

# NUKLEOSIDDIFOSFÁTKINASY

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. Reakční mechanismus
5. Fosforylace analogů nukleotidů použit k jejich izolaci
6. Terciární struktura NDP-kinasy byly připraveny ze savčích tkání
7. Vazebné místo
8. Kvartérní struktura
9. Inhibice NDP-kinas
10. Vlastnosti genů kódujících NDP-kinasy
11. Aktivace G-proteinů NDP-kinasou
12. Závěr

## 1. Úvod

Nukleosiddifosfátkinasy (ATP: nukleosiddifosfátfosfotransferasy, dále NDP-kinasy, EC 2.7.4.6) jsou relativně nespecifické enzymy, které fosforylují nukleosid-5'-difosfáty na trifosfáty; jako donor fosfátu využívají nejčastěji ATP (cit. <sup>1</sup>). Produkty této fosforylace se dále využívají pro syntézu *de novo* nukleových kyselin, proteinů, polysacharidů a lipidů<sup>2,3</sup>. NDP-kinasy jsou všudypřítomné enzymy nezbytné pro udržování intracelulární hladiny (d)NTP v prokaryotních<sup>4</sup> i eukaryotních<sup>5</sup> buňkách. I když jsou NDP-kinasy jedinými enzymy zodpovědnými za syntézu (d)NTP (s výjimkou ATP (cit. <sup>1,4,6</sup>)) není patrně fosforylace nukleosid-5'-difosfátů regulujícím krokem v anabolismu nukleotidů<sup>1</sup>. NDP-kinasy se zúčastní i dalších důležitých procesů v buňce jako např. iniciace buněčné proliferace

a diferenciací (potvrzeno i současnými studiemi indukce NDP-kinasy interleukinem (IL2) (cit. <sup>7</sup>) a interferonem (HuIFNs) (cit. <sup>8</sup>)), morfogeneze, signální transdukce, transkripce, aktivace GTP-vazebných bílkovin a nádorové metastáze<sup>9-13</sup>. Vysoká hladina NDP-kinas byla nalezena, na rozdíl od nukleosidmonofosfátkinas (dále NMP-kinas) (cit. <sup>9,14-16</sup>), jak v rychle rostoucích, tak i v neproliferujících tkáních<sup>17</sup>. V hovězím mozku tvoří NDP-kinasa přibližně 0,1-0,2 % buněčných bílkovin<sup>18</sup>. NDP-kinasy mají širší substrátovou specifitu<sup>19</sup> a 10x-100x vyšší specifickou aktivitu<sup>1</sup> než NMP-kinasy.

NDP-kinasa byla poprvé nezávisle popsána v roce 1953 z kvasinek<sup>20</sup> a holubího hrudního svalu<sup>21</sup>. V průběhu let byla izolována a charakterizována z řady tkání<sup>1,17,22,24</sup>. Ukázalo se, že NDP-kinasy, získané z různých zdrojů, se podstatně liší svými vlastnostmi, a proto bylo nezbytné izolaci rozdílné postupy<sup>18,25-33</sup>. Homogenní NDP-kinasy byly připraveny ze savčích tkání<sup>3,18,28,33-36</sup>, HeLa S3 buněk<sup>29</sup>, buněk Ehrlichova ascitu<sup>30</sup>, rostlin<sup>25,37-38</sup>, kvasinek<sup>39,40</sup> a bakterií<sup>26,27,41</sup>. V krystalické formě byly připraveny NDP-kinasy z *Myxococcus xanthus*<sup>4,41-43</sup>, *Escherichia coli*<sup>26</sup>, *Saccharomyces cerevisiae*<sup>39</sup>, *Drosophila melanogaster*<sup>44</sup>, *Dictyostelium discoideum*<sup>45-49</sup> a lidská NDP-kinasa (Nm23-H2) (cit. <sup>50</sup>). Geny kódující NDP-kinasu byly klonovány a sekvenovány u mnoha eukaryotních<sup>2,3,19,51-57</sup> a prokaryotních<sup>4,58,59</sup> organismů; jejich exprese v *E. coli* se využívá pro získání homogenních NDP-kinas v dostatečném množství<sup>4,43,45,47,49,58,60</sup>.

## 2. Obecné vlastnosti

NDP-kinasy jsou v buňce vázány na řadu buněčných struktur<sup>1,2,5, 18,30,34,37,38,57,61,62</sup>. Nejvíce enzymu bylo nalezeno v cytosolu<sup>1,63</sup>, zatímco v mitochondriích je méně než 10 % celkového buněčného obsahu NDP-kinasy<sup>61,62</sup>. Enzymy z různých buněčných struktur se pravděpodobně rozdílným způsobem uplatňují v metabolických procesech buňky. NDP-kinasy, vázané na mitochondriální membrány a mezimembránový prostor<sup>64</sup>, jsou zřejmě důležitým spojovacím článkem mezi přenosem energie a regulací buněčného metabolismu<sup>61</sup>. Značně prostudované NDP-ki-

nasy plazmatické membrány<sup>2-34,58,65</sup> se mohou naopak výrazně uplatňovat při regulaci funkce G-proteinů a některých specifických (na hormonech závislých) procesů<sup>6,31,34,66-72</sup>.

Nativní NDP-kinasy, získané z různých typů buněk a tkání, se výrazně liší svou relativní molekulovou hmotností. To je ve shodě s jejich monomerním až hexamerním podjednotkovým složením<sup>3-4,25,27,28,31-38,43-53,73</sup>. Hexamerní složení je u proteinů přenášejících fosfát velmi vzácné<sup>45</sup>. Ve srovnání s eukaryoty jsou prokaryotní NDP-kinasy pouze trimery nebo tetramery<sup>4</sup>. Multimerní NDP-kinasy obsahují jeden<sup>4,7,25,27,31,32,38,74-80</sup> nebo dva<sup>18,28-30,63</sup> typy podjednotek s relativní molekulovou hmotností 16 000 až 24 000 (cit. <sup>1,29,31,42</sup>). Nejvíce prostudovaný je enzym z lidských erythrocytů<sup>23,28</sup>, složený ze dvou rozdílných polypeptidových řetězců A a B (obecně označovaných NDP-kinasa A, resp. B), které se shodují s lidskými proteiny Nm23-H1 resp. Nm23-H2, získanými přepisem příslušných cDNA (cit. <sup>11,28,53</sup>). Analogické proteiny byly nalezeny u myší<sup>73-75</sup> (Nm23-M1 a Nm23-M2) a krys<sup>60</sup> (proteiny 3 a a).

Chromatografickými a elektroforetickými metodami byla u NDP-kinas zjištěna přítomnost jednoho<sup>18,32-34</sup> nebo několika izoenzymů<sup>1,28,37</sup> s rozdílnými hodnotami *pI*, rovnovážných konstant a aktivační energie<sup>1-62-68</sup>. Tyto izoenzymy vznikají pravděpodobně kombinací produktů pouze

dvou genů<sup>68</sup>. Podrobně jsou popsány izoenzymy NDP-kinasy z lidských erythrocytů (hexamery) (cit. <sup>1,23,28,68</sup>), které vznikají náhodnou asociací podjednotek A a B (A6, A5B, ..., B6).

Za izoenzymy se označují rovněž tři typy NDP-kinasy ze špenátových listů (*Spinacia oleracea*) (cit. <sup>38,81,82</sup>), lokalizované téměř výhradně v chloroplastech<sup>25-38</sup>. Jde o tři rozdílné homologní hexamery (s poměrně nízkou sekvenční homologií<sup>38,81</sup> asi 53-61 %), označované NDPK-I, NDPK-II a NDPK-III, o relativní molekulové hmotnosti 92 000, 110 000 a 102 000 (cit. <sup>25,38</sup>). Tyto izoenzymy se významně liší hodnotami *K<sub>m</sub>* pro GDP a ADP (cit. <sup>38</sup>), a proto se zřejmě odlišně uplatňují v regulaci intracelulárních hladin (d)NDP a (d)NTP.

