPs al salir de fase S es la activación de la expresión de SAMHD1. Esta enzima tiene la capacidad de hidrolizar eficientemente los cuatro desoxirribonucleótidos canónicos, dTTP, dCTP, dGTP y dATP, para dar el nucleósido correspondiente y una molécula de trifosfato (Goldstone, Ennis-Adeniran et al. 2011), además de ser activada por (d)GTP, nucleótido que es necesario para la formación del tetrámero activo (Amie, Bambara et al. 2013; Ji, Wu et al. 2013). Su regulación en función del ciclo celular minimiza su actividad durante la fase S, donde los requerimientos de dNTPs son máximos. Por el contrario, su expresión es máxima durante la fase G1 y es muy elevada en células quiescentes (Franzolin, Pontarin et al. 2013). Células deficientes en SAMHD1 presentan niveles aumentados de dNTPs y defectos en el crecimiento (Franzolin, Pontarin et al. 2013). Esta enzima se describió inicialmente como parte del sistema inmune ya que mutaciones en el gen son responsables del síndrome *Aicardi-Goutières*, una enfermedad neurodegenerativa con defectos en la respuesta inmune innata (Rice, Bond et al. 2009). Además, la actividad de SAMHD1 bloquea las etapas tempranas de la replicación del VIH (Laguet, Sobhian et al. 2011) aunque otros lentivirus escapan a la acción de este factor por la expresión de la proteína Vpx que dirige a SAMHD1 hacia la degradación dependiente de ubiquitina (Hrecka, Hao et al. 2011; Schaller, Goujon et al. 2012).

A.1.5. Metabolismo de nucleótidos mitocondrial

En mamíferos, podemos hablar de un *pool* de nucleótidos físicamente separado en dos compartimentos diferentes, el citosol y la mitocondria. En ambos casos se encuentran enzimas específicas encargadas de su mantenimiento y regulación (Mathews and Song 2007; Saada 2009). Los nucleótidos que abastecen al genoma nuclear son sintetizados en el citosol, pasando al núcleo a través de los poros nucleares probablemente por difusión pasiva. Sin embargo, hay evidencias de una localización nuclear de enzimas del metabolismo de pirimidinas, dónde aparecen asociadas a síntesis y reparación de DNA. Es el caso de la TS (Anderson, Woeller et al. 2012), la dCK o la TK1 (Chen, Eriksson et al. 2010), que se translocan al núcleo en fase S o en respuesta a daños en el genoma.

Cuando las células se están dividiendo, la alta cantidad de nucleótidos citosólicos producidos por la ribonucleótido reductasa, no solo suplen al DNA nuclear sino también al mitocondrial (Pontarin, Gallinaro et al. 2003). En este orgánulo encontramos al dCTP como el nucleótido más abundante, seguido del dTTP, dATP y por último el dGTP (Gonzalez-Vioque, Torres-Torronteras et al. 2011). Existen transportadores específicos, tanto para nucleótidos como para nucleósidos, encargados de la conexión constante entre ambos compartimentos. Se ha detectado transporte de nucleósidos monofosfato, en concreto para timidina monofosfato (Ferraro, Nicolosi et al. 2006), sin embargo aún no se conoce el transportador responsable. Por otro lado, aunque inicialmente se describió el transportador denominado DNC como responsable del transporte de nucleótidos difosfato y trifosfato (Dolce, Fiermonte et al. 2001) (Palmieri 2004), la revisión de los datos cinéticos junto con estudios de *knockout* del gen y datos clínicos, llevó a determinar su función como transportador de tiamina pirofosfato (Kang and Samuels 2008). Nuevos estudios asignan el transporte de nucleótidos de pirimidinas al miembro de la familia de transportadores mitocondriales SLC25A33, denominado PNC1, con preferencia por UTP, TTP y CTP, en este orden (Floyd, Favre et al. 2007), aunque no se ha determinado su

actividad frente a otros desoxirribonucleótidos. Su homólogo en *S. cerevisiae*, Rim2p, tiene la capacidad de transportar los tres ribonucleótidos trifosfato de pirimidina así como sus formas reducidas y difosfato (Marobbio, Di Noia et al. 2006). También se ha observado el transporte de las formas monofosfato aunque con menor eficiencia. Tanto los nucleósidos de purina como los de pirimidina, entran en la mitocondria a través del transportador hENT1, que ha sido identificado con localización mitocondrial además de en la membrana plasmática y cuya sobreexpresión aumenta la toxicidad mitocondrial a fármacos antivirales (Lai, Tse et al. 2004) (Lee, Lai et al. 2006).

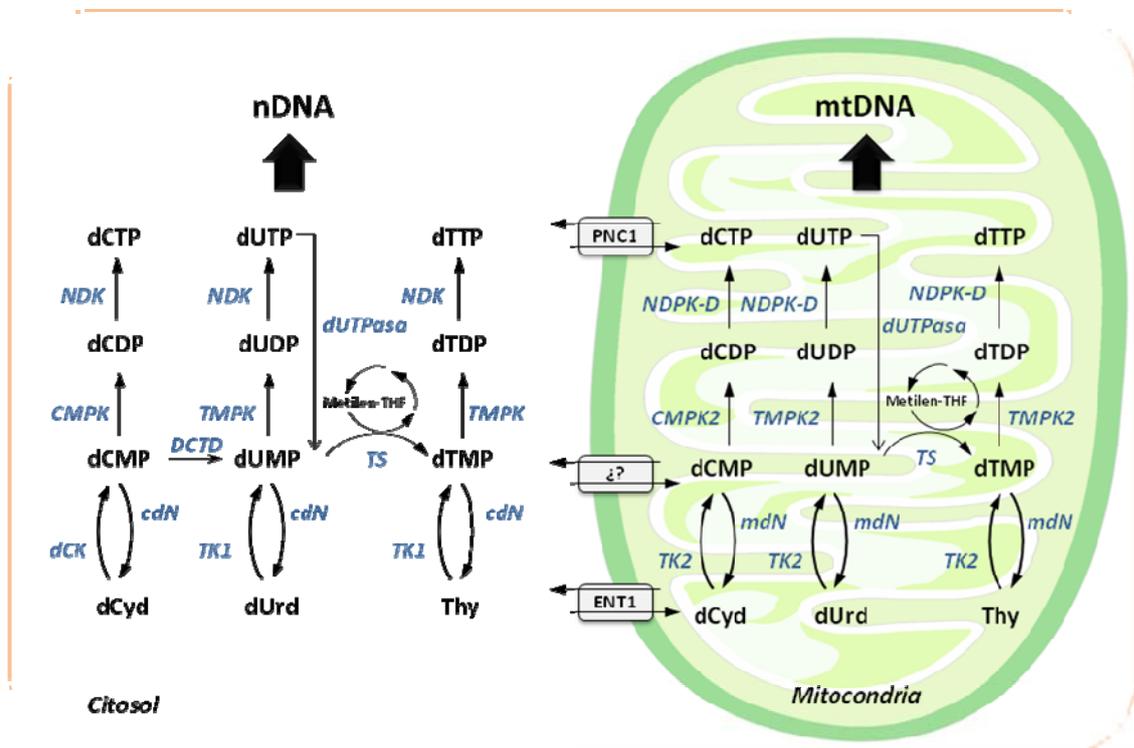


Figura A.7. Metabolismo de desoxirribonucleótidos en mitocondria y citosol y vías de transporte entre ambos compartimentos. NDK: nucleósido difosfato quinasa; CMPK: UMP/CMP quinasa; DCTD: dCMP desaminasa; TMPK: timidilato quinasa; TS: timidilato sintasa; dCK: desoxicititina quinasa; TK1: timidina quinasa 1; cdN: desoxinucleotidasa citosólica; NDPK-D: nucleósido difosfato quinasa D; CMPK2: UMP/CMP quinasa 2; TMPK2: timidilato quinasa 2; TS: timidilato sintasa; TK2: timidina quinasa 2; mdN: desoxinucleotidasa mitocondrial.

A diferencia de las células en división activa, la síntesis de DNA nuclear en tejidos diferenciados es relativamente baja. Sin embargo, la demanda de precursores para el DNA mitocondrial es constante. En el caso de células diferenciadas o en reposo, los precursores del DNA mitocondrial provienen principalmente del aporte de nucleótidos citosólicos generados por la subunidad p53R2 de la ribonucleótido reductasa, que se expresa constitutivamente durante todo el ciclo celular (Hakansson, Hofer et al. 2006; Bourdon, Minai et al. 2007), pero también de las vías de recuperación intramitocondrial. Dentro de la mitocondria encontramos quinasas específicas encargadas de fosforilar los nucleósidos hasta su forma trifosfato al igual que en el citosol (Figura A.7). La fosforilación de los tres nucleósidos de pirimidinas es llevada a cabo por la misma enzima, la timidina quinasa 2 (TK2). Para la conversión de dNMPs a dNDPs encontramos dos enzimas: la UMP/CMP quinasa 2 (CMPK2) que fosforila tanto dCMP como dUMP, y la timidilato quinasa 2 (TMPK2) que tiene como sustrato dTMP. La adición del tercer fosfato es catalizada, al igual que en el citosol, por una única enzima con una especificidad de sustrato muy amplia, la NDPK-D. Esta enzima se encuentra asociada a la membrana interna mitocondrial y se han encontrado indicios de un acoplamiento con la fosforilación oxidativa (Lacombe, Tokarska-Schlattner et al. 2009).

La recuperación de timidina catalizada por la TK2 no es suficiente para mantener la replicación del DNA mitocondrial, sino que se requiere también la conversión de dUMP en dTMP por la timidilato sintasa (TS). Esta enzima, dependiente de tetrahidrofolato (THF), se localiza también en la mitocondria (Samsonoff, Reston et al. 1997), al igual que las enzimas requeridas para la regeneración del dihidrofolato (DHF): la dihidrofolato reductasa L1 (DHFRL1) (Anderson, Quintero et al. 2011) y la serina hidroximetil transferasa 2 (SHMT2) (Appling 1991).

A.1.6. Defectos en el metabolismo de pirimidinas

El mantenimiento de las concentraciones tanto absolutas como relativas de dNTPs es un factor crítico en la fidelidad de la replicación de DNA y consecuentemente en la estabilidad del genoma. El exceso o defecto en alguno de los precursores de la síntesis de DNA puede tener consecuencias genotóxicas, como el aumento de la mutagénesis y de recombinaciones genéticas, la aparición de anormalidades cromosómicas e incluso llegar a producir la muerte celular (Mathews 2006; Rampazzo, Miazzi et al. 2010). A través de estudios de síntesis de DNA *in vitro* se ha visto como variaciones en el *pool* de nucleótidos provocan fallos en su incorporación, produciendo apareamientos erróneos, defectos en la corrección de errores durante la replicación o desplazamientos en el marco de lectura (Kunz, Kohalmi et al. 1994) (Bebenek, Roberts et al. 1992). Por esta razón, la concentración de los cuatro nucleótidos está regulada estrictamente mediante procesos catabólicos y anabólicos que compensan cualquier defecto del sistema.

La importancia de estas rutas de síntesis y degradación se pone de manifiesto en el hecho de que defectos en enzimas del metabolismo de nucleótidos se han asociado con varias enfermedades humanas. Hasta la fecha hay nueve patologías descritas asociadas al metabolismo de pirimidinas, con una expresión clínica muy diversa, por lo que el diagnóstico se apoya con la identificación de los metabolitos acumulados. El primer defecto genético detectado en el metabolismo de pirimidinas fue la aciduria orótica hereditaria, causada por la deficiencia en la UMPS, en la mayoría de los casos por mutaciones puntuales en el dominio OPRT de esta enzima bifuncional (Loffler, Fairbanks et al. 2005). Los pacientes se caracterizan por presentar anemia megaloblástica y en algunos casos inmunodeficiencia. Se diagnostica por la presencia de ácido orótico en orina y es tratable con uridina por vía oral. También se han detectado deficiencias en la actividad OMP descarboxilasa que se presentan con anormalidades neurológicas y sin anemia. Para el diagnóstico se detectan ácido orótico o orotidina en orina.

Los defectos asociados a la degradación de pirimidinas son más comunes. Uno de ellos es la deficiencia en UMP hidrolasa, una 5'-nucleotidasa encargada de eliminar UMP y CMP. Estos pacientes presentan anemia hemolítica causada por la acumulación de nucleótidos de uridina y citidina, así como CDP-etanolamina y CDP-colina. Otros casos muy similares son las deficiencias en CDP-colina o CDP etanolamina fosfotransferasas, en las que también se acumula CDP-colina y CDP-etanolamina, y los pacientes presentan anemia hemolítica.

Otros defectos en la degradación están asociados a déficits neurológicos, como es el caso de deficiencias en la dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD) o la dihidropirimidasa (DHP) que se diagnostican por la acumulación en orina de timina y uracilo, o timina y uracilo más dihidrotimina y dihidrouracilo, respectivamente.

En un último grupo encontramos las deficiencias en TP y TK2, englobadas en un conjunto de patologías mitocondriales conocidas como MDSs (metabolic depletion síndromes; síndromes de depleción de DNA mitocondrial), que se caracterizan por una reducción del número de copias de DNA mitocondrial (Saada 2009). En tejidos diferenciados, donde la replicación del DNA nuclear es relativamente baja, el DNA mitocondrial debe ser constantemente replicado, independientemente del ciclo celular, necesitando un constante (aunque bajo) aporte de dNTPs. Es en estas condiciones es donde el DNA mitocondrial es especialmente vulnerable a cambios en la concentración de nucleótidos al igual que al efecto tóxico de análogos de nucleótidos utilizados en algunas terapias antitumorales o antivirales. La primera patología descrita asociada a defectos en el DNA mitocondrial fue la provocada por la deficiencia en TP, conocida como MNGIE (encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial) (Copeland 2012) y que provoca miopatía ocular y esquelética junto con síntomas gastrointestinales. La deficiencia en esta enzima encargada de degradar la timidina, provoca un aumento en los niveles de dTTP. El exceso de este nucleótido inhibe la enzima mitocondrial TK2, encargada de fosforilar tanto la

timidina como la desoxicitidina. La consecuencia indirecta es una disminución en los niveles de dCTP, lo que constituye per se la principal causa de la depleción del DNA mitocondrial (Gonzalez-Vioque, Torres-Torronteras et al. 2011). Deficiencias en TK2 cursan de manera similar perturbando profundamente la función mitocondrial y causando graves miopatías.

Además, existen deficiencias en otros genes del metabolismo de nucleótidos y del DNA asociadas con la inestabilidad y disminución del DNA mitocondrial. Es el caso de mutaciones en la desoxiguanosina quinasa mitocondrial (dGK) relacionadas con la forma hepatocerebral de MDS, o deficiencias en la subunidad p53R2 de la RNR, imprescindible para la síntesis de DNA mitocondrial y que se han asociado a formas de MDS muscular (Bourdon, Minai et al. 2007). Dentro de los MDSs también se incluyen patologías producidas por defectos en la polimerasa pol- γ , implicada en la síntesis del DNA mitocondrial, o en Twinkle, una helicasa mitocondrial. Estos defectos genéticos están asociados con dolencias como la oftalmoplejía externa progresiva (PEO), síndrome de Alpers o ataxia (Rotig and Poulton 2009) (Eriksson and Wang 2008).

A.2. NTP-PIROFOSFATASAS

A.2.1. Función *house-cleaning*: eliminación de nucleótidos no canónicos

Uno de los objetivos fundamentales de la célula es protegerse de compuestos potencialmente dañinos. El ambiente en el que se encuentra la célula es una fuente constante de compuestos tóxicos de los que tiene que defenderse. La primera barrera es la membrana plasmática, pero aún así muchos compuestos entran por difusión pasiva o aprovechando los sistemas de transporte celular. Además de agentes externos, el propio metabolismo celular genera subproductos potencialmente dañinos. Los más abundantes son las

especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno o el ión superóxido, producidos por la cadena de transporte electrónico. No obstante, la célula dispone de sistemas de detoxificación que son clave para su supervivencia. A pesar de ello es inevitable que se produzca un nivel basal de daños, que provocan modificaciones en moléculas vitales como nucleótidos, lípidos o proteínas, que deberán ser entonces reparados o eliminados. Como resultado, el estrés oxidativo por ejemplo, se ha relacionado con una gran variedad de condiciones patológicas como cáncer, enfermedades cardiovasculares, envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas (Ames, Shigenaga et al. 1993).

En células cancerígenas este hecho es especialmente relevante ya que en muchos casos presentan una regulación redox alterada (Zhang, Du et al. 2011), y las especies reactivas de oxígeno afectan a la actividad de cascadas de señalización implicadas en su progresión y metástasis. Estas especies reactivas, así como otros compuestos que dañan tanto el DNA como el pool de nucleótidos, tienen además un papel crucial en carcinogénesis. En muchos casos, las células cancerígenas presentan defectos en reparación del DNA lo que las hace especialmente sensibles a la presencia de los nucleótidos modificados. Los defectos en la reparación de DNA no sólo contribuyen al inicio de un tumor, sino que también se están analizando las proteínas implicadas en reparación como blanco de acción de fármacos cuyo uso puede contribuir a aumentar la eficacia de la radioterapia o quimioterapia (Furgason and Bahassi el 2013).

Los ácidos nucleicos y sus precursores, el *pool* de (desoxi)ribonucleótidos, son un objetivo muy vulnerable de estos compuestos tóxicos. Los nucleótidos canónicos libres son constantemente modificados bajo condiciones fisiológicas, por reacciones de oxidación o desaminación (Evans, Dizdaroglu et al. 2004), o debido a la exposición a agentes químicos exógenos como compuestos alquilantes (Topal and Baker 1982) en una proporción que puede llegar a ser de hasta 13000 veces superior a la susceptibilidad del DNA. Algunos de los

nucleótidos libres modificados o no canónicos más comunes, son por ejemplo 8oxo-dGTP, 8oxo-dATP o 2oxo-dATP, así como nucleótidos intermediarios del metabolismo cuya concentración debe ser controlada, como dITP, dXTP y dUTP (Figura A.8). Además, diversos tipos de bases modificadas y análogos de nucleósidos que se originan durante los procesos de reparación del DNA, pueden ser también añadidos al *pool* a través de las vías de recuperación (Mathews 2006).

La eliminación de nucleótidos no canónicos antes de que sean incorporados al DNA durante la replicación es esencial para el mantenimiento de la integridad genética. Las enzimas responsables de interceptar y eliminar nucleótidos no canónicos son las NTP pirofosfatasa cuya función es hidrolizar los nucleósidos trifosfato dañados y convertirlos en su forma monofosfato correspondiente, iniciando de esta forma un proceso de tipo catabólico. La actividad de estas nucleotidohidrolasas se incluye así en una función celular más general denominada *house-cleaning*. Esta función *house-cleaning* no se limita a hidrolizar nucleótidos no canónicos, sino que es también la encargada de modular la acumulación de ciertos intermediarios de las vías metabólicas. Este es el caso de los nucleótidos de señalización Ap_nA, hidrolizados a AMP y ADP, los nucleótido-azúcares o la desfosforilación de los difosfoinositol polifosfatos.

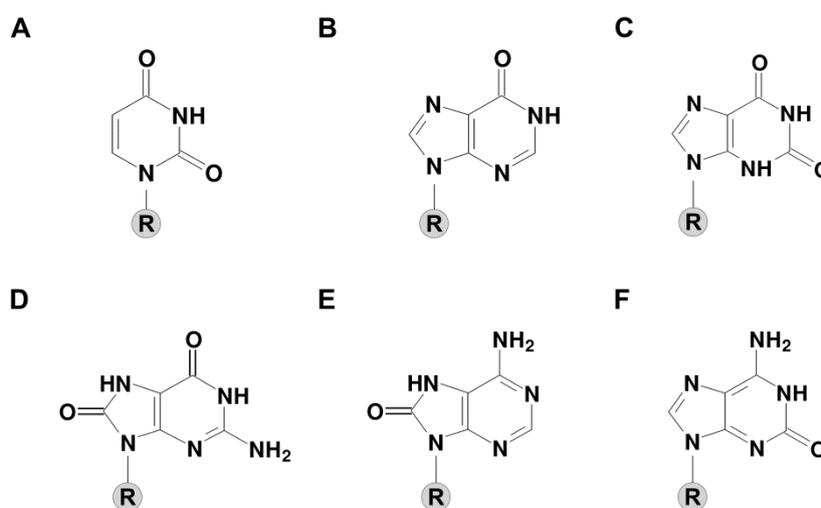


Figura A.8. Estructura de los nucleótidos no canónicos más comunes: **A**, dUTP; **B**, dITP; **C**, dXTP; **D**, 8oxo-dGTP; **E**, 8oxo-dATP; **F**, 2oxo-dATP. R indica en todos los casos desoxirribosa trifosfato.

A.2.2. Tipos de NTP-pirofosfatasa

Hasta la fecha se han descrito cuatro superfamilias estructuralmente distintas: hidrolasas Nudix, dUTPasas triméricas, ITPasas y NTP-pirofosfatasa todo- α (Galperin, Moroz et al. 2006) (Figura A.9).

Una característica general de este grupo de enzimas es su alta afinidad por sus sustratos naturales, con valores de K_m en un rango micromolar bajo. Esta alta afinidad les permite seleccionar de manera eficiente nucleótidos modificados de un entorno donde existe un exceso de nucleótidos canónicos.

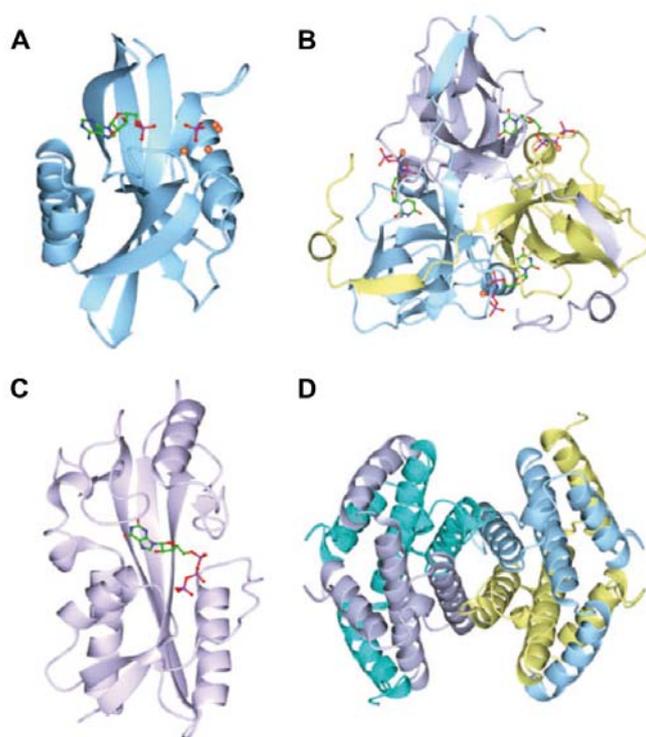


Figura A.9. Estructura y unión de sustrato en las diferentes superfamilias de NTP pirofosfatasa *house-cleaning*. **A**, Nudix; **B**, dUTPasas triméricas; **C**, ITPasas; **D**, NTP-pirofosfatasa todo- α (Galperin, Moroz et al. 2006).

Hidrolasas Nudix. Esta familia de enzimas se ha encontrado en toda clase de organismos e hidroliza un amplio rango de sustratos, incluyendo: nucleósidos di- y trifosfato, dinucleósidos y difosfoinositol polifosfatos, nucleótidos-azúcar y caperuzas de RNA (McLennan 2006). Estas enzimas contienen una secuencia motivo o “caja Nudix” característica: GX(5)EX(7)REUXEEXGU, donde U es un aminoácido hidrofóbico, y X cualquier residuo. Esta secuencia consenso no contiene los residuos implicados en el

reconocimiento de la base sino del magnesio. Por esta razón, en esta familia se pueden encontrar enzimas capaces de hidrolizar sustratos muy diferentes (Galperin, Moroz et al. 2006). Mientras unas hidrolizan nucleótidos potencialmente mutagénicos, otras se encargan de mantener niveles adecuados de determinados intermediarios metabólicos o compuestos de señalización. La enzima de *E. coli* MutT, perteneciente a esta familia, fue la primera enzima reconocida como *house-cleaning*, gracias a su capacidad de hidrolizar 8oxo-dGTP con alta afinidad (Maki and Sekiguchi 1992).

En mamíferos se han identificado alrededor de 24 genes Nudix, denominados *NUDT*, varios de los cuales codifican para más de una variante enzimática:

- hMTH1 (*NUDT1*). Esta enzima es funcionalmente similar a MutT de *E. coli*, aunque con un rango de sustratos más amplio. Es una nucleósido trifosfatasa que elimina 8oxo-dGTP, 2oxo-dATP y 8oxo-dATP. Se han detectado cuatro isoformas con distinto peso molecular, y al menos dos de ellas tienen señales potenciales de localización mitocondrial (Kang, Nishida et al. 1995). Una segunda 8oxo-dGTPasa, hMTH2 (*NUDT15*), presenta menor afinidad por este sustrato, si bien es capaz de reducir la frecuencia de mutación en células de *E. coli mutT⁻* (Cai, Ishibashi et al. 2003). Este mismo fenotipo podemos observarlo al complementar estas células con YSA1H (*NUDT5*), que además de hidrolizar ADP-azúcares, hidroliza eficientemente la forma difosfato, 8oxo-dGDP (Ishibashi, Hayakawa et al. 2003). Datos recientes han abierto una nueva vía de terapia contra el cáncer, ya que hMTH1 que normalmente no es una enzima esencial, es crucial en células cancerígenas donde la producción de especies reactivas de oxígeno es superior (Gad, Koolmeister et al. 2014). Deficiencias en esta actividad llegan a causar daños en el DNA y muerte celular.
- hAPAH1 (*NUDT2*). Esta enzima es la encargada de mantener unos niveles adecuados del dinucleótido de señalización Ap4A, que está implicado en el control de la replicación y la reparación de DNA (McLennan

2000), regulación de canales de K⁺ sensibles a ATP (Jovanovic, Alekseev et al. 1997), iniciación de apoptosis (Vartanian, Alexandrov et al. 1999) y activación de la expresión génica (Lee, Nechushtan et al. 2004).

- Familia DIPP (NUDT3, 4, 10 y 11). Las enzimas pertenecientes a esta familia hidrolizan principalmente distintos Ap_nA y difosfoinositol polifosfatos. DIPP1 (NUDT 3) y DIPP2 (NUDT 4), se distribuyen ampliamente, a diferencia de NUDT3 α (NUDT10) y NUDT3 β (NUDT11), que se expresan preferentemente en testículo y cerebro (Hidaka, Caffrey et al. 2002).

- NUDT9. En eucariotas superiores encontramos una ADP-ribosa hidrolasa con dos isoformas: NUDT9 α (mitocondrial) y NUDT9 β (citosólica); ambas con alta afinidad por ADP-ribosa e IDP-ribosa.

- NUDT12. Esta proteína humana es similar a YjaD de *E. coli* e hidroliza NAD(P)H, NAD(P)⁺, Ap_nA y ADP-ribosa. Se localiza en peroxisomas y estructuras de mayor tamaño aún no identificadas (Abdelraheim, Spiller et al. 2003).

- hDcp2 (NUDT20) y NUDT16. Ambas enzimas están implicadas en la eliminación de la estructura cap (caperuza) en 5' de los mRNAs, liberando m⁷GDP. Esta guanosina metilada en posición 7 protege a los mRNAs de la degradación por exonucleasas 5'-3'. hDcp2, que es la más extensamente estudiada, se ha detectado en los cuerpos citoplasmáticos llamados P-bodies, y está regulada por factores implicados en transcripción y estabilidad de los mRNAs (Wang, Jiao et al. 2002; Song, Bail et al. 2013). Además de esta función, NUDT16 ha sido identificada como una (d)ITPase/(d)IDPase implicada en estabilidad genética (Iyama, Abolhassani et al. 2010).

dUTPasas triméricas. El dUTP es el nucleótido no canónico más común en la célula debido a que es un intermediario de la ruta de síntesis de pirimidinas. Aún así, a diferencia de los otros nucleótidos citosólicos donde la forma trifosfato representa en torno al 90 % del total, el *pool* de nucleótidos de uridina

está principalmente compuesto por dUMP, siendo 100 veces mayor que la cantidad de dUTP (Rampazzo, Miazzi et al. 2010). Este nucleótido trifosfato puede ser generado por dos vías: reducción de UDP o desaminación de dCMP a dUMP, y posterior fosforilación. La célula debe evitar la utilización del dUTP por la DNA polimerasa, por lo que sus niveles son mantenidos al mínimo gracias a la dUTPasa. Se trata de una enzima altamente específica que hidroliza el dUTP produciendo dUMP y PPi. De esta manera, la célula mantiene la razón dUTP/dTTP lo más baja posible. Si aún así el uracilo es incorporado en el DNA o producido *in situ* por desaminación, es eliminado mediante mecanismos de reparación específicos iniciados por la uracil DNA glicosilasa.

Las dUTPasas se distribuyen desde bacterias a eucariotas superiores, aunque con diferencias a nivel estructural, en sus propiedades físico-químicas y en el papel que desempeñan en la célula. Estructuralmente se pueden dividir en dos grandes grupos: las dUTPasas todo- α y las todo- β . Las primeras están englobadas en la superfamilia de las NTP-pirofosfatasas todo- α que se explicarán posteriormente. Dentro de las todo- β , encontramos una gran diversidad: 1) dUTPasas monoméricas, encontradas en algunos virus; 2) las DCD-DUTasas (dCTP desaminasas-dUTPasas), enzimas bifuncionales encontradas en algunas arqueobacterias; y 3) las dUTPasas triméricas, que le dan nombre a la superfamilia y son las más abundantes, encontrándose en bacterias, hongos y eucariotas. A este último grupo pertenece la dUTPasa humana, una enzima altamente específica que solo hidroliza dUTP. No obstante, también es capaz de unir eficientemente dUDP, el cual actúa como un inhibidor competitivo.

ITPasas. Otras enzimas pertenecientes a la función *house-cleaning* son las ITP pirofosfatasas. La enzima humana, hITPasa o ITPA, hidroliza ITP, dITP y XTP, producidos a partir de intermediarios de la síntesis de purinas. Esta enzima, al igual que otras implicadas en *house-cleaning*, presenta una alta

especificidad de sustrato, con muy baja actividad frente a otros nucleótidos y completamente inactiva con la formas monofosfato o difosfato (Lin, McLennan et al. 2001). Ratones deficientes en el gen *itpa* muestran retraso en el crecimiento y mueren dos semanas después de nacer con graves alteraciones cardíacas (Behmanesh, Sakumi et al. 2009). Los daños provocados por el incremento de nucleótidos de inosina en la célula, pueden ser contrarrestados por la sobreexpresión de NUDT16 (Abolhassani, Iyama et al. 2010), que como hemos visto anteriormente hidroliza (d)IDP y (d)ITP. Ambas enzimas juegan un papel dual en la protección de la célula frente a la inestabilidad cromosómica provocada por niveles anormales de dIDP/IDP o dITP/ITP.

NTP-pirofosfatasas todo- α . La identificación de una nueva clase de dUTP pirofosfatasas diméricas en los protistas *Leishmania major* (Camacho, Arrebola et al. 1997) y *Trypanosoma cruzi* (Harkiolaki, Dodson et al. 2004), dio lugar a la descripción de esta nueva superfamilia de enzimas, estructuralmente diferenciadas por una alta composición en hélices alfa. A través de un análisis estructural, se identificaron nuevos miembros de esta superfamilia como la fosforribosil-ATP pirofosfatasa HisE, implicada en la síntesis de histidina, la NTP-pirofosfatasa MazG y las familias DR2231 y RS21-C6. Todas estas proteínas tienen como característica común un dominio MazG.

- dUTPasas diméricas. Tras la identificación de la enzima de *L. major*, este tipo de dUTPasa se ha descrito en otros eucariotas parásitos como *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*, además de en bacterias y en algunos fagos (Greenberg 1966; Bernier-Villamor, Camacho et al. 2002; Castillo-Acosta, Estevez et al. 2008; Musso-Buendia, Vidal et al. 2009). Las dUTPasas diméricas difieren enormemente de las clásicas triméricas y no solo por su estructura. Entre otras cosas, las dUTPasas diméricas tienen la habilidad de hidrolizar dUDP además de dUTP, siendo dUMP el producto en ambos casos.

■ Familia MazG. La primera enzima caracterizada en esta familia y que le da nombre, es la proteína MazG de *E. coli*. Esta enzima se identificó en primer lugar como una NTP pirofosfatasa poco específica, que hidrolizaba nucleótidos canónicos, aunque con valores de K_m en torno a 1 mM (Zhang and Inouye 2002). Con la resolución de la estructura cristalina de la enzima MazG de *Sulfolobus solfataricus*, se predijo que el sustrato natural de esta enzima era 2oxo-(d)ATP (isoGTP) (Moroz, Murzin et al. 2005), aunque este sustrato no ha sido experimentalmente verificado. Estudios recientes indican que EcMazG es capaz de disminuir los niveles intracelulares de la guanosina 3',5'-bisfosfato (ppGpp) (Gross, Marianovsky et al. 2006). Este nucleótido se sintetiza bajo condiciones de estrés nutricional, siendo un intermediario de la muerte celular programada bajo estas condiciones. Estudios posteriores en *Mycobacterium* han revelado que el gen micobacteriano *mazg* es inducible en condiciones de estrés oxidativo (Lu, Sun et al. 2010), mientras que la enzima que codifica es capaz de hidrolizar dUTP y 8oxo-dGTP, aunque con altos valores de K_m (1 mM y 0.16 mM respectivamente). Estudios más recientes proponen el 5-OH-dCTP como un sustrato natural para esta enzima, cuya hidrólisis es altamente eficiente ($K_m = 1.9 \mu\text{M}$) y fundamental en el mantenimiento de la integridad genética (Lyu, Tang et al. 2013).

■ Familia HisE. A diferencia de la mayoría de mamíferos, que son dependientes de la histidina aportada en la dieta, muchos microorganismos, hongos y plantas son capaces de sintetizar este aminoácido. La fosforribosil-ATP pirofosfohidrolasa, o HisE, es la enzima que cataliza el segundo paso de la biosíntesis de histidina, y su estructura tridimensional conserva la organización todo- α de esta superfamilia (Javid-Majd, Yang et al. 2008). Esta enzima se presenta en muchos casos fusionada con otras proteínas implicadas en distintos pasos de la misma ruta. Este es el caso de *Saccharomyces cerevisiae*, en el que HisE está formando una proteína trifuncional con la fosforribosil-AMP ciclohidrolasa y la histidinol deshidrogenasa (Keeseey, Bigelis et al. 1979), o en *E. coli* y *Arabidopsis thaliana*, donde encontramos una proteína bifuncional con la

fosforribosil-AMP ciclohidrolasa (Smith and Ames 1965) (Fujimori and Ohta 1998).

- Familia DR2231. A esta familia pertenecen proteínas bacterianas aún poco caracterizadas. La reciente resolución de la estructura de la proteína DR2231 de *Deinococcus radiodurans* (Goncalves, de Sanctis et al. 2011) confirma la estructura típica de las NTP-pirofosfatasas todo- α . *D. radiodurans* y otras bacterias carecen de dUTPasas triméricas, monoméricas o diméricas, y DR2231 ha sido caracterizada como un nuevo tipo de dUTPasa para estos organismos. Esta enzima presenta una K_m para el dUTP de 4.4 μ M, con un alto grado de selectividad. DR2231 es una enzima dimérica, estructuralmente similar a MazG, pero funcionalmente relacionada con la dUTPasas.

- Familia RS21-C6. Se han hallado ortólogos de esta proteína con un alto grado de conservación en todos los organismos vertebrados, en plantas, *Gibberella zeae* y en diversas bacterias (Moroz, Murzin et al. 2005).

A esta familia pertenece la proteína de ratón RS21-C6 y su ortólogo humano, denominado DCTPP1 (o XTP3TPA). DCTPP1 es una proteína de 170 aminoácidos que contiene el típico dominio MazG (Figura A.10 panel A), y un dominio EAR (epilepsy-associated repeat) de 47 aminoácidos, posiblemente implicado en interacciones proteína-proteína.

Un análisis transcripcional mediante el empleo de *microarrays* junto con datos disponibles en la base de datos Gene Expression Omnibus del NCBI y resultados obtenidos mediante inmunohistoquímica del proyecto The Human Protein Atlas, muestran que el gen *DCTPP1* se sobreexpresa en células embrionarias y en proliferación, además de en una amplia variedad de cánceres (Figura A.10 paneles B y C). En linfocitos-B, la expresión de DCTPP1 es activada por una plétora de inductores tales como las interleukinas 4 y 10, el interferon gamma, el ácido lisofosfatídico, la esfingosina-1-fosfato, etc.

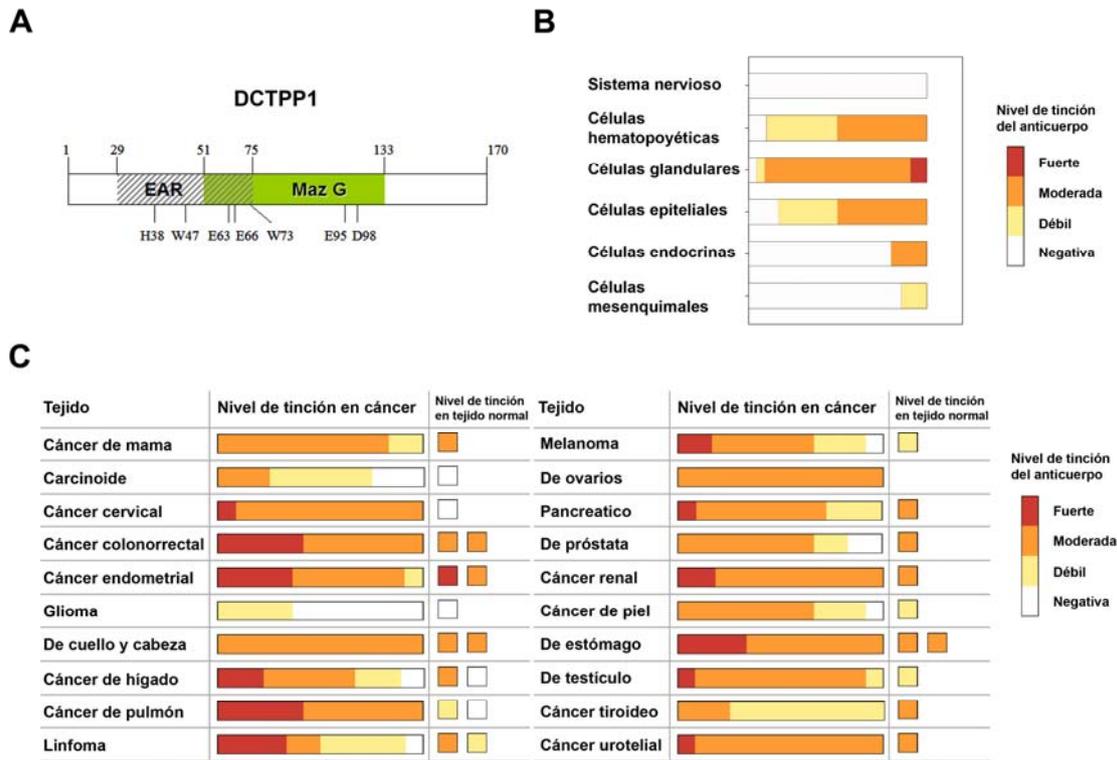


Figura A.10. **A**, Esquema del gen *DCTPP1*; **B**, Niveles de expresión de *DCTPP1* en diferentes tipos celulares; **C**, Niveles de expresión de *DCTPP1* en diferentes cánceres y su correspondiente expresión en tejido sano.

Recientemente, la proteína de ratón RS21-C6 se ha caracterizado bioquímicamente, demostrándose su capacidad de hidrolizar el dCTP así como el 5me-dCTP, si bien muestra una baja especificidad sobre otros nucleósidos trifosfato canónicos. La presencia de un grupo halogenado en posición 5 de la base de citosina incrementa significativamente la eficiencia catalítica de la enzima, especialmente los derivados 5-iodo-dCTP (5I-dCTP) o 5-bromo-dCTP (5Br-dCTP) (Nonaka, Tsuchimoto et al. 2009). La estructura tridimensional de RS21-C6 de ratón se ha descrito formando un complejo con 5me-dCTP (Wu, Liu et al. 2007). La estructura muestra el típico ordenamiento helicoidal de las NTP-pirofosfatasa todo- α . Cada monómero contiene 4 hélices alfa conectadas por lazos (Figura A.11 panel A).

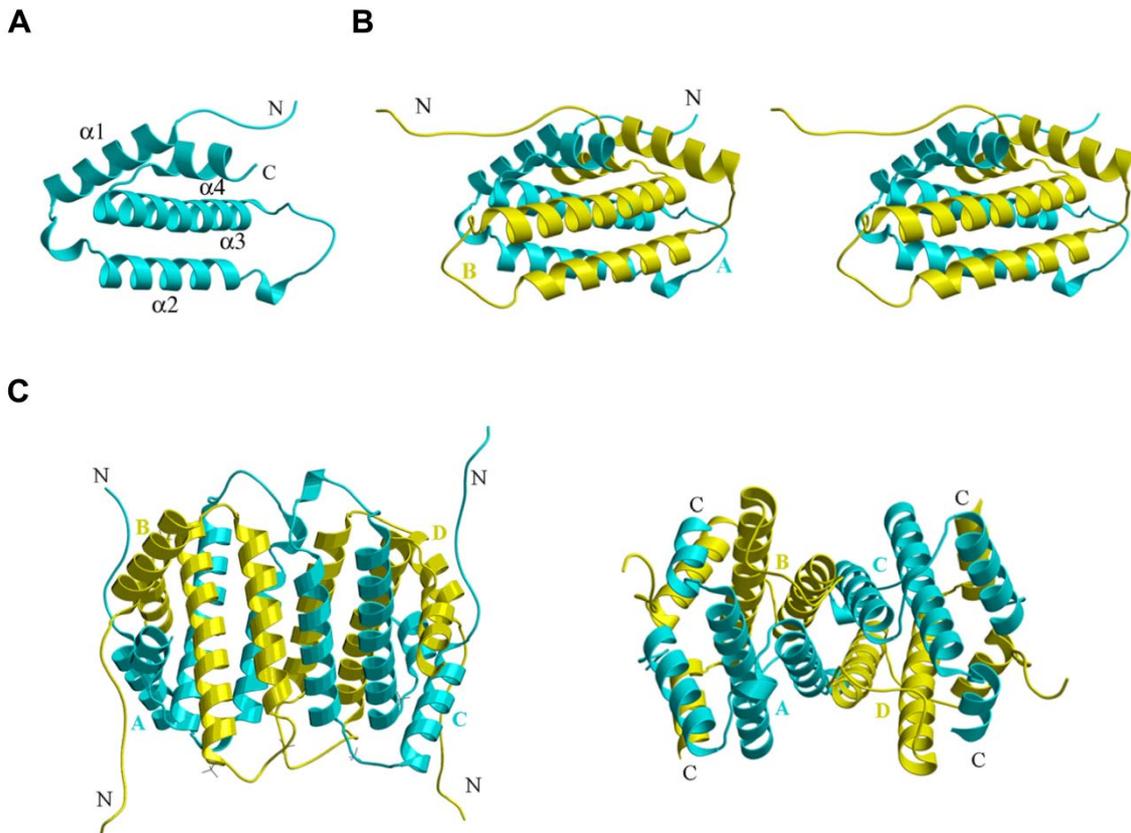


Figura A.11. Estructura completa de RS21-C6. N: extremo amino; C: extremo carboxilo; **A**, Estructura del monómero con las 4 hélices alfa numeradas del 1 al 4; **B**, Estructura del dímero; **C**, Vista horizontal (izquierda) y vista vertical (derecha) del tetrámero de RS21-C6 (Wu, Liu et al. 2007). A, B, C y D representan cada uno de los monómeros.

