

Тимидинкиназа 1 как потенциальный опухолеассоциированный маркер: структура, функции, активность в нормальных и опухолевых тканях

Н.С. Сергеева^{1,2}, Н.К. Парилова¹, Н.В. Маршуткина¹, И.С. Мейснер²

¹Отделение прогноза эффективности консервативного лечения Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена — филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Минздрава России; Россия, 125284 Москва, 2-й Боткинский проезд, 3;

²ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

Контакты: Наталья Сергеевна Сергеева prognos.06@mail.ru

В обзоре представлены данные о роли тимидинкиназы (ТК) в обеспечении репликации ДНК *de novo* и посредством запасного (*salvage*) пути в норме, а также при активации запасного пути при канцерогенезе. Описаны структура цитоплазматической ТК (ТК-1), называемой также фетальной, регуляция ее уровня и активности в клетках и их изменения на протяжении клеточного цикла. С учетом данных об отсутствии ТК-1 в покоящихся (G_0) клетках она позиционируется в литературе как маркер пролиферирующих клеток, активность которого регистрируется, начиная с поздней G_1 -фазы и достигая максимума в S -фазе, сохраняется в G_2 -фазе и митозе, быстро снижается до неопределяемых значений в ранней G_1 -фазе.

Систематизированы данные об экспрессии ТК-1 (в сопоставлении с Ki-67 и PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*)) в опухолевых тканях (при колоректальном раке, раке молочной железы, шейки матки, легкого, почки, предстательной железы, яичников), а также при некоторых доброкачественных и предопухолевых патологических процессах в сопоставлении с их клинико-диагностическими характеристиками. Представленные данные свидетельствуют о том, что исследования индекса пролиферации по ТК-1 (с антителами к домену HRA-210) целесообразно использовать наряду с Ki-67 и PCNA для более полной оценки пролиферативного статуса злокачественных новообразований, а также предраковых и доброкачественных состояний в целях прогнозирования течения опухолевого процесса и планирования тактики лечения.

Ключевые слова: тимидинкиназа 1 (ТК-1), Ki-67, PCNA, клеточный цикл, канцерогенез

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-1-17-23

The thymidine kinase-1 as a potential tumor marker: structure, function, activity in normal and malignant tissues

N.S. Sergeeva^{1,2}, N.K. Parilova¹, N.V. Marshutina¹, I.S. Meysner²

¹Department of Conservative Treatment Prognosis, P.A. Hertzen Moscow Oncology Research Institute — branch of the National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of Russia; 3 2nd Botkinskiy Proezd, Moscow 125284, Russia;

²N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Ostrovityanova St., Moscow 117997, Russia

In the review the role of the thymidine kinase (TK) to ensure the replication of DNA *de novo* and spare (*salvage the*) way in health and activate alternate ways in carcinogenesis is described. The structure of cytoplasmic TK (TK-1), also called fetal, and the level of regulation of its activity in the cells and their change during the cell cycle is described. Considering the data about the absence of TK-1 in resting (G_0) cells, TK-1 is positioned as a marker of proliferating cells, which activity is recorded from late G_1 phase, peaking in S -phase, it is stored in the G_2 and mitosis, quickly decreasing to undetectable levels in the early G_1 phase.

Data on the expression TK-1 (as compared with Ki-67 and PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*)) in tumor tissues (colorectal, breast, cervical, lung, renal, prostate and ovarian cancer), as well as some benign and precancerous pathological processes in relation to the clinical and diagnostic features of these processes are systemized. These data suggest that the proliferative index studies on TK-1 (antibody to the domain HRA-210) should be used together with Ki-67 and PCNA, for a more complete assessment of the proliferative status of malignant tumors and pre-cancerous and benign conditions, with the aim of prognosis of the tumor process and treatment planning.

Key words: thymidine kinase 1 (TK-1), Ki-67, PCNA, cell cycle, carcinogenesis

Введение

Одним из новых классов опухолеассоциированных маркеров являются так называемые метаболические маркеры, т.е. ферменты, обеспечивающие формирование или поддержание опухолевого фенотипа клеток.

Выделение их в отдельный класс обусловлено тем, что сначала была изучена их функция, а далее получены антитела для их идентификации. Это отличает их от «классических» сывороточных опухолеассоциированных маркеров (углеводного антигена (CA-125),

простатического специфического антигена (ПСА), углеводного антигена (СА-19-9) и др.), которые были идентифицированы иммунологическими методами, а в дальнейшем начато исследование их функций.

Один из таких метаболических опухолеассоциированных маркеров, перспективных для клинического использования, — тимидинкиназа (ТК).