### 3. Primární struktura

Primární struktura byla určena u NDP-kinas získaných z rostlin<sup>5-25,38</sup>, bakterií<sup>27-58-59</sup>, eukaryotních organismů<sup>2,32,34,55,73,78,83</sup> anádorových buněk<sup>30</sup>. Evolučně jsou NDP-kinasy jedny z nejlépe konzervovaných proteinů mezi organismy<sup>9-41</sup>. Řetězce podjednotek NDP-kinas obsahují zhruba 150 aminokyselinových zbytků s extrémně 143 u *E. coli*<sup>59</sup> a 155 aminokyselinových zbytků u *D. discoideum*<sup>55</sup>. Vysoký stupeň homologie vykazují zvláště u eu-

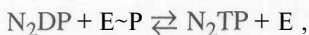
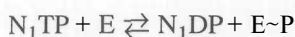
Tabulka I  
Stupeň sekvenční homologie (%) NDP-kinas z různých zdrojů

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Myxococcus xanthus</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	Špenát II	Rajče	Hrách <sup>5</sup>	Myš M1	M2	Krysa α	β	Člověk H1	H2
<i>E. coli</i> <sup>59</sup>		57	45	45									
<i>M. xanthus</i> <sup>58</sup>							48						
<i>D. discoid.</i> <sup>55</sup>						66	61						
<i>D. melan.</i> <sup>57</sup>		50	60			70	68						
Špenát <sup>82</sup> I			59	67	59	61	88			63	64	64	63
Špenát <sup>81</sup> II			52	54		53	64			50	51	52	50
Špenát <sup>38</sup> III										60	60	60	61
Rajče <sup>51</sup>							86						
Myš <sup>3</sup> M1	42						66	88					
Myš <sup>73</sup> M2	45	47	65	77									
Krysa <sup>2</sup> α	43			78			65	88	99	89	89	98	
Krysa <sup>19</sup> β								97				95	90
Člověk <sup>3</sup> H1	43			78		66	66	94	88				89
Člověk <sup>53</sup> H2							64	88	98				

karyot<sup>3,9,19,28</sup> (tab. I). Studium homologních sekvenčních míst u NDP-kinas slouží k získání poznatků o struktuře vazebného místa a povaze reakčního mechanismu<sup>38,82</sup>. Rozdíly v relativních molekulových hmotnostech určených z primární struktury a elektroforézou homogenních NDP-kinas za denaturujících podmínek jsou zřejmě odrazem posttranslačních modifikací<sup>61,81</sup>.

#### 4. Reakční mechanismus

NDP-kinasy pracují „ping-pong“ mechanismem, který zahrnuje tvorbu energeticky bohatých fosfoenzymových intermediátů:



kde  $N_1$  a  $N_2$  jsou ribo- nebo 2'-deoxyribonukleotidy s purinovou nebo pyrimidinovouází<sup>1</sup>. „Ping-pong“ mechanismus představuje katalytický proces zcela odlišný od mechanismu většiny kinas<sup>9,84</sup>. Po navázání  $N_1TP$  do vazebného místa enzymu se  $\gamma$ -fosfátová skupina přenáší na enzym za vzniku fosfoenzymového intermediátu.  $N_1DP$  se uvolní z molekuly fosfoenzymu a do stejného vazebného místa se pak může vázat  $N_2DP$ , který se chová jako akceptor fosfátu; vzniklý  $N_2TP$  se z enzymu uvolní<sup>84</sup>.

NDP-kinasy ve většině případů vyžadují pro oba kroky katalytického procesu dvojmocné kovové kationty<sup>1,4,27,30,43,69,70,85</sup>, především  $Mg^{2+}$ , které přemostují  $\alpha$ - a  $P$ -fosfát substrátu<sup>86</sup>. Vznik fosfoenzymového intermediátu u NDP-kinasy z *M. xanthus* probíhá i bez dvoj mocných kationtů<sup>44</sup>, trvá však sekundy až minuty<sup>77</sup> (v přítomnosti  $Mg^{2+}$  trvá méně než 1 ms); pro druhý krok katalytické reakce, přenos fosfátu z fosfoenzymového intermediátu na NDP, jsou dvojmocné kationty nezbytné<sup>43</sup>. Podle Peliska a spol.<sup>86</sup> probíhají oba kroky katalytického procesu mnohem rychleji v nepřítomnosti dvojmocných kationtů, pokud je donorem  $\gamma$ -sulfátový analog ATP (adenosin-5'-sulfátopyrofosfát, ADPSO<sub>3</sub>). Jsou-li v molekule NDP-kinasy sulfhydrylové skupiny, vyžaduje pro svou aktivitu též přítomnost thiolů (cystein, DTT, merkaptoethanol) (cit. 1,58,85,87).

U NDP-kinas bylo prokázáno, že vznik intermediátu je podmíněn vysoce efektivní reverzibilní fosforylací (s číslem přeměny větším než  $10^3 \text{ s}^{-1}$ ) histidinového zbytku<sup>1,88,89</sup>. Tento histidin se vyskytuje v sekvenci HGSD v okolí aminokyselinového zbytku v poloze 120 (cit. 26,28,42,45) a je

jediným konzervovaným histidinem u všech dosud sekvenovaných NDP-kinas<sup>42</sup>. Substituce His-122 za Cys u *D. discoideum*<sup>46</sup> vede ke ztrátě katalytické enzymové aktivity. Pravděpodobně díky fosforylaci histidinových zbytků<sup>1</sup> je většina fosfoenzymových intermediátů stabilní v alkalickém a labilní v kyselém prostředí<sup>26</sup>. Rentgenovou strukturní analýzou byla zjištěna kovalentní vazba  $\gamma$ -fosfátu k 8-atomu dusíku histidinu; fosfoenzymových intermediátů lze využít pro strukturní studie enzymu<sup>77-90</sup>.

U řady intermediátů byla popsána autofosforylace serinových zbytků<sup>26,37,41,50,75,91</sup>. Bominaara a spol.<sup>74</sup> pomocí cílených mutací zjistili, že nehistidinové autofosforylace vyžadují přítomnost histidinu v aktivním místě enzymu.

#### 5. Fosforylace analogů nukleotidů

Biologická aktivita některých 2',3'-dideoxyribonukleosidů, účinných proti retrovirům, je podmíněna fosforylací až na 5'-trifosfáty<sup>47,92,93</sup> (způsobují terminaci syntézy DNA při reverzní transkripci). Fosforylace příslušných 2',3'-dideoxynukleosid-5'-difosfátů je pomalá *in vitro* i *in vivo*, což znamená, že NDP-kinasa je limitujícím faktorem jejich účinku<sup>47</sup>. Nález je překvapující, protože NDP-kinasa vykazuje obecně širokou substrátovou specifitu<sup>93</sup>, a zřejmě souvisí se skutečností, že 3'-hydroxyl (cukerné části nukleotidu) má zásadní význam pro vazbu substrátu a vlastní katalýzu<sup>94</sup>. Karlsson a spol.<sup>93</sup> studovali schopnost lidských CEM buněk (T-lymfoblastoidních buněk) fosforylovat 3'-azido-2',3'-dideoxyguanosin (AzddGuo). Dokázali, že NDP-kinasa fosforyluje AzddGuo-5'-difosfát; tato fosforylace je limitujícím stupněm při tvorbě 5'-trifosfátu, účinného inhibitoru replikace lidského imunodeficitního viru (HIV) *in vitro*<sup>93</sup>. 5'-Trifosfáty dvou enantiomerů karboviru, karbocyklického analogu 2',3'-dideoxyguanosinu, jsou substráty a alternativní substrátové inhibitory HIV reverzní transkriptasy<sup>92</sup>. Na rozdíl od pyruvátkinasy, fosfoglycerátkinasy, kreatinkinasy, které fosforylují (+)- i (-)-enantiomer karbovirdifosfátu podobnou rychlostí, NDP-kinasa z hovězích jater přednostně a s účinností 150x vyšší fosforyluje (-)-enantiomer karbovirdifosfátu<sup>92</sup>. 5'-Trifosfát 3'-azido-2',3'-dideoxythymidinu (AZT) je rovněž substrátem reverzní transkriptasy<sup>47</sup>. Je dokázáno, že kvasinková a lidská NDP-kinasa fosforyluje AZT-5'-difosfát s nízkou účinností<sup>47-94</sup>. Z komplexu dTDP s NDP-kinasou vyplývá, že ve vazebném místě pro cukernou část nukleotidu není místo pro objemnou azidoskupinu nahrazující 3'-hydroxyl<sup>47</sup>.