Una subunidad se une a otras tres para formar un tetrámero, aunque la estructura puede ser mejor descrita como un dímero de dímeros. En cada dímero, las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 3$ interactúan a través de 17 pares de residuos hidrofóbicos (Figura A.11 panel B). La unión de dos dímeros se lleva a cabo mediante las 4 hélices $\alpha 2$ que quedan formando un haz de 4 hélices que estabiliza la estructura (Figura A.11 panel C). En un alineamiento de las distintas NTP-pirofosfatasas todo- α podemos ver que las 4 hélices de RS21-C6 se hallan ampliamente conservadas (Figura A.12).

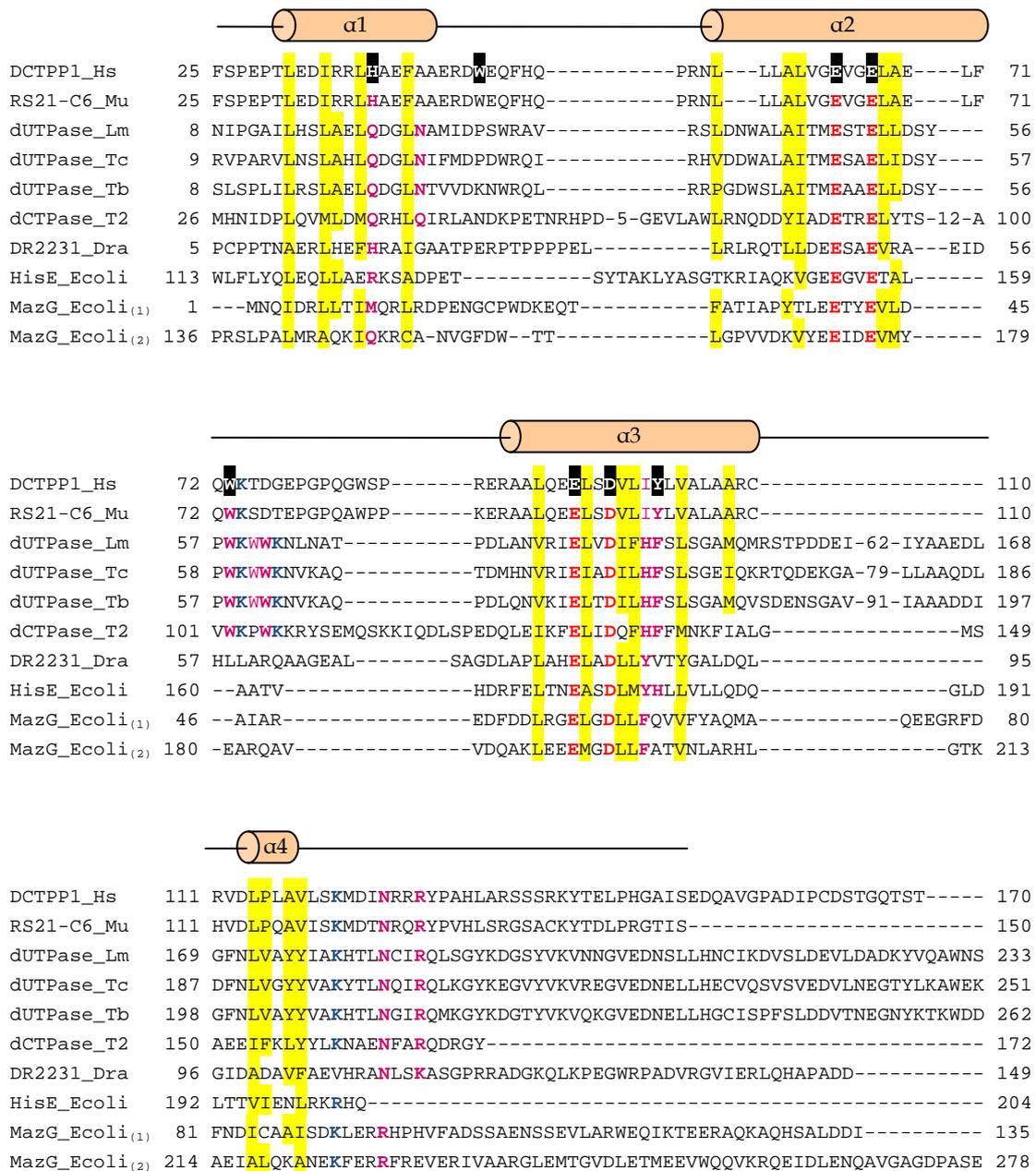


Figura A.12. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de proteínas de la superfamilia NTP-pirofosfatasas todo- α . Sobre el alineamiento se muestran las 4 hélices alfa descritas para RS21-C6. Los residuos hidrofóbicos conservados están resaltados en amarillo. En azul, rosa y rojo se muestran otros residuos conservados que forman parte del centro activo. Con letra blanca y fondo negro están resaltados los residuos que participan en catálisis.

En la estructura del complejo de RS21-C6 con 5me-dCTP, el bolsillo de unión al sustrato está compuesto por varios residuos, incluyendo His38, Trp47, Trp73, Tyr102, Glu63, Glu66, Glu95 y Asp98 (Figura A.13). La base nitrogenada y la desoxirribosa caen en una cavidad hidrofóbica y los grupos fosfato interactúan con cuatro residuos electronegativos. Según la interacción enzima-sustrato y los datos cinéticos obtenidos para diferentes mutantes, se ha determinado que los residuos His38, Trp47, Trp73 y Tyr102, están involucrados en el reconocimiento del sustrato mientras que Glu63, Glu66, Glu95 y Asp98, son los encargados de estabilizar los grupos fosfato a través de la unión de Mg^{2+} . Estos últimos cuatro residuos están implicados en la reacción catalítica, y mutaciones puntuales en estos aminoácidos inactivan la enzima.

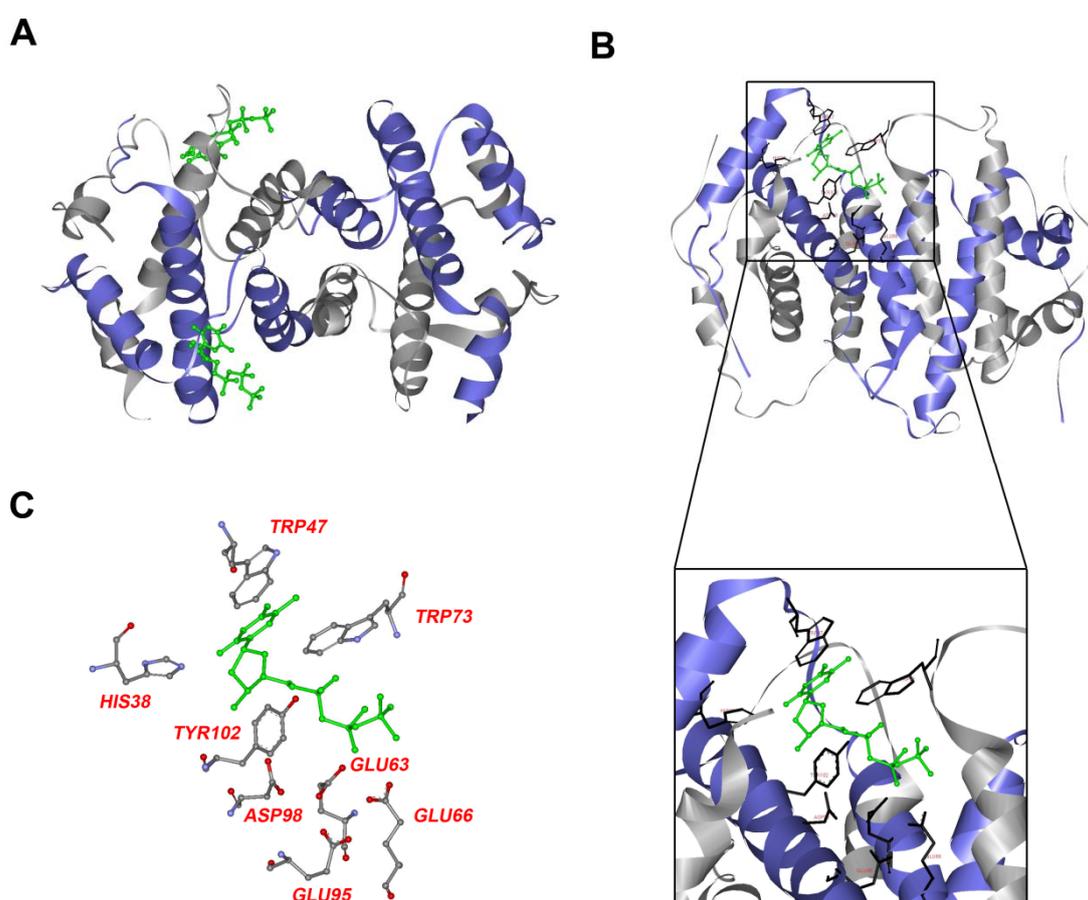


Figura A.13. **A**, Vista vertical del tetrámero de RS21-C6. Resaltado en verde se muestra la unión de las dos moléculas de 5me-dCTP; **B**, Vista girada del tetrámero y ampliación del sitio activo; **C**, Detalle de los residuos implicados en la unión del sustrato.

RS21-C6, forma una estructura tetramérica con dos sitios activos, cada uno de los cuales está compuesto por residuos de dos subunidades distintas, localizadas a su vez en dímeros distintos. El residuo de His38 está localizado en la hélice α -1 y el Trp47 está en el *loop* que conecta las hélices α -1 y α -2. La Glu63 y la Glu66 están localizadas en la hélice α -2, y la Glu95, el Asp98 y la Tyr102 están en la hélice α -3. Sin embargo, el Trp73 está localizado en la hélice α -2 de una molécula perteneciente a un dímero adyacente, por lo que ambos dímeros contribuyen a cada sitio de unión al sustrato. La estructura tetramérica es por tanto necesaria para la actividad nucleotidohidrolasa.

A.3. ANÁLOGOS DE CITIDINA EMPLEADOS COMO FÁRMACOS ANTITUMORALES Y ANTIVIRALES

Los análogos de nucleósidos (NAs) se han utilizado ampliamente en terapias antitumorales y antivirales, y aunque con características similares, exhiben diversos mecanismos de acción. Por lo general, estos compuestos inhiben o interfieren con la síntesis de DNA. El hecho de que la mayoría de las células de un organismo adulto estén en estado quiescente, hace que estos tratamientos presenten una alta selectividad frente a virus o células tumorales con una alta tasa de replicación. No obstante, estos fármacos muestran cierto grado de toxicidad en aquellos tejidos donde existen células en estado replicativo o llevando a cabo procesos de reparación del DNA que requieren el aporte constante de nucleótidos. A pesar de ello, se han obtenido compuestos muy efectivos que aumentan la supervivencia, y en algunos casos, curan al paciente de su enfermedad.

Una característica común a los NAs es el hecho de que deben ser administrados como pro-fármacos, que posteriormente deberán ser activados por el propio metabolismo celular. Esto se debe a que la forma activa está unida a varios grupos fosfato, tres si han de ser incorporados al DNA, lo que les confiere una elevada carga negativa que impide su paso por la membrana plasmática. Estos precursores entran en la célula generalmente aprovechando

transportadores de membrana, y entonces son incorporados a la vía de recuperación de nucleótidos para ser fosforilados por quinasas específicas. Este requerimiento constituye una de las limitaciones de estos fármacos ya que su activación depende de sistemas saturables (Parker 2009).

Muchos de estos análogos son derivados de dCyd y en su mayoría ejercen su acción tras incorporarse al DNA. En algunos casos, los NAs actúan como terminadores de cadena, bloqueando las células en la fase S del ciclo celular. Este es el caso de ara-Cyd o citarabina (Ross, Chen et al. 1990), que es el principal fármaco utilizado en el tratamiento de las leucemias mieloides agudas (Ewald, Sampath et al. 2008). Se trata de un derivado de dCyd con el grupo hidroxilo en posición 2' del azúcar en configuración β (Figura A.14). Otro análogo de dCyd es la Gemcitabina o dF-dCyd, con dos átomos de flúor en posición 2' del azúcar (Figura A.14), utilizado en un amplio espectro de tumores sólidos, como el pancreático, el de mama metastásico, de ovarios o cáncer de pulmón no microcítico. Se trata de otro terminador de cadena que compite con el dCTP, pero que requiere la incorporación de más de una molécula para bloquear la progresión de la horquilla de replicación. Además, a diferencia del ara-Cyd, este compuesto no es eliminado por la actividad 3'→5' exonucleasa de la DNA polimerasa (Huang, Chubb et al. 1991; Gandhi, Legha et al. 1996). Este fármaco tiene un segundo mecanismo de acción a través de la inhibición de la RNR. El dF-dCDP es el intermediario que inactiva esta enzima clave, provocando la disminución de los niveles de nucleótidos intracelulares (Heinemann, Xu et al. 1990). Al mismo tiempo, el aumento de la razón dFdCTP/dCTP potencia la actividad del fármaco al favorecer una mayor incorporación en el DNA e inhibir la actividad dCMP desaminasa (Heinemann, Xu et al. 1992).

Otro análogo de dCyd que ha demostrado eficacia en pruebas clínicas es la troxacitabina (OddCyd) (Figura A.14), desarrollada en principio como antiviral. Se acumula principalmente en su forma difosfato, aunque es fosforilada y un buen sustrato para la DNA polimerasa. Una vez incorporada, bloquea

instantáneamente la progresión de la replicación al no poseer el grupo OH en 3'. Entre las ventajas de este fármaco se encuentran el hecho de que no es susceptible a la degradación por CDA, y el que su entrada en la célula (uno de los pasos generalmente limitantes) parece ser por difusión pasiva, ya que la deficiencia en transportadores de nucleósidos no causan resistencias a este fármaco (Grove, Guo et al. 1995) (Grove and Cheng 1996).

Aunque los análogos de nucleósidos de citosina suelen inhibir la síntesis de DNA, el CNCAD (2'-C-ciano-2'-desoxi-1-beta-D-arabinofuranosil-citosina) (Figura A.14) tiene un mecanismo de acción distinto. Su incorporación en el DNA provoca roturas de cadena sencillas que son difíciles de reparar (Matsuda, Nakajima et al. 1991). Estos daños en el DNA provocan la detención del ciclo celular en fase G₂ (Liu, Guo et al. 2005). Un derivado N⁴-palmitoil, conocido como sapacitabina, está siendo actualmente estudiado en ensayos clínicos frente a tumores sólidos y cánceres hematológicos.

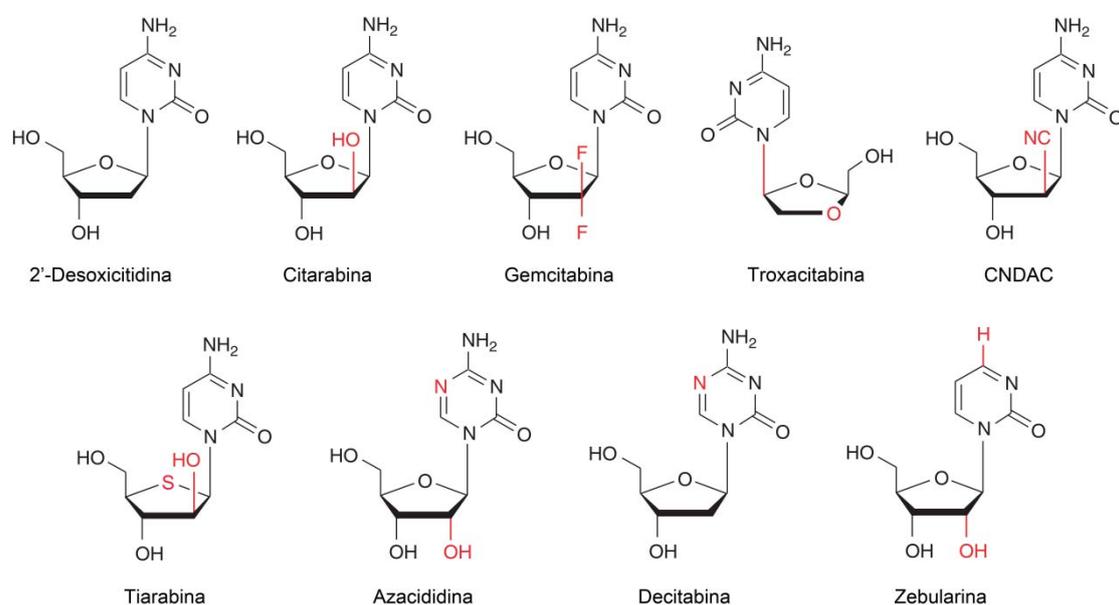


Figura A.14. Estructura de la desoxicitidina y de algunos análogos utilizados como fármacos antitumorales.

Uno de los principales problemas de estos fármacos es su corta vida media, por lo que se intentan desarrollar nuevos derivados, como la tiarabina (Figura A.14), similar a araC pero con una vida media 10 veces superior y mucho más eficaz en pruebas clínicas frente a tumores sólidos (Someya, Waud et al. 2006).

Dado que estos análogos de nucleósidos dependen de su incorporación en el DNA para ejercer su acción, su eficacia se limita a células con una proliferación activa. En casos como la leucemia linfocítica crónica (LLC) que afecta a células maduras, se estudia el uso de terapias combinadas de NAs con agentes genotóxicos que activen los sistemas de reparación de DNA y por tanto la síntesis de DNA (Yamauchi, Nowak et al. 2001). Esta estrategia terapéutica permite prevenir el desarrollo de resistencias por activación de los sistemas de reparación en tratamientos con agentes que dañan el DNA (Panasci, Paiement et al. 2001).

Otro grupo de análogos de nucleósidos son los que tienen como mecanismo de acción revertir el silenciamiento epigenético de las células cancerígenas. Azacitidina (aza-Cyd) y decitabina (aza-dCyd) (Figura A.14), clásicamente utilizados como agentes citostáticos (Vesely and Cihak 1977), son potentes inhibidores de la metilación del DNA. En ambos nucleósidos el carbono 5 del anillo de pirimidina está reemplazado por un nitrógeno. Antes de su incorporación al DNA en lugar del dCTP, ambos análogos han de ser activados por fosforilación y en el caso de la azacitidina también reducido por la RNR. La presencia de azacitosina en el DNA causa la formación de complejos covalentes con la DNA metiltransferasa 1 (DNMT1) (Khan, Vale et al. 2013). Esta enzima, encargada de metilar las citosinas en posición 5, queda irreversiblemente inactivada formando un complejo proteína-DNA que induce su degradación por el proteosoma. La depleción de DNMT1 lleva finalmente a una hipometilación generalizada del DNA de las células afectadas. Además de este efecto, la azacitidina se incorpora en gran medida al RNA interrumpiendo el metabolismo del RNA y la síntesis de proteínas. Este mecanismo aumenta los efectos secundarios de este fármaco, ya que afecta por igual tanto a células en

reposo como a células con una división activa. La decitabina a dosis altas provoca entrecruzamientos en el DNA y parada de la síntesis de DNA, con efecto citotóxico. Sin embargo, a dosis bajas la célula sobrevive con bajos niveles de DNMT1 y por tanto con el DNA hipometilado. Su potencial terapéutico ha sido probado en pacientes con síndrome mielodisplásico. Debido a la vida media tan corta que tienen estos compuestos, se han desarrollado nuevos derivados, como la zebularina (Figura A.14), que actúa como un inhibidor de la metilación de DNA y es mucho más estable en soluciones acuosas (Cheng, Matsen et al. 2003) (Marquez, Kelley et al. 2005).

Además de como agentes antitumorales, los NAs han sido ampliamente utilizados frente a virus. Desde que la azido-timidina (AZT) mostró eficacia inhibiendo la transcriptasa inversa del HIV y bloqueando la replicación del virus, se han desarrollado, siguiendo esta misma estrategia, un grupo de nucleótidos y nucleósidos antirretrovirales que inhiben la retrotranscriptasa (NRTIs) (Cihlar and Ray 2010). Su uso clínico en monoterapia o en terapias combinadas ha dado buenos resultados en pacientes. Algunos de los ya aprobados son análogos de citidina, como zalcitabina (ddCyd), lamivudina y emtricitabina (Figura A.15). La larga duración de los tratamientos, sus efectos secundarios y la generación de complejas resistencias, hace que se sigan desarrollando nuevos derivados, muchos de los cuales han dado buenos resultados en fase clínica.

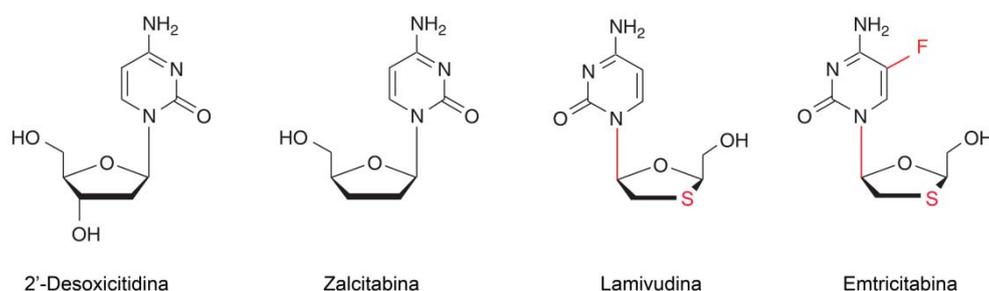


Figura A.15. Estructura de la desoxicitidina y análogo utilizados como fármacos antivirales.

OBJETIVOS

B. OBJETIVOS

El mantenimiento de la integridad de la información genética contenida en el DNA es uno de los mayores retos con los que se encuentra un organismo. De su importancia proviene el hecho de que la célula disponga de complejos mecanismos que actúan tanto evitando la producción de errores durante la síntesis de DNA, como reparando cualquier tipo de lesión que pueda generarse. Una función esencial que contribuye al control de daños en el DNA es el mantenimiento de la composición y el tamaño correcto del *pool* de nucleótidos que será utilizado por la DNA polimerasa durante la replicación. Esto implica no solo el mantener la proporción y la concentración adecuada de los diferentes dNTPs sino al mismo tiempo, eliminar del medio nucleótidos modificados o no canónicos cuya incorporación pudiera dar lugar a mutaciones y/o daños estructurales en el DNA.

Las enzimas implicadas en el metabolismo de nucleótidos y especialmente las consideradas como *house-cleaning* desempeñan un papel fundamental en la regulación y control del pool de nucleótidos, tanto en situaciones fisiológicas normales como patogénicas. Así mismo, estas enzimas pueden jugar un papel relevante en la activación y/o degradación de fármacos. Todo ello confiere especial interés al estudio y caracterización de nuevas enzimas implicadas en estas rutas celulares y su regulación a nivel bioquímico y celular.

El propósito central de esta tesis ha sido la caracterización bioquímica y funcional de la proteína humana DCTPP1, una nucleótidohidrolasa perteneciente a la superfamilia de enzimas *house-cleaning* conocida como NTP pirofosfatasas todo- α . Con este fin, se plantearon los siguientes objetivos:

1. Desarrollo de un sistema de expresión y de purificación de la proteína recombinante soluble DCTPP1.

2. Caracterización cinética de DCTPP1 y estudio detallado de su especificidad de sustrato e inhibición enzimática
3. Establecimiento de la localización subcelular de DCTPP1 en células humanas.
4. Estudio de las consecuencias de la depleción de los niveles de expresión de DCTPP1 sobre la viabilidad celular y el *pool* intracelular de nucleótidos de pirimidina.
5. Regulación de la expresión de DCTPP1 en función del ciclo celular y en respuesta a perturbaciones del metabolismo de nucleótidos causadas por la suplementación con nucleosidos exógenos o por la depleción de enzimas implicadas en la biosíntesis de pirimidinas.
6. Análisis del papel de esta enzima en la eliminación de nucleótidos modificados del medio intracelular.

MATERIALES Y MÉTODOS

C. MATERIALES Y MÉTODOS

C.1. MATERIALES

C.1.1. Líneas celulares

C.1.1.1. Células humanas

En este estudio se utilizaron líneas celulares humanas que se obtuvieron de *ATCC-LGC Cell Biology Collection*.

MRC-5: Línea celular humana procedente de fibroblastos de pulmón. Se trata de células adherentes diploides, con un cariotipo de 46, XY, de origen caucasiano y 14 semanas de gestación.

TK6: Línea celular humana procedente de linfoblastos de bazo con esferocitosis hereditaria. Son células que crecen en suspensión, con un cariotipo 46, XY y 5 años de edad. Esta línea deriva de la línea celular WIL-2, y es heterocigótica para el locus de la timidina kinasa (*tk*).

HeLa: Línea celular humana de tipo epitelial, procedente de cérvix con adenocarcinoma. Son células adherentes, con un cariotipo 46, XX y 31 años de edad.

C.1.1.2. Bacterias.

Para este estudio se utilizaron las siguientes cepas de *Escherichia coli*:

XL1-Blue (Bullock, Fernández et al. 1987) *Rec A1, end A1, gyr A96, thi-1, hdsR17, supE44, relA1, lac* [F'*proAB lacI^q ZAM15 Tn10* (Tet^r)]

BL21(DE3) (Phillips, VanBogelen et al. 1984) *F⁻ dcm, ompT, hsdS (r_B⁻ m_B⁻)gal λ*
(DE3)

C.1.2. Medios de cultivo

MEM (Minimum Essential Medium): Este medio se utilizó para el cultivo de la línea celular MRC-5, según las recomendaciones de ATCC-LGC. La composición del medio obtenido de Gibco (Life Technologies) es:

COMPONENTES	Molaridad (mM)
L-Hidrocloruro de arginina	0.597
L-Cisteína	0.100
L-Glutamina	2.000
L-Hidrocloruro de histidina-H ₂ O	0.200
L-Isoleucina	0.397
L-Leucina	0.397
L- Hidrocloruro de lisina	0.399
L-Metionina	0.101
L-Fenilalanina	0.194
L-Treonina	0.403
L-Triptófano	0.049
L-Tirosina	0.199
L-Valine	0.393
Colina cloruro	0.007
D-Pantotenato de calcio	0.002
Ácido fólico	0.002
i-Inositol	0.011
Niacinamida	0.008
Piridoxal hidrocloruro	0.005
Riboflavina	0.0003
Hidrocloruro de tiamina	0.003
Cloruro de calcio (CaCl ₂ -2H ₂ O)	1.800
Sulfato de magnesio (MgSO ₄ -7H ₂ O)	0.813
Cloruro de potasio (KCl)	5.330
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	26.190
Cloruro de sodio (NaCl)	117.240
Fosfato de sodio monobásico (NaH ₂ PO ₄ -2H ₂ O)	1.010
D-Glucosa (Dextrosa)	5.560
Rojo fenol	0.027

Tabla B.1.

Este medio se suplementó con suero bovino fetal (SBF) al 10 %, y con penicilina-estreptomicina a 100 U/ml - 100 µg/ml (Gibco, Life Technologies).

RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640: Este medio se utilizó para la línea celular TK6 (según ATCC-LGC) y se obtuvo de PAA (GE Healthcare):

COMPONENTES	Molaridad (mM)
Glicina	0.133
L-Arginina	1.150
L-Asparagina	0.379
L-Ácido aspártico	0.150
L-Cisteína	0.083
L-Ácido glutámico	0.136
L-Glutamina	2.050
L-Histidina	0.097
L-Hidroxiprolina	0.153
L-Isoleucina	0.382
L-Leucina	0.382
L- Hidrocloruro de lisina	0.274
L-Metionina	0.101
L-Fenilalanina	0.091
L-Prolina	0.174
L-Serina	0.286
L-Treonina	0.168
L-Triptófano	0.024
L-Tirosina	0.110
L-Valine	0.171
Biotina	0.001
Colina cloruro	0.021
D-Pantotenato de calcio	0.0005
Ácido fólico	0.002
i-Inositol	0.194
Niacinamida	0.008
Ácido para-aminobenzoico	0.007
Piridoxina hidrocloreto	0.004
Riboflavina	0.0005
Hidrocloreto de tiamina	0.003
Vitamina B12	0.0000037
Nitrato de calcio (Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O)	0.424
Sulfato de magnesio (MgSO ₄ -7H ₂ O)	0.407
Cloruro de potasio (KCl)	5.330
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	23.810
Cloruro de sodio (NaCl)	94.830
Fosfato de sodio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	5.630
D-Glucosa (Dextrosa)	11.110
Glutatión (reducido)	0.003
HEPES	25.030
Rojo fenol	0.013

Tabla B.2.

Este medio se suplementó también con suero bovino fetal (SBF) inactivado al 10 %, L-glutamina a 2 mM (GlutaMAX™) y penicilina-estreptomicina a 100 U/ml - 100 µg/ml (Gibco, Life Technologies).

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium): Este medio es el que se utilizó para el cultivo de la línea celular HeLa, según las recomendaciones de ATCC-LGC. La composición del medio obtenido de Gibco (Life Technologies) es:

COMPONENTES	Molaridad (mM)
L-Hidrocloruro de arginina	0.398
L-Cisteína	0.201
Glicina	0.400
L-Glutamina	3.970
L-Hidrocloruro de histidina-H ₂ O	0.200
L-Isoleucina	0.802
L-Leucina	0.802
L-Hidrocloruro de lisina	0.798
L-Metionina	0.201
L-Fenilalanina	0.400
L-Serina	0.400
L-Treonina	0.798
L-Triptófano	0.078
L-Tirosina	0.398
L-Valine	0.803
Colina cloruro	0.029
D-Pantotenato de calcio	0.008
Ácido fólico	0.009
i-Inositol	0.040
Niacinamida	0.033
Piridoxal hidrocloruro	0.020
Riboflavina	0.001
Hidrocloruro de tiamina	0.012
Cloruro de calcio (CaCl ₂ -2H ₂ O)	1.800
Nitrato ferrico (Fe(NO ₃) ₃ -9H ₂ O)	0.0002
Sulfato de magnesio (MgSO ₄ -7H ₂ O)	0.813
Cloruro de potasio (KCl)	5.330
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	44.050
Cloruro de sodio (NaCl)	110.340
Fosfato de sodio monobásico (NaH ₂ PO ₄ -2H ₂ O)	0.916
D-Glucosa (Dextrosa)	5.560
Piruvato de sodio	1.000
Rojo fenol	0.027

Tabla B.3.

Este medio se suplementó también con suero bovino fetal (SBF) inactivado al 10 %, L-glutamina a 2 mM (GlutaMAX™), una solución de aminoácidos no esenciales para MEM, y penicilina-estreptomicina a 100 U/ml - 100 µg/ml (Gibco, Life Technologies).

Medio LB (Luria-Bertani) (Sambrook, Fritsch et al. 1989): Este medio es el utilizado para los cultivos de bacterias y contiene: 10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura y 5 g/l de NaCl. En el medio sólido para placas se añade además 15 g/l de bacto-agar. Este medio se suplementó con ampicilina a 100 µg/ml, (ROCHE) o kanamicina a 50 µg/ml (Sigma-Aldrich) según la resistencia conferida por los plásmidos que porta cada bacteria.

C.1.3. Compuestos

Nucleótidos y nucleósidos: Los nucleótidos y nucleósidos utilizados en este estudio fueron: dCTP, dTTP, dATP, dGTP, dUTP y 5-metil-dCTP (5me-dCTP) de GE Healthcare; ATP, CTP, UTP, dCDP, dCMP, dUMP y 2'-desoxicitidina (dCyd) de Sigma-Aldrich; 5-iodo-dCTP (5I-dCTP), 5-bromo-dCTP (5Br-dCTP), 5me-dCDP, 5me-dCMP, 5me-dCyd y 5I-dCyd de Jena Bioscience; 5-hidroxi-dCTP (5h-dCTP), 5-hidroximetil-dCTP (5hme-dCTP), 5-formil-dCTP (5fo-dCTP) y 5-carboxil-dCTP (5ca-dCTP) de TriLink BioTechnologies.

Análogos de nucleósidos/nucleótidos con relevancia farmacológica: 5-aza-2'-desoxicitidina o decitabina (aza-dCyd) y ara-citidina o citarabina (ara-Cyd) de Sigma-Aldrich; aza-dCTP, ara-CTP, 2',2'-difluorocitidina-5'-trifosfato o gemcitabina (dF-CTP) y 2',3'-didesoxicitidina-5'-trifosfato (ddCTP) de Jena Bioscience.

Triptolide de Tocris Bioscience. Compuesto natural, con actividad anti-proliferativa, inmunosupresiva y anti-inflamatoria.

C.1.4. Tampones y soluciones

TAMPÓN/SOLUCIÓN	COMPOSICIÓN
Tampón de lisis	Tris-HCl 20 mM, KCl 0,4 M, DTT 5 mM, cóctel de inhibidores de proteasas (Roche), 20 % glicerol (pH 7,5)
Tampón A para purificación de DCTPP1	Fosfato de sodio 0,02 M, NaCl 0,5 M, MgCl ₂ 5 mM, imidazol 0,02 M (pH 7,4)
Tampón B para purificación de DCTPP1	Fosfato de sodio 0,02 M, NaCl 0,5 M, MgCl ₂ 5 mM, imidazol 0,5 M (pH 7,4)
Tampón A MonoQ	Fosfato de sodio 5 mM, NaCl 50 mM (pH 7,0)
Tampón B MonoQ	Fosfato de sodio 5 mM, NaCl 350 mM (pH 7,0)
Tampón de reacción de DCTPP1	Rojo cresol 50 µM, bicina 2 mM, pH 8, MgCl ₂ 20 mM, albumina de suero bovino (BSA) 0,75 mg/ml, KCl 0,1 M, ditioneitol (DTT) 4 mM.

Tabla B.4.

C.1.5. Material para biología molecular

C.1.5.1. Vectores

pGEM-T (Promega). Vector de 3000 pb, utilizado como vector de amplificación para clonar fragmentos de DNA obtenidos por PCR. La selección del plásmido se lleva a cabo mediante ampicilina y el sistema de regulación del *operon lac* (IPTG 0,1 M y X-Gal 20 mg/ml).

pET-28a (Novagen). Vector de expresión procariótico de 5369 pb, utilizado para clonar la región codificante del gen DCTPP1, con lo que queda fusionado a

un péptido de 6 histidinas. El plásmido utiliza el promotor de la T7 RNA polimerasa y se selecciona con kanamicina .

C.1.5.2. Oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos empleados en este estudio han sido sintetizados por los Servicios Técnicos del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López Neyra”.

En la Tabla B.5. se indican los oligonucleótidos utilizados, su secuencia en sentido 5' → 3' y su uso.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Sitio de restricción	Uso
T7P	AATACGACTCACTATAG		Secuenciación
T7T	GCTAGTTATTGCTCAGC		Secuenciación
SP6	ATTTAGGTGACACTATA		Secuenciación
Nde I-DCTPP1	CATATGTCGTGGCCGGT	Nde I	Clonación de <i>DCTPP1</i> en pET28a
DCTPP1-BamH I	GGATCCTAGGTTGAGGTCTG	BamH I	Clonación de <i>DCTPP1</i> en pET28a
E63Q1	CCTGGCCTTGGTTGGGC AAGTGGGGGAGCTGGC		Mutagénesis dirigida de <i>DCTPP1</i>
E63Q2	GCCAGCTCCCCCACTTG CCCAACCAAGGCCAGG		Mutagénesis dirigida de <i>DCTPP1</i>
Molde-det-dTTP	TTTATTATATTATTATT TAGGCGGTGGAGGCGG		Molde del ensayo de la DNA polimerasa
Molde-det-dCTP	TTTGTTTGTGGTTTGT TGGGCGGTGGAGGCGG		Molde del ensayo de la DNA polimerasa
DNApol Primer	CCGCCTCCACCGCC		Cebador del ensayo de la DNA polimerasa

Tabla B.5. Oligonucleótidos

C.1.6. Software

C.1.6.1. Programas informáticos

- *ImageQuant Version 5.0, Molecular Dynamics.*
- *LAS AF, Leica Application Suite.*
- *Cary WinUV Software.*
- *FlowJo Software.*
- *WebLab ViewerPro.*
- *DNA Strider® versión 1.1, Service de Biochimie-Departament de Biologie. Inst. de Recherche Fondamentale. Commissariat s l'Energie Atomique. France.*
- *Gen Constrution Kit® versión 1.03.1 (1990) B. Gross, A. Pytte y P. Rice. Textco, Inc.*
- *Oligonucleotides Properties Calculator, Northwestern University Medical School.*
- *ImageJ, versión original, MBF (McMaster Biophotonics Faculty) y Fiji.*
- *Imaris software (Bitplane, Scientific Software)*
- *Adobe Photoshop™ CS3 versión 10.0.*
- *SigmaPlot versión 8.0.*
- *GraphPad Software.*
- *EndNote X1.*
- *Internet Explorer y Mozilla Firefox.*
- *Paquete Microsoft Office 2007 (Microsoft Word, Microsoft Excel y Microsoft Power Point).*
- *Windows XP y Vista, Microsoft.*

C.1.6.2. Bases de datos

- **NCBI:** Utilizada para realizar búsquedas de secuencias de ADN, proteínas, datos de expresión de proteína y bibliografía.
- **EMBL-EBI:** Análisis de secuencias y alineamientos.
- **PDB (Protein Data Bank):** Búsqueda de estructuras de proteínas.
- **UniProtKB/Swiss-Prot:** Búsqueda de información sobre genes y proteínas.
- **Human Protein Atlas:** Búsqueda de información sobre proteínas y sus niveles de expresión.

- KEGG Pathway Maps: Información sobre rutas metabólicas.
- PhosphoSitePlus: Información sobre sitios de fosforilación en proteínas.

C.2. MÉTODOS

C.2.1. Cultivo y manipulación de células

C.2.1.1. Cultivo de las líneas celulares humanas

Los estudios *in vitro* con células humanas se llevaron a cabo en tres líneas celulares distintas: HeLa, MRC-5 y TK6. Para su mantenimiento, las células se cultivaron a 37 °C en un incubador con un 5 % de CO₂, utilizando frascos de 75 cm² y placas de distintos formatos (NUNC) según las necesidades. Los medios de cultivos utilizados son los indicados en el apartado B.1.2.

Las células adherentes, HeLa y MRC-5, se diluyen 1:2 ó 1:5, cada 1 ó 3 días o cada 2 ó 6 días, respectivamente. Para ello, tras retirar el medio de cultivo, las células se lavan con 5 ml de PBS 1X estéril (NaCl 0,14 M, KCl 2,6 mM, NaH₂PO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM (pH 7,2)) y se despegan de la superficie con 2 ml de tripsina - EDTA 0,25 % (Gibco, Life Technologies) e incubando a 37 °C durante 5 min. A continuación se añade medio de cultivo nuevo precalentado a 37 °C con el fin de inactivar la tripsina. Posteriormente se procede a diluir las células a la concentración deseada. Las células en suspensión TK6 se diluyen cada 1-2 días manteniéndose a una concentración entre 2 · 10⁵ - 1 · 10⁶ células/ml.

C.2.1.2. Criopreservación y descongelación

Las células se centrifugaron a 500 g durante 5 min a 4 °C y se resuspenden en una solución de medio de cultivo y DMSO al 5% a una concentración de 1-4 · 10⁶ células/ml. A continuación, 1 ml de la solución preparada se añade a cada vial de congelación. La congelación se lleva a cabo de manera gradual,

introduciendo los viales a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un recipiente con isopropanol 24 h antes de pasarlos a nitrógeno líquido para su conservación por periodos largos de tiempo.

Para el inicio de un cultivo, las células se descongelan rápidamente a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y el contenido del vial es transferido a un frasco de 75 cm^2 con 9 ml de medio de cultivo fresco.

C.2.1.3. Ensayos de proliferación celular y sensibilidad a fármacos

Para los ensayos de proliferación y viabilidad celular, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a 1000 células/pocillo. Para cada condición ensayada se utilizaron 4 pocillos distintos. Es el caso de los tratamientos con nucleosidos o fármacos, 24 h después de sembrar las células, se procedió a la exposición a distintas concentraciones de cada compuesto e incubación a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante distintos tiempos según la línea celular. Durante el periodo de tratamiento, el medio de cultivo y el fármaco se renovaron cada 24 h.

Para determinar el número de células viables, se utilizó el método de la reducción de Resazurina (Sigma-Aldrich). Se trata de un colorante vital de color azul y no fluorescente, permeable a la membrana plasmática, que es reducido en el interior celular a resorufina, un compuesto rojo y altamente fluorescente. En primer lugar, el medio se reemplaza por medio nuevo ($100\mu\text{l}$ /pocillo) sin compuesto. Como blanco, se emplean 4 pocillos sin células. A continuación se añade a cada pocillo $20\text{ }\mu\text{l}$ de Resazurina a $1,1\text{ mg/ml}$ en PBS 1X y tras una incubación a 37°C de 2 h, se mide la fluorescencia a 570-590 nm en un lector de placas SpectraMax GEMINIEM (Molecular Devices, CA, USA). El valor de fluorescencia determinado es proporcional al número de células presente en el cultivo dentro del rango establecido mediante una curva patrón con concentraciones conocidas de células.

Para el ensayo clonogénico, las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 300 células por pocillo y se trataron con concentraciones crecientes de decitabina (0-10 μM) durante 24 h (línea HeLa) o 48 h (línea MRC-5). Tras la finalización del tratamiento, se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron tres veces con PBS antes de añadir medio de cultivo fresco. Las células presentes en cada pocillo se dejaron proliferar durante 7 (Hela) o 12 días adicionales (MRC-5) para permitir la formación de colonias. Para la visualización de éstas se procedió a su tinción con una solución de cristal violeta al 0,5% en metanol.

