

PYRIMIDINNUKLEOSIDMONOFOSFÁTKINASY

ROMANA KREJČOVÁ a KVĚTA HORSKÁ

Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6

Došlo dne 9.I.1997

Obsah

1. Úvod
2. 2'-Deoxythymidylátkinasy
 - 2.1. Obecné vlastnosti
 - 2.2. Virové dTMP-kinasy
 - 2.3. Inhibice dTMP-kinasy
3. UMP-CMP-kinasy
 - 3.1. Uridylátkinasa ze *Saccharomyces cerevisiae*
 - 3.2. UMP-CMP-kinasa z *Dictyostelium discoideum*
 - 3.3. Uridylátkinasa z *Escherichia coli*
4. Závěr

1. Úvod

Nukleosidmonofosfátkinasy představují všudypřítomnou skupinu enzymů, které mají klíčové uplatnění v buněčném metabolismu, včetně syntézy DNA a RNA. Katalyzují reverzibilní přenos fosfátové skupiny z NTP (nejčastěji ATP) na NMP dle schématu: $MgN_1TP + N_2MP \rightleftharpoons MgN_1DP + N_2DP$. Obecné vlastnosti těchto enzymů jsou shrnuty v přehledném článku o adenylátkinase¹, která v současné době představuje nejlépe prostudovanou nukleosidmonofosfátkinasu vůbec². Podle povahy heterocyklické báze akceptoru fosfátové skupiny dělíme nukleosidmonofosfátkinasy na purinové a pyrimidinové. Pyrimidin-nukleosidmonofosfátkinasy se vyskytují v savčích buňkách jako dva odlišné enzymy. Zatímco první z nich (EC 2.7.4.9) fosforyluje dTMP a dUMP (cit. 3,4), druhý enzym (EC 2.7.4.14) vykazuje širokou substrátovou specifitu^{5,7}, fosforyluje UMP, CMP, dCMP a zcela vyjimečně dUMP. Vzhledem k tomu, že substráty pro pyrimidinové nukleosid-5'-fosfátkinasy *in vivo* vznikají jak *de novo*, tak při metabo-

lických procesech vedoucích k reutilizaci prekurzorů, jsou tyto enzymy nezbytné pro biosyntézu pyrimidinových nukleotidů. Jejich relativně široká substrátová specifita nachází využití i při chemoterapii rakoviny. Fosforylují např. 5'-fosfáty dvou pyrimidinových analogů, 1-(3-D-arabinofuranosyl)cytosinu a 5-fluorouracilu, známých jako kancerostatika^{5,7}; právě fosforylace těchto látek je nutným předpokladem pro jejich metabolickou konverzi na farmakologicky aktivní formy.

Pyrimidin-nukleosidmonofosfátkinasy (pyrimidin-nukleosid-5'-fosfátkinasy PNP-kinasy, PK) jsou zdaleka méně prostudovány ve srovnání s purinovými a to proto, že relativně dlouho nebyla popsána efektivní a selektivní izolační metoda. V roce 1985 Seagrave a Reyes⁸ popsali vysoce účinný postup, využívající afinitní chromatografie, pro izolaci pyrimidin-nukleosidmonofosfátkinasy z buněk kostní dřeně krys.

Zásadním převratem pro izolaci a studium těchto enzymů byla identifikace a izolace jejich genů a následná příprava příslušných cDNA (cit. 9-14). Řada pyrimidin-nukleosidmonofosfátkinasy byla připravena v krystalickém stavu^{9-15,17}, což umožnilo studium terciární struktury a její porovnání se strukturou adenylátkinasy (AMP-kinasy) a guanylátkinasy (GMP-kinasy) (cit. 1,2,18). Přesto ve srovnání s purin-nukleosidmonofosfátkinasy není jejich studium zdaleka tak systematické¹²⁻¹⁸. To se týká především typu enzymů známých v literatuře pod názvem UMP-CMP-kinasy. Dosud neexistuje o žádné pyrimidin-nukleosidmonofosfátkinase ucelená studie srovnatelná s AMP- nebo GMP-kinasou.

2. 2'-Deoxythymidylátkinasy

2'-Deoxythymidylátkinasy (ATP:dTMP-fosfotransferasy, dále dTMP-kinasy, EC 2.7.4.9) se účastní syntézy dTTP, a proto mají klíčový význam pro biosyntézu DNA. Fosforylují dTMP, vznikající *de novo* nebo jako produkt katabolismu prostřednictvím zachraňujících mechanismů¹⁹, na dTDP. Právě intracelulární koncentrace dTDP je s nejvyšší pravděpodobností faktorem, který limituje syntézu dTTP (cit. 20). 2'-Deoxythymidin-5'-trifosfát je sou-

časně zpětnovazebným inhibítorem dTMP-kinas²¹, které se tak výrazně uplatňují při regulaci úrovně buněčné proliferace^{3,20-22}. Aktivita dTMP-kinas je obtížně detegovatelná v neproliferujících tkáních²³⁻²⁴ (např. játra dospělých krys nebo myši); naopak v rychle rostoucích tkáních (např. embryonální tkáň, leukocyty, neoplastické tkáň) byly aktivity enzymů podstatně zvýšeny²³⁻²⁶. Příkladem může být dTMP-kinasa izolovaná z kuřecích jater²⁰. Maximální aktivita enzymu nalezená v raných stádiích vývoje (2-10 denní embryo), klesne na pětinu mezi 16.-21. dnem embryonálního vývoje. V jaterních tkáních dospělých kuřat byla zjištěna již jen nepatrná hladina dTMP-kinasy²⁰.

Postupně byly objeveny dTMP-kinasy kódované bakteriálním²⁷, eukaryotním^{3,21} i virovým²⁸ genomem. Částečně vyčištěné enzymy byly připraveny z bakteriálních, rostlinných a savčích zdrojů (*E. coli*^{29,30}, myší fibroblasty L60TM (cit. 31), telecí thymus⁶, myší embryonální fibroblasty L929 (cit. 32), krysí regenerující játra³², EAT buňky³², Landschutzovy ascity³³, ascity myšího Sarkomu 180 (cit. 34), leukemie^{32,34}, kuřecí játra²⁰, *Acetabularia mediterranea*³⁵). Extrémní nestabilita a minoritní obsah byly po dlouhou dobu hlavní překážkou izolace homogenních dTMP-kinas ze savčích tkání a buněk³⁶. Podstatným přínosem pro izolační postupy bylo zjištění, že aktivitu dTMP-kinas stabilizuje dTMP (v menší míře i dTDP a dTTP) v přítomnosti merkaptoethanolu³⁷. V téměř homogenní formě byly izolovány dTMP-kinasy z *E. coli*²⁷, myšího hepatomu³⁶, kvasinek²¹, lidských leukemických buněk³ a lidské placenty³⁸. Kvalitativní zvrát pro izolační postupy, stejně jako u AMP- a GMP-kinas, znamenalo až využití genového inženýrství; cDNA virových a savčích dTMP-kinas byly klonovány do *E. coli*³⁹ a *S. cerevisiae* CDC8 mutantu¹⁹ (deficientním na dTMP-kinasu, gen CDC8 (cit. 40,41)). Funkční enzymový preparát byl připraven expresí lidského genu (lidské Hep G2 buňky) v kvasinkách¹⁹. dTMP-kinasy byly nalezeny ve spojené nukleární a cytoplazmatické frakci, ale ne v mitochondriální²¹. U *A. mediterranea* je tento enzym lokalizován v chloroplastech^{35,42}.

