

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální biologicko-chemické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Anna Soldánová

Strukturní biologie enzymů metabolizujících merkaptopurin
Structural biology of the enzymes involved in mercaptopurine metabolism

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Pavlína Maloy Řezáčová, Ph.D.

Konzultant: Ing. Aleš Hnízda, Ph.D.

Praha 2016

Prohlášení:

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

V Praze, 16. 8. 2016

Podpis:

Anna Soldánová

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala školitelce RNDr. Pavlíně Maloy Řezáčové, Ph.D. za vlídný přístup, odborné vedení práce a její zaštitění a konzultantovi Ing. Aleši Hnízdovi, Ph.D. za velkou trpělivost a vstřícnost, četné připomínky a doporučení a především ochotnou pomoc, kdykoliv se vyskytl nějaký problém při psaní i v laboratoři. Dále bych chtěla poděkovat celému pracovišti Strukturní biologie na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i. za vytvoření příjemného pracovního prostředí a zejména Ing. Ireně Sieglové za jazykovou korekturu a laskavé rady při práci v laboratoři. V neposlední řadě bych také chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu během studia, a to zejména babičce Jarmile Soldánové a příteli Ing. Pavlu Švecovi, kteří mi byli po celou dobu největší oporou.

Abstrakt

Merkaptopurin (6-merkaptopurin) patří společně s příbuznými látkami azathioprinem a 6-thioguaninem mezi široce používaná chemoterapeutika a imunosupresiva. Během terapie thiopurinovými léčivy se mohou u pacientů objevit závažné nežádoucí účinky, jako například myelosuprese, nebo snížená terapeutická účinnost podávaného léčiva. Rozvoj metod sekvenace DNA a RNA umožňuje rozpoznat některé z příčin zmíněných problémů – různé genetické varianty enzymů účastnících se metabolismu fyziologických purinů a thiopurinových léčiv. Některé známé varianty těchto enzymů zásadním způsobem ovlivňují koncentraci cytotoxických forem thiopurinů, které mají dopad na úspěšnost a snášenlivost terapie.

V současnosti je popsáno několik mutantních variant genů enzymů metabolizujících thiopurinové deriváty, ale molekulární mechanismy vlivu těchto mutací nejsou dosud dostatečně prostudovány. Znalost trojrozměrné struktury těchto enzymů může objasnit projevy dané genetické varianty na úrovni proteinu a její efekt na biologickou aktivitu thiopurinů.

Tato práce se zaměřuje zejména na biochemicko-strukturní popis thiopurin-S-methyltransferasy, fosfatasy NUDT15 a cytosolické 5'-nukleotidasy II. Shrnuje problematiku s důrazem na význam strukturní biologie v interpretaci úlohy mutantních variant těchto enzymů v metabolismu thiopurinových léčiv.

Klíčová slova: merkaptopurin, deriváty thiopurinu, chemoterapeutika, strukturní biologie, farmakogenetika, farmakogenomika.

Abstract

Mercaptopurine (6-mercaptopurine) together with azathioprine and 6-thioguanine belong to a group of widely used chemotherapeutics and immunosuppressants. However, insufficient therapy outcome or severe adverse effects such as myelosuppression are still being reported. Technological progress in DNA and RNA sequencing facilitates effective identification of causative genes responsible for the therapy failure, i.e., description of genetic variants for enzymes involved in metabolism of physiological purines as well as thiopurine drugs. Variants of these enzymes may substantially alter concentrations of cytotoxic forms of thiopurines, which affect therapy success rates.

Currently, a number of mutations in genes that play role in thiopurine metabolism have been annotated. Nevertheless, molecular mechanisms underlying the effect of these mutations are not fully elucidated. Knowledge of 3D structure for these enzymes may shed light on the effect of the genetic variants to protein function and mechanisms modulating therapeutic efficacy of thiopurines.

This thesis focuses mainly on biochemical and structural characterization of thiopurine-S-methyltransferase, fosphatase NUDT15 and cytosolic 5'-nucleotidase II. It summarizes current state of knowledge and emphasizes the importance of structural biology methods for explaining the role of mutant variants in thiopurine metabolism.

Key words: mercaptopurine, thiopurine derivatives, chemotherapeutics, structural biology, pharmacogenetics, pharmacogenomics.

Seznam zkratek

<i>Zkratka</i>	<i>Význam anglicky</i>	<i>Význam česky</i>
5'-NT	5'-Nucleotidase	5'-Nukleotidasa
6-MeMP	S ⁶ -Methylmercaptapurine	S ⁶ -Methylmerkaptopurin
6-MeTG	S ⁶ -Methylthioguanine	S ⁶ -Methylthioguanin
6-MP	6-Mercaptopurine	6-Merkaptopurin
6-TG	6-Thioguanine	6-Thioguanin
6-TGN	6-Thioguanine nucleotides	6-Thioguaninové nukleotidy
6-TUA	6-Thiouric acid	6-Thiomočová kyselina
6-TX	6-Thioxanthine	6-Thioxanthin
8-OH-dGDP	8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine 5'-diphosphate	8-Hydroxy-2'-deoxyguanosin 5'-difosfát
8-OH-dGMP	8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine 5'-monophosphate	8-Hydroxy-2'-deoxyguanosin 5'-monofosfát
8-OH-dGTP	8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate	8-Hydroxy-2'-deoxyguanosin 5'-trifosfát
8-OH-TG	8-Hydroxy-6-thioguanine	8-Hydroxy-6-thioguanin
ADA	Adenosine deaminase	Adenosin deaminasa
AdK	Adenosine kinase	Adenosin kinasa
ADP	Adenosine 5'-diphosphate	Adenosin 5'-difosfát
AK	Adenylate kinase	Adenylát kinasa
ALL	Acute lymphoblastic leukemia	Akutní lymfoblastická leukemie
AML	Acute myeloid leukemia	Akutní myeloidní leukemie
AMP	Adenosine 5'-monophosphate	Adenosin 5'-monofosfát
AO	Aldehyde oxidase	Aldehyd oxidasa
APRT	Adenine phosphoribosyltransferase	Adenin fosforibosyltransferasa
ATP	Adenosine 5'-triphosphate	Adenosin 5'-trifosfát
AZA	Azathioprine	Azathioprin
c.XXX	Mutation XXX in coding (complementary) DNA	Mutace XXX v kódující (komplementární) DNA
cdN	Cytosolic 5'(3')-deoxyribonucleotidase	Cytosolická 5'(3')-deoxyribonukleotidasa
cDNA	Complementary DNA	Komplementární DNA

cN-II (I, III)	Cytosolic 5'-nucleotidase II (I, III)	Cytosolická 5'-nukleotidasa II (I, III)
dADP	2'-Deoxyadenosine 5'-diphosphate	2'-Deoxyadenosin 5'-difosfát
dAMP	2'-Deoxyadenosine 5'-monophosphate	2'-Deoxyadenosin 5'-monofosfát
dATP	2'-Deoxyadenosine 5'-triphosphate	2'-Deoxyadenosin 5'-trifosfát
dGDP	2'-Deoxyguanosine 5'-diphosphate	2'-Deoxyguanosin 5'-difosfát
dGK	2'-Deoxyguanosine kinase	2'-Deoxyguanosin kinasa
dGMP	2'-Deoxyguanosine 5'-monophosphate	2'-Deoxyguanosin 5'-monofosfát
dGTP	2'-Deoxyguanosine 5'-triphosphate	2'-Deoxyguanosin 5'-trifosfát
DNA	2'-Deoxyribonucleic acid	2'-Deoxyribonukleová kyselina
GDP	Guanosine 5'-diphosphate	Guanosin 5'-difosfát
GMP	Guanosine 5'-monophosphate	Guanosin 5'-monofosfát
GMPS	GMP synthase	GMP synthasa
GTP	Guanosine 5'-triphosphate	Guanosin 5'-trifosfát
GST	Glutathion-S-transferase	Glutathion-S-transferasa
GUA	Guanine deaminase	Guanin deaminasa
GUK	Guanylate kinase	Guanylát kinasa
HAD	Haloacid dehalogenase	Dehalogenasa halogenových kyselin
HGPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	Hypoxanthin-guanin fosforibosyltransferasa
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration	Poloviční inhibiční koncentrace
IMP	Inosine 5'-monophosphate	Inosin 5'-monofosfát
IMPDH	Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase	Inosin 5'-monofosfát dehydrogenasa
mdN	Mitochondrial 5'(3')-deoxyribonucleotidase	Mitochondriální 5'(3')-deoxyribonukleotidasa
MeTIMP	S ⁶ -Methylthioinosine 5'-monophosphate	S ⁶ -Methylthioinosin 5'-monofosfát
MeTGMP	S ⁶ -Methylthioguanosine 5'-monophosphate	S ⁶ -Methylthioguanosin 5'-monofosfát
mRNA	Messenger RNA	Mediátorová („messengerová“) RNA

MTH2 (1, 3)	MutT homologue 2 (1, 3)	MutT homolog 2 (1, 3)
MutT	Treffers' mutator (protein)	Treffersův mutační protein
NDPK	Nucleoside 5'-diphosphate kinase	Nukleosid 5'-difosfát kinasa
NMP	Nucleoside 5'-monophosphate	Nukleosid 5'-monofosfát
NUDIX (hydrolasa)	Nucleosid 5'-diphosphate-linked moiety X (hydrolase)	Hydrolasa nukleosid 5'-difosfátu spojeného se skupinou X
NUDT15 (1, 5, 17, 18)	NUDIX-type motif 15 (1, 5, 17, 18)	Motiv typu NUDIX 15 (1, 5, 17, 18)
p.XXX	Mutation XXX in protein sequence	Mutace XXX v proteinové sekvenci
PNP	Purine nucleoside phosphorylase	Fosforylaza purinových nukleosidů
PRPP	5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphate	5-Fosforibosyl-1-pyrofosfát
RNA	Ribonucleic acid	Ribonukleová kyselina
RR	Ribonucleotide reductase	Ribonucleotid reduktasa
rs číslo	Reference SNP cluster ID	Identifikační číslo SNP
SAH	S-Adenosyl-L-homocysteine	S-Adenosyl-L-homocystein
SAM	S-Adenosyl-L-methionine	S-Adenosyl-L-methionin
SNP	Single nucleotide polymorphism	Jednonukleotidový polymorfismus
SÚKL	State Institute for Drug Control	Státní ústav pro kontrolu léčiv
TdGDP	6-Thio-2'-deoxyguanosine 5'-diphosphate	6-Thio-2'-deoxyguanosin 5'-difosfát
TdGTP	6-Thio-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate	6-Thio-2'-deoxyguanosin 5'-trifosfát
TGDP	6-Thioguanosine 5'-diphosphate	6-Thioguanosin 5'-difosfát
TGMP	6-Thioguanosine 5'-monophosphate	6-Thioguanosin 5'-monofosfát
TGTP	6-Thioguanosine 5'-triphosphate	6-Thioguanosin 5'-trifosfát
THF	Tetrahydrofolate	Tetrahydrofolát
TIMP	6-Thioinosine 5'-monophosphate	6-Thioinosin 5'-monofosfát
TPMT	Thiopurine-S-methyltransferase	Thiopurin-S-methyltransferasa
TXMP	6-Thioxanthosine 5'-monophosphate	6-Thioxanthosin 5'-monofosfát
XMP	Xanthosine 5'-monophosphate	Xanthosin 5'-monofosfát
XO	Xanthine oxidase	Xanthin oxidasa

Obsah

1 Úvod.....	1
2 Metabolismus purinových nukleotidů.....	3
2.1 <i>De novo</i> syntéza.....	3
2.2 Recyklační dráha („salvage pathway“).....	5
2.3 Degradace	6
3 Thiopurinová léčiva.....	7
3.1 Terapeuticky využívaná thiopurinová léčiva.....	7
4 Metabolismus a mechanismus účinku thiopurinových léčiv.....	8
5 Vybrané enzymy spojené s poruchami metabolismu thiopurinových léčiv.....	11
5.1 Thiopurin-S-methyltransferasa (EC 2.1.1.67)	11
5.2 Fosfatasa NUDT15/MutT homolog 2 (EC 3.6.1.55).....	18
5.3 Cytosolická 5'-nukleotidasa II (EC 3.1.3.5)	23
6 Závěr.....	31
7 Literatura	33

1 Úvod

Léčiva odvozená od thiopurinu, 6-merkaptopurin (6-MP), 6-thioguanin (6-TG) a azathioprin (AZA), jsou v současnosti využívána v terapiích široké řady onemocnění. První klinické studie 6-MP (Burchenal *et al.*) byly uskutečněny již roku 1953. Dnes mají tato farmaka zásadní uplatnění při léčbě leukemie, idiopatických střevních zánětů a dalších imunitních či zánětlivých chorob nebo také jako imunosupresiva podávaná pacientům po transplantaci orgánů.

Deriváty thiopurinu cílí na enzymy fyziologického purinového metabolismu a syntézu nukleových kyselin. V genech pro tyto enzymy byly nalezeny jednonukleotidové polymorfismy („single nucleotide polymorfism“, SNP), které mohou vést k zásadním změnám ve struktuře proteinu, a tím i ve fungování enzymu. Změněná aktivita některých mutantních variant enzymů pak ovlivňuje metabolismus léčiva do takové míry, že terapie nemusí být dostatečně efektivní nebo naopak může pacientův život ohrozit vedlejšími účinky. Mezi závažné komplikace popsané v souvislosti s užíváním thiopurinů patří žloutenka (v důsledku hepatotoxicity) a potlačení krvetvorné funkce kostní dřeně (Einhorn a Davidsohn, 1964; Connell *et al.*, 1993).

Podstatné zlepšení účinnosti a bezpečnosti terapie díky získaným výsledkům farmakogenetických studií je dobře ilustrováno na příkladu thiopurin-S-methyltransferasy (TPMT). Polymorfismy pro TPMT a jejich vliv na metabolismus thiopurinových analog je nejprostudovanějším tématem v této oblasti. Nositelé alel kódujících defektní varianty tohoto proteinu jsou během léčby 6-MP a příbuznými látkami ohroženi pancytopenií (poklesem počtu všech typů krevních buněk) a dalšími nežádoucími účinky (Evans *et al.*, 1991). Při léčbě thiopurinovými deriváty je dnes již běžnou praxí personalizace dávkování či případně úplné vyloučení léčby na základě předchozí genotypizace TPMT u pacienta (Relling *et al.*, 2011).

Rychlý vývoj sekvenčních technik a rozšíření celogenomového a celoexomového sekvenování přispěly k objevu mutací i v dalších genech kódujících enzymy purinového metabolismu, které významně ovlivňují osud 6-MP v těle nemocného a úspěšnost léčby daného jedince. Tyto mutace byly identifikovány například v genech kódujících fosfatasu NUDT15 či cytosolickou 5'-nukleotidasu II (cN-II) – (Meyer *et al.*, 2013; Tzoneva *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014).

Pro pochopení interakcí mezi příslušnými enzymy a metabolity léčiv a pro porozumění vlivu mutací je důležité studium prostorové struktury proteinů. Na základě znalosti trojrozměrné struktury daných enzymů lze vyvodit, jakým mechanismem jednotlivé genetické varianty ovlivňují metabolismus 6-MP a jeho derivátů. Informace o prostorové struktuře tak mohou

poskytnout cenné podklady pro lepší užívání již zavedených léčiv i pro návrh nových farmak, například s vyšší účinností či nižším množstvím vedlejších účinků.

Cílem práce je shrnutí dosavadních poznatků o metabolismu 6-MP a dalších thiopurinových léčiv. Důraz je v této rešerši kladen zejména na využití informací o prostorovém uspořádání proteinu jako prostředku pro porozumění efektu mutantních variant na strukturu a funkci enzymů thiopurinového metabolismu.

2 Metabolismus purinových nukleotidů

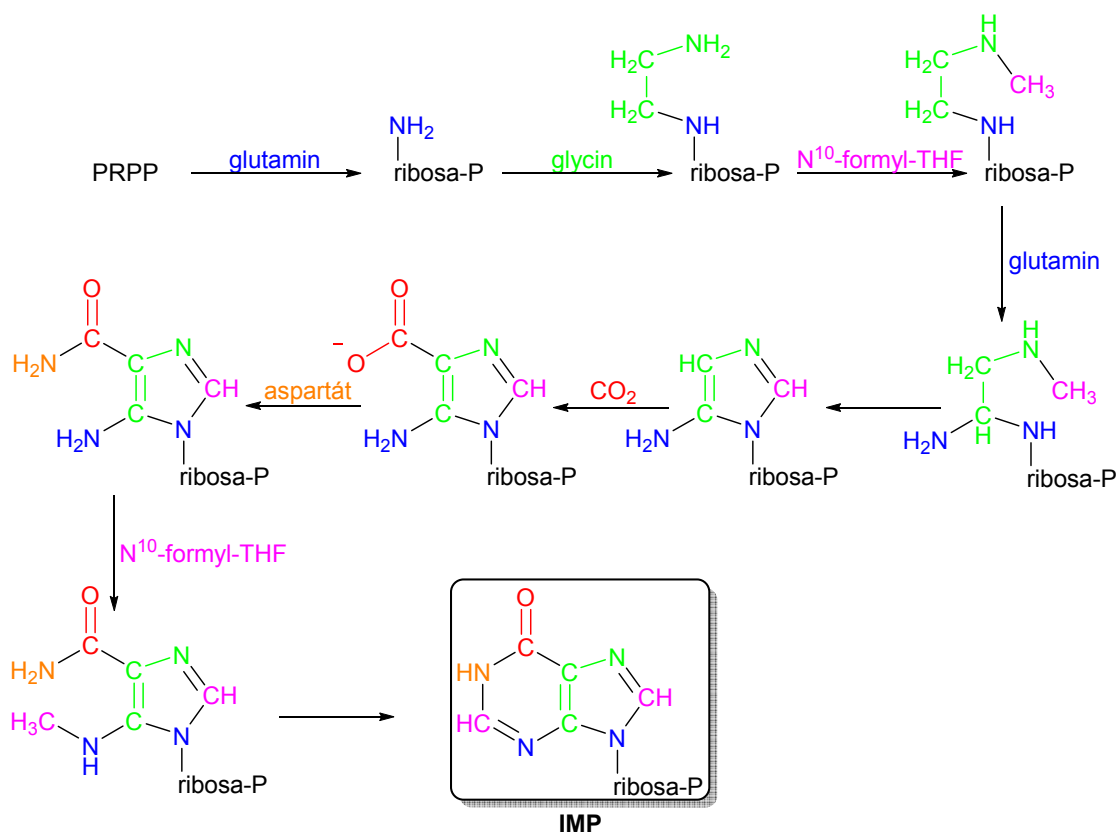
Terapeutický účinek všech tří používaných derivátů thiopurinu (6-MP, 6-TG a AZA) závisí na jejich intracelulární přeměně na biologicky aktivní formy – thiopurinové nukleotidy. Tyto reakce zprostředkovávají enzymy metabolismu fyziologických purinových nukleotidů. Vzniklé thiopurinové sloučeniny pak fungují jako antimetabolity těchto enzymů.

