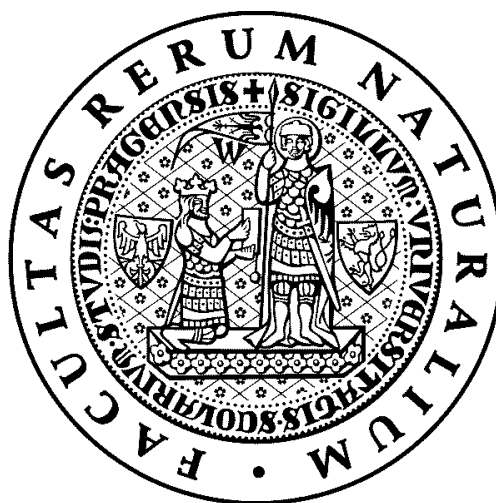


Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



INHIBICE THYMIDIN FOSFORYLASY

Bakalářská práce

INHIBITION OF THYMIDINE PHOSPHORYLASE

Bachelor's thesis

Vedoucí práce: RNDr. Jiří Brynda, CSc.

PRAHA 2010

EVA ZÁKOUCKÁ

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Jiřího Bryndy, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne

.....

Eva Zákoucká

Tato práce byla vypracována v oddělení strukturní biologie na Ústavu molekulární genetiky AV ČR.

Ráda bych poděkovala především svému školiteli RNDr. Jiřímu Bryndovi, CSc. za vstřícné a trpělivé vedení bakalářské práce, cenné rady a velkou pomoc během celé mé práce. Můj velký dík patří také RNDr. Pavlu Maderovi a Ing. Petru Pachlovi za jejich všestrannou pomoc, podporu a přátelský přístup.

Kolektivu laboratoře velmi děkuji za vytvoření příjemného a přátelského pracovního prostředí.

OBSAH:

1. Abstrakt.....	5
2. Abstract.....	6
3. Úvod	7
4. Cíl práce.....	7
5. Úvod do problematiky	8
5.1 Thymidin fosforylasy a její funkce	8
5.2 Porovnání pyrimidin nukleosid fosforylas	12
5.3 Struktura thymidin fosforylasy.....	13
5.3.1 Primární struktura	13
5.3.2 Sekundární struktura	19
5.3.3 Terciární struktura.....	20
Aktivní centrum.....	24
5.3.4 Kvartérní struktura	31
5.4 Inhibice thymidin fosforylasy	33
5.4.1 Kompetitivní inhibice	34
5.4.2 Nekompetitivní inhibice.....	35
5.4.3 Inhibitory thymidin fosforylasy	37
5.4.3.1 Přirozené inhibitory thymidin fosforylasy.....	37
5.4.3.2 Inhibitory první generace.....	37
5.4.3.3 Inhibitory založené na 6-aminouracilu	39
5.4.3.4 TPI a jeho analoga.....	41
5.4.3.5 Multisubstrátové inhibitory	44
5.4.3.6 Inhibitory interagující s enzymem mimo vazebné místo pro substrát	45
7. Diskuse	47
8. Závěr	49
9. Seznam použitých zkratk	50
10. Seznam použité literatury	51

1. Abstrakt

Thymidin fosforylasa, také známá jako gliostatin nebo endotheliální růstový faktor odvozený z krevních destiček, je důležitý enzym metabolismu nukleosidů podílející se na degradaci a recyklaci DNA. Tento enzym katalyzuje reverzibilní fosforolýzu pyrimidin-2'-deoxynukleosidů na 2-deoxy-D-ribose-1-fosfát a příslušnou nukleovou bázi a zároveň také katalyzuje přenos deoxyribosylů z pyrimidinových deoxynukleosidů k jiným nukleovým bazím za vzniku nového deoxynukleosidu a uvolnění báze z původního deoxynukleosidu.

Thymidin fosforylasa je velmi zajímavým potenciálním terapeutickým cílem, jelikož se účastní angiogeneze, tedy tvorby nových cév, a to obzvláště v pevných nádorech mnoha různých tkání. Napomáhá tím výživě a růstu nádorů stejně jako vzniku metastáz, tedy nových ložisek nádorů. Dále také inhibuje apoptózu, tedy řízenou smrt buňky, zejména nádorových buněk a degraduje některá protivirová a protinádorová léčiva. Kromě nádorových onemocnění je thymidin fosforylasa nadměrně produkována u dalších závažných onemocnění charakteristických tvorbou nových cév, jakými jsou například psoriáza, revmatoidní artritida nebo atheroskleróza.

Omezení aktivity thymidin fosforylasy zejména selektivně v tkáních postižených uvedenými onemocněními by tedy mělo velmi rozsáhlý terapeutický význam. Proto byla na základě znalosti struktury tohoto enzymu navrhnutá řada jeho inhibitorů, zejména strukturních analog jeho substrátů, které jsou v této práci shrnuty a podrobněji popsány.

Klíčová slova: thymidin fosforylasa, inhibice, angiogeneze, protinádorová léčiva

2. Abstract

Thymidine phosphorylase (TPase), also known as gliostatin or Platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF), is an enzyme with an important role in the nucleoside metabolism and is also involved in degradation and recycling of DNA. TPase catalyzes the reversible phosphorolysis of pyrimidine 2'-deoxynucleosides to 2-deoxy-D-ribose-1-phosphate and their respective bases, as well as the transfer of the deoxyribosyl moiety from one pyrimidine base to another.

Thymidine phosphorylase is a therapeutic target of great importance because of its participation in angiogenesis especially in solid tumors of various tissues. Therefore, TPase stimulates tumor growth and progression, as well as metastasis. In addition to this, TPase inhibits apoptosis, particularly of tumor cells and causes degradation of several antiviral and anticancer drugs. Apart from the carcinoma tissues, thymidine phosphorylase is overexpressed in various other tissues affected by disorders characterized by proliferation of blood vessels including psoriasis, rheumatoid arthritis and atherosclerosis.

Inhibiting the activity of TPase selectively in the tissues affected by the diseases listed above would be of great therapeutic significance. Therefore, many inhibitors, mainly substrate analogues, have been designed based on the knowledge of the enzyme's detailed structure. These inhibitors are listed and discussed in this thesis.

Key words: thymidine phosphorylase, inhibition, angiogenesis, anticancer drugs

3. Úvod

Tato bakalářská práce se zabývá enzymem thymidin fosforylasou a jeho inhibitory. Lidská thymidin fosforylasa se účastní angiogeneze (tvorby nových cév) a je nadměrně produkována zejména v pevných nádorech (solid tumors) – obzvláště ve tkáních prsou, vaječníku, jícnu a tlustého střeva^[1]. Tento enzym má velký vliv na progresi tumorů a vznik metastáz a také inhibuje apoptózu (řízená smrt buňky) tumorových buněk a buněk postižených hypoxií (nedostatkem kyslíku nutného pro metabolismus)^[1, 2, 3]. Dále thymidin fosforylasa degraduje nukleosidová analoga s antivirovými nebo protinádorovými účinky^[1, 4]. Kromě tumorů je thymidin fosforylasa nadměrně produkována i u dalších chronických zánětlivých onemocnění, která jsou charakteristická proliferací cév, jako například revmatoidní artritida, psoriáza nebo atheroskleróza^[2, 5, 6, 7, 8].

Thymidin fosforylasa tedy výrazně ovlivňuje růst tumorů a jejich léčbu, stejně jako další závažná onemocnění, a je proto velmi vhodné hledat inhibitory tohoto enzymu, které by byly schopné zabránit progresi nebo dokonce léčit rakovinu a další onemocnění. Pro navrhování vhodných inhibitorů thymidin fosforylasy je velmi důležité znát podrobně strukturu tohoto enzymu, proto tato práce pojednává zejména o strukturních aspektech tohoto enzymu získaných převážně rentgeno-strukturní analýzou vykrytalizovaného enzymu a jeho komplexů s inhibitory.

4. Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je získat literární přehled o dané problematice, popsat strukturu thymidin fosforylasy ve všech jejích aspektech, její funkci v metabolismu i roli při různých závažných onemocněních. Dalšími cíly této práce je shrnutí dostupných informací o inhibici thymidin fosforylasy a popis dosud známých inhibitorů se zaměřením na jejich potenciální využití v klinické praxi.

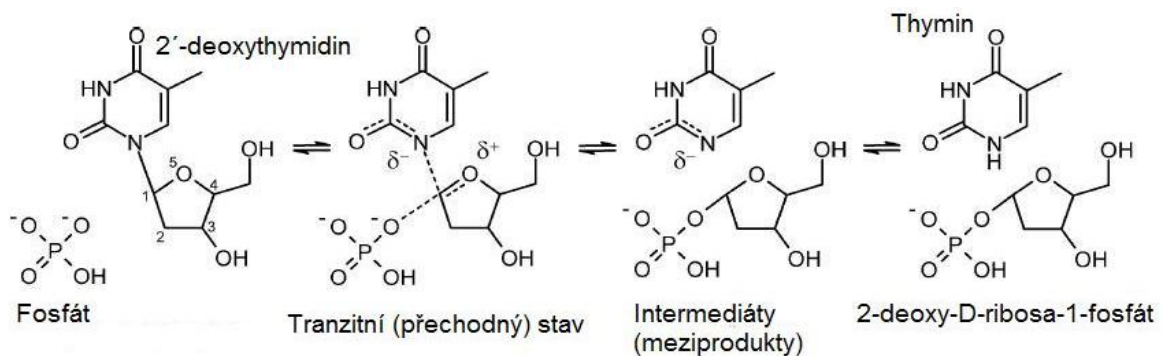
5. Úvod do problematiky

5.1 Thymidin fosforylasa a její funkce

Lidská thymidin fosforylasa je vnitrobuněčný enzym s enzymovým číslem EC 2.4.2.4., známý také pod zkratkou hTP (z anglického Human Thymidine Phosphorylase), nebo jako endoteliální růstový faktor odvozený z krevních destiček (PD-ECGF z anglického Platelet-derived endothelial cell growth factor), kde byla také poprvé objevena^[2, 8, 9, 10]. Dalším synonymem pro lidskou thymidin fosforylasu je gliostatin. Gliostatin byl poprvé izolován z lidských neurofibromů (vláknitých nádorů) a byla objevena jeho funkce jakožto inhibičního faktoru při růstu gliových buněk. Gliostatin je neurotrofický a má zásadní význam při výživě a přežití kortikálních neuronů *in vitro*. Z chemického a biologického hlediska se thymidin fosforylasa (TPasa), PD-ECGF a gliostatin ztotožňují, přestože pojem gliostatin se používá spíše jen pro revmatoidní artritidu a neurologický výzkum^[2, 4, 11].

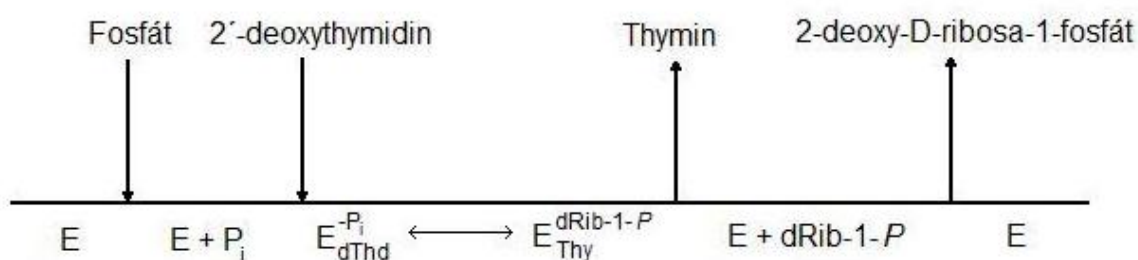
Z hlediska fyzikálně-chemických vlastností má monomer lidské thymidin fosforylasy hodnotu isoelektrického bodu $pI = 4,6$ a je termolabilní a nestabilní při nízkém pH. Dále je odolný vůči redukčním činidlům (dithiothreitol) a narozdíl od dalších růstových faktorů (PDGF ... růstový faktor odvozený z krevních destiček, TGF- β ... transformující růstový faktor β) jeho funkci neovlivňuje heparin^[10].

Thymidin fosforylasa je velmi důležitá v metabolismu nukleosidů, přesněji v katabolické části metabolismu, jelikož katalyzuje reverzibilní fosforolýzu 2'-deoxythymidinu (nebo obecně 2'-deoxynukleosidu) na 2-deoxy-D-ribose-1-fosfát a thymin (nebo příslušnou nukleovou bázi) – viz. Obrázek č. 1.



Obrázek č. 1: Reakce katalyzovaná thymidin fosforylasou – převzato a upraveno z [2].

Reakce probíhá uspořádaným mechanismem, při kterém se na thymidin fosforylasu naváže anorganický fosfát a následně 2'-deoxythymidin (obecně 2'-deoxynukleosid), čímž se vytvoří vysoko energetický komplex způsobující zeslabení glykosidické vazby pyrimidinových 2'-deoxynukleosidů. Glykosidická vazba je dále zeslabována tokem elektronů z 5'-O ribosového cyklu na pyrimidinový kruh, zatímco fosfát je situován tak, aby mohl nukleofilně atakovat 1'-C ribosy, čímž v dalším kroku vzniká 2-deoxy-D-ribose-1-fosfát a uvolňuje se thymin (obecně pyrimidinová báze)^[2, 12]. Tento mechanismus, při kterém je fosfát prvním navázaným substrátem a 2-deoxy-D-ribose-1-fosfát je posledním ligandem odštěpujícím se z aktivního centra enzymu (viz. Obrázek č. 2), jelikož enzym je stabilizován fosfátem a 2-deoxy-D-ribose-1-fosfátem a ne thyminem nebo 2'-deoxythymidinem^[2, 13], potvrzují i kinetické studie^[1, 2, 14, 15]. Pro lidskou thymidin fosforylasu byly pro thymidin naměřeny hodnoty $K_m = 0,35 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a $V_{\max} = 1,97 \text{ }\mu\text{M}/\text{min}$ ^[9].



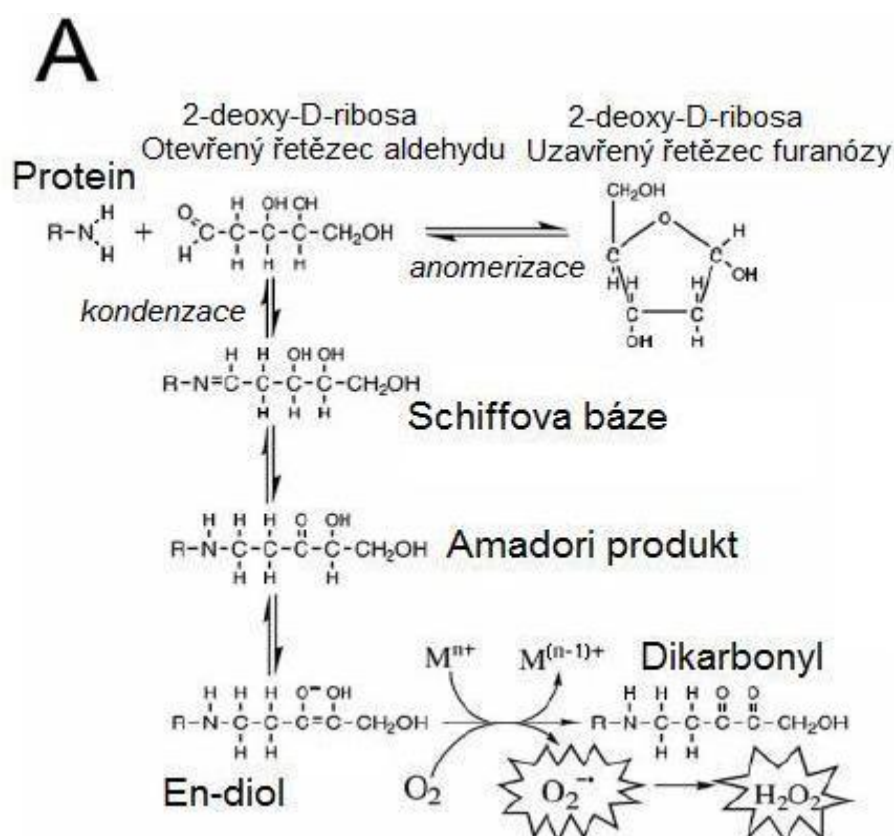
Obrázek č. 2: Schéma mechanismu reakce katalyzované thymidin fosforylasou: šipky značí navázání substrátů na enzym, popřípadě uvolnění produktů z enzymového komplexu. E ... volný enzym, Pi ... volný fosfát, E_{dThd}^{-Pi} ... tranzitní stav - komplex enzymu s navázaným fosfátem a 2'-deoxythymidinem, $E_{Thy}^{dRib-1-P}$... komplex enzymu s navázanými intermediáty (meziprodukty) reakce – 2-deoxy-D-ribose-1-fosfátem a thyminem, dRib-1-P ... volný 2-deoxy-D-ribose-1-fosfát
Převzato a upraveno z [15].

Thymin (nebo obecně nukleová báze) uvolněný touto reakcí se využívá k syntéze nukleotidů, zatímco 2-deoxy-D-ribose-1-fosfát je dále zpracováván na intermediáty pro pentos-fosfátový cyklus a následně glykolýzu^[5, 12].

Thymidin fosforylasa také katalyzuje přenos ("transfer") deoxyribosylů z pyrimidinových deoxynukleosidů k jiným nukleovým bazím za vzniku nového deoxynukleosidu a uvolnění báze z původního deoxynukleosidu, odkud také plyne její systematický název thymidin:orthofosfát deoxyribosyltransferasa^[4, 14, 15]. Zajišťuje tím homeostázi (tj. udržování stálé hodnoty nějaké veličiny) zásob deoxynukleosidtrifosfátů a zároveň zajišťuje recyklaci DNA například z poškozených buněk^[1, 8]. Pro

deoxyribosyltransferasovou aktivitu thymidin fosforylasy je nutná přítomnost fosfátu, pro který byla naměřena hodnota $K_m = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ [14, 15].

Přesný princip, jakým thymidin fosforylasa ovlivňuje angiogenesi, zatím není znám, ale předpokládá se, že ji nezpůsobuje sama thymidin fosforylasa, což dokazuje i skutečnost, že dosud nebyl identifikován žádný endoteliální buněčný receptor pro thymidin fosforylasu [4, 8]. Je tedy velmi pravděpodobné, že angiogenesi způsobuje až defosforylovaná 2-deoxyribosa, tedy defosforylovaný produkt reakce katalyzované thymidin fosforylasou, přičemž účast thymidin fosforylasy v tomto procesu je také nutná [1, 2, 8, 16, 17, 18, 19]. Podle nedávných poznatků 2-deoxyribosa způsobuje angiogenesi tvorbou kyslíkových radikálů, které způsobují tzv. oxidativní stres a podněcují sekreci molekul způsobujících růst nových cév, jako například vaskulární endoteliální růstový faktor nebo interleukin-8 [1, 8, 20] - viz. Obrázky č. 3 A a 3 B (na následující straně).



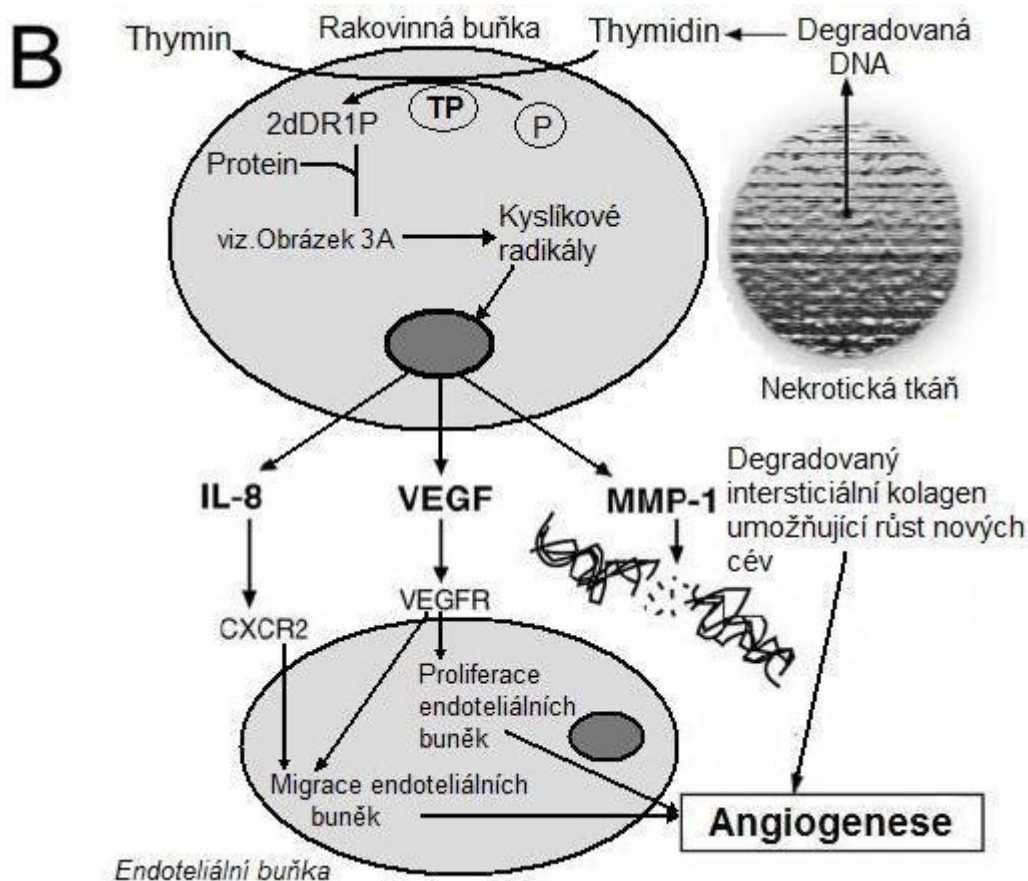
Obrázek č. 3 A: Předpokládaný mechanismus, kterým 2-deoxy-D-ribosa vytváří kyslíkové radikály:

2-deoxy-D-ribosa v otevřeném řetězci spontánně kondenzuje s aminoskupinou proteinu, čímž vzniká Schiffova báze, která se dále přemění na α -hydroxyketon, tzv. Amadori produkt. Ten se dále přemění na en-diolový meziprodukt, který podstupuje autooxidaci, přičemž reaguje s molekulárním kyslíkem za přítomnosti iontu kovu (M^{n+}) ve vyšším oxidačním čísle (například Cu^{2+} nebo Fe^{3+}). En-diol je oxidován na dikarbonyl, zatímco ion kovu je redukován na ion s nižším oxidačním číslem a molekulární kyslík je redukován na superoxidový anion. Superoxidový anion je poté

superoxid-dismutázou dále redukován na peroxid vodíku, který vstupuje do Fentonovy reakce a dává vzniku vysoce toxickým hydroxylovým radikálům.

