



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Dissertação de Mestrado

DAIANA RENCK

**ESTUDOS BIOQUÍMICOS E GENÉTICOS DA ENZIMA URIDINA
FOSFORILASE-1 HUMANA (E.C. 2.4.2.3)**

Porto Alegre

2010

DAIANA RENCK

**ESTUDOS BIOQUÍMICOS E GENÉTICOS DA ENZIMA URIDINA
FOSFORILASE-1 HUMANA (E.C. 2.4.2.3)**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Basso

Co-Orientador: Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos

Porto Alegre

2010



DAIANA RENCK

**ESTUDOS BIOQUÍMICOS E GENÉTICOS DA ENZIMA URIDINA
FOSFORILASE-1 HUMANA (E.C. 2.4.2.3)**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovado em _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra.

Nadja Schöreder

Prof. Dr.

Osmar Norberto de Souza

Prof. Dr.

Mário Sérgio Palma

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Diógenes Santiago Santos, agradeço pela oportunidade de integrar seu grupo de pesquisas e por me proporcionar um maior aprendizado.

Ao Prof. Luiz Augusto Basso, agradeço por todo o conhecimento compartilhado, pelas correções e sugestões que fizeram com que este trabalho fosse concluído.

Um agradecimento especial ao colaborador e amigo Dr. Rodrigo G. Ducati, por toda a paciência e por todos os ensinamentos que proporcionaram a realização deste trabalho e acrescentaram muito em minha vida acadêmica. Aos Drs. Gaby Renard, Claudia P. Nunes e Eraldo Batista Jr, por todos os conhecimentos e conselhos que foram passados com muita paciência e carinho, que com certeza foram muito importantes para a realização desse trabalho, mas acima de tudo pela amizade cultivada por todos esses anos.

Aos demais colegas e amigos do CPBMF e da Quatro G pela ajuda, amizade, companheirismo e pelos momentos de descontração, pois de alguma forma todos contribuíram para a realização desse trabalho.

Ao colega e amigo, Thiago M. de Assunção, por toda a ajuda, troca de experiências e compreensão que foram essenciais para a execução desse trabalho; e por estar presente em todos os momentos, não só como colega de profissão e trabalho, mas como amigo de tanto tempo, faço-lhe esse agradecimento mais que especial. Ao meu namorado, Leonardo Rosado, agradeço pela troca de experiências, ensinamentos, carinho, compreensão, dedicação e amor que foram essenciais para concluir essa etapa.

Aos meus pais, Ary Renck e Thereza Laux, agradeço pelo amor, carinho e dedicação que recebi, estando presente ou não, durante todos esses anos; pelos momentos em que a saudade teve que ser guardada e pelo exemplo de caráter e valores que levarei para o resto da vida. Agradeço também a minha irmã, Deise Renck, pela ajuda, pelos conselhos e pelo carinho durante essa etapa, que com certeza nunca serão esquecidos.

SUMÁRIO

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	iv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 A Visão Geral das Estimativas do Câncer.....	1
1.1.1Câncer de Mama e Cólorretal.....	3
1.2 Metabolismo de nucleotídeos pirimídicos	4
1.3 A uridina e seu papel protetor no uso do 5-FU	8
1.4 Uridina fosforilase humana	10
1.4.1 Uridina fosforilase é regulada pela p53	13
1.4.2 As duas isoformas da UP em mamíferos: UP1 e UP2	14
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos	17
3. ARTIGO CIENTÍFICO	18
Abstract.....	21
Introduction	22
Materials and Methods.....	25
Results and Discussion.....	31
Summary	39
References	42
Legends, figures and tables.....	50
4.CONSIDERAÇÕES FINAIS	61

ANEXO 1. TESTE DE PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	
HUP1.....	64
ANEXO 2. TESTE DE CRISTALIZAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA	
ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA PROTEÍNA RECOMBINANTE HUP1.....	65
ANEXO 3. EXPRESSÃO DIFERENCIAL EM TECIDOS NEOPLÁSICOS.....	66
ANEXO 4. CONFIRMAÇÃO DA SUBMISSÃO DO MANUSCRITO.....	69
ANEXO 5. APROVAÇÃO DO COMITÊ EM ÉTICA E PESQUISA.....	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	71

RESUMO

A uridina fosforilase (UP) é uma enzima chave na rota de salvamento das pirimidinas, catalisando a fosforólise reversível de uridina a uracil e ribose-1-fosfato (R1P). A UP humana do tipo 1 (hUP1) é um alvo molecular para o desenho de inibidores com a finalidade de aumentar os níveis endógenos de uridina para “resgatar” os tecidos normais da toxicidade produzida pelo uso de agentes quimioterápicos análogos de pirimidinas, como o 5-fluorouracil e a capecitabina. Neste trabalho, descrevemos o método de obtenção da proteína recombinante homogênea hUP1, dados de velocidade inicial, inibição pelo produto e ensaios de ligação em equilíbrio. Esses resultados sugerem que a hUP1 catalisa a fosforólise de uridina por um mecanismo cinético bi bi ordenado, no qual o fosfato inorgânico se liga primeiro seguido pela ligação da uridina, e o uracil se dissocia primeiro, seguido pela dissociação da R1P. Os ensaios de ligação por fluorescência em equilíbrio mostraram uma ligação cooperativa tanto do PI como da R1P. Os resíduos de aminoácidos envolvidos tanto na catálise como na ligação foram propostos pelo perfil de pH.

Palavras chave: Quimioterapia do câncer, velocidade inicial, inibição pelo produto, fluorimetria, perfil de pH, mecanismo cinético da uridina fosforilase.

ABSTRACT

Uridine phosphorylase (UP) is a key enzyme in the pyrimidine salvage pathway, catalyzing the reversible phosphorolysis of uridine to uracil and ribose-1-phosphate (R1P). The human UP type 1 (hUP1) is a molecular target for the design of inhibitors intended to boost endogenous uridine levels to rescue normal tissues from the toxicity of fluoropyrimidine nucleoside chemotherapeutic agents, such as capecitabine and 5-fluorouracil. Here, we describe a method to obtain homogeneous recombinant hUP1, and present initial velocity, product inhibition, and equilibrium binding data. These results suggest that hUP1 catalyzes uridine phosphorolysis by a steady-state ordered bi bi kinetic mechanism, in which inorganic phosphate binds first followed by the binding of uridine, and uracil dissociates first, followed by R1P release. Fluorescence titration at equilibrium showed cooperative binding of either P_i or R1P binding to hUP1. Amino acid residues involved in either catalysis or substrate binding were proposed based on pH-rate profiles.

Keywords: Cancer chemotherapy; Initial velocity; Product inhibition; Fluorescence spectroscopy; pH-rate profiles; Uridine phosphorylase kinetic mechanism

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Visão Geral das Estimativas do Câncer

O câncer é uma das doenças que mais atinge a população mundial e que está, a cada ano, fazendo mais vítimas. Segundo o relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC)/Organização Mundial da Saúde (OMS) [World Cancer Report 2008], o impacto global que o câncer gera dobrou nos últimos 30 anos, e de 2000 à 2020 esse impacto dobrará novamente. Em 2008, a IARC/OMS estimou que ocorressem 12,4 milhões de novos casos e 7,6 milhões de óbitos por câncer no mundo. Destes, os mais incidentes foram o câncer de pulmão (1,52 milhões de novos casos), câncer de mama (1,29 milhões) e câncer de cólon e reto (1,15 milhões).

Para América do Sul e Central, em 2008, foram cerca de 1 milhão de novos casos de câncer e 589 mil óbitos. Em homens, o câncer que teve maior prevalência foi o câncer de próstata, seguido por pulmão, estômago e cólon e reto. No sexo feminino, o mais freqüente foi o câncer de mama, seguido do colo do útero, cólon e reto, estômago e pulmão.

A distribuição dos novos casos de câncer segundo localização primária mostra-se heterogênea entre estados e capitais do Brasil; o que fica em evidência ao observarem-se as diferentes taxas brutas de incidência, como ilustrado nas tabelas apresentadas a seguir. As regiões Sul e Sudeste, de maneira geral, apresentam as maiores taxas, enquanto que as regiões Norte e Nordeste mostram as menores taxas. As taxas da região Centro-Oeste

apresentam um padrão intermediário [INCA: Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil].

Localização Primária Neoplasia maligna	Estimativa dos Casos Novos			
	Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	52.350	53,84	14.050	66,25
Traquéia, Brônquio e Pulmão	17.800	18,37	4.980	23,53
Estômago	13.820	14,25	3.490	16,48
Cólon e Reto	13.310	13,73	4.570	21,61
Cavidade Oral	10.330	10,64	2.920	13,74
Esôfago	7.890	8,12	1.610	7,37
Leucemias	5.240	5,40	1.440	6,84
Pele Melanoma	2.960	3,04	850	3,72
Outras Localizações	59.130	61,01	18.590	87,67
Subtotal	182.830	188,66	52.500	247,59
Pele não Melanoma	53.410	55,12	11.880	55,97
Todas as Neoplasias	236.240	243,77	64.380	303,50

Estimativas para o ano 2010 das taxas brutas de incidência por 100.000 e de número de casos novos por câncer, em homens, segundo localização primária. *Adaptado: INCA.*

Localização Primária Neoplasia maligna	Estimativa dos Casos Novos			
	Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Mama Feminina	49.240	49,27	17.540	74,56
Colo do Útero	18.430	18,47	5.280	22,50
Cólon e Reto	14.800	14,80	5.530	23,54
Traquéia, Brônquio e Pulmão	9.830	9,82	3.130	13,37
Estômago	7.680	7,70	2.340	9,94
Leucemias	4.340	4,33	1.330	5,52
Cavidade Oral	3.790	3,76	1.090	4,48
Pele Melanoma	2.970	2,92	860	3,38
Esôfago	2.740	2,69	660	2,55
Outras Localizações	78.770	78,83	28.510	121,33
Subtotal	192.590	192,74	66.270	282,03
Pele não Melanoma	60.440	60,51	12.800	54,45
Todas as Neoplasias	253.030	253,23	79.070	336,52

Estimativas para o ano 2010 das taxas brutas de incidência por 100.000 e de número de casos novos por câncer, em mulheres, segundo localização primária. *Adaptado: INCA.*

1.1.2 Câncer de Mama e Colorretal

O câncer de mama, o segundo tipo mais freqüente de câncer no mundo, é o mais comum entre as mulheres, respondendo por 22% dos casos novos a cada ano. No Brasil, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas, provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada tardiamente, gerando, apenas em 2007, um valor de 11.194 mil mortes. Na população mundial, a sobrevida média após cinco anos é de 61%. O câncer de mama é relativamente raro antes dos 35 anos, acima desta faixa etária sua incidência cresce rápida e progressivamente. Estatísticas indicam aumento de sua incidência tanto nos países desenvolvidos quanto nos em desenvolvimento, segundo a OMS. As estimativas para 2010 no Brasil geram um valor de 49.240 mil novos casos.

Com uma incidência um pouco menor, mas também preocupante, os tumores malignos que acometem o intestino grosso (cólon) e o reto ocupam o quarto lugar como o câncer mais comum no mundo e a segunda em países desenvolvidos. Grande parte desses tumores se inicia a partir de pólipos, lesões benignas que podem crescer na parede interna do intestino grosso. Uma maneira de prevenir o aparecimento dos tumores seria a detecção e a remoção dos pólipos antes de eles se tornarem malignos [Santos et al, 2005]. Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), o número de novos casos de câncer de cólon e reto estimados para o Brasil em 2010 é de 28.110 mil casos, sendo destes 13.310 em homens e 14.800 em mulheres. As mortes totalizadas por este tipo de câncer atingiram, em 2007, 11.322 mil pessoas, sendo destes 5.305 homens e 6.017 mulheres [www.inca.gov.br].

Dentro do panorama destes dois principais tipos de câncer, a cirurgia e o posterior tratamento com quimioterápicos são as escolhas de primeira linha. Dentre os quimioterápicos, um dos mais utilizados é o 5-Fluorouracil (5-FU), introduzido no mercado há mais de 40 anos e será discutido mais detalhadamente a seguir. Neste cenário, necessita-se de avanços aplicados ao tratamento e a prevenção, tornando-se fundamental que os recursos e esforços sejam direcionados para a busca de novos medicamentos de combate ao câncer assim como medicamentos que aumentem a qualidade de vida dos pacientes durante os longos e desgastantes tratamentos quimioterápicos.

A efetividade clínica do 5-FU é limitada por seus severos efeitos adversos como mielossupressão, trombocitopenia e lesões gastrointestinais e nas mucosas, entre outras. A uridina tem sido utilizada para reduzir esses efeitos adversos severos levando também a um aumento do índice terapêutico [Cao et al, 2002], no qual a disponibilidade e a concentração são reguladas pela uridina fosforilase (UP). Porém, o uso clínico desse “resgate da uridina” é dificultado pela sua rápida degradação, iniciada pela UP no fígado e pela toxicidade dose-limitante resultando na necessidade do uso de altas concentrações para obter a dose desejada à proteção dos tecidos. BAU, um inibidor da UP, tem sido capaz de aumentar a concentração endógena de uridina levando a uma proteção similar aos tecidos normais [Cao et al, 2002].

1.2 Metabolismo de nucleotídeos pirimídicos

Os nucleotídeos são compostos que fazem parte de um grande número de processos bioquímicos nas diferentes formas de vida e são classificados em

purínicos e pirimídicos. A importância desses nucleotídeos no metabolismo celular é suportada pelo fato de que quase todas as células podem sintetizá-los tanto *de novo* como a partir dos produtos de degradação dos ácidos nucléicos, denominando-se salvamento ou recuperação [Voet e Voet, 2006]. Os nucleotídeos purínicos e pirimídicos são encontrados em todos os organismos vivos onde suas funções estão relacionadas principalmente com a estrutura dos ácidos nucléicos (DNA e RNA), atuando como fonte de energia em muitos sistemas, na sinalização celular, na regulação de rotas de biossíntese, entre outras [Shambaugh, 1979].

Existem separadas vias enzimáticas para a produção destes nucleotídeos como mencionado acima, ocorrendo ou através da via *de novo*, a partir de precursores simples e com uma demanda maior de energia, ou através da via de salvamento (*Salvage Pathway*) (Figura 1), a partir de nucleosídeos e bases livres pré-formadas e com um gasto menor de energia devido a este processo de reciclagem [Shambaugh, 1976; Connolly e Duley, 1999]. As duas rotas, através de múltiplos passos enzimáticos envolvendo fosforilases e quinases, produzem um produto comum, uridina 5' monofosfato (UMP), o ponto no qual as duas rotas se encontram (Figura 2) [Connolly e Duley, 1999].

As fosforilases de nucleosídeos pirimídicos (PyNP) são enzimas chave na rota de salvamento destes nucleotídeos. Há dois tipos de PyNP na maioria dos organismos: a Uridina Fosforilase (UP) e a Timidina Fosforilase (TP), as quais catalisam a fosforólise reversível de uridina (Urd) e timidina ou desoxiuridina, respectivamente, para suas bases livres e ribose-1-fosfato (R1P) ou desoxiribose-1-fosfato [Watanabe e Uchida, 1995; Pizzorno et al, 2002;

Johansson, 2003]. Esses produtos de degradação são, então, utilizados ou como fontes de carbono e origem de energia ou para o resgate de bases pirimídicas para a síntese de nucleotídeos [Watanabe et al, 1995].

