

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie (NBIOD)



Bc. Vítězslav Brinsa

STUDIUM LIGANDŮ FOSFATAS Z RODINY
HALOACIDNÍCH DEHALOGENAS

STUDY OF LIGANDS FOR PHOSPHATASES FROM
THE HALOACID DEHALOGENASE SUPERFAMILY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí práce: RNDr. Pavlína Maloy Řezáčová, Ph.D.

Konzultant: Ing. Václav Veverka, Ph.D.

Praha 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....
Vítězslav Brinsa

Tato práce byla vypracována v Laboratoři strukturní biologie na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i. Financována byla z těchto zdrojů: Operační program výzkum, vývoj, vzdělávání; projekt Chemická biologie pro vývoj nových terapií (č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000729).

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval své školitelce RNDr. Pavlíně Maloy Řezáčové, Ph.D. za velkou trpělivost, cenné rady, odborné vedení a také zaštitění této diplomové práce. Děkuji svému konzultantovi Ing. Václavu Veverkovi, Ph.D. za pomoc a rady v projektu zabývajícím se vývojem inhibitorů cN-II a při psaní této práce. Velmi děkuji Ing. Lukáši Vrzalovi, Ph.D. za velkou ochotu, laskavé rady a pomoc při veškerých experimentech i zpracování dat v NMR spektroskopii. Můj obrovský dík patří Ing. Aleši Hnízdovi, Ph.D. za jeho přátelskou ochotu a vstřícnost a za jeho odborné rady, připomínky a doporučení při psaní této práce. Dále bych chtěl poděkovat RNDr. Milanovi Fábrymu, CSc. za přípravu expresních plasmidů, Ing. Ireně Sieglové za pomoc a laskavé rady při práci v laboratoři, Ing. Michaelu Kuglerovi za mnohé přátelské rady a pomoc při nastavení a přípravě DSF experimentů, doc. RNDr. Jiřímu Bryndovi, CSc. za rady při optimalizaci a vyhodnocování enzymologických experimentů, Mgr. Vlastimilu Královi, Ph.D. za mnohé přátelské rady a pomoc při práci se čtečkou destiček, a konečně celému kolektivu laboratoře za podporu a vytvoření skvělé a přátelské atmosféry na pracovišti. V neposlední řadě bych velice rád poděkoval především své rodině, přítelkyni, přátelům a blízkým za velkou podporu během psaní této diplomové práce i během celého studia.

Abstrakt (CZ)

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 degradační 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

Abstract (EN)

Phosphatases of the haloacid dehalogenase superfamily are one of the cell's tools for dephosphorylation of many diverse endogenous and exogenous compounds. This work is aimed at enzymes Tt82 and cytosolic purine 5'-nucleotidase II (cN-II), two members of this large enzyme superfamily.

The Tt82 originates in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus thioreducens*. Up to date, there is only a small amount of knowledge about properties and biological function of this enzyme. Based on its sequence and structure, it was predicted that the Tt82 should possess a phosphatase catalytic activity. Consequently, potential substrates of the Tt82 were proposed by the molecular docking. In this work, the phosphatase activity of the Tt82 was confirmed together with several of its substrates: AMP, D-glucose 1-phosphate, D-glucose 6-phosphate and *p*-nitrophenyl phosphate (*p*NPP). Activity towards AMP and *p*NPP was then characterized by steady-state kinetics at 37 °C and 60 °C. In consistence with its thermophilic origin, the Tt82 showed markedly higher activity towards both substrates at 60 °C. Nonetheless, the effectivity of the Tt82 catalytic activity towards these substrates was actually very low. This leads to assumption, that the identified substrates are probably not biologically relevant. On the other hand, it is quite likely that the substrate specificity of the Tt82 might be much broader. Taken together with its thermal stability, the Tt82 could have a potential use in biotechnology.

The cN-II is a human allosteric enzyme. It catalyses the first step in the degradation pathway of the purine nucleotide metabolism, where it holds a key regulatory function. Aberrations in the regulation of the cN-II activity are caused by activating mutations in the NT5C2 gene and are associated with several serious diseases, including the acute lymphoblastic leukaemia. Hyperactive mutant cN-II variants are responsible for the development of resistance of the leukemic cells to the antitumor therapy with thiopurines. Therefore, the cN-II is an important therapeutic target. One of the possible strategies to overcome the cN-II hyperactivity is the development of effective inhibitors. In relation to that, compounds that clearly interact with the cN-II were sought in this work. Two C-terminally truncated cN-II variants were successfully prepared for this purpose. Using the saturation transfer difference NMR method, 68 compounds (fragments) from 1000 tested was found to show interaction with the cN-II. Finally, based on the measure of the interaction, 50 best scoring fragments were selected for further experiments. These results provide a solid basis for further development of the future inhibitors targeted against the hyperactive mutant cN-II variants.

Keywords: phosphatases from HAD superfamily, cytosolic purine 5'-nucleotidase II, fragment-based drug discovery, Tt82 phosphatase, characterization of catalytic activity

[IN CZECH]

Obsah

1	Literární přehled	11
1.1	Úvod.....	11
1.2	Rodina haloacidních dehalogenas	11
1.3	Fosfatasy a fosfotransferasy rodiny HAD.....	12
1.3.1	Strukturní vlastnosti fosfatas a fosfotransferas rodiny HAD.....	12
1.3.2	Aktivní místo enzymů rodiny HAD.....	14
1.3.3	Katalytická aktivita enzymů rodiny HAD	17
1.4	Fosfatasa Tt82	18
1.4.1	Struktura Tt82 a jeho příslušnost k rodině HAD	19
1.4.2	Substrátová specifita Tt82	21
1.5	Lidské intracelulární 5'-nukleotidasy z rodiny HAD.....	23
1.6	Cytosolická purinová 5'-nukleotidasa II.....	24
1.6.1	Základní vlastnosti a katalytická funkce.....	24
1.6.2	Struktura cN-II.....	26
1.6.3	Regulace katalytické aktivity.....	30
1.6.4	Mutace v genu NT5C2.....	33
1.6.5	Patologie spojené s cN-II.....	34
2	Cíl práce.....	40
3	Materiál a metody	41
3.1	Materiál	41
3.1.1	Bakteriální kmeny.....	41
3.1.2	Plasmidy.....	41
3.1.3	Chemikálie	42
3.1.4	Použitá kultivační média, roztoky a pufry	44
3.1.5	Chromatografické kolony	46
3.1.6	Ostatní materiál.....	46
3.2	Přístroje a vybavení.....	47

3.3	Experimentální metody	48
3.3.1	Rekombinantní exprese proteinů	48
3.3.2	Purifikace	50
3.3.3	Diferenční skenovací fluorimetrie	53
3.3.4	NMR spektroskopie	54
3.3.5	Detekce fosfatasové aktivity	57
3.3.6	Enzymové reakce	59
3.3.7	Vysokoučinná kapalinová chromatografie: analýza enzymových reakcí	59
4	Výsledky	62
4.1	Heterologní exprese a izolace rekombinantních proteinů	62
4.2	Purifikace rekombinantních proteinů	62
4.3	Optimalizace pufru pro cN-II pomocí diferenční skenovací fluorimetrie	67
4.4	Hledání ligandů varianty cN-II D52N Δ	70
4.5	Enzymová aktivita a substráty Tt82	80
4.6	Charakterizace kinetických parametrů Tt82 se substráty AMP a pNPP	83
5	Diskuse	85
6	Závěr	89
7	Seznam použité literatury	91

Seznam zkratek a symbolů

Zkratka	Význam anglicky	Význam česky
2,3-BPG	2,3-bisphosphoglycerate	2,3-bisfosfoglycerát
5'N	5'-nucleotidases	5'-nukleotidasy
6-MP	6-mercaptopurine	6-merkaptopurin
6-TG	6-thioguanine	6-thioguanin
AA	acrylamide	akrylamid
ADA	adenosine deaminase	adenosin deaminasa
ADK	adenosine kinase	adenosin kinasa
ADP	adenosine 5'-diphosphate	adenosin-5'-difosfát
AfP	phosphatase from <i>Archaeoglobus fulgidus</i>	fosfatasa z termofilního organismu <i>Archaeoglobus fulgidus</i>
AICAR	5'-phosphoribosyl-5-amino-4-imidazolecarboxamide	5'-fosforibosyl-5-amino-4-imidazolkarboxamid
ALL	acute lymphoblastic leukaemia	akutní lymfoblastická leukemie
AMP	adenosine 5'-monophosphate	adenosin-5'-monofosfát
AMPDA	adenosine monophosphate deaminase	adenosin monofosfát deaminasa
Ap ₄ A	5',5'''-diadenosine tetraphosphate	diadenosin-5',5'''-tetrafosfát
Ap _n A	5',5'''-diadenosine polyphosphate	diadenosin-5',5'''-polyfosfát
APRT	adenine phosphoribosyltransferase	adenin fosforibosyltransferasa
APS	ammonium persulfate	peroxidisíran amonný
ATP	adenosine 5'-triphosphate	adenosin-5'-trifosfát
Bicin	N,N-Bis(2-hydroxyethyl)glycine	N,N-bis-(2-hydroxyethyl)glycin
BIS	N,N'-methylene-bis-acrylamide	N,N'-metylen-bis(akrylamid)
cdN	cytosolic 5'(3')-deoxy-nucleotidase	cytosolická 5'(3')-deoxy-nukleotidasa
cN-IA	cytosolic 5'-nucleotidase IA	cytosolická 5'-nukleotidasa IA
cN-IB	cytosolic 5'-nucleotidase IB	cytosolická 5'-nukleotidasa IB
cN-II	cytosolic 5'-nucleotidase II	cytosolická 5'-nukleotidasa II
cN-II WT Δ	(His) ₆ – cN-II WT (1-536); C-terminally truncated wild-type variant of cytosolic 5'-nucleotidase II carrying (His) ₆ tag	(His) ₆ – cN-II WT (1-536) C-terminálně zkrácená nemutantní varianta cytosolické 5'-nukleotidasy II nesoucí (His) ₆ kotvu na N-konci
cN-II D52N Δ	(His) ₆ – cN-II D52N (1-536); C-terminally truncated D52N mutant variant of cytosolic 5'-nucleotidase II carrying N-terminal (His) ₆ -tag	(His) ₆ – cN-II D52N (1-536); C-terminálně zkrácená mutantní varianta D52N cytosolické 5'-nukleotidasy II nesoucí (His) ₆ kotvu na N-konci
cN-III	cytosolic 5'-nucleotidase III	cytosolická 5'-nukleotidasa III
dAMP	2'-deoxyadenosine 5'-monophosphate	2'-deoxyadenosin-5'-monofosfát

dATP	2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate	2'-deoxyadenosin-5'-trifosfát
dGMP	2'-deoxyguanosine 5'- -monophosphate	2'-deoxyguanosin-5'-monofosfát
dH ₂ O	deionized water	deionizovaná voda
dIMP	2'-deoxyinosine 5'-monophosphate	2'-deoxyinosin-5'-monofosfát
dTGTP	2'-deoxy-6-thioguanosine 5'- -triphosphate	2'-deoxy-6-thioguanosin-5'- -trifosfát
DMSO	dimethyl sulfoxide	dimethylsulfoxid
DSF	differential scanning fluorimetry	diferenční skenovací fluorimetrie
DTT	dithiothreitol	dithiothreitol
mdN	mitochondrial 5'(3')-deoxy- -nucleotidase	mitochondriální 5'(3')-deoxy- -nukleotidasa
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	ethylendiamintetraoctová kyselina
ETG	ethyl-β-D-thiogalactopyranoside	ethyl-β-D-thiogalaktosid
FPLC	fast protein liquid chromatography	proteinová kapalinná chromatografie
f_s	scaling factor of differential ¹ H NMR spectrum against reference ¹ H NMR spectrum	škálovací faktor diferenčního ¹ H NMR spektra vůči referenčnímu ¹ H NMR spektru
GDA	guanine deaminase	guanin deaminasa
GMP	guanosine 5'-monophosphate	guanosin-5'-monofosfát
GMPS	guanosine monophosphate synthetase	guanosin-5'-monofosfát synthetasa
GTP	guanosine 5'-triphosphate	guanosin-5'-trifosfát
HAD	haloacid dehalogenase	haloacidní dehalogenasa
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid	kyselina N-2- -hydroxyethylpiperazin- -N'-2-ethansulfonová
HGPRT	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	hypoxanthin-guanin fosforibosyltransferasa
HPLC	high performance liquid chromatography	vysokoúčinná kapalinná chromatografie
HSP	hereditary spastic paraplegia	hereditární spastické paraparézy
I_F	relative measure of interaction between fragment and enzyme in %	relativní míra interakce daného fragmentu s enzymem v %
IGK	inosine-guanosine kinase	inosin-guanosin kinasa
IMP	inosine 5'-monophosphate	inosin-5'-monofosfát
IMPDH	inosine monophosphate dehydrogenase	inosin-5'-monofosfát dehydrogenasa
LB	Luria Bertani	Luria Bertani
μM	μmol/dm ³	μmol/dm ³
mM	mmol/dm ³	mmol/dm ³
M	mol/dm ³	mol/dm ³
MeTIMP	6-methylthioinosine-5'- -monophosphate	6-methylthioinosin-5'-monofosfát

MES	2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid	kyselina 2-(N-morfolino)-ethansulfonová
MESG	6-mercapto-7-methylguanosine	7-methylthioguanosin
NMP	(2'-deoxy)ribonucleoside-5'-monophosphate	(2'-deoxy)ribonukleosid-5'-monofosfát
OD ₅₅₀	optical density in 550 nm	optická hustota při vlnové délce 550 nm
<i>p</i> NPP	4-nitrophenyl phosphate	<i>para</i> -nitrofenylfosfát
PNP	purine nucleoside phosphorylase	purin nukleosid fosforylaza
PP _i	pyrophosphate	pyrofosfát
ppm	chemical shift in NMR spectroscopy (parts per million)	chemický posun v NMR spektroskopii
PRPP	phosphoribosyl pyrophosphate	5-fosforibosyl-1-pyrofosfát
R5P	ribose 5-phosphate	ribosa-5-fosfát
SDS	sodium dodecyl sulphate	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis	Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za denaturujících podmínek v přítomnosti dodecylsíranu sodného
SPGs	spastic paraplegia associated genes	geny asociované se spastickou paraplegií
STD NMR	saturation transfer difference NMR	„rozdíl z přenosu saturace“ NMR
TB	Terrific Broth	Terrific Broth
TCEP	tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride	tris(2-karboxyethyl)fosfin hydrochlorid
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TFA	trifluoroacetic acid	kyselina trifluoroctová
TGMP	6-thioguanosine-5'-monophosphate	6-thioguanosin-5'-monofosfát
TGTP	6-thioguanosine 5'-triphosphate	6-thioguanosin-5'-trifosfát
TIMP	6-thioinosine-5'-monophosphate	6-thioinosin-5'-monofosfát
T _M	melting temperature of protein in °C	teplota denaturace (tání) proteinu v jednotkách °C
TPMT	thiopurine S-methyltransferase	thiopurin S-methyltransferasa
Tris	tris(Hydroxymethyl)aminomethane	tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tt82	Tt82 phosphatase	fosfatasa Tt82
TtPSP	phosphoserine phosphatase from <i>Thermus thermophilus</i>	fosfoserin fosfatasa z termofilního organismu <i>Thermus thermophilus</i>
TXMP	6-thioxanthosine-5'-monophosphate	6-thioxanthosin-5'-monofosfát
WT	wild-type form of enzyme	nemutantní varianta enzymu
XO (XOR)	xanthin oxidase (oxidoreductase)	xanthin oxidasa (oxidoreduktasa)
XMP	xanthosine 5'-monophosphate	xanthosin-5'-monofosfát

1 Literární přehled

1.1 Úvod

Estery kyseliny fosforečné jsou nepostradatelnou součástí všech buněčných organismů. Mají nenahraditelnou roli v buněčné signalizaci, podílejí se na ukládání a přenosu energie, jsou stavební složkou buněčných membrán, nukleových kyselin, kostí a mnohých dalších struktur. Defosforylace těchto velmi rozmanitých sloučenin je jednou z klíčových reakcí, které v buňce probíhají. Je nezbytná pro uvolnění uskladněné energie v buňkách a hraje významnou roli například také v regulaci různých buněčných procesů [1-3]. V průběhu evoluce se vyvinulo velké množství enzymů, které jsou schopné hydrolytickou defosforylací katalyzovat. Tyto enzymy patří do skupiny tzv. fosfohydrolas a jsou rozděleny do přibližně jedné desítky enzymových rodin, mezi něž patří i rodina haloacidních dehalogenas (HAD) [4].

Rodina HAD obsahuje velké množství zástupců, mezi něž se řadí také enzymy Tt82 a cytosolická purinová 5'-nukleotidasa II (cN-II), jimiž se tato diplomová práce zabývá. Enzym Tt82, jenž pochází z termofilní archebakterie *Thermococcus thioreducens*, byl popsán teprve nedávno (v roce 2019) [5], přičemž není známa jeho biologická funkce ani katalytická aktivita. V této diplomové práci byla katalytická aktivita Tt82 objasněna a spolu s tím nalezeny některé jeho substráty. Lidským enzymem cN-II se naproti tomu výzkumy zabývají již řadu let. Zastává regulační funkci v metabolismu purinových nukleotidů a poruchy v jeho expresi či regulaci jsou spojeny s několika závažnými onemocněními. Těmi jsou akutní lymfoblastická leukemie (ALL), hereditární spastické paraparézy (HSP) a Lesch-Nyhanův syndrom. Z tohoto důvodu je cN-II považován za významný terapeutický cíl. Předmětem této diplomové práce je hledání nízkomolekulárních sloučenin, které s cN-II interagují a které by mohly tvořit základ pro vývoj budoucích, terapeuticky využitelných inhibitorů.

1.2 Rodina haloacidních dehalogenas

Do rodiny haloacidních dehalogenas (z angl. *haloalkanoic acid/haloacid dehalogenase superfamily*) bylo doposud zařazeno více než 500 000 známých enzymů. Zástupci z této rodiny se vyskytují v organismech napříč všemi říšemi [6]. Zastávají různé biologické funkce včetně účasti na primárním a sekundárním metabolismu, na regulaci hladiny buněčných metabolitů, v procesu získávání živin a udržování základních buněčných pochodů. Obecně se jedná o skupinu hydrolas schopných katalyzovat hydrolytické štěpení různých typů vazeb, jmenovitě C–Cl vazby, C–P vazby a esterových vazeb CO–P a PO–P. Rodinu HAD tvoří pět enzymových podskupin: fosfatasy (katalyzují hydrolýzu monoesterů kyseliny fosforečné za vzniku volného fosfátu a příslušného alkoholu), ATPasy (katalyzují

hydrolyzu ATP na ADP a volný fosfátový ion za současného uvolnění energie), fosfomutasy sacharidů (katalyzují hydrolyzu a intramolekulární přenos fosfátové skupiny), dehalogenasy (katalyzují hydrolyzu a uvolnění atomu halogenu z molekuly organického halogenidu) a fosfonatasy (katalyzují hydrolyzu fosfonoacetaldehydu za vzniku acetaldehydu a volného fosfátu) [4, 7-9].

1.3 Fosfatasy a fosfotransferasy rodiny HAD

Navzdory názvu této enzymové rodiny má převážná většina jejích zástupců (přibližně 99 %) nikoliv dehalogenasovou, ale fosfotransferasovou, resp. fosfatasovou aktivitu. Vyjma dehalogenas tedy katalyzují přenos fosfátové skupiny ze substrátu nebo na něj a jsou bezpodmínečně závislé na přítomnosti Mg^{2+} iontů coby kofaktoru [4, 8]. Vykazují širokou substrátovou specifitu, přičemž převážná většina je schopna katalyzovat přeměnu 5 a více různých substrátů [10, 11]. Molekulová velikost substrátů se pohybuje od těch téměř nejmenších molekul, jako jsou např. pyrofosfát, fosfoserin či fosfoglykolát, až po velké makromolekuly jako t-RNA a fosfoproteiny [7, 12]. Tato substrátová rozmanitost a rozdílná substrátová specifita pramení z charakteristických strukturních a sekvenčních rysů rodiny HAD, které jsou popsány v následujících podkapitolách.

1.3.1 Strukturní vlastnosti fosfatas a fosfotransferas rodiny HAD

Terciární struktura enzymů rodiny HAD je obecně tvořena dvěma hlavními doménami, které se nazývají *core* – „jádro“ (dále v textu označováno jako *core* doména), a *cap* – „víčko“ (dále v textu označováno jako *cap* doména).

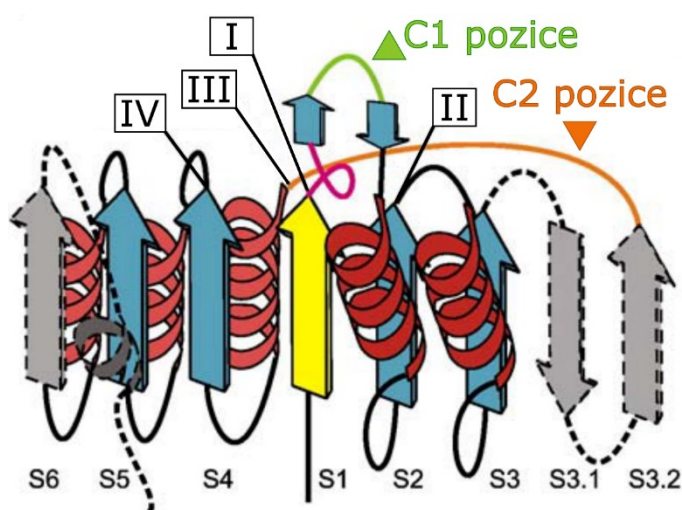
Doména *core*

Základnou proteinu a též nositelem aktivního místa (viz kapitola 1.3.2) je doména *core*. Doménu tvoří několikanásobné opakování β - α sekundárního strukturního motivu, které vytváří třívrstvý α/β sendvič – centrální β -skládání list obklopený sérií α -helixů. Toto uspořádání lze nazvat jako „Rossmann-like sbalení“ (z angl. *Rossmannoid fold* či *Rossmann-like fold*). Centrální β -skládání list je tvořen obvykle nejméně 5 řetězci, které jsou vůči sobě vždy paralelní. Jednotlivé řetězce se značí S1-S5 (S z angl. *sheet*) a v centrálním listu zaujímají specifické pořadí, které je vyobrazeno na Obrázku 1, str. 13. *Rossmann-like* sbalení dále obsahuje dva klíčové strukturní motivy nazývané v anglickém jazyce jako *squiggle* – „klička“, a *flap* – „klapka“ (Obrázek 1, str. 13), kterými se rodina HAD odlišuje od ostatních enzymových rodin obsahujících totéž sbalení. Motiv *squiggle* je tvořen přibližně šesti aminokyselinovými zbytky (z angl. *residues*) a nachází se bezprostředně za řetězcem S1 centrálního β -skládání listu, přičemž zaujímá téměř jednu kompletní otáčku α -helixu. Ihned za tímto motivem následuje β -vlásenka tvořená dvěma

antiparalelními řetězci, která se označuje jako motiv *flap*. Oba výše popsané strukturní motivy hrají důležitou roli v katalytické aktivitě enzymů rodiny HAD [4].

Doména *cap*

Vedle motivů *squiggle* a *flap* může *Rossmann-like* sbalení obsahovat v řadě případů také další strukturní variace, které se vyskytují zejména v oblasti centrálního β -skládaného listu. Jednou z nich je tak navýšení počtu řetězců přímo v centrálním β -skládaném listu. Nejpodstatnější variací je však právě doména *cap*, která může být vložena buď mezi dva řetězce β -vlásenky motivu *flap* (C1 pozice) nebo do úseku linkeru následujícího ihned za řetězcem S3 (C2 pozice) (Obrázek 1 a Obrázek 2A, B, str. 15) [4]. Na doménu *core* je napojena prostřednictvím motivu helix-smyčka-helix, přičemž smyčka v tomto motivu se značí L5 a z funkčního hlediska hraje důležitou roli [9], jež je popsána v kapitole 1.3.2.



Obrázek 1 – Klasické uspořádání *Rossmann-like* sbalení v doméně *core*

Centrální β -skládaný list obsahující 5 paralelních řetězců (S1-S5, žlutá a modrá) a oklopený sérií α -helixů (červená) představuje základní uspořádání *Rossmann-like* sbalení enzymů rodiny HAD. Římskými číslicemi I-IV jsou naznačeny pozice konzervovaných sekvenčních motivů I-IV. Naznačeny jsou také konzervované motivy *squiggle* (růžová) a *flap* (zelená), který je zároveň místem vložení *cap* domén typu C0 nebo C1 (C1 pozice, zelená). Dále je naznačeno místo vložení *cap* domén typu C0 nebo C2 (C2 pozice, oranžová). V případě mnoha zástupců rodiny HAD je toto základní uspořádání dále rozšířeno o různý počet dalších řetězců β -skládaného listu (např. o řetězce S3.1 a S3.2 aj.) či α -helixů (šedá). Obrázek byl upraven v programu Inkscape 0.92.4 podle a převzat z: [4].

Domény *cap* jsou strukturně velice rozličné a na základě své velikosti, místa vložení do *Rossmann-like* sbalení a své celkové topologie se rozdělují do tří podskupin: (1) C0 *cap* domény jsou tvořeny krátkým aminokyselinovým úsekem, který může vytvářet nanejvýš smyčku či třetí řetězec skládaného listu vložený mezi dva antiparalelní řetězce motivu *flap*. Představují strukturně nejjednodušší podskupinu a mohou se vyskytovat v obou z možných míst vložení popsaných výše v textu. (2) C1 *cap* domény se vyskytují vždy ve středu β -vlásenky motivu *flap* a ze strukturního hlediska je lze rozdělit do dvou podtříd. První z nich je označována jako α -helikální a je tvořena různě velkým svazkem α -helixů, od nejjednoduššího „helix-smyčka-helix“ motivu až po velké globulární svazky složené

z osmi α -helixů. Druhá podtřída se vyznačuje kombinací $\alpha+\beta$ struktur s centrálním tří řetězcovým β -skládaným listem. (3) C2 *cap* domény jsou oproti C1 kategorii vloženy vždy do linkeru následujícího za S3 řetězcem centrálního β -skládaného listu v *Rossmann-like* sbalení. Obdobně je však lze na základě strukturních prvků rozdělit, a sice na typ podobný NagD fosfatase a typ Cof fosfatasy [4]. Tyto dva typy lze pro přehlednost označovat jako typ C2A, respektive typ C2B [10]. Obecně jsou oba tyto typy tvořeny $\alpha+\beta$ strukturami s nejméně tří řetězcovým β -skládaným listem v jádru domény, avšak liší se od sebe dalšími strukturními variacemi a celkovým prostorovým uspořádáním. Typ C2B je v základu tvořen tří řetězcovým antiparalelním β -skládaným listem, který může být dále rozšířen o další strukturní prvky, například o jednu či více α - β jednotek na N-konci domény *cap*. Základem C2 *cap* domény u typu C2A je čtyř řetězcový paralelní β -skládaný list rozšířený o další paralelní β -skládaný list na N-konci řetězce a unikátní β -vlásečkou vloženou mezi 3. a 4. řetězcem základního β -skládaného listu [4].

Většina zástupců rodiny HAD obsahuje C1 nebo C2 *cap* doménu. V některých případech však mohou obsahovat kombinaci dvou domén zároveň, které si mohou být svou prostorovou velikostí a uspořádáním navzájem podobné, avšak i značně rozdílné. Příkladem je kombinace C1 *cap* domény tvořené několika α -helixy a C2 *cap* domény v podobě malé β -vlásečky. Pozorována byla dále také kombinace C0 *cap* domény s C2 *cap* doménou tvořenou taktéž malou β -vlásečkou [4].

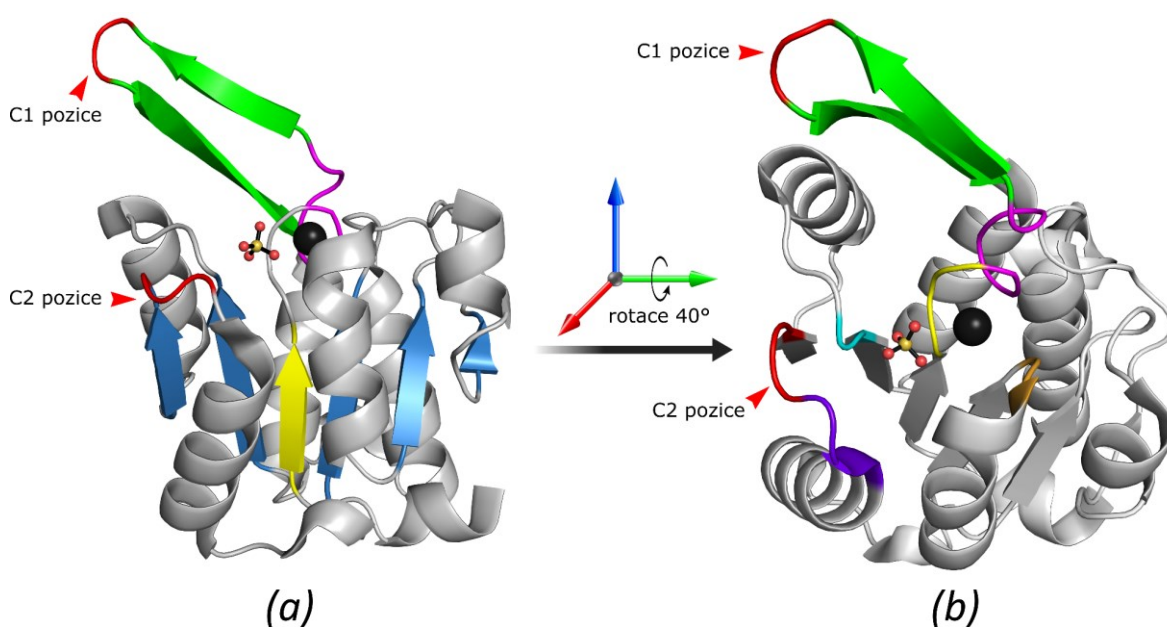
1.3.2 Aktivní místo enzymů rodiny HAD

Role domén *cap* a *core*

Hlavní úloha domény *cap* spočívá v interakci s přístupujícím substrátem, v jeho rozpoznání a následném směřování do centra aktivního místa. Tato interakce je příčinou substrátové specifity enzymů rodiny HAD a je zprostředkována zbytky aminokyselin, které jsou lokalizovány v tzv. smyčce substrátové specifity (z angl. *the substrate-specificity loop*) – označované též jako smyčka L5 (viz následující podkapitola) [4, 9]. Strukturní studie odhalily, že domény typu C0 či úplná absence *cap* domény ve struktuře udílejí enzymu úzkou substrátovou specifitu. Domény typu C1 a C2 jsou naproti tomu zodpovědné za substrátovou „promiskuitu“ a tedy sníženou substrátovou specifitu enzymů rodiny HAD [10]. V případě většiny hydrolas z rodiny HAD jsou v sekvenci *cap* domény dále obsaženy aminokyseliny, jejichž postranní řetězce hrají důležitou roli přímo v průběhu katalyzované reakce (viz dále). Vedle toho se *cap* doména může v některých případech podílet na utváření oligomerního rozhraní mezi protomery v oligomerním proteinu [4].

Vlastní katalytická aktivita je soustředěna především ve strukturně konzervované doméně *core*. Doména *core* vytváří „lešení“, do něhož je zasazeno aktivní místo ve tvaru konkávní dutiny tvořené čtyřmi smyčkami značenými jako L1-L4 (Obrázek 2B). Přístup do aktivního

místa je stericky stíněn β -vlásečkou motivu *flap* a doménou *cap*, je-li ve struktuře enzymu přítomna. V takovém případě slouží *cap* doména jako poklop, který se při vstupu substrátu do kavity dynamicky přiklopí nad její ústí pohybem podobným otočení dveří na pantu, uzavře substrát uvnitř a brání vstupu molekul rozpouštědla do aktivního místa. Konformace enzymu v tomto procesu přechází z otevřené na uzavřenou, čímž je vytvořeno prostředí vhodné pro uskutečnění enzymové reakce [4, 9]. Tato vlastnost *cap* domény má dále za následek, že enzymy nesoucí doménu typu C1 a/nebo C2, které jsou zpravidla prostorově objemnější než typ C0, pracují převážně s menšími substráty [7]. V případě enzymů, u kterých *cap* doména ve struktuře zcela chybí, tuto funkci zastává samotný substrát. Ten je natolik velký a objemný, že zcela vyplní kavitu aktivního místa, a vytěsni z něj tak zároveň veškeré molekuly rozpouštědla. Příkladem takového enzymu z rodiny HAD je polynukleotid kinasa z T4 fága [8].



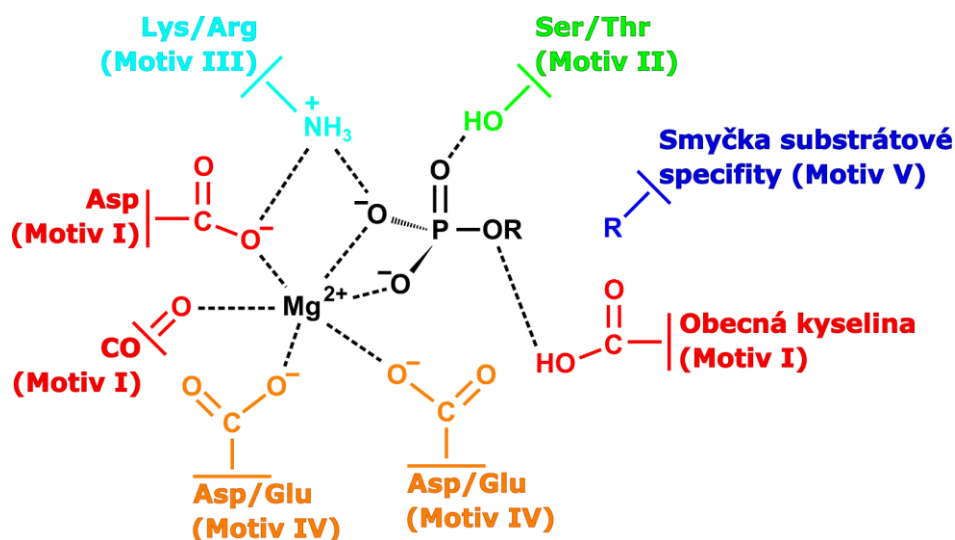
Obrázek 2 – Struktura typického zástupce enzymů rodiny HAD

Krystalová struktura 3-deoxy-D-manno-oktulosonát-8-fosfát fosfatasy KdsC (PDB kód 1k1e), typického zástupce rodiny HAD. **(a)** V centru struktury je zvýrazněn centrální β -skládaný list (žlutá a modrá) tvořený celkem 6 paralelními řetězci a obklopený sérií α -helixů; toto uspořádání lze nazvat jako *Rossmann-like* sbalení. Podobně jako na Obrázku 1 (str. 13) je žlutě zvýrazněn řetězec označovaný jako S1, celkové pořadí jednotlivých řetězců je pak (vzhledem k poloze od N-konce v sekvenci proteinu) zleva S3-S2-S1-S4-S5-S6. **(b)** *Rossmann-like* sbalení tvoří jádro domény *core*, jejíž součástí jsou také smyčky L1 (žlutá), L2 (tyrkysová), L3 (fialová) a L4 (oranžová). Tyto smyčky tvoří aktivní místo enzymu a obsahují katalyticky významné konzervované sekvenční motivy I-IV (Motiv I je součástí smyčky L1, motiv II smyčky L2, motiv III smyčky L3 a motiv IV smyčky L4). Prostřednictvím těchto smyček je koordinován iont Co^{2+} (černá), jenž se spolu se smyčkami L1-4 podílí na vazbě molekuly SO_4^{2-} v aktivním místě. Fyziologickými ligandy jsou však kofaktor Mg^{2+} a substrát nesoucí fosfát (Obrázek 3, str. 16). Ve struktuře jsou dále vyznačeny charakteristické strukturální motivy *flap* (zelená) a *squiggle* (purpurová). Červeně jsou zvýrazněna místa pro vložení *cap* domény typu C0 či C1 (C1 pozice), resp. typu C0 či C2 (C2 pozice). Obrázek byl vytvořen v programu PyMOL 1.5.0.2 (DeLano Scientific LLC, San Francisco, CA, USA) a upraven v programu Inkscape 0.92.4.

Konzervované sekvenční motivy

Aktivní místo je tvořeno celkem pěti konzervovanými sekvenčními motivy, jež se označují římskými číslicemi I-V. Motiv I, II, III a IV leží na odpovídajících smyčkách L1-L4 a jsou tedy součástí domény *core*, kdežto motiv V je součástí smyčky L5 a náleží doméně *cap*. V případě motivů I-IV se jedná o význačný identifikační prvek, který je charakteristický téměř pro všechny členy rodiny HAD [9].

Motiv I se nachází na smyčce L1 na konci řetězce S1 a zpravidla jej tvoří sled aminokyselin DxD, kde x je libovolná biogenní aminokyselina. Karboxylová skupina postranního řetězce v pořadí prvního aspartátu, Asp(n), a karboxylová skupina v pořadí druhého aspartátu, Asp(n+2), se podílí na koordinaci kofaktoru – iontu Mg^{2+} (Obrázek 3). V průběhu katalytické reakce vystupuje Asp(n) jako nukleofil a vytváří kovalentní intermediát s molekulou substrátu, zatímco druhý Asp(n+2) může sloužit jako obecná kyselina, respektive báze (viz kapitola 1.3.3) [4, 8, 13]. Významnou výjimku v sekvenci motivu I na pozici Asp(n+2) tvoří ATPasy a fosfonatasy. V případě ATPas se na této pozici vyskytuje threonin, což má za následek pomalejší průběh katalytické reakce [4, 7]. Fosfonatasy nesou na téže pozici alanin, což však nenarušuje jejich katalytickou aktivitu, neboť hydrolytická reakce těchto enzymů probíhá odlišným mechanismem než u ostatních enzymových podskupin rodiny HAD [9, 14]. Kromě těchto dvou hlavních výjimek byly na pozici Asp(n+2) zaznamenány ještě další odlišné aminokyselinové zbytky, nicméně zatím bez velké četnosti výskytu napříč touto enzymovou rodinou [4].



Obrázek 3 – Obecné schematické znázornění uspořádání vazby substrátu a kofaktoru Mg^{2+} do aktivního místa fosfatasy a fosfotransferasy rodiny HAD. Upraveno v programu Inkscape 0.92.4 podle a převzato z: [4].

Motiv II, tvořený vždy buďto serinem nebo threoninem (tj. sekvence motivu II je S/T), je součástí smyčky L2 a leží na konci řetězce S2. Postranní řetězec konzervovaného S/T napomáhá ke správné orientaci substrátu v aktivním místě tím, že prostřednictvím vodíkové

vazby váže přenášenou fosfátovou skupinu substrátu. Motiv III v podobě konzervovaného lysinu nebo argininu (tj. sekvence motivu III je K/R), se vyskytuje buďto ve smyčce L3 propojující řetězec S4 a jemu předcházející α -helix anebo je přímo součástí onoho α -helixu. Vzhledem k této nejednotné lokalizaci je motiv III, oproti ostatním třem, pouze slabě konzervovaný. Spolu s motivem II přispívají prostřednictvím postranních řetězců svých konzervovaných zbytků ke stabilizaci negativního náboje reakčních intermediátů v průběhu hydrolytické reakce (Obrázek 4, str. 18) [4, 7, 8, 13].

Přímou součástí řetězce S4 je motiv IV, který se nachází na jeho C-konci ve smyčce L4 [4, 9]. Tvoří jej dva vysoce konzervované Asp a vyskytují se nejčastěji v jednom ze tří následujících sekvenčních sledů: DD, GDxxxD či GDxxxxD. Postranní řetězce obou konzervovaných aspartátů motivu IV se podílejí spolu s oběma aspartáty motivu I na koordinaci kofaktoru Mg^{2+} (Obrázek 3, str. 16) [4, 8].

Sekvenční motiv V je lokalizován ve strukturním motivu helix-smyčka-helix, který leží na N-konci domény *cap* a napojuje ji k doméně *core*. Základem motivu V je vysoce konzervovaný glycin umístěný přímo v otočce β -vlásenky a je obklopen dalšími aminokyselinovými zbytky charakteristickými pro jednotlivé podskupiny rodiny HAD. Ty jsou svými postranními řetězci součástí aktivního místa, když je daný enzym v uzavřené konformaci [9]. Všechny výše popsané konzervované sekvenční motivy mají klíčové role a jsou nepostradatelné pro katalytickou funkci. Zprostředkovávají vazbu substrátu a kofaktoru v aktivním místě, podílejí se na desolvataci substrátu a jsou hlavními aktéry v hydrolytických reakcích katalyzovaných enzymy rodiny HAD [4, 9, 15].

1.3.3 Katalytická aktivita enzymů rodiny HAD

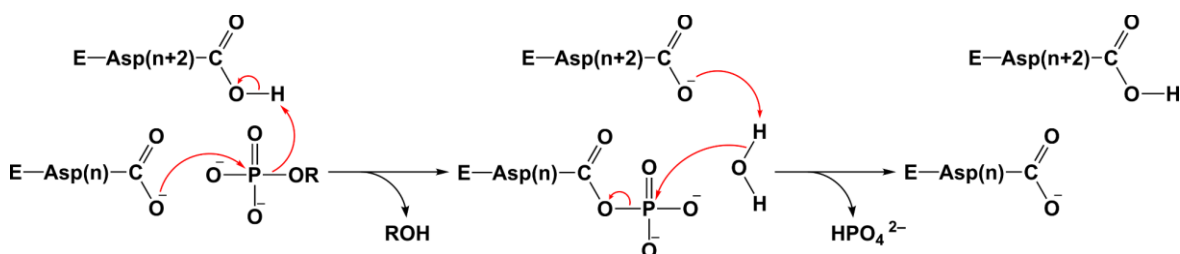
Mechanismus hydrolytické reakce katalyzované fosfatasami

Hydrolytická reakce katalyzovaná enzymy rodiny HAD s fosfatasovou aktivitou probíhá ve dvou dílčích reakčních krocích mechanismem nukleofilní substituce (Obrázek 4, str. 18). Vlastní reakci předchází dva klíčové děje: (1) po navázání substrátu do aktivního místa přechází konformace enzymu z otevřené na uzavřenou a (2) prostřednictvím motivů *squiggle* a *flap* jsou posléze z aktivního místa vytěsněny molekuly rozpouštědla. Kofaktor, tj. iont Mg^{2+} , v aktivním místě interaguje se záporně nabitou fosfátovou skupinou na substrátu, čímž vytváří vhodné podmínky pro první krok reakce [4]. Uspořádání substrátu v aktivním místě enzymu je schematicky vyobrazeno na Obrázku 3 na str. 16.

Následně dochází k prvnímu kroku reakce, při němž je fosfátová skupina přenesena z molekuly substrátu na enzym. Karboxylová skupina Asp(n) motivu I. provádí nukleofilní atak na atom fosforu fosfátové skupiny, zatímco kyselá karboxylová skupina Asp(n+2) téhož motivu protonuje zbylou část molekuly substrátu. Tato část se následně odštěpuje od fosfátové skupiny. Vzniká reakční intermediát enzym-fosfát, který má formu

aspartylfosfátu, v němž je fosfát kovalentně vázán esterovou vazbou na karboxyl Asp(n) molekuly enzymu. Záporný náboj na molekule fosfátu je v intermediátu stabilizován kladně nabitými postranními řetězci aminokyselin lysinu a serinu/threoninu z konzervovaných motivů II a III. Enzym posléze přechází do otevřené konformace a z aktivního místa odstupuje první produkt reakce ve formě alkoholu.