Tímto mechanismem může reagovat 2-deoxy-D-ribose (2dDR) získaná defosforylací 2-deoxy-D-ribose-1-fosfátu (2dDR1P), nebo i 2-deoxy-D-ribose-5-fosfát (2dDR5P) získaný přeměnou 2-deoxy-D-ribose-1-fosfátu (2dDR1P) pomocí fosfopentomutázy.

Převzato a upraveno z [20].



Obrázek č. 3 B: Předpokládaný mechanismus, kterým thymidin fosforylase zprostředkovává angiogenesi: v důsledku hydrolýzy DNA z nekrotických buněk v tumorových tkáních stoupá koncentrace thymidinu. Ten je v rakovinných buňkách produkujících přebytek thymidin fosforylase fosforolyzován na thymin a 2-deoxy-D-ribose-1-fosfát. 2-deoxy-D-ribose-1-fosfát je dále přeměňován na látky způsobující vznik kyslíkových radikálů (viz. Obrázek č. 3 A), které působí v rakovinných buňkách oxidativní stres, což podněcuje produkci angiogenních faktorů VEGF, IL-8 a MMP-1.

P ... fosfát, TP ... thymidin fosforylase, 2dDR1P ... 2-deoxy-D-ribose-1-fosfát, IL-8 ... interleukin-8, VEGF ... vaskulární endoteliální růstový faktor, MMP-1 ... matrix-metaloproteináza-1

Převzato a upraveno z [20].

Další možný způsob, jakým může thymidin fosforylase podmiňovat angiogenesi, je její schopnost snížit hladinu intracelulárního (vnitrobuněčného) thymidinu, který funguje jako inhibitor proliferace endoteliálních buněk^[3, 7, 16].

5.2 Porovnání pyrimidin nukleosid fosforylas

Thymidin fosforylasa (TPasa), stejně jako enzym uridin fosforylasa (UPasa) katalyzující reverzibilní fosforolýzu 2'-deoxyuridinu, patří do rodiny pyrimidin nukleosid fosforylas (zkratka PyNP z anglického názvu Pyrimidine nucleoside phosphorylase). V savčích buňkách jsou přítomny oba tyto enzymy (TPasa i UPasa), naproti tomu u nižších organismů se vyskytuje pouze enzym pyrimidin nukleosid fosforylasa (PyNPasa), který je schopen katalyzovat fosforolýzu 2'-deoxythymidinu i 2'-deoxyuridinu^[2, 4, 12]. Thymidin fosforylasa je vysoce specifická vůči 2'-deoxynukleosidům, zatímco uridin fosforylasa a pyrimidin nukleosid fosforylasa jsou schopny přijmout jako substrát pyrimidinové nukleosidy s deoxyribosou i ribosou^[4, 12, 21]. Specifita thymidin fosforylasy vůči 2'-deoxythymidinu a obecně 2'-deoxynukleosidům je podrobněji vysvětlena v podkapitole nazvané Aktivní centrum.

Podle kinetických studií se uridin fosforylasa (podobně jako purin nukleosid fosforylasa) od thymidin fosforylasy liší obzvláště v mechanismu, jakým katalyzuje reverzibilní fosforolýzu 2'-deoxynukleosidů a také transfer deoxyribosylů z pyrimidinových deoxynukleosidů k jiným nukleovým bazím za vzniku nových deoxynukleosidů^[14, 15]. U thymidin fosforylasy byl dokázán uspořádaný mechanismus reakce, kdy se v případě reakce ve směru fosforolýzy na enzym naváže nejdříve fosfát a následně 2'-deoxythymidin, přičemž 2-deoxy-D-ribosa-1-fosfát je posledním ligandem odštěpujícím se z aktivního centra enzymu; v případě deoxyribosylového transferu – reakce v opačném směru – je prvním ligandem vázajícím se do aktivního místa enzymu deoxyribosa-1-fosfát a meziproduktem reakce je komplex tvořený deoxyribosa-1-fosfátem navázaným v aktivním místě enzymu. Naproti tomu uridin fosforylasa (i purin nukleosid fosforylasa) katalyzuje tuto reverzibilní reakci neuspořádaným mechanismem, při kterém nezáleží na pořadí navázání substrátů na enzym, a meziproduktem reakce je volná deoxyribosa-1-fosfát^[5, 14]. Pořadí vazby substrátů a odštěpení produktů z aktivního centra enzymů je tedy u těchto enzymů rozdílné, což dokazuje i skutečnost, že thymidin fosforylasa je stabilizována jen fosfátem a 2-deoxy-D-ribosa-1-fosfátem, zatímco uridin fosforylasa (a purin nukleosid fosforylasa) jsou stabilizovány i deoxynukleosidy^[13]. Pro transfer deoxyribosylu je v případě uridin fosforylasy (a purin nukleosid fosforylasy) potřeba stechiometrické množství fosfátu, zatímco v případě thymidin fosforylasy je potřebné množství fosfátu menší^[14].

Srovnání struktur prokaryotické pyrimidin nukleosid fosforylasy a eukaryotické thymidin fosforylasy je podrobněji rozebráno v následující kapitole.

5.3 Struktura thymidin fosforylasy

5.3.1 Primární struktura

Primární struktura proteinů a tedy i enzymů je dána pořadím aminokyselin v polypeptidovém řetězci, tedy jejich sekvencí. Pro tuto práci je z hlediska primární struktury nejdůležitější porovnání různých enzymů z rodiny pyrimidin nukleosid fosforylas, tzv. sekvenční alignment. Ze porovnání sekvencí jedné podjednotky thymidin fosforylasy pěti různých organismů vyplynuly některé důležité rozdíly mezi tímto enzymem u různých organismů, obzvláště mezi prokaryoty a eukaryoty.

Porovnání primárních struktur, tzv. sekvenční alignment: pomocí programu ClustalW2
... <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>

Legenda: * = AMK v daném sloupci jsou shodné u všech použitých sekvencí
: = částečně zachované substituce v rámci sekvencí
. = úplně zachované substituce v rámci sekvencí

Sekvence enzymů jednotlivých organismů byly získány dne 18.1.2010 z databáze enzymů BRENDA:

Escherichia coli^[22], *Salmonella enterica*^[23], *Homo sapiens*^[24], *Rattus norvegicus*^[25],
Mus musculus^[26].

Sekvence organismů *Escherichia coli* a *Salmonella enterica*, tedy dvou zástupců prokaryot, jsou vzájemně velmi podobné – většina aminokyselin v sekvencích je shodná u obou organismů – viz. První porovnání sekvencí.

První porovnání sekvencí – prokaryota:

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment – prokaryota

```
Escherichia coli  
MFLAQEIIRKKRDGHALSDEEIRFFINGIRDNTISEGQIAALAMTIFFHDMTMPERVSLT 60  
Salmonella enterica  
MFLAQEIIRKKRDGHALSDEEIRFFINGIRDNTISEGQIAALAMTIFFHDMTMPERVSLT 60  
*****
```

```

Escherichia coli
MAMRDSGTVLDWKSLLHNGPIVDKHSTGGVGDVTSMLLGMVAACGGYIPMISGRGLGHT 120
Salmonella enterica
MAMRDSGTVLDWKSLLHNGPIVDKHSTGGVGDVTSMLLGMVAACGGYVPMISGRGLGHT 120
*****:*****:*****

Escherichia coli
GGTLDKLESIPGFDIFPDDNRFREIIKDVGVAIIGQTSSLAPADKRFYATRDRITATVDSI 180
Salmonella enterica
GGTLDKLEAIPGFDIFPDDNRFREIIQDVGVAIIGQTSSLAPADKRFYATRDRITATVDSI 180
*****.*****:*****

Escherichia coli
PLITASILAKKLAEGLDALVMDVKVSGAFMPTYELSEALAEAIIVGVANGAGVRTTALLT 240
Salmonella enterica
PLITGSILAKKLAEGLDALVMDVKVSGAFMPTYELSEALAEAIIVGVANGAGVRTTALLT 240
****.*****

Escherichia coli
DMNQVLASSAGNAVEVREAVQFLTGEYRNPRLFVDTMALCVEMLISGKLAKDDAEARAKL 300
Salmonella enterica
DMNQVLASSAGNAVEVREAVQFLTGEYRNPRLFVDTMALCVEMLISGQLAKDDAEARAKL 300
*****:*****

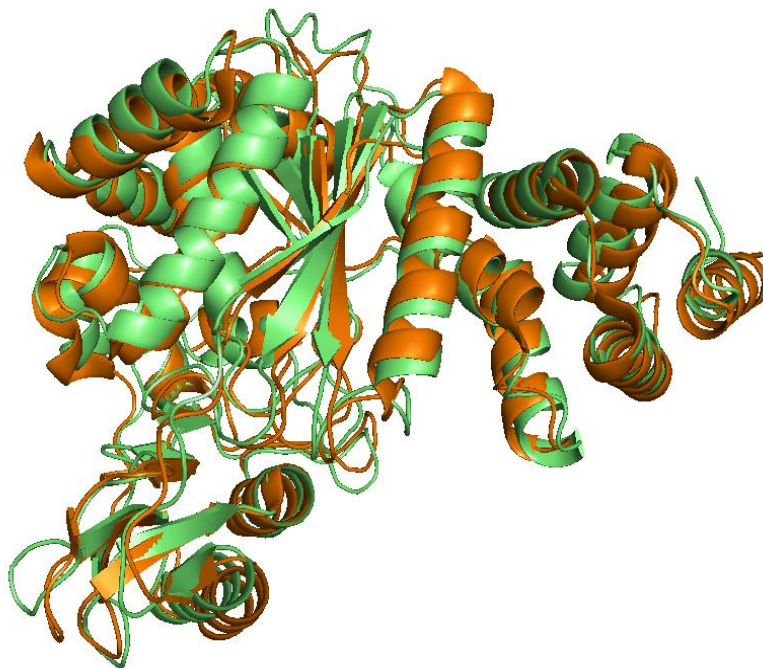
Escherichia coli
QAVLDNGKAAEVFGRMVAAQKGPTDFVENYAKYLPTAMLTAKAVYADTEGFVSEMDTRALG 360
Salmonella enterica
QAVLDNGKAAEVFGRMVAAQKGPSDFVENYDKYLPTAMLSKAVYADTEGFISAMDTRALG 360
*****:*****:*****:*****

Escherichia coli
MAVVAMGGGRRQASDTIDYSVGFTDMARLGDQVDGQRPLAVIHAKDENSWEAAKAVKAA 420
Salmonella enterica
MAVLSMGGGRRQASDTIDYSVGFTDMARLGDSDIGQRPLAVIHAKDETSEAAKAVKAA 420
***.:*****.:*****.*****

Escherichia coli
IKLADKAPSTPTVYRRRISE 440
Salmonella enterica
IILDDKAPASTPSVYRRRITE 440
* * * * * * * : * * * * * : *

```

Z přeložení více terciárních struktur na sebe na základě jejich strukturní podobnosti, tak zvaného strukturního alignmentu (viz. Obrázek č. 4 na následující straně), je rovněž patrné, že jsou si struktury pyrimidin nukleosid fosforylas v rámci prokaryot velmi podobné.



Obrázek č. 4: Porovnání terciárních struktur, tzv. strukturální alignment, dvou prokaryotických pyrimidin nukleosid fosforylas.

Zeleně: Pyrimidin nukleosid fosforylasa organismu *Escherichia coli*

Oranžově: Pyrimidin nukleosid fosforylasa organismu *Staphylococcus aureus*

Souřadnice krystalových struktur byly získány dne 29.4.2010 z databáze proteinových struktur PDB^[27, 28].

Porovnání terciárních struktur vytvořeno pomocí programu PyMOL, *RMSD* (root mean square deviation) = 1,38 Å.

Od sekvencí eukaryotických organismů, konkrétně savců – v tomto případě *Homo sapiens* (člověk), *Rattus norvegicus* (Potkan obecný) a *Mus musculus* (Myš domácí) – se ale sekvence prokaryotních organismů znatelně liší (viz. Druhé porovnání sekvencí na následující straně), a to zejména v délce aminokyselinového řetězce. U obou zástupců prokaryot je jedna podjednotka enzymu dlouhá 440 aminokyselin, zatímco v případě eukaryot je délka aminokyselinového řetězce mezi 471 a 482 aminokyselinami. Řetězec lidské thymidin fosforylasy je na N-konci oproti prokaryotickým pyrimidin nukleosid fosforylasám delší o třicet dva aminokyseliny, které zahrnují poměrně hodně glycinů, a netvoří proto přesně definovanou sekundární strukturu^[2]. V sekvencích eukaryot se navíc objevují četné inserce krátkých nukleotidových sekvencí oproti eukaryotickým sekvencím, a především se daleko více liší samotná sekvence aminokyselin – prokaryotická pyrimidin nukleosid fosforylasa má jen z přibližně 40 % totožnou sekvenci s lidskou thymidin fosforylasou^[2, 4, 12].

Druhé porovnání sekvencí – prokaryota a eukaryota:

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment – prokaryota a eukaryota

```

Rattus norvegicus
MAAPGTPPPLAPETAGADSGGGSG-----EHRQLPELIRLKRNGGHLSEADIRNFVHA 53
Mus musculus
MAAPGTPPPSA-----SGGGG-----EPRQLPELIRLKRDRGGHLREADIRNFVHA 46
Homo sapiens
MAALMTPGTGAPPAPGDFSGEGSQGLPDPSPEPKQLPELIRMKRDRGGRLSEADIRGFVAA 60
Salmonella enterica
-----MFLAQEIIIRKKRDGHALSDEEIRFFING 28
Escherichia coli
-----MFLAQEIIIRKKRDGHALSDEEIRFFING 28
                                     *:* *:* * : :* * : .
    
```

```

Rattus norvegicus
LMDGRAQDTQIGAMLMAIRLQGMDEETSVLTQALAESGQQLLEWP-KAWHQQLVDKHSTG 112
Mus musculus
VIDGRAQDTQIGAMLMAIRLQGMNLEETSVLTRALAESGQQLLEWP-KAWHQQLVDKHSTG 105
Homo sapiens
VVNGSAQGAQIGAMLMAIRLRGMDLEETSVLTQALAQSGQQLLEWP-EAWRQQLVDKHSTG 119
Salmonella enterica
IRDNTISEGQIAALAMTIFFDMTMPERVSMTMAMRDSGTVLDWKSLLNNGPIVDKHSTG 88
Escherichia coli
IRDNTISEGQIAALAMTIFFDMTMPERVSMTMAMRDSGTVLDWKSLLNNGPIVDKHSTG 88
: . . *:* *:* :*: * : * * * * : * * * * . :*****
    
```

```

Rattus norvegicus
GVGDKVSLVLPALAAACGCKVPMISGRSLGHTGGTLDKLESIPGFSVTQSPEQMLQILEE 172
Mus musculus
GVGDKVSLVLPALAAACGCKVPMISGRSLGHTGGTLDKLESIPGFGVTQSPEQMLHILEE 165
Homo sapiens
GVGDKVSLVLPALAAACGCKVPMISGRSLGHTGGTLDKLESIPGFNVIQSPEQMQLLDQ 179
Salmonella enterica
GVGDVTSMLGPMVAACGGYVPMISGRSLGHTGGTLDKLEAIPGFDIFPDDNRFREIIQD 148
Escherichia coli
GVGDVTSMLGPMVAACGGYIPMISGRSLGHTGGTLDKLESIPGFDIFPDDNRFREIIKD 148
**** .*:*. * :**** :*****.*****.*****.*****.: . : : : : :
    
```

```

Rattus norvegicus
VGCCIVGQSEKLVLPADGILYAARDVTATVDSVPLITASILSKKAVEGLSTLVVDVKFGGA 232
Mus musculus
VGCCIVGQSAKLVLPADGILYAARDVTATVDSVPLITASILSKKAVEGLSTLVVDVKFGGA 225
Homo sapiens
AGCCIVGQSEQLVPADGILYAARDVTATVDSLPLITASILSKKLVEGLSALVVDVKFGGA 239
Salmonella enterica
VGVAIIGQTSSLAPADKRFYATRDITATVDSIPLITGSILAKKLAEGLDALVMDVKVGS 208
Escherichia coli
VGVAIIGQTSSLAPADKRFYATRDITATVDSIPLITGSILAKKLAEGLDALVMDVKVGS 208
.* .*: * : .*.*** :*:**:* :*:**:* :*:**:* :*:**:* :*:**:* :*:**:* :
    
```

```

Rattus norvegicus
AVFPDQEKARELAKMLVRVGMGLQLVAAALTAMDNPLGRNVGHTLEVEEALLCLDGAGP 292
Mus musculus
AVFPDQEKARELAKMLVRVGSGLKVAAALTAMDNPLGRSVGHTLEVEEALLCLDGAGP 285
Homo sapiens
AVFPNQEQARELAKTLVGVGASLGLRVAAALTAMDKPLGRVGHAVEVEEALLCMDGAGP 299
Salmonella enterica
AFMPYELSEALAEAIIVGVANGAGVRTTALLTDMNQVLASSAGNAVEVREAVQFLTGEYR 268
Escherichia coli
AFMPYELSEALAEAIIVGVANGAGVRTTALLTDMNQVLASSAGNAVEVREAVQFLTGEYR 268
*:* * :. ** : * * . * : : * * * : * . * : : * * * : *
    
```



```

Rattus norvegicus
-PDLRDLVIRLGGAILWLSGQAETQDQGAARVAAALDDGSALHRFQLMLSAQGVDPLGLAR 351
Mus musculus
-PDLRDLVIRLGGAILWISGQAETQDQGAARVAAALDDGSARRRFQLMLSAQGVDPLGLAK 344
Homo sapiens
-PDLRDLVTTLGGALLWLSGHAGTQAQGAARVAAALDDGSALGRFERMLAAQGVDPLGLAR 358
Salmonella enterica
NPRLFVDVTMALCVEMLISGQLAKDDAEARAKLQAVLDNGKAAEVFGRMVAAQ-KGP---- 323
Escherichia coli
NPRLFVDVTMALCVEMLISGKLAKDDAEARAKLQAVLDNGKAAEVFGRMVAAQ-KGP---- 323
* * * : . * : * . * : : * : : * . * : * : * * : * * . *

Rattus norvegicus
ALCSGSPTQRRQLLPHARKQEELLSPADGIVECVRALPLACVLHELHAGRSRAGQPIRPG 411
Mus musculus
ALCSGSPTQRRQLLPHAREQEELLAPADGIVECVRALPLARVLHDLGAGRSRAGQPIRPG 404
Homo sapiens
ALCSGSPTQRRQLLPHAREQEELLAPADGIVECVRALPLARVLHDLGAGRSRAGQPIRPG 418
Salmonella enterica
---SDFVENYDKYLPTAMLKAVYADTEGFISAMDTRALGMAVLSMGGGRRQASDTIDYS 380
Escherichia coli
---TDFVENYAKYLPTAMLTKAVYADTEGFVSEMDTRALGMAVVAMGGGRRQASDTIDYS 380
. . : : * * * : : : * * . . : : * * : * * * : * . . :

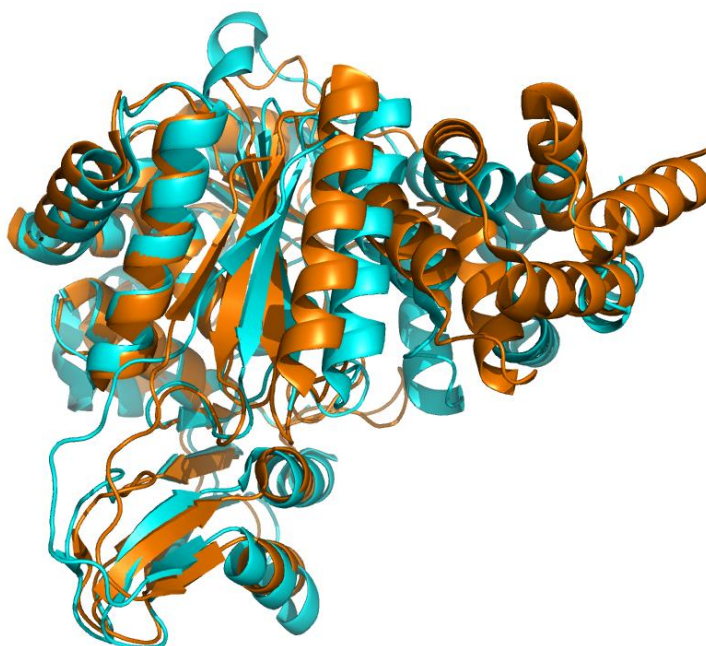
Rattus norvegicus
VGAELLVDVGQWLSRGTWPWLRVHLDGDPALSSQQRRTLLGALVLSDRAPFKAPSPFAELVL 471
Mus musculus
VGAELVLDVGQCLSRGTPWLRVHLDGDPALSSQQRRTLQALVLSDRAPFKVPSPPFAELVL 464
Homo sapiens
VGAELLVDVGQRLRRGTPWLRVHRDGPALSGPQSRALQEALVLSDRAPFAAPSPFAELVL 478
Salmonella enterica
VGFTDMARLGD SIDGQRPLAVIHAKDETSWQEAAKAVKAAIILDDKAPASTPSVYRRITE 440
Escherichia coli
VGFTDMARLGDQVDGQRPLAVIHAKDENSWQEAAKAVKAAIKLADKAPESTPTVYRRISE 440
* * . . : * : * . . : : * : * * * * . * : : .

Rattus norvegicus PPTTP-- 476
Mus musculus PPTIAQP 471
Homo sapiens PPQQ--- 482
Salmonella enterica -----
Escherichia coli -----

