

Abstrakt

Fosfatasy z rodiny haloacidních dehalogenas jsou jedním z nástrojů, prostřednictvím nichž buňky provádí defosforylaci velmi rozmanitého množství endogenních i exogenních sloučenin. Kromě mnoha jiných se mezi fosfatasy této rodiny řadí enzymy Tt82 a cytosolická purinová 5'-nukleotidasa II (cN-II), jimiž se tato diplomová práce zabývá.

Enzym Tt82 pochází z termofilní archebakterie *Thermococcus thio-reducens* a o jeho vlastnostech a biologické funkci je v současnosti známo jen málo. Na základě jeho strukturních a sekvenčních vlastností byla predikována fosfatasová katalytická aktivita a pomocí metody molekulového dokování navrženy potenciální substráty. Fosfatasová aktivita Tt82 byla v této diplomové práci potvrzena a spolu s tím nalezeno několik substrátů: AMP, D-glukosa-1-fosfát, D-glukosa-6-fosfát a *p*-nitrofenylfosfát (*p*NPP). Pro AMP a *p*NPP byla aktivita Tt82 detailně charakterizována při teplotách 37°C a 60°C a získány příslušné kinetické parametry. Aktivita enzymu byla pro oba substráty podstatně vyšší při teplotě 60 °C, což je v souladu s jeho původem z termofilního organismu. Efektivita katalytické aktivity Tt82 vůči identifikovaným substrátům je přesto poměrně nízká a patrně se tedy nejedná o biologicky relevantní substráty tohoto enzymu. Je však pravděpodobné, že Tt82 má mnohem širší substrátovou specifitu, což by ve spojení s jeho termofilní povahou mohlo představovat potenciál pro biotechnologické využití.

Lidský allosterický enzym cN-II je studován již řadu let. Katalyzuje první krok degrační dráhy v metabolismu purinových nukleotidů a má v této dráze klíčovou regulační funkci. Poruchy regulace aktivity cN-II zapříčiněné aktivujícími mutacemi v genu NT5C2 se však pojí s několika závažnými onemocněními včetně akutní lymfoblastické leukemie. Hyperaktivní mutantní varianty cN-II jsou odpovědné za vznik resistance leukemických buněk vůči protinádorové léčbě prostřednictvím thiopurinů. Enzym cN-II je proto významným terapeutickým cílem. Jednou z možných strategií, jak proti hyperaktivitě cN-II zakročit, je vývoj efektivních inhibitorů. V souvislosti s tím byly v této diplomové práci hledány sloučeniny, které s tímto enzymem prokazatelně interagují. Pro tyto účely byly úspěšně připraveny dvě C-terminálně zkrácené varianty cN-II. Prostřednictvím metody „saturation transfer difference“ (STD) NMR bylo nalezeno 68 interagujících nízkomolekulárních sloučenin (fragmentů) z 1000 testovaných. Na základě míry interakce s enzymem bylo posléze vybráno 50 nejlepších fragmentů. Tyto poskytnou základ pro vývoj budoucích inhibitorů cílených na hyperaktivní mutantní varianty cN-II.

Klíčová slova: fosfatasy z rodiny HAD, cytosolická purinová 5'-nukleotidasa II, vývoj inhibitorů s využitím malých fragmentů, fosfatasa Tt82, charakterizace katalytické aktivity