Metabolismus nukleotidů jakožto základních stavebních jednotek DNA, RNA a řady kofaktorů patří mezi nejdůležitější procesy v lidském těle. Zahrnuje dráhy jak anabolické (*de novo* syntéza), tak katabolické (degradace). Protože je syntéza *de novo* energeticky poměrně náročná (shrnutí v: Lane a Fan, 2015), využívají organismy také tzv. „salvage pathway“ neboli recyklační dráhu, kdy dochází k využití meziproductů degradačních reakcí pro resyntézu potřebných nukleotidů.

2.1 *De novo* syntéza

Úvodním krokem syntézy nového nukleotidu je vznik aktivované formy ribosy 5-fosfátu. Produktem této reakce je 5-fosforibosyl-1-pyrofosfát (PRPP), který slouží jako základ celého budoucího nukleotidu a probíhá na něm postupné skládání jednotlivých částí nukleobase (Obrázek 1). K výstavbě purinového kruhu jsou využívány části metabolitů z různých drah v organismu. Nejvíce jsou v purinu zastoupeny atomy pocházející z aminokyselin (glutaminu, glycinu a aspartátu) a dále z formylového zbytku z N¹⁰-formyl-tetrahydrofolátu. Karbonylová skupina pochází z molekuly CO₂ (HCO₃⁻ ve vodném prostředí v těle). Celého procesu se účastní celkem sedm enzymů, které katalyzují jedenáct reakcí. Na tyto reakce je spotřebována energie v podobě sedmi ekvivalentů ATP. Závěrečným produktem *de novo* syntézy je inosin 5'-monofosfát (IMP) – (Obrázek 1; shrnutí v: Hartman a Buchanan, 1959; Lane a Fan, 2015).

Vzniklý IMP je pak klíčovým meziproductem společným pro recyklační dráhy a *de novo* syntézu, zároveň jsou z něj syntetizovány všechny formy purinových nukleotidů (Obrázek 2; shrnutí v: Hartman a Buchanan, 1959; Lane a Fan, 2015).



Obrázek 1: Zjednodušené schéma de novo syntézy purinové base s vyznačením původu jednotlivých atomů.

Na aktivované formě ribosy (PRPP) dochází k postupné výstavbě purinové base z různých metabolitů běžně se vyskytujících v těle. Ke skládání jednotlivých částí dochází v následujícím pořadí: jako první je na PRPP připojena amidová skupina glutaminu, pak část molekuly glycinu, formylový zbytek z N¹⁰-formyl-THF, amidová skupina glutaminu, následuje cyklizace pětičlenného kruhu, poté je začleněn CO₂, aminoskupina aspartátu, formylový zbytek z N¹⁰-formyl-THF a po cyklizaci šestičlenného kruhu vzniká IMP. Vysvětlivky zkratk: IMP – inosin 5'-monofosfát; PRPP – 5-fosforibosyl-1-pyrofosfát; N¹⁰-formyl-THF – N¹⁰-formyltetrahydrofolát. Schéma bylo vytvořeno v programu ChemBioDraw Ultra 14.0 (Cambridge Soft, Cambridge, MA, USA).

fosforylaci adenosin kinasou za vzniku AMP a dAMP a obdobně je fosforylován i 2'-deoxyguanosin na dGMP 2'-deoxyguanosin kinasou. Poněkud složitější je využití nukleosidů guanosinu a inosinu v lidských a jiných živočišných buňkách. Důvodem je absence příslušných kinas, které by jim umožňovaly vytvořit odpovídající nukleosid 5'-monofosfáty (NMP). Recyklace pak probíhá prostřednictvím přeměny katalyzované fosforylasou purinových nukleosidů (PNP), a to na volnou nukleobasi, která je následně fosforibosylována HGPRT (shrnutí v: Nyhan, 2001; Lane a Fan, 2015). Chybějící kinasy fosforylující guanosin a inosin pravděpodobně může také nahrazovat fosfotransferasová aktivita cN-II a podílet se tak na regulaci hladiny jednotlivých nukleotidů v buňce (Barsotti *et al.*, 2005; Obrázek 2).

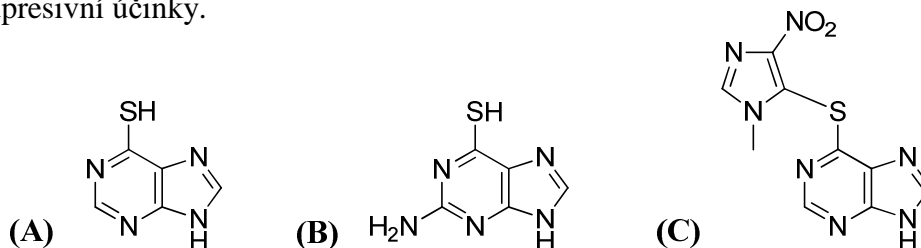
2.3 Degradace

První možností degradace adenosinových nukleotidů AMP a dAMP je defosforylace nukleotidasou, konkrétně cytosolickou nukleotidasou I (cN-I). Aminokupina takto vytvořeného adenosinu či 2'-deoxyadenosinu je odštěpena enzymem adenosin deaminasou (ADA) za vzniku inosinu. Druhou možností degradace AMP a dAMP je reakce katalyzovaná AMP deaminasou, kdy dochází k deaminaci AMP na IMP a následnému odstranění 5'-fosfátové skupiny pomocí cN-II. Z takto vzniklého inosinu PNP odštěpí molekulu ribosy a xanthin oxidasa (XO) vzápětí oxiduje hypoxanthin nejprve na xanthin a poté na kyselinu močovou (Obrázek 2; shrnutí v: Fox, 1981).

Katabolismus guanosinových nukleotidů GMP a dGMP stejně jako u AMP a dAMP začíná odštěpením koncového 5'-fosfátu prostřednictvím cN-II. Z uvolněného nukleosidu je enzymem PNP odstraněna ribosa. Po reakci katalyzované guanin deaminasou vzniká xanthin, který je XO oxidován na kyselinu močovou. Kyselina močová je u člověka a dalších vyšších primátů konečným produktem degradace purinových nukleotidů a je z těla vylučována močí (shrnutí v: Fox, 1981; Obrázek 2). Přestože je kyselina močová primárně odpadním produktem metabolismu purinů, je jí v lidském organismu také připisována role důležitého antioxidantu (Ames *et al.*, 1981).

3 Thiopurinová léčiva

Purinové sloučeniny s volnou či chráněnou sulfhydrylovou funkční skupinou, 6-MP, 6-TG a AZA (Obrázek 3), jsou do těla přijímány jako neaktivní prekursory (thiopurinové base), které jsou teprve uvnitř buňky metabolizovány na své biologicky aktivní formy - thiopurinové nukleotidy. Výsledné thiopurinové nukleotidy vykazují silně cytostatické, antineoplastické a imunosupresivní účinky.



Obrázek 3: Chemická struktura používaných thiopurinových léčiv.

(A) 6-merkaptopurin (9H-purin-6-thiol); (B) 6-thioguanin (2-amino-9H-purin-6-thiol); (C) azathioprin (6-((1-methyl-4-nitro-1H-imidazol-5-yl)thio)-9H-purin). Chemické struktury byly vytvořeny v programu ChemBioDraw Ultra 14.0 (Cambridge Soft, Cambridge, MA, USA).

3.1 Terapeuticky využívaná thiopurinová léčiva

V České republice je 6-MP (Obrázek 3A) součástí dvou léčivých přípravků – Xaluprine[®] (registrační číslo EU/1/11/727/001) ve formě suspenze a Puri-Nethol[®] (kód SÚKL 0136446, registrace v režimu specifického léčebného programu) v podobě tablet. Používají se k navození remise a v rámci udržovací terapie během léčby akutní lymfoblastické leukemie (ALL) a akutní myeloidní leukemie (AML) – (Státní ústav pro kontrolu léčiv, 2016).

6-TG (Obrázek 3B) je u nás prodáván jako léčivo Lanvis[®] (registrační číslo 44/022/75-S/C). Rovněž se používá k léčbě ALL a AML a dále také při terapii chronické myeloidní leukemie (CML) – (Státní ústav pro kontrolu léčiv, 2016).

AZA (Obrázek 3C) je v České republice k dostání v těchto přípravcích: Azathioprin Medac[®] (registrační číslo 59/242/13-C), Azathioprin Pharma Resources[®] (registrační číslo 59/243/13-C), Imasup[®] (registrační číslo 59/500/15-C) a Imuran[®] (registrační číslo 59/188/70-A/C a 59/188/70-B/C). Nejširší uplatnění nachází AZA v léčbě autoimunitních onemocnění a dalších onemocnění imunitního charakteru, dále také jako součást prevence odmítnutí alogenních transplantátů srdce, plic, jater, ledvin a slinivky. Proti imunitním chorobám, jako jsou Crohnova choroba a ulcerózní kolitida, systémový lupus erythematoses, chronická aktivní autoimunitní hepatitida a další, se užívá nejčastěji společně s kortikosteroidy, je ale předepisován i samostatně (Státní ústav pro kontrolu léčiv, 2016).

4 Metabolismus a mechanismus účinku thiopurinových léčiv

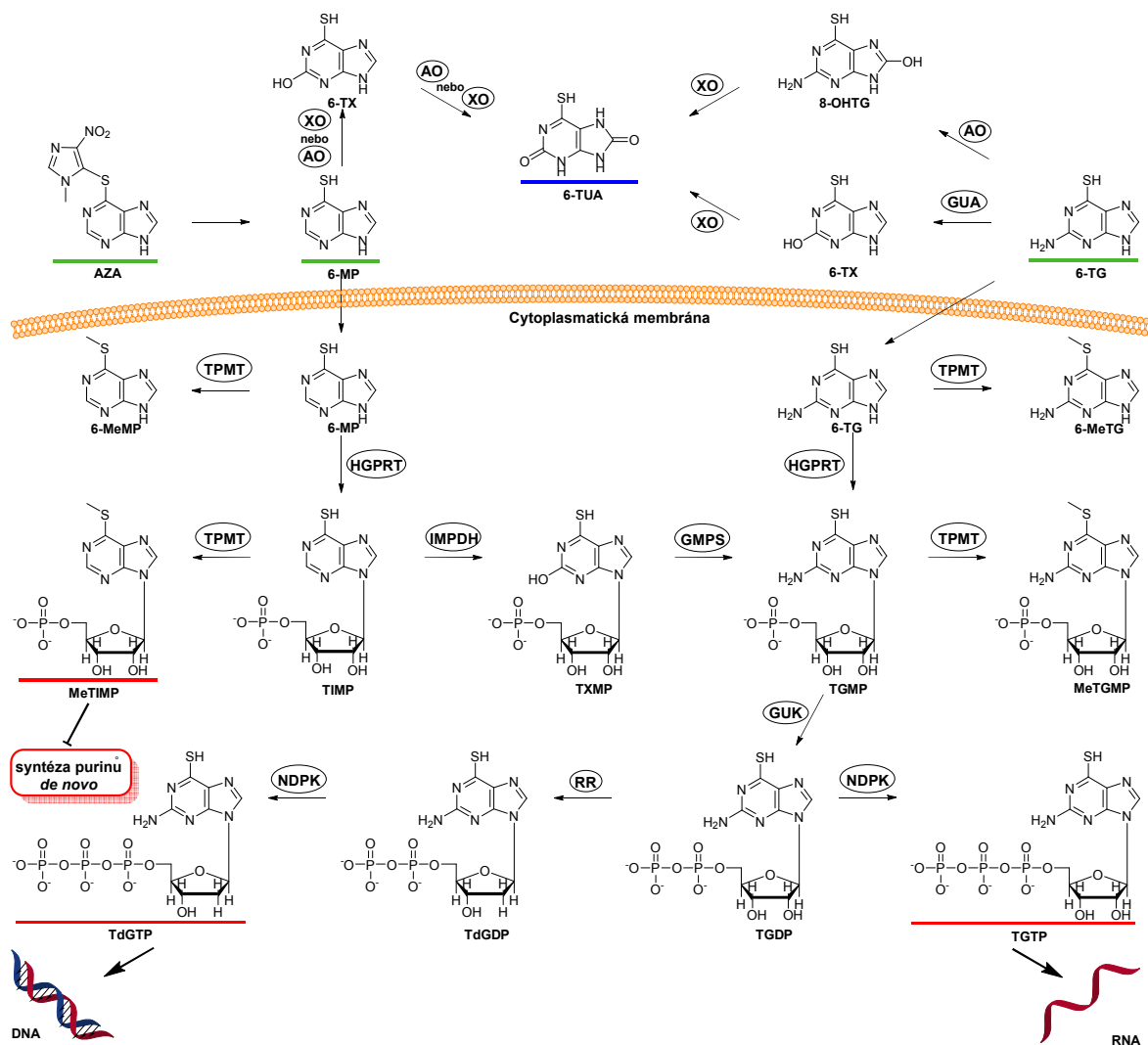
Předpokládá se, že cytotoxický účinek metabolitů 6-MP je zprostředkován třemi základními mechanismy: inhibicí syntézy purinů *de novo*, začleněním do DNA (indukce mutací nestandardním párováním basí) a začleněním do RNA (chyby v translaci proteinů) – (shrnutí v: Sahasranaman *et al.*, 2008). Tyto abnormality pak zastavují buněčnou proliferaci a mohou spustit obranné mechanismy, které končí apoptózou či jiným typem programované buněčné smrti (shrnutí v: Sahasranaman *et al.*, 2008). Jelikož se buňky po expozici thiopurinům ještě jednou až dvakrát rozdělí, označuje se toxicita způsobená včleňováním thiopurinových nukleotidů do nukleových kyselin jako tzv. zpožděná toxicita (Tidd a Paterson, 1974). Nedávné studie naznačují, že další z možných cytotoxických efektů thiopurinů může být zprostředkován oxidačním stresem způsobeným reaktivními formami kyslíku (Al Maruf *et al.*, 2014; shrnutí v: Pelin *et al.*, 2016).

Mechanismus účinku i metabolické dráhy jsou pro 6-MP, 6-TG i AZA v podstatě společné (Obrázek 4). AZA je proléčivem 6-MP a musí být v těle nejprve přeměněn na 6-MP odstraněním 1-methyl-4-nitroimidazol-5-ylové skupiny. Některé zdroje (Bresnick, 1959 v: Mitra a Narurkar, 1986) uvádí mechanismus přeměny jako neenzymatický. Toto tvrzení je podloženo výsledky pokusu, v němž byla pozorována přeměna AZA v jaterním homogenátu v nativních i různých denaturačních podmínkách (např. po zahřátí vzorku na 100 °C či přidání kyseliny trichloroctové). Další výzkum ukázal, že k reakci dochází za účasti cysteinu, glutathionu a dalších molekul s volnou sulfhydrylovou skupinou (Chalmers, 1974). Později však bylo popsáno, že AZA může být metabolizován *in vitro* pomocí glutathion-S-transferasy (GST) – (Watanabe *et al.*, 1978). Další enzymologické studie naznačují, že v cytosolu hepatocytů, kde z velké části aktivace AZA probíhá a kde je přirozeně vysoká koncentrace GST, by tento thiopurin mohl být aktivován prostřednictvím několika isoform GST (Eklund *et al.*, 2006). I přes výše uvedené poznatky tak není stále zcela jasné, jak přesně k transformaci AZA na 6-MP dochází.

Zpracování 6-MP a 6-TG může v těle probíhat třemi základními cestami – aktivující fosforibosylací či deaktivující oxidací nebo methylovací (Obrázek 4). Aktivace probíhá prostřednictvím HGPRT, klíčového enzymu v recyklační dráze purinů. Thiopuriny jsou tak fosforibosylací převedeny na nukleosid 5'-monofosfáty. Vzniklý 6-thio-NMP může být dále fosforylován či methylován. Methylování 6-thioinosin 5'-monofosfátu (TIMP) za vzniku S⁶-methylthioinosin 5'-monofosfátu (MeTIMP) patří mezi důležité děje metabolismu

thiopurinů. Bylo prokázáno, že MeTIMP blokuje *de novo* syntézu purinů inhibicí glutamin 5-fosforibosyl-1-pyrofosfát amidotransferasy (Tay *et al.*, 1969). TIMP může být také IMP dehydrogenasou (IMPDH) přeměněn na 6-thio-XMP a následně GMP synthasou na 6-thio-GMP. Fosforylací kinasami a případnou redukcí ribonukleotid reduktasou (RR) se pak tvoří tzv. 6-thioguaninové nukleotidy (6-TGN). Ty hrají důležitou roli v hlavním předpokládaném mechanismu cytotoxického působení, při němž je 6-thio-dGTP využíván DNA polymerasou při replikaci a v dalším kole replikace může vyvolat mutace způsobené chybným párováním basí (Warren *et al.*, 1995). Z toho důvodu se popsáný cytotoxický účinek projevuje zejména v prolifерujících buňkách, ve kterých je DNA rychleji replikována. Swann *et al.* (1996) na základě výzkumu prováděného na CHO a HeLa buňkách tvrdí, že 6-TGN mohou být v DNA dále methylovány S-adenosyl-L-methioninem (SAM) a následně indukovat chybné párování basí obdobně jako 6-TGN nemethylované. Jelikož ze studií replikace *in vitro* vyplývá, že frekvence zařazení chybné base naproti nemethylovaným 6-TGN není příliš vysoká (Rappaport, 1993), Swann *et al.* (1996) konstatují, že by methylace thiopurinových basí v DNA mohla indukci špatného párování ještě zvýšit. Chyby v párování basí způsobené inkorporací a případně dodatečnou methylací 6-TGN jsou pak rozpoznávány v rámci postreplikačního opravného mechanismu, kdy se buňka snaží opravit chybné úseky ve vláknech DNA rekombinací se sesterskou chromatidou (shrnuto v: Jiricny, 2013). Místo opravy ale v případě chyb indukovaných vlivem 6-TGN dochází během rekombinace pravděpodobně k ještě větší akumulaci chyb a následné smrti buňky. Výsledný cytotoxický efekt léčivé látky je zpožděný (Swann *et al.*, 1996).