Структура и функции тимидинкиназы 1

Поддержание баланса дезоксирибонуклеотидов (ДРН) в клетках эукариот — необходимое условие для репликации и репарации ДНК. Синтез ДРН осуществляется 2 путями: *de novo* и альтернативным (запасным, *salvage*) [1, 2]. При подготовке к делению в клетке *de novo* начинается синтез ДРН из рибонуклеотидов с участием ферментов рибонуклеотид-редуктазного комплекса [1, 3]. В интенсивно делящихся клетках в условиях энергетического дефицита активируются и реакции запасного пути синтеза с использованием продуктов катаболизма нуклеиновых кислот (реутилизация) [1]. В запасном пути первый этап фосфорилирования дезоксирибонуклеозидов катализируют дезоксирибонуклеозидкиназы [4] с различной субстратной специфичностью: 2 цитозольных — тимидинкиназа-1 (ТК-1) и дезоксицитидинкиназа; и 2 митохондриальных — тимидинкиназа-2 (ТК-2) и дезоксигуанозинкиназа [2]. ТК-1 отличаются узкой специфичностью и регуляция синтеза на уровне транскрипции по механизму индукции и репрессии в разных фазах клеточного цикла [1, 5–7]. Основная функция ТК-1 — фосфорилирование тимидинсодержащего нуклеозида до дезокситимидинмонофосфата, который в дальнейшем фосфорилируется до дезокситимидинтрифосфата, непосредственно участвующего в репликации ДНК [1, 8]. Тимидиловые нуклеотиды специфичны для ДНК, поэтому детекция субстратов, продуктов, а также ферментов в реакциях с их участием является ключевой для обнаружения делящихся клеток. Эксперименты, демонстрирующие проникновение меченого дезокситимидина (H^3 -Tdh) в делящиеся клетки, его дальнейшее фосфорилирование с последующим включением в ДНК, стали одним из важнейших открытий в области клеточной биологии и обеспечили возможность для идентификации делящихся клеток и детекции различных фаз клеточного цикла [9, 10]. С другой стороны, эти эксперименты стали одними из первых по изучению ТК-1 [11–13].

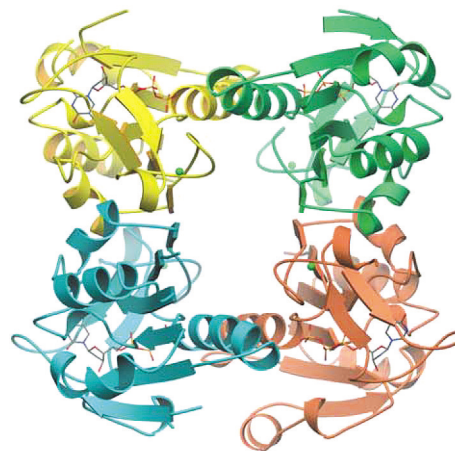
Включение дезокситимидина в метаболизм ДНК описано Р. Reichard и В. Estborn еще в 1951 г., реакция фосфорилирования дезокситимидина — А. Kornberg, I.R. Lehman и E.S. Simms в 1956 г. [9, 10]. В 1958–1960 гг. было доказано, что именно ТК катализирует данную реакцию, и данный фермент был выделен в чистом виде [14–16]. В начале 60-х годов прошлого века изоформы ТК обнаружены у разных видов прокариот и эукариот, а также у некоторых вирусов [17–20]. Изоформы ТК клеток эукариот сегодня категоризируют как цитоплазматиче-

скую (фетальную) форму ТК (ТК-1) [5, 16, 21] и митохондриальную ТК (ТК «взрослых», или ТК-2), экспрессия которой не зависит от клеточного цикла [22, 23].

В середине 70-х годов прошлого века установлена локализация гена *TK-1* в хромосоме 17 в области q21–22, рядом с локусом галактокиназы [24], а позднее локализация была уточнена — 17q25.2–25.3 [25]. В 1980-х гг. прошлого века обнаружено, что наследственная недостаточность галактокиназы сопровождается и недостаточностью ТК-1 [26]. Ген *TK-1* был клонирован [27], и установлена частота его полиморфизмов [28]. В 1986 г. В. Dutrillaux и М. Muleris показали, что при хромосомном дисбалансе увеличивается синтез нуклеотидов по запасному пути, что наблюдается при канцерогенезе [29].

Структура ТК-1 полностью расшифрована. Белок ТК-1 человека имеет молекулярную массу 25,4 кДа и состоит из 234 аминокислотных остатков [2, 30]. В неактивной форме ТК-1 присутствует в тканях в виде димера с молекулярной массой ~ 50 кДа. При активации формируется гомотетрамер с молекулярной массой ~ 100 кДа (см. рисунок) [30–32].