C.2.1.4. Obtención de extractos celulares

En el caso de células adherentes, las células se recogen de la placa o frasco, utilizando un raspador (*scraper*) tras añadir PBS 1X frío. La solución celular se centrifuga a 500 g durante 5 min a 4 °C y el pellet se lava con 5 ml de PBS 1X frío. A continuación, las células se resuspenden en 1 ml de PBS 1X frío y se transfieren a un tubo de 1,5 ml, se vuelven a centrifugar y el pellet se guarda a -20 °C. Para proceder a su lisis, las células se resuspenden en 10–50 μl de tampón de lisis (Tabla B.4.) y se sumergen durante 1 min en nitrógeno líquido. Inmediatamente después se ponen en hielo durante 20 min tras lo cual se centrifugan a 10000 g durante 20 min a 4 °C. La fase soluble que compone el extracto de proteínas se guarda en un nuevo tubo de 1,5 ml y se procede a determinar la concentración de proteínas del extracto mediante el método de Bradford (Bradford 1976).

C.2.2. Técnicas para el estudio de la proteína

El procedimiento seguido para llevar a cabo todas las técnicas básicas de biología molecular utilizadas en el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se describen en los manuales de protocolos de biología molecular (Sambrook,

Fritsch et al. 1989) (Ausubel, Brent et al. 1997) o se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones del fabricante.

C.2.2.1. Clonación de la secuencia codificante de DCTPP1 en pET28a

La secuencia codificante de la proteína humana DCTPP1 fue amplificada mediante PCR a partir de un clon de cDNA (IRATp970E124D6) obtenido de RZPD (German Resource Center for Genome Research). Para ello se utilizaron los oligonucleótidos NdeI-DCTPP1 y DCTPP1-BamHI (Tabla B.5), con los que se generaron sitios de restricción NdeI y BamHI en los extremos de la secuencia. El producto de PCR se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TAE 1x (Tris-Acetato 0,04 M, EDTA 1 mM (pH 8,0)) y posteriormente se procedió a su extracción y purificación empleando el kit *Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare). El fragmento conteniendo la secuencia de DCTPP1 se clonó en el vector intermediario pGEM-T (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante, dando lugar al plásmido pGEM-T-DCTPP1. Para la purificación del DNA plasmídico se utilizó el kit *Wizard Plus SV MiniPreps* (Promega). A partir de pGEM-T-DCTPP1 se obtuvo la secuencia de interés mediante digestión con NdeI y BamHI (Promega). El fragmento obtenido junto con el vector de expresión pET-28a (Novagen), previamente digerido con las mismas enzimas y desfosforilado con fosfatasa alcalina (Roche), se incubaron en presencia de la T4 DNA ligasa (Invitrogen, Life Technologies) a 16°C durante toda la noche. El producto de ligación se empleó para transformar la cepa de *E. coli* XL1B, seleccionándose un plásmido que se denominó pET28-DCTPP1, y que fue verificado por secuenciación y utilizado para la expresión de proteína recombinante.

C.2.2.2. Expresión de DCTPP1 en *E. coli*

La cepa de *E. coli* BL21(DE3) se transformó con el vector de expresión pET28-DCTPP1. A partir de un único clon se inició un cultivo bacteriano que se

incubó a 37 °C durante 16 h. 10 ml del cultivo estacionario obtenido se utilizaron para inocular 500 ml de medio LB con kanamicina (50 µg/ml). El cultivo se incubó a 37 °C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,6, momento en el que se indujo la expresión de DCTPP1 mediante la adición de IPTG (1 mM). Tras 6 h de incubación en estas condiciones, el cultivo se centrifugó a 3000 g y 4 °C durante 10 min. Tras un lavado con PBS 1X, las células se resuspendieron en 10 ml de tampón A de purificación (Tabla B.4) junto con un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche). Las células se rompieron mediante sonicación (5 x 30 s, potencia 50%), separando previamente el extracto en dos tubos con 5 ml cada uno. La fracción soluble se separó mediante centrifugación a 23000 g y 4 °C durante 30 min. La sobreexpresión de la proteína en los extractos de *E. coli* se comprobó mediante electroforesis en geles de acrilamida al 15 %, en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

C.2.2.3. Purificación de DCTPP1 recombinante

La proteína recombinante DCTPP1 se purificó mediante cromatografía de afinidad a níquel, gracias a que la clonación en el vector pET28a añade a la secuencia de la proteína una cola de histidinas en el extremo N-terminal. De esta manera aprovechamos la afinidad de los residuos de histidina por metales de transición, previamente unidos a un grupo quelante fijado al soporte sólido de la columna. Se utilizó una columna *HiTrap 1ml Chelating HP* (GE Healthcare) cargada con una solución 100 mM de NiCl₂. La columna se acopló a un equipo FPLC (Pharmacia Biotech). Los tampones empleados se describen en la Tabla B.4. El método de purificación consistió en :

- 1) Equilibrado de columna con tampón A (5 volúmenes de columna, CV).
- 2) Carga del extracto de proteína soluble previamente filtrado (filtros de 0,8/0,2 µm, PALL).
- 3) Lavado con tampón A + 40 mM de imidazol (5 CV) .

4) Elución de la proteína de interés mediante un gradiente lineal 40-500 mM de imidazol (10 CV).

Todo el proceso se llevó a cabo a un flujo de 0,2 ml/min y a 4°C. Al final del gradiente se obtuvo un único pico de absorbancia a 280 nm que se recogió utilizando un colector de fracciones. El tampón de elución de la proteína purificada se reemplazó por tampón de almacenamiento (Tris-HCl 0.1 M pH 8.0, MgCl₂ 0.1M, 20 % de glicerol) utilizando columnas PD-10 (GE Healthcare). La proteína se congeló en alícuotas a -80°C hasta su posterior utilización. La pureza y concentración de la proteína se determinaron mediante SDS-PAGE y el método Bradford, respectivamente.

C.2.2.4. Obtención del mutante DCTPP1-E63Q

Para la obtención de un mutante catalítico de DCTPP1 se hizo un estudio comparativo con su ortólogo en ratón, la proteína RS21-C6, identificando el residuo de glutamato 63 como esencial en la actividad. Este residuo fue reemplazado por glutamina, utilizando el *QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagen). Para este ensayo se realizó una PCR utilizando como molde el vector de expresión pET28-DCTPP1, y oligonucleótidos diseñados específicamente (oligos E63Q1 y E63Q2, Tabla B.5.) que portan la mutación deseada (G187C). Para la reacción, se utilizó una polimerasa de alta procesividad (DNA polimerasa Pfu Turbo). Posteriormente, el producto de PCR se digirió con la enzima Dpn I, que reconoce específicamente las copias parentales metiladas. Con el producto de la digestión se transformaron bacterias de *E. coli* XL1B supercompetentes. Tras la selección de clones resistentes a kanamicina, la secuenciación de DNA permitió comprobar que contenían la mutación de interés.

La construcción pET28-DCTPP1-E63Q se empleó para la expresión y purificación de proteína según el protocolo descrito anteriormente.

C.2.2.5. Análisis el estado de oligomerización de DCTPP1 mediante *crosslinking*

Para los ensayos de *crosslinking* se utilizaron dos compuestos: dimetil suberimidato (DMS) y dimetil adipimidato (DMA). Ambos interaccionan con residuos de lisina de distintos monómeros formando amidas. Los ensayos se realizaron en tampón de trietanolamina (TEA) 0,2 M a pH 8,5, 5 mg/ml de DMA o DMS y 0,5 mg/ml de la proteína DCTPP1 humana purificada, en un volumen final de 300 μ l. Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente durante 30 min, 1 h o 3 h, recogiendo alícuotas de 50 μ l a las que se le añadieron 50 μ l de tricloroacético (TCA) al 100 % para parar la reacción. Tras 10 min a 4 °C las muestras se centrifugaron a 16000 g durante 15 min. Se retiró el sobrenadante y se lavaron dos veces con 1 ml de acetona, centrifugando entre cada una a 16000 g durante 15 min. Tras retirar el último sobrenadante se dejó evaporar la acetona. Las muestras finales se cargaron en geles SDS-PAGE al 10 %. Los ensayos también se realizaron en presencia de 5 mM de DTT, 10 mM de $MgCl_2$, y 6 mM de dCTP, condiciones que pueden favorecer la conformación oligomérica.

C.2.2.6. Caracterización cinética

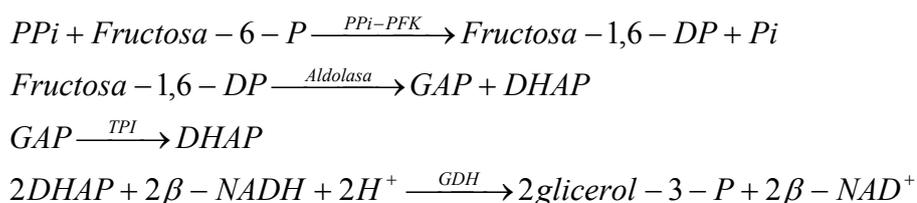
- Análisis del producto de la reacción catalizada por DCTPP1 mediante cromatografía de intercambio aniónico (monoQ)

Para un análisis cualitativo de los productos de reacción de DCTPP1, 40 μ g de enzima se incubaron con 200 nmol de dCTP en tampón de reacción (Bicina 2 mM pH 8,0, $MgCl_2$ 20 mM, BSA 0,75 mg/ml, KCl 0,1 M y DTT 4 mM) y en un volumen final de 250 μ l. Tras incubar la mezcla de reacción a 25 °C durante 30 min, se filtró con *Centrifugal Filter Units* de 0,22 μ m (Millipore). La muestra resultante se cargó en una columna *Mono QTM 5/50 GL* (GE Healthcare) acoplada a un sistema de HPLC *ÄKTAbasic* (GE Healthcare) y previamente equilibrada con 5 CV de Tampón A MonoQ (Tabla B.4). A continuación se

procedió a la elución de la muestra mediante un gradiente de concentración de NaCl (50-350 mM) con un flujo de 0,3 ml/min. Los nucleótidos presentes en la reacción se detectaron midiendo la absorbancia a 254 nm. El tiempo de retención de los nucleótidos en distintos estados de fosforilación se determinó mediante el uso de patrones comerciales.

- Determinación de pirofosfato

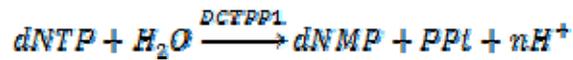
Para determinar el pirofosfato como producto de reacción de DCTPP1 se utilizó el kit *Pyrophosphate Reagent* (Sigma-Aldrich) según las instrucciones del fabricante. Se trata de un ensayo de enzimas acopladas en el que se produce la oxidación de dos moles de NADH por cada mol de pirofosfato, reacción que es cuantificada espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 340 nm.



Para este ensayo se utilizó como sustrato 5me-dCTP (2 mM) y dos concentraciones diferentes de DCTPP1 (4 y 12 μ M). La reacción se llevó a cabo en un tampón Tris-HCl 50 mM pH 8, MgCl₂ 50 mM y BSA 1 mg/ml, a 25 °C durante 10 min, en un volumen final de 25 μ l.

- Estudio de los parámetros cinéticos para DCTPP1

Para determinar las constantes cinéticas de la actividad pirofosfohidrolasa de DCTPP1, se midieron las velocidades iniciales de la enzima a diferentes concentraciones de sustrato. Para ello se utilizó un ensayo espectrofotométrico continuo, basado en la monitorización de protones liberados durante la reacción de hidrólisis del nucleótido (Larsson, Nyman et al. 1996) (Recio, Musso-Buendia et al. 2011).



Los cambios de absorbancia registrados a 573 nm, en un medio débilmente tamponado y en presencia de un indicador ácido-base, Rojo de Cresol, son directamente proporcionales a la concentración de producto que se genera. El análisis de los datos mediante la ecuación integrada de Michaelis-Menten, se llevó a cabo utilizando el programa MMD (cedido por Johan Nord, Universidad de Lund, Suecia).

La mezcla de la enzima y el sustrato se llevó a cabo utilizando un sistema de *stopped-flow* (SFA-20 Rapid Kinetic Accessory, Hi-Tech Scientific) unido a un espectrofotómetro UV-visible (Cary 50BIO, Varian). Las reacciones se llevaron a cabo a 25 °C y a pH 8,0, utilizando el tampón de reacción indicado en la Tabla B.4. En una reacción estándar (1 ml de volumen final) concentraciones crecientes de sustrato (10-250 μM) se incubaron con distintas concentraciones de DCTPP1 (0,1-1 μM). Los parámetros cinéticos se obtuvieron mediante el ajuste a la ecuación de Hill de los datos de velocidad inicial obtenidos a diferentes concentraciones de sustrato, utilizando para ello el programa SigmaPlot 8.0:

$$v_0 = \frac{V_{max} [S]^{nH}}{K_m^{nH} + [S]^{nH}}$$

El valor de k_{cat} se calculó dividiendo el valor de V_{max} obtenido entre la concentración de enzima utilizada y asumiendo que DCTPP1 es un tetrámero con dos sitios activos, de acuerdo a la estructura obtenida para su ortólogo en ratón, RS21-C6.

La inhibición de DCTPP1 fue analizada utilizando la representación lineal de los valores de K_m aparentes (K_{map}) frente a la concentración de inhibidor empleado. Las reacciones se llevaron a cabo en condiciones estándar con 0,5 μM de enzima y 50 μM de dCTP. El valor de K_i se obtuvo de la ecuación:

$$K_{map} = \frac{K_m}{K_t[I]} + K_m$$

C.2.3. Técnicas inmunológicas

C.2.3.1. Generación de anticuerpos anti-DCTPP1

El anticuerpo policlonal específico frente a DCTPP1 utilizado en el desarrollo de esta tesis, fue producido en el laboratorio mediante la inmunización de un conejo *New Zealand White* con proteína recombinante purificada. Previo a la inmunización, el conejo se mantuvo en cuarentena durante 21 días. Como control se obtuvo un suero preinmune a partir de 10 ml de sangre. La inmunización del conejo se realizó mediante cuatro inoculaciones, vía subcutánea, de proteína recombinante purificada. La solución de proteína se preparó como una emulsión de 500 µg de DCTPP1 en 600 µl de PBS 1X, mezclado con el mismo volumen de Adyuvante Completo de Freud para activar la respuesta inmune del conejo. Para las siguientes inoculaciones se utilizó el Adyuvante Incompleto de Freud, y se realizaron durante un periodo de 2 meses hasta la extracción final. Una semana después de cada inoculación se procedía a la extracción de 10 ml de sangre para comprobar el estado del título del anticuerpo.

Para la obtención del suero, la sangre extraída se sometió a una incubación a temperatura ambiente durante 2 h, seguida por una incubación a 37°C durante 20 minutos y por último a 4°C durante 4 h. Tras este periodo, el suero se obtuvo mediante centrifugación a 2500 g durante 10 minutos (X2). El título del anticuerpo fue 1:8000000, calculado mediante un ensayo ELISA donde la proteína recombinante DCTPP1 purificada es fijada a una placa multipocillo y luego detectada por el anticuerpo desarrollado.

C.2.3.2. Western blot

Las proteínas se separaron por peso molecular mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 15 % en SDS *Running buffer* (Tris 25 mM, glicina 102 mM, SDS 1% (pH 8,3)), a un voltaje de 200 V durante 50 min. Las proteínas se transfirieron del gel a membranas de nitrocelulosa (Whatman) entre dos papeles Whatman de 3 mm y sumergidos en solución de transferencia (Tris 25 mM, glicina 150 mM, metanol 20 % (pH 8,1 - 8,4)). La transferencia se realizó a 4 °C, bajo un voltaje de 100 V durante 45 min. La visualización de las proteínas y los marcadores de peso molecular (SDS-PAGE Standards Low Range, BioRad) fijados en la membrana se realizó mediante tinción con una solución de Rojo Ponceau durante 1 min. Posteriormente, las membranas se destiñeron con lavados en PBS 1X. Tras un paso previo de incubación de la membrana en solución de bloqueo [PBS 1X, 0,1 % de Tween 20 (PBS-T), leche en polvo desnatada 5 %], la membrana se incubó con el anticuerpo primario diluído en solución de bloqueo. Los anticuerpos y la diluciones empleadas fueron: anti-DCTPP1 (1:5000) y anti-dUTPasa (1:10000) (obtenidos en este laboratorio); anti-TMPK (1:10000), anti-TK (1:1000) y anti-DCTD (1:250) (Santa Cruz Biotechnologies), anti-dCK (1:3000) (Abcam) y anti- α tubulina (1:10000) (ACRIS Antibodies). Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario anti IgG de conejo o ratón conjugado con peroxidasa (1:5000 o 1:3000, respectivamente, Promega). Ambas incubaciones se realizaron durante 1 h, y después de cada una se realizaron lavados con PBS-T durante 10 min (X3). Por último, el anticuerpo se detectó mediante el kit de detección ECL™ (GE Healthcare) y exposición de la membrana a una película autorradiográfica Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare).

C.2.3.3. Microscopía de fluorescencia

Las células adherentes, MRC-5 y HeLa, se sembraron sobre cubreobjetos estériles (10^5 ó $2,5 \cdot 10^5$ células, respectivamente). Una vez alcanzado el grado de confluencia adecuado, los cubreobjetos se lavaron con PBS 1X y las células se

fijaron con *p*-formaldehído al 4 % diluido en solución de lavado (PBS 1X, 0,2 % de Tween 20). Para las células en suspensión TK6, $5 \cdot 10^5$ células se centrifugaron, se lavaron y se resuspendieron finalmente en 20 μ l de solución de fijación. A continuación se aplicó sobre un pocillo delimitado en un portaobjetos previamente tratado con poli L-lisina al 0,1 %. Tras 15 min de incubación a temperatura ambiente, las células se lavaron dos veces con solución de lavado y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1 % durante 10 min. Para la detección de DCTPP1, la preparación se bloqueó previamente durante 1 h en solución de bloqueo (Blocking Reagent 1 % en PBS 1X, Roche), y luego se llevaron a cabo incubaciones durante 1 h con soluciones del anticuerpo primario anti-DCTPP1 (1:1000) y del secundario anti-IgG de conejo conjugado con Alexa 488 (5 μ g/ml) (Invitrogen, Life Technologies), diluidos en solución de bloqueo. Tras cada incubación se realizaron 6 lavados de 5 min con solución de lavado. Para la detección de foci de γ H2AX, las células se incubaron con una dilución 1:250 de anticuerpo monoclonal anti- γ H2AX (Millipore) durante 30 min a 37 °C y posteriormente con una dilución 1:40 de anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con Alexa 488 (Invitrogen, Life Technologies). A continuación, las preparaciones se deshidrataron en metanol al 96 % durante 1 min, se dejaron secar y se montaron añadiendo 3 μ l de Vectashield-DAPI (Vector Laboratories, Inc.), como marcador de DNA nuclear. Para visualizar la mitocondria, los cultivos se incubaron con 250 nM de Mitotracker Red CMXRos (Invitrogen, Life Technologies) durante 30 min a 37 °C antes de recoger las células. Las preparaciones se sellaron con esmalte y se guardaron en oscuridad y a 4 °C hasta su procesamiento. Las imágenes digitales se tomaron utilizando un microscopio confocal LEICA TCS SP5. El análisis de la intensidad de señal y la colocalización de las distintas señales se llevó a cabo mediante el uso del programa de LEICA LAS AF v2.3.6 Build 5381sps y el software de procesamiento de imágenes ImageJ. Para el estudio de la colocalización en 3D, utilizando imágenes de z-stack completos se utilizó el programa Imaris (Bitplane, Scientific Software).

C.2.4. Técnicas para el estudio de DCTPP1 en cultivos celulares

C.2.4.1. Silenciamiento génico mediante siRNA

El silenciamiento génico de DCTPP1 se llevó a cabo mediante el uso de pequeños RNAs interferentes (siRNA). En concreto se utilizó un conjunto de 4 siRNA distintos (ON-TARGETplus SMARTpool, Dharmacon), específicos para distintas zonas del mRNA (Tabla B.6) (Figura B.1).

	Secuencia 5' → 3'
siRNA DCTPP1	1- GGC GAU AAC UUC UAG AUU A 2- CCC AGU AGG AUG UCA UGU A 3- UCU UAG AGA UUG AAG GCUG 4- CCG CAAG UAU ACAG AAUUG
siRNA DUT	1- GCU CAU UUG CGA ACG GAU U 2- UGU AGG AGC UGG UGU CAU A 3- UAG AGG AAA UGU UGG UGU U 4- UGCC UAUG AUU ACACA UAU A
siRNA DCK	1- CCAG AGACA UGCU UACA UAU A 2- AAAG CUGGC UCCUG CAUAG 3- UAU CAAG ACUGG CAUGACU 4- GGAA UGUUCU UCAGAUGAU
siRNA TK1	1- GGG CCG AUGU UCUCAGGAA 2- GCAU UAACCUG CCCACUGU 3- GCACAGAGUUGAUGAGACG 4- CAAAGACACUCGCUACAGC

Tabla B.6. Secuencias de los siRNAs específicos utilizadas para disminuir la expresión de DCTPP1, dUTPasa, dCK y TK1.



Figura B.1. Representación esquemática del mRNA de DCTPP1. En rojo se indican las zonas reconocidas por los distintos siRNAs utilizados.

La introducción del RNA en la célula se llevó a cabo mediante un agente de transfección basado en lípidos catiónicos, Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Life Technologies), que al formar agregados con los ácidos nucleicos permite que atraviesen la membrana plasmática. Para estos ensayos, las células MRC-5 o HeLa se sembraron un día antes de la transfección a un 30 o 15 % de confluencia, respectivamente, en el formato de placa requerido para el experimento a realizar. Cuatro o cinco horas antes de proceder con la transfección, las células se lavaron con PBS 1X y se añadió medio sin suero ni antibióticos. Las transfecciones se llevaron a cabo siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Para transfectar una placa de cultivo de 60 mm de diámetro, se mezclaron 100 pmol de RNA en 500 µl de medio sin suero ni antibióticos. Por otro lado, se mezclaron 10 µl de *Lipofectamine 2000* con 500 µl de medio y se incubaron durante 5 minutos. Inmediatamente después se mezclaron ambas soluciones y se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente para la formación los complejos RNA-*Lipofectamine*. A continuación, la solución (1 ml) se añadió gota a gota sobre la placa con células, tras lo cual se incubó a 37 °C durante 4-5 h, antes de reemplazar el medio de transfección por medio completo. Las concentraciones óptimas de ácido nucleico y agente de transfección se determinaron para cada caso monitorizando la disminución de proteína mediante *Western blot*. La línea celular MRC-5, en los casos en los que fue necesario, se retransfectó el día 4 post-transfección para prolongar el silenciamiento génico. Para transfectar en cualquier otro formato de placa de cultivos, las concentraciones de RNA y agente de transfección se extrapolaron en función de la superficie sembrada. Como control negativo, se utilizó un conjunto de cuatro siRNAs no específicos, sin ninguna diana en células de mamífero (ON-TARGETplus non-targeting pool, Dharmacon).

C.2.4.2. Análisis del ciclo celular mediante FACS

El estudio de la expresión y distribución de DCTPP1 a lo largo del ciclo celular se llevó a cabo mediante citometría de flujo en 2D. En estos ensayos, las

células en fase S se diferenciaron del resto por la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) en el DNA, que luego puede ser detectada por un anticuerpo específico.

Antes de recoger los cultivos, las células se incubaron con 10 μ M de BrdU (BD Pharmingen) durante 1 h a 37°C. Posteriormente, se fijaron con *p*-formaldehído al 4 % durante 15 min y se permeabilizaron con Tritón X-100 durante 10 min a temperatura ambiente. Para la detección del BrdU incorporado, las células se trataron con HCl 4N/Triton X-100 1 % durante 10 min y se lavaron inmediatamente después tres veces con 500 μ l de PBS 1X. Este paso es clave para la disociación de las histonas y la desnaturalización del DNA lo que permite que el BrdU incorporado esté accesible a los anticuerpos. Posteriormente, las células se incubaron en una solución 1:5 de anti-BrdU-FITC (Becton Dickinson) y solución de bloqueo, durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, las células se lavaron con PBS 1X y se incubaron con anti-DCTPP1 (1:1000) durante 30 min. Tras un nuevo lavado con PBS 1X, se incubaron con anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con alofocianina (APC) (1:100) (Invitrogen, Life Technologies) durante 30 min a temperatura ambiente. Para teñir el DNA, las células se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente con una solución 1 μ g/ml de DAPI (Sigma-Aldrich) y 50 μ g/ml de RNasa libre de DNasas (Qiagen). Las células lavadas y resuspendidas en PBS 1X se analizaron usando el citómetro de flujo FACSAria III cell sorter (Becton Dickinson). Los datos resultantes se evaluaron en el software de análisis FlowJo (Tree Star Inc.).

C.2.4.3. Sincronización del ciclo celular

La distribución intracelular de DCTPP1 en las diferentes fases del ciclo celular se analizó en células HeLa sincronizadas. La sincronización al principio de fase G1 se realizó mediante incubación en 60 μ M de lovastatina (Sigma-Aldrich) durante 24 h. Para la detención del ciclo celular en fase S se empleó afidicolina (Sigma-Aldrich) a 0,5 μ g/ml durante 18 h, y posterior incubación de

4 h en medio sin afidicolina. La sincronización en fase M o de mitosis, se llevó a cabo en presencia de nocodazol (Sigma-Aldrich) a 100 ng/ml durante 18 h, y posterior incubación en medio sin nocodazol durante 1 h. Todos los tratamientos se realizaron sobre 10^6 células en placas de 60 mm. La sincronización se determinó mediante el análisis del contenido en DNA por citometría de flujo. Para ello, tras los tratamientos, las células se lavaron con PBS 1X y se fijaron en una solución de etanol frío al 70 % en PBS 1X durante toda la noche a -20 °C. Al día siguiente, se lavaron con PBS 1X y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente en una solución con 50 μ g/ml de yoduro de propidio y 50 μ g/ml de RNasa libre de DNasa. La suspensión de células se analizó en un equipo FACScalibur (Becton Dickinson).

C.2.4.4. Cuantificación de los niveles intracelulares de nucleótidos

El ensayo utilizado para determinar los niveles de nucleótidos intracelulares está basado en la incorporación por la DNA polimerasa de dATP radiactivo en oligonucleótidos de secuencia específica (Sherman and Fyfe 1989). En presencia de un exceso del nucleótido radioactivo, la cantidad de radiactividad incorporada es proporcional a la cantidad de los nucleótidos limitantes presentes en el extracto celular. Para cada nucleótido, se utiliza un oligonucleótido sintético en el que se intercala una unidad del nucleótido a determinar en cada caso, por cada de tres unidades del nucleótido marcado radiactivamente (Tabla B.5).

Para la obtención del extracto celular con los desoxirribonucleótidos, 1×10^6 células MRC-5 o HeLa se resuspendieron en 1 ml de una solución metanol/agua 1:1 (v/v) a -20 °C. Esta solución celular se sometió a dos ciclos de congelación/descongelación, durante 10 min en una mezcla de hielo seco con etanol y después otros 10 min en hielo. Tras este proceso, las células se centrifugaron a 16000 g durante 20 min a 4 °C y se retiró el sobrenadante que se guardó en un tubo nuevo. A continuación, se procedió a una segunda

extracción a partir del pellet celular siguiendo el mismo protocolo. Los sobrenadantes obtenidos se juntaron y dividieron en tres muestras independientes, cada una de las cuales se utilizó para medir un nucleótido distinto. Estos sobrenadantes se guardaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

Previo a su uso, los extractos se evaporaron en vacío utilizando un SpeedVac DNA 120 (Savant). Para determinar dUTP, se realizó un tratamiento previo con dUTPasa a una de las muestras, de manera que los niveles de dUTP vendrán dados por la diferencia entre la determinación de la muestra sin tratar (dTTP+dUTP) y la muestra tratada con dUTPasa (sólo dTTP). Para el tratamiento con dUTPasa, las muestras se resuspendieron en tampón Tris-HCl 34 mM pH 7,8 y MgCl_2 5 mM, y se incubaron con 30 ng de dUTPasa humana obtenida en el laboratorio durante 20 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tras la incubación, se añadieron 60 μl de metanol al 100 % y se mantuvieron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min. Posteriormente se centrifugaron a 16000 g durante 20 min y $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante retirado se sometió entonces a evaporación en SpeedVac.

Para realizar el ensayo de la DNA polimerasa, las muestras se resuspendieron en el tampón de reacción de la DNA polimerasa (NEBuffer 2, New England Biolabs) junto con 32 nM de DNA molde, 32 nM de DNA *primer* (Tabla B.5.), 0,0032 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ de ^3H -dATP (PerkinElmer) y 0,3 unidades del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I (New England Biolabs) en un volumen final de 100 μl . La mezcla se incubó a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min, tras lo cual la reacción se detuvo mediante la adición de EDTA a una concentración final de 10 mM e incubación a $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 min. A continuación se procedió a la precipitación del DNA con 420 μl de Tris-HCl 10 mM pH 7,9 y TCA al 10 % e incubación a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante al menos 30 min. Cada muestra se cargó en un filtro Glass Microfibre Filters GF/C (Whatman), y utilizando un sistema de vacío se lavó con 30 ml de TCA al 5 % y 3 ml de etanol. Por último, los filtros se secaron y la radiactividad de cada muestra se midió en un contador de centelleo (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, Beckman CoulterTM).

C.2.4.5. Determinación de los niveles de metilación global

La cuantificación de los niveles de metilación global del DNA se realizó mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. El DNA genómico se aisló con el kit Tissue & Cell GenomicPrep Mini Spin (GE Healthcare). Una vez obtenido el DNA, éste se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm, empleando un NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). Un microgramo de DNA de cada muestra se evaporó en un SpeedVac y a continuación se sometió a una hidrólisis ácida mediante resuspensión en 100 µl de ácido fórmico al 99 % (Sigma-Aldrich). El material resuspendido se transfirió a un vial de vidrio de borosilicato (W224581, Wheaton) y se calentó a 150 °C durante 3 h. Con este tratamiento se liberan las bases del DNA para su análisis y cuantificación. Posteriormente, el ácido fórmico se evaporó a 70 °C y las muestras se resuspendieron en 100 µl de una solución acuosa 5 mM de ácido perfluoropentanoico (NFPA) (Sigma-Aldrich), tras lo que se almacenaron a -20 °C hasta su utilización. El análisis por UPLC/MS/MS se llevó a cabo con un espectrómetro Waters XEVO TQ-S en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, siguiendo el protocolo previamente descrito (Kok, Smith et al. 2007) (Rocha, Castro et al. 2010). Los resultados se expresaron como la razón 5meC/total-C, de manera que se eliminan los problemas de variabilidad en la cuantificación de DNA.

RESULTADOS

D. RESULTADOS

D.1. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE HUMANA DCTPP1

D.1.1. Construcción del vector de expresión de DCTPP1

La secuencia codificante de la proteína humana DCTPP1 se amplificó por PCR a partir de un plásmido obtenido de RZPD (German Science Centre for Genome Research) que contenía el cDNA de interés (IRATp970E124D6). Para ello se utilizaron dos oligonucleótidos diseñados específicamente (NdeI-DCTPP1 y DCTPP1-BamHI, Tabla B.5), en cuyos extremos 5' se introdujeron secuencias de corte para NdeI y BamHI que nos permiten su posterior inserción en un vector de expresión. El producto de la amplificación por PCR se comprobó en un gel de agarosa al 1% (Figura D.1. panel A), obteniendo una banda del tamaño esperado de 513 pb.

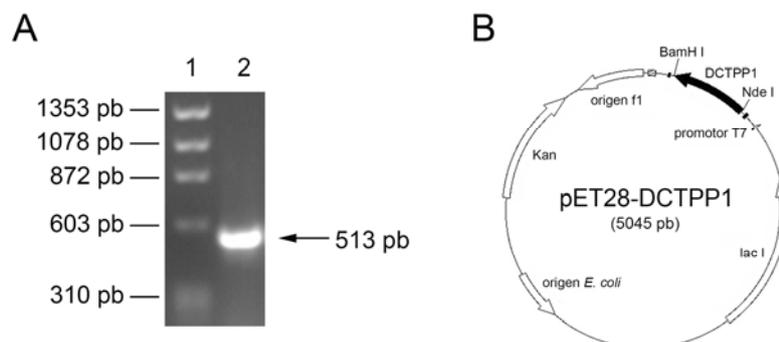


Figura D.1. Construcción del vector de expresión pET28-DCTPP1. A. Electroforesis en gel de agarosa al 1 %. 1- Marcadores de tamaño molecular de DNA. 2- Fragmento amplificado por PCR a partir del vector de origen con el cDNA codificante para la proteína humana DCTPP1. B. Mapa del vector de expresión pET28-DCTPP1.

El fragmento de 513 pb obtenido se purificó y clonó en el vector pGEM-T (Promega), generando el plásmido pGEMT-DCTPP1. La integridad del fragmento de DNA amplificado y clonado en pGEM-T se verificó por secuenciación utilizando los oligonucleótidos T7P y SP6 (Tabla B.5).

Con el fin de obtener proteína recombinante soluble, la secuencia codificante para DCTPP1 se subclonó en el vector de expresión pET28a (Novagen), que permite la expresión de la proteína fusionada a un hexapéptido de histidinas en el extremo N-terminal. Para ello, el plásmido pGEMT-DCTPP1 se digirió con las enzimas NdeI y BamHI. El fragmento de interés se separó en un gel de agarosa al 1 %, se purificó la banda correspondiente al tamaño esperado y se ligó con el vector pET28a previamente digerido con las mismas enzimas de restricción y desfosforilado con fosfatasa alcalina. El plásmido seleccionado se denominó pET28-DCTPP1 (Figura D.1 panel B). La correcta integración de la secuencia codificante de *dctpp1* fue comprobada por secuenciación empleando como cebadores los oligonucleótidos T7P y T7T (Tabla B.5).

D.1.2. Expresión de DCTPP1 en el sistema heterólogo *Escherichia coli*

La expresión de DCTPP1 se llevó a cabo en la cepa BL21(DE3) de *E. coli*, que contiene una copia del gen de la T7 RNA polimerasa necesaria para transcribir el gen de interés (Studier and Moffatt 1986). Esta cepa bacteriana se transformó con la construcción pET28-DCTPP1, seleccionándose la incorporación del plásmido por resistencia a kanamicina (50 µg/ml). Uno de los clones seleccionados se cultivó en 250 ml de medio LB hasta alcanzar una DO=0.6, momento en el cual se indujo la transcripción del gen mediante la adición de 1 mM de IPTG al medio de cultivo. Tras 2, 4 y 6 horas de incubación a 37°C y en agitación, se tomaron muestras del cultivo y se centrifugaron para recoger las células. Las bacterias se rompieron por sonicación y las fracciones

soluble e insoluble, esta última conteniendo los cuerpos de inclusión, se separaron por centrifugación y se analizaron en geles de acrilamida al 15% (Figura D.2 panel A). En todas las condiciones ensayadas se observó una elevada sobreexpresión de DCTPP1 (20,8 kDa) presente en la fracción soluble. Mediante *Western blot* se confirmó que la banda correspondiente a la proteína sobreexpresada, era detectada utilizando un anticuerpo monoclonal anti-His (1:5000, GE Healthcare), que reconoce específicamente el péptido de seis histidinas incorporado en el N-terminal de DCTPP1.

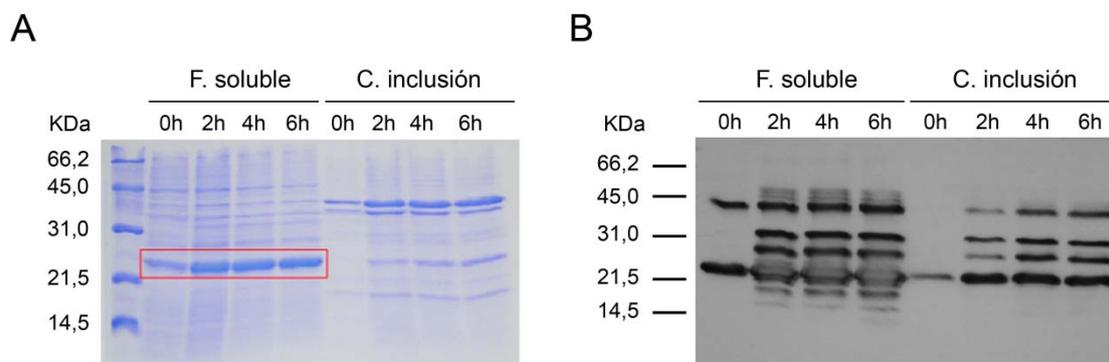


Figura D.2. Sobreexpresión de la proteína DCTPP1 humana en *E. coli* BL21 (DE3). Extractos de proteínas obtenidos de bacterias *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con pET28-DCTPP1 en ausencia de IPTG (0 h), y a distintos tiempos de inducción con 1 mM de IPTG (2, 4, y 6 h). Las muestras se separaron en su fracción soluble (izquierda) y en cuerpos de inclusión (derecha). **A.** Extractos separados en un gel de acrilamida al 15 % y teñido con azul de Coomassie. **B.** *Western blot* de estos extractos, utilizando un anticuerpo anti-His.

D.1.3. Purificación de la proteína recombinante DCTPP1

Para la purificación de DCTPP1 se utilizó la fracción soluble de extractos obtenidos de un cultivo de 500 ml de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pET28-DCTPP1, tras la inducción de la expresión con 1 mM de IPTG durante 6 h. La sobreexpresión de la enzima se comprobó mediante

electroforesis en geles de acrilamida al 15 % (Figura D.3). DCTPP1 se purificó mediante cromatografía de afinidad a metal bajo las condiciones indicadas en el apartado B.2.2.3. (Figura D.3).

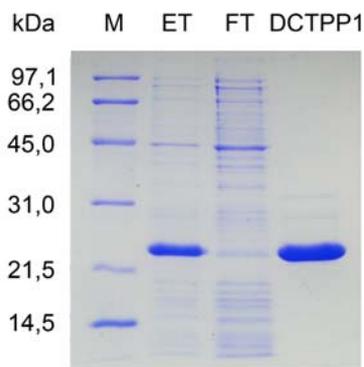


Figura D.3. Purificación de DCTPP1 mediante cromatografía de afinidad a níquel. Gel de acrilamida al 15 % teñido con azul de Coomassie. M, marcador de peso molecular; ET, fracción soluble del extracto total inducido con IPTG durante 6 h; FT, fracción de extracto no retenida en la columna o “flow-through”; DCTPP1, proteína una vez purificada.

D.1.4. Identificación de DCTPP1 mediante Huella de Masas Peptídicas

Para confirmar la identidad de la proteína purificada llevamos a cabo un análisis mediante Huella de Masas Peptídicas (Peptide Mass Fingerprinting, PMF) (Servicio de Proteómica del I.P.B. “López-Neyra”). La separación de 50 μ g de DCTPP1 recombinante en un gel de acrilamida al 10 % resulta en una banda mayoritaria, con un tamaño aproximado al esperado para DCTPP1 unido al péptido de histidinas (20,8 kDa), y cinco bandas minoritarias de pesos moleculares superiores (Figura D.4 panel A). Todas estas bandas se analizaron en el servicio de proteómica. Los resultados obtenidos identificaron 5 de las bandas como la proteína humana DCTPP1 (Figura D.4 panel B). Sólo la banda de mayor tamaño, situada en torno a 66,2 kDa, y que representa el 0,42 % de la proteína total, se identificó como una chaperona de *E. coli*.

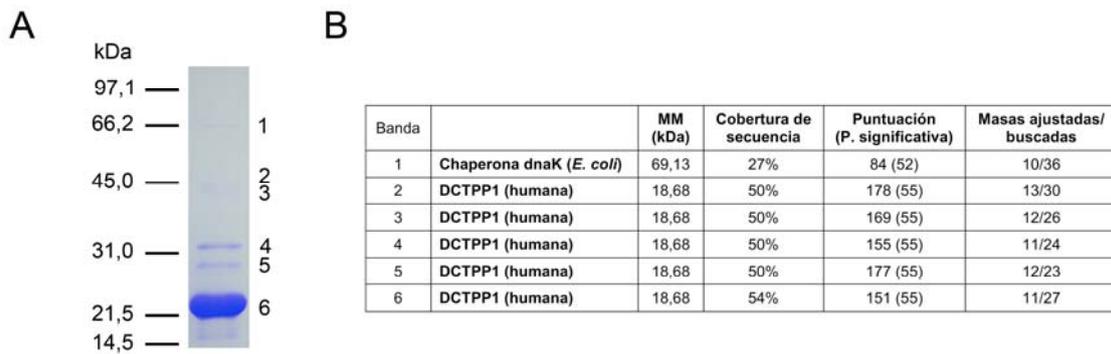


Figura D.4. Identificación de DCTPP1 mediante huella peptídica (PMF). **A.** Electroforesis en gel de acrilamida al 10 % de 50 μ g de DCTPP1 recombinante purificada. Con los números del 1 al 6 se indican las bandas analizadas mediante PMF. **B.** Resultados obtenidos en el análisis de PMF.

D.1.5. Determinación de la masa molecular de DCTPP1 mediante MALDI TOFF-TOFF

Con el fin de determinar la masa molecular de la proteína de estudio y confirmar que tiene el peso molecular esperado en solución, se analizó mediante espectrometría de masas MALDI TOF-TOF (Servicio de Proteómica de Centro Nacional de Biotecnología de Madrid (CNB)) (Figura D.5). El peso molecular teórico calculado a partir de la secuencia de aminoácidos de la enzima es de 18,681 kDa (*ProtParam tool* de *Expasy*), y de 20,844 kDa al expresarla unida al péptido de histidinas. Los resultados obtenidos mostraron que la proteína DCTPP1 recombinante purificada está presente mayoritariamente en una forma con 20,826 kDa, muy similar al tamaño esperado. Estos datos indican que no hay degradación significativa de DCTPP1 en solución.