Paralelně s reakcemi, které thiopurinová léčiva aktivují, probíhají procesy vedoucí zpravidla naopak k jejich deaktivaci. K deaktivaci může docházet methylací pomocí TPMT nebo oxidací enzymem XO, respektive aldehyd oxidasou (AO) či guanin deaminasou. Zatímco methylace probíhá intracelulárně, oxidační procesy jsou naproti tomu zejména extracelulární (shrnuto v: Sahasranaman *et al.*, 2008; Fotoohi *et al.*, 2010). Majoritním konečným produktem degradačních reakcí thiopurinů je pak kyselina 6-thiomočová, která je z těla vyloučena močí (Hamilton a Elion, 1954; Li Loo *et al.*, 1959; Obrázek 4).



Obrázek 4: Schéma hlavních drah metabolismu 6-MP a dalších thiopurinových léčiv.

Thiopurinové deriváty (podtrženy zeleně) jsou v těle zpracovávány třemi základními způsoby – fosforibosylací, kdy vznikají aktivní metabolity (thiopurinové nukleotidy; podtrženy červeně), nebo methylací a oxidací, které naopak thiopuriny deaktivují. S⁶-Methylthioinosin 5'-monofosfát představuje výjimku, kdy methylovaný metabolit je biologicky aktivní a blokuje *de novo* syntézu purinových nukleotidů. 6-Thio-2'-deoxyguanosin 5'-trifosfát je inkorporován do DNA a 6-thioguanosin 5'-trifosfát do RNA. Kyselina 6-thiomočová je jako konečný produkt degradace exkretována močí (podtržena modře). Vysvětlivky zkratk: 6-MeMP – S⁶-methylmercaptapurin; 6-MP – 6-merkaptopurin; 6-MeTG – S⁶-methylthioguanin; 6-TG – 6-thioguanin; 6-TUA – kyselina 6-thiomočová; 6-TX – 6-thioxanthin; 8-OHTG – 8-hydroxy-6-thioguanin; AO – aldehyd oxidasa; AZA – azathioprin; GUA – guanin deaminasa; GUK – guanylát kinasa; GMPS – GMP synthasa; HGPRT – hypoxanthin-guanin fosforibosyltransferasa; IMPDH – IMP dehydrogenasa; MeTGMP – S⁶-methylthioguanosin 5'-monofosfát; MeTIMP – S⁶-methylthioinosin 5'-monofosfát; NDPK – nukleosid 5'-difosfát kinasa; RR – ribonukleotid reduktasa; TdGDP – 6-thio-2'-deoxyguanosin 5'-difosfát; TdGTP – 6-thio-2'-deoxyguanosin 5'-trifosfát; TGDP – 6-thioguanosin 5'-difosfát; TGMP – 6-thioguanosin 5'-monofosfát; TGTP – 6-thioguanosin 5'-trifosfát; TIMP – 6-thioinosin 5'-monofosfát; TPMT – thiopurin-S-methyltransferasa; TXMP – 6-thioxanthosin 5'-monofosfát; XO – xanthin oxidasa. Obrázek byl připraven v programu ChemBioDraw Ultra 14.0 (Cambridge Soft, Cambridge, MA, USA) na základě Aarbakke *et al.* (1997); McLeod *et al.* (2000); Rashidi *et al.* (2007); Fotoohi *et al.* (2010); Choughule *et al.* (2014).

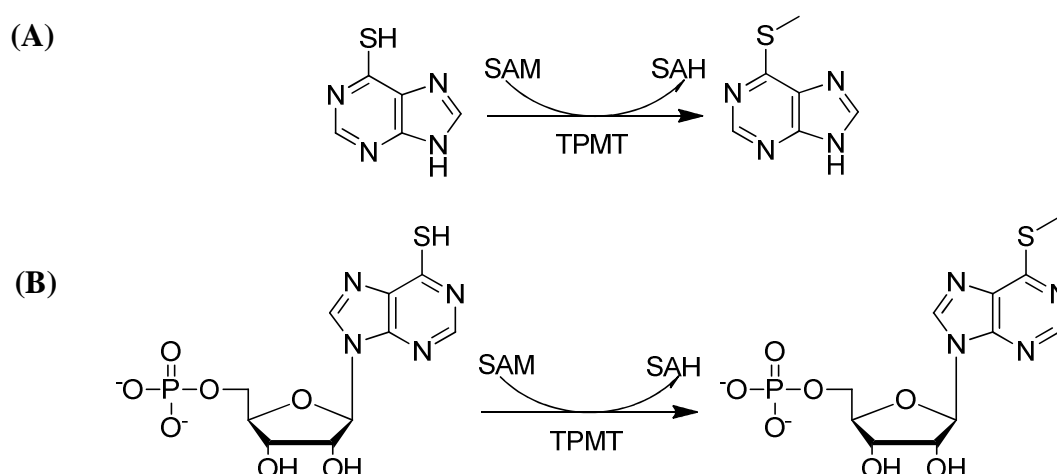
5 Vybrané enzymy spojené s poruchami metabolismu thiopurinových léčiv

Již v začátcích používání 6-MP v klinické praxi byly pozorovány občasné případy lékové toxicity, která se projevovala například žloutenkou, leukocytopenií nebo vředy ve střevech (Burchenal *et al.*, 1953; Clark *et al.*, 1960). Tyto vedlejší účinky byly poprvé spojeny s konkrétní příčinou v roce 1987. Tehdy byla objevena souvislost mezi nízkou aktivitou TPMT a vysokou koncentrací 6-TGN (Lennard *et al.*), jejíž vyšší hodnoty byly už dříve spojovány s rozvojem myelosuprese (Lennard *et al.*, 1983). Postupující vývoj sekvenování značně zjednodušil a urychlil hledání příčin komplikací thiopurinové terapie. Genetické varianty TPMT jsou v současné době detailně popsány a v bělošské a černošské populaci jsou pravděpodobně nejčastější příčinou nežádoucích účinků v průběhu thiopurinové léčby (Almoguera *et al.*, 2014). V asijské populaci se však deficitní varianty TPMT vyskytují minimálně. Významným objevem pro léčbu asijských pacientů je tak nedávná identifikace mutantních forem NUDT15 fosfatasy, které způsobují intoleranci k thiopurinovým farmakům (Yang *et al.*, 2015; Moriyama *et al.*, 2016). Varianty TPMT i NUDT15 představují vrozený činitel, který může negativně ovlivnit výsledek thiopurinové terapie, a genotypizace NUDT15 se může v budoucnu stát důležitým prvkem v personalizaci terapie, jako je tomu v současnosti u TPMT. Dalším zajímavým a důležitým faktorem v prognóze pacientů je gen pro enzym cN-II. Mutace v něm vznikají somaticky během léčby a jsou příčinou lékové rezistence při relapsech ALL (Meyer *et al.*, 2013; Tzoneva *et al.*, 2013). Výše uvedené enzymy nejsou jedinými, které mohou významně ovlivňovat výsledek terapie. Mezi další enzymy studované v souvislosti s thiopurinovým metabolismem patří inosin 5'-trifosfát pyrofosfatasa (Tanaka *et al.*, 2012; Wan Rosalina *et al.*, 2012), AO nebo XO (Smith *et al.*, 2009). Největší klinický dopad v thiopurinových terapiích však mají enzymy TPMT, NUDT15 a cN-II, a proto budou v následujícím textu blíže rozebrány.

5.1 Thiopurin-S-methyltransferasa (EC 2.1.1.67)

TPMT je cytosolický enzym, který katalyzuje přenos methylové skupiny z donorové molekuly SAM na atom síry různých thiopurinových metabolitů (Obrázek 5), a tím ovlivňuje jejich biologickou aktivitu (volné methylované thiopurinové metabolity jsou s výjimkou MeTIMP neúčinné). První zmínka o tomto proteinu pochází z práce o transmethylační aktivitě v savčích tkáních (Remy, 1963). Obdobnou methylační aktivitu poté popsali Zimmerman *et al.* (1974)

ve vzorcích lidské krve a kostní dřeně. Později byla vyvinuta i radiochemická metoda umožňující sledovat aktivitu TPMT (Weinshilboum *et al.*, 1978).



Obrázek 5: Příklad methylace thiopurinových metabolitů TPMT za účasti SAM.

(A) Methylace 6-MP za vzniku neaktivního 6-MeMP; (B) methylace TIMP vedoucí k tvorbě aktivního MeTIMP blokujícího purinovou *de novo* syntézu. Vysvětlivky zkratk: 6-MP – 6-merkaptopurin; 6-MeMP – S⁶-methylmerkaptopurin; MeTIMP – S⁶-methylthioinosin 5'-monofosfát; SAH – S-adenosyl-L-homocystein; SAM – S-adenosyl-L-methionin; TIMP – thioinosin 5'-monofosfát; TPMT – thiopurin-S-methyltransferasa. Reakční schémata byla vytvořena v programu ChemBioDraw Ultra 14.0 (Cambridge Soft, Cambridge, MA, USA).

Zmíněná radiochemická esej byla využita v populačních studiích, které analyzovaly aktivitu TPMT a její dědičnost (Weinshilboum a Sladek, 1980). Nejprve bylo provedeno měření aktivity TPMT za použití ¹⁴C značeného SAM u náhodného vzorku populace. Následně byli náhodně vybráni někteří z účastníků první části studie a aktivita TPMT byla změřena i u jejich rodinných příslušníků pro získání dat o možné dědičnosti této enzymové aktivity. Byla zjištěna aktivita TPMT tří prokazatelně odlišných hodnot – vysoká aktivita enzymu se vyskytovala s frekvencí přibližně 89 %, střední aktivita u cca 11 % subjektů a u zhruba jednoho účastníka z 300 nebyla detekována žádná aktivita. Srovnání aktivity u rodinných příslušníků a četnosti odlišně vysokých aktivit v populaci jasně naznačily kodominantní typ dědičnosti. V této práci byl tak objeven jeden z možných genetických faktorů ovlivňujících individuální odpověď na thiopurinovou léčbu, což bylo později potvrzeno v dalších studiích konkrétních klinických případů (Lennard *et al.*, 1987; Lennard *et al.*, 1989). V té době však ještě nebyly známy žádné konkrétní mutace vedoucí k expresi deficitních variant enzymu.

První identifikovaná mutace TPMT byla záměna jednoho nukleotidu c.238G>C vedoucí k substituci p.A80P v primární struktuře proteinu (Krynetski *et al.*, 1995). Tato mutantní alela

byla označena jako TPMT*2, přičemž jako TPMT*1 byla stanovena alela kódující normální protein. Později byla popsána další alela TPMT*3 (později přejmenována na TPMT*3A), která obsahovala dvě nukleotidové záměny (c.460G>A a c.719A>G) způsobující změnu v proteinovém řetězci (p.A154T a p.Y240C) – (Tai *et al.*, 1996). Yates *et al.* (1997) pak zavedli označení alel TPMT*3B a TPMT*3C obsahující vždy jen jednu z mutací přítomných na TPMT*3A (Tabulka 1). Následovaly identifikace dalších alel s nižší frekvencí v populaci (Garat *et al.*, 2008). Appell *et al.* (2013) se poté pokusili o sjednocení názvů a zavedení nomenklaturního systému, který je dostupný na internetových stránkách (<http://www.imh.liu.se/tpmtalleles>) a je průběžně aktualizován. K dnešnímu dni je popsáno celkem 44 různých alel SNP (včetně kanonické sekvence), z toho 39 vede ke změně v aminokyselinové sekvenci exprimovaného proteinu oproti normálnímu proteinu (Appell, 2015). Zbývající alely obsahují SNP synonymní (TPMT*1S) či v netranslatovaném exonu (TPMT*1A), které nemají vliv na strukturu proteinu (Yates *et al.*, 1997; Spire-Vayron de la Moureyre *et al.*, 1998), nebo vyskytující se na rozhraní exonu a intronu, které pravděpodobně ovlivňují sestřih mRNA a vedou ke snížené aktivitě enzymu (TPMT*4 a TPMT*15) – (Otterness *et al.*, 1998; Skrzypczak-Zielinska *et al.*, 2013). Jelikož se nejedná o mutace měnící strukturu proteinu, nejsou zde dále rozebírány.

Tabulka 1: Přehled nejčastějších mutantních alel TPMT.

Název alely	Nukleotidová substituce	Aminokyselinová substituce	Identifikační číslo	Reference
TPMT*2	c.238G>C	p.A80P	rs1800462	(Krynetski <i>et al.</i> , 1995)
TPMT*3A	c.460G>A c.719A>G	p.A154T p.Y240C	rs1800460 rs1142345	(Tai <i>et al.</i> , 1996)
TPMT*3B	c.460G>A	p.A154T	rs1800460	(Yates <i>et al.</i> , 1997)
TPMT*3C	c.719A>G	p.Y240C	rs1142345	(Yates <i>et al.</i> , 1997)

V různých etnických skupinách se aktivita TPMT a zastoupení genetických variant liší. McLeod *et al.* (1994) porovnávali aktivitu TPMT ve skupinách bílých Američanů a Afroameričanů a zjistili, že v obou souborech bylo rozložení výskytu normální a snížené aktivity TPMT podobné a že odpovídalo výsledkům předchozí studie provedené na bělošské populaci Weinshilboumem a Sladkem (1980). V průběhu dalších let byly postupně identifikovány alely specifické pro různá etnika. Navzdory podobné prevalenci snížené aktivity TPMT u europoidní rasy a afroamerického obyvatelstva se konkrétní genetické varianty pro tyto dvě skupiny výrazně odlišují. Zatímco u bělochů se nejčastěji vyskytovaly alely

TPMT*3A, TPMT*3C a TPMT*2, které tvoří 80 – 95 % výskytu všech nefunkčních alel TPMT (Yates *et al.*, 1997), u Afroameričanů je zdaleka nejvíce zastoupena varianta TPMT*3C (Almoguera *et al.*, 2014; Tabulka 2). TPMT*3C má také nejvyšší frekvenci výskytu u asijské populace, kde je ale celková přítomnost mutantních alel TPMT v populaci nižší (cca okolo 4 %) než u bělochů či osob afrického původu (přibližně 10 %) – (Ameyaw *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2015).

Tabulka 2: Přehled nejčastěji se vyskytujících mutantních alel TPMT a přibližná frekvence jejich výskytu v různých etnických skupinách.

Název alely	Frekvence výskytu alely v dané populaci [%]					
	běloši	Hispánci	Afroameričané	Afričané	Jihovýchodní Asiaté	Asiaté
TPMT*2	0,2	-	-	0	0	0
TPMT*3A	3,4 – 4,4	2,9	0,9	0	1	0
TPMT*3B	0 – 0,1	0,1	0	-	-	0
TPMT*3C	0,4 – 0,6	1,4	4,6	6,5	0	1,4
<i>Reference</i>	(Schaeffeler <i>et al.</i> , 2004; Almoguera <i>et al.</i> , 2014)	(Almoguera <i>et al.</i> , 2014)	(Almoguera <i>et al.</i> , 2014)	(Schaeffeler <i>et al.</i> , 2008)	(Collie-Duguid <i>et al.</i> , 1999)	(Kim <i>et al.</i> , 2015)

Přesný mechanismus, jakým ovlivňují jednotlivé mutace funkci proteinu, byl záhy po jejich identifikaci vysvětlen. Tai *et al.* (1997) zjistili pomocí metody „pulse-chase“, že deficitní proteiny kódované alelami TPMT*2 a TPMT*3A podléhají v *Saccharomyces cerevisiae* rychlejší degradaci než normální protein. V degradaci byla prokázána účast proteasomu závislá na ATP, jelikož v linii *S. cerevisiae* s defektem v expresi proteasomu (*pre-1*) docházelo k degradaci pomaleji než v kvasinkách s plně funkčním proteasomem, stejně jako při použití živného média bez ATP. Naopak míra degradace nebyla ovlivněna lysosomálním inhibitorem chlorochinem. Z těchto výsledků lze usuzovat na nižší stabilitu mutovaných proteinů vlivem jejich špatného sbalení (Tai *et al.*, 1997).

Vyřešení krystalové struktury TPMT výrazně napomohlo v pochopení vlivu jednotlivých mutací na strukturu a funkci proteinu (Obrázek 6). Trojrozměrnou strukturu lidského enzymu poprvé získali Wu *et al.* (2007). Dále byla popsána struktura myší TPMT v komplexu s 6-MP a SAH (Peng *et al.*, 2008). Model komplexu lidské TPMT s 6-MP a SAH, který vytvořili Mokmak *et al.* (2009) výpočetní metodou molekulární dynamické simulace za použití struktury lidské TPMT, byl konzistentní s výše zmíněnou experimentální strukturou s myší TPMT.

TPMT se řadí do skupiny methyltransferas I. třídy, se kterými sdílí charakteristicky strukturované jádro tvořené jednou doménou. Tato doména se skládá z devíti β -skládaných listů z každé strany obklopených třemi α -helixy, přičemž další dva α -helixy jsou vloženy mezi vlásenkovou strukturu osmého a devátého β -listu (Wu *et al.*, 2007). Methyltransferasová doména myšního proteinu se mírně liší – obsahuje sedm β -skládaných listů z obou stran obložených vždy třemi α -helixy, na N-konci je ale delší o čtyřicet aminokyselinových zbytků a uvnitř domény je navíc vlásenka a jeden malý α -helix vloženy mezi šestý a sedmý β -list (Obrázek 6C; Peng *et al.*, 2008). Tyto strukturní rozdíly však pravděpodobně výrazně neovlivňují vazbu ligandů, jelikož způsob vazby 6-MP a SAH v modelu lidské TPMT odpovídal experimentálním datům myší TPMT (Peng *et al.*, 2008; Mokmak *et al.*, 2009).

