

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Charakterizácia dvoch nukleozid-*N*-ribohydroláz
z machu (*Physcomitrella patens*)**

BAKALÁRSKA PRÁCA

Autor:	Eva Hájková
Študijní program:	B1406 Biochemie
Študijný obor:	Biochemie
Forma štúdia:	Prezenčná
Vedúci práce:	Mgr. Martina Kopečná, Ph.D.
Termín odovzdania práce:	6.5.2013

Prehlasujem, že som predloženú bakalársku prácu vypracoval(a) samostatne za použitia citovanej literatúry.

V Olomouci dňa

.....

Eva Hájková

Týmto by som chcela poďakovať svojej školiteľke Mgr. Martine Kopečnej, Ph.D. za odborné a trpezlivé vedenie pri tvorbe tejto bakalárskej práce. Taktiež by som chcela poďakovať Mgr. Davidovi Kopečnému, Ph.D. za všestrannú pomoc pri plnení experimentálnej i teoretickej časti práce.

Bibliografická identifikácia:

Meno a priezvisko autora	Eva Hájková
Názov práce	Charakterizácia dvoch nukleozid- <i>N</i> -ribohydroláz z machu (<i>Physcomitrella patens</i>)
Typ práce	bakalárska
Pracovisko	Oddelenie biochémie proteínov a proteomiky, CRH, PrF UP
Vedúci práce	Mgr. Martina Kopečná, Ph.D.
Rok obhajoby	2013
Abstrakt	<p>Táto práca sa zaoberá purifikáciou a charakterizáciou 2 nukleozid-<i>N</i>-ribohydroláz z machu mechúrovky odstavajúcej <i>Physcomitrella patens</i> (PpNRH). Teoretická časť sa venuje literárnej rešerši, ktorá zahŕňa metabolizmus purínov a pyrimidínov v rastlinách a výskyt nukleozid-<i>N</i>-ribohydroláz v rozmanitých organizmoch. Experimentálna časť je zameraná na expresiu PpNRH1 génu v bunkách <i>E.coli</i> a purifikáciu príslušných rekombinantných proteínov PpNRH1 (WT) a mutantnej formy Y244A pomocou afinitnej chromatografie. Analýza molekulových vlastností ukázala, že WT sa vyskytuje prednostne ako dimér, aj keď malá časť je schopná tvoriť tetramér. Ďalej bola študovaná teplotná stabilita enzýmu a nakoniec substrátová špecifita oboch enzýmov s použitím niekoľkých purínových a pyrimidínových ribozidov, pre ktoré boli stanovené kinetické parametre K_m a V_{im}.</p>
Kľúčové slová	nukleozid- <i>N</i> -hydroláza, mechúrovka odstavajúca (<i>Physcomitrella patens</i>), purín, pyrimidín
Počet strán	45
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Eva Hájková
Title	Characterization of 2 nucleoside-N-ribohydrolases from moss (<i>Physcomitrella patens</i>)
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Protein Biochemistry and Proteomics, CRH, Faculty of Science, UP
Supervisor	Mgr. Martina Kopečná, Ph.D.
The year of presentation	2013
Abstrakt	<p>This thesis deals with purification and characterization of 2 nucleoside-<i>N</i>-ribohydrolase from moss named <i>Physcomitrella patens</i> (PpNRH). Theoretical part concerns literal research which includes metabolism of purines and pyrimidines in plants and occurrence of nucleoside-<i>N</i>-ribohydrolase in various organisms. The experimental part is focused on PpNRH1 gene expression in <i>E. coli</i> cells and purification of the recombinant proteins PpNRH1 (WT) and mutant Y244A by affinity chromatography. Analysis of the molecular properties showed that WT occurs priority as a dimer, while a small part is able to form a tetramer. There was also studied thermal stability of the enzyme and finally substrate specificity of both enzymes using several purine and pyrimidine ribosides, then have been established kinetic parameters K_m and V_{lim}.</p>
Keywords	nucleoside- <i>N</i> -ribohydrolase, <i>Physcomitrella patens</i> , purine, pyrimidine
Number of pages	45
Number of appendices	0
Language	Slovak

OBSAH

1 CIELE PRÁCE	8
2 ÚVOD	9
3 TEORETICKÁ ČASŤ	10
3.1 Modelový organizmus <i>Physcomitrella patens</i>	10
3.1.1 Životný cyklus <i>P. patens</i>	10
3.2 Metabolizmus purínov a pyrimidínov v rastlinách	11
3.2.1 Metabolizmus pyrimidínov	13
3.2.1.1 <i>De novo</i> syntéza pyrimidínov	13
3.2.1.2 Katabolizmus pyrimidínov	14
3.2.1.3 Recyklácia pyrimidínov	15
3.2.2 Metabolizmus purínov	16
3.2.2.1 <i>De novo</i> syntéza purínov	16
3.2.2.2 Katabolizmus purínov	18
3.2.2.3 Recyklácia purínov	19
3.3 Nukleozid- <i>N</i> -ribohydrolázy	19
3.3.1 Kinetické vlastnosti NRH	22
4 PRAKTICKÁ ČASŤ	24
4.1 Biologický materiál	24
4.2 Použité chemikálie	24
4.3 Prístrojové vybavenie	26
4.4 Metódy	27
4.4.1 Produkcia rekombinantného proteínu v <i>E.coli</i>	27
4.4.2 Extrakcia PpNRH1 a mutantnej formy Y244A	27
4.4.3 Purifikácia PpNRH1 a mutantnej formy Y244A	27
4.4.4 Gélová permeačná chromatografia	28
4.4.5 SDS-PAGE	28
4.4.6 Stanovenie obsahu proteínov	29

4.4.7 Stanovenie teplotnej stability	30
4.4.8 Stanovenie nukleozidázovej aktivity PpNRH	30
4.4.9 Testovanie substrátovej špecificity, stanovenie K_m a V_{max}	31
5 VÝSLEDKY	32
5.1 Molekulové vlastnosti PpNRH1	32
5.2 Stanovenie výslednej koncentrácie proteínov	34
5.3 Stanovenie teplotnej stability PpNRH1	34
5.4 Stanovenie substrátovej špecificity PpNRH1 a mutantnej formy Y244A	35
5.5 Stanovenie kinetických parametrov PpNRH1 a mutantnej formy Y244A	36
6 DISKUSIA	38
7 ZÁVER	41
8 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	42

1 CIELE PRÁCE

- Teoretická časť:

Vypracovanie literárnej rešerše k téme práce, ktorá zahrňuje:

- metabolizmus purínov a pyrimidínov v rastlinách,
- bakteriálne, protozoálne a rastlinné nukleozid-*N*-ribohydrolázy, výskyt, substrátová špecificita,
- reakčný mechanizmus nukleozid-*N*-ribohydroláz.

- Experimentálna časť:

Expresia génu v *E.coli*, extrakcia, purifikácia rekombinantného proteínu.

Stanovenie molekulovej hmotnosti PpNRH1 gélovou chromatografiou.

Meranie teplotnej stability a substrátovej špecificity WT - PpNRH1 a Y244A - PpNRH1.

2 ÚVOD

Purínový a pyrimidínový metabolizmus má zásadný význam pre rast a vývoj rastlín, pretože zodpovedajúce nukleotidy predstavujú stavebné kamene nukleových kyselín, hlavné energetické nosiče, komponenty podstatných koenzýmov ako napríklad NAD a prekursorov alkaloidov a cytokínov. Kľúčový enzým spojený s metabolizmom purínov a pyrimidínov je nukleozid-*N*-ribohydroláza (NRH) alebo tiež nukleozidáza (NH), ktorá katalyzuje hydrolytickej štiepenie nukleosidov na zodpovedajúcu bázu a ribózu. Nukleozid-*N*-ribohydrolázy boli dobre charakterizované v mikroorganizmoch, napríklad v *Trypanosoma*, *Crithidia* a *Leishmania*, ale je pomerne málo poznatkov o ich príspevku v rastlinnom metabolizme.

Jedným z najlepšie charakterizovaných druhov machu je *Physcomitrella patens*. Využíva sa ako modelový organizmus nižších rastlín. *Physcomitrella patens* obsahuje 3 gény pre NRH (PpNRH1 - 3). Nukleozid-*N*-ribohydrolázy sú lokalizované v cytosóle. Poznávacím znakom nukleozidáz je aspartátový cluster sekvencie DXDXXXDD, ktorý sa nachádza poblíž N-konca polypeptidového reťazca a tvorí aktívne centrum týchto enzýmov.

Cieľom tejto práce je charakterizácia PpNRH1 (wild type - WT) a mutantnej formy Y244A a stanovenie enzýmovej aktivity a substrátovej špecificity s vybranými purínovými i pyrimidínovými ribozidmi ako potenciálnymi substrátmi.

3 TEORETICKÁ ČASŤ

3.1 Modelový organizmus *Physcomitrella patens*

V tejto práci bol použitý ako modelový organizmus mach mechúrovka odstávajúca *Physcomitrella patens*. Je to jednodomá rastlina, ktorá patrí do rodiny *Funariaceae*. Vyskytuje sa predovšetkým na Severnej pologuli, v miernom podnebnom pásme, rastie v pôde bohatej na výživné látky (Frahm and Frey, 2007).

V porovnaní so semennými rastlinami má *P. patens* niekoľko výhod, napríklad má zaujímavú fylogenetickú pozíciu medzi riasami a semennými rastlinami a väčšinu svojho života strávi v haploidnom stave, ktorý umožňuje použitie experimentálnych techník podobné tým, ktoré sa používajú u mikroorganizmov a kvasiniek (Cove, 2000).

Physcomitrella patens je jedným z mála známych mnohobunkových organizmov s vysokou účinnosťou homológnej rekombinácie, takže môžu byť vytvorené knockout mutanty. Využívajú sa na štúdium funkcií génov a v kombinácii so štúdiami u vyšších rastlín, ako je *Arabidopsis thaliana*, môžu byť použité k štúdiu molekulárneho vývoja rastlín (Schaefer, 2002).

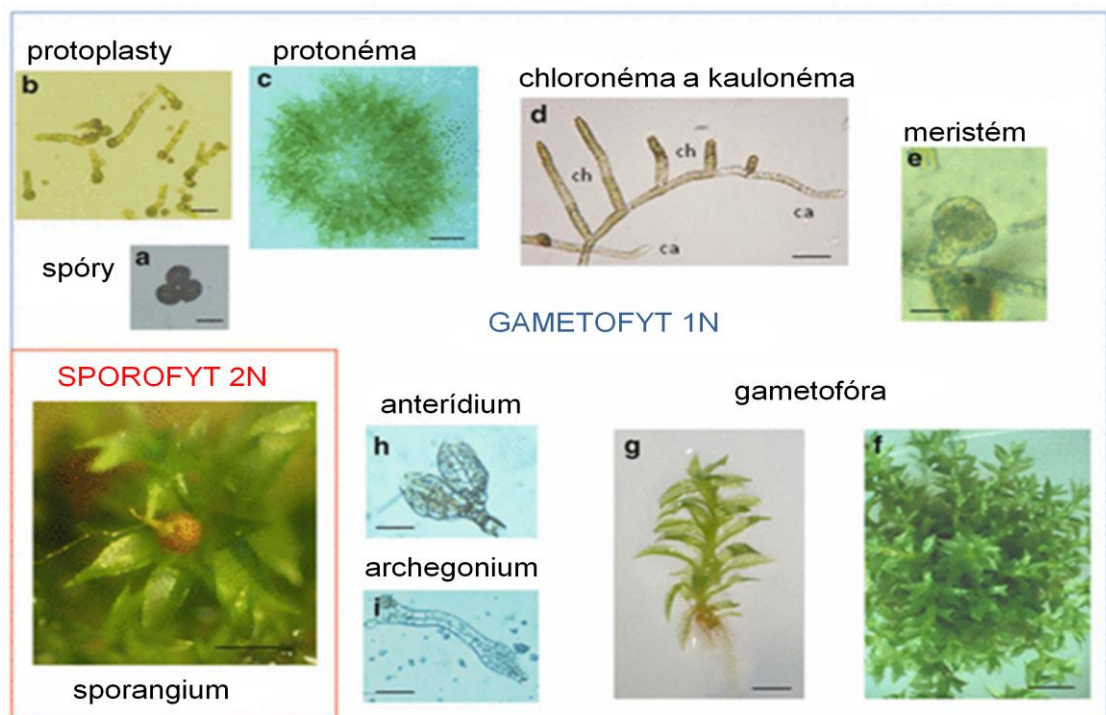
Genóm *P. patens* bol kompletne osekvenovaný v roku 2006, ako prvý genóm z oddelenia machov. Obsahuje asi 480 Mbp, ktoré sú rozložené v 27 chromozómoch. Sekvencia obsahuje 35 938 predpovedaných a dokumentovaných génových modelov. (Rensing et al., 2008).

Physcomitrella patens obsahuje 3 známe nukleozidribohydrolázy - PpNRH 1-3. Všetky tri formy sa pravdepodobne nachádzajú v cytosóle. PpNRH1 je najaktívnejším enzýmom a reťazec obsahuje 334 aminokyselín (36,08 kDa). PpNRH2 má v reťazci 329 aminokyselín (35,46 kDa) a PpNRH3 má 349 aminokyselín (37,67 kDa). PpNRH 1 a 2 obsahujú sekvenčný motív DXDXXXDD typický pre NRH, ale posledná PpNRH3 sa od nich odlišuje motívom DXXXXXDD a keďže sa zatiaľ nepodarilo exprimovať gén PpNRH3 a žiadne fenotypové zmeny neboli preukázané medzi WT a mutantom, tak sa predpokladá, že v štádiu sporofytu nemá PpNRH3 výraznú fyziologickú úlohu (Turčinov, 2011).

3.1.1 Životný cyklus *P. patens*

Rovnako ako u všetkých machorastov, aj životný cyklus *Physcomitrella patens* sa vyznačuje striedaním dvoch generácií: pohlavná generácia - haploidný gametofyt, ktorý produkuje pohlavné bunky gamety a nepohlavná generácia - diploidný sporofyt, ktorého úlohou je priniesť haploidné výtrusy (obrázok 1). Gametofyt je charakteristický

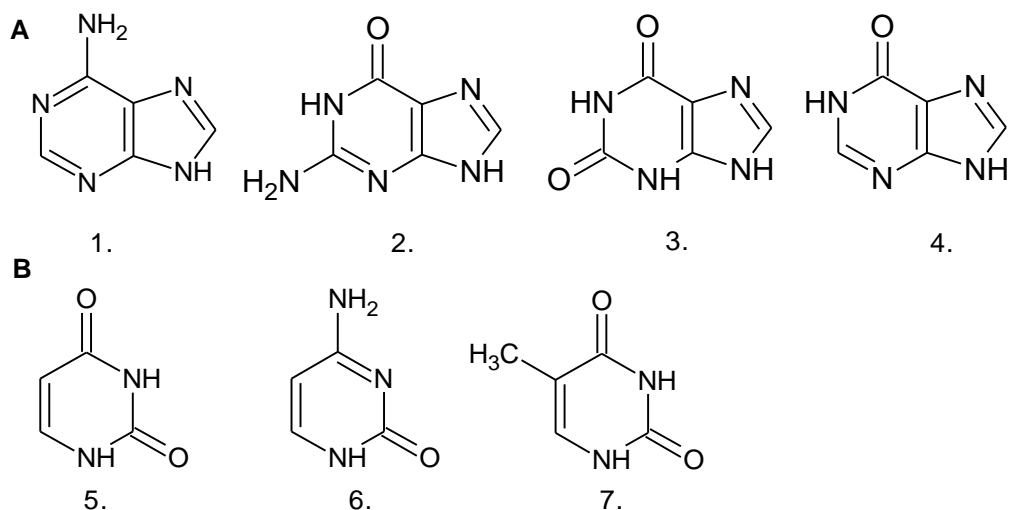
dvoma odlišnými vývojovými štádiami. Protonéma, ktorá vytvára cestu apikálneho rastu, prechádza do vláknitej siete dvoch typov buniek- chloronemálne a kaulonemálne bunky. Gametofóra, druhé vývojové štádium, sa odlišuje od jednoduchého apikálneho systému kaulinárnym rastom. *Physcomitrella* je jednodomá rastlina, samčie pohlavné bunky, spermatozoidy, sú vytvárané v plemeníčku (anterídiu) a samičie pohlavné bunky, oosféry, sú produkované zárodočníku (archegóniu) na rovnakej gametofóre. Za prítomnosti vody dôjde k oplodneniu, z diploidnej zygóty mitoticky vznikne zárodok, z ktorého sa vytvorí stopka s výtrusnicou. Tá predstavuje sporofyt a je trvalo spojená s gametofytom (Cove and Knight, 1993).