```

Porovnání terciárních struktur prokaryotické pyrimidin nukleosid fosforylasy z organismu *S. aureus* a lidské thymidin fosforylasy (viz. Obrázek č. 5 na následující straně) také ukazuje, že terciární struktury eukaryotického enzymu jsou rozdílné oproti terciárním strukturám tohoto enzymu u prokaryot, což dokazuje i vyšší hodnota průměrné kvadratické odchylky (RMSD) oproti porovnání pouze prokaryotických terciárních struktur. Při srovnání na sebe jsou si strukturně velmi podobné vždy jen malé α -domény, nebo jen velké α/β -domény, ale ne obě domény zároveň. Z toho vyplývá, že prokaryotické a eukaryotické struktury enzymu mají rozdílně tvořenou prohlubeň mezi malou a velkou doménou a tedy i aktivní centrum. Je tedy pravděpodobné, že schopnost prokaryotické pyrimidin fosforylasy katalyzovat reverzibilní fosforolýzu 2'-deoxythymidinu i 2'-deoxyuridinu, narozdíl od eukaryotické thymidin fosforylasy schopné katalyzovat

pouze fosforolýzu 2'-deoxythymidinu, je způsobena právě rozdílným uspořádáním v aktivním místě enzymů – viz. podkapitola Aktivní centrum.



Obrázek č. 5: Porovnání terciárních struktur, tzv. strukturní alignment, prokaryotické pyrimidin nukleosid fosforylasy a eukaryotické thymidin fosforylasy

Modře: Lidská thymidin fosforylasy

Oranžově: Pyrimidin nukleosid fosforylasy organismu *Staphylococcus aureus*

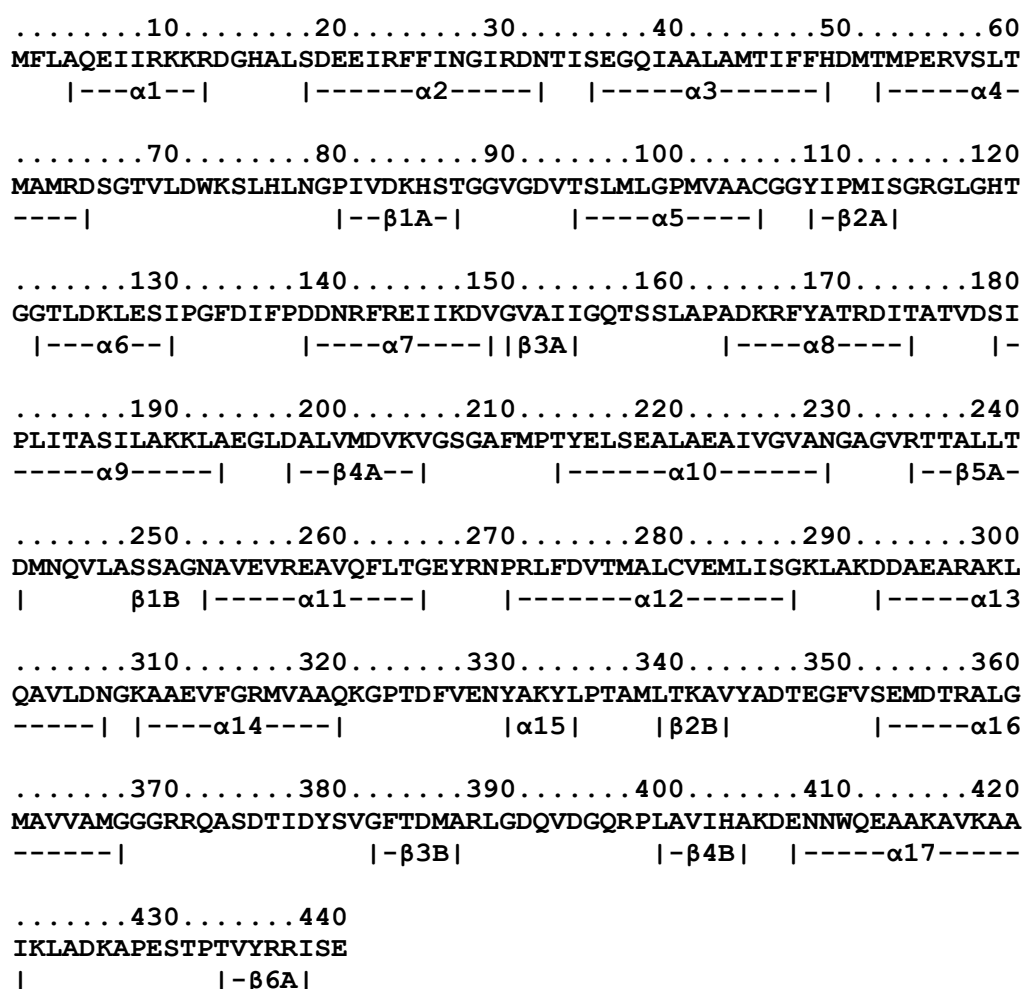
Souřadnice krystalových struktur byly získány dne 29.4.2010 z databáze proteinových struktur PDB^[28, 29].

Porovnání terciárních struktur vytvořeno pomocí programu PyMOL, *RMSD (root mean square deviation) = 3,80 Å*.

V rámci eukaryotických organismů (viz. Druhé porovnání sekvencí) jsou rozdíly v sekvencích aminokyselin velmi malé a délky řetězců u všech třech použitých exemplářů jsou srovnatelné. Největší rozdíl mezi sekvencemi je hned ze začátku řetězce, konkrétně u prvních třiceti aminokyselin, kdy řetězec lidské thymidin fosforylasy je úplný, zatímco v případě potkana se objevuje jedna větší mezera a v případě myši dvě větší mezery. V této oblasti jsou sekvence aminokyselin u myši a potkana téměř totožné, ale poměrně se liší od sekvence lidského enzymu. Ve zbytku řetězce se již sekvence eukaryot podstatně neliší i přesto, že člověk je fylogeneticky poměrně vzdálený od hlodavců (tedy myši a potkana), a občasné rozdíly v sekvenci nejspíš nejsou dány druhově, jelikož se nevyskytují například jen mezi hlodavci a člověkem, ale mezi všemi druhy stejnoměrně.

5.3.2 Sekundární struktura

Sekundární struktura proteinů a tedy i enzymů je dána prostorovým uspořádáním polypeptidového řetězce tak zvané na krátkou vzdálenost, tedy jen v rámci několika po sobě jdoucích aminokyselin. Sekundární struktura udává kde polypeptidový řetězec vytváří motivy α -helixu (α -šroubovice), β -sheetu (skládaný list), smyček (loop), případně neuspořádané struktury (random coil). Podrobný popis sekundární struktury pyrimidin nukleosid fosforylasy *E. coli* s umístěním jednotlivých segmentů sekundární struktury je uveden na Obrázku č. 6.



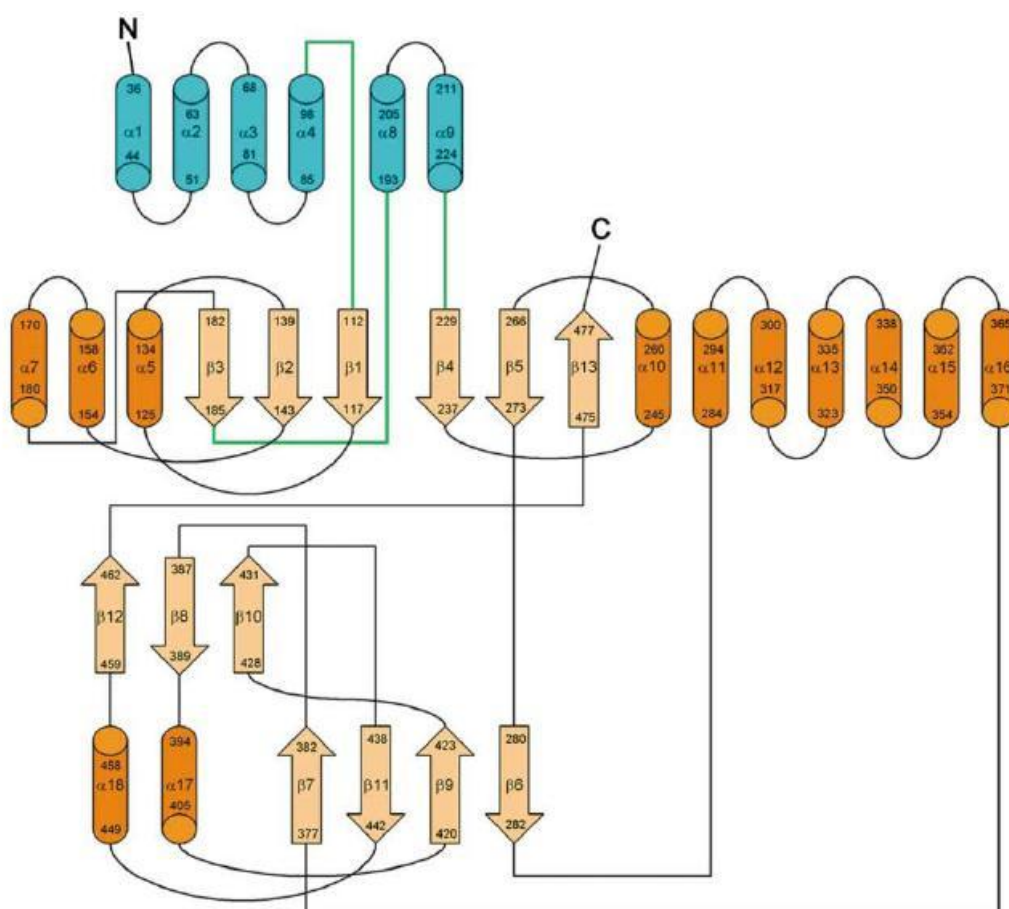
Obrázek č. 6: Podrobný popis sekundární struktury pyrimidin nukleosid fosforylasy *E. coli* naznačující oblasti α -helixů (α 1 - α 17) a β -sheetů (β 1A - β 4B) podle sekvence aminokyselin v řetězci. A značí šestivláknový β -sheet, B značí čtyřvláknový β -sheet.

Sekvence pyrimidin nukleosid fosforylasy *E. coli* byla získána dne 18. 1. 2010 z databáze enzymů BRENDA^[30].

5.3.3 Terciární struktura

Terciární struktura proteinů a tedy i enzymů je dána trojrozměrným uspořádáním celého polypeptidového řetězce, tedy uspořádáním a interakcemi motivů sekundární struktury v prostoru.

Thymidin fosforylase je dimer (viz. kapitola 5.3.4 Kvantérní struktura) tvořený dvěma identickými podjednotkami (monomery), přičemž každá ze dvou podjednotek enzymu je tvořena menší α -helikální doménou a velkou α/β -doménou, které jsou od sebe odděleny prohlubní obsahující vazbená místa pro substráty – viz. Obrázky č. 7 a č. 9 (na straně 24).



Obrázek č. 7: Schématický diagram struktury thymidin fosforylasy.

Válečky: α -helixy, šipky: β -sheety, N a C – označení N a C konce řetězce.

Modře: malá α -helikální doména, oranžově: α -helixy velké α/β -domény, světle oranžově: β -sheety velké α/β -domény, zeleně: smyčky spojující malou a velkou doménu (v tzv. prohlubni struktury).

Převzato z [2].

Struktura thymidin fosforylasy z *E. coli*: Malá α -helikální doména je tvořena aminokyselinami 1-65 a 163-195, počítáno od N-konce. Tato doména zahrnuje šest α -helixů ($\alpha 1$ - $\alpha 4$ a $\alpha 8$ - $\alpha 9$), které se účastní interakcí na rozhraní dimeru a také vazby

pyrimidinu. První čtyři helixy (tvořené aminokyselinami 1-65) tvoří tak zvaný shluk α -helixů ("helix bundle"), přičemž vždy dva prostorově přilehlé helixy ($\alpha 1$ s $\alpha 3$ a $\alpha 2$ s $\alpha 4$) jsou paralelní, zatímco dva helixy následující hned za sebou jsou antiparalelní. Aminokyseliny 163-193 tvoří dva helixy ($\alpha 8$ a $\alpha 9$) spojené krátkou smyčkou, které jsou prostorově otočené vůči prvním čtyřem helixům. Aminokyselinové zbytky z těchto dvou helixů tvoří jednu stranu prohlubně zahrnující aktivní centrum a jsou prostorově velmi blízko vazebnému místu pro 2'-deoxythymidin^[2, 31].

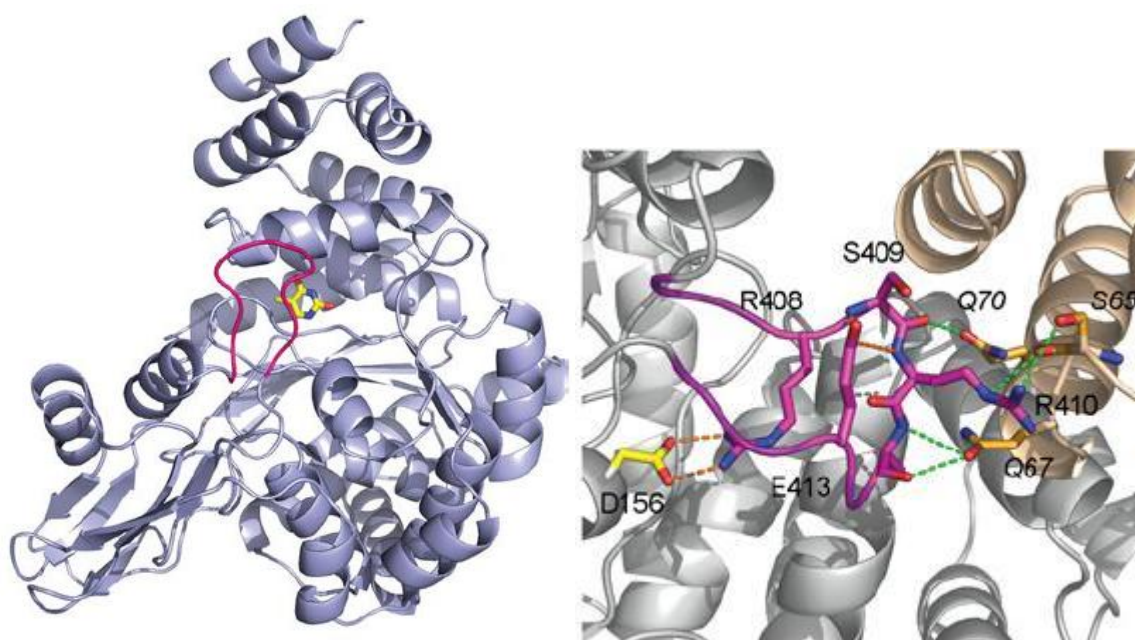
Velká α/β -doména je tvořena aminokyselinami 80-154 a 197-440. Hlavním rysem této domény je šestivláknový smíšený β -sheet (viz. Obrázek č. 6 ... A na straně 19), přičemž prvních pět vláken ($\beta 1$ - $\beta 5$) je paralelních, zatímco šesté vlákno ($\beta 13$), které je sekvenčně od ostatních vláken β -sheetu hodně vzdálené, je antiparalelní. Šest vláken β -sheetu je obklopeno α -helixy ($\alpha 5$ - $\alpha 7$ a $\alpha 10$ - $\alpha 16$)^[2, 31]. V této doméně tvoří α -helixy střídající se s paralelními β -sheety strukturu podobnou tzv. Rossmann-fold motivu. Rossmann-fold je strukturní motiv vyskytující se u proteinů vázajících nukleotidy a je tvořen třemi a více paralelními vlákny β -sheetu obklopenými dvěma a více helixy tak, že tvoří sekvenci " β -sheet – α -helix – β -sheet – α -helix – β -sheet", přičemž jeden Rossmann-fold motiv je schopen vázat jeden nukleotid. U thymidin fosforylasy není tento motiv přesně dodržen, ale centrální β -sheet velké α/β -domény se jí velmi podobá.

Mimo šestivláknového β -sheetu, který tvoří střed velké α/β -domény, je tato doména v případě *E. coli* dále tvořena menším antiparalelním čtyřvláknovým β -sheetem (viz. obrázek č. 6 ... B na straně 19)^[31]. V případě lidské thymidin fosforylasy je centrální smíšený β -sheet obklopen dvěma menšími antiparalelními β -sheety (vlákna $\beta 6$, $\beta 7$, $\beta 9$ a $\beta 11$ jako v případě *E. coli* a vlákna $\beta 8$, $\beta 10$ a $\beta 12$ navíc oproti *E. coli*) lemovanými dvěma α -helixy ($\alpha 17$ a $\alpha 18$)^[1]. Největší strukturní rozdíl mezi prokaryotickou pyrimidin nukleosid fosforylasou a lidskou thymidin fosforylasou je v rámci velké α/β -domény, kde má lidská thymidin fosforylasa oproti prokaryotické nukleosid fosforylase jeden α -helix navíc ($\alpha 15$), helix $\alpha 16$ je o jednu otáčku delší a stejně tak C-konec je delší^[2].

Tři smyčky spojující malou α -helikální doménu s velkou α/β -doménou (vyznačené na Obrázcích č. 7 na straně 20 zeleně a č. 9 na straně 24 červeně) fungují jako panty umožňující pohyb obou domén mezi konformací otevřenou (inaktivní) a zavřenou (aktivní, s navázaným substrátem), kdy se k sobě přiblíží aminokyselinové zbytky aktivního centra a substráty se k sobě dostanou na vzdálenost umožňující průběh reakce^[2, 12, 32]. Zavřená konformace je pro katalytickou aktivitu enzymu velmi důležitá také proto, že uzavření

enzymu kolem obou substrátů (fosfátu a 2'-deoxythymidinu) chrání substráty před hydrolyzou^[1].

Dále se v oblasti aktivního centra vyskytuje ještě jedna smyčka (aminokyseliny 405-415 u lidské thymidin fosforylasy – odpovídá aminokyselinám 364-371 pyrimidin nukleosid fosforylasy organismu *Bacillus stearothermophilus*, dnes *Geobacillus stearothermophilus*), která vodíkovými můstky stabilizuje uzavřenou konformaci, ale zřejmě není nutná k jejímu vytvoření^[1, 2]. Tato smyčka dále stabilizuje spojení monomerů do dimeru^[1, 2, 12] – viz. Obrázek č. 8.