Ve druhém reakčním kroku je fosfátová skupina přenesena z karboxylové skupiny Asp(n) na akceptor, kterým je v případě fosfatas molekula H₂O. Pro tento přenos je využita energie obsažená v esterové vazbě aspartylfosfátového intermediátu. Molekula H₂O přistupuje do aktivního místa enzymu, jenž se ještě stále nachází v otevřené konformaci, a vede nukleofilní atak na reakční intermediát. Současně postupuje proton karboxylové skupině Asp(n+2), která nyní po prvním reakčním kroku vystupuje jako báze. Výsledkem tohoto synchronizovaného procesu je přenos fosfátové skupiny na hydroxyl molekuly vody a odštěpení fosfátu z aktivního místa za jeho současné regenerace [4, 7, 8].



Obrázek 4 – Obecný reakční mechanismus hydrolytické reakce katalyzované fosfatasami rodiny HAD
Průběh celé reakce je popsán v textu, viz kapitola 1.3.3. Obrázek byl vytvořen podle a převzat z: [8, 15].

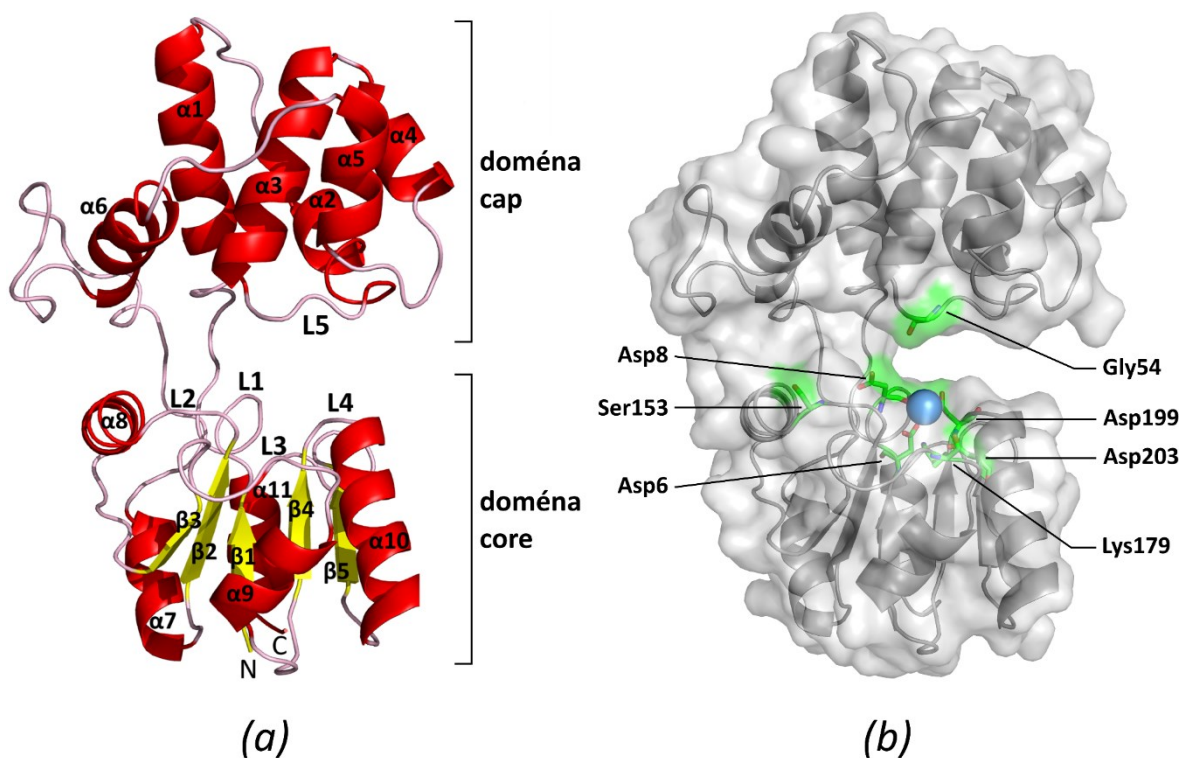
Výše popsaný mechanismus je pravděpodobně stále jediným, který byl dosud pozorován u fosfatas z rodiny HAD. Zástupci z řad těchto fosfatas, jejichž biologická funkce je alespoň zčásti známa, se svou katalytickou aktivitou podílí na mnohdy důležitých buněčných pochodech. Jednou z takových fosfatas rodiny HAD je cytosolická purinová 5'-nukleotidasa II, jíž je věnována kapitola 1.6. Naproti tomu jedním z mnoha enzymů této rodiny, jejichž katalytická a biologická funkce není objasněna, je fosfatasa Tt82, o níž pojednává kapitola 1.4.

1.4 Fosfatasa Tt82

Enzym nesoucí označení Tt82, jehož fosfatasová aktivita byla studována v praktické části této diplomové práce, pochází z termofilní archebakterie *Thermococcus thio-reducens*. Jedná se o obligátně anaerobní organismus redukuující síru a snášející teplotu až 94 °C. Poprvé byl izolován v roce 1999 ze vzorku shromážděného z hydrotermálního průduchu Rainbow (angl. *Rainbow hydrothermal vent*), který se nachází na dně středo-atlantského hřbetu v hloubce 2300 m [16]. Termofilní charakter archebakterie se odráží ve fyzikálních vlastnostech enzymu Tt82, který vykazuje stabilitu do teploty nejméně 75 °C [5]. Biologická funkce enzymu v tomto organismu však zatím není objasněna.

1.4.1 Struktura Tt82 a jeho příslušnost k rodině HAD

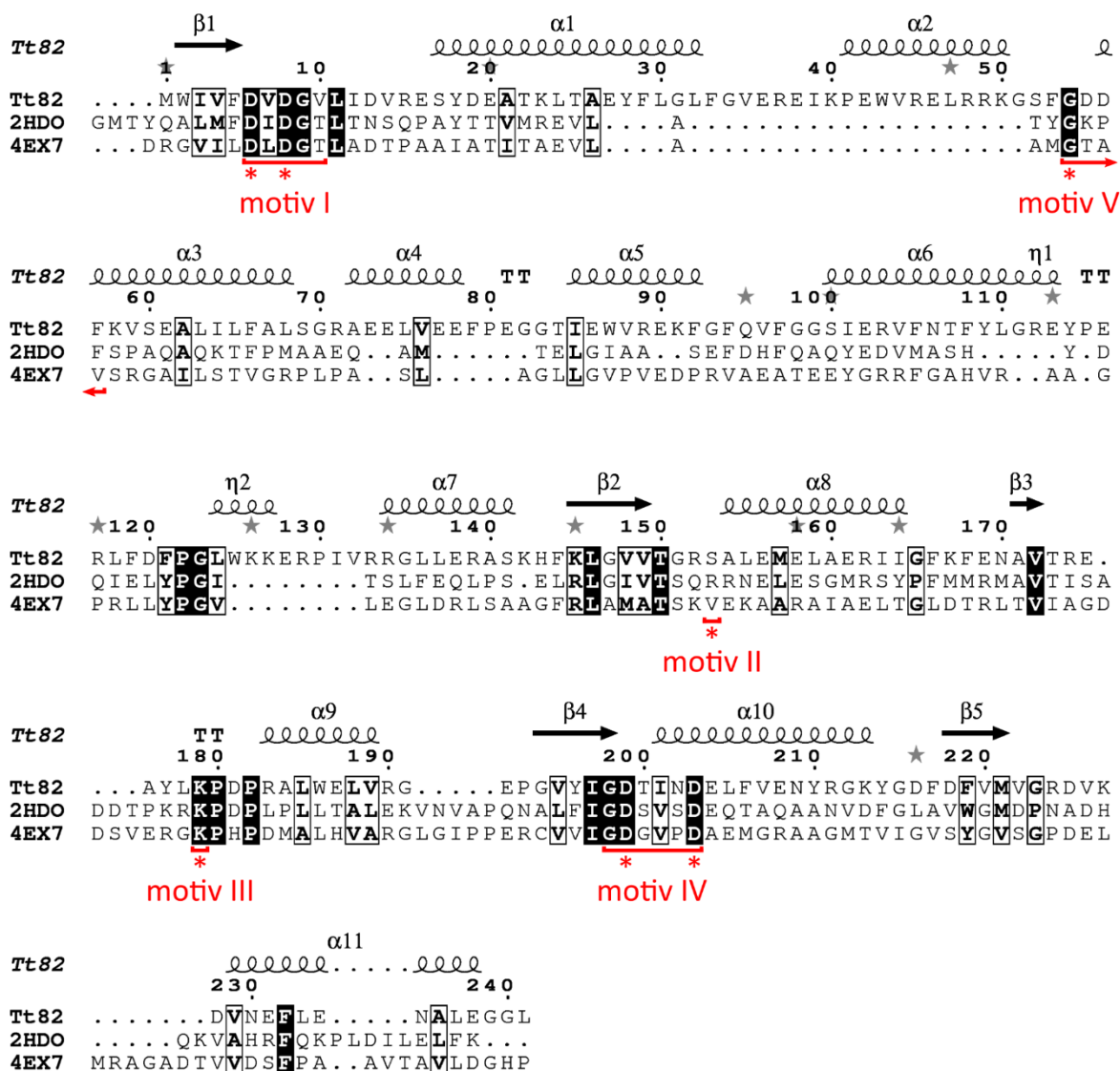
Enzym Tt82 je tvořen 241 aminokyselin dlouhým proteinovým řetězcem, který v nativním stavu vytváří monomerní uspořádání (Obrázek 5) o molekulové hmotnosti přibližně 27,9 kDa. Struktura nativního proteinu byla vyřešena prostřednictvím rentgenové krystalografie s rozlišením 1,75 Å (PDB kód 6iah) a je tvořena 11 α -helixy a 5 β -skládanými listy, které jsou od N-konce proteinového řetězce uspořádány v pořadí β 1- α 1- α 2- α 3- α 4- α 5- α 6- α 7- β 2- α 8- β 3- α 9- β 4- α 10- β 5- α 11 (Obrázek 5A). Prvky sekundární struktury vytváří dvě zřetelně odlišitelné domény *cap* a *core*. Doména *core*, kterou tvoří aminokyselinové zbytky s pořadím 1-12 a 128-240 v aminokyselinové sekvenci proteinu, je uspořádána do strukturního motivu třívrstvého β/α sendviče a zřetelně tedy zaujímá *Rossmann-like* sbalení. Dva linkery, tvořené aminokyselinami 13-18 a 123-127, spojují doménu *core* s doménou *cap*, jež se řadí mezi *cap* domény typu C1 a je složena z aminokyselin 19-122 [5].



Obrázek 5 – Krystalová struktura Tt82 (PDB kód 2hdo)

(a) Struktura enzymu Tt82 je tvořena doménami *cap* a *core*. Doména *core* obsahuje *Rossmann-like* sbalení, tj. centrální β -skládaný list (žlutá) obklopený sérií α -helixů. Doména *cap* typu C1 je tvořena svazkem šesti α -helixů. Ve struktuře jsou vyznačeny smyčky L1-L5 nesoucí konzervované sekvenční motivy I-V. Označeny jsou také N-konec a C-konec proteinového řetězce. (b) Aktivní místo Tt82 (zelená) je tvořeno aminokyselinovými zbytky konzervovaných sekvenčních motivů I-V, které jsou součástí smyček L1-L5. Zbytky Asp6 a Asp8 náleží motivu I (smyčka L1), Ser153 motivu II (smyčka L2), Lys179 motivu III (smyčka L3), Asp199 a Asp203 motivu IV (smyčka L4) a Gly54 motivu V (smyčka L5). Kofaktor Mg^{2+} koordinovaný v aktivním místě je vyznačen modrou sférou. Obrázek byl vytvořen v programu PyMOL 1.5.0.2 (DeLano Scientific LLC, San Francisco, CA, USA) a upraven v programu Inkscape 0.92.4. Obrázek (a) byl převzat z: [5].

Příslušnost Tt82 k rodině HAD byla určena na základě přítomnosti *Rossmann-like* sbalení a strukturní homologie s mnoha dalšími enzymy z této rodiny. Sekvenční a strukturní srovnání se dvěma vybranými blízkými homology (Obrázek 6, resp. Obrázek 7, str. 22), fosfoglykolát fosfatasou pocházející z prokaryotního organismu *Lactobacillus plantarum* (PDB kód 2hdo) a alumycin P fosfatasou pocházející z prokaryotního organismu (PDB kód 4ex7), odhalilo ve struktuře Tt82 konzervované sekvenční motivy I, II a IV [5] (Obrázek 6) typické pro rodinu HAD [4, 9]. Dále struktura obsahuje nepříliš konzervovaný motiv III [5].



Obrázek 6 – Srovnání sekvence Tt82 se sekvencemi dvou strukturně podobných fosfatas z rodiny HAD

Sekvence Tt82 sdílí se sekvencí fosfoglykolát fosfatasy (PDB kód 2hdo) 22% identitu, se sekvencí alumycin P fosfatasy (PDB kód 4ex7) pak 27% identitu. Červeně jsou vyznačeny konzervované sekvenční motivy I-V. Nad aminokyselinovou sekvencí Tt82 jsou rovněž zvýrazněny a označeny pozice jednotlivých prvků sekundární struktury: α pro α -helix, β pro β -skládaný list, η pro 3_{10} -helix, TT pro β -ohyb. Vytvořeno prostřednictvím programů Clustal Omega [17], ESPrpt 3.x [18] a Inkscape 0.92.4 podle: [5].

Aktivní místo enzymu je tvořeno aminokyselinovými zbytky, které jsou lokalizovány na celkem pěti smyčkách označených L1-L5 (Obrázek 5, str. 19). Smyčka L5 je součástí domény *cap* a nese konzervovanou aminokyselinu Gly54, jejímž významem je určení substrátové specifity enzymu. Smyčky L1-L4 jsou naproti tomu součástí domény *core* a nesou aminokyselinové zbytky, které jsou přímo zodpovědné za uskutečnění katalytické reakce enzymu. Smyčka L1 nese aminokyseliny Asp6 a Asp8 a spojuje prvky sekundární struktury β 1 a α 1, smyčka L2 obsahuje Ser153 a spojuje prvky β 2 a α 8, smyčka L3 spojuje prvky β 3 a α 9 a zahrnuje Lys179. Smyčka L4, která spojuje prvky β 4 a α 10, obsahuje konzervované aminokyseliny Asp199 a Asp203. Součástí aktivního místa je iont Mg^{2+} , jenž je v aktivním místě koordinován třemi molekulami vody, karboxylovými skupinami postranních řetězců Asp6 a Asp199 a karbonylovou skupinou aminokyseliny Asp8 ležící na hlavním proteinovém řetězci [5].

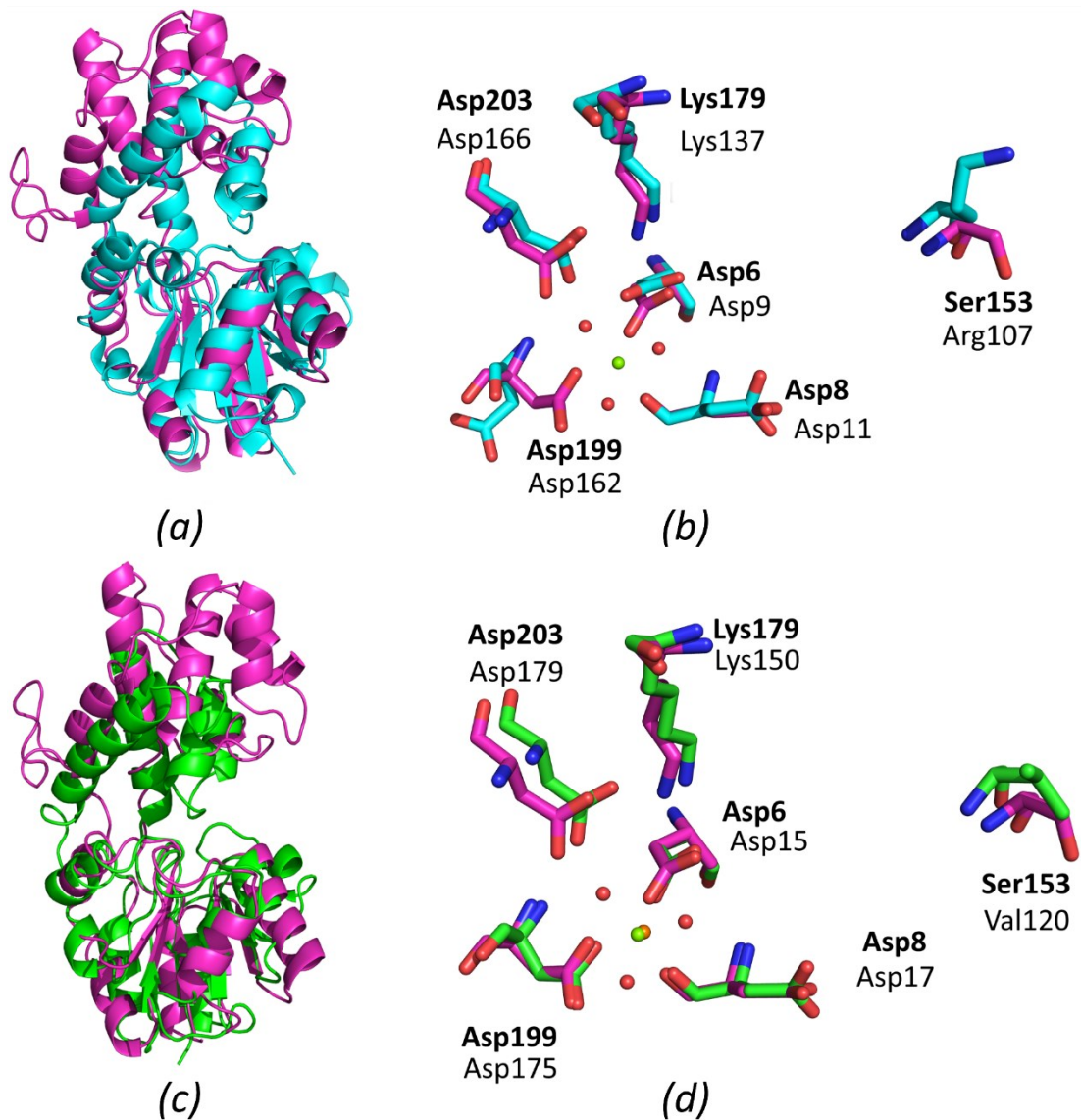
1.4.2 Substrátová specifita Tt82

Struktura aktivního místa a příslušnost k rodině HAD potvrdily, že enzym Tt82 patří do enzymové skupiny hydrolas. S vysokou pravděpodobností se jedná o fosfatasu, avšak nejsou zatím známy žádné její substráty. Krystalová struktura Tt82 byla využita k navržení potenciálních substrátů metodou molekulového dokování [19] provedeného a vyhodnoceného ve spolupracující laboratoři [5]. Sada těchto potenciálních substrátů Tt82 byla sestavena na základě seznamu nejběžnějších substrátů enzymů z rodiny HAD [10] a obsahovala 30 následujících sloučenin:

2-deoxy-6-fosfoglucitol	arabinsa-5-fosfát	D-sorbitol-6-fosfát
2-deoxy-D-glukosa-6-fosfát	D-allitol-6-fosfát	glycerol-1-fosfát
2-deoxy-D-ribitol-5-fosfát	D-erythritol-4-fosfát	glycerol-2-fosfát
2-deoxy-D-ribonát-5-fosfát	D-glukosa-1-fosfát	imidodifosfát
2-deoxy-D-ribosa-5-fosfát	D-glukosa-6-fosfát	L-arabitol-1-fosfát
3-deoxy-D-glukonát-6-fosfát	D-lyxosa-5-fosfát	L-xylitol-5-fosfát
3-deoxy-D-glukosa-6-fosfát	D-mannitol-6-fosfát	L-xylonát-5-fosfát
3-deoxy-D-sorbitol-6-fosfát	D-ribitol-5-fosfát	<i>p</i> -nitrofenylfosfát
acetylfosfát	D-ribonát-5-fosfát	pyridoxal-5-fosfát
adenosin 5'-monofosfát	D-sorbitol-1-fosfát	riboflavin-5-fosfát

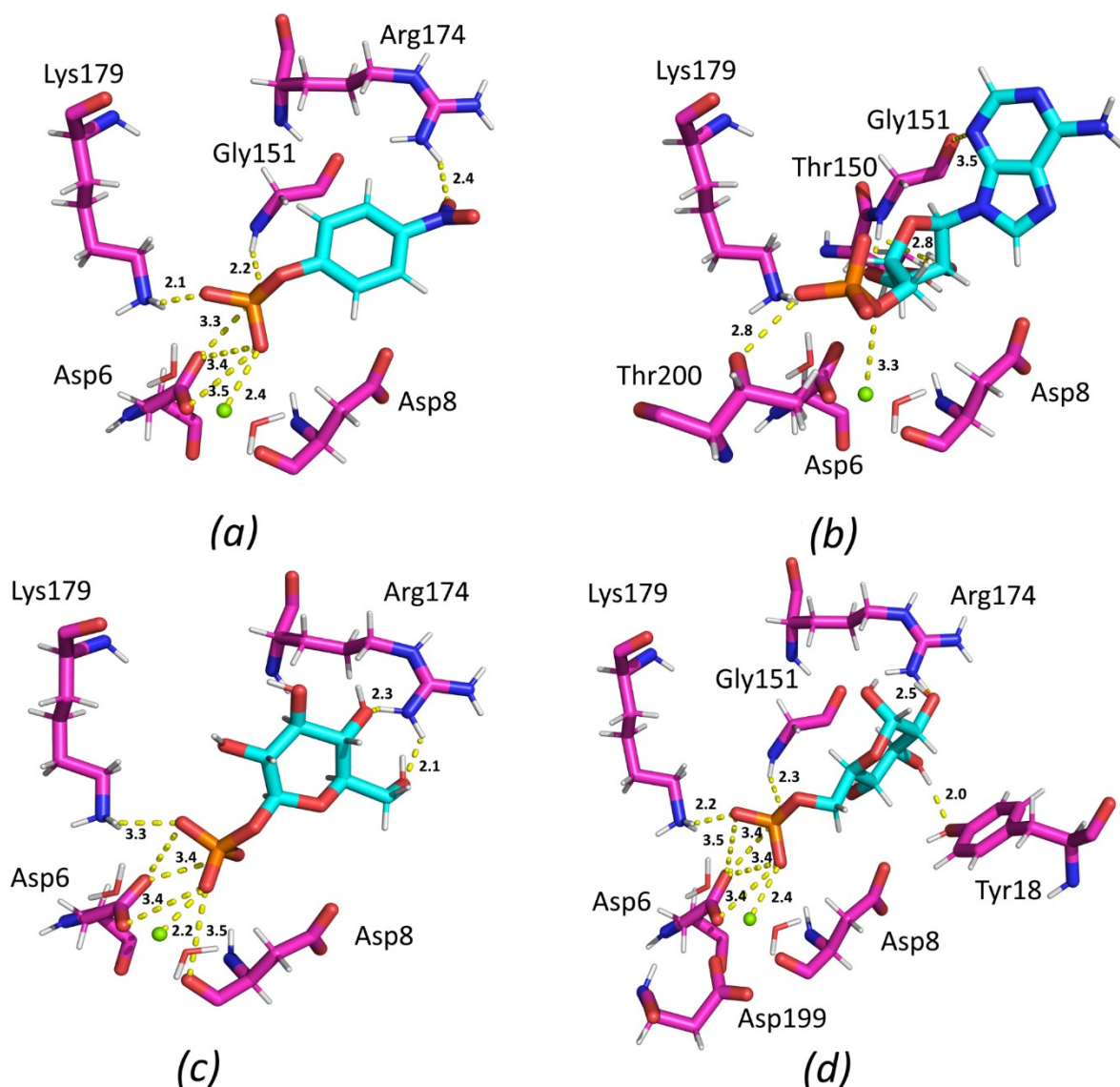
Výsledky molekulového dokování Tt82 se sadou 30 výše uvedených sloučenin jsou v této diplomové práci ilustrovány Obrázkem 8 na str. 23. Detailní výsledky (o poloze ligandu v aktivním místě, počtu vodíkových vazeb mezi ligandem a proteinem a množství atomů proteinu a ligandu zapojených do tvorby těchto vodíkových vazeb) jsou uvedeny v odborné

publikaci [5]. V experimentální části této diplomové práce byly použity pro výběr konečného souboru molekul, na němž byla experimentálně testována fosfatasová aktivita Tt82 (viz kapitoly 3-6).



Obrázek 7 – Porovnání struktury Tt82 se dvěma strukturálními homology z rodiny HAD

(a) Superpozice terciární struktury Tt82 (purpurová) s terciární strukturou fosfoglykolát fosfatasy (azurová, PDB kód 2hdo). (b) Superpozice aktivního místa Tt82 (purpurová) a fosfoglykolát fosfatasy (azurová, PDB kód 2hdo). (c) Superpozice terciární struktury Tt82 (purpurová) s terciární strukturou alumycin P fosfatasy (zelená, PDB kód 4ex7). (d) Superpozice aktivního místa Tt82 (purpurová) a alumycin P fosfatasy (zelená, PDB kód 4ex7). Pozn.: Část Arg107 v obrázku (b) není vyobrazena. Převzato z: [5].



Obrázek 8 – Predikované potenciální substráty Tt82 zasazené do aktivního místa pomocí molekulového dokování
 Na obrázku je vyobrazena molekula: (a) *para*-nitrofenylfosfátu; (b) AMP; (c) D-glukosa-1-fosfát; (d) D-glukosa-6-fosfát. Molekuly jsou v aktivním místě vázány vodíkovými můstky (žlutá), jejichž délky jsou uvedeny v jednotkách Å. Červeně jsou znázorněny atomy kyslíku, modře atomy dusíku, bílé atomy vodíku, oranžově atomy fosforu. Purpurově jsou zbarveny atomy uhlíku aminokyselin aktivního místa, světle modře pak atomy uhlíku náležících molekulám predikovaných substrátů. Zeleně je vyznačen kofaktor – iont Mg^{2+} . Převzato z: [5].

1.5 Lidské intracelulární 5'-nukleotidasy z rodiny HAD

Mezi zástupce fosfatas z rodiny HAD se řadí také šest enzymů, které patří do skupiny lidských intracelulárních 5'-nukleotidas (E.C. 3.1.3.5). Těmi jsou cytosolická 5'-nukleotidasa IA a IB (cN-IA a cN-IB), cytosolická purinová 5'-nukleotidasa II (cN-II), cytosolická 5'-nukleotidasa III (cN-III), cytosolická 5'(3')-deoxy-ribonukleotidasa (cdN) a mitochondriální 5'(3')-deoxy-ribonukleotidasa (mdN). Z charakteristických motivů rodiny HAD obsahuje všech 6 enzymů přinejmenším konzervované sekvenční motivy I a V,

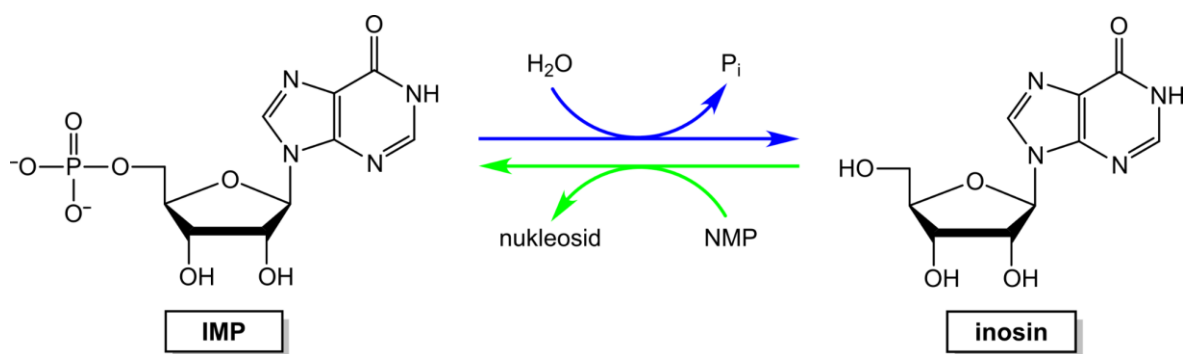
nicméně cN-II, cN-III, cdN a mdN nesou také motivy II-IV [13]. Krystalové struktury těchto čtyř jmenovaných nukleotidas dále odhalily přítomnost domény *cap* a *Rossmann-like* sbalení v jádře domény *core* [20, 21].

Výše jmenované enzymy katalyzují defosforylaci (2'-deoxy)ribonukleosid-5'-monofosfátů na příslušné (2'-deoxy)ribonukleosidy. Uvnitř buněk tvoří důležitý článek v regulaci intracelulární hladiny nukleotidů a svou katalytickou aktivitou působí protichůdně vůči katalytické aktivitě nukleosid kinas. Vzájemně se od sebe odlišují primární strukturou, různou mírou afinity vůči svým substrátům, lokalizací uvnitř buňky i distribucí v různých typech tkání. K expresi cN-II, cdN a mdN dochází v buňkách všech typů tkání, kdežto cN-I a cN-III jsou exprimovány pouze ve specifických tkáních. S některými z uvedených enzymů jsou spojeny také patologické souvislosti [13, 22, 23]. Jedním z příkladů je deficit cN-III zapříčiněný mutacemi v genu NT5C3, které vedou ke ztrátě funkce enzymu (angl. *loss of function*). Následkem toho vzniká autosomálně recesivní dědičné onemocnění – hemolytická anemie [24, 25]. Změny v enzymové aktivitě cN-IA, cN-III a zejména cN-II byly asociovány s nežádoucí změnou v responsivitě nádorových buněk vůči určitým protinádorovým léčivům podávaným při chemoterapii [26-30]. Nukleotidasa cN-II je nicméně spjata ještě s několika dalšími onemocněními (viz kapitola 1.6.5).

1.6 Cytosolická purinová 5'-nukleotidasa II

1.6.1 Základní vlastnosti a katalytická funkce

Nukleotidasa cN-II se vyskytuje v cytosolu (rozpuštěná část cytoplasmy) a je exprimována v buňkách všech lidských tkání, přičemž nejhojněji v pankreatu, kosterní svalovině a srdeční svalovině [22, 31-34]. Jedná se o bifunkční enzym, který primárně vystupuje jako fosfatasa nukleotidů (tj. nukleotidasa), ale vykazuje rovněž aktivitu fosfotransferasovou. Coby nukleotidasa katalyzuje hydrolytickou defosforylaci (2'-deoxy)ribonukleosid-5'-monofosfátů odvozených od 6-hydroxypurinu za vzniku příslušných (2'-deoxy)ribonukleosidů a volného fosfátového iontu (Obrázek 9, str. 25) [31, 32]. Tato reakce probíhá mechanismem, který je popsán v kapitole 1.3.3. Prostřednictvím fosfotransferasové aktivity zprostředkovává přenos fosfátové skupiny z molekuly (2'-deoxy)ribonukleosid-5'-monofosfátu na molekulu (2'-deoxy)ribonukleosidu, kterým jsou nejčastěji inosin nebo deoxyinosin (Obrázek 9, str. 25) [35]. Nukleotidasová i fosfotransferasová aktivita probíhají zpočátku stejným mechanismem, kdy dochází k vytvoření kovalentního enzym-fosfátového intermediátu (kapitola 1.3.3). Při nukleotidasové reakci je pak následně fosfátová skupina přenesena na molekulu H₂O, kdežto v případě fosfotransferasové reakce na molekulu nukleosidu [36, 37].



Obrázek 9 – Nukleotidasová a fosfotransferasová aktivita cN-II

Reakce katalyzovaná nukleotidasovou aktivitou cN-II je naznačena modře, fosfotransferasovou aktivitou pak zeleně. Substrátem nukleotidasové reakce mohou být kromě IMP ještě další purinové nukleotidy a jejich příslušné 2'-deoxy-analogy (viz odstavec níže), kdežto substrátem fosfotransferasové reakce je primárně (2'-deoxy)inosin. Donorem fosfátu ve fosfotransferasové reakci může být jakýkoliv (2'-deoxy)ribonukleosid-5'-monofosfát (NMP). Obrázek reakčního schématu byl vytvořen v programu ChemBioDraw Ultra12.0.2 (© 1986-2010 CambridgeSoft.) a upraven v programu Inkscape 0.92.4.

Upřednostňovanými substráty cN-II jsou purinové nukleotidy inosin-5'-monofosfát (IMP), guanosin-5'-monofosfát (GMP), xantosin-5'-monofosfát (XMP) a jejich příslušné 2'-deoxy-analogy. Adenosin-5'-monofosfát (AMP), 2'-deoxyadenosin-5'-monofosfát (dAMP) a pyrimidinové nukleosid-5'-monofosfáty jsou naproti tomu převážně slabými substráty. Nejvyšší katalytickou aktivitu vykazuje vůči IMP a GMP [31, 32, 35], proto je tento enzym označován též jako IMP-GMP specifická/selektivní nukleotidasa [38, 39]. Přesto však má vůči svým substrátům relativně nízkou afinitu. Michaelisova konstanta, K_m , pro IMP i GMP se pohybuje v oblasti desetin mM [31, 32], na základě čehož cN-II získala svůj další název: 5'-nukleotidasa s vysokým K_m (z angl. *high K_m 5'-nucleotidase*) [31].

Katalytická aktivita cN-II (nukleotidasová i fosfotransferasová) je bezpodmínečně závislá na přítomnosti Mg^{2+} iontů [31, 32], což je v souladu s obecnými vlastnostmi ostatních fosfatas z rodiny HAD (viz kapitola 1.3). Na rozdíl od ostatních lidských nukleotidas uvedených v kapitole 1.5 je regulována allosterickými mechanismy [20, 31, 32] (viz kapitola 1.6.3) prostřednictvím několika efektorů. Tyto efekторы se váží do allosterického místa, které se nachází poblíž aktivního místa enzymu (viz kapitola 1.6.2). Přírozenými aktivátory jsou nukleosid-5'-trifosfáty, některé nukleosid-5'-difosfáty, dále pak také 2,3-bisfosfoglycerát (2,3-BPG) a některé diadenosinpolyfosfáty (Ap_nA). Následující allosterické aktivátory cN-II jsou seřazeny podle klesající účinnosti aktivace: 2'-deoxyadenosin-5'-trifosfát (dATP) > diadenosin-5',5'''-tetrafosfát (Ap_4A) > adenosin-5'-trifosfát (ATP) = 2,3-BPG > guanosin-5'-trifosfát (GTP) > adenosin-5'-difosfát (ADP) [31, 32, 40]. Fyziologickým inhibítozem cN-II jsou volné fosfátové ionty. Jejich inhibiční efekt se projevuje i v přítomnosti allosterického aktivátoru a je silnější zejména v nižších koncentracích substrátu [31]. Vliv na aktivitu má vedle allosterické modulace také

hodnota pH. Pro nukleotidasovou aktivitu leží pH optimum v rozmezí 6,3-6,5 [31, 32], kdežto pro fosfotransferasovou aktivitu leží tentýž parametr v rozmezí 7,0-7,2 [35].

V buňce je nukleotidasová aktivita cN-II závislá na energetickém stavu buňky. V energeticky bohatém stavu, tj. při dostatečné intracelulární koncentraci ATP, dochází k allosterické aktivaci cN-II. Opačný případ nastává při nízkém energetickém stavu, v anoxii či ischemii. Zásoby ATP jsou postupně vyčerpány, což současně vede k nahromadění volných fosfátových iontů v buňce. Jejich zvýšená koncentrace následně inhibuje aktivitu cN-II a tím brání hydrolýze IMP a GMP, která by v takovém stavu vedla k nežádoucím ztrátám purinových nukleotidů [41, 42]. K fosfotransferasové aktivitě cN-II dochází v přítomnosti dostatečného množství vhodného nukleosidového akceptoru, tj. zejména (deoxy)inosinu [35].

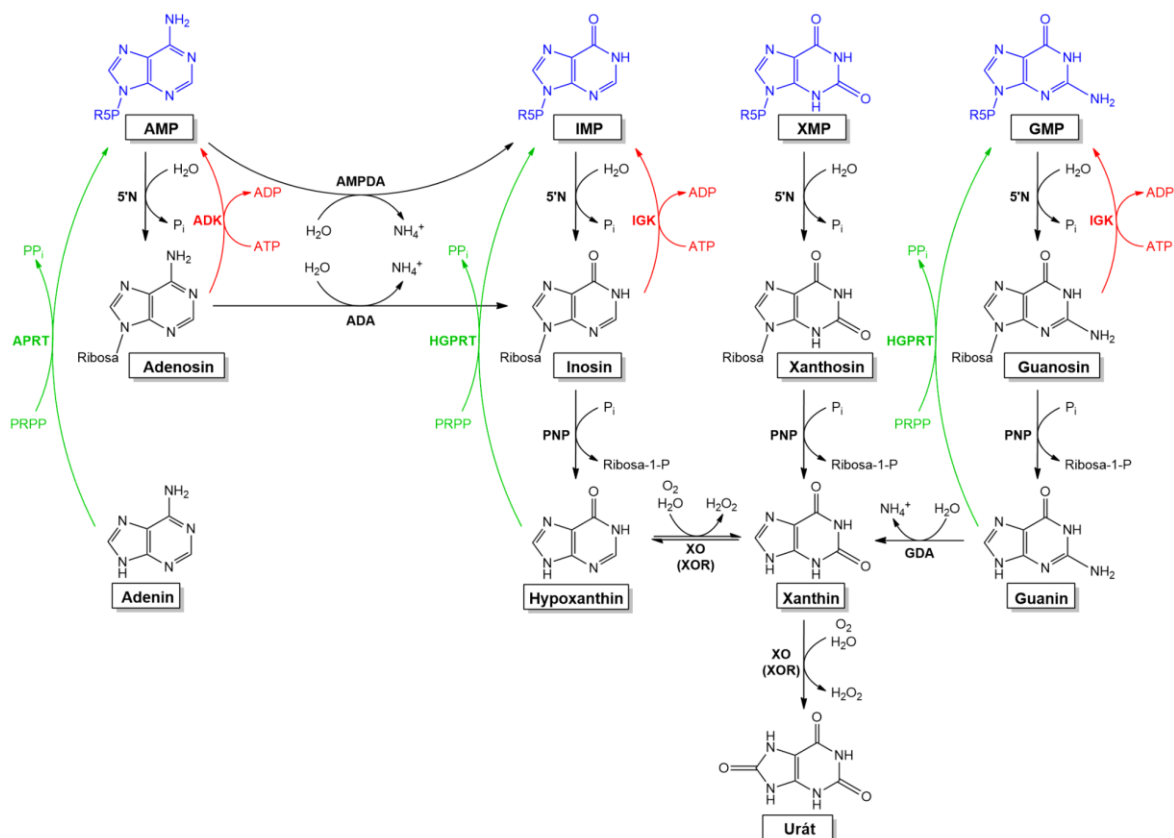
Nukleotidasová aktivita cN-II je zapojena do metabolismu purinů, který se skládá ze tří synchronizovaných metabolických procesů. Těmi jsou *de novo* syntéza, degradace a resyntéza (angl. *salvage pathway*) purinových nukleotidů, přičemž cN-II katalyzuje a reguluje první krok degradační dráhy. Součinností regulované aktivity cN-II s aktivitou enzymů zapojených do resyntézy (Obrázek 10, str. 27) je zajištěna citlivá regulace hladiny purinových nukleotidů v buňkách [43, 44].

1.6.2 Struktura cN-II

Kvarterní struktura

Protein cN-II je zakódován v genu NT5C2 ležícím na chromosomu 10 v úseku 10q24.32-q24.33 [38]. Expresí tohoto genu vzniká 561 aminokyselin dlouhý proteinový řetězec o molekulové hmotnosti 65 kDa [45, 46]. Sekvence proteinu je uvedena na Obrázku 11 na str. 28. V nativním stavu cN-II tvoří homotetramer o molekulové hmotnosti 260 kDa, který je složen ze dvou identických dimerů (Obrázek 12B, str. 30) a označuje se proto též jako dimer dimerů (angl. *dimer of dimers*) [20]. Právě dimerní uspořádání je nejmenší katalyticky aktivní jednotkou cN-II [47].

Dimerní uspořádání vzniká propojením dvou identických protomerů, čehož je docíleno prostřednictvím tzv. oligomerního rozhraní A (angl. *oligomeric interface A*), viz Obrázek 12B na str. 30. Ze dvou dimerů je následně vybudováno homotetramerní uspořádání, v němž jsou oba dimery propojeny kontakty na tzv. oligomerním rozhraní B (angl. *oligomeric interface B*), viz Obrázek 12B na str. 30. Oligomerní rozhraní A je tvořeno 53 aminokyselinovými zbytky od každé podjednotky dimeru, z nichž 19 zprostředkovává vazbu přilehlých podjednotek prostřednictvím vodíkových můstků a 4 prostřednictvím iontových vazeb. Oproti tomu oligomerní rozhraní B obsahuje z každé podjednotky dimeru pouze 28 aminokyselinových zbytků, z nichž pouze 8 vytváří mezi podjednotkami vodíkové můstky [20].

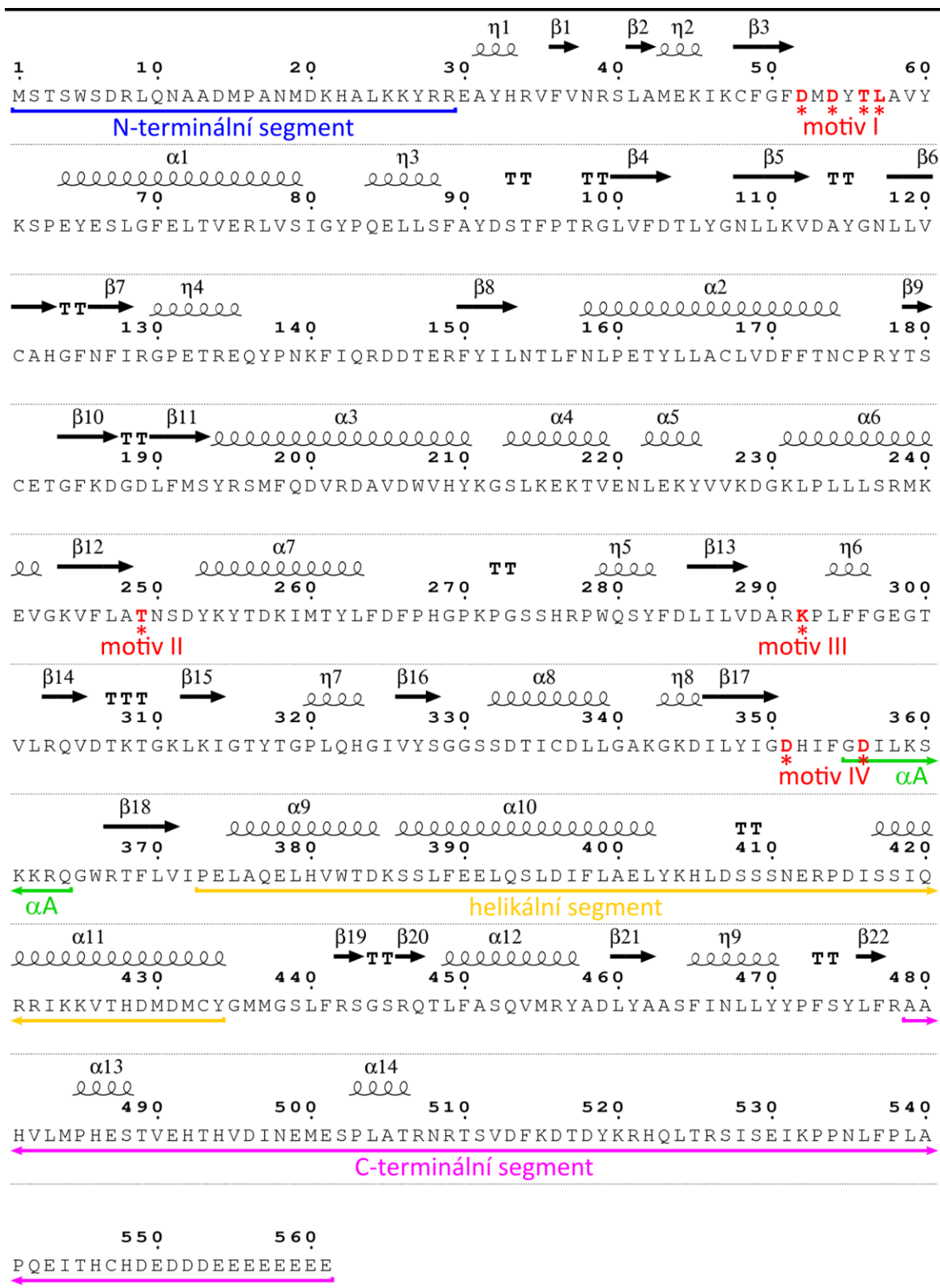


Obrázek 10 – Metabolismus purinů v lidských buňkách

Na obrázku je vyobrazena degradační dráha purinových nukleotidů (černá) a jejich zpětná resyntéza (zelená a červená). Dráha *de novo* syntézy purinových nukleotidů není součástí obrázku a je prezentována pouze jejími produkty (modrá). První krok degradace je katalyzován 5'-nukleotidasami (zkr. 5'N), mezi něž se řadí právě také cN-II. Hlavní roli v resyntéze nukleotidů pak hraje enzym hypoxanthin-guanin fosforybosyl transferasa (HGPRT), který je zároveň klíčový pro funkci thiopurinových protinádorových léčiv (viz kapitola 1.6.5 a Obrázek 14 na str. 37). Vysvětlení ostatních zkratk: ADA = adenosin deaminasa; ADK = adenosin kinasa; AMPDA = AMP deaminasa; APRT = adenin fosforibosyltransferasa; GDA = guanin deaminasa; IGK = inosin-guanosin kinasa; PNP = purin nukleosid fosforylaza; PP_i = pyrofosfát; PRPP = 5-fosforibosyl-1-pyrofosfát; R5P = ribosa-5-fosfát; XO (XOR) = xanthin oxidasa (xanthin oxidoreduktasa). Obrázek byl vytvořen v programu ChemBioDraw Ultra12.0.2 (© 1986-2010 CambridgeSoft.) a upraven v programu Inkscape 0.92.4.

