

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Sledování účinku iontů kovů na aktivitu deaminas

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Daniel Karas
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Hana Pospíšilová, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	14.05.2010

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne

Daniel Karas

Děkuji Mgr. Haně Pospíšilové, Ph.D. za odborné vedení, veškeré rady a za vždy vstřícný přístup. Mé poděkování patří také kolegům a pracovníkům Oddělení Molekulární biologie a Katedry biochemie UP za poskytnuté rady a příjemnou atmosféru. Dále bych chtěl také poděkovat Ing. Davidu Mildemu, Ph.D. za umožnění měření na atomovém absorpčním spektroskopu.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Daniel Karas
Název práce	Sledování účinku iontů kovů na aktivitu deaminas
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Hana Pospíšilová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2010
Abstrakt	<p>Adenindeaminasa katalyzuje hydrolytické štěpení adeninu na hypoxanthin a amoniak. Geny pro adenindeaminasy byly nalezeny u prokaryot a nižších eukaryot, jako jsou například kvasinky nebo prvoci. Kvasinkové adenindeaminasy jsou více podobné prokaryotickým i eukaryotickým adenosindeaminasám než prokaryotickým adenindeaminasám. Adenindeaminasa <i>Schizosaccharomyces pombe</i> byla exprimována v <i>Escherichia coli</i> a u purifikovaného enzymu bylo sledováno působení různých kovových iontů na aktivitu enzymu. Jelikož použitá adenindeaminasa patří mezi metalo-dependentní hydrolasy, lze předpokládat, že přítomnost či nepřítomnost určitého kovového iontu v určité koncentraci bude silně ovlivňovat enzymatickou aktivitu. Bylo zjištěno, že pro stabilitu enzymu jsou důležité jednomocné kovy v optimální koncentraci, zatímco dvojmocné kovy (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+} a Cu^{2+}) aktivitu výrazně snižují, případně enzym denaturují (Hg^{2+}). Na základě homologie kvasinkové adenindeaminasy s myší adenosindeaminasou byl predikován zinek jako kov nutný pro aktivitu metaloproteinu a pomocí atomové absorpční spektroskopie bylo potvrzeno, že studovaný enzym obsahuje jeden atom zinku na molekulu enzymu.</p>
Klíčová slova	Adenindeaminasa, adenosindeaminasa, metaloprotein, aktivita enzymu
Počet stran	41
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Daniel Karas
Title	Monitoring of the effect of metal ions on the activity of deaminases
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	Mgr. Hana Pospíšilová, Ph.D.
The year of presentation	2010
Abstract	Adenine deaminase catalyzes the hydrolytic cleavage of adenine to produce hypoxanthine and ammonia. Adenine deaminase genes have been found in prokaryotes and lower eukaryotes such as yeast or protozoa. Prokaryotic and eukaryotic adenosine deaminases are more similar to yeast adenine deaminase than prokaryotic adenine deaminases. <i>Schizosaccharomyces pombe</i> adenine deaminase was expressed in <i>Escherichia coli</i> and for purified enzyme was examined effect of various metal ions on enzyme activity. Since used adenine deaminase belongs among metal-dependent hydrolases, could be assumed, that enzymatic activity will be strongly influenced by absence or presence of certain metal ion at the specific concentration. Has been found, that for the stability of enzyme are important monovalent metals at the optimal concentration, while in the presence of divalent metals (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} a Cu^{2+}), enzyme activity is significantly reduced or enzyme denaturation is detected (Hg^{2+}). Based on the homology of yeast adenine deaminase with mice adenosine deaminase, zinc has been predicted as a metal required for metalloprotein activity. By atomic absorption spectroscopy has been confirmed that the studied enzyme contains one zinc atom per molecule of enzyme.
Keywords	Adenine deaminase, adenosine deaminase, metalloprotein, enzyme activity
Number of pages	41
Number of appendices	0
Language	Czech

1	Cíle práce	- 7 -
2	Teoretická část.....	- 8 -
2.1	Úvod	- 8 -
2.2	Amidohydrolasy	- 8 -
2.2.1	Obecné vlastnosti amidohydrolas	- 8 -
2.2.2	Chemické reakce a mechanismus působení.....	- 8 -
2.2.3	Dvojmocné kovové centrum	- 10 -
2.2.4	„β-barely“, smyčky a aktivní místa.....	- 13 -
2.2.5	Významní zástupci nadrodiny amidohydrolas	- 14 -
2.3	Adenindeaminasy	- 16 -
2.3.1	Obecné informace o adenindeaminasach.....	- 16 -
2.3.2	Proteinová struktura adenindeaminas	- 17 -
2.3.3	Srovnání adenindeaminas nižších eukaryot a prokaryot.....	- 18 -
2.4	Adenosindeaminasy.....	- 19 -
2.4.1	Obecné informace o adenosindeaminasach	- 19 -
2.4.2	Proteinová struktura adenosindeaminas.....	- 21 -
2.4.3	Srovnání adenosindeaminas.....	- 21 -
3	Experimentální část.....	- 23 -
3.1	Použitý materiál a přístroje.....	- 23 -
3.2	Metody.....	- 24 -
3.2.1	Složení kultivačního LB média.....	- 24 -
3.2.2	Kultivační podmínky a exprese rekombinantní adenindeaminasy.....	- 24 -
3.2.3	Purifikace rekombinantní adenindeaminasy	- 24 -
3.2.4	Složení sekundárních dialyzačních pufrů	- 25 -
3.2.5	Stanovení koncentrace rekombinantní adenindeaminasy	- 26 -
3.2.6	Měření aktivity rekombinantní adenindeaminasy.....	- 26 -
3.2.7	Atomová absorpční spektroskopie.....	- 27 -
3.3	Výsledky a diskuze.....	- 27 -
3.3.1	Vliv dialyzačního pufru na aktivitu deaminasy	- 27 -
3.3.2	Vliv reakčního pufru na aktivitu deaminasy	- 29 -
3.3.3	Predikce a stanovení kovu přítomného v kvasinkových deaminasach	- 30 -
4	Závěr	- 32 -
5	Seznam použité literatury.....	- 33 -
6	Seznam použitých zkratk.....	- 40 -

1 Cíle práce

- Literární rešerše popisující adenindeaminasy a adenosindeaminasy
- Vzájemné porovnání adenindeaminas a adenosindeaminas dle adenosindeaminasy z *Mus musculus*
- Exprese a purifikace rekombinantní adenindeaminasy
- Sledování účinku různých kovových iontů na aktivitu kvasinkové adenindeaminasy
- Ověření přítomnosti a stanovení množství zinku u kvasinkové adenindeaminasy pomocí atomové absorpční spektroskopie

2 Teoretická část

2.1 Úvod

Dle enzymové komise (Enzyme Commission) patří 44 enzymů do skupiny aminohydrolas a z toho 25 je klasifikováno jako deaminasy (Pospíšilová & Frébort, 2007). Aminohydrolasy jsou hydrolytické enzymy odštěpující aminoskupinu a jsou klasifikovány EC číslem 3.5.4. EC 3 je zařazuje mezi hydrolasy, EC 3.5 je specifikuje jako enzymy štěpící nepeptidickou vazbu mezi uhlíkem a dusíkem. V pořadí třetí číslo v klasifikaci dle enzymové komise obecně enzymy určuje ještě více, zařazuje je do tzv. podpodtřídy enzymů. Enzymy s označením EC 3.5.1 se účastní reakcí na lineárních amidech, enzymy s EC 3.5.2 na amidech cyklických, enzymy s EC 3.5.3 na lineárních amidinech, enzymy s EC 3.5.4 na amidinech cyklických a označují se aminohydrolasy, enzymy s EC 3.5.5 operují na nitrilech a nakonec enzymy s EC 3.5.99 na ostatních sloučeninách (NC-IUBMB). Obecně platí, že první číslo zařazuje enzymy do třídy, druhé do podtřídy a třetí do podpodtřídy a dohromady tato tři čísla popisují typ chemické transformace vykonávané enzymem. Pro označení enzymu existuje ještě čtvrté číslo v pořadí, které udává substrátovou specifitu (Andreini et al., 2008). Zástupci této skupiny enzymů jsou například deaminasy hydrolyzující adenin, adenosin, AMP, ADP, cytosin, cytidin a guanin, které hrají důležitou roli v metabolismu nukleových kyselin (Murray, 1971).