Obrázek č. 8: Vlevo: Terciární struktura lidské thymidin fosforylasy s thyminem navázaným v aktivním centru, a s vyznačenou smyčkou stabilizující spojení monomerů do dimeru a uzavřenou konformaci.

Růžově: smyčka z aminokyselin 405-415.

Tyčový model thyminu: žlutě C, modře N, červeně O.

Vpravo: Detailní pohled na interakce smyčky stabilizující spojení monomerů do dimeru a uzavřenou konformaci ... tento pohled byl vytvořen rotací struktury vlevo o 90° ve směru hodinových ručiček.

Šedě a světle hnědě: dva monomery lidské thymidin fosforylasy.

Růžově: smyčka z aminokyselin 405-415; modře N, červeně O.

Tyčové modely aminokyselin: žlutě C, modře N, červeně O.

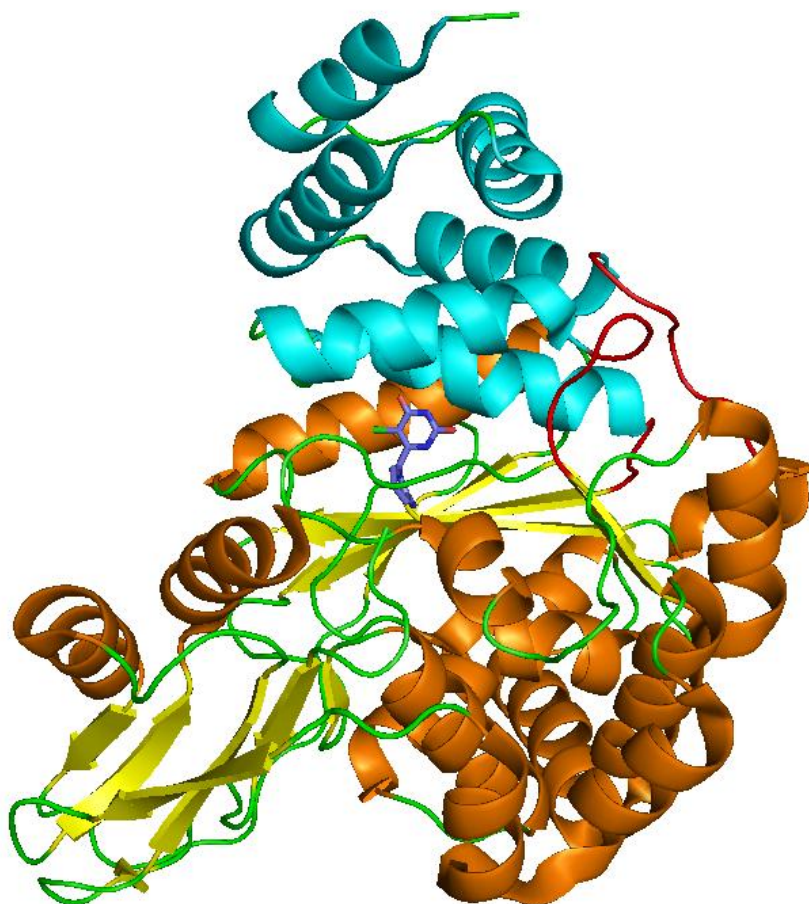
Oranžové přerušované černé čáry: vodíkové vazby v rámci jedné podjednotky, zelené

přerušované černé čáry: vodíkové vazby mezi dvěma podjednotkami.

R408, S409, Q70, S65, R410, Q67, E413, D156: jednopísmenné kódy aminokyselin s označením jejich pořadí v řetězci.

Převzato z [1].

Navázání fosfátu do aktivního centra (vazebného místa pro fosfát) zřejmě indukuje tvorbu vodíkového můstku mezi postranním řetězcem His150 a kyslíkem karbonylu Gly239 (v případě lidské thymidin fosforylasy; His119 a Gly208 v případě pyrimidin nukleosid fosforylasy *E. coli*), který pomáhá stabilizovat smyčku v oblasti aminokyselin 146 – 151, jenž je v důsledku vazby fosfátu destabilizována. Utvoření této vodíkové vazby se zdá být klíčové pro vzájemný pohyb domén. Malá α -helikální doména se pohybuje jakožto tuhé těleso, naproti tomu velká α/β -doména mírně mění konformaci, což souvisí právě s tvorbou vodíkové vazby mezi His150 a Gly239^[2, 32]. Navázání fosfátu do aktivního centra tedy umožní částečné uzavření struktury (α/β -doména se otočí o 8° směrem k α -doméně), nicméně až navázání 2'-deoxythymidinu způsobí úplné uzavření struktury (α/β -doména se otočí o dalších 20° směrem k α -doméně)^[1, 2, 9, 12]. To odpovídá kinetickým studiím, podle kterých je fosfát prvním navázaným substrátem, jelikož kdyby se nejdříve do aktivního centra navázal 2'-deoxythymidin, způsobil by úplné uzavření struktury enzymu, fosfát by se již nemohl do aktivního centra navázat a fosforolýza by nemohla proběhnout^[1]. Navázání samotného inhibitoru (TPI) bez přítomnosti fosfátu je však možné a způsobí úplné uzavření struktury a tedy vznik aktivní konformace^[2].



Obrázek č. 9: Terciární struktura thymidin fosforylasy s molekulou inhibitoru TPI.

Modře: malá α -helikální doména, oranžově: α -helixy velké α/β -domény, žlutě: β -sheety velké α/β -domény, červeně: smyčky spojující malou a velkou doménu zodpovědné za uzavření/otevření konformace, zeleně: smyčky spojující jednotlivé segmenty sekundární struktury.

Tyčový model inhibitoru TPI (5-chloro-6-[1-(2-iminopyrrolidinyl)methyl]uracil hydrochlorid): fialově C, modře N, červeně O, zeleně Cl.

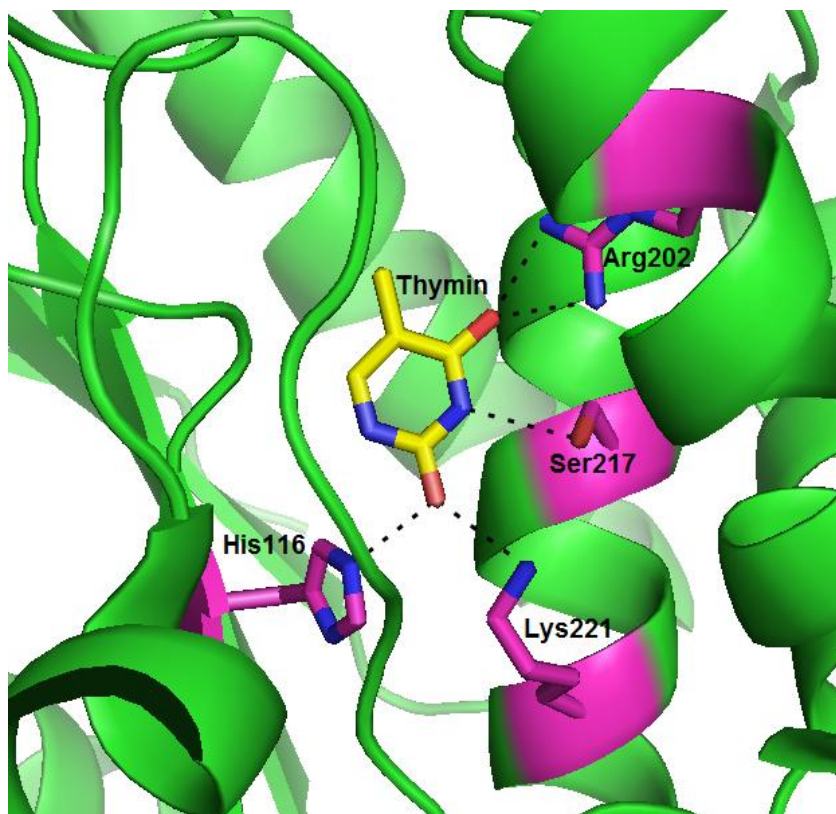
Souřadnice krystalové struktury byly získány dne 29.4.2010 z databáze proteinových struktur PDB^[29].

Struktura vytvořena pomocí programu PyMOL.

Aktivní centrum

Aktivní centrum thymidin fosforylasy se nachází v prohlubni mezi velkou α/β a malou α -doménou, přičemž vazebné místo pro 2'-deoxythymidin leží na malé α -doméně, zatímco vazebné místo pro fosfát leží na velké α/β -doméně. Vzdálenost mezi oběma substráty v aktivním centru je mezi 8 a 10 Å, což opět dokazuje, že enzym musí po navázání substrátů změnit konformaci na uzavřenou, aby se k sobě substráty dostaly dostatečně blízko a mohla proběhnout reakce^[4, 12, 31].

Vazbené místo pro 2'-deoxythymidin leží mezi α -helixy $\alpha 8$ a $\alpha 9$ a skládá se ze dvou oblastí – každá interaguje s jinou částí 2'-deoxythymidinu (popřípadě inhibitoru strukturně připomínajícího substrát, jako například TPI). Při navázání inhibitoru TPI do aktivního centra lidské thymidin fosforylasy interagují vodíkovými vazbami s 5-chlorouracilovou částí inhibitoru aminokyseliny Arg202 (vazba na 4-O pyrimidinu), Ser217 (vazba na 3-N) a Lys221 (vazba na 2-O) z malé α -domény a His116 (vazba na 1-N) z velké α/β -domény^[2] – viz. Obrázek č. 11 na straně 28. V případě navázání thyminu jakožto inhibitoru do aktivního centra interagují s pyrimidinovým cyklem stejné aminokyseliny jako v případě TPI, jen aminokyselina His116 vytváří vodíkovou vazbu s 2-O thyminu^[1] – viz. Obrázek č. 10 na následující straně. Struktury pyrimidin nukleosid fosforylas z organismů *Escherichia coli* a *Geobacillus stearothermophilus* ukazují velmi podobné aktivní centrum, kde je substrát/inhibitor stabilizován aminokyselinami Arg168, Ser183 a Lys187 v případě *G. stearothermophilus* a Arg171, Ser186 a Lys190 v případě *E. coli*, což odpovídá uvedeným aminokyselinám lidské thymidin fosforylasy. Role aminokyseliny His116, která je přítomna v celé rodině pyrimidin nukleosid fosforylas (odpovídá His82 u *G. stearothermophilus* a His85 u *E. coli*) není přesně známá, ale předpokládá se, že stabilizuje tranzitní stav při fosforolytické reakci, nebo je donorem protonu pro 1-N pyrimidinového cyklu po rozštěpení glykosidické vazby^[2, 12] – viz. Obrázek č. 1 na straně 8. Pro katalytickou aktivitu všech pyrimidin nukleosid fosforylas je tato aminokyselina nepostradatelná, což dokazuje i studie s thymidin fosforylasami s histidinem v pozici 116 v řetězci zaměněným za fenylalanin nebo lysin, které úplně postrádaly katalytickou aktivitu^[9].



Obrázek č. 10: Detailní pohled do aktivního centra thymidin fosforylasy s navázaným thyminem a se zvýrazněnými aminokyselinami tvořícími vodíkové vazby s thyminem.

Zeleně: aktivní centrum thymidin fosforylasy.

Tyčový model thyminu: žlutě C, modře N, červeně O.

Tyčové modely aminokyselin: růžově C, modře N, červeně O.

Přerušované černé čáry: vodíkové vazby.

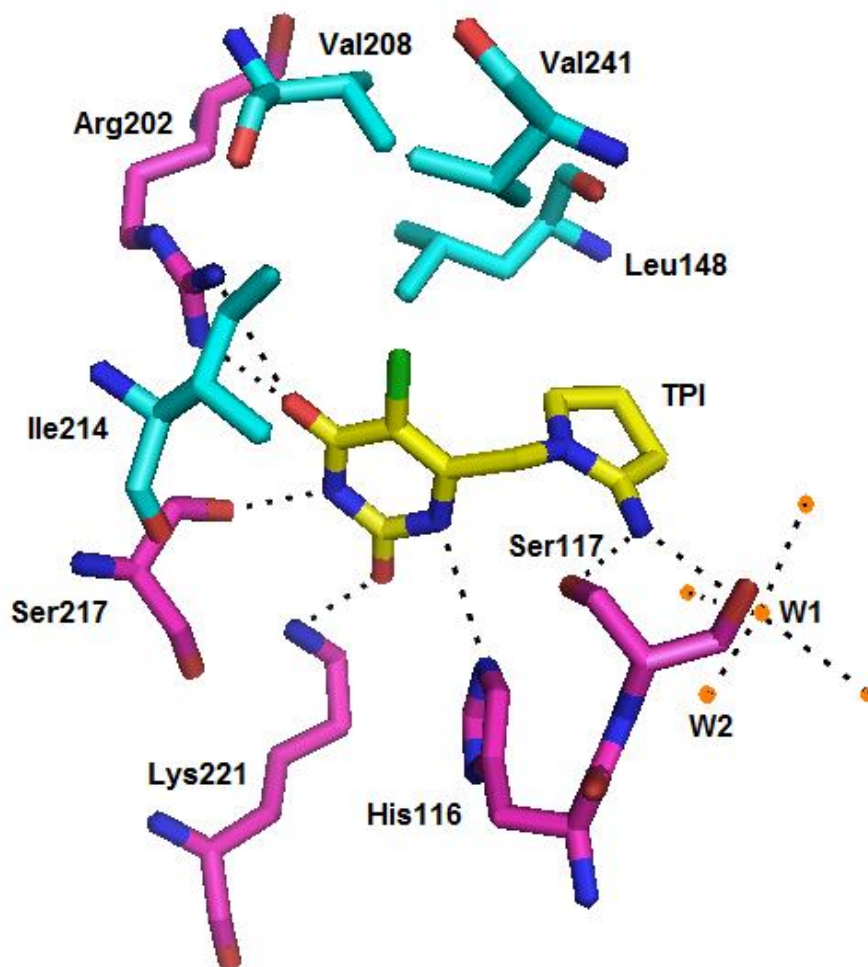
Arg202, Ser217, Lys221, His116: třípísmenné kódy aminokyselin s označením jejich pořadí v řetězci.

Souřadnice krystalových struktur byly získány dne 29.4.2010 z databáze proteinových struktur PDB^[33].

Struktura vytvořena pomocí programu PyMOL.

5-chlorouracilová část TPI je dále stabilizována v aktivním centru interakcemi chloru s hydrofobní kapsou tvořenou aminokyselinami Val208 a Ile214 z α -domény a Leu148 a Val241 z α/β -domény - viz. Obrázek č. 11 na straně 27. Aminokyselina Val241 přitom interaguje s chlorem van der Waalovými silami stejně tak, jak by s Val241 interagovala methylová skupina thyminu^[2]. Samotný uracil však v pozici 5 žádný substituent nemá, proto by se v případě navázání 2'-deoxyuridinu do aktivního centra lidské thymidin fosforylasy vytvořila mezi pozicí 5 pyrimidinového cyklu a aminokyselinou Val241 hydrofobní dutina, a uridin by nebyl v aktivním místě dostatečně stabilizován. Proto nemůže být 2'-deoxyuridin substrátem pro eukaryotickou thymidin fosforylasu. Naproti tomu u pyrimidin nukleosid fosforylasy organismu *Geobacillus stearothermophilus*

odpovídá aminokyselině Val241 aminokyselina Phe207 (což odpovídá Phe210 u *E. coli*). Fenylalanin zabírá více místa v prostoru než valin a tedy vzdálenost mezi pozicí 5 pyrimidinového cyklu 2'-deoxyuridinu a aminokyselinou Phe207 je menší, což umožňuje van der Waalsovy interakce mezi těmito skupinami a další stabilizaci 2'-deoxyuridinu v aktivním místě enzymu. Navázání 2'-deoxythymidinu do aktivního centra prokaryotní pyrimidin nukleosid fosforylasy by kvůli methylové skupině v pozici 5 pyrimidinového cyklu nebylo prostorově možné, pokud by se fenyl aminokyseliny Phe207 (popřípadě Phe210) neotočil o 90° podle osy spojující C β a C γ fenylalaninu. Takováto rotace by umožňovala prokaryotické pyrimidin nukleosid fosforylase přijmout jako substrát 2'-deoxythymidin i 2'-deoxyuridin bez nutnosti dalších strukturních změn v aktivním místě enzymu^[2, 9], což vysvětluje menší specifitu pyrimidin nukleosid fosforylasy oproti thymidin fosforylase. Ve struktuře pyrimidin nukleosid fosforylasy organismu *Geobacillus stearothermophilus* v otevřené konformaci byla dále identifikována vodíková vazba mezi postranním řetězcem aminokyseliny Asn175 a atomy hlavního řetězce aminokyseliny Phe207, která se však u uzavřené konformace již nevyskytuje. Tvorba této vodíkové vazby tedy může mít zásadní význam při znovuotevření struktury enzymu po proběhnutí katalytické reakce^[12].



Obrázek č. 11: Detailní pohled do aktivního centra thymidin fosforylasy s navázaným inhibitorem TPI (5-chloro-6-[1-(2-iminopyrrolidinyl)methyl]uracil hydrochlorid), a se zvýrazněnými aminokyselinami a molekulami vody interagujícími s TPI.

Tyčový model TPI: žlutě C, modře N, červeně O, zeleně Cl.

Tyčové modely aminokyselin vytvářejících vodíkové vazby s TPI: růžově C, modře N, červeně O.

Tyčové modely aminokyselin vytvářejících hydrofobní kapsu stabilizující chlor: tyrkysově C, modře N, červeně O.

Oranžově: molekuly vody ve vazebném místě pro fosfát. W1 a W2 ... molekuly vody interagující ve vazebném místě pro fosfát zastupující dva kyslíkové atomy fosfátu interagující s TPI.

Přerušované černé čáry: vodíkové vazby.

Arg202, Ser217, Lys221, His116, ...: třípísmenné kódy aminokyselin s označením jejich pořadí v řetězci.

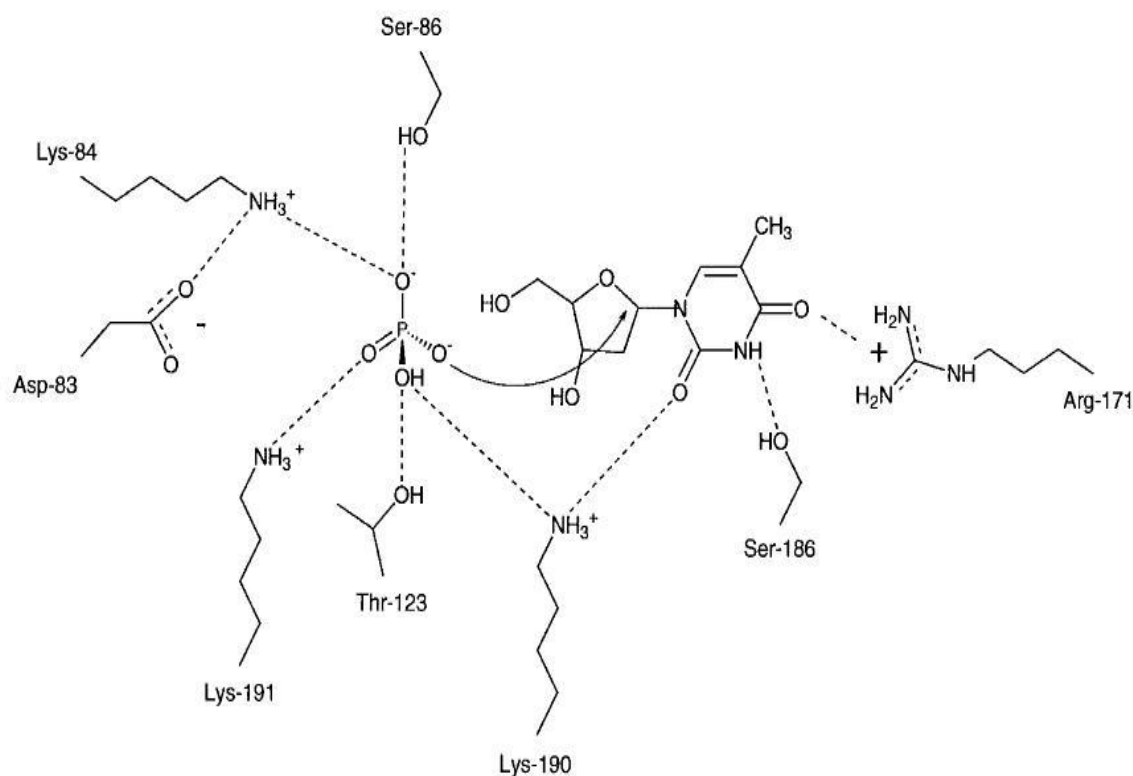
Souřadnice krystalových struktur byly získány dne 29.4.2010 z databáze proteinových struktur PDB^[29].

Struktura vytvořena pomocí programu PyMOL.