Terciární struktura a aktivní místo

Terciární struktura cN-II (Obrázek 12A, str. 30) obsahuje (v souladu s příslušností enzymu k rodině HAD) dvě hlavní domény *cap* a *core* (viz kapitola 1.3.1), mezi nimiž se nachází aktivní místo. Doména *core* obsahuje *Rossmann-like* sbalení, které je tvořeno centrálním β -skládaným listem složeným z osmi paralelních β -řetězců a obklopeným osmi α -helixy. Na této doméně se nacházejí také čtyři konzervované sekvenční motivy I-IV tvořící jádro aktivního místa [20]. Aminokyselinové zbytky Asp52, Asp54, Thr56 a Leu57 v sekvenci cN-II tvoří motiv I, Thr249 představuje motiv II a motiv III je tvořen Lys292. Motiv IV je pak složen z aminokyselin Asp351 a Asp356 [13, 20, 48]. Tyto motivy umožňují vazbu kofaktoru Mg^{2+} a fosfátové části substrátu v aktivním místě (viz Obrázek 3 na str. 16) a jsou hlavním strukturálním elementem pro katalytickou aktivitu cN-II (viz kapitola 1.3.3). Aktivní



Obrázek 11 – Aminokyselinová sekvence cN-II

Sekvence obsahuje tři významné strukturální segmenty (modrá, žlutá, purpurová), které jsou popsány v textu. Červeně jsou vyznačeny konzervované sekvenční motivy I-IV, zeleně pak úsek, který při allosterické aktivaci cN-II zaujímá strukturu α -helixu označovaného jako helix A (zkr. αA). Nad sekvencí cN-II jsou rovněž zvýrazněny a označeny pozice jednotlivých prvků sekundární struktury: α pro α -helix, β pro β -skládaný list, η pro 3_{10} -helix, TT pro β -ohyb a TTT pro α -ohyb. Vytvořeno prostřednictvím programů Clustal Omega [17], ESPript 3.x [18] a Inkscape 0.92.4 podle: [5].

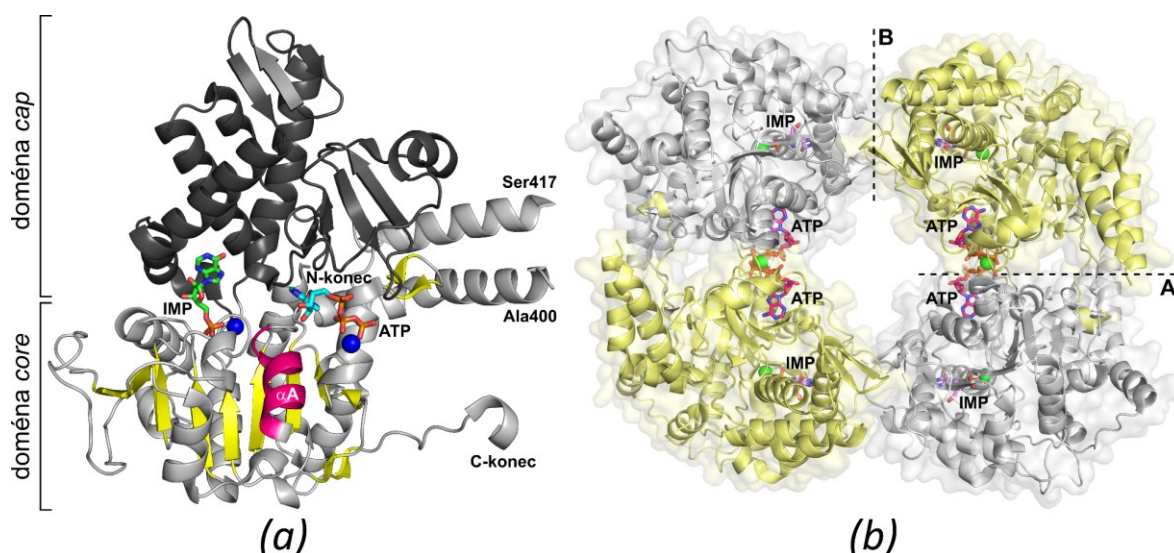
místo enzymu se nachází na povrchu domény *core* a je stericky stíněno doménou *cap* (Obrázek 12A, str. 30).

Doména *cap* je tvořena svazkem 4 α -helixů a dvěma antiparalelními β -skládanými listy, z nichž jeden je tvořen 3 β -řetězci a druhý 4 β -řetězci. Dále tato doména obsahuje od svazku odloučený α -helix a dvě smyčky [20]. Na základě své morfologie se řadí ke *cap* doménám typu C1 (viz kapitola 1.3.1) Doména *cap* je zprostředkovatelem substrátové specifity cN-II a zčásti se též podílí na konstrukci aktivního místa. Rozpoznání a částečná vazba substrátu enzymem jsou totiž zajištěny postranními řetězci aminokyselin Phe157, Arg202, Asp206, His209 a Tyr210 ležících na doméně *cap* za spoluúčasti několika molekul H_2O . Nukleosidová část substrátu je vtěsnána mezi vhodně upořádaná aromatická jádra Phe157, His209 a Tyr210, kdežto postranní řetězce Arg202 a Asp206 vytváří s touto částí substrátu elektrostatické interakce. Uspořádání polárních postranních řetězců *cap* domény v oblasti kolem 2'-pozice sacharidové části nukleosidu je pravděpodobnou příčinou pro upřednostňování substrátů IMP a GMP nad 2'-deoxy-IMP (dIMP) a 2'-deoxy-GMP (dGMP) [48].

Vedle domén *cap* a *core* jsou součástí struktury cN-II tři významné strukturní segmenty (Obrázek 11, str. 28 a Obrázek 12A, str. 30): (1) N-terminální segment tvořený aminokyselinami Met1-Arg29, (2) helikální segment (z angl. *helical arm*) složený z aminokyselin Pro373-Tyr434 a (3) C-terminální segment, který je tvořen úsekem aminokyselin Ala479-Glu561. Biologická role C-terminálního segmentu není dosud plně objasněna, kdežto zbylé dva jmenované segmenty se spolu s allosterickým místem podílí na velmi komplexní regulaci enzymové aktivity cN-II – více viz kapitoly 1.6.3 a 1.6.4 [47].

Allosterické místo

Poblíž aktivního místa a oligomerního rozhraní A v doméně *core* leží allosterické místo enzymu, které se zároveň nachází v rámci dimerního uspořádání v těsné blízkosti allosterického místa sousední podjednotky (Obrázek 12, str. 30). Vazba efektorů do allosterického místa je zprostředkována postranními řetězci aminokyselin Arg144, Asn154, Ile152, Phe354, Lys362, Asn453, Arg456 a Tyr457. V případě efektorů jako ATP a dATP připadá jedna molekula efektoru na jedno allosterické místo v dimeru cN-II. Tato molekula je zde vázána aminokyselinovými zbytky pouze téže podjednotky, na níž allosterické místo leží. Naproti tomu 2,3-BPG a diadenosinpolyfosfáty jako Ap_4A obsazují obě allosterická místa dimeru pouze jednou molekulou efektoru, která je zde vázána oběma podjednotkami zároveň. Molekula Ap_4A je zanořena do každého z allosterických míst jednou ze svých dvou adenosinových částí, kdežto molekula 2,3-BPG je vázána přímo na oligomerním rozhraní obou podjednotek [48].



Obrázek 12 – Krystalová struktura cN-II

Struktura katalyticky neaktivní C-terminálně zkrácené varianty cN-II D52N (PDB kód 2xcw), která je takřka totožná se strukturou C-terminálně zkrácené nativní formy cN-II WT. Flexibilní úsek Glu401-Ile416 není součástí struktury. **(a)** Terciární struktura protomeru cN-II v aktivovaném stavu. Struktura je tvořena *cap* doménou typu C1 (tmavě šedá) a doménou *core* (světle šedá). Žlutě jsou v doméně *core* zvýrazněny řetězce β -skládaných listů. Hlavní část této domény tvoří tzv. *Rossmann-like* sbalení, jehož centrální β -skládaný list je tvořen osmi paralelními β -řetězci (žlutá). Součástí domény *core* je aktivní místo, do něhož je navázána molekula substrátu IMP (zelená), a allosterické místo s navázanou molekulou allosterického aktivátoru ATP (světle modrá). Oba ligandy jsou koordinovány s ionty Mg^{2+} (modré sféry). Růžovou barvou je zvýrazněn tzv. helix A (ozn. αA). **(b)** Kvartérní strukturu cN-II tvoří homotertramer složený ze dvou identických dimerů. Dimery jsou mezi sebou propojeny prostřednictvím oligomerních rozhraní B (ozn. B). Každý dimer je tvořen dvěma identickými protomery, které jsou propojeny prostřednictvím oligomerního rozhraní A (ozn. A). V aktivním místě každé podjednotky je navázána molekula IMP, v allosterickém místě každé podjednotky pak molekula ATP. Zelenou sférou jsou vyznačeny koordinované ionty Mg^{2+} . V obou obrazech jsou oranžově zbarveny atomy fosforu ve fosfátových skupinách obou ligandů. Obrázek byl vytvořen v programu PyMOL 1.5.0.2 (DeLano Scientific LLC, San Francisco, CA, USA) a upraven v programu Inkscape 0.92.4.

1.6.3 Regulace katalytické aktivity

Allosterická aktivace

Ve formě apoproteinu, kdy v allosterickém místě není navázán žádný aktivátor, směřuje postranní řetězec Asp356 motivu IV pryč z aktivního místa enzymu. Za těchto podmínek se do aktivního místa nemůže navázat kofaktor Mg^{2+} nezbytný pro katalytickou aktivitu enzymu, který tak setrvává v neaktivní formě. Po navázání aktivátoru do allosterického místa dochází v doméně *core* ke strukturálnímu přeuspořádání jinak neuspořádaného úseku aminokyselin Gly355-Gln364, který následně zaujímá konformaci α -helixu (Obrázek 13A, str. 32) [47, 48]. Tento α -helix se označuje jako tzv. helix A a je stabilizován prostřednictvím iontových interakcí Lys361 s Asp459 [47] a elektrostatických interakcí Lys362 s fosfátovými zbytky aktivátoru [48]. Jeho zformováním dochází k natočení postranního řetězce Asp356 motivu IV do prostoru aktivního místa a zároveň odsunutí aromatického jádra postranního řetězce Phe354 mimo aktivní místo. Pootočení nabitého Asp356 do aktivního místa má za následek další konformační změny ve struktuře cN-II, načež enzym

přechází z původně basálního, neaktivního stavu do aktivovaného stavu. Tím je umožněna koordinace kofaktoru Mg^{2+} a poté i vazba fosfátové části substrátu v aktivním místě [48].

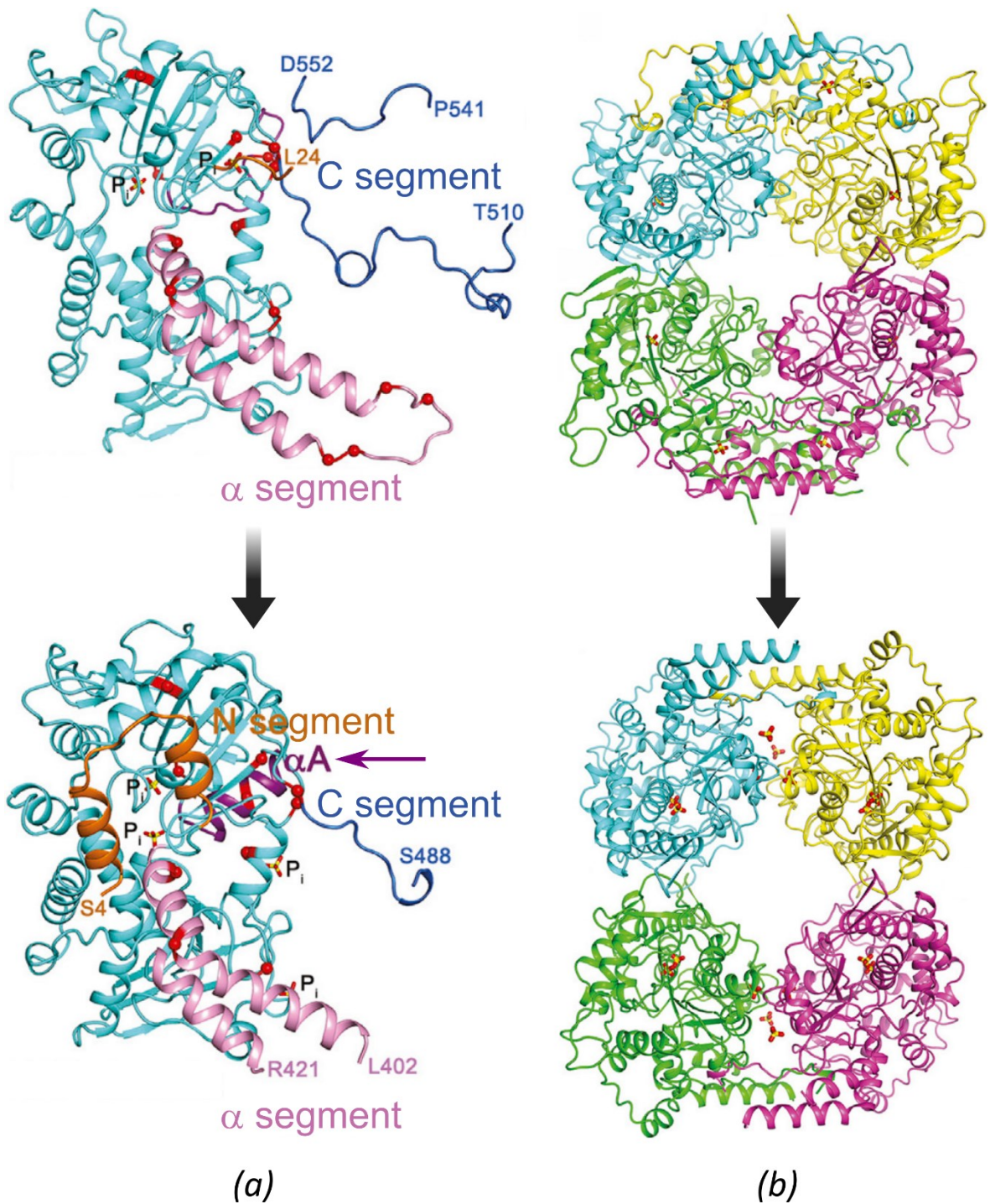
Zformování helixu A je klíčovým mechanismem v regulaci katalytické aktivity cN-II a je bezpodmínečně nutné k tomu, aby vůbec bylo umožněno navázání substrátu do aktivního místa [48]. Přechod enzymu z basálního do aktivovaného stavu (a zpět) je však doprovázen také změnou celkové konfigurace homotetrameru. Při allosterické aktivaci dochází zejména na oligomerních rozhraních k řadě konformačních změn [47, 49], vlivem nichž enzym přechází z původně uzavřenější, těsněji semknuté konfigurace na více otevřenou (Obrázek 13B, str. 32) [47].

Mechanismus zpětné inaktivace

Přechod do otevřenější, tj. aktivní konformace je současně spjat s autoregulačním mechanismem zpětné inaktivace (z angl. *switch-off mechanism*), za nímž stojí helikální segment [47]. Segment sestává z α -helixu a jeho vrcholu, který nese aminokyseliny Asp407 a Ser408. V basálním stavu enzymu zaujímá vrchol tvar smyčky (je označována jako tzv. interhelikální smyčka), kdy Ser408 interaguje s Arg238 lokalizovaným na tzv. helixu B v sousední podjednotce dimeru blízko kladně nabitě kapsy na dimerním rozhraní [47, 50]. Uspořádání do tvaru smyčky zároveň umožňuje Asp407 interagovat s kladně nabitými aminokyselinovými zbytky tohoto rozhraní. Po přechodu do aktivního stavu a zformování helixu A jsou tyto interakce přerušeny vlivem posunu helikálního segmentu. Interhelikální smyčka přechází v neuspořádanou strukturu a její Asp407 se dostává do blízkosti a interakce s Lys361 v helixu A na přilehlé podjednotce dimeru. To destabilizuje interakci Lys361 s Asp459, jejíž úlohou je helix A stabilizovat, a zprostředkovává tak návrat enzymu do neaktivního basálního stavu [47].

Terminální segmenty

Zatímco N-terminální segment se pravděpodobně podílí na usnadnění přechodu z basálního do aktivního stavu cN-II, role konzervovaného C-terminálního konce není zřejmá. Představuje flexibilní strukturu bohatou na kyselá residua, zejména pak na úplném C-konci proteinového řetězce (viz Obrázek 11 na str. 28). V odborné strukturní studii bylo popsáno, že v basálním stavu cN-II vytváří jakousi závoru, která obepíná základnu helikálního segmentu v sousední podjednotce, a významně tak přispívá k těsněji semknuté neaktivní konfiguraci cN-II. Může tedy představovat zábranu v allosterické aktivaci enzymu [47]. Proti této regulační funkci však hovoří výsledky kinetické studie z odborné publikace, která byla vypracována na školícím pracovišti. Z těchto výsledků vyplývá, že kinetické vlastnosti nemutantních i mutantních variant cN-II (viz kapitola 1.6.4) jsou při allosterické aktivaci obdobné, nezávisle na přítomnosti či absenci C-terminálního segmentu ve struktuře enzymu [49]. Vzhledem k výrazně polárnímu charakteru tohoto segmentu je pravděpodobné, že přispívá ke stabilizaci struktury cN-II. Jeho biologická funkce však zůstává neobjasněna.



Obrázek 13 – Strukturální změny při allosterické aktivaci cN-II

Přechod z basálního (nahore) do aktivního stavu (dole) je doprovázen změnami ve struktuře cN-II. **(a)** Zásadní změnou v protomeru cN-II je zformování tzv. helixu A (fialová, ozn. αA), čímž je následně umožněna vazba kofaktoru a substrátu do aktivního místa. Tvar α -helixu nabývá také N-terminální segment (zkr. N segment, oranžová). Ke změnám dále dochází v α -helikálním segmentu (zkr. α segment, růžová) a v C-terminálním segmentu (zkr. C segment, tmavě modrá). **(b)** Změny v jedné podjednotce se prostřednictvím oligomerních rozhraní přenáší na sousední podjednotky. Při allosterické aktivaci přechází těsněji sbalená struktura homotetrameru (nahore) na více otevřenou (dole). Jednotlivé podjednotky jsou od sebe barevně odlišeny. Upraveno v programu Inkscape 0.92.4 a převzato z: [47].

Nelze vyloučit, že kromě výše popsaných mechanismů se na regulaci aktivity cN-II mohou podílet ještě další, dosud neodhalené mechanismy. Tento systém regulace je velice komplexní a k jeho poškození může dojít vlivem některých mutací v genu NT5C2.

1.6.4 Mutace v genu NT5C2

V současnosti je známo více než 450 různých mutací zasahujících do genu NT5C2 [51]. Mnoho z těchto mutací ovlivňuje katalytickou aktivitu cN-II a lze je na základě toho rozdělit do následujících tří skupin. První skupinou jsou mutace, které výrazně či vůbec nepozměňují aktivitu cN-II. Jedná se o neutrální mutace, mezi něž se řadí například mutantní varianty T3A a H380R [50]. Druhou skupinu tvoří mutace vedoucí ke ztrátě enzymu či jeho katalytické funkce (angl. *loss-of-function*). Do této skupiny se zatím řadí několik homozygotních mutací, z nichž všechny mají za následek poruchu exprese cN-II [52]. Třetí a nejpočetnější skupinu představují mutace, které vedou ke zvýšení katalytické aktivity enzymu (angl. *gain-of-function*). Tyto aktivující mutace narušují prostřednictvím různých mechanismů allosterickou regulaci a způsobují hyperaktivitu katalytické funkce cN-II [47, 49, 50].

Aktivující mutace a hyperaktivita cN-II

Aktivující mutace v genu NT5C2 jsou ve struktuře cN-II rozmístěny do různých míst, často se však nacházejí ve funkčně důležitých částech popsaných v předchozí kapitole. Těmi jsou helix A a jeho přilehlé okolí, helikální segment a zejména oligomerní rozhraní [47, 50]. Právě obě oligomerní rozhraní (A i B) jsou klíčová pro propagaci efektů těchto mutací v celém tetramerním uspořádání enzymu [49, 50]. Na základě mechanismu, jímž narušují allosterickou regulaci cN-II, je lze rozdělit do tří tříd I-III.

Mutace třídy I narušují mechanismus aktivace enzymu prostřednictvím zformování helixu A při vazbě aktivátoru do allosterického místa (viz kapitola 1.6.3). Uzamykají helix A v uspořádané helikální konformaci, následkem čehož enzym trvale setrvává v aktivovaném stavu bez ohledu na přítomnost allosterického aktivátoru. Do této třídy se řadí mutantní varianty K359Q a L375F. Oproti nemutantní variantě enzymu označované jako wild-type (zkr. WT, dále jen cN-II WT) vykazují silně zvýšenou nukleotidasovou aktivitu, která se po navázání allosterického aktivátoru dále výrazně zvyšuje [47, 49]. Zatímco záměna K359Q je přímou součástí helixu A (ovlivňuje jej tedy přímo), záměna L375F je od helixu A více vzdálena a ovlivňuje tento úsek prostřednictvím řetězce drobných konformačních změn včetně částečného vychýlení helikálního segmentu [49].

Převážná většina aktivujících mutací v genu NT5C2 náleží do třídy II. Zasahují buďto do vrcholu či oblasti helikálního segmentu anebo jsou lokalizovány v kladně nabitě kapse na dimerním rozhraní. Výskytem na těchto pozicích pak narušují zejména právě interakce mezi helikálním segmentem a aminokyselinovými zbytky v kladně nabitě kapse.

Zatímco mechanismus allosterické aktivace enzymu prostřednictvím helixu A zůstává převážně neovlivněn, mechanismus zpětné inaktivace je poškozen (viz kapitola 1.6.3) [47]. V basálním neaktivním stavu si mutantní varianty třídy II zachovávají podobně nízkou katalytickou aktivitu jako cN-II WT, která se však po allosterické aktivaci mnohonásobně zvyšuje [47, 49]. Mezi mutace třídy II jsou zařazeny mutantní varianty R39Q, R238W, R367Q, D407A, S408R, S445F a R478S, dále pak pravděpodobně také varianty R238G/L/Q, R291W, K404N, D407E/H/V/Y, P414A/S a D415G [47, 50].

Mutace třídy III způsobují ztrátu C-terminálního segmentu (viz kapitola 1.6.3), následkem čehož enzym zaujímá otevřenější konfiguraci již v basálním stavu. Třída III má zatím pouze jednoho zástupce, kterým je C-terminálně zkrácená varianta Q523*. Nukleotidasová aktivita této mutantní varianty je v basálním i aktivovaném stavu srovnatelná s aktivitou cN-II WT, ale ke stimulaci aktivity dochází již za nižších koncentrací allosterického aktivátoru [47]. Mechanismus, kterým je tato odchylka v allosterické aktivaci zprostředkována, však zatím není objasněn.

Mezipodjednotková stimulace katalytické aktivity

Velká část aktivujících mutací v genu NT5C2 je heterozygotní. V buňkách v takovém případě dochází k expresi mutantní varianty i nemutantní WT varianty zároveň. Následně vznikají nejen homotypické tetramery (homotetramery), ale též smíšené heterotetramery cN-II, v nichž mohou být tyto varianty zastoupeny v poměru 4:0, 3:1, 2:2, 1:3 nebo 0:4 [47, 50]. Bylo zjištěno, že přítomnost mutantních podjednotek v heterotetrameru stimuluje hyperaktivitu u WT podjednotek. Aktivační efekt mutací se na přilehlé WT podjednotky přenáší prostřednictvím konformačních změn na oligomerních rozhraních, načež již v basálním stavu vykazují zvýšenou katalytickou aktivitu. Po vazbě aktivátoru do allosterického místa pak nabývají své standardní aktivity, jakou mají v homotetrameru cN-II WT v aktivovaném stavu [50].

1.6.5 Patologie spojené s cN-II

Hyperaktivita nebo poruchy exprese cN-II byly zaznamenány ve spojení s některými onemocněními jako hyperurikemie, hyperurikosurie, Lesch-Nyhanův syndrom [53], hereditární spastické paraparézy (zkr. HSP, z angl. *hereditary spastic paraplegia* či *familial spastic paraparesis*) [52] či akutní lymfoblastická leukemie (zkr. ALL) [28, 29].

Hereditární spastické paraparézy

Hereditární spastické paraparézy jsou skupinou dědičných neurodegenerativních onemocnění, jejichž hlavním projevem je porucha motoriky dolních končetin charakterizovaná jejich zvyšující se ztuhlostí a nehybností. Tato porucha je zapříčiněna degenerací axonů nervových buněk v kortikospinální dráze, jejíž funkcí je vědomé ovládání kosterního svalstva. Na základě množství a povahy symptomů lze rozlišit nekomplikovanou

a komplikovanou formu HSP [52, 54]. Nekomplikovaná forma je charakterizována pouze méně extrémní křečovitostí a slabostí kosterních svalů, syndromem hyperaktivního měchýře (angl. *hypertonic urinary bladder disturbance*) a lehce narušenou citlivostí pro vnímání vibrací v dolních končetinách. Tytéž problémy zahrnuje i komplikovaná forma HSP, ta je však vždy dále doprovázena dalšími neurologickými problémy jako úzkost, epileptické záchvaty, hluchota, ztráta zraku, duševní poruchy, svalová atrofie, ichtyóza, extrapyramidový syndrom či periferní neuropatie [54, 55]. Prevalence HSP se přibližně pohybuje mezi 3 až 10 případy na 100 000 jedinců, přičemž první symptomy se mohou objevit v jakémkoliv věku.

Hlavní příčinou vzniku HSP jsou genové mutace [52, 54, 56]. V současnosti je s tímto onemocněním spjato přes 70 různých chromosomových úseků tohoto onemocnění, které zahrnují více než 60 různých genů označovaných jako geny asociované se spastickou paraplegií (zkr. SPGs, z angl. *spastic paraplegia genes*) [56]. Mezi SPGs se řadí také gen NT5C2, v němž bylo dosud identifikováno pět homozygotních vysoce delečních mutací vedoucích k poruše exprese a deficitu cN-II [52]. Není zcela jasné, jakým způsobem tento deficit přispívá ke vzniku HSP. Vzhledem k fyziologické funkci cN-II v metabolismu purinů je však velmi pravděpodobné, že dochází k závažnému narušení regulace hladiny purinových nukleotidů. Purinové nukleotidy hrají klíčovou roli ve vývoji mozku a mají neuro-protektivní funkci (například při jeho ischemii) [57]. V současnosti jsou známy již různé poruchy v metabolismu purinů, které zároveň často zasahují do různých částí lidského nervového systému [58]. Lze se tedy domnívat, že vliv deficitu cN-II na hladinu purinových nukleotidů je podstatou mechanismu, kterým cN-II přispívá ke vzniku neurologických problémů v HSP.

Lesch-Nyhanův syndrom

Lesch-Nyhanův syndrom je autosomálně recesivní dědičné onemocnění vázané na chromosom X, které postihuje výhradně muže, přičemž první příznaky se obvykle objevují již v kojeneckém věku. Charakteristickými projevy tohoto onemocnění jsou mentální retardace, spastická mozková obrna (z angl. *spastic cerebral spalsy*), choreoatetóza (mimovolné, občasné a nekontrolovatelné pohyby mimických svalů a končetin) a nutkavé sebepoškození. Příznaky jsou také hyperurikemie a hyperurikosurie, které postupně vedou ke vzniku močových a ledvinových kamenů, nefropatie, dny a s ní související artritidy [59].

Molekulární podstatou vzniku Lesch-Nyhanova syndromu je porucha metabolismu purinových nukleotidů zapříčiněná úplným deficitem hypoxanthin-guanin fosforibosyltransferasy (HGPRT; EC 2.4.2.8) [59-61]. Tento enzym, kódovaný genem HPRT1, katalyzuje přenos molekuly fosforibosylpyrofosfátu (PRPP) na purinové báze hypoxanthin a guanin za vzniku IMP, respektive GMP [61]. Tato reakce je klíčová v resyntéze purinových nukleotidů (Obrázek 10, str. 27). Úplný deficit HGPRT vede

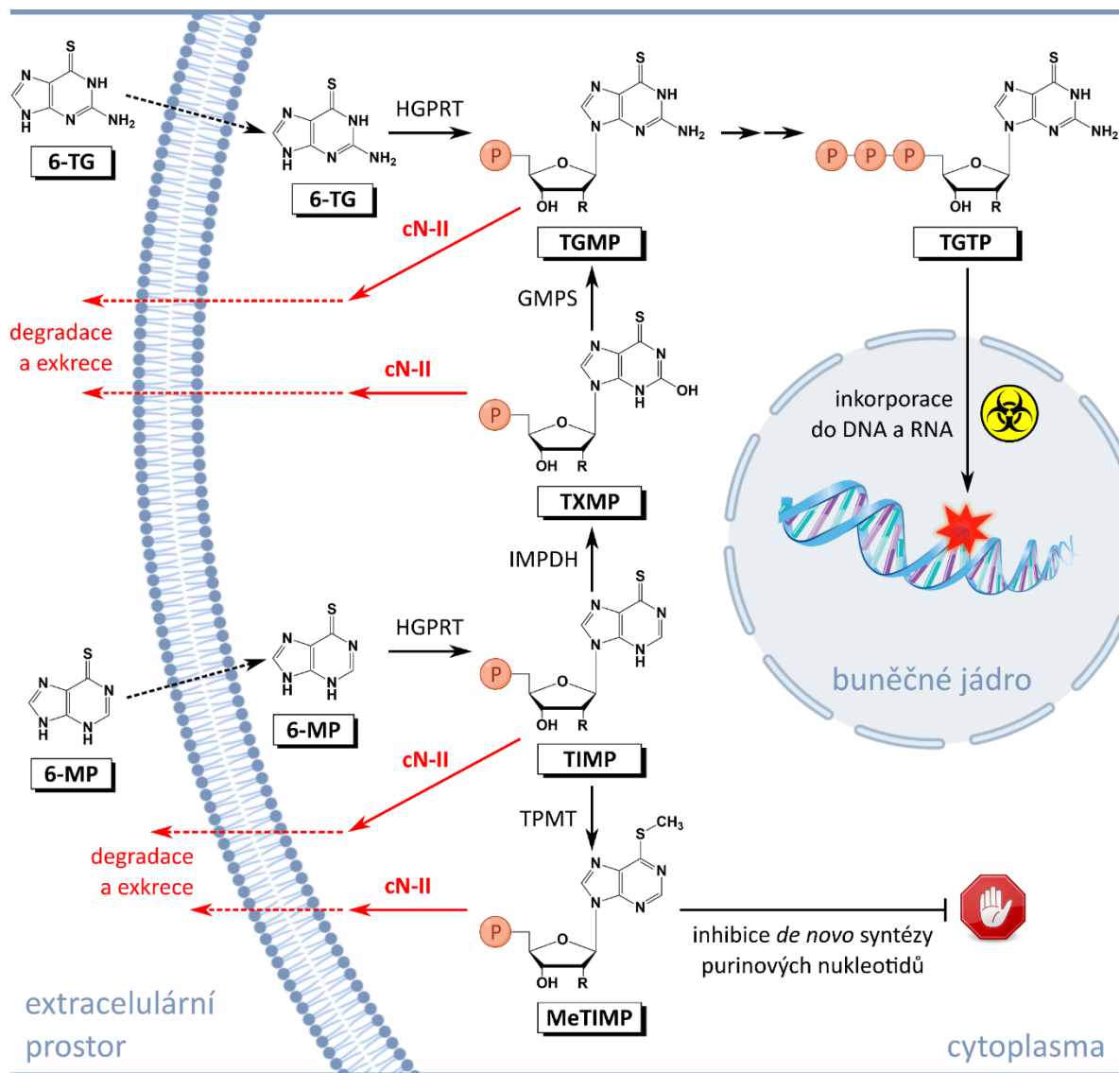
k nedostatku purinových nukleotidů v organismu, který se jej snaží kompenzovat prostřednictvím navýšení *de novo* syntézy. Tím ovšem dochází k jejich ohromné nadprodukci a současně zvýšené degradaci. Výsledkem je kontinuálně vznikající nadměrné množství urátu a hyperurikemie [62].

Do výše popsaného mechanismu je zapojen také enzym cN-II, který figuruje v degradaci purinových nukleotidů. U několika pacientů s částečným nebo úplným deficitem HGPRT však byla zaznamenána hyperaktivita cN-II při hydrolytické defosforylaci 5'-fosforibosyl-5'-amino-4-imidazolkarboxamidu (AICAR) – v Lesch-Nyhanově syndromu nadprodukované sloučeniny, která je v *de novo* syntéze prekursorem IMP. Bylo prokázáno, že produkt hydrolytické reakce je toxický vůči některým typům nervových buněk a způsobuje jejich apoptózu. Tato skutečnost naznačuje, že hyperaktivita cN-II může být jednou z možných příčin rozvoje neurodegenerativních poruch v Lesch-Nyhanově syndromu [53].

Akutní lymfoblastická leukemie

Akutní lymfoblastická leukemie představuje závažné hematologické nádorové onemocnění, jehož příčinou je maligní transformace lymfoidních progenitorových buněk. Projevuje se poruchou krvetvorby bílých krvinek a postihuje pacienty v dospělém i dětském věku. Akutní lymfoblastická leukemie je nejčastějším nádorovým onemocněním dětí. Navzdory vysoké šanci léčených pacientů na přežití, jež ve vyspělých zemích přesahuje 85 %, dochází často k relapsu tohoto onemocnění, který ve více než 60 % případů končí smrtí [28, 63].

Léčebná terapie pacientů s ALL zahrnuje podávání vysokých dávek kombinovaných chemoterapeutik. Ve více než 90 % případů se tímto postupem podaří docílit klinické a hematologické remise (vymizení příznaků a projevů onemocnění). Poté obvykle následuje tzv. "udržovací" terapie po dobu 2 let. Nedílnou součástí udržovací terapie při remisi ALL jsou protinádorová „proléčiva“ (z angl. *prodrugs*) 6-merkaptopurin (6-MP) a 6-thioguanin (6-TG) [63]. V buňkách organismu dochází k jejich konverzi prostřednictvím enzymu HGPRT v procesu resyntézy purinových nukleotidů (viz předchozí podkapitola – Lesch-Nyhanův syndrom). Takto je 6-MP přeměněn na 6-thioinosin-5'-monofosfát (TIMP) a 6-TG na 6-thioguanosin-5'-monofosfát (TGMP). Následná přeměna TIMP probíhá dvěma možnými směry. Buďto je ve dvou reakčních krocích přeměněn enzymy IMP-dehydrogenasa (IMPDH) a GMP syntetasa (GMPS) taktéž na TGMP, nebo dochází k jeho konverzi na 6-methylthioinosin-5'-monofosfát (MeTIMP) prostřednictvím enzymu thiopurin S-methyltransferasa (TPMT). Další příslušné enzymy katalyzují přeměnu TGMP na 6-thioguanosin-5'-trifosfát (TGTP) a 2'-deoxy-6-thioguanosin-5'-trifosfát (dTGTP) [64, 65]. Celkové schéma aktivace 6-MP a 6-TG je znázorněno na Obrázku 14 na str. 37.



Obrázek 14 – Schéma aktivace 6-MP a 6-TG a jejich zpětná inaktivace prostřednictvím cN-II

Aktivace thiopurinových léčiv 6-MP a 6-TG probíhá ve směru černých plných šipek; černé přerušované šipky naznačují jejich import z extracelulárního prostoru do buněčné cytoplasmy. Cytotoxické účinky TGTP a MeTIMP jsou naznačeny symboly. Mechanismus cytotoxicity těchto sloučenin a jednotlivé kroky aktivace 6-MP a 6-TG jsou podrobně popsány v textu této podkapitoly. Červenými šipkami je zjednodušeně naznačen mechanismus zpětné inaktivace: prostřednictvím 5'-nukleotidasy cN-II nejprve dochází k hydrolytické defosforylaci aktivovaných metabolitů 6-MP a 6-TG (červené plné šipky) za vzniku příslušných nukleosidů (pro jednoduchost nejsou ve schématu vyobrazeny), které jsou vzápětí exportovány z buňky do extracelulárního prostoru (červené přerušované šipky), zde dále degradovány, a nakonec vyloučeny s močí pryč z organismu. R = OH nebo H. Vysvětlení zkratk: TXMP = 6-thioxanthosin-5'-monofosfát; ostatní zkratky enzymů a sloučenin jsou vysvětleny výše v textu. Obrázek byl vytvořen prostřednictvím programů ChemBioDraw Ultra12.0.2 (© 1986-2010 CambridgeSoft.) a Inkscape 0.92.4 podle [64].

Sloučeniny 6-MP a 6-TG se společně s TIMP a TGMP označují jako analoga purinových nukleotidů. Jejich metabolity popsané výše se řadí mezi tzv. purinové antimetabolity a vykazují cytotoxické účinky. Při replikaci a transkripci dochází k začlenění TGTP a dTGTP do řetězců RNA a DNA, čímž vznikají poškozené molekuly nukleových kyselin obsahující chyby. Rozpoznání těchto chyb v postižené buňce posléze vede ke spuštění její

programované buněčné smrti. Mechanismus účinku MeTIMP naproti tomu spočívá v inhibici enzymu fosforibosylpyrofosfát amidotransferasa. Dochází tak k narušení *de novo* syntézy purinových nukleotidů, do které je tento enzym přímo zapojen. Vzhledem ke zvýšeným nárokům na přísun živin a metabolickému obratu při nekontrolované proliferaci mají nádorové buňky mj. vysokou spotřebu nukleotidů coby stavebních kamenů pro syntézu DNA a RNA. Buňky musí tuto spotřebu kompenzovat a jejich hladinu neustále doplňovat, k čemuž intenzivně využívají resyntézu purinových nukleotidů. Z extracelulárního prostoru tak čerpají velká množství nukleosidů a bází, a to včetně 6-TG a 6-MP.

V průběhu udržovací terapie často dochází ke vzniku resistance nádorových buněk vůči 6-TG a 6-MP, což následně vede k relapsu ALL. Jednou z příčin tohoto problému jsou hyperaktivující mutace v genu NT5C2 (viz kapitola 1.6.4) [28, 29]. Kromě svých přirozených substrátů je enzym cN-II schopen defosforylovat také analoga purinových nukleosid-5'-monofosfátů, tj. TIMP a TGMP. Nemutantní varianta enzymu, cN-II WT, má vůči těmto sloučeninám nižší afinitu než vůči svým přirozeným substrátům IMP a GMP. Bylo však pozorováno, že hyperaktivní mutantní varianty cN-II asociované s relapsem ALL vykazují nejen vyšší afinitu vůči IMP a GMP, ale také vůči TIMP a TGMP (afinita vůči TIMP a TGMP je dokonce několikanásobně vyšší než vůči IMP a GMP) [65]. Následkem je nadměrná defosforylace, tj. inaktivace purinových antimetabolitů (Obrázek 14, str. 37) a snížení účinnosti protinádorové léčby [28, 29, 65]. Exprese hyperaktivních mutantních variant cN-II navíc nepřímo ovlivňuje transmembránový transport léčiv. Zatímco míra transportu 6-MP a 6-TG do intracelulárního prostoru je snížena, míra transportu jejich inaktivovaných metabolitů do extracelulárního prostoru je zvýšena. Toto dále přispívá ke snížení senzitivity a zvýšení resistance nádorových buněk vůči thiopurinovým léčivům. Účinky hyperaktivních mutantních variant cN-II jsou však ještě větší, neboť vedou k celkovému metabolickému přeprogramování nádorových buněk. Narušují nejen metabolismus a homeostázi purinových nukleotidů, ale také další metabolické dráhy. Ovlivněny jsou tak například metabolismus pyrimidinových nukleotidů a syntéza aminokyselin [65].

V asociaci s ALL bylo popsáno již několik desítek hyperaktivních mutantních variant cN-II, mezi něž patří K25E, R34Q, R39Q, R195Q, R238G/L/Q/W, R291W, K359Q, S360P, K359Q, R367Q, L375F, K404N, D407A/E/H/V/Y, S408R, P414A/S, D415G, S445F, R478S, P533L a C-terminálně zkrácená varianta Q523* [28, 29, 47, 49, 50]. Dosud s nejvyšší četností se u pacientů vyskytují varianty R367Q a R238W [50].

Aktivující mutace v genu NT5C2 se v nádorových buněčných liniích pacientů objevují výhradně při relapsu ALL nebo těsně před ním [28, 29, 64]. Toto je s vysokou

pravděpodobností způsobeno vývojovým tlakem při léčebné a udržovací chemoterapii thiopurinovými léčivy. Resistence, která je vůči těmto léčivům zprostředkována hyperaktivitou cN-II, nicméně přichází za cenu snížené rychlosti růstu a buněčného dělení nádorových buněk. Toto je úzce spjato s nadměrnou degradací purinových nukleotidů a jejich exportem do extracelulárního prostoru. Závislost nádorových buněk na resyntéze a *de novo* syntéze purinů tak výrazně vzrůstá [64].

