

GUANYLÁTKINASY

ROMANA KREJČOVÁ a KVĚTA HORSKÁ

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

Došlo dne 9.I.1997

Obsah

1. Úvod
2. Obecné vlastnosti
3. Primární struktura
4. Terciární struktura
5. Vazebná místa
6. Obecné vlastnosti vazebných míst pro nukleotidy
7. Inhibice GMP-kinasy
8. Závěr

1. Úvod

Nukleosidmonofosfátkinasy (NMP-kinasy) jsou všudypřítomné enzymy, které mají klíčový význam jak pro energetický metabolismus buňky, tak pro syntézu prekursorů nukleových kyselin a dalších intermediátů, obsahujících nukleotidylové zbytky^{1,4}. Většina buněk obsahuje AMP-, GMP-, UMP- a CMP-kinasy, které jako substráty využívají ribo-, resp. deoxyribo-5'-fosfátů, obsahujících purinové nebo pyrimidinové báze. Obecně lze říci, že jde o bílkoviny s výraznou sekvenční homologií a podobnou terciární strukturou⁴. Obecné vlastnosti těchto enzymů jsou shrnuty v přehledném článku o adenylátkinasách (dále AMP-kinasy nebo AK) (cit. 2).

Guanylátkinasy (ATP:GMP-fosfotransferasy, dále GMP-kinasy nebo GK; EC 2.7.4.8.), které katalyzují reverzibilní reakci $\text{MgATP} + (\text{d})\text{GMP} \rightleftharpoons \text{MgADP} + (\text{d})\text{GDP}$, Eukaryotní guanylátkinasy jsou malé monomerní bílkoviny o relativní molekulové hmotnosti 18 500–24 000 (cit. 13). Bakteriální GMP-kinasy se naopak vyskytují jako multimery^{20,27}; při nízké iontové síle existují jako tetramery, zatímco při vysoké iontové síle jako dimery²⁷. Aga-

transdukci⁵. Navíc byl zjištěn vysoký počet identických aminokyselinových zbytků (~35 %) s kvasinkovou GMP-kinasou jak u jednoho z bílkovinných produktů (tzv. dlG-A-protein) tumor supresorového genu *dlG Drosophila melanogaster*⁶⁻⁸, tak u bílkoviny p53, která je hlavní palmitoylovanou bílkovinou v membráně lidských erythrocytů^{8,9}. Žádná z těchto bílkovin však nevykazuje guanylátkinasovou aktivitu. Rovněž objevení virostatických¹⁰ a kancerostatických¹¹ účinků guanosinových analogů ukázalo, že biologická aktivita těchto analogů je plně závislá na jejich fosforylaci virovými a buněčnými nukleosid- a nukleotid-kinasami. Guanylátkinasy katalyzují v přítomnosti ATP (s menší účinností v přítomnosti dATP) vznik GDP, který je dále nukleosiddifosfátkinasou fosforylován na GTP. Tyto dvě po sobě následující fosfotransferasové reakce spolu s antionkogenem p53 (cit. 6) regulují hotovost guaninových nukleotidů (inhibicí IMP-dehydrogenasy) nezbytnou pro nejrozličnější metabolické pochody v buňce jako např. pro proteosyntézu, syntézu NK, cGMP cyklus a další.

Guanylátkinasová aktivita byla poprvé popsána Klenowem a Lichtlerem¹². V průběhu let byla GMP-kinasa izolována z řady tkání^{11,13-25}. Nativní homogenní bílkovina byla připravena z kvasinek^{18,25}, hovězích sítnic¹⁴, lidských erythrocytů^{13,16,17,21,26}, vepřového mozku²² a *Escherichia coli*^{19,20,27}. Izolace guanylátkinasových cDNA z kvasinek²⁸, hovězích sítnic²⁹, lidských sítnic³⁰ a *E. coli*²⁷ a jejich exprese ve vhodných bakteriálních kmech podstatně zvýšila, stejně jako v případě adenylátkinasy, výtěžky izolačních metod. Gen pro GMP-kinasu z lidských sítnic byl lokalizován na chromosomu 1 v poloze q31–q42 (cit. 30). Guanylátkinasy patří k relativně velmi stabilním enzymům^{13,18,21}.

