

ADENYLÁTKINASY

ROMANA KREJČOVÁ a KVĚTA HORSKÁ akceptory

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

Věnováno prof. RNDr. Josefu Koštiřovi k 90. narozeninám

Obsah

1. Úvod
2. Obecné vlastnosti
3. Primární struktura
4. Terciární struktura
5. Vazebná místa
6. Inhibice AMP-kinas
7. Závěr

1. Úvod

Nukleosidmonofosfátkinasy se vyskytují ve všech typech buněk. Katalyzují reverzibilní přenos γ -fosfátu nukleosid-5'-trifosfátu (NTP) dle schématu:



Vzhledem ke svému klíčovému významu v bazálních metabolismu buňky byly tyto enzymy v průběhu let intenzivně studovány¹. Homogenní bílkoviny byly získány jak z prokaryotních, tak eukaryotních buněk. Stanovení primární struktury umožnilo srovnávací studie, které byly přínosem pro lokalizaci a studium vlastností vazebných míst a prostorového uspořádání enzymové molekuly.

Nukleosidmonofosfátkinasy jsou monomerní bílkoviny, které vykazují výraznou sekvenční homologii a velmi podobnou podjednotkovou strukturu²⁻⁵. Pro tyto enzymy je typická relativně úzká specifita pro nukleosid-5'-fosfáty,

fosfátové skupiny. Nejeфективněji využívají jako donor fosfátu ATP. Pro svou aktivitu vyžadují jak přítomnost dvojmocného kovového kationtu^{6,7-19}, který tvoří komplex s příslušným nukleosid-5'-tri- a difosfátem^{6,17,18,20}, tak agens chránících thiolové skupiny^{11-13,21-24}. Nejvyšší aktivitu vykazují obvykle s Mg^{2+} , který lze u některých enzymů nahradit Mn^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} nebo Co^{2+} , avšak s nižší účinností^{8-10,12-14,17-19,25-27}.

Koshland²⁸ a Jencks²⁹ zjistili, že u enzymů přenášejících fosfát probíhá po navázání substrátu konformační změna, při které enzymy přecházejí z inaktivní konformace E na aktivní konformaci E*; během této změny dochází k uvolnění vody katalytického centra. Tento jev tzv. „induced fit“ vysvětluje vysokou specifitu a extrémně nízkou rychlost abortivní syntézy, která byla zjištěna u fosfokinas.

Mechanismus reakce je náhodný („random“) bi-bi a chemická přeměna limituje rychlost reakce^{6,11,12,23,30-35}. Stereochemický průběh reakce sleduje S_N2 mechanismus; to znamená, že dochází k přímému přenosu fosfátových skupin bez vzniku kovalentních intermediátů s molekulou bílkoviny^{32,36}.

Všechny buňky využívají v rozsáhlém měřítku adeninových nukleotidů AMP, ADP a ATP pro příjem, uchování a přenos chemické energie. Tyto nukleotidy jsou rovněž nezbytné jako modulatory regulačních enzymů glykolýzy, cyklu kyseliny citronové a oxidační fosforylace. Proto mají zásadní význam v buněčném metabolismu všechny faktory, které ovlivňují vnitrobuněčnou koncentraci adeninových nukleotidů³⁷⁻⁴⁰. Jedním z nich je právě adenylátkinasa (NTP:AMP-fosfotransferasa, kde N je adenin nebo guanin, dále AMP-kinasa nebo AK), která v současné době představuje nejlépe prostudovanou nukleosidmonofosfátkinasu vůbec¹. Jde o všudypřítomnou bílkovinu, která katalyzuje reakci mezi AMP a $ATP(Mg^{2+})$ s faktorem $>10^{12}$ a je téměř perfektním enzymem ($K_{cat}/K_m > 10^7 s^{-1}M^{-1}$) (lit. ³⁰). Lze tedy říci, že přeměna adeninových nukleotidů má zvláštní význam v tkáních s vysokým obrátem (turnover) energie (ve svalových vláknech, mitochondriích a chloroplastech). AMP-kinasa představuje výhodný model pro studie vzájemného vztahu mezi strukturou a funkcí kinas, enzymů zasahujících do značného počtu metabolických a regulačních procesů⁴⁰⁻⁴². V této souvislosti je zvláště zajímavá

vlastnost AMP-kinasy z *Escherichia coli* (dále AKec), která jako jediná nukleosidmonofosfátkinasavykazuje také aktivitu nukleosid-5'-difosfátkinasy⁴⁰. V poslední době je zřejmé, že je zajímavá i pro evoluční studie^{37-43,46}.

2. Obecné Vlastnosti

Homogenní AMP-kinasy byly připraveny a charakterizovány z různých typů savčí tkáně^{6,7,43,47,52}, myších leukemických buněk L1210 (lit. ⁵³), kvasinek^{25,44-54-55}, rostlin^{41,56-59} a řady bakterií^{8-9-60,63}. Většina izolačních postupů využívá stability AMP-kinas vůči kyselému pH (lit. ^{6,7,48}). Přínosem pro izolační postupy bylo využití jak P¹, P⁵-di(adenosin-5'-)pentafofátu^{60,64} (dále Ap₅A), tak afinitní chromatografie^{9,25,43,60}. Všechny klasické izolační metody jsou však velmi časově náročné a jejich výtěžek je často velmi nízký. Např. AMP-kinasu z *E. coli*, která představuje asi 0,1–0,2 % rozpustných bílkovin, lze získat pouze v 5 % výtěžku⁶⁰. Genovou manipulací a následnou expresí intaktních nebo cíleně mutovaných genů AMP-kinas (nejčastěji v *E. coli*) však byly připraveny homogenní bílkovinné molekuly v množství dostatečném pro moderní analytické postupy^{40,44,45,51,57,62,65-69}.

AMP-kinasy jsou nízkomolekulární globulární monomerní bílkoviny o relativní molekulové hmotnosti 22 000–26 000. Izoelektrickou fokusací byla u vyšších eu-

karyot zjištěna existence tří izoenzymů³⁷; jedné krátké varianty (cytoplazmatická AK1) a dvou dlouhých variant (mitochondriální AK2 a AK3), které obsahují navíc zhruba 30 aminokyselinových zbytků³⁰. Zastoupení jednotlivých typů je specifické pro různé tkáně a mění se v průběhu vývoje^{6,41-70}. Všechny izoenzymy jsou kódovány v jaderném genomu, syntetizovány v cytoplazmě a transportovány do mitochondrií. Liší se např. lokalizací v buňce, molekulovou hmotností, citlivostí vůči Ellmanovu činidlu⁷¹ a Ap₅A, dále katalytickými a imunologickými vlastnostmi⁷²⁻⁷⁴ (tab. I).