2.2 Amidohydrolasy

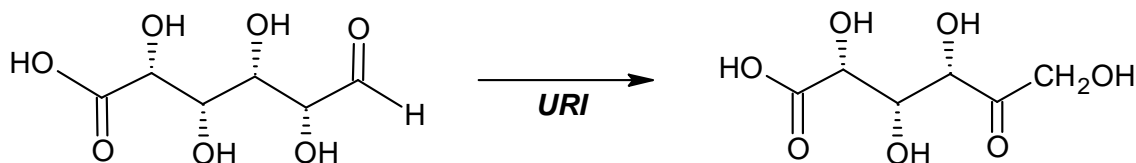
2.2.1 Obecné vlastnosti amidohydrolas

Amidohydrolasy tvoří významnou skupinu enzymů, která je pojmenována na základě charakteristických strukturních znaků. Tyto enzymy katalyzují hydrolyzu široké škály substrátů s amidovou nebo esterovou funkční skupinou na uhlíku nebo fosforu. Hlavním strukturním znakem této skupiny převážně hydrolytických enzymů je mononukleární nebo binukleární kovové centrum vymezené „(β/α)₈-barelem“. U všech reakcí katalyzovaných amidohydrolasami je nukleofilní molekula vody aktivována komplexací s mononukleárním nebo binukleárním kovovým centrem. Pro celkovou katalytickou aktivitu enzymu má potom kovové centrum dvojí funkci, a to aktivaci štěpitelné vazby a deprotonaci molekuly vody na lepší nukleofil. Počátek objevu této skupiny enzymů můžeme datovat na rok 1997 a v dnešní době zde řadíme více než tisíc enzymů. V současnosti je u asi 16 různých enzymů známá struktura ve vysokém rozlišení získaná pomocí rentgenostrukturní analýzy (Seibert & Raushel, 2005).

2.2.2 Chemické reakce a mechanismus působení

Z 16 amidohydrolas dostupných v proteinové databázi (PDB) nebyly pouze 3 charakterizovány

z hlediska chemických reakcí. Jsou to 2 enzymy z *Thermotoga maritima* a PTE homologní protein (PHP) z *Escherichia coli* (Buchbinder et al., 1998). Zbývající enzymy katalyzují hydrolytické reakce, kromě uronátisomerasy (URI), která katalyzuje aldosovou/ketosovou isomeraci mezi D-glukuronátem a D-frukturonátem (Obr.1) (Schwarzenbacher et al., 2003).



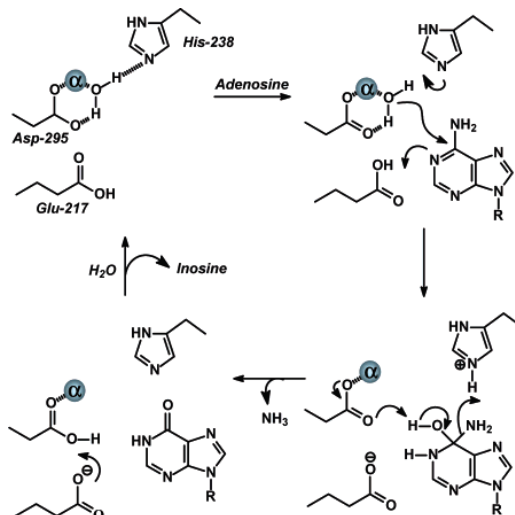
Obrázek 1 – Schéma aldosové izomerace D-glukuronátu na D-frukturonát za katalýzy uronátisomerasou.

Obecně amidohydrolasy katalyzují reakce aminokyselin, sacharidů, nukleových kyselin a organofosfátových esterů. Rentgenostrukturní analýzou bylo strukturně charakterizováno sedm variant specifických aminokyselinových kovových ligandů. U binukleárních kovových center jsou karbonylová a fosforylová skupina polarizovány prostřednictvím katalýzy Lewisovou kyselinou pomocí komplexace s β -kovovým iontem, zatímco molekula solventu je pro napadení nukleofilem aktivována interakcí s α -kovovým iontem. U mononukleárních kovových center je substrát aktivován přenosem protonů z aktivního místa a molekula vody je aktivována vazbou kovu a obecnou bazickou katalýzou. Kovová centra se nacházejí v C-terminálním konci „ β -barelového“ jádra uvnitř „ $(\beta\alpha)_8$ domény“. Pestrost substrátů je dána konformačními omezeními vytvořenými osmi smyčkami táhnoucími se od konců osmi β -vláken (Seibert & Raushel, 2005).

U některých amidohydrolas byly prvky mechanismu katalytické reakce detailně prozkoumány. Nejlépe zdokumentována je katalýza dihydroorotasy (DHO) z *E. coli* (Thoden et al., 2001; Aubert et al., 2004). Krystalová struktura byla vyřešena v přítomnosti karbamoylaspartátu při pH, kdy termodynamická rovnovážná konstanta mezi dihydroorotasou a karbamoylaspartátem je téměř ve shodě (Thoden et al., 2001). DHO je dimer a na základě znalosti krystalové struktury víme, že se substrát a produkt neváží uvnitř dimerního proteinu ke stejné, ale k odlišné monomerní jednotce (Seibert & Raushel, 2005).

Reakční mechanismus katalytické reakce byl detailně popsán i u enzymu adenosindeaminasy (ADA) (Wang & Quioco, 1998; Wilson et al., 1991). Adenosindeaminasa má mononukleární kovové centrum tzv. subtypu III (viz 2.2.3) a reakce, kterou katalyzuje je příklad nukleofilní aromatické substituce vodou. U kovových center subtypu III je samostatný kovový iont v pozici M_α . V takovýchto případech je histidin z vlákna 5 koordinován se samotným kovovým iontem za účasti dvou histidinů z vlákna 1 a aspartátu z vlákna 8. Histidin z vlákna 6 zřejmě odděluje proton z molekuly vody vázané v kovovém centru. Vznikající hydroxid napadá aromatický kruh za vzniku tetraedrického meziprojektu. Tato reakce je aktivována dodáním protonu z glutamátu nacházejícího se 3 residua za konzervovaným

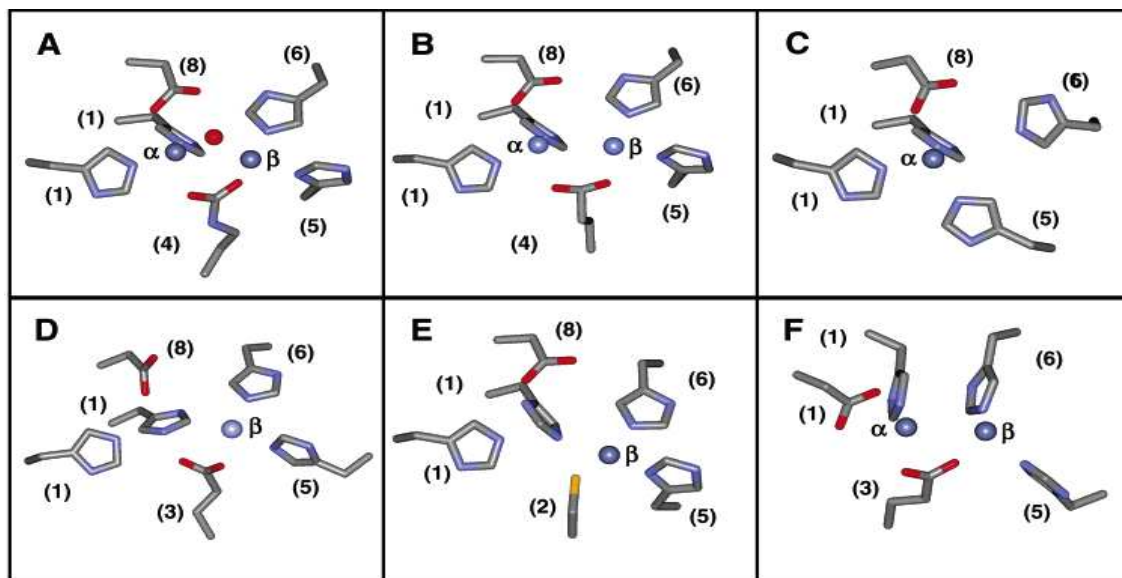
histidinem z vlákna 5. Tento „HxxE“ motiv na konci vlákna 5 se nachází ve všech známých amidohydrolasach, které katalyzují nukleofilní aromatické substituce, kromě adenosindeaminasy. Rozpad tetraedrického meziproductu je usnadněn dodáním protonu z protonovaného histidinu vlákna 6 a přenosem protonu z karbinolu na aspartát z vlákna 8 nebo glutamát z vlákna 6. Reakční mechanismus adenosindeaminasy můžeme vidět na Obr.2 (Seibert & Raushel, 2005).