2. Obecné vlastnosti

Eukaryotní guanylátkinasy jsou malé monomerní bílkoviny o relativní molekulové hmotnosti 18 500–24 000 (cit. 13). Bakteriální GMP-kinasy se naopak vyskytují jako multimery^{20,27}; při nízké iontové síle existují jako tetramery, zatímco při vysoké iontové síle jako dimery²⁷. Agarosovou elektroforézou a izoelektrickou fokusací byla u ně-

kterých nativních guanylátkinas prokázána přítomnost izoenzymů^{13,16,17}, jejichž izoelektrické body leží, narozdíl od AMP-kinas, v kyselé oblasti; izoenzymy GK vykazují stejné kinetické vlastnosti^{16,26}. Počet izoenzymů je typický pro tkáň, ze které je GMP-kinasa izolována. Zatímco u kvasinek¹⁸ (pI 5,8) a vepřového mozku²² (pI 5,6) byla nalezena pouze jedna enzymová aktivita, dvě aktivity (pI 5,2 a 5,5) byly zjištěny u ascitických buněk Sarkomul 80 (cit. ¹⁷). Tři guanylátkinasové aktivity byly nalezeny u bílkoviny, získané z krysích jater (pI 4,7; 4,9 a 5,1) a to s více ne 90 % zastoupením enzymové aktivity ve frakci pI 4,9 (cit. ^{13,16}). U guanylátkinasy z lidských erythrocytů byla dokonce dokázána přítomnost čtyř izoenzymů (pI 4,9; 5,1; 5,4 a 5,8) (cit. ^{13,16,17,26}).

Pro GMP-kinasy je charakteristická vysoká specifita pro guaninovou strukturu^{11,13,18,31}. Nejvyšší aktivitu vykazují s GMP, fosforylují též dGMP, 8-azaGMP a další analogy přirozeného substrátu, avšak s podstatně nižší účinností^{11,13-15,17,23,25,32-34}. K_m se pro uvedené látky liší u izoenzymů získaných z různých tkání. ATP a dATP jsou jedinými vhodnými donory fosfátu (tabulka I).

GMP-kinasy vyžadují pro svou aktivitu přítomnost jak dvojmocného kovového kationtu, tak i jednomocných iontů; nejvyšší aktivitu vykazují obvykle při kombinaci drasel-

ných a hořečnatých iontů^{13,15,18,21,36}. Kvasinková GK (dále GK_y) vykazuje relativně vysokou aktivitu v široké oblasti pH. Zatímco pH optimum enzymu je při pH 7,7, při pH 7,3 a 8,0 představuje katalytická účinnost dokonce 95 % aktivity při optimálním pH; při pH 6,8 a 8,6 dosahuje aktivita 80 %.

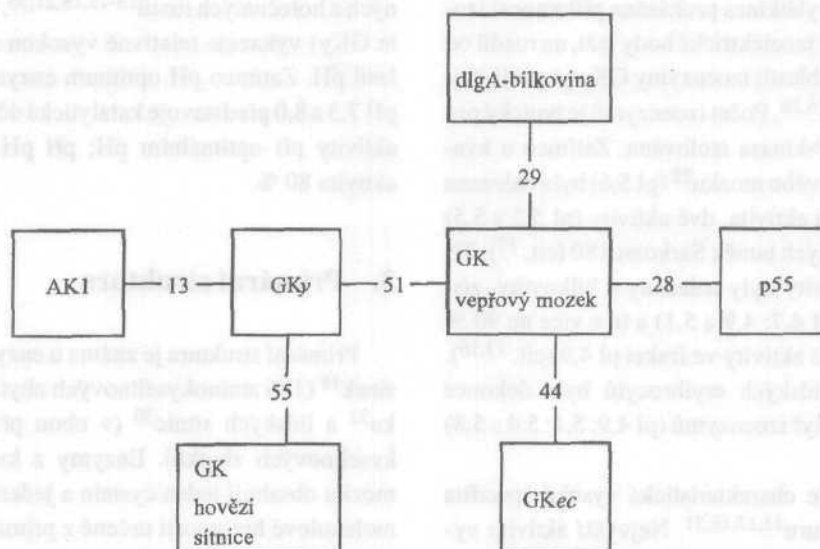
3. Primární struktura

Primární struktura je známa u enzymů získaných z kvasinek¹⁸ (186 aminokyselinových zbytků), vepřového mozku²² a lidských sítnic³⁰ (v obou případech 197 aminokyselinových zbytků). Enzymy z kvasinek a vepřového mozku obsahují jeden cystein a jeden tryptofan. Relativní molekulové hmotnosti určené z primární struktury se shodují s relativní molekulovou hmotností určenou elektroforézou za denaturujících podmínek. Guanylátkinasy vykazují sekvenční homologii (obr. 1) nejen mezi sebou, ale i se synaptickou bílkovinou SAP 90 (cit. ³⁸) a s bílkovinami dlG a p55 (cit. ²²). Na N-konci GK_y byl nalezen acetylovaný serin¹⁸, zatímco u enzymu z vepřového mozku acetylovaný glycin²². C-Konec u GK_y obsahuje lysin¹⁸; u guanylátkinasy z vepřového mozku byl nalezen serin²².