2.1. Obecné vlastnosti

Relativní molekulová hmotnost lidské dTMP-kinasy (lidské Hep G2 buňky) vypočtená z příslušné cDNA, obsahující kódující oblast 633 nukleotidů, je 24 000 (cit. 19). Tato hodnota se shoduje s hodnotou relativní molekulové hmotnosti dTMP-kinasy z lidské placenty³⁸, která byla určena elektroforézou za denaturujících podmínek. Podstatně vyšší relativní molekulovou hmotnost 50 000 našli

Lu a Cheng³ u enzymu z lidských leukemických buněk. Proto se předpokládá, že lidská dTMP-kinasa tvoří *in vivo* dimer složený ze dvou identických podjednotek¹⁹. Relativní molekulová hmotnost dTMP-kinas izolovaných klasickým způsobem z různých tkání a buněk se pohybuje v rozmezí 25 000-65 000. Některé hodnoty však byly stanoveny bez ohledu na podjednotkové složení enzymů^{20,27,34,36,40}.

2'-Deoxythymidylátkinasy jsou stabilní v širokém rozmezí pH (pH ~ 6-9) s optimem pH - 7 (cit. 3,21,36,43), podmínkou jejich stability je saturace substráty dTMP a ATP(Mg²⁺). Stejně jako ostatní nukleosidmonofosfátkinasy nejvyšší aktivitu vykazují v přítomnosti hořčičných iontů. Poměr ekvivalentů Mg²⁺ a ATP v komplexu ATP(Mg²⁺) je variabilní v závislosti na zdroji enzymu^{3,27,34,36}.

Charakteristickým znakem purifikovaných dTMP-kinas je vysoký stupeň substrátové specifity vzhledem k akceptoru fosfátu^{3,20-21,36}; hodnoty K_m pro dTMP-kinasy z různých zdrojů se liší dokonce i o několik řádů^{3,20,21,27,34,36,39}. V případě enzymů kvasinek a *E. coli*²⁷ byla pozorována též fosforylace dUMP a jeho strukturálního analogu 5-jodo-dUMP, ale pouze s účinností 31 % (u kvasinek) a 15 % resp. 60 % (u *E. coli*) ve srovnání s dTMP (cit. 21,27). Bessman a Bello⁴⁴ popsali dTMP-kinasu z fága T2, kterou oddělili od bakteriálního enzymu. Tento enzym katalyzuje fosforylaci dGMP se stejnou afinitou jako dTMP. Vůči nukleosid-5'-trifosfátům mají dTMP-kinasy podstatně širší substrátovou specifitu. Nejlepšími donory fosfátu je ATP a dATP, ale některé 2'-deoxythymidylátkinasy využívají i CTP, dCTP, GTP a dGTP (cit. 3,21,27). Obecně lze říci, že purinové nukleosid-5'-trifosfáty jsou účinnějšími donory fosfátu než pyrimidinové a i v tomto ohledu se bakteriální a kvasinková dTMP-kinasa jeví méně specifická^{21,27} než enzymy ze savčích zdrojů.

Klonovaná nukleotidová sekvence lidské cDNA kóduje protein o relativní molekulové hmotnosti 24 000, který vykazuje významnou homologii (42 %) s dTMP-kinasami z kvasinek a z viru vakcinie¹⁹. Srovnáním aminokyselinových sekvencí těchto tří enzymů byly nalezeny oblasti homologie, které mohou být významné pro vazbu substrátů a katalytickou funkci proteinů¹⁹.

2.2. Virové dTMP-kinasy

K nejlépe prostudovaným virem kódovaným dTMP-kinasám patří enzym vakcinia viru^{28,39}. Virus vakcinie je velký DNA virus, který se replikuje v cytosolu infikované

buňky a nemůže proto přímo využít jaderné enzymy hostitelské buňky pro transkripci nebo DNA syntézu³⁹. Genom vakcinia viru obsahuje otevřený čtecí rámeček („open reading frame“, ORF), který je transkribován v raném stadiu infekce³⁹. Tento gen (SalF 13R) kóduje polypeptid s 204 aminokyselinami²⁸ o relativní molekulové hmotnosti 23 200. Expresí vakcinia ORF v CDC8 mutantu *S. cerevisiae* byla potvrzena funkční slučitelnost virové a kvasinkové 2'-deoxythymidylátkinasy³⁹. Gen kódující dTMP-kinasu není esenciální pro replikaci vakcinia viru v kultivovaných buňkách³⁹ (*in vitro*), a proto může být užitečným místem pro inzerci cizí DNA a též činitelem virové patogenity²⁸ (*in vivo*). Přítomnost 2'-deoxythymidylátové aktivity byla popsána též u HSV-1 (cit. 22,45,46). Genom HSV-1 kóduje 2'-deoxythymidinkinasy^{22,46} (dTho-kinasa), která je pro svůj mnohofunkční charakter označována termínem thymidinkinasy⁴³; tento komplex vykazuje mimo jiné též 2'-deoxythymidylátovou aktivitu. dTho-kinasa HSV-1 se skládá ze dvou identických podjednotek⁴⁷, které mají relativní molekulovou hmotnost 38 000, 39 000 nebo 43 000. Homologie mezi tímto HSV-1 enzymem s dTMP-kinasovou aktivitou a buněčnými dTMP-kinasami je malá nebo žádná^{19,28}. Z podrobných studií struktury HSV-1 dTho-kinasy se předpokládá, že rozhodující oblastí pro její 2'-deoxythymidylátkinasovou aktivitu jsou pravděpodobně aminokyselinové zbytky v poloze 38-45 (cit. 48).