V současnosti je popsáno několik možných přístupů, jak v praxi bojovat proti vzniku a progresi resistantních forem ALL nesoucích hyperaktivní varianty cN-II. Evoluční výběr nádorových klonů nesoucích mutace v genu NT5C2 by mohlo být možné utlumit či potlačit vhodnou změnou léčebné strategie, v níž by se 6-MP a 6-TG využívaly s menším zastoupením [64, 65]. Bylo také pozorováno, že zvýšená závislost nádorových buněk na resyntéze a *de novo* syntéze purinových nukleotidů je jejich citlivým místem [64]. Syntézu IMP a jeho následnou přeměnu na GMP v závěru *de novo* syntézy purinových nukleotidů katalyzují enzymy IMP synthasa a IMP dehydrogenasa, přičemž oba tyto enzymy jsou selektivně inhibovány léčivem mizoribin (imunosupresivum) [66]. Při použití mizoribinu *in vivo* je takto zablokována syntéza GMP, což následně dramaticky snižuje přežití leukemických buněk nesoucích hyperaktivní varianty cN-II [64]. Vhodný zásah do *de novo* syntézy purinů a případně i jiné metabolické dráhy tak může znamenat účinný nástroj k eliminaci této resistantní formy ALL. V neposlední řadě se jako jeden z možných přístupů jeví snaha o nalezení vhodných, specifických a dostatečně silných inhibitorů vůči hyperaktivním mutantním variantám cN-II [67-70].

2 Cíl práce

Diplomová práce se zabývá problematikou spojenou s enzymem cN-II a je součástí dlouhodobého projektu řešeného ve školící laboratoři. Tento projekt je zaměřen na vývoj inhibitorů cN-II. Dále se tato práce zabývá studiem katalytických vlastností enzymu Tt82.

Cíle diplomové práce jsou:

- ❖ literární přehled současné problematiky se zaměřením na charakterizaci enzymové rodiny HAD
- ❖ rekombinantní exprese, izolace a purifikace C-terminálně zkrácených variant **cN-II**
- ❖ nalezení nízkomolekulárních fragmentů vykazujících interakci s C-terminálně zkrácenou variantou **cN-II**
- ❖ analýza vzájemného ovlivnění interakce IMP, ATP a nalezených ligandů s C-terminálně zkrácenou variantou **cN-II**
- ❖ experimentální potvrzení predikované fosfatasové aktivity **Tt82** s potenciálními substráty
- ❖ charakterizace kinetických parametrů **Tt82** pro nejúčinnější substrát

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Bakteriální kmeny

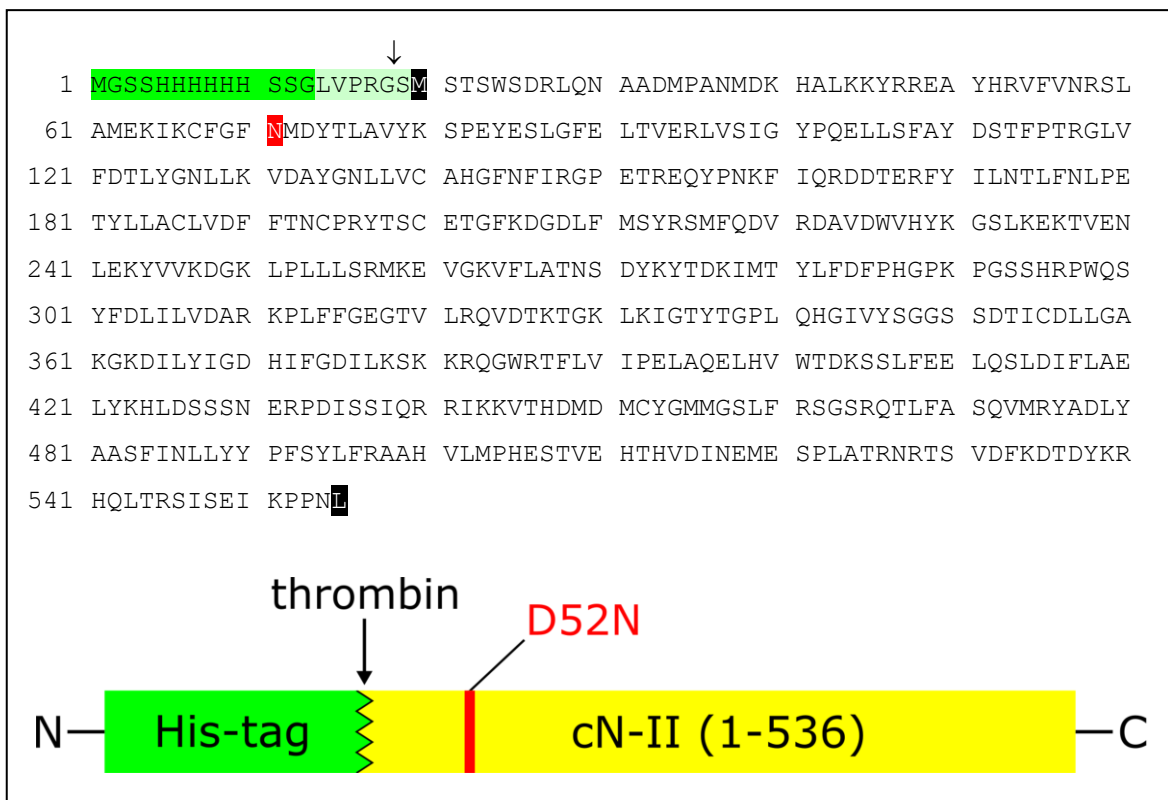
Escherichia coli BL 21 codon plus (DE3) RIL (Agilent Technologies): *E. coli* s DE3 profágem λ , nesoucím gen T7 RNA polymerasy pod transkripční kontrolou promotoru p_{lacUV5} ; extra kopie genů *argU*, *ileY*, and *leuW* tRNA.

3.1.2 Plasmidy

Plasmidy k expresi cN-II WT (1-536) a cN-II D52N (1-536) byly připraveny na školícím pracovišti RNDr. Milanem Fábrym, CSc. Expresní konstrukty jsou odvozeny z plasmidu pET28 (Novagen) kódujícího lidskou cytosolickou purinovou 5'-nukleotidasu II zkrácenou na C-konci (Δ 537–561). Tento plasmid byl zakoupen u Source Bioscience, UK. Mutace D52N byla zavedena ve vhodném subfragmentu kódující DNA s použitím protokolu QuikChange Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies) a mutovaný úsek vložen zpět do expresního plasmidu. Oba vektory jsou pod kontrolou indukovatelného T7 promotoru a nesou resistenci vůči kanamycinu.

Charakterizace konstruktů cN-II

Produktem exprese jsou rekombinantní proteiny (His)₆–cN-II WT (1-536) a (His)₆–cN-II D52N (1-536). Sekvence obou variant je tvořena 555 aminokyselinami a je uvedena na Obrázek 15 (str. 42). Na svém N-konci jsou konstrukty opatřeny histidinovou kotvou tvořenou sérií šesti histidinů (viz Obrázek 15, str. 42), jejíž účelem je zvýšení účinnosti purifikace proteinu prostřednictvím chelatační chromatografie. Za histidinovou kotvou následuje několik aminokyselin dlouhý úsek představující štěpnou sekvenci pro serinovou proteasu thrombin (sekvence LVPR||GS; viz Obrázek 15, str. 42), což v případě potřeby umožňuje histidinovou kotvu z proteinu odstranit. Kotva však neovlivňuje katalytickou aktivitu ani nebrání v případné krystalizaci cN-II [20, 49] a proto nebylo nutné ji před dalšími experimenty odstranit (kapitoly 4.3 a 4.4). Pro případnou krystalizaci enzymu s potenciálními ligandy jsou oba konstrukty zkrácené o 25 aminokyselin na kyselém C-konci sekvence cN-II (Δ 537–561). Toto zkrácení enzym stabilizuje a napomáhá v dosažení jeho dostatečně vysoké koncentrace, která je pro krystalizaci nezbytná [20] (pozn.: v současnosti již existuje protokol pro krystalizaci nezkrácené varianty cN-II [47], který však v době návržení těchto konstruktů, jejich přípravy a následných úvodních experimentů s nimi ještě nebyl publikován). Konstrukt (His)₆–cN-II D52N (1-536) představuje katalyticky neaktivní mutantní variantu cN-II, neboť obsahuje aminokyselinovou záměnu v aktivním místě enzymu vedoucí ke ztrátě jeho katalytické aktivity. Substrát (např. IMP) se tak do aktivního místa enzymu může pouze navázat, nedochází však k jeho hydrolýze [48].



Obrázek 15 – Aminokyselinová sekvence a schematické zobrazení konstruktů (His)₆– cN-II D52N (1-536)

Sekvence konstruktů (His)₆– cN-II WT (1-536) je totožná, pouze na pozici 52 je aminokyselina Asp. V sekvenci je černě vyznačena počáteční a koncová aminokyselina vlastní sekvence cN-II. Zeleně je zvýrazněna histidinová kotva (angl. *His-tag*), jejíž součástí je štěpná sekvence rozpoznávaná proteasou thrombinem (světle zelená), přičemž štěpné místo je naznačeno černou šipkou. Červenou barvou je zvýrazněna aminokyselinová záměna D52N. Obrázek schématu konstruktů byl vytvořen v programu Inkscape 0.92.4. Sekvence byla naformátována v online programu Sequence Manipulation Suite: Group Protein [71] (dostupné z: https://www.bioinformatics.org/sms2/group_protein.html).

3.1.3 Chemikálie

acetonitril	Sigma-Aldrich, USA
acetylfosfát	Sigma-Aldrich, USA
adenosin monofosfát (AMP)	Sigma-Aldrich, USA
adenosin trifosfát (ATP)	Sigma-Aldrich, USA
agarosa	Bio-Rad, USA
akrylamidové činidlo (40% roztok)	Sigma-Aldrich, USA
bromfenolová modř	Sigma-Aldrich, USA
β-merkptoethanol	Sigma-Aldrich, USA
citrát sodný dihydrát	Sigma-Aldrich, USA
D ₂ O	Eurisotop, UK
D-erythritol-4-fosfát	Sigma-Aldrich, USA
D-glukosa	Penta, Česká republika
D-glukosa-1-fosfát	Sigma-Aldrich, USA

D-glukosa-6-fosfát	Sigma-Aldrich, USA
dihydrogenfosforečnan draselný monohydrát	Sigma-Aldrich, USA
dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát	Sigma-Aldrich, USA
dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, USA
dimethylsulfoxid (DMSO) deuteriovaný (D6)	Eurisotop, UK
dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, USA
dodecylsírán sodný (SDS)	Sigma-Aldrich, USA
dusičnan stříbrný	Sigma-Aldrich, USA
ethanol	Penta, Česká republika
ethyl- β -D-thiogalaktosid (ETG)	Carbosynth Limited, UK
ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA)	Sigma-Aldrich, USA
inosin monofosfát (IMP)	Sigma-Aldrich, USA
formaldehyd	Sigma-Aldrich, USA
glycerol	Penta, Česká republika
glycerol-1-fosfát	Sigma-Aldrich, USA
glycerol-2-fosfát	Sigma-Aldrich, USA
glycin	Sigma-Aldrich, USA
hydroxid sodný	Penta, Česká republika
hydrogenfosforečnan sodný heptahydrát	Sigma-Aldrich, USA
chloramfenikol	Sigma-Aldrich, USA
chlorid draselný	Penta, Česká republika
chlorid hořečnatý	Sigma-Aldrich, USA
chlorid sodný	Penta, Česká republika
imidazol	Sigma-Aldrich, USA
kanamycin sulfát	Sigma-Aldrich, USA
kyselina 2-(N-morfolino)-ethansulfonová (MES)	Sigma-Aldrich, USA
kyselina chlorovodíková	Penta, Česká republika
kyselina N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová (HEPES)	Sigma-Aldrich, USA
kyselina octová	Penta, Česká republika
kyselina trifluoroctová (TFA)	Sigma-Aldrich, USA
Luria Bertani (LB)	Sigma-Aldrich, USA
methanol	Penta, Česká republika
methanol (pro HPLC)	Sigma-Aldrich, USA
methanol (pro HPLC)	VWR International
N,N-bis-(2-hydroxyethyl)glycin (Bicin)	Sigma-Aldrich, USA
N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, USA
<i>p</i> -nitrofenylfosfát (<i>p</i> NPP)	Sigma-Aldrich, USA

peroxodisíran amonný (APS)	Sigma-Aldrich, USA
octan amonný	Sigma-Aldrich, USA
octan sodný	Fluka, Švýcarsko
SYPRO Orange Protein Gel Stain	Lifesciences, USA
Terrific Broth, modified (TB)	Sigma-Aldrich, USA
triethylamonium bikarbonát	Sigma-Aldrich, USA
tris(2-karboxyethyl)fosfin hydrochlorid (TCEP)	Sigma-Aldrich, USA
thiosíran sodný	Sigma-Aldrich, USA
tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Merck, Německo
uhličitan sodný	Penta, Česká republika

3.1.4 Použitá kultivační média, roztoky a pufr

Agarové plotny

35 mg/ml agar (Sigma-Aldrich, USA); 20% (w/v) glukosa; 50 µg/ml kanamycin; 34 µg/ml chloramfenikol

LB (Luria Bertani) médium

20 mg/ml Luria Bertani

TB (Terrific Broth) médium

47,6 mg/ml Terrific Broth; 0,008% (v/v) glycerol; 50 µg/ml kanamycin; 34 µg/ml chloramfenikol

Lyzační pufr

50mM HEPES, pH 7,5; 500mM NaCl; 10mM imidazol; 10% (v/v) glycerol; 0,5mM TCEP; EDTA-free PIC (Protease Inhibitor Cocktail; 1 tableta na 50 ml)

Ekvilibrační pufr pro chelatační chromatografii

50mM HEPES, pH 7,5; 500mM NaCl; 10mM imidazol; 10% (v/v) glycerol; 0,5mM TCEP

Eluční pufr pro chelatační chromatografii

50mM HEPES, pH 7,5; 500mM NaCl; 500mM imidazol; 10% (v/v) glycerol; 0,5mM TCEP

Ekvilibrační pufr pro iontově výměnnou chromatografii

50mM Na-fosfátový pufr pH 6,7; 100mM NaCl; 10% (v/v) glycerol; 2mM TCEP

Eluční pufr pro iontově výměnnou chromatografii

50mM Na-fosfátový pufr pH 6,7; 1M NaCl; 10% (v/v) glycerol; 2mM TCEP

Pufr vhodný pro skladování cN-II

50mM Na-fosfátový pufr pH 7,4; 100mM NaCl; 2mM TCEP

PBS (phosphate buffer saline) pufr

10mM Na₂HPO₄; 1,8mM KH₂PO₄; 136mM NaCl; 2,6mM KCl; pH 7,2

Roztoky pro diskontinuální elektroforézu v polyakrylamidovém gelu za denaturujících podmínek v přítomnosti SDS

Vzorkový pufr (VP-S)

125mM Tris (pH 6,8); 20% (v/v) glycerol; 0,1% (v/v) merkaptoethanol; 4% (w/v) SDS; 0,2% (w/v) bromfenolová modř

Elektrodový pufr

20mM Tris (pH 8,3); 200mM glycin; 0,1% (w/v) SDS

Roztoky pro přípravu polyakrylamidového gelu

Zásobní roztok 40% akrylamidového činidla – *Sigma Aldrich, USA*

Dělicí gel

12,5% (w/v) AA; 375mM Tris (pH 8,8); 1mM EDTA; 5% (v/v) glycerol; 0,1% (w/v) SDS; 0,1% (v/v) TEMED; 0,1% (w/v) persíran amonný

Zaostřovací gel

5% (w/v) AA; 125mM Tris pH 6,8; 1mM EDTA; 5% (v/v) glycerol; 0,1% (w/v) SDS; 0,1% (v/v) TEMED; 0,1% (w/v) persíran amonný

Roztoky pro barvení polyakrylamidového gelu stříbrem

Fixační roztok

12% (v/v) kyselina octová; 50% (v/v) methanol; 0,05% (v/v) formaldehyd

Roztok methanolu

50% (v/v) methanol

Roztok Na₂S₂O₃

0,8mM Na₂S₂O₃

Roztok AgNO₃

12mM AgNO₃; 0,07% (v/v) formaldehyd

Roztok pro vyvolání

570mM Na₂CO₃; 0,05% (v/v) formaldehyd; 16μM Na₂S₂O₃

Roztok pro zastavení vyvolání

12% (v/v) kyselina octová; 50% (v/v) methanol

Roztok pro uchování gelu

50% (v/v) methanol

HPLC mobilní fáze

Mobilní fáze pro separaci složek enzymových reakcí Tt82 s AMP

0.1M KH₂PO₄ (pH 6.0); 5% (v/v) methanol

Mobilní fáze pro separaci složek enzymových reakcí Tt82 s pNPP

0.1M KH₂PO₄ (pH 6.0); 20% (v/v) methanol

Mobilní fáze pro separaci složek enzymových reakcí s cN-II WT (FL)

0,1M triethylamonium bikarbonát (pH 8,5)

Mobilní fáze pro vymývání separační HPLC kolony

- 50% (v/v) methanol; 0,05% (v/v) TFA
- 100% methanol; 0,05% (v/v) TFA

Reakční pufr

Reakční pufr pro enzymové reakce s Tt82

50mM Tris-HCl (pH 7,5); 1mM MgCl₂

Reakční pufr pro enzymové reakce s cN-II WT (FL)

60mM imidazol (pH 7,4); 150mM NaCl; 1mM MgCl₂; 0,5mM DTT

Pufr pro měření STD NMR (zkráceně NMR pufr)

150mM Na-fosfátový pufr (pH 7,6); 200mM NaCl; 1mM MgCl₂; 0,5mM DTT

3.1.5 Chromatografické kolony

- HisTrapTM HP 5 ml (GE Healthcare)
- MonoS 5/50 GL 1 ml (GE Healthcare)
- Gemini® 5 μm C18 110 Å column (LC Column 100 x 3 mm, Phenomenex)

3.1.6 Ostatní materiál

- centrifugační filtry Amicon® Ultra 0.5mL, mezní velikost pórů 10 kDa (Merck Millipore, USA)

- celulosová dialyzační membrána, mezní velikost pórů 10 kDa (Sigma-Aldrich, USA)
- dialyzační jednotky Slide-A-Lyzer^(R) Mini Dialysis Unit 10 kDa (Thermo Fisher Scientific, USA)
- dialyzační rámečky Slide-A-Lyzer^(R) Dialysis Casette 10 kDa (Thermo Fisher Scientific, USA)
- standard molekulových hmotností pro SDS-PAGE SpectraTM Multicolor Broad range Protein Ladder 10–260 kDa (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 96-jamková mikrotitrační destička pro real-time PCR LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 (Roche Life Sciences)
- fólie LightCycler® 480 Sealing Foil (Roche Life Sciences)
- 3mm NMR kyvety
- destička MediSorpTM Nunc-ImmunoTM 96 MicroWellTM plate (Thermo Fisher Scientific, USA)
- fólie na krystalizační destičky Greiner VIEWseal (Jena Bioscience, Německo)
- souprava pro detekci volných fosfátových iontů v roztoku EnzChek Phosphate Assay Kit (Invitrogen)

3.2 Přístroje a vybavení

autokláv	Unisteri HP 366, BMT Medical Technology s.r.o. (MMT Group, Německo)
automatická pipeta	Pipetman M P12x20M, Gilson USA Pipetman M P12x300M, Gilson USA
centrifugy	Beckman Avanti TM J-E, rotor JLA 9.1000, JA-20, USA Beckman Avanti TM JXN-26, rotor JLA 9.1000, JA-20, USA Beckman Allegra X-15R, rotor SX4750 μ Plate Carrier, USA Eppendorf Mini Spin, Německo Hettich Zentrifugen EBA 12R, rotor 1412, Německo
spektrofotometry	NanoDrop ND-1000, USA Ultrospec 3100 <i>pro</i> UV/Visible Spectrophotometer Amersham Biosciences, Velká Británie
čtečka destiček	Tecan Infinite M200 microplate reader (Tecan Life Sciences)
souprava na elektroforézu	Mighty Small TM II SE 250 Hoefer TM Scientific Instruments, USA zdroj Consort EV243, Belgie

inkubátor	Sanyo MCO-20AIC CO2 Incubator, Japonsko
rotační inkubátory	Gallenkamp Orbital Incubator, Velká Británie Sanyo Orbital Incubator, Japonsko
FPLC	Äkta Prime Amersham Bioscience, Švédsko Äkta FPLC (GE Healthcare, UK)
HPLC	Agilent 1100 HPLC system (Agilent Technologies, USA)
přístroj pro DSF	LightCycler [®] 480 Instrument II RT PCR (Roche Life Sciences, USA)
NMR spektrometr	Bruker Avance III [™] HD 600 MHz spectrometer (Bruker Corporation, USA)
optické mikroskopy	Olympus SZX10, Japonsko
laminární box	BSB 4A Gelaire, Austrálie
vodní lázeň	Grant Instruments GD100 Series (UK)
suchá lázeň	Benchmark MyBlock [™] mini dry bath (Benchmark Scientific, USA) Labnet International D1100 AccuBlock [™] Digital Dry Bath (Labnet International, USA)
váhy	Ohaus Adventurer Pro AV2102CM, OHAUS Corp., USA Ohaus Pioneer PA2102C, OHAUS Corp., USA Ohaus Pioneer PA124C, OHAUS Corp., USA PRS 620-3, KERN & SOHN GmbH, Německo
pH metr	GMH 3530 Griesinger Electronic, Německo
sonikátor	Dynatech (Farmingdale, NY, USA)
třepačka	Rotamax 120 Heidolph Instruments, Německo
magnetická míchačka	Jenway 1000, Velká Británie
vortex	Stuart vortexmixer SA8 (Stuart Scientific, UK)

3.3 Experimentální metody

3.3.1 Rekombinantní exprese proteinů

Příprava agarových ploten a kultivačního média

Agarové plotny o průměru 15 cm byly připraveny z agarového roztoku. Roztok byl nachystán zahřátím a rozpuštěním 10,5 g práškového agaru ve 300 ml deionizované vody (dH₂O) a sterilizován v autoklávu Unisteri HP 366 po dobu 20 min při teplotě 121 °C a tlaku 220 kPa. Sterilizovaný agarový roztok byl postupně za stálého míchání ochlazen pod studenou tekoucí vodou na teplotu snesitelnou dotykem pokožky a k tomuto roztoku

následně přidán 20% (v/v) sterilní zásobní roztok glukosy do finální koncentrace 1 % (v/v). Do agarového roztoku byl nakonec přidán zásobní roztok chloramfenikolu a zásobní roztok kanamycinu o finální koncentraci těchto antibiotik 34 µg/ml, respektive 50 µg/ml. Vzápětí bylo na každou ze dvou sterilních Petriho misek (průměr 15 cm) nalito přibližně 150 ml tohoto roztoku. Po jeho zatuhnutí byly vzniklé agarové plotny umístěny do laminárního boxu, zde sušeny po dobu 40 minut a poté skladovány při teplotě 5 °C.

Teriffic Broth (TB) médium pro kultivaci buněk o objemu 8 × 500 ml bylo připraveno následovným postupem. Do každé z 8 Erlenmeyerových baněk o objemu 2 L bylo odváženo 23,8 g práškového TB, přidány 4 ml glycerolu a 500 ml dH₂O a následně baňky přesunuty do autoklávu a sterilizovány po dobu 20 min při teplotě 121 °C a tlaku 220 kPa. Po vychladnutí na laboratorní teplotu byly baňky se sterilním TB médiem skladovány při teplotě 5 °C.

Transformace, exprese a sklízení buněk

Proteiny (His)₆– cN-II WT (1-536) (dále jen cN-II WT Δ) a (His)₆– cN-II D52N (1-536) (dále jen cN-II D52N Δ) byly exprimovány rekombinantně v kompetentním bakteriálním kmenu *Escherichia coli* BL21 (DE3) RIL. Expresa obou proteinů probíhala dle stejného postupu, proto je následující postup při expresi popsán pouze pro cN-II WT Δ a případné odlišnosti jsou zmíněny.

Do 100 µl suspenze kompetentních buněk byl přidán 1 µl roztoku daného expresního plasmidu a suspenze nadále ponechána 30 minut na ledu. Transformace buněk plasmidy bylo docíleno metodou teplotního šoku. Suspenze byla přenesena na dobu 45 s do vodní lázně temperované na 42 °C a následně opět umístěna na led. Po 2 min bylo 900 µl LB média bez antibiotik inokulováno ve sterilní zkumavce 100 µl transformované buněčné suspenze. Inokulované médium bylo inkubováno 1 hod v rotačním inkubátoru Gallenkamp při 37 °C a 200 ot./min. Na 15cm agarovou plotnu obsahující chloramfenikol a kanamycin bylo následně rozetřeno 300 µl buněčné suspenze a takto ošetřená plotna umístěna inkubovat při 37 °C přes noc v inkubátoru Sanyo MCO-20AIC.

Erlenmeyerovy baňky se sterilním TB médiem byly přesunuty do rotačního inkubátoru Gallenkamp a vytemperovány na teplotu 37 °C při 200 ot./min. Do každé baňky byl přidán zásobní roztok chloramfenikolu (finální koncentrace 34 µg/ml) a zásobní roztok kanamycinu (finální koncentrace 50 µg/ml). Z každé z 8 baněk bylo posléze odebráno 11 ml média a s 15 ml tohoto média následně z agarové plotny setřeny buněčné kolonie narostlé přes noc. Na spektrofotometru Ultrospec 3100pro byla změřena optická densita bakteriální buněčné suspenze při vlnové délce 550 nm (OD₅₅₀). S celkovým objemem přibližně 13 ml (resp. 16 ml) této suspenze byly následně inokulovány 4 Erlenmeyerovy baňky s 500 ml TB média vždy tak, že hodnota počáteční OD₅₅₀ buněk v každé baňce se rovnala přibližně 0,02.

Následně byla v rotačním inkubátoru zahájena kultivace bakteriálních buněk při 37 °C a 200 ot./min a vždy v jedné, na počátku kultivace zvolené baňce spektrofotometricky měřena v pravidelných intervalech hodnota OD₅₅₀. Po překročení hodnoty OD₅₅₀ přibližně 0,9 byly baňky přemístěny do rotačního inkubátoru Sanyo předem temperovaného na teplotu 18 °C a ponechány vychladit na uvedenou teplotu po dobu 30 min při 200 ot./min. Expres rekombinantního proteinu byla indukována přidáním roztoku 0,5M etyl-β-D-thiogalaktosidu (ETG) sterilní pipetou do každé baňky tak, aby jeho koncentrace v kultivačním médiu byla 0,5 mM. Bakteriální buňky byly takto nadále pěstovány přes noc.

Následující den ráno dosáhla OD₅₅₀ hodnoty 13,40 (resp. 12,34) a dále již nerostla. Baňky byly vyjmuty z rotačního inkubátoru, buněčná suspenze o objemu přibližně 2 l přelita do dvou 1l centrifugačních kyvet a centrifugována v předem předchlazené centrifuze Beckman Avanti™ J-E (5000 G, rotor JLA 9.1000, 20 min, 4 °C). Supernatant byl odebrán a peleta v každé centrifugační kyvetě suspendována na ledu vždy ve 100 ml vychlazeného PBS pufru (z angl. *phosphate buffer saline*). Vzniklá suspenze o objemu přibližně 200 ml byla přenesena do 40ml centrifugačních nádob a centrifugována v předem předchlazené centrifuze Beckman Avanti™ J-E (10000 G, rotor JA-20, 20 min, 4 °C). Supernatant byl opět odebrán a pelety bakteriálních buněk zamrazeny a uchovány při –80 °C.

3.3.2 Purifikace

Purifikace obou proteinů probíhala dle stejného postupu, proto je následující postup purifikace popsán pouze pro cN-II WT Δ a případné odlišnosti jsou zmíněny.

Resuspendace a desintegrace buněk

Množství buněčné biomasy o celkové hmotnosti 20,5 g (resp. 24,04 g) bylo rozmrazeno a resuspendováno na ledu v 210 ml (resp. 240 ml) lyzačního pufru (3.1.4). Přibližně 200 ml (resp. 240 ml) buněčné suspenze bylo rozděleno na objem přibližně 4 × 50 ml (resp. 5 × 50 ml) a homogenizováno na ledu sonikátorem Dynatech. Vzniklý buněčný lyzát byl následně centrifugován ve 40ml centrifugačních nádobách v předem předchlazené centrifuze Beckman Avanti™ J-E (20000 G, rotor JA-20, 30 min, 4 °C). Přibližně 200 ml (resp. 240 ml) supernatantu buněčného lyzátu bylo přelito do 300ml Erlenmeyerovy baňky, umístěno na led a vzápětí podrobena chelatační chromatografii.

Chromatografické metody – chelatační chromatografie

V prvním purifikačním kroku prostřednictvím chelatační chromatografie byla použita kolona HisTrap™ HP (3.1.5). Chromatografie byla prováděna za laboratorní teploty, přičemž baňka se supernatantem buněčného lyzátu byla držena po celou dobu separace na ledu. Při průtoku 5 ml/min byla kolona nejprve ekvilibrována filtrovaným a odvzdušněným ekvilibračním pufrem pro chelatační chromatografii obsahujícím 10mM imidazol (3.1.4). Následně byl na kolonu nanesen supernatant buněčného lyzátu při průtoku

1 ml/min. Po jeho nanesení byla kolona při průtoku 2 ml/min promyta nejprve samotným ekvilibračním pufrem obsahujícím 10mM imidazol a následně tímž pufrem, avšak již s 3% podílem elučního pufru pro chelatační chromatografii (3.1.4), obsahujícím celkově 25mM imidazol. Prostřednictvím směsi ekvilibračního pufru s 10mM imidazolem a elučního pufru s 500mM imidazolem byla provedena eluce molekul zachycených na koloně v lineárním gradientu elučního pufru z 3 % (25 mM imidazol) na 100 % (500 mM imidazol) v celkovém objemu 60 ml a při průtoku 2 ml/min. Průběh eluce byl pozorován spektrofotometricky při vlnové délce 280 nm. Při eluci byly jímány frakce o objemu 2 ml.

Frakce byly analyzovány prostřednictvím diskontinuální elektroforézy v 12,5% (w/v) polyakrylamidovém gelu za denaturujících podmínek v přítomnosti SDS s následnou detekcí stříbrem (viz str. 52 a 53). Na základě této analýzy byly vybrány a spojeny frakce obsahující protein a dialýzou (viz str. 52) převedeny do ekvilibračního pufru vhodného pro iontově výměnnou chromatografii (3.1.4).

Chromatografické metody – iontově výměnná chromatografie

Ve druhém purifikačním kroku bylo využito celkového povrchového náboje purifikovaných proteinů [hodnota pI obou proteinů má hodnotu vyšší než 7,5: pI = 7,68 pro (His)₆-cN-II WT (1-536); pI = 8,00 pro (His)₆-cN-II D52N (1-536); tyto parametry byly vypočteny na základě aminokyselinové sekvence rekombinantních proteinů prostřednictvím programu ExPASy – ProtParam Tool [72], dostupné na: <https://web.expasy.org/protparam/>]. Roztok obsahující cílový protein byl proto podroben iontově výměnné chromatografii na MonoS 5/50 GL koloně (měnič kationtů) (3.1.5). Kolona byla při průtoku 1 ml/min ekvilibrována ekvilibračním pufrem pro iontově výměnnou chromatografii obsahujícím 100mM chlorid sodný (3.1.4). Poté na ni byl při průtoku 1 ml/min nanesen proteinový preparát. Eluce proběhla prostřednictvím gradientu elučního pufru pro iontově výměnnou chromatografii s 1M chlorid sodný (3.1.4). Za průtoku 1 ml/min nejprve probíhal gradient elučního pufru z 0 % na 50 % v objemu 25 ml a poté v 50 % na 100 % již pouze v objemu 5 ml. V dalších 5 ml byla kolona promyta již 100% elučním pufrem pro iontově výměnnou chromatografii. Průběh eluce byl sledován spektrofotometricky při vlnové délce 280 nm. Objem sbíraných frakcí byl 2 ml. Sekvence tvořená ekvilibrací, nanesením proteinového preparátu a následnou elucí představoval jeden cyklus, který byl několikrát opakován v závislosti na množství proteinového preparátu a nanášecí kapacitě chromatografické kolony.

Frakce byly analyzovány pomocí diskontinuální elektroforézy v 12,5% (w/v) polyakrylamidovém gelu za denaturujících podmínek v přítomnosti SDS s následnou detekcí stříbrem (viz dále, str. 52 a 53). Následně byly vybrané frakce spojeny a dialýzou (viz str. 52) převedeny do pufru vhodného pro skladování proteinu (3.1.4).

Dialýza

Za účelem převedení proteinových roztoků do vhodného pufru byla použita dialýza při 4 °C za stálého míchání dialyzátu. Větší objemy (> 15 ml) proteinového roztoku byly dialyzovány v celulosové dialyzační membráně s mezní velikostí pórů 12,5 kDa, menší objemy (< 15 ml) pak v dialyzačních rámečcích Slide-A-Lyzer™ s mezní velikostí pórů 10 kDa. Po dialýze byl filtrát vždy centrifugován v centrifuze Beckman Avanti™ J-E (10000 G, rotor JA-20, 10 min, 4 °C) anebo, v případě malých objemů ($V \leq 2$ ml), v centrifuze Hettich EBA 12 R (10000 RCF, 4 °C, 10 min).

Stanovení koncentrace proteinu měřením absorbance

Za účelem určení koncentrace purifikovaných cílových proteinů či orientačnímu určení koncentrace proteinů v průběhu proteinové purifikace byla měřena absorbance těchto proteinových roztoků za laboratorní teploty na přístroji NanoDrop ND-1000 při vlnové délce 280 nm. Pro výpočet hodnot koncentrace byl použit absorpční koeficient, který má při této vlnové délce pro oba rekombinantní proteiny cN-II, tj. (His)₆ – cN-II WT (1-536) i (His)₆ – cN-II D52N (1-536), hodnotu 1,158 ml·mg⁻¹·cm⁻¹ a pro Tt82 hodnotu 1,413 ml·mg⁻¹·cm⁻¹. Tyto hodnoty jsou teoretické a byly vypočítány na základě aminokyselinové sekvence daných rekombinantních proteinů prostřednictvím programu ExPASy – ProtParam Tool [72] (dostupné na: <https://web.expasy.org/protparam/>).

Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za denaturujících podmínek v přítomnosti SDS

Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za denaturujících podmínek v přítomnosti SDS (SDS-PAGE) byla provedena ve vertikálním tris-glycinovém uspořádání na aparatuře Mighty Small II SE 250. Zaostřovací gel obsahoval 5% (w/v) akrylamid (AA), dělicí gel pak 12,5% (w/v) AA (3.1.4). Vzorky proteinů byly nejprve zředěny tak, aby množství proteinu v objemu 10 µl nepřesahovalo hodnotu 5 µg. K 10 µl naředěných vzorků bylo následně pipetováno 5 µl VP-S obsahujícího merkaptoethanol (3.1.4), vzorky přivedeny k varu při teplotě 100 °C v suchém inkubátoru MyBlock™ mini a poté krátce centrifugovány na centrifuze Eppendorf MiniSpin (13 400 RCF/min, laboratorní teplota, cca 15 s). Do první jamky zaostřovacího gelu bylo nanášeno 5 µl standardu molekulových hmotností pro SDS-PAGE (3.1.6), do dalších jamek bylo nanášeno vždy 12,5 µl připravených vzorků. Poté byla při počátečním napětí zdroje 100 V zahájena elektroforetická separace. Jakmile linie modrých proužků (bromfenolová modř, jež byla součástí VP-S) doputovala na rozhraní mezi zaostřovacím a dělicím gelem, bylo napětí zdroje zvýšeno na 180 V. Elektroforéza byla ukončena ve chvíli, kdy linie modrých proužků doputovala k dolnímu okraji gelu.

Barvení polyakrylamidových gelů stříbrem

Po ukončení elektroforézy byl gel barven stříbrem. V průběhu procesu byla využívána třepačka Rotamax 120, složení jednotlivých používaných roztoků je uvedeno v kapitole 3.1.4. Nejprve byl gel fixován ve fixačním roztoku po dobu 45 min. Poté byl celkem třikrát, vždy po dobu 5 min, promyt 50% (v/v) roztokem methanolu a následně vložen na 20 s do roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Po uplynutí 20 s následovalo opláchnutí gelu dH_2O a promývání v roztoku AgNO_3 po dobu 20 min. Po promývání byl gel opět opláchnut v dH_2O a vložen do roztoku pro vyvolání. Zde byl ponechán přibližně 1 min, dokud se dostatečně nevybarvil stříbrem. Další, již nežádoucí vyvíjení stříbra, bylo posléze ukončeno přenesením gelu do roztoku pro zastavení vyvolávání. Obarvený gel byl uložen do uchovávacího 50% (v/v) roztoku methanolu.

Sušení gelu

Gel uložený v 50% (v/v) roztoku methanolu byl za účelem jeho archivace máčen v roztoku 20% (v/v) ethanolu a 3% (v/v) glycerolu a následně vysušen na napnuté celofánové fólii.

3.3.3 Diferenční skenovací fluorimetrie

Pro nalezení složení pufru, který by co možná nejlépe stabilizoval cN-II WT Δ a cN-II D52N Δ v nativním stavu, byla využita metoda diferenční skenovací fluorimetrie (DSF).

Zahuštění proteinu

Rekombinantní proteiny byly zahuštěny ultrafiltrací na koncentraci 4,6 mg/ml s využitím centrifugačních filtrů Amicon® Ultra 0.5ml o mezní velikosti pórů 10 kDa. Ultrafiltrace byla prováděna na centrifuze Hettich EBA 12 R (10000 RCF, 4 °C) v 3minutových intervalech a mezi každým intervalem byl zahušťovaný roztok proteinu opatrně promíchán špičkou pipety. Zahuštěný roztok proteinu byl posléze centrifugován na tomtéž přístroji a za stejných podmínek po dobu 10 min, aby byla z roztoku oddělena denaturovaná část proteinu.

Příprava vzorků a měření strukturní stability proteinu

Do jamek v 96-jamkové mikrotitrační destičce pro real-time PCR (LightCycler® 480 Multiwell Plate 96) byla připravena směs 1 μl proteinu o finální koncentraci 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ve 23 μl analyzovaného pufru o variabilním složení. V primárním DSF experimentu byly použity následující pufrы: octan sodný (pH 4,5 a 5,0); citrát sodný (pH 4,7 a 5,5); dihydrogenfosforečnan draselný (pH 5,0 a 6,0 a 7,0), dihydrogenfosforečnan sodný (pH 5,5 a 6,5 a 7,5); MES (pH 5,8 a 6,2 a 6,5); HEPES (pH 7,0 a 8,0); octan amonný (pH 7,3); Tris (pH 7,5 a 8,0 a 8,5); Bicin (pH 8,0 a 9,0); imidazol (pH 8,0). V následujícím sekundárním DSF experimentu byl testován pufr obsahující dihydrogenfosforečnan sodný (rozmezí koncentrací 25-200 mM, pH 7,5) a chlorid sodný (rozmezí koncentrace

50-300 mM). V závěrečném třetím DSF experimentu byl použit obsahující 150mM dihydrogenfosforečnan sodný (pH 7,6), 200mM chlorid sodný, 1mM chlorid hořečnatý a 0,5mM dithiothreitol (DTT), 0-10mM ATP a 0-30mM IMP.

Za sníženého osvětlení byl poté na stěnu každé jamky pipetován automatickou pipetou 1 μ l 25 \times zředěného fluorescenčního barviva SYPRO Orange Protein Gel Stain. Celkový objem směsi v každé jamce byl 25 μ l. Mikrotitrační destička byla vzápětí zakryta těsnící fólií (LightCycler[®] 480 Sealing Foil) a obalena alobalem za účelem ochrany fluorescenčního barviva před světlem.

Před vlastním měřením strukturní stability proteinu byla mikrotitrační destička za laboratorní teploty krátce centrifugována v centrifuze Beckman Allegra X-15R, vyjmuta z alobalu a vložena do přístroje LightCycler[®] 480 Instrument II RT PCR. Následně byly analyzované směsi podrobeny gradientu teploty z 20 °C na 90 °C během 90 min, v průběhu něhož byla v každé jamce nepřetržitě snímána intenzita fluorescence v rozmezí vlnových délek 465-580 nm.

Způsob vyhodnocení naměřených dat

Data jsou naměřena ve formě denaturačních křivek. Hodnota teploty v inflexních bodech těchto křivek představuje hodnoty teplot denaturace (tání) proteinu – T_M (z angl. *melting temperature*). S rostoucí hodnotou T_M se tedy strukturní stabilita proteinu v daném prostředí zvyšuje. Prostřednictvím softwarového programu Roche LightCycler[®] 480 (Software release 1.5.1.62 SP3) byly takto z naměřených dat získány informace o strukturní stabilitě proteinu v prostředí pufrů o variabilním složení. Na základě těchto informací bylo zvoleno takové složení pufru, při kterém obě varianty cN-II vykazovaly nejvyšší možnou strukturní stabilitu (viz kapitola 4.3). Zvolený pufr byl následně použit v NMR spektroskopii (3.3.4).

3.3.4 NMR spektroskopie

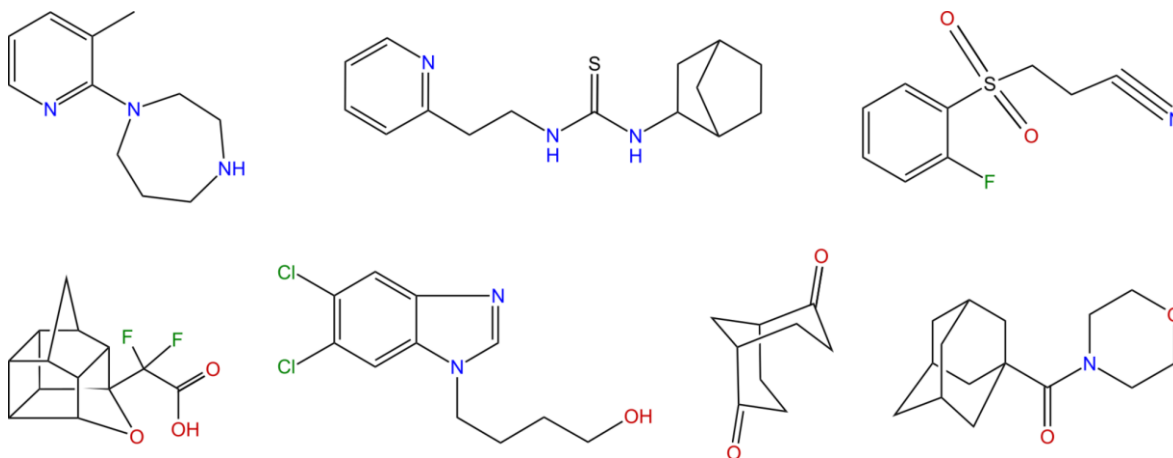
Metoda pro detekci interakcí ligandů s cN-II D52N Δ

Pro hledání interakcí nízkomolekulárních látek (ligandů) s enzymem cN-II byla využita metoda „rozdílu z přenosu saturace“ (z angl. *saturation transfer difference*) NMR (zkr. STD NMR) [73, 74]. Experiment byl proveden s C-terminálně zkrácenou neaktivní mutantní variantou cN-II D52N Δ , která umožňuje vazbu substrátu do aktivního místa, aniž by byl vzápětí katalyticky přeměněn na produkt.