Tabulka I
Substráty GMP-kinasy

Substrát	K_m ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)											
	Vepř. mozek ¹³	Lidské erythrocyty ¹³	Izoenzymy lidských erythrocytů (pI) (cit. ²⁶)				Kvasinky ²⁵	Izoenzymy krysích jater (pI) (cit. ¹⁶)			Vepř. mozek ³³	Vepř. mozek ³⁵
			4,9	5,1	5,4	5,8		4,7	4,9	5,1		
GMP	6,0	18,0	15,0	16,0	19,0	24,0	48,0	16,5	9,8	11,3	7,4	32,0
dGMP	10,0	74,0	90,0	71,0	100	145	-	33,2	28,2	21,7	-	83,0
8-AzaGMP ^a	16,0	91,0	-	-	-	-	-	55,3	70,4	46,9	-	-
6-ThioGMP ^b	-	2100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DHPGMP ^c	-	-	54,0	42,0	47,0	48,0	-	-	-	-	-	-
ACVMP ^d	-	-	753	462	427	209	-	-	-	-	-	-
G(CH ₂) ₄ CH ₂ PO ₃ H ₂ ^e	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	250
G(CH ₂) ₄ CF ₂ PO ₃ H ₂ ^f	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ⁱ N
Karbovirfosfát (-) ^g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-2,0	-
Karbovirfosfát (+) ^h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	270	-
ATP	120	190	-	-	-	-	500	-	-	-	-	-

^a 8-Azaguanosin-5'-fosfát; ^b 6-thioguanosin-5'-fosfát; ^c (S)-9-(1-fosforyloxy-3-hydroxy-2-propoxymethyl)guanin; ^d 9-(2-fosforyloxyethoxymethyl)guanin; ^e 9-(5-fosfonopentyl)guanin; ^f 9-(5,5-difluoro-5-fosfonopentyl)guanin; ^g [(1R,4S)-9-(4-fosforyloxyethyl)-2-cyklopenten-1-yl]guanin; ^h [(1S,4S)-9-(4-fosforyloxymethyl)-2-cyklopenten-1-yl]guanin; ⁱ není substrátem (při 1 mM koncentraci)



Obr. 1. Stupeň sekvenční homologie (%) guanylátkinas se svalovou adenylátkinasou a proteiny **dlgA** a **p55** (cit. ^{22,29,37})

Berger a spol.¹⁸ srovnáním primární struktury GMP-kinasy a AMP-kinasy zjistili, že guanylátkinasa sdílí největší podobnost s AK1 z vepřového svalu.

-fosfát („NMP-bind“) byly však nalezeny podstatné rozdíly v terciární struktuře^{37,39}. Bližší údaje o zmíněných oblastech jsou uvedeny v přehledném článku o adenylátkinasách².

4. Terciární struktura

Základní poznatky o terciární struktuře a povaze vazebných míst guanylátkinas, přinesly krystalografické studie GK_y, která byla připravena jak volná¹⁸, tak v komplexu s GMP (cit. ^{37,39}). V asymetrické jednotce byl nalezen jeden komplex enzym-substrát, který obsahuje všech 186 aminokyselinových zbytků, N-koncovou acetylovou skupinu, GMP, sulfátový ion a 174 molekul vody³⁷.

Terciární struktura GK_y, tvořená pěti paralelními polypeptidovými řetězci v β-struktuře (p9, β8, β1, β7, β2) obklopenými šesti α-spirálami (α1, α3, α4, α5, α6, α7), se podobá struktuře AMP-kinas^{37,39}. GK_y však obsahuje navíc oblast (tzv. „mixed P-sheet“), složenou ze tří anti-paralelních (P5, p6, p3) a jednoho paralelního p-řetězce (p4). Do p-struktur a α-spirál je uspořádáno 73 % molekuly GK_y (cit. ³⁷).