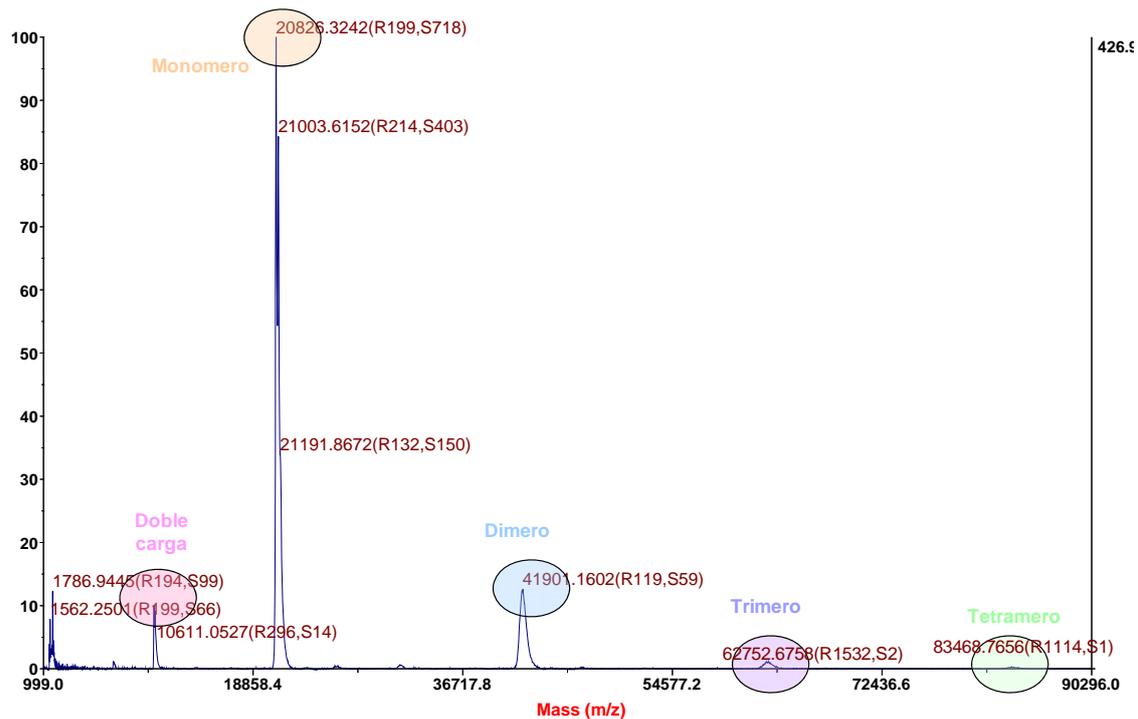


Figura D.5. Determinación de la masa molecular de DCTPP1 mediante MALDI TOF-TOF.

Mediante este análisis también es posible obtener información sobre el estado de oligomerización de la proteína. En el espectro obtenido se observaron diferentes especies cuyos tamaños moleculares corresponden con las formas monomérica, trimérica y tetramérica de la enzima. Estos resultados sugieren que DCTPP1, al igual que el ortólogo de ratón RS21-C6, es capaz de formar una estructura tetramérica en solución.

D.1.6. Análisis el estado de oligomerización de DCTPP1 mediante *Crosslinking*.

El estado de oligomerización de DCTPP1 también se estudió mediante un ensayo de *crosslinking*. En este ensayo se utilizan agentes bifuncionales, que interactúan con las distintas subunidades de las proteínas formando enlaces covalentes (Davies and Stark 1970). De esta manera, las moléculas que están interactuando en solución quedan unidas lo que permite visualizar la

formación de complejos de proteína en geles de acrilamida en condiciones desnaturizantes.

La proteína DCTPP1 purificada se incubó a temperatura ambiente con los agentes de *crosslinking* DMA y DMS como se indica en el apartado B.2.2.5., además de en distintas condiciones que pudieran favorecer la conformación oligomérica, como la presencia de $MgCl_2$, DTT o un sustrato de la enzima. Las muestras se precipitaron, se lavaron con acetona y se analizaron en electroforesis en gel de acrilamida al 10 % (Figura D.6).

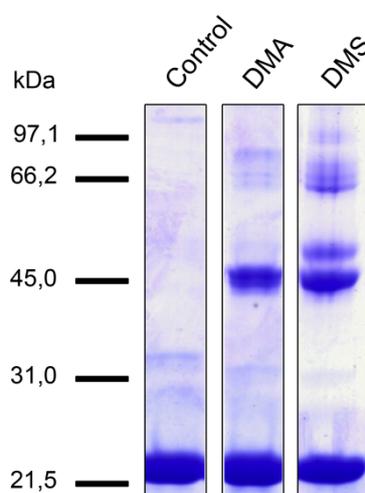


Figura D.6. Ensayo de *crosslinking* de la proteína DCTPP1. Control, proteína incubada sin agente de *crosslinking*; DMA, DCTPP1 incubada en presencia de DMA; DMS, DCTPP1 incubada en presencia de DMS. En todos los ensayos se utilizaron 25 μ g de proteína, y DMA y DMS a una concentración de 5 mg/ml. Las mezclas se incubaron en tampón TEA con 5 mM de DTT y 10 mM de $MgCl_2$, durante 30 minutos a 25 °C.

Los resultados obtenidos muestran una banda principal correspondiente a la forma monomérica de la enzima, y otra de menor intensidad en torno al marcador de 45 kDa, similar al tamaño esperado para el dímero de DCTPP1 (41,6 kDa). En todas las condiciones ensayadas, y especialmente en los tratamientos con DMS, podemos observar también especies oligoméricas de mayor tamaño, con pesos moleculares en torno a los esperados para las formas

trimérica (62,4 kDa) y tetramérica (83,2 kDa) de la enzima. Estos datos confirman los obtenidos en la determinación de masa molecular mediante MALDI TOF-TOF.

D.2. CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE DCTPP1

D.2.1. Actividad nucleósido trifosfato hidrolasa

Nuestro primer objetivo fue establecer la actividad nucleótido hidrolasa de DCTPP1, basándonos en el hecho de que la mayoría de proteínas pertenecientes a la superfamilia todo-alfa, entre las que se encuentran diversas enzimas de la familia MazG, se han caracterizado experimentalmente como NTP pirofosfatasas. Un análisis preliminar del sitio activo de DCTPP1 sugirió como sustrato potencial el 5-metil-dCTP (Moroz et al., 2005). En nuestro estudio, la actividad pirofosfohidrolasa de DCTPP1 se ensayó empleando bien dCTP o 5-metil-dCTP como sustratos. La identificación de los productos de reacción se realizó mediante dos metodologías complementarias. En primer lugar, se utilizó cromatografía de intercambio aniónico (Mono Q™ 5/50 GL, GE Healthcare) que permite la discriminación de nucleósidos en distintos estados de fosforilación. Así, se analizaron estándares conocidos de dCTP, dCDP, dCMP y dCyd (Figura D.7), para determinar los tiempos de retención de cada uno de ellos. Posteriormente, se analizó el producto de la reacción catalizada por DCTPP1 en presencia de dCTP. Para ello, 40 µg de proteína DCTPP1 se incubaron con 200 nmol de dCTP en tampón de reacción (Tabla B.4) durante 30 min a 25°C. El análisis de la mezcla de reacción reveló la desaparición del pico correspondiente al dCTP, y la aparición de un nuevo pico que presenta el mismo tiempo de retención que el de dCMP.

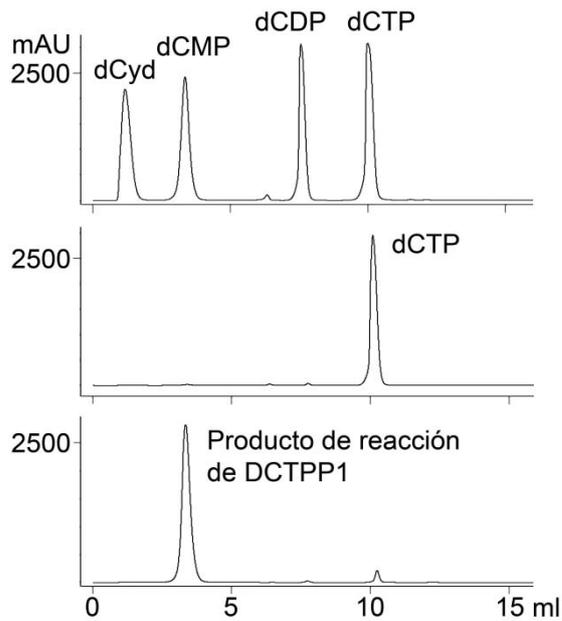


Figura D.7. Análisis de los productos de reacción de DCTPP1 mediante cromatografía de intercambio aniónico. Panel superior, estándares de dCTP, dCDP, dCMP y dCyd. Panel intermedio, mezcla de reacción en ausencia de enzima. Panel inferior, producto de la reacción catalizada por DCTPP1.

La hidrólisis del dCTP por DCTPP1 daría lugar a la formación de dCMP y de PPi. Para confirmar la liberación concomitante de pirofosfato se empleó en segundo lugar un ensayo de enzimas acopladas (Pyrophosphate Reagent Kit, SIGMA) según se describe en Materiales y Métodos. En este ensayo, la concentración de pirofosfato en la solución es proporcional a la cantidad de NAD⁺ producido, proceso que podemos cuantificar midiendo la absorbancia a 340 nm. En este caso, las reacciones se llevaron a cabo utilizando 5me-dCTP como sustrato (Tabla D.1). Como control se empleó un estándar con una cantidad conocida de pirofosfato (1 mM).

Mediante este ensayo se determinó que el pirofosfato es uno de los productos liberados en la reacción de DCTPP1, si bien en las condiciones ensayadas, el sustrato no es completamente hidrolizado.

Muestra	ΔA_{340}	[PPi] (mM)
Blanco	0,004	0
Control (1 mM PPI)	0,246	1,18
Muestra 1 (4 μ M DCTPP1)	0,127	0,63
Muestra 2 (12 μ M DCTPP1)	0,178	0,88
Muestra 1 + control	0,374	1,82

Tabla D.1. Determinación del pirofosfato producido en la reacción catalizada por DCTPP1. El cálculo de la concentración final se realizó teniendo en cuenta la absorptividad molar del NADH y los moles del mismo producidos por mol de pirofosfato hidrolizado. Las mezclas de reacción con 5me-dCTP (2 mM) y DCTPP1 (4 ó 12 μ M) se incubaron en tampón de reacción (Tris-HCl 50 mM pH 8, MgCl₂ 50 mM y BSA 1 mg/ml) a 25 °C durante 10 min. Blanco, tampón de reacción sin enzima ni sustrato.

D.2.2. Efecto de las condiciones de reacción sobre la actividad específica de DCTPP1

La actividad pirofosfohidrolasa de DCTPP1 se estudió en detalle utilizando un ensayo continuo con un espectrofotómetro provisto de un accesorio “stopped-flow”. La liberación de protones asociada a la reacción de hidrólisis del nucleótido, provoca una disminución de pH en un medio débilmente tamponado, que podemos monitorizar gracias a la presencia de un indicador ácido-base, el rojo de cresol (Larsson, Nyman et al. 1996). A partir de la curva de hidrólisis de sustrato podemos aplicar la ecuación integrada de Michaelis-Menten, obteniendo valores de V_0 a distintas concentraciones de sustrato.

En primer lugar, se evaluó empíricamente la composición de la mezcla de reacción con el fin de determinar las condiciones óptimas de hidrólisis:

Relevancia del ion metálico. Las enzimas que utilizan nucleótidos como sustrato, dependen de iones divalentes, principalmente de magnesio (Mg²⁺) para llevar a cabo el proceso de catálisis. El papel del ion metálico en la actividad catalítica de DCTPP1 se estudió mediante la adición de diferentes

concentraciones de MgCl_2 al tampón de reacción, desde 1 hasta 80 mM (Figura D.8 panel A). En nuestras condiciones de ensayo, la velocidad de la reacción aumentó con la concentración del catión divalente hasta alcanzar un máximo en torno a 20 mM. En un tampón sin MgCl_2 se observan niveles residuales de hidrólisis de dCTP, debido probablemente a que la enzima es purificada y almacenada en presencia de MgCl_2 . En cambio, al añadir un agente quelante de iones metálicos como el EDTA (1 mM), la reacción catalizada por DCTPP1 se inhibe por completo, lo que indica el carácter esencial del ion metálico en el proceso de catálisis.

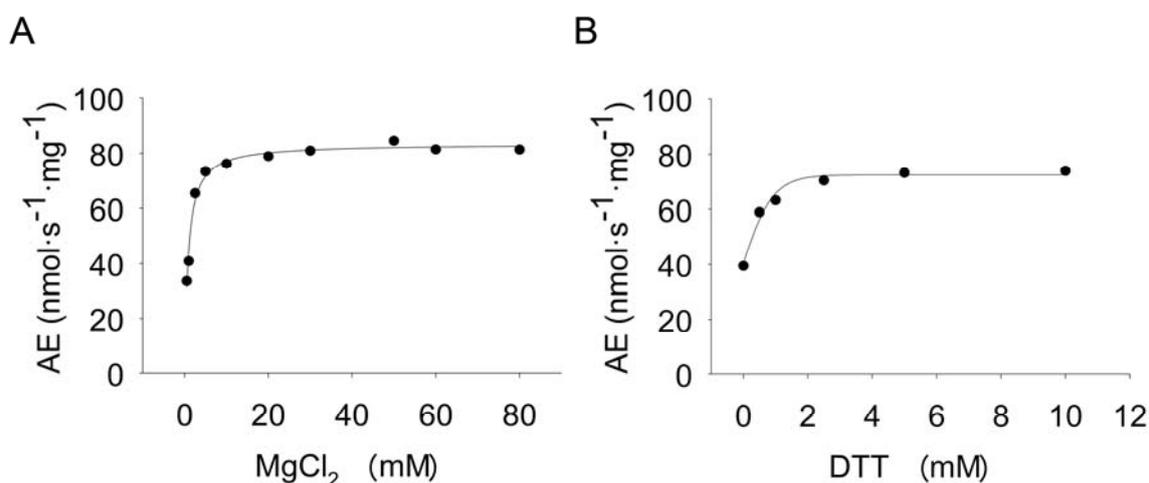


Figura D.8. Efecto del magnesio sobre la actividad específica de DCTPP1.

Las reacciones se llevaron a cabo a $1\ \mu\text{M}$ de DCTPP1 y $50\ \mu\text{M}$ de dCTP, en presencia de distintas concentraciones de **A.** MgCl_2 o **B.** DTT. Cada punto corresponde al valor medio de al menos tres determinaciones independientes. Los valores de desviación estándar no superaron en ningún caso el 10% del valor total.

Agentes reductores. Los grupos sulfidrilo (-SH) presentes en residuos de cisteína pueden presentarse en forma reducida o como enlaces disulfuro (-S-S) entre dos residuos. En muchas ocasiones, el estado en el que se encuentran es determinante para la catálisis o la conformación de la enzima. Un agente reductor como el DTT (ditiotreitól), capaz de reducir enlaces disulfuro, puede prevenir o eliminar enlaces intramoleculares o intermoleculares inapropiados.

Debido a que la proteína recombinante DCTPP1 mostró tendencia a la agregación, quisimos determinar si la presencia de DTT en la reacción afectaba a su actividad. Para ello, la hidrólisis de dCTP por DCTPP1 se llevó a cabo en tampones de reacción con distintas concentraciones de DTT, encontrándose un máximo de actividad específica en presencia de al menos 3 mM de DTT (Figura D.8 panel B). Sin embargo, concentraciones superiores a 10 mM eran inapropiadas para la estabilidad del tampón de reacción.

Efecto de la fuerza iónica. La estructura de una proteína en solución puede verse afectada por la fuerza iónica del medio. Además, pueden producirse cambios en su actividad por variaciones en los pK_a de los residuos pertenecientes al centro activo. Por ello se estudió el efecto de diferentes concentraciones de KCl sobre la actividad de DCTPP1 (Figura D.9 panel A). Los resultados revelaron un leve aumento en la velocidad de la reacción de hidrólisis del dCTP, alcanzando un máximo de actividad a una concentración de KCl de 100 mM. A concentraciones superiores se observa un descenso en la actividad.

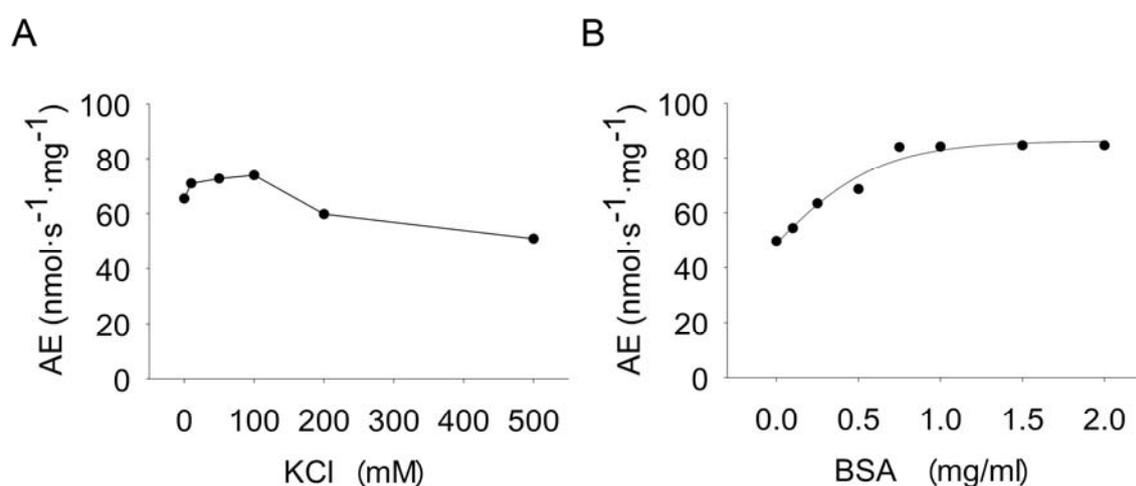


Figura D.9 Efecto de la fuerza iónica y del BSA sobre la actividad específica de DCTPP1. Representación de la actividad específica (AE) de DCTPP1 (1 μ M) en presencia de dCTP (50 μ M) a distintas concentraciones de **A.** KCl o **B.** BSA. Cada punto corresponde al valor medio de al menos tres determinaciones independientes. Los valores de desviación estándar no superaron en ningún caso el 10% del valor total.

Papel estabilizador del BSA. Dado que una elevada concentración de proteína es uno de los factores que favorece la estabilidad de una enzima en solución, en muchas ocasiones la presencia de BSA (“Bovine Serum Albumin”) en las reacciones enzimáticas puede contribuir significativamente al aumento de la actividad enzimática. Para estudiar el efecto del BSA sobre la capacidad de hidrólisis de DCTPP1, se ensayaron diferentes tampones con concentraciones crecientes de BSA (Figura D.9 panel B). Los resultados obtenidos muestran un incremento de la hidrólisis de dCTP por DCTPP1 a concentraciones de BSA iguales o superiores a 0,75 mg/ml.

D.2.3. Determinación de los parámetros cinéticos de DCTPP1

La curva de saturación de DCTPP1 obtenida a diferentes concentraciones de dCTP en condiciones óptimas de actividad, muestra una desviación significativa de la cinética hiperbólica de Michaelis-Menten. El carácter sigmoidal de la curva sugiere que la unión del sustrato al centro activo ocurre de manera cooperativa. Los datos experimentales ajustados a la ecuación de Hill dan un coeficiente de Hill (n_H) = 2,13 (Figura D.10 panel A). Este coeficiente mayor que 1 es indicativo de cooperatividad positiva, comportamiento que es característico de las enzimas oligoméricas, apoyando esto la hipótesis de que DCTPP1 podría adoptar la misma conformación tetramérica que su ortólogo en ratón, RS21-C6. El carácter cooperativo de DCTPP1 se manifiesta así mismo en la representación gráfica de dobles inversos o linearización de Lineweaver-Burk (Figura D.10 panel B), en la que podemos encontrar dos pendientes distintas. A partir del ajuste de la ecuación de Hill, se determinó que DCTPP1 hidroliza dCTP con una $V_{max} = 1,42 \pm 0,05 \mu\text{M}/\text{s}$ y una $K_m = 47,63 \pm 2,66 \mu\text{M}$.

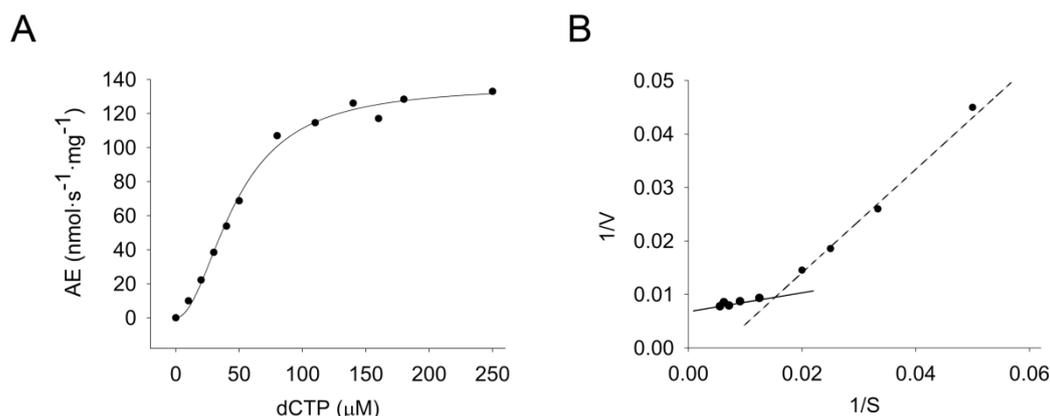


Figura D.10. Hidrólisis de dCTP por DCTPP1. **A.** Ajuste de los valores de velocidad obtenidos a la ecuación de Hill. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo incubando $0,5 \mu\text{M}$ de DCTPP1 con concentraciones crecientes de dCTP ($20\text{-}250 \mu\text{M}$), bajo condiciones de reacción estándar descritas en el apartado B.2.2.6. (AE, actividad específica) **B.** Representación de dobles inversos o de Lineweaver-Burk a partir de los datos de V_0 obtenidos a distintas concentraciones de dCTP. Cada punto corresponde al valor medio de al menos tres determinaciones independientes. Los valores de desviación estándar no superaron en ningún caso el 10% del valor total.

D.2.4. Estudio de la especificidad de sustrato de DCTPP1

La mayoría de las NTP pirofosfatasas descritas hasta la fecha llevan a cabo una función de “house-cleaning”, hidrolizando nucleótidos no canónicos o modificados evitando de esta forma su incorporación al genoma por DNA polimerasas. En este trabajo, con el fin de determinar la especificidad de sustrato de DCTPP1, se ha analizado su actividad frente a una amplia selección de nucleótidos, tanto canónicos como derivados modificados (Figura D.11).

De los cuatro nucleótidos canónicos, dCTP es el sustrato preferido por DCTPP1, con una constante de especificidad $(k_{\text{cat}}/K_m) = 119000 \text{ s}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$, seguido por dTTP y dUTP, con valores de 28000 y $25000 \text{ s}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$, respectivamente. Por el contrario, no se detectó ninguna actividad utilizando dGTP como sustrato.

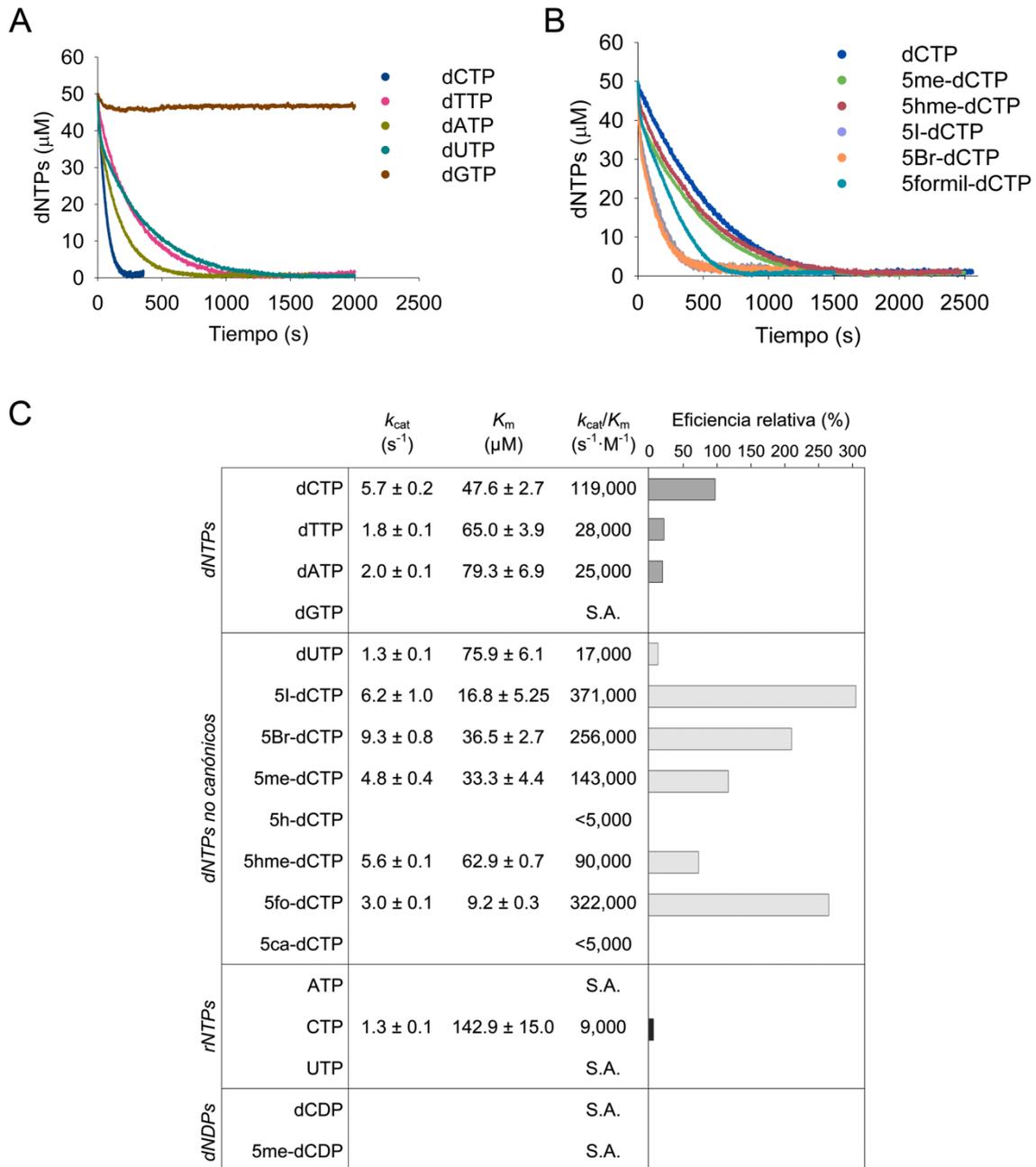


Figura D.11. Especificidad de sustrato de DCTPP1. **A.** Curvas de hidrólisis de los cuatro nucleótidos canónicos y del dUTP. **B.** Curvas de hidrólisis de derivados del dCTP con modificaciones en posición 5 de la base. La curva de hidrólisis del dCTP se incluye como referencia. Todas las reacciones se llevaron a cabo con $0.1 \mu M$ de DCTPP1 y $50 \mu M$ de sustrato. **C.** Parámetros cinéticos para DCTPP1. Los valores de k_{cat} se calcularon asumiendo que la enzima es un tetrámero con dos sitios activos. Los datos son la media de al menos tres determinaciones independientes. S.A. indica sin actividad o por debajo de los niveles de detección bajo las condiciones de ensayo utilizadas.

En general, los ribonucleótidos no son un buen sustrato para DCTPP1, que sólo es capaz de hidrolizar CTP, aunque con una constante de especificidad 13 veces inferior a la del correspondiente desoxirribonucleótido ($9000 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$). Este dato nos indica una fuerte exclusión del grupo OH en posición 2' de la ribosa, lo que hace a la enzima altamente selectiva frente a desoxirribonucleótidos, presentes en concentraciones muy inferiores. A diferencia de otras enzimas de la superfamilia $\text{todo-}\alpha$, como las dUTPasas diméricas y DR2231, DCTPP1 es muy poco eficiente hidrolizando dUTP, con un valor de $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}} = 17000 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$. Esta observación nos indica además, la relevancia del grupo amino de la citosina en el proceso catalítico. Por otra parte, DCTPP1 no es capaz de hidrolizar ninguna de las formas difosfato ensayadas, dCDP o 5me-dCDP.

Por último, y basándonos en la preferencia de DCTPP1 por desoxicitidina trifosfato, se ensayaron una serie de derivados de dCTP con distintas sustituciones en posición C5 de la base y con posible función fisiológica. DCTPP1 es muy eficiente eliminando derivados halogenados como 5I-dCTP ($371000 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) y 5Br-dCTP ($256000 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$), mientras que 5me-dCTP se hidroliza con una eficiencia similar al dCTP ($143000 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$). Dentro del grupo de derivados oxidados de dCTP y 5me-dCTP, encontramos la mayor constante de especificidad para el 5fo-dCTP ($322000 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$). Este sustrato es hidrolizado por DCTPP1 con un valor de K_{m} cinco veces inferior al de dCTP, el más bajo encontrado hasta el momento para esta enzima. El siguiente mejor sustrato de este grupo es el 5hme-dCTP ($90000 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$), mientras que la actividad sobre 5h-dCTP y 5ca-dCTP es muy baja.

D.2.5. Inhibición competitiva de DCTPP1 por PPi y dCDP

La inhibición por producto ha sido previamente caracterizada en otras $\text{todo-}\alpha$ nucleótido hidrolasas, por lo que se llevó a cabo un estudio del efecto del dCMP y el PPi sobre la actividad de DCTPP1. Para estos ensayos, la enzima ($0,5 \mu\text{M}$) se incubó en la mezcla de reacción con el sustrato, dCTP ($50 \mu\text{M}$), y con

distintas concentraciones de cada uno de los productos de hidrólisis. En estas condiciones, la adición de dCMP a la reacción no causó ningún efecto sobre DCTPP1. Sin embargo, concentraciones crecientes de PPi provocaron un aumento en los valores de K_m (Figura D.12 panel A.). La hidrólisis de dCTP por DCTPP1 fue inhibida por PPi de forma competitiva con una constante de inhibición en el rango micromolar ($K_i = 56,3 \mu\text{M}$).

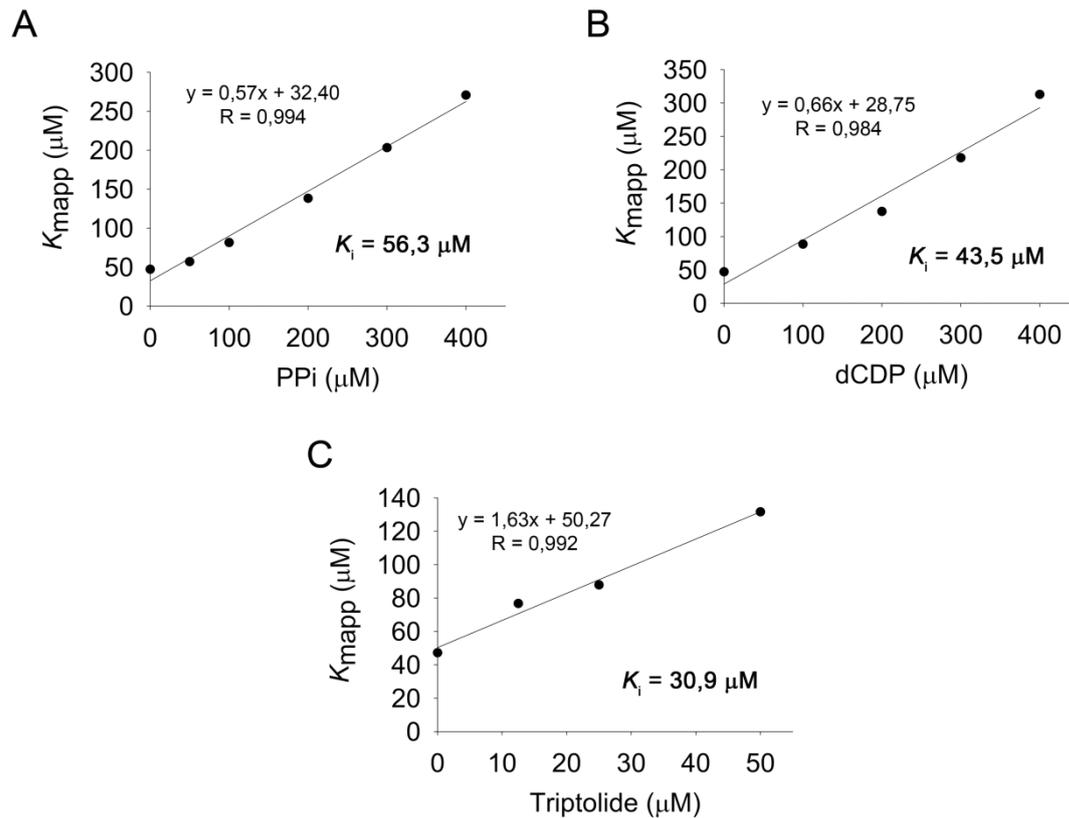


Figura D.12. Inhibición de DCTPP1 por PPi, dCDP y triptolide. Cálculo de las constantes de inhibición a partir de la regresión lineal de las K_m aparentes (K_{mapp}) respecto a la concentración de inhibidor, para: **A.** PPi; **B.** dCDP; y **C.** triptolide. Cada valor de K_{mapp} corresponde al obtenido del ajuste de Hill de la curva de saturación de dCTP, en presencia de la concentración indicada de inhibidor, y $0,5 \mu\text{M}$ de DCTPP1. Los valores representados son la media de al menos tres determinaciones independientes. La desviación estándar no superó en ningún caso el 10% del valor total.

Además de los productos de reacción, se ensayaron otros nucleótidos no hidrolizables o nucleósidos. De ellos, ATP, UTP, dGTP, 5me-dCMP, dUMP y 5me-dCyd, no afectaron a la hidrólisis de dCTP por DCTPP1. Por el contrario, se observó que la adición de dCDP a la mezcla de reacción provocaba un aumento en los valores de K_m (Figura D.12 panel B.). El análisis de la inhibición de DCTPP1 por dCDP dio un valor de $K_i = 43,5 \mu\text{M}$. Estos datos sugieren que el dCDP intracelular podría actuar como un regulador negativo de la actividad de DCTPP1.

Por último, también se estudió la inhibición provocada por triptolide sobre DCTPP1. Se trata de un compuesto natural, con actividad anti-proliferativa, inmunosupresiva y anti-inflamatoria, y para el cual se ha descrito una interacción directa con DCTPP1 (Corson, Cavga et al.). Bajo nuestras condiciones de ensayo, triptolide inhibe la conversión de dCTP a dCMP y PPi de manera competitiva y presentando una K_i de $30,9 \mu\text{M}$ (Figura D.12 panel C.).

D.3. ELIMINACIÓN DE LA COLA DE HISTIDINAS DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE

La enzima recombinante DCTPP1 ha sido expresada y purificada unida a un péptido de 6 histidinas, incorporado en su extremo N-terminal, gracias al vector de expresión pET28a. Además de facilitar la purificación por cromatografía de afinidad, la presencia de la cola de histidinas en estas proteínas de fusión presenta algunas ventajas adicionales como son la mejora de la expresión, el plegamiento y la solubilidad de la proteína así como la disminución de la proteólisis y antigenicidad (Arnau, Lauritzen et al. 2006). Pero por otro lado también se han observado efectos negativos como cambios en la conformación de la proteína, inhibición de la actividad enzimática, alteraciones en su actividad biológica, excesiva flexibilidad en estudios estructurales o toxicidad.

Debido a los posibles efectos negativos de las proteínas de fusión es siempre recomendable la eliminación del péptido unido. Con este fin, el vector utilizado, pET28a, incorpora una secuencia de corte para la proteasa trombina, situada delante del sitio de clonación de la secuencia codificante (Figura D.13). La secuencia de corte para esta enzima es Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser, dejando la glicina y la serina unidas a la proteína.

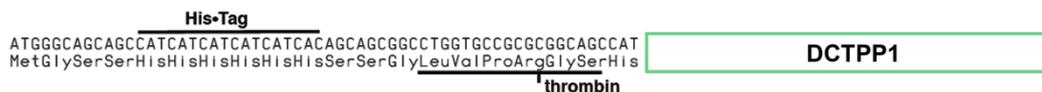


Figura D.13. Detalle de la proteína de fusión His-DCTPP1. En el esquema se muestra la secuencia de seis histidinas unidas a la proteína y el sitio de corte para la liberación del péptido.

Para la digestión de His-DCTPP1 se utilizó el Thrombin CleanCleave Kit (SIGMA), una suspensión de trombina-agarosa, de manera que tras la digestión, la proteasa puede ser eliminada fácilmente por centrifugación. La reacción se llevó a cabo con 1 mg de proteína, en 50 mM de Tris-HCl pH 8,0 con 10 mM de CaCl₂, a temperatura ambiente, y se recogieron alícuotas a 10, 20, 30, 40, y 50 min de incubación (Figura D.14). A los 10 min de incubación se observa la aparición de una banda ligeramente inferior al control que correspondería a DCTPP1 sin el péptido de histidinas (18,7 kDa), completándose la digestión a los 50 min. En las condiciones de digestión empleadas, se produce así mismo la aparición de un producto de degradación inespecífico, situado entre los marcadores de 21,5 y 14,5 kDa.

Las dos bandas resultantes de la digestión se identificaron mediante huella peptídica y determinación de masa molecular (Servicio de Proteómica del IPB “López-Neyra”) (Figura D.15). El análisis reveló que ambas bandas correspondían a DCTPP1, la superior con 18963 Da y la inferior de 15372 Da.

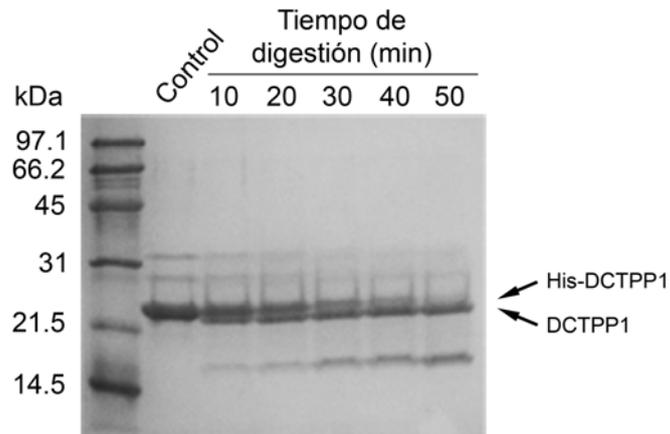


Figura D.14. Digestión de His-DCTPP1 con trombina. La proteína His-DCTPP1 (1 mg) se incubó en presencia de trombina (15 μ g) a temperatura ambiente. En un gel de acrilamida al 15 % se analizaron 20 μ g del producto de digestión recogido a los tiempos indicados. Como control la proteína se incubó durante 50 min en las mismas condiciones que las muestras pero sin proteasa.

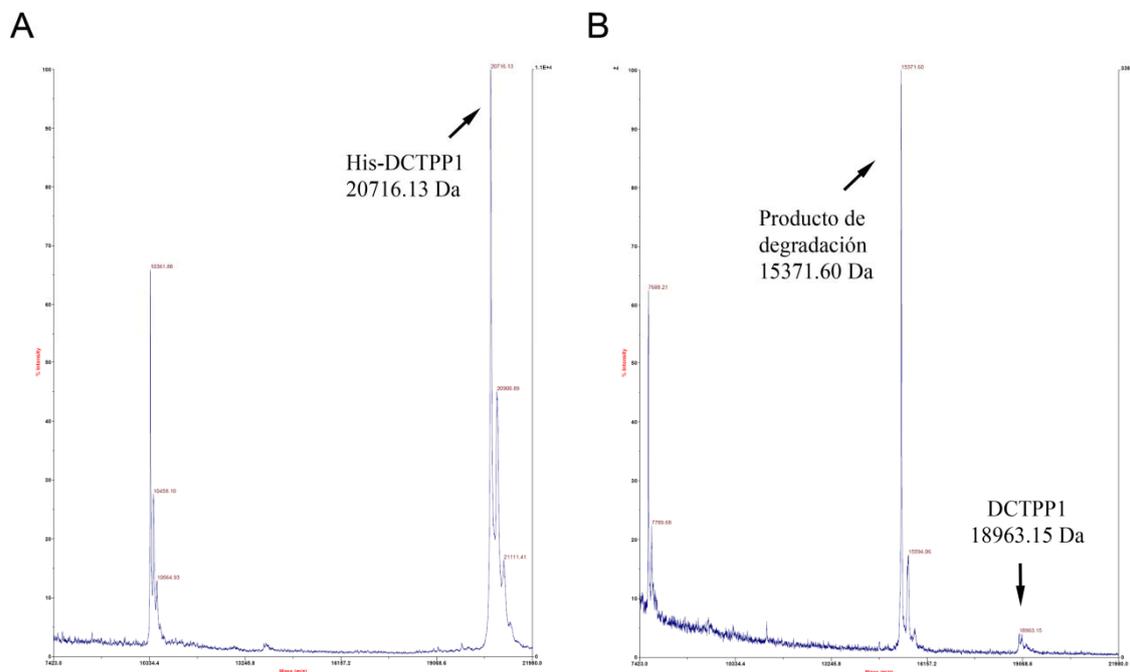


Figura D.15. Espectro de masas del producto de digestión de His-DCTPP1 con trombina. A. Proteína recombinante incubada en las mismas condiciones de digestión pero en ausencia de proteasa. B. Producto de digestión de His-DCTPP1 con trombina. La proteína recombinante se incubó con la proteasa a temperatura ambiente durante 1 h.

El efecto del péptido de histidina sobre la actividad enzimática se analizó mediante ensayos cinéticos en condiciones estándar de reacción empleando 50 μM de 5me-dCTP y 1 μM del producto de digestión por trombina o de la proteína sin digerir como control (Figura D.16 panel A). En una superposición de las curvas de hidrólisis obtenidas no se observan diferencias significativas (Figura D.16 panel B), manteniéndose las constantes cinéticas. Estos resultados indican que el péptido de 6 histidinas no afecta la reacción catalizada por DCTPP1.

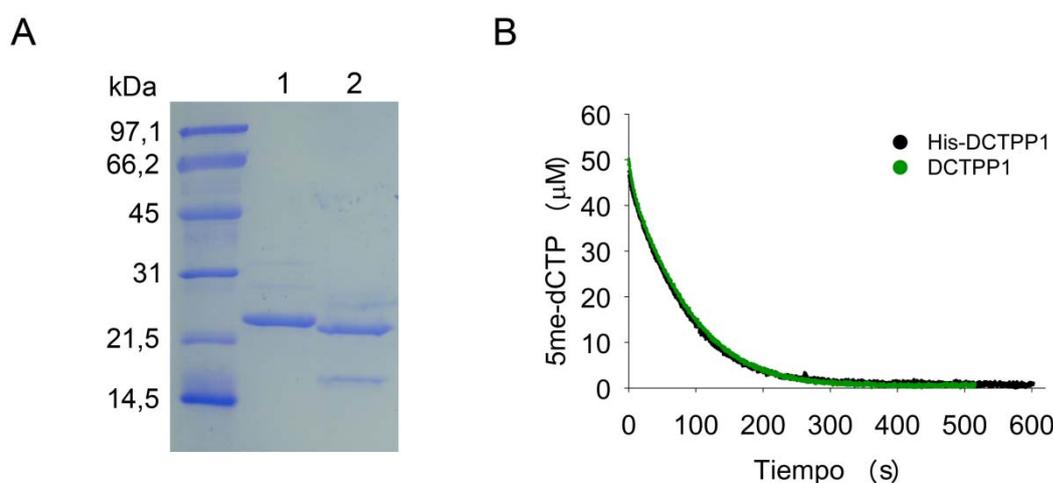


Figura D.16. Comportamiento cinético de His-DCTPP1 y de DCTPP1 tras digestión con trombina. A. Gel SDS-PAGE al 15 %: 1, His-DCTPP1; 2, proteína recombinante digerida con trombina durante 1 h a temperatura ambiente. B. Comparación de las curvas de hidrólisis de 5me-dCTP (50 μM) por His-DCTPP1 o por el producto de digestión con trombina (1 μM).