Fragmentová knihovna

Zdrojem potenciálních ligandů enzymu byla fragmentová knihovna sestavená z 1000 nízkomolekulárních organických látek (fragmentů) zakoupených u specializované firmy Maybridge a uspořádaná do zásobních roztoků obsahujících vždy směs

5-6 fragmentů v DMSO. Zásobní koncentrace každého z fragmentů ve fragmentové knihovně byla 20 mM. Tyto fragmenty se vyznačují velkou strukturální diverzitou (viz Obrázek 16) a splňují tzv. pravidlo tří (z angl. *Rule of Three*) [75].



Obrázek 16 – Příklad vybraných zástupců z testované fragmentové knihovny demonstrující velkou strukturální diverzitu těchto malých molekul

Obrázek byl vytvořen s použitím programů Inkscape 0.92.4 a ChemBioDraw Ultra12.0.2 (© 1986-2010 CambridgeSoft.).

Příprava vzorků pro STD NMR screening

Před vlastní přípravou vzorků bylo potřebné množství zkrácené neaktivní varianty cN-II D52N Δ převedeno dialýzou do NMR pufru (3.1.4). Příprava vzorků pro primární screening fragmentové knihovny probíhala za laboratorní teploty. Každý vzorek o celkovém objemu 160 μ l připravený do mikrozkušavky obsahoval 1,5 μ M cN-II D52N Δ v NMR pufru a 10% (v/v) D₂O. Do vzorku bylo poté pipetováno 4 μ l zásobní směsi 5-6 fragmentů z určité pozice fragmentové knihovny, přičemž finální koncentrace každého fragmentu ve vzorku byla přibližně 500 μ M. Takto formulovaný vzorek o celkovém objemu 164 μ l byl poté za laboratorní teploty krátce centrifugován v centrifuze Eppendorf Minispin při 12100 G po dobu 30 s. Účelem bylo oddělit vzorek od potenciálních agregátů a odstranit z něj případné vzduchové bubliny. Následně byl přenesen skleněnou Pasteurovou pipetou do 3mm NMR kyvet a v této podobě případně skladován při 4 °C přes noc. Nejpozději následujícího dne však byly všechny připravené vzorky podrobeny STD NMR screeningu.

Vzorky pro validační screening fragmentů představujících potenciální ligandy enzymu byly připraveny obdobně – rozdílem v přípravě bylo pouze přidání 4 μ l zásobního roztoku již pouze jednotlivého fragmentu namísto směsi 5-6 fragmentů. Finální koncentrace samotného fragmentu ve vzorku o celkovém objemu 164 μ l byla opět přibližně 500 μ M. Vzorky pro analýzu vlivu přítomnosti IMP a ATP na interakci vybraných fragmentů s enzymem obsahovaly navíc kromě jednotlivých 500 μ M fragmentů také 500 μ M IMP bez či spolu s 500 μ M ATP.

STD NMR screening vzorků a jeho nastavení

Primární screening fragmentové knihovny s cN-II D52N Δ a následně též validační screening fragmentů vybraných na základě primárního screeningu (viz kapitola 4.4) byl proveden prostřednictvím ^1H STD NMR experimentu na spektrometru Bruker Avance IIITM HD 600 MHz vybaveném kryo-sondou a zásobníkem vzorků s 24 pozicemi.

Detailní nastavení spektrometru:

- **Magnet:** Superconducting 600 MHz, UltraShieldTM Plus
- **Konsole:** Avance III HD 600, tři kanály, BOSS III (36 korekcí homogenity magnetického pole), BSMS 2, zesilovače BLAXH2H 300/100 a BLAX 500
- **Bruker Cryoplatfom:** chlazené kanály ^1H a ^{13}C
- **Teplotní jednotka (angl. temperature unit):** BSVT, BCU 05
- **Hlavice sond (angl. probeheads):** inverzní troj-resonanční kryosonda s modulem ATM (5 mm CPTCI $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/\text{D}$ Z-GRD), inverzní širokopásmá sonda (5 mm BBI $^1\text{H}/\text{D}$ -BB Z-GRD), mikro-kryo inverzní troj-resonanční kryosonda s modulem ATM (1.7 mm CPTCI $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/\text{D}$ Z-GRD)
- **Pracovní rozhraní:** Linux CentOS 5.11, NMR software Topspin 3.2 pl 6

Všechna ^1H STD NMR spektra vzorků byla nasnímana při teplotě 20 °C s použitím standardní pulsní sekvence „stddiffesgp“ [76, 77]. Tato sekvence umožňuje efektivní potlačení signálů protonů vody ve vzorku a zvyšuje tak významně citlivost měření. Neselektivní 50ms tvarovaný puls Eburp2.1000 o výkonu 40 dB byl nastaven na ozařovací frekvenci 430 Hz, díky čemuž bylo následně možné tímto pulsem selektivně ozářit a saturovat pouze oblast ve frekvenčním rozsahu ± 100 Hz od středu ozařované frekvence. Na této ozařovací frekvenci nebo v její těsné blízkosti uvnitř uvedeného frekvenčního intervalu se vykytují signály protonů methylových skupin enzymu cN-II D52N Δ , které jsou dostatečně separované od téměř všech signálů protonů ostatních molekul (zejména testovaných fragmentů) ve vzorku. Podstatou dostatečné separace je zabránit vzniku falešných pozitivních signálů od ostatních molekul. Referenční (Off-resonance, viz dále) spektra byla nasnímana obdobným způsobem za stejných podmínek, avšak s ozařovací frekvencí 20000 Hz. V oblasti této ozařovací frekvence se obvykle nevyskytují žádné signály protonů, jejichž jádra by mohla být selektivně ozářena.

Výše popsaným způsobem bylo pro každý vzorek nasnímano ^1H STD NMR spektrum s rozlišením 1 Hz. Primární screening celkem 192 vzorků proběhl ve dvou měřeních, vždy po 96 vzorcích, přičemž v prvním měření byla otestována první polovina a ve druhém měření druhá polovina fragmentové knihovny. Nasnímání STD NMR spektra jednoho vzorku probíhalo po dobu přibližně 30 minut, z čehož vyplývá, že každé ze dvou měření trvalo přibližně 48 hodin.

Následný validační screening sloužil k ověření, zdali fragmenty, které se v primárním screeningu jeví jako interagující (avšak ve směsi s dalšími 4-5 fragmenty), s enzymem skutečně interagují. Tento proběhl při stejném nastavení a stejným způsobem jako primární screening, avšak pouze se 70 vzorky v jediném souvislém měření, které trvalo přibližně 35 hodin.

Screening vzorků obsahujících směs enzymu, daného fragmentu a IMP, resp. IMP a ATP sloužil pro analýzu, jak přirozené ligandy cN-II ovlivňují interakci jednotlivých fragmentů s enzymem. Nastavení a průběh screeningu byly obdobné jako při validačním a primárním screeningu. Souvisle bylo proměřeno celkem 103 vzorků a měření trvalo přibližně 56 hodin.

Zpracování naměřených dat

Nasnímaná data měla nejprve formát FID (angl. *free induction decay*), což představuje záznam závislosti intenzity proudu v měřící cívice spektrometru na čase. Tato data byla následně prostřednictvím Fourierovy transformace převedena na příslušná ^1H STD NMR spektra, která již představují závislost spektrální intenzity na frekvenci. Veškeré manipulace s NMR spektry byly prováděny v programu TopSpin verze 3.5 pl7 a 3.6.2 (Bruker BioSpin GmbH).

Získaná spektra byla zpracována následovně: STD spektrum daného vzorku, rozdělené na referenční (Off-resonance) a diferenční (On-resonance) ^1H NMR spektrum, bylo porovnáno s příslušnými spektry samotných fragmentů, které byly v tomto vzorku obsaženy. Z tohoto porovnání byly jednotlivé píky v referenčním spektru přiřazeny k daným fragmentům (pro ilustraci viz Obrázek 25A na str. 72).

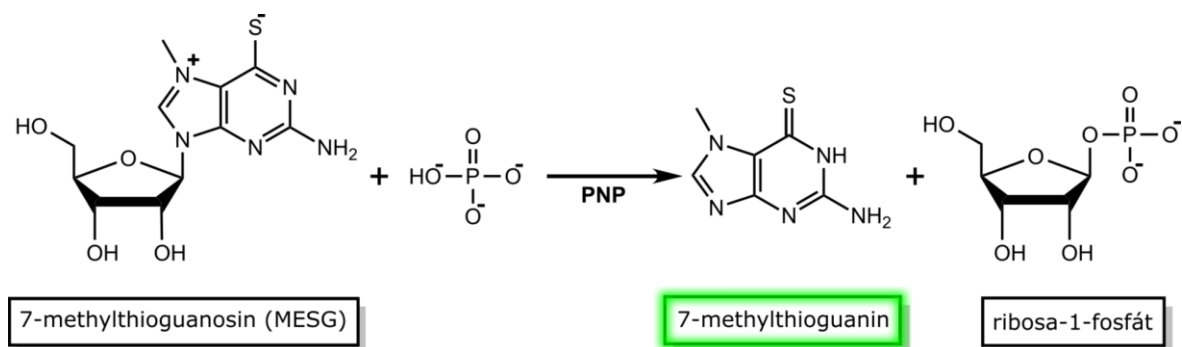
Míra interakce daného fragmentu s enzymem byla vyhodnocena prostřednictvím škálování diferenčního spektra vůči referenčnímu spektru. Diferenční spektrum bylo škálováno (zvětšováno), dokud jeden z píků náležících v tomto spektru protonům ligandu nedosáhl stejné výšky jako tentýž pík v referenčním spektru (pro ilustraci viz Obrázek 26 na str. 73). Hodnota „škálovacího faktoru“, f_S , diferenčního spektra vůči referenčnímu spektru byla dosazena do vztahu (1) a vypočítána tak relativní míra interakce daného fragmentu s enzymem, I_F .

$$I_F [\%] = \frac{1}{f_S} \cdot 100 \quad (1)$$

3.3.5 Detekce fosfatasové aktivity

Fosfatasová aktivita Tt82 vůči potenciálním substrátům byla sledována prostřednictvím komerčně dostupné soupravy EnzChek phosphate assay kit (3.1.6), pomocí níž lze detekovat přítomnost volných fosfátových iontů v analyzované směsi. Enzym purin nukleosid

fosforylasa (PNP), který je součástí soupravy, katalyzuje v přítomnosti volných fosfátových iontů fosforolýzu N-glykosidické vazby v chromogenním substrátu 7-methylthioguanosinu (MESG). Klíčovým produktem této reakce (Obrázek 17) je 7-methylthioguanin, který lze spektrofotometricky detekovat v jeho absorpčním maximu při vlnové délce 360 nm. Vzniklé množství tohoto produktu odpovídá v jednotkovém poměru množství původně volných fosfátových iontů v analyzované směsi. Díky tomuto mechanismu lze soupravu použít jako vhodný nástroj pro kvalitativní i kvantitativní analýzu fosfatasové aktivity Tt82.



Obrázek 17 – Schéma reakce, která je biochemickou podstatou fungování soupravy EnzChek phosphate kit

V přítomnosti volných fosfátových iontů (Pi) dochází prostřednictvím purin nukleotid fosforylasy (PNP) k fosforolytickému rozkladu substrátu 7-methylthioguanosinu (MESG). Produktem reakce jsou ribosa-1-fosfát a 7-methylthioguanin, který lze spektrofotometricky detekovat v jeho absorpčním maximu při vlnové délce 360 nm. Obrázek chemických struktur byl vytvořen v programu ChemBioDraw Ultra12.0.2 (© 1986-2010 CambridgeSoft.) a upraven v programu Inkscape 0.92.4.

Enzymové reakce s Tt82 byly připraveny do 96-jamkové destičky (MediSorp™ Nunc-Immuno™ 96 MicroWell™ plate, Fisher Scientific). Reakční směs obsahovala 25 μM Tt82, PNP (množství odpovídající enzymatické aktivitě 1 U), 0,2 mM MESG a 50 mM reakční pufr Tris-HCl (pH 7,5) doplněný o 1 mM chlorid hořečnatý a 0,1 mM azid sodný. Multikanálovou automatickou pipetou byl do reakční směsi přidán potenciální substrát o finální koncentraci 10 mM, čímž byla enzymová reakce zahájena. Následně byla 96-jamková destička vložena do přístroje Tecan Infinite M200 microplate reader (Tecan Life Sciences), v němž enzymová reakce nadále pokračovala při teplotě 26 °C. Prostřednictvím přístroje byla při vlnové délce 360 nm snímána absorbance ve všech využitých jamkách destičky ve 30s intervalech po dobu 120 min. Takto bylo možné detailně sledovat průběh reakcí v delším časovém horizontu. Naměřené hodnoty absorbance v jednotlivých enzymových reakcích byly poté zpracovány a v reakčním čase 30 min od zahájení reakce vyhodnoceny (viz kapitola 4.5).

Pro sestavení kalibrační funkce závislosti míry absorbance 7-methylthioguaninu při vlnové délce 360 nm na koncentraci volných fosfátových iontů v reakční směsi bylo provedeno standardizační měření. Reakční směs o celkovém objemu 100 μl v 96-jamkové destičce (viz výše) obsahovala PNP (1 U), 0,2 mM MESG a 50 mM reakční pufr Tris-HCl (pH 7,5) doplněný o 1 mM chlorid hořečnatý a 0,1 mM azid sodný. Enzymová reakce byla zahájena

přidáním standardu fosfátu o finální koncentraci v rozmezí od 2 μM do 150 μM , destička vložena do přístroje Tecan Infinite M200 a reakce ponechána probíhat při 26 °C. Po uplynutí 30 min byla prostřednictvím přístroje změřena míra absorbance při vlnové délce 360 nm ve všech využitých jamkách destičky a naměřené hodnoty použity k sestavení kalibrační funkce (viz kapitola 4.5).

Každá enzymová reakce byla provedena v duplikátu, od naměřené hodnoty absorbance v enzymové reakci byla vždy odečtena hodnota absorbance z příslušné reakce negativní kontroly. Složení reakce negativní kontroly bylo až na nepřítomnost Tt82, respektive standardu fosfátu, totožné jako složení příslušných enzymových reakcí.

3.3.6 Enzymové reakce

Příprava reakcí pro sledování aktivity Tt82

Za účelem stanovení kinetických parametrů fosfatasové aktivity Tt82 byl enzym podroben enzymovým reakcím s vybranými substráty, AMP a *p*-nitrofenylfosfátem (*p*NPP), při teplotě 37 °C a 60 °C.

Enzymová reakce byla zahájena přidáním substrátu do reakční směsi obsahující 5 μM Tt82 a 50mM Tris-HCl pufr (pH 7,5) doplněný o 1mM chlorid hořečnatý. Finální koncentrace substrátu v reakční směsi se pohybovala v rozmezí od 0,1 mM do 300 mM, celkový objem reakční směsi byl 100 μl . Po přidání substrátu byly mikrozkušavky s reakcemi přeneseny do suchého inkubátoru D1100 AccuBlock™ předem vytemperovaného na požadovanou teplotu. Při teplotě 37 °C probíhaly enzymové reakce s AMP po dobu 120 min a s *p*NPP po dobu 60 min. Při teplotě 60 °C byly naproti tomu enzymové reakce ponechány probíhat pouze po dobu 20 min s AMP a po dobu 10 min s *p*NPP. Přenesením z inkubátoru na led a následným přidáním 40 μl 0,5M kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA) do reakční směsi byly enzymové reakce zastaveny a do doby vlastní analýzy prostřednictvím vysokoúčinné kapalinové chromatografie (viz kapitola 3.3.7) uchovávány při -20 °C. Každá enzymová reakce byla provedena v duplikátu.

3.3.7 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie: analýza enzymových reakcí

Reakční směsi připravené dle postupu uvedeného v kapitole 3.3.6 byly analyzovány prostřednictvím vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) na reverzní fázi se spektrofotometrickou detekcí. Objem 5 μl analyzovaného vzorku byl nanesen na chromatografickou kolonu Gemini® 5 μm C18 110 Å column (LC Column 100 x 3 mm, Phenomenex) připojenou k HPLC přístroji Agilent 1100 a separováno isokratickou elucí. Mobilní fáze byla tvořena pufrům o různém složení v závislosti na typu substrátu ve vzorku. Přehled pufrů použitých jako mobilní fáze při HPLC separaci substrátu a produktu je společně s vlnovou délkou jejich spektrofotometrické detekce při analýze studovaných

enzymových reakcí s Tt82 uveden v Tabulce 1. Po isokratické eluci vzorku byla kolona vždy promyta směsí methanolu a 0,05% (v/v) kyseliny trifluoroctové (TFA).

Tabulka 1 – Přehled pufrů použitých jako mobilní fáze při HPLC separaci substrátu a produktu a vlnová délka jejich spektrofotometrické detekce při analýze studovaných enzymových reakcí s Tt82

Substrát	Produkt	Detekce	Mobilní fáze
AMP	adenosin	260 nm	0,1M KH ₂ PO ₄ (pH 6,0); 5% (v/v) methanol
<i>p</i> NPP	<i>p</i> -nitrofenol ^(*)	310 nm	0,1M KH ₂ PO ₄ (pH 6,0); 20% (v/v) methanol

*pozn.: absorpční maximum *p*-nitrofenolu je značně závislé na pH prostředí; při pH 6,0 se nachází při vlnové délce 310 nm [78]

Spektrofotometrickou analýzou chromatografické separace byl získán chromatogram. Prostřednictvím programu Agilent ChemStation (Agilent Technologies, USA) byla z chromatogramu získána plocha pod píky substrátu a produktu a následně vypočítán stupeň konverze enzymové reakce, α , s použitím vzorce (2):

$$\alpha = \frac{S_s}{S_s + S_p} \quad (2)$$

kde S_s je plocha pod píkem odpovídajícím substrátu a S_p plocha pod píkem odpovídajícím produktu. Získaný stupeň konverze byl následně použit k výpočtu počáteční reakční rychlosti, v_0 , enzymu Tt82 při různých počátečních koncentracích substrátů AMP a *p*NPP ze vztahu (3):

$$v_0 = \frac{[S]_{\text{poč}} \cdot V \cdot \alpha}{t} \quad (3)$$

kde $[S]_{\text{poč}}$ je počáteční koncentrace substrátu, V je objem reakční směsi a t je doba, po kterou enzymová reakce probíhala. V programu GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc) byly do grafu vyneseny hodnoty počátečních reakčních rychlostí v závislosti na počáteční koncentraci substrátu. Body grafu byly proloženy odpovídající funkcí enzymové kinetiky – buďto rovnicí Michaelise-Mentenové (4) anebo rovnicí pro inhibici substrátem (5) [79]. Z průběhu této funkce byly následně prostřednictvím výše uvedeného programu získány hodnoty kinetických parametrů Michaelisovy konstanty, K_M , maximální reakční rychlosti, V_{max} , a případně též inhibiční konstanty, K_i .

$$v_0 = \frac{V_{\text{max}} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (4)$$

$$v_0 = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S] \cdot \left(1 + \frac{[S]}{K_i}\right)} \quad (5)$$

Ze získaných parametrů byla podle vzorce (6) vypočtena rychlostní konstanta enzymové reakce, k_{cat} , enzymu Tt82 s daným substrátem.

$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\max}}{[E]_t} \quad (6)$$

Člen $[E]_t$ ve vzorci (6) vyjadřuje celkovou koncentraci enzymu v reakční směsi. V případě Tt82 byla za tento člen dosazována hodnota $5 \mu\text{M}$ v jednotkách $\text{nmol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Hodnota V_{\max} byla vždy nejprve vztažena na objem reakční směsi (tj. $1 \cdot 10^{-4} \text{ dm}^3$) a do vzorce (6) dosazována v jednotkách $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{dm}^{-3}$.

4 Výsledky

Cytosolická purinová 5'-nukleotidasa II

4.1 Heterologní exprese a izolace rekombinantních proteinů

Po své expresi je lidská nukleotidasa cN-II lokalizována v buněčném cytosolu. Konstrukty (His)₆ – cN-II WT (1-536) (dále jen cN-II WT Δ) a (His)₆ – cN-II D52N (1-536) (dále jen cN-II D52N Δ) byly exprimovány v bakteriálním kmenu *Escherichia coli* BL21 (DE3) RIL (metodický postup je popsán v kapitolách 3.1.1, 3.1.2 a 3.3.1). Ze 2 l TB média, v němž byly pěstovány bakteriální buňky s indukovanou expresí konstruktu cN-II WT Δ, bylo získáno 32 g buněčné biomasy. Z tohoto množství bylo 20,5 g následně použito pro izolaci rekombinantního proteinu a zbytek uchován při –20 °C. V případě bakteriálních buněk s indukovanou expresí konstruktu cN-II D52N Δ bylo ze 2 l TB média získáno 36,5 g buněčné biomasy a z toho 24 g použito pro následnou izolaci rekombinantního proteinu.

Rozbitím bakteriálních buněk v lyzačním pufru (3.1.4) prostřednictvím sonikace a následnou centrifugací byla oddělena rozpustná frakce od nerozpustné frakce. Produkty rekombinantní exprese, tj. oba rekombinantní proteiny, se nacházely zejména v rozpustné frakci (viz Obrázek 19 na str. 64). Bylo získáno přibližně 200 ml supernatantu buněčného lyzátu obsahujícího rekombinantní protein cN-II WT Δ, respektive přibližně 240 ml supernatantu buněčného lyzátu obsahujícího rekombinantní protein cN-II D52N Δ. Ze získaných supernatantů byly posléze tyto proteiny purifikovány.

4.2 Purifikace rekombinantních proteinů

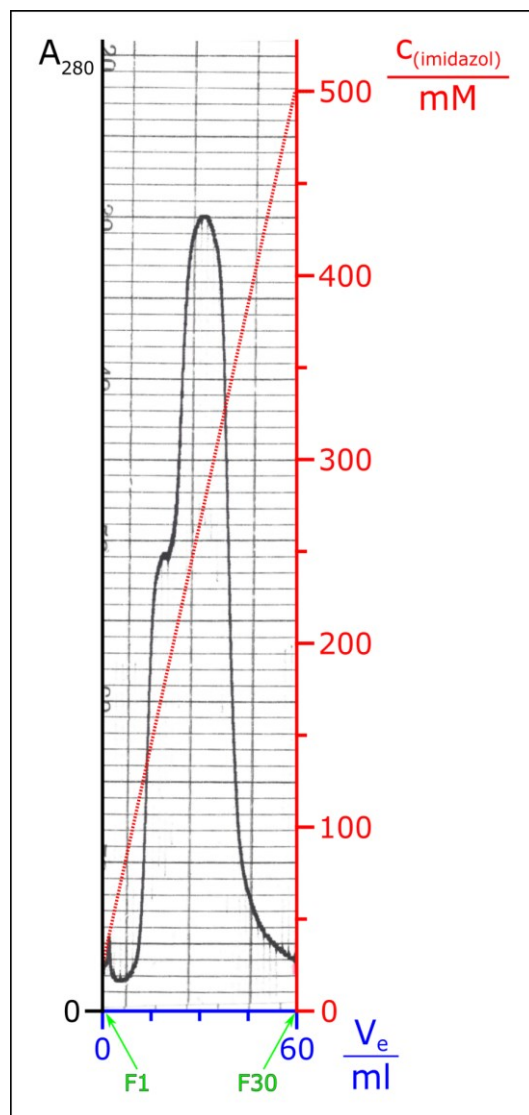
Oba rekombinantní proteiny byly podrobeny dvou krokovou purifikací (kapitola 3.3.2) podle již dříve zavedeného protokolu [49], nejprve prostřednictvím chelatační chromatografie za využití histidinové kotvy a posléze prostřednictvím iontově výměnné chromatografie s využitím teoretické hodnoty isoelektrického bodu těchto proteinů. Separace rekombinantních proteinů pomocí obou chromatografických metod byla sledována prostřednictvím SDS-PAGE (kapitola 3.3.2). V elektrickém poli za denaturujících podmínek putuje 65kDa nezkrácená (angl. *full-length*) varianta cN-II jako částice s molekulovou hmotností přibližně 55-57 kDa [46], proto lze oba rekombinantní proteiny očekávat v oblasti 50-60 kDa molekulových hmotností standardu.

V prvním purifikačním kroku byly rekombinantní proteiny obsažené v příslušném supernatantu buněčného lyzátu podrobeny chelatační chromatografií na koloně HisTrapTM HP (3.1.5). Nanesením supernatantu na tuto chromatografickou kolonu

se na koloně podařilo zachytit velké množství rekombinantního proteinu, avšak společně s dalšími balastními proteiny a molekulami s dostatečnou afinitou ke chromatografickému nosiči kolony. Tyto molekuly byly posléze z kolony vytěsněny stoupajícím gradientem imidazolového elučního pufru pro chelatační chromatografii (3.1.4) a sbírány ve 2ml frakcích. V případě cN-II WT Δ bylo při eluci posbíráno 38 frakcí (Obrázek 19A, str. 64), v případě cN-II D52N Δ pak 30 frakcí (Obrázek 19B, str. 64). Průběh eluce obou rekombinantních proteinů byl obdobný a je proto reprezentován pouze jedním chromatogramem z eluce cN-II D52N Δ , který je zachycen na Obrázek 18.

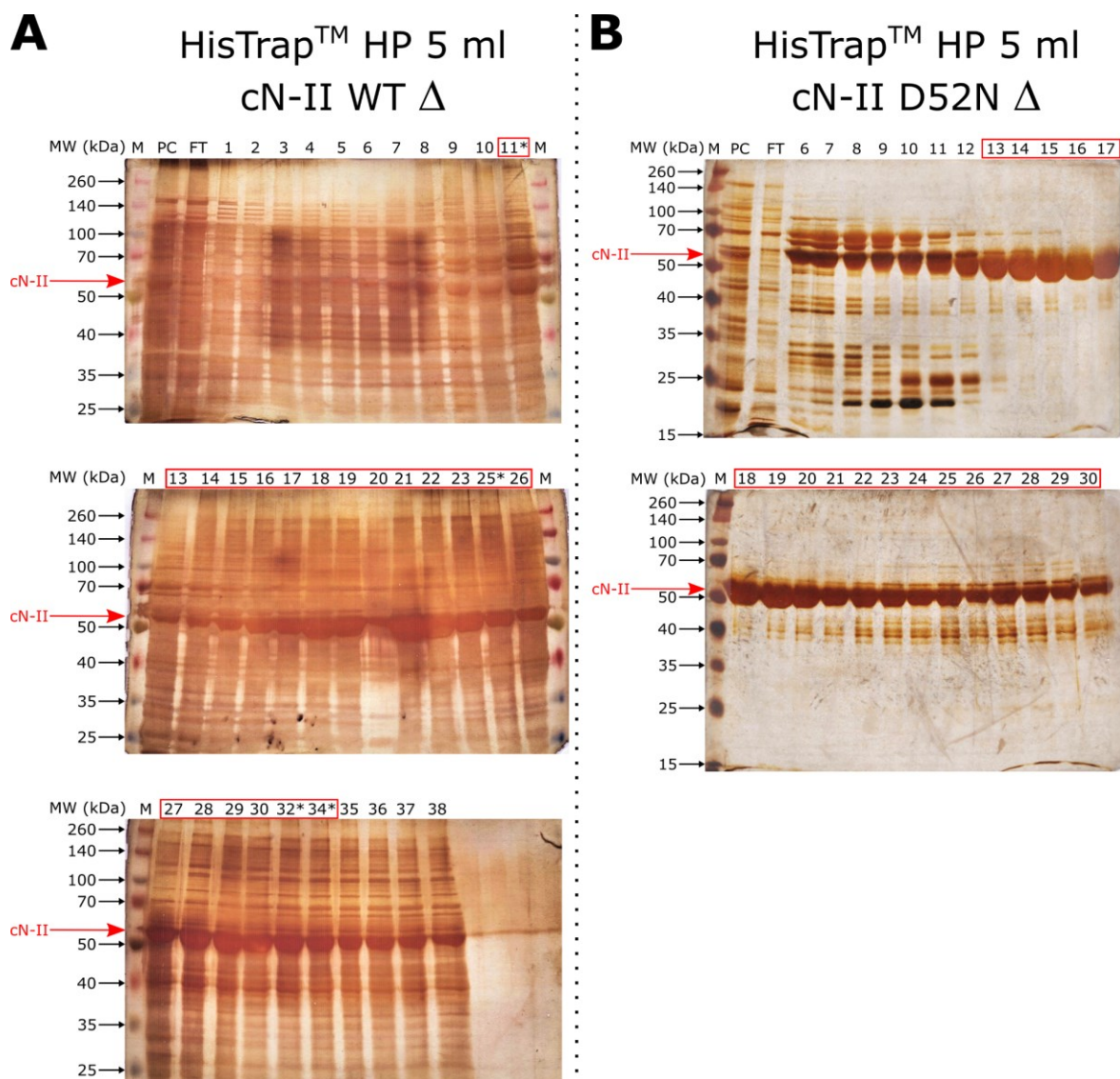
Účinnost separace obou rekombinantních proteinů byla následně ověřena prostřednictvím SDS-PAGE (Obrázek 19, str. 64). Na základě těchto výsledků byly v případě cN-II WT Δ vybrány frakce 11*-34* o celkovém objemu přibližně 40 ml, v případě cN-II D52N Δ pak frakce 13-30 o celkovém objemu přibližně 37 ml. Příslušné frakce byly sloučeny a dialyzovány v ekvilibračním pufru pro iontově výměnnou chromatografii (3.1.4). Bylo získáno přibližně 42 ml filtrátu obsahujícího cN-II WT Δ a odděleného centrifugací od precipitátu, jehož absorbance při $\lambda = 280$ nm (A_{280}) měla hodnotu 3,54. Vedle toho filtrát o objemu 37 ml obsahující cN-II D52N Δ vykazoval hodnotu absorbance $A_{280} = 4,53$.

Ve druhém purifikačním kroku byly oba rekombinantní proteiny purifikovány pomocí iontově výměnné chromatografie na koloně MonoS 5/50 GL (měnič kationtů).



Obrázek 18 – Chromatogram zachycující průběh eluce při chelatační chromatografii cN-II D52N Δ na koloně HisTrap™ HP 5ml (GE Healthcare)

Eluce probíhala při konstantním průtoku 2 ml/min elučního pufru pro chelatační chromatografii (3.1.4). Během eluce bylo jímáno celkem 30 frakcí o objemu přibližně 2 ml. Na chromatogramu je vyznačen eluční objem 1. a 30. frakce (F1 a F30, zelená); zbylé frakce 2-29 byly jímány v elučním objemu mezi 1. a 30. frakcí. Černá křivka znázorňuje průběh relativní absorbance eluátu, který byl sledován chromatografickou stanicí ÄKTA Prime (Amersham Bioscience, Švédsko). Červenou křivkou je znázorněn teoretický průběh gradientu imidazolu v elučním pufru. Obrázek byl upraven v programu Inkscape 0.92.4.

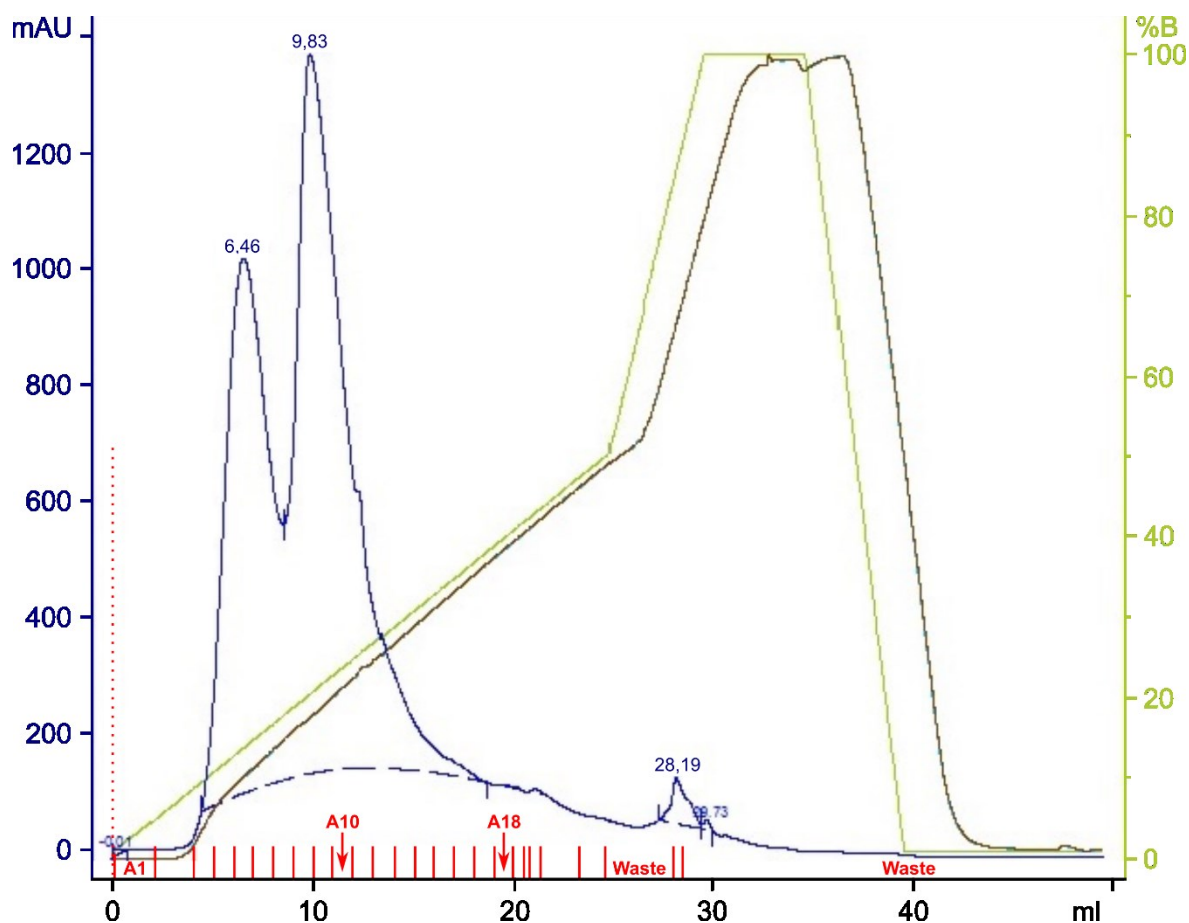


Obrázek 19 – Analýza průběhu chelatační chromatografie na niklové koloně HisTrap™ HP 5ml (GE Healthcare)

Na obrázku jsou vyobrazeny polyakrylamidové gely obarvené stříbrem (kapitola 3.3.2), prostřednictvím nichž byly analyzovány frakce sbírané při chromatografické separaci supernatantu buněčného lyzátu obsahujícího **A)** rekombinantní protein cN-II WT Δ ; **B)** rekombinantní protein cN-II D52N Δ . Červenou šipkou je vždy naznačeno umístění proužků odpovídajících cN-II. Na základě této analýzy byly vybrány a spojeny frakce vhodné pro další práci. Vybrané frakce jsou označeny červeným rámečkem. Vysvětlení zkratk: M – standard molekulových hmotností Spectra™ Multicolor Broad range Protein Ladder; MW – molekulové hmotnosti v jednotkách kDa přiřazené k příslušným proužkům standardu; PC – vzorek před chromatografickou separací; FT – „flow-through“ = vzorek roztoku proteklého chromatografickou kolonou při nanášení buněčného lyzátu; označení * vyjadřuje vzorek frakce vzniklé spojením dvou po sobě následujících frakcí. Obrázek byl upraven v programu Inkscape 0.92.4.

Rekombinantní protein cN-II WT Δ byl ze svého roztoku o přibližném celkovém objemu 42 ml purifikován ve třech stejných dílčích separačních cyklech. Na ekvilibrovanou katexovou kolonu byla nanesena vždy přibližně pouhá třetina tohoto roztoku, aby nebyla překročena kapacita použité chromatografické kolony a nedošlo tak ke zbytečným ztrátám rekombinantního proteinu. Za výše popsaných podmínek se rekombinantní protein na kolonu navázal a po jejím promytí byl následně eluován rostoucí iontovou silou vlivem

gradientu elučního pufru pro iontově výměnnou chromatografii (3.1.4). Průběh eluce při jednom ze tří dílčích separačních cyklů je vyobrazen na reprezentativním chromatogramu na Obrázku 20. Během všech tří separačních cyklů bylo nasbíráno celkem 27 frakcí (Obrázek 21A, str. 66). Purifikace rekombinantního proteinu cN-II D52N Δ probíhala ze svého roztoku o přibližném celkovém objemu 37 ml obdobně, avšak ve čtyřech dílčích separačních cyklech. Během nich bylo nasbíráno celkem 36 frakcí (Obrázek 21B, str. 66). Průběh eluce byl při všech dílčích separačních cyklech obdobný jako pro cN-II WT Δ a je proto ilustrován chromatogramem na Obrázku 20.

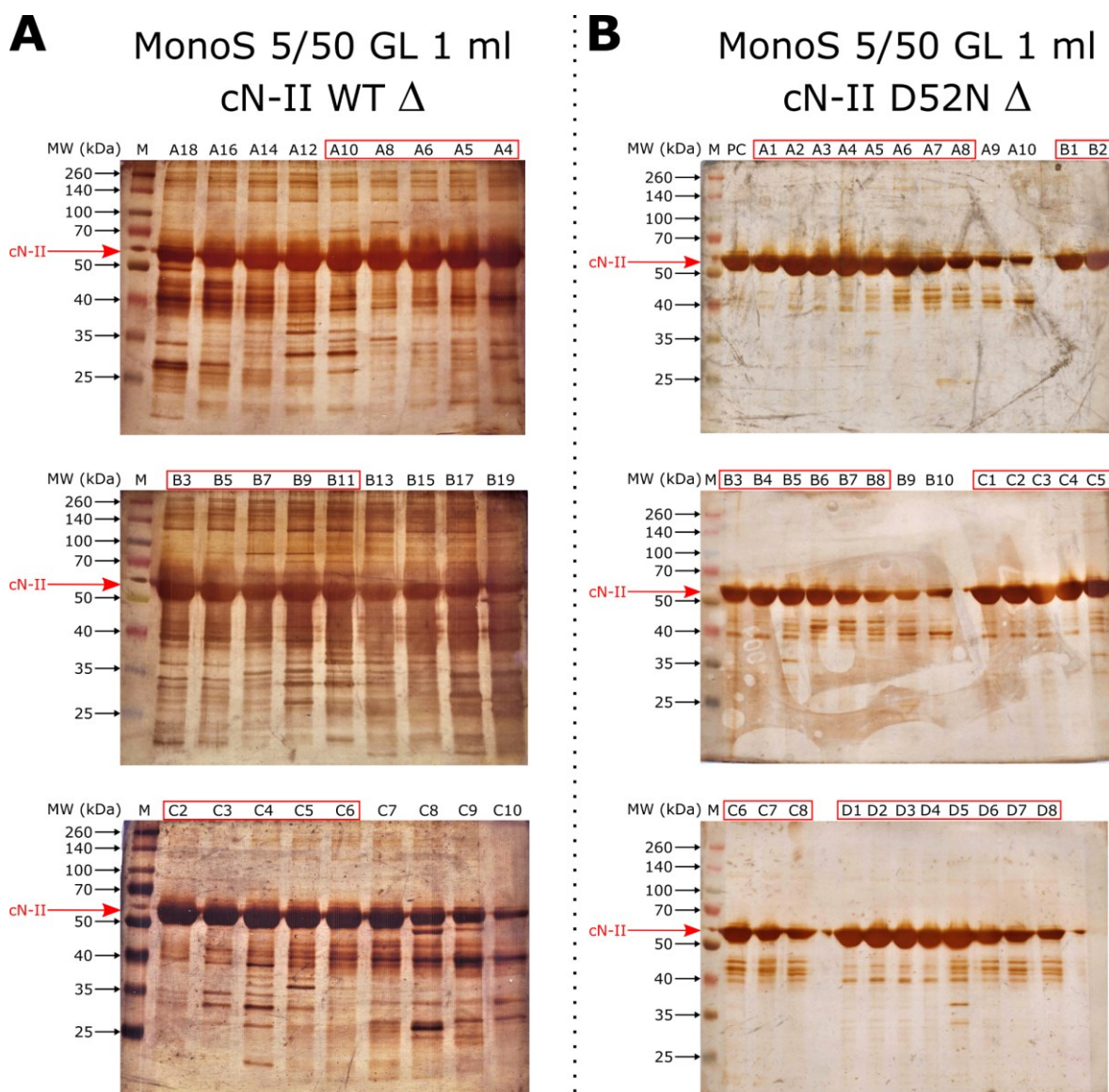


Obrázek 20 – Chromatogram zachycující průběh eluce cN-II WT Δ při iontově výměnné chromatografii na koloně MonoS 5/50 GL 1 ml (GE Healthcare)

V grafu je zachycen průběh absorbance při vlnové délce 280 nm (tmavě modrá), průběh gradientu elučního pufru (%B) obsahujícího 500mM NaCl (ovlivově zelená) a s tím spojený průběh konduktivity elučního roztoku (tmavě hnědá). Při ose x jsou taktéž znázorněny jednotlivé sbírané frakce (červená). Pro přehlednost jsou vyznačeny pouze frakce A1, A10 a A18.

Účinnost chromatografické separace rekombinantních proteinů byla opět ověřena prostřednictvím SDS-PAGE (Obrázek 21, str. 66). Na základě těchto výsledků byly v případě cN-II WT Δ vybrány frakce A4-A10, B3-B11 a C2-C6 o celkovém objemu přibližně 32 ml, v případě cN-II D52N Δ pak frakce A1-A8, B1-B8, C1-C8 a D1-D8 o celkovém objemu přibližně 64 ml. Příslušné frakce byly sloučeny a dialýzou převedeny do pufru vhodného pro skladování cN-II (3.1.4). Tím bylo po oddělení od precipitátu získáno

přibližně 29 ml roztoku purifikovaného cN-II WT Δ , jehož absorbance A_{280} měla hodnotu 1,74, což odpovídá přibližné koncentraci 1,5 mg/ml tohoto proteinu. Takto byl získán také roztok purifikovaného cN-II D52N Δ o přibližném objemu 66 ml. Roztok proteinu vykazoval absorbanci $A_{280} = 1,23$, což odpovídá koncentraci přibližně 1,1 mg/ml rekombinantního proteinu. Proteiny nebylo nutné zahušťovat na vyšší koncentraci.



Obrázek 21 – Analýza průběhu iontové výměnné chromatografie na koloně MonoS 5/50 GL (GE Healthcare)

Na obrázku jsou vyobrazeny polyakrylamidové gely obarvené stříbrem (kapitola 3.3.2), prostřednictvím nichž byly analyzovány frakce sbírané při chromatografické separaci roztoku obsahujícího **A)** rekombinantní protein cN-II WT Δ ; **B)** rekombinantní protein cN-II D52N Δ . Červenou šipkou je vždy naznačeno umístění proužků odpovídajících cN-II. Na základě této analýzy byly vybrány a spojeny frakce obsahující rekombinantní protein v dostatečné čistotě pro další experimenty. Vybrané frakce jsou označeny červeným rámečkem. Vysvětlení zkratk: M – standard molekulových hmotností Spectra™ Multicolor Broad range Protein Ladder; MW – molekulové hmotnosti v jednotkách kDa přiřazené k příslušným proužkům standardu; PC – vzorek před chromatografickou separací; označení A, B, C či D vyjadřuje frakce sbírané v průběhu 1., 2., 3. či 4. dílčí chromatografické separace. Obrázek byl upraven v programu Inkscape 0.92.4.