Krystalografické studie s jemným rozlišením 0,20 nm potvrdily výraznou podobnost terciární struktury GK_y a AK1 (cit. ³⁷) a to především v oblasti jádra („core“, dříve „main“) a v oblasti víčka („lid“, dříve „insert“). U GK_y tvoří oblast víčka pouze pět aminokyselinových zbytků³⁷, zatímco u AK1 jedenáct a u AK3 dokonce 38 aminokyselinových zbytků. V oblasti vázající nucleosid-5'-

5. Vazebná místa

U guanylátkinas byla, stejně jako u AMP-kinas, dokázána přítomnost dvou vazebných míst pro substráty, t.j. vazebného místa pro ATP a vazebného místa pro GMP (cit. ^{13,37}). GMP-kinasa obsahuje v blízkosti N-konce glycinem obohacenou smyčku³⁷, která tvoří u AMP-kinas obrovskou aniontovou díru⁴⁰, vázající a- a P-fosfát ATP (cit. ⁴¹). Je pravděpodobné, že stejným způsobem dochází k vazbě ATP i u GMP-kinas. U GK_y má tato smyčka (aminokyselinové zbytky 8–15) určitý stupeň pohyblivosti ve srovnání s AK1 a AK3, kde je rigidní³⁷. Vazebné místo pro ATP u guanylátkinasy z kvasinek vykazuje zřetelnou strukturní homologii (tabulka II) se stejnou oblastí u adenylátkinas a GTP-vazebných bílkovin^{37,42,44}. Naproti tomu vazebné místo pro GMP, i když se obecně nalézá ve stejné oblasti enzymové molekuly, má naprosto odlišné prostorové uspořádání řetězce od AMP-vazebné domény, což je způsobeno rozdílnou polaritou³⁷. Polohy fosfátových skupin u AMP i GMP si odpovídají, avšak vzájemná poloha ribos a heterocyklickýchází se liší. U GMP je ribosa v konformaci 3'-endo, zatímco u AMP v 2'-endo. Navíc ribosa interaguje pouze s rozpouštědlem, zatímco 2'-hydroxylová skupina

AMP se váže na kyslík karbonylu peptidové vazby. Za pozornost stojí vazba guaninu na dvě karbonylové skupiny; u adeninu tento typ vazby neexistuje³⁷. Na základě strukturní podobnosti obou kinas lze předpokládat, že pravděpodobně dochází i v oblasti vázající GMP po navázání obou substrátů (GMP a ATP) ke změně prostorového uspořádání enzymové molekuly. To se týká především oblastí ribosy a fosfátového zbytku; u purinového kruhu GMP se naopak předpokládá malá konformační změna³⁷. Byla dokázána interakce GMP s Ile-99, Asp-100 (oblast jádra) a Tyr-78 (oblast vázající GMP). Pro katalýzu má zásadní význam Asp-98, který přispívá k vazbě hořčnatého iontu a karboxylová skupina Glu-69, která zodpovídá za specifitu pro guanin³⁷. Primární struktury segmentů tvořících vazebná místa pro ATP a GMP jsou uvedeny v tabulkách II a III.

Tabulka II

Sekvence vazebných míst pro NTP^a

Enzym	Zdroj (ligand)	Sekvence (vazebný segment)		
		kinase-1a	kinase-2	kinase-3a
GK	kvasinky (GMP)	⁸ GPSGTGKSTLL	⁹⁴ ILDIDMO	¹³⁵ RGTETEEESINKR
AK	vepřový sval (Ap ₅ A)	¹⁵ GGPGSGKGTQC	⁸⁹ GFLIDGY	¹³⁸ RVDDNEETIKKR
	kvasinky (Ap ₅ A)	²⁴ GPPGAGKGTQA	⁸⁷ GFILDGF	¹³⁴ RLIHPASGRSY
	<i>E. coli</i> (Ap ₅ A)	⁷ GAPGAGKGTQA	⁸⁰ GFLLDGF	¹²³ RRVHAPSGRVY
				¹⁵⁶ RKDDQEETVRKR
				kinase-3b
Ef-Tu	<i>E. coli</i> (GTP)	¹⁸ GHVDHGKTTLT	⁷⁶ YAHVDCP	¹³² YFLNKCDMVDD
ras p21	lidský (GTP)	¹⁰ GAGGVGKSALT	⁵³ LDILDACQE	¹¹³ LVGNKCDLPSR

^aTraut³¹; aminokyselinové zbytky tučně vytištěné vykazují silnou interakci s ligandem