Рекомбинантная форма ТК-1 не способна формировать тетрамер, что подтверждает важность ряда посттрансляционных модификаций этого фермента [2, 33, 34]. Каждая субъединица гомотетрамера ТК-1 состоит из 2 доменов: α/β -домена и цинксодержащего домена. Активный центр фермента находится между 2 этими доменами. По своему строению α/β -домен сходен с аденозинтрифосфатсвязывающим доменом ферментов семейства RecA- F_1 ATPase, которое включает несколько геликаз и «ДНК-восстанавливающих» белков, участвующих в репарации и поддержании стабильной структуры ДНК бактерий. Небольшой цинксодержащий домен ТК-1 состоит из 70–80 аминокислот и формирует длинную лассообразную петлю (аминокислоты Gly₁₆₇–Lys₁₈₀), которая отвечает за связь с тимидином. Домен ХРА-161 в данной петле консервативен у разных видов млекопитающих [35–37]. Пептид Ala₁₆₁–Ser₁₈₃,



Пространственное изображение тимидинкиназы 1 человека. Субъединицы А–D в тетрамере окрашены оранжевым, голубым, желтым и зеленым цветами (адаптировано из [32])

содержащий домен XPA-161, был синтезирован и использован в целях получения поли- и моноклональных антител к ТК-1 (anti-XPA-161) в ходе создания наборов для иммунохимической детекции фермента [38]. Также для получения поли- и моноклональных антител (anti-XPA-210) использовали пептид Gly₁₉₅–Gln₂₂₅, соответствующий домену XPA-210, который представляет собой С-концевой пептид ТК-1. Его аминокислотная последовательность оказалась также видоспецифичной [39]. Таким образом, для идентификации клеток в поздней G₁- и S-фазах цикла, содержащих повышенные уровни ТК-1, используются оба этих типа анти-ТК-1-антител, строго специфичных для ТК-1 человека [39].

Позднее было показано, что основная доля циркулирующей в крови ТК-1 представлена формой с молекулярной массой 730 кДа. Это связано с образованием в сыворотке крови комплекса фермента с белками, что в конечном итоге повышает его стабильность [30, 31].

Регуляция уровня и активности тимидинкиназы 1 в клетке

Исторически ТК-1 относят к группе S-специфических ферментов, активность которых повышается (в 10–20 раз) при вступлении клетки в S-фазу, а после ее завершения активность снижается. Изменение активности обеспечивается 2 регуляторными механизмами, один из которых отвечает за повышение ферментативной активности на протяжении S-фазы, другой обеспечивает down-регуляцию после ее завершения [7].

В 1974 г. установлено, что периодическое повышение и снижение активности фермента в клетках (линия KB) совпадает с началом и окончанием репликации ДНК [5]. Авторами было показано, что скорость синтеза ТК-1 определяется интенсивностью транскрипции кодирующей фермент матричной РНК (мРНК), которая снижается при завершении репликации ДНК [5]. В этой же публикации было уточнено, что завершение синтеза ТК-1 по времени более точно совпадает не с завершением S-фазы, а с началом митоза, т. е. с окончанием G₂-фазы [5].

В 1987 г. D.L. Sorposk и A.B. Pardee на клеточной культуре 3T3 *in vitro* подтвердили, что повышение активности ТК-1 в клетке связано с увеличением уровня ее мРНК [40]. Авторами установлено, что при переходе клетки из G₁-фазы в S-фазу возрастают не только интенсивность транскрипции гена *TK1* (в 2–4 раза) и уровни мРНК ТК-1 (более чем в 20 раз), но и время полураспада ТК-1 (с 8 до 12 ч) [40].

В 1988 г. J.L. Sherley и T.J. Kelly, используя синхронизированные культуры HeLa-клеток, выявили корреляцию количества белка ТК-1 с его активностью на протяжении всех стадий клеточного цикла [7]. При переходе из G₁-фазы в S-фазу возрастали уровень мРНК (~ в 3 раза) и скорость синтеза ТК-1 (~ в 10 раз) и, соответственно, концентрация и активность ТК-1 в клетках быстро увеличивались (~ в 15

раз) в начале S-фазы, достигая своих максимальных уровней в G₂-фазе. Это позволило авторам сделать вывод о том, что активное накопление ТК-1 в клетке на протяжении S-фазы обусловлено в большей степени активацией трансляции с мРНК.

В 2009 г. было подтверждено, что возрастание уровня ТК-1 происходит уже в поздней G₁-фазе клеточного цикла, достигая пика в ранней S-фазе [39], опережая как увеличение уровня Ki-67 (маркера клеточной пролиферации) [41], так и включение BrdU (маркера S-фазы клеточного цикла) в цепь ДНК [39]. Таким образом, установлено, что ТК-1 является уникальным маркером клеток, которые прошли точку рестрикции в G₁-фазе, т. е. надежным маркером пролиферации [39].

Снижение уровня ТК-1 наряду с плавным уменьшением количества мРНК ТК-1 начинается в конце G₂-фазы и продолжается в течение митоза, что обусловлено как специфическим разрушением белка, так и снижением скорости его синтеза [7, 42]. При этом уменьшение активности и количества ТК-1 не предшествует снижению уровня ее мРНК и не превосходит его по степени [42].