Obrázek 2 – Reakční mechanismus adenosindeaminasy (Seibert & Raushel, 2005).

2.2.3 Dvojmocné kovové centrum

U amidohydrolas se setkáváme se sedmi subtypy dvojmocného kovového centra, které jsou označovány římskými čísly v pořadí I – VII. Nejčastěji se vyskytujícím centrem je subtyp I, který je tvořen dvěma dvojmocnými kovy (Zn a Ni). Tyto kovy jsou vázány k šesti aminokyselinám proteinu skrze elektrostatické interakce. Podobný je subtyp II, který však obsahuje pouze zinek. Dvojmocné kovové centrum subtypu III se nachází u adenosindeaminasy (ADA) a cytosindeaminasy (CDA) a obsahuje v aktivním místě pouze jediný kovový iont (Seibert & Raushel, 2005). Je zajímavé, že i když adenosindeaminasa i cytosindeaminasa katalyzují velmi podobné chemické reakce, ADA je enzym, jehož aktivita je závislá na přítomnosti zinku (Wilson et al., 1991), zatímco CDA vyžaduje pro katalytickou aktivitu přítomnost železa (Porter & Austin, 1993). Subtyp IV je zastoupen amidohydrolasou *N*-acetylglukosamin-6-fosfátdeacetylase (AGD), která má v aktivním místě stejně jako CDA mononukleární železné centrum. Železo je zde vázáno třemi aminokyselinami postranního řetězce „β-barelu“. Na kovový iont jsou zde také vázány dvě molekuly vody. Deacetylase *D*-aminokyselin (DAA) zastupuje subtyp V. Tento subtyp je charakterizován opět přítomností zinku v aktivním místě, stejně jako je tomu u subtypu VI, kam řadíme např. ledvinnou dipeptidase (RDP). Do posledního subtypu (subtypu VII) můžeme zařadit uronátisomerase (URI). Tato skupina enzymů není plně charakterizována (Schwarzenbacher et al., 2003). Přehled sybtypů viz Obr.3.



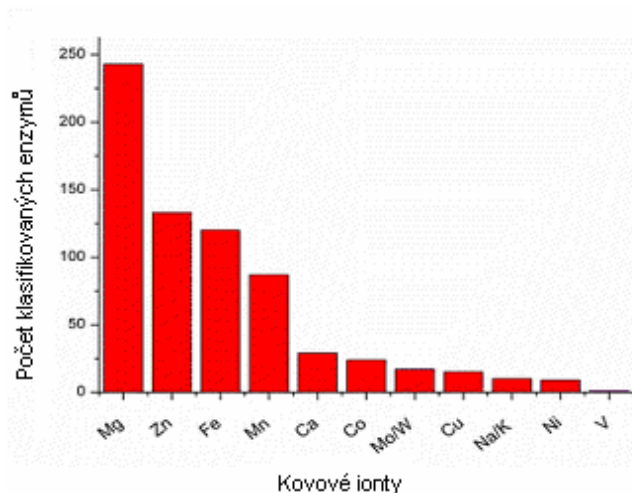
Obrázek 3 – Šest variant vazeb jednoho nebo dvou dvojmocných kovů v aktivním místě různých amidohydrolas /A – subtyp I, B – subtyp II, C – subtyp III, D – subtyp IV, E – subtyp V, F – subtyp VI/. Modré kuličky označují kovové ionty (Seibert & Raushel, 2005).

Ve skupině amidohydrolas, u kterých je dostupná krystalová struktura, můžeme dále nalézt velké množství nejrůznějších residuů, sekundárních kovových ligandů, které jsou vázány vodíkovými vazbami nebo iontově s primárním ligandem kovu. Takovéto vazby jsou zřetelné zejména u několika enzymů subtypu I s binukleárním kovovým centrem. (Seibert & Raushel, 2005).

2.2.3.1 Úloha kovových iontů v enzymech

Okolo 1/3 všech enzymů využívá interakce s kovem pro katalýzu. Funkce těchto proteinů, nazvaných příznačně metaloproteiny, je založena na interakci mezi proteiny a vázanými kovy (Tainer et al., 1991; Degtyarenko, 2000). Nejhojněji se vyskytujícím kovem u strukturně charakterizovaných proteinů je zinek a často se také vyskytuje železo, hořčík a vápník (Shi & Chance, 2008). Metaloproteiny jsou jedny z nejrozmanitějších proteinů, které obsahují kovové ionty vázané koordinačně kovalentní vazbou zajišťující katalytickou, regulační a strukturní roli důležitou pro funkci proteinů (Degtyarenko, 2000).

V rámci všech známých enzymů je nejrozšířenějším kovem hořčík (Obr.4), díky úloze esenciálního partnera substrátů obsahujících fosfát, jako je ATP, které se v buňkách vyskytuje převážně jako komplex s Mg^{2+} (Luthi et al., 1999).



Obrázek 4 – Výskyt kovových iontů v enzymech známé struktury (Andreini et al., 2008).

Vazba Mg^{2+} s fosfátem je důležitá u některých klíčových biologických molekul jako jsou například DNA nebo RNA. Uvnitř buněk je hladina hořčíku udržována v poměrně vysokých (milimolárních) koncentracích. Hořčík je dále značně využíván k elektrostatické stabilizaci a elektrofilní aktivaci substrátů skrze polarizaci vazeb mezi fosforem a kyslíkem nebo uhlíkem a kyslíkem.

Převažujícím redoxním kovem v biologických systémech je železo, které je převážně součástí kofaktorů. Přirozeně se železo vyskytuje ve dvou oxidačních stavech, +2 a +3, ovšem u enzymových mechanismů se může nacházet i ve vyšších (+4) a nižších (+1) oxidačních stavech. Železo, stejně jako jiné kovy, například měď, má schopnost vázat koordinačně kyslík. V některých takových enzymech, například methanmonooxygenase, se nachází jako biželezné ($Fe^{2+} - Fe^{2+}$) centrum (Andreini et al., 2008).

Zinek je po hořčíku druhý nejhojněji vyskytující se kov v enzymech (opět v rámci všech známých enzymů) (Obr.4). Důvodem intenzivního výzkumu působení zinku v enzymové katalýze jsou jeho charakteristické vlastnosti, jako je stabilita v oxidačním stavu +2 a netečnost k redoxním reakcím (Andreini et al., 2008).