2.3. Inhibice dTMP-kinas

Většina dTMP-kinas je kompetitivně inhibována 2'-deoxythymidin-5'-difosfátem a 2'-deoxythymidin-5'-trifosfátem (zpětnovazebná inhibice) (cit. 3,19-21,27,34,38). U kvasinkové dTMP-kinasy²¹ klesá inhibiční efekt nukleotidů a thymidinu v řadě: dTDP > thymidin > 5-jodo-dUMP > ADP > dADP > dUMP > dTTP > dUDP. U enzymu z kuřecích jater²⁰ a myšího hepatomu³⁶ byla pozorována nekompetitivní inhibice produktem reakce ADP. Jedná se patrně o smíšenou inhibici, při které vazba ADP na enzym brání disociaci produktů z komplexu s enzymem a současně brání vazbě ATP na enzym²⁰⁻³⁶. dTMP-kinasa z periferních blastů je silně inhibována P¹,P⁵-(adenosin-5')-(deoxythymidin-5')-pentafofosfátem (Ap₅dT) a P¹,P⁶-(adenosin-5')-(deoxythymidin-5')-hexafofosfátem (Ap₆dT) (cit. 49); kinetická data ve srovnání s AMP-kinasou z králíčího svalu jsou uvedena v tabulce I. Některé 5'-substituované deriváty inhibují enzym z buněk myšího Sarkomu 180 (cit. 34). Inhibiční účinnost těchto struktur klesá v řadě: -Cl > -(pyro)trifosfát > -(pyro)difosfát > -CO₂H > -I=OH > -NH₂.

Dále byla popsána specifická inhibice 2'-deoxythymidylátkinasy z buněk Ehrlichova ascitu (EAT-buňky) 2',5'-dideoxy-5'-fluorothymidinem⁵⁰. V HeLa buňkách inhibuje dTMP-kinasu 2',5'-dideoxythymidin⁵¹. Nukleosidové analogy 2',5'-dideoxy-5-fluorothymidin a 2',5'-dideoxythymidin by mohly být využity v chemoterapii⁵¹ za předpokladu, že jejich inhibiční účinky budou využitelné *in vivo*.

Tabulka I
Inhibice 2'-deoxythymidylátkinasy^a

Enzym	Substrát	K _m [mmol.l ⁻¹]	Inhibitor	K _i [μmol.l ⁻¹]	Typ inhibice
dTMP-kinasa	ATP	0,25	Ap4dT	20,9	kompetitivní
	dTMP	0,04	Ap4dT	17,5	kompetitivní
	ATP	0,25	Ap5dT	0,60	kompetitivní
	dTMP	0,04	Ap5dT	0,47	kompetitivní
	ATP	0,25	Ap6dT	0,20	kompetitivní
	dTMP	0,04	Ap6dT	0,18	kompetitivní
AMP-kinasa	ATP	0,10	Ap6A	1,67	kompetitivní
	AMP	0,60	Ap6A	0,38	kompetitivní

^a Bone a spol.⁴⁹

3'-Azido-2',3'-dideoxythymidin-5'-trifosfát je účinným inhibitorem HIV-1 reverzní transkriptasy *in vitro*⁵². Fosforylaci 3'-azido-2',3'-dideoxythymidin-5'-fosfátu (substrát/inhibitor dTMP-kinasy) do druhého stupně katalyzuje dTMP-kinasa hostitelské buňky⁵³.

3. UMP-CMP-kinasy

Jde o skupinu nukleosidmonofosfátkinas (ATP:UMP-CMP-fosfotransferasy, UMP-kinasy, dále UK, EC 2.7.4.14) se širokou substrátovou specifitou, která se odráží v jejich naprosto nesystematickém názvosloví uváděném různými autory. Do devadesátých let byly základní poznatky o UMP-CMP-kinasách získány pouze s částečně vyčištěnými enzymovými preparáty z řady tkání (*Mycoplasma mycoides*⁵⁴, *Tetrahymena pyriformis*⁵⁵⁻⁵⁷, *S. cerevisiae*^{58,59}, telecího thymu⁶, krysích jater^{5-60,63}, lidských erythrocytů⁶⁴⁻⁶⁹, ascitů Novikoffova hepatomu⁶¹, Yoshidova sarkomu⁶³, CEM-lymfoblastoidních buněk⁷). Výjimku představují pyrimidinukleosidmonofosfátkinasy z buněk kostní dřevě krys^{8-70,71}, připravené v homogenní for-

Tabulka II

Srovnání hydrofobní „leader“ sekvence kvasinkové UMP-kinasy (UK) a primární struktury N-konců AMP-kinas (AK) z různých zdrojů^a

Zdroj	Kinasa	N-koncová sekvence ^b
Kvasinky	UKy	Met Thr Ala Ala Thr Thr Ser Gln Pro Ala Phe Ser Pro <u>Asp</u> Gln Val Ser Val Ileu Phe
Vepř	AK1	Met <u>Glu</u> <u>Glu</u> <u>Lys</u> Leu <u>Lys</u> <u>Lys</u> Ser <u>Lys</u> Ileu Ileu Phe
Králík	AK1	Met <u>Glu</u> <u>Glu</u> <u>Lys</u> Leu <u>Lys</u> <u>Lys</u> Ala <u>Lys</u> Ileu Ileu Phe
Hovězí	AK2	Met <u>Glu</u> <u>Glu</u> <u>Lys</u> Leu <u>Lys</u> <u>Lys</u> Ala <u>Lys</u> Ileu Ileu Phe
Člověk	AK1	Met <u>Glu</u> <u>Glu</u> <u>Lys</u> Leu <u>Lys</u> <u>Lys</u> Thr <u>Lys</u> Ileu Ileu Phe
Kuře	AK1	Met Ser Thr <u>Glu</u> <u>Lys</u> Leu <u>Lys</u> <u>His</u> <u>His</u> <u>Lys</u> Ileu Ileu Phe
Kvasinky	AKy	Ser Ser <u>Glu</u> Ser Ileu <u>Arg</u> Met Val -
<i>E. coli</i>	AKec	Met <u>Arg</u> Ileu Ileu Leu

^a Liljelund a spol.⁵⁹, ^b nabité aminokyselinové zbytky jsou zvýrazněny podtržením

mě. Srovnávací studie normálních a nádorových buněk dokázaly, že pro nádorové tkáně je charakteristická zvýšená hladina UMP-CMP-kinas^{7,60,61,63}. Významným přínosem pro studium těchto enzymů byla izolace a charakterizace genů a jejich mutant, resp. příprava cDNA u *Salmonella typhimurium*^{72,73}, *S. cerevisiae*^{11-13,59,74}, *D. discoideum*⁷⁵ a *E. coli*⁷⁶.