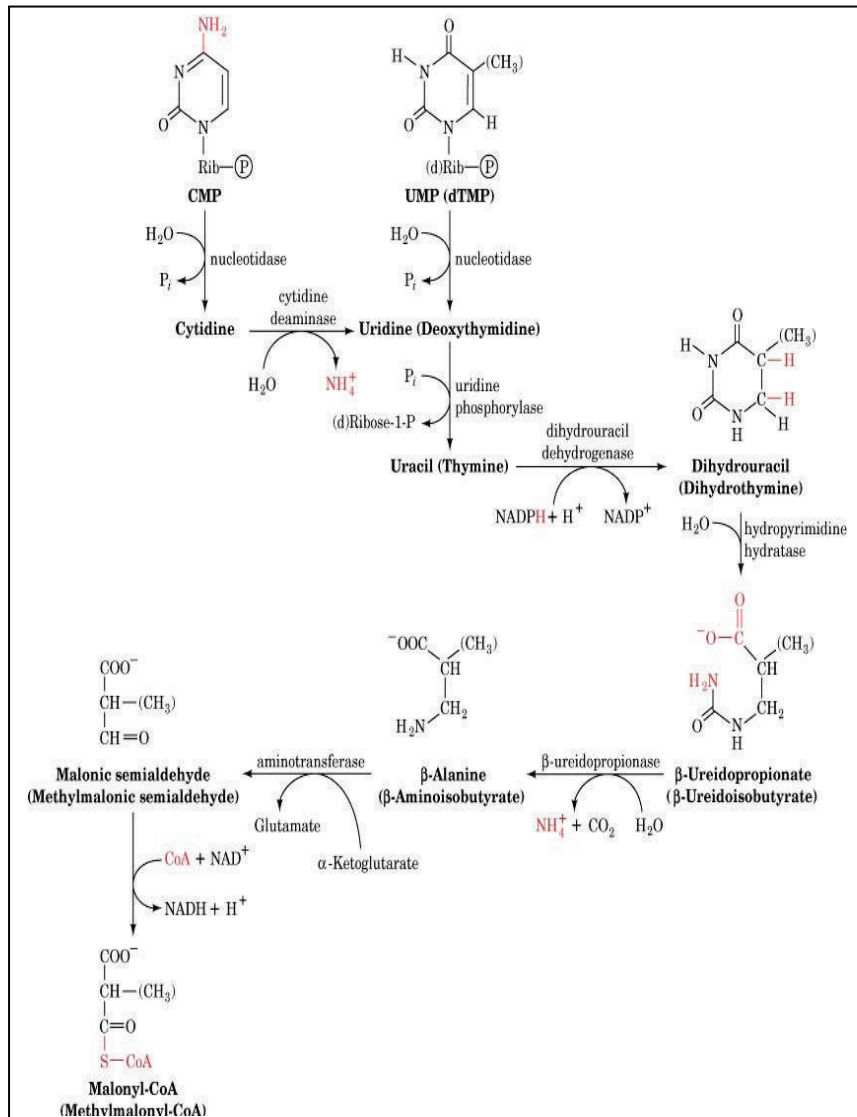


Figura 1. Catabolismo dos nucleotídeos pirimídicos. Adaptado: Voet e Voet, 2006.

Além de seus substratos naturais citados acima, as PyNP possuem um papel importante na ativação e no metabolismo de alguns análogos de nucleosídeos e bases utilizados na quimioterapia do câncer, como o 5-FU [Liu et al, 1998; Cao et al, 2002]. Os altos níveis de expressão e atividade destas enzimas em células tumorais, em comparação aos seus equivalentes normais é, provavelmente, um dos mecanismos que resulta na alta sensibilidade das células cancerosas a estes análogos citotóxicos, possuindo assim, bons índices terapêuticos [Watanabe et al, 1995; Johansson, 2003] e, desta maneira, corroborando com crescente interesse por essas enzimas.

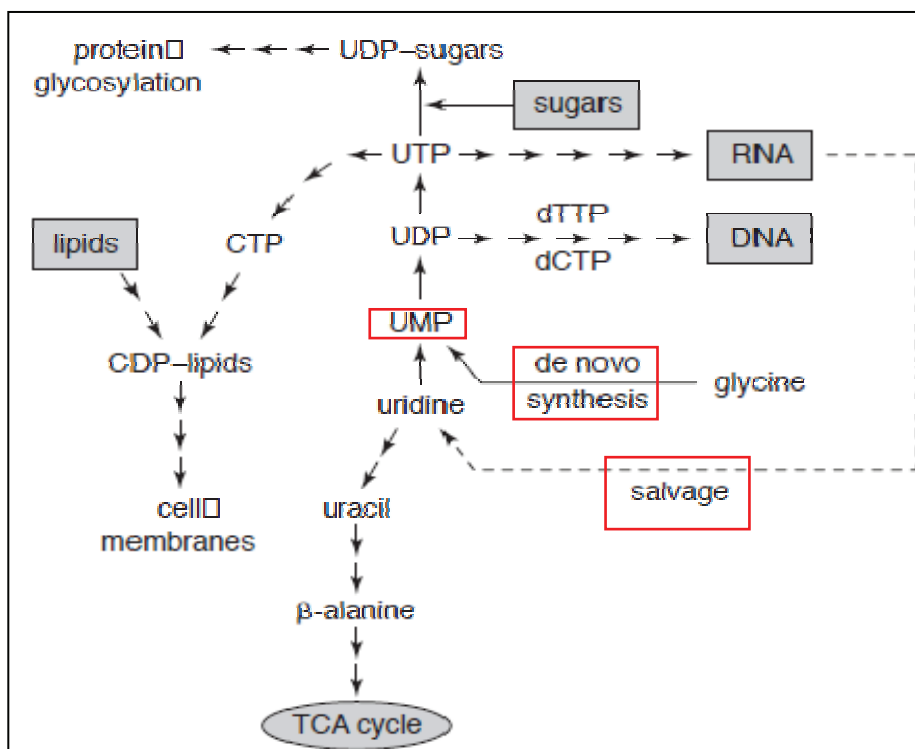


Figura 2. Metabolismo da uridina e alguns dos seus derivados. UMP é sintetizado ou a partir da via *de novo* ou a partir da fosforilação da uridina pela uridina quinase. *Adaptado de Connolly e Duley, 1999.*

1.3 A uridina e seu papel protetor no uso do 5-FU

A Urd, um nucleosídeo pirimídico, é um importante precursor da rota de salvamento das pirimidinas [Balestri et al, 2007; Cao et al, 2005]. Além de a Urd ser essencial para a síntese de RNA e de biomembranas, através da formação de conjugados pirimidina-lipídeo e pirimidina-açúcar [Connolly e Duley, 1999], há também evidências experimentais e clínicas que sugerem que ela é um elemento crucial na regulação de processos fisiológicos normais [Connolly e Duley, 1999; Cansey, 2006], especialmente no sistema nervoso central [Cansey, 2006], e em alguns estados patológicos [Connolly e Duley, 1999].

Farmacologicamente, a Urd tem sido utilizada para proteger os tecidos normais dos efeitos colaterais tóxicos da quimioterapia anti câncer (baseada em pirimidinas), principalmente como uma terapia de “resgate” para a toxicidade produzida pelo 5-FU justamente por ela ser um competidor natural [Krenitsky et al, 1965; Martin et al, 1982; Leyva et al, 1984; Pizzorno et al, 1998; Cao et al, 1999; el Kouni et al, 2000; Zhang et al, 2001; Pizzorno et al, 2002].

O 5-FU consiste em um análogo da base uracil possuindo como diferença um átomo de flúor no carbono 5 no lugar de um hidrogênio e teve sua introdução na clínica há mais de 40 anos. Ele rapidamente entra nas células através de difusão facilitada e é convertido aos seus metabólitos ativos. O 5-FU é uma droga que interfere na duplicação e transcrição do DNA [Pandolfo et al, 2005] e ainda representa um dos agentes mais ativos no tratamento de

tumores sólidos como mama, cólon e câncer de cabeça e pescoço, entre outros [Cao et al, 2002].

Dois mecanismos de ação contribuem para o efeito citotóxico do 5-FU: a) toxicidade direta ao DNA, onde o 5-FluorodesoxiUMP (5-FdUMP) se liga fortemente à Timidilato Sintase (TS), resultando na inibição da síntese de DNA e no crescimento celular e com menor frequência a incorporação de fluorodesoxinucleotídeos no DNA levando à sua fragmentação e morte celular; b) citotoxicidade direta ao RNA com incorporação do FUTP em várias espécies de RNA, incluindo RNA polissomal, RNA nuclear e RNA mensageiro, por meio disso interrompendo a maturação e algumas funções do RNA [Cao et al, 2002] (Figura 3). Há hipóteses de que a atividade antitumoral do 5-FU consiste na inibição da TS enquanto que a sua toxicidade se dá pela incorporação do nucleotídeo fluorado, gerado a partir da ativação do 5-FU, no RNA.

Se altas doses exógenas de Urd forem administradas algumas horas após o medicamento, a ligação do FdUMP à TS não será afetada, mas o UTP substituirá o FUTP no RNA [Pinedo e Peters, 1988], revelando que a atividade antitumoral do medicamento não é afetada, porém seus efeitos adversos diminuem. Entretanto, esses elevados níveis exógenos de Urd não são bem tolerados em humanos [Pizzorno et al, 1998], causando mais efeitos adversos ao paciente além daqueles já produzidos pela medicação [Cao et al, 1999]; porém esses altos níveis são essenciais para que ocorra o efeito de proteção desejado devido à meia vida curta [Leyva et al, 1984; Miyashita et al, 2002] da Urd no organismo (10-15 minutos) [Miyashita et al, 2002].

Por esta razão, uma das enzimas que metaboliza o fármaco em tecidos normais e tumorais e ainda regula a concentração homeostática da Urd tem

sido extensivamente investigadas, a UP. Além disso, a atividade da UP geralmente é bastante elevada na maioria dos tecidos tumorais, e essa indução aparenta conferir uma vantagem terapêutica do 5-FU aos pacientes com câncer [Cao et al, 2004].

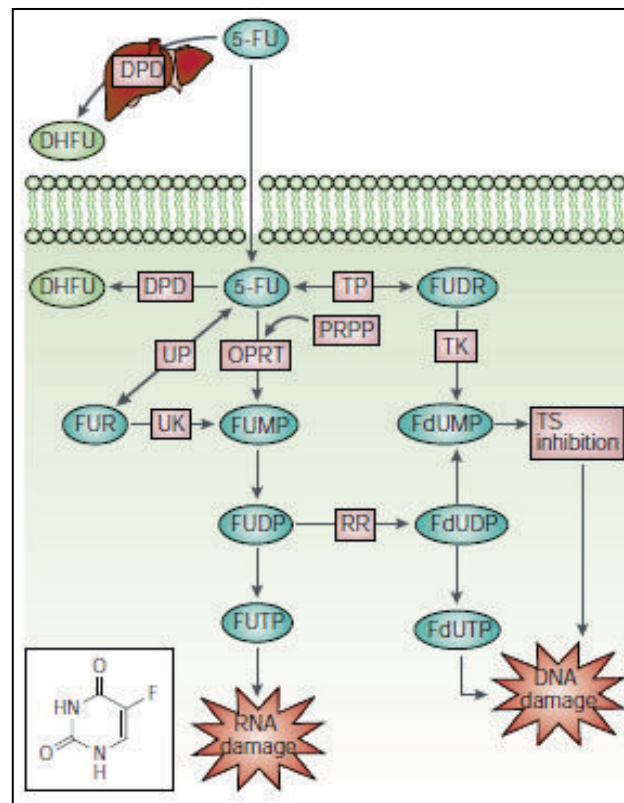


Figura 3. Metabolismo do 5-FU. Adaptado de Longley et al, 2003.

1.4 Uridina fosforilase humana

Como mencionado anteriormente, no metabolismo das pirimidinas duas PyNP foram identificadas em células eucarióticas: a UP (EC 2.4.2.3) e a TP (EC 2.4.2.4) [Pizzorno et al, 2002; Johansson, 2003]. A atividade fosforolítica da UP, que regula os níveis extracelulares e intracelulares da Urd, revela o seu papel crítico na modulação da rota de salvamento das pirimidinas [Zhang et al,

2001]. A enzima está distribuída em procariotos, leveduras e organismos superiores e a sua seqüência de aminoácidos é altamente conservada entre enzimas bacterianas, humana e de camundongos [el Kouni et al, 2000]. A atividade fosforolítica básica é conservada ao longo de toda a hierarquia evolucionária, de bactérias a humanos, embora a estrutura gênica e protéica e o tamanho da proteína variem, se apresentando, por exemplo, como um hexâmero em *Escherichia coli* [Caradoc-Davies et al, 2004] e *Salmonella typhimurium* [Lashkov et al, 2009] enquanto que em humanos uma das isoformas, como discutido mais adiante, tem a sua estrutura arranjada como um dímero (Figura 4) [Roosild et al, 2009].

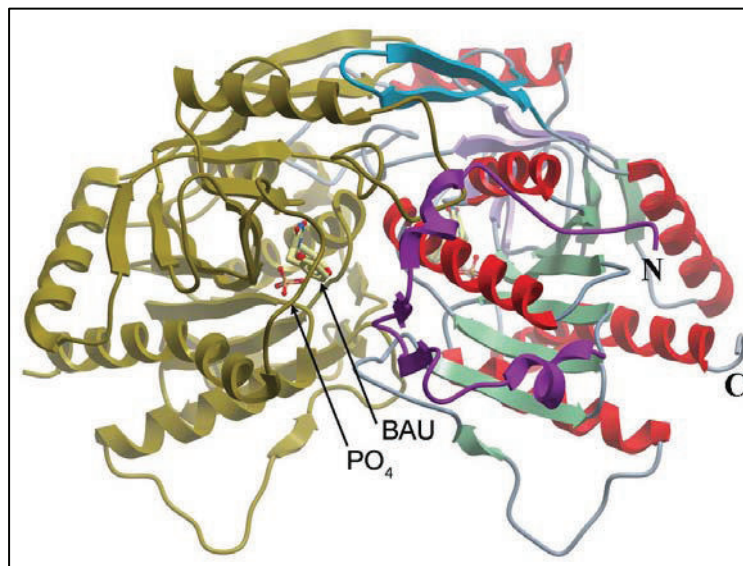


Figura 4. Estrutura cristalográfica da uridina fosforilase 1 humana. Adaptado de Roosild et al, 2009.

A UP é uma enzima chave responsável pela fosforólise reversível de Urd a uracil [Darnowski e Handschumacher, 1985; Watanabe et al, 1995; Watanabe e Uchida, 1995; Liu et al, 1998; Zhang et al, 2001; Pizzorno et al, 2002; Cao et

al, 2005] e, na presença de R1P, ela pode também catalisar a reação reversa, formando o nucleosídeo a partir da base livre (Figura 5) [Grem, 2000; Cao et al, 2002; Pizzorno et al, 2002].

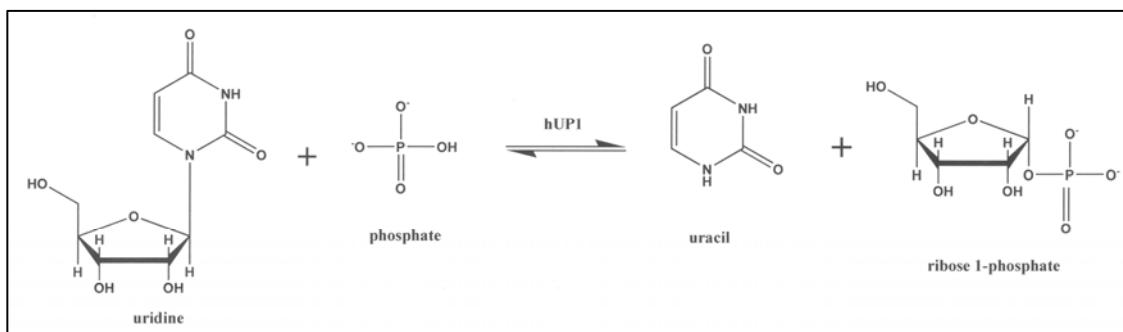


Figura 5. Reação catalisada pela UP.

Altos níveis de atividade da UP são encontrados em diversas espécies de tumores sólidos e o nível de expressão dela pode estar correlacionado com a progressão da doença [Miyashita et al, 2002; Johansson, 2003]. Zhang e colaboradores [Zhang et al, 2001] clonaram e caracterizaram parcialmente a região promotora da UP e verificaram que ela apresenta supostos elementos regulatórios para alguns fatores oncogênicos e genes supressores de tumor, incluindo a p53, como descrito a seguir.