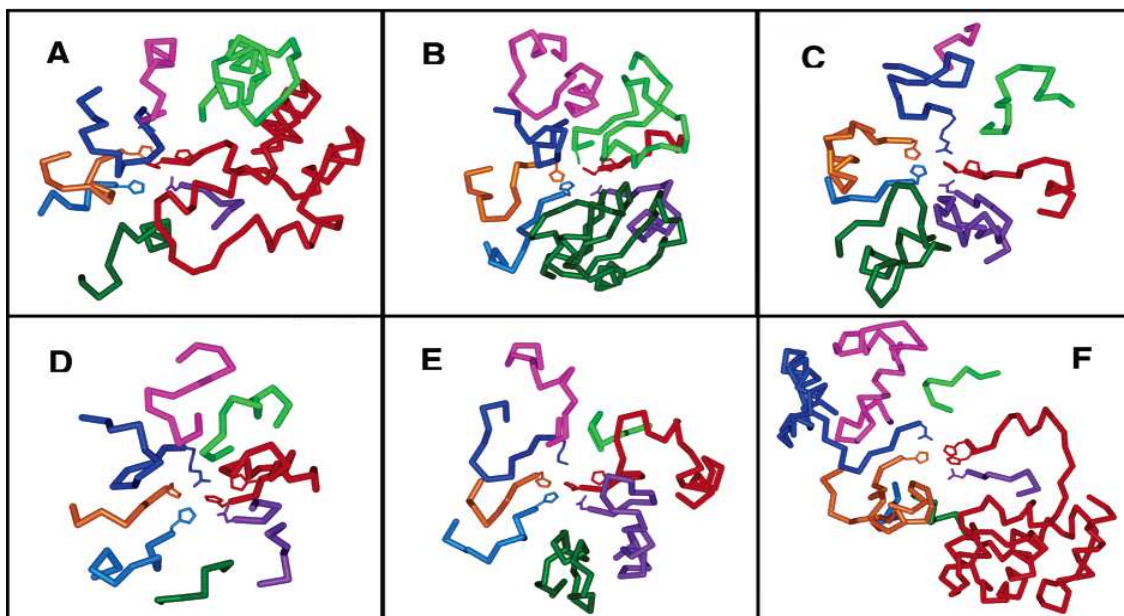
Zinek hraje významnou roli tvorbou hydroxidového iontu pro napadení substrátu (Vallee & Auld, 1990). V některých enzymech se zinek podílí jak na tvorbě atakujícího nukleofilu, tak při zvyšování elektrofility napadeného substrátu skrze polarizace vazeb mezi fosforem a kyslíkem nebo uhlíkem a kyslíkem (Andreini et al., 2008). Příkladem enzymu vykonávajícího obě funkce je karboxypeptidasa A (Christianson & Lipscomb, 1989), thermolysin (Matthews, 1988) a pravděpodobně i matrixové metaloproteiny (Bertini et al., 2006). V ostatních případech je toto zajištěno binukleárním místem, ve kterém jeden (např. alkalická fosfatasa) nebo oba (např. aryldialkylfosfatasa (Aubert et al., 2004) a bakteriální leucyl aminopeptidasa (Chen et al., 1997)) ionty zinku přispívají k aktivaci vody, která spojuje tyto dva kovy a pouze jeden ion se uplatňuje při vazbě a aktivaci substrátu. Zinek je v enzymech

vždy zapojen ve vazbě substrátu a může mít koordinační číslo od 4 (tetraedr) do 6 (Andreini et al., 2008).

2.2.4 „ β -barely“, smyčky a aktivní místa

U amidohydrolas je „ β -barel“ tvořen interakcí osmi β -vláken způsobem obdobným jako u proteinů zvaných „ $(\beta\alpha)_8$ -barelové“ proteiny (Holm & Sander, 1997). Na C-konci „ β -barelu“ se kov-vázající residua formující jádro mononukleárního či binukleárního kovového centra od sebe v rámci nadrodiny amidohydrolas pouze lehce odchyľují (Seibert & Raushel, 2005).

Navzdory silně strukturně konzervovaným „ β -barelům“ a α -helixům, je osm smyček, které se nacházejí ihned za kov-vázajícími residui β -vláken, výrazně variabilních ve složení, délce a prostorovém uspořádání, díky čemuž připomínají hypervariabilní regiony v protilátkách. Tyto úseky jsou lokalizovány až po N-konce tvořené α -helixy (Obr.5).



Obrázek 5 – Konformační rozmanitost mezi smyčkami, které následují osm β -vláken „ β -barelů“ amidohydrolas /barvy smyček: 1 - červená, 2 - purpurová, 3 - tmavě zelená, 4 - světle modrá, 5 - oranžová, 6 - tmavě modrá, 7 - růžová, 8 - světle zelená; enzymy: A - adenosindeaminasa, B - deacetylase D-aminokyselín, C - dihydroorotasa, D - D-isospartylidipeptidasa, E - fosfotriesterasa, F - uronátisomerasa/ (Seibert & Raushel, 2005).

Všechny tyto smyčky vykazují významnou rozdílnost v délce. U strukturně charakterizovaných amidohydrolas je pouze 18 ze 64 smyček v kontaktu se substrátem, produktem či inhibitorem ve strukturách, které obsahují malé molekuly vázané v aktivním místě (Seibert & Raushel, 2005).

Přístupy do aktivních míst u některých enzymů vyžadují konformační změny, například ADA a CDA mají relativně velké substráty, ovšem žlábký pro vstup do jejich aktivního místa jsou malé. U ADA i CDA má přímý kontakt se substrátovými analogy smyčka 1. U ADA působí jako regulátor vstupu substrátu do aktivního místa Trp 117. Omezený přístup do

aktivního místa svědčí o tom, že katalytická přeměna mezi substrátem a produktem musí být oddělena od solventu. U iso-aspartyldipeptidasy jsou smyčky 1 – 4 v přímém kontaktu se substrátem (aspartátem). Při nedostatku aspartátu jsou residua, která kryjí aktivní místo velmi pohyblivá a pravděpodobně neblokují vstup dipeptidů. U dihydroorotasy je produkt (dihydroorotát) vázán na jednu podjednotku, zatímco substrát (karbamoyl-aspartát) je vázán na sousední podjednotku uvnitř stejného dimerního komplexu (Thoden et al., 2001). Největší rozdíl v konformaci mezi dvěma podjednotkami se nachází ve smyčce 4. Tyto změny v orientaci smyčky 4 zprostředkovávají katalytickou přeměnu mezi substrátem a produktem.

Mnoho proteinů váže substrát prostřednictvím smyček 6, 7 a 8. U všech amidohydrolas se setkáváme se základní stavbou aktivního místa vytvořenou pro produkci a dodání hydroxidu (nukleofilu) k akceptorovému substrátu. Strukturní motivy pro aktivaci hydrolytické molekuly vody jsou vysoce konzervované, na druhou stranu součástí aktivního místa, která přispívá pomocí smyček k přesnému vymezení substrátové specifity, vykazuje značnou variabilitu (Seibert & Raushel, 2005).

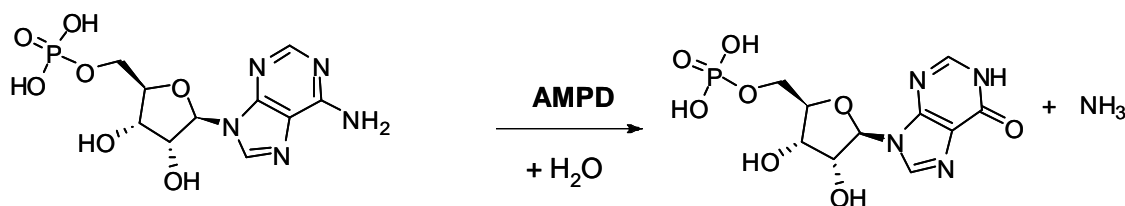
2.2.5 Významní zástupci nadrodiny amidohydrolas

2.2.5.1 Allantoinasa

Allantoinasa je významný enzym skupiny amidohydrolas, který hraje klíčovou roli v biosyntéze a degradaci ureidů, tím, že katalyzuje změnu (*S*)-allantionu na allantoát (Kim et al., 2009). Allantoát je dále odbouráván na amoniak a glyoxylát tříkrokovou enzymovou katalýzou (Todd et al., 2006; Smith & Atkins, 2002). Allantoin a allantoát, souhrnně nazývané ureidy, mají nezbytnou funkci v asimilaci, uskladňování a transportu dusíku. Allantoinasa z *E. coli* je homotetramer, kde každý monomer obsahuje dvě domény: „pseudotriosafosfát-isomerasový barel“ a β -list. Stejně jako u ostatních amidohydrolas je i u allantoinasy zachováno binukleární kovové centrum v aktivním místě, které je lokalizované uvnitř záhybu „barelu“ (Kim et al., 2009). Strukturní analýza ukázala, že kovové ionty v aktivním místě váží jeden hydroxid a šest aminokyselin, které jsou zachovány i u allantoinas jiných organismů. Funkční analýza ukázala nezbytnost zinku v aktivním místě pro schopnost katalýzy a enantioselektivity substrátu. Pro enzymovou aktivitu jsou rozhodující kovová centra a rovněž Asn 94 a Ser 317 v aktivním místě (Kim et al., 2009).