Obrázok 1. Životný cyklus *Physcomitrella patens*. Spóry (a) a regenerované protoplasty (b) vedú k tvorbe protonémy (c) formovanej z chloronemálnych a kaulonemálnych buniek (d). Prechod na rast samotnej rastliny iniciuje diferenciácia meristematických buniek (e), ktoré sa ďalej vyvíjajú na listové výhonky (g, f). Anterídium (h) a archegonium (i) sa nachádzajú na vrcholku gametofóry. Oplodnenie za prítomnosti vody prebieha v archegoniu a z oplodnených buniek sa vyvinie diploidné sporangium. (Obrázok prevzatý z Bonhomme et al., 2013).

3.2 Metabolizmus purínov a pyrimidínov v rastlinách

Z chemického hľadiska sú nukleotidy nízkomolekulárne látky tvorené nukleozidmi, na ktorých je naviazaná jedna alebo viacero fosfátových skupín. Nukleozidy sú tvorené pyrimidinovými alebo purínovými dusíkatými bázami, ktoré sú prepojené cez *N*-glykozidovú väzbu s atómom C₁ cukrového zvyšku pentózy (ribózy alebo deoxyribózy). Zástupcami purínových báz je adenín, hypoxantín, xantín a guanín. Medzi pyrimidinové báze patria cytozín, uracil a tymín (obrázok 2).



Obrázok 2. Štruktúrne vzorce (A) purínových a (B) pyrimidínových báz. Zobrazené bázy sú: 1 - adenín, 2 - guanín, 3 - xantín, 4 - hypoxantín, 5 - uracil, 6 - cytozín, 7 - tymín.

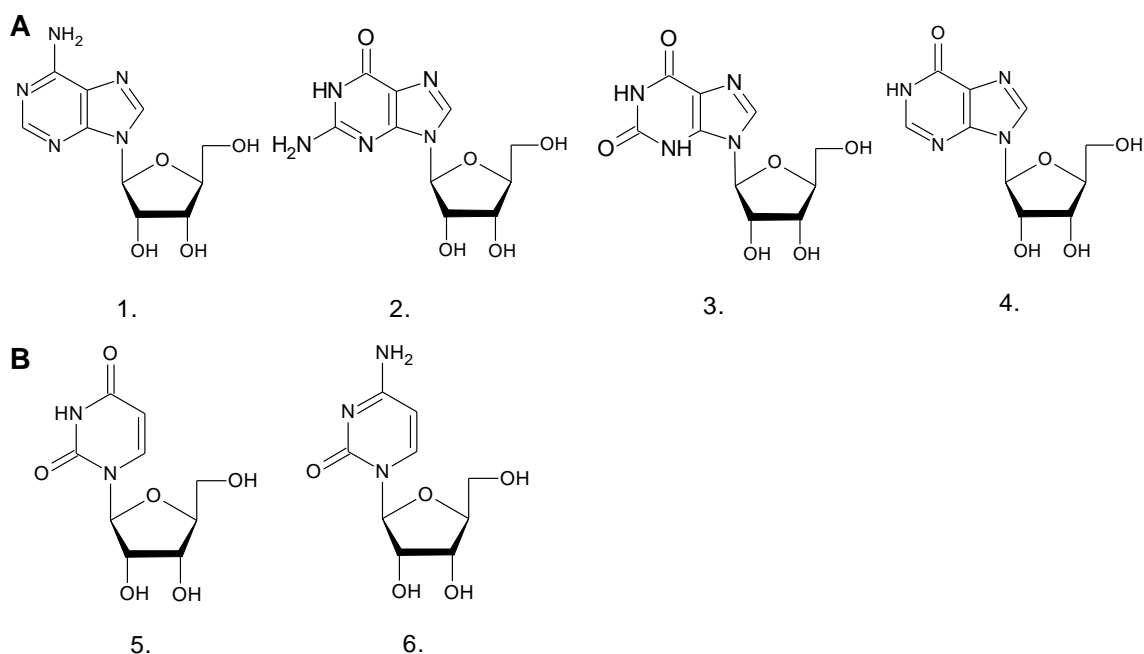
Nukleotidy sú jedným z najdôležitejších bunkových komponentov v rastline. Podporujú primárny a sekundárny metabolizmus, génovú expresiu a väčšinu základných bunkových a biochemických procesov dôležitých pre rast a vývoj rastliny. Regulujú syntézu aminokyselín, fosfolipidov, glykolipidov, jednoduchých cukrov či polysacharidov. Počas základných procesov fotosyntézy a dýchania purínový nukleotid ATP je produkovaný reakciou ATP a fosfátu ako hlavný trifosfát pre všeobecné energetické procesy.

Purínové a pyrimidínové nukleotidy majú významnú úlohu pri skladovaní a využívaní genetickej informácie ako stavebného bloku jadrovej DNA, zložky transkriptov a pri syntéze organel a proteínov. Taktiež slúžia ako prekurzory vitamínov skupiny B - kyseliny listovej, riboflavínu a thiamínu a sú súčasťou koenzýmov - nikotínamidadenín dinukleotidu (NAD), flavinadenín dinukleotidu (FAD) a S-adenosylmetionínu (SAM) (Hanson and Gregory, 2002, Herz et al., 2000).

Adenozinový derivát ATP slúži ako univerzálny prenášač energie do ďalších metabolických dejov a využíva sa ako prekurzor pre syntézu mnohých makromolekúl. Ďalší derivát, AMP, aktivuje aminokyseliny pri syntéze proteínov, ADP - aktivované monosacharidy sú zas potrebné pri syntéze polysacharidov ako je škrob alebo celulóza (Song et al., 2006). Cyklický AMP (cAMP) je druhý posol, ktorý prenáša signál od hormónu do vnútra bunky, viacnásobne tento signál zosilňuje, a tým ovplyvňuje transkripciu génov. Pôsobí obvykle ako aktivátor proteinkináz (konkrétne proteinkinázy A), ktorá fosforyluje cieľové proteíny ovplyvňujúce množstvo metabolických funkcií.

V rastlinách pyrimidínové deriváty UTP, UDP a UMP slúžia ako kosubstráty alebo energeticky bohaté prekuzory pri metabolizme sacharidov a syntéze celulózy a zložiek matrixu v bunkovej stene.

Metabolizmus nukleotidov zahrňuje *de novo* syntézu z jednoduchých molekúl, recykláciu z už existujúcich nukleozidov, báz alebo nukleových kyselín a degradáciu na jednoduché molekuly, takže tým poskytujú stavebné zložky, ako napríklad uhlík, dusík či fosforečný anión, pre syntézu iných molekúl.



Obrázok 3. Štruktúrne vzorce (A) purínových a (B) pyrimidínových ribonukleozidov. Zobrazené bázy sú: 1 - adenosín, 2 - guanosín, 3 - xantosín, 4 - inosín, 5 - uridín, 6 - cytidín.

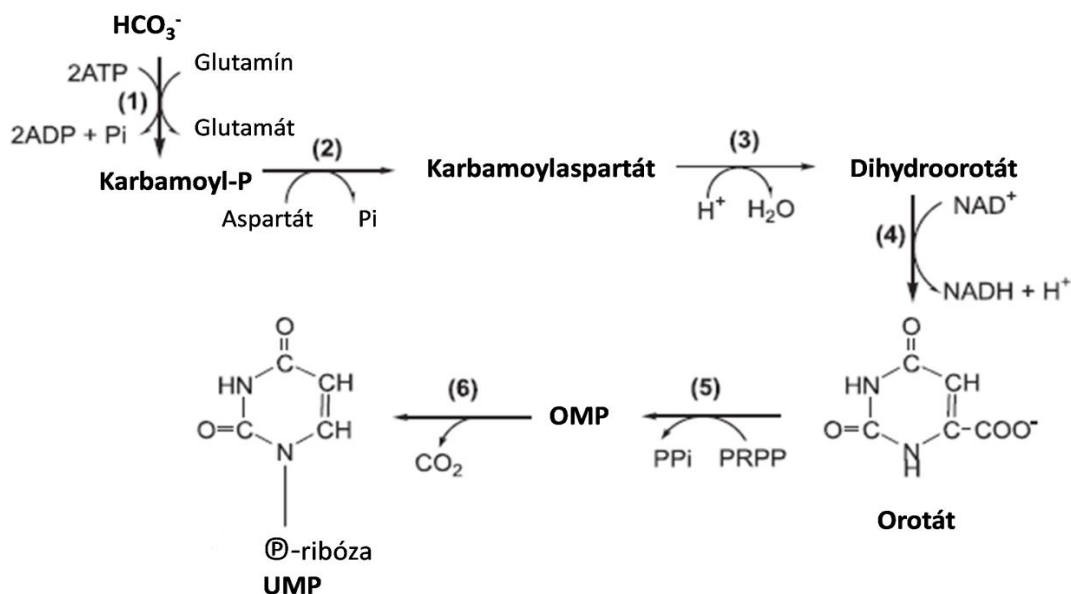
3.2.1 Metabolizmus pyrimidínov

3.2.1.1 *De novo* syntéza pyrimidínov

De novo biosyntéza pyrimidínu je definovaná ako tvorba uridin-5-monofosfátu (UMP) z karbamoylfosfátu, aspartátu a 5-fosforibosyl-1-pyrofosfátu (PRPP). Táto syntéza je označovaná aj ako orotátová dráha. Pozostáva zo šiestich enzymatických krokov, ktoré sú znázornené na obrázku 4.

Karbamoylfosfátsyntetáza (CPSáza) sa podieľa na produkcii karbamoylfosfátu z kombinácie uhličitanu, amoniaku alebo amidoskupiny z glutamínu a 2 ATP. Karbamoylfosfát je využívaný nielen pri *de novo* syntéze pyrimidínu, ale aj ako prekuzor syntézy arginínu. V nasledujúcom kroku katalyzovanom aspartáttranskarbamoylázou (ATCáza) nastáva kondenzácia karbamoylfosfátu s aspartátom a vzniká karbamoylaspartátu, ktorý je ďalej cyklizovaný na pyrimidínový

kruh dihydroorotátu. Táto reakcia je katalyzovaná enzýmom dihydroorotázou (DHOáza). Následne sa dihydroorotát oxiduje dihydroorotátdehydrogenázou na orotát. Potom orotát reaguje s PRPP v prítomnosti orotátfosforibosyltransferázy na orotidin-5'-fosfát, ktorý sa potom dekarboxyluje za vzniku UMP pomocou orotidylátdekarboxylázy (Zrenner et al., 2006).



Obrázok 4. De novo biosyntéza pyrimidínových nukleotidov. Uvedené enzýmy sú: (1) karbamoylfosfátsyntetáza, (2) aspartáttranskarmamoyláza, (3) dihydroorotáza, (4) dihydroorotátdehydrogenáza, (5) - (6) UMP syntéza (orotátfosforibosyltransferáza a orotidin-5'-fosfátdekarboxyláza). (Obrázok upravený podľa Stasolla et al., 2003).

3.2.1.2 Katabolizmus pyrimidínov

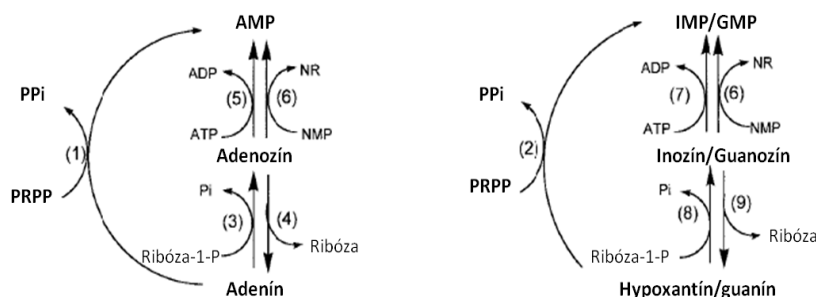
Pyrimidínové nukleotidy sú odbúrané na pyrimidínové nukleozidy odstránením fosfátovej skupiny v reakcii katalyzovanej 5' -nukleotidázou, napríklad uridinmonofosfáthydrolázou (UMPH). Tieto nukleozidy sú následne prevedené na voľné pyrimidínové bázy v reakcii katalyzovanej príslušnou nukleozidázou, napríklad uridinnukleozidázou (URH). Ďalej je cytidín pomocou cytidíndeaminázy deaminovaný na uridín. Niektorá z nukleozidáz hydrolyzuje deoxytymidín a uridín. Takto vzniknutý tymín a uracil sa v prítomnosti NADPH redukujú dihydrouracildehydrogenázou za vzniku 5,6-dihydrotymínu resp. 5,6-dihydrouracilu. V ďalšom kroku je redukovaný pyrimidínový kruh rozložený pomocou dihydropyrimidínamidohydrolázy za vzniku β -ureidoisobutyrovej, respektíve β -ureidopropionovej kyseliny. β -ureidopropionáza ich deaminuje a dekarboxiluje na β -aminoisobutyrát, resp. β -alanín (Zrenner et al., 2006). Schéma katabolizmu pyrimidínu je na obrázku 7.

3.2.1.3 Recyklácia pyrimidínov

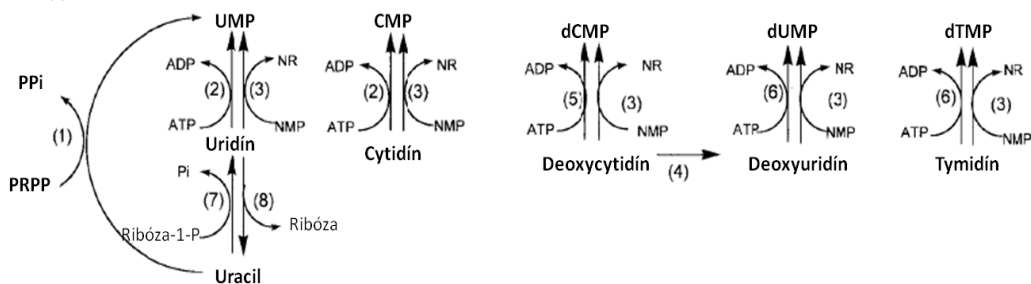
Ako už bolo uvedené, nukleotidy môžu byť katabolizované na pyrimidínové nukleozidy a voľné bázy postupným pôsobením 5' -nukleotidázy (napr. UMPH) a nukleozidázy (napr. URH). Pretože *de novo* syntéza nukleotidov je energeticky veľmi náročná, bunky si vyvinuli mechanizmus pre opakované využitie predpripravených nukleozidov a nukleobáz prostredníctvom recyklačných reakcií (známych ako „salvage pathway“).