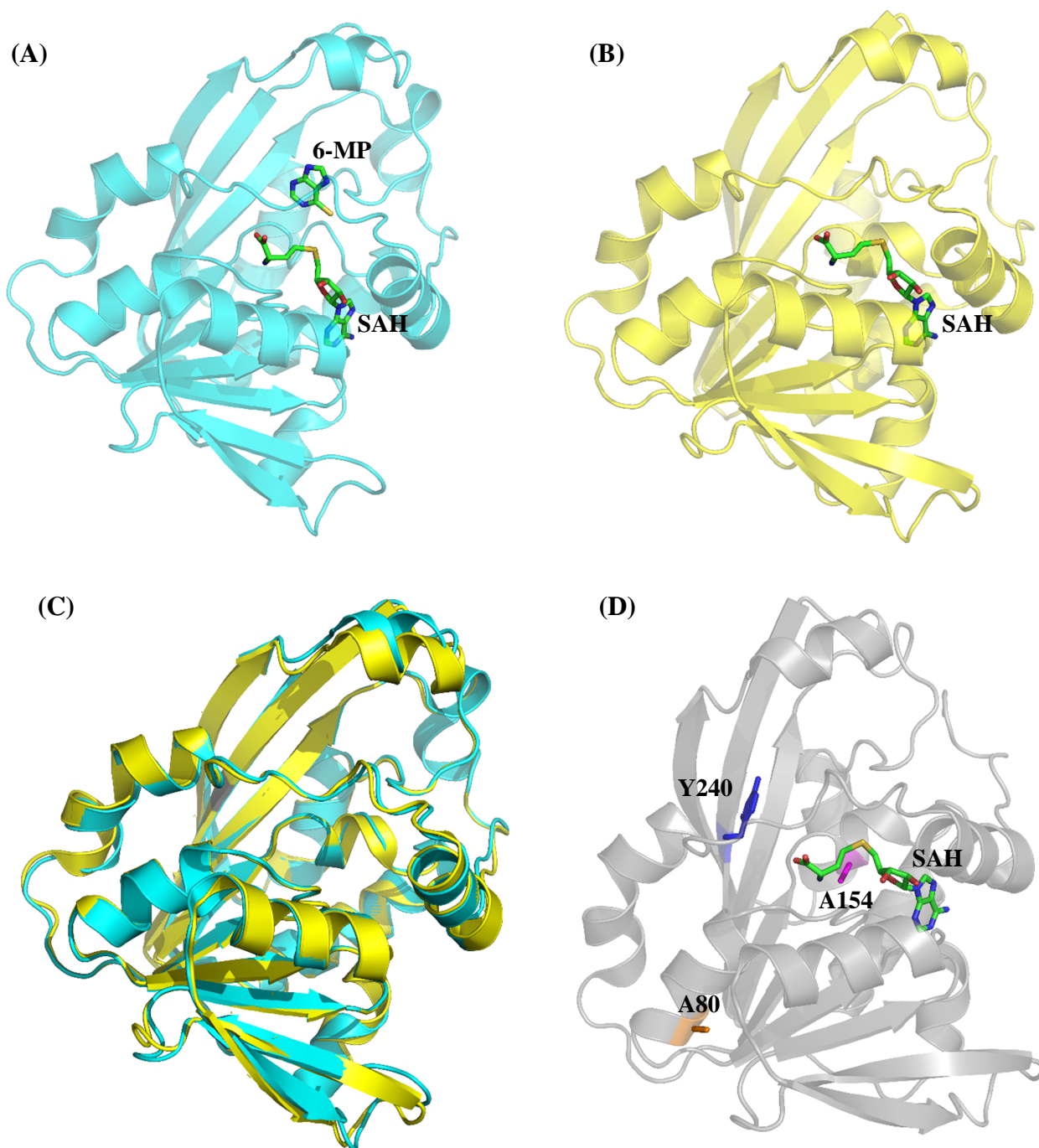
Struktura myší TPMT s 6-MP a model lidské TPMT s 6-MP dále ukazují, že se přes vazebné místo vine flexibilní smyčka, jejíž pohyb patrně souvisí se schopností aktivního místa vázat více druhů substrátů. Zároveň se blízko navázaného 6-MP vyskytují dva postranní řetězce argininu (R147 a R221 v myší TPMT a R152 a R226 v lidské TPMT), které jsou na základě mutagenetické studie blíže neurčeným mechanismem důležité pro transmethylační reakci (Peng *et al.*, 2008; Mokmak *et al.*, 2009).

Wu *et al.* (2007) na základě vyřešené krystalové struktury rozdělili mutantní varianty TPMT do tří skupin podle předpokládaného vlivu na protein: 1) ty, které stabilizují celkovou strukturu prostřednictvím Van der Waalsových slabých ne vazebných interakcí (př. p.A80P, p.A154T a p.Y240C, které představují nejčastěji se vyskytující mutantní alely TPMT*2, TPMT*3A a TPMT*3C); 2) ty, které participují na elektrostatických intramolekulárních interakcích (př. p.E28V, p.K119T a další) a 3) ty, které se přímo či nepřímo podílí na vazbě kofaktoru (p.G71R, p.Q42E). Mutace z první skupiny pravděpodobně mají největší dopad na funkci proteinu, jelikož se nachází v centrální části oblasti β -listů, které tvoří hydrofobní jádro proteinu (Wu *et al.*, 2007). Vlivem mutace dochází nejspíš k narušení struktury a odhalení hydrofobní části proteinu, což vede k jeho úplné destabilizaci. Takto narušené proteiny jsou rozpoznány buněčnými kontrolními mechanismy a následně degradovány proteasomem. Tyto úvahy jsou v souladu s pozorováními v předchozích studiích Tai *et al.* (1997). Mutace patřící do druhé skupiny se nachází na povrchu proteinu mimo aktivní místo. Mají vliv na stabilizaci molekuly prostřednictvím polárních intramolekulárních interakcí s postranními řetězci dalších aminokyselin na povrchu (Wu *et al.*, 2007) a mohou tak vést k chybám ve sbalení proteinu a jeho následné degradaci. Pravděpodobně je však množství špatně sbaleného proteinu nižší než u mutací v hydrofobním jádře. Vliv této skupiny mutací na enzymovou aktivitu je tak méně

patrný, čemuž odpovídají i data sledování aktivity *in vitro*, konkrétně pro mutace p.E28V a p.K119T (Hamdan-Khalil *et al.*, 2003; Garat *et al.*, 2008). Mutace třetí kategorie p.G71R a p.Q42E mění náboj aminokyselinových zbytků účastnících se vazby kofaktoru, což může mít za následek snížení jeho vazebné afinity. Některé mutace se dají zařadit do dvou skupin zároveň, jako například p.A154T (TPMT*3B), která kromě celkové stability proteinu může díky své pozici poblíž efektorového a aktivního místa ovlivňovat i afinitu vazby kofaktoru a enzymovou aktivitu. (Wu *et al.*, 2007). Další mutace z druhé a třetí kategorie se zpravidla v populaci vyskytují minoritně a jejich klinický význam je tak výrazně nižší.

Výše uvedených poznatků o trojrozměrné struktuře (Wu *et al.*, 2007) bylo využito k analýze SNP v genu pro TPMT. V této studii Fazel-Najafabadi *et al.* (2015) použili řadu bioinformatických nástrojů, které umožňují stanovit evoluční konzervovanost aminokyselin (Polyview) či předpovědět stabilitu proteinu a jeho tendenci k agregaci (AMYL PRED2, FoldX a další). Bylo identifikováno celkem jedenáct silně konzervovaných aminokyselinových zbytků, jejichž záměna zejména za aminokyselinu jiných vlastností může vést k výraznému snížení či ztrátě funkce proteinu. Mutace šesti zbytků z těchto konzervovaných oblastí (p.A80P, p.L49S, p.G71R, p.L69V, p.R163P a p.G36S) mají za následek téměř nedetekovatelnou aktivitu enzymu. Mutace p.A80P (čili alela TPMT*2) pak představuje známou defektní variantu TPMT významnou v klinické praxi.

Ačkoliv TPMT patří mezi relativně dobře prostudované enzymy, dosud se nepodařilo popsat strukturu mutantních variant. Příčinou může být horší rozpustnost purifikovaných variantních proteinů (zejména TPMT*3A a TPMT*3B) a jejich tendence tvořit agregáty (TPMT*2, TPMT*3A, TPMT*3B a TPMT*3C), jak již dříve popsali Wu *et al.* (2007) a Wang *et al.* (2005). Také v linii epiteliálních buněk z ledviny kočkodana obecného COS-1 byla pro TPMT*3A, TPMT*3B a TPMT*3C v přítomnosti inhibitoru proteasomů MG132 pozorována formace tzv. agresomu, neboli cytoplasmatického útvaru tvořeného agregovaným polyubikvitinovaným proteinem (Wang *et al.*, 2005). To naznačuje, že chybné sbalení proteinu, jeho částečná agregace a následná rychlá degradace agregovaného i neagregovaného proteinu jsou hlavním mechanismem, který vede ke snížené aktivitě nejčastějších deficitních variant enzymů.



Obrázek 6: Krystalová struktura TPMT z *Mus musculus* a *Homo sapiens*.

(A) Celková struktura monomeru myší TPMT ve stuhovém zobrazení hlavního řetězce s náhledem do aktivního místa ukazující vazbu 6-MP a SAH; (B) „struktura monomeru lidské TPMT v komplexu s molekulou SAH; (C) srovnání struktury lidské (žlutá) a myší (tyrkysová) TPMT; (D) lokalizace nejčastěji se vyskytujících mutací lidské TPMT. Vysvětlivky zkratk: 6-MP – 6-merkaptopurin; SAH – S-adenosyl-L-homocystein; TPMT – thiopurin-S-methyltransferasa. Obrázek byl připraven v programu PyMOL verze 1.5.0.1. (DeLano Scientific LLC, San Francisco, CA, USA) za použití souborů PDB ID 3BGD a 2BZG (Wu *et al.*, 2007; Peng *et al.*, 2008; RCSB PDB, 2016).

5.2 Fosfatasa NUDT15/MutT homolog 2 (EC 3.6.1.55)

Fosfatasa „motiv typu NUDIX 15“ (NUDT15) neboli MutT homolog 2 (MTH2) patří do superrodiny tzv. NUDIX hydrolas. Tyto enzymy katalyzují pyrofosfohydrolyzu nukleosid 5'-difosfátů s určitou funkční skupinou X. NUDT15 se řadí do skupiny lidských MutT homologů, jejichž název je odvozen na základě předpokládané funkční a strukturní podobnosti s proteinem kódovaným tzv. Treffersovým mutačním genem *mutT* (MutT). Předpokládá se, že se MutT a příbuzné proteiny podílejí na štěpení oxidovaných nukleotidů. Jako první byl objeven MutT protein z bakterie *Escherichia coli*, který selektivně přeměňuje 8-OH-dGTP na 8-OH-dGMP a podílí se tím na ochraně buňky před mutagenními účinky oxidovaných nukleotidů (Maki a Sekiguchi, 1992). Mechanismus mutagenního účinku spočívá v začleňování oxidovaných guaninových nukleotidů do řetězce DNA proti adeninu, a tím indukci chybného párování basí. Následně dochází k nukleotidové záměně A:T párů v DNA za C:G (Satou *et al.*, 2007).

U člověka byly doposud popsány tři funkční homology MutT proteinů zapojené do metabolismu oxidovaných nukleotidů, jmenovitě MTH1 neboli NUDT1 (Mo *et al.*, 1992), MTH2 neboli NUDT15 (Hori *et al.*, 2010) a MTH3 neboli NUDT18 (Takagi *et al.*, 2012). MTH1 je v současnosti považován za hlavní enzym snižující množství oxidovaných nukleotidů v buňce. Studie enzymové aktivity *in vitro* totiž ukázala, že aktivita NUDT15 vůči 8-OH-dGTP je až 40× nižší než aktivita MTH1 (Takagi *et al.*, 2012). Zapojení v metabolismu oxidovaných nukleotidů bylo studováno pro několik dalších proteinů ze skupiny NUDIX hydroláz, konkrétně NUDT5 (Hori *et al.*, 2010) a NUDT17 (Carter *et al.*, 2015). Nízké hodnoty jejich enzymových aktivit ale naznačují jejich zanedbatelný fyziologický význam (Ito *et al.*, 2011; Carter *et al.*, 2015).

NUDT15 byl poprvé identifikován jako produkt myší cDNA schopný štěpit 8-OH-dGTP na 8-OH-dGMP, který zároveň snižoval v buňkách *E. coli* s delecí genu pro MutT protein (*mutT* kmen) množství vznikajících spontánních mutací (Cai *et al.*, 2003). Úloha tohoto proteinu v omezení vzniku mutací byla dále prokázána studií, ve které byl popsán vliv inaktivace genu pro NUDT15 v lidských 293T buňkách. Při expozici buněk s chybějící NUDT15 byl pozorován výrazný nárůst koncentrace 8-OH-dGTP a následné vyšší množství indukovaných mutací (Hori *et al.*, 2010). V rámci hledání možných substrátů NUDT15 byla zjištěna aktivita vůči 8-OH-dGDP (Takagi *et al.*, 2012). V následných experimentech však Carter *et al.* (2015) ukázali, že aktivita vůči 8-OH-dGDP je nižší než vůči některým jiným testovaným substrátům, jako například dGTP či thiopurinovým metabolitům 6-thio-GTP

(TGTP) a 6-thio-dGTP (TdGTP). To by mohlo znamenat, že primární role NUDT15 nesouvisí s defosforylací oxidovaných nukleotidů. Přesná fyziologická role tohoto enzymu tak zůstává neznámá. Výše uvedená studie ale také ukázala, že enzym se pravděpodobně přímo podílí na metabolismu thiopurinových léčiv, jelikož vykazoval detekovatelnou aktivitu vůči thiopurinovým metabolitům. Tato data také naznačují, že by NUDT15 svou fosfatasovou aktivitou mohl ovlivňovat rovnováhu thiopurinových metabolitů v buňce a odštěpením fosfátové skupiny z TGTP a TdGTP přímo snižovat koncentraci těchto biologicky aktivních thiopurinů (Carter *et al.*, 2015; Moriyama *et al.*, 2016). Tyto úvahy ale bude nutné ověřit v dalších studiích.

Středem zájmu se NUDT15 stal po objevu vrozených variant, které vedou k intoleranci thiopurinové terapie (Yang *et al.*, 2014). V rámci celogenomové asociační studie Yang *et al.* (2014) zkoumali korejské pacienty s Crohnovou chorobou, u nichž se při terapii thiopurinovými medikamenty objevila leukocytopenie. Byla tak identifikována varianta NUDT15, která obsahuje nukleotidovou substituci c.415C>T způsobující záměnu aminokyselin p.R139C (Yang *et al.*, 2014). Tento SNP byl dále studován u dětí s ALL léčených 6-MP a výskytu NUDT15 v různých etnických skupinách (Tabulka 3). Genetická data byla korelována s tolerancí terapie. Pacienti heterozygotní v genu pro NUDT15 tolerovali přibližně 63 % původní plánované dávky, zatímco nositelé obou alel defektních pouze okolo 8 % (Yang *et al.*, 2015).

Tabulka 3: Přibližná frekvence výskytu mutantní alely NUDT15 v různých etnických skupinách podle Yang *et al.* (2015).

Název alely	Frekvence výskytu mutantní alely v dané populaci [%]			
	Afričané	Evropané	Hispanci	Jihovýchodní Asiaté
NUDT15 p.R139C	0	0,2	3,9	9,8

Podobné výsledky získali také Liang *et al.* (2015), kteří sledovali souvislost intolerance thiopurinové léčby a SNP vyskytujících se v genech pro NUDT15 a TPMT u dětí z Taiwanu. Genotyp pro NUDT15 byl dále studován u japonských pacientů s idiopatickými střevními záněty (Asada *et al.*, 2016) a thajských pacientů s ALL (Chiengthong *et al.*, 2016), u kterých byl také prokázán vliv mutací v genu pro NUDT15 na výsledek thiopurinové terapie. Všechny výše uvedené práce ukazují zásadní klinický význam genotypu NUDT15 pro volbu terapeutických strategií v asijské populaci, jelikož frekvence výskytu mutantních alel NUDT15

v této populaci výrazně převyšuje výskyt defektních variant TPMT. Moriyama *et al.* (2016) pak identifikovali další nefunkční alely NUDT15 (Tabulka 4) a studovali jejich vliv na aktivitu NUDT15. Heterozygoti nesoucí jednu alelu kanonické sekvence a jednu mutantní alelu (NUDT15*1/*2, NUDT15*1/*3, NUDT15*1/*4 a NUDT15*1/*5) vykazovali středně sníženou aktivitu, zatímco heterozygoti a homozygoti se dvěma alelami mutantních variant (NUDT15*2/*3, NUDT15*3/*3 a NUDT15*3/*5) velmi nízkou. Podobný efekt pro neznámé kombinace alel byl pozorován i u TPMT (Weinshilboum a Sladek, 1980), což naznačuje, že i pro NUDT15 platí autozomálně kodominantní typ dědičnosti. To znamená, že přítomnost i jedné mutantní alely se projeví ve fenotypu.

Nižší aktivita enzymu u jedinců s jednou mutantní alelou či aktivita téměř chybějící u nositelů dvou mutantních alel pravděpodobně způsobuje snížení procesů degradace 6-TGN, což má za následek zvýšení koncentrace biologicky aktivních metabolitů a dochází k zesílenému cytotoxickému působení. Toto tvrzení podporují i výsledky studie Moriyama *et al.* (2016), ve které byl sledován obsah 6-TGN v DNA leukocytů u dětských pacientů s ALL. Pacienti s oběma mutantními alelami měli více začleněných 6-TGN do DNA než heterozygoti s jednou alelou pro normální protein či homozygoti pouze s nemutovaným enzymem. Studie však byla provedena na 64 pacientech, z čehož 16 jedinců neslo kombinaci alel odpovídající střední aktivitě NUDT15 a pouze 3 subjekty měly obě alely mutantní. Výsledky studie by tedy měly být ještě potvrzeny na početnější kohortě pacientů, jelikož výsledky této práce se lišily od jiných klinických studií.