AK1 je hlavním izoenzymem kosterního svalstva, mozku a erytrocytů (tzv. svalový typ AMP-kinas, myokinasa) (lit. ³⁷); u člověka je polymorfní⁷³. AK2 se nalézá v mezimembránovém prostoru mitochondrií. Je převládajícím enzymem jater a ledvin (tzv. jaterní typ AMP-kinas). AK1 a AK2 jsou ATP:AMP-fosfotransferasy (EC 2.7.4.3). AK3 je vázána na mitochondriální matrix³⁷ a na rozdíl od AK1 a AK2 jde o GTP:AMP-fosfotransferasu (EC 2.7.4.10). U kvasinek byla nalezena nejméně jedna krátká a jedna dlouhá varianta AMP-kinasy (dále AKy), odpovídající funkčně zřejmě AK1 a AK2 (lit. ³⁷), zatímco u *E. coli*^{43,67,75} a kukuřičných chloroplastů⁵⁶ byla nalezena pouze dlouhá varianta.

AKec se vyskytuje jak v cytoplazmě, tak v mezimembránovém prostoru; to navozuje i její uplatnění v bakteriální buňce⁷⁶. Zatímco AKec přítomná v cytoplazmě zajišťuje

Tabulka I

Vlastnosti isoenzymů savčích AMP-kinas (Frank a spol.)

Vlastnost	AK1	AK2	AK3
Lokalizace genu (u člověka)	chromosom 9	chromosom 1	chromosom 9
Vnitrobuňková lokalizace	cytosol	mezimembránový prostor mitochondrií	matrix mitochondrií
Imunochemická reakce	anti-AK1 (+); anti-AK2 (-)	anti-AK1 (+); anti-AK1 (-)	anti-AK3 (+); anti-AK1 (+); anti-AK2(±)
Tkáně s relat. vysokým obsahem	kosterní sval (25 μmol.kg ⁻¹)	játra (5 μmol.kg ⁻¹); srdeční sval (0,5 μmol.kg ⁻¹)	játra (>1 μmol.kg ⁻¹); srdeční sval (0,15 μmol.kg ⁻¹)
Relativní mol. hmotnost	< 23000	> 23000	26000
Obsah Cys-zbytků	> 1 SH-skupina	> 1 disulfid	0
Inhibice Ellmanovým reagens (%)	100	0	0
K _i pro Ap ₅ A ^a	3 nmol.l ⁻¹	3 μmol.l ⁻¹	~100 μmol.l ⁻¹ ; 20 nmol.l ⁻¹ pro Gp ₅ A
Substrátová specifita	absolutní pro AMP, nižší s ohledem na adenin v ATP		absolutní pro AMP, GTP nebo ITP

^a P¹, P⁵-di(adenosin-5'-)pentafofát

rovnováhu adeninových nukleotidů, předpokládá se, že enzym obsažený v periplazmatickém kompartmentu nebo vnitřní membráně buňky se zúčastní přímo nebo nepřímo syntézy fosfolipidů.

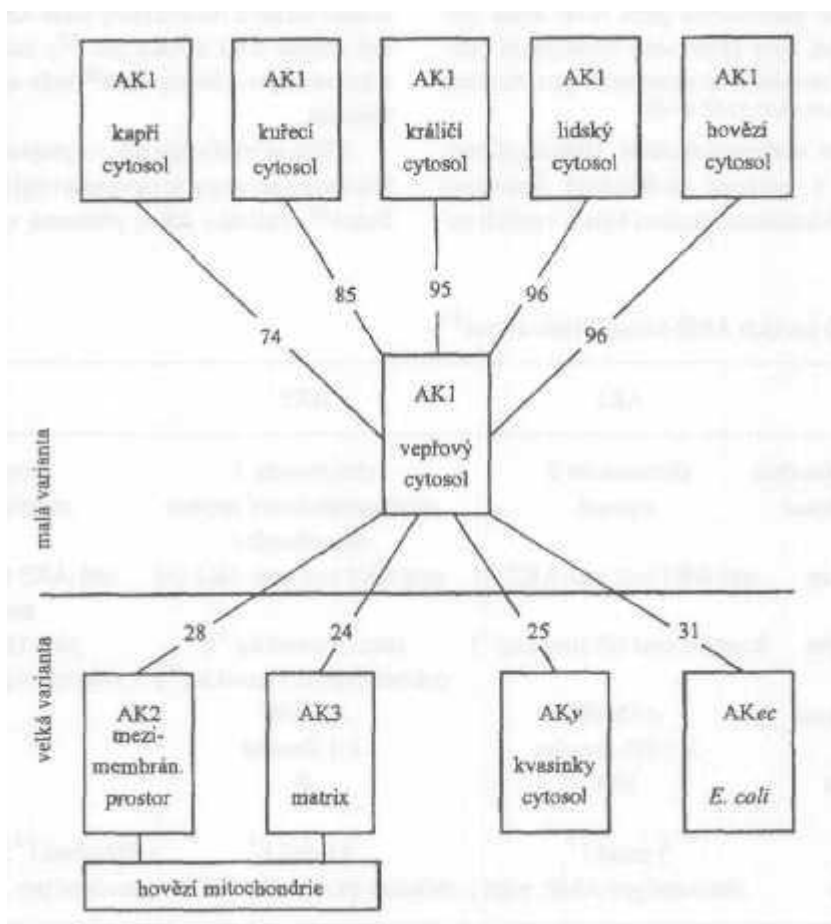
AMP-kinasy vykazují vysokou substrátovou specifitu pro AMP (lit. ^{25,47,53,59,77}); fosforylují rovněž dAMP (lit. ^{25,47,53,59,78}), CMP (lit. ⁵⁹), 7-deazaadenosin-5'-fosfát⁷⁷, adenin-9-β-D-arabinofuranosa-5'-fosfát⁷⁷ a acyklické fosfonátové analogy 9-(2-fosfomethoxyethyl)adenin (PMEA) (lit. ^{53,74}) a (S)-9-(3-hydroxy-2-fosfonomethoxypropyl)-adenin (HPMPA) (lit. ⁵³), avšak s podstatně nižší účinností.