## 6. Terciární struktura

Výsledky rentgenových krystalografických<sup>42-46,48,77</sup> a NMR (cit. <sup>90</sup>) studií v kombinaci s použitím cílených mutací<sup>26,41,46,78</sup> poskytly, stejně jako u NMP-kinas<sup>9,14-16</sup>, základní poznatky o povaze vazebního místa a terciární struktury NDP-kinas. Mikrokrystaly NDP-kinasy z kvasinek<sup>40</sup> byly poprvé popsány v roce 1964. Strukturálně nejvíce prostudovanými NDP-kinasami jsou enzymy z *D. melanogaster*<sup>44</sup>, *M. xanthus*<sup>43</sup> a cytosolová NDP-kinasa z *D. discoideum*<sup>48</sup> (dále Awd, Mx resp. Dd). Zatímco Dd a Awd jsou homologní hexamery (155 resp. 153 aminokyselinových zbytků v podjednotce<sup>48</sup>), vykazující 60 % sekvenční homologii, Mx je tetramer (145 aminokyselinových zbytků v podjednotce), který vykazuje pouze 45 % sekvenční homologii s Awd a Dd (cit. <sup>48</sup>). Uvedené NDP-kinasy byly připraveny v krystalické formě buď jako volné<sup>42,44-46,48,49</sup> nebo jako komplexy s ADP (cit. <sup>43,45</sup>), dTDP (cit. <sup>47</sup>) nebo cAMP (cit. <sup>95</sup>).

Na rozdíl od nukleosidmonofosfátkinas (AMP-kinasy<sup>14</sup>, GMP-kinasy<sup>15</sup>) a některých G-proteinů (ras p21; EF-Tu) (cit. <sup>96,97</sup>) NDP-kinasy neobsahují ani klasické uspořádání s paralelními  $\beta$ -řetězci („mononucleotide-binding fold“) (cit. <sup>46</sup>) ani fosfát vázající smyčku („P-loop“) (cit. <sup>9,45</sup>). Jediný glycin, nalezený ve vazebném místě pro nukleotid u Dd v poloze 117, interaguje spíše s bází než s fosfáty<sup>45</sup>.

Podjednotka NDP-kinasy má charakteristické prostorové uspořádání společné pro struktury Dd, Awd i Mx (cit. <sup>48</sup>). Podobné prostorové uspořádání bylo nalezeno v allosterické doméně regulační podjednotky aspartáttranskaryb-amylysy z *E. coli*<sup>98,99</sup>, u malého jaderného ribonukleoproteinu A v doméně vázající RNA-U1 (cit. <sup>100</sup>), v aktivační doméně prokarboxypeptidasy B (cit. <sup>101</sup>) a v acylfosfatase<sup>102</sup>; tyto proteiny nejsou navzájem příbuzné a liší se svými aminokyselinovými sekvencemi<sup>46</sup>.

Prostorové uspořádání monomerních NDP-kinas spočívá v globulární  $\alpha/\beta$  doméně, rozvolněném C-koncovém segmentu<sup>43-44,46</sup> a prostorově neuspořádané N-koncové části<sup>48</sup>. Centrální  $\alpha/\beta$  doména (u Dd zahrnuje aminokyselinové zbytky 8-138) (cit. <sup>46</sup>) je tvořena 4 antiparalelními řetězci v p-struktuře s pořadím řetězců  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_4$ , obklopených a propojených 5 hlavními a-šroubovicemi  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_A$  (cit. <sup>43,44,46,48</sup>). Pro prostorové uspořádání je rovněž důležitá sekvence tvořená dvaceti aminokyselinovými zbytky, která je označovaná jako Kpn-smyčka<sup>43,44,48</sup>. Je lokalizována mezi  $\alpha_3$ -šroubovicí a  $\beta_4$ -řetězcem, (u Dd zahrnuje aminokyselinové zbytky 99-118) (cit. <sup>46,48</sup>). Kpn-smyčka významně přispívá k vytvoření vazebního místa pro nukleotidy<sup>43,48</sup>. Všechny  $\alpha$ -šroubovi-

ce, P-řetězce a Kpn-smyčky jsou přítomny v ekvivalentních polohách u Dd, Awd a Mx (cit. <sup>43,44,48</sup>) a pravděpodobně i ve všech homologních NDP-kinasách<sup>48</sup>.

N- a C-koncové segmenty Dd, Awd a Mx vykazují, na rozdíl od  $\alpha/\beta$  domény, zřetelné rozdíly v prostorovém uspořádání<sup>48</sup>. Na N-konci má Dd (cit. <sup>48</sup>), ve srovnání s Awd resp. Mx, navíc tři<sup>44</sup> resp. pět<sup>43</sup> aminokyselinových zbytků. Daleko významnější jsou rozdíly v C-koncových segmentech. Sekvenční studie ukázaly, že Awd obsahuje o jeden aminokyselinový zbytek více než Dd; u Mx chybí ekvivalentní aminokyselinové zbytky v polohách 151-155 (cit. <sup>48</sup>). Tyto vzájemné odlišnosti se pak projevují v rozdílném prostorovém uspořádání jednotlivých segmentů.

U NDP-kinas je známa řada konzervovaných sekvencí, jejichž aminokyselinové zbytky se pravděpodobně účastní stabilizace terciární a kvartérní struktury enzymu a přenosu fosfátové skupiny<sup>38,51,73,81,82,103</sup>. Sekvence IHGSD je shodná u většiny NDP-kinas<sup>82</sup>. Všechny enzymy, kromě bakteriálních<sup>73</sup>, obsahují tripeptid RGD, který je charakteristickou rozpoznávací sekvencí NDP-kinas<sup>104</sup>. Předpokládá se, že zbytek kyseliny asparagové interaguje s fosfátovými skupinami ATP prostřednictvím můstků s  $Mg^{2+}$  (cit. <sup>103</sup>). Některé sekvence přítomné v G-proteinech, (např. GXXGK a DXXG) (cit. <sup>105</sup>) se vyskytují i v NDP-kinase z *M. xanthus*<sup>58</sup>; sekvence NKXD, která se u G-proteinů zúčastní rozpoznávání guaninové báze<sup>105</sup>, však u tohoto enzymu chybí<sup>58</sup>.