Время полураспада белка ТК-1 на протяжении значительной части жизненного цикла клетки остается постоянным, составляя около 40 ч. Однако непосредственно после завершения митоза (в ранней G₁-фазе) за короткий интервал времени стабильность белка резко снижалась (время полураспада < 1 ч), что обеспечивало быстрое освобождение дочерних клеток от этого фермента [7].

В 1991 г. M.G. Kauffman и T.J. Kelly выявили, что внутриклеточная деградация фермента начинается со связывания убиквитина с С-концевым фрагментом фермента (KEN) и завершается в протеасомах [43]. С-концевая делеция участка из 40 аминокислот или присоединение бета-галактозидазы к карбоксильному концу ТК-1 стабилизировало белок на протяжении всего клеточного цикла без изменения специфической ферментной активности [43, 44].

Механизм строгого контроля активности ТК-1 в клетке подчеркивает значимость этого фермента в регуляции внутриклеточного уровня дезокситимидинтрифосфата. В частности, показано, что нарушение протеолиза ТК-1 ассоциировано с повышением частоты генных мутаций в клетках [45, 46]. В экспериментах V.N. Dobrovolsky и соавт. в 2003 г. показано, что нокаут гена ТК-1 у мышей приводит к развитию почечной недостаточности и угнетению иммунной системы, и как следствие, к резкому уменьшению продолжительности жизни животных [47].

Многочисленные исследования подтверждают отсутствие ТК-1 в непродлиферирующих (покоящихся) клетках [5–7, 40, 48].

Совокупность представленных данных позволяет считать ТК-1 важным биологическим маркером клеточной пролиферации.

Экспрессия тимидинкиназы 1 в опухолевых тканях

В 2002 г. в корпорации SSTK Inc (Шэньчжэнь, Китай) были синтезированы поли- и моноклональные антитела к ТК-1. Эта разработка завершилась созданием высокочувствительных серологических и иммуногистохимических тестов для определения уровня ТК-1 в биологических жидкостях и уровня экспрессии ТК-1 в клетках [37, 49, 50].

С учетом того, что ТК-1 проявляет себя как маркер клеточной пролиферации и практически не обнаруживается в неделящихся клетках, исследования по изучению степени ее экспрессии нашли свое применение в области онкологии [53–66]. В этих работах была сопоставлена экспрессия ТК-1 и 2 других широко используемых маркеров клеточной пролиферации (Ki-67 и PCNA (proliferating cell nuclear antigen)) [41] при ряде солидных злокачественных новообразований (колоректальном раке, раке почки, яичников, шейки матки, предстательной и молочной желез), некоторых доброкачественных опухолях и предраковых состояниях, а также в нормальных тканях [53–66].

При иммуногистохимических исследованиях в опухолевых тканях этот фермент в ряде случаев обнаруживался не только в цитоплазме клеток, но и в их ядре, что, по мнению авторов, связано с перераспределением избытка ТК-1 между ядром и цитоплазмой в активно пролиферирующих опухолевых клетках и являлось неблагоприятным прогностическим признаком течения опухолевого процесса [53–55].

При раке молочной железы ТК-1 выявлялась главным образом в цитоплазме клеток и только в отдельных случаях в ядре [49, 51–53]. Проллиферативный индекс данного маркера в опухолевой ткани (доля ТК-1-положительных клеток) превышал значение индекса пролиферации, измеренного по Ki-67 [52, 53] или PCNA [51], и коррелировал со стадией заболевания и степенью злокачественности опухолевых клеток [50–52]. Степень экспрессии ТК-1 возрастала в ряду: простая протоковая гиперплазия < протоковая гиперплазия с атипией < протоковый рак *in situ* < инвазивный протоковый рак [53]. Доля положительных по ТК-1 клеток при простой протоковой гиперплазии молочной железы (без атипии) не превышала 5 %, в то время как в отдельных случаях рака молочной железы достигала 80–90 % [53]. В одном из приведенных выше исследований показано наличие выраженной корреляции Ki-67 с ТК-1 при опухолях молочной железы [53]. В другом отмечено, что накопление ТК-1 в опухолевых клетках более характерно для распространенных опухолевых процессов и высокой степени злокачественности опухолевых клеток, а Ki-67 — для более ранних стадий опухолевого процесса и низких степеней злокачественности опухолевых клеток [52]. Поэтому авторы считают, что сочетанное исследование Ki-67 и ТК-1 при раке молочной железы позволяет более глубоко и адекватно охарактеризовать пролиферативный статус опухоли и спрогнозировать течение опухолевого процесса [52].