Po výše popsané dvou krokové purifikaci byly oba rekombinantní proteiny získány v čistotě dostatečně vysoké pro následující experimenty. Výtěžek činil přibližně 43,5 mg rekombinantního proteinu cN-II WT Δ z 20,5 g vlhké buněčné biomasy a přibližně 73 mg rekombinantního proteinu cN-II D52N Δ z 24 g vlhké buněčné biomasy. V pufru vhodném pro skladování cN-II (3.1.4) byly následně oba purifikované proteiny zamrazeny na suchém ledu a skladovány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

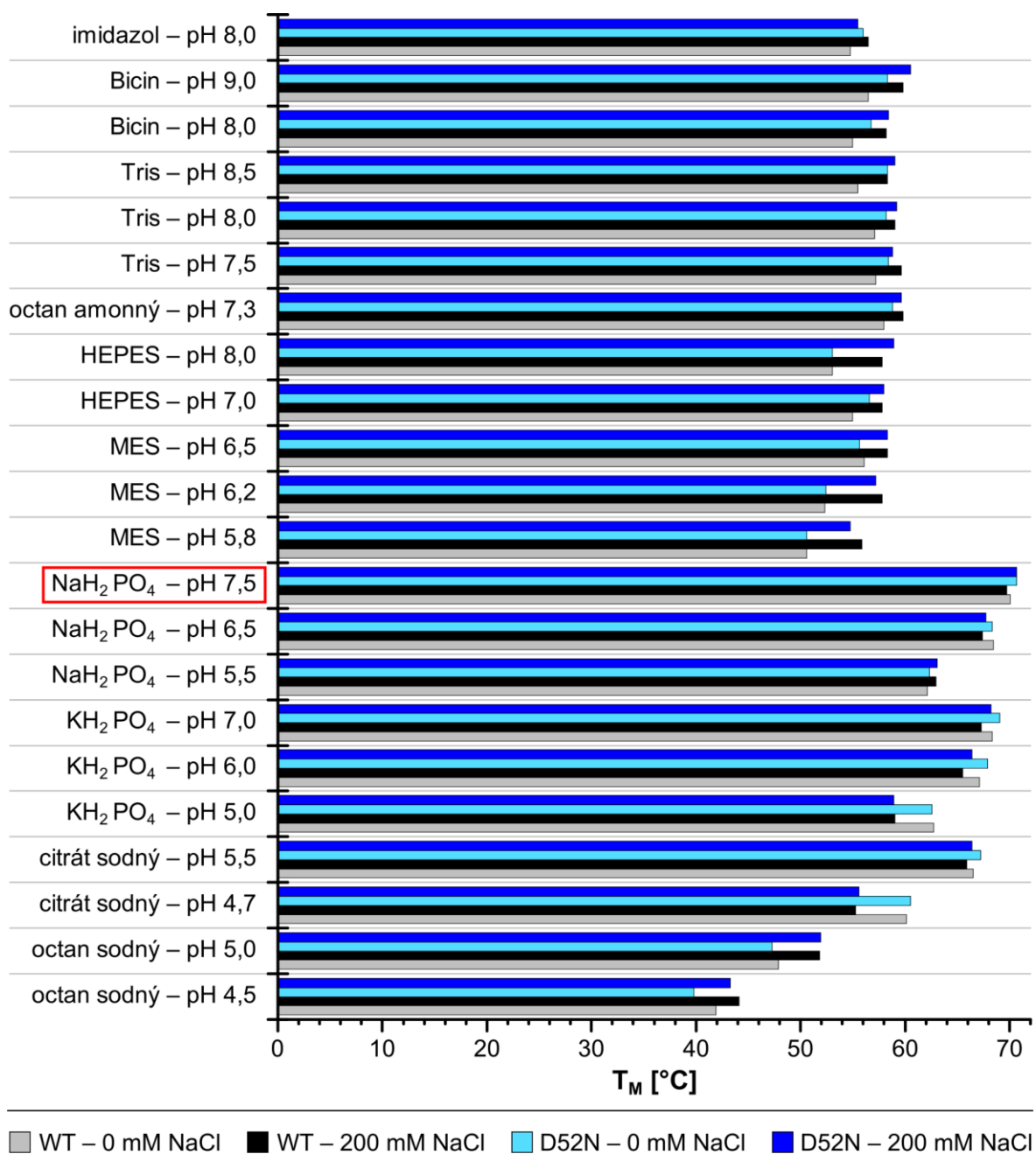
4.3 Optimalizace pufru pro cN-II pomocí diferenční skenovací fluorimetrie

Pro nalezení optimálního složení pufru, v němž zkrácené varianty cN-II WT Δ a cN-II D52N Δ vykazují nejvyšší strukturní stabilitu, byla využita metoda DSF. Postup a provedení následujících experimentálních kroků a způsob zpracování naměřených dat je popsán v kapitole 3.3.3.

V prvním kroku byly oba proteiny testovány v prostředí různých pufrů (viz kapitola 3.3.3). Výslednou strukturní stabilitu cN-II WT Δ a cN-II D52N Δ shrnuje sloupcový graf na Obrázku 22 (str. 68). Mezi testovanými pufrů mají nejvyšší stabilizační účinky sodné a draselné fosfátové pufrů. Na základě těchto výsledků byl pro další optimalizaci zvolen pufr o složení: 100mM NaH_2PO_4 (pH 7,5), 200mM NaCl. V tomto pufru vykazovaly oba rekombinantní proteiny nejvyšší hodnotou T_M , a sice $69,74\text{ }^{\circ}\text{C}$ v případě cN-II WT Δ a $70,66\text{ }^{\circ}\text{C}$ v případě cN-II D52N Δ .

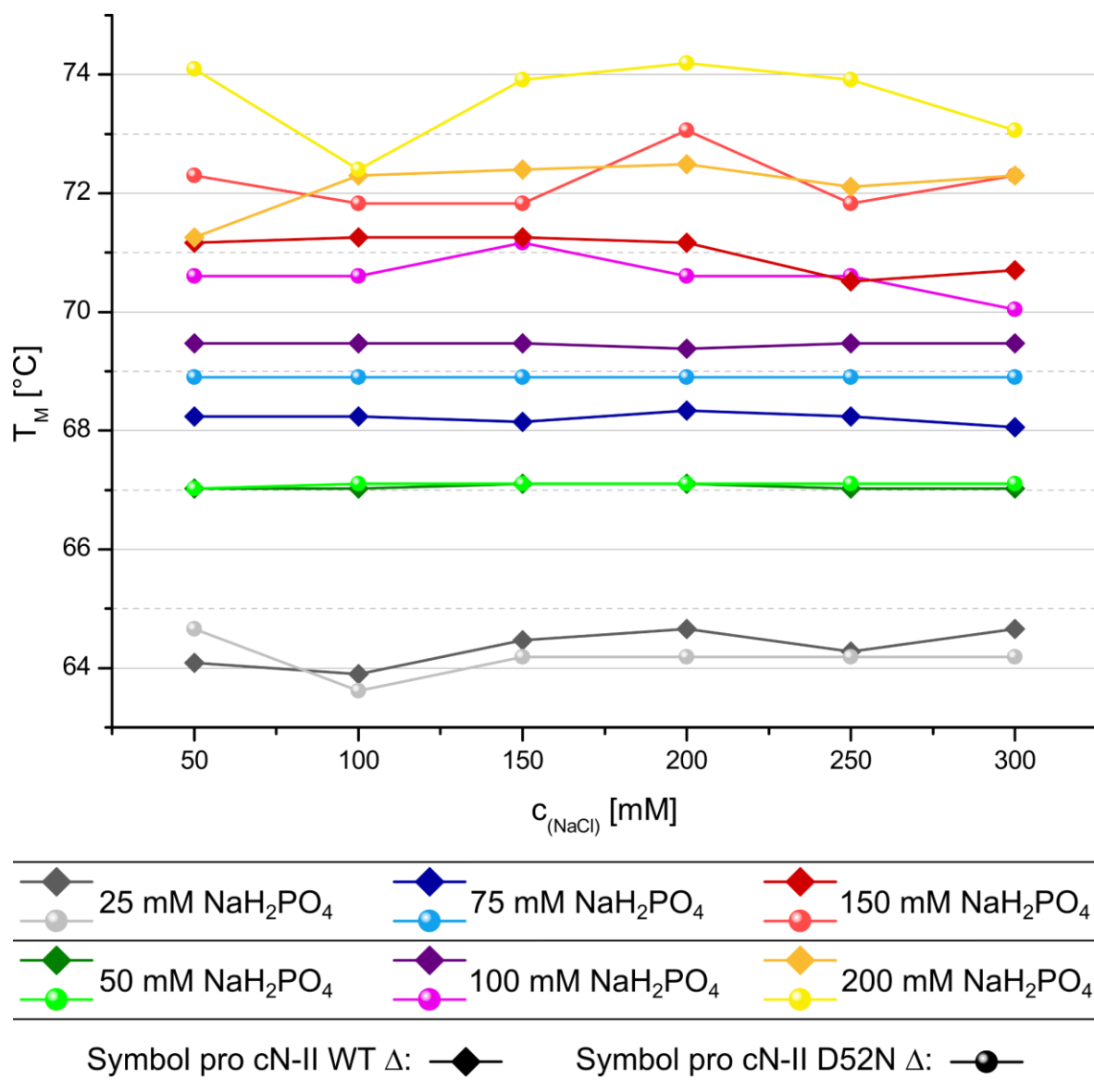
Pro vybraný pufr byly ve druhém kroku s oběma variantami cN-II testovány různé koncentrace NaH_2PO_4 a NaCl. Výsledky z tohoto měření jsou shrnuty prostřednictvím spojnicového grafu (Obrázek 23, str. 69). S přihlédnutím k celkové iontové síle bylo z těchto výsledků vybráno následující složení fosfátového pufru: 150mM NaH_2PO_4 (pH 7,6), 200mM NaCl. V tomto pufru byla pro cN-II WT Δ naměřena hodnota $T_M = 71,17\text{ }^{\circ}\text{C}$, pro cN-II D52N Δ pak hodnota $T_M = 73,06\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Třetí DSF experiment sloužil k ověření, jak na stabilitu zkrácených variant cN-II v přítomnosti 150mM NaH_2PO_4 (pH 7,6), 200mM NaCl, 1mM MgCl_2 a 0,5mM DTT působí různá koncentrace substrátu IMP a aktivátoru ATP. Hodnoty T_M získané po provedení experimentu a zpracování denaturačních křivek jsou uvedeny v tabulkách na Obrázku 24 (str. 70).



Obrázek 22 – Strukturní stabilita variant cN-II WT Δ a cN-II D52N Δ

Strukturní stabilitu vyjadřuje teplota denaturace proteinu, T_M , v jednotkách $^{\circ}\text{C}$. Stabilita byla testována v prostředí různých pufrů o variabilním pH za přítomnosti či absence 200mM NaCl. Červeným rámečkem je označen pufr, v němž bylo pro obě varianty dosaženo nejvyšší strukturní stability. Data jsou výsledkem jednoho neopakovaného měření. Graf byl vytvořen v programu OriginPro 8 a upraven v programu Inkscape 0.92.4.



Obrázek 23 – Závislost strukturní stability cN-II WT Δ na koncentraci NaH_2PO_4 a NaCl

Strukturní stabilitu vyjadřuje teplota denaturace proteinu, T_M , v jednotkách $^\circ\text{C}$. Data jsou výsledkem jednoho neopakovaného měření. Obrázek byl vytvořen v programu OriginPro 8 a upraven v programu Inkscape 0.92.4.

Celkovým výsledkem ze tří výše popsaných DSF experimentů byl optimalizovaný pufr, v němž strukturní stabilita rekombinantních proteinů cN-II WT Δ a cN-II D52N Δ přesahuje teplotu $70\text{ }^\circ\text{C}$. Finální složení tohoto pufru je: 150mM NaH_2PO_4 (pH 7,6), 200mM NaCl, 1mM MgCl_2 a 0,5mM DTT. Co nejvyšší strukturní stabilita proteinů je mj. důležitou podmínkou pro experimenty, při nichž je daný protein jinak udržovaný na ledu vystaven po delší časový interval (např. v řádu hodin) pokojové či vyšší teplotě. Takovým experimentem je i STD NMR screening, jemuž byly oba konstrukty cN-II podrobeny.

cN-II WT Δ

		Koncentrace IMP [mM]										
		0,00	0,03	0,05	0,10	0,30	0,50	1,00	3,00	5,00	10,00	30,00
Koncentrace ATP [mM]	0,0	69,38	69,19	69,47	71,08	69,94	69,19	69,38	69,38	68,81	69,00	69,47
	0,1	69,19	68,90	69,38	69,19	68,90	69,28	69,19	69,38	69,47	69,75	70,70
	0,3	69,47	68,90	69,47	69,47	70,04	70,04	69,75	69,75	70,04	70,04	70,13
	0,5	68,34	69,47	69,38	69,38	69,94	70,04	69,38	69,47	69,19	69,47	70,13
	1,0	68,90	68,90	69,47	69,38	69,75	68,90	70,04	69,47	69,57	70,04	69,94
	3,0	69,47	70,04	69,94	70,13	69,75	69,94	69,75	69,75	69,75	69,00	69,19
	5,0	70,04	69,94	69,94	70,51	69,94	69,94	69,75	69,94	70,13	70,89	69,47
	10,0	71,08	71,26	70,04	70,04	69,94	70,04	70,04	70,89	70,89	70,70	69,38

cN-II D52N Δ

		Koncentrace IMP [mM]										
		0,00	0,03	0,05	0,10	0,30	0,50	1,00	3,00	5,00	10,00	30,00
Koncentrace ATP [mM]	0,0	71,74	71,74	71,17	71,45	71,26	70,13	70,32	70,04	70,04	71,27	70,13
	0,1	71,26	71,45	72,40	71,26	70,32	70,32	70,04	70,13	71,17	70,04	71,17
	0,3	70,32	70,60	70,70	70,32	70,60	70,70	69,28	71,17	70,70	70,13	71,17
	0,5	71,26	69,47	69,47	70,89	70,13	69,66	70,04	70,13	70,04	70,13	71,92
	1,0	71,17	71,17	69,94	71,85	70,60	70,04	70,60	70,04	69,47	71,26	70,13
	3,0	70,32	70,89	70,70	70,70	70,51	70,04	70,04	70,04	70,23	70,60	72,21
	5,0	70,79	70,13	70,04	70,32	71,17	70,04	72,99	69,94	70,70	69,38	70,51
	10,0	70,23	70,41	70,70	72,30	71,26	71,08	72,68	71,74	70,70	72,68	70,70

Obrázek 24 – Závislost strukturální stability C-terminálně zkrácených variant cN-II na koncentraci ATP a IMP

Oba proteiny byly v pufru o složení: 150mM NaH₂PO₄ (pH 7,6), 200mM NaCl, 1mM MgCl₂ a 0,5mM DTT. Výsledné hodnoty v tabulce mají charakter teploty denaturace proteinu, T_M, v jednotkách °C. Data jsou výsledkem jednoho neopakovaného měření. Obrázek byl upraven v programu Inkscape 0.92.4.

4.4 Hledání ligandů varianty cN-II D52N Δ

Veškeré výsledky v této kapitole jsou součástí dlouhodobého projektu řešeného ve školící laboratoři a nebyly dosud publikovány. Struktury níže zmiňovaných fragmentů (viz Tabulka 2 na str. 71) proto nemohly být v této diplomové práci uvedeny.

Primární STD NMR screening

Ligandy cN-II byly hledány metodou STD NMR (viz kapitola 3.3.4). Prostřednictvím této metody se v primárním NMR screeningu testovalo, zdali některé z 1000 malých organických molekul (fragmentů) z fragmentové knihovny interagují se zkrácenou neaktivní variantou cN-II D52N Δ . Postup přípravy vzorků, nastavení a provedení experimentu a způsob vyhodnocení získaných spekter je detailně popsán v kapitole 3.3.4.

V primárním screeningu bylo otestováno 196 vzorků, kdy každý vzorek představoval směs 1,5 μ M enzymu s 5-6 fragmenty o koncentraci 500 μ M každého z nich. V naměřených spektrech vzorků byly nejprve jednotlivé píky přiřazeny k daným fragmentům (Obrázek 25A na str. 72). Fragmenty, jejichž přiřazené píky byly výraznější a dobře

rozeznatelné v referenčním i diferenčním spektru zároveň, byly posléze vybrány jako pravděpodobně interagující s enzymem. Na Obrázku 25A na str. 72 je takovým fragmentem sloučenina s označením F082F05, jejíž přiřazené píky 1-3 jsou dobře viditelné také v diferenčním spektru. Ze všech 196 testovaných vzorků bylo tímto postupem vybráno celkem 70 potenciálních ligandů. Jejich interakce s enzymem byla následně znovu ověřena ve validačním screeningu, který je ilustrován příkladem na Obrázku 25B (str. 72).

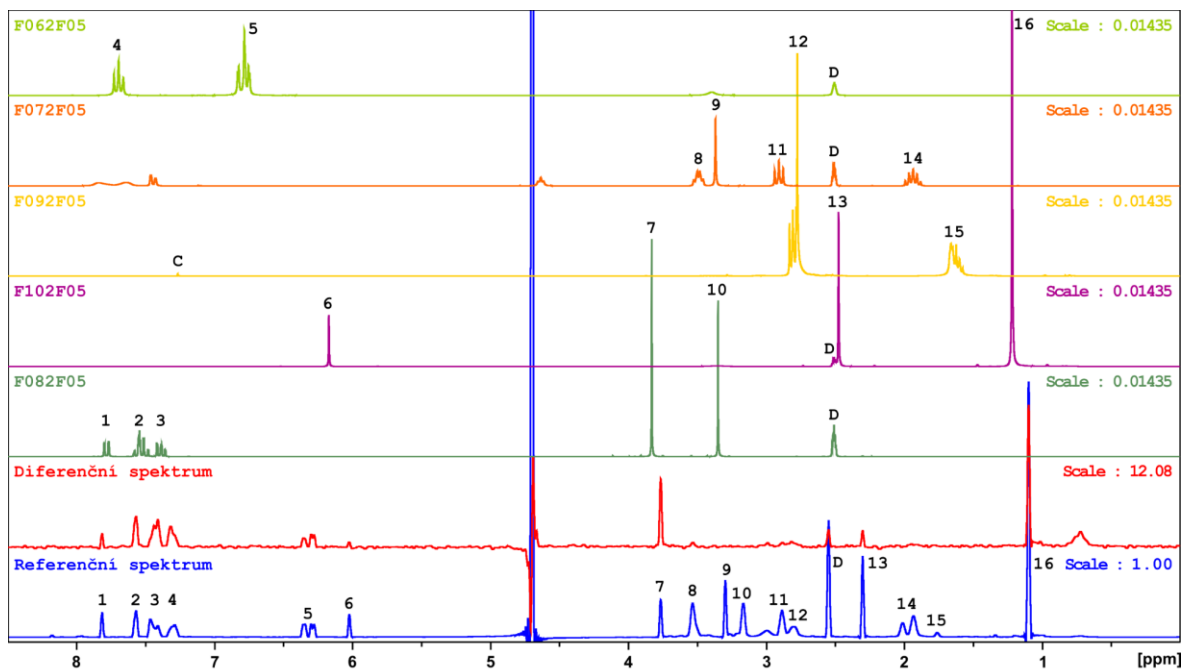
Validační STD NMR screening

Ve validačním screeningu bylo otestováno 70 vzorků, přičemž každý vzorek obsahoval 1,5 μ M enzym ve směsi s jedním ze 70 potenciálních ligandů vybraných v primárním screeningu o koncentraci 500 μ M. Míra interakce daného fragmentu s enzymem byla vyhodnocena prostřednictvím škálování diferenčního spektra vůči referenčnímu spektru (viz Obrázek 26 na str. 73), více viz kapitola 3.3.4. Všechny 70 fragmentů bylo poté seřazeno podle vzrůstající relativní míry interakce s enzymem, I_F , viz Tabulka 2. Na základě tohoto parametru bylo následně pro další experimenty vybráno 50 fragmentů, jejichž I_F měla hodnotu vyšší než 3,5 % (Tabulka 2).

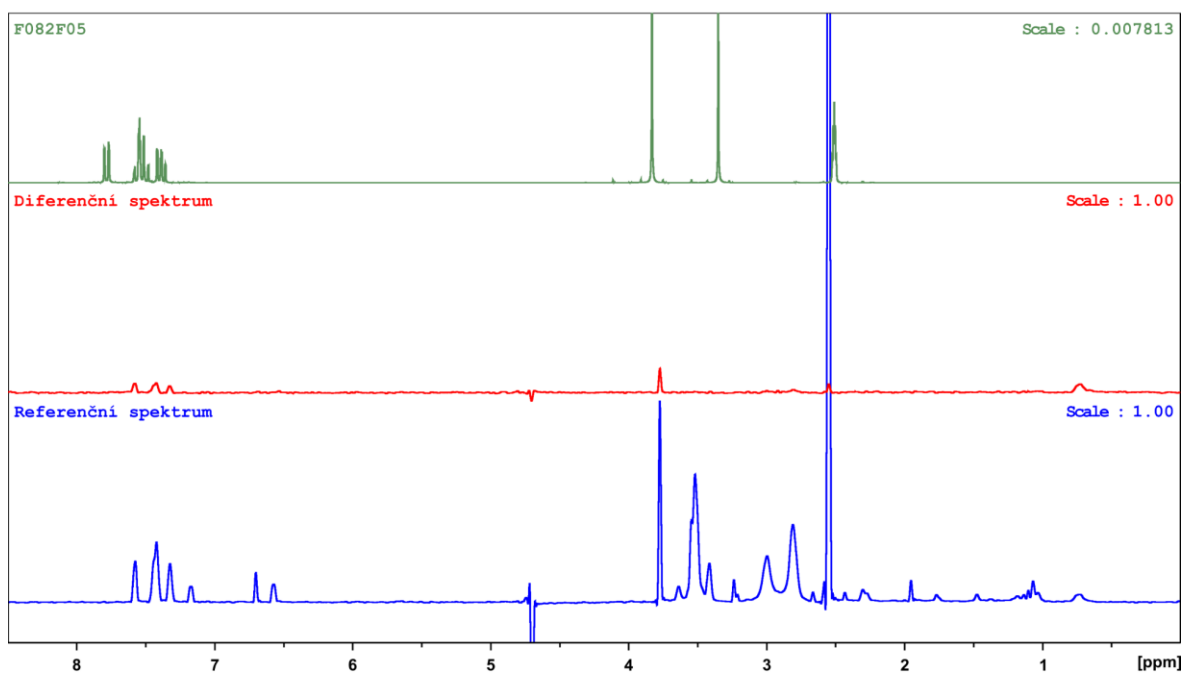
Tabulka 2 – Výsledky validačního screeningu se 70 vybranými fragmenty

Jednotlivé fragmenty označené svými pozicemi ve fragmentové knihovně jsou seřazeny a očíslovány podle relativní míry interakce s enzymem cN-II D52N Δ (I_F). Červeným písmem jsou označeny fragmenty, které byly vyřazeny z dalších experimentů.

#	Označení	I_F [%]	#	Označení	I_F [%]	#	Označení	I_F [%]	#	Označení	I_F [%]
1	F082F05	22,69	19	F082H09	7,42	37	F011A09	4,86	55	F062H04	3,31
2	F021B12	17,81	20	F102A02	7,42	38	F062D12	4,64	56	F021C06	3,13
3	F082F02	13,35	21	F041C12	7,08	39	F021H08	4,45	57	F092C06	2,95
4	F041F10	13,09	22	F082H04	7,08	40	F011B04	4,40	58	F011B02	2,87
5	F092G06	12,75	23	F092H10	7,01	41	F082C06	4,21	59	F082F10	2,86
6	F021F04	12,38	24	F072H03	7,01	42	F102G10	4,04	60	F072A04	2,58
7	F031E10	11,56	25	F062B04	6,79	43	F082A04	3,98	61	F051G02	2,55
8	F031D09	11,45	26	F021G01	6,56	44	F041D09	3,86	62	F051F04	2,50
9	F041G07	10,90	27	F011G05	6,51	45	F102A09	3,84	63	F031G10	2,27
10	F092F10	10,51	28	F051A09	6,48	46	F031C03	3,82	64	F072H07	1,82
11	F102E02	10,07	29	F051C12	5,94	47	F102H07	3,82	65	F102F06	1,45
12	F031C06	9,70	30	F041D03	5,77	48	F092E12	3,72	66	F072H10	1,38
13	F062B03	9,53	31	F072D12	5,56	49	F021E04	3,64	67	F011G07	1,31
14	F062G12	9,35	32	F051H01	5,52	50	F031H01	3,63	68	F011B12	1,00
15	F041C10	8,93	33	F021G05	5,45	51	F051H10	3,47	69	F011D11	0,00
16	F011A02	8,74	34	F062E12	5,45	52	F092H09	3,40	70	F021C12	0,00
17	F092F06	8,73	35	F062E03	5,35	53	F102B09	3,34	–	–	–
18	F041C03	8,34	36	F021B04	5,20	54	F031E02	3,33	–	–	–



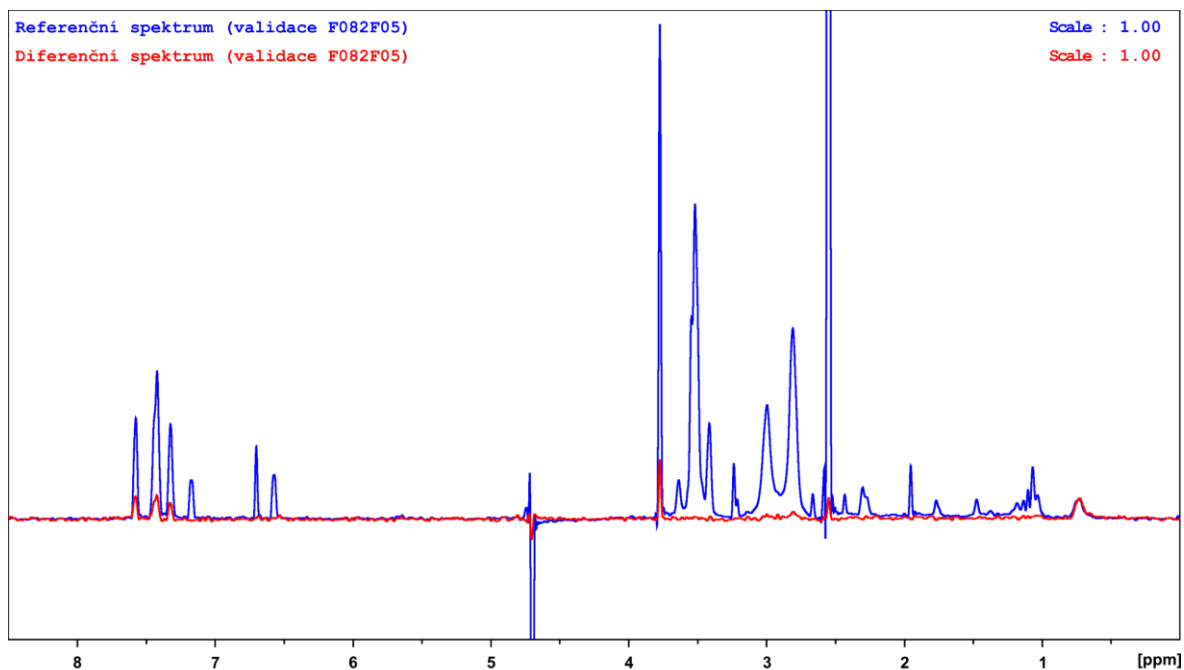
(a)



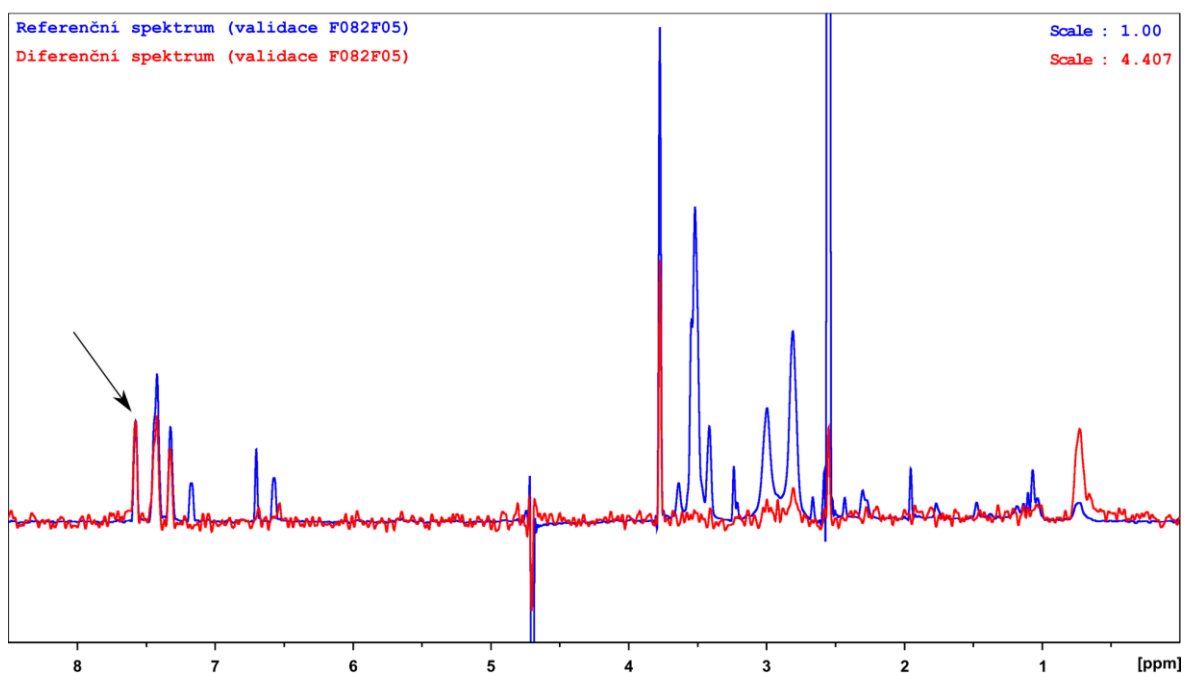
(b)

Obrázek 25 – Příklad analýzy STD NMR dat z (a) primárního screeningu a (b) validačního screeningu

(a) Srovnáním referenčního ^1H NMR spektra vzorku (modrá) s ^1H NMR spektry samotných fragmentů (tmavě zelená, fialová, žlutá, oranžová, světle zelená) byly jednotlivé píky v referenčním spektru odhadem přiřazeny (viz očíslování) k jednotlivým fragmentům. Fragmenty, jejichž přiřazené píky byly dostatečně rozeznatelné také v diferenčním spektru (červená), byly vybrány jako potenciálně interagující s enzymem – v tomto případě fragment s označením F082F05 (tmavě zelená). Píky označené ve spektru indexem D (chemický posun přibližně 2,5 ppm) a C (chemický posun přibližně 7,3 ppm) odpovídají signálům protonů dimethylsulfoxidu (DMSO), resp. chloroformu [80]. (b) Validace interakce fragmentu F082F05 s enzymem (tmavě zelená). Ze signálů v aromatické oblasti (tj. 6-8 ppm) diferenčního spektra (červená) vyplývá, že fragment s enzymem opravdu interaguje. Obrázek byl vytvořen v programu TopSpin 3.6.2 (Bruker BioSpin GmbH) a upraven v programu Inkscape 0.92.4.



(a)



(b)

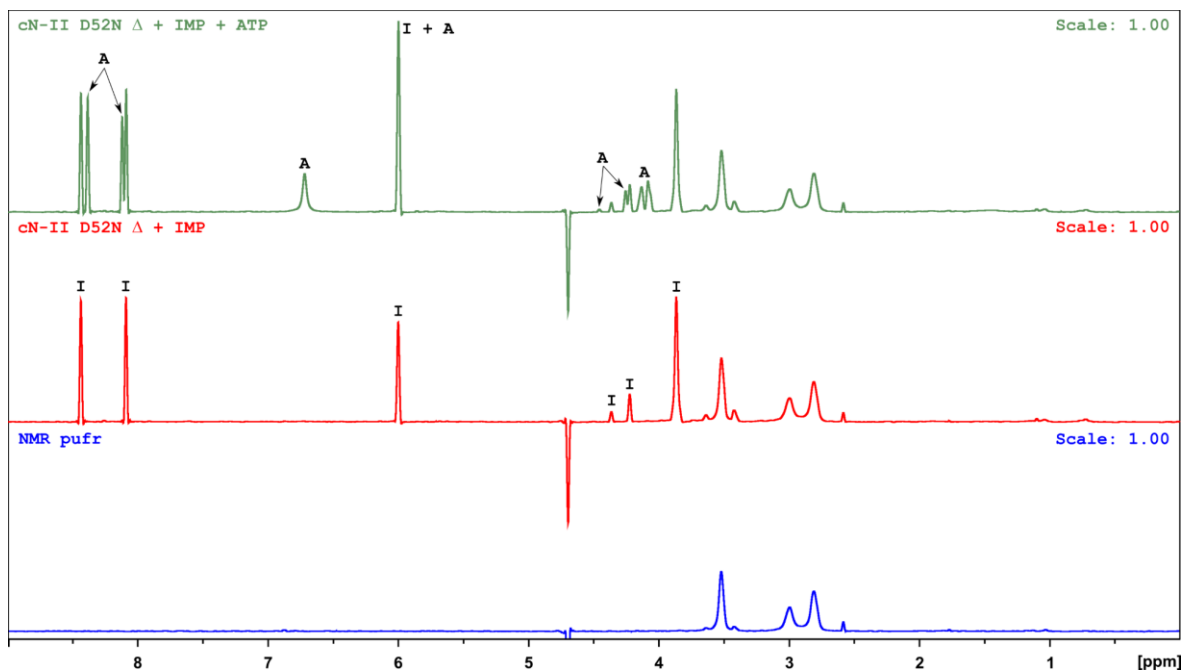
Obrázek 26 – Příklad vyhodnocení míry interakce fragmentů s enzymem

Prékrytové zobrazení referenčního (modrá) a diferenčního (červená) ^1H NMR spektra vzorku z validačního screeningu obsahujícího směs $1,5\mu\text{M}$ enzymu cN-II D52N Δ s fragmentem F082F05. (a) Zpočátku jsou obě spektra ve vzájemném poměru zvětšení 1 : 1. (b) Diferenční spektrum bylo vůči referenčnímu škálováno, dokud jeden z píků náležících v diferenčním spektru signálům protonů fragmentu (oblast chemického posunu 7-8 ppm) nedosáhl stejné výšky jako tentýž pík v referenčním spektru. Toho bylo jako první dosaženo u píku naznačeného černou šipkou, kdy byla obě spektra ve vzájemném poměru zvětšení 1 : 4,407. Míra zvětšení diferenčního spektra byla označena jako škálovací faktor (ve spektru ozn. jako „Scale“) a použita k vyjádření relativní míry interakce daného fragmentu s enzymem (více viz kapitola 3.3.4). Obdobným způsobem byla vyhodnocována také vazba IMP a ATP na enzym, viz následující text. Obrázek byl vytvořen v programu TopSpin 3.6.2 (Bruker BioSpin GmbH) a upraven v programu Inkscape 0.92.4.

Analýza vzájemného ovlivnění vazby IMP, ATP a fragmentů s cN-II

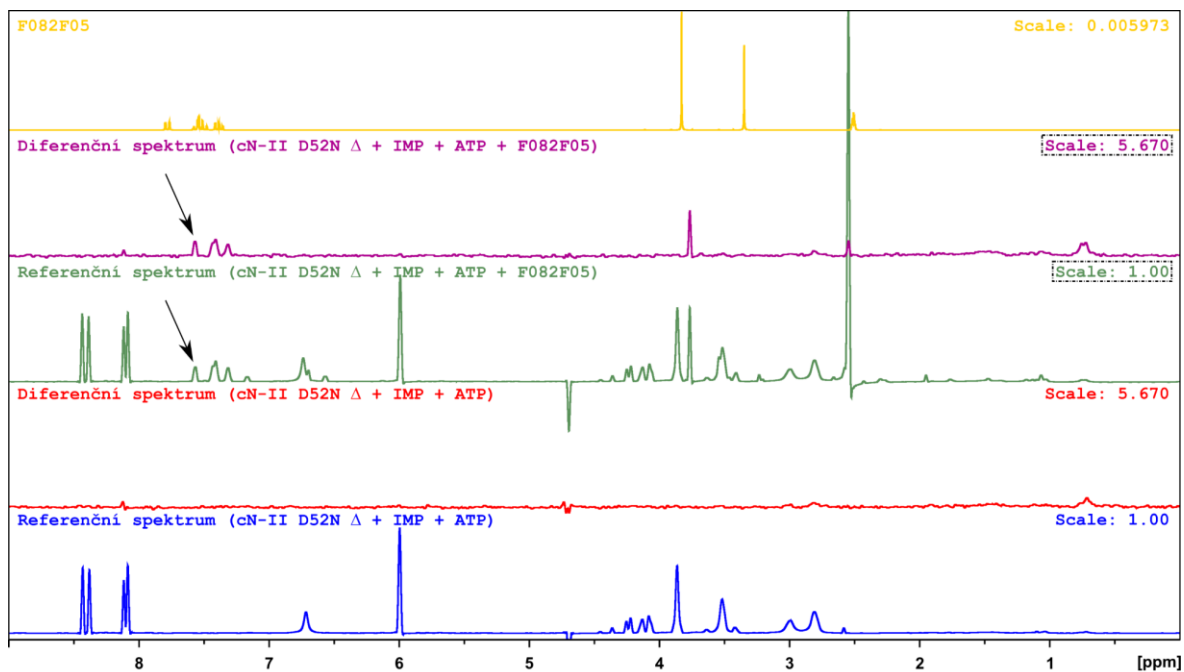
V dalším experimentálním kroku bylo prostřednictvím STD NMR testováno, zdali přítomnost 500 μ M substrátu IMP a 500 μ M allosterického aktivátoru ATP ovlivňuje míru interakce těchto 50 vybraných fragmentů s enzymem. Zároveň bylo v tomto experimentu, jehož provedení je popsáno v kapitole 3.3.4, otestováno, jak přítomnost daného fragmentu ovlivňuje vazbu IMP a ATP na enzym.

Data nasnímaná z celkem 103 vzorků byla zpracována obdobně jako v předchozích STD NMR experimentech. Pro rozpoznání píků náležících protonům IMP a ATP byla porovnána ^1H NMR spektra NMR pufru, enzymu ve směsi s IMP a enzymu ve směsi s IMP a ATP (Obrázek 27). Míra interakce fragmentů s enzymem za přítomnosti IMP nebo IMP spolu s ATP byla vyhodnocena obdobně jako ve validačním screeningu. Vazba IMP a ATP na enzym byla posuzována stejným způsobem, pouze s tím rozdílem, že dané diferenční spektrum bylo vůči referenčnímu škálováno se zaměřením na píky náležící protonům právě IMP či ATP. Pro ilustraci je analýza míry interakce daného fragmentu s enzymem za přítomnosti IMP spolu s ATP uvedena na Obrázku 28A (str. 75). Analýza, jak přítomnost daného fragmentu ovlivňuje vazbu IMP a ATP na enzym, je pak ilustrována Obrázkem 28B (str. 75).

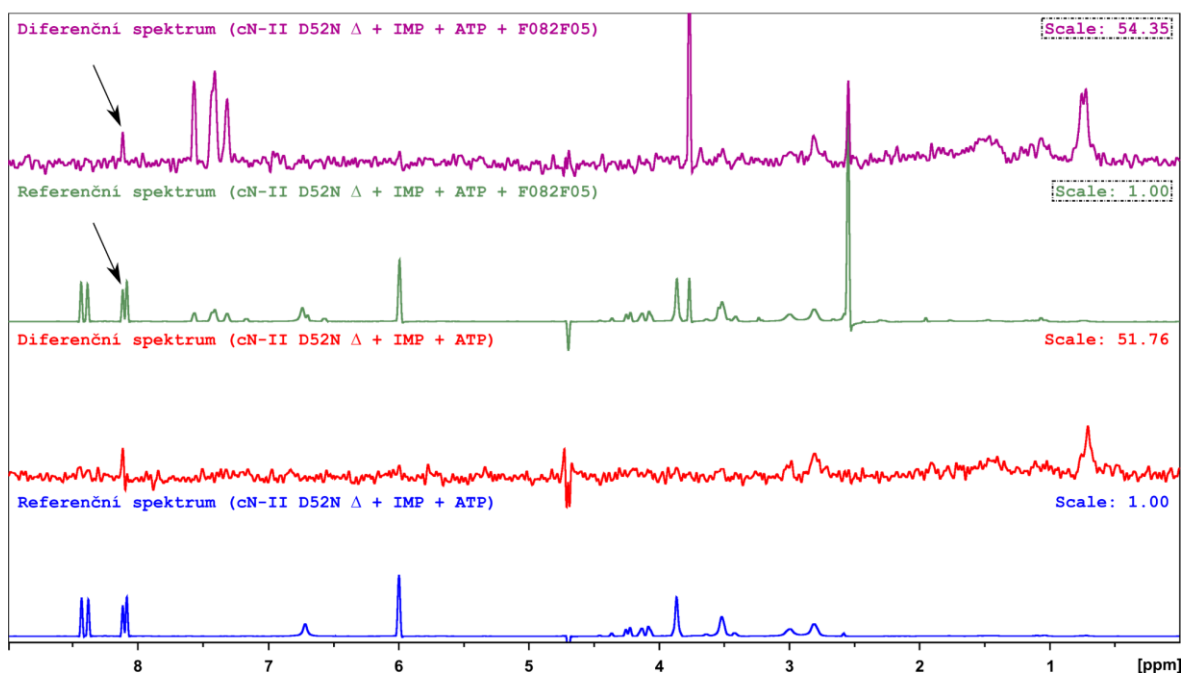


Obrázek 27 – Identifikace signálů náležících protonům IMP a ATP v ^1H NMR spektru

Spektra vzorků obsahujících pouze NMR pufr (3.1.4) (modrá, dole), navíc 1,5 μ M enzym cN-II D52N Δ ve směsi s 500 μ M IMP (červená, uprostřed); navíc 1,5 μ M enzym cN-II D52N Δ ve směsi s 500 μ M IMP a 500 μ M ATP (tmavě zelená, nahoře). Indexy I a A jsou označeny píky náležící signálům protonů IMP, resp. ATP. Obrázek byl vytvořen v programu TopSpin 3.6.2 (Bruker BioSpin GmbH) a upraven v programu Inkscape 0.92.4.