Druhá oblast aktivního centra interagující s 2-iminopyrrolidinovou částí TPI je tvořena aminokyselinou Ser117 z α/β -domény a sítí molekul vody ve vazebném místě pro fosfát – viz. Obrázek č. 11. Jelikož má 2-iminopyrrolidin charakter kladně nabitě částice, může napodobovat transitní stav podobný oxokarbeniový iontu při fosforolýze thymidinu. Dvě molekuly vody ve vazebném místě pro fosfát zastupují kyslíkové atomy fosfátu^[2].

Vazebné místo pro fosfát je u prokaryotické pyrimidin nukleosid fosforylasy umístěno mezi β -sheety $\beta 1$ a $\beta 2$ ^[2, 12], a je stabilizováno vodíkovými vazbami s aminokyselinami Asp83, Lys84, Ser86, Lys191 a Thr123 v případě *E. coli* (viz. Obrázek č. 12) a aminokyselinami Lys81, Ser 83, Lys108, Ser110 a Thr 120 v případě organismu *Geobacillus stearothermophilus*^[12, 32].

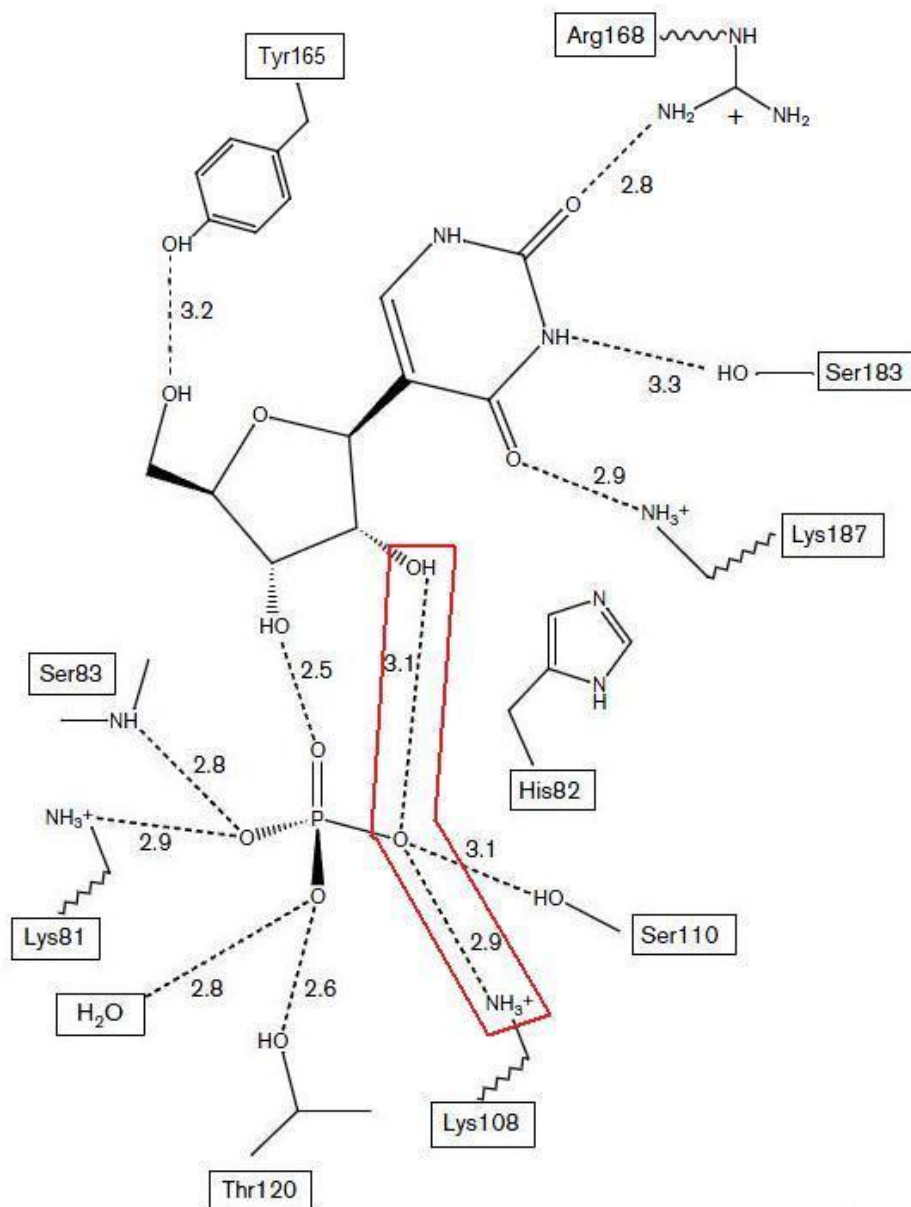
Detailní schéma celého aktivního centra pyrimidin fosforylasy *E. coli* s navázaným fosfátem i 2'-deoxythymidinem a naznačenými pravděpodobnými vodíkovými vazbami je rozkresleno na Obrázku č. 12.



Obrázek č. 12: Schéma pravděpodobného modelu katalytické aktivity pyrimidin nukleosid fosforylasy *E. coli* v aktivním centru, vytvořené simulací uzavřené struktury. Přerušované čáry představují možnou tvorbu H-můstek. Převzato z [32].

Thymidin fosforylase je narušena od uridin fosforylasy a pyrimidin nukleosid fosforylasy, které jsou schopny katalyzovat reverzibilní fosforolýzu nukleosidů i 2'-deoxynukleosidů, vysoce specifická vůči 2'-deoxynukleosidům^[4, 12, 21]. Podstatou této specifity je pravděpodobně aminokyselina Lys108, která se vyskytuje u všech dosud popsaných enzymů z rodiny pyrimidin nukleosid fosforylas kromě *E. coli* a lidské thymidin fosforylasy, kde se namísto lysinu v této pozici v řetězci vyskytuje methionin. Lysin vytváří vodíkovou vazbu s 1-O fosfátu, který pak dále tvoří vodíkovou vazbu

s 2'-OH ribosy (viz. Obrázek č. 13), což se v případě methioninu neděje. Rozdílná chemická podstata postranních řetězců těchto aminokyselin zřejmě způsobuje odlišnou vazbu fosfátu, což v důsledku ovlivňuje specifitu enzymů z rodiny pyrimidin nukleosid fosforylas vůči 2'-OH ribosového cyklu.



Obrázek č. 13: Schéma interakcí mezi fosfátem, pseudouridinem, molekulami vody a aminokyselinami aktivního centra pyrimidin nukleosid fosforylasy organismu *Geobacillus stearothermophilus*, s vyznačenými vodíkovými vazbami, vzdálenostmi mezi danými atomy v angstrémech a s červeně vyznačenou oblastí vodíkových vazeb umožňujících interakci s 2'-OH ribosového cyklu.

Prerušované černé čáry: vodíkové vazby.

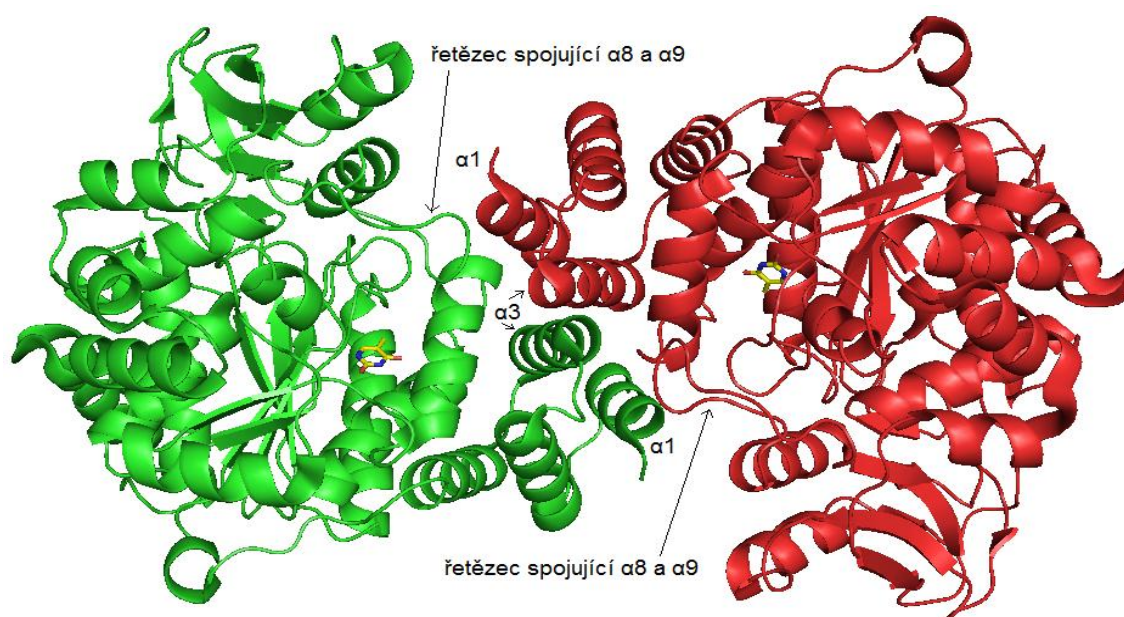
Tyr165, Arg168, Ser183, Lys187, ...: třípísmenné kódy aminokyselin s označením jejich pořadí v řetězci.

Převzato a upraveno z [12].

5.3.4 Kwartérní struktura

Kwartérní struktura proteinů a tedy i enzymů je dána uspořádáním podjednotek celého proteinu.

Thymidin fosforylasa je dimer tvořený dvěma identickými podjednotkami (monomery) souměrný podle dvojčetné krystalografické osy. Monomery jsou k sobě orientovány malými α -helikálními podjednotkami, které dohromady tvoří klubko α -helixů ("coiled coil"), viz. Obrázek č. 14. Nejbližší jsou u sebe α -helixy α_3 z každé podjednotky, a α -helixy α_1 z jedné podjednotky jsou orientovány vždy k řetězci spojující helixy α_8 a α_9 z druhé podjednotky^[1, 12].



Obrázek č. 14: Struktura dimeru lidské thymidin fosforylasy s thyminy navázanými v aktivních centrech monomerů.

Zeleně a červeně: dva monomery lidské thymidin fosforylasy.

Tyčové modely thyminů: žlutě C, modře N, červeně O.

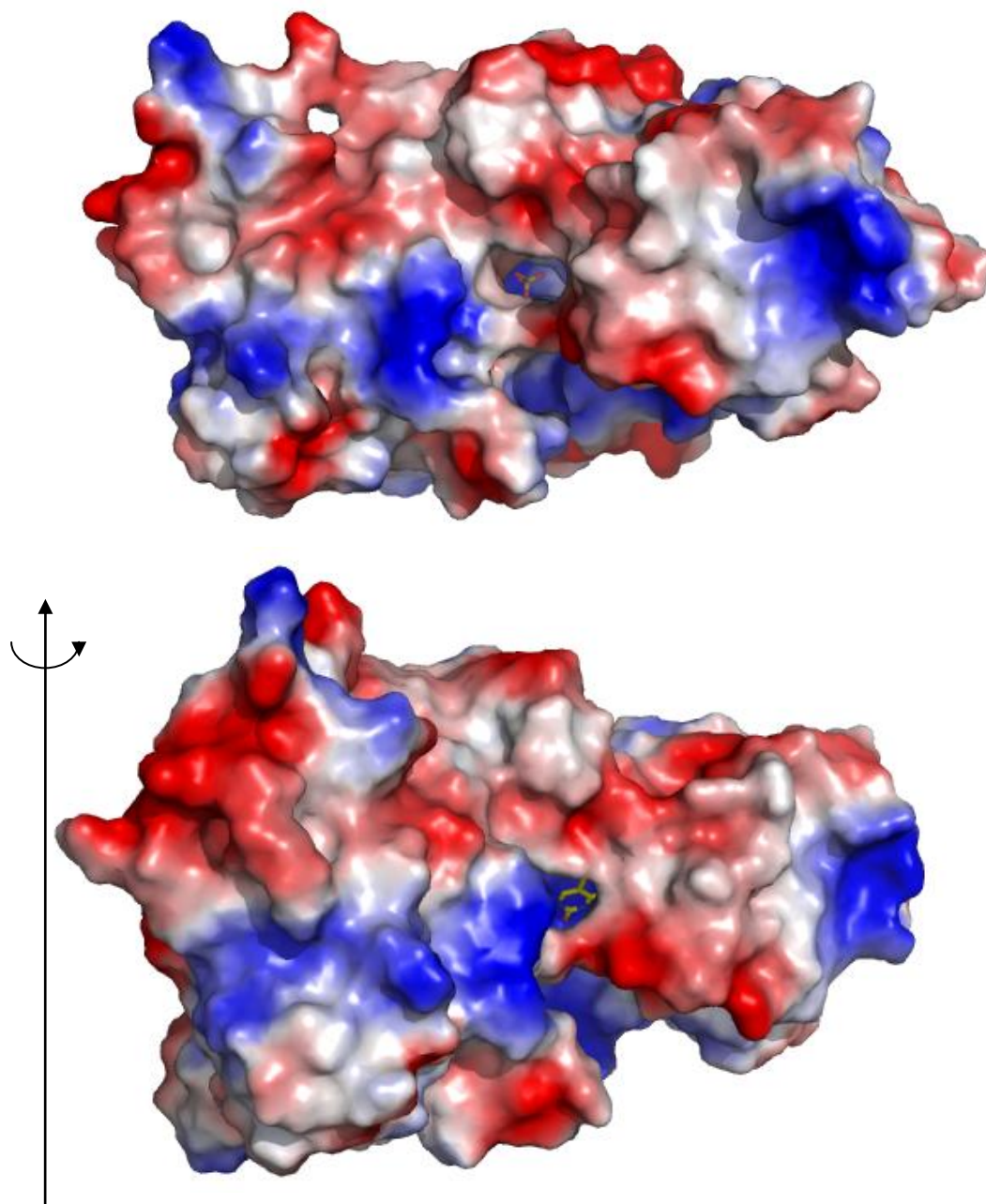
α_1 , α_3 , α_8 a α_9 : označení α -helixů důležitých pro spojení monomerů do dimeru.

Souřadnice krystalových struktur byly získány dne 29.4.2010 z databáze proteinových struktur PDB^[33].

Struktura vytvořena pomocí programu PyMOL.

Dimer má esovitý tvar a rozměry přibližně 110 Å na délku a 60 Å na šířku při tloušťce 40 Å v nejtlustším místě a tloušťce 26 Å na rozhraní podjednotek. Povrch molekuly je relativně hladký, bez větších výběžků, vyjma prohlubně obsahující vazebná místa pro thymin, thymidin a fosfát – viz. Obrázek č. 15 na následující straně. Tato prohlubeň je přibližně 10 Å hluboká a 8 Å široká a otvírá se jen do jedné roviny molekuly thymidin

fosforylasy. Prohlubně jsou tedy na molekule dvě – jedna na každé podjednotce – a jsou od sebe vzájemně vzdálené přibližně 40 Å^[31].



Obrázek č. 15: Model povrchu pyrimidin nukleosid fosforylasy organismu *E. coli* s thyminem a fosfátem navázanými v aktivním centru enzymu.

Nahoře: pohled do vazebného místa pro fosfát.

Dole: pohled do vazebného místa pro thymin; vytvořeno rotací horního modelu o 45° doprava podle naznačené osy.

Na obrázku je znázorněn solventu přístupný povrch molekuly vybarvený podle elektrostatického potenciálu: červeně místa povrchu se záporným potenciálem, modře místa s kladným potenciálem

Tyčové modely thyminu a fosfátu: žlutě C, modře N, červeně O, oranžově S.

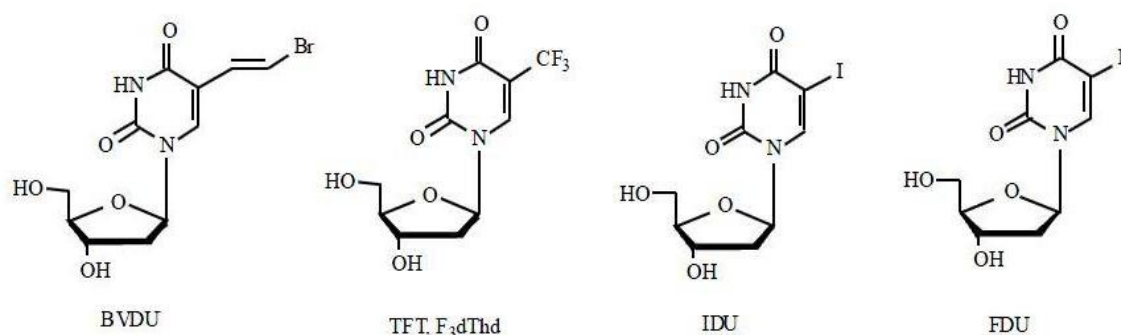
Souřadnice krystalových struktur byly získány dne 29.4.2010 z databáze proteinových struktur PDB^[34].

Struktura vytvořena pomocí programu PyMOL.

Molární hmotnost dimeru se pohybuje kolem 90 kDa u *Escherichie coli* (prokaryota) až 110 kDa u savců (eukaryota)^[2, 4, 31, 35, 36].

5.4 Inhibice thymidin fosforylasy

Jak již bylo uvedeno v úvodu, inhibice thymidin fosforylasy je potenciálně vhodným prostředkem léčby různých závažných onemocnění. Kromě již zmíněné účasti při angiogenezi a inhibici apoptózy, thymidin fosforylasa degraduje a deaktivuje některá chemoterapeutická léčiva, jako například TFT (trifluoro-2'-deoxythymidin)^[2, 21], BVDU ((E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridin neboli "brivudin")^[1, 37], IDU (5-jodo-2'-deoxyuridin)^[4, 11, 21] nebo FDU (5-flouro-2'-deoxyuridin)^[4, 38] – viz. Obrázek č. 16.



Obrázek č. 16: Nukleosidová analoga používaná jako protivirová a protinádorová léčiva, která jsou degradována thymidin fosforylasou – převzato z [4].

Zároveň však thymidin fosforylasa aktivuje jiná léčiva, jako například doxifluridin a fluorouracil^[1], nebo může být využita na přeměnu "proléčiv" ("prodrugs"), jako například tegafur (1-(tetrahydro-2-furanyl)-5-fluorouracil), nebo capecitabin (N⁴-pentyloxycarbonyl-5'-deoxy-5-fluorocytidin) na protinádorová nukleotidová léčiva zasahující do replikace DNA selektivně v nádorových tkáních^[2, 39, 40]. Možnost terapeutického využití thymidin fosforylasy tedy nemusí spočívat jen v její inhibici, ale naopak také ve využití její schopnosti aktivovat některá protinádorová léčiva selektivně v nádorových tkáních, což by mohlo pomoci významně omezit dávku chemoterapeutických léčiv podávaných pacientům a tím omezit i jejich nepříznivé vedlejší účinky.

Jelikož je většina dosud navržených inhibitorů thymidin fosforylasy strukturními analogy jejich substrátů, inhibují tento enzym kompetitivně. Kinetické studie však

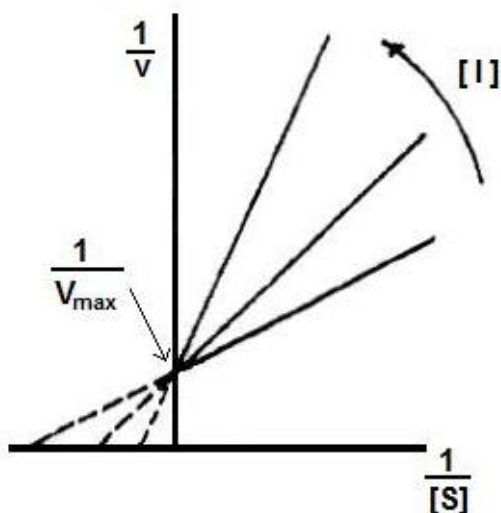
prokázaly, že thymin, tedy produkt reakce katalyzované thymidin fosforylasou, je zároveň jejím nekompetitivním inhibítoem. Pro lepší nastínění problematiky jsou principy kompetitivní a nekompetitivní inhibice podrobněji rozebrány ve dvou následujících podkapitolách.

5.4.1 Kompetitivní inhibice

Inhibitory enzymů jsou obecně látky snižující rychlost enzymově katalyzované reakce interakcí s danými enzymy. Inhibitory mohou s enzymem reagovat ireverzibilně, tedy kovalentními vazbami, nebo reverzibilně, tedy nekovalentními vazbami – například vodíkovými vazbami. Z hlediska enzymové kinetiky lze na inhibici reverzibilními inhibitory aplikovat rovnici Michaelis-Mentenové.

Kompetitivní inhibitory jsou látky strukturně velmi podobné přirozeným substrátům daného enzymu, a váží se tedy do stejného vazebného místa enzymu jako substrát. Kompetitivní inhibitor tedy se substrátem soutěží ("to compete") o aktivní místo enzymu. Inhibitor je ale narozdíl od substrátu nereaktivní, tedy enzymem nepřeměnitelný na produkt, a tudíž pokud se inhibitor naváže do aktivního centra enzymu, zcela toto vazebné místo obsadí a zabrání tím navázání substrátu, a proto reakce katalyzovaná daným enzymem nemůže proběhnout.