Zajímavé bylo zjištění, že UMP-kinasa z lidských erythrocytů je polymorfní^{66-68,77}. Ukázalo se, že příslušný gen se může vyskytovat ve třech alelách autosomálně lokalizovaných. Výskyt jednotlivých alel se liší u různých populací^{67,68}. Produkty těchto alel se označují UMPK1, UMPK2 a UMPK3. Obecně převažuje UMPK1 (>90 %) (cit. 66,69); přičemž výskyt UMPK3 je spojen se zvýšenou citlivostí k onemocnění způsobeným *Haemophilus influenzae* B (cit. 67,78).

UMP je známým allosterickým inhibitorem aspartát-transkarbamylasy⁷⁹ a karbamoylfosfátsyntasy⁸⁰ a má klíčový význam pro metabolismus jak v normálních, tak v nádorových buňkách. UMP-kinasa je nezbytným enzymem pro biosyntézu UTP (cit. 11). Fosforyluje UMP za vzniku UDP, který je dále NDP-kinasou fosforylován na trifosfát. Touto metabolickou cestou vznikají prekurzory biosyntézy RNA a cukrů obsahujících UDP (UDP-glukosa, UDP-galaktosa). Pyrimidin nukleosid-5'-fosfáty jsou kompetitivními inhibitory dCMP-kinasy z telecího thymu⁶ a CMP-UMP-kinasy z buněk Yoshidova sarkomu⁶³. UMP-CMP-kinasa z *T. pyriformis*⁵⁷ a kostní dřevě⁷¹ kryse je inhibována CDP, UDP a ADP a též vysokými koncentracemi ATP nebo Mg²⁺. Kinetické studie ukazují, že jde o kompetitivní charakter inhibice. Kvasinková UMP-kinasa je stejně jako ostatní nu-

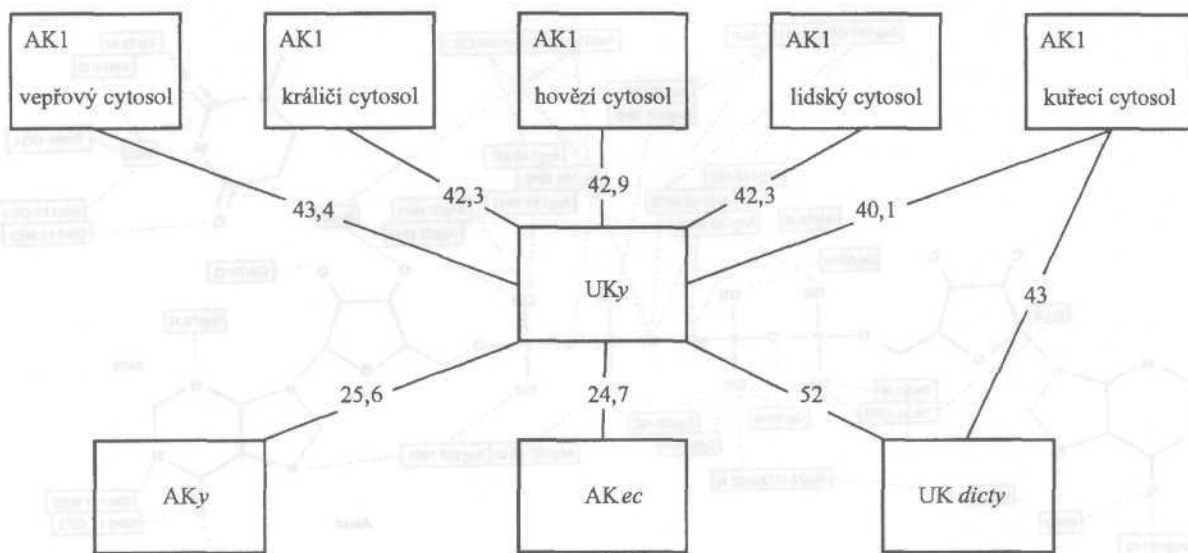
V současné době je nejkompexněji prostudována UMP-kinasa z *S. cerevisiae*, UMP-kinasa z *E. coli* a UMP-CMP-kinasa z *D. discoideum*. Těmto enzymům a jejich srovnání s adenylátkinasami budou věnovány následující kapitoly.

3.1. Uridylátkinasa ze

Saccharomyces cerevisiae

V buňkách kvasinek byla UMP-kinasa (dále UKy) nalezena v cytoplazmě (~80 %) a jádře (~20 %), ne však v mitochondriích^{10,81}. Geny kvasinkové UMP-kinasy byly označeny SOC8 (cit. 12,13) a URA6 (cit. 11). Oba geny jsou vzájemně alelické a jsou lokalizovány na chromosomu XI (cit. 11-13,59,74). Jsou exprimovány jak v *E. coli*^{9,11,59}, tak ve vysoce produktivních kvasinkových kmenech^{11,74,81}, což umožnilo přípravu homogenních preparátů UKy (cit. 9,74).

Na rozdíl od genů kódujících AMP-kinasy, které na 5'-konci obsahují krátkou, co do náboje bohatou oblast zahrnující jak kyselé, tak bazické aminokyselinové zbytky, je pro oblast kódující UKy charakteristická přítomnost hydrofobní „leader“ sekvence⁶² (17 aminokyselinových zbytků, tab. II). Předpokládá se, že by hydrofobní oblast mohla představovat signál nebo „topogenní“ sekvenci⁸², která specificky řídí pohyb molekuly enzymu vnitrobuněčnou membránou⁵⁹, a to proto, že u kvasinek bylo dokázáno biosyntéza pyrimidinů v jádře¹⁴. První enzymy metabolické dráhy, komplex aspartáttranskarbamylasy a karbamoylfosfátsyntasy jsou syntetizovány v cytoplazmě a transportovány do jádra⁵⁹.