При цервикальной интраэпителиальной неоплазии и инвазивном раке шейки матки ТК-1 обнаруживалась как в цитоплазме, так и в ядре клеток [54]. Проллиферативный индекс, оцененный по ТК-1 в обеих группах, оказался выше, чем по Ki-67. При этом оба этих показателя коррелировали со стадией опухолевого процесса. Степень экспрессии ТК-1 в ядре клеток служила важным прогностическим признаком течения заболевания как при раке *in situ*, так и при инвазивных формах рака шейки матки, а при распространенных формах позволяла идентифицировать больных с благоприятным прогнозом [54].

При раке яичников накопление ТК-1 отмечалось в цитоплазме опухолевых клеток. Проллиферативный индекс по этому маркеру был несколько ниже, чем по Ki-67. Экспрессия ТК-1, как и Ki-67, коррелировала со стадией, степенью злокачественности, размером опухоли, временем безрецидивного течения и 10-летней выживаемостью пациентов. При распространенных стадиях опухолевого процесса низкая экспрессия ТК-1 была ассоциирована с лучшими показателями выживаемости больных [49, 55].

Проллиферативный индекс, оцененный по ТК-1 при аденокарциномах легкого, оказался почти в 2 раза выше, чем индекс, оцененный по Ki-67 (68 % против 36 %), а при плоскоклеточном раке легкого они значимо не различались, превышая у большинства больных 50 %. Высокая степень экспрессии ТК-1 (индекс пролиферации > 25 %) при аденокарциномах коррелировала не только с наличием лимфо-/гематогенной диссеминации, но и с высокой степенью стромальной инвазии и большими размерами первичного опухолевого узла, а также со стадией опухолевого процесса [56–58] и была сопряжена с низкой вероятностью 5-летней выживаемости больных [57, 58].

Экспрессия ТК-1 и PCNA при колоректальном раке не различалась. Проллиферативный индекс, оцененный по обоим маркерам, коррелировал со стадией заболевания, а по ТК-1 и со степенью злокачественности опухолевых клеток [59]. Степень экспрессии как ТК-1, так и PCNA при аденомах кишки была ниже, чем при колоректальном раке [59]. При аденоматозных полипах более 2 см с широким основанием степень экспрессии ТК-1 оказалась выше, чем при полипах на «тонкой» ножке. В нормальном эпителии толстой кишки уровень экспрессии ТК-1 не превосходил нескольких процентов [49, 59, 60].

Экспрессия ТК-1 при раке почки зависела от гистологического типа опухоли [49, 61–63]. Так, при светлоклеточном раке почки G. Gakis и соавт. [59] отмечали наличие высокой доли интенсивно окрашенных антителами к ХРА-210 опухолевых клеток, причем в ядрах экспрессия ХРА-210 была выше, чем в цитоплазме. В отличие от результатов, описанных для новообразований других локализаций, между размером опухоли и экспрессией ХРА-210 при раке почки выявлена обратная корреляция: пролиферативный

индекс маркера был выше при размерах опухоли < 7 см по сравнению с более крупными опухолями. Авторы объясняют это ухудшением трофики больших по размеру опухолей [49, 61]. Опухолевые клетки из «не-костных» метастазов светлоклеточного рака почки отличались высокой ядерной экспрессией ХРА-210, а в клетках костных метастазов экспрессия данного антигена не обнаруживалась [61]. S. Kruck и соавт. выявили высокую экспрессию ХРА-210 при светлоклеточном и папиллярном типах почечно-клеточного рака; экспрессия маркера при хромофобном раке почки не отличалась от таковой в здоровой ткани почки. Установлена корреляция степени экспрессии ХРА-210 со стадией процесса, а также со степенью злокачественности опухолевой ткани почечно-клеточного рака [62]. Р. Luo и соавт. установили, что содержание ТК-1 в опухолевых клетках почки ниже, чем в нормальных клетках почечных канальцев, и выше, чем в клетках гломерулярного аппарата и промежуточной соединительной ткани здоровой почки [63].

При раке мочевого пузыря ТК-1 обнаруживалась главным образом в цитоплазме клеток. Степень экспрессии маркера при инвазивном раке мочевого пузыря была во много раз выше, чем в здоровой ткани. В норме экспрессия ТК-1 выявлена в основном в клетках базального слоя уротелия мочевого пузыря [64].

В здоровой ткани предстательной железы и в участках доброкачественной гиперплазии экспрессия ТК-1

не определялась [65]. При интраэпителиальной неоплазии отмечался сравнительно невысокий уровень экспрессии ТК-1 (индекс пролиферации $\sim 17\%$), а у больных раком предстательной железы пролиферативный индекс по данному маркеру составлял в среднем около 57% , что несколько превышало значение, установленное по Ki-67 ($\sim 47\%$) [65]. При исследовании экспрессии ХРА-210 установлено, что интенсивность окрашивания клеток коррелировала со стадией опухолевого процесса и оценкой злокачественности по шкале Глисона. Кроме того, высокий уровень экспрессии ХРА-210 коррелировал с коротким временем как до развития биохимического рецидива заболевания, так и до визуализации метастазов [66].