Nukleozidy v rastlinách môžu byť priamo fosforylované na nukleotidy zodpovedajúcimi nukleozidkinázami (uridínkináza (UK)). Pomocou uracilfosforibosyltransferázy (UPRT) môže byť uracil ako jediný z pyrimidínových báz prevedený priamo na UMP (Zrenner et al., 2006). Bolo preukázané, že monodoménový gén, nazývaný UPP, kóduje funkčný UPRT enzým, zatiaľ čo dvojdóménové enzýmy, obsahujúce UK a UPRT domény, nevykazujú UPRT aktivitu (Mainquet et al., 2009), ale len UK aktivitu (Chen and Thelen, 2011). Schéma recyklačných reakcií pyrimidínu je na obrázku 5.

A) Recyklácia purínu



B) Recyklácia pyrimidínu



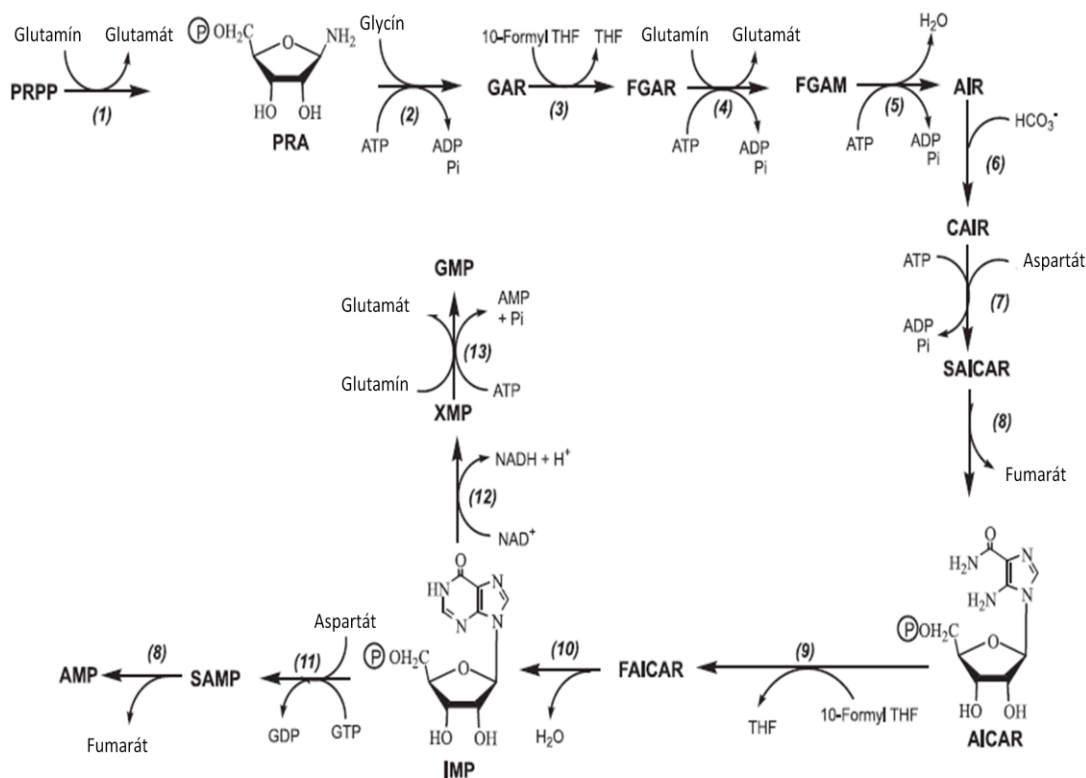
Obrázok 5. Recyklačné reakcie (A) purínových a (B) pyrimidínových báz a nukleozidov v rastlinách. Uvedené enzýmy sú: (A)-(1) adenínfosforibosyltransferáza, (2) hypoxantín-guanínfosforibosyltransferáza, (3) adenozínfosforyláza, (4) adenozín-nukleozidáza, (5) adenozínkináza, (6) nešpecifická nukleozidfosfotransferáza, (7) inozín-guanozínkináza, (8) inozín-guanozínfosforyláza, (9) inozín-guanozínnukleozidáza. (B)-(1) uracilfosforibosyltransferáza, (2) uridín/cytidínkináza, (3) nešpecifická nukleozidfosfotransferáza, (4) deoxycytidindeamináza, (5) deoxycytidínkináza, (6) tymidínkináza, (7) uridínfosforyláza, (8) uridínnukleozidáza. (Obrázok prevzatý z Stasolla et al., 2003).

3.2.2 Metabolizmus purínov

3.2.2.1 *De novo* syntéza purínov

De novo biosyntéza purínu prebieha u rastlín z malých molekúl, ako sú aminokyseliny glycín, glutamín a aspartát, ďalej z 5-fosforibosyl-1-difosfátu (PRPP), 10-formyl-tetrahydrofolátu (10F-THF) a oxidu uhličitého. Biosyntéza začína tvorbou 5-fosforibosylaminu (PRA) tým, že amidová skupina z glutamínu je prenesená na PRPP. Táto reakcia je katalyzovaná PRPP-amidotransferázou (obrázok 6).

GAR-syntetáza katalyzuje tvorbu glycínamidoribonukleotidu (GAR). Pri tejto reakcii je potrebná prítomnosť ATP. GAR je potom formylovaný pomocou GAR-transformylázy za účasti 10F-THF a vznikne formylglycínamidribonukleotid (FGAR). Ďalší krok je katalyzovaný formylglycínamidinribonukleotidsyntetázou (FGAM-syntetáza), spotrebovávajúca ATP a glutamín a vedie k tvorbe formylglycínamidinribonukleotid (FGAM). Nasleduje uzavretie cyklu, pričom sa spotrebuje ďalšia molekula ATP. Tak vznikne 5-aminoimidazolribonukleotid (AIR) katalyzovaný AIR-syntetázou. K vybudovaniu druhého cyklu purínového skeletu sú vložené CO_2 , aspartát a druhá molekula 10F-THF. AIR je karboxylovaný molekulou CO_2 . Túto reakciu katalyzuje AIR-karboxyláza a vzniká 4-karboxyaminoimidazolribonukleotid (CAIR). Pridaním aspartátu a ďalšej molekuly ATP za katalýzy SAICAR-syntetázou je vytvorený N-sukcinyl-5-aminoimidazol-4-karboxamid-ribonukleotid (SAICAR). Pomocou adenylosukcinátlyázy sa uvoľní fumarát a vytvorí sa 5-aminoimidazol-4-karboxamid-ribonukleotid (AICAR). Posledné dva kroky sú katalyzované jedným bifunkčným enzýmom AICAR-transformylázou / IMP-cyklohydrolázou. Posledný uhlík z purínového cyklu je prenesený z 10F-THF. Vzniká 5-formaminoimidazol-4-karboxamid-ribonukleotid (FAICAR), ktorý je potom dehydratovaný a vzniká inosinmonofosfát (IMP).



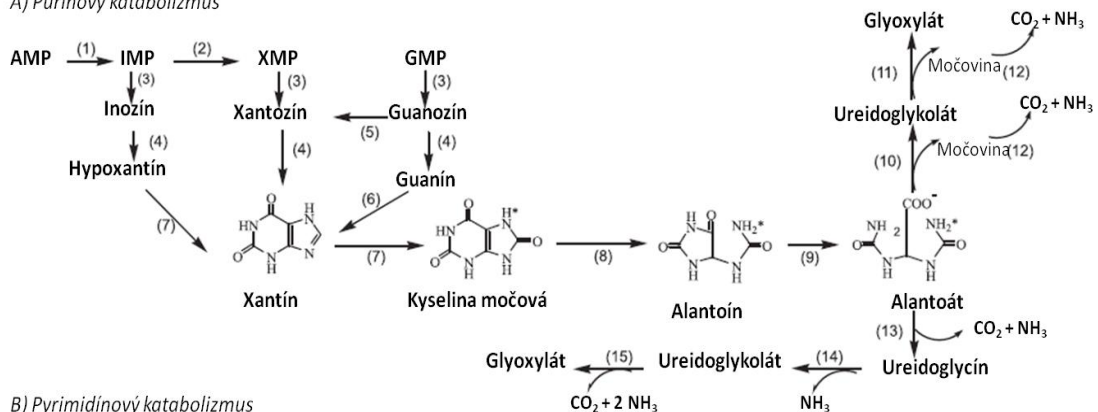
Obrázok 6. De novo biosyntéza purínových nukleotidov. Metabolity: PRPP - 5-fosforibosyl-1-difosfát, PRA - 5-fosforibosylamín, GAR - glycínamidribonukleotid, FGAR - formyl- glycínamidribonukleotid, FGAM - formylglycínamidinribonukleotid, AIR - 5-amino- imidazolribonukleotid, CAIR - 4-karboxyaminoimidazolribonukleotid, SAICAR - N-sukcínyl-5-aminoimidazol-4-karboxamid-ribonukleotid, AICAR - 5-aminoimidazol-4-karboxamidribo nukleotid, FAICAR -5-formaminoimidazol-4-karboxamid-ribonukleotid, SAMP - adenylosukcinát, XMP - xantosinmonofosfát, IMP - inosinmonofosfát, AMP - adenosin- monofosfát, GMP- guanosinmonofosfát. Enzyémy: (1) PRPP-amidotferasa, (2) GAR-syntetasa, (3) GAR-transformylasa, (4) FGAM-syntetasa, (5) AIR-syntetasa, (6) AIR-karboxylasa, (7) SAICAR-syntetasa (8) adenylosukcinátlyasa, (9) AICAR-transformylasa, (10) IMP-cyklohydrolyasa, (11) SAMP-syntetasa, (12) IMP-dehydrogenasa, (13) GMP-syntetasa. (Obrázok upravený podľa Stasolla et al. 2003).

Po vzniku IMP sa biosyntéza rozdeľuje na dve vetvy (obrázok 5). Z jednej vzniká adenosínmonofosfát (AMP) a z druhej cez xantosínmonofosfát (XMP) vzniká guanosínmonofosfát (GMP). AMP je syntetizovaný nahradením karboxylovej skupiny na uhlíku C6 aminoskupinou, ktorú poskytne aspartát a vznikne adenylosukcinát. GTP je donorom energetickej bohatej fosfátovej väzby. Táto reakcia je katalyzovaná adenylosukcinátsyntetázou. Potom je fumarát odštiepený pomocou adenylosukcinátlyázy a vzniká AMP. Druhá vetva je zahájená oxidáciou IMP, nasleduje vloženie aminoskupiny, ktorú poskytne glutamín. XMP je vytvorený IMP-dehydrogenázou, ktorá ako akceptor H^+ používa NAD^+ . Z nej potom účinkom GMP-syntetázy, ktorá za spotreby ATP prenáša amidovú skupinu glutamínu, vzniká GMP (Zrenner et al., 2006).

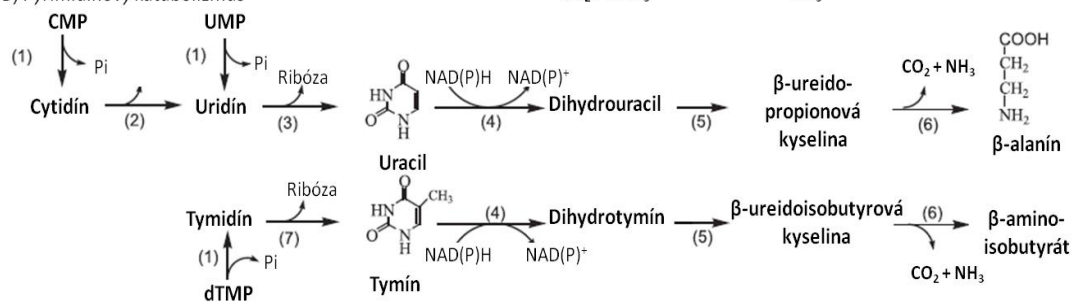
3.2.2.2 Katabolizmus purínov

Katabolizmus purínu má dôležitú úlohu pri metabolizme dusíku. Rastliny sú závislé na efektívnom využití a zužitkovaní dusíka predtým ako ho vylúčia. Vo väčšine rastlín sú purínové nukleotidy oxidačne degradované prostredníctvom kyseliny močovej a alantoínu na oxid uhličitý a amoniak, ktorý je pomocou glutamín-oxoglutarát-aminotransferázovou (GOGAT) dráhou reasimilovaný.

A) Purínový katabolizmus



B) Pyrimidínový katabolizmus



Obrázok 7. Katabolizmus (A) purínových nukleotidov a (B) pyrimidínových nukleotidov v rastlinách. Uvedené enzýmy sú: (A) - (1) AMP deamináza, (2) IMP dehydrogenáza, (3) 5'-nukleotidáza a / alebo fosfatáza, (4) inozín-guanozínnukleozidáza, (5) guanozindeamináza, (6) guanindeamináza, (7) xantindehydrogenáza, (8) urikáza, (9) alantoináza, (10) alantoikáza, (11) ureidoglykolátlyzáza, (12) ureáza, (13) alantóindeamináza, (14) ureidoglycínamidohydrolyzáza, (15) ureidoglykolátlyzáza. (B) - (1) 5'-nukleotidáza a / alebo fosfatáza, (2) cytidindeamináza, (3) uridínnukleozidáza, (4) dihydrouracilidehydrogenáza, (5) dihydropyrimidinamidohydrolyzáza, (6) β-ureidopropionáza, (7), tymidínfosforyláza a / alebo tymidínnukleozidáza. (Obrázok upravený podľa Stasolla et al. 2003).

Najprv je AMP účinkom AMP-deaminázy deaminovaný a vznikne IMP. Následne je IMP oxidovaný na XMP pomocou IMP-dehydrogenázy alebo je pomocou nešpecifických fosfatáz alebo 5'-nukleotidáz defosforylovaný na inozín. Potom je inozín hydrolyzovaný inozín-guanozínnukleozidázou na hypoxantín a následne je pomocou xantindehydrogenázy oxidovaný na xantín. Pred samotným členením purínového heterocyklu sú všetky degradované purínové metabolity prevedené na xantín. Ten je potom xantín-dehydrogenázou oxidovaný na kyselinu močovú, ktorá je ďalej štepená urikázou na alantóin. Účinkom alantoinázy je alantóin následne oxidovaný na kyselinu alantóovú, a tá je potom prevedená cez ureidoglycín a ureidoglykolát na finálne produkty (amoniak, oxid uhličitý a glyoxylát). Tieto konečné produkty môžu byť znovu

využitie pri fotosyntéze reasimilované GOGAT dráhou. (Zrenner et al., 2006). Schéma katabolizmu purínu je na obrázku 7.

3.2.2.3 Recyklácia purínov

Vzhľadom k tomu, že *de novo* syntéza purínov má vysoké energetické požiadavky a využíva päť nukleotidov k tvorbe AMP a sedem k tvorbe GMP, recyklácia je energeticky veľmi výhodná, pretože je vyžadovaný len jeden ATP. Recyklačný cyklus („salvage“) slúži taktiež k zníženiu hladiny purínových báz a nukleozidov, ktoré by inak mohli mať inhibičný efekt na iné metabolické reakcie (Moffatt and Ashihara, 2002).