Deste modo, o entendimento da regulação do gene UP, afetando tanto a atividade catalítica como a expressão, tornou-se crítico para a elucidação do seu potencial papel na tumorigênese e para a modulação do tratamento de câncer.

1.4.1 A Uridina Fosforilase é regulada pela p53

O supressor tumoral p53, possui um papel crucial no controle do crescimento celular, no reparo do DNA danificado e na regulação da apoptose [Ko e Prives, 1996]. A regulação supressora da p53 sobre o gene UP indica a presença de um controle negativo na rota de salvamento de pirimidinas, provavelmente como um mecanismo celular de auto-proteção em caso de depleção de ribonucleotídeos [Zhang et al, 2001; Pizzorno et al, 2002] (Figura 6). Um dano celular causando uma perda ou um desequilíbrio no “pool” desses nucleotídeos pode causar a ativação da p53, conduzindo a uma supressão da expressão da UP e à ativação da rota de salvamento de pirimidinas para reabastecer o “pool” de nucleotídeos de pirimidinas afetado [Pizzorno et al, 2002].

O esclarecimento da regulação do controle negativo da p53 sobre o gene promotor da UP e a sua expressão podem ter uma implicação considerável a níveis clínicos, desde no presente promotor do DNA da UP até no resultado terapêutico em tumores com mutação específica em p53, quando submetido a terapias anti-câncer baseadas em anti metabólitos [Zhang et al, 2001].

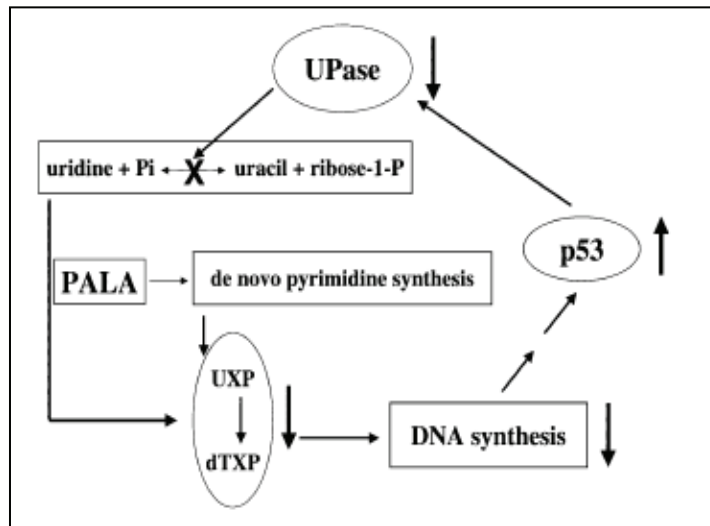


Figura 6. Controle dependente de p53 da expressão da UP e a regulação da rota de salvamento das pirimidinas. *Adaptado de Pizzorno et al, 2002.*

1.4.2 As duas isoformas de UP em mamíferos: UP1 e UP2

Liu e colaboradores [Liu et al, 1998] clonaram o cDNA da UP humana e também purificaram a proteína de tecido humano normal e tumoral. A seqüência de aminoácidos expressa foi comparada com seqüências protéicas pré-estabelecidas tanto de TP como UP, e um cDNA codificante de uma nova proteína humana similar, porém não idêntica à UP humana já descrita, foi identificado [Johansson, 2003]. Entretanto, Krenisty e colaboradores [Krenitsky et al, 1965] já haviam relatado a existência de dois tipos de UP e o motivo que as diferenciava era a faixa de pH ótimo de cada uma delas e que, devido a isto, uma ficaria no citoplasma enquanto a outra se localizaria no núcleo.

O alinhamento da seqüência de aminoácidos preditos da nova enzima com a UP humana mostrou que a mesma possui uma identidade de aproximadamente 60% com a seqüência de aminoácidos já descrita, assim

como as enzimas de camundongo, também possui uma elevada similaridade com as duas isoformas humanas [Johansson, 2003] (Figura 7).

Baseado nos altos níveis de similaridade da seqüência, a nova enzima foi nomeada Uridina Fosforilase-2 (UP2) enquanto que a Uridina Fosforilase humana previamente caracterizada parcialmente foi nomeada UP1 [Johansson, 2003]. Assim, houve a identificação da terceira fosforilase de nucleosídeos pirimídicos, presente em células de mamíferos, além da UP1 e TP.

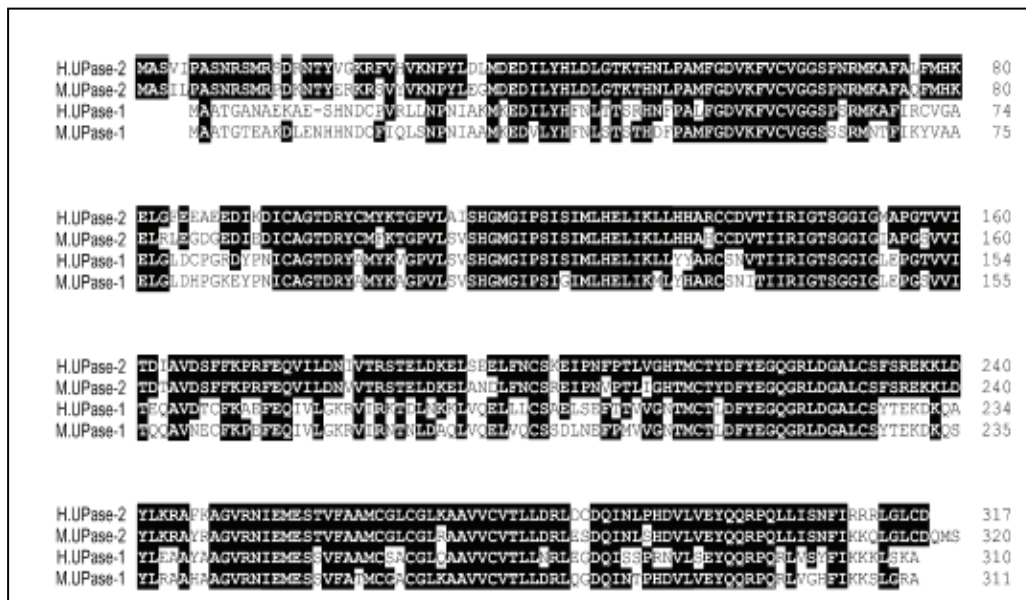


Figura 7. Alinhamento da seqüência de aminoácidos preditos da UP-2 humana (H. UPase-2) e de camundongo (M. UPase-2) com a UP-1 humana (H. UPase-1) e de camundongo (M. UPase-1), respectivamente. As porções destacadas em preto indicam os resíduos de aminoácidos idênticos, conservados em comparação à seqüência da UP-1 humana. *Adaptado de Johansson et al, 2003.*

Em humanos, as duas enzimas se encontram em genes e cromossomos distintos e o local de maior expressão também difere entre as duas isoformas. Enquanto que a UP2 é predominantemente expressa no rim, a UP1 encontra-se distribuída de uma maneira mais generalizada no organismo. Esta

expressão diferenciada entre as duas isoformas ainda não está bem esclarecida, não se sabendo ao certo o motivo pelo qual ocorre no organismo visto que as duas realizam a mesma função [Cao et al, 2005].

Assim, a caracterização da UP1 humana poderá contribuir para o desenvolvimento de inibidores seletivos e para a quimioterapia do câncer.

2. OBJETIVOS

2.1 Obejtivo Geral

Este trabalho tem por objetivo geral a expressão, a purificação e a caracterização da enzima Uridina Fosforilase-1 humana realizados no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tubérculos (INCT-TB) - Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional da PUCRS (CP-BMF). Tais experimentos fazem parte de um projeto maior existente no laboratório que visa à caracterização de enzimas (humanas e de *M. tuberculosis*) da via de salvamento de purinas e pirimidinas para o desenvolvimento racional de possíveis inibidores.

2.2 Objetivos Específicos

- A amplificação do gene UPP1 através da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando oligonucleotídeos iniciadores;
- Clonagem do amplicon em vetor de clonagem e posteriormente em vetor de expressão;
- Estabelecimento de um protocolo de expressão e de purificação da proteína UP1 por meio de Cromatografia Líquida de Rápida Performance (FPLC);
- Análise por espectrometria de massas e pelo método de Degradação de Édman para a determinação da identidade da proteína homogênea;
- Teste de atividade e caracterização da enzima através de cinética enzimática;

3. ARTIGO CIENTÍFICO

TITLE OF THE ARTICLE

The kinetic mechanism of human uridine phosphorylase 1: towards the development of new enzyme inhibitors for cancer chemotherapy.

PERIODIC CHOSEN FOR SUBMISSION

Archives of Biochemistry and Biophysics (impact factor: 2.626).

The kinetic mechanism of human uridine phosphorylase 1: towards the development of enzyme inhibitors for cancer chemotherapy[†]

Daiana Renck^{1,2}, Rodrigo G. Ducati¹, Mario S. Palma³, Diógenes S. Santos^{1,2,*}, Luiz A. Basso^{1,2,*}

¹Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), 6681/92-A Av. Ipiranga, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil.

³Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica, Centro de Estudos de Insetos Sociais, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, SP, Brazil.

[†]This work was supported by the National Institute of Science and Technology on Tuberculosis (DECIT/SCTIE/MS-MCT-CNPq-FNDCT-CAPES) and the Millennium Initiative Program (CNPq) to D.S.S. and L.A.B. D.S.S. (CNPq, 304051/1975-06), L.A.B. (CNPq, 520182/99-5), and M.S.P. (CNPq, 500079/90-0) are Research Career Awardees of the National Research Council of Brazil (CNPq). R.G.D. is a postdoctoral fellow of CNPq. D.R. is recipient of an MSc scholarship awarded by BNDES.

Running Title: Kinetic mechanism of human uridine phosphorylase 1

*Corresponding authors. Telephone/Fax: +55-51-33203629.

E-mail addresses: l Luiz A. Basso; [Diógenes S. Santos](mailto: Diógenes S. Santos)).

Abstract

Uridine phosphorylase (UP) is a key enzyme in the pyrimidine salvage pathway, catalyzing the reversible phosphorolysis of uridine to uracil and ribose-1-phosphate (R1P). The human UP type 1 (hUP1) is a molecular target for the design of inhibitors intended to boost endogenous uridine levels to rescue normal tissues from the toxicity of fluoropyrimidine nucleoside chemotherapeutic agents, such as capecitabine and 5-fluorouracil. Here, we describe a method to obtain homogeneous recombinant hUP1, and present initial velocity, product inhibition, and equilibrium binding data. These results suggest that hUP1 catalyzes uridine phosphorolysis by a steady-state ordered bi bi kinetic mechanism, in which inorganic phosphate binds first followed by the binding of uridine, and uracil dissociates first, followed by R1P release. Fluorescence titration at equilibrium showed cooperative binding of either P_i or R1P binding to hUP1. Amino acid residues involved in either catalysis or substrate binding were proposed based on pH-rate profiles.

Keywords: Cancer chemotherapy; Initial velocity; Product inhibition; Fluorescence spectroscopy; pH-rate profiles; Uridine phosphorylase kinetic mechanism

Pyrimidine nucleoside phosphorylases are key enzymes in the pyrimidine salvage pathway. Two types of enzymes have been identified in human cells: uridine phosphorylase (UP¹; EC 2.4.2.3) and thymidine phosphorylase (EC 2.4.2.4) [1,2,3]. UP belongs to the nucleoside phosphorylase (NP) super-family of proteins, in the NP-1 subset [4], and plays an important role in nucleoside metabolism, catalyzing the phosphorolysis of uridine (Urd) to uracil and ribose-1-phosphate (R1P) (Fig. 1). These products can be further utilized for nucleoside synthesis [5,6]. In humans, there are two isoforms of UP, hUP1 [3] and hUP2 [2], which are encoded by two different genes in distinct chromosomes. The alignment of the isoforms showed that they share approximately 60% amino acid sequence identity [2]. The hUP1 cDNA contains an open reading frame coding for a sequence of 310 amino acid residues corresponding to a protein with a subunit molecular mass of 33.9 kDa that is dimeric in solution [3,7], which is in contrast to the hexameric *Escherichia coli* enzyme [8,9].

Although UP is present in most normal and tumoral tissues, its activity as well as its expression is elevated in certain tumors, a feature that may contribute to selectivity of chemotherapeutic agents [3,10,11,12]. Studies have shown that this expression can be up-regulated by treating tumor cells with cytokines such as interferon- α , interferon- γ , tumor necrosis factor- α , and interleukin-1 α [3,13]. RT-PCR analysis demonstrated that basic fibroblast growth factor (bFGF) increases the expression level of mouse UP1 in osteolineage cell lines; the induction by bFGF is dependent of NF κ B activity [14]. In

¹Abbreviations used: Arg, arginine; BAU, 5-benzylacyclouridine; CV, column volume; bFGF, basic fibroblast growth factor; ESI-MS, electrospray ionization mass spectrometry; EWS, Ewing's sarcomas; 5-FU, 5-fluorouracil; FUrd, fluorouridine; FUMP, fluorouridine monophosphate; FUDP, fluorouridine diphosphate; FUTP, fluorouridine triphosphate; FdUrd, fluorodeoxyuridine; FdUMP, fluorodeoxyuridine monophosphate; FdUDP, fluorodeoxyuridine diphosphate; FdUTP, fluorodeoxyuridine triphosphate; Hepes, *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid; His, histidine; hUP1, human uridine phosphorylase 1; IPTG, isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside; LB, Luria-Bertani; NP, nucleoside phosphorylase; OPRT, orotate phosphoribosyltransferase; P_i, inorganic phosphate; PNP, purine nucleoside phosphorylase; R1P, ribose-1-phosphate; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; TB, Terrific Broth; TK, thymidine kinase; TP, thymidine phosphorylase; Tris, tris(Hydroxymethyl)aminomethane; Urd, uridine; UK, uridine kinase; UP, uridine phosphorylase.

addition, it has been shown that tumor-associated chromosomal translocation in Ewing's family tumors, where the N-terminus of Ewing's sarcoma (EWS) gene fuses with the C-terminus of some ETS transcription factors, up-regulates UP promoter *in vivo*, suggesting that UP could be a direct target of EWS/ETS fusion proteins [15,16]. In contrast, the activity and gene promoter levels of UP have been shown to be down-regulated by wild-type p53, a tumor suppressor gene that plays a key role in cell growth control, DNA damage repair, and apoptosis [1,17].

UP plays an important role in the homeostatic regulation of Urd concentration in plasma (1 - 5 μ M) and tissues, and affects activation and catabolism of several nucleoside analogues used in cancer chemotherapy [2]. These analogues include fluoropyrimidines, such as 5-fluorouracil (5-FU) [1,8], which is a uracil analogue with a fluorine atom at the C-5 position. This compound was developed in 1957 [18] after the observation that rat tumoral tissues use uracil more rapidly than normal tissues, which indicated that uracil metabolism is a potential target for chemotherapy [8]. Since then, 5-FU has been used in clinical practice against many types of solid tumors; yet, most of its use is related to colorectal cancer [8,19]. 5-FU is converted to fluorodeoxyuridine monophosphate (FdUMP), fluorodeoxyuridine triphosphate (FdUTP) and fluorouridine triphosphate (FUTP), the three main active metabolites. The main mechanism of 5-FU activation is either directly by orotate phosphoribosyltransferase (OPRT), or indirectly by the sequential action of UP converting 5-FU to fluorouridine (FUrd) which, in turn, is converted to fluorouridine monophosphate (FUMP) by uridine kinase (UK) [8,14]. FUMP is phosphorylated to fluorouridine diphosphate (FUDP), which can be either phosphorylated to FUTP or converted by ribonucleotide reductase into fluorodeoxyuridine diphosphate (FdUDP) [8]. The latter, in turn, can either be phosphorylated to FdUTP or dephosphorylated to FdUMP, both of which are active

metabolites. There is also an alternative pathway that involves conversion of 5-FU to fluorodeoxyuridine (FdUrd) by thymidine phosphorylase (TP), and conversion of FdUrd to FdUMP by thymidine kinase (TK). The main metabolites of 5-FU exert their anti-cancer activity either by disrupting RNA synthesis (FUTP), or inhibiting thymidylate synthase (TS) enzyme activity (FdUMP) that converts dUMP to deoxythymidine monophosphate (dTMP), which is needed for DNA synthesis and repair. In addition, inhibition of TS by FdUMP results in accumulation of dUMP leading to increased levels of dUTP. The latter and the 5-FU metabolite FdUMP can be misincorporated into DNA. Clinical evidences have demonstrated the ability of Urd to reduce bone marrow and gastrointestinal toxicity induced by 5-FU, called “*rescue of 5-FU toxicity*” [2,6,10,20]. High doses of uridine are required to produce the “rescue” effect due to the short half-life of plasma uridine of only two minutes and the regulation of plasma uridine homeostasis at the 2-4 μM level by the activity of hepatic UP [6,10]. However, these high doses needed to produce this effect are not well tolerated and produce dose-limiting effect in humans. It is thus necessary to develop a drug capable of maintaining elevated endogenous levels of Urd [6,7,10] to protect the normal tissues through Urd rescue effect. Accordingly, inhibition of UP activity appears an attractive therapeutic strategy to rescue 5-FU toxicity. Acyclouridine analogues, including 5-benzylacyclouridine (BAU), have been designed as hUP1 inhibitors, and BAU has been shown in clinical trials to be capable of increasing plasma Urd concentration, thereby increasing the therapeutic index of 5-FU [7].