D.4. GENERACIÓN DEL MUTANTE DCTPP1-E63Q, PURIFICACIÓN Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Para confirmar que la actividad nucleótido hidrolasa detectada es intrínseca de la proteína recombinante purificada se obtuvo un mutante catalítico de la misma. Según los datos estructurales existentes para el ortólogo de DCTPP1 en ratón, RS21-C6, uno de los residuos clave del centro activo es el glutamato en

posición 63, que participa en la interacción con un grupo fosfato del nucleótido sustrato (Wu, Liu et al. 2007).

Mediante mutagénesis dirigida (QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit ,oligos E63Q1 y E63Q2, Tabla B.5), la guanina 187 de la secuencia codificante de DCTPP1 se sustituyó por citosina. Este cambio conlleva el reemplazamiento del glutamato 63 por glutamina. La proteína mutante DCTPP1-E63Q se expresó y purificó siguiendo el mismo protocolo que para la proteína nativa (Figura D.17 paneles A y B).

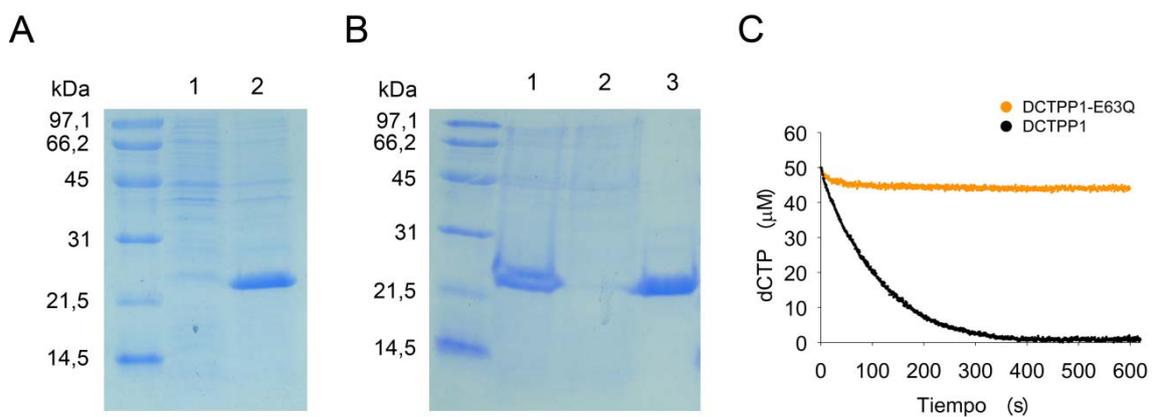


Figura D.17. Expresión y purificación del mutante catalítico DCTPP1-E63Q.

A. Gel SDS-PAGE al 15 % mostrando la inducción de la expresión de la proteína recombinante en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3): 1. no inducida; 2. inducida con 1 mM de IPTG. **B.** Purificación de la enzima mediante cromatografía de afinidad a níquel: 1. extracto total; 2. lavado a 40 mM de imidazol; 3. elución a 500 mM de imidazol. **C.** Comparación de las curvas de actividad de DCTPP1-E63Q (0,5 μ M) (naranja) respecto de la de DCTPP1 (0,5 μ M) (negro), empleando dCTP (50 μ M) como sustrato.

Como se muestra en la Figura D.17 (panel C) la sustitución del glutamato 63 en la proteína DCTPP1-E63Q conlleva la pérdida de la actividad nucleótido hidrolasa en las condiciones ensayadas, indicando el papel esencial de este residuo en el proceso catalítico.

D.5. LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE DCTPP1

D.5.1. Obtención de anticuerpos policlonales frente a la proteína recombinante DCTPP1

Con el objetivo de estudiar la localización de DCTPP1 en el interior de la célula, se generaron anticuerpos policlonales específicos frente a la proteína recombinante purificada.

Estudio de la especificidad del anticuerpo mediante *Western blot*. En primer lugar se determinó la capacidad del suero extraído del conejo inmunizado para detectar la proteína recombinante purificada DCTPP1. Estos estudios se llevaron a cabo mediante *Western blot*, utilizando 0,1 y 1 μg de DCTPP1 y una dilución del suero anti-DCTPP1 1:100000. Como anticuerpo secundario se utilizó un anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Figura D.18 panel A). El resultado obtenido muestra que el anticuerpo generado es capaz de detectar los niveles de proteína pura ensayados.

Por otra parte, se llevó a cabo un ensayo de saturación del anticuerpo para confirmar su especificidad (Figura D.18 panel B). En este ensayo, el suero anti-DCTPP1 (50 μg) se incubó con proteína recombinante purificada (25 μg) a 4°C durante toda la noche. Esta incubación bloquea el anticuerpo anti-DCTPP1, perdiendo éste la capacidad de reconocer la proteína en *Western blot*.

La especificidad del anticuerpo se estudió también en extractos celulares de tres líneas celulares distintas: MRC-5, TK6 y HeLa (Figura D.18 panel C). En todos los casos, el anticuerpo reconoce una única banda en torno al tamaño esperado. Por otro lado, DCTPP1 presenta diferentes niveles de expresión en las líneas celulares estudiadas, llegando a ser más de 10 veces superior en TK6 y HeLa que en MRC-5. Esta expresión diferencial se ha asociado de forma directamente proporcional con la diferente capacidad proliferativa de cada línea celular.

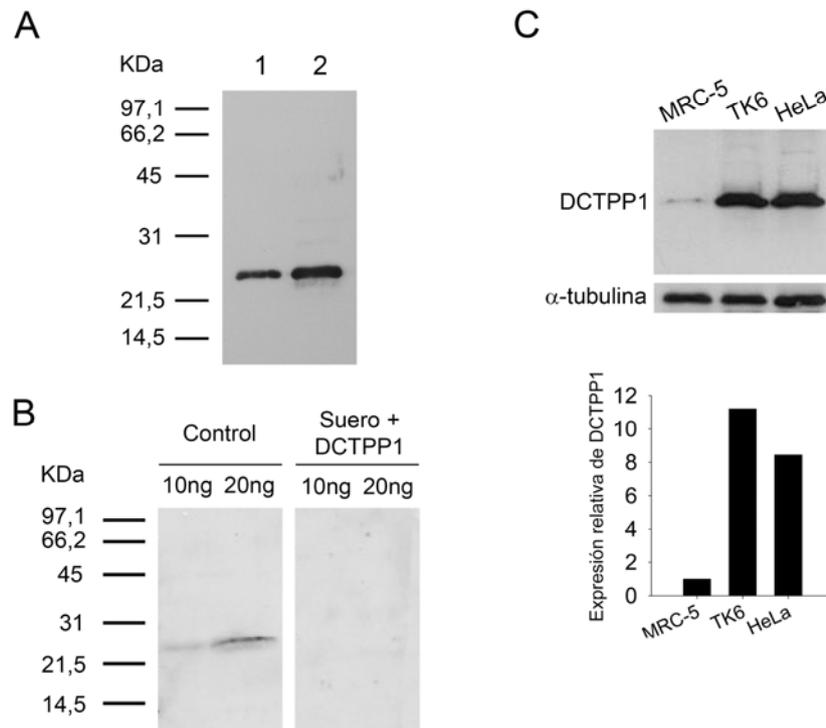


Figura D.18. Especificidad del anticuerpo anti-DCTPP1 en Western blot. **A.** Immunodetección de proteína recombinante purificada. 1, 0,1 µg; 2, 1 µg (anti-DCTPP1 1:100000). **B.** Ensayo de saturación del anticuerpo anti-DCTPP1. Western blot de 10 y 20 ng de proteína recombinante purificada incubados con anti-DCTPP1 (1:10000) (panel izquierdo). La saturación del anticuerpo se llevó a cabo mediante una pre-incubación del suero anti-DCTPP1 con la proteína recombinante purificada (panel derecho). **C.** Immunodetección de DCTPP1 en extractos celulares (40 µg) de MRC-5, TK6 y HeLa; anti-DCTPP1, 1:5000 (panel superior). Como control de carga se determinaron los niveles de tubulina. Cuantificación por densitometría de los niveles de expresión en cada una de ellas (panel inferior).

D.5.2. Análisis por microscopía de inmunofluorescencia

La localización intracelular de DCTPP1 se determinó llevando a cabo estudios de inmunofluorescencia indirecta en tres líneas celulares distintas: TK6, MRC-5 y HeLa. Para ello se utilizó el anticuerpo policlonal anti-DCTPP1 (1:1000), producido en el laboratorio a partir de la proteína recombinante

purificada, y anti-IgG de conejo conjugado con Alexa 488 como anticuerpo secundario (Figura D.19 panel A). Mediante tinción con DAPI se localizó el núcleo de la célula, y con Mitotracker Red se detectó la mitocondria. Las imágenes se visualizaron en un microscopio confocal. Como controles se utilizaron el suero preinmune obtenido del conejo, o sólo el anticuerpo secundario, no observándose señal en ninguno de los casos.

DCTPP1 presenta una distribución citosólica, nuclear y mitocondrial de aspecto granular en las tres líneas celulares humanas estudiadas. La distribución relativa de proteína en los distintos compartimentos varía en función de la línea celular. En HeLa y MRC-5, el citosol contiene la mayoría de la enzima (hasta un 50 % y un 72 % del total de DCTPP1, respectivamente), mientras que la mitocondria y el núcleo acumulan los restantes 26 % y 24 %, respectivamente (HeLa) o el 13 % y 15 % (MRC-5). Sin embargo, DCTPP1 se encuentra principalmente en el núcleo de células TK6 (45 %) y es menos abundante en el citosol (25 %) o en la mitocondria (30 %). Por otro lado, la intensidad de la señal de fluorescencia asociada a DCTPP1 en el núcleo y en el citosol es similar en todas las líneas celulares, mientras que llega a ser hasta tres veces superior en las regiones que colocalizan con la señal de Mitotracker Red (Figura D.19 panel B), lo que indica una mayor concentración de DCTPP1 en mitocondria.

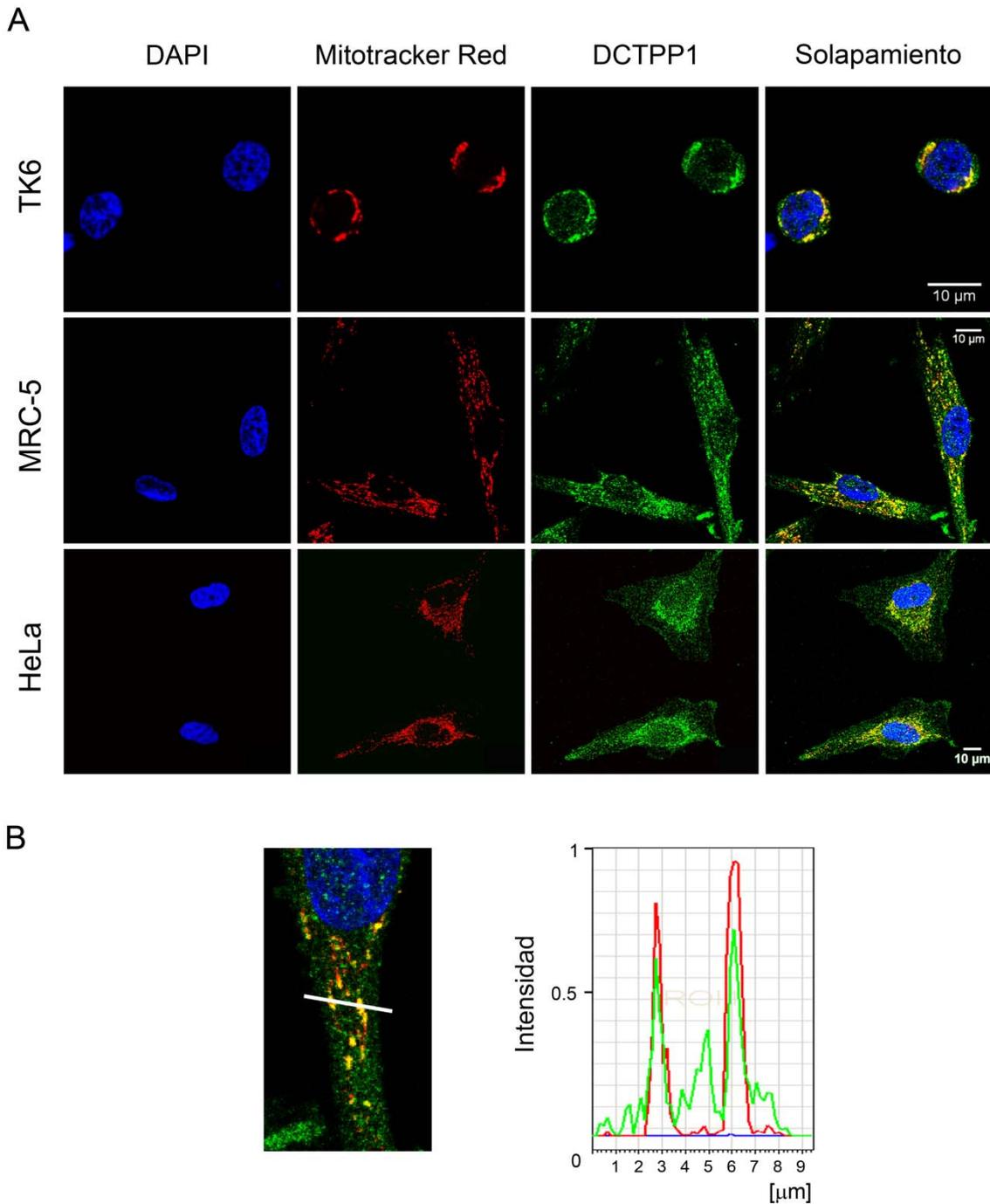


Figura D.19. Localización intracelular de DCTPP1. **A.** Imágenes de microscopía confocal mostrando la distribución de DCTPP1 y la colocalización con núcleo y mitocondria. La inmunodetección se llevó a cabo con anti-DCTPP1 y anti-IgG de conejo conjugado con Alexa 488. El DNA nuclear se tiñó con DAPI y la mitocondria con Mitotracker Red. **B.** Escáner cuantitativo de la señal de fluorescencia de una sección de MRC-5 (línea blanca). DCTPP1, línea verde; mitocondria, línea roja; núcleo, línea azul.

D.6. DISTRIBUCIÓN DE DCTPP1 A LO LARGO DEL CICLO CELULAR

D.6.1. Análisis de los niveles de expresión de DCTPP1 mediante FACS.

Algunas enzimas asociadas con la replicación se expresan de forma diferencial en función de la fase del ciclo celular. Este es el caso también de algunas de las enzimas del metabolismo de nucleótidos, ya que el mantenimiento de una apropiada concentración de nucleótidos es esencial para la síntesis de DNA y la proliferación celular. Dado que los datos bioquímicos sugieren una implicación de DCTPP1 en el metabolismo de nucleótidos, se estudió la expresión de DCTPP1 a lo largo del ciclo celular. En un cultivo de células proliferativas y sin sincronizar se procedió a diferenciar subpoblaciones celulares en distintas fases del ciclo celular: G0/G1, S y G2/M. Esto se llevó a cabo mediante doble marcaje con DAPI y BrdU y posterior análisis por citometría de flujo (Figura D.20 panel A). Al mismo tiempo, las células se marcaron con anti-DCTPP1 y anti-IgG de conejo conjugado con alofococianina (APC). De esta manera podemos estudiar los niveles de fluorescencia asociada a DCTPP1 en cada una de las fases del ciclo celular perfectamente diferenciadas (Figura D.20 paneles B y C).

Este análisis mostró una modulación de la expresión de DCTPP1 a lo largo del ciclo celular, comportamiento que fue similar en las dos líneas celulares estudiadas: TK6 y MRC5. En comparación con G0/G1, los niveles de DCTPP1 aumentan 1,38 veces y 1,34 veces en fase S, y 1,96 veces y 1,73 veces en G2/M, en células TK6 y MRC-5, respectivamente.

El aumento de proteína en fase S concuerda con la activación de la síntesis *de novo* asociada a replicación. Estos niveles pueden seguir aumentando hasta que se active su degradación. Este es también el caso de TK1 y TMPK, cuyos niveles aumentan en fase S y la degradación por proteólisis mediada por

APC/C - Cdh1 es activada al terminar mitosis y antes de entrar en G1 (Ke, Kuo et al. 2005) (Hu and Chang 2007).

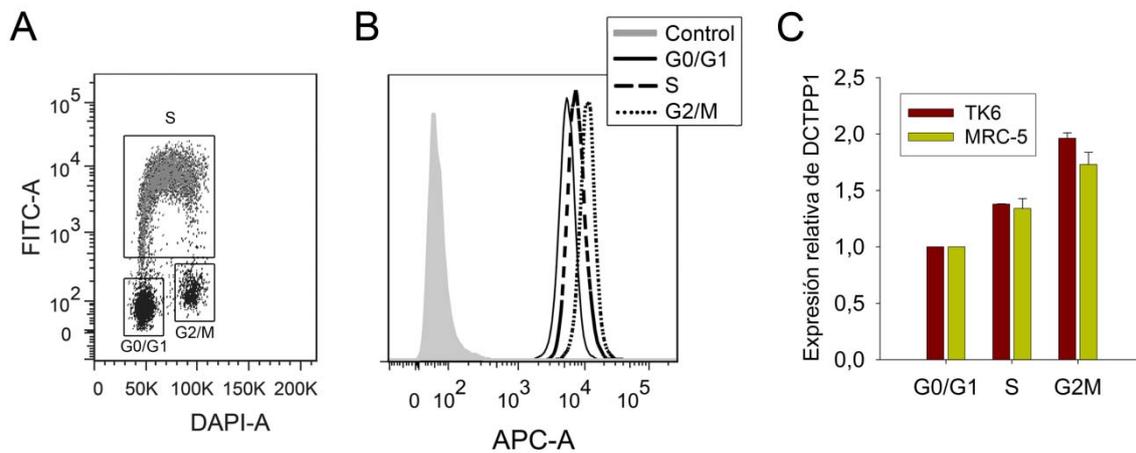


Figura D.20. Expresión relativa de DCTPP1 en función del ciclo celular. A. Determinación del contenido en DNA mediante tinción con DAPI. Las células en fase S se marcaron específicamente mediante la incorporación de BrdU y posterior detección con anti-BrdU-FITC. **B.** Determinación de la fluorescencia asociada a DCTPP1 en cada una de las fases del ciclo celular, utilizando un anticuerpo anti-DCTPP1 y un anticuerpo secundario conjugado con APC. **C.** Cuantificación de los niveles relativos de DCTPP1 en fase G0/G1, fase S y fase G2/M.

D.6.2. Localización subcelular de DCTPP1 en función del ciclo.

Para estudiar la dinámica de la distribución de DCTPP1 en las distintas fases del ciclo celular, se sincronizaron células HeLa al principio de fase G1, en fase S y en mitosis, como se describe en el apartado B.2.4.3. La correcta sincronización se monitorizó midiendo el contenido en DNA mediante citometría de flujo (Figura D.21 panel A). Las células sincronizadas se fijaron sobre cubreobjetos, procediéndose posteriormente a la inmunodetección de DCTPP1. Para estos ensayos se tomaron imágenes de *z-stack* completos, de al menos 40 células en 4 campos diferentes por condición ensayada (Figura D.21

panel B). A partir de estas imágenes se llevó a cabo una colocación en 3 dimensiones de DCTPP1 con la mitocondria y con el núcleo, en cada una de las fases del ciclo celular (Figura D.21 panel C). Los resultados obtenidos muestran que la distribución de DCTPP1 permanece invariable a lo largo de las diferentes etapas del ciclo celular.

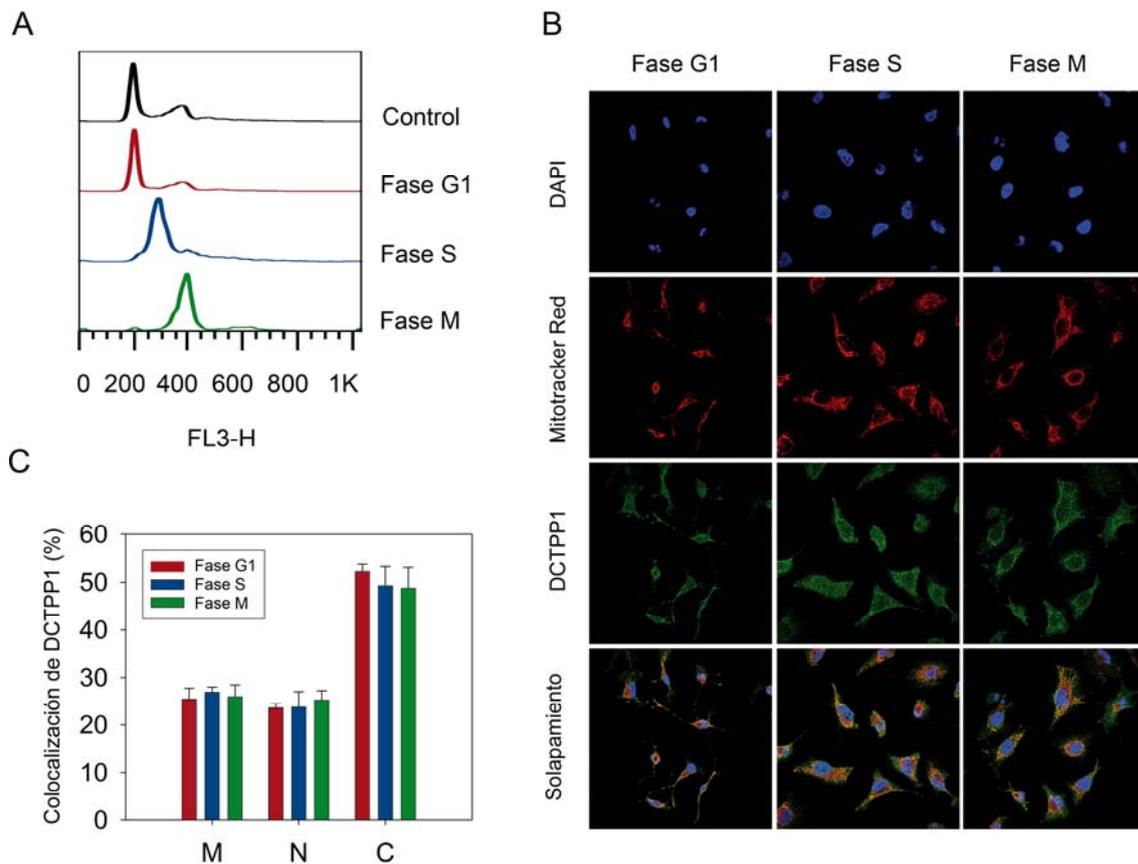


Figura D.21. Distribución intracelular de DCTPP1 en células sincronizadas.

A. Determinación del contenido de DNA en células HeLa sincronizadas por citometría de flujo. **B.** Microscopía de inmunofluorescencia en células sincronizadas. DCTPP1 se detectó mediante anti-DCTPP1 y un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488. La mitocondria y el núcleo se marcaron con Mitotracker Red y DAPI, respectivamente. Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía confocal. **C.** Resultados de los porcentajes de colocación de DCTPP1 con la mitocondria (M), el núcleo (N) y el citosol (C) respecto del volumen completo de la célula.

D.7. PAPEL DE DCTPP1 EN EL METABOLISMO DE NUCLEÓTIDOS EN CÉLULAS HUMANAS.

D.7.1. Disminución de la expresión de DCTPP1 mediante siRNA

Con el fin de estudiar el papel que DCTPP1 lleva a cabo en la célula, se procedió a su silenciamiento génico de forma transitoria mediante la transfección de pequeños RNAs interferentes o “small interfering RNAs” (siRNAs), que promueven la degradación específica del RNA mensajero de interés.

Las transfecciones transitorias se llevaron a cabo en células MRC-5 y Hela utilizando un agente de transfección lipídico y siguiendo el protocolo indicado en el apartado B.2.4.1. Los niveles de proteína DCTPP1 en extractos celulares se comprobaron cada 24 h mediante *Western blot* (Figura D.22 panel A). A las 96 h post-transfección, los niveles de proteína disminuyen significativamente en ambas líneas celulares, llegando a una disminución de la expresión de un 90 % en MRC-5 y un 95 % en HeLa. En todos los experimentos llevados a cabo, se utilizaron como control negativo células transfectadas con un siRNA inespecífico (siRNA control). Estas células transfectadas con el siRNA control no mostraron ningún cambio significativo en los niveles de DCTPP1 respecto a las células sin transfectar durante el periodo analizado.

La disminución de la expresión de DCTPP1 mediada por siRNAs se analizó también mediante microscopía confocal de inmunofluorescencia. En cultivos transfectados con el siRNA específico para *DCTPP1* se observó una disminución significativa y mayoritaria en la intensidad de la señal de fluorescencia asociada a DCTPP1 (Figura D.22 panel B). Estos resultados confirman por un lado, la especificidad del anticuerpo generado en nuestro laboratorio y por otro, la alta eficacia del proceso de transfección. Esta reducción de la señal se produce por igual en regiones que colocalizan con la señal de DAPI, con MitoTracker o con ninguna de ellas, validando de esta forma, la localización de DCTPP1 en núcleo, mitocondria y citosol respectivamente (Figura D.22 panel C).

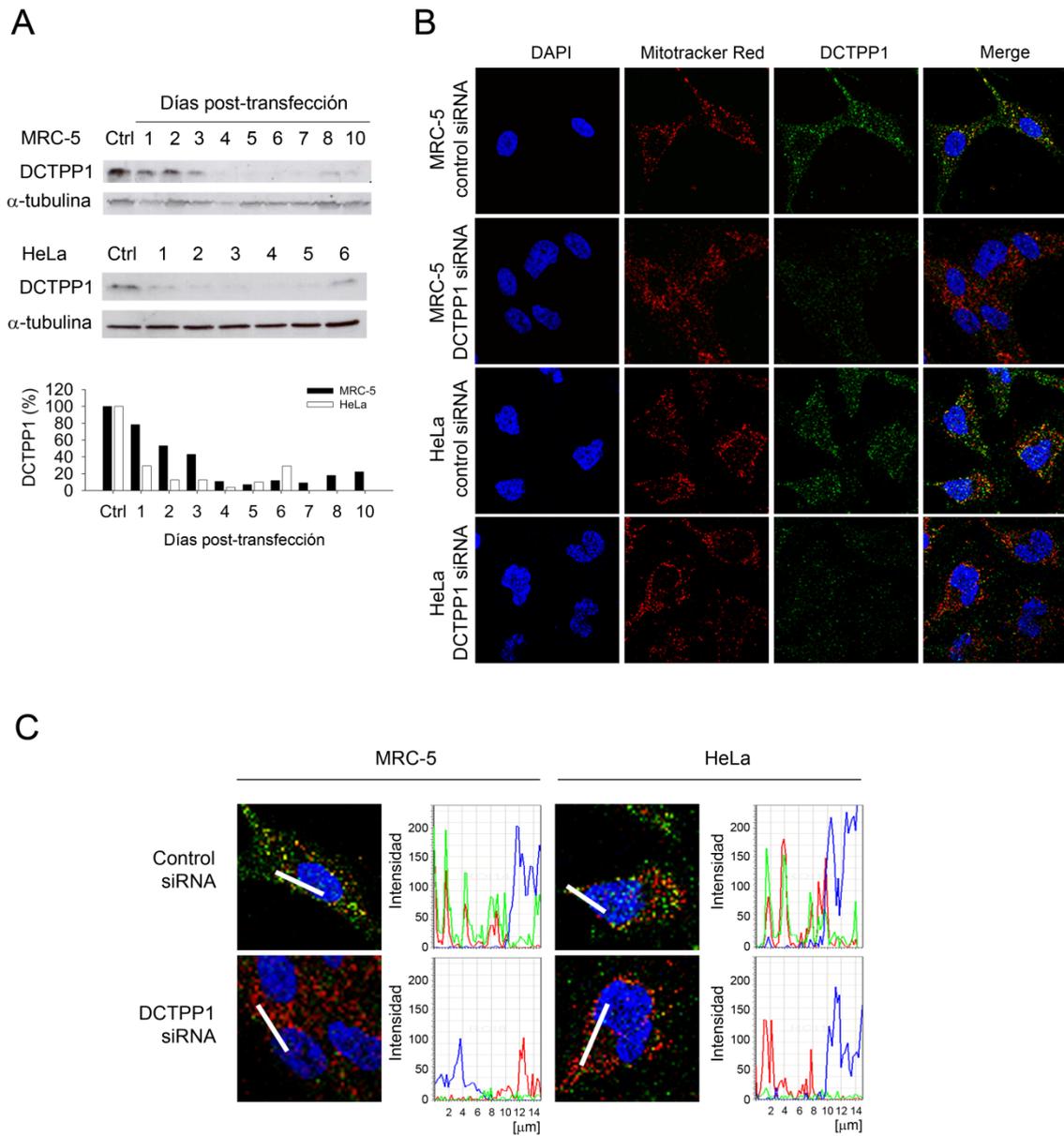


Figura D.22. Silenciamiento de DCTPP1 mediante siRNA. **A.** Análisis mediante *western blot* de los niveles de DCTPP1 en células MRC-5 y HeLa transfectadas con siRNAs. Ctrl (control), células transfectadas con un siRNA inespecífico. Los niveles de DCTPP1 se normalizaron respecto a los niveles de tubulina. En diagrama de barras se representa el porcentaje de DCTPP1 en células MRC-5 (barras negras) y HeLa (barras blancas) tras la transfección, teniendo como valor de referencia el nivel de DCTPP1 en células control. **B.** Microscopía confocal de inmunofluorescencia de células transfectadas con el siRNA control o el siRNA específico para DCTPP1. **C.** Análisis cuantitativo de la señal de fluorescencia en una sección específica (línea blanca). DCTPP1 (línea verde), Mitotracker Red (línea roja), DAPI (línea azul).

D.7.2. DCTPP1 regula el pool de nucleótidos intracelular.

En vista de la actividad *in vitro* de la proteína recombinante como dCTP hidrolasa, se estudió su papel en el control de los niveles de nucleótidos pirimidínicos presentes en el interior celular. La concentración de dTTP, dCTP y dUTP en células MRC-5 y HeLa se determinó a las 96 h después de la transfección mediante el método basado en la DNA polimerasa descrito en el apartado B.2.4.4. Las células con niveles disminuidos de DCTPP1 muestran un aumento significativo en la concentración de dCTP, en comparación con las células que expresan niveles normales de esta enzima (Figura D.23). Así, los niveles de dCTP en células control MRC-5 y HeLa fueron respectivamente 8,6 y 2,9 pmol por 10^6 células. En cambio, tras el silenciamiento génico de *DCTPP1*, se produjo un aumento significativo de dCTP hasta 12,3 pmol/ 10^6 células en MRC-5 y 5,0 pmol/ 10^6 células en HeLa. Estas variaciones suponen incrementos de 1,4 y 1,7 veces, respectivamente.

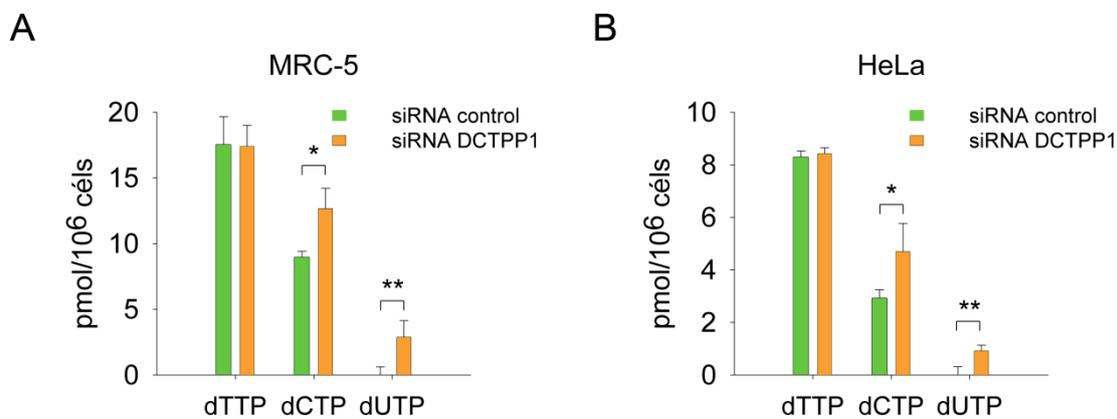


Figura D.23. Determinación de nucleótidos pirimidínicos tras el silenciamiento génico de *DCTPP1*. A. MRC-5 B. HeLa. Los datos corresponden a determinaciones efectuadas a las 96 h post-transfección y son la media de al menos tres determinaciones independientes. * representa $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$.

Además de alterar los niveles de dCTP, la supresión de DCTPP1 provoca la aparición de niveles detectables de dUTP en el *pool* de nucleótidos (2,85

pmol/10⁶ células MRC-5 y 0,88 pmol/10⁶ células HeLa). En ningún caso se observaron variaciones significativas en los niveles de dTTP tras la disminución de la expresión de DCTPP1.

D.7.3. Modulación de la expresión de DCTPP1 en respuesta al suplemento con desoxicitidina.

Dada la actividad de DCTPP1 como dCTPasa y su papel en la homeostasis de dCTP, se estudió el efecto de un incremento del *pool* intracelular de dCTP sobre los niveles de expresión de la enzima. Con este fin, se analizaron los niveles de DCTPP1 mediante *Western blot* a distintos tiempos de incubación en medio suplementado con 100 μ M de dCyd, concentración a la que no se observa pérdida de viabilidad celular. Una vez incorporada al interior de la célula, la dCyd es transformada en dCTP a través de la vía de recuperación de pirimidinas mediante tres fosforilaciones consecutivas catalizadas por la desoxicitidina quinasa, la UMP/CMP quinasa y la nucleósido difosfato quinasa. En presencia de un exceso de dCyd, se produce un rápido aumento en los niveles de DCTPP1 en células HeLa, observable a los 30 min tras la adición del nucleósido (Figura D.24 panel A). Tras 24 h de incubación, los niveles de proteína incrementaron hasta 5 veces respecto de los detectados en células sin tratar. En la línea celular MRC-5, también se observó un aumento a partir de las 24 h de hasta 2,4 veces respecto del control correspondiente, que se mantuvo al menos hasta las 76 h (Figura D.24 panel B).

En paralelo se determinaron cambios en los niveles de expresión de otras enzimas implicadas en el metabolismo de pirimidinas bajo condiciones de exceso de dCyd en el medio de cultivo. En la línea celular HeLa aumentaron significativamente los niveles de expresión de la dUTPasa ($\times 9$), TK1 ($\times 3$), DCTD ($\times 6$) y TMPK ($\times 15$) tras 24 de incubación, mientras que los niveles de dCK permanecieron invariables (Figura D.24 panel A). En células MRC-5, se indujo

la expresión de la dUTPasa ($\times 12$), TK1 ($\times 15$) y TMPK ($\times 2$), mientras que los niveles de dCK y DCTD apenas sufrieron modificación (Figura D.24 panel B).

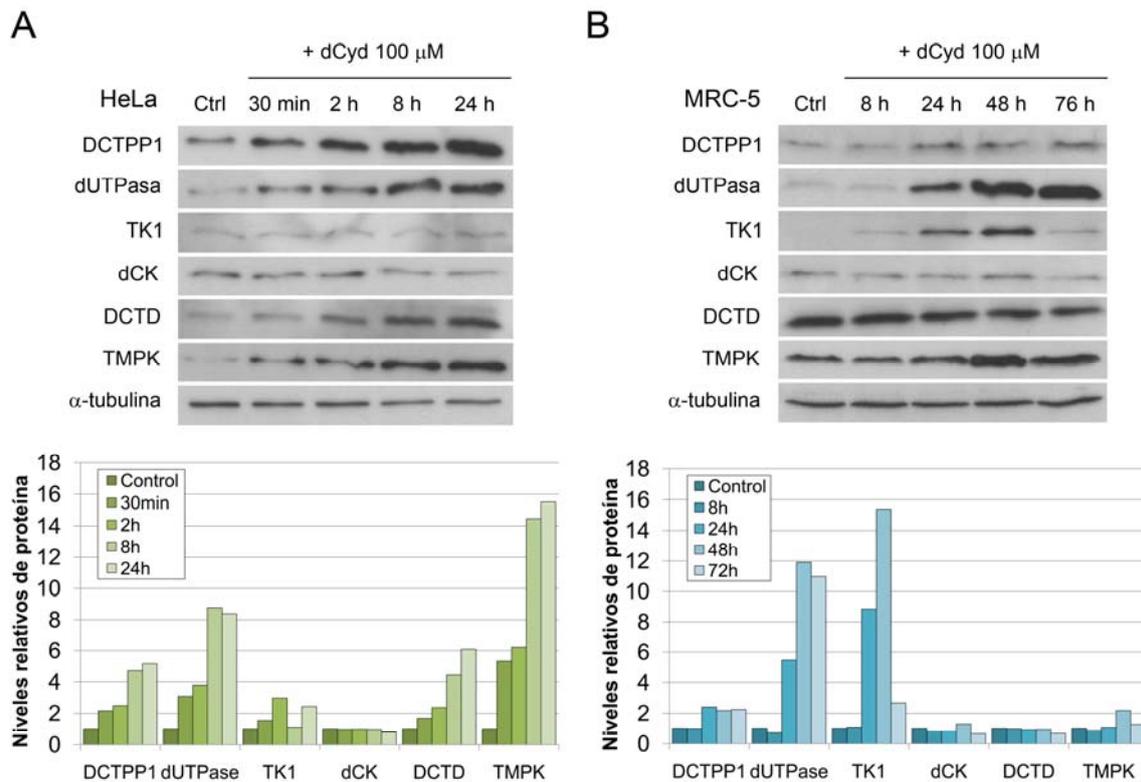


Figura D.24. Modulación de los niveles de expresión de enzimas del metabolismo de pirimidinas. Análisis mediante *Western blot* de extractos celulares de **A.** HeLa (5 μ g) y **B.** MRC-5 (10 μ g), tras exposición a 100 μ M de desoxicitidina durante diferentes periodos de tiempo.

D.7.4. Regulación coordinada de la expresión de DCTPP1 y enzimas del metabolismo de pirimidinas.

En vista de la implicación de DCTPP1 en el metabolismo del dCTP y su posible papel en la generación de dCMP y dUMP como precursor del timidilato, se estudió a continuación el efecto que la inhibición de su expresión tendría sobre los niveles de otras enzimas implicadas en la síntesis de timidilato y eventualmente de dTTP. Con este fin se seleccionaron tres enzimas del

metabolismo de pirimidinas: por un lado la dUTPasa, que hidroliza el dUTP dando lugar al precursor de timidilato, el dUMP y por otro lado la TK1 y la dCK, dos enzimas claves que forman parte de la vía de recuperación de timidina y desoxicitidina respectivamente (Figura A.3 y A.4 de Introducción). Para este estudio se llevó a cabo el silenciamiento transitorio en células HeLa de la expresión de cada proteína por separado, además de silenciamientos dobles DCTPP1/dUTPasa, DCTPP1/TK1 y DCTPP1/dCK. En todas las transfecciones se emplearon ratios siRNA:agente de transfección óptimas para la disminución de la expresión de las proteínas estudiadas. Ni en la línea deficiente en DCTPP1, ni en ninguna de las otras enzimas o combinaciones de enzimas estudiadas se observó un efecto significativo sobre la proliferación celular en un periodo de 6 días post-transfección, (Figura D.25, paneles A y B).

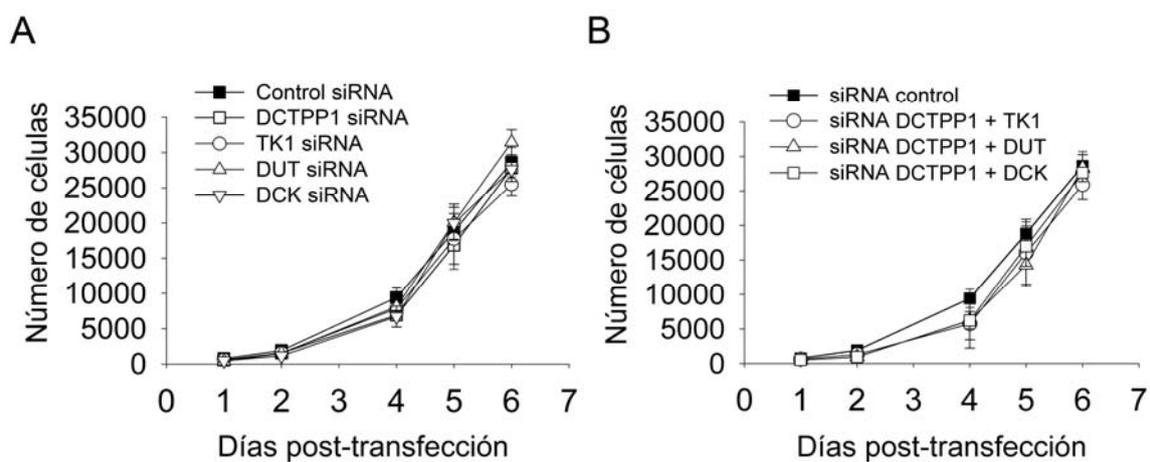


Figura D.25. Proliferación de células transfectadas con siRNAs dirigidos contra enzimas del metabolismo de pirimidinas. **A.** Líneas deficientes en DCTPP1, dUTPasa, TK1 o dCK; **B.** Líneas deficientes en DCTPP1 en combinación con dUTPasa, TK1 o dCK. Como control se utilizaron células transfectadas con un siRNA inespecífico. Los datos son la media de tres determinaciones independientes.