3. Primární Struktura

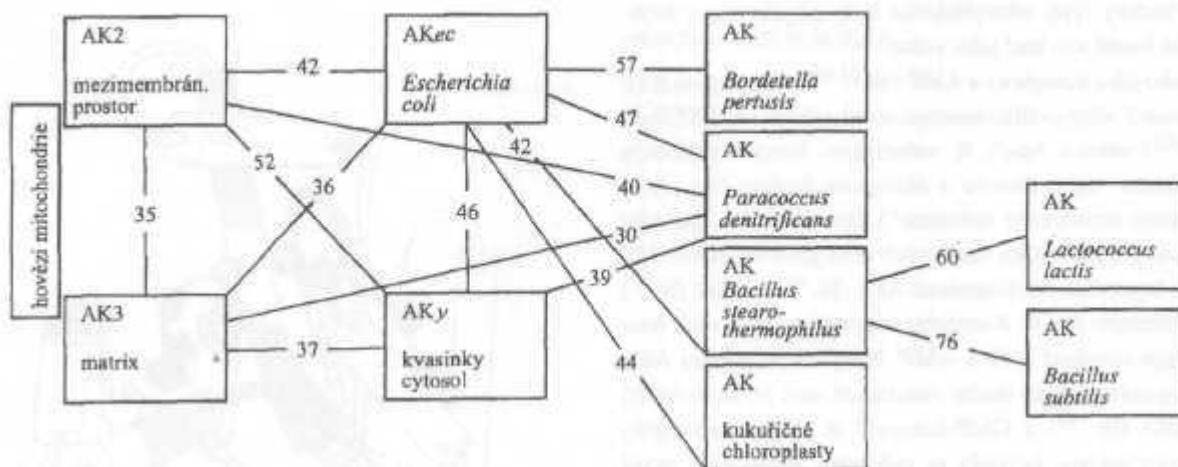
Primární struktura byla určena u všech typů adenylátkinas^{43,48,49,54,77,79,80}. Je zřejmé, že AK obsahují běžné aminokyseliny; neobsahují vázané kofaktory⁶. Zatímco u skupiny malých variant AMP-kinas (AK1) je patrný vysoký

stupeň homologie (více než 90 %), ve skupině velkých variant, stejně jako mezi malými a velkými variantami adenylátkinas je stupeň homologie výrazně nižší³⁷ (obr. 1,2). Pro jednotlivé skupiny AMP-kinas je typické zastoupení bazických a kyselých aminokyselinových zbytků, počet thiolových skupin a obsah tryptofanu. AK1 a bakteriální adenylátkinasy neobsahují tryptofan s výjimkou enzymu z *Bordetella pertussis*⁶⁷. Překvapivé bylo zjištění, že enzym z gram pozitivní bakterie *Bacillus stearothermophilus* obsahuje zinek^{61,62}, který se váže na 4 cysteiny a přispívá tak k extrémně vysoké termodynamické stabilitě bílkoviny.

AK1 a AK2 mají na C-konci lysin, případně substituívaný lysin a na N-konci acetylmethionin^{20,48,50,54}. Podobná struktura N-konce byla nalezena i u archaebakterií⁸. Naproti tomu u AK3 je N-konec heterogenní⁷⁹. Detailní porovnání sekvencí různých typů adenylátkinas vedlo k jejich klasifikaci⁸¹ jako „protein family“, s vysoce konzervovanými aminokyselinovými zbytky³⁷. AMP-kinasa získaná z archaebakterie *Sulfolobus acidocaldarius* představuje zvláštní skupinu, neboť vykazuje minimální pří-



Obr. 1. Stupeň sekvenční homologie (%) malých a velkých variant adenylátkinas³⁷



Obr. 2. Stupeň sekvenční homologie (%) velkých variant adenylátkinas

buznost s dosud známými adenylátkinasami^{84,85}; svou délkou (194 aminokyselinových zbytků) a primární strukturou se podobá více eukaryotním AMP-kinasám než bakteriálním.

4. Terciární struktura

Základní představy o terciární struktuře a lokalizaci vazebných míst vycházely z krystalografických studií AK1 z vepřového svalu, jejíž terciární struktura byla určena již v roce 1974 (lit. ⁸²). Později Dreusicke a spol.⁸³ použili jemné rozlišení 0,21 nm a tuto strukturu upřesnili. Aktivní centrum lokalizovali vyhodnocením krystalografických^{48,82,84}, chemických^{84,85}, sekvenčních^{48,81} a vazebných studií^{81,86,87} a současně podali přehled strukturního uspořádání třiceti vysoce konzervovaných aminokyselinových zbytků.

Podrobné studie terciární struktury obou variant AMP-kinas a ostatních nukleosidmonofosfátkinas rozlišují tři oblasti v prostorovém uspořádání polypeptidových řetězců^{32,46,88,89} oblast zvanou jádro („core“, dříve „main“) tvoří pět paralelních polypeptidů v P-struktuře, obklopených devíti až desíti α -šroubovicemi^{82,83,86,88,89}. Velká varianta AMP-kinas obsahuje oblast nazývanou víčko („lid“, dříve „insert“), zahrnující 38 aminokyselinových zbytků. Tato oblast, tvořená čtyřmi polypeptidy v β -struktuře, zabudovaná mezi aminokyselinové zbytky v poloze 132 a 133, se nalézá v místě, kde malá varianta obsahuje smyčku s pouhými jedenácti aminokyselinovými zbytky^{75,83,88,90,91}. Oblast víčka společně s oblastí, která váže nukleosid-5'-fosfát („NMP-bind“, dříve „AMP-bind“), je lokalizována v blízkosti katalytického centra enzymu³²⁻⁴⁶. Uvedená terciární struktura byla potvrzena CD-spektro-

skopickými studiemi třinácti syntetických segmentů AK1 z vepřového svalu⁹². Všechny AMP-kinasy obsahují smyčku bohatou na glycin⁹³ („glycin-rich loop“, „G-loop“), nazývanou rovněž fosfát vázající smyčka⁹⁴ („phosphate binding loop“, „P-loop“); zahrnuje aminokyselinové zbytky 15-22 (¹⁵GXPGXGK²²G) (lit. ³⁰). Za touto typickou doménou následuje vysoce konzervovaný lysin a serin nebo threonin⁹⁴. Jde o znak společný většině bílkovin, které vážou ATP nebo GTP (např. elongační faktory, thymidinkinasy, fosfoglycerátkinasy) (lit. ⁹⁴).