Enzyme inhibitors make up roughly 25 % of the drugs marketed in United States [21]. Enzymes catalyze multistep chemical reactions to achieve rate accelerations by stabilization of the transition state structure [22]. Accordingly, mechanistic analysis (kinetic, chemical, and catalytic mechanisms) should always be a top priority for

enzyme-targeted drug programs aiming at the rational design of potent enzyme inhibitors. Here we describe amplification, cloning, and sequencing of the recombinant hUP1 coding gene. We also present heterologous protein expression in *Escherichia coli*, purification to homogeneity, N-terminal amino acid sequencing, electrospray ionization mass spectrometry analysis, determination of true steady-state kinetic parameters, product inhibition, equilibrium fluorescence of substrate/product binding, and pH-rate profiles of functional recombinant hUP1 enzyme. These results provide a solid foundation on which to base function-guided hUP1 enzyme inhibitors with potential anti-cancer activity.

Materials and methods

Amplification and cloning of the human UPP1 gene

The human *UPP1* coding sequence was searched on the GeneBank (BC007348) of the National Institute for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

The cDNA of *UPP1* was obtained by RT-PCR amplification of colorectal RNA (from Ambion; Austin, TX, USA). The oligonucleotide primers used (forward primer, 5'-CAGTTGGCCCATATGGCGGCCACGGGAGC-3'; and reverse primer, 5'-GCGGAGAAAGCTTGGCAGCGCTCAGGCC-3') contained, respectively, *NdeI* and *HindIII* (New England Biolabs) restriction sites (underlined). The PCR product was analyzed on 1% agarose gel, and a 930-bp band was detected and purified. The DNA fragment was cloned into pCR-Blunt cloning vector (Invitrogen), cleaved with *NdeI* and *HindIII* restriction enzymes, and subcloned into the pET-23a(+) expression vector (Novagen). The complete *UPP1* gene sequence was determined by automated DNA-

sequencing to confirm sequence integrity and the absence of mutations in the cloned fragment.

Expression and purification of recombinant hUP1

The pET-23a(+):*UPP1* recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* Rosetta (DE3) competent cells (Novagen) and selected on Luria-Bertani (LB) agar plates containing 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ampicillin and 34 $\mu\text{g mL}^{-1}$ cloranfenicol. A single colony was grown overnight in LB medium pH 7.2 (60 mL) containing the same antibiotics, at 37°C. An aliquot of this culture (10 mL) was used to inoculate Terrific Broth (TB) medium (2.5 L, with the same antibiotics) and grown for 36 h at 30°C after reaching an $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ of 0.4 - 0.6, without isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) induction. The same procedure was employed for *E. coli* Rosetta (DE3) cells transformed with pET-23a(+) (control). The cells (40 g) were harvested by centrifugation at 11,800g for 30 min at 4°C and stored at -20°C. Soluble protein expression was analyzed by 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) stained with Coomassie Brilliant Blue [23].

All purification steps were performed at 4°C and sample elution was monitored by UV detection. Frozen cells (5 g) were suspended in 25 mL of 50 mM *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (Hepes) pH 7.0 (buffer A) and incubated with 0.2 mg mL^{-1} lysozyme (Sigma) for 30 min. The cells were disrupted by sonication (5 pulses of 10 sec) and the solution was cleared by centrifugation at 48,000g for 30 min. The supernatant was treated with 1% (wt/vol) streptomycin sulfate (Sigma; final concentration) for 30 min to precipitate the nucleic acids, and centrifuged (48,000g for 30 min). The supernatant was dialyzed against buffer A (2 x 2 L, 3 h each). Residual

precipitate was removed by centrifugation (48,000g for 30 min) and the supernatant was loaded onto a SP Sepharose Fast Flow cation exchange column (GE Healthcare) pre-equilibrated with buffer A. The column was washed with 5 column volumes (CV) of buffer A and the adsorbed material was eluted with 15 CV linear gradient (0 - 100%) of 50 mM Hepes 200 mM NaCl pH 7.0 (buffer B) at a 1 mL min⁻¹ flow rate. The target recombinant protein was eluted at approximately half of the gradient, where a single SDS-PAGE band could be observed. The homogenous recombinant protein was dialyzed against 100 mM tris(Hydroxymethyl)aminomethane (Tris) pH 7.4 (3 x 2 L, 3 h each), concentrated, and stored at -80°C. Protein concentration was determined with Bradford Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories) and bovine serum albumin was used as standard [24]. All subsequent activity and binding assays were performed in 100 Tris pH 7.4, unless stated otherwise.

Amino acid sequence and mass spectrometry analysis

The N-terminal amino acid sequence of homogeneous recombinant hUP1 protein was analyzed by automated Edman degradation sequencing using a gas-phase sequencer PPSQ-21 A (Shimadzu) [25].

hUP1 was assessed by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) according to Chassigne and Lobinski, with some adaptations [26]. The sample was analyzed on Quattro-II triple-quadrupole mass spectrometer (Micromass; Altrincham, United Kingdom). During all experiments, the source temperature was maintained at -80°C and the capillary voltage at 3.6 kV; a drying nitrogen gas flow (200 L h⁻¹) and a nebulizer gas flow (20 L h⁻¹) were used. Intact horse heart myoglobin was used to calibrate the mass spectrometer and its typical cone voltage-induced fragments. hUP1

subunit molecular mass was determined by adjusting the mass spectrometer to yield a peak with a half-height of 1 mass unit, and the sampling cone-to-skimmer lens voltage controlling the transfer of ions to the mass analyzer was set to 38 V. Approximately 50 pmol of each sample were injected into the electrospray transport solvent. The ESI spectrum was obtained in the multichannel acquisition mode, with scanning from 500 to 1,800 m/z at a scan time of 7 sec. The mass spectrometer is equipped with MassLynx and Transform softwares for data acquisition and spectrum handling.

hUP1 enzymatic assay

Recombinant hUP1 enzyme activity was monitored in an UV-2550 UV/Visible spectrophotometer (Shimadzu). All assays were performed under initial rate conditions at 37°C and 100 mM Tris pH 7.4, in 500 μL total reaction volumes for 60 sec. This assay was based on the maximum difference in absorbance at 280 nm between Urd and uracil ($\Delta A_{\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}} = 2100$), in which a decrease in absorbance is observed upon conversion of Urd to uracil [27].

Initial velocity measurements

Initial velocity studies were carried out to determine the true steady-state kinetic parameters, in the forward direction. Saturation curves were performed varying concentrations of Urd (20 - 500 μM) against several fixed-varying concentrations of inorganic phosphate (P_i) (1 - 10 mM).

Product inhibition patterns

To provide an additional experimental approach to distinguish between the possible kinetic mechanisms, product inhibition studies were carried out at varying concentrations of one substrate, fixed concentrations of the co-substrate (in non-saturating levels), and fixed-varying concentrations of products (either R1P or uracil). The experimental conditions were as follows: varying Urd concentrations (20 - 500 μM), fixed P_i concentration (2 mM), and fixed-varying concentrations of either uracil (50 - 600 μM) or R1P (24 - 160 μM); varying P_i concentrations (1 - 10 mM), fixed Urd concentration (50 μM), and fixed-varying concentrations of either uracil (50 - 300 μM) or R1P (80 - 320 μM).

Equilibrium binding by fluorescence spectroscopy

Fluorescence measurements were carried out in a RF-5301 PC Spectrofluorophotometer (Shimadzu) at 25°C. Measurements of intrinsic hUP1 protein fluorescence employed excitation wavelength at 280 nm in each binding experiment, and the emission wavelength ranged from 285 to 350 nm. The slits for excitation and emission were both 3 nm. Fluorescence titrations of binary complex formation were carried out by making microliter additions of the following compounds to 2 mL containing 10 μM hUP1: 40 mM P_i stock solution (19.99 - 434.2 μM final concentration); 5 mM Urd stock solution (2.498 - 97.92 μM final concentration); 10 mM uracil stock solution (4.997 - 123.3 μM final concentration); 4 mM R1P stock solution (1.99 - 41.53 μM final concentration). Control experiments were employed to both determine the maximum ligand concentrations to be used with no inner filter effect and to account for any dilution effect on protein fluorescence.

pH-rate profiles

To determine the dependence of the kinetic parameters on pH, initial velocities were measured in the presence of varying concentrations of one substrate and a saturating level of the other in a buffer mixture of 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid /Hepes/2-(*N*-cyclohexylamino)ethanesulfonic acid over the following pH values: 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 and 9.0 [28]. The data were plotted as pH values versus either $\log k_{\text{cat}}$ or $\log k_{\text{cat}}/K_M$. As the K_M values changed as a function of pH, different concentration ranges of the variable substrate as well as the fixed substrate had to be employed. For varying Urd concentrations the experimental conditions were: at pH 5.0: $P_i = 20 \text{ mM}$, $200 \text{ }\mu\text{M} \leq \text{Urd} \leq 900 \text{ }\mu\text{M}$; at pH 5.5: $P_i = 20 \text{ mM}$, $100 \text{ }\mu\text{M} \leq \text{Urd} \leq 800 \text{ }\mu\text{M}$; at pH 6.0: $P_i = 12 \text{ mM}$, $20 \text{ }\mu\text{M} \leq \text{Urd} \leq 800 \text{ }\mu\text{M}$; at pH 6.5: $P_i = 10 \text{ mM}$, $20 \text{ }\mu\text{M} \leq \text{Urd} \leq 700 \text{ }\mu\text{M}$; at pH 7.0 and 7.5: $P_i = 10 \text{ mM}$, $20 \text{ }\mu\text{M} \leq \text{Urd} \leq 500 \text{ }\mu\text{M}$; at pH 8.0: $P_i = 10 \text{ mM}$, $20 \text{ }\mu\text{M} \leq \text{Urd} \leq 700 \text{ }\mu\text{M}$; at pH 8.5: $P_i = 10 \text{ mM}$, $20 \text{ }\mu\text{M} \leq \text{Urd} \leq 600 \text{ }\mu\text{M}$; and at pH 9.0: $P_i = 10 \text{ mM}$, $20 \text{ }\mu\text{M} \leq \text{Urd} \leq 800 \text{ }\mu\text{M}$. For varying P_i concentrations the experimental ranges employed were as follows: at pH 5.0, $\text{Urd} = 800 \text{ }\mu\text{M}$, $2 \text{ mM} \leq P_i \leq 20 \text{ mM}$; at pH 5.5, $\text{Urd} = 700 \text{ }\mu\text{M}$, $2 \text{ mM} \leq P_i \leq 16 \text{ mM}$; at pH 6.0, $\text{Urd} = 700 \text{ }\mu\text{M}$, $0.5 \text{ mM} \leq P_i \leq 8 \text{ mM}$; at pH 6.5, $\text{Urd} = 600 \text{ }\mu\text{M}$, $0.05 \text{ mM} \leq P_i \leq 8 \text{ mM}$; at pH 7.0 and 7.5, $\text{Urd} = 500 \text{ }\mu\text{M}$, $0.1 \text{ mM} \leq P_i \leq 8 \text{ mM}$; at pH 8.0, $\text{Urd} = 600 \text{ }\mu\text{M}$, $0.1 \text{ mM} \leq P_i \leq 8 \text{ mM}$; at pH 8.5, $\text{Urd} = 500 \text{ }\mu\text{M}$, $0.05 \text{ mM} \leq P_i \leq 5 \text{ mM}$; and at pH 9.0, $\text{Urd} = 700 \text{ }\mu\text{M}$, $0.05 \text{ mM} \leq P_i \leq 5 \text{ mM}$.

Results and discussion

Amplification, cloning, and DNA sequencing

The PCR amplification protocol yielded a product with an expected size corresponding to the human *UPP1* (930-bp) DNA coding sequence (data not shown). The fragment was purified from the agarose gel and ligated into the pET-23a(+) expression vector. Nucleotide sequence analysis confirmed both identity and integrity of human *UPP1* DNA coding sequence.

Expression of recombinant hUP1 protein

The pET-23a(+):*UPP1* recombinant plasmid was transformed into *E. coli* Rosetta (DE3) host cells by electroporation. Analysis by SDS-PAGE (Fig. 2) showed that the cell extracts contained the recombinant protein, in the insoluble and soluble fraction, with an apparent molecular mass of 33 kDa, in agreement with the expected size of 33.934 kDa for hUP1. Among a number of protocols tested, the best experimental condition for expression of recombinant hUP1 occurred with *E. coli* Rosetta (DE3) cells grown for 36 h (after reaching an $OD_{600\text{ nm}}$ of 0.4 - 0.6, without IPTG induction) at 30°C in TB medium. The pET expression vector system (Novagen) has a strong IPTG-inducible bacteriophage T7 *lacUV5* late promoter that controls the T7 RNA polymerase to transcribe cloned target genes [29]. It has been shown that *lac*-controlled systems could have high-levels of protein expression in the absence of inducer [30,31]. It has been proposed that leaky protein expression is due to derepression of the *lac*-controlled system when cells approach stationary phase in

complex medium and that cyclic AMP, acetate, and low pH are required to achieve high-level expression in the absence of IPTG induction, which may be part of a general cellular response to nutrition limitation [32]. However, more recently, it has been shown that unintended induction in the pET system is due to the presence of as little as 0.0001% of lactose in the medium [33]. It is noteworthy that a large amount of recombinant hUP1 protein remained in the insoluble fraction (Fig. 2, lane 3). Although inclusion body formation can greatly simplify protein purification, there is no guarantee that the in vitro refolding will yield large amounts of biologically active protein. Moreover, inclusion body purification schemes present a number of problems such as: use of denaturants that are expensive and can cause irreversible modifications of protein structure that will elude all of the most sophisticated analytical tests, refolding usually must be done in very dilute solution and the protein reconcentrated, and refolding encourages protein isomerization leading to precipitation during storage [34]. Since we aimed at determining the mode of action of recombinant hUP1 enzyme, we deemed more appropriate to avoid solubilizing agents.

Purification of recombinant hUP1 protein

Recombinant hUP1 protein was efficiently purified to homogeneity (Fig. 3) by a single-step purification protocol, using a cation exchange column. The target protein eluted at approximately 50% of buffer B. The 3.8-fold purification protocol resulted in a protein yield of 43% and 20.8 mg of active recombinant hUP1 protein from 5 g of cells (Table 1). In contrast to Roosild and co-workers [7], we found no need to add potassium salt in the purification buffers to prevent protein aggregation and precipitation. The homogeneous protein was stored at -80°C , with no loss of activity.