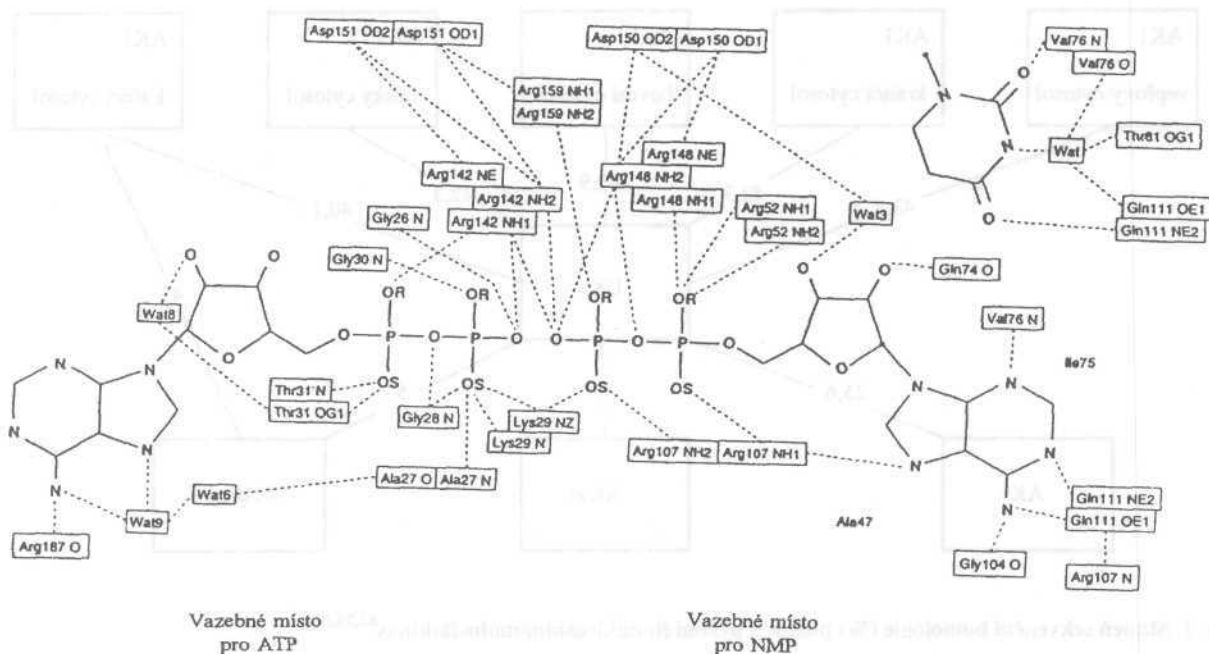


Obr. 1. Stupeň sekvenční homologie (%) purin- a pyrimidinnukleosidmonofosfátkinas^{62,75,81}

kleosid-5'-fosfátkinasy malou monomerní bílkovinou o relativní molekulové hmotnosti 23 000 (cit. ^{59,74}). Její primární struktura byla určena jak ze sekvence cDNA (205 aminokyselinových zbytků) (cit. ^{40,59}), tak analýzou homogenní bílkoviny (219 aminokyselinových zbytků) (cit. ⁷⁴). Překvapující je, že primární struktura kvasinkové UK vykazuje vyšší stupeň homologie s krátkou (cytosolovou, AK1) variantou AMP-kinasy než s variantou dlouhou (mitochondriální, AKy, AKec). UKy je vysoce homologní s CMP-UMP-kinasou z *Dictyostelium discoideum* (dále UKdicty) (obr. 1) a minimálně s GMP-kinasami^{9,83,84}.

Kvasinková UMP-kinasa má širokou substrátovou specifitu^{10,15,74,81}. Nejlepším akceptorem je UMP a jako donor je neefektivněji využíván ATP. Obecně lze říci, že se UKy svou velikostí, primární strukturou a funkcí podobá AMP-kinase. Oba enzymy obsahují smyčku bohatou na glycin (aminokyselinové zbytky 23-30 u UKy) (cit. ^{9,59}), která má základní význam pro vazbu ATP (cit. ⁸⁵) a je společným prvkem řady bílkovin, které vážou nukleotidy⁸⁶. Müller-Dieckmann a Schulz⁹ využili skutečnosti, že UKy fosforyluje AMP a CMP (~30 %, resp. 10 % ve srovnání s UMP) (cit. ^{10,15}), a že se výrazně podobá AK1. Homogenní UKy krystalovali v prostředí jak ATP (cit. ⁹), tak ADP (cit. ¹⁵). Získané komplexní krystaly studovali pomocí rentgenových paprsků a srovnávali s volnou krystalickou AK1 z vepřového svalu^{9,15}. U obou typů komplexních krystalů našli obsazená obě substrátová vazebná

místa, t.j. vazebné místo pro nukleosid-5'-fosfát a vazebné místo pro ATP. Dále zjistili, že oba typy komplexních krystalů mají identickou sekundární strukturu (5 paralelních polypeptidových řetězců v β -struktura, obklopených α -spirálami), která se s malými rozdíly na N-konci shoduje se strukturou AK1 z vepřového svalu¹⁵. Jak již bylo uvedeno u adenylátkinas, jsou v prostorovém uspořádání polypeptidových řetězců podstatně tři oblasti: oblast jádra („core“, dříve „main“), oblast víčka („lid“, dříve „insert“) a oblast vazající nukleosid-5'-fosfát („NMP-bind“) (cit. ^{1,2,87}). Je dokázáno, že po navázání substrátu dochází k podstatným konformačním změnám v oblasti víčka a v oblasti pro vazbu nukleosidmonofosfátu (tzv. „induced fit“); naopak v nepřítomnosti substrátů je zřejmé „rozvolnění“ katalytického centra⁸⁷. Srovnání primární struktury vazebného místa pro nukleosid-5'-fosfát kvasinkové UMP-kinasy, UMP-CMP-kinasy z *D. discoideum* a 28 AMP-kinas přineslo překvapivý výsledek¹⁵. U zmíněných UMP-kinas se při vazbě UMP uplatňují aminokyselinové zbytky Ala-47, Ile-75 a Gln-111 (UKy) resp. Asn-111 (UKdicty). Adenylátkinasy mají v poloze 47 Thr (79 %) nebo Ser (11 %) a v poloze 75 Leu (93 %). Předpokládá se, že záměnou aminokyselinových zbytků u UKy došlo ke zvětšení „vazebné kapsy“ pro nukleosid-5'-fosfát, což umožňuje vazbu i AMP. Bylo dokázáno, že do stejného místa se váže UMP i CMP, avšak vždy s jednou molekulou vody¹⁵. Obr. 2 zachycuje možné vodíkové můstky komplexu UKy:ADP:ADP/AMP s polypeptidem.



Obr. 2. Schéma vodíkových vazeb dvou molekul ADP a kvasinkové UMP-kinasy v komplexu UKy:ADP:ADP/AMP (cit.⁵)

3.2. UMP-CMP-kinasa

z *Dictyostelium discoideum*

Weismiiller a spol.⁷⁵ izolovali a sekvenovali cDNA kódující UMP-CMP-kinasu z *D. discoideum*. Primární struktura odvozená ze sekvence cDNA (enzym je kódován jediným genem) vykazuje vysoký stupeň homologie s AMP-kinasami, především s AK1 (43 %) (cit. ⁷⁵)(obr. 1). Gen UKdicty je exprimován v *E. coli*, což umožnilo přípravu vysoce homogenního enzymu ^{75,88}.