2.2.5.2 AMP-deaminasa

AMP-deaminasa (AMP-aminohydrolasa, AMPD, EC 3.5.4.6) je tetramerní enzym katalyzující deaminaci AMP v pozici 6 adeninového kruhu na IMP a amoniak (Obr.6), a hrající důležitou roli v katabolismu adenylátu.



Obrázek 6 – Katalytická reakce AMP-deaminasy.

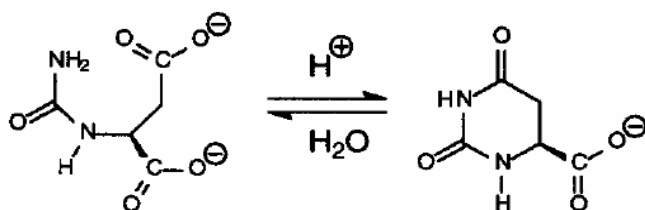
AMP-deaminasy patří spolu s adenindeaminasami a adenosindeaminasami do skupiny metalo-dependenčních hydrolas obsahujících konzervovanou doménu cd01319. AMPD se nachází u nižších (askomycety, prvoci) i vyšších (rostliny, savci) eukaryot. U vyšších eukaryot se AMPD nachází v isoformách L, M, E1 a E2 (Ogasawara et al., 1982). U prokaryot se místo AMPD nachází enzym AMP-nukleosidasa (EC 3.2.2.4) katalyzující hydrolyzu AMP na adenin a ribosa-5'-fosfát. Při porovnání aminokyselinové sekvence AMP-nukleosidasy s kvasinkovou AMP-deaminasou byla nalezena oblast, ve které je šest z osmi aminokyselin identických, ale žádná jiná homologie se zde nenachází (Leung et al., 1989).

AMP-deaminasa se nachází také v rostlinách. AMP-deaminasová aktivita byla nalezena v extraktech buněk *Catharanthus roseus* (Yabuki & Ashihara, 1991) a *Arabidopsis thaliana*, kde byla také dále studována (Xu et al., 2005).

Rostlinná AMP-deaminasa je na rozdíl od výše popsaných enzymů funkční dimer a uplatňuje se zejména během embryogeneze.

2.2.5.3 Dihydroorotasa

Dihydroorotasa (DHO) hraje klíčovou roli v pyrimidinové biosyntéze katalýzou reverzibilní vnitřní přeměny karbamoyl-aspartátu na dihydroorotát. DHO je metaloenzym obsahující zinek a konkrétně katalyzuje reverzibilní cyklizaci karbamoyl-*L*-aspartátu na *L*-dihydroorotát v biosyntetické dráze sloužící ke shromažďování pyrimidinových nukleotidů (Obr.7).



Obrázek 7 – Biosyntetická dráha pro shromažďování pyrimidinových nukleotidů (Thoden et al., 2001).

Každá podjednotka homodimerního enzymu z *E. coli*, u které je známá trojrozměrná struktura DHO v rozlišení 1.7 Å, je vázána do „TIM barelového“ motivu s osmi vlákny paralelního β-listu obklopeného α-helixy. Každá podjednotka obsahuje binukleární zinkové centrum, ve kterém jsou kovové ionty vzdáleny 3.6 Å. Karboxylovaný Lys 102 slouží jako přemostující

ligand mezi oběma kationty. V podjednotce I je α -kovový ion ohraničen His 16, His 18, Lys 102, Asp 250 a molekulou solventu (nejpravděpodobněji hydroxidovým iontem) v uspořádání trigonální bipyramidy. Blíže solventu je β -kovový ion tetraedricky vázán Lys 102, His 139, His 177 a hydroxidem. *L*-dihydroorotát je vázán v podjednotce I karbonylovým kyslíkem, O4, ležícím ve vzdálenosti 2.9 Å od β -kovového iontu. Významné interakce pro vstup dihydroorotátu do aktivního místa zahrnují solný můstek s guanidiovou skupinou Arg 20 a různé elektrostatické interakce s kostrou proteinu a atomy postranního řetězce. V podjednotce II je karbamoyl-*L*-aspartát vázán blízko binukleárního kovového centra karboxylátovým postranním řetězcem vázajícím dva kovy a takto nahrazuje hydroxidový ion. Ze trojrozměrné struktury enzym-substrát a produkt byl navržen specifický katalytický mechanismus pro dihydroorotasu. Ve směru hydrolýzy dihydroorotátu napadá hydroxid „*re*-face“ dihydroorotátu v přítomnosti báze pomocí interakce s β -kovovým iontem. V průběhu cyklizace karbamoyl-aspartátu, Asp 250 spustí reakci odejmutím protonu z dusíku (N3) substrátu. Karboxylát postranního řetězce karbamoyl-aspartátu je polarizován skrze přímou elektrostatickou interakci s binukleárním kovovým centrem. Následný tetraedrický meziproduct obsahující vazbu C-O vyloučí hydroxid, který následně váže binukleární kovové centrum (Thoden et al., 2001).

U vyšších organismů se tento enzym nachází uvnitř velkého polyfunkčního proteinu (CAD), který je také katalyzátorem pro karbamoylfosfátsynthetasu a aspartáttranskarbamoylasu. U bakterií (např. *E. coli*) je DHO homodimerní a monofunkční enzym s molekulovou hmotností kolem 76600 (Washabaugh & Collins, 1984).

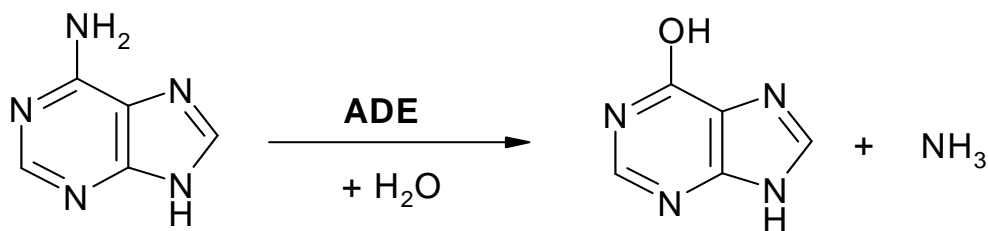
2.2.5.4 Cytidineaminasa

Cytidineaminasa (CDA) je homodimerní protein, na rozdíl od monomeru adenosindeaminasy. Značně se také liší od ADA aktivním místem. Vazba Zn^{2+} se silným inhibitorem u ADA je skutečněna pěti ligandy (tři His, jeden Asp a hydroxylová skupina inhibitoru nebo molekula vody) v geometrii trigonální bipyramidy, zatímco u CDA jsou ligandy pouze čtyři (dva Cys, jeden His a hydroxylová skupina analogu transitního stavu nebo molekula vody). Katalyticky významná residua His 238 a Asp 295 adenosindeaminasy nejsou u CDA přítomny. V aktivním místě ADA se nachází také podstatně více kyselých residuí (Wang & Quioco, 1998). CDA můžeme najít například u *E. coli* (Kim et al., 2009).

2.3 Adenindeaminasy

2.3.1 Obecné informace o adenindeaminasach

Adenindeaminasy (adeninaminohydrolasy či adenasy, ADE, EC 3.5.4.2) patří mezi enzymy katalyzující hydrolytické štěpení adeninu za vzniku hypoxanthinu a amoniaku (Obr.8) (Pospíšilová & Frébort, 2007).