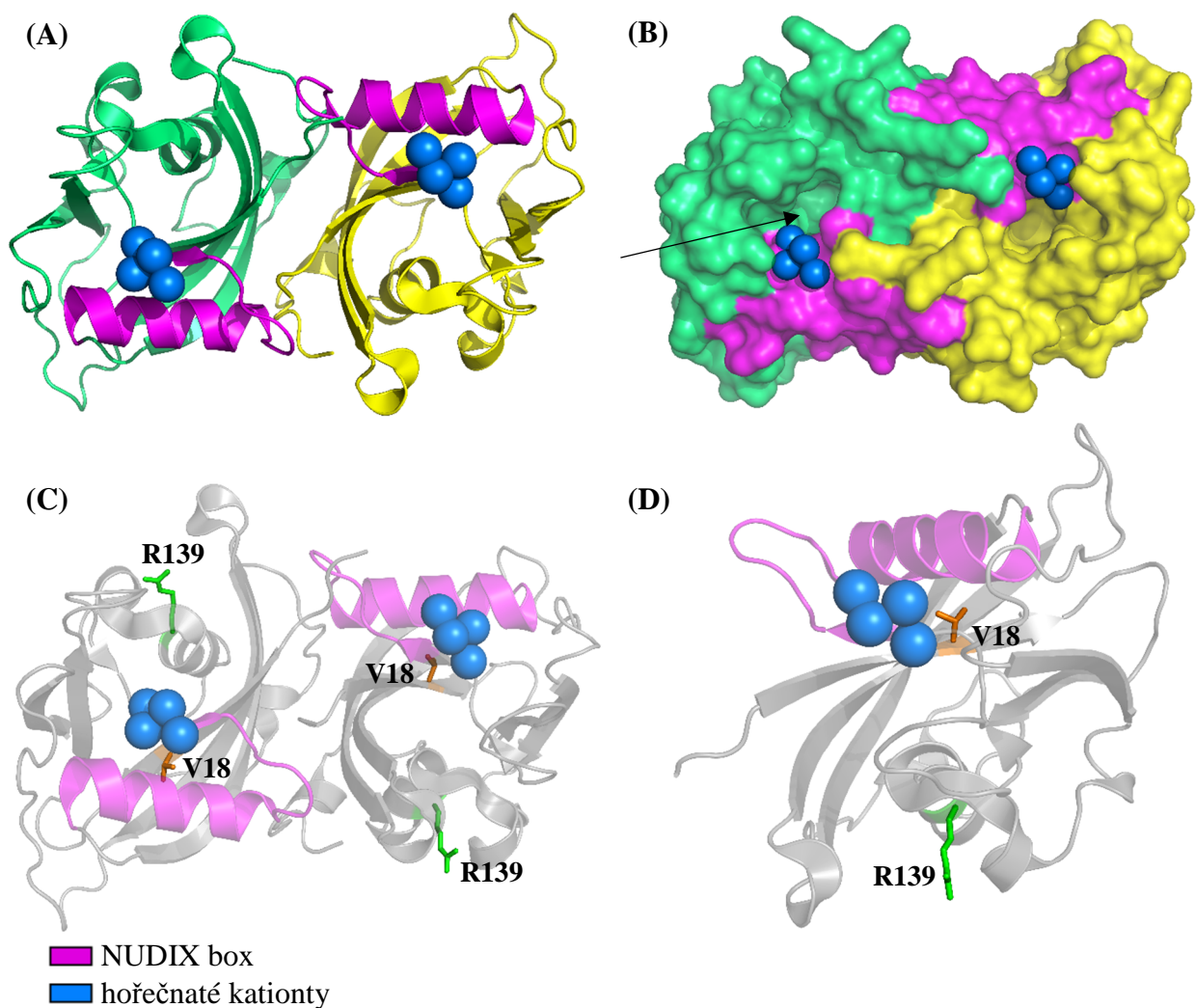
V práci Asada *et al.* (2016) nebyla prokázána souvislost mezi genotypem pro NUDT15 a koncentrací 6-TGN v lyzátu erytrocytů japonských pacientů, u kterých byly léčeny idiopatické střevní záněty a vyskytla se u nich leukocytopenie indukovaná thiopurinovou léčbou. Tato rozcházející se zjištění mohou být způsobena tím, že intolerance thiopurinové terapie by mohla mít odlišný mechanismus vzniku u různých onemocnění, jelikož v těchto studiích byli zkoumáni pacienti s ALL a idiopatickými střevními záněty. Další možné vysvětlení rozdílných závěrů daných studií může spočívat v tom, že Moriyama *et al.* (2016) sledovali 6-TGN zakomponované v DNA leukocytů, zatímco Asada *et al.* (2016) měřili celkový obsah 6-TGN v lyzátu erytrocytů. Přesná role NUDT15 v metabolismu thiopurinových derivátů tedy vyžaduje další studium.

Tabulka 4: Přehled popsanych variant NUDT15 podle Moriyama et al. (2016).

Název alely	Nukleotidová změna	Aminokyselinová změna	Identifikační číslo
NUDT15*2	c.36_37insGGAGTC c.415C>T	p.V18_V19insGV p.R139C	rs554405994 rs116855232
NUDT15*3	c.415C>T	p.R139C	rs116855232
NUDT15*4	c.416G>A	p.R139H	rs147390019
NUDT15*5	c.52G>A	p.V18I	rs186364861

Molekulární mechanismy mutací NUDT15 je nyní možné odhadovat díky nedávno vyřešené krystalové struktuře (Carter *et al.*, 2015; Obrázek 7). Tento protein tvoří homodimer, čímž se liší od blízké příbuzného enzymu, monomerního MTH1. Terciární struktura NUDT15 vykazuje charakteristické strukturní rysy sdílené NUDIX hydrolasami. Mezi ně patří tzv. NUDIX box, což je 22 aminokyselin dlouhá struktura s obecnou sekvencí G-x(5)-E-x(4)-[TAGCV]-[LIVMACF]-x-R-[EL]-[LIVMFGSTA]-x-[EA]-E-x-[GNDTHR], kde x je libovolná aminokyselina a u aminokyselin v hranatých závorkách je na daném místě sekvence vždy právě jedna z aminokyselin z výběru (PROSITE, 2016). NUDIX box tvoří jeden ze dvou α -helixů, které monomer proteinu obsahuje. V jedné proteinové podjednotce leží NUDIX box na jedné straně smíšeného β -skládaného listu a druhý α -helix na jeho straně opačné. Dohromady tak tyto struktury tvoří tzv. NUDIX „fold“ neboli α - β - α sendvičovou strukturu. Aminokyselinové zbytky NUDIX boxu formují aktivní místo enzymu, podílejí na koordinaci hořčnatých kationtů a na hydrolýze substrátu (Carter *et al.*, 2015).

Strukturně-funkční důsledky jednotlivých SNP v NUDT15 nebyly dosud zcela vysvětleny. Na základě struktury proteinu kanonické sekvence lze usuzovat, že mutace p.R139C, která je umístěna v α -helixu ve spodní části vazebné kapsy, by mohla vést k tvorbě disulfidické vazby mezi C139 a C140, a tím ke změně struktury aktivního místa a narušení funkce enzymu (Carter *et al.*, 2015). Mutace p.R139H by naopak mohla způsobovat pokles parciálního kladného náboje, a tím pozměnit preferenci substrátu nebo jeho orientaci ve vazebném místě (Moriyama *et al.*, 2016). Další dvě charakterizované varianty ovlivňují valin na pozici 18 (V18), který je umístěn v β -skládaném listu. Z publikovaných strukturních dat zatím není možné odhadnout možný mechanismus, který vede k narušení aktivity u těchto mutantních variant. Je však již jasné, že varianty NUDT15 patří mezi důležité faktory ovlivňující průběh thiopurinové terapie a do budoucna se mohou stát významnými parametry pro personalizaci léčby thiopuriny.



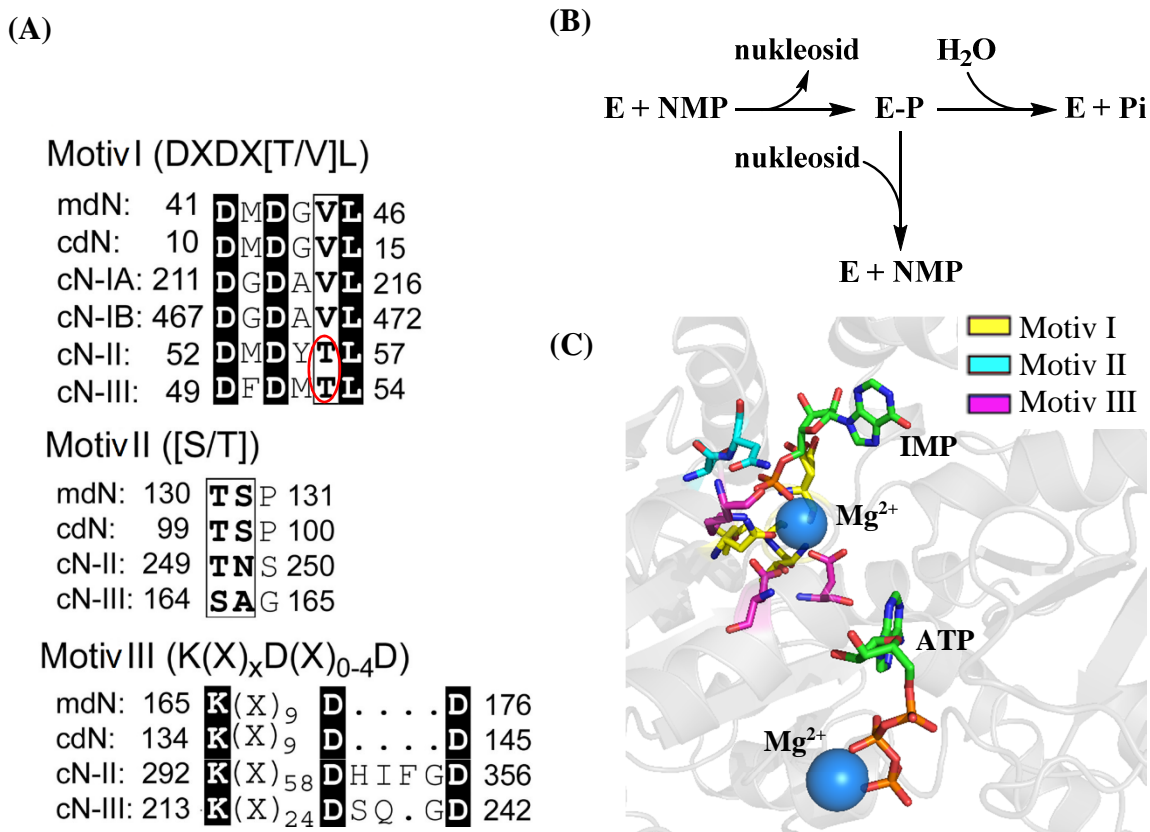
Obrázek 7: Krystalová struktura NUDT15.

(A) Celková struktura dimeru NUDT15 ve stuhovém zobrazení hlavního řetězce, podjednotky jsou barevně odlišeny a NUDIX box a hořečnaté ionty jsou zvýrazněny barvami uvedenými v legendě; (B) struktura dimeru NUDT15 zobrazená jako vodě přístupný povrch, šipka označuje předpokládanou vazebnou kapsu pro substrát; (C) lokalizace nejčastěji se vyskytujících mutací v dimeru NUDT15; (D) lokalizace nejčastěji se vyskytujících mutací v jedné podjednotce NUDT15. Obrázek byl připraven v programu PyMOL verze 1.5.0.1. (DeLano Scientific LLC, San Francisco, CA, USA) za použití souboru PDB ID 5BON (Carter *et al.*, 2015; RCSB PDB, 2016) a na základě dat z databáze UniProt (UniProt, 2016).

5.3 Cytosolická 5'-nukleotidasa II (EC 3.1.3.5)

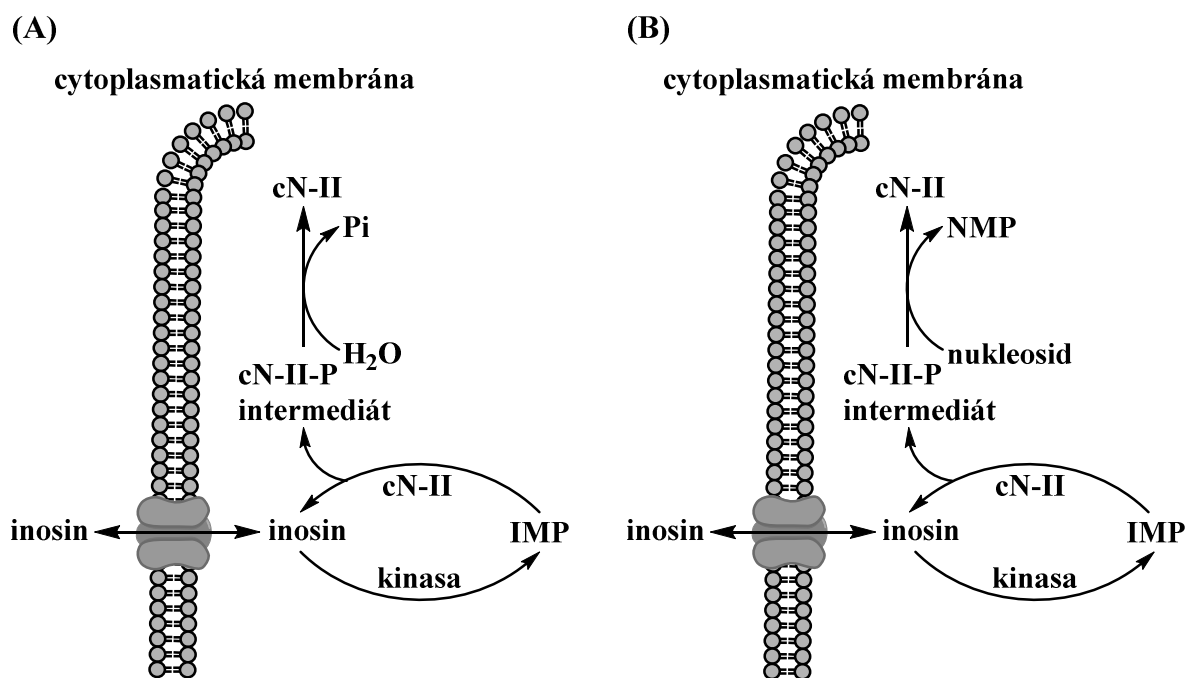
Důležitou roli v metabolismu nukleotidů a jejich antimetabolitů hrají 5'-nukleotidasy (5'-NT), hydrolyzující fosfodiesterovou vazbu na 5' uhlíku ribosy či 2'-deoxyribosy. Na základě strukturní podobnosti se řadí do rodiny halogenkyselinových dehalogenas (HAD). U člověka bylo popsáno sedm různých typů 5'-NT, které se od sebe navzájem liší svým substrátem a lokalizací v buňce (shrnutí v: Bianchi a Sychala, 2003). Sdílejí určité konzervované sekvenční motivy v katalytickém místě (Obrázek 8A, 8C) i mechanismus hydrolytické reakce přes fosfo-enzymový intermediát (Baiocchi *et al.*, 1996; shrnutí v: Bianchi a Sychala, 2003). 5'-Nukleotidasy cN-II a cN-III navíc vykazují i fosfotransferasovou aktivitu, která u ostatních enzymů z této skupiny nebyla pozorována (Worku a Newby, 1982; Amici *et al.*, 1997; shrnutí v: Bianchi a Sychala, 2003; Obrázek 8B).

5'-Nukleotidasa cN-II neboli purinová nukleotidasa hydrolyzuje především IMP a GMP (odtud také jiný název IMP/GMP selektivní nukleotidasa) – (Obrázek 9; Itoh, 1981). Bylo prokázáno, že díky své fosfotransferasové aktivitě (Obrázek 9) dovede také fosforylovat purinová analoga *in vitro*, a tím je aktivovat či deaktivovat (Keller *et al.*, 1985; Johnson a Fridland, 1989; Banditelli *et al.*, 1996). Je však možné, že fyziologicky není tato aktivita příliš významná (Turriani *et al.*, 1994). Již Pieters *et al.* (1992) prokázal určitou korelaci mezi vyšší aktivitou cN-II a rezistencí vůči thiopurinové léčbě u pacientů trpících ALL. O pár let později práce Kerstens *et al.* (1995) poukázala na možnou souvislost mezi nízkou aktivitou cN-II a selháním kostní dřeně u pacienta s revmatoidní artritidou léčeného AZA. Zásadním omezením studie ale je, že Kerstens *et al.* detekovali celkovou aktivitu 5'-NT pomocí metody enzymatické eseje se ¹⁴C značeným AMP a měření vzniklého ¹⁴C adenosinu, přestože AMP nepatří mezi specifické substráty cN-II. Z toho plyne, že aktivita cN-II pravděpodobně činí pouze malý podíl z celkové naměřené aktivity 5'-NT. V některých studiích však bylo popsáno, že cN-II může účinně hydrolyzovat i AMP, například v lyzátu krysích granulocytů *in vitro* (Worku a Newby, 1983). Navzdory tomuto nedostatku však zmíněné studie upozornily na potenciální klinickou důležitost cN-II v léčbě thiopuriny.



Obrázek 8: Charakteristické rysy 5'-nukleotidas.

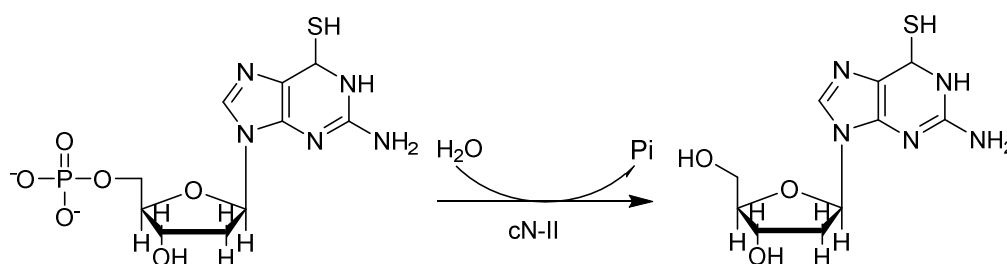
(A) Aminokyselinové sekvence konzervovaných strukturních motivů intracelulárních 5'-NT – threoninové zbytky (červeně zakroužkované) pravděpodobně souvisejí s fosfotransferasovou aktivitou cN-II a cN-III; (B) obecné schéma hydrolytické a fosfotransferasové reakce 5'-NT přes fosfo-enzymový intermediát; (C) trojrozměrné uspořádání motivů v rámci struktury podjednotky cN-II (p.D52N) – orientace postranních řetězců konzervovaných aminokyselin v aktivním místě proteinu, motivy jsou zvýrazněny barvami uvedenými v legendě. Vysvětlivky zkratk: 5'-NT - 5'-nukleotidasy; cdN – cytosolická 5'(3')-deoxyribonukleotidasa; cN-I(A/B) – cytosolická 5'-nukleotidasa I (AMP specifická); cN-II – cytosolická 5'-nukleotidasa II (IMP/GMP specifická); cN-III – cytosolická 5'-nukleotidasa III (pyrimidinová); IMP – inosin 5'-monofosfát; mdN – mitochondriální 5'(3')-deoxyribonukleotidasa; NMP – nukleosid 5'-monofosfát. Obrázek 8A byl upraven podle Wallden *et al.* (2007). Obrázek 8B byl připraven v programu ChemBioDraw Ultra 14.0 (Cambridge Soft, Cambridge, MA, USA) podle Pesi *et al.* (2010). Obrázek 8C byl připraven v programu PyMOL verze 1.5.0.1. (DeLano Scientific LLC, San Francisco, CA, USA) za použití souboru PDB ID 2XCW (Wallden a Nordlund, 2011; RCSB PDB, 2016).