Mass spectrometry and N-terminal amino acid sequencing

The subunit molecular mass value for hUP1 was determined to be 33,934.00 Da by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). Since the predicted molecular mass is 33,934.00 Da, this result indicates removal of the N-terminal methionine (predicted methionine molecular mass = 131.20 Da). These results provide evidence that confirm the identity of recombinant hUP1.

The Edman degradation method identified the first 21 N-terminal amino acid residues of the recombinant hUP1 as: AATGANAEKAESHNDPVRLL. This result unambiguously demonstrates that the purified protein is hUP1, and confirms the removal of the N-terminal methionine. Protein N-terminal methionine excision is a common type of post-translational modification process that occurs in the cytoplasm of many organisms displaying protein synthesis. The cleavage of the initiator methionine is usually directed by the penultimate amino acid residues with the smallest side chain radii of gyration (Gly, Ala, Ser, Thr, Pro, Val, and Cys) [35], which is in agreement with removal of the N-terminal methionine from hUP1 since alanine is the penultimate N-terminal amino acid residue.

Initial velocity and steady-state kinetic parameters

The double-reciprocal plots for the forward reaction (phosphorolysis) showed a family of lines intersecting to the left of the y -axis (Fig. 4 A and B), which is consistent with ternary complex formation and a sequential mechanism [36]. Ping-pong and rapid equilibrium ordered mechanisms could be ruled out, since these mechanisms display

parallel lines and intersecting lines at the y -axis, respectively. The data were fitted to the following equation: $v = VAB/(K_{ia}K_b + K_aB + K_bA + AB)$, yielding the following true steady-state kinetic parameters: $k_{cat} = 7.5 (\pm 0.2) \text{ s}^{-1}$, $K_{Urd} = 51 (\pm 4) \mu\text{M}$, $K_{Pi} = 2462 (\pm 228) \mu\text{M}$, $k_{cat}/K_{Urd} = 14.7 (\pm 1.2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, and $k_{cat}/K_{Pi} = 3.05 (\pm 0.28) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. These values are different from the apparent steady-state kinetic constants reported for human liver UP1 [10]. Although it is not possible to offer a clear explanation for these differences, here we present the true steady-state kinetic parameters whereas Liu and co-workers [10] presented apparent steady-state kinetic parameters.

Product inhibition

The initial velocity results described above cannot distinguish between a steady-state ordered bi bi mechanism and rapid equilibrium random bi bi system. Accordingly, product (either RIP or uracil) inhibition measurements were carried out to determine the order of substrate addition to the enzyme. The data were fitted to an equation for either competitive or noncompetitive inhibition: $v = VA/[K_a(I + I/K_{is}) + A]$ or $v = VA/[K_a(I + I/K_{is}) + A(1 + K_{ii})]$, respectively. The double-reciprocal plots revealed a pattern of three noncompetitive and one competitive inhibition (Table 2). This pattern is in agreement with a steady-state ordered bi bi kinetic mechanism [36], in which P_i binds first to free hUP1 enzyme followed by Urd binding to form the catalytically competent ternary complex. This pattern also suggests that uracil is released first followed by RIP dissociation from the RIP-hUP1 binary complex. In addition, a steady-state random bi bi mechanism could be discarded because double reciprocal plots were linear in initial velocity studies and the pattern of product inhibition would be noncompetitive for all substrate-product pairs. The steady-state ordered bi bi kinetic mechanism for hUP1 is in

agreement with the cytoplasmic rat liver UP [19,37]. However, this mechanism is in disagreement with the random order of substrate addition for UP from both *E. coli* [38,39] and *Lactobacillus casei* [40], and in disagreement with the ordered mechanism for UP from guinea pig, in which binding of uracil precedes that of P_i [41].

Equilibrium binding of ligands to hUP1

Binding experiments were employed to confirm the order of substrate addition proposed by product inhibition for hUP1, and to reinforce the proposal of the order of product dissociation from the catalytically competent ternary complex. Intrinsic hUP1 fluorescence enhanced upon either P_i or R1P binding to free hUP1. Plots of either P_i or R1P concentration versus relative protein fluorescence variation upon binary complex formation (Fig. 5 A and B) were sigmoidal, and the data were fitted to the Hill equation [42]: $F/F_{\max} = A^n / (K' + A^n)$, yielding values of $K' = 106 (\pm 56)$ mM and $n = 2.0 (\pm 0.1)$ for P_i, and $K' = 297 (\pm 102)$ μ M and $n = 2.0 (\pm 0.1)$ for R1P. K' represents the mean dissociation constant for hUP1:ligand binary complex formation, which is comprised of interaction factors and the intrinsic dissociation constant, and n represents the total number of binding sites [36]. The value of 2 for n is in agreement with the dimeric form of hUP1 in solution demonstrated by size-exclusion chromatography and multi-angle static light scattering [7]. Positive cooperativity in the binding of P_i or R1P to hUP1 was supported by upward-curved double-reciprocal plots (insets in Fig 5 A and B, respectively). No enhancement in intrinsic protein fluorescence could be detected upon binding of either uridine or uracil to free hUP1, thereby lending support to the proposed kinetic mechanism for hUP1. Interestingly, based on crystal structures of ternary complexes of *E. coli* UP either with 5-FU and R1P or FURd and P_i, it has been proposed

that there appears to be a cooperative pattern of substrate binding [18]. Our results demonstrate that there is indeed cooperativity that is brought about by P_i or R1P binding to hUP1.

The initial velocity, product inhibition, and equilibrium binding results are consistent with a steady-state ordered bi bi kinetic mechanism, in which P_i binds first to the free enzyme, followed by the binding of Urd to form the catalytically competent ternary complex, and uracil is the first product to dissociate from the complex, followed by the release of R1P (Fig. 6).

pH-rate profiles

pH Dependence of the kinetic parameters was evaluated to probe acid-base catalysis in hUP1 mode of action. The bell-shaped pH-rate profiles were fitted to the following equation: $\log y = \log[C/(1 + H/K_a + K_b/H)]$, yielding K_a and K_b , respectively, the apparent acid and base dissociation constants for ionizing groups. In this equation, y represents the apparent kinetic parameter (k_{cat} or k_{cat}/K_M), C is the pH-independent plateau value of y , and H is the proton concentration. The bell-shaped pH-rate profiles showed values of 1 for the acidic limb and -1 for the basic limb, indicating participation of a single ionizable group in each limb. The data from pH 5.0 - 6.0 for k_{cat}/K_{P_i} , and pH 5.0 for k_{cat}/K_{Urd} were not included in the analysis, since these saturation curves were sigmoidal. It is interesting to note that, as has been pointed out in a recent review showing a timeline of evolution of allostery as a concept [43], pH is now considered an allosteric effector. At any rate, as the intracellular pH is near neutral, we deemed more appropriate to consider only the pH values that yielded hyperbolic curves to allow a more straightforward data analysis.

The pH-rate profile for k_{cat} indicates that protonation of a group with $\text{p}K_{\text{a}}$ value of $5.5 (\pm 0.6)$ and deprotonation of another group with $\text{p}K_{\text{a}}$ value of $8.2 (\pm 0.9)$ play a critical role in hUP1 enzyme catalysis (Fig. 7A). The amino acid side chain having a $\text{p}K_{\text{a}}$ value of 5.5 that has to be deprotonated for efficient catalysis may tentatively be ascribed to the conserved His36 residue showed by crystallography to interact with the acyclic moiety of 5-benzylacetylouridine (BAU, an inhibitor of hUP1) [7]. In the usually predominant nonionized tautomeric form of His36, the N-3 nitrogen (ϵ_2) with the hydrogen atom may act as an electrophile and H-bond donor, whereas N-1 nitrogen (δ_1) atom may act as a nucleophile and acceptor for H-bonding. However, the position of the hydrogen atom can vary with conditions in the local environment of hUP1 active site. The conserved Tyr35, Lys271, and Lys272 are candidates for the residue having a $\text{p}K_{\text{a}}$ value of 8.2 that has to be protonated for efficient hUP1 catalysis to occur.

The pH dependence of $k_{\text{cat}}/K_{\text{P}_i}$ (Fig. 7B) indicates that protonation of a group and deprotonation of another group with an average $\text{p}K_{\text{a}}$ value of $7.7 (\pm 0.8)$ abolish P_i binding. These data suggest that there is no pH plateau in which hUP1 would be fully in its active form as regards P_i binding. In other words, with increasing pH, before one group has been fully deprotonated to give its active form, another group required in the protonated form has started to lose its proton. Amino acid sequence comparison demonstrates conservation of three arginine residues (Arg64, Arg94, and Arg138) in hUP1. Although these residues are involved in P_i binding, the crystal structure of hUP1 has shown that Arg64 is bent away from the P_i anion in the active site, leaving two guanidinium groups (Arg94 and Arg138), one from each subunit of the dimer, to bind the substrate [7]. Based on this finding, the Arg64 residue has been suggested not to participate in P_i binding [7]. The $\text{p}K_{\text{a}}$ value of the δ -guanido group of arginine in solution is usually about 12. How can one reconcile the $\text{p}K_{\text{a}}$ values of 7.7 for amino acid

side chains involved in P_i binding? It has been pointed out by Copeland [44] that in some cases the pK_a values that are measured cannot be correctly ascribed to a particular amino acid, but rather reflect a specific set of residue interactions within an enzyme molecule that create in situ a unique acid-base center. Moreover, the hydrophobic interior of enzyme active sites that undergo domain closure can greatly perturb the pK_a values of amino acid side chains relative to their typical pK_a values in aqueous solution. At any rate, site-directed mutagenesis of Arg64, Arg94, and Arg138 residues of hUP1 and crystal structure determination of these mutants will have to be carried out to ascertain the role, if any, of these residues in P_i binding.

The pH dependence of k_{cat}/K_{Urd} (Fig. 7C) indicates that protonation of group with pK_a of $6.5 (\pm 0.6)$ and deprotonation of another group with pK_a of $8.4 (\pm 0.9)$ abolish uridine binding. The side chains of His8 and Glu198 have been shown to be involved in *E. coli* UP ribose binding site [18], corresponding to His36 and Glu250 in hUP1. The side chain of His36 is a more likely candidate for the group with pK_a value of 6.5 that has to be deprotonated to interact with the 5'-OH group of the ribose moiety of Urd in hUP1. There are also H-bonds formed between the 2'-OH group of ribose and the main-chain nitrogen of Met197 (Met249 in hUP1) and the side-chain of Arg91 (Arg138 in hUP1) [18]. As Arg138 has been shown to be involved in P_i binding in hUP1 [7], it is not likely that Arg138 represents the group with pK_a of 8.4 whose deprotonation abolishes Urd binding. The crystal structure of *E. coli* UP has also shown that Gln166 and Arg168 are key residues in the uracil binding pocket and together with a tightly bound water molecule are seen to be involved in the substrate specificity of UP [18]. These residues correspond to Gln217 and Arg219 in human UP1 [7]. It is unlikely that this role is played by Gln217 because its amine side chain does not ionize. On the other hand, the δ -guanidinium group of the side chain of the conserved Arg168 amino

acid in *E. coli* UP (Arg219 in hUP1) interacts with the O4 of the carbonyl group of uracil, and it has been proposed to play a role in substrate selectivity *via* an electrostatic effect [18]. It is thus tempting to assign to the guanidinium side chain of Arg219 residue the pK_a value of 8.4 that has to be protonated for Urd binding to occur.

Notwithstanding, site-directed mutagenesis will have to be carried out to assign any role in substrate binding and catalysis to a particular amino acid residue in hUP1.

Summary

Here we describe an efficient method to obtain homogeneous recombinant hUP1. We also present initial velocity, product inhibition, and equilibrium binding data that show that hUP1 catalyzes the phosphorolysis of Urd by a steady-state ordered bi bi kinetic mechanism, in which P_i binds first to free enzyme, followed by the binding of Urd to form the catalytically competent ternary complex, and uracil is the first product to dissociate from the complex, followed by R1P release. Amino acid residues involved in either catalysis or substrate binding were proposed based on pH-rate profiles. A comparison between the crystal structure of free hUP1 and BAU-hUP1 binary complex showed that there is a large inter-domain motion between monomers of dimeric hUP1 [7]. These findings prompted the authors to propose that the “open” conformation of hUP1 provides an opportunity to develop a novel class of allosteric inhibitors of this enzyme that lock the protein in a functionally disabled form [7]. However, there was no experimental evidence showing that hUP1 exhibits allostery. Thermodynamic dissociation constants were assessed by the enhancement of intrinsic protein fluorescence upon P_i or R1P binding to hUP1, and the results demonstrated that these substrates exhibit cooperative binding to the enzyme. These results lend support to the

proposal of designing allosteric inhibitors of hUP1 enzyme activity. It has been proposed that the conservation of key residues and interactions with substrate in the phosphate and ribose binding pockets would indicate that ribooxocarbenium ion formation during catalysis of UP may be similar to that proposed for *E. coli* purine nucleoside phosphorylase (PNP) [18]. Human PNP catalyzes the phosphorolysis of *N*-ribosidic bonds of 6-oxy-purine nucleosides and deoxynucleosides to the corresponding purine base and α -D-ribose 1-phosphate. Transition-state analogues that have picomolar inhibition constants have been developed for human PNP based on the transition-state structure for calf spleen PNP [45]. For instance, Immucillin-H possesses features of the transition state that include an elevated pK_a at the N7 position of the 9-deazahypoxanthine ring, a positive charge in the protonated iminoribitol moiety to mimic the ribooxocarbenium ion, and an enzymatically stable carbon-carbon ribosidic bond [45]. Human PNP has a later transition state and DADMe-Immucillin-H has been synthesized to be a mimicry of the proposed transition state. On the other hand, bovine PNP has an earlier transition state and Immucillin-H has been synthesized to be a mimicry of this transition state. It has been shown that DADMe-Immucillin-H binds more tightly to human PNP than Immucillin-H, thereby showing that even though bovine and human PNPs share 87% sequence identity and have totally conserved active site residues, inhibitors with differential specificity can be designed [46]. The crystal structure of human PNP in complex with Immucillin-H showing the amino acid residues that interact with this transition-state analogue has been reported [47]. Accordingly, the transition state analogues of human PNP could serve as blueprints for the design of inhibitors of hUP1 enzyme activity. As hUP1 is a molecular target for the design of specific inhibitors intended to boost endogenous uridine levels for the purpose of rescuing normal tissues from the toxicity of fluoropyrimidine nucleoside

chemotherapeutic agents, the data here presented provide pivotal data for the design of function-based inhibitors. Understanding the mode of action of hUP1 will inform us on how to better design inhibitors targeting hUP1 with potential therapeutic application in cancer chemotherapy.

References

- [1] G. Pizzorno, D. Cao, J.J. Leffert, R.L. Russel, D. Zhang, R.E. Handschumacher, Homeostatic control of uridine and the role of uridine phosphorylase: a biological and clinical update, *Biochim. Biophys. Acta* 1587 (2002) 133-144.
- [2] M. Johansson, Identification of a novel human uridine phosphorylase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307 (2003) 41-46.
- [3] S.I. Watanabe, T. Uchida, Cloning and expression of human uridine phosphorylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216 (1995) 265-272.
- [4] M.J. Pugmire, S.E. Ealick, Structural analyses reveal two distinct families of nucleoside phosphorylases, *Biochem. J.* 361 (2002) 1-25.
- [5] D. Cao, J.J Leffert, J. McCabe, B. Kim, G. Pizzorno, Abnormalities in uridine homeostatic regulation and pyrimidine nucleotide metabolism as a consequence of the deletion of the uridine phosphorylase gene, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 21169-21175.
- [6] D. Cao, R.L. Russell, D. Zhang, J.J. Leffert, G. Pizzorno, Uridine phosphorylase (-/-) murine embryonic stem cells clarify the key role of this enzyme in the regulation of the pyrimidine salvage pathway and in the activation of fluoropyrimidines, *Cancer Res.* 62 (2002) 2313-2317.