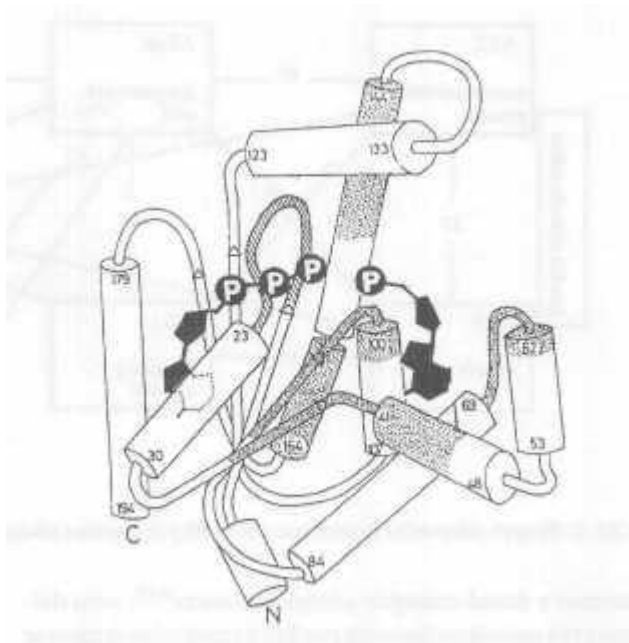
5. Vazebná místa

Pro adenylátkinasy byla dokázána existence dvou nukleotidových vazebných míst^{6-25,84,95}. U eukaryotních enzymů se vazebné místo pro AMP na rozdíl od ATP vazebného místa vyznačuje vysokou specifitou^{6,7,25,47,96}, zatímco pro AKec je typická daleko menší specifita⁷⁷. U AK z kukuřičných chloroplastů bylo zjištěno, že do akceptorového místa pro NMP mohou vstupovat i pyrimidinové nukleotidy; důvodem je jiná primární struktura vazebného místa ve srovnání s ostatními adenylátkinasami⁵⁶.

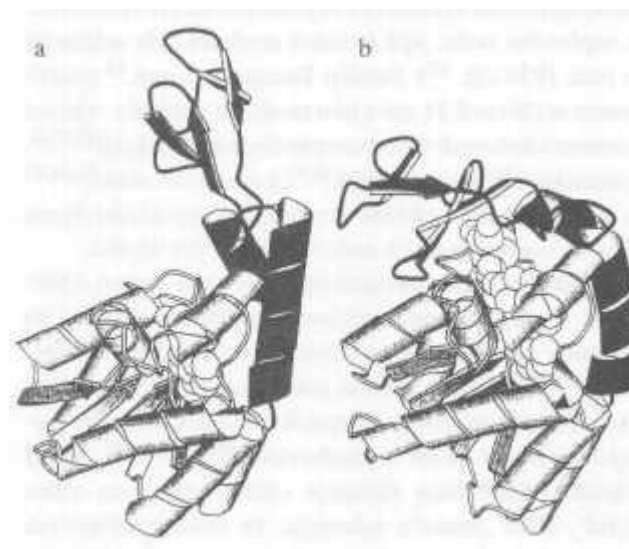
Pro určení lokalizace a povahy vazebných míst je výhodné porovnat struktury AMP-kinas jak bez substrátů, tak s jedním nebo dvěma navázanými substráty. Na základě konformačních změn lze pak získat představu o molekulárních aspektech, které doprovázejí samotnou katalýzu. Traut⁴² se zabýval detailním studiem bílkovin (včetně AMP- a GMP-kinasy), u kterých byla popsána vazebná místa pro nukleotidy. Obecné vlastnosti těchto vazebných míst jsou shrnuty v přehledném článku o guanylátkinasách⁹⁷.

Všechny typy adenylátkinas byly připraveny v krystalické formě a to buď jako volné^{6,9,20,48,49,52,82-84,87,93,98-101} nebo jako komplexy s AMP (lit. ^{88,90}), s analogem ATP adenosin-5'-(β,γ - μ -difluormethylen)trifosfátem (AMPPCF₂P) (lit. ¹⁰²) nebo s Ap₅A, tj. substrátem, který napodobuje současnou vazbu donoru a akceptoru fosfátu (tzv. „two substrates-mimicking substrate“) (lit. ^{46,75,91}). Základní představy o lokalizaci vazebných míst přinesly především studie krystalických komplexů AKy (lit. ⁸⁶) a AKec (lit. ⁷⁵) s inhibitorem Ap₅A. Kovalentní symetrie Ap₅A však neumožňuje rozlišení ATP a AMP. Nevýhodou použití AKI pro krystalografické studie vazebných míst je, že na rozdíl od AK3 (lit. ⁸⁸) a GMP-kinasy²⁶ se dosud nepodařilo připravit směsné krystaly se substráty. Proto byly první představy o vazebných místech získány „sycením“ krystalické vepřové AKI (lit. ⁸⁷) nebo jejich fragmentů⁸⁴ substráty nebo jejich analogy. Výsledkem těchto rentgenostrukturních studií je tzv. rentgenový model („X-ray model“) (lit. ⁶⁶) prostorového uspořádání AKI, který byl na základě NMR-studií v pozdějších letech korigován¹⁰³ (obr. 3). Architektura vazebného místa pro AMP byla poprvé odvozena ze struktury homologní GMP-kinasy (jedno adenosinové vazebné místo odvozené z krystalografických studií komplexů AK s Ap₅A odpovídá strukturně vazebnému místu pro GMP (lit. ^{75,86})) a konečně přímo zviditelněná u AK3, která krystaluje se svým substrátem AMP (lit. ^{88,90}). Schulz a spol.⁴⁶ popsali na základě srovnání krystalografických struktur homologních adenylátkinas upřesněnou představu o přechodu enzymu z neaktivní na aktivní konformaci (tzv. „induced fit“). Ze srovnávací studie vyplynulo, že u dvou strukturních oblastí - víčka a oblasti, která váže NMP - dochází po navázání substrátů ke značné pohyblivosti a tím k podstatným konformačním změnám (obr. 4). Další informace o povaze vazebných míst byly získány nejrozličnějšími spektroskopickými metodami. Impulzem pro využití NMR v této oblasti byl objev Hamady et al.⁸⁴, dokazující vazbu AMP a ATP na dva různé fragmenty, získané z nativní AKI králíčího svalu. To umožnilo NMR studie vazebných míst roztoků jak nativních adenylátkinas (*E. coli*¹⁰⁴, vepřového svalu^{105,108}, králíčího svalu¹⁰⁹, kvasinek⁵⁵), tak syntetického fragmentu odpovídajícího aminokyselinovému zbytkům 1-45 u AKI z králíčího svalu^{110,111}. Na základě těchto studií byl vytvořen NMR model AKI, který byl široce diskutován s dříve navrženým rentgenovým modelem^{30,103}.