La disminución de los niveles de DCTPP1 intracelular produjo principalmente un aumento en la expresión de la dUTPasa ($\times 3,5$ veces). En cambio, los niveles de TK1, dCK, DCTD y TMPK no resultaron afectados significativamente (Figura D.26 panel A). En el caso del silenciamiento de la dUTPasa, la expresión de DCTPP1 y TMPK se incrementó 2,8 y 2 veces, respectivamente mientras que TK1, dCK y DCTD mostraron sólo leves variaciones de expresión respecto al control. Cuando se inhibió la expresión de TK1 aumentaron significativamente tanto DCTPP1 como la dUTPasa (4,3 y 5 veces, respectivamente). Por último, un efecto similar en la expresión de estas dos enzimas se obtuvo mediante la supresión de la expresión de dCK (4,5 y 3,4 veces, respectivamente). En ausencia de esta enzima, también se observaron cambios moderados en los niveles de DCTD ($\times 2$) y TMPK ($\times 1,5$).

El silenciamiento simultáneo de la expresión de DCTPP1 junto con dUTPasa, TK1 o dCK, dio lugar a ligeros descensos en la expresión de las restantes enzimas estudiadas (Figura D.26 panel B). Por ejemplo, la supresión de DCTPP1 y dUTPasa provocó disminuciones de aproximadamente el 50% en la expresión de dCK, DCTD y TMPK. Variaciones similares en la expresión de la dUTPasa, dCK, DCTD y TMPK se observaron tras el silenciamiento de DCTPP1 y TK1. Y por último, el silenciamiento doble de DCTPP1 y dCK, produjo la reducción de los niveles de dUTPasa, DCTD y TMPK, permaneciendo inalterados los de TK1.

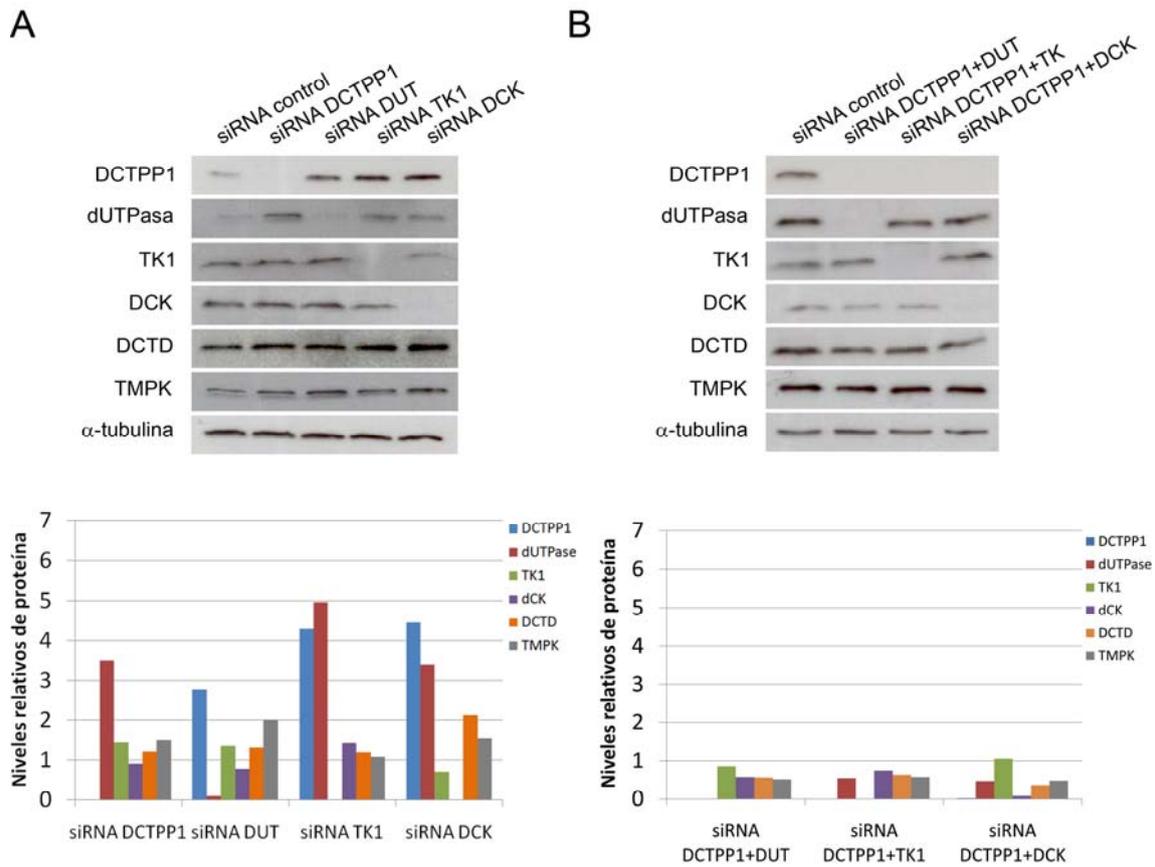


Figura D.26. Respuesta al silenciamiento génico de enzimas implicadas en metabolismo de pirimidinas. Análisis mediante *Western blot* de la expresión de DCTPP1, dUTPasa, TK1, dCK, DCTD y TMPK, en extractos celulares donde se ha disminuido la expresión mediante siRNA **A.** siRNAs sencillos dirigidos contra DCTPP1, dUTPasa, TK1 y dCK. **B.** siRNAs dobles dirigidos contra DCTPP1/dUTPasa, DCTPP1/TK1 y DCTPP1/dCK. Las muestras se recogieron a los 4 días post-transfección. En todos los casos la señal se cuantificó por densitometría y se normalizó utilizando la señal de α -tubulina. En un diagrama de barras se representan los niveles de proteína relativos al control de células transfectadas con un siRNA inespecífico.

Los cambios de expresión observados sugieren una coordinación entre las actividades de DCTPP1 y de la dUTPasa que tendría como finalidad la síntesis regulada de timidilato. En este escenario, la deficiencia en una de estas enzimas podría ser compensada, al menos parcialmente, por la sobreexpresión de la otra

y viceversa. Sin embargo, en ausencia de ambas enzimas, la célula no dispondría de la vía de síntesis *de novo*, dependiendo exclusivamente de la ruta de salvamento. Con el fin de evaluar el impacto de una deficiencia en síntesis *de novo* de timidilato sobre la proliferación celular, se procedió a mantener la inhibición de la expresión de DCTPP1 y de dUTPasa durante periodos de tiempo prolongados. En estos ensayos, tras la transfección inicial se llevaron a cabo retransfecciones cada 4 días, determinándose el número de células viables cada 24 h hasta un total de 14 días. Tanto las células deficientes en DCTPP1 como las células sin dUTPasa muestran una tasa de proliferación notablemente inferior a partir del día 10 post-transfección (aproximadamente entre el 30-40% de la tasa en células control). En contra de lo esperado, las células doblemente silenciadas para DCTPP1 y dUTPasa, deficientes en síntesis *de novo*, no presentaron un mayor defecto en proliferación mostrando una tasa de duplicación celular similar a la de células deficientes en una sola de estas enzimas (Figura D.27).

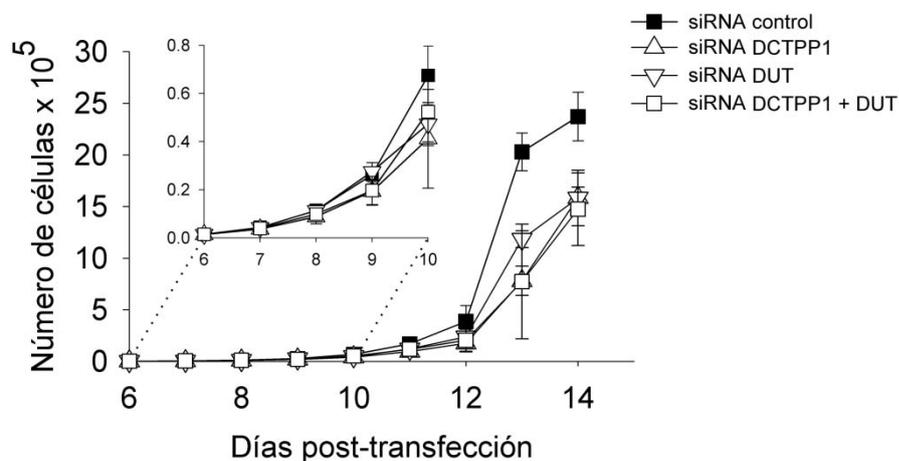


Figura D.27. Curvas de proliferación de células con niveles disminuidos de DCTPP1, dUTPasa o ambas enzimas. Las células se retransfectaron cada 4 días para mantener la disminución de la expresión. Como control se transfectaron células con un siRNA inespecífico por el mismo periodo de tiempo. Los datos representados son la media de tres determinaciones independientes.

D.8. PAPEL DE DCTPP1 EN LA ELIMINACIÓN DE NUCLEÓTIDOS MODIFICADOS DEL MEDIO INTRACELULAR.

D.8.1. Sensibilidad de células deficientes en DCTPP1 a análogos derivados de citidina

Además del dCTP, DCTPP1 tiene capacidad de hidrolizar *in vitro* con una alta eficiencia otros nucleótidos trifosfato de citosina con distintos tipos de modificaciones en posición 5. Entre los más relevantes desde un punto de vista biológico se encuentran el 5-I-dCTP y el 5me-dCTP. Con el fin de determinar si DCTPP1 es capaz de hidrolizar estos nucleótidos no canónicos una vez incorporados al *pool* intracelular, células MRC-5 y HeLa transfectadas con el siRNA específico para DCTPP1 o el siRNA control se expusieron a concentraciones crecientes de 5I-dCyd o 5me-dCyd. Tras el periodo de tratamiento, la viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de reducción de resazurina. Como control, las células se incubaron en primer lugar con concentraciones crecientes de dCyd. Como se muestra en la Figura D.28 (panel A), la ausencia de niveles normales de DCTPP1 no afectó al crecimiento de células MRC-5 o HeLa en medio suplementado con cantidades elevadas de dCyd.

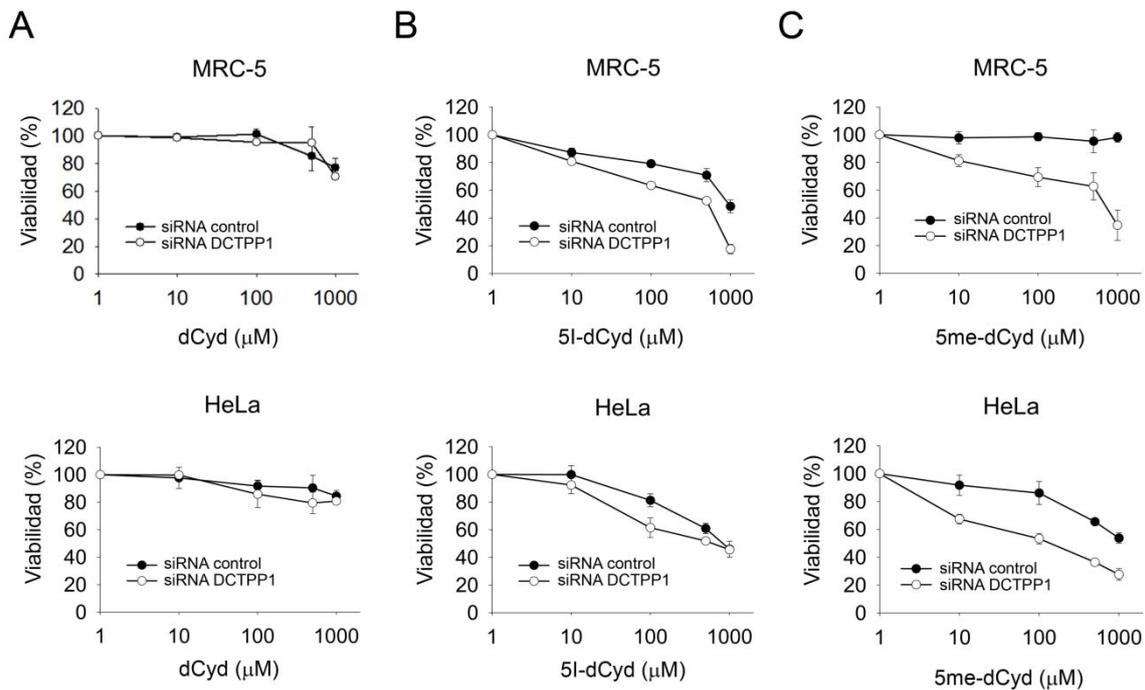


Figura D.28. Sensibilidad de células deficientes en DCTPP1 tras incubación con análogos de nucleósidos. Células MRC-5 y HeLa (10^4 céls/ml) se expusieron a concentraciones crecientes de: **A.** 2'-desoxicitidina (dCyd); **B.** 5-iodo-2'-desoxicitidina (5I-dCyd); **C.** 5-metil-2'-desoxicitidina (5me-dCyd); durante 5 (MRC-5) ó 3 días (HeLa). El porcentaje de viabilidad se calculó en relación al número de células viables en ausencia de nucleósidos exógenos. Cada punto representa la media de tres determinaciones independientes.

La exposición a dosis bajas del derivado halogenado 5I-dCyd indujo una moderada citotoxicidad en ambas líneas celulares transfectadas con el siRNA control, mostrando únicamente una pérdida significativa de viabilidad a dosis altas del nucleósido modificado. Por el contrario, las células deficientes en DCTPP1 mostraron una mayor sensibilidad a 5I-dCyd, observándose una significativa pérdida de viabilidad a todas las concentraciones ensayadas (Figura D.28 panel B). Cuando las células se expusieron a 5me-dCyd, la deficiencia en DCTPP1 también aumentó la sensibilidad a este análogo de nucleósido (Figura D.28 panel C), induciendo un nivel importante de muerte celular incluso a dosis donde células con niveles normales de DCTPP1 no se ven prácticamente afectadas.

D.8.2. Papel protector de DCTPP1 frente a la acción de análogos de nucleósidos con acción antitumoral.

Muchos análogos de nucleósidos utilizados actualmente en terapias contra el cáncer o como antivirales requieren su fosforilación previa por enzimas intracelulares antes de ser incorporados al DNA donde ejercen su efecto genotóxico (Galmarini, Mackey et al. 2002) (Otto 2004). Dado que DCTPP1 es capaz de hidrolizar *in vitro* la forma trifosfato del fármaco antitumoral decitabina o aza-dCyd, se procedió a evaluar su potencial papel en el mecanismo de acción de este análogo de nucleósido.

Para evaluar la capacidad de DCTPP1 de hidrolizar aza-dCyd una vez fosforilado en el medio intracelular, células transfectadas con el siRNA específico para DCTPP1 o con el siRNA control, se trataron con concentraciones crecientes del fármaco. Como control, las células se expusieron a ara-Cyd, fármaco cuya forma trifosfato activada no puede ser hidrolizada *in vitro* por DCTPP1. Las células transfectadas con el siRNA inespecífico mostraron resistencia frente a aza-dCyd hasta 1 mM en las condiciones ensayadas. Por el contrario, células deficientes en DCTPP1 presentaron una pérdida significativa de viabilidad a concentraciones superiores a 10 μ M (Figura D.29 panel A). En cambio, el silenciamiento génico de DCTPP1 no tuvo ningún efecto sobre la letalidad inducida por ara-Cyd (Figura D.29 panel B). En ensayos clonogénicos donde analizamos la supervivencia a largo plazo, observamos que ambas líneas deficientes en DCTPP1 son más sensibles a tratamientos con decitabina a concentraciones inferiores a 10 μ M (Figura D.29 panel C), sugiriendo que el papel protector de DCTPP1 está vinculado con la hidrólisis del fármaco a su forma monofosfato inactiva.

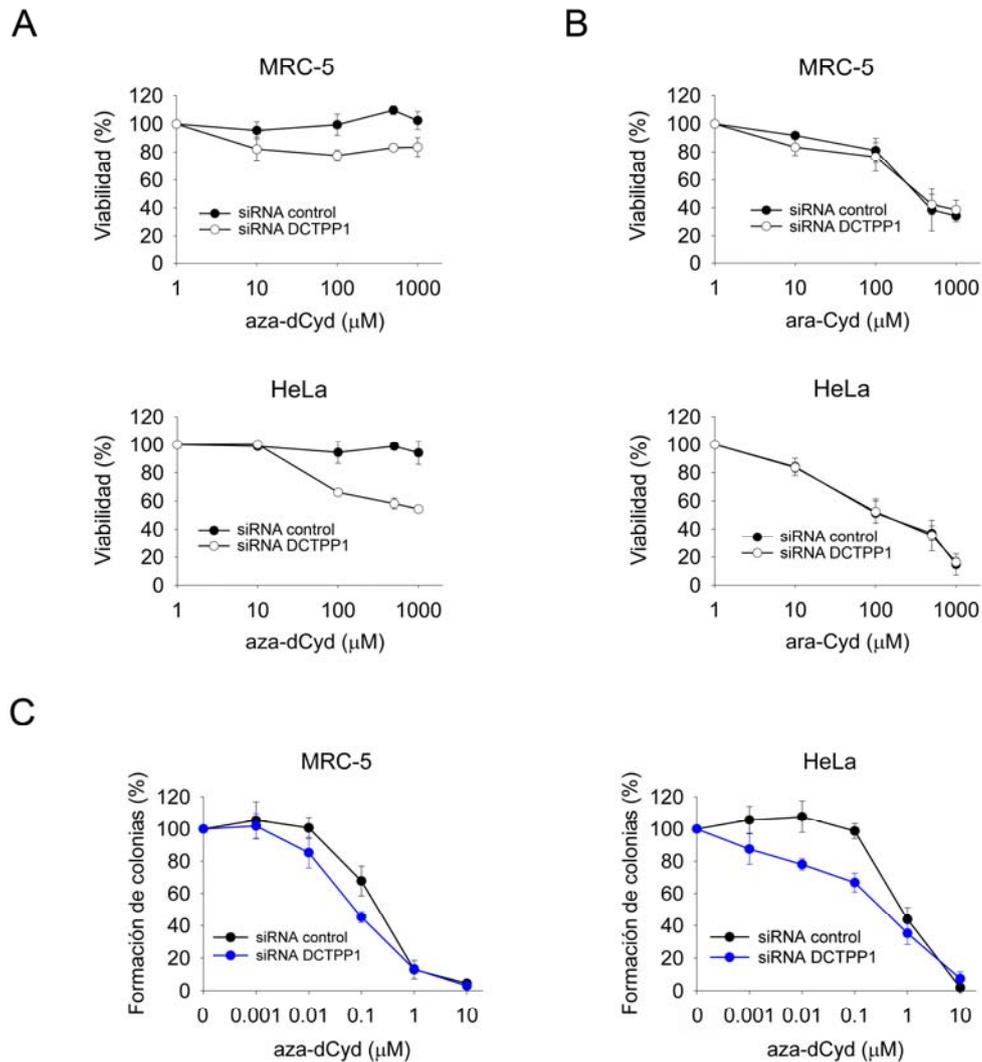


Figura D.29. DCTPP1 confiere resistencia frente a decitabina. Células MRC-5 y HeLa (10^4 céls/ml) se expusieron a concentraciones crecientes de **A.** 5-aza-2'-desoxicitidina (aza-dCyd); **B.** ara-citidina (ara-Cyd); durante 3 (MRC-5) ó 1 días (HeLa). El porcentaje de viabilidad se calculó en relación al número de células viables en ausencia de nucleósidos exógenos. Los experimentos se realizaron tres veces para cada compuesto. **C.** Ensayo de clonogenicidad de células tratadas con 5aza-dCyd durante 48 h (MRC-5) o 24h (HeLa). Se representa el porcentaje de formación de colonias respecto a las células sin tratar. Cada punto representa la media de 4 experimentos independiente.

D.8.3. Contribución de DCTPP1 al nivel de metilación global del DNA en respuesta a agentes metilantes y desmetilantes

La presencia de 5me-dCyd o aza-dCyd en el *pool* intracelular de nucleótidos puede inducir alteraciones en los niveles de metilación global de la célula. En el caso de 5me-dCyd, su incorporación directa al DNA por la acción de la DNA polimerasa incrementa los niveles de metilación (Holliday and Ho 1995). Por el contrario, el mecanismo de acción de la aza-dCyd promueve la desmetilación del genoma, al inhibir irreversiblemente la actividad de la DNA metiltransferasa (Momparler 2005).

La hipersensibilidad de células deficientes en DCTPP1 a 5me-dCyd y aza-dCyd sugiere que esta enzima podría estar impidiendo la incorporación de estos agentes al DNA y por tanto, evitando cambios en el patrón de metilación global del genoma. Para confirmar esta hipótesis, se midieron las cantidades relativas de 5-metilcitosina y citosina mediante LC-MS/MS, tras un proceso de hidrólisis ácida del DNA genómico obtenido de células tratadas con 1 mM de 5me-dCyd o aza-dCyd (Figura D.30).

En ausencia de agentes metilantes o desmetilantes, la disminución de los niveles de expresión de DCTPP1 mediante siRNA, no afectó al contenido en citosinas metiladas en el genoma. Por el contrario, el tratamiento de células control con 5me-dCyd aumentó significativamente los niveles de metilación global, siendo el incremento más pronunciado en ausencia de DCTPP1. Por otro lado, la incubación con aza-dCyd provocó un descenso significativo del contenido en 5-metilcitosina (5meC). Este descenso fue aún más evidente tras el silenciamiento de DCTPP1. En conjunto, estos datos confirman la formación de las formas trifosfato 5me-dCTP y aza-dCTP, ambas sustrato de DCTPP1, y respaldan el papel de esta enzima en la eliminación de estos nucleótidos modificados del medio intracelular, evitando su incorporación al DNA y sus consecuencias genotóxicas.

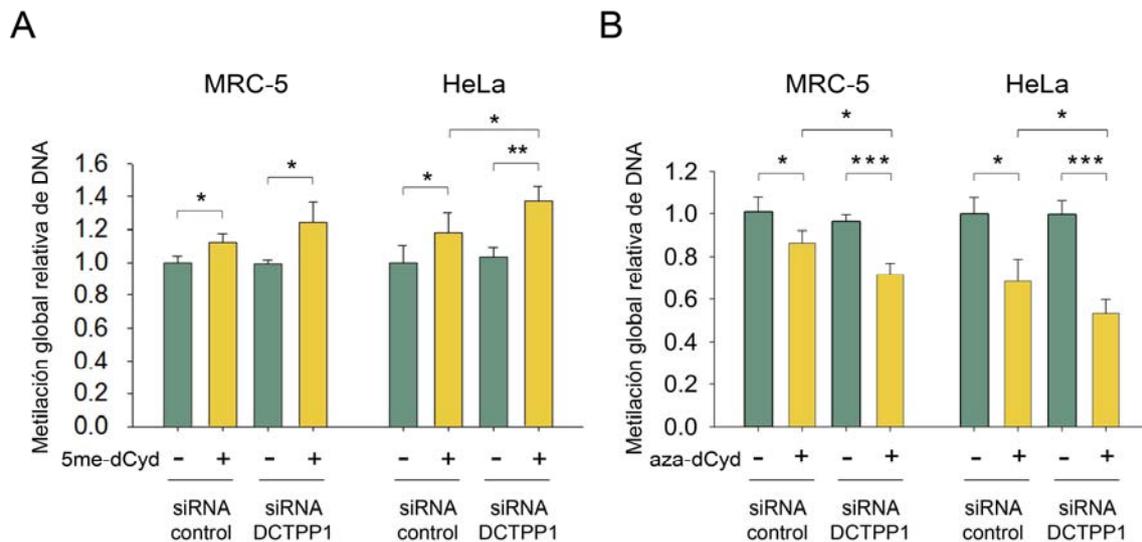


Figura D.30. Metilación global de DNA en células incubadas con análogos de nucleósidos. **A.** Niveles de metilación en DNA genómico de células expuestas a 5me-dCyd (1 mM) durante 5 (MRC-5) ó 3 (HeLa) días; **B.** aza-dCyd (1 mM) durante 3 (MRC-5) ó 1 (HeLa) día. Los resultados están expresados como la cantidad relativa de metilación de DNA con respecto a la muestra control (DNA extraído de células transfectadas con el siRNA no específico y no expuestas a ningún nucleósido exógeno). * representa $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ y *** $p < 0,0005$.

D.8.4. Estudio del efecto de aza-dCyd en células deficientes en dUTPasa

La desaminación intracelular de aza-dCyd podría dar lugar a derivados con capacidad de inhibir la TS e interferir de esta forma con la biosíntesis de pirimidinas (Vesely, Gostof et al. 1969). Puesto que la dUTPasa es un factor crítico en la modulación de la respuesta a agentes quimioterapéuticos dirigidos contra la TS (Tinkelenberg, Hansbury et al. 2002) (Koehler and Ladner 2004) (Wilson, LaBonte et al. 2012) se evaluó el efecto del silenciamiento de esta enzima sobre la citotoxicidad ejercida por decitabina.

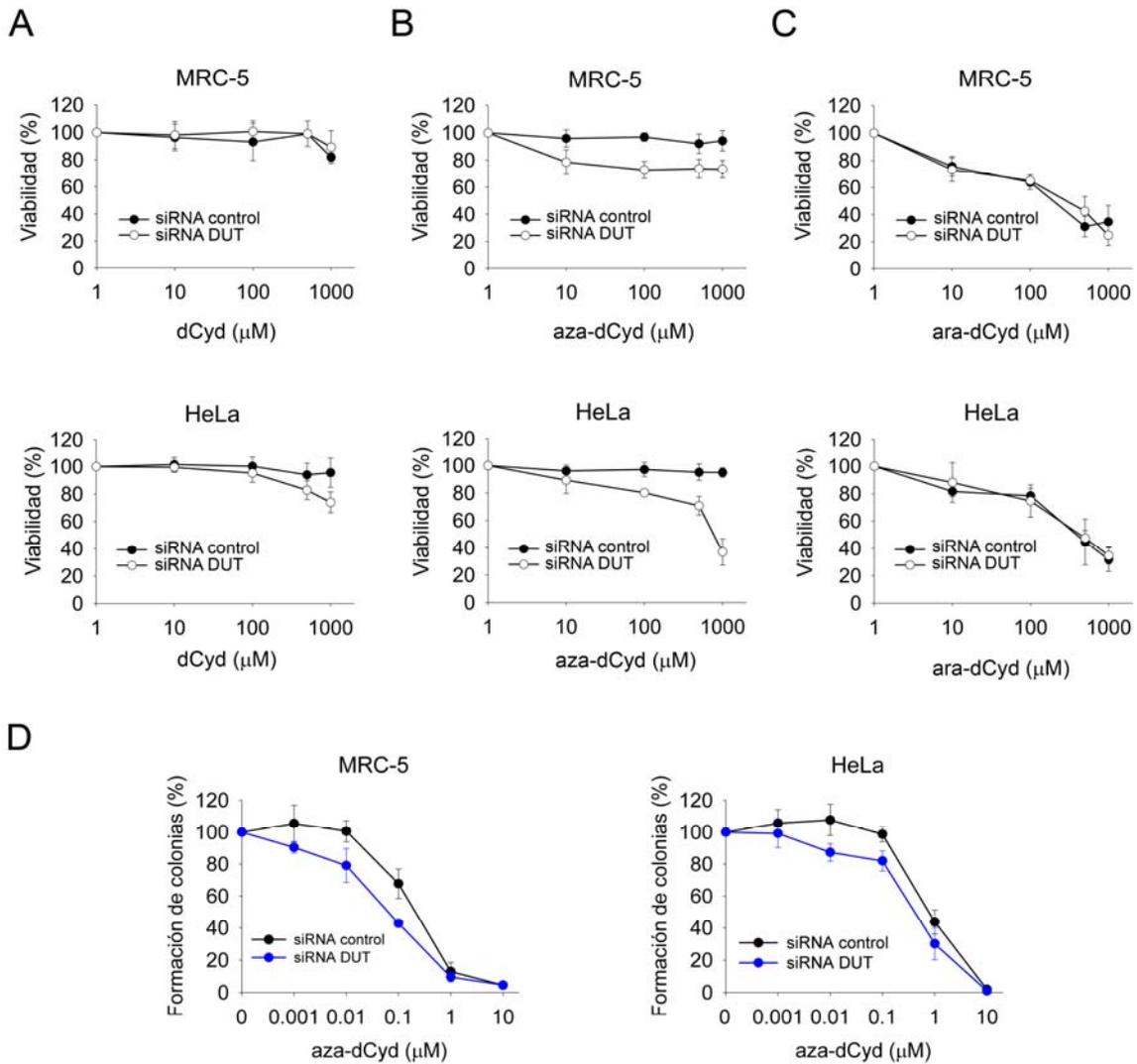


Figura D.31. Papel protector de la actividad dUTPasa en células tratadas con decitabina . Células MRC-5 y HeLa (10^4 céls/ml) expuestas a concentraciones crecientes de: **A.** 2'-desoxicitidina (dCyd); **B.** 5-aza-2'-desoxicitidina (aza-dCyd o decitabina); **C.** 5-ara-citidina (ara-Cyd o citarabina); durante 3 (MRC-5) ó 1 días (HeLa). El porcentaje de viabilidad se calculó en relación al número de células viables en ausencia de nucleósidos exógenos. Los experimentos se realizaron tres veces para cada compuesto. **D.** Ensayo de clonogenicidad de células tratadas con 5aza-dCyd durante 48 h (MRC-5) o 24h (HeLa). Se representa el porcentaje de formación de colonias respecto a las células sin tratar. Cada punto representa la media de 4 experimentos independiente.

Con este objetivo, células MRC-5 y HeLa silenciadas para el gen DUT se trataron con concentraciones crecientes de aza-dCyd hasta 1 mM (Figura D.31). Como control, las células se expusieron a las mismas cantidades de dCyd o ara-Cyd, observándose sólo una ligera sensibilidad en células HeLa con menor expresión de dUTPasa a 1 mM de dCyd. En cambio, la deficiencia en dUTPasa confirió mayor sensibilidad a decitabina en ambas líneas celulares. Este resultado se confirmó en un ensayo clonogénico a concentraciones por debajo de 10 μ M, donde las células con menores niveles de dUTPasa mostraron una capacidad reducida para formar colonias tras la retirada del fármaco.

Para determinar si la exposición a decitabina promueve el aumento de los niveles de dUTP de manera similar a los inhibidores de la TS como el 5-fluorouracilo o la 5-fluorodesoxiuridina (Wilson, LaBonte et al. 2012), determinamos la concentración de nucleótidos de pirimidina tras el tratamiento con aza-dCyd de células HeLa (Figura D.32 panel A). Es importante tener en cuenta que el ensayo basado en la DNA polimerasa utilizado para cuantificar nucleótidos no permite discriminar entre dCTP y aza-dCTP ni entre dUTP y aza-dUTP (ver apartado B.2.5.3.). Por tanto, aquí nos referiremos a ellos como dCTP o dUTP. En células control, transfectadas con el siRNA inespecífico, sólo los tratamientos a dosis más elevadas de decitabina inducen un incremento importante en los niveles de dCTP (8.5 frente a 4.1 pmol/ 10^6 células), probablemente debido a la conversión de aza-dCyd en aza-dCTP y la saturación de las vías catabólicas. Es en el caso de las células deficientes en dUTPasa y expuestas a aza-dCyd cuando se observan diferencias significativas en los nucleótidos de pirimidina intracelulares. Las alteraciones consistieron fundamentalmente en un fuerte incremento en los niveles de dCTP y dTTP (de 4,4 a 20,9 y de 8,0 a 22,4 pmol/ 10^6 células, respectivamente); y por otro lado, en una acumulación significativa de dUTP en el *pool* intracelular (1,7 y 3,4 pmol/ 10^6 células a 10 μ M y 1 mM, respectivamente), provocando una disminución efectiva de la razón dTTP/dUTP de 16 a 7 veces aproximadamente.

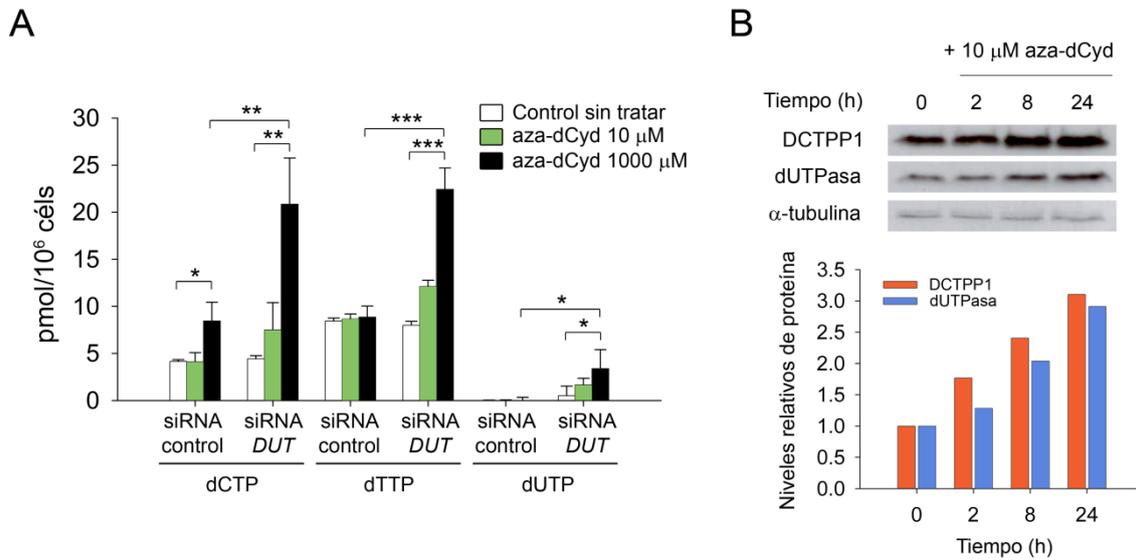


Figura D.32. Efecto de la decitabina sobre la concentración intracelular de nucleótidos y la expresión de DCTPP1 y dUTPasa. **A.** Concentración de nucleótidos de pirimidinas en células HeLa 4 días después de la transfección con el siRNA específico para *DUT*. Los tratamientos se realizaron con 0, 10 o 1000 μM de aza-dCyd durante 24 h. Los datos representan la media de al menos 4 determinaciones independientes. * representa $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ y *** $p < 0,0005$. **B.** Modulación de los niveles de expresión de DCTPP1 y dUTPasa tras exposición a aza-dCyd. Niveles determinados mediante *Western blot* a partir de extractos de células HeLa (10 μg) tratadas con 10 μM de decitabina. La intensidad de las bandas se cuantificó utilizando ImageQuant y se normalizó con la señal de α -tubulina.

En el apartado D.7.4. se mostró como el suplemento de células MRC-5 y HeLa con un exceso de desoxicitidina indujo un aumento en la expresión de DCTPP1 y de la dUTPasa. Era de interés por tanto establecer si la exposición a decitabina podría inducir una modulación similar de los niveles de ambas enzimas en respuesta a la acumulación de aza-dCTP y aza-dUTP. Tras la incubación de células HeLa con aza-dCyd a 10 μM , se analizó la expresión de ambas nucleótido hidrolasas a distintos tiempos de incubación mediante *Western blot* (Figura D.32 panel B). En las condiciones ensayadas, los niveles de DCTPP1 y dUTPasa incrementaron hasta 3 veces, lo que sugiere que la sobreexpresión de estas enzimas podría contribuir a contrarrestar la citotoxicidad de aza-dCyd..

D.8.5. Papel de DCTPP1 y la dUTPasa en la formación de *foci* de γ H2AX en respuesta a aza-dCyd.

La fosforilación de la histona H2AX (H2AX fosfoserina-139) es la señal molecular de la respuesta celular a roturas dobles de cadena del DNA (DSBs). Diversos estudios han demostrado que el tratamiento con aza-dCyd promueve la formación de *foci* de γ H2AX y de DSBs de forma directa o indirecta (Pali, Van Emburgh et al. 2008). Basándonos en estas observaciones, procedimos a cuantificar la formación de *foci* de γ H2AX mediante microscopía de inmunofluorescencia en células HeLa deficientes en DCTPP1 o dUTPasa tras una incubación con decitabina. La exposición de células control a 10 μ M de aza-dCyd produjo alrededor de un 7% de células positivas para γ H2AX mientras que este porcentaje incrementó hasta el 10% y 12% en ausencia de DCTPP1 y dUTPasa respectivamente (Figura D.33). Mayores diferencias se observaron a 100 μ M de aza-dCyd, donde el número de células γ H2AX positivas aumentó desde un 21% en células control a un 33% y un 38% en células silenciadas para DCTPP1 y dUTPasa respectivamente. Estos resultados sugieren que la deficiencia en cualquiera de estas nucleotidohidrolasas incrementa la susceptibilidad al efecto genotóxico de la decitabina.

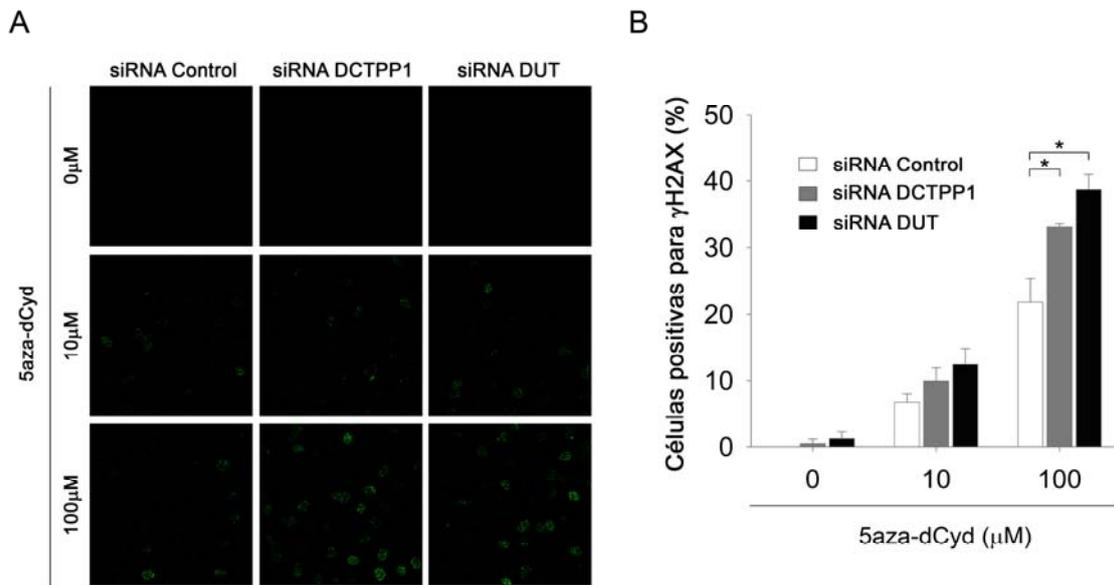


Figura D.33. Inducción de *foci* γH2AX por aza-dCyd en células deficientes en DCTPP1 o dUTPasa. A. Imágenes representativas de microscopía de inmunofluorescencia mostrando el marcaje de foci γH2AX en células HeLa no tratadas o tratadas con 10 μM ó 100 μM de aza-dCyd. Todos los campos escogidos contienen un número similar de células (~ 50) determinado mediante tinción con DAPI. B. Porcentaje de células positivas para γH2AX en células control, siRNA-DCTPP1 y siRNA-DUT tratadas con aza-dCyd como se indica en la figura. Las células positivas para γH2AX se contaron de un total de 200 células analizadas por línea celular y dosis y por experimento. Los datos representados son la media de dos experimentos independientes.

DISCUSIÓN

E. DISCUSIÓN

La proteína humana DCTPP1 pertenece a la superfamilia de enzimas NTP-pirofosfatasas todo- α que comprende un diverso grupo de proteínas ampliamente distribuidas desde organismos superiores hasta bacterias. Dentro de ellas encontramos enzimas capaces de hidrolizar nucleótidos canónicos en distintos estados de fosforilación o con diversas modificaciones. En términos generales podemos decir que las enzimas pertenecientes a esta superfamilia desempeñan dos importantes funciones en la célula. Por un lado, una función denominada *house-cleaning*, encargada de mantener la integridad del conjunto de precursores del DNA. Este es el caso de las dUTPasas diméricas, DR2231, también con actividad dUTPasa, o MazG, recientemente caracterizada como una enzima importante en respuesta a estrés oxidativo y que elimina 5OH-dCTP. Por otro lado, existen NTP-pirofosfatasas todo- α que participan en el metabolismo normal de la célula, como es el caso de HisE, una enzima perteneciente a la ruta de síntesis de la histidina en bacterias, o la dUTPasa de tripanosomátidos, ya que además de su función en eliminar el dUTP potencialmente tóxico, su actividad tiene una mayor transcendencia en la formación de dTTP, ya que estos organismos carecen de dCMP/dCTP desaminasa. En vista de las diversas funciones llevadas a cabo por las enzimas de la superfamilia todo- α , en el trabajo desarrollado en la presente tesis se ha realizado un análisis exhaustivo de la especificidad de sustrato de DCTPP1 *in vitro* así como el estudio de la función desempeñada por esta enzima en un contexto celular.

E.1. PROPIEDADES CINÉTICAS DE DCTPP1

E.1.1. DCTPP1 es una NTP pirofosfatasa con capacidad para hidrolizar el dCTP

Los resultados obtenidos muestran que DCTPP1 posee actividad NTP pirofosfatasa que actúa preferentemente hidrolizando dCTP frente a otros nucleótidos canónicos. De hecho, DCTPP1 puede ser considerada como la primera actividad dCTP pirofosfatasa descrita en células humanas. La hidrólisis del nucleótido trifosfato dCTP genera dCMP y PPi, los dos productos esperados en reacciones catalizadas por NTP pirofosfatasas. La curva de saturación obtenida a partir de los valores de velocidad máxima muestra una cinética sigmoideal (Figura D.8), con un coeficiente de Hill superior a 1, lo que es indicativo de cooperatividad positiva. Los fenómenos de cooperatividad positiva son característicos de enzimas oligoméricas donde la formación de la estructura cuaternaria se ve favorecida por la unión al sustrato. En este tipo de cinéticas la unión de una primera molécula de sustrato al centro activo promueve cambios en la conformación tridimensional de la enzima que facilitan la unión de la siguiente molécula al segundo centro activo. Esto tendría como finalidad que una enzima de tipo catabólico como DCTPP1 sea poco eficiente a bajas concentraciones de sustrato, y su actividad aumente cuando los niveles de dCTP sobrepasen las necesidades de la célula o puedan ser incluso tóxicos. Este comportamiento cooperativo observado en DCTPP1 así como los estudios de *crosslinking* y de espectrometría de masas por MALDI TOF-TOF apoyan la hipótesis de que esta enzima pueda adoptar la estructura cuaternaria tetramérica de RS21-C6. Bajo condiciones óptimas, DCTPP1 hidroliza dCTP con una $K_m = 47,6 \mu\text{M}$ y una $K_{cat} = 5,7 \text{ s}^{-1}$. El valor de K_m se encuentra muy próximo a la concentración fisiológica de dCTP (Traut TW, 1994) y en el rango del de otras enzimas que actúan sobre nucleótidos de citosina como UMP/CMPK ($513 \mu\text{M}$) (Liou, Dutschman et al. 2002), UCK1 ($291 \mu\text{M}$), UCK2 ($86 \mu\text{M}$) (Van Rompay, Norda et al. 2001), CDA ($39 \mu\text{M}$) (Vincenzetti, Cambi et al. 2000),

dCMP desaminasa (22 μM) (Liou, Krishnan et al. 2003) y DCK (17 μM) (Wang, Kucera et al. 1993).