- [7] T.P. Roosild, S. Castronovo, M. Fabbiani, G. Pizzorno, Implications of the structure of human uridine phosphorylase 1 on the development of novel inhibitors for improving the therapeutic window of fluoropyrimidine chemotherapy, *BMC Struct. Biol.* 16 (2009) 9-14.
- [8] D.B. Longley, D.P. Harkin, P.G. Johnston, 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies, *Nat. Rev. Cancer* 3 (2003) 330-338.
- [9] E.Y. Morgunova, A.M. Mikhailov, A.N. Popov, E.V. Blagova, E.A. Smirnova, B.K. Vainshtein, C. Mao, S.R. Armstrong, S.E. Ealick, A.A. Komissarov, E.V. Linkova, A.A. Burlakova, A.S. Mironov, V.G. Debabov, Atomic structure at 2.5 Å resolution of uridine phosphorylase from *E. coli* as refined in the monoclinic crystal lattice, *FEBS Lett.* 367 (1995) 183-187.
- [10] M. Liu, D. Cao, R. Russell, R.E. Handschumacher, G. Pizzorno, Expression, characterization, and detection of human uridine phosphorylase and identification of variant uridine phosphorolytic activity in selected human tumors, *Cancer Res.* 58 (1998) 5418-5424.
- [11] H. Miyashita, Y. Takebayashi, J.F. Eliason, F. Fujimori, Y. Nitta, A. Sato, H. Morikawa, A. Ohashi, K. Motegi, M. Fukumoto, S. Mori, T. Uchida, Uridine phosphorylase is a potential prognostic factor in patients with oral squamous cell carcinoma, *Cancer* 94 (2002) 2959-2966.

[12] T.A. Krenitsky, M. Barclay, J.A. Jacquez, Specificity of mouse uridine phosphorylase, chromatography, purification, and properties, *J. Biol. Chem.* 239 (1964) 805-812.

[13] D. Cao, M.A. Nimmakayalu, F. Wang, D. Zhang, R.E. Handschumacher, P. Bray-Ward, G. Pizzorno, Genomic structure, chromosomal mapping, and promoter region analysis of murine uridine phosphorylase gene, *Cancer Res.* 59 (1999) 4997-5001.

[14] Y. Im, H.K. Shin, H. Kim, S. Jeong, S. Kim, Y. Kim, D.H. Lee, S. Jeon, H. Lee, J. Choi, Enhanced cytotoxicity of 5-FU by bFGF through up-regulation of uridine phosphorylase 1, *Mol. Cells* 28 (2009) 119-124.

[15] B. Deneen, H. Hamidi, C.T. Denny, Functional analysis of the EWS/ETS target gene uridine phosphorylase, *Cancer Res.* 63 (2003) 4268-4274.

[16] A. Arvand, C.T. Denny, Biology of EWS/ETS fusions in Ewing's family tumors, *Oncogene.* 20 (2001) 5747-5754.

[17] D. Zhang, D. Cao, R. Russell, G. Pizzorno, p53-dependent suppression of uridine phosphorylase gene expression through direct promoter interaction, *Cancer Res.* 61 (2001) 6899-6905.

[18] T.T. Caradoc-Davies, S.M. Cutfield, I.L. Lamont, J.F. Cutfield, Crystal structures of *Escherichia coli* uridine phosphorylase in two native and three complexed forms reveal

basis of substrate specificity, induced conformation changes and influence of potassium, *J. Mol. Biol.* 337 (2004) 337-354.

[19] R. Bose, E.W. Yamada, Uridine phosphorylase, molecular properties and mechanism of catalysis, *Biochemistry* 13 (1974) 2051-2056.

[20] G.P. Connolly, J.A. Duley, Uridine and its nucleotides: biological actions, therapeutic potentials, *Trends Pharmacol. Sci.* 20 (1999) 218-225.

[21] J.G. Robertson, Mechanistic basis of enzyme-targeted drugs. *Biochemistry* 44 (2005) 5561-5571.

[22] J.G. Robertson, Enzymes as a special class of therapeutic target: clinical drugs and modes of action. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17 (2007) 674-679.

[23] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680-685.

[24] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254.

[25] B.M. de Souza, M.S. Palma, Monitoring the positioning of short polycationic peptides in model lipid bilayers by combining hydrogen/deuterium exchange and

electrospray ionization mass spectrometry, *Biochim. Biophys. Acta* 1778 (2008) 2797-2805.

[26] H. Chassaigne, R. Lobinski, Characterization of horse kidney metallothionein isoforms by electrospray MS and reversed-phase HPLC-electrospray MS, *Analyst*. 123 (1998) 2125-2130.

[27] G. Magni, Uridine nucleosidase from yeast, *Methods Enzymol.* 51 (1978) 290-296.

[28] P.F. Cook, W.W. Cleland, *Enzyme Kinetics and Mechanisms*, Garland Science, London, New York, 2007.

[29] K.C. Kelley, K.J. Huestis, D.A. Austen, C.T. Sanderson, M.A. Donohue, S.K. Stickel, E.S. Kawasaki, M.S. Osburne, Regulation of CD4-183 gene expression from phage-T7-based vectors in *Escherichia coli*, *Gene* 156 (1995) 33–36.

[30] C. Rizzi, J. Frazzon, F. Ely, P.G. Weber, I.O. Fonseca, M. Gallas, J.S. Oliveira, M.A. Mendes, B.M. Souza, M.S. Palma, D.S. Santos, L.A. Basso, DAHP synthase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: cloning, expression, and purification of functional enzyme, *Protein Expr. Purif.* 40 (2005) 23-30.

[31] R.G. Silva, L.P. Carvalho, J.S. Oliveira, C.A. Pinto, M.A. Mendes, M.S. Palma, L.A. Basso, D.S. Santos, Cloning, overexpression, and purification of functional human purine nucleoside phosphorylase, *Protein Exp. Purif.* 27 (2003) 158-164.

- [32] T.H. Grossman, E.S. Kawasaki, S.R. Punreddy, M.S. Osburne, Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability, *Gene*. 209 (1998) 95–103.
- [33] F.W. Studier, Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures, *Protein Expr. Purif.* 41 (2005) 207-234.
- [34] C.H. Schein, Production of soluble recombinant proteins in bacteria, *Biotechnology* 7 (1989) 1141-1149.
- [35] P.H. Hirel, M.J. Schmitter, P. Dessen, G. Fayat, S. Blanquet, Extent of N-terminal methionine excision from *Escherichia coli* proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86 (1989) 8247-8251.
- [36] I.H. Segel, *Enzyme Kinetics, Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1975.
- [37] A. Kraut, E.W. Yamada, Cytoplasmic uridine phosphorylase of rat liver - characterization and kinetic, *J. Biol. Chem.* 246 (1971) 2021-2030.
- [38] T.A. Krenitsky, Uridine phosphorylase from *Escherichia coli* - Kinetic properties and mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 429 (1976) 352-358.

- [39] A. Vita, C.Y. Huang, G. Magni, Uridine phosphorylase from *Escherichia coli* B.: kinetic studies on the mechanism of catalysis, Arch. Biochem. Biophys. 226 (1983) 687-692.
- [40] Y. Avraham, N. Grossovicz, J. Yashphe, Purification and characterization of uridine and thymidine phosphorylase from *Lactobacillus casei*, Biochem. Biophys. Acta 1040 (1990) 287-293.
- [41] T.A. Krenitsky, Pentosyl transfer mechanisms of the mammalian nucleoside phosphorylase, J. Biol. Chem. 243 (1968) 2871-2875.
- [42] A.V. Hill, The Combinations of Haemoglobin with Oxygen and with Carbon Monoxide. I, Biochem. J. 7 (1913) 471-480.
- [43] N.M. Goodey, S.J. Benkovic, Allosteric regulation and catalysis emerge via a common route, Nat. Chem. Biol. 4 (2008) 474-482.
- [44] R.A. Copeland, Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis, Wiley-VCH, New York, 2000.
- [45] V.L. Schramm, Enzymatic transition states: thermodynamics, dynamics and analogue design, Arch. Biochem. Biophys. 433 (2005) 13-26.

[46] E.A. Taylor Ringia, P.C. Tyler, G.B. Evans, R.H. Furneaux, A.S. Murkin, V.L. Schramm, Transition state analogue discrimination by related purine nucleoside phosphorylases, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 7126-7127.

[47] Azevedo W.F.Jr, F. Canduri, D.M. Santos, J.H. Pereira, M.V. Dias, R.G. Silva, M.A. Mendes, L.A. Basso, M.S. Palma, D.S. Santos, Structural basis for inhibition of human PNP by immucillin-H, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309 (2003) 917-922.

Figure legends

Fig. 1. Chemical reaction catalyzed by hUP1.

Fig. 2. 12% SDS-PAGE analysis of total insoluble and soluble proteins. Expression of hUP1 after 36 h of cell growth after reaching an $OD_{600\text{ nm}}$ of 0.4 - 0.6 in TB medium without addition of IPTG. Lane 1, Protein Molecular Weight Marker (Fermentas); lane 2, insoluble *E. coli* Rosetta (DE3) [pET-23a(+)] (control) extract; lane 3, insoluble *E. coli* Rosetta (DE3) [pET-23a(+):UPP1] extract; lane 4, soluble *E. coli* Rosetta (DE3) [pET-23a(+)] (control) extract; lane 5, soluble *E. coli* Rosetta (DE3) [pET-23a(+):UPP1] extract.

Fig. 3. 12% SDS-PAGE analysis of pooled fractions from hUP1 purification steps. Lane 1, Protein Molecular Weight Marker (Fermentas); lane 2, crude extract; lane 3, SP Sepharose Fast Flow cation exchange elution.

Fig. 4. Intersecting initial velocity patterns for hUP1 with either Urd (A) or P_i (B) as the variable substrate. Each curve represents fixed-varying levels of the co-substrate.

Fig. 5. Dissociation constant for hUP1 with P_i (A) and with R1P (B) binary complex formation monitoring changes in intrinsic protein fluorescence. Insets represent the fit of double-reciprocal plots of the fluorescence data to an exponential growth equation.

Fig. 6. Proposed kinetic mechanism for hUP1.

Fig. 7. pH dependence of hUP1 kinetic parameters. Plots: (A) $\log k_{\text{cat}}$, (B) $\log k_{\text{cat}}/K_{\text{Pi}}$, and (C) $\log k_{\text{cat}}/K_{\text{Urd}}$.

Figure 1.

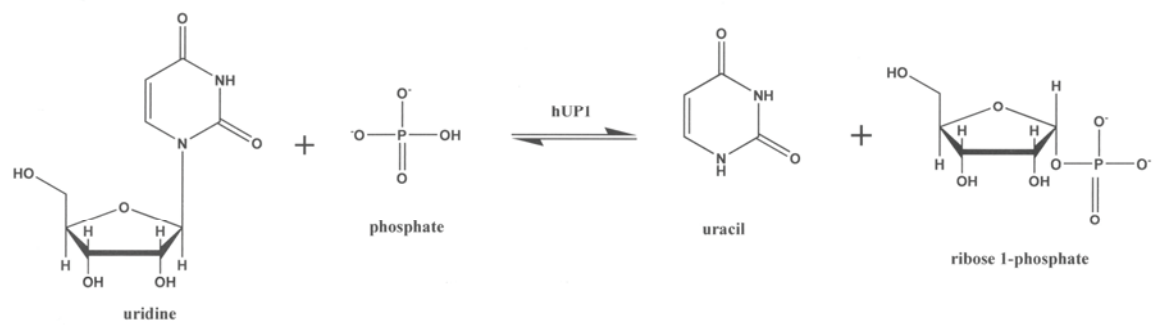


Figure 2.

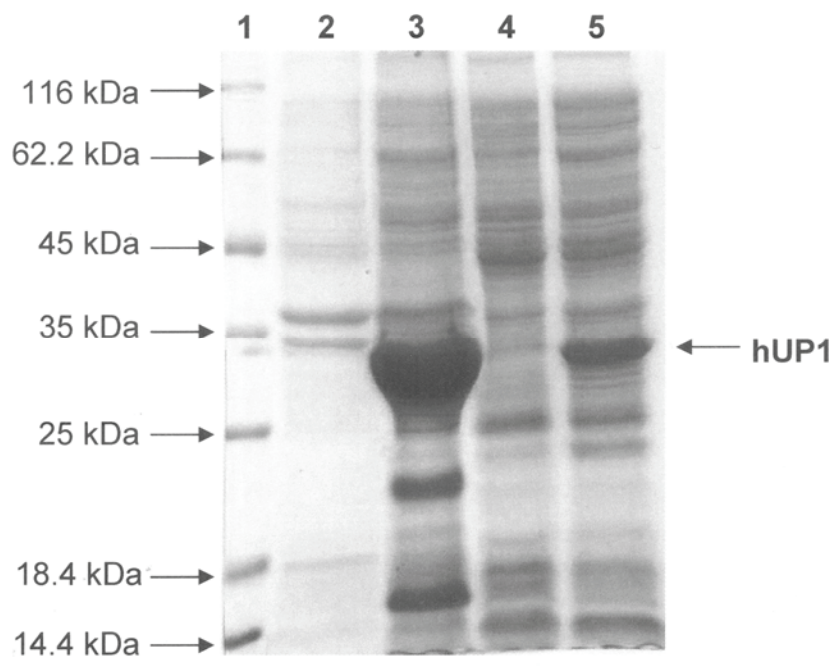


Figure 3.

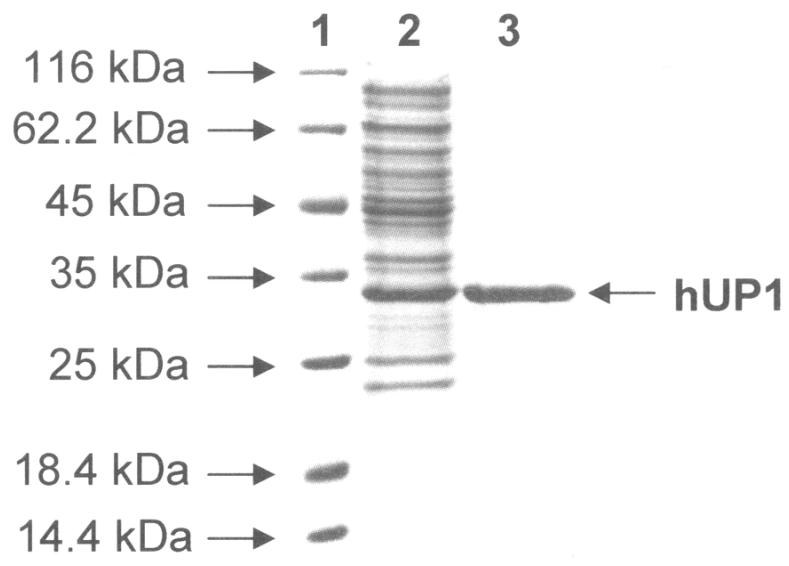


Figure 4.

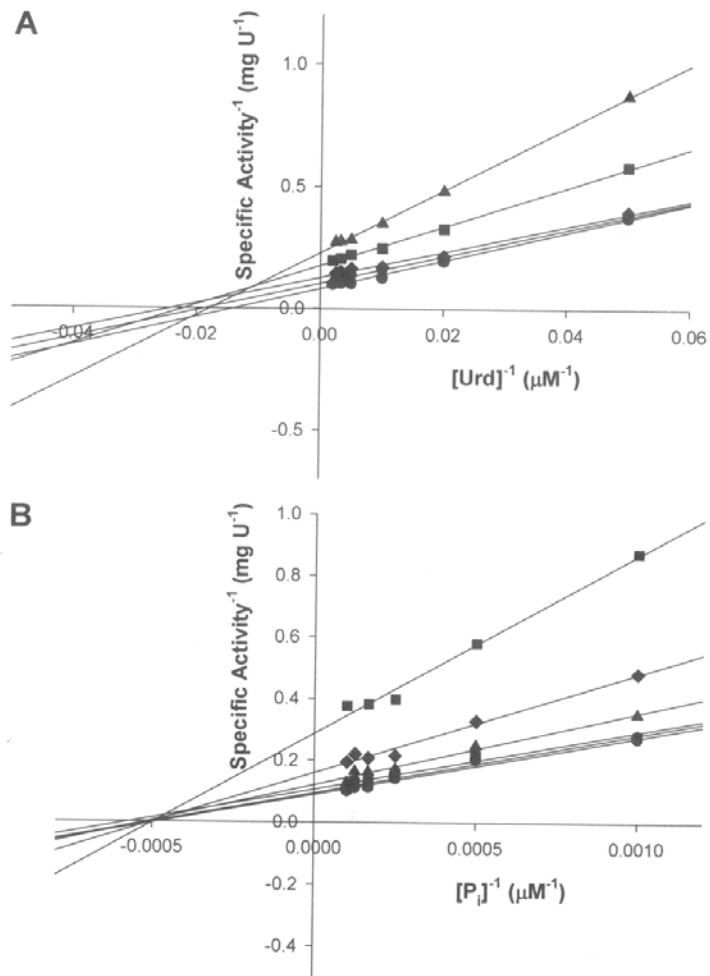


Figure 5.