Заключение

Таким образом, в соответствии с результатами ряда исследований ТК-1 позиционируется как маркер пролиферирующих клеток, степень экспрессии которого коррелирует со стадией процесса и морфологической злокачественностью опухолевой ткани. Исследования индекса пролиферации по ТК-1 (с антителами к домену ХРА-210) целесообразно использовать наряду с Ki-67 и PCNA для более полной оценки пролиферативного статуса злокачественных новообразований, а также предраковых и доброкачественных состояний в целях прогнозирования течения опухолевого процесса и планирования тактики лечения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Силаева С.А. Раздел 10. Обмен нуклеотидов. В кн.: Биохимия. Учебник для вузов. Под ред. Е.С. Северина, 2003. 779 с. С. 521–44. [Silava S.A. Section 10. Nucleotide metabolism. In: Biochemistry. University textbook. Ed. by E.S. Severin, 2003. 779 p. Pp. 521–44. (In Russ.)].
2. Welin M., Kosinska U., Mikkelsen N.-E. et al. Structures of thymidine kinase 1 of human and mycoplasma origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(52): 17970–5.
3. Jordan A., Reichard P. Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem* 1998;67:71–98.
4. Arner E.S., Eriksson S. Mammalian deoxyribonucleoside kinases. *Pharmacol Ther* 1995;67(2):155–86. DOI: 10.1016/0163-7258(95)00015-9.
5. Bello L.J. Regulation of thymidine kinase synthesis in human cells. *Exp Cell Res* 1974;89(2):263–74.
6. Munch-Petersen B., Tyrsted G. Induction of thymidine kinases in phytohaemagglutinin-stimulated human lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 1977;478(3): 364–75.
7. Sherley J.L., Kelly T.J. Regulation of human thymidine kinase during the cell cycle. *J Biol Chem* 1988;263(17):8350–8.
8. Segura-Pena D., Lichter J., Trani M. et al. Quaternary structure change as a mechanism for the regulation of thymidine kinase 1-like enzymes. *Structure* 2007;15(12):1555–66. DOI: 10.1016/j.str.2007.09.025. PMID: 18073106.
9. Kornberg A., Lehman I.R., Simms E.S. Polydeoxyribosides in the synthesis of polynucleotides. *Fed Proc* 1956;15: 291–2.
10. Reichard P., Estborn B. Utilization of desoxyribosides in the synthesis of polynucleotides. *J Biol Chem* 1951;188(2):839–46. PMID: 14824173.
11. Mathews C.K. Enzymatic channeling of DNA precursors. *Basic Life Sci* 1985;31:47–66.
12. Leeds J.M., Mathews C.K. Cell cycle-dependent effects on deoxyribonucleotide and DNA labeling by nucleoside precursors in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1987;7(1):532–4.
13. Nicander B., Reichard P. Dynamics of pyrimidine deoxynucleoside triphosphate pools in relationship to DNA synthesis in 3T6 mouse fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80(5): 1347–51.
14. Bollum F.J., Van Potter R. Incorporation of thymidine into deoxyribonucleic acid by enzymes from rat tissues. *J Biol Chem* 1958;233:478–82.
15. Bollum F.J., Van Potter R. Nucleic acid metabolism in regenerating rat liver. Soluble enzymes which convert thymidine to thymidine phosphates and DNA. *Cancer Res* 1959;19:561–5.
16. Weissman S.M., Smellie R.M., Paul J. Studies on the biosynthesis of deoxyribonucleic acid by extracts of mammalian cells. IV. The phosphorylation of thymidine. *Biochim Biophys Acta* 1960;45:101–10.
17. Okazaki R., Kornberg A. Deoxythymidine kinase of *Escherichia coli*. I. Purification and some properties of the enzyme. *J Biol Chem* 1964;239:269–74.
18. Hotta Y., Stern H. Molecular facets of mitotic regulation I. Synthesis of thymidine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1963;49(5):648–54.
19. Chello P.L., Jaffe J.J. Comparative properties of trypanosomal and mammalian thymidine kinases. *Comp Biochem Physiol* 1972;43(3):543–62.