Tabulka III

Sekvence vazebných míst pro NMP^a

Enzym	Zdroj (ligand)	Sekvence (vazebný segment)		
		NMP-1	NMP-2	NMP-3b
GK	kvasinky (GMP)	³⁴ SSTTRTPR	⁵⁷ EFKSMIKNNEFI	⁶⁸ IEWAQFSGNYYGS
				NMP-3a
AK	vepřový sval (AMP)	³⁷ LSTGDLRL	⁶² EGKGOLVPLETV	⁹¹ LIDGYPREVKQ
	<i>E. coli</i> (AMP)	²⁹ ISTGDMLR	⁵³ MDAGKLVTDLV	⁸² LLDGFPRITPQ
	hovězí srdce (AMP)	³⁴ LSSGDLRL	⁵⁸ IDQGKLTDPDDVM	⁸⁶ LLGGFPRITLPQ
	kvasinky (AMP)	³⁵ LATGDMLR	⁵⁹ MDQGGLVSDDIM	⁸⁹ ILDGFPRITPQ

^aTraut³¹; aminokyselinové zbytky tučně vytištěné vykazují silnou interakci s ligandem

6. Obecné vlastnosti vazebných míst

Traut³¹ provedl analýzu současných dat 16 bílkovinných struktur s definovanými vazebnými místy pro nukleotidy (včetně AMP- a GMP-kinasy) a našel konzervované sekvence pro peptidové segmenty, které tvoří vazebná místa. Vytvoření vazebného místa pro ATP a GTP předpokládá přítomnost tří peptidových segmentů: a) Segment „Kinase-1a“ - byl nalezen u všech analyzovaných sekvencí; u většiny se nachází v blízkosti N-konce. Účastní se vazby fosfátů příslušného ligandu. U některých bílkovin byly nalezeny variantní verze, srovnatelné s tímto fragmentem; tato obměna zřejmě souvisí s jejich specifickou funkcí. b) Segment „Kinase-2“ - obsahuje konzervované aspartáty, které koordinují kation hořčíku na ATP(Mg²⁺); kromě

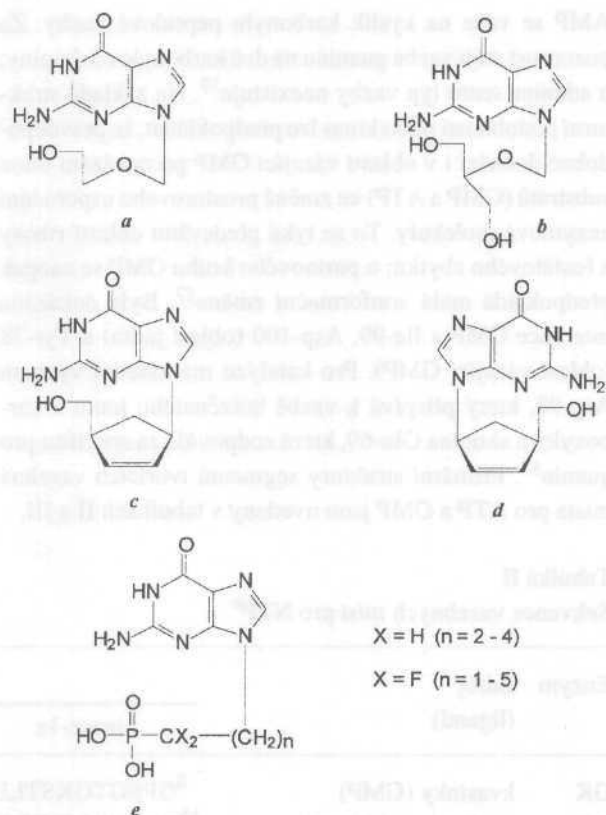
toho se také účastní vazby fosfátu. c) Segment "Kinase-3" - se vyskytuje nejméně ve čtyřech variantách a uplatní se při vazbě purinové báze nebo pentosy. Primární struktura těchto fragmentů je uvedena v tabulce II. Pro fragment „Kinase-1a“ je charakteristická přítomnost invariantního lysinu (K), zatímco pro fragment „Kinase-2“ invariantního aspartátu (D). Dále bylo zjištěno, že u většiny případů se vazebné místo pro donor nucleosid-5'-trifosfát (NTP) vyskytuje před vazebným místem pro akceptor³¹. GTP-vazebné bílkoviny (G-proteiny) jako elongační faktory a rasp21 vykazují značnou podobnost s adenylátkinasami zvláště v oblasti glycinové smyčky⁴²⁺⁴⁵⁺⁴⁶.