I když během posledních let byly izolovány cDNA adenylátkinas z různých zdrojů^{44,45,65,67,68,70}, většina současných studií o vazebných místech využívá klonované



Obr. 3. Korigovaný model trojrozměrné struktury adenylátkinasy z vepřového svalu. Model zahrnuje vazebná místa pro AMP a ATP(Mg⁺). Válce znázorňují α -spirály, šipky 5 paralelních polypeptidových řetězců v β -struktuře, tečkované jsou vyznačeny oblasti s vysokým stupněm sekvenční homologie u adenylátkinas, šrafované je vyznačena smyčka bohatá na glycin



Obr. 4. Konformační změny u velké varianty adenylátkinas po navázání substrátů. a - „otevřená forma“ - mitochondriální AMP-kinasa z hovězího srdce s navázaným AMP, b - „uzavřená forma“ - AMP-kinasa z *E. coli* s navázaným Ap₅A (substrát, který napodobuje současnou vazbu donoru a akceptoru fosfátu), vazbu doprovází rotace oblasti víčka o 88°, čímž dochází k uzavření katalytického centra

Enzym	Substráty	kcat [s ⁻¹]	K _m [mmol.l ⁻¹]	kcat/K _m [s ⁻¹ /mmol.l ⁻¹]	kcat/K _m pro AMP/dAMP
Nemutovaný	ATP(Mg ²⁺) + AMP	500	0,15	3,3.10 ⁶	80
Nemutovaný	ATP(Mg ²⁺) + dAMP	87	2,1	4,1.10 ⁴	
D140A ^a	ATP(Mg ²⁺) + AMP	6	1,4	4,3.10 ³	170
D140A ^a	ATP(Mg ²⁺) + dAMP	0,10	3,9	25	
D141A ^a	ATP(Mg ²⁺) + AMP	22	1,8	1,2.10 ⁴	460
D141A ^a	ATP(Mg ²⁺) + dAMP	0,27	10,3	26	

^a Mutace kuřecí AK1 v poloze 140 nebo 141 záměnou asparaginu za alanin

kuřecí AK1 (lit. 51,69,78,112-118) aAKec(lit. 77,104,119-123). Cílenou mutací lze získat informaci o strukturních změnách a o uplatnění aminokyselinových zbytků při katalytickém procesu^{30,123}. Záměnou jediného aminokyselinového zbytku může dojít k podstatným změnám vlastností enzymu^{78,96}, včetně jeho aktivity⁷⁸ (tab. II).

Pro AK1, získanou expresí cDNA z kuřecího svalu v *E. coli*, současné metodické přístupy upřesnily význam specifických aminokyselinových zbytků pro katalytický proces^{30,66,68,69,75,78,81,87,88,96,111-118,121,122,124-127}. Tak např. Lys-21 (tzv. invariantní lysin) je u všech adenylátkinas součástí glycinové smyčky³⁰. Pro tento lysin je charakteristické, že jeho chemickou modifikací dochází k dramatické ztrátě katalytické aktivity; vazbou nukleotidu lze této modifikaci zabránit¹²⁴. U rentgenového modelu vazby substrátu⁸⁷ Lys-21 interaguje s γ -fosfátem ATP; naproti tomu NMR model předpokládá, že Lys-21 je schopen pohybu a interaguje s α -fosfátem¹¹¹; Lys-21 má dále klíčový význam pro správnou orientaci trifosfátového seskupení ATP(Mg²⁺) (lit. 113,125). To je ve shodě s výsledky Dreusicke a spol.⁸³, kteří na základě krystalografické studie dokázali, že Lys-21 tvoří vodíkovou vazbu s kyslíkem karbonylu Gly-15; tato vodíková vazba je nutná pro stabilizaci glycinové smyčky, která má klíčový význam pro strukturu. Asp-93 interaguje s ternárním komplexem; hydroxylová skupina asparaginu váže a fixuje hořčnatý ion a ten pak orientuje fosfáty do vhodných konformací³⁰. Arg-132, Arg-138 a Arg-149 přispívají ke stabilizaci ternárních komplexů a přechodného stavu a to v pořadí Arg-132 < Arg-138 < Arg-149. Žádný z těchto tří argininových zbytků nereaguje s binárními komplexy¹²⁶. Arg-44 a Arg-97 interagují specificky¹²⁶ s AMP. Bylo dokázáno, že Arg-88 má klíčový

význam jak pro vazbu obou substrátů, tak pro katalytickou funkci. Thr-39 se nalézá spolu s Leu-43, Gly-64, Leu-66, Val-67, Val-172 a Glu-101 v blízkosti AMP vazebného místa¹²⁷. Jeho záměnou za alanin, případně v kombinaci se záměnou Leu-66 za isoleucin dochází k zásadní změně substrátové specifity ve prospěch pyrimidinových nukleotidů⁹⁶.

6. Inhibice AMP-kinaS

AMP-kinasy jsou inhibovány látkami, které reagují s volnými thiolovými skupinami, jako např. AgNO₃, *p*-chlormerkuribenzoátem, *p*-hydroxymerkuribenzoátem, *p*-hydroxymerkurifenylosulfonátem a 5,5'-di(2-thio-bis-(2-nitrobenzoátem)) (Ellmanovo činidlo) (lit. 7,71,73). Známým inhibitorem adenylátkinas je Ap₅A, který se na molekulu enzymu váže v ekvimolárním poměru^{8,9,60,62,64,72,128,129}; AK1, AK2 a AK3 se liší svou citlivostí k tomuto inhibitoru (tab. I). Jde o kompetitivní inhibici, kterou lze odstranit přebytkem substrátu^{64,128,129}. AMP-kinasa z *S. acidocaldarius*⁸ vykazuje podstatně nižší citlivost vůči Ap₅A než AKec (lit. 60) a svalové adenylátkinasy⁷². P¹, P⁵-(adenosin-5')-(guanosin-5')-pentafofát (Gp₅A) je účinným inhibitorem AK3 (lit. 52).