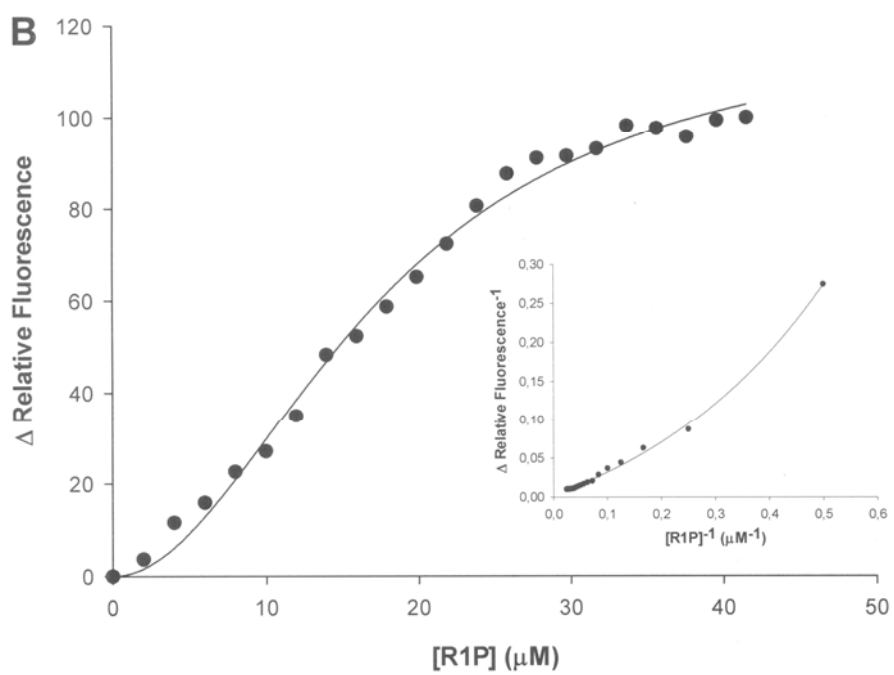
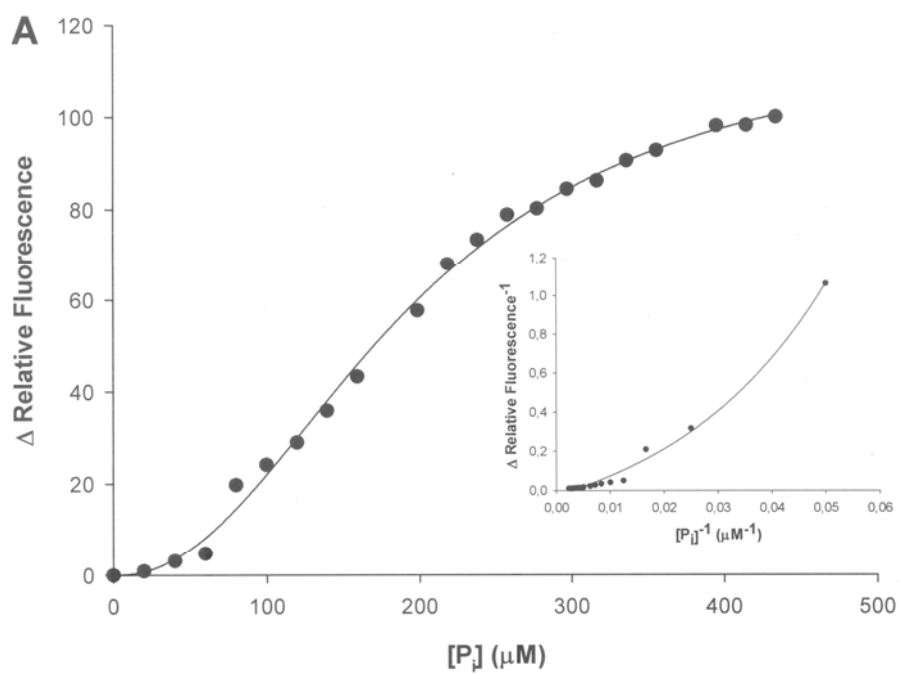


Figure 6.



Figure 7.

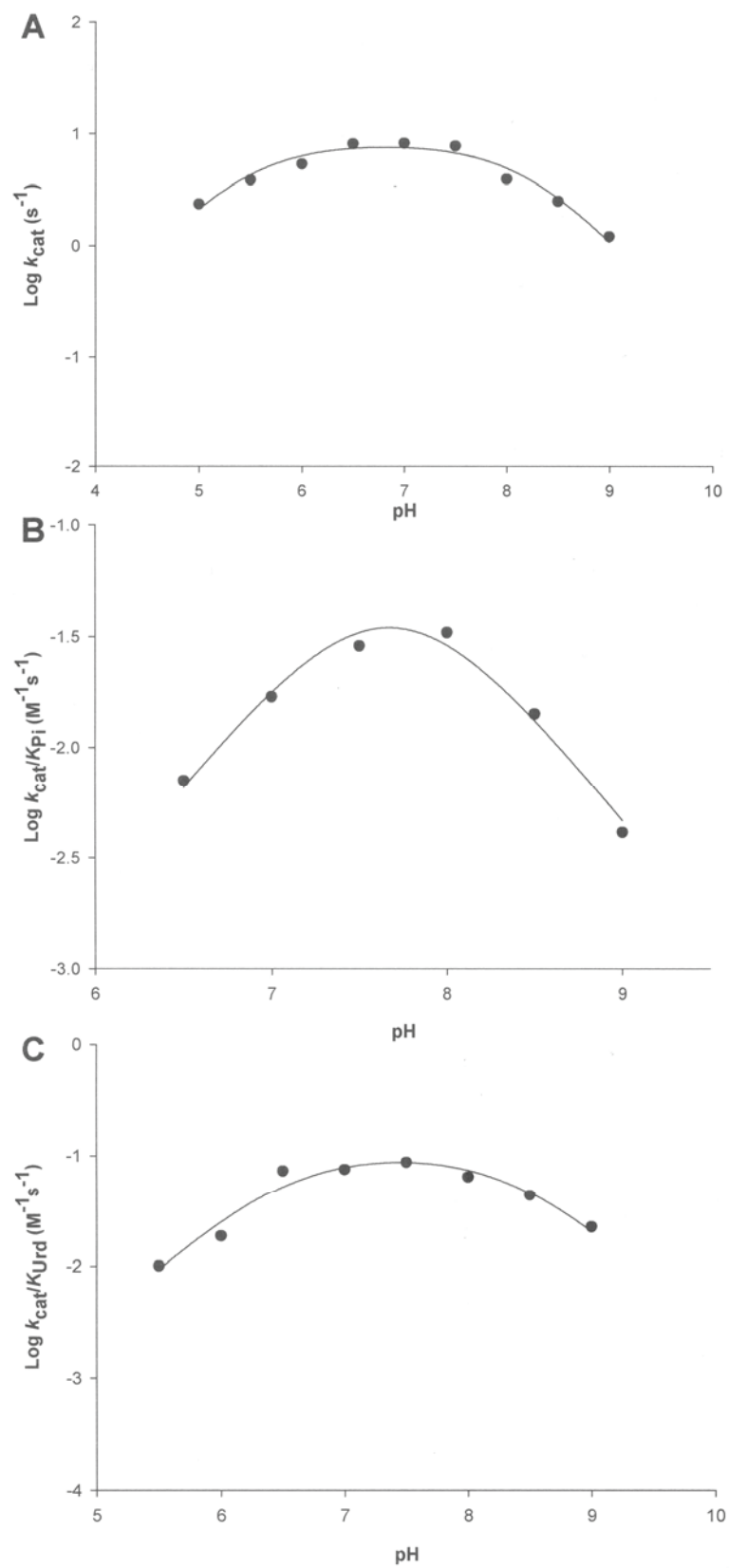


Table 1.

Purification of hUP1 from *E. coli* Rosetta (DE3). Typical purification protocol from 5 g wet cell paste (300 mL of culture).

Purification step	Total protein (mg)	Total enzyme activity (U)	Specific activity (U mg ⁻¹)	Purification fold	Yield (%)
Crude extract	180.3	367.5	2.04	1.0	100
SP Sepharose Fast Flow	20.8	159.9	7.70	3.8	43

Table 2Product inhibition patterns for hUP1.^a

Variable substrate	Product inhibitor	Inhibition type ^b	K_{is} (μM) ^c	K_{ii} (μM) ^d
Uridine	Uracil	NC	50 ± 7	618 ± 119
Uridine	R1P	NC	34 ± 7	2.16×10^6 ^e
P _i	Uracil	NC	137 ± 27	251 ± 20
P _i	R1P	C	494 ± 61	-----

^aAt 37°C and 100 mM Tris pH 7.4.^bNC = noncompetitive, C = competitive.^c K_{is} is the slope inhibition constant.^d K_{ii} is the intercept inhibition constant.^e This value was poorly defined due to a large SE value

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A importância da uridina fosforilase à quimioterapia do câncer advém do fato dela ser uma das enzimas responsáveis pela ativação ou degradação de alguns análogos quimioterápicos, como as 5-fluoropirimidinas.

A importância da uridina fosforilase na quimioterapia do câncer tem gerado um grande interesse no desenvolvimento de inibidores para essa enzima. Desse modo, os inibidores podem aumentar a efetividade quimioterápica dessas drogas pela prevenção de sua degradação e/ou toxicidade ao hospedeiro [el Kouni et al, 2000], assim como podem atuar separadamente inibindo parcialmente a via de salvamento de pirimidinas através da não reciclagem da base uracil.

Durante este trabalho foi possível realizar a amplificação do gene *UPP1*, a partir de cDNA obtido por RT-PCR de um RNA colorretal e a sua clonagem em vetor de expressão pET23a(+). Determinamos que a melhor condição de expressão solúvel para a proteína humana UP1 foi com a cepa de *E. coli* Rosetta(DE3), utilizando o meio Terrific Broth, à 30C° por 36h e sem indução com IPTG. A obtenção da proteína aparentemente homogênea foi através de apenas uma etapa cromatográfica utilizando uma coluna de troca catiônica, e sua identidade e massa molecular também foram determinados. Com a proteína homogênea, foi possível fazer sua parcial caracterização através de cinética enzimática, revelando-nos um mecanismo enzimático ordenado bi bi, onde o fosfato inorgânico se liga primeiro seguido da uridina, para formar o complexo ternário cataliticamente competente, com o uracil se dissociando primeiro seguido pela liberação de ribose-1-fosfato. Também foi possível a

determinação das constantes cinéticas verdadeiras (K_m , k_{cat} e V_{max}) assim como a influência do pH nesses parâmetros e os possíveis aminoácidos envolvidos na catálise e na ligação aos substratos, como visualizado na figura 8.

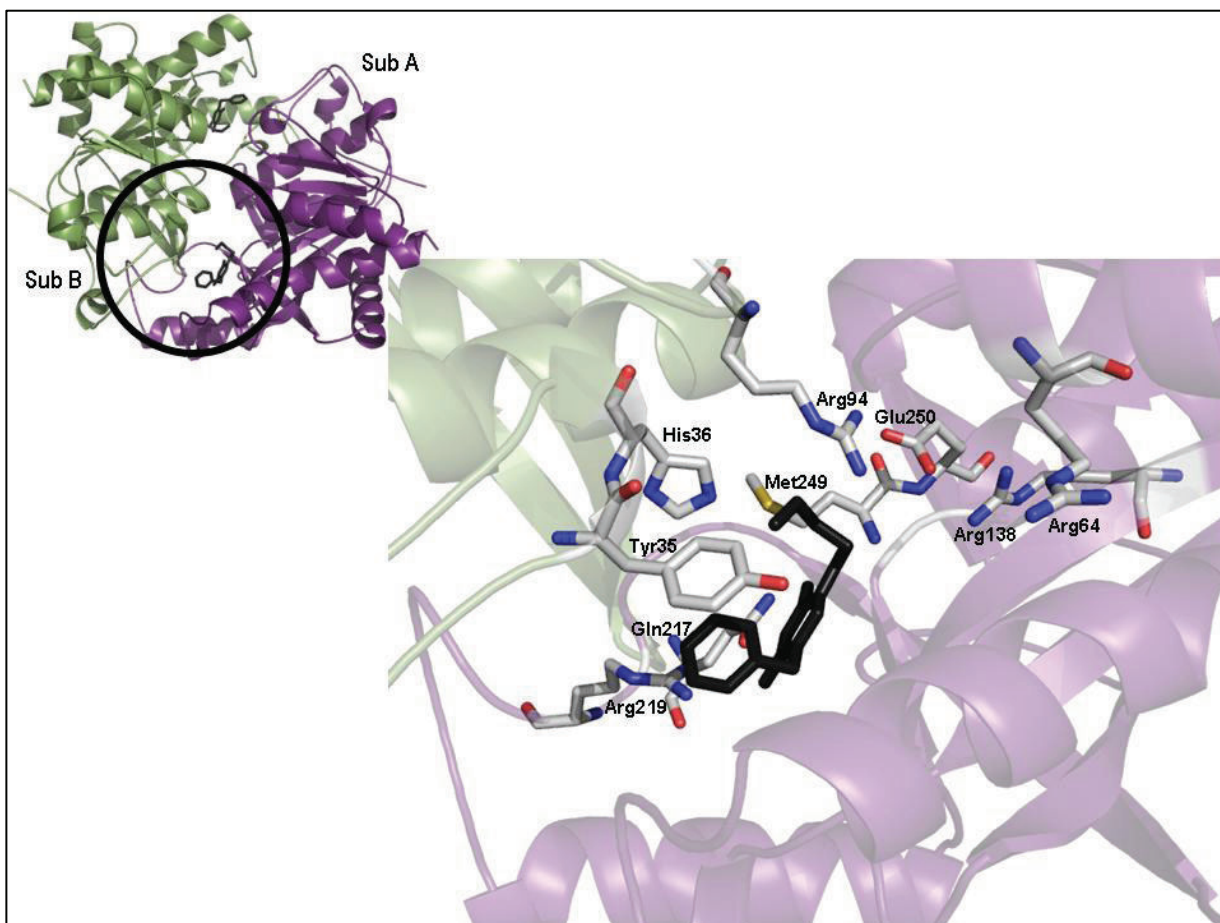


Figura 8. Ilustração das duas subunidades do dímero, mostrando a sítio ativo entre as duas subunidades. Ampliado estão os possíveis resíduos envolvidos na ligação e/ou catálise, como descrito no manuscrito. *Fonte: PDB, código de acesso 3EUF.*

Após uma análise mais acurada através de sua estrutura tridimensional, foi verificado que os resíduos de aminoácidos conservados no sítio ativo (Lys271 e Lys272) sugeridos durante a realização do manuscrito, na realidade seriam os resíduos Leu272 e Leu273. Deste modo, as Leu272 e Leu273 não

podem ser os resíduos candidatos ao pK_a de 8.2, como sugerido no manuscrito, pois estes resíduos não podem sofrer protonação ou deprotonação. Sendo assim, como sugerido no manuscrito, apenas o resíduo de Tyr35 envolvido na catálise.