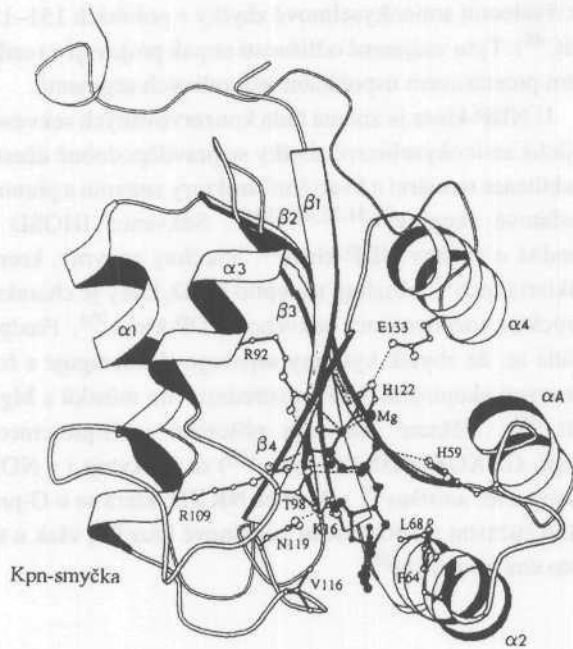
## 7. Vazebné místo

Podjednotka NDP-kinasy má, na rozdíl od NMP-kinas, pouze jedno vazebné místo pro substrát (cit. <sup>9,14-16,84</sup>). Histidinový zbytek, který je během katalýzy fosforylován (u *D. discoideum* v poloze 122 (cit. <sup>46</sup>), tzv. aktivní místo), se nachází na  $\beta_4$ -řetězci ve štěrbině mezi  $\alpha_4$ - a  $\alpha_A$ -šroubovicemi<sup>48</sup>. Každá podjednotka NDP-kinasy nese jedno aktivní místo<sup>90</sup>. Rentgenové strukturální studie jak volné Dd (cit. <sup>48</sup>), tak jejího komplexu s ADP( $Mg^{2+}$ ) (cit. <sup>45</sup>) nebo dTDP( $Mg^{2+}$ ) (cit. <sup>47</sup>) ukazují, že se vazebné místo nachází v jiné části enzymové molekuly než histidin 122. Substrát se váže na hranu P-struktury v poloze výhodné k přenosu  $\gamma$ -fosfátu na 5-atom dusíku histidinu<sup>48</sup> a je současně vklíněn mezi  $\alpha_2$ -šroubovicí a Kpn-smyčkou (obr. 1). Z těchto studií vyplývá, že vazebné místo vázejakribo- tak i 2'-deoxyribonukleosid-5'-difosfáty, které interagují obdobným způsobem s proteinem bez ohledu na povahu báze a cukru<sup>77</sup>. Při vazbě substrátu nedochází k polárním interakcím s aktiv-



ními skupinami hlavního řetězce, ale pouze se skupinami postranních řetězců<sup>45</sup>. Většinu interakcí s molekulou enzymu zajišťuje pyrofosfát a cukr, zatímco báze se těchto specifických interakcí neúčastní<sup>43,45</sup>.

Navázáním substrátu do vazebného místa nedochází ke změnám kvartérní struktury<sup>47</sup>. Většina změn nastává ve flexibilním polypeptidovém segmentu, tvořeném aminokyselinovými zbytky 60-64, lokalizovaném mezi  $\alpha_A$ - a  $\alpha_2$ -šroubovicemi, který může přizpůsobovat své prosto-



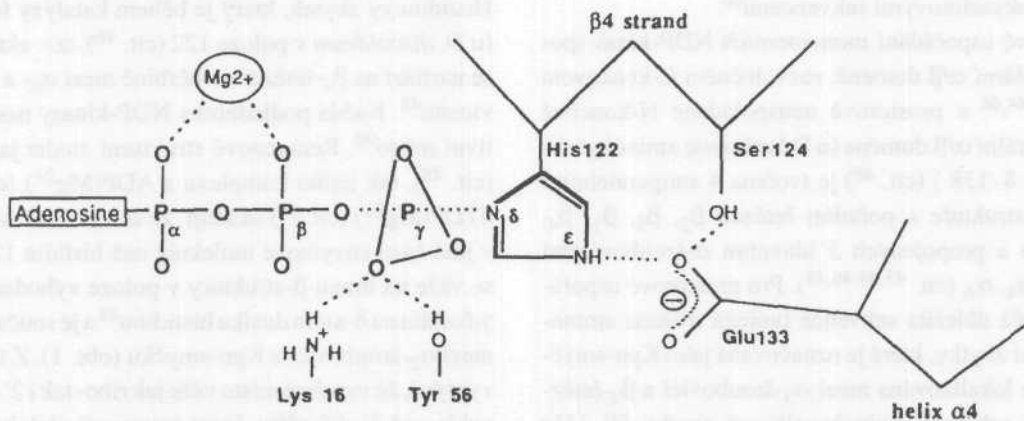
Obr. 1. Schéma trojrozměrné struktury komplexu dTDP(Mg<sup>2+</sup>) s podjednotkou NDP-kinasy z *D. discoideum*<sup>47</sup>

rové uspořádání povaze báze<sup>47</sup>. Ve volné NDP-kinase je tento segment v otevřené formě, která usnadňuje vstup nukleotidu do vazebného místa. U komplexu substrát-enzym je v uzavřené formě, u níž se Phe-64 dotýká purinové nebo pyrimidinové báze a vtláčuje bázi mezi hydrofobní postranní řetězec Val-116 a aromatický kruh<sup>47</sup>. Phe-64, stejně jako Gly-26, Gly-96, Lys-16 a Asn-119 jsou konzervovány ve všech dosud známých sekvencích NDP-kinas<sup>41,45,59</sup>. Thymin a adenin interagují v sousední podjednotce hexameru prostřednictvím molekul vody s C-koncem Glu-155, konzervovaným u eukaryotních NDP-kinas, zatímco u prokaryotních enzymů chybí<sup>47</sup>.

Krystalografické studie Dd ukázaly, že  $\alpha$ -fosfát neinteraguje přímo s proteinem<sup>45</sup>. Naproti tomu P-fosfát atakuje vysoce konzervované aminokyselinové zbytky Arg-92, Thr-98 a Arg-109; Arg-92 se navíc spolu s Tyr-56, Lys-16 a Mg<sup>2+</sup> přímo uplatňuje při vzniku fosfoenzymového intermediátu<sup>45</sup>. Jak je zřejmé z obr. 2, Glu-133 u Dd tvoří vodíkový můstek s e-atomem dusíku histidinu 122 (cit. <sup>90</sup>); jeho substitucí za lysin dochází ke ztrátě enzymové aktivity<sup>106</sup>.

## 8. Kvartérní struktura

NDP-kinasy se liší od monomerních enzymů přenášejících fosfát především svou kvartérní strukturou<sup>48</sup>. Je známo, že velmi intenzivní interakce podjednotek multimerů NDP-kinas značně znesnadňují izolaci aktivních podjednotek; k destabilizaci multimerů se v současné době využívá bodově-cílených mutací<sup>48</sup>. Stejně jako u terciární struktury, je nejvíce prostudována kvartérní struktura Dd (cit. <sup>48</sup>), Awd (cit. <sup>44</sup>) a Mx (cit. <sup>43</sup>). Z krystalografických



Obr. 2. Schéma modelu přechodného stavu při přenosu  $\gamma$ -fosfátové skupiny<sup>106</sup>

studii Mx vyplývá, že tvoří v krystalickém stavu a v roztoku tetramer<sup>43</sup> s D2 symetrií<sup>48</sup>. Dd a Awd jsou hexamery s D3 symetrií. Mohou být chápány jako dva trimery uspořádané kolem vertikální 3-četné osy nebo tři dimery uspořádané okolo 2-četných os v horizontální rovině<sup>44-48</sup>. Struktura dimerů je velmi podobná ve všech třech NDP-kinasách, stejně jako struktura trimerů u Dd a Awd (cit. 48).

Na tvorbě dimeru se účastní  $\alpha_1$ -šroubovice,  $\beta_2$ -řetězec a C-koncový segment podjednotek<sup>43+44+48</sup>. Dimery se dále spojují na tetramery; u Mx jsou dimery uspořádány okolo krystalografické 2-četné osy a rozhraní mezi dimery je stabilizováno (na rozdíl od rozhraní v dimeru) solnými můstky<sup>43</sup>. Při tvorbě trimeru se uplatňují  $\alpha_1$ - a  $\alpha_3$ -šroubovice, Kpn-smyčka a C-koncový segment každé podjednotky<sup>44,48</sup> (obr. 3). Nejdůležitější část rozhraní představují

interakce tří Kpn-smyček, které jsou velmi blízko 3-četné osy. C-Koncový segment se účastní jak tvorby dimeru, tak trimeru, a má proto velký význam v určení kvartérní struktury NDP-kinas<sup>44</sup>. Hexamery u Dd a Awd mají velkou centrální dutinu<sup>44+48</sup>, která se táhne přibližně 2,5 nm podél 3-četné osy hexameru a má objem okolo 3 nm<sup>3</sup>. Dutina je na obou koncích uzavřena Kpn-smyčkou<sup>44</sup>. Předpokládá se, že je v dutině navázáno asi 100 molekul vody; při rozlišení 0,18 nm bylo u Dd určeno 78 molekul vody tj. 13 molekul na podjednotku<sup>48</sup>.