UKdicty je monomerní bílkovina o relativní molekulové hmotnosti 25 000 (cit. ⁷⁵). Podobně jako AMP-kinasy vykazuje širokou specifitu pro nukleosid-5'-trifosfáty (donory fosfátu) (cit. ²). Tomu odpovídá identická sekvence vazebného místa pro ATP(Mg²⁺) v N-koncové části enzymové molekuly a vysoký stupeň homologie v oblasti glycinové smyčky, která váže (3- a γ -fosfáty nukleosid-5'-trifosfátu)⁷⁵. U UMP-CMP-kinasy je, stejně jako u AMP-kinasy², specifita pro NMP dána sekvencí aminokyselinových zbytků v oblasti N-konce⁷⁵. Zatímco pro adenylátkinasy získané z různých zdrojů jsou charakteristické identické aminokyselinové zbytky v polohách 149, 152 a 158 (Leu, Tyr, alifatická aminokyselina), UKdicty má v těchto polohách fenylalaniny⁷⁵. Thr-39 a Leu-66, rovněž vysoce konzervované u AMP-kinasy (lokalizované v blízkosti adeninového kruhu navázaného AMP) (cit. ⁸⁹), jsou u UMP-

CMP-kinasy⁹⁰ nahrazeny Ala, resp. Ile. UKdicty obsahuje dva cysteinové zbytky v polohách 23 a 119, které jsou nezbytné pro jeho aktivní konformaci⁷⁵. Inhibice UKdicty 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoovou kyselinou) ukázala, že klíčový pro katalytickou aktivitu je Cys-23, který se nachází v blízkosti glycinové smyčky („G-loop“) a je, podobně jako Cys-25 u AK1, konzervován⁷⁵.

Účinným specifickým inhibítozem UKdicty je P¹,P⁵-(adenosin-5'-)(uridin-5'-) pentafošfát (Ap₅U, Ki = 0,5.10⁻⁷M) (cit. ⁷⁵). Tato sloučenina se analogicky jako P¹,P⁵-di(adenosin-5'-)pentafošfát (Ap₅A) v případě AK váže v ekvimolárním poměru do vazebných míst UKdicty. Enzym je schopen vázat též Ap₅A, ale s menší účinností⁸⁸. Této skutečnosti využili Weismüller a spol.⁸⁸ a připravili krystalické UKdicty s dvěma navázanými bisubstrátovými analogy. Krystaly podrobili rentgenové analýze a získané výsledky využili pro studium vazebného místa pyrimidinových nukleotidů.

3.3. Uridylátkinasa z *Escherichia coli*

Homogenní UMP-kinasa z *E. coli* (dále UKec), produkt genu pyrH (cit. ⁷⁶), má naprosto odlišné vlastnosti od dosud popsaných pyrimidinnukleosidmonofosfátkinasy^{62,75,91}>⁹². Vykazuje naopak výraznou podobnost s aspartátkinasami, glutamátkinasami a karbamátkinasami z *Pseudomonas*

*aeruginosa*⁹². Stejně jako další enzymy, které u *E. coli* představují součást syntézy pyrimidinových nukleotidů (UTP a CTP) *de novo* je UKec oligomerem a podléhá regulaci GTP (allosterický aktivátor) a UTP (allosterický inhibitor). Navíc sekvence pyrH genu je identická se sekvencí genu *smbA*, který zajišťuje distribuci *chromosomů* do dceřiných buněk před rozdělením buňky⁹³.

Pro UKec je charakteristická termostabilita⁹² (enzym je stabilní až do teploty 65 °C) a extrémně nízká rozpustnost při neutrálním pH, kdy dochází ke tvorbě solných můstků mezi nabitými aminokyselinovými zbytky oligomerů s následující agregací bílkoviny⁹¹; UTP a alkalické pH rozpustnost UKec podstatně zvyšují⁹¹. Jako akceptor fosfátu využívá pouze UMP; nejlepším donorem fosfátu je GTP a ATP (cit. ⁹²). UTP(Mg²⁺) je rovněž donorem, ale s nepatrnou účinností (4–5 % ve srovnání s ATP). Volný UTP je naopak silným inhibitorem UKec. Za nativních podmínek je UKec hexamer⁹², složený ze šesti identických podjednotek o celkové relativní molekulové hmotnosti 156 000.

Primární struktura UKec nevykazuje sekvenční podobnost se žádnou z dosud popsaných nukleosidmonofosfátkinas⁹², dokonce ani s CMP(dCMP) kinasou z téhož zdroje^{17–94}. To nasvědčuje, že oba enzymy patří k rozdílným skupinám kinas. Bucurenci a spol.¹⁷ dokázali, že CMP-kinasa z *E. coli* je monomerní bílkovinou, která i přes minimální sekvenční homologii se známými nukleosidmonofosfátkinasami vykazuje strukturální podobnost s adenylátkinasami a CMP-UMP-kinasami. Na rozdíl od UKec CMP-kinasa ze stejného zdroje využívá jako akceptoru fosfátu jak CMP, tak dCMP a arabinofuranosyl-CMP (cit. ¹⁷). Za zmínku stojí, že u *Bacillus subtilis* je popsána pouze jedna pyrimidinnukleosidmonofosfátkinasová aktivita⁹⁵, která fosforyluje UMP i CMP. Účinným inhibitorem UKec je Ap₅U, zatímco bisubstrátový analog Ap₅A má jen slabé inhibiční účinky⁹².

4. Závěr

Nukleosidmonofosfátkinasy (NMP-kinasy) katalyzují reverzibilní přenos γ -fosfátu nukleosid-5'-trifosfátu (nejčastěji ATP) na nukleosid-5'-fosfát. V savčích tkáních byly nalezeny nejméně čtyři odlišné typy NMP-kinas: adenylátkinasy, guanylátkinasy, 2'-deoxythymidylátkinasy a pyrimidinnukleosidmonofosfátkinasy.

Obecně se pyrimidinnukleosidmonofosfátkinasy, enzymy nezbytné pro biosyntézu pyrimidinových nukleotidů,

vyskytují v savčích buňkách jako dva odlišné enzymy. Zatímco první z nich (EC 2.7.4.9) fosforyluje dTMP a dUMP, druhý enzym (EC 2.7.4.14) vykazuje širokou substrátovou specifitu, fosforyluje UMP, CMP, dCMP a některé antimetabolity s protinádorovým účinkem.

Pyrimidinnukleosidmonofosfátkinasy jsou daleko méně systematicky prostudovány ve srovnání s purinnukleosidmonofosfátkinasami (adenylátkinasa, guanylátkinasa). Významným přínosem pro studium těchto enzymů byla identifikace a izolace jejich genů a následná příprava cDNA. Tento přehledný článek shrnuje současné znalosti o obecných vlastnostech, terciární struktuře a vazebných místech 2'-deoxythymidylátkinas a UMP-CMP-kinas získaných z různých zdrojů; rovněž je diskutována podobnost těchto enzymů s purinnukleosidmonofosfátkinasami.