Obrázek 9: Schéma enzymatické aktivity cN-II v buňce.

(A) Hydrolytická aktivita cN-II – enzym katalyzuje přenos 5'-fosfátové skupiny z IMP na molekulu vody; (B) fosfotransferasová aktivita cN-II – enzym katalyzuje přenos 5'-fosfátové skupiny z IMP na volný nukleosid. Vysvětlivky zkratk: cN-II – cytosolická 5'-nukleotidasa II (IMP/GMP specifická); IMP – inosin 5'-monofosfát; NMP – nukleosid 5'-monofosfát. Schéma bylo vytvořeno v programu ChemBioDraw Ultra 14.0 (Cambridge Soft, Cambridge, MA, USA) podle Galmarini *et al.* (2003).

Zásadní klinický význam pak v budoucnu může mít objev somatických mutací v genu pro cN-II asociovaných s relapsy leukemie (Meyer *et al.*, 2013; Tzoneva *et al.*, 2013). S využitím techniky celoexomového sekvenování byly popsány mutace v genu pro cN-II, jejichž výskyt koreloval s recidivami u pacientů s ALL, kterým v rámci standardní terapie byla podávána analoga nukleosidů jako 6-MP a 6-TG. Ze srovnávání exomů pacientů v době diagnózy a relapsu pak vyplývá, že tyto mutace byly získány v průběhu nemoci a jsou tedy somatické (Meyer *et al.*, 2013). Mezi identifikované mutace cN-II patří například p.R367Q, p.R238W, p.L375F nebo p.K359Q. Tyto varianty enzymu vykazují vyšší enzymovou aktivitu *in vitro* než nemutovaná verze proteinu. Předpokládá se, že cN-II katalyzuje defosforylaci biologicky aktivních thiopurinových metabolitů ve formě NMP, a tím je deaktivuje (Obrázek 10). Vyšší aktivita enzymu pak nejspíše vede k rychlejší degradaci těchto látek. Leukemické buňky kódující zmíněné hyperaktivní mutantní varianty cN-II tak vykazují rezistenci vůči thiopurinovým chemoterapeutikům (Tzoneva *et al.*, 2013).



Obrázek 10: Schéma předpokládané reakce, kterou cN-II ovlivňuje hladinu metabolitů thiopurinu v buňce.

cN-II pravděpodobně defosforyluje 6-thio-2'-deoxyguanosin 5'-monofosfát a 6-thioguanosin 5'-monofosfát na příslušné nukleosidy, čímž nepřímo snižuje i koncentraci trifosfátových forem těchto látek, které zprostředkovávají cytotoxický účinek léčiva svou inkorporací do DNA a RNA. Vysvětlivky zkratk: cN-II – cytosolická 5'-nukleotidasa II (IMP/GMP specifická). Reakční schéma bylo vytvořeno v programu ChemBioDraw Ultra 14.0 (Cambridge Soft, Cambridge, MA, USA).

Podrobněji se na mechanismus vzniku lékové rezistence a evoluci klonů lymfomu zaměřili Kunz *et al.* (2015) a Ma *et al.* (2015). Ti zkoumali vznik mutací v genech pro různé proteiny (cN-II, proteiny některých signálních kaskád či proteiny zodpovědné za metylaci promotorových oblastí) u pacientů s ALL. U pacientů byly analyzovány buňky pocházející z prekursorů B-lymfocytů (Ma *et al.*, 2015) i T-lymfocytů (Kunz *et al.*, 2015), a to od diagnózy až po recidivu onemocnění. Původcem relapsu byl často jen jediný klon buněk, který díky konkrétní mutaci (např. právě v cN-II) dokázal vzdorovat léčbě. Mutace ve výše zmíněných proteinech pak měly tendenci vyskytovat se v určitých „klastrech“. Mutantní varianty cN-II však byly detekovány téměř výhradně až během relapsu, což znamená, že se neúčastní primární leukemické transformace, ale jejich vznik byl pravděpodobně indukován léčbou používanými chemoterapeutiky.

Pro bližší vysvětlení mechanismu lékové rezistence byla modulována exprese a aktivita cN-II v různých rakovinných buněčných liniích (Cividini *et al.*, 2015a; Cividini *et al.*, 2015b; Jordheim *et al.*, 2015). Linie leukemických buněk HL-60 byla transfekována vektorem, který zajistil sníženou expresi cN-II. Poté byly buňky vystaveny působení řady chemoterapeutických látek včetně 6-MP a 6-TG. Snížená aktivita cN-II měla za následek několikanásobné snížení hodnoty IC₅₀ (oproti kontrolním buňkám transfekovaným prázdným vektorem), což znamenalo zvýšení citlivosti buněk k těmto látkám (Jordheim *et al.*, 2015). Cytotoxicita chemoterapeutik byla také testována i na buňkách ADF glioblastomu, které stabilně produkovaly suprafyziologické množství cN-II. Změna IC₅₀ pro 6-MP v těchto buňkách nebyla signifikantní, byla však pozorována pro některé jiné testované látky využívané v chemoterapiích, například

pro fludarabin či cisplatinu (Cividini *et al.*, 2015a). Výsledky těchto studií poukazují na význam aktivity cN-II a jejích změn v chemoterapiích.

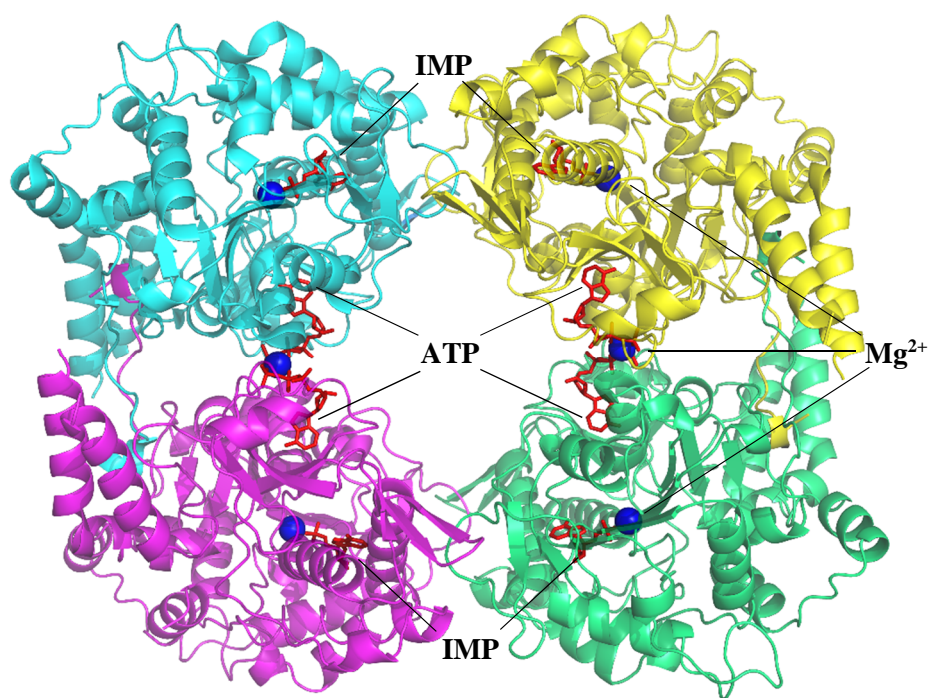
Genetické studie ukázaly, že selektivní inhibice mutantní cN-II by mohla představovat novou léčebnou strategii. K návrhu účinných inhibitorů ale chybí znalost strukturně-funkčních mechanismů, které vedou ke zvýšené aktivitě mutantů. K modelování struktury mutantních variant však může být využita struktura cN-II odpovídající proteinu s normální fyziologickou aktivitou, která již byla vyřešena. Wallden *et al.* (2007) nejprve získali strukturu bez substrátu s ligandy BeF_3^- a adenosinem. Wallden a Nordlund (2011) později popsali strukturu komplexu enzymu se substráty a s alosterickými aktivátory, a to na neaktivní variantě cN-II p.D52N, se kterou bylo možno studovat vazbu se substrátem navázaným v aktivním místě.

Funkční cN-II je tvořena tetramerem složeným ze dvou identických dimerů (Obrázek 11). Jedním z běžných strukturních rysů HAD rodiny, kam cN-II patří, je tzv. α/β středová doména Rossmanova typu a doména tvořená svazkem čtyř α -helixů. V cN-II se tato doména skládá z osmi antiparalelních řetězců β -skládaného listu obklopených osmi α -helixy. Její součástí jsou také strukturní motivy typické pro intracelulární 5'-NT (Obrázek 8A), středová doména cN-II však obsahuje navíc pět dalších α -helixů a smyčkové struktury. Tyto úseky se nejspíše účastní interakcí na pomezí jednotlivých podjednotek či na vazbě efektorových molekul. Každá podjednotka proteinu pak obsahuje také menší tzv. čepičkovou doménu složenou ze svazku čtyř α -helixů, dvou antiparalelních β -skládaných listů (jednoho ze tří řetězců a druhého ze čtyř), dalšího α -helixu a dvou smyček (Wallden *et al.*, 2007).

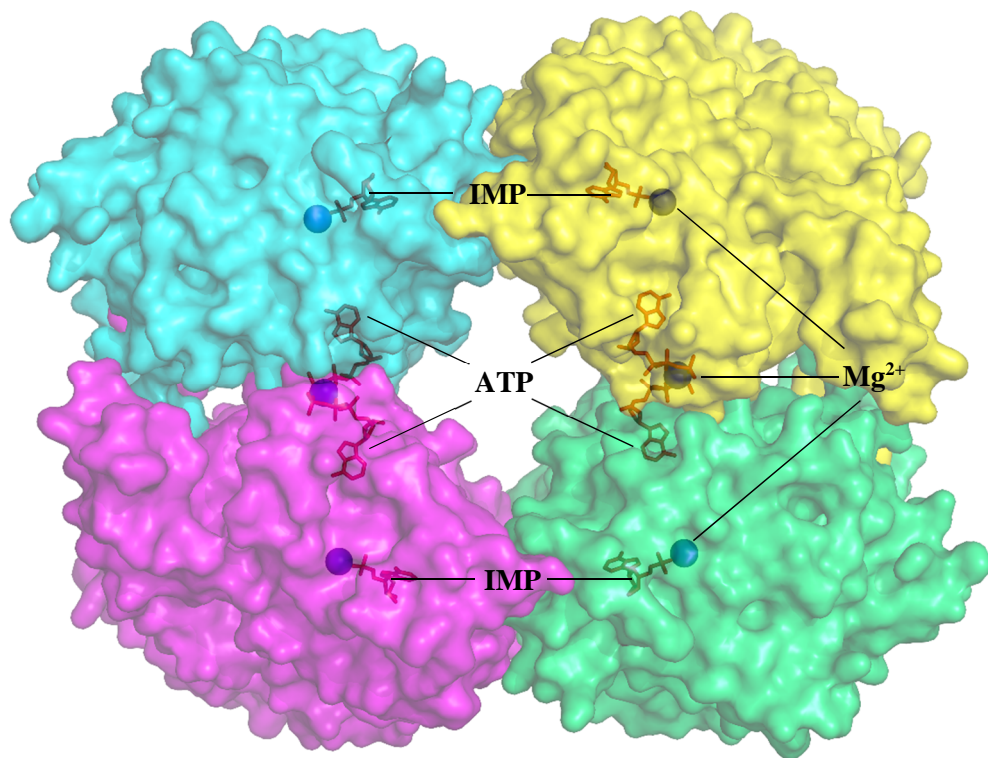
Aktivita cN-II je regulována alosterickými mechanismy, čímž se odlišuje od ostatních buněčných 5'-NT. Mezi aktivátory cN-II patří ATP, 2,3-bisfosfoglycerát, dATP (Spychala *et al.*, 1988) a dinukleosid 5'-polyfosfátové sloučeniny se čtyřmi až šesti fosfátovými skupinami (např. adenosin-5'-tetrafosfo-5'-adenosin) – (Marques *et al.*, 1998). Porovnáním struktury apoenzymu a komplexu s efektoem a substrátem popsali Wallden a Nordlund (2011) pravděpodobný mechanismus alosterické regulace enzymu. Ta je zprostředkována stabilizací α -helixu A elektrostatickými silami mezi fosfátovými skupinami efektoru (zde konkrétně ATP) a K362 a patrovými interakcemi mezi nukleobasí efektoru a F354, který se vysune z aktivního místa. Do aktivního místa se naopak dostane R356 z motivu IV a další aminokyselinové zbytky z motivu III, které jsou přímo zapojené do enzymové katalýzy a jejichž reorientace zvyšuje aktivitu cN-II (Wallden a Nordlund, 2011).

Na základě strukturního mapování jednotlivých mutací cN-II za použití známé struktury byla vyslovena hypotéza, že mutace cN-II způsobující hyperaktivitu stabilizují protein ve stavu podobném jako po navázání efektoru a protein pak ke své plné katalytické aktivitě efektor již nepotřebuje (Meyer *et al.*, 2013; Tzoneva *et al.*, 2013). Mechanismus vlivu mutace p.K359Q na strukturu a funkci proteinu je jako jediný odvoditelný ze známé struktury cN-II. Dle analýzy Tzoneva *et al.* (2013) by tato mutace měla přispět ke stabilitě α -helixu A, zabránit přístupu molekul solventu do aktivního místa a posunout do něj zbytek R356. Mechanismus aktivace a zvýšení aktivity, jež bylo například pro variantu p.R367Q až osmnáctinásobné, zůstává pro ostatní varianty enzymu nejasný. Hlubší vhled do tohoto problému by mohla vnést znalost 3D struktury daných variant cN-II s rozlišením na atomové úrovni.

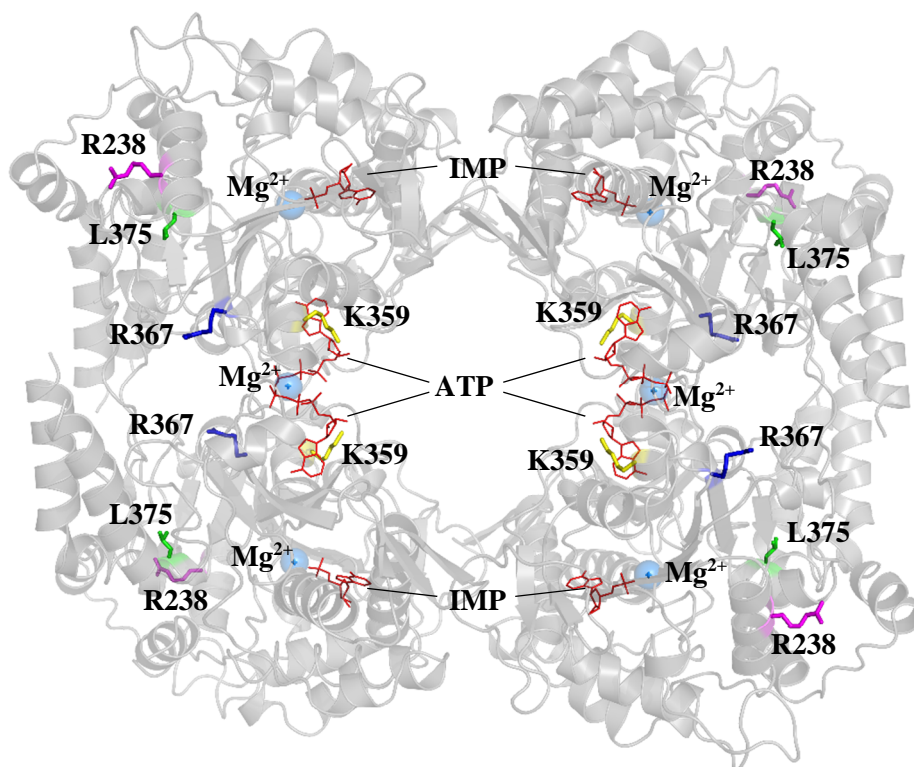
(A)



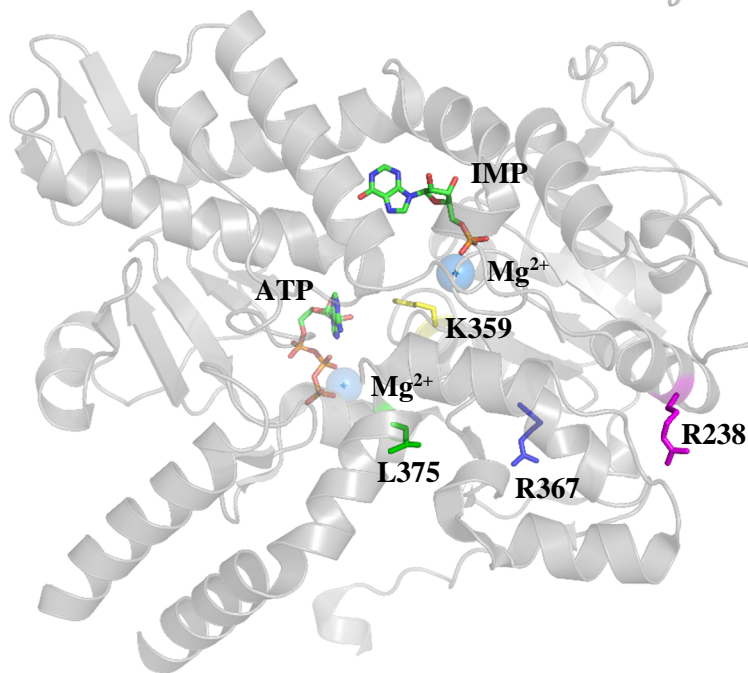
(B)



(C)



(D)



Obrázek 11: Krystalová struktura cN-II p.D52N.