## 9. Inhibice NDP-kinas

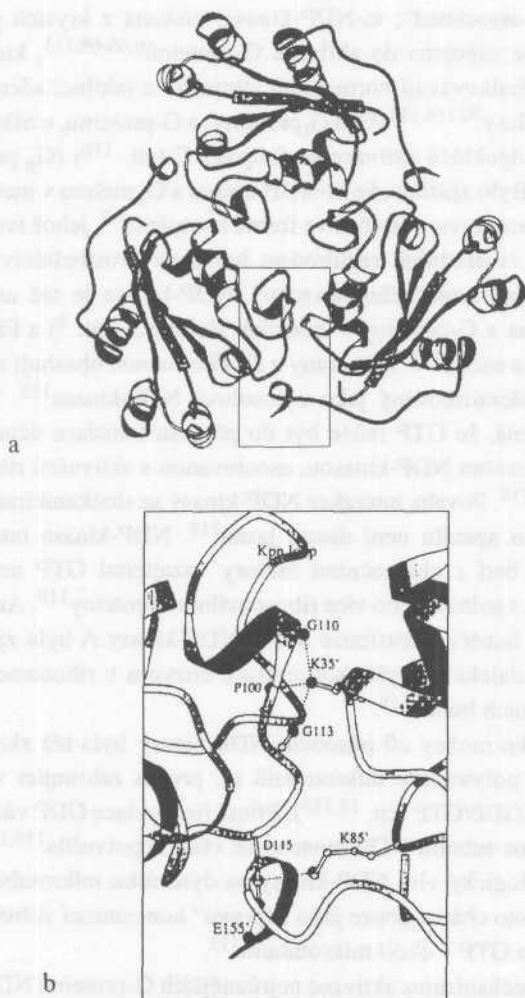
Slabými kompetitivními inhibitory NDP-kinas jsou nukleosid-5'-fosfáty<sup>1</sup> (např. AMP, GMP, UMP, dTMP, IMP, CMP, 8-azaGMP). NDP-kinasa z lidských erythrocytů je také inhibována adenosin-5'-sulfátem, 3',5'-cAMP, guanosem a adeninem<sup>107</sup>. U řady NDP-kinas bylo zjištěno, že některé NDP a NTP (např. ADP, GDP, UDP, GTP, CTP, UTP) kompletně blokují, nezávisle na typu heterocyklické báze, tvorbu fosfoenzymového intermediátu<sup>7,17,27,107,108</sup>. Stejný účinek má i 2 mM EDTA na aktivitu NDP-kinasy indukovanou interleukinem 2 (IL-2) u myších NK buněk<sup>7</sup>.

U některých NDP-kinas je popsána inhibice *p*-chloromerkuribenzoátem<sup>1,108</sup>, *p*-hydroxymerkuribenzoátem<sup>85</sup> a *N*-ethylmaleimidem<sup>7,108</sup>, tj. inhibitory SH-enzymů. Inhibované enzymy lze reaktivovat přidáním cysteinu, DTT nebo merkaptoethanolu do reakční směsi<sup>1,108</sup>. V prostředí 2 M močoviny je inaktivace NDP-kinasy, způsobená *p*-chloromerkuribenzoátem, ireverzibilní<sup>108</sup>.

Desdanin, antibiotikum produkované *Streptomyces caelestis*, inhibuje specificky a ireverzibilně NDP-kinasu z *E. coli*; inhibice je závislá na teplotě<sup>109</sup>. Zmíněné antibiotikum neinhubuje NDP-kinasu z krysích jater<sup>109</sup>. Vzhledem k relativně vysoké homologii sekvencí v oblasti aktivního místa NDP-kinas lze předpokládat, že se desdanin u *E. coli* váže na specifické místo, které je od katalytického centra vzdálené<sup>109</sup>. NDP-kinasy oocytů z *Xenopus laevis* a hořčičných jater<sup>31</sup> jsou inhibovány 25 mM EDTA; hořčičnaté ionty enzym částečně reaktivují. Zinečnaté ionty jsou v přítomnosti EDTA silnými inhibitory NDP-kinas<sup>31</sup>.

## 10. Vlastnosti genů kódujících NDP-kinasy

Geny NDP-kinas z různých zdrojů se liší svými vlastnostmi a uplatněním v buněčném metabolismu. U *Salmo-*



Obr. 3. Schéma trimeru NDP-kinasy z *D. discoideum* 48, a - celkový pohled na uspořádání podjednotek trimeru, b - detail interakcí mezi aminokyselinami na rozhraní podjednotek trimeru

*nella typhimurium*<sup>110a</sup> v *M. xanthus*<sup>58</sup> je gen kódující NDP-kinasu esenciální pro buněčný růst, zatímco naopak gen kódující NDP-kinasu u *E. coli* je za normálních růstových podmínek postradatelný<sup>111</sup>. Znamená to, že u *E. coli* musí existovat ještě jiný enzym, pravděpodobně adenylát-kinasa<sup>13</sup>, plnící funkci NDP-kinasy<sup>26</sup>.

U *D. discoideum* byly popsány 2 geny kódující NDP-kinasu<sup>54</sup>. Gen *gip17* kóduje cytosolový enzym, zatímco gen *guk* kóduje mitochondriální enzym, lokalizovaný v mezimembránovém prostoru; obě NDP-kinasy vykazují 71 % homologii<sup>61</sup>. Mitochondriální NDP-kinasa je kódována v jádře, vznikající enzym obsahuje NH<sub>2</sub>-koncovou presekvenční tvořenou 57 aminokyselinovými zbytky, která se během transportu bílkoviny do mitochondrie odštěpí. Výsledný protein je o 6 aminokyselinových zbytků delší než cytosolová NDP-kinasa<sup>61</sup>.

U savců je popsána rodina úzce příbuzných, nezávisle regulovaných *nm23* genů<sup>53</sup>. Zdá se, že podjednotky NDP-kinas nalezené v myších, krysích a lidských buňkách vznikly pravděpodobně zdvojením genu<sup>61</sup>. Například geny pro krysí a- a p-protein, vykazující NDP-kinasovou aktivitu, obsahují na stejných místech kódující oblasti ve vzdálenosti 3 kb čtyři tandemově uspořádané introny (cit. <sup>19,52</sup>). V krysích tkáních (kromě mozku) převažuje exprese genu pro  $\alpha$ -protein, což naznačuje nezávislou expresi obou genů v buňce<sup>19</sup>. Je zajímavé, že vyšší homologie byly pozorovány mezi krysí  $\alpha$ -NDP-kinasou a lidskou Nm23-H2 resp. krysí  $\beta$ -NDP-kinasou a lidskou Nm23-H1, než mezi enzymy stejného druhu<sup>19</sup>. Ze srovnávací studie mezi krysími a lidskými NDP-kinasami vyplývá, že k diferenciaci enzymu téhož druhu došlo dříve než k evolučnímu rozlišení těchto dvou druhů<sup>19</sup>.

Dále bylo zjištěno, že I-faktor (supresorový protein diferenciacie myších leukemických buněk), lokalizovaný v membránové frakci, je rovněž NDP-kinasou<sup>65</sup>. Vzhledem k vysoké homologii jeho aminokyselinové sekvence s proteiny Nm23-M1, Nm23-H1 a Nm23-H2 (cit. <sup>65,73</sup>) je velice pravděpodobné, že I-faktor je NDP-kinasou kódovanou genem *nm23-M2* (cit. <sup>73</sup>).