Tri purínové bázy adenín, guanín a hypoxantín sú recyklované na AMP, GMP a IMP. Na týchto recyklačných dráhach sa podieľajú dva enzýmy: adenínfosforibosyltransferáza a hypoxantín/guanínfosforibosyltransferáza. Purínové bázy môžu byť taktiež recyklované na nukleotidy prostredníctvom nukleozidov. Adenosínfosforiláza a inosín/guanosínfosforiláza sa môžu podieľať na syntéze príslušných nukleozidov z danej bázy a ribosa-1-fosfátu. V rastlinách je však aktivita týchto enzýmov veľmi malá, preto je táto reakcia veľmi výnimočná a má len druhoradú úlohu. (Moffatt and Ashihara, 2002).

Adenozín, guanozín a inosín môžu byť recyklované pomocou kináz alebo nukleozid-fosfotransferáz. Adenozínkináza je všadeprítomná a jej aktivita je pomerne vysoká, zatiaľ čo inozín-guanozín-kináza sa nevyskytuje vo všetkých rastlinných druhoch. (Zrenner et al., 2006). Schéma recyklačných reakcií purínu je na obrázku 5.

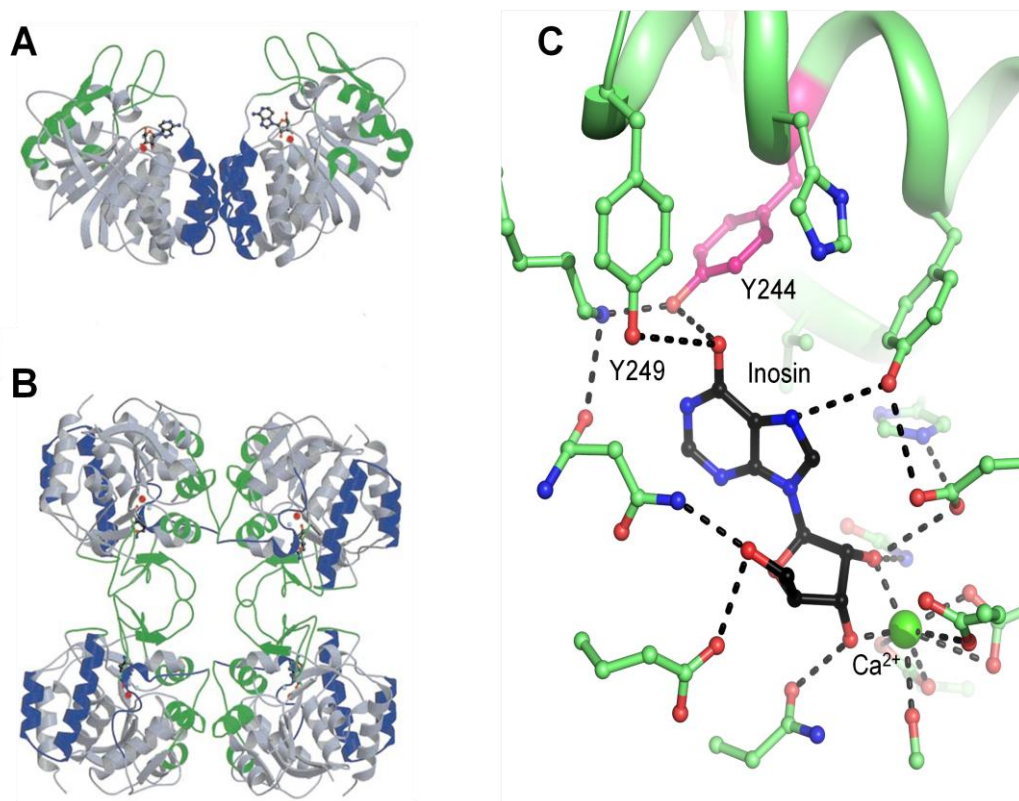
Pri recyklácii purínov boli dôkladnejšie študované reakcie, na ktorých sa podieľajú adenínfosforibosyltransferáza a adenosínkináza (Moffatt and Ashihara, 2002), pretože tieto enzýmy zasahujú aj do metabolizmu cytokinínov. Ich mutanty vykazovali zníženie alebo stratu plodnosti, zmeny v transmetylačných reakciách zapojených do biosyntézy bunkovej steny (Schoor and Moffatt, 2004).

3.3 Nukleozid-*N*-ribohydrolázy

Ako už bolo napísané v predchádzajúcich častiach, rastliny sú schopné ribozidy a zásady buď recyklovať alebo degradovať. Kľúčovú úlohu v týchto procesoch hrajú nukleozid-*N*-ribohydrolázy (NRH). Tieto enzýmy katalyzujú hydrolytické štiepenie ribozidov na príslušné bázy a ribózu cez oxokarbeniový intermediát (obrázok 9) (Versees a Steyaert, 2003). NRH zahŕňajú rodinu štruktúrne spojených metaloproteínov s topológiou β -skladaného listu. Nukleozid-*N*-ribohydrolázy sú lokalizované v cytosóle. Poznávacím znakom nukleozidáz je aspartátový cluster

sekvencie DXDXXXDD, ktorý sa nachádza poblíž N-konca polypeptidového reťazca a tvorí aktívne centrum týchto enzýmov (Versées a Steyaert, 2003). Nukleozid-*N*-ribohydrolázy majú v aktívnom mieste Ca^{2+} ión (obrázok 8). Aktívne miesto je špecifické pre ribózu a substrát sa naň viaže cez ribozylový koniec (Verseés et al., 2001).

U niekoľkých organizmov je známa kryštalická štruktúra NRH. *T. vivax* obsahuje IAG-NRH, ktorá má dimérnu štruktúru (obrázok 8). Obsahuje dve aktívne miesta, ktoré sú na sebe nezávislé. Aktívne miesto sa nachádza na C-konci reťazca, v strede ôsmich β -listov oboch podjednotiek. Na vápenatý ión sú naviazané karboxylové skupiny troch aspartátov (jeden aspartát poskytuje oba atómy kyslíku, zvyšné dva aspartáty len jeden kyslík), karbonylová skupina treonínu, 2 OH - skupiny, ktoré poskytuje ribóza a molekula vody (Verseés et al., 2001). IU-NRH z *C. fasciculata* má tetramérnu štruktúru (obrázok 8), ale v aktívnom mieste taktiež obsahuje osemväzobný Ca^{2+} ión (Degano et al., 1996). Tetramérnu štruktúru majú tiež YbeK (Muzzolini et al., 2006) a YeiK (Giabbai B. and Degano M., 2004) proteíny z *E. coli*.



Obrázok 8. Porovnanie kvartérnych štruktúr (A) IAG-NH z *T. vivax* a (B) IU-NH z *C. fasciculata*. (C) Aktívne miesto PpNRH1. A: IAG-NH tvorí dimérnu štruktúru. B: IU-NH tvorí tetramér. C: Obrázok znázorňuje interakciu enzýmu PpNRH1 so substrátom (inozínom). 6-oxo alebo 6-amino skupina je schopná interakcie s dvoma tyrozínovými zvyškami Y244 a Y249.

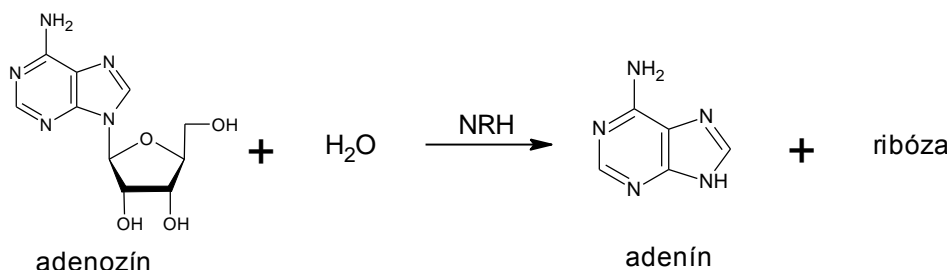
NRH sú v prírode široko rozšírené, nachádzajú sa v baktériách (Petersen a Møller, 2001) kvasinkách (Kurtz et al., 2002), prvokoch (Parkin, 1996) a v mesozoách (Verseés et al., 2003). Gény, ktoré obsahujú charakteristický NRH motív sú tiež

prítomné v rastlinách (Jung *et al.*, 2009) a v hmyze (Ribeiro a Valenzuela, 2003). Naopak, u cicavcov nebola zistená žiadna aktivita NRH (Parkin *et al.*, 1991).

Enzýmy zodpovedné za metabolizmus nukleozidov sa líšia v závislosti od organizmu. V baktérii *Escherichia coli* sú exogénne ribonukleozidy prevažne metabolizované nukleozidfosforylázami, katalyzujú fosforolýzu N-glykozidickej väzby nukleozidov za vzniku voľnej bázy a ribóza-1-fosfátu. Uridínfosforyláza kódovaná génom *udp* (Zalkin and Nygaard, 1996) je špecifická pre uridín, zatiaľ čo purínnukleozidfosforyláza, kódovaná *deoD* génom (Zalkin and Nygaard, 1996), je schopná katalyzovať rozštiepenie všetkých purínových nukleozidov za vzniku voľnej purínovej bázy a ribóza-1-fosfátu, s výnimkou xantozínu, ktorý je metabolizovaný xantozínfosforylázou kódovanou *xapA* génom. Naopak, v *E.coli* vyskytujúce sa NRH kódované *rihA*, *rihB* a *rihC* génmi majú druhoradú úlohu (Petersen and Moller, 2001).

Metabolická úloha NRH je najviac preskúmaná v parazitických prvokoch, napríklad *Trypanosoma brucei*, *Crithidia fasciculata* a *Leishmania major*. Tieto organizmy sa spoliehajú na recykláciu purínov, pretože, na rozdiel od väčšiny organizmov, nemajú schopnosť *de novo* syntetizovať purínové nukleotidy. Namiesto toho využívajú recyklačné enzýmy na získanie purínových báz a nukleozidov z ich hostiteľského organizmu a prevádzajú ich na príslušné nukleotidy. Vzhľadom k týmto rozdielom medzi parazitom a hostiteľom, v posledných rokoch boli parazitné NRH intenzívne študované ako potenciálny cieľ pre chemoterapeutické využitie. NRH boli klasifikované do štyroch skupín na základe ich substrátovej špecifity: substrátovo nešpecifické NRH z *Leishmania major* (Shi *et al.*, 1999), NRH, ktoré preferujú inozín a uridín (IU-NRH) (Parkin *et al.*, 1991) a inozín a guanozín (IG-NRH) (Estupiñán a Schramm, 1994) z *Crithidia fasciculata* a nakoniec NRH z *Trypanosoma brucei brucei* (Parkin, 1996) preferujúce inozín, adenosín a guanozín (IAG-NRH), ktoré vykazujú špecifitu k purínovým nukleozidom.

Aktivita NRH bola preukázaná na mnohých rastlinných druhoch, napríklad v pšenici (Chen and Kristopeit, 1981), v jačmeni (Guranowski and Schneider, 1977), v paradajke (Burch and Stuchbury, 1986), ale aj v čaji (Imagawa *et al.*, 1979) či káve (Campos *et al.*, 2005). Len nedávno bola charakterizovaná NRH rodina (AtNRH1 a 2) z *Arabidopsis thaliana* (Jung *et al.* 2009, 2011), pričom obe izoformy majú v rastline inú funkciu. AtNRH1 hrá hlavnú úlohu v katabolizme purínov a pyrimidínov, AtNRH2 sa prejavuje najmä v neskoršej fáze starnutia a podporuje hydrolyzu inozínu.



Obrázok 9. Reakčný mechanizmus nukleozid-*N*-ribohydroláz na príklade adenosínu. Hydrolýzou *N*-glykozidickej väzby vzniká báza adenín a ribóza. Reakcia prebieha cez prechodný stav oxokarbeniového iónu.

Pre niektoré NRH bol stanovený pH profil. Ako príklad sa môže uviesť NRH z *T. brucei brucei* (Parkin, 1996). Z pH profilu pre hydrolýzu inozínu vyplýva, že tri protonované skupiny prispievajú k úplnej katalytickej účinnosti IAG-NRH. Strata protónu z najkyslejšej skupiny znižuje V_{lim} desaťkrát, avšak strata dvoch protónov spôsobí úplnú inaktiváciu IAG-NRH. Zo závislosti V_{lim}/K_m na pH vyplýva, že katalytická účinnosť sa nemení v rozmedzí pH 5 až 8. Avšak nad pH 8 sa účinnosť výrazne znižuje kvôli dvom ionizovateľným skupinám voľného enzýmu.

3.3.1 Kinetické vlastnosti NRH

Doposiaľ bolo celkovo charakterizované len malé množstvo NRH pomocou kinetických parametrov. Z protozoálnych organizmov bola charakterizovaná z *Trypanosoma brucei* (Parkin, 1996) NRH preferujúca hlavne inozín, adenosín a guanozín (IAG-NRH). Inozín je najlepšie prirodzene sa vyskytujúci substrát IAG-NRH s hodnotou K_m 18 μM a V_{lim} 0,8 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Hodnoty K_m pre puríny a pyrimidíny sú podobné, od 15 μM pre adenosín po 106 μM pre cytidín, ale rýchlosť hydrolýzy pyrimidínových substrátov uridínu (V_{lim} je 0,00032 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$) a cytidínu (V_{lim} je 0,07 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$) je výrazne nižšia v porovnaní s purínovými substrátmi. Taktiež bola popísaná NRH z prvoka *Leishmania major* (Shi et al., 1999). V porovnaní s NRH z *T. brucei*, tak tento enzým výrazne strácal afinitu k enzýmom, pretože hodnoty K_m boli niekoľkonásobne vyššie (napríklad K_m pre inozín bola 445 μM).

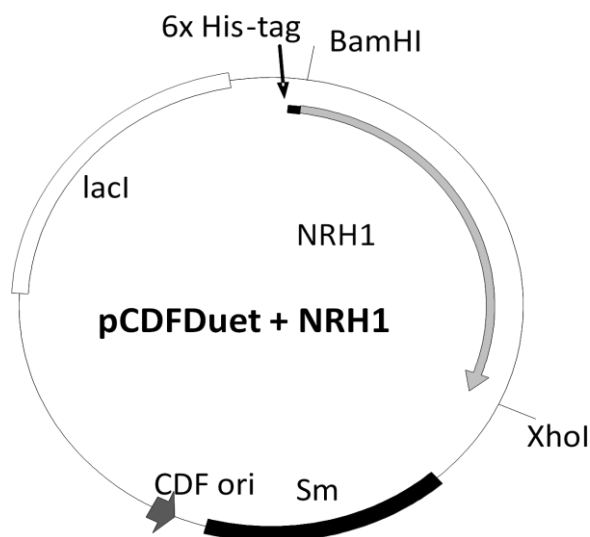
Ďalšie dva proteíny boli charakterizované z *E. coli*: YbeK (Muzzolini et al., 2006) and YeiK (Giabbai a Degano, 2004). YeiK proteín je charakterizovaný ako purín špecifická NRH. Katalytická účinnosť YeiK voči inozínu, adenosínu a guanozínu bola viac ako tisíckrát menšia ako voči uridínu a preto sa tieto substráty pokladajú za neaktívne. Naopak, YbeK proteín sa radí medzi pyrimidín špecifické NRH. Tento enzým hydrolyzuje pyrimidínové nukleozidy 100 - 10000-krát efektívnejšie než purínové nukleozidy. Z pyrimidínov je uridín prevedený najúčinnejšie, hlavne kvôli nízkej hodnote K_m (83 μM). Z rastlín je to napríklad NRH z *Arabidopsis thaliana*

(AtNRH1) (Jung et al., 2009). Preferuje najmä uridín (hodnota K_m je 0,8 mM a hodnota V_{lim} je $0,004 \text{ mmol s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). Rýchlosť hydrolýzy inozínu a adenzínu bola oveľa nižšia v porovnaní s uridínom (V_{lim} pre inozín bola $0,0002 \text{ mmol s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ a pre adenzín len $7,7 \times 10^{-6} \text{ mmol s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$).