(a)

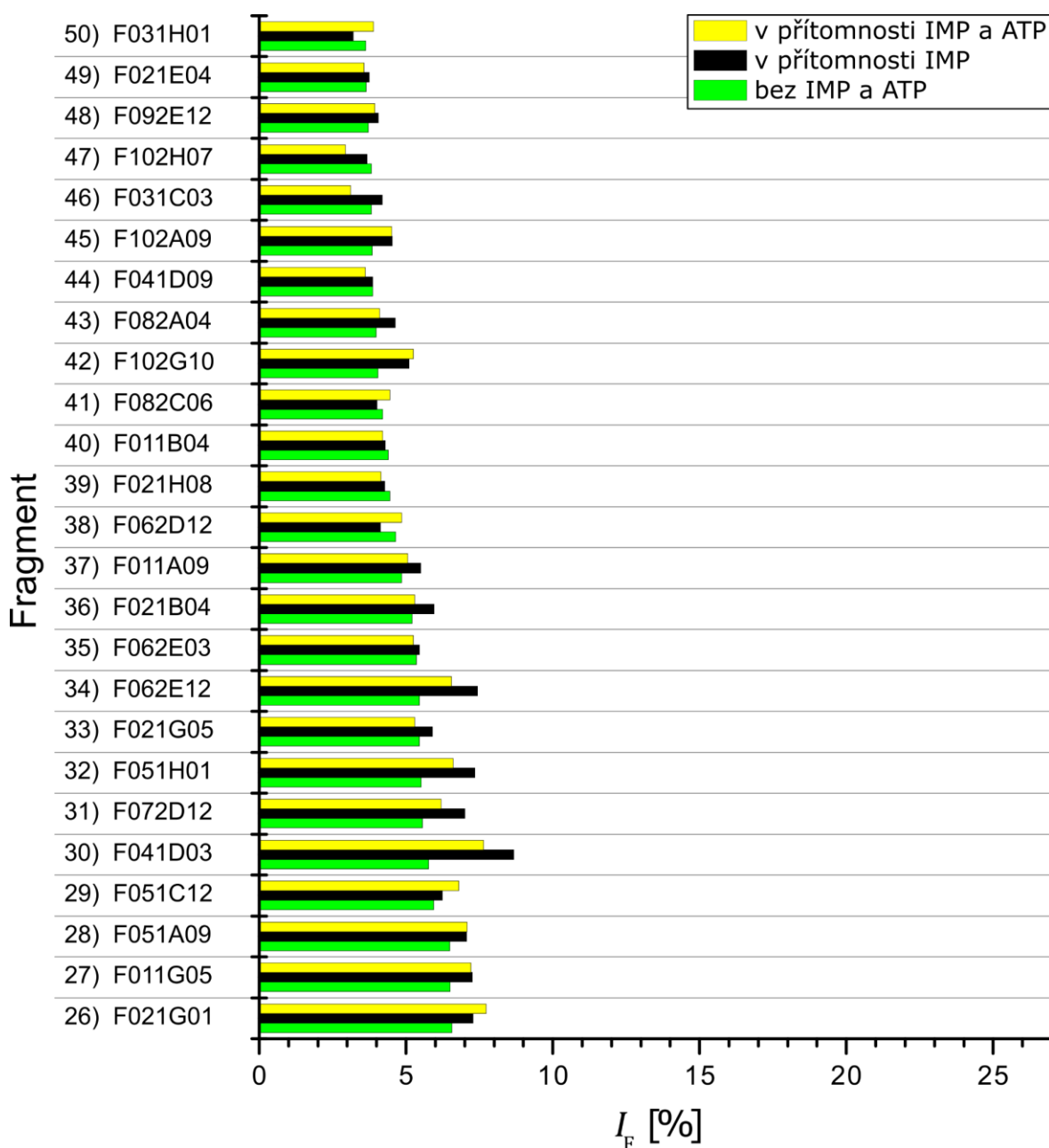


(b)

Obrázek 28 – Analýza (a) míry interakce fragmentu s enzymem cN-II D52N Δ v přítomnosti IMP i ATP a (b) ovlivnění vazby IMP či ATP na tento enzym v přítomnosti fragmentu

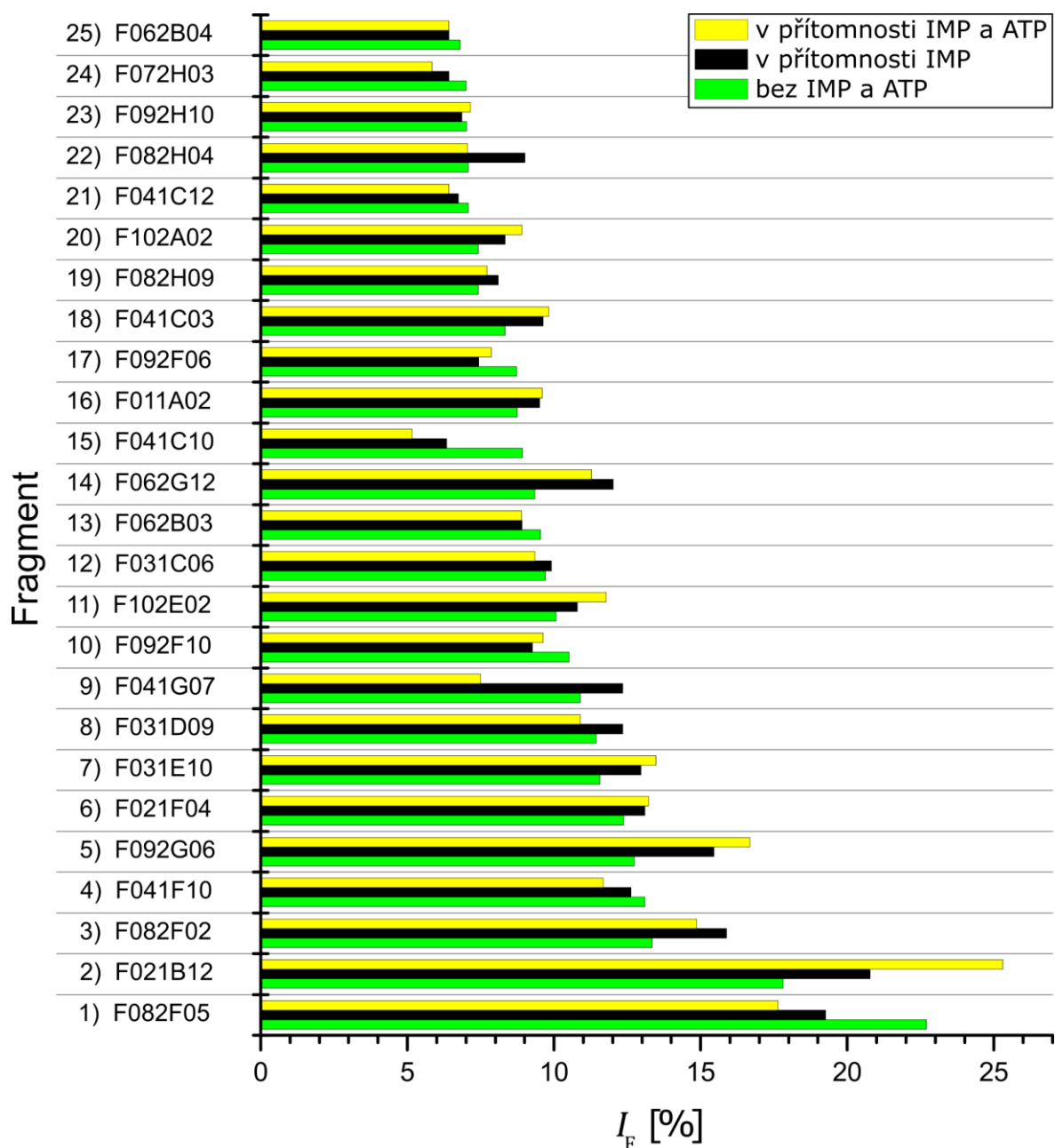
Způsob analýzy je popsán výše v textu a vysvětlen na Obrázku 26 na str. 73. Diferenční spektra (fialová) byla škálována vůči příslušnému referenčnímu spektru (tmavě zelená) ve vztahu k píkům odpovídajících signálům protonů (a) fragmentu F082F05, resp. (b) ATP. Tyto píky jsou naznačeny černou šipkou a hodnota výsledného škálovacího poměru mezi příslušnými spektry je označena čerchovaným rámečkem. Referenční a diferenční spektra vzorku bez přítomnosti fragmentu (červená a modrá) jsou uvedena pouze pro srovnání. Pro identifikaci signálů fragmentu je uvedeno také ^1H NMR spektrum samotného fragmentu F082F05 rozpuštěného v DMSO (žlutá). Obrázek byl vytvořen v programu TopSpin 3.6.2 (Bruker BioSpin GmbH) a upraven v programu Inkscape 0.92.4.

Výsledky tohoto experimentu pro směsi s jednotlivými fragmenty o koncentraci 500 μM jsou shrnuty pomocí sloupcových grafů na Obrázku 29 (str. 76), Obrázku 30 (str. 77), Obrázku 31 (str. 78) a Obrázku 32 (str. 79). V případě 8 z 50 testovaných fragmentů došlo ke zvýšení míry interakce s enzymem pouze v přítomnosti 500 μM IMP, u 4 jiných fragmentů se míra této interakce zvýšila pouze v přítomnosti 500 μM IMP s 500 μM ATP. Naproti tomu však u celkem 25 z 50 fragmentů došlo ke zvýšení v obou případech – jak v přítomnosti samotného IMP, tak i ve směsi IMP s ATP.



Obrázek 29 – Vliv IMP a ATP na relativní míru interakce, I_F , fragmentů s enzymem cN-II D52N Δ

Obrázek uvádí výsledky pro fragmenty označené číslem 26-50. Výsledky pro fragmenty 1-25 jsou uvedeny na Obrázku 30 na str. 77. Koncentrace fragmentů, IMP i ATP ve vzorcích byla 500 μM , koncentrace enzymu pak 1,5 μM . Obrázek byl vytvořen v programu OriginPro 8 a upraven v programu Inkscape 0.92.4.

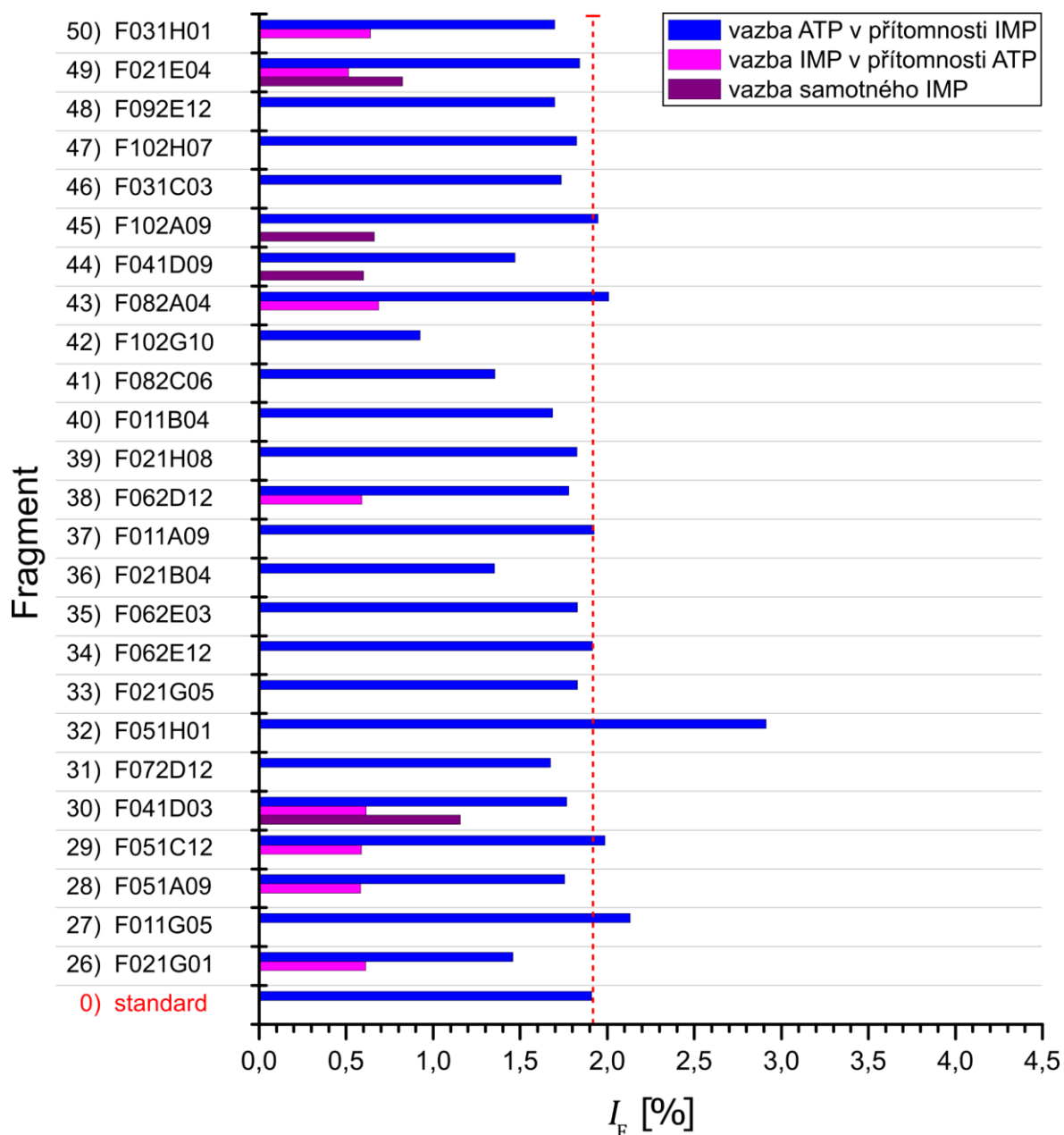


Obrázek 30 – Vliv IMP a ATP na relativní míru interakce, I_F , fragmentů s enzymem cN-II D52N Δ

Obrázek uvádí výsledky pro fragmenty označené číslem 1-25. Výsledky pro fragmenty 26-50 jsou uvedeny na Obrázku 29 na str.76. Koncentrace fragmentů, IMP i ATP ve vzorcích byla 500 μ M, koncentrace enzymu pak 1,5 μ M. Obrázek byl vytvořen v programu OriginPro 8 a upraven v programu Inkscape 0.92.4.

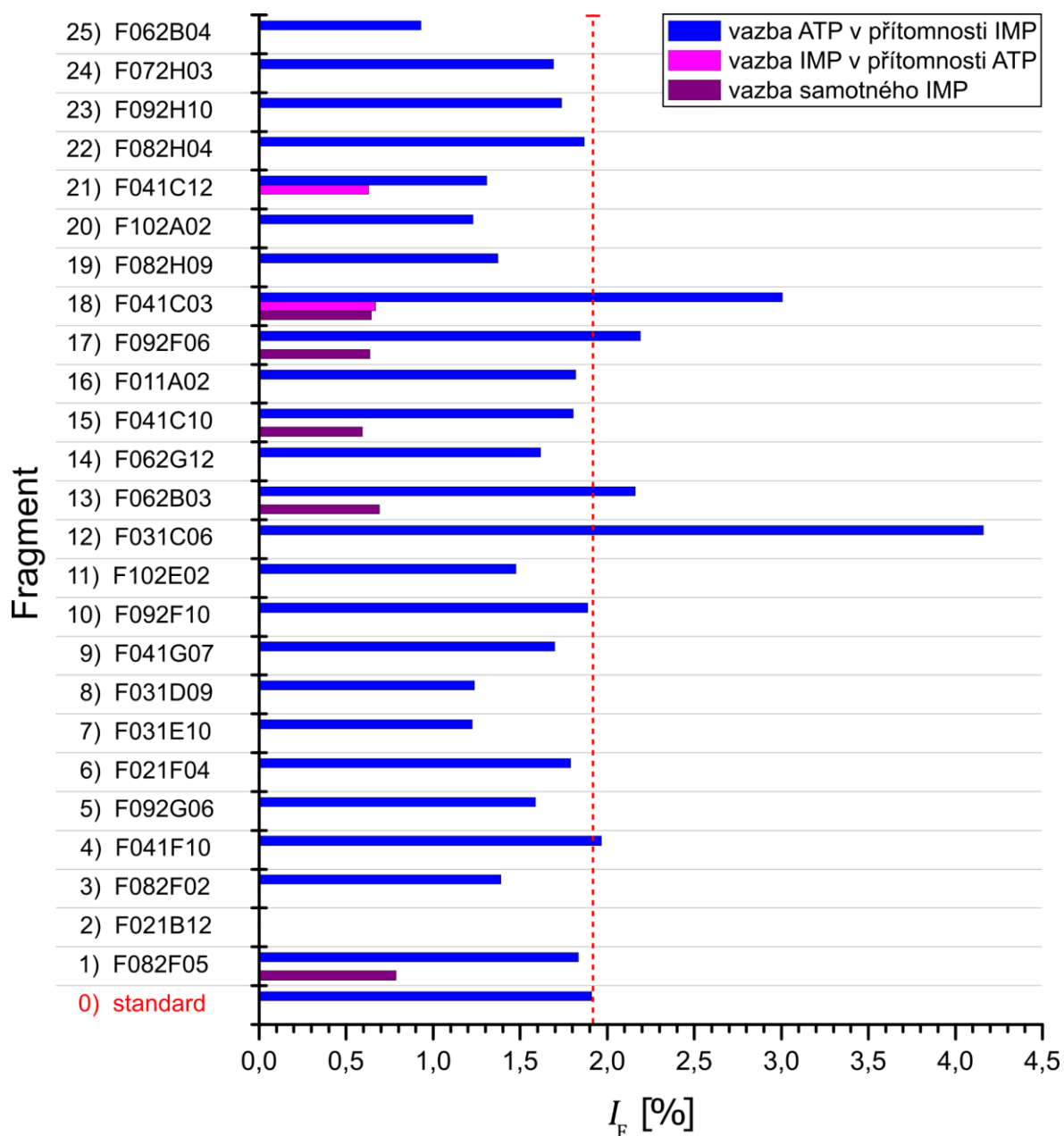
Vazba IMP samotného i ve směsi s ATP na enzym nebyla ve většině případů (včetně standardu tvořeného směsí enzymu a IMP s i bez ATP) vůbec pozorována. Jestliže některý slabý signál v diferenčním spektru mohl odpovídat některému z protonů IMP, nebylo možné jej odlišit od šumu. V takových případech hodnota I_F pro domnělou vazbu IMP k enzymu zpravidla nepřesahovala hranici 0,8 %. Vazba ATP k enzymu ve standardní směsi tvořené enzymem spolu s IMP a ATP byla charakterizována I_F o hodnotě 1,9 %. Pouze ve směsi s fragmenty F031C06 (# 12), F041C03 (# 18) a F051H01 (# 32) se tato vazba výrazněji,

tj. nejméně o hodnotu 1 %, zvýšila. V ostatních případech byla převážně buďto srovnatelná anebo nižší. Přítomnost fragmentů F062B04 (# 25) nebo F102G10 (# 42) snížila intenzitu vazby ATP na hodnotu přibližně 1 % (tj. více než o polovinu) oproti standardní hodnotě a ve směsi s fragmentem F021B12 (# 2) nebyla vazba vůbec zachycena.



Obrázek 31 – Vliv přítomnosti jednotlivých fragmentů na vazbu IMP a ATP na enzym cN-II D52N Δ

Vazba je charakterizována v podobě relativní míry interakce, I_F , s enzymem. Obrázek uvádí výsledky pro směsi s fragmenty označenými číslem 26-50. Výsledky pro směsi s fragmenty 1-25 jsou uvedeny na Obrázku 32 na str. 79. Červeně označený „standard“ s číslem 0 uvádí pouze relativní míru intenzity vazby ATP na enzym bez přítomnosti jakéhokoliv z 50 testovaných fragmentů. Tato referenční míra vazby ATP je v grafu znázorněna červenou čárkovanou kolmicí. Vazba IMP na enzym naproti tomu nebyla ve standardu pozorována ani za přítomnosti ATP, ani v jeho absenci. Ve většině případů nebyla vazba IMP na enzym zachycena ani v přítomnosti fragmentu. Obrázek byl vytvořen v programu OriginPro 8 a upraven v programu Inkscape 0.92.4.



Obrázek 32 – Vliv přítomnosti jednotlivých fragmentů na vazbu IMP a ATP na enzym cN-II D52N Δ

Vazba je charakterizována v podobě relativní míry interakce, I_F , s enzymem. Obrázek uvádí výsledky pro směsi s fragmenty označenými číslem 1-25. Výsledky pro směsi s fragmenty 26-50 jsou uvedeny na Obrázku 31 na str. 78. Červeně označený „standard“ s číslem 0 uvádí pouze relativní míru intenzity vazby ATP na enzym bez přítomnosti jakéhokoliv z 50 testovaných fragmentů. Tato referenční míra vazby ATP je v grafu znázorněna červenou čárkovanou kolmicí. Vazba IMP na enzym naproti tomu nebyla ve standardu pozorována ani za přítomnosti ATP, ani v jeho absenci. Ve většině případů nebyla vazba IMP na enzym zachycena ani v přítomnosti fragmentu. Obrázek byl vytvořen v programu OriginPro 8 a upraven v programu Inkscape 0.92.4.

Fosfatasa Tt82

4.5 Enzymová aktivita a substráty Tt82

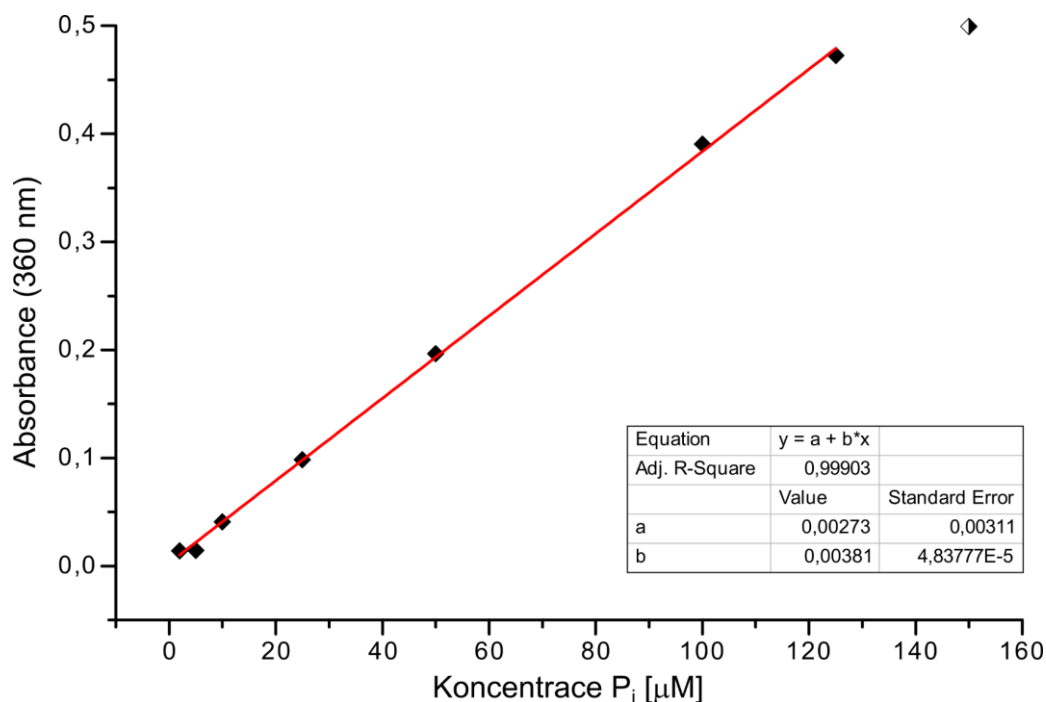
Enzymová aktivita Tt82 byla studována při teplotě 26 °C prostřednictvím soupravy EnzChek phosphate assay kit (viz kapitola 3.3.5) na souboru komerčně dostupných sloučenin, které byly vybrány na základě výsledků molekulového dokování jako potenciální substráty tohoto enzymu (viz kapitola 1.4.2 na str. 21). Jednalo se o tyto sloučeniny: acetylfosfát, AMP, D-erythritol-4-fosfát, D-glukosa-1-fosfát, D-glukosa-6-fosfát, glycerol-1-fosfát, glycerol-2-fosfát, *p*NPP, pyridoxalfosfát a riboflavin-5-fosfát.

Nejprve bylo provedeno kalibrační měření s koncentrační řadou standardu fosfátových iontů. Z tohoto měření byla získána závislost absorbance 7-methylthioguaninu (viz kapitola 3.3.5) při vlnové délce 360 nm (A_{360}) na koncentraci volných fosfátových iontů v reakční směsi v intervalu koncentrací 2-150 μM . Tato závislost byla vynesena do grafu v programu OriginPro 8. Body v rozmezí koncentrace 2-125 μM vzájemně ležely přibližně na přímce a byly proto proloženy lineární regresní funkcí. Graf a rovnice této funkce jsou vyobrazeny na Obrázku 33 (str. 81). Takto byla získána kalibrační funkce platná v rozmezí koncentrace 2-125 μM volných fosfátových iontů. Je definována rovnicí (7), kde $[P_i]$ představuje rovnovážnou koncentraci volných fosfátových iontů v jednotkách μM .

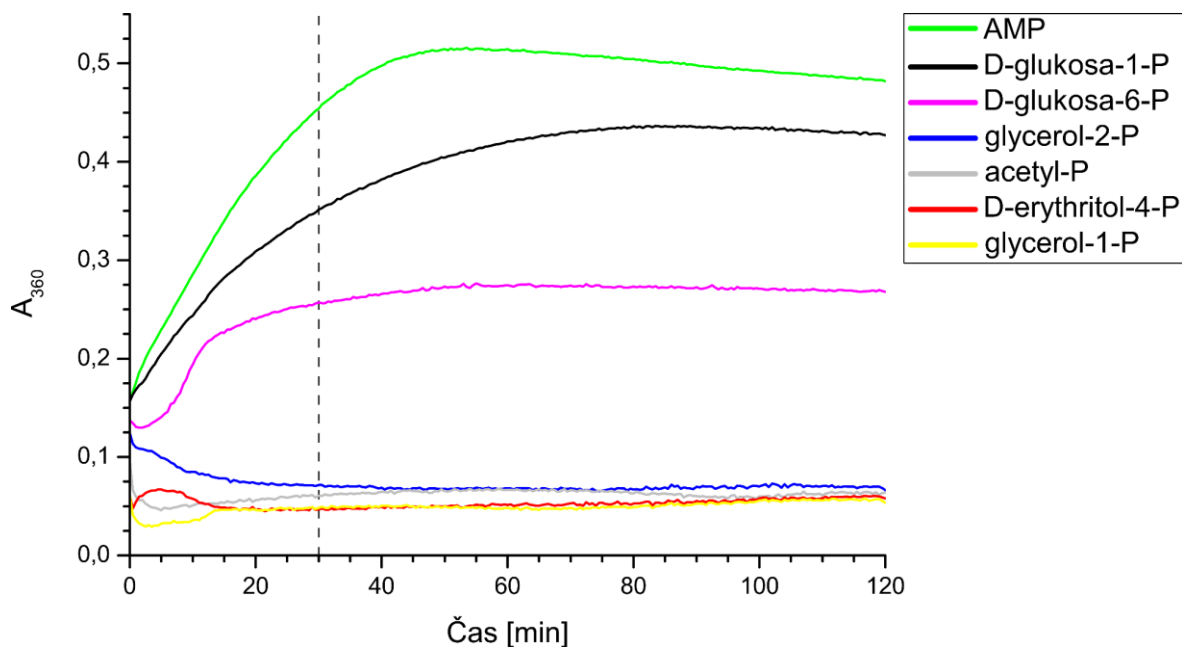
$$A_{360} = 0,002 + 0,0038 \cdot [P_i](\mu\text{M}); \forall [P_i] \in \langle 2 \mu\text{M}; 125 \mu\text{M} \rangle \quad (7)$$

Poté již byly provedeny reakce Tt82 s výše jmenovanými potenciálními substráty – kromě pyridoxalfosfátu, u něhož nebylo možné dosáhnout požadované koncentrace v důsledku příliš nízké rozpustnosti ve vodě za daných podmínek. Reakce byly provedeny vždy v duplikátu s jednou příslušnou reakcí negativní kontroly (reakce neobsahující Tt82) a průběžně sledovány měřením A_{360} po dobu 120 min. Postup provedení tohoto experimentu je blíže popsán v kapitole 3.3.5. Na Obrázku 34 na str. 81 je vyobrazen průběh reakcí Tt82 jednotlivě s acetylfosfátem, AMP, D-erythritol-4-fosfátem, D-glukosa-1-fosfátem, D-glukosa-6-fosfátem, glycerol-1-fosfátem a glycerol-2-fosfátem. Enzymové reakce Tt82 s riboflavin-5-fosfátem a *p*NPP nebylo možné zvolenou metodou sledovat kvůli absorpci záření obou molekul v oblasti spektra elektromagnetického vlnění při vlnové délce 360 nm.

Z průběhu sledovaných reakcí byly pro vyhodnocení měření zvoleny hodnoty absorbance naměřené v reakčním čase 30 min od jejich zahájení (viz Obrázek 34 na str. 81). Nejprve byla od této hodnoty naměřené v daném duplikátu odečtena hodnota naměřená v příslušné reakci negativní kontroly. Bylo nutné, aby se tento rozdíl, ΔA_{360} , pohyboval v intervalu hodnot od 0,01 do 0,477, přičemž tato podmínka byla u všech reakcí splněna (viz Tabulka 3, str. 82).



Obrázek 33 – Graf závislosti absorbance při vlnové délce 360 nm (A_{360}) na koncentraci volných fosfátových iontů
 Červenou barvou je znázorněna přímka lineární regrese představující kalibrační funkci platnou v rozmezí koncentrací 2-125 μM volných fosfátových iontů (P_i). Rovnice této funkce má tvar: $y = a + bx$, hodnoty parametrů a a b jsou uvedeny v tabulce, jež je součástí grafu. Půlený bod ležící v grafu při koncentraci 150 μM nebyl do lineární regrese zahrnut vzhledem ke své odlehlejší poloze. Obrázek byl vytvořen v programu OriginPro 8 a upraven v programu Inkscape 0.92.4.



Obrázek 34 – Průběh enzymových reakcí Tt82 s potenciálními substráty při teplotě 26 °C

Reakce byly sledovány měřením absorbance při vlnové délce 360 nm (A_{360}) v 30s intervalech po dobu 120 min od svého zahájení. Příslušné křivky reprezentující průběh reakce s daným substrátem jsou průměrem průběhu dvou duplikátních reakcí zmenšeného o průběh příslušné reakce negativní kontroly. Černou čárkovanou kolmicí je vyznačen čas 30 min od zahájení reakcí (příslušné hodnoty A_{360} v tomto reakčním čase byly použity pro vyhodnocení experimentu, viz text). Obrázek byl vytvořen v programu OriginPro 8 a upraven v programu Inkscape 0.92.4.

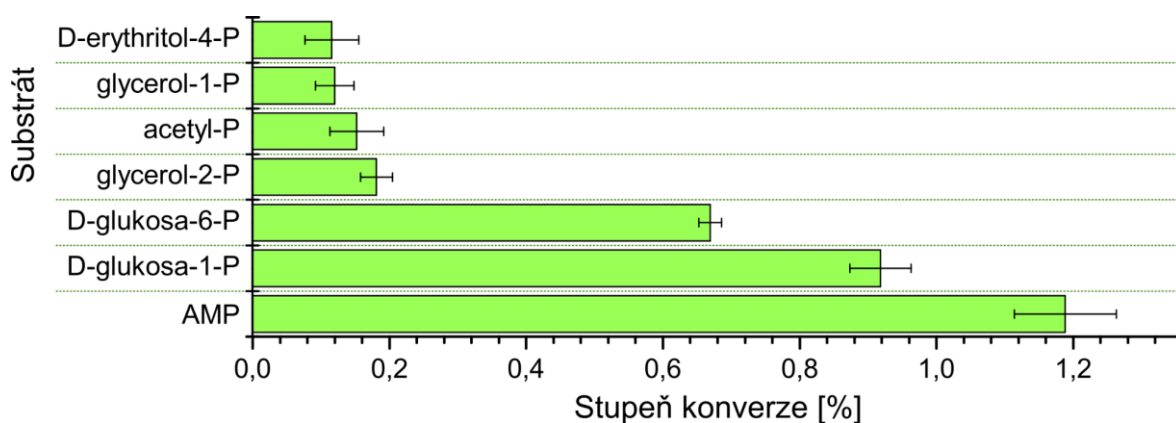
Tabulka 3 – Hodnoty absorbance při vlnové délce 360 nm (ΔA_{360}) jednotlivých duplikátních reakcí D1 a D2 naměřené v reakčním čase 30 min od jejich zahájení. Tyto hodnoty jsou zmenšené o příslušné hodnoty reakcí negativních kontrol, tj. reakcí v nepřítomnosti Tt82.

Substrát	ΔA_{360} (D1)	ΔA_{360} (D2)
AMP	0,4742	0,4341
D-glukosa-1-fosfát	0,3635	0,3394
D-glukosa-6-fosfát	0,2615	0,2526
glycerol-2-fosfát	0,0653	0,0778
acetylfosfát	0,0712	0,0501
D-erythritol-4-fosfát	0,0560	0,0409
glycerol-1-fosfát	0,0362	0,0573

S využitím rovnice kalibrační funkce, viz rovnice (7) na str. 80, byl poté z hodnot ΔA_{360} uvedených v Tabulce 3 vypočítán stupeň konverze, α , v jednotlivých reakcích prostřednictvím výrazu (8),

$$\alpha [\%] = \frac{\Delta A_{360} - 0,002}{0,0038 \cdot c_0} \cdot 100 \quad (8)$$

kde c_0 je počáteční koncentrace 10mM potenciálního substrátu v jednotkách $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Výsledné průměrné hodnoty jsou shrnuty v grafu na Obrázku 35. Tímto experimentem byla prokázána fosfatasová aktivita Tt82. Na základě těchto výsledků byly jako substráty tohoto enzymu identifikovány molekuly AMP, D-glukosa-1-fosfát a D-glukosa-6-fosfát, přičemž AMP se z těchto tří substrátů jeví jako nejúčinnější.



Obrázek 35 – Fosfatasová aktivita Tt82 v reakci s potenciálními substráty

Aktivita je vyjádřena formou stupně konverze substrátů. Jedná se o průměrné hodnoty se směrodatnou odchylkou, které byly vypočítány z hodnot dvou duplikátních reakcí. Reakce probíhaly při teplotě 26 °C a byly vyhodnoceny v reakčním čase 30 min od svého zahájení. Obrázek byl vytvořen v programu OriginPro 8 a upraven v programu Inkscape 0.92.4.

4.6 Charakterizace kinetických parametrů Tt82 se substráty AMP a pNPP

Fosfatasová aktivita Tt82 byla dále charakterizována pro AMP a pNPP prostřednictvím enzymové kinetiky v ustáleném stavu (angl. *steady-state kinetics*). Zatímco AMP bylo vybráno jako nejúčinnější substrát Tt82, chromogenní sloučenina pNPP je běžným substrátem fosfatas a je proto hojně využívána za účelem testování či charakterizace fosfatasové aktivity [10, 81].

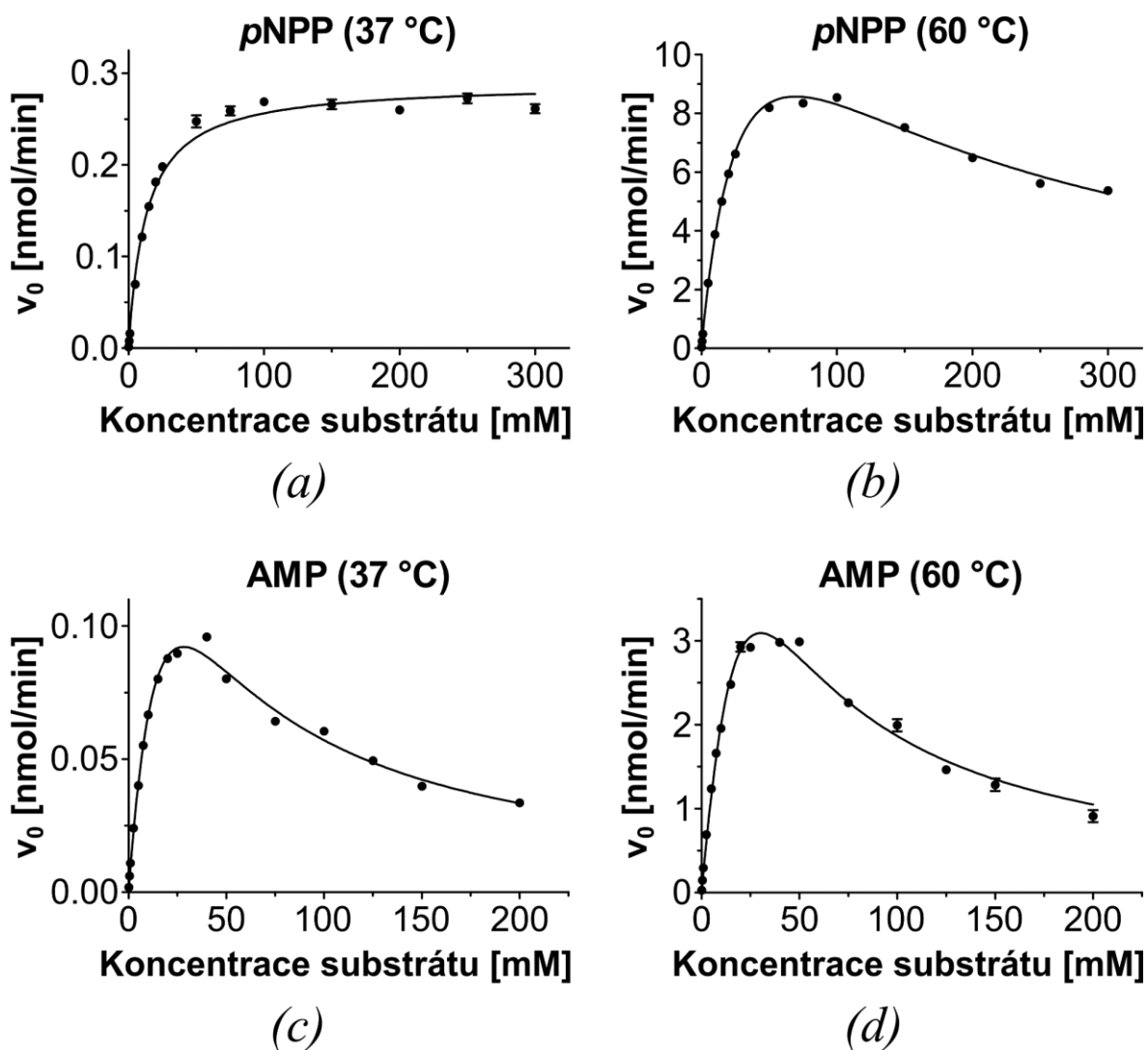
Enzymové reakce Tt82 s koncentracemi substrátů v rozmezí 0,1-200 mM v případě AMP a 0,1-300 mM v případě pNPP byly provedeny při teplotách 37 °C a 60 °C a po svém ukončení analyzovány prostřednictvím HPLC na reverzní fázi se spektrofotometrickou detekcí. Celkové provedení reakcí a jejich analýzy je popsáno v kapitolách 3.3.6 a 3.3.7.

Pro tyto jednotlivé reakce byly posléze vypočteny příslušné počáteční reakční rychlosti, v_0 . Výpočty byly provedeny za použití vztahů (2) a (3), které jsou uvedeny v kapitole 3.3.7. Takto získané závislosti v_0 na počáteční koncentraci daného substrátu při dané reakční teplotě byly v programu GraphPad Prism 5 vyneseny do grafů (Obrázek 36, str. 84). Jednotlivé grafy byly proloženy odpovídající funkcí enzymové kinetiky – buďto rovnicí Michaelise-Mentenové (Obrázek 36A, str. 84) anebo rovnicí pro inhibici substrátem (Obrázek 36B, C, D na str. 84). Tyto rovnice (4) a (5) jsou uvedeny v kapitole 3.3.7. Z průběhu funkcí proložených jednotlivými grafy byly získány kinetické parametry K_M , V_{max} a případně též K_i . Tyto parametry jsou shrnuty v Tabulce 4, která též obsahuje příslušné hodnoty k_{cat} vypočítané ze vztahu (6), viz kapitola 3.3.7.

Z kinetických parametrů vyplývá, že pNPP je taktéž substrátem Tt82, přičemž při teplotě 60 °C je aktivita enzymu vůči oběma substrátům znatelně vyšší než při 37 °C. Při obou teplotách Tt82 vykazoval vyšší afinitu vůči pNPP, avšak číslo přeměny, k_{cat} , je při dané teplotě pro reakci s oběma substráty srovnatelné. Inhibice substrátem byla pozorována u reakcí s AMP při obou teplotách a u reakce s pNPP při teplotě 60 °C.

Tabulka 4 – Souhrn hodnot kinetických parametrů pro fosfatasovou aktivitu Tt82 v reakci se substráty AMP nebo pNPP při teplotě 37 °C a 60 °C

Substrát	K_M [mM]	V_{max} [nmol/min]	$k_{cat} \cdot 10^2$ [s ⁻¹]	K_i [mM]
AMP (37 °C)	28,5 ± 3,8	0,279 ± 0,026	0,93 ± 0,09	27,7 ± 3,5
AMP (60 °C)	66 ± 18	16,6 ± 3,7	55 ± 12	13,8 ± 3,6
pNPP (37 °C)	12,96 ± 0,64	0,3340 ± 0,0074	0,97 ± 0,01	–
pNPP (60 °C)	33,9 ± 1,4	16,91 ± 0,45	56,4 ± 1,5	142,9 ± 7,0



Obrázek 36 – Enzymová kinetika Tt82 se substráty AMP a pNPP

Závislost počáteční reakční rychlosti, v_0 , 5 μ M Tt82 na počáteční koncentraci (a) pNPP při teplotě 37 °C; (b) pNPP při teplotě 60 °C; (c) AMP při teplotě 37 °C; (d) AMP při teplotě 60 °C. Průběh grafu v bodu (a) odpovídá klasické enzymové kinetice podle Michaelise-Mentenové, kdežto průběh grafů v bodech (b), (c) a (d) je typický pro inhibici substrátem [79]. Příslušné kinetické parametry jsou uvedeny v Tabulce 4 na str. 83. Grafy byly vytvořeny v programu GraphPad Prism 5 a upraveny v programu Inkscape 0.92.4.

5 Diskuse

Cytosolická purinová 5'-nukleotidasa II

Vývoj inhibitorů cN-II je předmětem zájmu mnoha výzkumných pracovišť. Žádný dosud nalezený inhibitor však není aplikovatelný v klinické praxi [67, 70]. V této diplomové práci byla pro vývoj inhibitorů cN-II využita metoda testování malých fragmentů (angl. *fragment-based drug discovery*). Tato metoda umožňuje hledat ve fragmentové knihovně molekuly, které specificky interagují s daným enzymem (viz kapitola 3.3.4). Rekombinantní expresi dle zavedeného protokolu byly za tímto účelem připraveny dvě C-terminálně zkrácené varianty cN-II. Neaktivní mutantní varianta cN-II D52N Δ byla připravena pro použití v STD NMR experimentech, varianta cN-II WT Δ pro budoucí krystalizační experimenty. Zkrácené varianty cN-II umožňují jejich úspěšnou krystalizaci, a právě toto bylo důvodem pro zvolení zkrácených variant v případě obou rekombinantních proteinů (viz kapitola 3.1.2). Oba enzymy se podařilo získat v množství dostatečném pro následné experimenty.

Prostřednictvím DSF experimentů bylo nalezeno složení pufru, v němž mají obě varianty cN-II nejvyšší strukturní stabilitu (kapitola 4.3). Celková iontová síla tohoto pufru má hodnotu přibližně 350 mM, což je srovnatelné s intracelulární iontovou silou pohybující se v rozmezí 400-500 mM [82]. Iontová síla prostředí se navíc významně podílí na síle elektrostatických interakcí mezi receptorem a jeho ligandy [83]. Zvolené složení pufru se tak jeví jako prostředí vhodné pro hledání ligandů enzymu přirozeně se vyskytujícího v buněčné cytoplasmě. Z výsledků provedených DSF experimentů je patrné, že s rostoucí koncentrací fosfátu se strukturní stabilita cN-II zvyšuje. Tento stabilizující účinek lze vysvětlit tím, že fosfát samotný je ligandem cN-II (viz kapitola 1.6.1), přičemž vazbou svých přirozených ligandů je obdobně stabilizováno mnoho dalších enzymů [84-87]. Přesto však v přítomnosti 0-10mM allosterického aktivátoru ATP a/nebo 0-30mM substrátu IMP nebyly stabilizační účinky těchto ligandů pozorovány. V případě ATP je toto v rozporu s publikovanými výsledky [49], které ukazují, že přítomnost ATP má výrazný stabilizující účinek na nezkrácené i C-terminálně zkrácené varianty cN-II (teplota denaturace proteinů se zvyšuje o 3-5 °C). Tento rozdíl je tak nepochybně zapříčiněn právě velmi vysokou koncentrací fosfátu v použitém pufru, kdy při mnohem nižší koncentraci IMP a ATP není stabilizační efekt těchto přirozených ligandů cN-II měřitelný.