Lidský gen kódující transkripční faktor PuF („c-myc purine-binding“) je identický s genem pro NDP-kinasu Nm23-H2, považovanou za negativní regulátor nádorové metastáze<sup>112</sup>. Ze získaných poznatků vyplývá, že enzym Nm23-H2 je zapojen *in vitro* do regulace transkripce lidského c-myc onkogenu<sup>11,112</sup>.

Předpokládá se, že *D. melanogaster* má nejméně 2 geny pro NDP-kinasu: *awd* a gen, který působí během embryogeneze<sup>57</sup>. Produkt genu *awd* je NDP-kinasa spojená s mi-

krotubuly, která je odpovědná za morfogenezi<sup>57</sup>. Značný stupeň sekvenční homologie (78 % homologie) mezi geny *awd* a *nm23* svědčí o jejich funkční homologii<sup>3</sup>. Oba geny přispívají k normálnímu vývoji buněk, ztráta exprese těchto genů vede k defektnímu vývoji nebo ke zhoubnému bujení<sup>3</sup>.

## 11. Aktivace G-proteinů NDP-kinasou

Signální bílkoviny (GTP-vazebné bílkoviny, G-proteiny) se uplatňují u eukaryot v mnoha procesech hormonální a signální transdukce<sup>71</sup>. Jde o heterotrímery (složené z podjednotek  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ ), které přenášejí signály z aktivovaných receptorů k efektorům jako jsou enzymy nebo iontové kanály<sup>71</sup>.

Zdá se, že zejména membránová NDP-kinasa („membrane-associated“; m-NDP-kinasa) získaná z krysích jater<sup>67</sup> je zapojena do aktivace G-proteinů<sup>6,66-68,113</sup>, které zprostředkovávají hormonální stimulaci a inhibici adenylátcykly<sup>70,114,115</sup> ( $G_s$  a  $G_i$  proteiny) a G-proteinu, u něhož se předpokládá aktivace fosfolipasy C (cit. <sup>116</sup>) ( $G_p$  protein). Bylo zjištěno, že m-NDP-kinasa a  $G_s$  mohou v membráně existovat částečně ve formě komplexu<sup>67</sup>, jehož tvorba je reverzibilně regulována hormony prostřednictvím receptorů buněčného povrchu<sup>6</sup>. NDP-kinasa je též asociována s G-proteiny v buňkách HeLa S3 (cit. <sup>8</sup>) a Ehrlichova ascitu<sup>117</sup>. Ribosomy z *D. discoideum* obsahují enzym identifikovaný jako cytosolová NDP-kinasa<sup>118</sup>. To znamená, že GTP může být do procesu translace účinně přisunováno NDP-kinasou, asociovanou s aktivními ribosomy<sup>118</sup>. Povaha interakce NDP-kinasy se složkami translačního aparátu není dosud jasná<sup>118</sup>. NDP-kinasa interaguje buď s elongačními faktory vázajícími GTP nebo přímo s jedním nebo více ribosomálními proteiny<sup>118</sup>. Analýzou buněčné distribuce lidské NDP-kinasy A byla zjištěna zdaleka nejvyšší koncentrace enzymu v ribosomech maligních buněk<sup>118</sup>.

Jako možný cíl působení NDP-kinasy byla též zkoumána polymerace mikrotubulů t.j. proces zahrnující výměnu GDP/GTP (cit. <sup>18,113</sup>). Přímá fosforylace GDP vázaného na tubulin NDP-kinasou se však nepotvrdila<sup>113,119</sup>. Fyziologický vliv NDP-kinasy na dynamiku mikrotubulů lze proto chápat pouze jako „úpravu“ koncentrací volného GDP a GTP v okolí mikrotubulů<sup>113</sup>.

Mechanismus aktivace nejrůznějších G-proteinů NDP-kinasou není dosud zcela jasný<sup>68</sup>. Může jít o přímou aktivaci G-proteinu, neboli schopnost NDP-kinasy přímo fosforylovat GDP vázané na příslušný G-protein *in situ*<sup>113</sup>,

většinou v přítomnosti dvojmocných kationtů<sup>69,70</sup> ( $Mg^{2+}$  nebo  $Ca^{2+}$ ). V řadě studií jsou popsány *in vitro* důkazy podporující tento mechanismus aktivace<sup>8,69-71,117</sup>. Podle posledních výsledků je však hypotéza přímé aktivace G-proteinů nepravděpodobná<sup>120</sup>, protože nebylo prokázáno, že v okamžiku přenosu fosfátové skupiny z fosfoenzymového intermediátu je GDP skutečně vázán na G-protein<sup>68</sup>.

Druhým možným mechanismem je aktivace cestou GDP/GTP výměny<sup>85</sup>, někdy též označovaný jako „channeling“ mechanismus<sup>113,118</sup>, podle kterého se GDP i GTP vážou na  $\alpha$ -podjednotky G-proteinů<sup>71</sup>; k vazbě GTP však dochází až po uvolnění GDP (cit. <sup>121</sup>). Předpokládá to buď lokalizaci NDP-kinasy v bezprostřední blízkosti G-proteinů nebo její schopnost vznikající GTP „směřovat“ ke G-proteinům<sup>121</sup>. Disociace GDP je zřejmě v aktivaci limitujícím krokem<sup>122,124</sup>. Zdá se proto pravděpodobné, že NDP-kinasa reguluje v okolí G-proteinů poměr GTP/GDP (cit. <sup>121</sup>).

## 12. Závěr

Nukleosiddifosfátkinasy (NDP-kinasy) jsou všudypřítomné enzymy nezbytné pro udržování intracelulární hladiny (d)NTP v buňkách. Jde o relativně nespecifické enzymy, které fosforylují nukleosid-5'-difosfáty na trifosfáty; jako donor fosfátu využívají nejčastěji ATP. Produkty této fosforylace se dále využívají pro syntézu *de novo* nukleových kyselin, proteinů, polysacharidů a lipidů. NDP-kinasy se zúčastní i dalších důležitých procesů v buňce jako např. iniciace buněčné proliferace a diferenciaci, morfogeneze, transkripce, transdukce, aktivace GTP-vazebných bílkovin a nádorové metastáze. Evolučně představují NDP-kinasy jedny z nejvíce konzervovaných proteinů.

NDP-kinasy mají širší substrátovou specifitu a vyšší specifickou aktivitu než nukleosidmonofosfátkinasy, od kterých se rovněž liší svou multimerní strukturou. NDP-kinasy pracují „ping-pong“ mechanismem, který zahrnuje tvorbu energeticky bohatých fosfoenzymových intermediátů. Je dokázáno, že vznik intermediátu je podmíněn efektivní reverzibilní fosforylací histidinového zbytku enzymu.

Tento přehledný článek shrnuje současné znalosti o obecných vlastnostech, terciární struktuře, kvartérní struktuře a vazebných místech NDP-kinas získaných z různých zdrojů.