Obrázek 8 – Odbourávání adeninu adenindeaminasou.

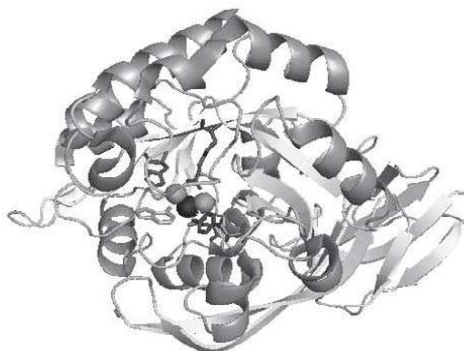
Geny ADE byly nalezeny u prokaryot a nižších eukaryot, jako jsou například kvasinky nebo prvoci. Až od nedávna nebyly geny kódující eukaryotické adenindeaminasy známy, ovšem genetické a fyziologické důkazy naznačovaly, že se tyto enzymy nacházejí u askomycet a houbové enzymy s predikovanou adenosindeaminasovou aktivitou, které byly klonovány a exprimovány v *E. coli*, vykazovaly adenindeaminasovou aktivitu (Ribard et al., 2003). Mezi prokaryotické a eukaryotické mikroorganismy u kterých byla detekována adenindeaminasová aktivita patří například *Pseudomonas synxantha* (Jun & Sakai, 1979), *Bacillus subtilis* (Nygaard, 1996), *Leishmania donovani* (Kidder & Nolan, 1979), *Escherichia coli* (Matsui et al., 2001) a *Azotobacter vinelandii* (Heppel et al., 1957). Bakteriální adenindeaminasy jsou na úrovni aminokyselinové sekvence podobnější allantoinasam, ureasam a dihydrooratasam než eukaryotickým ADE (Ribard et al., 2003).

Jediným přirozeným substrátem adenindeaminas je adenin (Allam, 1981), ovšem tyto enzymy jsou také schopny hydrolyzovat 6-halogenpuriny (Jun & Sakai, 1979; Abbondandolo et al., 1971) (například 6-chloropurin). Jelikož se jedná o metalo-dependentní hydrolasy, je pro enzymatickou aktivitu některých enzymů nezbytná přítomnost kovových iontů v optimální koncentraci, například Mn^{2+} pro adenindeaminasy z *Bacillus subtilis* (Nygaard, 1996) a *Escherichia coli* (Matsui et al., 2001). Na druhou stranu některé kovy jsou částečnými či úplnými inhibitory ADE (Ca^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} a Mn^{2+}) (Jun & Sakai, 1979; Matsui et al., 2001; Heppel et al., 1957).

2.3.2 Proteinová struktura adenindeaminas

Typickým zástupcem adenindeaminas nižších eukaryot je enzym AAH1 ze *Saccharomyces cerevisiae*. Gen kódující tento protein (GenID: 855581) se nachází na chromozomu XIV (NC_001146), tvoří jej 1043 párů bazí na pozici 359598 - 360641 a nemá introny. Na základě aminokyselinové domény patří tyto enzymy do nadrodiny metalo-dependentních hydrolas, rodiny adenosindeaminas a podrodiny „ α/β -barelových“ enzymů a 2. rodiny adenindeaminas. Hlavním strukturním rysem tohoto proteinu je konzervovaná doména cd01320, která je charakteristická pro monomerní zinek-dependentní protein, který katalyzuje ireverzibilní hydrolytickou deaminaci adenosinu na amoniak a inosin a 2'-deoxyadenosinu na amoniak a deoxyinosin. Stejná doména je přítomna ve většině adenosindeaminas.

Typickým zástupcem bakteriálních adenindeaminas je yicP kryptická adenindeaminasa z *E. coli* K12. Gen (GenID: 945851) je tvořen 1766 páry bazí lokalizovanými na pozici 3841987 – 3843753 v genomu *E. coli*. Enzym patří do 1. rodiny adenindeaminas třídy 1 (Ribard et al., 2003) a obsahuje konzervovanou doménu cd01295, která je rozdílná od domény cd01320 z AAH1. Podobnou doménu můžeme nalézt u enzymu z bakterie *Enterococcus faecalis* u něhož byla struktura vyřešena nedávno a doposud zůstává jedinou určenou strukturou v rámci prokaryotických a eukaryotických adenindeaminas (Sugadev et al., 2006) (Obr.9).



Obrázek 9 – Struktura adenindeaminasy z *Enterococcus faecalis* (Sugadev et al., 2006).

2.3.3 Srovnání adenindeaminas nižších eukaryot a prokaryot

Jak je patrné z Tab.1, adenindeaminasy kvasinek jsou velmi málo podobné adenindeaminasám bakterií a archaeí.

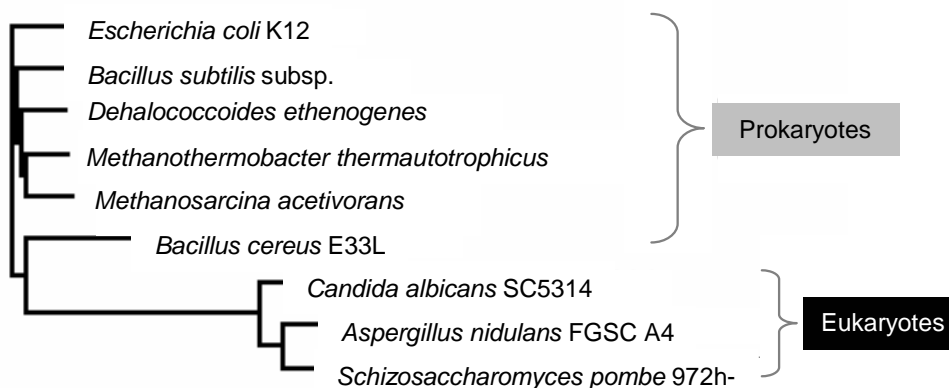
Tabulka 1 – Porovnání aminokyselinových sekvencí adenindeaminas kvasinek a bakterií s některými prokaryotickými a eukaryotickými adenosindeaminasami (Pospíšilová & Frébort, 2007).

	1. ADE, <i>E. coli</i>	2. ADE, <i>M. acetivorans</i>	3. ADE, <i>S. pombe</i>	4. ADE, <i>C. albicans</i>	5. ADE, <i>S. cerevisiae</i>	6. ADA, <i>H.sapiens</i>	7. ADA, <i>S. pombe</i>	8. ADA, <i>L. major</i>	9. ADA, <i>A. fumigatus</i>	10. ADA, <i>M. loti</i>	11. ADA, <i>E. coli</i>
1. ADE, <i>E. coli</i>	ID										
2. ADE, <i>M. acetivorans</i>	0,312	ID									
3. ADE, <i>S. pombe</i>	0,061	0,064	ID								
4. ADE, <i>C. albicans</i>	0,057	0,062	0,463	ID							
5. ADE, <i>S. cerevisiae</i>	0,049	0,05	0,459	0,588	ID						
6. ADA, <i>H.sapiens</i>	0,049	0,062	0,212	0,205	0,21	ID					
7. ADA, <i>S. pombe</i>	0,047	0,042	0,345	0,322	0,358	0,162	ID				
8. ADA, <i>L. major</i>	0,061	0,051	0,347	0,379	0,367	0,2	0,338	ID			
9. ADA, <i>A. fumigatus</i>	0,061	0,055	0,533	0,458	0,463	0,208	0,326	0,364	ID		
10. ADA, <i>M. loti</i>	0,04	0,05	0,24	0,221	0,235	0,218	0,226	0,236	0,251	ID	
11. ADA, <i>E. coli</i>	0,045	0,053	0,227	0,227	0,227	0,298	0,214	0,235	0,246	0,245	ID
	identity	0,81-0,99	0,60-0,80	0,45-0,59	0,31-0,44	0,20-0,30	0,00-0,19				

Znamé eukaryotické ADE enzymy jsou velmi podobné s kvasinkovým enzymem anotovaným jako adenosindeaminasa a mají také konzervovanou aminokyselinovou sekvenci, která se

nachází u bakteriálních a savčích adenosindeaminas (Pospíšilová & Frébort, 2007).