Selektivním inhibitorem AK je železnatan draselný. Jde o látku, která irreverzibilně inaktivuje Tyr-95 a Cys-25. AK lze chránit kompetitivními inhibitory nebo substráty⁸⁵. Garin a Vignais¹³⁰ popsali silnou inhibici AK z králíčeho svalu v přítomnosti NaF, BeCl₂, ADP a Mg²⁺. Mechanismus inhibice autoři vysvětlují na základě vzniku komplexu nukleotidu s fluoroberylátem.

7. Závěr

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

Adenylátkinasy (AK) představují jeden z faktorů, které ovlivňují vnitrobuněčnou koncentraci adeninových nukleotidů, jejichž přeměna má zvláštní význam v tkáních s vysokým obrátem energie (svalová vlákna, mitochondrie, chloroplasty). Jde o všudypřítomné nízkomolekulární globulární monomerní bílkoviny, které katalyzují reakci $Mg^{2+}NTP + (d)AMP \rightleftharpoons Mg^{2+}NDP + (d)ADP$. U vyšších eukaryot byla zjištěna existence tří izoenzymů: jedné krátké varianty (cytoplazmatická AK1) a dvou dlouhých variant (mitochondriální AK2 a AK3). Zmíněné enzymy byly stejně jako adenylátkinasy z *E. coli* a *S. cerevisiae* vyčištěny do homogenity. Tato práce shrnuje současné znalosti o obecných vlastnostech, trojrozměrné struktuře a vazebných místech adenylátkinas získaných z různých zdrojů.

Zpracovat toto téma nám umožnila podpora projektu GAAVČRA455 402 a GA ČR 203/96/K 001. Autořděkují RNDr. I. Votrubovi, CSc. za podnětné náměty a zájem při sepisování tohoto článku a paní M. Marešové za pomoc při zpracování rukopisu.

LITERATURA

1. Krejčová R.: *Rešeršní práce ke kandidátskému minu*, Praha 1996.
2. Müller-Dieckmann H.-J., Schulz G. E.: J. Mol. Biol. 236, 361 (1994).
3. Konrad M.: J. Biol. Chem. 267, 25652(1992).
4. Liljelund P., Sanni A., Friesen J. D., Lacronte F.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 165, 464 (1989).
5. Wiesmüller L., Noegel A. A., Bâzu O., Gerisch G., Schleicher M.: J. Biol. Chem. 265, 6339(1990).
6. Noda L., v knize: *The Enzymes* (Boyer P. D., ed.), str. 8, 279. Academic Press, New York 1973.
7. Criss W. E., Pradhan T. K.: Methods Enzymol. 57,459 (1978).
8. Lacher K., Schafer G.: Arch. Biochem. Biophys. 302, 391 (1993).
9. Yeh S., Tomasselli A. G., Noda L. H.: Eur. J. Biochem. 136, 523 (1983).
10. Tomasselli A. G., Noda L. H.: Eur. J. Biochem. 103, 481 (1980).
11. Agarwal K. C., Miech R. P., Parks R. E., Jr.: Methods Enzymol. 57,483 (1978).
12. Maness P., Orengo A.: Biochemistry 14, 1484(1975).
13. Orengo A., Maness P.: Methods Enzymol. 51, 321 (1978).
14. Jong A., Yeh Y., Ma J. J.: Arch. Biochem. Biophys. 304, 197(1993).
15. Müller-Dieckmann H.-J., Schulz G. E.: J. Mol. Biol. 246, 522(1995).
16. Garvey T. Q., Millar F. K., Anderson E. P.: Biochim. Biophys. Acta 302, 38 (1973).
17. Lee L.-S., Cheng Y.-C: J. Biol. Chem. 252, 5686(1977).
18. Jong A. Y. S., Campbell J. L.: J. Biol. Chem. 259, 14394(1984).
19. Nelson D. J., Carter C. E.: J. Biol. Chem. 244, 5254(1969).
20. Kuby S. A., Palmier R. H., Frischat A., Fischer A. H., Wu L. H., Maland L., Manship M.: Biochemistry 23, 2393 (1984).
21. Maness P. F., Orengo A.: Cancer Res. 36,2312 (1976).
22. Seagrave J., Reyes P.: Arch. Biochem. Biophys. 247, 10(1986).
23. Scott E. M., Wright R. C: Biochim. Biophys. Acta 571, 45 (1979).
24. Sugino Y., Teraoka H., Shimono H.: J. Biol. Chem. 241, 961 (1966).
25. Ito Y., Tomasselli A. G., Noda L. H.: Eur. J. Biochem. 105, 85 (1980).
26. Hall S. W., Kühn H.: Eur. J. Biochem. 161, 551 (1986).
27. Shimono H., Sugino Y.: Eur. J. Biochem. 19, 256(1971).
28. Koshland D. E., Jr: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 44, 98(1958).
29. Jencks W. P.: Advan. Enzymol. 43, 219 (1975).
30. Tsai M.-D., Yan H.: Biochemistry 30, 6806 (1991).
31. Seagrave J., Reyes P.: Arch. Biochem. Biophys. 254, 518(1987).
32. Müller-Dieckmann H.-J., Schulz G. E.: J. Mol. Biol. 236, 361 (1994).
33. Agarwal K. C., Parks R. E., Jr.: Biochem. Pharmacol. 24,791 (1975).
34. Agarwal R. P., Scholar E. M., Agarwal K. C., Parks R.E., Jr.: Biochem. Pharmacol. 20, 1341 (1971).
35. Anderson E. P., v knize: *The Enzymes* (Boyer P. D., ed.), str. 9, 49. Academic Press, New York (1973).
36. Richard J. P., Frey P. A.: J. Am. Chem. Soc. 100,1151 (1978).
37. Schulz G. E.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 52, 429 (1987).