Zpracovat toto téma nám umožnila podpora projektů GA AVČR A455 402 a GA ČR 203/96/K 001. Autoři děkují RNDr. I. Votrubovi, CSc. za podnětné náměty a zájem při sepisování tohoto článku apaníM. Marešové za pomoc při zpracování rukopisu.

LITERATURA

1. Krejčová R., Horská K.: Chem. Listy 91, 179(1997).
2. Krejčová R.: Rešeršní práce ke kandidátskému minimu, Praha 1996.
3. Lee L.-S., Cheng Y.-C.: J. Biol. Chem. 252, 5686 (1977).
4. Kielley R. K.: J. Biol. Chem. 245, 4204 (1970).
5. Maness P., Orengo A.: Biochemistry 14, 1484 (1975).
6. Sugino Y., Teraoka H., Shimono H.: J. Biol. Chem. 241, 961 (1966).
7. Hande K. R., Chabner B. A.: Cancer Res. 38, 579 (1978).
8. Seagrave J., Reyes P.: Anal. Biochem. 149, 169 (1985).
9. Müller-Dieckmann H.-J., Schulz G. E.: J. Mol. Biol. 236, 361 (1994).
10. Schricker R., Magdolen V., Kaniak A., Wolf K., Bandler W.: Gene 122, 111 (1992).
11. Liljelund P., Lacronte F.: Mol. Gen. Genet. 205, 74 (1986).
12. Jiang Z., Abaigar L. T., Huang S.-H., Cai B., Yong A. Y.: J. Biol. Chem. 266, 18287(1991).
13. Choi W.-J., Campbell J. L., Kuo C, Jong A. Y.: J. Biol. Chem. 264, 15593 (1989).
14. Nagy M., Laporte J., Penverue B., Herve G.: J. Cell Biol. 92, 790 (1982).

15. Müller-Dieckmann H.-J., Schulz G. E.: *J. Mol. Biol.* 246,522(1995).
16. Wiesmüller L., Scheffzek K., Kliche W, Goody R. S., Wittinghofer A., Reinstein J.: *FEBS Lett.* 363, 22(1995).
17. Bucurenci N., Sakamoto H., Briozzo P., Palibroda N., Serina L., Sarfati R. S., Labesse G., Briand G., Danchin A., Bárzu O., Gilles A.-M.: *J. Biol. Chem.* 271, 2856(1996).
18. Krejčová R., Horská K.: *Chem. Listy* 91, 350 (1997).
19. Su J.-Y., Sclafani R. A.: *Nucleic. Acids. Res.* 19, 823 (1991).
20. Smith L. K., Eakin R. E.: *Arch. Biochem. Biophys.* 167,61 (1975).
21. Jong A. Y. S., Campbell J. L.: *J. Biol. Chem.* 259, 14394(1984).
22. Chen M. S., Walker J., Prusoff W. H.: *J. Biol. Chem.* 254, 10747 (1979).
23. Kielley R. K.: *Cancer Res.* 23, 801 (1963).
24. Nakamura H., Sugino Y.: *Cancer Res.* 26, 1425 (1966).
25. Gordon H. L, Bardos T. J., Chmielewicz Z. F., Ambrus J. L.: *Cancer Res.* 28, 2068 (1968).
26. de Groot E. J., Schweiger H. G.: *J. Cell Sci.* 64, 27 (1983).
27. Nelson D. J., Carter C. E.: *J. Biol. Chem.* 244, 5254 (1969).
28. Smith G. L., de Carlos A., Chan Y. S.: *Nucleic. Acids. Res.* 77, 7581 (1989).
29. Lehman I. R., Bessman M. J., Simms E. S., Kornberg A.: *J. Biol. Chem.* 233, 163 (1958).
30. Hurwitz I.: *J. Biol. Chem.* 234, 2351 (1959).
31. Griffith T. J., Helleiner C. W.: *Biochim. Biophys. Acta* 108, 114 (1965).
32. Weissman S. M., Smellie R. M. S., Paul J.: *Biochim. Biophys. Acta* 45, 101 (1960).
33. Grav H. J., Smellie R. M. S.: *Biochem. J.* 94, 518 (1965).
34. Cheng Y.-C., Prusoff W. H.: *Biochemistry* 12, 2612 (1973).
35. de Groot E. J., Schweiger H. G.: *J. Cell Sci.* 64, 13 (1983).
36. Kielley R. K.: *J. Biol. Chem.* 245, 4204 (1970).
37. Bojarski T. B., Hiatt H. H.: *Nature* 188, 1112 (1960).
38. Tamiya N., Yusa T., Yamaguchi Y., Tsukifuji R., Kuroiwa N., Moriyama Y., Fujimura S.: *Biochim. Biophys. Acta* 995, 28 (1989).
39. Hughes S. J., Johnston L. H., de Carlos A., Smith G. L.: *J. Biol. Chem.* 266, 20103 (1991).
40. Jong A. Y. S., Kuo C.-L., Campbell J. L.: *J. Biol. Chem.* 259, 11052 (1984).
41. Sclafani R. A., Fangman W. L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 5821 (1984).
42. de Groot E. J., Schweiger H. G.: *J. Cell Sci.* 72, 15 (1984).
43. Labenz J., Friedrich D., Müller W. E. G., Falke D.: *Intervirology* 19, 11 (1983).
44. Bessman M. J., Bello L. J.: *J. Biol. Chem.* 236, PC 72 (1961).
45. Chen M. S., Prusoff W. H.: *J. Biol. Chem.* 253, 1325 (1978).
46. Maga G., Focher F., Wright G. E., Capobianco M. Garbesi A., Bendiscioli A., Spadari S.: *Biochem. J.* 302, 279 (1994).
47. Jamieson A. T., Subak-Sharpe J. H.: *J. Gen. Virol.* 24, 481 (1974).
48. Irmiere A. F., Manos M. M., Jacobson J. G., Gibbs J. S., Coen D. M.: *Virology* 168, 210(1989).
49. Bone R., Cheng Y.-C., Wolfenden R.: *J. Biol. Chem.* 261, 16410(1986).
50. Langen P., Kowolik G.: *Eur. J. Biochem.* 6, 344 (1968).
51. Kára J., Duschinsky R.: *Biochim. Biophys. Acta* 186, 223(1969).
52. Mitsuya H., Weinhold K. I, Furman P. A., St. Clair M. H., Nusinoff-Lehrman S., Gallo R. C, Bolognesi D., Barry D. W., Broder S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 7096(1985).
53. Furman P. A., Fyfe J. A., St. Clair M. H., Weinhold K., Rideout J. L., Freeman G. A., Nusinoff-Lehrman S., Bolognesi D. P., Broder S., Mitsuya H., Barry D. W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 8333 (1986).
54. Neale G. A. M., Mitchell A., Finch L. R.: *J. Bacteriol.* 156, 1001 (1983).
55. Garvey T. Q., Millar F. K., Anderson E. P.: *Biochim. Biophys. Acta* 302, 38 (1973).
56. Anderson E. P.: *Methods Enzymol.* 57, 331 (1978).
57. Ruffner B. W. Jr., Anderson E. P.: *J. Biol. Chem.* 244, 5994 (1969).
58. Kishi F., Maruyama M., Tanizawa Y., Nakazawa A.: *J. Biol. Chem.* 267, 2942 (1986).
59. Liljelund P., Sanni A., Friesen J. D., Lacronte F.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 765, 464 (1989).
60. Orengo A., Maness P.: *Methods Enzymol.* 51, 321 (1978).
61. Maness P. F., Orengo A.: *Cancer Res.* 36, 2312 (1976).
62. Maness P., Orengo A.: *Biochim. Biophys. Acta* 429, 182(1976).
63. Arima T., Akiyoshi H., Fujii S.: *Cancer Res.* 37, 1593 (1977).
64. Scott E. M., Wright R. C: *Biochim. Biophys. Acta* 577, 45(1979).
65. Teng Y.-S.: *J. Biol. Chem.* 257, 4179 (1976).
66. Harada S., Ito M., Misawa S.: *Humangenetik* 29, 255 (1975).