(A) Stuhové zobrazení tetrameru cN-II s navázanými molekulami ATP v efektorovém místě na rozhraní protomerů, substrátem IMP v aktivním místě a hořečnatými kationty a barevně odlišenými podjednotkami; (B) struktura tetrameru cN-II zobrazená jako vodě přístupný povrch – je patrná orientace hořečnatých kationtů vůči fosfátovým skupinám ATP a IMP; (C) lokalizace nejčastěji se vyskytujících mutací v tetrameru cN-II; (D) lokalizace nejčastějších mutací v jedné podjednotce cN-II a bližší pohled na relativní pozici mutací vzhledem k aktivnímu a efektorovému místu. Vysvětlivky zkratk: cN-II – cytosolická 5'-nukleotidasa II (IMP/GMP specifická); IMP – inosin 5'-monofosfát. Obrázek byl připraven v programu PyMOL verze 1.5.0.1. (DeLano Scientific LLC, San Francisco, CA, USA) za použití souboru PDB ID 2XCW (Wallden a Nordlund, 2011; RCSB PDB, 2016).

6 Závěr

Vzhledem k širokému uplatnění thiopurinových medikamentů v léčbě leukemií, onemocnění imunitního charakteru, jako jsou Crohnova choroba a ulcerózní kolitida, a při transplantacích orgánů, je vyvíjena co největší snaha minimalizovat možná rizika spojená s jejich podáváním. Genetické varianty enzymů thiopurinového metabolismu u pacientů významně ovlivňují výsledek thiopurinové terapie. Hledání těchto variant prostřednictvím analýz genomu a exomu je tak věnována velká pozornost. Následné mapování výskytu genetických variant v populaci může napomoci vyvinout protokol pro odpovídající úpravu léčebného postupu podle genotypu relevantních genů. Metody strukturní biologie pak pomáhají interpretovat data získaná v rámci genetických studií a mohou poskytnout vysvětlení vlivu jednotlivých SNP na strukturu a funkci proteinu.

Ze známých enzymů thiopurinového metabolismu, jejichž mutace ovlivňují snášenlivost terapie, je nejlépe prostudována TPMT. Předpokládaným mechanismem vlivu mutantních variant TPMT je špatné sbalení proteinu a jeho následná degradace. Mutantní varianty TPMT jsou rozšířené v etnických skupinách evropského a afrického původu a dávkování thiopurinových léčiv je dnes běžně stanovováno na základě genotypizace pacienta. Tento terapeutický postup tak nejlépe demonstruje význam farmakogenetických studií pro klinickou praxi. Zásadním objevem pro preciznější personalizovanou léčbu thiopuriny se může stát nedávná identifikace mutantních variant NUDT15, které byly zejména u asijské populace označeny jako klíčový faktor pro snášenlivost thiopurinové terapie. Molekulární mechanismy stojící za výskytem závažných nežádoucích účinků u pacientů s mutantní NUDT15 však nejsou dosud známy. Na základě publikovaných výsledků lze říci, že mutantní varianty NUDT15 stejně jako TPMT jsou spojeny s vyšší hladinou cytotoxických látek, která je zapříčiněna pomalejší přeměnou thiopurinů na neaktivní metabolity. Jiným významným genetickým faktorem pro efektivní léčbu thiopuriny jsou somatické mutace v genu pro cN-II, které způsobují rezistenci vůči léčbě a vedou k recidivám onemocnění. Vysvětlení chemorezistence leukemických buněk s hyperaktivní cN-II je ale na molekulární úrovni stále nejasné.

V této práci byly shrnuty dosavadní poznatky o metabolismu thiopurinových léčiv a jeho změnách vlivem genetických variant zúčastněných enzymů. Hlavním zaměřením práce bylo využití strukturní biologie k interpretaci efektu mutantních variant, které mají dopad na průběh léčby thiopurinovými deriváty. Kinetické studie zmíněných proteinů společně s vyřešením trojrozměrných struktur jednotlivých alelických variant mohou napomoci lepšímu pochopení

molekulárních mechanismů vedoucích k odlišné odezvě na léčbu. Tyto znalosti pak mohou významně přispět k účinnější a bezpečnější terapii thiopurinovými analogy.

7 Literatura

*přehledové články a sekundární zdroje

AARBAKKE, J., JANKA-SCHAUB, G. & ELION, G. B. 1997. Thiopurine biology and pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences*, 18, 3-7.*

AL MARUF, A., WAN, L. & O'BRIEN, P. J. 2014. Evaluation of azathioprine-induced cytotoxicity in an in vitro rat hepatocyte system. *BioMed Research International*, 2014, 379748.

ALMOGUERA, B., VAZQUEZ, L., CONNOLLY, J. J., BRADFIELD, J., SLEIMAN, P., KEATING, B. & HAKONARSON, H. 2014. Imputation of TPMT defective alleles for the identification of patients with high-risk phenotypes. *Frontiers in Genetics*, 5, 96.

AMES, B. N., CATHCART, R., SCHWIERS, E. & HOCHSTEIN, P. 1981. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78, 6858-6862.

AMEYAW, M.-M., COLLIE-DUGUID, E. S. R., POWRIE, R. H., OFORI-ADJEI, D. & MCLEOD, H. L. 1999. Thiopurine Methyltransferase Alleles in British and Ghanaian Populations. *Human Molecular Genetics*, 8, 367-370.

AMICI, A., EMANUELLI, M., MAGNI, G., RAFFAELLI, N. & RUGGIERI, S. 1997. Pyrimidine nucleotidases from human erythrocyte possess phosphotransferase activities specific for pyrimidine nucleotides. *FEBS Letters*, 419, 263-267.

APPELL, M. L., BERG, J., DULEY, J., EVANS, W. E., KENNEDY, M. A., LENNARD, L., MARINAKI, T., MCLEOD, H. L., RELLING, M. V., SCHAEFFELER, E., SCHWAB, M., WEINSHILBOUM, R., YEOH, A. E. J., MCDONAGH, E. M., HEBERT, J. M., KLEIN, T. E. & COULTHARD, S. A. 2013. Nomenclature for alleles of the thiopurine methyltransferase gene. *Pharmacogenetics and Genomics*, 23, 242-248.

ASADA, A., NISHIDA, A., SHIOYA, M., IMAEDA, H., INATOMI, O., BAMBA, S., KITO, K., SUGIMOTO, M. & ANDOH, A. 2016. NUDT15 R139C-related thiopurine leukocytopenia is mediated by 6-thioguanine nucleotide-independent mechanism in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *Journal of Gastroenterology*, 51, 22-29.

BAIOCCHI, C., PESI, R., CAMICI, M., ITOH, R. & GRAZI TOZZI, M. 1996. Mechanism of the reaction catalysed by cytosolic 5'-nucleotidase/phosphotransferase: formation of a phosphorylated intermediate. *Biochemical Journal*, 317, 797-801.

BANDITELLI, S., BAIOCCHI, C., PESI, R., ALLEGRINI, S., TURRIANI, M., IPATA, P. L., CAMICI, M. & TOZZI, M. G. 1996. The phosphotransferase activity of cytosolic 5'-nucleotidase; a purine analog phosphorylating enzyme. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 28, 711-720.

BARSOZZI, C., PESI, R., GIANNECCHINI, M. & IPATA, P. L. 2005. Evidence for the involvement of cytosolic 5'-nucleotidase (cN-II) in the synthesis of guanine nucleotides from xanthosine. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 13465-13469.

BIANCHI, V. & SPYCHALA, J. 2003. Mammalian 5'-nucleotidases. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 46195-46198.*

BRESNICK, E. 1959. The metabolism *in vitro* of antitumor imidazolyl derivatives of mercaptopurine. v: MITRA, A. K. & NARURKAR, M. M. 1986. Effect of mercaptan nucleophiles on the degradation of azathioprine in aqueous solution. *International Journal of Pharmaceutics*, 28, 119-124.*

- BRETONNET, A. S., JORDHEIM, L. P., DUMONTET, C. & LANCELIN, J. M. 2005. Regulation and activity of cytosolic 5'-nucleotidase II. *FEBS Letters*, 579, 3363-3368.*
- BURCHENAL, J. H., MURPHY, M. L., ELLISON, R. R., SYKES, M. P., TAN, T. C., LEONE, L. A., KARNOF-SKY, D. A., CRAVER, L. F., DARGEON, H. W. & RHOADS, C. P. 1953. Clinical evaluation of a new antimetabolite, 6-mercaptopurine, in the treatment of leukemia and allied diseases. *Blood*, 8, 965-999.
- CAI, J.-P., ISHIBASHI, T., TAKAGI, Y., HAYAKAWA, H. & SEKIGUCHI, M. 2003. Mouse MTH2 protein which prevents mutations caused by 8-oxoguanine nucleotides. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 305, 1073-1077.
- CARTER, M., JEMTH, A. S., HAGENKORT, A., PAGE, B. D., GUSTAFSSON, R., GRIESE, J. J., GAD, H., VALERIE, N. C., DESROSES, M., BOSTROM, J., WARPMAN BERGLUND, U., HELLEDAY, T. & STENMARK, P. 2015. Crystal structure, biochemical and cellular activities demonstrate separate functions of MTH1 and MTH2. *Nature Communications*, 6, 7871.
- CIVIDINI, F., CROS-PERRIAL, E., PESI, R., MACHON, C., ALLEGRINI, S., CAMICI, M., DUMONTET, C., JORDHEIM, L. P. & TOZZI, M. G. 2015a. Cell proliferation and drug sensitivity of human glioblastoma cells are altered by the stable modulation of cytosolic 5'-nucleotidase II. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 65, 222-229.
- CIVIDINI, F., FILONI, D. N., PESI, R., ALLEGRINI, S., CAMICI, M. & TOZZI, M. G. 2015b. IMP-GMP specific cytosolic 5'-nucleotidase regulates nucleotide pool and prodrug metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1850, 1354-1361.
- CLARK, P. A., HSIA, Y. E. & HUNTSMAN, R. G. 1960. Toxic complications of treatment with 6-mercaptopurine; two cases with hepatic necrosis and intestinal ulceration. *British Medical Journal*, 1, 393-395.
- COLLIE-DUGUID, E. S., PRITCHARD, S. C., POWRIE, R. H., SLUDDEN, J., COLLIER, D. A., LI, T. & MCLEOD, H. L. 1999. The frequency and distribution of thiopurine methyltransferase alleles in Caucasian and Asian populations. *Pharmacogenetics*, 9, 37-42.
- CONNELL, W. R., KAMM, M. A., RITCHIE, J. K. & LENNARD-JONES, J. E. 1993. Bone marrow toxicity caused by azathioprine in inflammatory bowel disease: 27 years of experience. *Gut*, 34, 1081-1085.
- EINHORN, M. & DAVIDSOHN, I. 1964. Hepatotoxicity of mercaptopurine. *The Journal of the American Medical Association*, 188, 802-806.
- EKLUND, B. I., MOBERG, M., BERGQUIST, J. & MANNERVIK, B. 2006. Divergent activities of human glutathione transferases in the bioactivation of azathioprine. *Molecular Pharmacology*, 70, 747-754.
- EVANS, W. E., HORNER, M., CHU, Y. Q., KALWINSKY, D. & ROBERTS, W. M. 1991. Altered mercaptopurine metabolism, toxic effects, and dosage requirement in a thiopurine methyltransferase-deficient child with acute lymphocytic leukemia. *Journal of Pediatrics*, 119, 985-989.
- FAZEL-NAJAFABADI, E., VAHDAT AHAR, E., FATTAHPOUR, S. & SEDGHI, M. 2015. Structural and functional impact of missense mutations in TPMT: An integrated computational approach. *Computational Biology and Chemistry*, 59, Part A, 48-55.
- FOTOOHI, A. K., COULTHARD, S. A. & ALBERTIONI, F. 2010. Thiopurines: Factors influencing toxicity and response. *Biochemical Pharmacology*, 79, 1211-1220.*
- FOX, I. H. 1981. Metabolic basis for disorders of purine nucleotide degradation. *Metabolism*, 30, 616-634.*

- GALMARINI, C. M., JORDHEIM, L. & DUMONTET, C. 2003. Role of IMP-selective 5'-nucleotidase (cN-II) in hematological malignancies. *Leukemia & Lymphoma*, 44, 1105-1111.*
- GARAT, A., CAUFFIEZ, C., RENAULT, N., LO-GUIDICE, J. M., ALLORGE, D., CHEVALIER, D., HOUDRET, N., CHAVATTE, P., LORIOT, M. A., GALA, J. L. & BROLY, F. 2008. Characterisation of novel defective thiopurine S-methyltransferase allelic variants. *Biochemical Pharmacology*, 76, 404-415.
- HAMDAN-KHALIL, R., ALLORGE, D., LO-GUIDICE, J.-M., CAUFFIEZ, C., CHEVALIER, D., SPIRE, C., HOUDRET, N., LIBERSA, C., LHERMITTE, M., COLOMBEL, J.-F., GALA, J.-L. & BROLY, F. 2003. In vitro characterization of four novel non-functional variants of the thiopurine S-methyltransferase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 309, 1005-1010.
- HAMILTON, L. & ELION, G. B. 1954. The fate of 6-mercaptopurine in man. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 60, 304-314.
- HARTMAN, S. C. & BUCHANAN, J. M. 1959. Nucleic acids, purines, pyrimidines (nucleotide synthesis). *Annual Review of Biochemistry*, 28, 365-410.*
- HORI, M., SATOU, K., HARASHIMA, H. & KAMIYA, H. 2010. Suppression of mutagenesis by 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate (7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate) by human MTH1, MTH2, and NUDT5. *Free Radical Biology and Medicine*, 48, 1197-1201.
- CHALMERS, A. H. 1974. Studies on the mechanism of formation of 5-mercapto-1-methyl-4-nitroimidazole, a metabolite of the immunosuppressive drug azathioprine. *Biochemical Pharmacology*, 23, 1891-1901.
- CHIENGTHONG, K., ITTIWUT, C., MUENSRI, S., SOPHONPHAN, J., SOSOTHIKUL, D., SEKSAN, P., SUPPIPAT, K., SUPHAPEETIPORN, K. & SHOTELERSUK, V. 2016. NUDT15 c.415C>T increases risk of 6-mercaptopurine induced myelosuppression during maintenance therapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 101, e24-26.
- CHOUGHULE, K. V., BARNABA, C., JOSWIG-JONES, C. A. & JONES, J. P. 2014. In vitro oxidative metabolism of 6-mercaptopurine in human liver: insights into the role of the molybdoflavoenzymes aldehyde oxidase, xanthine oxidase, and xanthine dehydrogenase. *Drug Metabolism and Disposition*, 42, 1334-1340.
- ITO, R., SEKIGUCHI, M., SETOYAMA, D., NAKATSU, Y., YAMAGATA, Y. & HAYAKAWA, H. 2011. Cleavage of oxidized guanine nucleotide and ADP sugar by human NUDT5 protein. *Journal of Biochemistry*, 149, 731-738.
- ITOH, R. 1981. Purification and some properties of cytosol 5'-nucleotidase from rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta*, 657, 402-410.
- JIRICNY, J. 2013. Postreplicative mismatch repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5, a012633.*
- JOHNSON, M. A. & FRIDLAND, A. 1989. Phosphorylation of 2',3'-dideoxyinosine by cytosolic 5'-nucleotidase of human lymphoid cells. *Molecular Pharmacology*, 36, 291-295.
- JORDHEIM, L. P., PUY, J.-Y., CROS-PERRIAL, E., PEYROTTE, S., LEFEBVRE, I., PÉRIGAUD, C. & DUMONTET, C. 2015. Determination of the enzymatic activity of cytosolic 5'-nucleotidase cN-II in cancer cells: development of a simple analytical method and related cell line models. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407, 5747-5758.
- KELLER, P. M., MCKEE, S. A. & FYFE, J. A. 1985. Cytoplasmic 5'-nucleotidase catalyzes acyclovir phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 260, 8664-8667.

- KERSTENS, P. J. S. M., STOLK, J. N., DE ABREU, R. A., LAMBOOY, L. H. J., VAN PUTTE, L. B. A. D. & BOERBOOMS, A. A. M. T. 1995. Azathioprine-related bone marrow toxicity and low activities of purine enzymes in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 38, 142-145.
- KIM, H. Y., LEE, S. H., LEE, M. N., KIM, J. W., KIM, Y. H., KIM, M. J., LEE, Y. M., KANG, B., CHOE, Y. H., LEE, N. H., KIM, D. H., YOO, K. H., SUNG, K. W., LEE, S. Y. & KOO, H. H. 2015. Complete sequence-based screening of TPMT variants in the Korean population. *Pharmacogenetics and Genomics*, 25, 143-146.
- KRYNETSKI, E. Y., SCHUETZ, J. D., GALPIN, A. J., PUI, C. H., RELLING, M. V. & EVANS, W. E. 1995. A single point mutation leading to loss of catalytic activity in human thiopurine S-methyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 949-953.
- KUNZ, J. B., RAUSCH, T., BANDAPALLI, O. R., EILERS, J., PECHANSKA, P., SCHUESSELE, S., ASSENOV, Y., STÜTZ, A. M., KIRSCHNER-SCHWABE, R., HOF, J., ECKERT, C., VON STACKELBERG, A., SCHRAPPE, M., STANULLA, M., KOEHLER, R., AVIGAD, S., ELITZUR, S., HANDGRETINGER, R., BENES, V., WEISCHENFELDT, J., KORBEL, J. O., MUCKENTHALER, M. U. & KULOZIK, A. E. 2015. Pediatric T-cell lymphoblastic leukemia evolves into relapse by clonal selection, acquisition of mutations and promoter hypomethylation. *Haematologica*, 100, 1442-1450.
- LANE, A. N. & FAN, T. W.-M. 2015. Regulation of mammalian nucleotide metabolism and biosynthesis. *Nucleic Acids Research*, 43, 2466-2485.*
- LENNARD, L., REES, C. A., LILLEYMAN, J. S. & MADDOCKS, J. L. 1983. Childhood leukaemia: a relationship between intracellular 6-mercaptopurine metabolites and neutropenia. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 16, 359-363.
- LENNARD, L., VAN LOON, J. A., LILLEYMAN, J. S. & WEINSHILBOUM, R. M. 1987. Thiopurine pharmacogenetics in leukemia: Correlation of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity and 6-thioguanine nucleotide concentrations. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 41, 18-25.
- LENNARD, L., VAN LOON, J. A. & WEINSHILBOUM, R. M. 1989. Pharmacogenetics of acute azathioprine toxicity: Relationship to thiopurine methyltransferase genetic polymorphism. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 46, 149-154.
- LI LOO, T., MICHAEL, M. E., GARCEAU, A. J. & REID, J. C. 1959. 6-Thiouric acid – a metabolite of 6-mercaptopurine. *Journal of the American Chemical Society*, 81, 3039-3041.
- LIANG, D. C., YANG, C. P., LIU, H. C., JAING, T. H., CHEN, S. H., HUNG, I. J., YEH, T. C., LIN, T. H., LAI, C. L., LAI, C. Y. & SHIH, L. Y. 2015. NUDT15 gene polymorphism related to mercaptopurine intolerance in Taiwan Chinese children with acute lymphoblastic leukemia. *The Pharmacogenomics Journal*.
- MA, X., EDMONSON, M., YERGEAU, D., MUZNY, D. M., HAMPTON, O. A., RUSCH, M., SONG, G., EASTON, J., HARVEY, R. C., WHEELER, D. A., MA, J., DODDAPANENI, H., VADODARIA, B., WU, G., NAGAHAWATTE, P., CARROLL, W. L., CHEN, I. M., GASTIER-FOSTER, J. M., RELLING, M. V., SMITH, M. A., DEVIDAS, M., GUIDRY AUVIL, J. M., DOWNING, J. R., LOH, M. L., WILLMAN, C. L., GERHARD, D. S., MULLIGHAN, C. G., HUNGER, S. P. & ZHANG, J. 2015. Rise and fall of subclones from diagnosis to relapse in pediatric B-acute lymphoblastic leukaemia. *Nature Communications*, 6, 6604.
- MAKI, H. & SEKIGUCHI, M. 1992. MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature*, 355, 273-275.