38. Laterveer F. D., Nicolay K., Gellerich F. N.: *FEBS Lett.* 386, 255(1996).
39. Zeleznikar R. I., Dzeja P. P., Goldberg N. D.: *J. Biol. Chem.* 270, 7311 (1995).
40. Lu Q., Inouye M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 5720 (1996).
41. Schlattner U., Wagner E., Greppin H., Bonzon M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217, 509 (1995).
42. Traut T. W.: *Eur. J. Biochem.* 222, 9(1994).
43. Spürgin P., Tomasselli A. G., Schiltz E.: *Eur. J. Biochem.* 779, 621 (1989).
44. Konrad M.: *J. Biol. Chem.* 268, 11326 (1993).
45. Kath T., Schmid R., Schäfer G.: *Arch. Biochem. Biophys.* 307, 405 (1993).
46. Schulz G. E., Muller Ch. W., Diedrichs K.: *J. Mol. Biol.* 213, 627 (1990).
47. Tsuboi K. K.: *Methods Enzymol.* 57, 467 (1978).
48. Heil A., Muller G., Noda L., Pinder T., Schirmer H., Schirmer I., von Zabern I.: *Eur. J. Biochem.* 43, 131 (1974).
49. Kuby S. A., Fleming G., Frischat A., Cress M. C., Hamada M.: *J. Biol. Chem.* 258, 1901 (1983).
50. von Zabern I., Wittman-Liebold B., Untucht-Grau R., Schirmer R. H., Pai E. F.: *Eur. J. Biochem.* 68, 281 (1976).
51. Tanizawa Y., Kishi F., Kaneko T., Nakazawa A.: *J. Biochem.* 707, 1289 (1987).
52. Tomasselli A. G., Schirmer R. H., Noda L. H.: *Eur. J. Biochem.* 93, 257 (1979).
53. Merta A., Votruba I., Jindřich J., Holý A., Cihlář T., Rosenberg I., Otmar M., Herve T. Y.: *Biochem. Pharmacol.* 44, 2067 (1992).
54. Tomasselli A. G., Mast E., Janes W., Schiltz E.: *Eur. J. Biochem.* 755, 111 (1986).
55. Vetter I. R., Konrad M., Rosch P.: *Biochemistry* 30, 4137(1991).
56. Schiltz E., Burger S., Grafmüller R., Deppert W. R., Haehnel W., Wagner E.: *Eur. J. Biochem.* 222, 949(1994).
57. Kawai M., Kidou S., Kato A., Uchimiya H.: *Plant J.* 2, 845 (1992).
58. **Kawai M., Uchimiya H.:** *Plant Mol. Biol.* 27, 943 (1995).
59. Kleczkowski L. A., Randall D. D.: *Plant Physiol.* 81, 1110(1986).
60. Bâzu O., Michelson S.: *FEBS Lett.* 153, 280 (1983).
61. Gilles A.-M., Glaser P., Perrier V., Meier A., Longin R., Sebald M., Maignan L., Pistotnik E., Bâzu O.: *J. Bacteriol.* 776, 520 (1994).
62. Glaser P., Presecan E., Delepierre M., Surewicz W. K., Mantsch H. H., Bâzu O., Gilles A.-M.: *Biochemistry* 31, 3038 (1992).
63. Rusnak P., Haney P., Konisky J.: *J. Bacteriol.* 777, 2977(1995).
64. Feldhaus P., Fröhlich T., Goody R. S., Isakov M., Schirmer R. H.: *Eur. J. Biochem.* 57, 197 (1975).
65. Kishi F., Maruyama M., Tanizawa Y., Nakazawa A.: *J. Biol. Chem.* 261, 2942 (1986).
66. Haase G. H. W., Brune M., Reinstein J., Pai E. F., Pingoud A., Wittinghofer A.: *J. Mol. Biol.* 207, 151 (1989).
67. Gilles A.-M., Sismeiro O., Munier H., Fabian H., Mantsch H. H., Surewicz W. K., Craescu C. C., Bâzu O., Danchin A.: *Eur. J. Biochem.* 218, 921 (1993).
68. Brune M., Schumann R., Wittinghofer F.: *Nucleic Acid Res.* 13, 7139 (1985).
69. Matsuura S., Igarashi M., Tanizawa Y., Yamada M., Kishi F., Kajii T., Fujii H., Miwa S., Sakurai M., Nakazawa A.: *J. Biol. Chem.* 264, 10148 (1989).
70. Tanabe T., Yamada M., Noma T., Kajii T., Nakazawa A.: *J. Biochem.* 113, 200 (1993).
71. Schirmer R. H., Thuma E.: *Biochim. Biophys. Acta* 268, 92 (1972).
72. Frank R., Trosin M., Tomasselli A. G., Schulz E. G., Schirmer R. H.: *Eur. J. Biochem.* 747, 629 (1984).
73. Khoo J. C., Russell P. J.: *Biochim. Biophys. Acta* 268, 98 (1972).
74. Robbins B. L., Greenhaw J., Connelly M. C., Fridland A.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 2304 (1995).
75. Müller Ch. W., Schulz G. E.: *J. Mol. Biol.* 224, 159 (1992).
76. Watanabe K., Fukumoto H., Isoi K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134, 527 (1986).
77. Saint Girons I., Gilles A.-M., Margarita D., Michelson S., Monnot M., Femandjian S., Danchin A., Barzu O.: *J. Biol. Chem.* 262, 622 (1987).
78. Dahnke T., Tsai M.-D.: *J. Biol. Chem.* 269, 8075 (1994).
79. Tomasselli A. G., Frank R., Schiltz E.: *FEBS Lett.* 202, 303 (1986).
80. Frank R., Trosin M., Tomasselli A. G., Noda L., Krauth-Siegel R. L., Schirmer R. H.: *Eur. J. Biochem.* 754, 205 (1986).
81. Schulz G. E., Schiltz E., Tomasselli A. G., Frank R., Brune M., Wittinghoffer A., Schirmer R. H.: *Eur. J. Biochem.* 767, 127 (1986).
82. Schulz G. E., Elzinga M., Marx F., Schirmer R. H.: *Nature* 250, 120 (1974).
83. Dreusicke D., Karplus P. A., Schulz G. E.: *J. Mol. Biol.* 799, 359 (1988).
84. Hamada M., Palmieri R. H., Russell G. A., Kuby S. A.: *Arch. Biochem. Biophys.* 795, 155 (1979).