Síla interakce mezi inhibitorem a enzymem je dána inhibiční konstantou K_I , která je definována jako disociační konstanta pro komplex EI: $K_I = [E] \cdot [I] / [EI]$, kde $[E]$ je koncentrace volného enzymu, $[I]$ koncentrace volného inhibitoru a $[EI]$ koncentrace komplexu enzym-inhibitor, který je katalyticky neúčinný. Při kompetitivní inhibici se při zvyšování koncentrace inhibitoru nemění hodnota V_{max} , ale vzrůstá hodnota K_m ^[41, 42] – viz. Obrázek č. 17 na následující straně.



Obrázek č. 17: Kompetitivní inhibice: dvojnásobně reciproký výnos podle Lineweavera a Burka – graf závislosti $1/v$ (reciproká hodnota reakční rychlosti) na $1/[S]$ (reciproká hodnota koncentrace substrátu). Jednotlivé přímky značí závislost $1/v$ na $1/[S]$ při různých koncentracích kompetitivního inhibitoru. $[I]$ značí koncentraci inhibitoru, která se směru šipky vzrůstá. $1/V_{\max}$ značí reciprokou hodnotu maximální reakční rychlosti. $-1/K_m$, tedy záporná reciproká hodnota Michaelisovy konstanty, pro jednotlivé koncentrace inhibitorů leží na průsečíku osy x ($1/[S]$) s jednotlivými přímkami závislosti.

Při kompetitivní inhibici se při zvyšování koncentrace inhibitoru nemění hodnota V_{\max} (a tedy ani $1/V_{\max}$), ale vzrůstá hodnota K_m (a tedy vzrůstá i hodnota $-1/K_m$). Jednotlivé přímky závislosti tedy mají různou směrnici, různý průsečík s osou x ($1/[S]$), ale stejný průsečík s osou y ($1/v$).

Převzato a upraveno z [42].

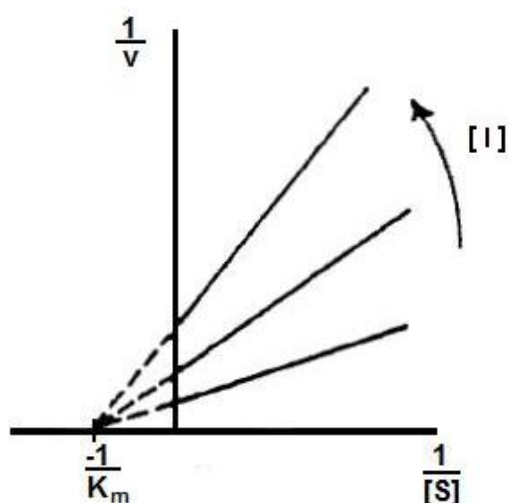
5.4.2 Nekompetitivní inhibice

Inhibitory působící nekompetitivně se nevážou do aktivního místa enzymu, tedy do vazebného místa pro substrát, ale na jiné místo enzymu. Navázání nekompetitivního inhibitoru na toto určité místo enzymu způsobuje strukturní změny aktivního místa enzymu, který poté přestane být katalyticky aktivní. Nekompetitivní inhibitory se narozdíl od kompetitivních inhibitorů, které se mohou vázat pouze na volný enzym, mohou vázat jak na volný enzym, tak na komplex enzym-substrát. Substrát a nekompetitivní inhibitor si tedy vzájemně nekonkurují^[41, 42].

Síla interakce mezi inhibitorem a volným enzymem je dána inhibiční konstantou K_I , která je definována jako disociační konstanta pro komplex EI: $K_I = [E].[I]/[EI]$, kde $[E]$ je koncentrace volného enzymu, $[I]$ koncentrace volného inhibitoru a $[EI]$ koncentrace komplexu enzym-inhibitor, který je katalyticky neúčinný. Síla interakce mezi inhibitorem a komplexem enzymem-substrát je dána inhibiční konstantou K_I' , která je definována jako disociační konstanta pro ternární komplex ESI: $K_I' = [ES].[I]/[ESI]$, kde $[ES]$ je

koncentrace komplexu enzym-substrát, $[I]$ koncentrace volného inhibitoru a $[ESI]$ koncentrace katalyticky neúčinného ternárního komplexu enzym-substrát-inhibitor. Při nekompetitivní inhibici má inhibitor stejnou afinitu k volnému enzymu i ke komplexu enzym-substrát, a platí pro něj tedy $K_I = K_I'$. Obecným případem nekompetitivní inhibice je inhibice smíšená, při které se inhibitor také může vázat na volný enzym i komplex enzym-substrát, ale s různou afinitou, a platí pro něj tedy $K_I \neq K_I'$.

Při kompetitivní inhibici se při zvyšování koncentrace inhibitoru nemění hodnota K_m , ale klesá hodnota V_{max} ^[41, 42] – viz. Obrázek č. 18.



Obrázek č. 18: Nekompetitivní inhibice: dvojnásobně reciproký výnos podle Lineweavera a Burka – graf závislosti $1/v$ (reciproká hodnota reakční rychlosti) na $1/[S]$ (reciproká hodnota koncentrace substrátu). Jednotlivé přímky značí závislost $1/v$ na $1/[S]$ při různých koncentracích nekompetitivního inhibitoru. $[I]$ značí koncentraci inhibitoru, která se směru šipky vzrůstá. $-1/K_m$ značí zápornou reciprokou hodnotu Michaelisovy konstanty. $1/V_{max}$, tedy reciproká hodnota maximální reakční rychlosti, pro jednotlivé koncentrace inhibitorů leží na průsečíku osy y ($1/v$) s jednotlivými přímkami závislosti.

Při nekompetitivní inhibici se při zvyšování koncentrace inhibitoru nemění hodnota K_m (a tedy ani $-1/K_m$), ale snižuje se hodnota V_{max} (tudíž se zvyšuje hodnota $1/V_{max}$). Jednotlivé přímky závislosti tedy mají různou směrnici, různý průsečík s osou y ($1/v$), ale stejný průsečík s osou x ($1/[S]$).

Převzato a upraveno z [42].

5.4.3 Inhibitory thymidin fosforylasy

5.4.3.1 Přirozené inhibitory thymidin fosforylasy

Thymidin fosforylasa je přirozeně inhibována thyminem, tedy produktem reakce, kterou katalyzuje^[1, 10]. Kromě kinetických studií byla tato skutečnost potvrzena krystalizací thymidin fosforylasy v uzavřené konformaci s thyminem v aktivním centru, přičemž 2-deoxy-D-ribose-1-fosfát v krystalu přítomen nebyl. Jelikož je 2-deoxy-D-ribose-1-fosfát posledním ligandem opouštějícím aktivní centrum enzymu, nebylo by možné po normálním průběhu reakce vykristalizovat enzym s navázaným thyminem, jelikož by musel opustit aktivní centrum dříve než 2-deoxy-D-ribose-1-fosfát. Thymin byl tedy v aktivním centru navázán jako inhibitor^[1]. Zároveň kinetické studie ukazují, že thymin inhibuje thymidin fosforylasu nekompetitivně^[10, 43] a neměl by se tedy vázat do aktivního centra enzymu. Z výše uvedených poznatků tudíž vyplývá, že thymin, uvolněný po fosforolýze 2'-deoxythymidinu, se opět naváže do aktivního centra, čímž způsobí konformační změnu struktury enzymu, tedy její uzavření, a substrát už se k aktivnímu centru nedostane, což je podstatou nekompetitivní inhibice thyminem^[1, 10].

Jakožto přirozený inhibitor angiogenní aktivity thymidin fosforylasy se ukázala být 2-deoxy-L-ribose, tedy enantiomer 2-deoxy-D-ribosy. 2-deoxy-L-ribose neinhibuje přímo thymidin fosforylasu, ale až fyziologickou aktivitu 2-deoxy-D-ribosy, tedy defosforylovaného produktu reakce katalyzované thymidin fosforylasou^[44]. Jelikož podle nejnovějších poznatků právě 2-deoxy-D-ribose způsobuje angiogenesi a podporuje růst tumorů a vznik metastáz, a její vznik je podmíněn katalytickou aktivitou thymidin fosforylasy, mohla by mít 2-deoxy-L-ribose také velmi důležitý terapeutický význam.

5.4.3.2 Inhibitory první generace

Mezi první navržené inhibitory pyrimidin fosforylas patří 5'-substituované acyklouridiny (1-(2'-hydroxyethoxymethyl)uracily) jako například 5'-benzylacyklouridin (BAU) nebo 5'-benzyloxybenzylacyklouridin (BBAU), a 5-benzyluracil s hodnotou $IC_{50} = 1,4 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Tyto sloučeniny však inhibovaly zejména uridin fosforylasu a katalytickou aktivitu thymidin fosforylasy vůbec neovlivnily^[21, 45].

Dalších třicet let byly za nejúčinnější inhibitory thymidin fosforylasy považovány sloučeniny 6-aminothymin (6AT), 6-amino-5-chlorouracil (6A5CU) a 6-amino-5-bromouracil (6A5BU) s hodnotami IC_{50} kolem $30\mu M$ – viz. Obrázek č. 19. Jejich inhibiční schopnost byla nejspíše založena na umocnění inhibice thymidin fosforylasy produktem reakce, kterou katalyzuje, tedy thyminem, přičemž substituce aminem v pozici 6 pyrimidinového cyklu zvyšovala účinnost inhibice dvakrát až devětkrát oproti samotnému thyminu^[46]. Přesto tyto sloučeniny neměly dostatečnou inhibiční schopnost aby zabránily degradaci důležitých pyrimidin 2'-deoxynukleosidů používaných jako chemoterapeutická léčiva^[21].

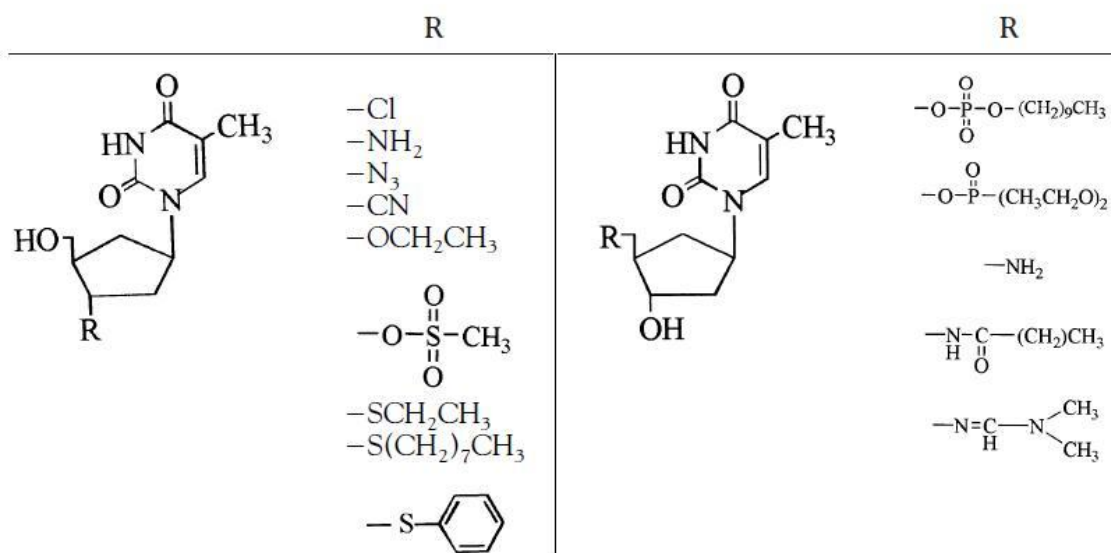
Již na konci 60. let 20. století bylo zřejmé, že pozice 2, 3 a 4 pyrimidinového cyklu musí zůstat neobsazené, aby mohl pyrimidin účinně interagovat s thymidin fosforylasou, zatímco navázání methylové skupiny, bromu nebo chloru do pozice 5 pyrimidinového cyklu zlepšuje interakci enzymu s pyrimidinem a zvyšuje účinnost inhibitoru^[47]. To je způsobeno přítomností hydrofobní kapsy v aktivním centru thymidin fosforylasy, která při navázání substrátu/inhibitoru sousedí s pozicí 5 pyrimidinového cyklu. Tato hydrofobní kapsa je lemována aminokyselinou Phe210 (u pyrimidin nukleosid fosforylasy *E. coli*), která lipofilně interaguje s malými skupinami navázanými na pozici 5 pyrimidinového cyklu, čímž umožňuje lepší vazbu substrátu/inhibitoru - viz. také podkapitola Aktivní centrum. Dále se zdá být v aktivním centru thymidin fosforylasy přítomna další hydrofobní kapsa sousedící s pozicí 6 pyrimidinového cyklu, a je tedy vhodné, aby měly inhibitory vhodně substituovanou i pozici 6 pyrimidinového cyklu, čímž by zaplnily i tuto hydrofobní kapsu. Z tohoto důvodu je většina původních inhibitorů thymidin fosforylasy 6-amino nebo 6-methylenamino deriváty uracilu.



Obrázek č. 19: Inhibitory thymidin fosforylasy první generace s aminoskupinami v pozici 6 pyrimidinového cyklu – převzato a upraveno z [4].

Dále byl zkoumán vliv substitucí v pozicích 3' a 5' deoxyribosové části pyrimidinových 2'-deoxynukleosidů na katalytickou aktivitu thymidin fosforylasy, ale žádná z testovaných

sloučenin (viz. Obrázek č. 20) thymidin fosforylasu neinhobovala. Sloučeniny s deoxyribosovou částí pyrimidinových 2'-deoxynukleosidů substituovanou za alkylovou, fenylovou, nebo karbonylovou skupinu v pozici 1-N pyrimidinového cyklu také nevykazovaly inhibiční aktivitu vůči thymidin fosforylase^[21].

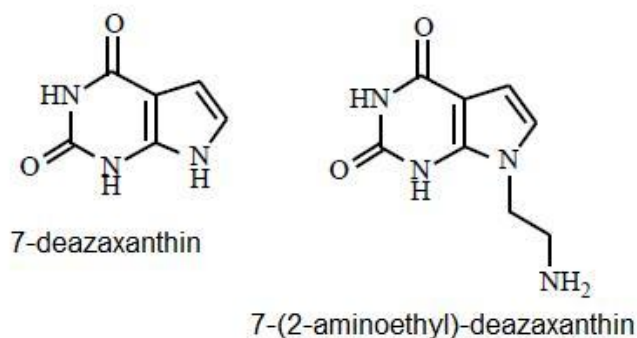


Obrázek č. 20: Potenciální inhibitory thymidin fosforylasy – sloučeniny odvozené od 2'-deoxyuridinu s různými substituenty v pozicích 3' a 5' deoxyribosové části 2'-deoxyuridinu. R udává substituenty, u jejichž sloučenin byl zkoumán vliv na katalytickou aktivitu thymidin fosforylasy. Převzato a upraveno z [21].

Mezi další inhibitory první generace patří i 5-jodouracil (5IUR) s hodnotou inhibiční konstanty $K_I = 0,48 \text{ mmol.dm}^{-3[9]}$.

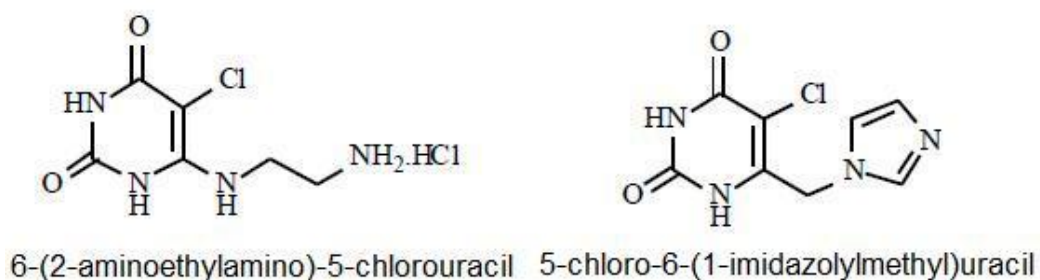
5.4.3.3 Inhibitory založené na 6-aminouracilu

Na základě rozřešení krystalové struktury pyrimidin nukleosid fosforylasy *E. coli* byly navrhnuty již zmíněné inhibitory první generace s aminoskupinou navázanou v pozici 6 pyrimidinového cyklu. Dále bylo cílem zaplnit prostor vedle Phe210 v hydrofobní kapse v aktivním místě enzymu (odpovídá aminokyselině Val241 u lidské thymidin fosforylasy) a dosáhnout tím dalších stabilizujících interakcí mezi enzymem a inhibitorem. Z tohoto důvodu byl k pyrimidinovému cyklu přidán další cyklus, čímž vznikly purinové deriváty jako například 7-deazaxanthin (7DX) a 7-(2-aminoethyl)-deazaxanthin^[44, 48] - viz. Obrázek č. 21 na následující straně.



Obrázek č. 21: Inhibitory thymidin fosforylasy založené na 6-aminouracilu: purinové deriváty – převzato a upraveno z [4].

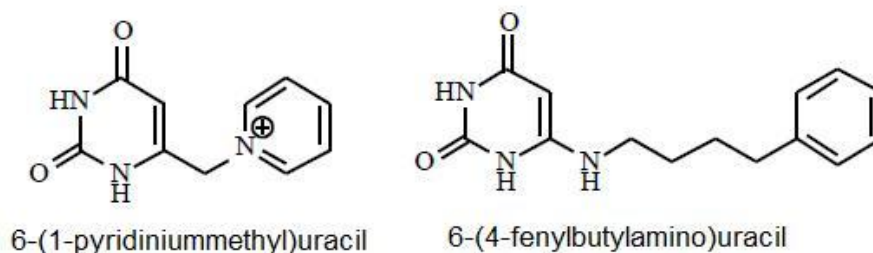
Hlavním důvodem vývoje nových inhibitorů na základě 6-aminouracilu byla snaha o zvýšení účinnosti těchto inhibitorů a zároveň zvýšení jejich rozpustnosti oproti inhibitorům první generace, jakým je například 6-amino-5-bromouracil. Jedním z takto vytvořených inhibitorů byl například 6-(2-aminoethylamino)-5-chlorouracil (AEAC), který je šedesátpětkrát účinnějším inhibitorem lidské thymidin fosforylasy než 6-amino-5-bromouracil. Obdobný 6-aminoethanol derivát nebyl jakožto inhibitor účinný, což poukazovalo na nutnost bazického substituentu v pozici 6 pyrimidinového cyklu. Mezi další takto vytvořené inhibitory patřil i 5-chloro-6-(1-imidazolymethyl)uracil (CIMU) – viz. Obrázek č. 22. Tento inhibitor však kromě thymidin fosforylasy inhiboval i uridin fosforylasu, což nebylo žádoucí^[49].



Obrázek č. 22: Inhibitory thymidin fosforylasy založené na 6-aminouracilu: bazické substituenty v pozici 6 pyrimidinového cyklu – převzato z [4].

Pro zlepšení rozpustnosti inhibitorů byly navrženy sloučeniny substituované pyrimidinem, přičemž navázání pyrimidinu přímo do pozice 6 pyrimidinového cyklu nebylo z hlediska inhibice thymidin fosforylasy účinné, zatímco navázání pyrimidinu do pozice 6 přes methylen dalo vzniknout inhibitorům se stejnou účinností jako u 6-amino-5-bromouracilu, jako například 6-(1-pyridiniummethyl)uracil. Dále byly připraveny 6-(fenylalkylamino) deriváty uracilu, jako například 6-(4-fenylbutylamino)uracil – viz.

Obrázek č. 23, který byl o něco účinnějším inhibítorem než 6-aminothymidin^[47, 50, 51]. U této skupiny inhibitorů byly účinnější sloučeniny bez substituentu v poloze 5 pyrimidinového cyklu, což se vymykalo obecnému chování inhibitorů thymidin fosforylasy.



Obrázek č. 23: Inhibitory thymidin fosforylasy založené na 6-aminouracilu: ve vodě rozpustné inhibitory – převzato z [4].

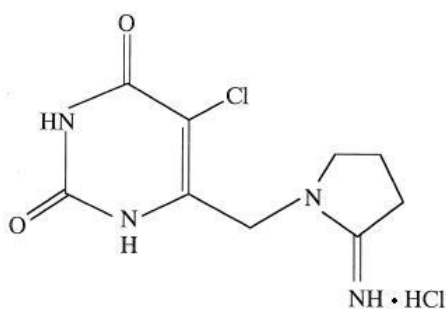
5.4.3.4 TPI a jeho analoga

Další velkou skupinou kompetitivních inhibitorů thymidin fosforylasy s poměrně vysokou inhibiční aktivitou tvoří deriváty 5-chlorouracilu substituované v pozici 6 pyrimidinového cyklu. Tyto sloučeniny inhibují thymidin fosforylasu výrazně lépe než například 6-amino-5-chlorouracil a zároveň inhibují uridin fosforylasu jen ve velmi malé míře^[21]. Podrobný výčet derivátů 5-chlorouracilu s různými substituenty v pozici 6 pyrimidinového cyklu s jednotlivými hodnotami IC_{50} pro thymidin i uridin fosforylasu je uveden v Tabulce č. 1.