V úvodním STD NMR screeningu se podařilo identifikovat 70 fragmentů potenciálně interagujících s cN-II D52N Δ . V následujícím validačním měření byla tato interakce potvrzena v případě 68 ze 70 validovaných fragmentů. U 50 fragmentů byla relativní míra interakce (viz kapitola 3.3.4) vyšší než 3,5 %, přičemž v případě 11 z nich přesahovala hranici 10 %. Těchto 50 fragmentů bylo vybráno pro kompetiční STD NMR experiment. Účelem bylo zjistit, jak přítomnost 500 μ M substrátu IMP a 500 μ M allosterického aktivátoru

ATP ovlivňuje míru interakce vybraných fragmentů s enzymem, a naopak, jak vybrané fragmenty ovlivňují sílu vazby IMP a ATP na enzym.

Míra interakce s enzymem se alespoň z části zvýšila u celkem 37 z 50 fragmentů (Obrázek 29 a Obrázek 30, str. 76 a 77), z čehož v případě 25 fragmentů bylo zvýšení zaznamenáno v přítomnosti jak samotného IMP, tak i společně s ATP. V přítomnosti IMP bylo zvýšení o hodnotu nejméně 1,5 % zaznamenáno u 8 fragmentů, ve směsi s IMP a ATP pak u 7 fragmentů. Jindy však přítomnost ATP vedla ke snížení míry interakce fragmentů s enzymem, čehož příčinou mohla být kompetice o allosterické místo mezi ATP a daným fragmentem. Z porovnání výsledků se strukturami fragmentů nicméně nevyplývá žádná zřetelná strukturální korelace. Změny v přítomnosti ATP lze obecně vysvětlit změnou konformace enzymu při vazbě ATP do allosterického místa (viz kapitola 1.6.3), neboť v diferenčním spektru směsí s IMP a ATP byla v případě takřka všech fragmentů vždy zaznamenána vazba ATP na enzym. Výjimku tvořil pouze fragment s označením F021B12 (# 2), kde vazba ATP v analyzované směsi zaznamenána nebyla, a přesto míra interakce fragmentu v přítomnosti ATP vzrostla nejvíce (o hodnotu 7,5 %) ze všech analyzovaných fragmentů. Zdali je tedy pozorovaný efekt opravdu způsoben vazbou aktivátoru do allosterického místa, by bylo možné ověřit použitím jiného allosterického aktivátoru cN-II, jako např. 2,3-BPG či Ap₄A (kapitola 1.6.1). Jakým způsobem ovlivňuje interakci fragmentů s enzymem přítomnost IMP, není jasné.

V přítomnosti většiny testovaných fragmentů nedošlo k výrazným změnám ve vazbě IMP a ATP na enzym (Obrázek 31 a Obrázek 32, str. 78 a 79). Relativní míra interakce ATP se zpravidla pohybovala v intervalu 1,5-2,0 %. Vazba IMP naproti tomu nebyla v drtivé většině případů vůbec pozorována, a to včetně směsi obsahující pouze enzym a IMP. Slabé vazebné interakce IMP a ATP s enzymem lze přičítat nejen velmi nízké afinitě cN-II ke svým přirozeným ligandům [31, 32] (viz kapitola 1.6.1), ale především také příliš vysoké koncentraci fosfátových iontů obsažených v použitém pufru. Fosfátové ionty jsou fyziologickým inhibítorem cN-II (viz kapitola 1.6.1) a v jejich přítomnosti nepochybně dochází k silné kompetici o vazbu do aktivního i allosterického místa. Pouze v přítomnosti několika málo fragmentů došlo ke znatelnějšímu zvýšení míry interakce ATP s enzymem. To může být spjato s lepším přístupem ATP do allosterického místa enzymu, pokud vlivem vazby daného fragmentu na molekulu enzymu dochází k lepším elektrostatickým interakcím mezi ATP a enzymem v okolí allosterického místa. Podstatně zajímavější však bylo pozorování v případě fragmentů F021B12 (# 2), F062B04 (# 25) a F102G10 (# 42), kdy míra interakce ATP poklesla přibližně na polovinu (# 25 a # 42) nebo nebyla vůbec zachycena (# 2). V těchto třech případech dochází s vysokou pravděpodobností ke kompetici mezi ATP a fragmentem o vazbu do allosterického místa. Úplné zablokování přístupu aktivátoru do allosterického místa by znemožnilo přechod enzymu do aktivovaného stavu.

Případný inhibitor působící takovýmto mechanismem by mohl být velice účinný zejména proti hyperaktivním mutantním variantám cN-II třídy II.

V budoucích experimentech bude všech 50 vybraných fragmentů podrobena enzymové kinetice s nezkrácenou variantou cN-II WT za účelem odhalit případné efekty fragmentů na katalytickou aktivitu enzymu. Tento experiment je však zatím stále ve fázi optimalizace. Pokud se v případě některých z fragmentů podaří prokázat inhibiční účinky na aktivitu enzymu, budou tyto fragmenty dále podrobeny krystalizačním experimentům se zkrácenou variantou cN-II WT Δ pro získání strukturních informací o místě jejich vazby na molekulu enzymu. Takové fragmenty budou následně použity pro vývoj účinnějších inhibitorů s možným terapeutickým potenciálem.

Fosfatasa Tt82

Druhá část diplomové práce se zabývá enzymem Tt82, jehož biologická funkce v termofilním organismu *Thermococcus thio-reducens* zatím není objasněna. Cílem této práce bylo prozkoumat enzymovou aktivitu a substrátovou specifitu Tt82. Fosfatasová katalytická aktivita Tt82, jež byla predikována na základě sekvenční a strukturní analýzy, byla otestována v enzymových reakcích při teplotě 26 °C prostřednictvím soupravy EnzChek phosphate assay kit na souboru sedmi vybraných potenciálních substrátů. Pět z nich bylo zvoleno ze seznamu sloučenin, které jsou nejčastějšími substráty fosfatas [10], a to na základě výsledků molekulového dokování [5] (viz kapitola 1.4.2) s přihlédnutím k jejich komerční dostupnosti. U zbývajících dvou, glycerol-1-fosfátu a glycerol-2-fosfátu, bylo na základě výsledků molekulového dokování predikováno, že by se nemělo jednat o substráty Tt82. Obě tyto sloučeniny byly do experimentu zahrnuty coby negativní kontrola.

Enzymologická analýza potvrdila fosfatasovou aktivitu Tt82 a odhalila několik substrátů tohoto enzymu, jimiž jsou AMP, D-glukosa-1-fosfát a D-glukosa-6-fosfát. Ostatní testované sloučeniny substráty nejsou, a to včetně glycerol-1-fosfátu a glycerol-2-fosfátu. Výsledky analýzy jsou tak zároveň v souladu s negativní predikcí substrátů prostřednictvím molekulového dokování. Identifikované substráty mají nízkou molekulovou hmotnost, což je typické pro substráty fosfatas rodiny HAD nesoucích ve své struktuře *cap* doménu typu C1 (viz kapitola 1.3.1). Právě Tt82 ve své struktuře tento typ *cap* domény obsahuje.

Nejvyšší stupeň konverze byl pozorován v případě AMP, proto byla katalytická aktivita Tt82 v reakci s tímto substrátem detailně charakterizována prostřednictvím enzymové kinetiky v ustáleném stavu při teplotách 37 °C a 60 °C. Takto byla aktivita enzymu charakterizována také pro *p*NPP, neboť tato sloučenina je modelovým substrátem mnoha různých fosfatas [10, 81]. Bylo pozorováno, že v případě obou substrátů je aktivita Tt82 znatelně vyšší při teplotě 60 °C. Enzym má při obou testovaných teplotách přibližně 2× větší afinitu

k *p*NPP než k AMP. Hodnoty K_M (Tabulka 4, str. 83) se však pro oba substráty pohybují v řádech desítek mM. Byly proto srovnány s kinetickými parametry dvou jiných zástupců fosfatas z rodiny HAD: fosfoserin fosfatas z termofilního organismu *Thermus thermophilus* (zkr. TtPSP; testovaný substrát L-fosfoserin; $K_M = 0,25$ mM a $k_{cat} = 1506$ s⁻¹ při teplotě 70 °C) [88] a fosfatas z termofilního organismu *Archaeoglobus fulgidus* (zkr. AfP; testovaný substrát dihydroxyacetonfosfát; $K_M = 10,47$ mM a $k_{cat} = 0,16$ s⁻¹ při teplotě 37 °C; $K_M = 4,72$ mM a $k_{cat} = 0,64$ s⁻¹ při teplotě 60 °C) [89]. Při teplotě 60 °C je hodnota K_M pro Tt82 s AMP nejméně 10× menší oproti AfP. Lze navíc předpokládat, že při teplotě 70 °C by tato hodnota byla ve srovnání s TtPSP ještě mnohonásobně menší. U mnohých jiných fosfatas z rodiny HAD se pak hodnota K_M obvykle pohybuje v μ M oblasti [10]. Z porovnání je tedy patrné, že AMP není hlavním substrátem Tt82.

Při vyšších koncentracích AMP bylo pozorováno, že při obou testovaných teplotách dochází ke zřetelné inhibici katalytické aktivity Tt82 substrátem. Totéž bylo pozorováno při teplotě 60 °C v reakcích s vyššími koncentracemi *p*NPP. Ze získaných hodnot K_i (Tabulka 4, str. 83) je pro AMP patrné, že s rostoucí teplotou efektivita inhibice substrátem vzrůstá. Vzhledem k termofilnímu původu Tt82 se lze domnívat, že se jedná o přirozený regulační mechanismus. V případě AMP i *p*NPP se tento efekt projevuje až při koncentracích, které již nejsou biologicky relevantní. Za vyšších teplot však nelze vyloučit, že v případě dosud nenalezeného hlavního substrátu by k tomuto jevu mohlo docházet už při fyziologické koncentraci. Regulace katalytické aktivity prostřednictvím mechanismu inhibice substrátem byla popsána u mnoha enzymů, v jejichž biologické funkci hraje mnohdy velmi významnou roli [90]. Inhibice substrátem byla mimo jiné pozorována například také u fosfatas HAD4, jednoho ze zástupců fosfatas rodiny HAD pocházejícího z organismu *Escherichia coli* [91]. Ve vztahu k fosfatasam rodiny HAD se tak nemusí jednat o ojedinělé případy.

Vzhledem k výsledkům dosaženým v této diplomové práci je pravděpodobné, že substrátová specifita tohoto enzymu je mnohem širší. Na základě struktury zde identifikovaných substrátů by dalšími mohly být jiné purinové nebo pyrimidinové nukleotidy či různé hexosy a pentosy nesoucí esterově vázanou fosfátovou skupinu. Případná širší substrátová specifita Tt82 by v kombinaci se strukturální stabilitou enzymu do nejméně 60 °C, resp. 75 °C [5], mohla najít biotechnologické využití například v organické syntéze vyžadující defosforylační reakce rozmanitých sloučenin při vyšších teplotách.

6 Závěr

Tématem této diplomové práce bylo studium enzymů cN-II a Tt82, které se společně řadí mezi fosfatasy z enzymové rodiny HAD. V literární rešerši byly nejprve shrnuty charakteristické strukturní, sekvenční a katalytické vlastnosti fosfatas této enzymové rodiny. Dále se rešerše věnovala problematice obou výše uvedených enzymů. Část zabývající se lidským enzymem cN-II je zaměřena především na regulaci katalytické aktivity enzymu a na její poruchy, s nimiž se pojí některá závažná onemocnění. V případě enzymu Tt82, jež pochází z termofilní archebakterie *Thermococcus thio-reducens*, se text zabývá jeho strukturními a sekvenčními vlastnostmi ve vztahu k jeho katalytické aktivitě a pravděpodobným substrátům.

Experimentální část této diplomové byla zaměřena na dva hlavní cíle: (1) nalezení ligandů interagujících s cN-II a (2) studium katalytické aktivity Tt82 a nalezení substrátů tohoto enzymu. Oba tyto cíle byly splněny.

- (1) Rekombinantní expresí a následnou dvou krokovou purifikací prostřednictvím chelatační chromatografie a iontově výměnné chromatografie byly připraveny C-terminálně zkrácené varianty cN-II WT Δ a cN-II D52N Δ . Prostřednictvím metody DSF bylo optimalizováno složení pufru, v němž obě varianty vykazují vysokou strukturní stabilitu s T_M přesahující 70 °C. V takto optimalizovaném pufru byly pomocí metody STD NMR hledány ligandy interagující s variantou cN-II D52N Δ . Bylo nalezeno celkem 68 nízkomolekulárních sloučenin (tzv. fragmentů) z 1000 testovaných, které zřetelně vykazovaly interakci s enzymem. Z těchto bylo vybráno 50 fragmentů, jejichž relativní míra interakce přesahovala hodnotu 3,5 %. V přítomnosti IMP a/nebo ATP, jež jsou substrátem, resp. allosterickým aktivátorem cN-II, míra interakce těchto vybraných fragmentů s enzymem většinou vzrostla. Bylo také pozorováno, že v přítomnosti několika fragmentů dochází k výraznému až úplnému snížení míry vazby ATP na enzym.

Tyto výsledky poskytují dobrý základ pro další experimenty. Budou-li mít některé z 50 vybraných fragmentů inhibiční účinky na aktivitu cN-II, znamenalo by to první úspěšný krok potenciálně směřující k vývoji účinných a terapeuticky využitelných inhibitorů hyperaktivních mutantních variant cN-II.

- (2) Na souboru potenciálních substrátů vybraných na základě výsledků z molekulového dokování byla testována fosfatasová katalytická aktivita Tt82. Byly identifikovány čtyři možné substráty tohoto enzymu: AMP, D-glukosa-1-fosfát, D-glukosa-6-fosfát a pNPP. Při teplotách 37 °C a 60 °C byly pro AMP a pNPP následně získány příslušné kinetické parametry K_M , V_{max} , k_{cat} a případně K_i . Katalytická aktivita Tt82 je pro oba

substráty znatelně vyšší při teplotě 60 °C, což je v souladu s původem enzymu z termofilního organismu. Ve vyšších koncentracích AMP při obou testovaných teplotách byla dále pozorována inhibice katalytické aktivity Tt82 substrátem. Totéž bylo pozorováno i v případě *p*NPP, avšak pouze při teplotě 60 °C. Reakce Tt82 s tímto substrátem při teplotě 37 °C odpovídala klasickému modelu reakční kinetiky podle Michaelise-Mentenové. Z kinetických parametrů nicméně vyplývá, že efektivita katalytické aktivity Tt82 je vůči identifikovaným substrátům poměrně nízká. Pravděpodobně se tedy nejedná o pravé substráty tohoto enzymu.

Tato diplomová práce potvrdila fosfatasovou aktivitu Tt82 s několika jeho substráty, což přispělo k jednomu z prvních poznatků o vlastnostech tohoto enzymu. Tyto výsledky byly publikovány v odborném článku [5]. V dalších výzkumech by bylo vhodné nalézt pravé substráty tohoto enzymu a detailně prozkoumat jeho katalytické vlastnosti za vysokých teplot. Termofilní povaha Tt82 v kombinaci s jeho pravděpodobně širší substrátovou specifikou může mít potenciál v biotechnologickém využití.

7 Seznam použité literatury

1. Roskoski, R., Jr.: Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**(1): p. 1-14 (2005).
2. Klumpp, S.; Krieglstein, J.: Phosphorylation and dephosphorylation of histidine residues in proteins. *Eur. J. Biochem.* **269**(4): p. 1067-1071 (2002).
3. Scott, J. D.; Pawson, T.: Cell signaling in space and time: where proteins come together and when they're apart. *Science.* **326**(5957): p. 1220-1224 (2009).
4. Burroughs, A. M.; Allen, K. N.; Dunaway-Mariano, D.; Aravind, L.: Evolutionary genomics of the HAD superfamily: understanding the structural adaptations and catalytic diversity in a superfamily of phosphoesterases and allied enzymes. *J. Mol. Biol.* **361**(5): p. 1003-1034 (2006).
5. Havlickova, P.; Brinsa, V.; Brynda, J.; Pahl, P.; Prudnikova, T.; Mesters, J. R.; Kascakova, B.; Kutý, M.; Pusey, M. L.; Ng, J. D.; Rezacova, P.; Kuta Smatanova, I.: A novel structurally characterized haloacid dehalogenase superfamily phosphatase from *Thermococcus thio-reducens* with diverse substrate specificity. *Acta Crystallogr., Sect. D: Struct. Biol.* **75**(8): p. 743-752 (2019).
6. Park, J.; Guggisberg, A. M.; Odom, A. R.; Tolia, N. H.: Cap-domain closure enables diverse substrate recognition by the C2-type haloacid dehalogenase-like sugar phosphatase *Plasmodium falciparum* HAD1. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **71**(Pt 9): p. 1824-1834 (2015).
7. Allen, K. N.; Dunaway-Mariano, D.: Phosphoryl group transfer: evolution of a catalytic scaffold. *Trends Biochem. Sci.* **29**(9): p. 495-503 (2004).
8. Allen, K. N.; Dunaway-Mariano, D.: Markers of fitness in a successful enzyme superfamily. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **19**(6): p. 658-665 (2009).
9. Lahiri, S. D.; Zhang, G.; Dai, J.; Dunaway-Mariano, D.; Allen, K. N.: Analysis of the substrate specificity loop of the HAD superfamily cap domain. *Biochemistry.* **43**(10): p. 2812-2820 (2004).
10. Huang, H.; Pandya, C.; Liu, C.; Al-Obaidi, N. F.; Wang, M.; Zheng, L.; Toews Keating, S.; Aono, M.; Love, J. D.; Evans, B.; Seidel, R. D.; Hillerich, B. S.; Garforth, S. J.; Almo, S. C.; Mariano, P. S.; Dunaway-Mariano, D.; Allen, K. N.; Farelli, J. D.: Panoramic view of a superfamily of phosphatases through substrate profiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**(16): p. E1974-E1983 (2015).
11. Koonin, E. V.; Tatusov, R. L.: Computer analysis of bacterial haloacid dehalogenases defines a large superfamily of hydrolases with diverse specificity. Application of an iterative approach to database search. *J. Mol. Biol.* **244**(1): p. 125-132 (1994).

12. Huang, H.; Patskovsky, Y.; Toro, R.; Farelli, J. D.; Pandya, C.; Almo, S. C.; Allen, K. N.; Dunaway-Mariano, D.: Divergence of structure and function in the haloacid dehalogenase enzyme superfamily: *Bacteroides thetaiotaomicron* BT2127 is an inorganic pyrophosphatase. *Biochemistry*. **50**(41): p. 8937-8949 (2011).
13. Seifried, A.; Schultz, J.; Gohla, A.: Human HAD phosphatases: structure, mechanism, and roles in health and disease. *FEBS J.* **280**(2): p. 549-571 (2013).
14. Morais, M. C.; Zhang, W.; Baker, A. S.; Zhang, G.; Dunaway-Mariano, G.; Allen, K. N.: The crystal structure of *Bacillus cereus* phosphonoacetaldehyde hydrolase: insight into catalysis of phosphorus bond cleavage and catalytic diversification within the HAD enzyme superfamily. *Biochemistry*. **39**(34): p. 10385-10396 (2000).
15. Lu, Z.; Dunaway-Mariano, D.; Allen, K. N.: The catalytic scaffold of the haloalkanoic acid dehalogenase enzyme superfamily acts as a mold for the trigonal bipyramidal transition state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**(15): p. 5687-5692 (2008).
16. Pikuta, E. V.; Marsic, D.; Itoh, T.; Bej, A. K.; Tang, J.; Whitman, W. B.; Ng, J. D.; Garriott, O. K.; Hoover, R. B.: *Thermococcus thio-reducens* sp. nov., a novel hyperthermophilic, obligately sulfur-reducing archaeon from a deep-sea hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**(Pt 7): p. 1612-1618 (2007).
17. Madeira, F.; Park, Y. M.; Lee, J.; Buso, N.; Gur, T.; Madhusoodanan, N.; Basutkar, P.; Tivey, A. R. N.; Potter, S. C.; Finn, R. D.; Lopez, R.: The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res.* **47**(W1): p. W636-W641 (2019).
18. Robert, X.; Gouet, P.: Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res.* **42**(W1): p. W320-W324 (2014).
19. Meng, X. Y.; Zhang, H. X.; Mezei, M.; Cui, M.: Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr. Comput. -Aided Drug Des.* **7**(2): p. 146-157 (2011).
20. Wallden, K.; Stenmark, P.; Nyman, T.; Flodin, S.; Graslund, S.; Loppnau, P.; Bianchi, V.; Nordlund, P.: Crystal structure of human cytosolic 5'-nucleotidase II: insights into allosteric regulation and substrate recognition. *J. Biol. Chem.* **282**(24): p. 17828-17836 (2007).
21. Pachl, P.; Fabry, M.; Rosenberg, I.; Simak, O.; Rezacova, P.; Brynda, J.: Structures of human cytosolic and mitochondrial nucleotidases: implications for structure-based design of selective inhibitors. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **70**(Pt 2): p. 461-470 (2014).
22. Hunsucker, S. A.; Mitchell, B. S.; Spsychala, J.: The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. *Pharmacol. Ther.* **107**(1): p. 1-30 (2005).
23. Bianchi, V.; Spsychala, J.: Mammalian 5'-nucleotidases. *J. Biol. Chem.* **278**(47): p. 46195-46198 (2003).

24. Marinaki, A. M.; Escuredo, E.; Duley, J. A.; Simmonds, H. A.; Amici, A.; Naponelli, V.; Magni, G.; Seip, M.; Ben-Bassat, I.; Harley, E. H.; Thein, S. L.; Rees, D. C.: Genetic basis of hemolytic anemia caused by pyrimidine 5' nucleotidase deficiency. *Blood*. **97**(11): p. 3327-3332 (2001).
25. Chiarelli, L. R.; Bianchi, P.; Fermo, E.; Galizzi, A.; Iadarola, P.; Mattevi, A.; Zanella, A.; Valentini, G.: Functional analysis of pyrimidine 5'-nucleotidase mutants causing nonspherocytic hemolytic anemia. *Blood*. **105**(8): p. 3340-3345 (2005).
26. Hunsucker, S. A.; Spsychala, J.; Mitchell, B. S.: Human cytosolic 5'-nucleotidase I: characterization and role in nucleoside analog resistance. *J. Biol. Chem.* **276**(13): p. 10498-10504 (2001).
27. Patzak, M. S.; Kari, V.; Patil, S.; Hamdan, F. H.; Goetze, R. G.; Brunner, M.; Gaedcke, J.; Kitz, J.; Jodrell, D. I.; Richards, F. M.; Pilarsky, C.; Gruetzmann, R.; Rummele, P.; Knosel, T.; Hessmann, E.; Ellenrieder, V.; Johnsen, S. A.; Neesse, A.: Cytosolic 5'-nucleotidase 1A is overexpressed in pancreatic cancer and mediates gemcitabine resistance by reducing intracellular gemcitabine metabolites. *EBioMedicine*. **40**: p. 394-405 (2019).
28. Tzoneva, G.; Perez-Garcia, A.; Carpenter, Z.; Khiabani, H.; Tosello, V.; Allegretta, M.; Paietta, E.; Racevskis, J.; Rowe, J. M.; Tallman, M. S.; Paganin, M.; Basso, G.; Hof, J.; Kirschner-Schwabe, R.; Palomero, T.; Rabadan, R.; Ferrando, A.: Activating mutations in the NT5C2 nucleotidase gene drive chemotherapy resistance in relapsed ALL. *Nat. Med.* **19**(3): p. 368-371 (2013).
29. Meyer, J. A.; Wang, J.; Hogan, L. E.; Yang, J. J.; Dandekar, S.; Patel, J. P.; Tang, Z.; Zumbo, P.; Li, S.; Zavadil, J.; Levine, R. L.; Cardozo, T.; Hunger, S. P.; Raetz, E. A.; Evans, W. E.; Morrison, D. J.; Mason, C. E.; Carroll, W. L.: Relapse-specific mutations in NT5C2 in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet.* **45**(3): p. 290-294 (2013).
30. Li, L.; Fridley, B.; Kalari, K.; Jenkins, G.; Batzler, A.; Safgren, S.; Hildebrandt, M.; Ames, M.; Schaid, D.; Wang, L.: Gemcitabine and cytosine arabinoside cytotoxicity: association with lymphoblastoid cell expression. *Cancer Res.* **68**(17): p. 7050-7058 (2008).
31. Spsychala, J.; Madrid-Marina, V.; Fox, I. H.: High K_m soluble 5'-nucleotidase from human placenta. Properties and allosteric regulation by IMP and ATP. *J. Biol. Chem.* **263**(35): p. 18759-18765 (1988).
32. Bontemps, F.; Van den Berghe, G.; Hers, H. G.: 5'-Nucleotidase activities in human erythrocytes. Identification of a purine 5'-nucleotidase stimulated by ATP and glycerate 2,3-bisphosphate. *Biochem. J.* **250**(3): p. 687-696 (1988).
33. Tavenier, M.; Skladanowski, A. C.; De Abreu, R. A.; de Jong, J. W.: Kinetics of adenylate metabolism in human and rat myocardium. *Biochim. Biophys. Acta.* **1244**(2-3): p. 351-356 (1995).

34. Bastian, F.; Parmentier, G.; Roux, J.; Moretti, S.; Laudet, V.; Robinson-Rechavi, M.: Bgee: Integrating and Comparing Heterogeneous Transcriptome Data Among Species. In: *Data Integration in the Life Sciences*. Bairoch, A.; Cohen-Boulakia, S.; Froidevaux, C. (Ed.). Springer, Berlin, Heidelberg: Lecture Notes in Computer Science, vol 5109, 2008, p. 124-131. ISBN 978-3-540-69827-2.
35. Banditelli, S.; Baiocchi, C.; Pesi, R.; Allegrini, S.; Turriani, M.; Ipata, P. L.; Camici, M.; Tozzi, M. G.: The phosphotransferase activity of cytosolic 5'-nucleotidase; a purine analog phosphorylating enzyme. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **28**(6): p. 711-720 (1996).
36. Baiocchi, C.; Pesi, R.; Camici, M.; Itoh, R.; Grazi Tozzi, M.: Mechanism of the reaction catalysed by cytosolic 5'-nucleotidase/phosphotransferase: formation of a phosphorylated intermediate. *Biochem. J.* **317**(Pt 3): p. 797-801 (1996).
37. Worku, Y.; Newby, A. C.: Nucleoside exchange catalysed by the cytoplasmic 5'-nucleotidase. *Biochem. J.* **205**(3): p. 503-510 (1982).
38. Galmarini, C. M.; Jordheim, L.; Dumontet, C.: Role of IMP-selective 5'-nucleotidase (cN-II) in hematological malignancies. *Leuk. Lymphoma.* **44**(7): p. 1105-1111 (2003).
39. Cividini, F.; Filoni, D.N.; Pesi, R.; Allegrini, S.; Camici, M.; Tozzi, M. G.: IMP-GMP specific cytosolic 5'-nucleotidase regulates nucleotide pool and prodrug metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* **1850**(7): p. 1354-1361 (2015).
40. Johnson, M. A.; Fridland, A.: Phosphorylation of 2',3'-dideoxyinosine by cytosolic 5'-nucleotidase of human lymphoid cells. *Mol. Pharmacol.* **36**(2): p. 291-295 (1989).
41. Berman, P. A.; Black, D. A.; Human, L.; Harley, E. H.: Oxypurine cycle in human erythrocytes regulated by pH, inorganic phosphate, and oxygen. *J. Clin. Invest.* **82**(3): p. 980-986 (1988).
42. Itoh, R.: Regulation of cytosol 5'-nucleotidase by adenylate energy charge. *Biochim. Biophys. Acta.* **659**(1): p. 31-37 (1981).
43. Brinsa V.: *Regulace metabolismu purinů jako farmakologický cíl*. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha, str. 13-26 (2017).
44. Rampazzo, C.; Miazzi, C.; Franzolin, E.; Pontarin, G.; Ferraro, P.; Frangini, M.; Reichard, P.; Bianchi, V.: Regulation by degradation, a cellular defense against deoxyribonucleotide pool imbalances. *Mutat. Res.* **703**(1): p. 2-10 (2010).
45. Oka, J.; Matsumoto, A.; Hosokawa, Y.; Inoue, S.: Molecular cloning of human cytosolic purine 5'-nucleotidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**(1): p. 917-922 (1994).
46. Rampazzo, C.; Gazzola, C.; Ferraro, P.; Gallinaro, L.; Johansson, M.; Reichard, P.; Bianchi, V.: Human high- K_m 5'-nucleotidase effects of overexpression of the cloned cDNA in cultured human cells. *Eur. J. Biochem.* **261**(3): p. 689-697 (1999).

47. Dieck, C. L.; Tzoneva, G.; Forouhar, F.; Carpenter, Z.; Ambesi-Impiombato, A.; Sanchez-Martin, M.; Kirschner-Schwabe, R.; Lew, S.; Seetharaman, J.; Tong, L.; Ferrando, A. A.: Structure and Mechanisms of NT5C2 Mutations Driving Thiopurine Resistance in Relapsed Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell*. **34**(1): p. 136-147 (2018).
48. Wallden, K.; Nordlund, P.: Structural basis for the allosteric regulation and substrate recognition of human cytosolic 5'-nucleotidase II. *J. Mol. Biol.* **408**(4): p. 684-696 (2011).
49. Hnizda, A.; Skerlova, J.; Fabry, M.; Pachl, P.; Sinalova, M.; Vrzal, L.; Man, P.; Novak, P.; Rezacova, P.; Veverka, V.: Oligomeric interface modulation causes misregulation of purine 5'-nucleotidase in relapsed leukemia. *BMC Biol.* **14**(1): 91 (2016).
50. Hnizda, A.; Fabry, M.; Moriyama, T.; Pachl, P.; Kugler, M.; Brinsa, V.; Ascher, D. B.; Carroll, W. L.; Novak, P.; Zaliova, M.; Trka, J.; Rezacova, P.; Yang, J. J.; Veverka, V.: Relapsed acute lymphoblastic leukemia-specific mutations in NT5C2 cluster into hotspots driving intersubunit stimulation. *Leukemia*. **32**(6): p. 1393-1403 (2018).
51. Lek, M.; Karczewski, K. J.; Minikel, E. V.; Samocha, K. E.; Banks, E.; Fennell, T.; O'Donnell-Luria, A. H.; Ware, J. S.; Hill, A. J.; Cummings, B. B.; Tukiainen, T.; Birnbaum, D. P.; Kosmicki, J. A.; Duncan, L. E.; Estrada, K.; Zhao, F.; Zou, J.; Pierce-Hoffman, E.; Berghout, J.; Cooper, D.N.; Deflaux, N.; DePristo, M.; Do, R.; Flannick, J.; Fromer, M.; Gauthier, L.; Goldstein, J.; Gupta, N.; Howrigan, D.; Kiezun, A.; Kurki, M. I.; Moonshine, A. L.; Natarajan, P.; Orozco, P.; Peloso, G. M.; Poplin, R.; Rivas, M. A.; Ruano-Rubio, V.; Rose, S. A.; Ruderfer, D. M.; Shakir, K.; Stenson, P. D.; Stevens, C.; Thomas, B. P.; Tiao, G.; Tusie-Luna, M. T.; Weisburd, B.; Won, H. H.; Yu, D.; Altshuler, D. M.; Ardissino, D.; Boehnke, M.; Danesh, J.; Donnelly, S.; Elosua, R.; Florez, J. C.; Gabriel, S. B.; Getz, G.; Glatt, S. J.; Hultman, C. M.; Kathiresan, S.; Laakso, M.; McCarroll, S.; McCarthy, M. I.; McGovern, D.; McPherson, R.; Neale, B. M.; Palotie, A.; Purcell, S. M.; Saleheen, D.; Scharf, J. M.; Sklar, P.; Sullivan, P. F.; Tuomilehto, J.; Tsuang, M. T.; Watkins, H. C.; Wilson, J. G.; Daly, M. J.; MacArthur, D. G.: Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*. **536**(7616): p. 285-291 (2016).
52. Novarino, G.; Fenstermaker, A. G.; Zaki, M. S.; Hofree, M.; Silhavy, J. L.; Heiberg, A. D.; Abdellateef, M.; Rosti, B.; Scott, E.; Mansour, L.; Masri, A.; Kayserili, H.; Al-Aama, J. Y.; Abdel-Salam, G. M. H.; Karminejad, A.; Kara, M.; Kara, B.; Bozorgmehri, B.; Ben-Omran, T.; Mojahedi, F.; El Din Mahmoud, I. G.; Bouslam, N.; Bouhouche, A.; Benomar, A.; Hanein, S.; Raymond, L.; Forlani, S.; Mascaro, M.; Selim, L.; Shehata, N.; Al-Allawi, N.; Bindu, P. S.; Azam, M.; Gunel, M.; Caglayan, A.; Bilguvar, K.; Tolun, A.; Issa, M. Y.; Schroth, J.; Spencer, E. G.; Rosti, R. O.; Akizu, N.; Vaux, K. K.; Johansen, A.; Koh, A. A.; Megahed, H.; Durr, A.; Brice, A.; Stevanin, G.; Gabriel, S. B.; Ideker, T.; Gleeson, J. G.: Exome sequencing links corticospinal motor neuron disease to common neurodegenerative disorders. *Science*. **343**(6170): p. 506-511 (2014).

53. Pesi, R.; Micheli, V.; Jacomelli, G.; Peruzzi, L.; Camici, M.; Garcia-Gil, M.; Allegrini, S.; Tozzi, M. G.: Cytosolic 5'-nucleotidase hyperactivity in erythrocytes of Lesch-Nyhan syndrome patients. *NeuroReport*. **11**(9): p. 1827-1831 (2000).
54. Fink, J. K.: Hereditary spastic paraplegia: clinico-pathologic features and emerging molecular mechanisms. *Acta Neuropathol*. **126**(3): p. 307-328 (2013).
55. Finsterer, J.; Loscher, W.; Quasthoff, S.; Wanschitz, J.; Auer-Grumbach, M.; Stevanin, G.: Hereditary spastic paraplegias with autosomal dominant, recessive, X-linked, or maternal trait of inheritance. *J. Neurol. Sci*. **318**(1-2): p. 1-18 (2012).
56. Elert-Dobkowska, E.; Stepniak, I.; Krysa, W.; Ziora-Jakutowicz, K.; Rakowicz, M.; Sobanska, A.; Pilch, J.; Antczak-Marach, D.; Zaremba, J.; Sulek, A.: Next-generation sequencing study reveals the broader variant spectrum of hereditary spastic paraplegia and related phenotypes. *Neurogenetics*. **20**(1): p. 27-38 (2019).
57. Thauerer, B.; Zur Nedden, S.; Baier-Bitterlich, G.: Purine nucleosides: endogenous neuroprotectants in hypoxic brain. *J. Neurochem*. **121**(3): p. 329-342 (2012).
58. Jinnah, H. A.; Sabina, R. L.; Van Den Berghe, G.: Metabolic disorders of purine metabolism affecting the nervous system. *Handb. Clin. Neurol*. **113**: p. 1827-1836 (2013).
59. Nyhan, W.L.: The Lesch-Nyhan syndrome. *Annu. Rev. Med*. **24**: p. 41-60 (1973).
60. Stout, J. T.; Caskey, C. T.: The Lesch-Nyhan syndrome: clinical, molecular and genetic aspects. *Trends Genet*. **4**(6): p. 175-178 (1988).
61. Torres, R. J.; Puig, J. G.: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency: Lesch-Nyhan syndrome. *Orphanet J. Rare Dis*. **2**: 48 (2007).
62. Edwards, N. L.; Recker, D.; Fox, I. H.: Overproduction of uric acid in hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency. Contribution by impaired purine salvage. *J. Clin. Invest*. **63**(5): p. 922-930 (1979).
63. Koren, G.; Ferrazini, G.; Sulh, H.; Langevin, A. M.; Kapelushnik, J.; Klein, J.; Giesbrecht, E.; Soldin, S.; Greenberg, M.: Systemic exposure to mercaptopurine as a prognostic factor in acute lymphocytic leukemia in children. *N. Engl. J. Med*. **323**(1): p. 17-21 (1990).
64. Tzoneva, G.; Dieck, C. L.; Oshima, K.; Ambesi-Impiombato, A.; Sanchez-Martin, M.; Madubata, C. J.; Khiabani, H.; Yu, J.; Waanders, E.; Iacobucci, I.; Sulis, M. L.; Kato, M.; Koh, K.; Paganin, M.; Basso, G.; Gastier-Foster, J. M.; Loh, M. L.; Kirschner-Schwabe, R.; Mullighan, C. G.; Rabadan, R.; Ferrando, A. A.: Clonal evolution mechanisms in NT5C2 mutant-relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. **553**(7689): p. 511-514 (2018).
65. Moriyama, T.; Liu, S.; Li, J.; Meyer, J.; Zhao, X.; Yang, W.; Shao, Y.; Heath, R.; Hnizda, A.; Carroll, W. L.; Yang, J. J.: Mechanisms of NT5C2-Mediated Thiopurine Resistance in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mol. Cancer Ther*. **18**(10): p. 1887-1895 (2019).

66. Appel, A. S.; Appel, G. B.: Chapter 10 - Immunosuppressive Agents for the Therapy of Glomerular and Tubulointerstitial Disease. In: *Therapy in Nephrology & Hypertension (Third Edition)*. Wilcox, C. S. (Ed.). W.B. Saunders: Philadelphia, 2008, p. 105-111. ISBN 978-1-416-05484-9
67. Marton, Z.; Guillon, R.; Krimm, I.; Preeti; Rahimova, R.; Egron, D.; Jordheim, L. P.; Aghajari, N.; Dumontet, C.; Perigaud, C.; Lionne, C.; Peyrottes, S.; Chaloin, L.: Identification of Noncompetitive Inhibitors of Cytosolic 5'-Nucleotidase II Using a Fragment-Based Approach. *J. Med. Chem.* **58**(24): p. 9680-9696 (2015).
68. Gallier, F.; Lallemand, P.; Meurillon, M.; Jordheim, L. P.; Dumontet, C.; Perigaud, C.; Lionne, C.; Peyrottes, S.; Chaloin, L.: Structural insights into the inhibition of cytosolic 5'-nucleotidase II (cN-II) by ribonucleoside 5'-monophosphate analogues. *PLoS Comput. Biol.* **7**(12): e1002295 (2011).
69. Cividini, F.; Pesi, R.; Chaloin, L.; Allegrini, S.; Camici, M.; Cros-Perrial, E.; Dumontet, C.; Jordheim, L. P.; Tozzi, M. G.: The purine analog fludarabine acts as a cytosolic 5'-nucleotidase II inhibitor. *Biochem. Pharmacol.* **94**(2): p. 63-68 (2015).
70. Guillon, R.; Rahimova, R.; Preeti; Egron, D.; Rouanet, S.; Dumontet, C.; Aghajari, N.; Jordheim, L. P.; Chaloin, L.; Peyrottes, S.: Lead optimization and biological evaluation of fragment-based cN-II inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **168**: p. 28-44 (2019).
71. Stothard, P.: The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *BioTechniques.* **28**(6): p. 1102, 1104 (2000).
72. Gasteiger, E.; Gattiker, A.; Hoogland, C.; Ivanyi, I.; Appel, R. D.; Bairoch, A.: ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* **31**(13): p. 3784-3788 (2003).
73. Lepre, C. A.: Practical aspects of NMR-based fragment screening. *Methods Enzymol.* **493**: p. 219-239 (2011).
74. Viegas, A.; Manso, J.; Nobrega, F. L.; Cabrita, E.: Saturation-Transfer Difference (STD) NMR: A Simple and Fast Method for Ligand Screening and Characterization of Protein Binding. *J. Chem. Educ.* **88**: p. 990-994 (2011).
75. Congreve, M.; Carr, R.; Murray, C.; Jhoti, H.: A 'rule of three' for fragment-based lead discovery? *Drug Discovery Today.* **8**(19): p. 876-877 (2003).
76. Mayer, M.; Meyer, B.: Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **38**(12): p. 1784-1788 (1999).
77. Hwang, T. L.; Shaka, A. J.: Water Suppression That Works. Excitation Sculpting Using Arbitrary Wave-Forms and Pulsed-Field Gradients. *J. Magn. Reson., Ser. A.* **112**(2): p. 275-279 (1995).
78. Peng, Y.; Fu, S.; Liu, H.; Lucia, L. A.: Accurately Determining Esterase Activity via the Isosbestic Point of *p*-Nitrophenol. *BioResources.* **11**(4): p. 10099-10111 (2016).

79. Copeland, R. A.: *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*. 2nd ed. New York, John Wiley & Sons, 2000.
80. Fulmer, G.; Miller, A.; Sherden, N.; Gottlieb, H.; Nudelman, A.; Stoltz, B.; Bercaw, J.; Goldberg, K.: NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist. *Organometallics*. **29**(9): p. 2176-2179 (2010).
81. Lorenz, U.: Protein tyrosine phosphatase assays. *Curr. Protoc. Immunol.* **Chapter 11: Unit 11.7** (2011).
82. Storey, K. B.: *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. 1st ed. New York, John Wiley & Sons, 2005.
83. Papaneophytou, C. P.; Grigoroudis, A. I.; McInnes, C.; Kontopidis, G.: Quantification of the effects of ionic strength, viscosity, and hydrophobicity on protein-ligand binding affinity. *ACS Med. Chem. Lett.* **5**(8): p. 931-936 (2014).
84. Lejeune, A.; Vanhove, M.; Lamotte-Brasseur, J.; Pain, R. H.; Frere, J. M.; Matagne, A.: Quantitative analysis of the stabilization by substrate of *Staphylococcus aureus* PC1 beta-lactamase. *Chem. Biol.* **8**(8): p. 831-842 (2001).
85. Pace, C. N.; McGrath, T.: Substrate stabilization of lysozyme to thermal and guanidine hydrochloride denaturation. *J. Biol. Chem.* **255**(9): p. 3862-3865 (1980).
86. Wurth, C.; Kessler, U.; Vogt, J.; Schulz, G. E.; Folkers, G.; Scapozza, L.: The effect of substrate binding on the conformation and structural stability of Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase. *Protein Sci.* **10**(1): p. 63-73 (2001).
87. Hussain, R.; Hughes, C. S.; Javorfi, T.; Siligardi, G.; Williams, P.; Bonev, B. B.: To Boil an Egg: Substrate Binding Affects Critical Stability in Thermal Unfolding of Proteins. *J. Phys. Chem. B.* **122**(8): p. 2213-2218 (2018).
88. Chiba, Y.; Yoshida, A.; Shimamura, S.; Kameya, M.; Tomita, T.; Nishiyama, M.; Takai, K.: Discovery and analysis of a novel type of the serine biosynthetic enzyme phosphoserine phosphatase in *Thermus thermophilus*. *FEBS J.* **286**(4): p. 726-736 (2019).
89. Wang, W.; Meng, D.; Li, Q.; Li, Z.; You, C.: Characterization of a hyperthermophilic phosphatase from *Archaeoglobus fulgidus* and its application in in vitro synthetic enzymatic biosystem. *Bioresources and Bioprocessing*. **6**(1): Article No. 22 (2019).
90. Reed, M. C.; Lieb, A.; Nijhout, H. F.: The biological significance of substrate inhibition: a mechanism with diverse functions. *BioEssays*. **32**(5): p. 422-429 (2010).
91. Pfeiffer, M.; Wildberger, P.; Nidetzky, B.: *Yihx*-encoded haloacid dehalogenase-like phosphatase HAD4 from *Escherichia coli* is a specific α -d-glucose 1-phosphate hydrolase useful for substrate-selective sugar phosphate transformations. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **110**: p. 39-46 (2014).