Neste sentido, a realização deste projeto amplia o conhecimento da uridina fosforilase 1 com a finalidade de, futuramente, identificar inibidores naturais e/ou sintéticos, que permitam o posterior desenvolvimento de drogas para o tratamento quimioterápico do câncer.

Como perspectivas, temos a finalização de sua caracterização cinética, tentativas de cristalografia, *virtual screening* para a busca de inibidores e estes serão, então, analisados cineticamente e em células e animais. Serão igualmente realizadas as mesmas análises para a outra isoforma humana, UP2, para determinar suas semelhanças e suas diferenças, que poderão ser úteis para o desenho de inibidores seletivos.

ANEXO 1. TESTE DE PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA REOMBIANTE hUP1

Os testes de purificação foram realizados utilizando o sistema de purificação de Cromatografia Líquida de Rápida Eficiência (*FPLC*) ÄKTA (GE Healthcare) para o controle do fluxo, pressão da coluna cromatográfica, detecção de vários comprimentos de onda, pH, temperatura, controle de gradiente, aplicação e coleta de amostras. As células foram preparadas conforme descrito no manuscrito e para a determinação do protocolo final de purificação diversas colunas cromatográficas e perfis de corrida foram testados, a fim de se obter o melhor rendimento e a otimização do processo.

Para o teste inicial, com colunas de 1mL, foram utilizadas as colunas cromatográficas de troca catiônica (HiTrap SPFF e HiTrap SPXL). As duas trocas catiônicas apresentaram um padrão semelhante, sendo muito eficientes para separar a proteína alvo das proteínas “contaminantes” da própria *E. coli*. A coluna escolhida para os próximos testes foi a SPFF de 58mL e para a obtenção da proteína recombinante aparentemente homogênea vários perfis de corrida foram testados. Desta maneira, apenas uma coluna, a SPFF, foi utilizada para obter a proteína aparentemente homogênea, como descrito no manuscrito.

ANEXO 2. TESTES DE CRISTALIZAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA PROTEÍNA RECOMBINANTE hUP1

As tentativas de cristalização para determinação da estrutura tridimensional foram feitas pelo método de difusão de vapor por gota em suspensão, sob uma temperatura controlada de 20°C. Os kits utilizados para o screening inicial foram Hampton Crystal Screen e Crystal Screen 2 (Hampton Research). As gotas em suspensão foram preparadas misturando 2µL de uma solução contendo 2mg/mL da proteína recombinante hUP1 em 50mM Tris-HCl pH7.5 e 1µL da solução do reservatório.

Não foi verificada a formação de nenhum cristal de proteína em nenhuma das condições testadas. Serão realizadas algumas mudanças no protocolo para a tentativa de obter os cristais, visto que já existe a estrutura tridimensional da hUP1 publicada [Roosild et al, 2009], porém com uma seqüência de aminoácidos a mais no N-terminal; o que justifica o nosso interesse na obtenção dos cristais.

Estes estudos de determinação da estrutura tridimensional da proteína foram realizados no laboratório de Bioquímica LaBioQuest, na PUCRS, laboratório sob coordenação do Prof. Dr. Walter Figueira de Azevedo Jr. da PUCRS.

ANEXO 3. EXPRESSÃO DIFERENCIAL EM TECIDOS NEOPLÁSICOS

Para realizarmos estudos genéticos de expressão diferencial, optamos pela técnica de PCR em Tempo Real. Para isso, utilizamos amostras normais e tumorais de tecido colorretal que já estavam disponíveis por terem sido utilizadas em outro experimento pelo nosso grupo. Os tecidos obtidos já possuem aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS (CEP N°: 797/09, documento anexado) e a autorização por parte dos pacientes ou responsáveis pela assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido. Essas amostras, depois de removidas dos pacientes, foram armazenadas em solução para estabilização de RNA (RNA later™ RNA Stabilization Reagent, Ambion, Austin, TX, USA). Amostras pareadas de tecido normal e tumoral foram obtidas de 10 pacientes e pesavam aproximadamente 30 mg. Elas foram trituradas sob incubação em nitrogênio líquido e solubilizadas com tampão de lise fornecido pelo fabricante (Qiagen, Valencia, CA, USA). O tecido lisado foi transferido para colunas de afinidade cromatográfica e processado de acordo com o protocolo de isolamento do RNA fornecido. O RNA purificado foi eluído em 30µl de água livre de RNase e armazenado a -80°C.

A quantidade e a qualidade do RNA foram estimadas através de espectrofotometria e gel de agarose desnaturante respectivamente. As amostras que apresentaram uma OD igual ou maior que 1.6 e que apresentavam seu RNA íntegro (inspeção das bandas do RNA ribossomal 18s e 28s, através de eletroforese em gel de formaldeído em condições de desnaturamento corado com SYBRGold®) foram selecionadas.

A partir desses RNA selecionados, foi feita a transcrição reversa utilizando primers oligoméricos, dNTPs, MgCl₂ e a enzima derivada do vírus da leucemia mielóide aviária em 20uL de reação. O cDNA sintetizado foi armazenado a -20°C.

A técnica de PCR em Tempo Real foi utilizada para a quantificação relativa das enzimas UP1 e UP2 humanas em tecido tumoral e normal de cólon e reto a partir de material de arquivo mencionado anteriormente. O estudo foi baseado na comparação da expressão dos genes de interesse em tecidos tumorais em relação a tecidos normais (calibrador), utilizando o GAPDH como controle endógeno da reação. Uma placa de 96 poços foi preparada para cada gene de interesse, sendo que cada uma tinha 10 pares (Normal e Tumoral) de amostras diferentes, para a amplificação do gene alvo e para a amplificação do controle endógeno. Para cada amostra analisada foram preparadas duplicatas contendo 25ng de cDNA, produto resultante da transcrição reversa e uma mistura previamente preparada contendo tampão, dNTPs, MgCl₂ e enzima Taq (Universal PCR Master Mix TaqMan®, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), primers e sondas com o marcador de fluorescência para UP1 e UP2 humana (TaqMan® Gene Expression Assays, Assays-on-Demand, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), incluindo também, primers e sondas para GAPDH (controle endógeno). O volume final da reação para cada duplicata foi de 25µl.

As condições de temperatura para a realização da PCR em tempo real foram divididas em quatro estágios: primeiramente as misturas contendo as reações foram submetidas a uma temperatura de 30°C por 2 minutos, o segundo estágio seguiu a 95°C por 10 minutos, o terceiro estágio com 50 ciclos

a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. A expressão da UP1 e UP2 em tecido tumoral foi fornecida através de quantificação relativa utilizando o método $\Delta\Delta C_t$ como anteriormente descrito por Livak [Livak e Schittgen, 2001]. A calibragem do sistema e eficiência das reações foram calculados a partir de uma diluição seriada de cDNA tumoral e de tecido normal para UP1 e UP2 e GAPDH, devendo o valor do coeficiente de determinação (r^2) ser igual ou maior que 98% para ambos os alvos.

Os resultados obtidos por esses experimentos, tanto para UP1 como para UP2, não apresentaram diferença significativa de expressão destas enzimas entre as amostras normais e tumorais de colorretal. Esses experimentos foram repetidos para a confirmação dos resultados encontrados. O fato de não haver diferença de expressão gênica entre as amostras normais e tumorais não significa que não há diferença quanto à atividade da enzima; o que já é descrito pela literatura como elevada nos tecidos tumorais. Não se sabe ao certo quais os fatores que regulam a expressão da enzima e como ocorre esse aumento da atividade sem haver necessariamente o aumento da taxa de transcrição dessa proteína, poderia ser algum mecanismo de reciclagem, mas essa informação ainda não é bem descrita.

4. CONFIRMAÇÃO DA SUBMISSÃO DO MANUSCRITO

From: ees.yabbi.0.67c5f.b40559a3@eesmail.elsevier.com on behalf of ABB

Sent: Tue 1/19/2010 2:50 PM

To: Luiz Augusto Basso

Subject: Manuscript number assigned

Dear Dr Basso,

Your submission entitled "The kinetic mechanism of human uridine phosphorylase 1: towards the development of enzyme inhibitors for cancer chemotherapy" has been assigned the following manuscript number: ABBI-10-32.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author.

The URL is <http://ees.elsevier.com/yabbi/>.

Thank you for submitting your work to Archives of Biochemistry and Biophysics.

Kind regards,

Jon Stein

Journal Manager

Archives of Biochemistry and Biophysics

5. APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

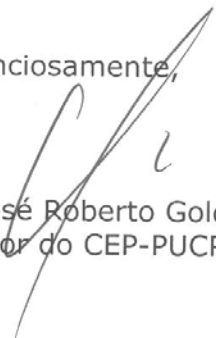
OF.CEP-797/09

Porto Alegre, 07 de julho de 2009.

Senhor Pesquisador,

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS em resposta à correspondência datada de 24 de junho de 2009, informa que tendo em vista que o material biológico foi coletado para esta mesma finalidade, havendo apenas uma ampliação do número de exames, que não haverá identificação do material nesta etapa, e da possibilidade de geração de novos conhecimentos relevantes para a área, é de parecer favorável à sua realização como emenda ao projeto original, com autorização do pesquisador responsável pelo projeto.

Atenciosamente,


Prof. Dr. José Roberto Goldim
Coordenador do CEP-PUCRS

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Luiz Augusto Basso
Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 - 3º andar - CEP: 90610-000
Sala 314 - Fone Fax: (51) 3320-3345
E-mail: cep@pucrs.br
www.pucrs.br/prppg/cep

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Balestri F, Barsotti C, Lutzemberger L, Camici M, Ipata PL. Key role of uridine kinase and uridine phosphorylase in the homeostatic regulation of purine and pyrimidine salvage in brain. *Neurochem Int.* 2007; 51(8):517-23. Epub 2007 Jun 22.

Cansey M. Uridine and cytidine in the brain: their transport and utilization. *Brain Res Rev.* 2006; 52(2):389-97.

Cao D, Nimmakayalu MA, Wang F, Zhang D, Handschumacher RE, Bray-Ward P, Pizzorno G. Genomic structure, chromosomal mapping, and promoter region analysis of murine uridine phosphorylase gene. *Cancer Res.* 1999; 59(19):4997-5001.

Cao D, Russell RL, Zhang D, Leffert JJ, Pizzorno G. Uridine phosphorylase (-/-) murine embryonic stem cells clarify the key role of this enzyme in the regulation of the pyrimidine salvage pathway and in the activation of fluoropyrimidines. *Cancer Res.* 2002; 62(8):2313-7.

Cao D, Pizzorno G. Uridine Phosphorylase: an important enzyme in pyrimidine metabolism and fluoropyrimidine activation. *Drugs of Today.* 2004; 40(5):431-443.

Cao D, Leffert JJ, McCabe J, Kim B, Pizzorno G. Abnormalities in uridine homeostatic regulation and pyrimidine nucleotide metabolism as a consequence of the deletion of the uridine phosphorylase gene. *J Biol Chem.* 2005; 280(22):21169-75. Epub 2005 Mar 16.

Caradoc-Davies TT, Cutfield SM, Lamont IL, Cutfield JF, Crystal structures of *Escherichia coli* uridine phosphorylase in two native and three complexed forms reveal basis of substrate specificity, induced conformation changes and influence of potassium, *J. Mol. Biol.* 2004; (337):337-354.

Connolly GP, Duley JA. Uridine and its nucleotides: biological actions, therapeutic potentials. *Trends Pharmacol Sci.* 1999; 20(5):218-25.

Darnowski JW, Handschumacher RE. Tissue-specific enhancement of uridine utilization and 5-fluorouracil therapy in mice by benzylacetyluridine. *Cancer Res.* 1985; 45(11 Pt 1):5364-8.

Grem JL. 5-Fluorouracil: forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development. *Invest New Drugs.* 2000; 18(4):299-313.

Instituto Nacional de Câncer, INCA. Endereço eletrônico: http://www1.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=1. Acessado em 19 de janeiro de 2010.

Johansson M. Identification of a novel human uridine phosphorylase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 307(1):41-6.

Krenitsky TA, Mellors JW, Barclay RK. Pyrimidine nucleosidases. Their classification and relationship to uric acid ribonucleoside phosphorylase. *J Biol Chem.* 1965; 240:1281-6.

Ko LJ, Prives C. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* 1996; 10(9):1054-72.

el Kouni MH, Goudgaon NM, Rafeeq M, Al Safarjalani ON, Schinazi RF, Naguib FN. 5-phenylthioacetyluridine: a potent and specific inhibitor of uridine phosphorylase. *Biochem Pharmacol.* 2000; 60(6):851-6.

Lashkov AA, Gabdoulkhakov AG, Shtil AA, Mikhailov AM. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of *Salmonella typhimurium* uridine phosphorylase complexed with 5-fluorouracil. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 2009; 65(Pt 6):601-3.

Leyva A, van Groeningen CJ, Kraal I, Gall H, Peters GJ, Lankelma J, Pinedo HM. Phase I and pharmacokinetic studies of high-dose uridine intended for rescue from 5-fluorouracil toxicity. *Cancer Res.* 1984; 44(12 Pt 1):5928-33.

Liu M, Cao D, Russell R, Handschumacher RE, Pizzorno G. Expression, characterization, and detection of human uridine phosphorylase and identification of variant uridine phosphorolytic activity in selected human tumors. *Cancer Res.* 1998; 58(23):5418-24.

Livak KJ, Schittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25(4):402-8.

Martin DS, Stolfi RL, Sawyer RC, Spiegelman S, Young CW. High-dose 5-fluorouracil with delayed uridine "rescue" in mice. *Cancer Res.* 1982; 42(10):3964-70.

Miyashita H, Takebayashi Y, Eliason JF, Fujimori F, Nitta Y, Sato A, et al. Uridine phosphorylase is a potential prognostic factor in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2002; 94(11):2959-66.

Pandolfo M, Araújo RA, Nascimento L, Goulart. Farmacogenoma do fluorouracil. Análise de polimorfismo no gene da diidropirimidina desidrogenase. *Infarma.* 2005; 17(3-4).

Pinedo HM, Peters GF. Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. *J Clin Oncol.* 1988; 6(10):1653-64.

Pizzorno G, Yee L, Burtness BA, Marsh JC, Darnowski JW, Chu MY, et al. Phase I clinical and pharmacological studies of benzylacetyluridine, a uridine phosphorylase inhibitor. *Clin Cancer Res.* 1998; 4(5):1165-75.

Pizzorno G, Cao D, Leffert JJ, Russell RL, Zhang D, Handschumacher RE. Homeostatic control of uridine and the role of uridine phosphorylase: a biological and clinical update. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1587(2-3):133-44.

Roosild TP, Castronovo S, Fabbiani M, Pizzorno G, Implications of the structure of human uridine phosphorylase 1 on the development of novel inhibitors for improving the therapeutic window of fluoropyrimidine chemotherapy, *BMC Struct. Biol.*; 2009 (16): 9-14.

Santos AMR, Ferreira, J. M. O., Oliveira, J. F. P., Duarte, K. S., Santos, M. O., Rebelo, M. S., Reis, R. S. Estimativa/ 2006 Incidencia de câncer no Brasil.

Shambaugh GE 3rd. Pyrimidine biosynthesis. Am J Clin Nutr. 1979; 32(6):1290-7.

Voet D, Voet J. Bioquímica. Porto Alegre: Artes médicas; 2006.

Zhang D, Cao D, Russell R, Pizzorno G. p53-dependent suppression of uridine phosphorylase gene expression through direct promoter interaction. Cancer Res. 2001; 61(18):6899-905.

Watanabe S, Hino A, Wada K, Eliason JF, Uchida T. Purification, cloning, and expression of murine uridine phosphorylase. J Biol Chem. 1995; 270(20):12191-6.

Watanabe S, Uchida T. Cloning and expression of human uridine phosphorylase. Biochem Biophys Res Commun. 1995; 216(1):265-72.

World Cancer Report 2008, acessado pela World Health Organization, WHO.
Endereço eletrônico:
<http://apps.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?sesslan=1&codlan=1&codcol=76&codcch=26>. Acessado em 19 de janeiro de 2010.