Tabulka č. 1: Inhibitory thymidin fosforylasy – deriváty 5-chlorouracilu s různými substituenty v pozici 6 pyrimidinového cyklu, s udanými hodnotami IC_{50} pro thymidin i uridin fosforylasu. Převzato a upraveno z [21].

	R	Substituent	TPasa IC_{50} [mol.dm ⁻³]	UPasa IC_{50} [mol.dm ⁻³]
	-NH ₂	amin	1.5×10^{-5}	5.3×10^{-5}
		amidinothiomethyl hydrochlorid	3.5×10^{-7}	6.1×10^{-5}
		(1-methylguanidino)methyl hydrochlorid	8.7×10^{-8}	2.3×10^{-4}
		(1-pyrrolidinyl)methyl	2.2×10^{-6}	8.6×10^{-6}
		(1-pyrrolidinyl)ethyl	8.2×10^{-5}	ND†
		(2-imino-1-pyrrolidin-1-yl)methyl hydrochlorid	3.5×10^{-8}	$>1.0 \times 10^{-3}$

Za nejúčinnější inhibitor thymidin fosforylasy současnosti se považuje TPI (5-chloro-6-[1-(2-iminopyrrolidinyl)methyl]uracil hydrochlorid) – viz. Obrázek č. 24 – s hodnotami K_I přibližně 20nM, $IC_{50} = 35 \text{ nM}$ a $pK_A = 6,1$. TPI je tedy přibližně tisíckrát účinnější kompetitivní inhibitor než 6-amino-5-chlorouracil, a je zároveň velmi specifický vůči thymidin fosforylase aniž by inhiboval další enzymy metabolizující pyrimidiny jakými jsou uridin fosforylase, thymidin kinasa, orotát fosforibosyltransferasa nebo dihydropyrimidin dehydrogenasa^[21, 44, 52]. Při experimentech na myších postižených nádory s nadměrnou produkcí thymidin fosforylasy omezil dlouhodobě podávaný TPI velmi výrazně růst těchto tumorů, pravděpodobně z důvodu omezení angiogeneze v tumorech a zvýšení počtu buněk vykonávajících apoptózu^[2, 21, 52].

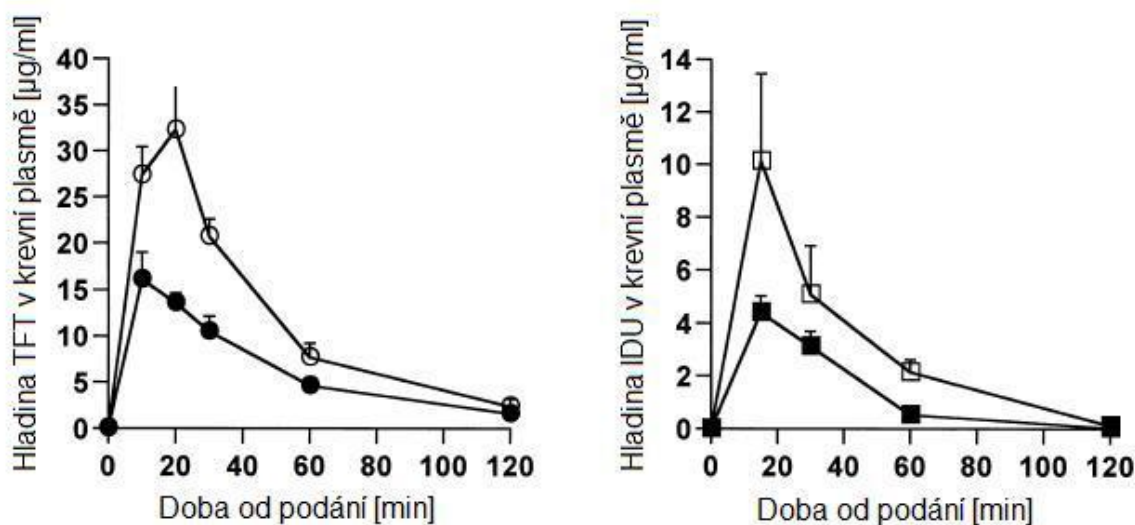


Obrázek č. 24: TPI = 5-chloro-6-[1-(2-iminopyrrolidinyl)methyl]uracil hydrochlorid, v současné době nejúčinnější inhibitor thymidin fosforylasy – převzato z [21].

Při navrhování TPI byl zkoumán vliv substituentu v pozici 5 pyrimidinového cyklu na inhibiční aktivitu dané sloučeniny vůči thymidin fosforylase. Kromě atomu chloru byly navrženy deriváty 6-[1-(2-iminopyrrolidinyl)methyl]uracil hydrochloridu i s jinými substituenty v pozici 5 pyrimidinového cyklu – konkrétně s bromem, jodem a methylovou skupinou. 6-[1-(2-iminopyrrolidinyl)methyl]uracil hydrochlorid substituovaný bromem nebo jodem v pozici 5 pyrimidinového cyklu vykazoval téměř stejnou inhibiční aktivitu vůči fosforylase jako TPI, pro tyto sloučeniny byla naměřena hodnota $IC_{50} = 3,0 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (pro TPI byla naměřena hodnota $IC_{50} = 3,5 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$). Naproti tomu 6-[1-(2-iminopyrrolidinyl)methyl]uracil hydrochlorid substituovaný methylovou skupinou v pozici 5 pyrimidinového cyklu vykazoval řádově nižší inhibiční aktivitu – byla pro něj naměřena hodnota $IC_{50} = 1,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ^[4, 21]. 6-[1-(2-iminopyrrolidinyl)methyl]uracil hydrochloridy substituované bromem nebo jodem by tedy mohly být stejně účinné a specifické inhibitory thymidin fosforylasy jako TPI, a derivát TPI s bromem nadto vykazoval stejně jako TPI příznivý farmakokinetický profil. Avšak syntéza 5-bromo-6-[1-(2-iminopyrrolidinyl)methyl]uracil hydrochloridu by byla natolik

náročná, že se od ní upustilo, a pouze TPI byl vybrán pro klinické testy jakožto potenciální protinádorové léčivo^[53].

TPI výrazně ovlivňuje osud chemoterapeutických léčiv na bázi nukleosidů, jakými jsou například IDU (5-jodo-2'-deoxyuridin) nebo TFT (trifluoro-2'-deoxythymidin), v těle, jelikož zabraňuje jejich degradaci thymidin fosforylasou. TPI byl původně vyvinut aby podpořil terapii pomocí TFT^[2, 4, 21]. Při podávání ekvimolární směsi (směs více sloučenin v molárním poměru 1:1) TPI a TFT, popřípadě IDU, myším a opicím orálně byla hladina uvedených chemoterapeutických léčiv v krevní plasmě po krátké době po podání výrazně vyšší oproti podávání samotného TFT, popřípadě IDU^[21] – viz. Obrázek č. 25.



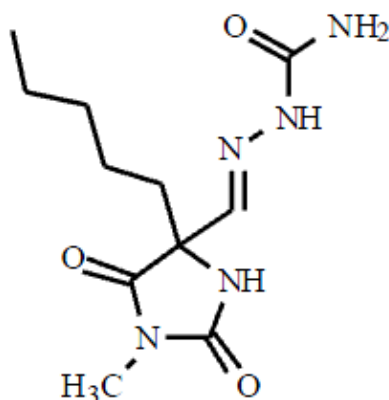
Obrázek č. 25: Časová závislost koncentrace 2'-deoxyribonukleosidů TFT (trifluoro-2'-deoxythymidin) a IDU (5-jodo-2'-deoxyuridin) v krevní plasmě myši v závislosti na době po orálním podání. ● a ■ značí podání samotného TFT, respektive IDU, v dávce 50 mg/kg; ○ a □ značí podání TFT, respektive IDU, spolu s TPI v molárním poměru 1:1. Hladiny TFT a IDU v krevní plasmě byly určeny podle postupu uvedeného v [21]. Uvedené hodnoty hladin 2'-deoxyribonukleosidů v krevní plasmě jsou aritmetické průměry (\pm směrodatná odchylka) z hodnot určených u šesti myši. Převzato a upraveno z [21].

Jelikož je mechanismus působení chemoterapeutických léčiv na bázi nukleosidů poměrně dlouhodobý, je vhodné, aby byla tato léčiva podávána opakovaně v delším časovém úseku namísto jednorázového nebo přerušovaného podávání. V současné době probíhá fáze I klinických testů kombinace TPI s TFT v molárním poměru 1:0,5 (nazývá se TAS-102), kterou je možné podávat orálně^[2, 4, 44].

TPI stejně jako thymin jsou jakožto inhibitory vázány v aktivním centru thymidin fosforylasy vodíkovými můstky k aminokyselinám Arg202, Ser217, Lys221, a His 116^[1, 2] – viz. Obrázky č. 10 na straně 25 a č. 11 na straně 27. TPI se do aktivního místa thymidin

fosforylasy váže jako "zwitterion", tedy obojetný ion - obsahuje kladně i záporně nabitě skupiny.

Na základě znalosti interakcí TPI s aktivním centrem thymidin fosforylasy byly navrženy další inhibitory jako například *N*-(2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydrothieno[3,2-*d*]pyrimidin-7-yl)guanidin - viz. Obrázek č. 26. Tento inhibitor, který jako jeden z mála inhibitorů thymidin fosforylasy není odvozen od uracilu, interagoval s aktivním centrem thymidin fosforylasy velmi podobně jako TPI, avšak měl mnohem nižší inhibiční aktivitu oproti TPI – byla pro něj naměřena hodnota $IC_{50} = 6,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ [4, 54].

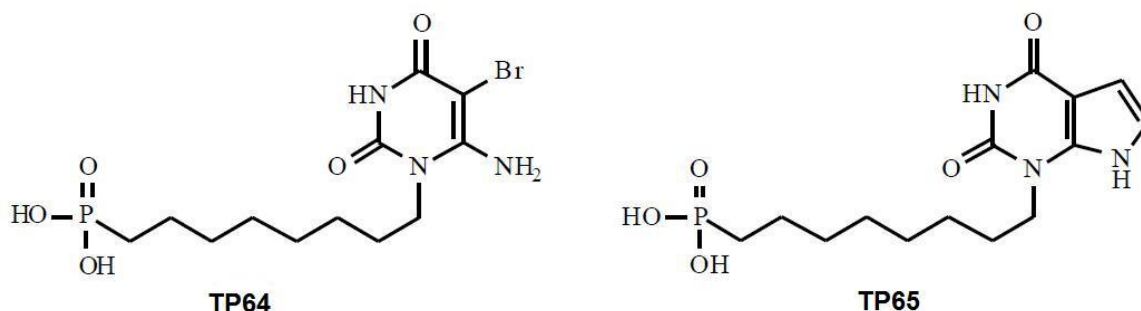


Obrázek č. 26: Inhibitor thymidin fosforylasy: *N*-(2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydrothieno[3,2-*d*]pyrimidin-7-yl)guanidin – převzato z [4].

5.4.3.5 Multisubstrátové inhibitory

Na základě otevřené konformace pyrimidin nukleosid fosforylasy *E. coli* byly navrženy tzv. multisubstrátové inhibitory vázající se do vazebného místa pro 2'-deoxythymidin i pro fosfát zároveň. Jelikož jsou od sebe vazebná místa pro substráty v otevřené konformaci vzdálená 8 až 10 Å, skládají se multisubstrátové inhibitory z pyrimidinové báze (nejčastěji thyminu) interagující s vazebným místem pro 2'-deoxythymidin, tak zvaného mezerníku ("spacer") tvořeného šesti až devíti atomy umožňujícího překonání vzdálenosti mezi vazebnými místy pro substráty, a fosfonovou skupinou interagující s vazebným místem pro fosfát^[55]. Záměnou pyrimidinové báze za 6-amino-5-bromouracil nebo 7-deazaxanthin byly vytvořeny ještě účinnější multisubstrátové inhibitory TP64 a TP65 (viz. Obrázek č. 27 na následující straně) s hodnotami IC_{50} přibližně $2,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pro TP64 a $8,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pro TP65. Další výhodou tohoto typu inhibitorů je jejich rozpustnost ve

vodě, která velmi usnadňuje jejich potenciální využití jakožto chemoterapeutických léčiv^[55].

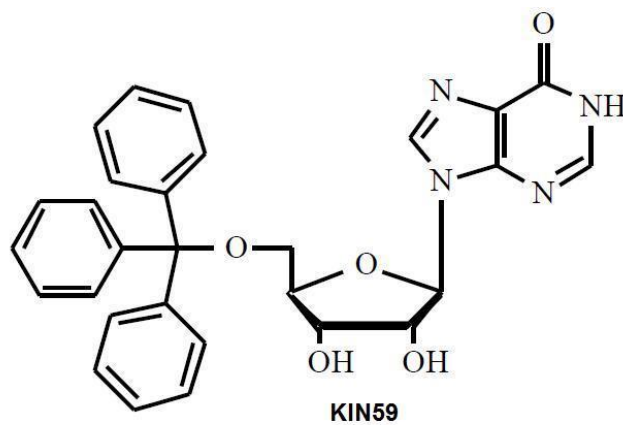
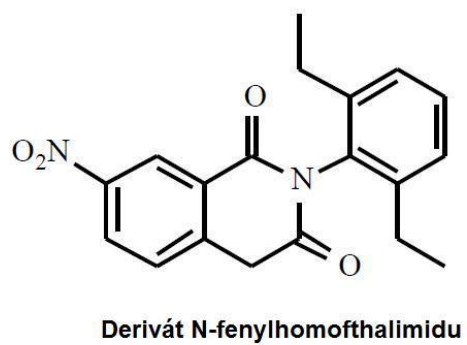


Obrázek č. 27: Multisubstrátové inhibitory thymidin fosforylasy – převzato a upraveno z [4].

5.4.3.6 Inhibitory interagující s enzymem mimo vazebné místo pro substrát

Většina dosud popsaných inhibitorů interaguje s vazebnými místy pro substráty a to zejména s vazebným místem pro 2'-deoxythymidin, a tedy (s výjimkou thyminu) inhibují thymidin fosforylasu kompetitivně. Byly však vyvinuty i sloučeniny inhibující thymidin fosforylasu nekompetitivně nebo smíšeně. Jedním druhem takovýchto inhibitorů jsou deriváty N-fenylhomofthalimidu (viz. Obrázek č. 28 na následující straně) s hodnotou $IC_{50} = 24,6 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, které vykazují smíšený typ kompetitivní inhibice a interagují tedy s thymidin fosforylasou minimálně na dvou místech, z čehož jedno je vazebné místo pro substrát (konkrétně 2'-deoxythymidin)^[56].

Nedávno byl navržen a popsán nový inhibitor thymidin fosforylasy, 5'-O-tritylinosin (KIN59 - viz. obrázek č. 28 na následující straně), tedy purin ribonukleosidový derivát, s hodnotou $IC_{50} = 6,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pro lidskou thymidin fosforylasu^[57]. Tento inhibitor byl navržen na strukturním základě 7-deazaxanthinu^[44, 58]. Narozdíl od všech již popsaných inhibitorů KIN59 neinteraguje ani s jedním vazebným místem pro substrát, ale inhibuje thymidin fosforylasu nekompetitivně. Thymidin fosforylasa tedy pravděpodobně obsahuje ještě další dosud neznámé vazebné místo, se kterým může KIN59 interagovat^[57].



Obrázek č. 28: Inhibitory thymidin fosforylasy interagující s enzymem mimo vazebné místo pro substrát– převzato a upraveno z [4].

7. Diskuse

Základem práce bylo získání a porovnání literárních, sekvenčních a strukturních dat o enzymu thymidin fosforylase s enzymovým číslem EC 2.4.2.4. dostupných v časopisech a databázích. Z porovnání pyrimidin nukleosid fosforylasy několika prokaryotních organismů s eukaryotními thymidin fosforylasami, včetně lidské, bylo zjištěno, že se tyto enzymy mírně liší v oblasti aktivního centra, což má pravděpodobně za následek rozdílnou substrátovou specifitu daných enzymů. Jednotlivé domény se v rámci těchto enzymů výrazně neliší a ve všech případech je pro průběh reakce nutný vznik aktivní uzavřené konformace.

Z hlediska porovnávání prokaryotických pyrimidin nukleosid fosforylas a několika struktur lidské thymidin fosforylasy se literární zdroje v některých ohledech mírně liší. Odlišnosti ve strukturních aspektech enzymů napříč prostudovanou literaturou jsou patrně dány převážně rozdílnými experimentálními podmínkami při krystalizaci daných enzymů a většinou nemají zásadní význam. Literární údaje se dále částečně liší v udávané specifitě enzymů, což však může být dáno zdrojovým organismem, čistotou získaného enzymu, purifikační metodou, nebo i otázkou terminologie. V této práci je tedy předkládán převládající názor, podle kterého má organismus *Escherichia coli* pouze prokaryotní pyrimidin nukleosid fosforylasu, a lidská thymidin fosforylasa není schopna katalyzovat reverzibilní fosforolýzu 2'-deoxyuridinu.

Pro průběh fosforolytické reakce katalyzované thymidin fosforylasou je nutné vytvoření tzv. uzavřené konformace způsobené přiblížením velké α/β -domény k malé α -helikální doméně. Vznik uzavřené konformace je důležitý z několika hledisek: vazebné místo pro fosfát leží na velké α/β -doméně zatímco vazebné místo pro 2'-deoxythymidin leží na malé α -doméně a tato vazebná místa jsou od sebe v otevřené, tedy neaktivní, konformaci vzdálená 8 až 10 Å. Tato vzdálenost je příliš velká pro vznik vazby mezi kyslíkem fosfátu a pozicí 3'-deoxyribosové části 2'-deoxythymidinu, ke které dochází při fosforolytické reakci. Substráty se tudíž k sobě musí přiblížit na vzdálenost dostatečnou pro vznik vazby, což umožňuje právě uzavření celé struktury thymidin fosforylasy. Uzavřením struktury dále vzniká kolem aktivního místa hydrofobní kapsa, která chrání substráty před hydrolyzou. Princip uzavřené (aktivní) konformace také vysvětluje uspořádaný následný mechanismus fosforolytické reakce katalyzované thymidin fosforylasou, který udává, že

fosfát je prvním substrátem navázaným do aktivního centra. Navázání fosfátu do aktivního místa enzymu totiž způsobuje jen částečné uzavření struktury a až následné navázání 2'-deoxythymidinu způsobuje úplné uzavření struktury. 2'-deoxythymidin tedy nemůže být prvním substrátem vázajícím se do aktivního místa enzymu, jelikož po jeho navázání už by byla thymidin fosforylasa ve zcela uzavřené konformaci a fosfát už by se ke svému vazebnému místu nedostal.

Z literárního přehledu dostupných informací o inhibici thymidin fosforylasy vyplynula řada obecných principů důležitých pro navrhování nových inhibitorů. Většina dosud navržených inhibitorů je strukturně odvozena od substrátu 2'-deoxythymidinu a jsou tedy deriváty pyrimidin 2'-deoxynukleosidů. Z hlediska pyrimidinové báze, která je přítomna u drtivé většiny inhibitorů thymidin fosforylasy, je zásadní zachovat oxoskupiny v pozicích 2 a 4 stejně jako azoskupiny v pozici 3 pyrimidinového cyklu nesubstituované, aby mohly správně interagovat s thymidin fosforylasou a účinně se vázat do aktivního centra. Naproti tomu substituce v pozici 5 pyrimidinového cyklu zejména atomem chloru nebo jiného halogenu výrazně zlepšuje interakci inhibitoru s enzymem a zvyšuje účinnost daného inhibitoru. Různorodost dnes známých inhibitorů thymidin fosforylasy spočívá zejména v substituentech v pozici 6 pyrimidinového cyklu. Substituenty v této pozici obecně také zlepšují interakci s aktivním centrem enzymu, ale závisí obzvláště na jejich chemické povaze jak bude výsledný inhibitor účinný vůči thymidin fosforylase, zda bude specifický jen vůči ní, nebo bude inhibovat zároveň i uridin fosforylasu nebo další enzymy účastnící se metabolismu nukleosidů, zda bude rozpustný ve vodě a tedy lépe využitelný pro terapeutické účely.

U inhibitorů odvozených od pyrimidin 2'-deoxynukleosidů se zachovanou deoxyribosovou složku je důležité ponechat tuto složku nezměněnou, jelikož hydroxylace v pozici 2' ribosového cyklu by ze sterických důvodů znemožnila navázání inhibitoru do aktivního místa enzymu, a substituce hydroxylových skupin v pozicích 3' a 5' způsobuje ztrátu inhibiční aktivity inhibitorů.