20. Kit S., Dubbs D.R. Acquisition of thymidine kinase activity by *Herpes simplex* infected mouse fibroblast cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1963;11:55–9.
21. Littlefield J.W. The periodic synthesis of thymidine kinase in mouse fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1966;114(2): 398–403.
22. Berk A.J., Clayton D.A. A genetically distinct thymidine kinase in mammalian mitochondria. Exclusive labeling of mitochondrial deoxyribonucleic acid. *J Biol Chem* 1973;248(8):2722–9.
23. Berk A.J., Meyer B.J., Clayton D.A. Mitochondrial-specific thymidine kinase. *Arch Biochem Biophys* 1973;154(2): 563–5.
24. Elsevier S.M., Kucherlapati R.S., Nichols E.A. et al. Assignment of the gene for galactokinase to human chromosome 17 and its regional localisation to band q21–22. *Nature* 1974;251(5476):633–6.
25. Kuo W.L., Hirschhorn R., Huie M.L., Hirschhorn K. Localization and ordering of acid alpha-glucosidase (GAA) and thymidine kinase (TK1) by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 1996;97(3):404–6.
26. Schoen R.C., Cox S.H., Wagner R.P. Thymidine-kinase activity of cultured cells from individuals with inherited galactokinase deficiency. *Am J Hum Genet* 1984;36(4):815–22.
27. Bradshaw H.D. Jr, Deininger P.L. Human thymidine kinase gene: molecular cloning and nucleotide sequence of a cDNA expressible in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1984;4(11):2316–20.
28. Murphy P.D., Kidd J.R., Castiglione C.M. et al. A frequent polymorphism for the cytosolic thymidine kinase gene, TK1, (17q21–q22) detected by the enzyme TaqI. *Nucleic Acids Res* 1986;14(10):4381.
29. Dutrillaux B., Muleris M. Induction of increased salvage pathways of nucleotide synthesis by dosage effect due to chromosome imbalances may be fundamental in carcinogenesis: the example of colorectal carcinoma. *Ann Genet* 1986;29(1):11–5.
30. Hanan S., Jagarlamudi K.K., Liya W. et al. Quaternary structures of recombinant, cellular, and serum forms of thymidine kinase 1 from dogs and humans. *BMC Biochem* 2012;13:12. DOI: 10.1186/1471-2091-13-12. PMID: 22741536.
31. Karlström A.R., Neumüller M., Gronowitz J.S., Källander C.F. Molecular forms in human serum of enzymes synthesizing DNA precursors and DNA. *Mol Cell Biochem* 1990;92(1):23–35.
32. Birringer M.S., Claus M.T., Folkers G. et al. Structure of a type II thymidine kinase with bound dTTP. *FEBS Lett* 2005;579(6):1376–82. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.01.034.
33. Munch-Petersen B., Cloos L., Jensen H.K., Tyrsted G. Human thymidine kinase 1. Regulation in normal and malignant cells. *Adv Enzyme Regul* 1995;35:69–89.
34. Li C.L., Lu C.Y., Ke P.Y., Chang Z.F. 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* 2004;313(3):587–93.
35. He Q., Wang N., Skog S. et al. Characterization of a peptide antibody against a C-terminal part of human and mouse cytosolic thymidine kinase, which is a marker for cell proliferation. *Eur J Cell Biol* 1996;70(2):117–24.
36. Wang N., He Q., Skog S. et al. Investigation on cell proliferation with new antibody against thymidine kinase 1. *Anal Cell Pathol* 2001;23(1):11–9.
37. Wu C., Yang R., Zhou J. et al. Production and characterisation of a novel chicken IgY antibody raised against C-terminal peptide from human thymidine kinase 1. *J Immunol Methods* 2003;277(1–2): 157–69.
38. Eriksson S. New exposed proliferation related peptide, ligands and methods employing the same. PCT application WO 2008:142664.
39. Gasparri F., Wang N., Skog S. et al. Thymidine kinase 1 expression defines as activated G1 state of cell cycle as revealed with site-specific antibodies and ArrayScan assays. *Eur J Cell Biol* 2009;88(12):779–85.
40. Coppock D.L., Pardee A.B. Control of thymidine kinase mRNA during the cell cycle. *Mol Cell Biol* 1987;7(8):2925–32.
41. Gerdes J., Schwab U., Lemke H., Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983;31(1):13–20.
42. Gross M.K., Kainz M.S., Merrill G.F. The chicken thymidine kinase gene is transcriptionally repressed during terminal differentiation: the associated decline in TK mRNA cannot account fully for the disappearance of TK enzyme activity. *Dev Biol* 1987;122(2):439–51.
43. Kauffman M.G., Kelly T.J. Cell cycle regulation of thymidine kinase: residues near the carboxyl terminus are essential for the specific degradation of the enzyme at mitosis. *Mol Cell Biol* 1991;11(5):2538–46.
44. Sutterluety H., Bartl S., Karlseder J. et al. Carboxy-terminal residues of mouse thymidine kinase are essential for rapid degradation in quiescent cells. *J Mol Biol* 1996;259(3):383–92.
45. Hu C.M., Chang Z.F. Mitotic control of dTTP pool: a necessity or coincidence? *J Biomed Sci* 2007;14(4):491–7.
46. Ke P.Y., Kuo Y.Y., Hu C.M., Chang Z.F. Control of dTTP pool size by anaphase promoting complex/cyclosome is essential for the maintenance of genetic stability. *Genes Dev* 2005;19(16):1920–33.
47. Dobrovolsky V.N., Bucci T., Heflich R.H. et al. Mice deficient for cytosolic thymidine kinase gene develop fatal kidney disease. *Mol Genet Metab* 2003;78(1):1–10.
48. Ke P.Y., Chang Z.F. Mitotic degradation of human thymidine kinase 1 is dependent on the anaphase-promoting complex/cyclosome-CDH1-mediated pathway. *Mol Cell Biol* 2004;24(2):514–26.
49. Zhou J., He E., Skog S. The proliferation marker thymidine kinase 1 in clinical use. *Mol Clin Oncol* 2013;1(1):18–28.
50. Kuroiwa N., Nakayama M., Fukuda T. et al. Specific recognition of cytosolic thymidine kinase in the human lung tumor by monoclonal antibodies raised against recombinant human thymidine kinase. *J Immunol Methods* 2001;253(1–2):1–11.
51. Mao Y., Wu J., Wang N. et al. A comparative study: immunohistochemical detection of cytosolic thymidine kinase and proliferating cell nuclear antigen in breast cancer. *Cancer Invest* 2002;20(7–8): 922–31.
52. He Q., Mao Y., Wu J. et al. Cytosolic thymidine kinase is a specific histopathologic tumour marker for breast carcinomas. *Int J Oncol* 2004;25(4):945–53.
53. Guan H., Sun Y., Zan Q. et al. Thymidine kinase 1 expression in atypical ductal hyperplasia significantly differs from usual ductal hyperplasia and ductal carcinoma in situ: A useful tool in tumor therapy management. *Mol Med Rep* 2009;2(6):923–9. DOI: 10.3892/mmr_00000193.
54. Chen G., He C., Li L. et al. Nuclear TK1 expression is an independent prognostic factor for survival in pre-malignant and malignant lesions of the cervix. *BMC Cancer* 2013;13:249. DOI: 10.1186/1471-2407-13-249.
55. Liu C., Gao Q., Shi Q.L. et al. Significance of TK1 and Ki-67 expression in ovarian serous adenocarcinoma. *J Clin Exp Pathol* 2011;27:1289–93.
56. Mao Y., Wu J., Skog S. et al. Expression of cell proliferating genes in patients with non-small cell lung cancer by immunohistochemistry and cDNA profiling. *Oncol Rep* 2005;13(5): 837–46.
57. Xu Y., Liu B., Shi Q.L. et al. Thymidine kinase 1 is a better prognostic marker than Ki-67 for pT1 adenocarcinoma of the lung. *Int J Clin Exp Med* 2014;7(8):2120–8.
58. Xu Y., Shi Q.L., Ma H. et al. High thymidine kinase 1 (TK1) expression is a predictor of poor survival in patients with pT1 of lung adenocarcinoma. *Tumour Biol* 2012;33(2):475–83. DOI: 10.1007/s13277-011-0276-0.
59. Wu J., Mao Y., He L. et al. A new cell proliferating marker: cytosolic thymidine kinase as compared to proliferating cell nuclear antigen in patients with colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 2000;20(6C):4815–20.