*Zpracovat toto téma nám umožnila podpora projektů GA AV ČR A455 402 a GA ČR 203/96/K 001. Autorky*

*děkují RNDr. I. Votrubovi, CSc. za podnětné náměty a zájem při sepisování tohoto článku a paní M. Marešové za pomoc při zpracování rukopisu.*

## LITERATURA

1. Parks R. E., Jr., Agarwal R. P.: *The Enzymes* (Boyer P. D., ed.), str. 8, 307. Academic Press, New York 1973.
2. Kimura N., Shimada N., Nomura K., Watanabe K.: *J. Biol. Chem.* 265, 15744 (1990).
3. Rosengard A. M., Krutzsch H. C., Shearn A., Biggs J. R., Barker E., Margulies I. M. K., Richter King C., Liotta L. A., Steeg P. S.: *Nature* 342, 177 (1989).
4. Muñoz-Dorado J., Inouye S., Inouye M.: *J. Biol. Chem.* 265, 2707(1990).
5. Finan P. M., White I. R., Redpath S. H., Findlay J. B. C., Millner P. A.: *Plant Mol. Biol.* 25, 59 (1994).
6. Kimura N., Shimada N.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 757,248(1988).
7. Ohtsuki K., Yokoyama M., Ishii F., Ishida N.: *Biochem. Int.* 10, 13(1985).
8. Ohtsuki K., Yokoyama M., Ikeuchi T., Ishida N., Sugita K., Satoh K.: *FEBS Lett.* 196, 145 (1986).
9. Krejčová R.: *Rešeršní práce ke kandidátskému minimu*. Praha 1996.
10. Yokoyama M., Uesaka H., Ohtsuki K.: *FEBS Lett.* 206, 287 (1986).
11. Hildebrandt M., Lacombe M.-L., Mesnildrey S., Véron M.: *Nucleic Acids Res.* 23, 3858 (1995).
12. Inoue H., Takahashi M., Oomori A., Sekiguchi M., Yoshioka T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218, 887 (1996).
13. Lu Q., Ynouye M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 5720 (1996).
14. Krejčová R., Horská K.: *Chem. Listy* 91, 179 (1997).
15. Krejčová R., Horská K.: *Chem. Listy* 91, 350 (1997).
16. Krejčová R., Horská K.: *Chem. Listy* 91, 404 (1997).
17. Nakamura H., Sugino Y.: *J. Biol. Chem.* 241, 4917 (1966).
18. Nickerson J. A., Wells W. W.: *J. Biol. Chem.* 259, 11297(1984).
19. Shimada N., Ishikawa N., Munakata Y., Toda T., Watanabe K., Kimura N.: *J. Biol. Chem.* 268, 2583 (1993).
20. Berg P., Joklik W. K.: *Nature* 772, 1008 (1953).
21. Krebs H. A., Hems R.: *Biochim. Biophys. Acta* 72, 172(1953).



22. Ingraham J. L., Ginther C. L.: *Methods Enzymol.* 57, 371 (1978).
23. Agarwal R. P., Robison B., Parks R. E., Jr.: *Methods Enzymol.* 7, 376 (1978).
24. Walinder O.: *J. Biol. Chem.* 243, 3947 (1968).
25. Namura T., Fukui T., Ichikawa A.: *Biochim. Biophys. Acta* 7077, 47(1991).
26. Almaula N., Lu Q., Delgado J., Belkin S., Inouye M.: *J. Bacteriol.* 777, 2524 (1995).
27. Ohtsuki K., Yokoyama M., Koike T., Ishida N.: *Biochem. Int.* 8, 715 (1984).
28. Gilles A.-M., Presecan E., Vonica A., Lascu I.: *J. Biol. Chem.* 266, 8784(1991).
29. Yokoyama M., Uesaka H., Ohtsuki K.: *FEBS Lett.* 206, 287 (1986).
30. Koyama K., Yokoyama M., Koike T., Ohtsuki K., Ishida N.: *J. Biochem.* 95, 925 (1984).
31. Buczynski G., Potter R. L.: *Biochim. Biophys. Acta* 1041, 296 (1990).
32. Robinson J. B. Jr., Brems D. N., Stellwagen E.: *J. Biol. Chem.* 256, 10769(1981).
33. Islam K., Burns R. G.: *Anal. Biochem.* 137, 8 (1984).
34. Kimura N., Shimada N.: *J. Biol. Chem.* 263, 4647 (1988).
35. Presecan E., Vonica A., Lascu I.: *FEBS Lett.* 250, 629 (1989).
36. Huitorel P., Simon C., Pantaloni D.: *Eur. J. Biochem.* 744,233(1984).
37. Moisyadi S., Dharmasiri S., Harrington H. M., Lukas T. J.: *Plant Physiol.* 104, 1401 (1994).
38. Zhang J., Fukui T., Ichikawa A.: *Biochim. Biophys. Acta* 1248, 19 (1995).
39. Edlund B., Rask L., Olsson P., Walinder O., Zetterqvist Ó., Engström L.: *Eur. J. Biochem.* 9, 451 (1969).
40. Ratliff R. L., Weaver R. H., Lardy H. A., Kuby S. A.: *J. Biol. Chem.* 239, 301 (1964).
41. Muñoz-Dorado J., Almaula N., Inouye S., Inouye M.: *J. Bacteriol.* 775, 1176 (1993).
42. Williams R. L., Muñoz-Dorado J., Jacobo-Molina A., Inouye S., Inouye M., Arnold E.: *J. Mol. Biol.* 220, 5 (1991).
43. Williams R. L., Oren D. A., Muñoz-Dorado J., Inouye S., Inouye M., Arnold E.: *J. Mol. Biol.* 234, 1230 (1993).
44. Chiadmi M., Moréra S., Lascu I., Dumas C., LeBras G., Véron M., Janin J.: *Structure* 7, 283 (1993).
45. Moréra S., Lascu I., Dumas C., LeBras G., Briozzo P., Véron M., Janin J.: *Biochemistry* 33, 459 (1994).
46. Dumas C, Lascu I., Moréra S., Glasser P., Fourme R., Wallet V., Lacombe M. L., Véron M., Janin J.: *EMBO J.* 77, 3203 (1992).
47. Cherfils J., Moréra S., Lascu I., Véron M., Janin J.: *Biochemistry* 33, 9062 (1994).
48. Moréra S., LeBras G., Lascu I., Lacombe M. L., Véron M., Janin J.: *J. Mol. Biol.* 243, 873 (1994).
49. Dumas C, LeBras G., Wallet V., Lacombe M. L., Véron M., Janin J.: *J. Mol. Biol.* 277, 239 (1991).
50. Webb P. A., Perisic O., Mendola Ch. E., Backer J. M., Williams R.: *J. Mol. Biol.* 257, 574 (1995).
51. Harris N., Taylor J. E., Roberts J. A.: *Plant Mol. Biol.* 25, 739 (1994).
52. Ishikawa N., Shimada N., Munakata Y., Watanabe K., Kimura N.: *J. Biol. Chem.* 267, 14366 (1992).
53. Stahl J. A., Leone A., Rosengard A. M., Porter L., Richter King C, Steeg P. S.: *Cancer Res.* 57, 445 (1991).
54. Wallet V., Mutzel R., Troll H., Bárzu O., Wurster B., Véron M., Lacombe M. L.: *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 1199(1990).
55. Lacombe M. L., Wallet V., Troll H., Véron M.: *J. Biol. Chem.* 265, 10012(1990).
56. Yano A., Shimazaki T., Kato A., Umeda M., Uchimiya H.: *Plant Mol. Biol.* 23, 1087 (1993).
57. Biggs J., Hersperger E., Steeg P. S., Liotta L. A., Shearn A.: *Cell* 63, 933 (1990).
58. Muñoz-Dorado J., Inouye M., Inouye S.: *J. Biol. Chem.* 265, 2702 (1990).
59. Hama H., Almaula N., Lerner C. G., Inouye S., Inouye M.: *Gene* 105, 31 (1991).
60. Fukuchi T., Shimada N., Hanai N., Ishikawa N., Watanabe K., Kimura N.: *Biochim. Biophys. Acta* 7205, 113 (1994).
61. Troll H., Winckler T., Lascu I., Müller N., Saurin W., Véron M., Mutzel R.: *J. Biol. Chem.* 268, 25469 (1993).
62. Cheng Y.-C, Robinson B., Parks R. E., Jr.: *Biochemistry* 72, 5 (1973).
63. Guignard F., Markert M.: *Biochem. J.* 316, 233 (1996).
64. Roisin M. P., Kepes A.: *Biochim. Biophys. Acta* 526, 418(1978).
65. Okabe-Kado J., Kasukabe T., Honma Y., Hayashi M., Henzel W. J., Hozumi M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182, 987 (1992).
66. Seifert R., Rosenthal W., Schultz G., Wieland T., Gierschick P., Jakobs K. H.: *Eur. J. Biochem.* 175, 51 (1988).