4 PRAKTICKÁ ČASŤ

4.1 Biologický materiál

- Expresné bunky *E.coli* T7 express (New England Biolabs) nesúce gény *PpNRH1* pre WT proteín a jeho mutantnú formu Y244A, ktoré boli poskytnuté školiteľom (obrázok 10).



Obrázok 10. Mapa expresného vektoru PpNRH1 (999 bp; GenBank accession no. JQ649322). Skladá sa z 346 aminokyselín vrátane His-kotvy (kotva 14 aminokyselín), kotva sa nachádza na N-konci.

4.2 Použité chemikálie

- (2S,3S) -1,4-bis(sulfanyl)butan-2,3-diol (Sigma-Aldrich, USA)
- adenzín (Sigma-Aldrich, USA)
- akrylamid (Bio-Rad, USA)
- apoferritin z konskej sleziny (Sigma-Aldrich, USA)
- B-PER (Thermo, USA)
- cytidín (Sigma-Aldrich, USA)
- dihydrogénfosforečnan draselný (Merck, Nemecko)
- DNAza (Top-Bio, ČR)
- dodecylsírán sodný (Bio-Rad, USA)
- ethanol (Lach-Ner, ČR)
- farbiaci roztok Coomassie blue (Bio-Rad, USA)
- glukóza (Chemapol, ČR)
- glycerol (Lach-Ner, ČR)
- guanidín-HCl (AppliChem, SRN)

- guanozín (Sigma-Aldrich, USA)
- hovädzí sérový albumín (Sigma-Aldrich, USA)
- hovädzí tyroglobulín (Sigma-Aldrich, USA)
- chlorid draselný (Sigma-Aldrich, USA)
- chlorid horečnatý (AppliChem, SRN)
- chlorid sodný (Lach-Ner, ČR)
- chromatografický sorbent Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Biosciences, Švédsko)
- chromatografický sorbent: HIS-Select Cobalt (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- imidazol (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- inhibítor proteáz (Sigma, ČR)
- inozín (Sigma-Aldrich, USA)
- isopropyl- β -D-tiogalaktopyranozid (Fermentas, Litva)
- karboanhydráza z hovädzích erytrocytov (Sigma-Aldrich, USA)
- kvasinková alkoholdehydrogenáza (Sigma-Aldrich, USA)
- LB médium (Roth, SRN)
- lyzozým (Sigma-Aldrich, USA)
- močovina (Sigma-Aldrich, USA)
- *N,N,N',N'*-tetramethylethylendiamín (Bio-Rad, USA)
- *N,N'*-metylén-bisakrylamid (Bio-Rad, USA)
- *n*-butanol (Lach-Ner, ČR)
- nikotínamidadenindinukleotid (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- persíran amónny (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- Protein Ladder (10-250 kDa) (BioLabs, USA)
- RNAza (TopBio, ČR)
- streptomycín (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- Tris-HCl pufr, pH 6,8
- Tris-HCl pufr, pH 8
- Tris-HCl pufr, pH 8,8
- uridín (Sigma-Aldrich, USA)
- xantozín (Sigma-Aldrich, USA)
- α -amyláza (Sigma-Aldrich, USA)

4.3 Prístrojové vybavenie

- analytické váhy (Sartorius, SRN)
- centrifúga 5430R (Eppendorf, SRN)
- centrifúga 5430 (Eppendorf, SRN)
- centrifúga Benchtop 4-16 K (Sigma, SRN)
- digitálny pH meter (Multical WTW, SRN)
- elektroforetická komôrka (Bio-Rad, USA)
- elektromagnetická miešačka (IKA, SRN)
- kvapalinový chromatograf pre strednotlakovú chromatografiu BioLogic Duo Flow (Bio-Rad, USA)
- laminárny box (Schoeller, ČR)
- magnetická miešačka (IKA, SRN)
- minicentrifúga BLUE (Labnet,SRN)
- PCR termocykler (Eppendorf, SRN)
- rotátor (Biosan,
- spektrofotometer LightWave II UV-Vis II diode array UV/Visible (Biochrom Ltd, UK)
- spektrofotometer UV-VIS s (Agilent, SRN)
- termostat (Labnet, USA)
- transiluminátor (Eastport, USA)
- trepačka RCT basic (IKA, SRN)
- vortex (Stuart, UK)

- **Základné vybavenie laboratória:** kádinky, Erlenmayerove banky, odmerné valce, kyvety do spektrofotometra, magnetické miešadlá, nádoba na ľad, parafilm, strička na destilovanú vodu, stojan na skúmavky, sada pipiet (2,5; 10; 20; 100; 200; 1000; 5000 µl), centrifugačné kyvety

4.4 Metódy

4.4.1 Produkcia rekombinantného proteínu v *E.coli*

Zo zásobnej ependorfky bola kultúra *E.coli* (2-5 μ l) inokulovaná do Erlenmayerovej banky, ktorá obsahovala 10 ml LB média, antibiotikum streptomycin (50 μ g/ml) a 1 ml 20% glukosy (konečná koncentrácia 1 %). Inkubácia prekultúry prebiehala za mierneho trepania na trepačke cez noc pri 37 °C. Na druhý deň bola prekultúra zcentrifugovaná (4000 g, 5 minút, 20 °C). Supernatant bol vyliaty a pelet *E.coli* bol resuspendovaný v 10 ml pripraveného LB média so streptomycinom. Do Erlenmayerovej banky, ktorá obsahovala 90 ml LB média so streptomycinom, boli preliate rozsuspendované baktérie, a potom bola kultúra inkubovaná na trepačke približne 1 hodinu pri 30 °C, kým hodnota optickej density sa nepohybovala v rozmedzí $OD_{600} = 0,5-0,6$. Následne bol odobratý 1 ml kultúry pred indukciou do čistej ependorfky, ktorá bola zcentrifugovaná (4000 g), supernatant bol odpipetovaný a pelet zamrazený. Prídavkom 200 μ l 0,5 M isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosidu (IPTG) k 200 ml kultúry v Erlenmayerovej banke bola indukovaná expresia rekombinantného proteínu pri 20 °C cez noc na trepačke.

4.4.2 Extrakcia PpNRH1 a mutantnej formy Y244A

Najprv bola kultúra centrifugovaná (4000 g, 20 min, 20 °C), supernatant bol vyliaty a pelet bol ďalej použitý pre extrakciu. Bakteriálny pelet bol resuspendovaný v 6 ml pufru, ktorý obsahoval 2,5 ml 50 mM Tris-HCl, pH 8, 0,5 ml 10 mM $MgCl_2$, 100 μ l inhibítora proteas a 2,9 ml vody. Boli pridané 3 ml detergenčného činidla B-PER a zmes bola inkubovaná 10 minút pri laboratórnej teplote. Následne bolo pridané 100 μ l lysozemu a opäť inkubované pri laboratórnej teplote až kým vzorka zgélovatela. Pridala sa voda na konečný objem 10 ml. Potom bolo pridané 8 μ l RNasy (10 μ g/ml) a 8 μ l DNAsy (10 U/ μ l). Zmes bola inkubovaná na vodnom kúpeli 30 minút pri 37 °C. Následne bolo pridané 1,3 ml 1M NaCl a 1,3 ml 50 % glycerolu. Do čistej ependorfky bolo odobraté 0,1 ml lyzátu, ktorý sa centrifugoval (10000 g, 10 minút), supernatant bol prenesený do čistej ependorfky a pelet rozsuspendovaný v 50 μ l 4M močoviny. Zvyšný lyzát sa tiež centrifugoval (10000 g, 30 minút, 4 °C) a supernatant bol prenesený do novej falkonky.

4.4.3 Purifikácia PpNRH1 a mutantnej formy Y244A

Purifikácia bola vykonaná pomocou afinitných chromatografických koloniiek His selected cobalt gel (Thermo). Je vysoko selektívna pre rekombinantné proteíny

s histidínovou značkou a vykazuje nízku nešpecifickú väzbu ďalších proteínov. Kolonky boli najprv premyté ekvilibračným pufrom, ktorý obsahoval 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) 100 mM NaCl, 5 % glycerol, 10 mM imidazol, vodu a boli centrifugované (300 g, 1 minúta). Potom boli na kolonky nanosený supernatant z extrakcie, umiestnené na rotátore boli inkubované pri 4 °C cca 30 minút až 1 hodinu. Potom boli opäť centrifugované (300 g, 1 minúta) a bola zachytená prvá frakcia. Následne sa kolonky zas premyli ekvilibračným pufrom. Pridal sa elučný pufer, ktorý bol obsahovo totožný s ekvilibračným pufrom, až na koncentráciu imidazolu (250 mM), kolonky sa inkubovali na rotátore 15 až 30 minút pri 4 °C. Potom sa centrifugovali a do čistej falkonky bola získaná ďalšia frakcia. Inkubácia s elučným pufrom a centrifugácia sa zopakovala ešte dvakrát. Získané elučné frakcie boli spojené. Následne sa kolonky ešte dvakrát premyli elučným pufrom, vodou, bol pridaný 6 M guanidin-HCl (pre elúciu zostávajúcich nečistôt) a nakoniec sa pridal 20 % etanol a kolonky boli uschované.

4.4.4 Gélová permeačná chromatografia

Základom gélovej permeačnej chromatografie je, že náplň kolóny je porézna s definovanou veľkosťou pórov. Molekuly s veľkou molekulovou hmotnosťou sú vylučované ako prvé, pretože nemôžu vstúpiť do vnútra gélových častíc. Molekuly s nižšou molekulovou hmotnosťou sa naopak dostávajú do inertných priestorov a sú na kolóne zachytávané.

Bol použitý kvapalinový chromatograf pre strednotlakovú chromatografiu BioLogic DuoFlow (Bio-Rad) s kolónou Superdex 200 HR 10/30, ktorá obsahuje zosieťovanú agarosu pripojenú k dextranu. Mobilnú fázu tvoril 50 mM K-fosfátový pufer, pH 7, ktorý obsahoval 150 mM NaCl. Ako štandardy boli použité thyroglobulin (669 kDa), apoferittin (443 kDa), α -amylasa (200 kDa), alkoholdehydrogenasa (150 kDa), BSA (66 kDa), karboanhydrasa (29 kDa). Prietoková rýchlosť bola 0,7 ml/min.

4.4.5 SDS-PAGE

SDS-PAGE je elektroforéza v prítomnosti dodecylsírany sodného (SDS). SDS sa viaže na bielkoviny v pomere 1,4 g SDS na 1 gram bielkoviny a udáva im uniformný záporný náboj, a teda sa pohybujú k anóde. Záporný náboj je priamo úmerný molekulovej hmotnosti proteínu, a tak dochádza k separácii nabitých častíc na základe rozdielnej pohyblivosti v elektrickom poli.

Vzorky pre elektroforézu boli pripravené tak, že k 50 μ l jednotlivých frakcií bolo pridané 50 μ l vzorkovacieho pufru (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 5% (v/v) zásobný roztok bromfenolovej modrej, 5% (v/v) β -merkptoethanol vo vode, 10% (w/v) SDS).

Inkubovali sa 10 minút pri 100 °C, vychladli a zcentrifugovali na mikrocentrifuge. Deliaci a zaostrovací gél bol pripravený podľa tabuľky 1.

Deliaci gél bol nanesený medzi sklá upevnené v nalievacom stojane, potom bol prevrstvený *n*-buthanolom a nechal sa polymerizovať pri laboratórnej teplote približne 30 minút. Po zatuhnutí deliaceho gélu bol pomocou filtračného papiera odstránený *n*-buthanol a povrch gélu bol prepláchnutý pomocou deionizovanej vody. Potom bola medzi sklá naliata vrstva zaostrovacieho gélu, do ktorého bol zasunutý hrebienok pre vytvorenie požadovaného množstva jamiek. Gél sa opäť nechal polymerizovať približne 30 minút pri laboratórnej teplote. Po ukončení polymerizácie bol hrebienok vybraný a sklá s pripraveným gélom vložené do elektroforetickej komôrky s elektródovým pufrom (0.025 M Tris, 0.192 M glycin, 0.1 % SDS, pH 8.3). Do jamiek bolo aplikované vhodné množstvo vzorku a štandardu. Komôrka bola následne uzavretá a pripojená k zdroju napätia na 120 V. Samotná elektroforéza prebiehala asi jednu hodinu. Po jej ukončení sa gél premyl deionizovanou vodou a bol vložený do farbiaceho roztoku Coomassie Brilliant Blue. Potom bol farbiaci roztok vyliaty do odpadu a gél bol odfarbený roztokom na odfarbovanie.

Tabuľka 1. Zloženie deliaceho a zaostrovacieho gélu.

	Deliaci gél (12%)	Zaostrovací gél (4%)
AA/BIS	4	0.65
Tris/HCl, 1.5 M, pH 8.8	2.5	-
Tris/HCl, 0.5 M, pH 6.8	-	1.25
H ₂ O	3.2	2.95
SDS (10 %)	0.1	0.1
APS (10 %)	0.05	0.06
TEMED	0.015	0.015

4.4.6 Stanovenie obsahu proteínov

Koncentrácia proteínu bola stanovená spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 280 nm po zahustení a eliminácii imidazolu, pričom ako slepá vzorka bola použitá destilovaná voda. Pre výpočet koncentrácie proteínu bol použitý vzorec:

$$c_{vzorky} [mg/ml] = \frac{A_{vzorka}}{A_{ProtParam}} * riedenie$$

kde $A_{ProtParam}$ je taká absorbancia daného proteínu, ktorého koncentrácia je 1 mg/ml. Táto absorbancia bola získaná zo sekvencie aminokyselín (GenBank kod: JQ649322) na stránke Expasy.org pomocou nástroja ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>). Program počíta extinčné koeficienty proteínov

pomocou Edelhochovej metódy (Edelhoich, 1967), ale extinčné koeficienty pre tryptofán a tyrozín sú stanovené metódou podľa Pace et al. (Pace et al., 1995).

4.4.7 Stanovenie teplotnej stability

Enzým bol inkubovaný pri určitých teplotách v rozmedzí od 4 °C do 60 °C po dobu 30 minút a následne bola stanovená jeho reziduálna aktivita. Reakčná zmes v kyvete obsahovala 1,79 ml zásobného pufru 200 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 µl enzýmu a 200 µl substrátu, ktorý bol v tomto prípade inozín.

4.4.8 Stanovenie nukleozidázovej aktivity

Enzýmová aktivita je definovaná ako rýchlosť katalyzovanej reakcie. Rýchlosť premeny substrátu bola skorej vyjadrovaná v µmolech substrátu premeneného za 1 minútu (1U). Jednotkou na vyjadrovanie enzýmovej aktivity je v súčasnosti katal (kat). 1 katal je taká aktivita enzýmu, ktorá premení 1 mol substrátu za 1 sekundu. Pre výpočet sa používa vzťah:

$$a [\text{katal}] = \frac{\Delta A}{\Delta t} \frac{V}{\epsilon \cdot l}$$

kde ΔA je zmena absorpcie, Δt je doba reakcie udávaná v sekundách, V je objem zmesi v kyvete udávaný v litroch, ϵ je molárny absorpčný koeficient v jednotkách $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a l je šírka kyvety v centimetroch.