- MARQUES, A. F. P., TEIXEIRA, N. A., GAMBARETTO, C., SILLERO, A. & GÜNTHER SILLERO, M. A. 1998. IMP-GMP 5'-nucleotidase from rat brain: Activation by polyphosphates. *Journal of Neurochemistry*, 71, 1241-1250.
- MCLEOD, H. L., KRYNETSKI, E. Y., RELING, M. V. & EVANS, W. E. 2000. Genetic polymorphism of thiopurine methyltransferase and its clinical relevance for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 14, 567-572.*
- MCLEOD, H. L., LIN, J.-S., SCOTT, E. P., PUI, C.-H. & EVANS, W. E. 1994. Thiopurine methyltransferase activity in American white subjects and black subjects. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 55, 15-20.
- MEYER, J. A., WANG, J., HOGAN, L. E., YANG, J. J., DANDEKAR, S., PATEL, J. P., TANG, Z., ZUMBO, P., LI, S., ZAVADIL, J., LEVINE, R. L., CARDOZO, T., HUNGER, S. P., RAETZ, E. A., EVANS, W. E., MORRISON, D. J., MASON, C. E. & CARROLL, W. L. 2013. Relapse specific mutations in NT5C2 in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics*, 45, 290-294.
- MO, J. Y., MAKI, H. & SEKIGUCHI, M. 1992. Hydrolytic elimination of a mutagenic nucleotide, 8-oxodGTP, by human 18-kilodalton protein: sanitization of nucleotide pool. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 11021-11025.
- MOKMAK, W., TONGSIMA, S. & JENWITHEESUK, E. 2009. Molecular dynamics simulation of a human thiopurine S-methyltransferase complexed with 6-mercaptopurine model. *Bioinformation*, 4, 59-62.
- MORIYAMA, T., NISHII, R., PEREZ-ANDREU, V., YANG, W., KLUSSMANN, F. A., ZHAO, X., LIN, T. N., HOSHITSUKI, K., NERSTING, J., KIHARA, K., HOFMANN, U., KOMADA, Y., KATO, M., MCCORKLE, R., LI, L., KOH, K., NAJERA, C. R., KHAM, S. K., ISOBE, T., CHEN, Z., CHIEW, E. K., BHOJWANI, D., JEFFRIES, C., LU, Y., SCHWAB, M., INABA, H., PUI, C. H., RELING, M. V., MANABE, A., HORI, H., SCHMIEGELOW, K., YEOH, A. E., EVANS, W. E. & YANG, J. J. 2016. NUDT15 polymorphisms alter thiopurine metabolism and hematopoietic toxicity. *Nature Genetics*, 48, 367-373.
- NYHAN, W. L. 2001. Nucleotide synthesis via salvage pathway. *eLS*. John Wiley & Sons, Ltd.*
- OTTERNESS, D. M., SZUMLANSKI, C. L., WOOD, T. C. & WEINSHILBOUM, R. M. 1998. Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics. Kindred with a terminal exon splice junction mutation that results in loss of activity. *Journal of Clinical Investigation*, 101, 1036-1044.
- PELIN, M., DE IUDICIBUS, S., LONDERO, M., SPIZZO, R., DEI ROSSI, S., MARTELOSSI, S., VENTURA, A., DECORTI, G. & STOCCO, G. 2016. Thiopurine biotransformation and pharmacological effects: contribution of oxidative stress. *Current Drug Metabolism*, 17, 542-549.*
- PENG, Y., FENG, Q., WILK, D., ADJEI, A. A., SALAVAGGIONE, O. E., WEINSHILBOUM, R. M. & YEE, V. C. 2008. Structural basis of substrate recognition in thiopurine s-methyltransferase. *Biochemistry*, 47, 6216-6225.
- PESI, R., ALLEGRINI, S., CAREDDU, M. G., FILONI, D. N., CAMICI, M. & TOZZI, M. G. 2010. Active and regulatory sites of cytosolic 5'-nucleotidase. *FEBS Journal*, 277, 4863-4872.
- PIETERS, R., HUISMANS, D. R., LOONEN, A. H., PETERS, G. J., HAHLEN, K., VAN DER DOES-VAN DEN BERG, A., VAN WERING, E. R. & VEERMAN, A. J. 1992. Relation of 5'-nucleotidase and phosphatase activities with immunophenotype, drug resistance and clinical prognosis in childhood leukemia. *Leukemia Research*, 16, 873-880.
- RAPPAPORT, H. P. 1993. Replication of the base pair 6-thioguanine/5-methyl-2-pyrimidine with the large Klenow fragment of Escherichia coli DNA polymerase I. *Biochemistry*, 32, 3047-3057.

- RASHIDI, M.-R., BEEDHAM, C., SMITH, J. S. & DAVARAN, S. 2007. In vitro study of 6-mercaptapurine oxidation catalysed by aldehyde oxidase and xanthine oxidase. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 22, 299-306.
- RELLING, M. V., GARDNER, E. E., SANDBORN, W. J., SCHMIEGELOW, K., PUI, C. H., YEE, S. W., STEIN, C. M., CARRILLO, M., EVANS, W. E. & KLEIN, T. E. 2011. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 89, 387-391.
- REMY, C. N. 1963. Metabolism of thiopyrimidines and thiopurines: S-Methylation with S-adenosylmethionine transmethylase and catabolism in mammalian tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 238, 1078-1084.
- SAHASRANAMAN, S., HOWARD, D. & ROY, S. 2008. Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 64, 753-767.*
- SATOU, K., KAWAI, K., KASAI, H., HARASHIMA, H. & KAMIYA, H. 2007. Mutagenic effects of 8-hydroxy-dGTP in live mammalian cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 42, 1552-1560.
- SCHAEFFELER, E., FISCHER, C., BROCKMEIER, D., WERNET, D., MOERIKE, K., EICHELBAUM, M., ZANGER, U. M. & SCHWAB, M. 2004. Comprehensive analysis of thiopurine S-methyltransferase phenotype-genotype correlation in a large population of German-Caucasians and identification of novel TPMT variants. *Pharmacogenetics*, 14, 407-417.
- SCHAEFFELER, E., ZANGER, U. M., EICHELBAUM, M., ASANTE-POKU, S., SHIN, J.-G. & SCHWAB, M. 2008. Highly multiplexed genotyping of thiopurine S-methyltransferase variants using MALDI-TOF mass spectrometry: Reliable genotyping in different ethnic groups. *Clinical Chemistry*, 54, 1637-1647.
- SKRZYPCZAK-ZIELINSKA, M., BORUN, P., MILANOWSKA, K., JAKUBOWSKA-BUREK, L., ZAKERSKA, O., DOBROWOLSKA-ZACHWIEJA, A., PLAWSKI, A., FROSTER, U. G., SZALATA, M. & SLOMSKI, R. 2013. High-resolution melting analysis of the TPMT gene: A study in the Polish population. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 17, 153-159.
- SMITH, M. A., MARINAKI, A. M., ARENAS, M., SHOBOWALE-BAKRE, M., LEWIS, C. M., ANSARI, A., DULEY, J. & SANDERSON, J. D. 2009. Novel pharmacogenetic markers for treatment outcome in azathioprine-treated inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 30, 375-384.
- SPIRE-VAYRON DE LA MOUREYRE, C., DEBUYSÈRE, H., SABBAGH, N., MAREZ, D., VINNER, E., CHEVALIER, E. D., GUIDICE, J.-M. L. & BROLY, F. 1998. Detection of known and new mutations in the thiopurine S-methyltransferase gene by single-strand conformation polymorphism analysis. *Human Mutation*, 12, 177-185.
- SPYCHALA, J., MADRID-MARINA, V. & FOX, I. H. 1988. High Km soluble 5'-nucleotidase from human placenta. Properties and allosteric regulation by IMP and ATP. *The Journal of Biological Chemistry*, 263, 18759-18765.
- SWANN, P. F., WATERS, T. R., MOULTON, D. C., XU, Y.-Z., ZHENG, Q., EDWARDS, M. & MACE, R. 1996. Role of postreplicative DNA mismatch repair in the cytotoxic action of thioguanine. *Science*, 273, 1109-1111.
- TAI, H.-L., KRYNETSKI, E. Y., SCHUETZ, E. G., YANISHEVSKI, Y. & EVANS, W. E. 1997. Enhanced proteolysis of thiopurine S-methyltransferase (TPMT) encoded by mutant alleles in humans (TPMT*3A, TPMT*2): Mechanisms for the genetic polymorphism of TPMT activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 6444-6449.

- TAI, H. L., KRYNETSKI, E. Y., YATES, C. R., LOENNECHEN, T., FESSING, M. Y., KRYNETSKAIA, N. F. & EVANS, W. E. 1996. Thiopurine S-methyltransferase deficiency: two nucleotide transitions define the most prevalent mutant allele associated with loss of catalytic activity in Caucasians. *The American Journal of Human Genetics*, 58, 694-702.
- TAKAGI, Y., SETOYAMA, D., ITO, R., KAMIYA, H., YAMAGATA, Y. & SEKIGUCHI, M. 2012. Human MTH3 (NUDT18) protein hydrolyzes oxidized forms of guanosine and deoxyguanosine diphosphates: comparison with MTH1 and MTH2. *The Journal of Biological Chemistry*, 287, 21541-21549.
- TANAKA, Y., MANABE, A., NAKADATE, H., KONDOH, K., NAKAMURA, K., KOH, K., UTANO, T., KIKUCHI, A. & KOMIYAMA, T. 2012. The activity of the inosine triphosphate pyrophosphatase affects toxicity of 6-mercaptopurine during maintenance therapy for acute lymphoblastic leukemia in Japanese children. *Leukemia Research*, 36, 560-564.
- TAY, B. S., LILLEY, R. M., MURRAY, A. W. & ATKINSON, M. R. 1969. Inhibition of phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase from Ehrlich ascites-tumour cells by thiopurine nucleotides. *Biochemical Pharmacology*, 18, 936-938.
- TIDD, D. M. & PATERSON, A. R. P. 1974. A biochemical mechanism for the delayed cytotoxic reaction of 6-mercaptopurine. *Cancer Research*, 34, 738-746.
- TURRIANI, M., PESI, R., NARDONE, A., TURCHI, G., SGARRELLA, F., IPATA, P. L. & TOZZI, M. G. 1994. Cytosolic 5'-nucleotidase/nucleoside phosphotransferase: A nucleoside analog activating enzyme? *Journal of Biochemical Toxicology*, 9, 51-57.
- TZONEVA, G., PEREZ-GARCIA, A., CARPENTER, Z., KHIABANIAN, H., TOSELLO, V., ALLEGRETTA, M., PAIETTA, E., RACEVSKIS, J., ROWE, J. M., TALLMAN, M. S., PAGANIN, M., BASSO, G., HOF, J., KIRSCHNER-SCHWABE, R., PALOMERO, T., RABADAN, R. & FERRANDO, A. 2013. Activating mutations in the NT5C2 nucleotidase gene drive chemotherapy resistance in relapsed ALL. *Nature Medicine*, 19, 368-371.
- WALLDEN, K. & NORDLUND, P. 2011. Structural basis for the allosteric regulation and substrate recognition of human cytosolic 5'-nucleotidase II. *Journal of Molecular Biology*, 408, 684-696.
- WALLDEN, K., STENMARK, P., NYMAN, T., FLODIN, S., GRASLUND, S., LOPPNAU, P., BIANCHI, V. & NORDLUND, P. 2007. Crystal structure of human cytosolic 5'-nucleotidase II: insights into allosteric regulation and substrate recognition. *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 17828-17836.
- WAN ROSALINA, W. R., TEH, L. K., MOHAMAD, N., NASIR, A., YUSOFF, R., BABA, A. A. & SALLEH, M. Z. 2012. Polymorphism of ITPA 94C>A and risk of adverse effects among patients with acute lymphoblastic leukaemia treated with 6-mercaptopurine. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 37, 237-241.
- WANG, L., NGUYEN, T. V., MCLAUGHLIN, R. W., SIKKINK, L. A., RAMIREZ-ALVARADO, M. & WEINSHILBOUM, R. M. 2005. Human thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: variant allozyme misfolding and aggregates formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 9394-9399.
- WARREN, D. J., ANDERSEN, A. & SLØRDAL, L. 1995. Quantitation of 6-thioguanine residues in peripheral blood leukocyte DNA obtained from patients receiving 6-mercaptopurine-based maintenance therapy. *Cancer Research*, 55, 1670-1674.
- WATANABE, A., HOBARA, N. & NAGASHIMA, H. 1978. Demonstration of enzymatic activity converting azathioprine to 6-mercaptopurine. *Acta Medica Okayama*, 32, 173-179.

WEINSHILBOUM, R. M., RAYMOND, F. A. & PAZMINO, P. A. 1978. Human erythrocyte thiopurine methyltransferase: radiochemical microassay and biochemical properties. *Clinica Chimica Acta*, 85, 323-333.

WEINSHILBOUM, R. M. & SLADEK, S. L. 1980. Mercaptopurine pharmacogenetics: Monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *American Journal of Human Genetics*, 32, 651-662.

WORKU, Y. & NEWBY, A. C. 1982. Nucleoside exchange catalysed by the cytoplasmic 5'-nucleotidase. *Biochemical Journal*, 205, 503-510.

WORKU, Y. & NEWBY, A. C. 1983. The mechanism of adenosine production in rat polymorphonuclear leucocytes. *Biochemical Journal*, 214, 325-330.

WU, H., HORTON, J. R., BATTAILE, K., ALLALI-HASSANI, A., MARTIN, F., ZENG, H., LOPPNAU, P., VEDADI, M., BOCHKAREV, A., PLOTNIKOV, A. N. & CHENG, X. 2007. Structural basis of allele variation of human thiopurine-S-methyltransferase. *Proteins*, 67, 198-208.

YANG, J. J., LANDIER, W., YANG, W., LIU, C., HAGEMAN, L., CHENG, C., PEI, D., CHEN, Y., CREWS, K. R., KORNEGAY, N., WONG, F. L., EVANS, W. E., PUI, C. H., BHATIA, S. & RELLING, M. V. 2015. Inherited NUDT15 variant is a genetic determinant of mercaptopurine intolerance in children with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 33, 1235-1242.

YANG, S. K., HONG, M., BAEK, J., CHOI, H., ZHAO, W., JUNG, Y., HARITUNIANS, T., YE, B. D., KIM, K. J., PARK, S. H., PARK, S. K., YANG, D. H., DUBINSKY, M., LEE, I., MCGOVERN, D. P., LIU, J. & SONG, K. 2014. A common missense variant in NUDT15 confers susceptibility to thiopurine-induced leukopenia. *Nature Genetics*, 46, 1017-1020.

YATES, C. R., KRYNETSKI, E. Y., LOENNECHEN, T., FESSING, M. Y., TAI, H.-L., PUI, C.-H., RELLING, M. V. & EVANS, W. E. 1997. Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: Genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. *Annals of Internal Medicine*, 126, 608-614.

ZIMMERMAN, T. P., CHU, L.-C., BUGGÉ, C. J. L., NELSON, D. J., LYON, G. M. & ELION, G. B. 1974. Identification of 6-methylmercaptopurine ribonucleoside 5'-diphosphate and 5'-triphosphate as metabolites of 6-mercaptopurine in man. *Cancer Research*, 34, 221-224.

Internetové zdroje

Appell, Malin Lindqvist. Thiopurine methyltransferase nomenclature website. *Linköping University*. [online]. Aktualizováno 16. 1. 2015 [cit. 2016-04-22]. Dostupné z: <http://www.imh.liu.se/tpmtalleles/tabell-over-tpmt-alleler>

Databáze léků. *Státní ústav pro kontrolu léčiv*. [online]. Aktualizováno 19. 4. 2016 [cit. 2016-04-20]. Dostupné z: www.sukl.cz/modules/medication/search.php

PROSITE Entry: PS00893. *PROSITE*. [online]. Aktualizováno březen 2016 [cit. 2016-04-23]. Dostupné z: <http://prosite.expasy.org/PS00893>

The Protein Data Bank. *RCSB PDB*. [online]. Aktualizováno květen 2016 [cit. 2016-05-02]. Dostupné z: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

UniProtKB – Q9NV35 (NUD15_HUMAN). *UniProt*. [online]. Aktualizováno 16. 3. 2016 [cit. 2016-04-21]. Dostupné z: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9NV35>