85. Crivellone M. D., Hermanson M., Axelrod B.: *J. Biol. Chem.* 260, 2657 (1985).
86. Egner U., Tomasselli A. G., Schulz G. E.: *J. Mol. Biol.* 195, 649 (1987).
87. Pai E. F., Sachsenheimer W., Schirmer R. H., Schulz G. E.: *J. Mol. Biol.* 114, 37 (1977).
88. Diedrichs K., Schulz G. E.: *J. Mol. Biol.* 217, 541 (1991).
89. Gerstein M., Schulz G., Chothia C.: *J. Mol. Biol.* 229, 494 (1993).
90. Diedrichs K., Schulz G. E.: *Biochemistry* 29, 8138 (1990).
91. Müller C. W., Schulz G. E.: *J. Mol. Biol.* 202, 909 (1988).
92. Beck-Sickinger A. G., Kiess ML, Keru P., Folkers G.: *Pharm. Acta Helv.* 70, 33 (1995).
93. Dreusicke D., Schulz G. E.: *FEBS Lett.* 208, 301 (1986).
94. Saraste M., Sibbald P. R., Wittinghofer A.: *Trends Biochem. Sci.* 15, 430 (1990).
95. Tomasselli A. G., Noda L. H.: *Eur. J. Biochem.* 93, 263 (1979).
96. Okajima T., Tamizawa K., Fukui T.: *FEBS Lett.* 334, 86 (1993).
97. Krejčová R.: *Chem. listy*, v přípravě do tisku.
98. Sachsenheimer W., Schulz G. E.: *J. Mol. Biol.* 114, 23 (1977).
99. Kuby S. A., Hamada M., Gerber D., Tsai W.-Ch., Jacobs H. K., Cress M. C., Chua G.-K., Fleming G., Wu L. H., Fischer A. H., Frischat A., Maland L.: *Arch. Biochem. Biophys.* 187, 34 (1978).
100. Schirmer I., Schirmer R. H., Schulz G. E., Thuma E.: *FEBS Lett.* 10, 333 (1970).
101. Pai E. F., Schulz G. E., Tomasselli A. G., Noda L. H.: *J. Mol. Biol.* 164, 347 (1983).
102. Schlauderer G. J., Proba K., Schulz G. E.: *J. Mol. Biol.* 256, 223 (1996).
103. Kim H. J., Nishikawa S., Tokutomi Y., Takenaka H., Hamada M., Kuby S. A., Uesugi S.: *Biochemistry* 29, 1107 (1990).
104. Vetter I. R., Reinstein J., Rösch P.: *Biochemistry* 29, 7459 (1990).
105. Klaus W., Scharf M., Zimmermann S., Rosch P.: *Biochemistry* 27, 5407 (1988).
106. Ray B. D., Rosch P., Nageswara B. D., Rao R.: *Biochemistry* 27, 8669 (1988).
107. Shyy Y.-J., Tian G., Tsai M.-D.: *Biochemistry* 26, 6411 (1987).
108. Rosch P., Klaus W., Auer M., Goody R. S.: *Biochemistry* 28, 4318 (1989).
109. Fry D. C., Kuby S. A., Mildvan A. S.: *Biochemistry* 26, 1645 (1987).
110. Fry D. C., Byler D. M., Susi H., Brown E. M., Kuby S. A., Mildvan A. S.: *Biochemistry* 27, 3588 (1988).
111. Fry D. C., Kuby S. A., Mildvan A. S.: *Biochemistry* 24, 4680 (1985).
112. Yan H., Shi Z., Tsai M.-D.: *Biochemistry* 29, 6385 (1990).
113. Tian G., Yan H., Jiang R.-T., Kishi F., Nakazawa A., Tsai M.-D.: *Biochemistry* 29, 4296 (1990).
114. Yoneya T., Okajima T., Tagaya M., Tanizawa K., Fukui T.: *J. Biol. Chem.* 265, 21488 (1990).
115. Tian G., Sanders II Ch. R., Kishi F., Nakazawa A., Tsai M.-D.: *Biochemistry* 27, 5544 (1988).
116. Okajima T., Tanizawa K., Fukui T.: *J. Biochem.* 114, 627 (1993).
117. Tagaya M., Yagami T., Noumi T., Futai M., Kishi F., Nakazawa A., Fukui T.: *J. Biol. Chem.* 264, 990 (1989).
118. Shi Z., Byeon I. L., Jiang R.-T., Tsai M.-D.: *Biochemistry* 32, 6450 (1993).
119. Reinstein J., Schlichting I., Wittinghofer A.: *Biochemistry* 29, 7451 (1990).
120. Reinstein I., Vetter I. R., Schlichting I., Rosch P., Wittinghofer A., Goody R. S.: *Biochemistry* 29, 7440 (1990).
121. Reinstein J., Gilles A.-M., Rose T., Wittinghofer A., Saint-Girons I., Barzu O., Surewicz W. K., Mantsch H. H.: *J. Biol. Chem.* 264, 8107 (1989).
122. Gilles A. M., Saint-Girons I., Mounot M., Femandjian S., Michelson S., Bârzu O.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 5798 (1986).
123. Bilderback T., Fulmer T., Mantulin W. W., Glaser M.: *Biochemistry* 35, 6100 (1996).
124. Tagaya M., Yagami T., Fukui T.: *J. Biol. Chem.* 262, 8257 (1987).
125. Byeon L., Shi Z., Tsai M.-D.: *Biochemistry* 34, 3172 (1995).
126. Yan H., Dahnke T., Zhou B., Nakazawa A., Tsai M.-D.: *Biochemistry* 29, 10956 (1990).
127. Byeon I. L., Yan H., Edison A. S., Mooberry E. S., Abildgaard F., Markley J. L., Tsai M.-D.: *Biochemistry* 32, 12508 (1993).
128. Kleczkowski L. A., Randall D. D., Zahler W. L.: *Z. Naturforsch.* 45c, 607 (1990).
129. Lienhard G. E., Secemski I. I.: *J. Biol. Chem.* 248, 1121 (1973).
130. Garin J., Vignais P. V.: *Biochemistry* 32, 6821 (1993).

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

Nucleoside monophosphokinases (NMP kinases) catalyze the reversible transfer of the terminal phosphoryl group from a nucleoside triphosphate (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. All factors affecting the concentration of intracellular adenine

nucleotides play important roles in the cells. One of these factors is adenylate kinase (NTP : AMP phosphotransferase, where N is adenine or guanine, EC 2.7.4.3, myokinase, AK), a ubiquitous small monomeric intracellular enzyme that catalyzes the interconversion of adenosine nucleotides: $\text{Mg}^{2+}\text{NTP}+(\text{d})\text{AMP} \rightleftharpoons \text{Mg}^{2+}\text{NDP}+(\text{d})\text{ADP}$. In mammals, three major isoenzymes AK1, AK2 and AK3 were purified and studied in detail together with AK from *E. coli* and *S. cerevisiae*. The paper reports the recent knowledge of the general properties, three-dimensional structure and the properties of binding sites of these enzymes.