Rozdíly mezi adenindeaminasami z bakterií a archaeí jsou minimální. Jak naznačuje fylogenetická analýza, mají úzce spjatý genetický původ (Obr.10).



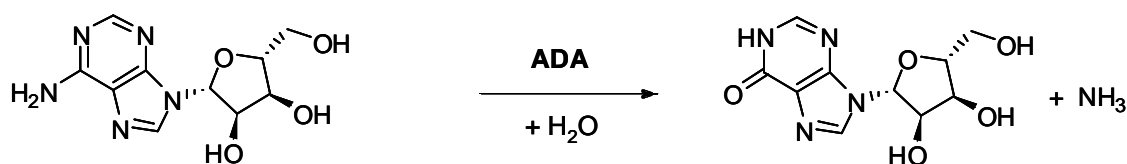
Obrázek 10 – Fylogenetický strom adenindeaminas bakterií, archaeí a hub (Pospíšilová & Frébort, 2007).

Tyto proteiny, nacházející se u prokaryot, vytváří samostatnou skupinu značně odlišnou od eukaryotických adenindeaminas nebo adenosindeaminas. Tyto rozdíly jsou určeny malou podobností v aminokyselinové sekvenci.

2.4 Adenosindeaminasy

2.4.1 Obecné informace o adenosindeaminasach

Adenosindeaminasy (jiným názvem adenosinaminohydrolasy, ADA, EC 3.5.4.4) katalyzují ireverzibilní deaminaci adenosinu a 2'-deoxyadenosinu na inosin a deoxyinosin (Obr.11).



Obrázek 11 - Katalytická reakce ADA.

Konkrétněji jde o přiblížení hydroxidu do polohy 6 (C6) adenosinu za tvorby tetraedrického uspořádání za současného odstranění amoniaku a tvorby inosinu (Wolfenden et al., 1969; Evans & Wolfenden, 1973; Kurz & Frieden, 1983).

Adenosindeaminasy jsou klíčové enzymy v metabolismu purinů. Vzhledem k jejich významu v klinické medicíně, byly tyto enzymy zkoumány podrobněji než adenindeaminasy. ADA a ADA homologní proteiny se nacházejí v nejrůznějších prokaryotech i eukaryotech (hmyzu, nižších obratlovcích, rybách, savcích a také v rostlinách).

U savců je ADA přítomna prakticky ve všech tkáních a nedostatek její aktivity se projevuje vážnými onemocněními imunity a genetickými dědičnými onemocněními, které jsou

v případě, že nejsou dobře diagnostikovány a léčeny smrtelné pro novorozence (Kredich & Hershfield, 1989). Velké množství ADA v zažívacím traktu a deciduálních buňkách při rozvoji propojení matky a plodu je zařazuje mezi enzymy hrající unikátní roli při růstu buněk, implantaci embrya a dalších funkcích (Lee, 1973; Chinsky et al., 1990; Hong et al., 1991).

V rostlinách nebyla prokázána přítomnost proteinů s ADA aktivitou, a to i přes znalost genomu *Arabidopsis thaliana* a jiných rostlin, u kterých byly na základě homologie predikovány geny kódující právě tyto enzymy. V některých publikacích se uvádí, že nejsou adenosindeaminasy přítomny v rostlinách vůbec (Yabuki & Ashihara, 1991; Katahira & Ashihara, 2006; Guranowski, 1982) nebo že je enzymová aktivita velmi malá a hlavní význam pro hospodaření s adenosinem má v rostlinách adenosinkinasa (EC 2.7.1.77) (Moffat et al., 2002; Moffat & Ashihara, 2002).

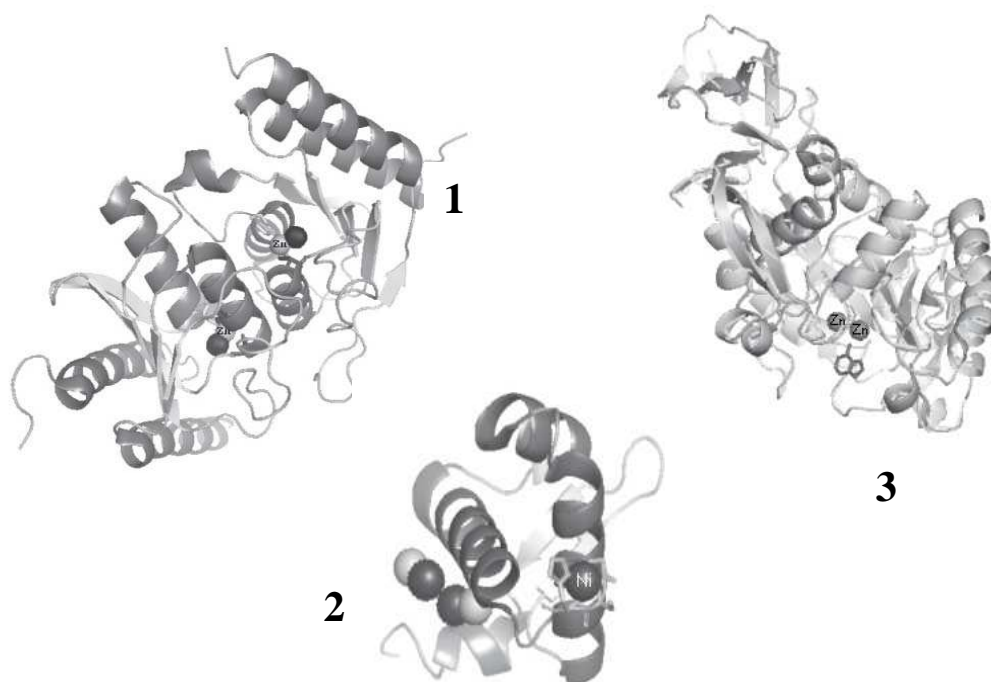
Mezi substráty různých adenosindeaminas patří adenosin (Ataie et al., 2004), adenin (Nygaard, 1978) a jejich deriváty 2', 3'- deoxyadenosin (Iwaki-Egawa & Watanabe, 2002), 2'-deoxyadenosin (Tsukada & Yoshino, 1980), 3'-deoxyadenosin (Nygaard, 1978), isopropylidenadenosin (Pickard, 1975), adeninarabinosid (Ling et al., 1991), 2'-dAMP (Rosinová et al., 1978), 5'-AMP (Jun et al., 1994), adenosin-3'-monofosfát (Jun et al., 1991), ADP a ATP (Jun et al., 1994), cAMP (Jun et al., 1991), dvouřetězcová RNA (Hough & Bass, 1994), tRNA (Keegan et al., 2000) a další sloučeniny purinu jako 2-amino-6-chloropurinribosid (Pickard, 1975), 6-chloropurinribosid a 6-methoxypurinribosid (Lupidi, 1998), 6-methylaminopurinribonukleosid (Nygaard, 1978) a formycin A (Tsukada & Yoshino, 1980). Kovové ionty jsou při určitých koncentracích v některých případech nezbytné pro enzymovou aktivitu. $MgCl_2$ a $CoSO_4$ mají obrovský aktivační efekt na ADA pocházející z *Aspergillus terricola* (Abu-Shady et al., 1994). Pro některé ADA jsou také důležité ionty Fe^{3+} a Sn^{2+} . Aktivitu enzymu *Bacillus servus* stabilizují ionty NH_4^+ nebo K^+ , na druhou stranu ovšem nedostatek těchto nebo jiných monovalentních kationů vede k nevratné ztrátě aktivity (Gabellieri et al., 1986). Pro enzym s *Argopecten irradians concentricus* jsou aktivačními sloučeninami NH_4Cl a $(NH_4)_2SO_4$ (Harbison & Fischer, 1973), pro enzym z *Candida albicans* 8-aza-adenin, adenin, AMP, ATP, IMP, inosin a *N*-acetyl-D-glukosamin (Challa et al., 1999) a pro enzym z *Mus musculus* pak dibutyryl-cAMP (Singh & Sharma, 2000).