Aktivita bola meraná spektrofotometricky pri 30 °C podľa metódy popísanej Parkinom (1996). Pri spektrofotometrickom stanovení bola zvolená vlnová dĺžka a molárny absorpčný koeficient v závislosti na substráte (tabuľka 2). Reakčná zmes obsahovala 200 mM Tris-HCl pufer (pH 8,0) s 400 mM KCl, 1 mM DTT a ribozidový substrát. Celkový objem v kyvete bol 2 ml. Reakcia bola štartovaná pridaním príslušného množstva enzýmu.

Tabuľka 2. Spektrofotometrické vlastnosti substrátov. Vybrané substráty pre spektrofotometrické stanovenie a ich vlnová dĺžka a molárny absorpčný koeficient.

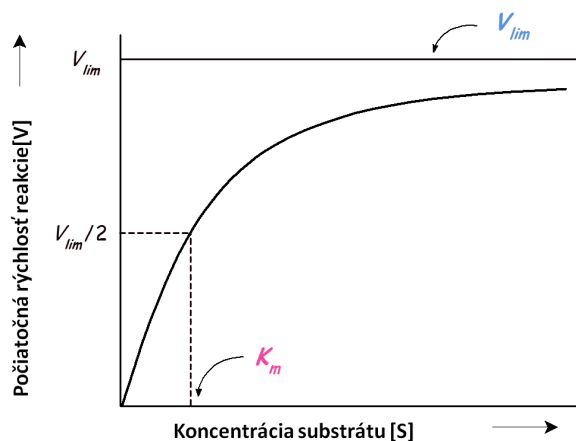
Substrát	Vlnová dĺžka (nm)	Molárny absorpčný koeficient ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
Inozín	280	-920
Xantozín	245	-3700
Uridín	280	-1800
Adenozín	276	-1400
Guanozín	253	-4100
Cytidín	280	-3420

4.4.9 Testovanie substrátovej špecificity, stanovenie K_m a V_{max}

Kinetické konštanty boli stanovené analytickým programom GraphPad Prism 5.0. Michaelisova konštantá (K_m) je definovaná ako taká koncentrácia substrátu, pri ktorej rýchlosť enzýmovej reakcie dosahuje práve polovicu maximálnej rýchlosti a je v podstate mierou afinity medzi enzýmom a substrátom. Limitná (maximálna) rýchlosť (V_{lim} alebo tiež V_{max}) je mierou celkovej koncentrácie enzýmu. Základným vzťahom enzýmovej kinetiky je rovnica Michaelis-Mentenovej:

$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

kde V je počiatočná rýchlosť reakcie, V_{max} udáva limitnú rýchlosť reakcie, K_m je Michaelisova konštantá a $[S]$ je koncentrácia substrátu. Grafickým vyjadrením tejto rovnice je hyperbola (obrázok 11).



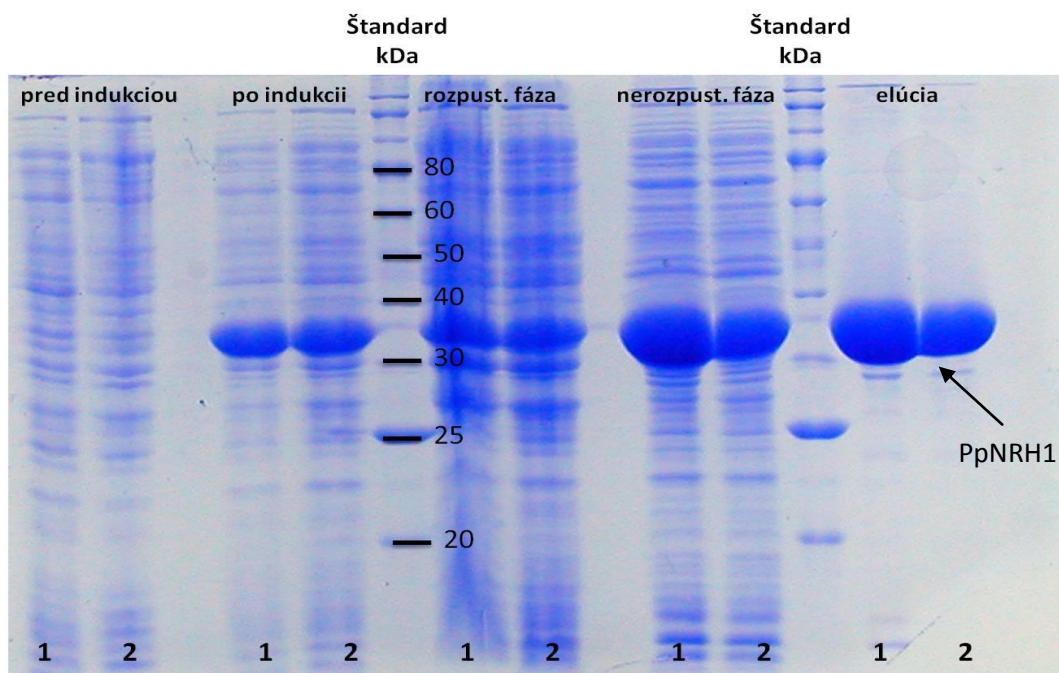
Obrázok 11. Saturačná krivka. Závislosť rýchlosti katalyzovanej reakcie na koncentrácii substrátu.

Stanovenie K_m a V_{lim} bolo uskutočnené pomocou nelineárnej regresie v programe GraphPad Prism 5.0.

5 VÝSLEDKY

5.1 Molekulové vlastnosti PpNRH1

Pomocou SDS-PAGE elektroforézy bola zhodnotená úroveň expície a stanovená približná molekulová hmotnosť monoméru skúmaných proteínov za denaturačných podmienok (obrázok 11). Výsledné proteíny PpNRH1 (WT) i mutantná forma Y244A sú podobne exprimované. Približná molekulová hmotnosť monoméru je 35 kDa a korešponduje s teoretickou hmotnosťou monoméru (37,5 kDa) vypočítanej na základe sekvencie aminokyselín v programe ProtParam vrátane His-tagu (obrázok 17). Na obrázku 12 je zobrazený enzým pred a po indukcii pomocou IPTG a taktiež je znázornený jeho výskyt v rozpustnej a nerozpustnej fáze. Aj keď je väčšia časť oboch proteínov v inklúzných telieskach, množstvo v rozpustnej fáze je dostatočné pre ďalšiu purifikáciu a prácu.



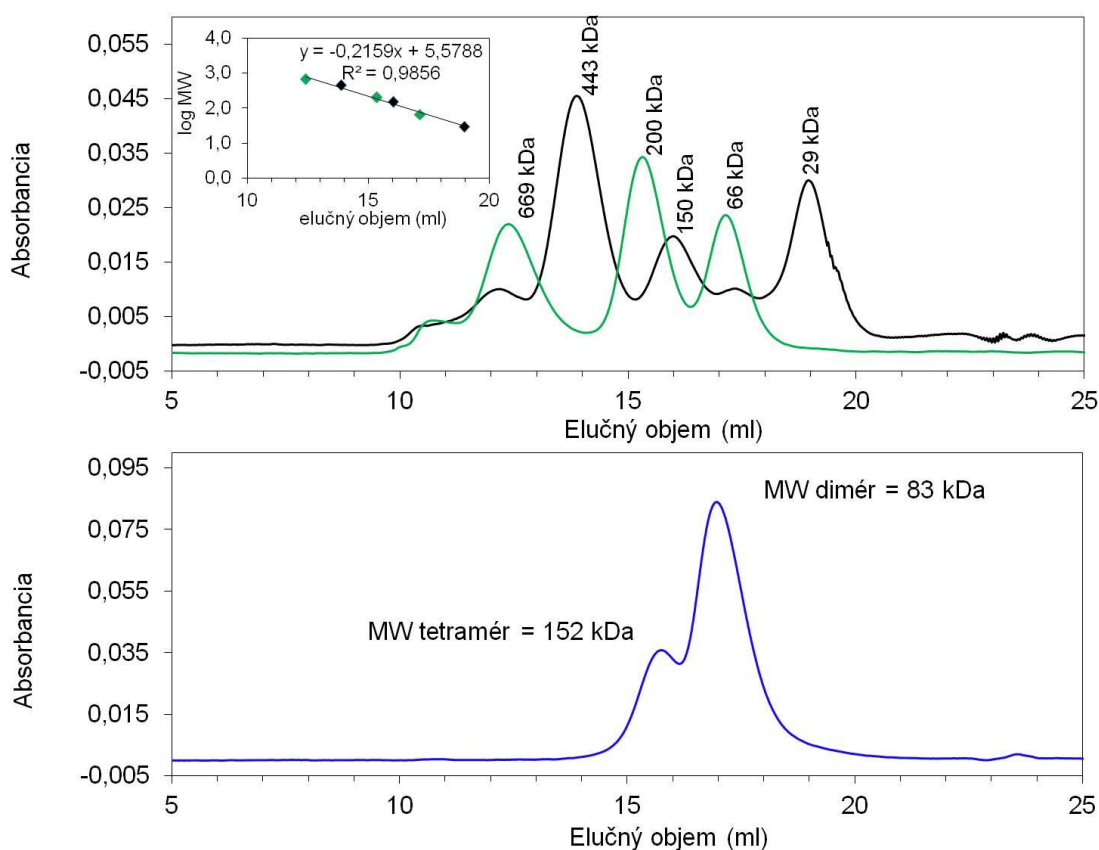
Obrázok 12. SDS-PAGE elektroforéza rekombinantných PpNRH1. Ako štandard bol použitý Protein Ladder (10-250 kDa). V stĺpci 1 bola nanosená PpNRH1 WT, v stĺpci 2 PpNRH1 z mutantu Y244A.

Pomocou gélovej permeačnej chromatografie na kolóne Superdex 200 HR10/30, s prietokom 0,7 ml/min bola stanovená molekulová hmotnosť za natívnych podmienok. Kalibračná priamka bola zostavená vynesením logaritmu molekulových hmotností proteínových štandardov proti ich elučnému objemu (tabuľka 4, obrázok 13). Bolo zistené, že proteín PpNRH1 sa vyskytuje prednostne ako dimér, aj keď malá časť je schopná tvoriť tetramér. Molekulová hmotnosť získaná z experimentu je 83 kDa pre

dimér a 152 kDa pre tetramér. Vypočítaná hodnota molekulovej hmotnosti na základe sekvencie vrátane His-tagu sa líši, 75 kDa pre dimér a 150 kDa pre tetramér.

Tabuľka 3. Výsledky gélovej permeačnej chromatografie.

Štandard	MW (kDa)	log MW	Elučný objem (ml)
tyreoglobulín	669	2,83	12,39
apoferitin	443	2,65	13,87
α -amyláza	200	2,30	15,35
alkoholdehydrogenáza	150	2,17	16,03
BSA	66	1,82	17,14
karboanhydráza	29	1,46	18,97
PpNRH1 WT (a)	152	2,18	15,74
PpNRH1 WT (b)	83	1,91	16,96



Obrázok 13. Gelová chromatografie PpNRH1 na kolóne Superdex 200 HR10/30, s prietokom 0,7 ml/min. A: Proteínové štandardy: tyreoglobulín (669 kDa), apoferitin (443 kDa), α -amyláza (200 kDa), alkoholdehydrogenáza (150 kDa), BSA (66 kDa), karboanhydráza (29 kDa). Vynesením závislosti logaritmu molekulových hmotností štandardov proti ich elučným objemom bola zostavená kalibračná priamka. B: Elučný profil PpNRH1-WT s vypočítanými molekulovými hmotnosťami.

5.2 Stanovenie výslednej koncentrácie proteínov

Výpočet v programe ProtParam stanovil, že stanovovaný proteín má pri koncentrácii 1 mg ml⁻¹ absorbanciu 0,953. Pri vlnovej dĺžke 280 bola spektrofotometricky získaná hodnota absorbancie daného proteínu, ktorá bola potom dosadená do vzorca:

$$c_{vzorky}[\text{mg/ml}] = \frac{A_{vzorka}}{A_{\text{ProtParam}}} * \text{riedenie}.$$

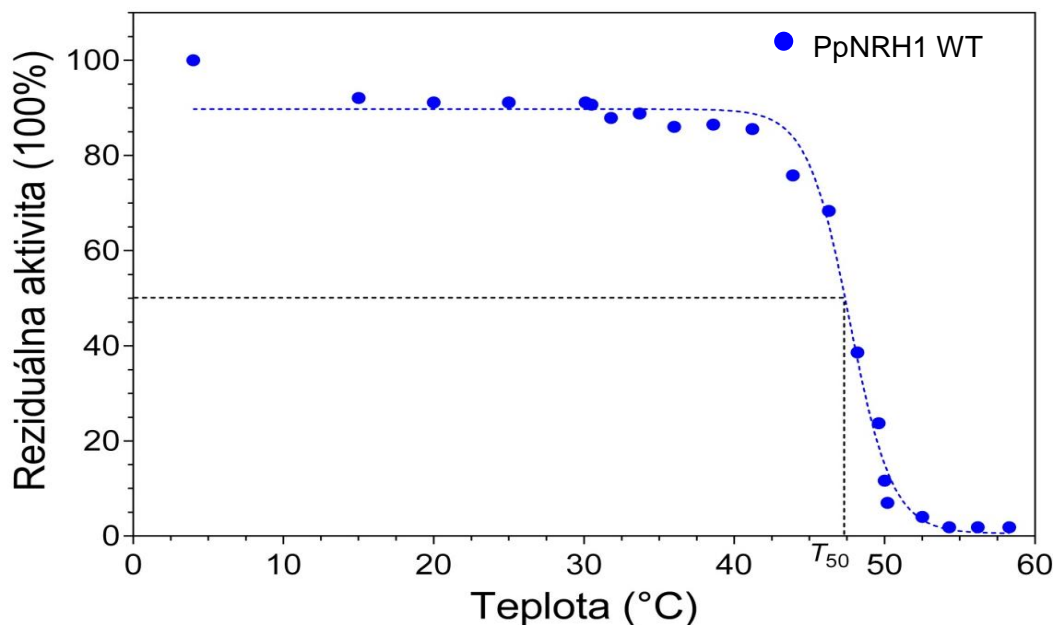
Následne bola spočítaná koncentrácia proteínu v zásobnom roztoku (tabuľka 3). Výsledná koncentrácia WT proteínu bola 33,3 mg ml⁻¹ a koncentrácia mutantnej formy Y244A bola 24,7 mg ml⁻¹.

Tabuľka 4. Stanovenie obsahu proteínov.

	$A_{\text{ProtParam}}$	A_{vzorka}	riedenie	c_{vzorka} (mg ml ⁻¹)
WT	0,953	0,317	100	33,26
Y244A	0,953	0,235	100	24,66

5.3 Stanovenie teplotnej stability PpNRH1

Teplotná aktivita bola stanovená pre enzým PpNRH1 WT. Enzým bol inkubovaný 30 minút v rozmedzí teplôt 4 - 60 °C. Po pridaní 100 μM inozínu bola stanovená jeho reziduálna aktivita. PpNRH1 vykazovala teplotnú stabilitu približne do 40 °C a potom strácala aktivitu. Hodnota T_{50} (čo je teplota, pri ktorej je zachované 50 % aktivity po 30 minútovej inkubácii pri danej teplote) je 47,7 °C (obrázok 14).