Mimo kompetitivní inhibitory vytvořené na základě znalosti aktivního centra thymidin fosforylasy může být pozornost v budoucnu dále zaměřena na nekompetitivní inhibitory vázající se do dosud neznámého vazebného místa enzymu. Identifikace a detailní prozkoumání struktury tohoto vazebného místa by mohlo přinést další možnosti pro vývoj nových nekompetitivních inhibitorů thymidin fosforylasy.

8. Závěr

V úvodní části této práce byly popsány vlastnosti thymidin fosforylasy a její funkce a význam v metabolismu. Dále byla podrobně rozebrána její role při tvorbě nových cév, která je z terapeutického hlediska zásadní. Thymidin fosforylasy byla porovnána z kinetického i strukturního hlediska s dalšími enzymy z rodiny pyrimidin nukleosid fosforylas se zaměřením na podobnost prokaryotické pyrimidin nukleosid fosforylasy a eukaryotických thymidin fosforylas včetně lidské. Porovnání těchto enzymů umožňuje určit, do jaké míry je možné znalosti struktury a interakcí prokaryotického enzymu aplikovat na eukaryotický, především lidský, enzym. Pozornost byla věnována zejména detailní struktuře aktivního centra thymidin fosforylasy a identifikaci klíčových aminokyselin zodpovědných za vazbu substrátu, stabilizaci tranzitního stavu a vazbu inhibitoru.

V druhé části této práce byla pozornost zaměřena na obecné principy inhibice a dále konkrétně na inhibici thymidin fosforylasy a její terapeutický význam. Byla popsána řada více či méně účinných inhibitorů thymidin fosforylasy včetně v dnešní době nejúčinnějšího inhibitoru, TPI, jehož kombinace s dalším chemoterapeutickým léčivem TFT nyní prochází první fází klinických testů jakožto potenciálně velmi specifické antiangiogenní a protinádorové léčivo.

Tato práce shrnující současný stav dané problematiky může být dobrým východiskem pro racionální navrhování specifických inhibitorů thymidin fosforylasy, které by byly potenciálně využitelné pro terapii nádorových a dalších onemocnění zahrnující psoriázu, atherosklerózu a revmatoidní artritidu.

9. Seznam použitých zkratek

- 2dDR ... 2-deoxy-D-ribosa
2dDR1P ... 2-deoxy-D-ribosa-1-fosfát
2dDR5P ... 2-deoxy-D-ribosa-5-fosfát
5IUR ... 5- jodouracil
6AT ... 6-aminothymin
6A5BU ... 6-amino-5-bromouracil
6A5CU ... 6-amino-5-chlorouracil
7DX ... deazaxanthin
AEAC ... 6-(2-aminoethylamino)-5-chlorouracil
BAU ... 5-benzylacyklouridin
BBAU ... 5'-benzyloxybenzylacyklouridin
BVDU ... (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridin neboli brivudin
CIMU ... 5-chloro-6-(1-imidazolylmethyl)uracil
DNA ... deoxyribonukleová kyselina
FDU ... 5-fluoro-2'-deoxyuridin
hTP ... lidská thymidin fosforylase
IC₅₀ ... koncentrace inhibitoru, při které je inhibováno 50 % aktivity enzymu
IDU ... 5-jodo-2'-deoxyuridin
IL-8 ... interleukin-8
K_I ... inhibiční konstanta ... disociační konstanta pro komplex EI ... $K_I = [E].[I]/[EI]$
K_m ... Michaelisova konstanta ... koncentrace substrátu, při které je reakční rychlost rovna polovině maximální rychlosti V_{max}
KIN59 ... 5'-O-tritylinosin
MMP-1 ... matrixmetaloproteináza-1
P, Pi ... fosfát
PD-ECGF ... endoteliální růstový faktor odvozený z krevních destiček
PDGF ... růstový faktor odvozený z krevních destiček
PyNP, PyNPasa ... pyrimidin nukleosid fosforylase
RMSD = root mean square deviation ... průměrná kvadratická odchylka
TAS-102 ... kombinace TPI s TFT v molárním poměru 1:0,5 ... léčivo ve fázi I klinických testů
TFT, F₃dThd ... trifluoro-2'-deoxythymidin (= 5-trifluoromethyl-2'-deoxyuridin)
TGF-β ... transformující růstový faktor β
TP, TPasa ... thymidin fosforylase
TP64 ... 8-(6-amino-5-bromo-2,4-dioxo-pyrimidin-1-yl)oktylfosfonová kyselina
TP65 ... [8-(2,4-dioxo-2,3,4,7-tetrahydro-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-1-yl)-oktyl]fosfonová kyselina
TPI ... 5-chloro-6-[1-(2-iminopyrrolidinyl)methyl]uracil hydrochlorid
UPasa ... uridin fosforylase
V_{max} ... maximální rychlost reakce
VEGF ... vaskulární endoteliální růstový faktor

10. Seznam použité literatury

- [1] Omari, K. E., Bronckaers, A., Liekens, S., Pérez-Pérez, M.-J., Balzarini, J., Stammers, D. K., *Structural basis for non-competitive product inhibition in human thymidine phosphorylase: implications for drug design*. *Biochemical Journal*, 2006. 399: 199-204.
- [2] Norman, R. A., Barry, S. T., Bate, M., Breed, J., Colls, J. G., Ernill, R. J., Luke, R. W. A., Minshull, C. A., McAlister, M. S. B., McCall, E. J., McMiken, H. H. J., Paterson, D. G., Timms, D., Tucker, J. A., Pauptit, R. A., *Crystal structure of human thymidine phosphorylase in complex with a small molecule inhibitor*. *Structure*, 2004. 12: 75-84.
- [3] Han, H. S., Hwang, T. S., *Angiogenesis in gastric cancer: Importance of the thymidine phosphorylase expression of cancer cells as an angiogenic factor*. *Oncology Reports*, 2007. 17: 61-65.
- [4] Pérez-Pérez, M.-J., Priego, E.-M., Hernández, A.-I., Camarasa, M.-J., Balzarini, J., Liekens, S., *Thymidine phosphorylase inhibitors: recent developments and potential therapeutic applications*. *Mini-Reviews in Medicinal chemistry*, 2005. 5: 1113-1123.
- [5] Takeuchi, M., Otsuka, T., Matsui, N., Asai, K., Hirano, T., Moriyama, A., Isobe, I., Eksioglu, Y. Z., Matsukawa, K., Kato, T., *Aberrant production of gliostatin/platelet-derived endothelial cell growth factor in rheumatoid synovium*. *Arthritis & Rheumatism*, 1994. 37: 662-672.
- [6] Creamer, D., Jaggar, R., Allen, M., Bicknell, R., Barker, J., *Overexpression of the angiogenic factor platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase in psoriatic epidermis*. *British Journal of Dermatology*, 1997. 137: 851-855.
- [7] Ignatescu, M. C., Gharehbaghi-Schnell, E., Hassan, A., Rezaie-Majd, S., Korschineck, I., Schleef, R. R., Glogar, H. D., Lang, I. M., *Expression of the angiogenic protein, platelet-derived endothelial cell growth factor, in coronary atherosclerotic plaques: in vivo correlation of lesional microvessel density and constrictive vascular remodeling*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1999. 19: 2340-2347.
- [8] Brown, N. S., Bicknell, R., *Thymidine phosphorylase, 2-deoxy-D-ribose and angiogenesis*. *Biochemical Journal*, 1998. 334: 1-8.
- [9] Mitsiki, E., Papageorgiou, A. C., Iyer, S., Thiyagarajan, N., Prior, S. H., Sleep, D., Finnis, C., Acharya, K. R., *Structures of native human thymidine phosphorylase and in complex with 5-iodouracil*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009. 386: 666-670.
- [10] Miyazono, K., Okabe, T., Urabe, A., Takaku, F., Heldin, C. H., *Purification and properties of an endothelial cell growth factor from human platelets*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1987. 262: 4098-4103.
- [11] Asai, K., Nakanishi, K., Isobe, I., Eksioglu, Y. Z., Hirano, A., Hama, K., Miyamoto, T., Kato, T., *Neurotrophic action of gliostatin on cortical neurons. Identity of gliostatin and platelet-derived endothelial cell growth factor*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1992. 267: 20311-20316.
- [12] Pugmire, M. J., Ealick, S. E., *The crystal structure of pyrimidine nucleoside phosphorylase in a closed conformation*. *Structure*, 1998. 6: 1467-1479.

- [13] Krenitsky, T. A., Tuttle, J. V., *Correlation of substrate-stabilization patterns with proposed mechanisms for three nucleoside phosphorylases*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1982. 703: 247-249.
- [14] Krenitsky, T. A., *Pentosyl transfer mechanism of the mammalian nucleoside phosphorylases*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1968. 243: 2871-2875.
- [15] Schwartz, M., *Thymidine phosphorylase from Escherichia coli – Properties and kinetics*. *European Journal of Biochemistry (dnes FEBS)*, 1971. 21: 191-198.
- [16] Miyadera, K., Sumizawa, T., Haraguchi, M., Yoshida, H., Konstanty, W., Yamada, Y., Akiyama, S., *Role of thymidine phosphorylase activity in the angiogenic effect of platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase*. *Cancer Research*, 1995. 55: 1687-1690.
- [17] Moghaddam, A., Zhang, H.-T., Fan, T.-P., Hu, D.-E., Lees, V. C., Turley, H., Fox, S. B., Gatter, K. C., Harris, A. L., Bicknell, R., *Thymidine phosphorylase is angiogenic and promotes tumor growth*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995. 92: 998-1002.
- [18] Sumizawa, T., Furukawa, T., Haraguchi, M., Yoshimura, A., Takeyasu, A., Ishizawa, M., Yamada, Y., Akiyama, S., *Thymidine phosphorylase activity associated with the platelet-derived endothelial cell growth factor*. *The Journal of Biochemistry*, 1993. 114: 9-14.
- [19] Sengupta, S., Sellers, L. A., Matheson, H. B., Fan, T. P. D., *Thymidine phosphorylase induces angiogenesis in vivo and in vitro: an evaluation of possible mechanisms*. *British Journal of Pharmacology*, 2003. 139: 219-231.
- [20] Brown, N. S., Jones, A., Fujiyama, C., Harris, A. L., Bicknell, R., *Thymidine phosphorylase induces carcinoma cell oxidative stress and promotes secretion of angiogenic factor*. *Cancer Research*, 2000. 60: 6298-6302.
- [21] Fukushima, M., Suzuki, N., Emura, T., Yano, S., Kazuno, H., Tada, Y., Yamada, Y., Asao, T., *Structure and activity of specific inhibitors of thymidine phosphorylase to potentiate the function of antitumor 2'-deoxyribonucleosides*. *Biochemical Pharmacology*, 2000. 59: 1227-1236.
- [22] Sekvence pyrimidin nukleosid fosforylasy organismu *Escherichia coli* z databáze enzymů BRENDA, získána dne 18. 1. 2010:
<http://www.brenda-enzymes.org/index.php4?page=sequences/seq.php4?AC=Q8XB35>.
- [23] Sekvence pyrimidin nukleosid fosforylasy organismu *Salmonella enterica* z databáze enzymů BRENDA, získána dne 18. 1. 2010:
<http://www.brenda-enzymes.org/index.php4?page=sequences/seq.php4?AC=B5Q315>.
- [24] Sekvence thymidin fosforylasy organismu *Homo sapiens* z databáze enzymů BRENDA, získána dne 18. 1. 2010:
<http://www.brenda-enzymes.org/index.php4?page=sequences/seq.php4?AC=P19971>.
- [25] Sekvence thymidin fosforylasy organismu *Rattus norvegicus* z databáze enzymů BRENDA, získána dne 18. 1. 2010:
<http://www.brenda-enzymes.org/index.php4?page=sequences/seq.php4?AC=Q5FVR2>.

- [26] Sekvence thymidin fosforylasy organismu *Mus musculus* z databáze enzymů BRENDA, získána dne 18. 1. 2010:
<http://www.brenda-enzymes.org/index.php4?page=sequences/seq.php4?AC=Q99N42>.
- [27] Sekvence pyrimidin nukleosid fosforylasy organismu *Escherichia coli* z databáze proteinových struktur PDB, získána dne 29. 4. 2020:
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1OTP>.
- [28] Sekvence pyrimidin nukleosid fosforylasy organismu *Staphylococcus aureus* z databáze proteinových struktur PDB, získána dne 29. 4. 2020:
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3H5Q>.
- [29] Sekvence lidské thymidin fosforylasy z databáze proteinových struktur PDB, získána dne 29. 4. 2020: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1UOU>.
- [30] Sekvence pyrimidin nukleosid fosforylasy organismu *Escherichia coli* z databáze enzymů BRENDA, získána dne 18. 1. 2010:
<http://www.brenda-enzymes.org/index.php4?page=sequences/seq.php4?AC=P07650>.
- [31] Walter, M. R., Cook, W. J., Cole, L. B., Short, S. A., Koszalka, G. W., Krenitsky, T. A., Ealick, S. E., *Three-dimensional structure of thymidine phosphorylase from Escherichia coli at 2.8 Å resolution*. The Journal of Biological Chemistry, 1990. 265: 14016-14022.
- [32] Pugmire, M. J., Cook, W. J., Jasanoff, A., Walter, M. R., Ealick, S. E., *Structural and theoretical studies suggest domain movement produces an active conformation of thymidin phosphorylase*. Journal of Molecular Biology, 1998. 281: 285-299.
- [33] Sekvence lidské thymidin fosforylasy z databáze proteinových struktur PDB, získána dne 29. 4. 2020: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2JOF>.
- [34] Sekvence pyrimidin nukleosid fosforylasy organismu *Escherichia coli* z databáze proteinových struktur PDB, získána dne 29. 4. 2020:
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2TPT>.
- [35] Desgranges, C., Razaka, G., Rabaud, M., Bricaud, H., *Catabolism of thymidine in human blood platelets purification and properties of thymidine phosphorylase*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA), 1981. 654: 211-218.
- [36] Kraut, A., Yamada, E. W., *Cytoplasmatic uridine phosphorylase of rat liver*. The Journal of Biological Chemistry, 1971. 246: 2021-2030.
- [37] Balzarini, J., Sienaert, R., Liekens, S., Van Kuilenburg, A., Carangio, A., Esnouf, R., De Clercq, E., McGuigan, C., *Lack of susceptibility of bicyclic nucleoside analogs, highly potent inhibitors of varicella-zoster virus, to the catabolic action of thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase*. Molecular Pharmacology, 2002. 61: 1140-1145.
- [38] Asai, K., Hirano, T., Kaneko, S., Moriyama, A., Nakanishi, K., Isobe, I., Eksioglu, Y. Z., Kato, T., *A novel glial growth inhibitory factor, gliostatin, derived from neurofibroma*. Journal of Neurochemistry, 1992. 59: 307-317.
- [39] Patterson, A. V., Zhang, H.-T., Moghaddam, A., Bicknell, R., Talbot, D. C., Stratford, I. J., Harris, A. L., *Increased sensitivity to the prodrug 5'-deoxy-5-fluorouridine and modulation of 5-*

flouro-2'-deoxyuridine sensitivity in MCF-7 cells transfected with pyrimidine phosphorylase. British Journal of Cancer, 1995. 72: 669-675.

[40] Miwa, M., Ura, M., Nishida, M., Sawada, N., Ishikawa, T., Mori, K., Shimma, N., Umeda, I., Ishitsuka, H., *Design of a novel oral flouropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates 5-fluorouracil selectively in tumors by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue*. European Journal of Cancer, 1998. 34: 1274-1281.

[41] Voet, D., Voet, J. G. (z angličtiny přeložil Arnošt Kotyk a kolektiv), *Mechanismy působení enzymů*, v knize Biochemie. Victoria Publishing, Praha, 1995. 345-432.

[42] Kolektiv pracovníků katedry biochemie (Hudeček, J., Tichá, M., Barthová, M., Stiborová, M., Krajhanzl, A., Sofrová, D., Entlicher, G., Hladík, J., Novák, F.), *Enzymy*, v knize Biochemie - základní kurz. Univerzita Karlova v Praze, Praha, 1999. 38-60.

[43] Iltzch, M. H., el Kouni, M. H., Cha, S., *Kinetic studies of thymidine phosphorylase from mouse liver*. Biochemistry, 1985. 24: 6799-6807.

[44] Akaiyama, S., Furukawa, T., Sumizawa, T., Takebayashi, Y., Nakajima, Y., Shimaoka, S., Haraguchi, M., *The role of thymidine phosphorylase, an angiogenic enzyme, in tumor progression*. Cancer Science, 2004. 95: 851-857.

[45] Niedzwicki, J. G., Chu, S. H., el Kouni, M. H., Rowe, E. C., Sungman, C., *5-benzylacyclouridine and 5-benzoyloxybenzylacyclouridine, potent inhibitors of uridine phosphorylase*. Biochemical Pharmacology, 1982. 31: 1857-1861.

[46] Langen, P., Etzold, G., Bärwolff, D., Preussel, B., *Inhibition of thymidine phosphorylase by 6-aminothymine and derivatives of 6-aminouracil*. Biochemical Pharmacology, 1967. 16: 1833-1837.

[47] Baker, B. R., Kelley, J. L., *Irreversible enzyme inhibitors. 188. Inhibition of mammalian thymidine phosphorylase*. Journal of Medicinal Chemistry, 1971. 14: 812-816.

[48] Balzarini, J., Gamboa, A. E., Esnouf, R., Liekens, S., Neyts, J., De Clercq, E., Camarasa, M. J., Pérez-Pérez, M.-J., *7-deazaxanthine, a novel prototype inhibitor of thymidine phosphorylase*. FEBS Letters, 1998. 438: 91-95.

[49] Klein, R. S., Lenzi, M., Lim, T. H., Hotchkiss, K. A., Wilson, P., Schwartz, E. L., *Novel 6-substituted uracil analogs as inhibitors of the angiogenic actions of thymidine phosphorylase*. Biochemical Pharmacology, 2001. 62: 1257-1263.

[50] Murray, P. E., McNally, V. A., Lockyer, S. D., Williams, K. J., Stratford, I. J., Jaffar, M., Freeman, M., *Synthesis and enzymatic evaluation of pyridinium-substituted uracil derivatives as novel inhibitors of thymidine phosphorylase*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2002. 10: 525-530.

[51] Focher, F., Ubiali, D., Pregnotato, M., Zhi, C. X., Gambino, J., Wright, G. E., Spadari, S., *Novel nonsubstrate inhibitors of human thymidine phosphorylase, a potential target for tumor-dependent angiogenesis*. Journal of Medicinal Chemistry, 2000. 43: 2601-2607.

[52] Matsushita, S., Nitanda, T., Furukawa, T., Sumizawa, T., Tani, A., Nishimoto, K., Akiba, S., Miyadera, K., Fukushima, M., Yamada, Y., Yoshida, H., Kanzaki, T., Akiyama, S., *The effect of a thymidine phosphorylase inhibitor on angiogenesis and apoptosis in tumors*. Cancer Research, 1999. 59: 1911-1916.

- [53] Yano, S., Kazuno, H., Sato, T., Suzuki, N., Emura, T., Wierzba, K., Yamashita, J., Tada, Y., Yamada, Y., Fukushima, M., Asao, T., *Synthesis and evaluation of 6-methylene-bridged uracil derivatives. Part 2: Optimization of inhibitors of human thymidine phosphorylase and their selectivity with uridine phosphorylase*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2004. 12: 3443-3450.
- [54] Price, M. L. P., Guida, W. C., Jackson, T. E., Nydick, J. A., Gladstone, P. L., Juarez, J. C., Donate, F., Ternansky, R. J., *Design of novel N-(2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-thieno[3,2-d]pyrimidin-7-yl)-guanidines as human thymidine phosphorylase inhibitors, and flexible docking to a homology model*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2003. 13: 107-110.
- [55] Gamboa, A. E., Balzarini, J., Esnouf, R., De Clercq, E., Camarasa, M. J., Pérez-Pérez, M.-J., *Design, synthesis, and enzymatic evaluation of multisubstrate analogue inhibitors of Escherichia coli thymidine phosphorylase*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2000. 43: 971-983.
- [56] Kita, T., Takahashi, H., Hashimoto, Y., *Thymidine phosphorylase inhibitors with a homophthalimide skeleton*. *Biological & Pharmacological Bulletin*, 2001. 24: 860-862.
- [57] Liekens, S., Hernández, A. I., Ribatti, D., De Clercq, E., Camarasa, M. J., Pérez-Pérez, M. J., *The nucleoside derivative 5'-O-trityl-inosine (KIN59) suppresses thymidine phosphorylase-triggered angiogenesis via a noncompetetive mechanism of action*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2004. 279: 29598-29605.
- [58] Liekens, S., Bronckaers, A., Hernández, A.-I., Priego, E.-M., Casanova, E., Camarasa, M.-J., Pérez-Pérez, M.-J., Balzarini, J., *5'-O-tritylated nucleoside derivatives: inhibition of thymidine phosphorylase and angiogenesis*. *Molecular Pharmacology*, 2006. 70: 501-509.