60. Wei J.W., Xu C.R., Zen D.Z., Chen Y. Analysis on the content of TK1 of patients with colonic polyps. *Lab Med Clin* 2011;8:769.
61. Gakis G., Hennenlotter J., Scharpf M. et al. XPA210: a new proliferation marker to characterize tumor biology and progression of renal cell carcinoma. *World J Urol* 2011;29(6):801–6. DOI: 10.1007/s00345-010-0621-8.
62. Kruck S., Hennenlotter J., Vogel U. et al. Exposed proliferation antigen 210 (XPA-210) in renal cell carcinoma (RCC) and oncocytoma: clinical utility and biological implications. *BJU Int* 2012;109(4):634–8. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2011.10392.x.
63. Luo P., Wang N., He E. et al. The proliferation marker thymidine kinase 1 level is high in normal kidney tubule cells compared to other normal and malignant renal cells. *Pathol Oncol Res* 2010;16(2):277–83. DOI: 10.1007/s12253-009-9222-5.
64. Rausch S., Hennenlotter J., Teepe K. et al. Muscle-invasive bladder cancer is characterized by overexpression of thymidine kinase 1. *Urol Oncol* 2015;33(10):426.e21–9. DOI: 10.1016/j.urolonc.2015.06.007.
65. Ye F.P., Xie Q.L., Liu X.L. et al. Expression of TK1 and Ki67 in prostate diseases. *J Clin Exp Pathol* 2008;24:644–67.
66. Aufderklamm S., Hennenlotter J., Todenhoefer T. et al. XPA-210: a new proliferation marker determines locally advanced prostate cancer and is a predictor of biochemical recurrence. *World J Urol* 2012;30(4):547–52. DOI: 10.1007/s00345-011-0768-y.