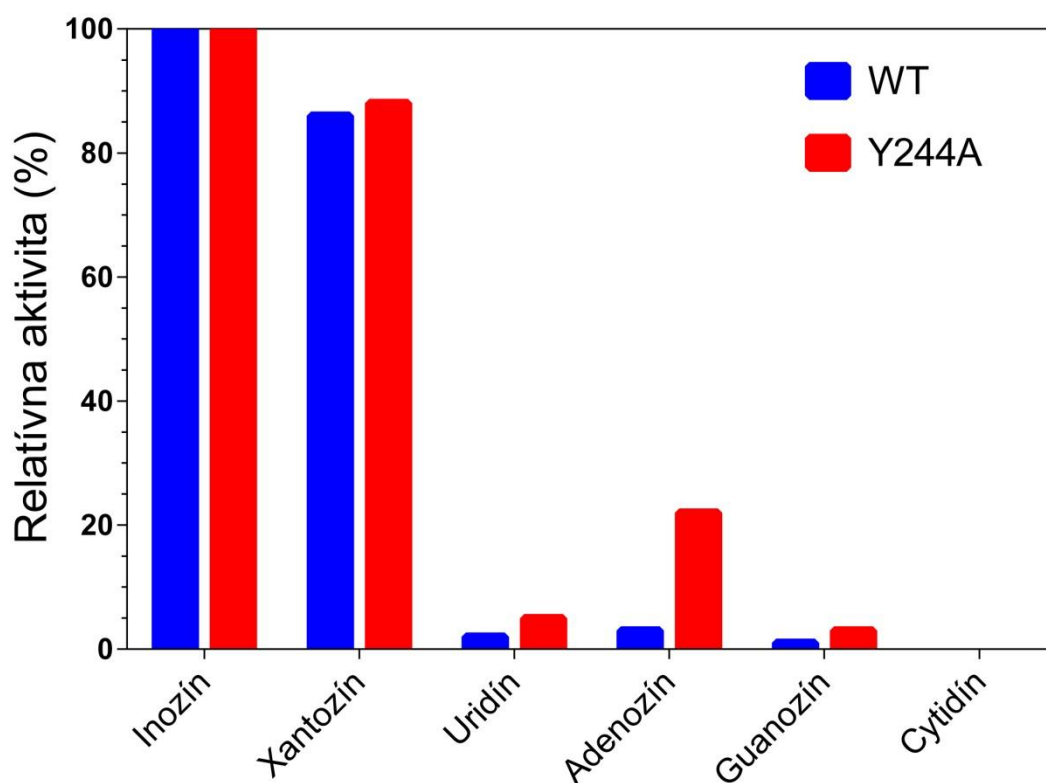


Obrázok 14. Teplotná stabilita PpNRH1 WT. Enzým bol inkubovaný v rozmedzí teplôt 4 - 60 °C. Reakčná zmes v kyvete obsahovala 1,79 ml zásobného pufru 200 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 µl enzýmu a 200 µl substrátu (100 µM), ktorý bol v tomto prípade inozín.

5.4 Stanovenie substrátovej špecificity PpNRH1 a mutantnej formy Y244A

V tejto práci bola testovaná špecificita oboch enzýmov voči 6 substrátom - inozínu, xantozínu, uridínu, adenzínu, guanozínu a cytidínu pri 200 µM koncentrácii. Aktivita oboch enzýmov bola najvyššia s inozínom a pre relatívne porovnanie je zobrazená ako 100 % (obrázok 15).

Aktivita s xantozínom bola u oboch enzýmov približne rovnaká (86 % pre WT a 88 % pre Y244A), čo však neplatilo pre ostatné substráty. S uridínom vykazoval WT len 3 % aktivitu voči inozínu, zatiaľ čo mutant Y244A dvojnásobnú, tzn. 6 % voči inozínu. Najväčší rozdiel enzýmy vykazovali v aktivite s adenzínom. Zatiaľ čo WT hydrolyzuje adenzín len asi 3 % rýchlosti voči inozínu, mutantná varianta Y244A vykazuje takmer štvrtinovú rýchlosť (22 %) voči inozínu. Aktivita s guanozínom bola veľmi nízka, okolo 1 % pre WT a 3 % pre Y244A voči inozínu. Cytidín nebol hydrolyzovaný ani jedným zo skúmaných enzýmov. Všeobecne sú purínové nukleozidy preferované študovaným enzýmom PpNRH1 (a jeho mutantnou formou Y244A) pred pyrimidínovými nukleozidmi.



Obrázok 15. Porovnanie relatívnej aktivity skúmaných enzýmov. Aktivita PpNRH1 k inozínu bola vybraná pre relatívne porovnanie ako 100 %. Reakčná zmes v kyvete obsahovala zásobný pufer 200 mM Tris-HCl (pH 8,0), 200 μ M substrát a príslušné množstvo enzýmu.

5.5 Stanovenie kinetických parametrov PpNRH1 a mutantnej formy Y244A

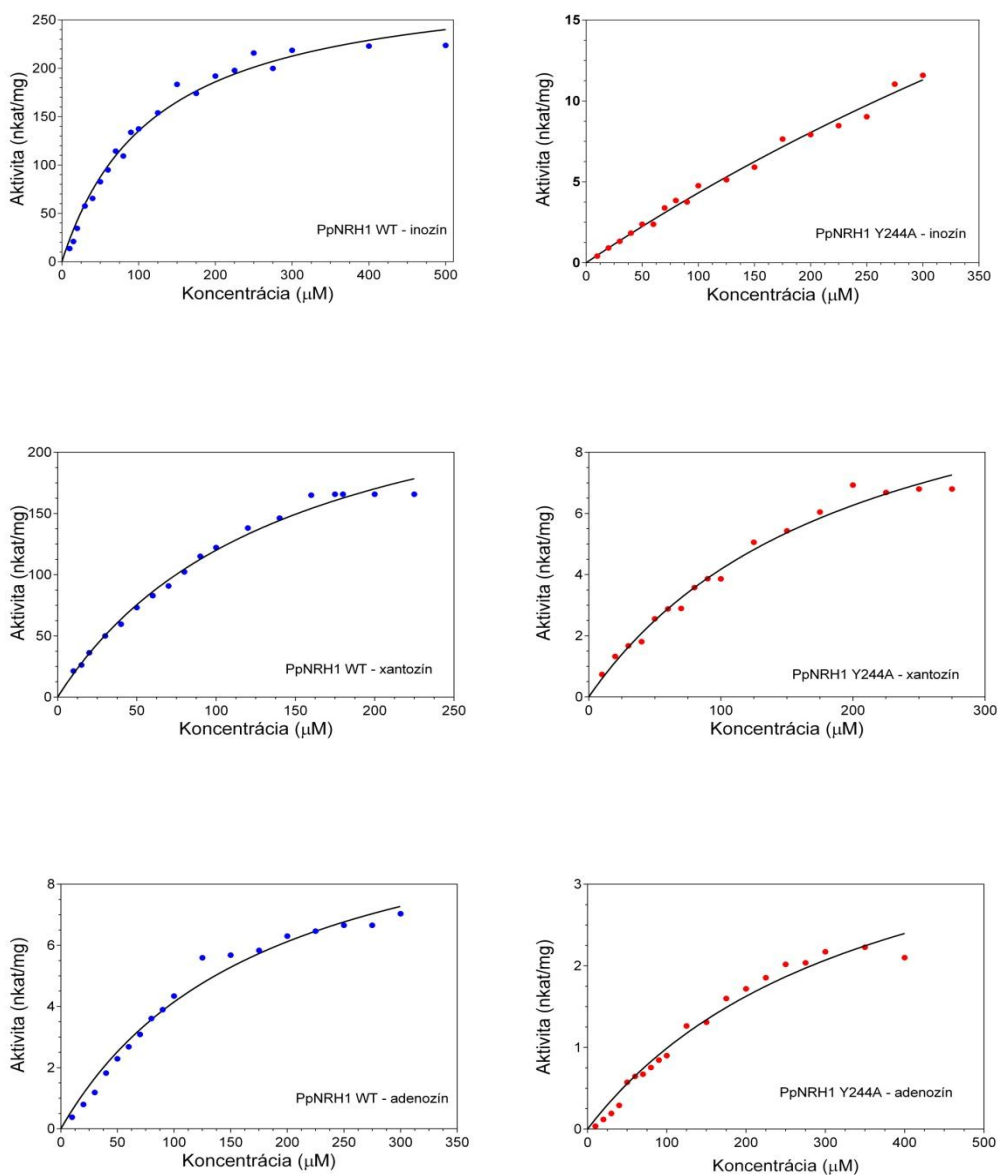
Pre stanovenie kinetických parametrov boli namerané saturačné krivky (obrázok 16) oboch enzýmov s tromi substrátmi - inozínom, xantozínom a adenozínom. Pre dané substráty bola určená Michaelisova konštanta K_m , limitná rýchlosť V_{lim} , relatívny pomer V_{lim}/K_m . Hodnoty príslušných K_m , V_{lim} a V_{lim}/K_m sú uvedené v tabuľke 5 a 6.

Tabuľka 5. Kinetické parametre PpNRH1 WT pre vybrané substráty. Meranie prebiehalo v prostredí zásobného 200 mM Tris-HCl pufru (pH 8,0).

Substrát	WT		
	K_m (μ M)	V_{lim} (nmol s ⁻¹ mg ⁻¹)	V_{lim}/K_m (relatívne)
Inozín	119 \pm 10	299 \pm 11	1
Xantozín	144 \pm 14	293 \pm 15	0,81
Adenozín	182 \pm 25	12 \pm 0,8	0,026

Tabuľka 6. Kinetické parametre PpNRH1 Y244A pre vybrané substráty. Meranie prebiehalo v prostredí zásobného pufru 200 mM Tris-HCl (pH 8,0).

Y244A			
Substrát	K_m (μM)	V_{lim} ($\text{nmol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	V_{lim}/K_m (relatívne)
Inozín	1268 ± 405	$59,1 \pm 16$	1
Xantozín	201 ± 25	12 ± 1	1,28
Adenozín	360 ± 65	$4,5 \pm 0,5$	0,27



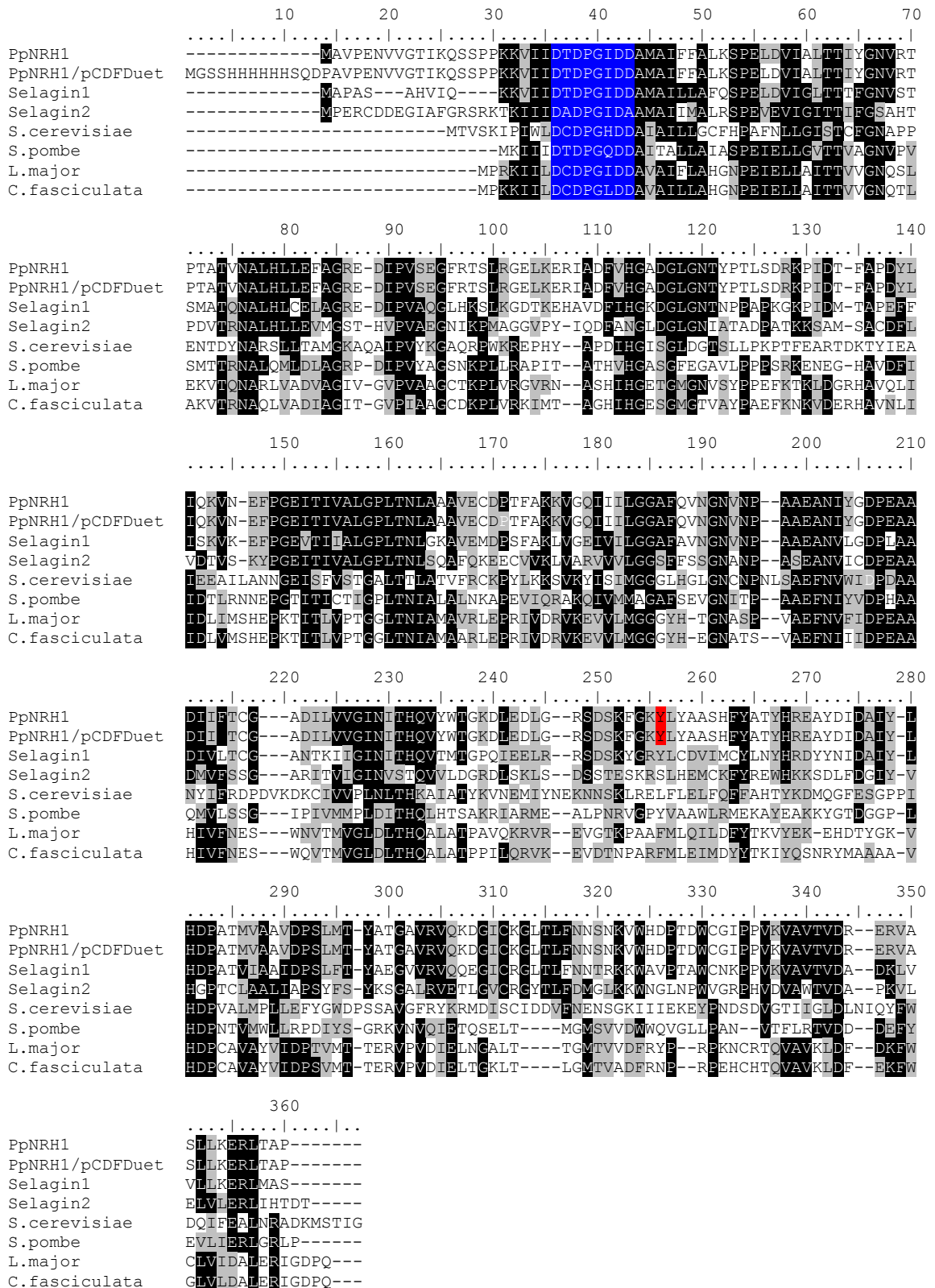
Obrázok 16. Saturačné krivky PpNRH1 so skúmanými substrátmi. A: PpNRH1 WT - inozín, B: PpNRH1 WT - xantozín, C: PpNRH1 WT - adenozín, D: PpNRH1 Y244A - inozín, E: PpNRH1 Y244A - xantozín, F: PpNRH1 Y244A - adenozín. Meranie prebiehalo v prostredí zásobného pufru 200 mM Tris-HCl (pH 8,0).

6 DISKUSIA

Táto bakalárska práva sa venuje charakterizácii NRH z machu mechúrovky odstávajúcej (*Physcomitrella patens*). V rámci práce bola vykonaná purifikácia a boli charakterizované kinetické a molekulové vlastnosti dvoch enzýmov: PpNRH1 (WT) a jeho mutantnej formy Y244A. Z bakteriálnej kultúry *E.coli* boli enzýmy extrahované pomocou lyzozýmu a následne prečistené pomocou afinitných chromatografických kolonií s imobilizovanými kobaltnatými iónmi. Použitím SDS-PAGE bola overená miera produkcie oboch proteínov v rozpustnej forme a ich čistota po purifikácii. Výsledná koncentrácia oboch proteínov bola 33,3 mg ml⁻¹ pre WT proteín a 24,7 mg ml⁻¹ pre Y244A proteín. Celkový výtazok proteínov po purifikácii z 200 ml kultúry bol 66,6 mg ml⁻¹ pre WT proteín a 49,4 mg ml⁻¹ pre Y244A proteín.