Strukturní analýzy ukazují, že „kapsu“ pro vazbu NMP tvoří také tři peptidové segmenty: NMP-1 a NMP-2 segmenty vytvářejí podstatnou část vazebného místa, zatímco segment NMP-3 zodpovídá za vazbu specifického nukleotidu³¹. Primární struktura jmenovaných segmentů je uvedena v tabulce III. Segmenty NMP-1 a NMP-2 se vyskytují u AMP- i GMP-kinas. U AK z *E. coli* bylo dokázáno, že NMP-1 segment váže imidazolovou část molekuly adeninu za současné interakce s fosfátovou skupinou; segment NMP-2 váže ribosu⁴⁷. U AK segment NMP-3a specificky interaguje s aminoskupinou v poloze 6 adeninu obsaženého v AMP (cit. ³¹). Strukturně rozdílný segment NMP-3b se vyskytuje u GMP-kinas, kde interaguje s guaninovým kruhem³¹ a tím pravděpodobně určuje specifitu pro GMP.

Ukázalo se, že poloha a počet NTP- a NMP-segmentů není u analyzovaných bílkovinných struktur konstantní. Zatímco segmenty „Kinase-2“ a „Kinase-3“ se mohou vyskytovat několikrát, segment „Kinase-1a“ je u všech analyzovaných struktur pouze jednou a to v blízkosti N-konce. Segmenty NMP-1 a NMP-3 se vyskytují též jen jednou; to platí pro enzymy, které fosforylují AMP, CMP, GMP, dTMP nebo UMP. NMP-2 se běžně vyskytuje více než dvakrát³¹.

7. Inhibice GMP-kinas

Guanylátkinasy z krysích jater a erythrocytů jsou inhibovány *p*-hydroxymerkuribenzoátem, N⁶-ethylmaleinimidem a 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoovou kyselinou); enzym inaktivovaný *p*-chlormerkuribenzoátem lze reaktivovat dithiothreitem¹³. IMP, AMP, dXMP a guanosin kompetitivně inhibují GK z *E. coli*¹⁹. Analogy nukleotidů 6-thioguanosin-5'-fosfát^{11,17,21,32,48} jsou kompetitivními inhibitory GMP-kinas z vepřového mozku, lidských erythrocytů a buněk Sarkomu 180. Agarwal a Parks¹⁶ prokázali



Obr. 2. Struktura acykloviru, DHPG, karboviru a fosfonoalkylguaninů;

a - acyklovir - [9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanin] (cit. ²⁶),
b - DHPG - [9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanin] (cit. ²⁶),
c - karbovir(-) - [(1R,4S)-9-(4-(hydroxymethyl)-2-cyklopenten-1-yl)guanin] (cit. ²⁶),
d - karbovir(+) - [(1S,4S)-9-(4-(hydroxymethyl)-2-cyklopenten-1-yl)guanin] (cit. ²³),
e - 9-(fosfonoalkyl)- resp. 9-(difluorofosfonoalkyl)guanin (cit. ²⁵)

stejný typ inhibice těmito látkami také u nejvíce zastoupeného izoenzymu GK z krysích jater (pI 4,9).

Acyklické guanosinové analogy (obr. 2) DHPG [9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanin] a ACV [Acyklovir, 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanin] jsou účinnými inhibitory replikace herpes simplex viru. Jejich monofosfáty inhibují aktivitu izoenzymů guanylátkinasy získaných z lidských erythrocytů²⁶. Zatímco monofosfát DHPG (DHPGMP) vykazuje kompetitivní charakter inhibice u všech čtyř izoenzymů ve vztahu ke GMP, monofosfát ACV (ACVMP) způsobuje smíšený typ inhibice^{21,26}. Obě látky jsou současně i substráty pro GMP-kinasy (cit. ^{21,26}); v tabulce I jsou uvedeny jejich kinetické charakteristiky ve srovnání s přirozeným substrátem. Navé a spol.³⁵ studovali možnost uplatnění několika derivátů 9-(fosfonoalkyl)guaninu a 9-(difluorofosfonoalkyl)guaninu (obr. 2e),

Tabulka IV
Inhibitory GMP-kinas

Zdroj enzymu	Izozym (pI)	Inhibitor [K_i ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)]					
		6-SH-GMP ^a	6-Se-GMP ^b	ACVMP ^c	DHPGMP ^d	G(CH ₂) ₅ CH ₂ PO ₃ H ₂ ^e	G(CH ₂) ₅ CF ₂ PO ₃ H ₂ ^f
Krysí játra ^{f6}	4,9	68	90	—	—	—	—
Lidské erythrocyty	4,9	75	—	840	60	—	—
(cit. ^{26,32})	5,1	130	—	650	67	—	—
	5,4	210	—	670	43	—	—
	5,8	75	—	450	52	—	—
buňky Sarkomu 180	5,2	170	—	—	—	—	—
(cit. ³²)	5,5	67	—	—	—	—	—
vepřový mozek ³⁵	—	—	—	—	—	150	110