E.1.2. Base estructural de la actividad y especificidad de sustrato

La obtención de la estructura tridimensional del fragmento central de la proteína RS21-C6 (residuos 21-126) unida a 5me-dCTP ha permitido la identificación de residuos clave en la interacción con el sustrato. Dada la alta identidad de secuencia aminoacídica de DCTPP1 con RS21-C6, las conclusiones extraídas pueden ser extrapoladas para la enzima humana. El sitio de unión al sustrato se compone de varios residuos íntegramente conservados en DCTPP1, entre ellos His38, Trp47, Trp73, Tyr102, Glu63, Glu66, Glu95, and Asp98, algunos de los cuales establecen interacciones que permiten la estabilización el sustrato. His38 forma un puente de hidrógeno con el O2 de la base nitrogenada mientras que las cadenas laterales de Trp47 y Trp73 forman un bolsillo hidrofóbico donde se sitúa la base 5meC. También existe una interacción de tipo hidrofóbico entre la Tyr102 y la desoxiribosa. RS21-C6 y DCTPP1 presentan además cuatro residuos ácidos en el sitio activo, Glu63, Glu66, Glu95, y Asp98, con un papel esencial en la catálisis. Estos residuos se hallan conservados en la dUTPasa de *C. jejuni* y en MazG de *S. solfataricus* donde están implicados en la coordinación de iones Mg^{2+} y en la estabilización de la conformación de los grupos fosfato del nucleótido.

Los datos cinéticos presentados muestran una alta selectividad de DCTPP1 por el desoxirribonucleótido dCTP frente al ribonucleótido CTP. La estructura cristalina de la dUTPasa de *T. cruzi* en complejo con dUDP establece las bases moleculares de la selectividad por la forma desoxi en estas enzimas diméricas (Harkiolaki, Dodson et al. 2004). Mientras la Asn201 ancla la desoxirribosa a través de dos enlaces de hidrógeno, dos residuos aromáticos (His83 y Phe84) flanquean el azúcar evitando cualquier movimiento una vez que el sustrato está

unido (Harkiolaki, Dodson et al. 2004) (Figura A.1.2) (Figura E.1). Estos residuos impiden el posicionamiento de la correspondiente ribosa en el UTP debido a impedimentos estéricos causados por el grupo hidroxilo extra. DCTPP1, al igual que RS21-C6, conserva la asparragina (Asn125) y dos residuos hidrofóbicos (Ile101 y Tyr102) que podrían estar implicados en la discriminación del grupo desoxi- del ribonucleótido. La posible interacción de Asn125 con la desoxirribosa no se menciona en la estructura cristalina de RS21-C6 obtenida por Wu et al., debido probablemente a la localización del residuo Asn125 en el extremo de la proteína truncada, lo que pudiera haber afectado a su correcto posicionamiento dentro de la estructura.

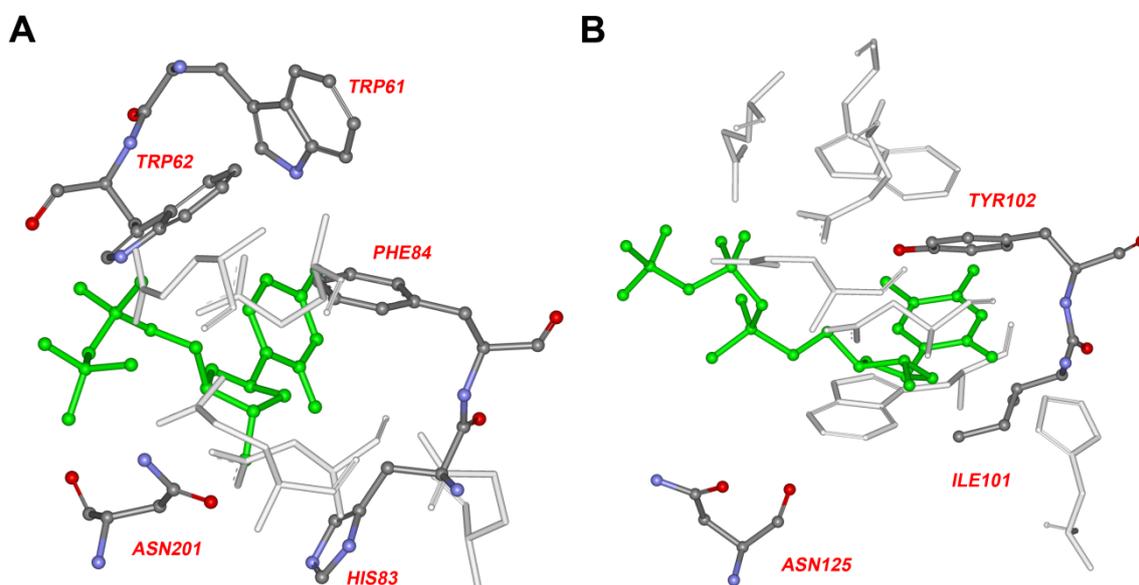


Figura E.1. Comparación de los centros activos de: A, la dUTPasa de *T. cruzi* y B, RS21-C6 de ratón. En verde está resaltado el sustrato: dUDP o 5me-dCTP respectivamente.

A pesar de sus similitudes estructurales, las dUTPasas diméricas difieren de DCTPP1 en su capacidad para reconocer el dUTP y al mismo tiempo, excluir dCTP y dTTP de su sitio activo. Los datos cinéticos de DCTPP1 muestran una baja eficiencia en la hidrólisis de dUTP o dTTP lo que indica la relevancia del grupo amino en posición C4 de la citosina en el proceso catalítico. En la dUTPasa de *T. cruzi*, la discriminación entre citosina y uracilo tiene lugar

mediante el Trp61 que actuaría repeliendo el grupo amino de la citosina y en su ausencia, formando un enlace de hidrógeno con el O4 del uracilo. Por otro lado, la dUTPasa excluye el dTTP de su sitio activo por interferencias estéricas de la cadena lateral del Trp62 con el grupo metilo de la timina. Ambos residuos de Trp se hallan ausentes en la enzima humana DCTPP1 y en la de ratón RS21-C6, lo que contribuye a su baja actividad dUTPasa así como a su capacidad para reconocer e hidrolizar por igual dCTP y 5me-dCTP.

Otro hecho diferencial entre DCTPP1 y las dUTPasas diméricas de tripanosomatidos es la capacidad de estas últimas de hidrolizar la forma difosfato correspondiente, el dUDP. Dado que estos organismos carecen de dCMP desaminasa, esta segunda actividad constituye la principal vía de producción de dUMP como intermediario para la síntesis de dTTP pues permite hidrolizar de forma rápida la forma difosfato reducida por la RNR antes de ser fosforilada hasta dUTP.

Una característica común de las enzimas implicadas en procesos de *house-cleaning* es la alta afinidad que presentan para sus sustratos naturales. Esta alta afinidad les permite seleccionar estos sustratos que están en concentraciones muy bajas de una mezcla que contiene un exceso de nucleótidos canónicos. Con el fin de identificar sustratos potenciales de la actividad *house-cleaning* de DCTPP1 se ensayaron un amplio grupo de derivados de dCTP con modificaciones en la posición C5 de la base. De todos los derivados ensayados, la mayor afinidad se encontró para los nucleótidos halogenados en posición 5 (5-Iodo, 5-Bromo) así como para el 5-formil-dCTP, que presentaron valores de K_m en el rango de micromolar bajo. Estos sustituyentes comparten propiedades físico-químicas y estructurales similares que sin duda juegan un papel importante en la especificidad, aunque los determinantes estructurales que favorecen la hidrólisis de estos sustratos aún no han sido identificados. La obtención de la estructura tridimensional de DCTPP1 en complejo con alguno de estos sustratos permitiría responder a éstas y otras cuestiones que aún quedan por resolver tales como determinar los residuos implicados en la

interacción con el grupo amino de la citosina y el papel del residuo Asn125 en la exclusión de ribonucleótidos.

E.1.3. Regulación de la actividad de DCTPP1

La inhibición por el producto de reacción o inhibición de tipo *feed-back* es un mecanismo común entre las enzimas para controlar su actividad en función de la necesidad de producto existente. Esto también ocurre a menudo entre las NTP pirofosfatasas, como las dUTPasa diméricas que muestran una fuerte inhibición por dUMP. DCTPP1 también es regulada por uno de sus productos, en este caso el pirofosfato. Una gran cantidad de enzimas biosintéticas liberan PPi y muchas de ellas se encuentran inhibidas por este producto. En condiciones normales, los niveles de pirofosfato están sujetos a una estrecha regulación mediante su hidrolisis a fosfato inorgánico en una reacción catalizada por pirofosfatasas. Se ha descrito que niveles altos de PPi intracelular debido a deficiencias en actividad pirofosfatasa, provocan parada del ciclo celular y muerte en levaduras (Serrano-Bueno, Hernandez et al. 2013), probablemente debido a una inhibición general de procesos metabólicos de tipo anabólico.

La actividad de DCTPP1 se regula además por otro metabolito intermediario de la síntesis de pirimidinas, el dCDP. Este nucleótido puede proceder de la síntesis *de novo* tras la reducción de CDP llevada a cabo por la RNR, o de la vía de recuperación tras la fosforilación de dCMP catalizada por la CMPK (Figura E.2). Independientemente de la vía empleada, cuando aumentan los requerimientos de dCTP y comienza su síntesis activa, se genera dCDP, que además de como intermediario, contribuiría a la formación de dCTP mediante la inhibición de DCTPP1.

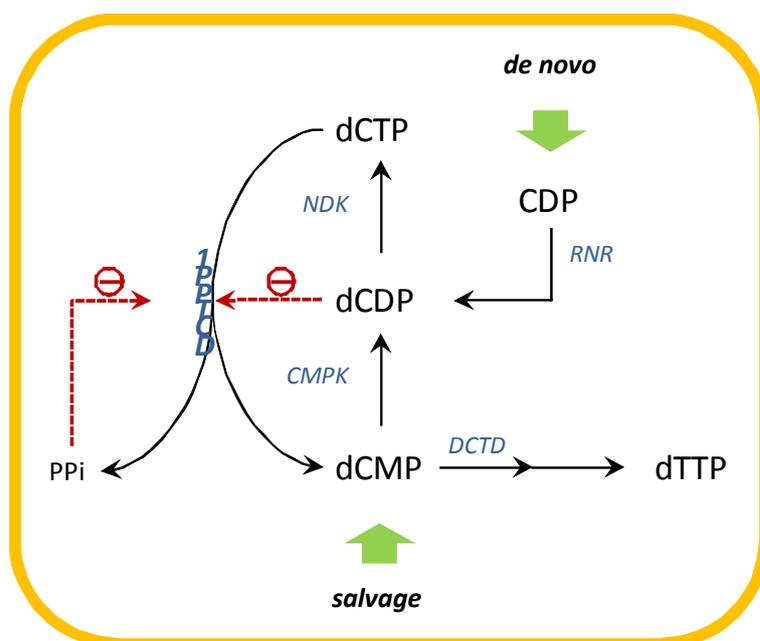


Figura E.2. (Versión 1) Regulación de la actividad de DCTPP1 durante la síntesis de pirimidinas. En líneas rojas discontinuas se muestra la inhibición de DCTPP1 por PPi y dCDP.

E.2. DCTPP1 CONTRIBUYE A LA HOMEOSTASIS INTRACELULAR DE NUCLEÓTIDOS DE PIRIMIDINA

La actividad dCTP hidrolasa de DCTPP1 así como el aumento en la concentración de dCTP intracelular tras su inhibición mediante siRNA sugiere su implicación en la regulación de los niveles de dCTP en la célula. Al mismo tiempo, la hidrólisis de dCTP podría tener como finalidad la formación de dCMP que puede derivarse hacia la síntesis de dTTP (Figura E.4). Acompañado del incremento en dCTP, también se produce un aumento en los niveles intracelulares de dUTP tras la depleción de DCTPP1. En células de mamífero, la desaminación de dCMP a dUMP por la dCMP desaminasa es la vía principal que proporciona los precursores intermediarios para la síntesis *de novo* de dTTP (Jackson 1978). La pérdida de esta actividad desaminasa genera un drástico desbalance del *pool* intracelular de dNTPs, especialmente con un aumento en el dCTP intracelular y una disminución en el dTTP, siendo estas células auxótroficas para timidina (Weinberg, Ullman et al. 1981) (de Saint Vincent,

Dechamps et al. 1980). El dUMP producido en esta reacción es convertido a dTMP por la acción de la timidilato sintasa. El dUMP es sintetizado también vía reducción de UDP a dUDP por la RNR, seguido de fosforilación por NDK e hidrólisis por la dUTPasa. Por tanto, estas dos vías son la que determinan la razón dCTP/dTTP. Una de las causas posibles del aumento en la concentración de dUTP causado por la depleción de DCTPP1 es probablemente la sobreproducción de dUMP debido a la activación de la dCMP desaminasa en presencia de un exceso de dCTP (Maley and Maley 1968). En estas condiciones, la actividad TS podría estar saturada y parte del dUMP acumulado sería fosforilado hasta dUTP. Por otro lado, una activación de la reducción de UDP debido al bloqueo de la vía complementaria a través de dCTP, aportaría dUDP para la síntesis de dTTP, lo que también podría conllevar un aumento en los niveles de dUTP. En nuestras condiciones experimentales, los niveles de dTTP permanecieron invariables. Esto puede deberse a una compensación por parte de la vía de recuperación tanto de timidina y uridina, a través de TK1, como de desoxicitidina por la acción de la dCK.

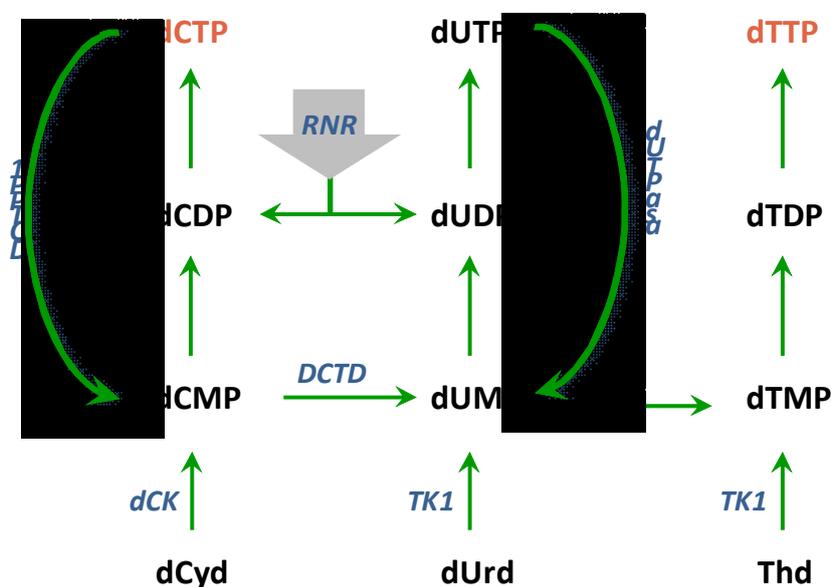


Figura E.4. Función de DCTPP1 en la ruta de biosíntesis de pirimidinas. RNR: ribonucleótido reductasa, TK1: timidina quinasa 1, dCK: desoxicitidina quinasa, DCTD: dCMP desaminasa.

Otra de las evidencias que apoyan la implicación de DCTPP1 en el control de los niveles de dCTP se encuentra el aumento de su expresión cuando se suplementa el medio de cultivo con desoxicitidina. Una vez incorporada al interior celular, la dCyd es fosforilada hasta dCTP por la acción consecutiva de tres quinasas: dCK, CMPK y NDK. El rápido aumento de la expresión de DCTPP1 de hasta 5 veces su expresión basal, estaría de acuerdo con la necesidad de la célula de retirar el exceso de dCTP producido. Además de DCTPP1, otras enzimas del metabolismo de pirimidinas experimentan cambios en su expresión en respuesta a dCyd. En las dos líneas celulares estudiadas se produce un incremento en la expresión de la dUTPasa, probablemente como respuesta a los altos niveles de dUTP que se generan por la desaminación del dCMP a dUMP que a su vez es fosforilado a dUTP. El comportamiento del resto de las enzimas parece tener como fin la formación de dTTP, compensando así la razón dCTP/dTTP y dUTP/dTTP. En el caso de células HeLa, esto se logra con un aumento en la expresión de DCTD y de TMPK, mientras que en células MRC-5 sólo se observa un aumento significativo de los niveles de TK1. Las diferentes respuestas encontradas pueden deberse a diferencias en el nivel de expresión basal en cada línea, de forma que el incremento de expresión afectaría únicamente a aquellas enzimas cuya actividad es limitante a la hora de eliminar el exceso de dCyd.

La concentración de cada uno de los precursores utilizados para la síntesis y reparación del DNA es un factor esencial que determina la fidelidad de las polimerasas y por tanto la integridad genética. Por ello, es lógico encontrar que la ruta de síntesis de desoxirribonucleótidos presenta una estricta regulación que determina la concentración absoluta y relativa de cada nucleótido en el pool intracelular. En este trabajo se han presentado datos que indican una interregulación de algunas de las enzimas implicadas en la síntesis de pirimidinas. En primer lugar, se pone de manifiesto una clara relación inversa entre los niveles de DCTPP1 y de la dUTPasa. Dado que ambas enzimas tienen un papel central en la generación de dUMP a partir de la síntesis *de novo*, la pérdida de la actividad de una de ellas podría ser compensada por la célula

aumentando la expresión de la otra. Por otro lado, la inhibición de la actividad dCTP hidrolasa de DCTPP1 causa un incremento significativo en la concentración intracelular de dUTP, el cual podría ser el desencadenante de la activación de la dUTPasa cuyos niveles aumentan para eliminar este nucleótido no canónico del medio. Otro ejemplo notable de la regulación coordinada de la ruta es el hecho de que los niveles de DCTPP1 y de dUTPasa aumentan cuando se inhibe la vía de recuperación de nucleótidos tras la depleción mediante siRNA de dCK o TK1. Por el contrario, la inhibición de las dos nucleotidohidrolasas no conlleva un aumento significativo del nivel de expresión de enzimas implicadas en la vía de recuperación de pirimidinas, al menos en los intervalos de tiempo estudiados, aunque posiblemente puedan existir otros mecanismos de activación independientes del incremento de los niveles de proteína.

A pesar de los mecanismos de regulación descritos, la función que desempeña DCTPP1 en la ruta del metabolismo de pirimidinas resulta esencial para la proliferación celular a medio y largo plazo. Así, se ha observado una pérdida de viabilidad celular de un 30-40 % tras 14 días de silenciamiento, aunque no a periodos más cortos. La deficiencia prolongada de DCTPP1 o de la dUTPasa provoca finalmente un desequilibrio en el *pool* de nucleótidos que probablemente produce una acumulación de daños que genera toxicidad a medio largo plazo tras múltiples rondas de replicación. El efecto sobre la viabilidad de la depleción simultánea de ambas enzimas no es aditivo ya que la viabilidad celular es similar a la observada tras la depleción de cada una de manera independiente.

E.3. DCTPP1 SE LOCALIZA DE FORMA UBÍCUA EN LA CÉLULA

En las tres líneas celulares analizadas, DCTPP1 presenta una amplia distribución celular, localizándose en el citosol, en el núcleo y en la mitocondria. Este último compartimento alberga la mayor concentración de esta hidrolasa de dCTP, lo que sugiere que debe cumplir una función especialmente relevante en

este orgánulo. Por el contrario, RS21-C6 se detectó exclusivamente en la fracción citosólica aislada a partir de células de hígado de ratón (Nonaka, Tsuchimoto et al. 2009), lo que podría indicar que existen diferencias esenciales entre el metabolismo de nucleótidos en humanos y en ratón.

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que DCTPP1 controla el nivel intracelular absoluto de dCTP. Este hecho junto con los datos de localización de DCTPP1 sugieren que esta enzima está implicada en la regulación del *pool* de nucleótidos requeridos para la replicación y reparación tanto del genoma nuclear como del mitocondrial. En este estudio se ha medido la concentración total intracelular no pudiendo establecer conclusiones acerca del papel de la enzima en la homeostasis de nucleótidos de distintos orgánulos. Por consiguiente, se hace imprescindible determinar la composición de dNTPs nuclear y mitocondrial tras la disminución de la expresión de DCTPP1 con el fin de establecer el papel que juega esta enzima en la fidelidad de replicación de cada genoma.

Los nucleótidos mitocondriales pueden provenir del citosol o ser sintetizados a través de la vía de recuperación que posee este orgánulo. En células no replicativas de tejidos diferenciados, la síntesis *de novo* de dNTPs citosólica se encuentra reducida al mínimo, mientras que la replicación del DNA mitocondrial requiere un aporte continuado de nucleótidos. En estas células, el suministro de nucleótidos depende en gran medida de la subunidad de R2 inducible por p53 de la RNR citosólica (R1-p53R2) (Hakansson, Hofer et al. 2006) así como de la vía de recuperación mitocondrial, con TK2 catalizando la primera fosforilación de las pirimidinas (Saada 2009). De hecho, defectos en los genes que codifican alguna de estas enzimas se han asociado con síndromes de depleción mitocondrial, caracterizados por la reducción de la cantidad de DNA mitocondrial en células post-mitóticas diferenciadas. Es interesante mencionar en particular uno de estos síndromes, la encefalomiopatía neurogastrointestinal mitocondrial (MNGIE), que se caracteriza por alteraciones en la degradación de dTTP y una expansión del *pool* de este nucleótido por una

deficiencia en timidina fosforilasa. Recientemente se ha demostrado que la consecuencia indirecta de la deficiencia en TP y la expansión de dTTP es la disminución secundaria de dCTP. El dTTP es un inhibidor alostérico de la RNR y un inhibidor de la TK2, una enzima mitocondrial que fosforila tanto la timidina como la desoxicitidina. De forma semejante, el dCTP también inhibe a la TK2. Además la fosforilación de desoxicitidina por TK2 es inhibido competitivamente por timidina y la fosforilación de timidina es inhibida (aunque menos eficientemente) por desoxicitidina. En pacientes con MNGIE, como consecuencia de la inhibición de la TK2 en respuesta a un acúmulo de dTTP se produce un descenso en la fosforilación mitocondrial de desoxicitidina lo que conlleva una depleción de dCTP. En estas condiciones, la disponibilidad de dCTP adquiere una importancia significativa en el control de la tasa de replicación en este orgánulo y parece ser el factor responsable del síndrome en el caso de MNGIE. Es posible por tanto que si DCTPP1 está involucrada en la homeostasis de dNTPs mitocondrial, su función pueda ser especialmente relevante en la mitocondria de células no replicativas. Por ejemplo, la deficiencia en actividad dCTP hidrolasa en la mitocondria podría conllevar el aumento de los niveles de dCTP, que también puede actuar como inhibidor de TK2 (Wang, Saada et al. 2003), provocando en este caso una depleción secundaria de dTTP. Además hemos comprobado que el dTTP es un sustrato de DCTPP1 con una Km semejante al del dCTP pero con una eficiencia catalítica aproximadamente 4 veces menor. Si el cociente dTTP/dCTP es muy elevado, el dTTP podría actuar como un inhibidor competitivo de DCTPP1 contribuyendo de esta manera a regular/compensar los niveles de dCTP. Es posible especular con la posibilidad de emplear inhibidores de DCTPP1 con el fin de revertir, al menos parcialmente, la disminución del dCTP mitocondrial en MNGIE (Camara, Gonzalez-Vioque et al. 2013; Camara, Gonzalez-Vioque et al. 2014).

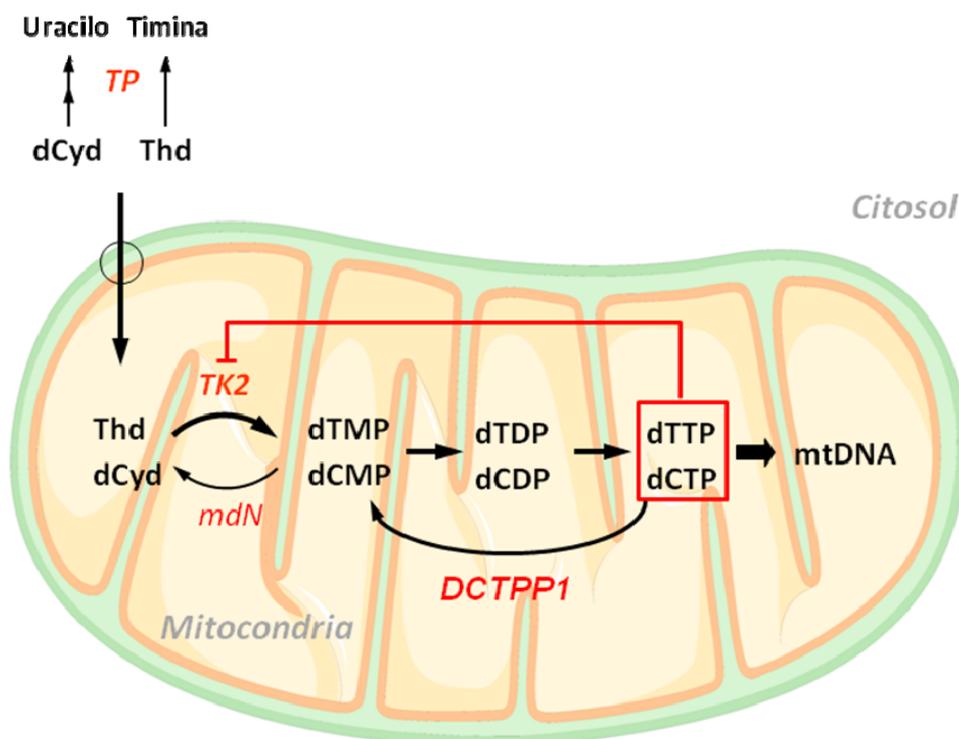


Figura E.3. Posible papel de DCTPP1 en la homeostasis mitocondrial de pirimidinas. TP: timidina fosforilasa, TK2: timidina quinasa 2, mdN: desoxinucleotidasa mitocondrial, mtDNA: DNA mitocondrial.

E.4. FUNCIÓN *HOUSE-CLEANING* DE DCTPP1

E.4.1. Eliminación de análogos derivados de citidina del medio intracelular

Nuestros datos cinéticos indican que los derivados 5-halogenados de dCTP son sustrato para DCTPP1, incluyendo 5I-dCTP y 5Br-dCTP. Resultados similares se obtuvieron en un estudio con su homólogo en ratón RS21-C6, en el que también se incluyó entre sus posibles sustratos al 5Cl-dCTP (Nonaka, Tsuchimoto et al. 2009). La hipersensibilidad de células deficientes en DCTPP1 expuestas a nucleósidos halogenados sugiere un papel de su actividad hidrolasa en la eliminación de estos nucleótidos modificados, evitando así su incorporación al DNA. Estudios previos sugieren que la halogenación de citosina puede ocurrir en el DNA *in vivo* a través de moléculas reactivas que

participan en los procesos de inflamación (Kawai, Morinaga et al. 2004). Tanto la enzima mieloperoxidasa, sintetizada y secretada por neutrófilos y monocitos, como la peroxidasa del eosinófilo, liberada por eosinófilos activados, producen agentes de clorinación y brominación respectivamente con capacidad para modificar una gran cantidad de moléculas biológicas, incluyendo ácidos nucleicos y nucleósidos precursores como 2'-desoxicitidina (Henderson, Byun et al. 1999) (Henderson, Byun et al. 2001). Los nucleótidos halogenados son potencialmente citotóxicos y mutagénicos si se incorporan en el DNA. En concreto, se ha descrito que la halogenación de residuos de citosina en el DNA provocada por los procesos de inflamación puede mimetizar a la 5-metilcitosina, alterando de esta manera la afinidad de las proteínas que se unen a estos residuos y promoviendo la metilación mediada por DNMT1 de citosinas dentro de secuencias CpG (Valinluck and Sowers 2007). Por tanto, las citosinas halogenadas pueden interferir en la regulación epigenética de la expresión génica. Diversos autores han propuesto que el daño al DNA o la perturbación de los patrones de metilación debido a la halogenación, podrían ser la causa de la carcinogénesis asociada a enfermedades inflamatorias crónicas (Coussens and Werb 2002).

Estudios preliminares de modelización comparativa del centro activo de DCTPP1 (Moroz, Murzin et al. 2005) señalaron al nucleótido 5me-dCTP como sustrato potencial para esta enzima. Nuestros datos cinéticos indican que efectivamente, DCTPP1 es capaz de hidrolizarlo con una eficiencia similar al dCTP. Además, en ausencia de DCTPP1, las células mostraron una mayor sensibilidad a 5me-dCyd así como unos niveles de metilación global superiores tras la exposición al nucleósido. Sin embargo, el silenciamiento transitorio de DCTPP1 no alteró el contenido de citosinas metiladas en DNA genómico en ausencia de nucleósidos exógenos por lo que no podemos concluir que el nivel de 5me-dCTP intracelular sea fisiológicamente relevante, al menos en los tipos celulares y condiciones experimentales empleadas. No obstante, no podemos descartar que una incorporación significativa de 5meC requiera una disminución más prolongada de la expresión de DCTPP1. Dado que la 5meC

induce silenciamiento génico en células de mamífero, un exceso de 5me-dCTP en el *pool* intracelular disponible para ser utilizado por la DNA polimerasa puede ser la causa de patrones erróneos de regulación epigenética (Nyce 1991). Se ha demostrado que las células de mamífero pueden incorporar 5me-dCyd al DNA, en forma de timina o de 5me-citosina, lo que sugiere que la actividad dCMP desaminasa tiene un papel importante en prevenir la incorporación errónea de este nucleótido al DNA (Holliday and Ho 1998). Una vía alternativa de eliminación de 5me-dCMP es su degradación al correspondiente nucleósido por actividades de tipo catabólico. En este escenario, DCTPP1 podría formar parte de esta vía catabólica de eliminación de nucleótidos de citosina metilados, previniendo así su utilización por la DNA polimerasa y sus consecuencias genotóxicas.

Otro potencial sustrato fisiológico de DCTPP1 es el derivado oxidado 5fo-dCTP. Diversos estudios han demostrado la presencia en el genoma de mamíferos de 5-hidroximetilcitosina (5hmC), 5-formilcitosina (5foC) y 5-carboxicitosina (5caC) como resultado de tres oxidaciones consecutivas catalizadas por la familia de enzimas TET, cuyo sustrato inicial es la 5mC (Wu and Zhang 2011) (Ito, Shen et al. 2011) (Figura E.5). Los recientes descubrimientos de estos productos de oxidación han dado lugar a un nuevo escenario para la desmetilación activa del DNA. De acuerdo a la hipótesis vigente, las citosinas metiladas que han de ser retiradas del DNA son previamente oxidadas por las enzimas TET a 5-hidroximetil-citosina, y este posteriormente a 5-formil-citosina y 5-carboxil-citosina. En un segundo paso, se procedería a su escisión por la timina DNA glicosilasa (TDG) (He, Li et al. 2011) (Maiti and Drohat 2011) y finalmente la restauración de la citosina no metilada por la vía de reparación por escisión de bases (BER) (Wu and Zhang 2011). El DNA mitocondrial también contiene una significativa proporción de 5meC y su derivado oxidado 5hmC (Shock, Thakkar et al. 2011) y es posible que los derivados oxidados de 5meC, incluyendo 5foC, se formen también en el mtDNA a causa del ataque por las especies reactivas de oxígeno generadas por el metabolismo mitocondrial (Kamiya 2003). Hasta la fecha, no se ha encontrado

TDG en este orgánulo, por lo que el mecanismo de escisión de estas bases modificadas podría ser a través de la reparación de apareamientos erróneos o *mismatch repair* (MMR) que libera el nucleósido monofosfato correspondiente. Podemos hipotetizar que la 5foC o el 5fo-dCMP libre resultante del proceso de escisión del DNA puedan ser recuperados e incorporados al pool intracelular de nucleótidos trifosfato, proporcionando un sustrato para DCTPP1. La incorporación de 5fo-dCTP por la DNA polimerasa puede generar apareamientos erróneos, como lo sugieren las propiedades mutagénicas de la 5foC en células de mamífero (Xing, Liu et al. 2013), además de perturbar la programación epigenética de la célula.

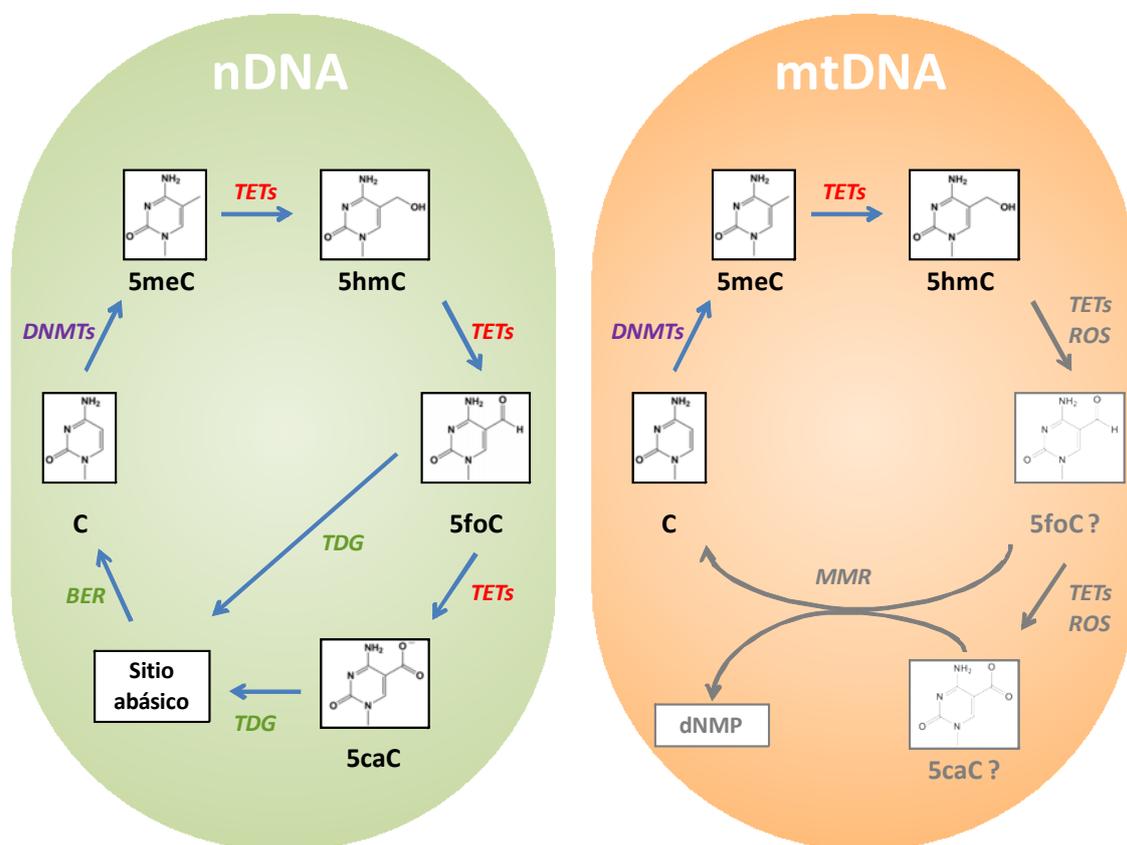


Figura E.5. Mecanismos potenciales de desmetilación activa en el DNA nuclear (nDNA) y en el DNA mitocondrial (mtDNA). C: citosina, 5meC: 5-metilcitosina, 5hmC: 5-hidroximetilcitosina, 5foC: 5-formilcitosina, 5caC: 5-carboxicitosina, DNMTs: DNA metiltransferasas, TDG: timina-DNA glicosilasa, BER: Reparación por Escisión de Bases, MMR: Reparación de Apareamientos Erróneos, ROS: especies reactivas de oxígeno.

E.4.2. Las nucleotidohidrolasas DCTPP1 y dUTPasa como factores de resistencia al agente antitumoral decitabina

La decitabina (aza-dCyd) es un fármaco antitumoral que está indicado para el tratamiento del síndrome mielodisplásico, la leucemia crónica mielomonocítica y la leucemia mieloide aguda. Para ejercer su función antitumoral, la decitabina (aza-dCyd) debe ser activada metabólicamente mediante sucesivas fosforilaciones hasta formar 5aza-dCTP (Figura E.6), el cual puede ser entonces incorporado al DNA durante la replicación. La presencia de este análogo de citosina en el DNA induce una disminución de la actividad DNA metiltransferasa debido al secuestro de la enzima que reacciona y forma una unión covalente con la azacitosina (Christman 2002). El resultado es la desmetilación global del DNA genómico y como consecuencia la reactivación génica. La eficiencia farmacológica de los análogos de nucleósidos que se emplean como antivirales o antitumorales se ve comprometida por actividades del propio metabolismo celular. Así, el mecanismo de resistencia primario frente a inhibidores de la metilación de DNA basados en análogos de citosina es el incremento en la actividad desaminasa (citidina desaminasa o dCMP desaminasa) o la disminución de la actividad de la desoxicitidina quinasa (Qin, Castoro et al. 2011). La afinidad mostrada del DCTPP1 por el aza-dCTP *in vitro*, sugiere un papel fundamental de la enzima en la susceptibilidad o resistencia hacia este análogo de nucleósido. La hidrólisis por parte de DCTPP1 implica la conversión al derivado monofosfato y por tanto la reversión de los pasos de fosforilación. El papel de DCTPP1 en el modo de acción de la decitabina viene apoyado por el hecho de que células deficientes en DCTPP1 presentan un fenotipo de hipersensibilidad al fármaco. De hecho, el silenciamiento de DCTPP1 aumenta la desmetilación observada en el DNA genómico tras el tratamiento con decitabina, lo que sugiere que una vez que el fármaco es activado en el interior celular es susceptible de ser hidrolizado por esta enzima antes de ser utilizado por la DNA polimerasa. De acuerdo a este modelo, la proporción relativa de actividad quinasa respecto a la de dCTP hidrolasa podría

tener un valor clínico predictivo. Dado que niveles intracelulares elevados de DCTPP1 podrían comprometer la respuesta clínica a este agente hipometilante, el uso de inhibidores de esta enzima o el desarrollo de nuevos análogos que no sean eficientemente hidrolizados por DCTPP1 podría prevenir fenotipos de resistencia.

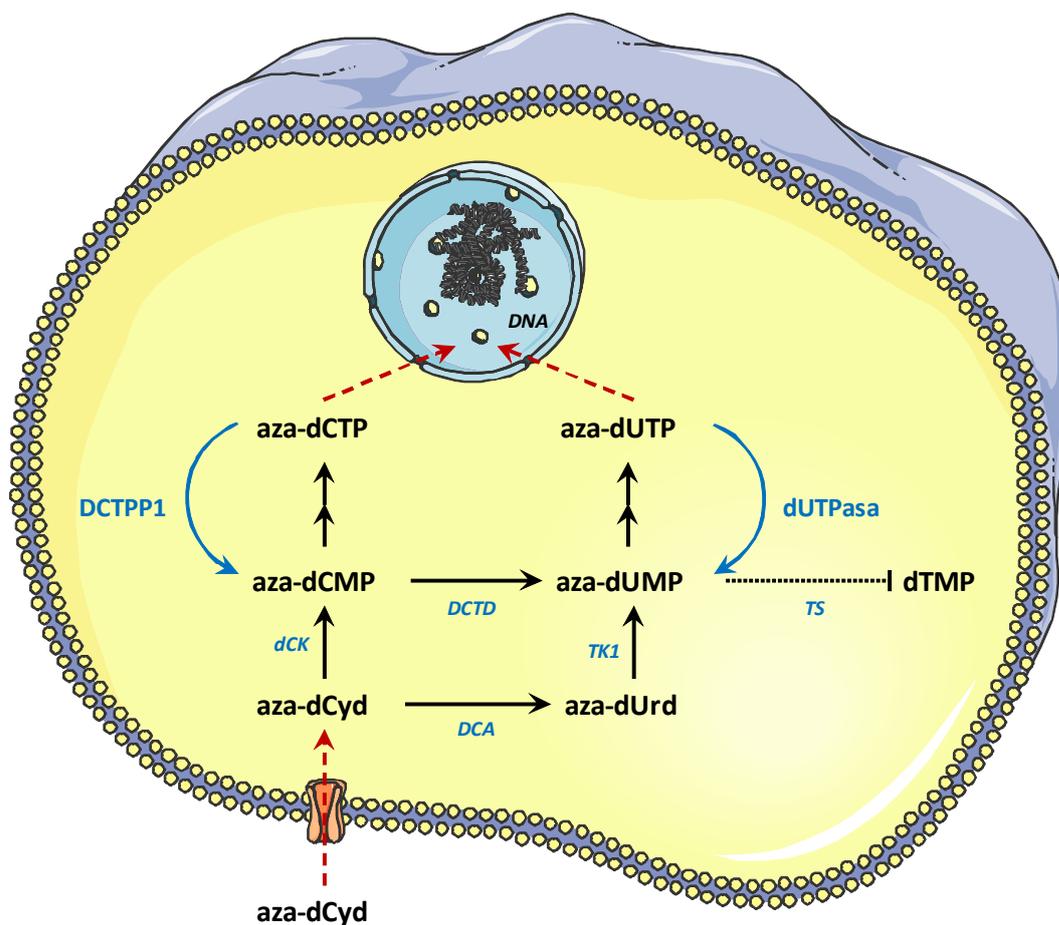


Figura E.6. Metabolismo de la decitabina (aza-dCyd). DCA: desoxicitidina desaminasa, TK1: timidina quinasa 1, dCK: desoxicitidina quinasa, DCTD: dCMP desaminasa, TS: timidilato sintasa.