Použitím SDS-PAGE bola tiež stanovená približná molekulová hmotnosť monoméru skúmaných proteínov za denaturačných podmienok. Táto hmotnosť bola pre obe monomérmé formy približne 35 kDa. Na stanovenie molekulovej hmotnosti PpNRH1 v natívnom stave bola využitá gélová permeačná chromatografia. Bolo zistené, že proteín PpNRH1 sa vyskytuje prednostne ako dimér, aj keď malá časť je schopná tvoriť tetramér. Molekulová hmotnosť získaná z experimentu je 83 kDa pre dimér a 152 kDa pre tetramér. Vypočítaná hodnota molekulovej hmotnosti na základe sekvencie vrátane His-tagu sa líši, 75 kDa pre dimér a 150 kDa pre tetramér. Pre natívnu PpNRH1 bola taktiež stanovená teplotná stabilita. Enzým vykazoval teplotnú stabilitu do 40 °C, pri vyšších teplotách strácal aktivitu. Hodnota T_{50} 47,7 °C.

Na obrázku 17 je zobrazená rastlinná sekvencia PpNRH1 (WT) a sekvencia mutantnej formy Y244A s His-tagom na N-konci. Všetky NRH obsahujú aspartátový cluster sekvencie DXDXXXDD, nachádzajúci sa pri N-konci reťazca. Rastlinné sekvencie sa líšia od protozoálnych, kvasinkových, či bakteriálnych tým, že majú DTDPGIDD motív. Druhý a štvrtý aspartát sa podieľa na koordinácii vápenatého iónu v aktívnom mieste, tretí aspartát sa podieľa na väzbe 2-OH skupiny ribózy. Y244 je čiastočne konzervované rezíduum. V niektorých rastlinných sekvenciách sa na jeho mieste môže vyskytovať napríklad fenylalanín alebo tryptofán. Naopak, YbeK proteín z baktérie *E.coli* alebo NRH nachádzajúca sa v kvasinke *S. pombe* obsahujú rovnaký tyrozín.



Obrázok 17. Porovnanie sekvencie natívnej PpNRH1, rekombinantnej PpNRH1 s 6His-tagom na N-konci a ďalších vybraných organizmov(sekvencia NRH1 a 2 zo Selaginy, sekvencia NRH1 zo *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Leishmania major*, *Crithidia fasciculata*). Červenou je znázornené rezíduum Y244, miesto mutácie u študovanej formy Y244A. Modrou je znázornený motív unikátny pre NRH1 a ktorý sa podieľa na väzbe Ca²⁺ iónu a 2-OH skupiny ribózy.

Bola určená aj substrátová špecifita PpNRH1 a mutantnej formy Y244A. Aktivita oboch enzýmov bola testovaná s niekoľkými substrátmi (purínovými a pyrimidínovými ribozidmi) pri 200 μ M koncentrácii. Oba enzýmy preferujú inozín a xantozín (obrázok 15). Najväčší rozdiel medzi aktivitami enzýmov nastal v reakcii s adenosínom. WT hydrolyzuje adenosín len 3 % rýchlosťou voči inozínu, kým mutantná forma Y244A vykazuje rýchlosť až 22 % voči inozínu. Mutant tiež pri reakcii s uridínom a guanosínom vykazoval približne dvojnásobne väčšiu aktivitu (6 % pre uridín a 3 % pre guanosín voči inozínu) oproti WT (3 % pre uridín a 1% pre xantozín). Substrát cytidín nebol premieňaný ani jedným enzýmom. Všeobecne sú purínové nukleozidy uprednostňované študovaným enzýmom PpNRH1 (a jeho mutantnou formou Y244A) pred pyrimidínovými nukleozidmi. Na porovnanie, AtNRH1 uprednostňuje purínové nukleozidy, najmä uridín (Jung et al., 2009).

Z kinetických údajov (pomerov K_m/V_{lim}) v tabuľke 5 a 6 vyplýva, že WT-PpNRH1 preferuje hlavne inozín a xantozín. Enzým vykazuje veľmi malú aktivitu k adenosínu. Absencia rezídua v mutantnej forme Y244A vplyva na rýchlosť hydrolyzy inozínu, ktorá je asi päťkrát menšia ako pri WT. Taktiež tento mutant stráca afinitu k substrátom, pretože sa zvyšuje hodnota K_m . Platí to najmä pre substráty inozín a adenosín, ktoré majú substituent len na pozícii C6, zatiaľ čo xantozín môže niesť dva substituenty na pozíciách C2 a C6, takže strata Y244 nevedie k tak výraznému zníženiu schopnosti viazať substrát. Preto mutantná forma preferuje xantozín (na základe V_{lim}/K_m). Avšak mutácia výrazne znižuje rozdiel medzi V_{lim} pre adenosín (obsahujúci purínové jadro nesúce aminoskupinu) a inozín s xantozínom (obsahujúce purínové jadro nesúce oxoskupinu). Hodnota V_{lim} u NRH je podmienená stabilitou oxokarbeniového intermediátu (Versees a Steyaert., 2003). Zatiaľ čo pokles V_{lim} u Y244A proteínu oproti WT pre adenosín je len trojnásobný a pokles V_{lim} pre inozín päťnásobný, pokles V_{lim} pre xantozín je dvadsaťpäťnásobný. V porovnaní PpNRH1 s AtNRH1, AtNRH1 vykazuje niekoľkonásobne vyššiu rýchlosť hydrolyzy inozínu i adenosínu (kapitola 3.3.1).

7 ZÁVER

- V tejto bakalárskej práci boli v teoretickej časti zhrnuté poznatky o metabolizme purínových a pyrimidínových báz. Táto časť bola taktiež zameraná na popis nukleozid-N-ribohydroláz v rastlinách, ale aj v iných organizmoch, napríklad v baktériách, či protozoách.
- Experimentálna časť sa zaoberala purifikáciou rekombinantných proteínov PpNRH1 (WT) a mutantnej formy Y244A pomocou afinitnej chromatografie a oba enzýmy boli ďalej charakterizované z hľadiska molekulových vlastností a kinetických parametrov. Z výsledkov merania vyplynulo, že všeobecne sú purínové nukleozidy preferované študovaným enzýmom PpNRH1 (a jeho mutantnou formou Y244A) pred pyrimidínovými nukleozidmi. Ďalej bol študovaný vplyv rezídua Y244 na substrátovú špecifitu. Pre oba enzýmy a určité substráty boli stanovené kinetické konštanty K_m , V_{lim} a pomer V_{lim}/K_m .

8 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- Bonhomme S., Nogué F., Rameau C., Schaefer D.G. (2013) Usefulness of *Physcomitrella patens* for Studying Plant Organogenesis. *Methods in Molecular Biology* Volume 959, 2013, pp 21-43.
- Burch L.R. and Stuchbury T. (1986) Purification and properties of adenosine nucleosidases from tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots and leaves. *Journal of Plant Physiology* 125: 267-273.
- Campos A., Rijo-Johansen M.J., Carneiro M.F., Fevereiro P. (2005) Purification and characterisation of adenosine nucleosidase from *Coffea arabica* young leaves. *Phytochemistry* 66 (2): 147-151.
- Cove D. (2000) The moss, *Physcomitrella patens*. *Journal of Plant Growth Regulation* 19: 275-283.
- Cove D.J. and Knight C.D (1993) The Moss *Physcomitrella patens*, a Model System with Potential for the Study of Plant Reproduction, *The Plant Cell*, Vol. 5, 1483-1488
- Degano M., Gopaul D. N., Scapin G., Schramm V. L. and Sacchetini J. C. (1996) Three-dimensional structure of the inosine-uridine nucleoside N-ribohydrolase from *Crithidia fasciculata*. *Biochemistry*, 35,5971-5980.
- Edelhoch H. (1967) Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry* 6, 1948-1954.
- Estupiñán B., Schramm V. L. (1994) Guanosine- Inosine-preferring nucleoside N-glycohydrolase from *Crithidia fasciculata*. *The Journal of Biological Chemistry* 269, 23068-23073.
- Frahm, J-P., W. Frey (2007) *Moosflora*. Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Giabbai B. and Degano M. (2004) Crystal Structure to 1.7Å of the *Escherichia coli* Pyrimidine Nucleoside Hydrolase YeiK, a Novel Candidate for Cancer Gene Therapy. *Structure*, Volume 12, Issue 5, 739-749.
- Guranowski A. and Schneider Z. (1977) Purification and characterization of adenosine nucleosidase from barley leaves. *Biochimica et Biophysica Acta* 482: 145-158.
- Hanson A.D. and Gregory J.F. (2002) Synthesis and turnover of folates in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 244-249.
- Herz S., Eberhardt S., Bacher A. (2000) Biosynthesis of riboflavin in plants. The ribA gene of *Arabidopsis thaliana* specifies a bifunctional GTP cyclohydrolase II/3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase. *Phytochemistry* 53, 723-731.
- Chen C.M. and Kristopeit S.M. (1981) Metabolism of cytokinin: deribosylation of cytokinin ribonucleoside by adenosine nucleosidase from wheat germ cells. *Plant Physiology* 68: 1020-1023.

- Chen M. and Thelen J. J. (2011) Plastid uridine salvage activity is required for photoassimilate allocation and partitioning in Arabidopsis. *Plant Cell* 23: 2991-3006.
- Imagawa H., Yamano H., Inoue K., Takino Y. (1979) Purification and properties of adenosine nucleosidase from tea leaves. *Agricultural Biology and Chemistry* 43 (11): 2337-2342.
- Jung B., Florchinger M., Kunz H.H., Traub M., Wartenberg R., Jeblick W., Neuhaus H.E., Mohlmann T. (2009) Uridine-Ribohydrolase Is a Key Regulator in the Uridine Degradation Pathway of Arabidopsis. *Plant Cell* 21, 876-891.
- Jung B., Hoffmann C., Mohlmann T. (2011) Arabidopsis nucleoside hydrolases involved in intracellular and extracellular degradation of purines. *Plant J.* 65, 703-711.
- Kurtz J.E., Exinger F., Erbs P., Jund R. (2002) The *URH1* uridine ribohydrolase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* 41: 132-141.
- Mainguet S.E., Gakière B., Majira A., Pelletier S., Bringel F., Guérard F., Caboche M., Berthomé R. and Renou J.P. (2009) Uracil salvage is necessary for early Arabidopsis development. *The Plant J.* 60: 280–291.
- Moffatt B.A. and Ashihara H. (2002) Purine and pyrimidine nucleotide synthesis and metabolism. *The Arabidopsis Book* 1 published by American Society of Plant Biologists.
- Muzzolini L., Versées W., Paola Tornaghi P., Van Holsbeke E., Steyaert J., Degano M. (2006) New Insights into the Mechanism of Nucleoside Hydrolases from the Crystal Structure of the *Escherichia coli* YbeK Protein Bound to the Reaction Product. *Biochemistry* 45, 773-782.
- Pace C.N., Vajdos F., Fee L., Grimsley G., and Gray T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* 11, 2411-2423.
- Parkin D. W. (1996) Purine-specific nucleoside *N*-ribohydrolase from *Trypanosoma brucei brucei*. Purification, specificity, and kinetic mechanism. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 21713-21719.
- Parkin D. W., Horenstein B. A., Abdulah D. R., Estupiñán B. and Schramm V. L. (1991) Nucleoside hydrolase from *Crithidia fasciculata*. Metabolic role, purification, specificity, and kinetic mechanism. *The Journal of Biological Chemistry* 266, 20658-20665.
- Petersen C. and Møller L.B. (2001) The RihA, RihB, and RihC ribonucleosidehydrolases of *Escherichia coli*. Substrate specificity, gene expression, and regulation. *The Journal of Biological Chemistry* 2001, 276:884-894.
- Rensing S.A., Lang D., Zimmer A.D., Terry A., Salamov A., Shapiro H., Nishiyama T., Perroud P.F., Lindquist E.A., Kamisugi Y., Tanahashi T., Sakakibara K., Fujita T.,

- Oishi K., Shin-I T., Kuroki Y., Toyoda A., Suzuki Y., Hashimoto S., Yamaguchi K., Sugano S., Kohara Y., Fujiyama A., Anterola A., Aoki S., Ashton N., Barbazuk W.B., Barker E., Bennetzen J.L., Blankenship R., Cho S.H., Dutcher S.K., Estelle M., Fawcett J.A., Gundlach H., Hanada K., Heyl A., Hicks K.A., Hughes J., Lohr M., Mayer K., Melkozernov A., Murata T., Nelson D.R., Pils B., Prigge M., Reiss B., Renner T., Rombauts S., Rushton P.J., Sanderfoot A., Schween G., Shiu S.H., Stueber K., Theodoulou F.L., Tu H., Van de Peer Y., Verrier P.J., Waters E., Wood A., Yang L.X., Cove D., Cuming A.C., Hasebe M., Lucas S., Mishler B.D., Reski R., Grigoriev I.V., Quatrano R.S., Boore J.L. (2008) The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* 319, 64-69.
- Ribeiro J.M. and Valenzuela J.G. (2003) The salivary purine nucleosidase of the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33: 13-22.
- Shi W., Schramm V. L. and Almo S. C. (1999) Nucleoside hydrolase from *Leishmania major*. Cloning, expression, catalytic properties, transition state inhibitors, and the 2.5-Å crystal structure. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 21114-21120.
- Schaefer D.G. (2002) A new moss genetics: targeted mutagenesis in *Physcomitrella patens*. *Annual Review of Plant Biology* 53: 477-501.
- Schoor S. and Moffatt B.A. (2004). Applying high throughput techniques in the study of adenosine kinase in plant metabolism and development. *Front. Biosci.* 9:1771–81.
- Song C.J., Steinebrunner I., Wang X., Stout S.C., Roux S.J. (2006) Extracellular ATP induces the accumulation of superoxide via NADPH oxidases in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 140: 1222-1232.
- Stasolla C., Katahira R., Thorpe T.A., Ashihara H. (2003) Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants. *J. Plant Physiol.* 160, 1271-1295.
- Turčinov H., 2011. Identifizierung und charakterisierung der Ribohydrolase-(RH)-Familie aus dem Laubmoos *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. und ihr funktionelle *knockout*. Department Biologie der Fakultät Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften. Universität Hamburg, Hamburg.
- Verseés W. and Steyaert J. (2003) Catalysis by nucleoside hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology* 13: 731-738.
- Verseés W., Decanniere K, Pelle R., Depoorter J., Brosens E, Parkin D.W., Steyaert J. (2001) Structure and function of a novel purine specific nucleoside hydrolase from *Trypanosoma vivax*. *Journal of Molecular Biology* 307: 1363-1379.
- Verseés W., Van Holsbeke E., De Vos S., Decanniere K., Zegers I., Steyaert J. (2003) Cloning, preliminary characterization and crystallization of nucleoside hydrolases from *Caenorhabditis elegans* and *Campylobacter jejuni*. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography* 59: 1087-1089.

- Zalkin H., Nygaard P.P. (1996) Biosynthesis of purine nucleotides. In: F.C. Neidhardt *et al.* (ed.) *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington: 561-579.
- Zrenner R., Stitt M., Sonnewald U., Boldt R. (2006) Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *The Annual Review of Plant Biology* 57: 805-836.