^a 6-Thioguanosin-5'-fosfát; ^b 6-selenoguanosin-5'-fosfát; ^c 9-(2-fosforyloxyethoxymethyl)guanin; ^d (S)-9-(1-fosforyloxy-3-hydroxy-2-propoxymethyl)guanin; ^e 9-(6-fosfonohehyl)guanin; ^f 9-(6,6-difluoro-6-fosfonohehyl)guanin

teré obsahují alkylové řetězce o rostoucí délce n , jako potenciálních substrátů a inhibitorů GMP-kinas. S výjimkou 9-(5-fosfonopentyl)guaninu ($n = 4$), který je substrátem pro guanylátkinasy s účinností 0,3 % ve srovnání s GMP, jsou všechny uvedené látky inhibitory guanylátkinas; neúčinnější z nich jsou fosfátové $[\text{G}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_2\text{PO}_3\text{H}_2]$ a difluorfosfátové $[\text{G}(\text{CH}_2)_5\text{CF}_2\text{PO}_3\text{H}_2]$ deriváty, kde $n = 5$. Oba typy analogů vykazují kompetitivní charakter inhibice (K_i inhibitorů jsou uvedeny v tabulce IV).

8. Závěr

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

Guanylátkinasy (GK) jsou nízkomolekulární monomerní bílkoviny, které mají klíčový význam pro regulaci intracelulárních hladin guaninových nukleotidů. Katalyzují reverzibilní reakci $\text{Mg}^{2+}\text{ATP} + (\text{d})\text{GMP} \rightleftharpoons \text{Mg}^{2+}\text{ADP} + (\text{d})\text{GDP}$. I když se svými vlastnostmi a biologickou funkcí podobají adenylátkinasám, představují GK skupinu enzymů daleko méně prostudovanou. Byly získány v homogenizované formě z řady tkání; u některých GK byla dokázána existence izoenzymů. Tato práce shrnuje současné znalosti o obecných vlastnostech, trojrozměrné struktuře a vazeb-

ných místech guanylátkinas získaných z různých zdrojů. Je rovněž diskutována podobnost těchto enzymů s adenylátkinasami.

Zpracovat toto téma nám umožnila podpora projektu GA AV ČRA455 402 a GA ČR 203/96/K 001. Autoři děkují RNDr. I. Votrubovi, CSc. za podnětné náměty a zájem při sepsování tohoto článku a paní M. Marešové za pomoc při zpracování rukopisu.

LITERATURA

1. Krejčová R.: *Rešeršní práce ke kandidátskému mí-nimu*. Praha 1996.
2. Krejčová R., Horská K.: Chem. Listy 91, 179 (1997).
3. Krejčová R., Horská K.: Chem. Listy, v přípravě do tisku.
4. Serina L., Bucurenci N., Gilles A.-M., Surewicz W. K., Fabian H., Mantsch H. H., Takahashi M., Petrescu I., Batelier G., Bárzu O.: Biochemistry 35, 7003 (1996).
5. Cox L. S., Lane D. P.: BioEssays 17, 501 (1995).
6. Sherley J. L.: J. Biol. Chem. 266, 24815 (1991).
7. Woods D. F., Bryant P. J.: Cell 66, 451 (1991).
8. Bryant P. J., Woods D. F.: Cell 68, 621 (1992).
9. Goebel M. G.: TIBS 17, 99 (1992).
10. Furman P. A., St. Clair M. H., Fyfe J. A., Readeout J. L., Keller P. M., Elion G. B.: J. Virol. 32, 72 (1979).
11. Miech R. P., Parks R. E., Jr.: J. Biol. Chem. 240, 351 (1965).