67. Petersen G. M., Silimperi D. R., Scott E. M., Hall D. R., Rotter J. I., Ward J. I.: *Adv. Exp. Med. Biol.* **195**, PtA 137 (1986).
68. Gallango M. L., Müller A., Suinaga R.: *Biochem. Genet.* **16**, 1085 (1978).
69. Gallango M. L., Suinaga R.: *Am. J. Hum. Genet.* **30**, 215(1978).
70. Seagrave J., Reyes P.: *Arch. Biochem. Biophys.* **247**, 76(1986).
71. Seagrave J., Reyes P.: *Arch. Biochem. Biophys.* **254**, 518(1987).
72. Ingraham J. L., Neuhard J.: *J. Biol. Chem.* **247**, 6259 (1972).
73. Beck Ch. F., Neuhard J., Thomassen E., Ingraham J. L., Kleker E.: *J. Bacteriol.* **120**, 1370 (1974).
74. Ma J. I., Huang S. H., Yong A. Y.: *J. Mol. Biol.* **265**, 19122(1990).
75. Wiesmüller L., Noegel A. A., Bárzu O., Gerisch G., Schleicher M.: *J. Biol. Chem.* **265**, 6339 (1990).
76. Smallshaw J. E., Kelln R. A.: *Genetics (Life Sci. Adv.)* **11**, 59 (1992).
77. Zarinah K. H., Abdullah F., Tan S. G.: *Am. Hum. Biol.* **11**, 533 (1984).
78. Petersen G. M., Silimperi D. R., Scott E. M., Hall D. R., Rotter J. I., Ward J. I.: *Lancet.* **2**, 417 (1985).
79. Easton M. J., Yon R. J.: *Biochim. Biophys. Acta* **1118**, 298 (1992).
80. Rubio V., Cervera I., Lusty C. J., Bendala E., Britton H. G.: *Biochemistry* **30**, 1068 (1991).
81. Jong A., Yeh Y., Ma J. J.: *Arch. Biochem. Biophys.* **304**, 197(1993).
82. Blobel G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 1496(1980).
83. Zschocke P. D., Schiltz E., Schulz G. E.: *Eur. J. Biochem.* **213**, 263 (1993).
84. Stehle T., Schulz G. E.: *J. Mol. Biol.* **224**, 1127 (1992).
85. Dreusicke D., Schulz G. E.: *FEBS Lett.* **208**, 301 (1986).
86. Tsai M.-D., Yan H.: *Biochemistry* **30**, 6806 (1991).
87. Schulz G. E., Müller Ch. W., Diedrichs K.: *J. Mol. Biol.* **213**, 627 (1990).
88. Wiesmüller L., Scheffzek K., Kliche W., Goody R. S., Wittinghofer A., Reinstein J.: *FEBS Lett.* **363**, 22(1995).
89. Schulz G. E.: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **52**, 429 (1987).
90. Okajima T., Tamizawa K., Fukui T.: *FEBS Lett.* **334**, 86(1993).
91. Serina L., Bucurenci N., Gilles A.-M., Surewicz W. K., Fabian H., Mantsch H. H., Takahashi M., Petrescu I., Batelier G., Bárzu O.: *Biochemistry* **35**, 7003 (1996).
92. Serina L., Blondin C., Krin E., Sismeiro O., Danchin A., Sakamoto H., Gilles A.-M., Bárzu O.: *Biochemistry* **34**, 5066 (1995).
93. Yamanaka K., Ogura T., Niki H., Hiraga S.: *J. Bacteriol.* **774**, 7517 (1992).
94. Fricke J., Neuhard J., Kelln R. A., Pedersen S.: *J. Bacteriol.* **777**, 517 (1995).
95. Waleh N. S., Ingraham J. L.: *Arch. Microbiol.* **110**, 49(1976).

R. Krejčová and K. Horská (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Pyrimidine Nucleoside Monophosphokinases**

A review is a continuation of preceding papers on individual types of nucleoside monophosphokinases (NMP kinases) which catalyze the reversible transfer of the terminal phosphoryl group from a nucleoside triphosphate (in most cases ATP) to nucleoside monophosphates in mammalian tissues. Pyrimidine nucleoside monophosphate kinases (PNP kinases), which catalyze the reversible transfer of γ -phosphate of ATP to pyrimidine nucleoside monophosphate have been shown to exist as two distinct enzymes in mammalian cells. One of these enzymes (EC 2.7.4.9.) acts on dTMP and dCMP. The second enzyme (EC 2.7.4.14) shows a broad substrate specificity, enabling utilization of UMP, dUMP, CMP, and dCMP. The PNP-kinases occupy a strategic position in the biosynthesis of pyrimidine nucleotides since their phosphate acceptor substrates are products of both the *de novo* and the salvage pathways. We report on the recent knowledge of general properties, mechanism, and three-dimensional structure of dTMP-kinases from different sources; their similarity to AMP- and GMP-kinases, respectively, is also discussed.