67. Kimura N., Shimada N.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168, 99 (1990).
68. Randazzo P. A., Northup J. K., Kahn R. A.: *J. Biol. Chem.* 2(57, 18182(1992).
69. Uesaka H., Yokoyama M., Ohtsuki K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 143, 552 (1987).
70. Ohtsuki K., Yokoyama M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148, 300 (1987).
71. Kikkawa S., Takahashi K., Takahashi K., Shimada N., Ui M., Kimura N., Katada T.: *J. Biol. Chem.* 265, 21536(1990).
72. Klinker J. F., Laugwitz K.-L., Hagelüken A., Seifert R.: *Biochem. Pharmacol.* 51, 217 (1996).
73. Urano T., Takamiya K., Furukawa K., Shiku H.: *FEBS Lett.* 309, 358(1992).
74. Bominaar A. A., Tepper A. D., Véron M.: *FEBS Lett.* 353, 5 (1994).
75. MacDonald N. J., De La Rosa A., Benedict M. A., Freije J. M. P., Krutsch H., Steeg P. S.: *J. Biol. Chem.* 268, 25780 (1993).
76. Yue R. H., Ratliff R. L., Kuby S. A.: *Biochemistry* 6, 2923(1967).
77. Moréra S., Chiadmi M., LeBras G., Lascu I., Janin J.: *Biochemistry* 34, 11062 (1995).
78. Lascu I., Chaffotte A., Limbourg-Bouchon B., Véron M.: *J. Biol. Chem.* 267, 12775 (1992).
79. Hossler F.E., Rendi R.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43, 530 (1971).
80. Colomb M. G., Chérury A., Vignais P.V.: *Biochemistry* 13, 2269 (1974).
81. Zhang J., Nomura T., Yatsunami K., Honda A., Sugimoto Y., Moriwaki T., Yamamoto J., Ohta M., Fukui T., Ichikawa A.: *Biochim. Biophys. Acta* 777, 304 (1993).
82. Nomura T., Yatsunami K., Honda A., Sugimoto Y., Fukui T., Zhang J., Yamamoto J., Ichikawa A.: *Arch. Biochem. Biophys.* 297, 42 (1992).
83. Palmieri R., Yue R. H., Jacobs H. K., Maland L., Wu L., Kuby S. A.: *J. Biol. Chem.* 248, 4486 (1973).
84. Traut T. W.: *Eur. J. Biochem.* 222, 9 (1994).
85. Kowluru A., Metz S. A.: *Biochemistry* 33, 12495 (1994).
86. Peliska J. A., O'Leary M. H.: *Biochemistry* 30, 1049 (1991).
87. Ginther C.L., Ingraham J.L.: *J. Biol. Chem.* 249, 3406 (1974).
88. Noiman S., Shaul Y.: *FEBS Lett.* 364, 63 (1995).
89. Lascu I., Pop R. D., Porumb H., Presecan E., Proinov L.: *Eur. J. Biochem.* 735, 497 (1983).
90. Lecroisey A., Lascu I., Bominaar A. A., Véron M., Delepierre M.: *Biochemistry* 34, 12445 (1995).
91. Hemmerich S., Pecht I.: *Biochemistry* 31, 4580(1992).
92. 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).
93. Karlsson A., Reichard P., Eckstein F.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 766, 273 (1990).
94. Bourdais J., Biondi R., Sarfati S., Guerreiro C, Lascu I., Janin J., Véron M.: *J. Biol. Chem.* 271, 7887(1996).
95. Strelkov S. V., Perisic O., Webb P. A., Williams R. L.: *J. Mol. Biol.* 249, 665 (1995).
96. Schulz G. E., Schiltz E., Tomasselli A. G., Frank R., Brune M., Wittinghoffer A., Schirmer R. H.: *Eur. J. Biochem.* 767, 127(1986).
97. Saraste M., Sibbald P. R., Wittinghofer A.: *Trends Biochem. Sci.* 75, 430 (1990).
98. Kantrowitz E. R., Lipscomb W. N.: *Science* 241, 669 (1988).
99. Gouaux J. E., Stevens R. C., Lipscomb W. N.: *Biochemistry* 29, 7702 (1990).
100. Nagai K., Oubridge C, Jessen T. H., Li J., Evans P. R.: *Nature* 348, 515(1990).
101. Coll M., Guasch A., Avilés F. X., Huber R.: *EMBO J.* 10, 1 (1991).
102. Pastore A., Saudek V., Ramponi G., Williams R. J. P.: *J. Mol. Biol.* 224, 427 (1992).
103. Buechler J. A., Taylor S. S.: *Biochemistry* 27, 7356 (1988).
104. Hynes R. O.: *Cell* 69, 11 (1992).
105. Dever T. E., Glynias M. J., Merrick W. C: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 1814 (1987).
106. Tepper A. D., Dammann H., Bominaar A. A., Véron M.: *J. Biol. Chem.* 269, 32175 (1994).
107. Mourad N., Parks R. E., Jr.: *J. Biol. Chem.* 241, 271(1966).
108. Agarwal R. P., Parks R. E., Jr.: *J. Biol. Chem.* 246, 2258(1971).
109. Saeki T., Hori M., Umezawa H.: *J. Biochem.* 76, 623 (1974).
110. Ginther C. L., Ingraham J. L.: *J. Bacteriol.* 118, 1020 (1974).
111. Lu Q., Zhang X., Almaula N., Mathews Ch.K., Inouye M.: *J. Mol. Biol.* 254, 337 (1995).
112. Postel E. H., Berberich S. J., Flint S. J., Ferrone C. A.: *Science* 261, 478 (1993).
113. Melki R., Lascu I., Carlier M. F., Véron M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 787, 65 (1992).

114. Totsuka Y., Nielsen T. B., Field J. B.: *Biochim. Biophys. Acta* 718, 135 (1982).
115. Kimura N., Shimada N.: *J. Biol. Chem.* 258, 2278 (1983).
116. Anthes J. C., Billah M. M., Cali A., Egan R. W., Siegel M. I.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145, 825 (1987).
117. Ohtsuki K., Yokoyama M., Uesaka H.: *Biochim. Biophys. Acta* 929, 231 (1987).
118. Sonnemann J., Mutzel R.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209, 490(1995).
119. Islam K., Burns R. G.: *Biochem. J.* 232, 651 (1985).
120. Randazzo P. A., Northup J. K., Kahn R. A.: *Science* 254,850(1991).
121. Haney S. A., Broach J. R.: *J. Biol. Chem.* 269, 16541 (1994).
122. Ferguson K. M., Higashijima T., Smigel M. D., Gilman A. G.: *J. Biol. Chem.* 261, 7393 (1986).
123. Higashijima T., Ferguson K. M., Smigel M. D., Gilman A. G.: *J. Biol. Chem.* 262, 757 (1987).
124. Florio V. A., Sternweis P. C.: *J. Biol. Chem.* 264, 3909 (1989).

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

Nucleoside diphosphate kinase (NDP kinase, EC 2.7.4.6) is a ubiquitous enzyme that catalyzes phosphorylation of nucleoside 5'-diphosphate, with the exception of ADP, to the corresponding triphosphate, following a ping-pong mechanism, which includes the formation of a high-energy phosphohistidine intermediate. It has a broad specificity for phosphoryl donors and acceptors to maintain the balanced levels of nucleotide triphosphates in the cell. The structures of NDP kinases are highly conserved from *Escherichia coli* to human (43 % identity) and they are believed to be a housekeeping enzyme for DNA and RNA synthesis. In addition, NDP kinases have been shown to have additional regulatory functions for growth and developmental control, signal transduction, transcription, activation of GTP-binding proteins, and tumour metastasis suppression. The recent information on the general properties, three-dimensional structure, quaternary structure, and the properties of the binding site of this enzyme are reported.