12. Klenow H., Lichtler E.: *Biochim. Biophys. Acta* 23, 6 (1957).
13. Agarwal K. C., Miech R. P., Parks R. E., Jr.: *Methods Enzymol.* 57, 483 (1978).
14. Hall S. W., KUhn H.: *Eur. J. Biochem.* 161, 557 (1986).
15. Shimono H., Sugino Y.: *Eur. J. Biochem.* 19, 256 (1971).
16. Agarwal K. C., Parks R. E., Jr.: *Biochem. Pharmacol.* 24, 791 (1975).
17. Agarwal R. P., Scholar E. M., Agarwal K. C., Parks R. E., Jr.: *Biochem. Pharmacol.* 20, 1341 (1971).
18. Berger A., Schiltz E., Schulz G. E.: *Eur. J. Biochem.* 184, 433 (1989).
19. Oeschger M. P., Bessman M. J.: *J. Biol. Chem.* 241, 5452 (1966).
20. Oeschger M. P.: *Methods Enzymol.* 57, 473 (1978).
21. Miller W. H., Miller R. L.: *J. Biol. Chem.* 255, 7204 (1980).
22. Zschocke P. D., Schiltz E., Schulz G. E.: *Eur. J. Biochem.* 213, 263 (1993).
23. Buccino R. J., Jr., Roth J. S.: *Arch. Biochem. Biophys.* 132, 49 (1969).
24. Le Floch F., Lafleur J.: *Plant Physiol. Biochem.* 28, 191 (1990).
25. Moriguchi M., Kohno H., Kamei M., Tochikura T.: *Biochim. Biophys. Acta* 662, 165 (1981).
26. Boehme R. E.: *J. Biol. Chem.* 259, 12346 (1984).
27. Gentry D., Bengra Ch., Ikehara K., Cashel M.: *J. Biol. Chem.* 268, 14316 (1993).
28. Konrad M.: *J. Biol. Chem.* 267, 25652 (1992).
29. Gaidarov I. O., Suslov O. N., Abdulaev N. G.: *FEBS Lett.* 335, 81 (1993).
30. Fitzgibbon J., Katsanis N., Wells D., Delhanty J., Vallins W., Hunt D. M.: *FEBS Lett.* 385, 185 (1996).
31. Traut T. W.: *Eur. J. Biochem.* 222, 9 (1994).
32. Agarwal K. C., Parks R. E., Jr.: *Mol. Pharmacol.* 8, 128 (1972).
33. Miller W. H., Daluge S. M., Garvey E. P., Hopkins S., Reardon J. E., Boyd F. L., Miller R. L.: *J. Biol. Chem.* 267, 21220 (1992).
34. Karlsson A., Reichard P., Eckstein F.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166, 273 (1990).
35. Navé J.-F., Eschbach A., Halazy S.: *Arch. Biochem. Biophys.* 295, 253 (1992).
36. Anderson E. P.: *The Enzymes* (Boyer P. D., ed.) 9, 49 (1973).
37. Stehle T., Schulz G. E.: *J. Mol. Biol.* 224, 1127 (1992).
38. Kistner U., Garner C. C., Linial M.: *FEBS Lett.* 359, 159 (1995).
39. Stehle T., Schulz G. E.: *J. Mol. Biol.* 211, 249 (1990).
40. Dreusicke D., Schulz G. E.: *FEBS Lett.* 208, 301 (1986).
41. Miiller Ch. W., Schulz G. E.: *J. Mol. Biol.* 224, 159 (1992).
42. de Vos A. M., Tong L., Milburn M. V., Matias P. M., Jancarik J., Noguchi S., Nishimura S., Miura K., Ohtsuka E., Kim S.-H.: *Science* 239, 888 (1988).
43. La Cour T. F. M., Nyborg J., Thirup S., Clark B. F. C.: *EMBO J.* 4, 2385 (1985).
44. Tong L., de Vos A. M., Milburn M. V., Kim S.-H.: *J. Mol. Biol.* 217, 503 (1991).
45. Schulz G. E., Müller Ch. W., Diedrichs K.: *J. Mol. Biol.* 213, 627 (1990).
46. Pai E. F., Kabsch W., Krengel V., Holmes K. C., John J., Wittinghofer A.: *Nature* 341, 209 (1989).
47. Klaus W., Scharf M., Zimmermann S., Rösch P.: *Biochemistry* 27, 5407 (1988).
48. Miech R. P., York R., Parks R. E., Jr.: *Mol. Pharmacol.* 5, 30 (1969).

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

Nucleoside monophosphokinases (NMP kinases) catalyze the reversible transfer of the terminal phosphoryl group from a nucleoside triphosphate (from ATP in most cases) to nucleoside monophosphates. In mammalian tissues, at least four distinct NMP kinases have been biochemically identified: adenylate kinase, guanylate kinase, thymidylate kinase, and pyrimidine nucleoside monophosphokinase. Guanylate kinase (EC 2.7.4.8) is a small monomeric enzyme catalyzing the reversible reaction $\text{Mg}^{2+}\text{ATP} + (\text{d})\text{GMP} \rightleftharpoons \text{Mg}^{2+}\text{ADP} + (\text{d})\text{GDP}$. The enzyme plays an essential role in the recovery of (d)GMP and thus in the biosynthesis of GTP and dGTP. Its reaction and biological function closely resembling adenylate kinases, which phosphorylate (d)AMP, are also discussed. The recent knowledge of the general properties, three-dimensional structure, and properties of binding sites in these enzymes is reported.