Una vez que la aza-dCyd se encuentra formando parte del *pool* intracelular de nucleótidos, ésta puede seguir una ruta metabólica diferente a la de su fosforilación hasta aza-dCTP. La decitabina puede ser desactivada por desaminación hasta aza-desoxiuridina (aza-dUrd), cuya fosforilación por la

timidina quinasa es probablemente tan poco eficiente como la de dUrd (Munch-Petersen, 1991). Por otra parte, el intermediario aza-dCMP también puede ser desaminado por la dCMP desaminasa. El producto de la desaminación, el aza-dUMP, actuaría como un inhibidor de la TS, y contribuir así a la expansión del pool de dUTP o ser fosforilado a aza-dUTP. Esta hipótesis está también fundamentada en nuestra observación de que las células deficientes en dUTPasa son más sensibles a la aza-dCyd. Además, la exposición a decitabina provoca un aumento significativo en la concentración intracelular de dUTP, aunque con la técnica utilizada no es posible distinguir entre dUTP y aza-dUTP. El aumento de (aza)dUTP conlleva una disminución asociada de la razón dTTP/(aza)dUTP, si bien esta alteración se produce únicamente en células deficientes en dUTPasa, lo que indica que en condiciones normales, esta enzima es capaz de hidrolizar el (aza)dUTP producido. No hay que olvidar que la exposición a decitabina induce el incremento de los niveles intracelulares tanto de DCTPP1 como de dUTPasa, lo que sugiere que ambas tienen un papel fundamental en el modo de acción del fármaco.

A la luz de nuestros datos es razonable pensar que en células deficientes en dUTPasa, la aza-dCyd promueve la incorporación errónea de uracilo o aza-uracilo en el DNA activando mecanismos de reparación por escisión de bases. De hecho, nuestros resultados muestran como células deficientes en DCTPP1 o dUTPasa presentan una mayor proporción de roturas de doble cadena, indicado por la fosforilación de γ H2AX, cuando son sometidas a un tratamiento con decitabina. La expansión del pool de dTTP observada, es probablemente la consecuencia de la activación de la síntesis de dNTPs en respuesta a daños en el DNA (Chen, Eriksson et al. 2010). La decitabina ha sido caracterizada como un agente que causa daños en el DNA, tanto roturas de cadena sencilla como de cadena doble (Chai, Li et al. 2008), por lo que es posible que algunos de estos daños se deban a hiperactivación de la reparación de uracilo o aza-uracilo en el DNA. En consonancia con esta hipótesis, un estudio reciente muestra que células mutantes para XRCC1, deficientes en BER, son hipersensibles a aza-

dCyd y este fenotipo se correlaciona con un incremento en sitios abásicos y roturas de cadena de DNA (Orta, Hoglund et al. 2014).

Existen numerosos estudios en los que se ha descrito que las propiedades antiproliferativas de la decitabina aumentan en combinación con inhibidores de desacetilasas de histonas (HDAC) como el ácido valproico, tricostatina A, fenilbutirato, depsipéptido o vorinostat (Stiborova, Eckschlager et al. 2012). La hipótesis propuesta es que la inhibición simultánea de la metilación de DNA y de las HDAC induciría un incremento sinérgico en la expresión de genes que están metilados en su región promotora (Wade 2001). Sin embargo, hasta la fecha no se ha podido establecer una clara correlación entre la inhibición de la proliferación celular, la respuesta clínica y la reversión de la metilación y la reactivación de genes (Griffiths and Gore 2008). Curiosamente, los inhibidores de HDAC también aumentan el efecto citotóxico del agente antitumoral 5-fluorouracilo (5-FU). El mecanismo de acción de 5-FU se basa en la inhibición de la TS y uno de los mecanismos de resistencia más frecuentes es el aumento en la expresión de esta enzima. Sin embargo, la administración combinada de 5-FU junto con inhibidores de desacetilasas de histonas es capaz de revertir esta resistencia debido a la reducción de la expresión de la TS (Lee, Park et al. 2006) (Fazzone, Wilson et al. 2009). Es por tanto tentador especular que la actividad de la decitabina, de forma similar a 5-FU, podría potenciarse en presencia de inhibidores de desacetilasas debido a la disminución de la expresión de uno de sus blancos celulares, como es la TS.

En resumen, los datos obtenidos sugieren un modo de acción dual para la decitabina, como inhibidor tanto de la metilación de DNA como de la TS. El resultado es la acumulación de aza-dCTP y aza-dUTP en el pool de nucleótidos y el daño genotóxico al DNA. En este escenario, las actividades catabólicas de DCTPP1 y de la dUTPasa tendrían un papel importante en la eliminación de estos precursores de DNA no canónicos, de manera que el uso de inhibidores específicos de ambas enzimas en combinación con decitabina podría potenciar la eficacia del tratamiento y prevenir la aparición de fenotipos de resistencia.

A la luz de los datos obtenidos en esta tesis doctoral podemos proponer una función dual para DCTPP1 en la célula. Por un lado, esta enzima puede actuar como dCTP hidrolasa modulando los niveles intracelulares de dCTP. Además, DCTPP1 puede estar también proporcionando dCMP como precursor para la síntesis de dTTP. Por otro lado, esta enzima puede estar también implicada en la prevención de la incorporación de nucleótidos modificados que son agentes potencialmente mutagénicos debido a su apareamiento erróneo o a sus propiedades epigenéticas. En relación con esta función, hemos demostrado como DCTPP1 está implicada en la eliminación del análogo antitumoral aza-dCyd, abriendo nuevas vías de investigación de resistencias al fármaco e incluso la posibilidad de utilizar inhibidores de esta enzima en terapias combinadas.

CONCLUSIONES

F. CONCLUSIONES

1. DCTPP1 es una nucleótidohidrolasa que cataliza de manera eficiente la hidrólisis de dCTP liberando su forma monofosfato dCMP y pirofosfato (PPi). La curva de saturación de este sustrato por DCTPP1 muestra carácter sigmoidal, con un coeficiente de Hill $n = 2,15$, que es indicativo de cooperatividad positiva.
2. El análisis de la especificidad de sustrato revela que DCTPP1 tiene preferencia por otros nucleósidos trifosfato derivados de desoxicitidina con modificaciones en la posición 5 de la base. Las constantes de especificidad mayores se encontraron con el derivado 5-formil y los derivados halogenados 5-yodo y 5-bromo.
3. La actividad de DCTPP1 se encuentra regulada mediante inhibición competitiva por uno de los productos de la reacción (PPi) y por un intermediario en la síntesis de dCTP, el dCDP.
4. El análisis de la concentración de nucleótidos en células deficientes en DCTPP1 indica que esta enzima juega un papel relevante en la regulación del pool de nucleótidos mediante el control del nivel intracelular de dCTP.
5. La supresión prolongada de la actividad DCTPP1 mediante siRNA en células HeLa inhibe significativamente la proliferación celular.
6. El aumento de proteína DCTPP1 causado por la presencia de concentraciones elevadas de desoxicitidina en el medio de cultivo indica la existencia de mecanismos de regulación de la expresión de DCTPP1 en respuesta a perturbaciones en la concentración intracelular de dCTP.
7. Los estudios de localización intracelular de DCTPP1 muestran una distribución citosólica, nuclear y mitocondrial, encontrándose una mayor acumulación de enzima en este último compartimento. Esta distribución sugiere un papel relevante para DCTPP1 en la regulación del pool de nucleótidos tanto nuclear como mitocondrial.
8. DCTPP1 no presenta una expresión o localización subcelular diferencial en función del ciclo celular.

9. La expresión de DCTPP1 se regula en respuesta a cambios en los niveles de expresión de otras enzimas implicadas en la síntesis de pirimidinas como la dUTPasa, TK1 y dCK.
10. La deficiencia en DCTPP1 confiere hipersensibilidad a análogos de desoxicitidina con potencial genotóxico como 5I-dCyd y 5me-dCyd así como al fármaco antitumoral aza-dCyd (decitabina) cuya forma activada trifosfato es hidrolizada de manera eficiente por DCTPP1.
11. Las nucleotidohidrolasas DCTPP1 y la dUTPasa juegan un papel relevante en la protección celular frente al efecto citotóxico y antiproliferativo de la decitabina. La decitabina ejerce su mecanismo de acción no sólo a través de la formación de aza-dCTP y su incorporación al genoma sino también mediante la formación de aza-dUMP que actuaría inhibiendo la timidilato sintasa y promoviendo la producción de nucleótidos de carácter genotóxico como el dUTP y aza-dUTP.

BIBLIOGRAFÍA

G. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelraheim, S. R., D. G. Spiller, et al. (2003). "Mammalian NADH diphosphatases of the Nudix family: cloning and characterization of the human peroxisomal NUDT12 protein." Biochem J **374**(Pt 2): 329-335.
- Abolhassani, N., T. Iyama, et al. (2010). "NUDT16 and ITPA play a dual protective role in maintaining chromosome stability and cell growth by eliminating dIDP/IDP and dITP/ITP from nucleotide pools in mammals." Nucleic Acids Res **38**(9): 2891-2903.
- Ames, B. N., M. K. Shigenaga, et al. (1993). "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(17): 7915-7922.
- Amie, S. M., R. A. Bambara, et al. (2013). "GTP is the primary activator of the anti-HIV restriction factor SAMHD1." J Biol Chem **288**(35): 25001-25006.
- Anderson, D. D., C. M. Quintero, et al. (2011). "Identification of a de novo thymidylate biosynthesis pathway in mammalian mitochondria." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(37): 15163-15168.
- Anderson, D. D., C. F. Woeller, et al. (2012). "Serine hydroxymethyltransferase anchors de novo thymidylate synthesis pathway to nuclear lamina for DNA synthesis." J Biol Chem **287**(10): 7051-7062.
- Appling, D. R. (1991). "Compartmentation of folate-mediated one-carbon metabolism in eukaryotes." FASEB J **5**(12): 2645-2651.
- Arnau, J., C. Lauritzen, et al. (2006). "Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins." Protein Expr Purif **48**(1): 1-13.
- Ausubel, F. M., R. Brent, et al. (1997). Current Protocols in Molecular Biology. New York, John Wiley & Sons, Inc.
- Balestri, F., C. Barsotti, et al. (2007). "Key role of uridine kinase and uridine phosphorylase in the homeostatic regulation of purine and pyrimidine salvage in brain." Neurochem Int **51**(8): 517-523.
- Bebenek, K., J. D. Roberts, et al. (1992). "The effects of dNTP pool imbalances on frameshift fidelity during DNA replication." J Biol Chem **267**(6): 3589-3596.
- Behmanesh, M., K. Sakumi, et al. (2009). "ITPase-deficient mice show growth retardation and die before weaning." Cell Death Differ **16**(10): 1315-1322.

- Bernier-Villamor, V., A. Camacho, et al. (2002). "Characterization of deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase from *Trypanosoma cruzi*." FEBS Lett **526**(1-3): 147-150.
- Bjorklund, S., S. Skog, et al. (1990). "S-phase-specific expression of mammalian ribonucleotide reductase R1 and R2 subunit mRNAs." Biochemistry **29**(23): 5452-5458.
- Bourdon, A., L. Minai, et al. (2007). "Mutation of RRM2B, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion." Nat Genet **39**(6): 776-780.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Bullock, W. O., J. M. Fernández, et al. (1987). "XL1Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection." Biotechniques **5**: 376-378.
- Cai, J. P., T. Ishibashi, et al. (2003). "Mouse MTH2 protein which prevents mutations caused by 8-oxoguanine nucleotides." Biochem Biophys Res Commun **305**(4): 1073-1077.
- Camacho, A., R. Arrebola, et al. (1997). "Description of a novel eukaryotic deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase in *Leishmania major*." Biochem J **325** (Pt 2): 441-447.
- Camara, Y., E. Gonzalez-Vioque, et al. (2014). "Administration of deoxyribonucleosides or inhibition of their catabolism as a pharmacological approach for mitochondrial DNA depletion syndrome." Hum Mol Genet **23**(9): 2459-2467.
- Camara, Y., E. Gonzalez-Vioque, et al. (2013). "Feeding the deoxyribonucleoside salvage pathway to rescue mitochondrial DNA." Drug Discov Today **18**(19-20): 950-957.
- Castillo-Acosta, V. M., A. M. Estevez, et al. (2008). "Depletion of dimeric all-alpha dUTPase induces DNA strand breaks and impairs cell cycle progression in *Trypanosoma brucei*." Int J Biochem Cell Biol **40**(12): 2901-2913.
- Chabes, A. L., S. Bjorklund, et al. (2004). "S Phase-specific transcription of the mouse ribonucleotide reductase R2 gene requires both a proximal repressive E2F-binding site and an upstream promoter activating region." J Biol Chem **279**(11): 10796-10807.

- Chabes, A. L., C. M. Pflieger, et al. (2003). "Mouse ribonucleotide reductase R2 protein: a new target for anaphase-promoting complex-Cdh1-mediated proteolysis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 3925-3929.
- Chai, G., L. Li, et al. (2008). "HDAC inhibitors act with 5-aza-2'-deoxycytidine to inhibit cell proliferation by suppressing removal of incorporated abases in lung cancer cells." PLoS One **3**(6): e2445.
- Chang, Z. F., D. Y. Huang, et al. (1994). "Differential phosphorylation of human thymidine kinase in proliferating and M phase-arrested human cells." J Biol Chem **269**(33): 21249-21254.
- Chen, Y. L., S. Eriksson, et al. (2010). "Regulation and functional contribution of thymidine kinase 1 in repair of DNA damage." J Biol Chem **285**(35): 27327-27335.
- Cheng, J. C., C. B. Matsen, et al. (2003). "Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine." J Natl Cancer Inst **95**(5): 399-409.
- Christman, J. K. (2002). "5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy." Oncogene **21**(35): 5483-5495.
- Cihlar, T. and A. S. Ray (2010). "Nucleoside and nucleotide HIV reverse transcriptase inhibitors: 25 years after zidovudine." Antiviral Res **85**(1): 39-58.
- Copeland, W. C. (2012). "Defects in mitochondrial DNA replication and human disease." Crit Rev Biochem Mol Biol **47**(1): 64-74.
- Corson, T. W., H. Cavga, et al. "Triptolide directly inhibits dCTP pyrophosphatase." ChemBiochem **12**(11): 1767-1773.
- Coussens, L. M. and Z. Werb (2002). "Inflammation and cancer." Nature **420**(6917): 860-867.
- Davies, G. E. and G. R. Stark (1970). "Use of dimethyl suberimidate, a cross-linking reagent, in studying the subunit structure of oligomeric proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **66**(3): 651-656.
- de Saint Vincent, B. R., M. Dechamps, et al. (1980). "The modulation of the thymidine triphosphate pool of Chinese hamster cells by dCMP deaminase and UDP reductase. Thymidine auxotrophy induced by CTP in dCMP deaminase-deficient lines." J Biol Chem **255**(1): 162-167.

- Dolce, V., G. Fiermonte, et al. (2001). "The human mitochondrial deoxynucleotide carrier and its role in the toxicity of nucleoside antivirals." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(5): 2284-2288.
- Eriksson, S. and L. Wang (2008). "Molecular mechanisms of mitochondrial DNA depletion diseases caused by deficiencies in enzymes in purine and pyrimidine metabolism." Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids **27**(6): 800-808.
- Evans, D. R. and H. I. Guy (2004). "Mammalian pyrimidine biosynthesis: fresh insights into an ancient pathway." J Biol Chem **279**(32): 33035-33038.
- Evans, M. D., M. Dizdaroglu, et al. (2004). "Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance." Mutat Res **567**(1): 1-61.
- Ewald, B., D. Sampath, et al. (2008). "Nucleoside analogs: molecular mechanisms signaling cell death." Oncogene **27**(50): 6522-6537.
- Fazzone, W., P. M. Wilson, et al. (2009). "Histone deacetylase inhibitors suppress thymidylate synthase gene expression and synergize with the fluoropyrimidines in colon cancer cells." Int J Cancer **125**(2): 463-473.
- Ferraro, P., L. Nicolosi, et al. (2006). "Mitochondrial deoxynucleotide pool sizes in mouse liver and evidence for a transport mechanism for thymidine monophosphate." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(49): 18586-18591.
- Floyd, S., C. Favre, et al. (2007). "The insulin-like growth factor-I-mTOR signaling pathway induces the mitochondrial pyrimidine nucleotide carrier to promote cell growth." Mol Biol Cell **18**(9): 3545-3555.
- Franzolin, E., G. Pontarin, et al. (2013). "The deoxynucleotide triphosphohydrolase SAMHD1 is a major regulator of DNA precursor pools in mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(35): 14272-14277.
- Fujimori, K. and D. Ohta (1998). "Isolation and characterization of a histidine biosynthetic gene in Arabidopsis encoding a polypeptide with two separate domains for phosphoribosyl-ATP pyrophosphohydrolase and phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase." Plant Physiol **118**(1): 275-283.
- Furgason, J. M. and M. Bahassi el (2013). "Targeting DNA repair mechanisms in cancer." Pharmacol Ther **137**(3): 298-308.
- Fyrberg, A., S. Mirzaee, et al. (2006). "Cell cycle dependent regulation of deoxycytidine kinase, deoxyguanosine kinase, and cytosolic 5'-nucleotidase I activity in MOLT-4 cells." Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids **25**(9-11): 1201-1204.

- Gad, H., T. Koolmeister, et al. (2014). "MTH1 inhibition eradicates cancer by preventing sanitation of the dNTP pool." Nature **508**(7495): 215-221.
- Galmarini, C. M., J. R. Mackey, et al. (2002). "Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment." Lancet Oncol **3**(7): 415-424.
- Galperin, M. Y., O. V. Moroz, et al. (2006). "House cleaning, a part of good housekeeping." Mol Microbiol **59**(1): 5-19.
- Gandhi, V., J. Legha, et al. (1996). "Excision of 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) monophosphate residues from DNA." Cancer Res **56**(19): 4453-4459.
- Gelbard, A. S., J. H. Kim, et al. (1969). "Fluctuations in deoxycytidine monophosphate deaminase activity during the cell cycle in synchronous populations of HeLa cells." Biochim Biophys Acta **182**(2): 564-566.
- Goldstone, D. C., V. Ennis-Adeniran, et al. (2011). "HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase." Nature **480**(7377): 379-382.
- Goncalves, A. M., D. de Sanctis, et al. (2011). "Structural and functional insights into DR2231 protein, the MazG-like nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase from *Deinococcus radiodurans*." J Biol Chem **286**(35): 30691-30705.
- Gonzalez-Vioque, E., J. Torres-Torronteras, et al. (2011). "Limited dCTP availability accounts for mitochondrial DNA depletion in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE)." PLoS Genet **7**(3): e1002035.
- Greenberg, G. R. (1966). "New dUTPase and dUDPase activities after infection of *Escherichia coli* by T2 bacteriophage." Proc Natl Acad Sci U S A **56**(4): 1226-1232.
- Griffiths, E. A. and S. D. Gore (2008). "DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors in the treatment of myelodysplastic syndromes." Semin Hematol **45**(1): 23-30.
- Gross, M., I. Marianovsky, et al. (2006). "MazG -- a regulator of programmed cell death in *Escherichia coli*." Mol Microbiol **59**(2): 590-601.
- Grove, K. L. and Y. C. Cheng (1996). "Uptake and metabolism of the new anticancer compound beta-L-(-)-dioxolane-cytidine in human prostate carcinoma DU-145 cells." Cancer Res **56**(18): 4187-4191.

- Grove, K. L., X. Guo, et al. (1995). "Anticancer activity of beta-L-dioxolane-cytidine, a novel nucleoside analogue with the unnatural L configuration." Cancer Res **55**(14): 3008-3011.
- Hakansson, P., A. Hofer, et al. (2006). "Regulation of mammalian ribonucleotide reduction and dNTP pools after DNA damage and in resting cells." J Biol Chem **281**(12): 7834-7841.
- Harkiolaki, M., E. J. Dodson, et al. (2004). "The crystal structure of Trypanosoma cruzi dUTPase reveals a novel dUTP/dUDP binding fold." Structure **12**(1): 41-53.
- He, Y. F., B. Z. Li, et al. (2011). "Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA." Science **333**(6047): 1303-1307.
- Heinemann, V., Y. Z. Xu, et al. (1990). "Inhibition of ribonucleotide reduction in CCRF-CEM cells by 2',2'-difluorodeoxycytidine." Mol Pharmacol **38**(4): 567-572.
- Heinemann, V., Y. Z. Xu, et al. (1992). "Cellular elimination of 2',2'-difluorodeoxycytidine 5'-triphosphate: a mechanism of self-potentialiation." Cancer Res **52**(3): 533-539.
- Henderson, J. P., J. Byun, et al. (1999). "Chlorination of nucleobases, RNA and DNA by myeloperoxidase: a pathway for cytotoxicity and mutagenesis by activated phagocytes." Redox Rep **4**(6): 319-320.
- Henderson, J. P., J. Byun, et al. (2001). "Bromination of deoxycytidine by eosinophil peroxidase: a mechanism for mutagenesis by oxidative damage of nucleotide precursors." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(4): 1631-1636.
- Hengstschlager, M., C. Denk, et al. (1993). "Cell cycle regulation of deoxycytidine kinase. Evidence for post-transcriptional control." FEBS Lett **321**(2-3): 237-240.
- Hidaka, K., J. J. Caffrey, et al. (2002). "An adjacent pair of human NUDT genes on chromosome X are preferentially expressed in testis and encode two new isoforms of diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase." J Biol Chem **277**(36): 32730-32738.
- Hofer, A., M. Crona, et al. (2012). "DNA building blocks: keeping control of manufacture." Crit Rev Biochem Mol Biol **47**(1): 50-63.

- Holliday, R. and T. Ho (1995). "Evidence for gene silencing by DNA methylation in normal human diploid fibroblasts." Somat Cell Mol Genet **21**(3): 215-218.
- Holliday, R. and T. Ho (1998). "Evidence for gene silencing by endogenous DNA methylation." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(15): 8727-8732.
- Hrecka, K., C. Hao, et al. (2011). "Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein." Nature **474**(7353): 658-661.
- Hu, C. M. and Z. F. Chang (2007). "Mitotic control of dTTP pool: a necessity or coincidence?" J Biomed Sci **14**(4): 491-497.
- Huang, M. and L. M. Graves (2003). "De novo synthesis of pyrimidine nucleotides; emerging interfaces with signal transduction pathways." Cell Mol Life Sci **60**(2): 321-336.
- Huang, P., S. Chubb, et al. (1991). "Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis." Cancer Res **51**(22): 6110-6117.
- Ishibashi, T., H. Hayakawa, et al. (2003). "A novel mechanism for preventing mutations caused by oxidation of guanine nucleotides." EMBO Rep **4**(5): 479-483.
- Ito, S., L. Shen, et al. (2011). "Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine." Science **333**(6047): 1300-1303.
- Ives, D. H. and J. P. Durham (1970). "Deoxycytidine kinase. 3. Kinetics and allosteric regulation of the calf thymus enzyme." J Biol Chem **245**(9): 2285-2294.
- Ives, D. H., P. A. Morse, Jr., et al. (1963). "Feedback inhibition of thymidine kinase by thymidine triphosphate." J Biol Chem **238**: 1467-1474.
- Iyama, T., N. Abolhassani, et al. (2010). "NUDT16 is a (deoxy)inosine diphosphatase, and its deficiency induces accumulation of single-strand breaks in nuclear DNA and growth arrest." Nucleic Acids Res **38**(14): 4834-4843.
- Jackson, R. C. (1978). "The regulation of thymidylate biosynthesis in Novikoff hepatoma cells and the effects of amethopterin, 5-fluorodeoxyuridine, and 3-deazauridine." J Biol Chem **253**(20): 7440-7446.
- Javid-Majd, F., D. Yang, et al. (2008). "The 1.25 Å resolution structure of phosphoribosyl-ATP pyrophosphohydrolase from *Mycobacterium tuberculosis*." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **64**(Pt 6): 627-635.

- Ji, X., Y. Wu, et al. (2013). "Mechanism of allosteric activation of SAMHD1 by dGTP." Nat Struct Mol Biol.
- Johansson, E., K. Hjortsberg, et al. (1998). "Two YY-1-binding proximal elements regulate the promoter strength of the TATA-less mouse ribonucleotide reductase R1 gene." J Biol Chem **273**(45): 29816-29821.
- Jovanovic, A., A. E. Alekseev, et al. (1997). "Intracellular diadenosine polyphosphates: a novel family of inhibitory ligands of the ATP-sensitive K⁺ channel." Biochem Pharmacol **54**(2): 219-225.
- Kamiya, H. (2003). "Mutagenic potentials of damaged nucleic acids produced by reactive oxygen/nitrogen species: approaches using synthetic oligonucleotides and nucleotides: survey and summary." Nucleic Acids Res **31**(2): 517-531.
- Kang, D., J. Nishida, et al. (1995). "Intracellular localization of 8-oxo-dGTPase in human cells, with special reference to the role of the enzyme in mitochondria." J Biol Chem **270**(24): 14659-14665.
- Kang, J. and D. C. Samuels (2008). "The evidence that the DNC (SLC25A19) is not the mitochondrial deoxyribonucleotide carrier." Mitochondrion **8**(2): 103-108.
- Kawai, Y., H. Morinaga, et al. (2004). "Endogenous formation of novel halogenated 2'-deoxycytidine. Hypohalous acid-mediated DNA modification at the site of inflammation." J Biol Chem **279**(49): 51241-51249.
- Ke, P. Y., Y. Y. Kuo, et al. (2005). "Control of dTTP pool size by anaphase promoting complex/cyclosome is essential for the maintenance of genetic stability." Genes Dev **19**(16): 1920-1933.
- Keesey, J. K., Jr., R. Bigelis, et al. (1979). "The product of the his4 gene cluster in *Saccharomyces cerevisiae*. A trifunctional polypeptide." J Biol Chem **254**(15): 7427-7433.
- Keim, D., N. Hailat, et al. (1992). "Proliferation-related expression of p19/nm23 nucleoside diphosphate kinase." J Clin Invest **89**(3): 919-924.
- Khan, H., C. Vale, et al. (2013). "Role of DNA methylation in the pathogenesis and treatment of myelodysplastic syndromes." Semin Hematol **50**(1): 16-37.
- Koehler, S. E. and R. D. Ladner (2004). "Small interfering RNA-mediated suppression of dUTPase sensitizes cancer cell lines to thymidylate synthase inhibition." Mol Pharmacol **66**(3): 620-626.

- Kok, R. M., D. E. Smith, et al. (2007). "Global DNA methylation measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: analytical technique, reference values and determinants in healthy subjects." Clin Chem Lab Med **45**(7): 903-911.
- Kunz, B. A., S. E. Kohalmi, et al. (1994). "International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Deoxyribonucleoside triphosphate levels: a critical factor in the maintenance of genetic stability." Mutat Res **318**(1): 1-64.
- Lacombe, M. L., M. Tokarska-Schlattner, et al. (2009). "Interaction of NDPK-D with cardiolipin-containing membranes: Structural basis and implications for mitochondrial physiology." Biochimie **91**(6): 779-783.
- Ladner, R. D. and S. J. Caradonna (1997). "The human dUTPase gene encodes both nuclear and mitochondrial isoforms. Differential expression of the isoforms and characterization of a cDNA encoding the mitochondrial species." J Biol Chem **272**(30): 19072-19080.
- Laguet, N., B. Sobhian, et al. (2011). "SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx." Nature **474**(7353): 654-657.
- Lai, Y., C. M. Tse, et al. (2004). "Mitochondrial expression of the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) results in enhanced mitochondrial toxicity of antiviral drugs." J Biol Chem **279**(6): 4490-4497.
- Larsson, G., P. O. Nyman, et al. (1996). "Kinetic characterization of dUTPase from *Escherichia coli*." J Biol Chem **271**(39): 24010-24016.
- Le Francois, B. G., J. A. Maroun, et al. (2007). "Expression of thymidylate synthase in human cells is an early G(1) event regulated by CDK4 and p16INK4A but not E2F." Br J Cancer **97**(9): 1242-1250.
- Lee, E. W., Y. Lai, et al. (2006). "Identification of the mitochondrial targeting signal of the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1): implications for interspecies differences in mitochondrial toxicity of fialuridine." J Biol Chem **281**(24): 16700-16706.
- Lee, J. H., J. H. Park, et al. (2006). "Histone deacetylase inhibitor enhances 5-fluorouracil cytotoxicity by down-regulating thymidylate synthase in human cancer cells." Mol Cancer Ther **5**(12): 3085-3095.
- Lee, L., R. E. Kelly, et al. (1985). "Oligomeric structure of the multifunctional protein CAD that initiates pyrimidine biosynthesis in mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(20): 6802-6806.

- Lee, Y. N., H. Nechushtan, et al. (2004). "The function of lysyl-tRNA synthetase and Ap4A as signaling regulators of MITF activity in FcepsilonRI-activated mast cells." Immunity **20**(2): 145-151.
- Li, C. L., C. Y. Lu, et al. (2004). "Perturbation of ATP-induced tetramerization of human cytosolic thymidine kinase by substitution of serine-13 with aspartic acid at the mitotic phosphorylation site." Biochem Biophys Res Commun **313**(3): 587-593.
- Liacouras, A. S. and E. P. Anderson (1977). "Uridine-cytidine kinase. III. Competition between uridine and cytidine for a single enzyme." Mol Cell Biochem **17**(3): 141-146.
- Lin, S., A. G. McLennan, et al. (2001). "Cloning, expression, and characterization of a human inosine triphosphate pyrophosphatase encoded by the itpa gene." J Biol Chem **276**(22): 18695-18701.
- Liou, J. Y., G. E. Dutschman, et al. (2002). "Characterization of human UMP/CMP kinase and its phosphorylation of D- and L-form deoxycytidine analogue monophosphates." Cancer Res **62**(6): 1624-1631.
- Liou, J. Y., P. Krishnan, et al. (2003). "Assessment of the effect of phosphorylated metabolites of anti-human immunodeficiency virus and anti-hepatitis B virus pyrimidine analogs on the behavior of human deoxycytidylate deaminase." Mol Pharmacol **63**(1): 105-110.
- Liu, X., Y. Guo, et al. (2005). "Molecular basis for G2 arrest induced by 2'-Cyano-2'-deoxy-1-beta-D-arabino-pentofuranosylcytosine and consequences of checkpoint abrogation." Cancer Res **65**(15): 6874-6881.
- Loffler, M., L. D. Fairbanks, et al. (2005). "Pyrimidine pathways in health and disease." Trends Mol Med **11**(9): 430-437.
- Lu, L. D., Q. Sun, et al. (2010). "Mycobacterial MazG is a novel NTP pyrophosphohydrolase involved in oxidative stress response." J Biol Chem **285**(36): 28076-28085.
- Lyu, L. D., B. K. Tang, et al. (2013). "Mycobacterial MazG safeguards genetic stability via housecleaning of 5-OH-dCTP." PLoS Pathog **9**(12): e1003814.
- Maiti, A. and A. C. Drohat (2011). "Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites." J Biol Chem **286**(41): 35334-35338.
- Maki, H. and M. Sekiguchi (1992). "MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis." Nature **355**(6357): 273-275.

- Maley, G. F. and F. Maley (1968). "Regulatory properties and subunit structure of chick embryo deoxycytidylate deaminase." J Biol Chem **243**(17): 4506-4512.
- Marobbio, C. M., M. A. Di Noia, et al. (2006). "Identification of a mitochondrial transporter for pyrimidine nucleotides in *Saccharomyces cerevisiae*: bacterial expression, reconstitution and functional characterization." Biochem J **393**(Pt 2): 441-446.
- Marquez, V. E., J. A. Kelley, et al. (2005). "Zebularine: a unique molecule for an epigenetically based strategy in cancer chemotherapy." Ann N Y Acad Sci **1058**: 246-254.
- Mathews, C. K. (2006). "DNA precursor metabolism and genomic stability." FASEB J **20**(9): 1300-1314.
- Mathews, C. K. and S. Song (2007). "Maintaining precursor pools for mitochondrial DNA replication." FASEB J **21**(10): 2294-2303.
- Matsuda, A., Y. Nakajima, et al. (1991). "Nucleosides and nucleotides. 100. 2'-C-cyano-2'-deoxy-1-beta-D-arabinofuranosyl-cytosine (CNDAC): design of a potential mechanism-based DNA-strand-breaking antineoplastic nucleoside." J Med Chem **34**(9): 2917-2919.
- McLennan, A. G. (2000). "Dinucleoside polyphosphates-friend or foe?" Pharmacol Ther **87**(2-3): 73-89.
- McLennan, A. G. (2006). "The Nudix hydrolase superfamily." Cell Mol Life Sci **63**(2): 123-143.
- Momparler, R. L. (2005). "Epigenetic therapy of cancer with 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine)." Semin Oncol **32**(5): 443-451.
- Moroz, O. V., A. G. Murzin, et al. (2005). "Dimeric dUTPases, HisE, and MazG belong to a new superfamily of all-alpha NTP pyrophosphohydrolases with potential "house-cleaning" functions." J Mol Biol **347**(2): 243-255.
- Musso-Buendia, J. A., A. E. Vidal, et al. (2009). "Kinetic properties and inhibition of the dimeric dUTPase-dUDPase from *Campylobacter jejuni*." J Enzyme Inhib Med Chem **24**(1): 111-116.
- Niida, H., M. Shimada, et al. (2010). "Mechanisms of dNTP supply that play an essential role in maintaining genome integrity in eukaryotic cells." Cancer Sci **101**(12): 2505-2509.

- Nonaka, M., D. Tsuchimoto, et al. (2009). "Mouse RS21-C6 is a mammalian 2'-deoxycytidine 5'-triphosphate pyrophosphohydrolase that prefers 5-iodocytosine." FEBS J **276**(6): 1654-1666.
- Nordlund, P. and P. Reichard (2006). "Ribonucleotide reductases." Annu Rev Biochem **75**: 681-706.
- Nyce, J. (1991). "Gene silencing in mammalian cells by direct incorporation of electroporated 5-methyl-2'-deoxycytidine 5'-triphosphate." Somat Cell Mol Genet **17**(6): 543-550.
- Orta, M. L., A. Høglund, et al. (2014). "The PARP inhibitor Olaparib disrupts base excision repair of 5-aza-2'-deoxycytidine lesions." Nucleic Acids Res **42**(14): 9108-9120.
- Otto, M. J. (2004). "New nucleoside reverse transcriptase inhibitors for the treatment of HIV infections." Curr Opin Pharmacol **4**(5): 431-436.
- Palii, S. S., B. O. Van Emburgh, et al. (2008). "DNA methylation inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine induces reversible genome-wide DNA damage that is distinctly influenced by DNA methyltransferases 1 and 3B." Mol Cell Biol **28**(2): 752-771.
- Palmieri, F. (2004). "The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications." Pflugers Arch **447**(5): 689-709.
- Panasci, L., J. P. Paiement, et al. (2001). "Chlorambucil drug resistance in chronic lymphocytic leukemia: the emerging role of DNA repair." Clin Cancer Res **7**(3): 454-461.
- Parker, W. B. (2009). "Enzymology of purine and pyrimidine antimetabolites used in the treatment of cancer." Chem Rev **109**(7): 2880-2893.
- Phillips, T. A., R. A. VanBogelen, et al. (1984). "lon gene product of Escherichia coli is a heat-shock protein." J Bacteriol **159**(1): 283-287.
- Pontarin, G., P. Ferraro, et al. (2012). "Out of S-phase: shift of subunits for ribonucleotide reduction." Cell Cycle **11**(22): 4099-4100.
- Pontarin, G., L. Gallinaro, et al. (2003). "Origins of mitochondrial thymidine triphosphate: dynamic relations to cytosolic pools." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(21): 12159-12164.
- Qin, T., R. Castoro, et al. (2011). "Mechanisms of resistance to decitabine in the myelodysplastic syndrome." PLoS One **6**(8): e23372.

- Rampazzo, C., C. Miazzi, et al. (2010). "Regulation by degradation, a cellular defense against deoxyribonucleotide pool imbalances." Mutat Res **703**(1): 2-10.
- Recio, E., A. Musso-Buendia, et al. (2011). "Site-directed mutagenesis provides insights into the selective binding of trityl derivatives to Plasmodium falciparum dUTPase." Eur J Med Chem **46**(8): 3309-3314.
- Rice, G. I., J. Bond, et al. (2009). "Mutations involved in Aicardi-Goutieres syndrome implicate SAMHD1 as regulator of the innate immune response." Nat Genet **41**(7): 829-832.
- Rocha, M. S., R. Castro, et al. (2010). "Global DNA methylation: comparison of enzymatic- and non-enzymatic-based methods." Clin Chem Lab Med **48**(12): 1793-1798.
- Ross, D. D., S. R. Chen, et al. (1990). "Effects of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine on DNA replication intermediates monitored by pH-step alkaline elution." Cancer Res **50**(9): 2658-2666.
- Rotig, A. and J. Poulton (2009). "Genetic causes of mitochondrial DNA depletion in humans." Biochim Biophys Acta **1792**(12): 1103-1108.
- Saada, A. (2009). "Fishing in the (deoxyribonucleotide) pool." Biochem J **422**(3): e3-6.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, et al. (1989). Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samsonoff, W. A., J. Reston, et al. (1997). "Intracellular location of thymidylate synthase and its state of phosphorylation." J Biol Chem **272**(20): 13281-13285.
- Schaller, T., C. Goujon, et al. (2012). "AIDS/HIV. HIV interplay with SAMHD1." Science **335**(6074): 1313-1314.
- Serrano-Bueno, G., A. Hernandez, et al. (2013). "Inorganic pyrophosphatase defects lead to cell cycle arrest and autophagic cell death through NAD⁺ depletion in fermenting yeast." J Biol Chem **288**(18): 13082-13092.
- Sherley, J. L. and T. J. Kelly (1988). "Regulation of human thymidine kinase during the cell cycle." J Biol Chem **263**(17): 8350-8358.
- Sherman, P. A. and J. A. Fyfe (1989). "Enzymatic assay for deoxyribonucleoside triphosphates using synthetic oligonucleotides as template primers." Anal Biochem **180**(2): 222-226.

- Shock, L. S., P. V. Thakkar, et al. (2011). "DNA methyltransferase 1, cytosine methylation, and cytosine hydroxymethylation in mammalian mitochondria." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(9): 3630-3635.
- Sigoillot, F. D., J. A. Berkowski, et al. (2003). "Cell cycle-dependent regulation of pyrimidine biosynthesis." J Biol Chem **278**(5): 3403-3409.
- Smith, D. W. and B. N. Ames (1965). "Phosphoribosyladenosine Monophosphate, an Intermediate in Histidine Biosynthesis." J Biol Chem **240**: 3056-3063.
- Someya, H., W. R. Waud, et al. (2006). "Long intracellular retention of 4'-thio-arabinofuranosylcytosine 5'-triphosphate as a critical factor for the anti-solid tumor activity of 4'-thio-arabinofuranosylcytosine." Cancer Chemother Pharmacol **57**(6): 772-780.
- Song, M. G., S. Bail, et al. (2013). "Multiple Nudix family proteins possess mRNA decapping activity." RNA **19**(3): 390-399.
- Stiborova, M., T. Eckschlager, et al. (2012). "The synergistic effects of DNA-targeted chemotherapeutics and histone deacetylase inhibitors as therapeutic strategies for cancer treatment." Curr Med Chem **19**(25): 4218-4238.
- Studier, F. W. and B. A. Moffatt (1986). "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." J Mol Biol **189**(1): 113-130.
- Tinkelenberg, B. A., M. J. Hansbury, et al. (2002). "dUTPase and uracil-DNA glycosylase are central modulators of antifolate toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*." Cancer Res **62**(17): 4909-4915.
- Topal, M. D. and M. S. Baker (1982). "DNA precursor pool: a significant target for N-methyl-N-nitrosourea in C3H/10T1/2 clone 8 cells." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(7): 2211-2215.
- Valinluck, V. and L. C. Sowers (2007). "Inflammation-mediated cytosine damage: a mechanistic link between inflammation and the epigenetic alterations in human cancers." Cancer Res **67**(12): 5583-5586.
- Van Rompay, A. R., A. Norda, et al. (2001). "Phosphorylation of uridine and cytidine nucleoside analogs by two human uridine-cytidine kinases." Mol Pharmacol **59**(5): 1181-1186.
- Vartanian, A., I. Alexandrov, et al. (1999). "Ap4A induces apoptosis in human cultured cells." FEBS Lett **456**(1): 175-180.

- Vesely, J. and A. Cihak (1977). "Incorporation of a potent antileukemic agent, 5-aza-2'-deoxycytidine, into DNA of cells from leukemic mice." Cancer Res **37**(10): 3684-3689.
- Vesely, J., R. Gostof, et al. (1969). "Radioprotective effect of 5-azacytidine in AKR mice." Z Naturforsch B **24**(3): 318-320.
- Vincenzetti, S., A. Cambi, et al. (2000). "Possible role of two phenylalanine residues in the active site of human cytidine deaminase." Protein Eng **13**(11): 791-799.
- Wade, P. A. (2001). "Methyl CpG binding proteins: coupling chromatin architecture to gene regulation." Oncogene **20**(24): 3166-3173.
- Wang, L., A. Saada, et al. (2003). "Kinetic properties of mutant human thymidine kinase 2 suggest a mechanism for mitochondrial DNA depletion myopathy." J Biol Chem **278**(9): 6963-6968.
- Wang, L. M., G. L. Kucera, et al. (1993). "Purification and characterization of deoxycytidine kinase from acute myeloid leukemia cell mitochondria." Biochim Biophys Acta **1202**(2): 309-316.
- Wang, Z., X. Jiao, et al. (2002). "The hDcp2 protein is a mammalian mRNA decapping enzyme." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(20): 12663-12668.
- Weinberg, G., B. Ullman, et al. (1981). "Mutator phenotypes in mammalian cell mutants with distinct biochemical defects and abnormal deoxyribonucleoside triphosphate pools." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(4): 2447-2451.
- Wilson, P. M., M. J. LaBonte, et al. (2012). "Inhibition of dUTPase induces synthetic lethality with thymidylate synthase-targeted therapies in non-small cell lung cancer." Mol Cancer Ther **11**(3): 616-628.
- Wu, B., Y. Liu, et al. (2007). "Crystal structure of RS21-C6, involved in nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolysis." J Mol Biol **367**(5): 1405-1412.
- Wu, H. and Y. Zhang (2011). "Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation." Genes Dev **25**(23): 2436-2452.
- Xing, X. W., Y. L. Liu, et al. (2013). "Mutagenic and cytotoxic properties of oxidation products of 5-methylcytosine revealed by next-generation sequencing." PLoS One **8**(9): e72993.
- Yamauchi, T., B. J. Nowak, et al. (2001). "DNA repair initiated in chronic lymphocytic leukemia lymphocytes by 4-hydroperoxycyclophosphamide

is inhibited by fludarabine and clofarabine." Clin Cancer Res 7(11): 3580-3589.

Zhang, J. and M. Inouye (2002). "MazG, a nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase, interacts with Era, an essential GTPase in *Escherichia coli*." J Bacteriol 184(19): 5323-5329.

Zhang, Y., Y. Du, et al. (2011). "Redox control of the survival of healthy and diseased cells." Antioxid Redox Signal 15(11): 2867-2908.



Universidad de Granada



ipbln

Instituto de Parasitología y Biomedicina
López-Neyra
Consejo Superior de Investigaciones Científicas