Na konci 60. let 20. století byl koformycin izolovaný ve filtrátech kultur *Nocardia interforma* a *Streptomyces kaniharaensis* prokázán jako účinný inhibitor adenosindeaminas (Sawa et al., 1967). O 10 let později byl pentostatin neboli (8*R*)-hydroxyl-2'-deoxykoformycin (DCF), izolovaný z bujónu *Streptomyces antibioticus* (Woo et al., 1974) prokázán jako silnější inhibitor než koformycin (Agarwal et al., 1977; Agarwal et al., 1978). Silný inhibiční účinek obou těchto přírodních látek ukazuje, že jde o analogy přechodového stavu. Koformycin i DCF mají tetraedrický uhlík v poloze 8, která odpovídá pozici 6 (C6) adenosinu. Účinek DCF je hodně závislý na stereochemii hydroxylové skupiny v poloze 8 (C8): 8*R* isomer je schopen

vázat 10^7 krát silněji než isomer 8S (Schramm & Baker, 1985). DCF je často využíván klinicky ke zvýšení účinnosti různých protinádorových a antivirálních analogů adenosinu.

2.4.2 Proteinová struktura adenosindeaminas

Proteinová struktura byla vyřešena pro prokaryotické i eukaryotické adenosindeaminasy, rozmanité domény ADA a řetězce ADAR (adenosindeaminasa působící na RNA) a pro čtyři řetězce bakteriální ADAT (tRNA-specifická adenosindeaminasa). Co se této skupiny enzymů týče, není známa struktura u žádného z rostlinných enzymů. Porovnání proteinové struktury tří typických reprezentantů této skupiny enzymů můžeme vidět na Obr.12.



Obrázek 12 – Struktura adenosindeaminas: 1.) struktura ADAT z *E. coli*, 2.) Z- β doména ADAR1 z *Homo sapiens*, 3.) struktura adenosindeaminasy z *Bos taurus* (Pospíšilová & Frébort, 2007).

Struktura myší adenosindeaminasy získaná pomocí rentgenostrukturní analýzy je první pro purinové/pyrimidinové deaminasové enzymy. Je to monomerní protein (40 kDa) vyžadující Zn^{2+} kofaktor pro katalýzu (Wilson et al., 1991). Adenosindeaminasy se nachází u prokaryotických i eukaryotických organismů v různých formách a patří do skupiny enzymů s „ α/β barelem“ podobných adenindeaminasam (Ribard et al., 2003). ADA má „ $(\beta/\alpha)_8$ -barelový“ strukturní motiv. Tento motiv se nachází u více než 30 dalších enzymů. Aktivní místo adenosindeaminasy se nachází na C-terminálním konci „ β -barelu“ v hluboké obdélníkové „kapse“, v jejímž nejhlubším místě je zasazen pentakoordinovaný Zn^{2+} kofaktor.

2.4.3 Srovnání adenosindeaminas

Lidský gen pro ADA1 je lokalizován na chromozomu 20 (20q12-q13.11). Gen je dlouhý 32213

párů bazí a obsahuje 11 intronů. Kódující sekvence tvoří pouze 4.53 % celého genu. Tento kódovaný protein patří do skupiny metalo-dependentních hydrolas, adenosindeaminas a obsahuje adenosindeaminasovou konzervovanou doménu cd01320.

Typickým zástupcem prokaryotických genů je gen pro ADA z *Escherichia coli* K12, lokalizovaný v pozici od 1700257 do 1701258 páru bazí a tvoří jej tedy 1001 párů bazí. Kódovaný enzym obsahuje stejnou konzervovanou doménu jako lidská ADA.

Sekvence genů kódujících adenosindeaminasy u prokaryotických a eukaryotických organismů jsou si navzájem více podobné než je tomu u adenindeaminas. Sekvence genů vyšších eukaryot, zvláště savců, jsou téměř identické. Stupeň identity mezi savčími enzymy je velmi vysoký a zřetelně tuto skupiny odděluje od ostatních (Tab.2).

Tabulka 2 - Porovnání aminokyselinových sekvencí mezi prokaryotickými a eukaryotickými adenosindeaminasami (Pospíšilová & Frébort, 2007).

	1. ADA, <i>H.sapiens</i>	2. ADA, <i>P. troglodytes</i>	3. ADA, <i>B. taurus</i>	4. ADA, <i>C. familiaris</i>	5. ADA, <i>M. musculus</i>	6. ADA, <i>R. norvegicus</i>	7. ADA, <i>G. gallus</i>	8. ADA, <i>X. tropicalis</i>	9. ADA, <i>D. rerio</i>	10. ADA, <i>S. pombe</i>	11. ADA, <i>L. major</i>	12. ADA, <i>P. berghei</i>	13. ADA, <i>A. fumigatus</i>	14. ADA, <i>E. coli</i>	15. ADA, <i>V. cholerae</i>
1. ADA, <i>H.sapiens</i>	ID														
2. ADA, <i>P. troglodytes</i>	0,983	ID													
3. ADA, <i>B. taurus</i>	0,887	0,881	ID												
4. ADA, <i>C. familiaris</i>	0,856	0,856	0,856	ID											
5. ADA, <i>M. musculus</i>	0,807	0,807	0,826	0,79	ID										
6. ADA, <i>R. norvegicus</i>	0,829	0,823	0,837	0,79	0,94	ID									
7. ADA, <i>G. gallus</i>	0,646	0,646	0,66	0,649	0,636	0,652	ID								
8. ADA, <i>X. tropicalis</i>	0,695	0,692	0,703	0,675	0,708	0,708	0,719	ID							
9. ADA, <i>D. rerio</i>	0,634	0,629	0,629	0,626	0,63	0,622	0,64	0,726	ID						
10. ADA, <i>S. pombe</i>	0,167	0,167	0,169	0,177	0,174	0,177	0,196	0,182	0,181	ID					
11. ADA, <i>L. major</i>	0,2	0,197	0,192	0,192	0,206	0,209	0,202	0,204	0,201	0,349	ID				
12. ADA, <i>P. berghei</i>	0,217	0,22	0,22	0,215	0,226	0,234	0,235	0,227	0,217	0,174	0,156	ID			
13. ADA, <i>A. fumigatus</i>	0,207	0,209	0,223	0,202	0,228	0,234	0,24	0,225	0,201	0,329	0,356	0,219	ID		
14. ADA, <i>E. coli</i>	0,29	0,287	0,284	0,276	0,302	0,293	0,295	0,293	0,288	0,223	0,237	0,208	0,241	ID	
15. ADA, <i>V. cholerae</i>	0,276	0,276	0,276	0,26	0,29	0,279	0,3	0,301	0,271	0,205	0,239	0,213	0,232	0,688	ID
	identity	0,81-0,99	0,60-0,80	0,45-0,59	0,31-0,44	0,20-0,30	0,00-0,19								

Houbové (kvasinkové) enzymy vytvářejí skupinu, která je nejméně podobná s ostatními. Přestože tyto enzymy řadíme mezi adenosindeaminasy, nejsou žádné experimentální důkazy, že mají adenosindeaminasovou aktivitu. Neslučitelnost se zařazením těchto enzymů do skupiny adenosindeaminas můžeme vidět na příkladu enzymu ze *Schizosaccharomyces pombe* (SPBC1198.02), který neodbourává adenosin, ale adenin (Ribard et al., 2003; Pospíšilová et al., 2006), proto tento enzym nemůžeme řadit do ADA, ale do ADE. Je pravděpodobné, že některé jiné úzce spjaté enzymy askomycet mají ADE, a ne ADA aktivitu a je možné, že nejsou adenosindeaminasy u nižších eukaryot obsaženy vůbec.

Geny nižších eukaryot neobsahují introny, ovšem u savců introny tvoří zhruba 95 % ADA genů. Typický ADA gen obsahuje 11 intronů.

3 Experimentální část

3.1 Použitý materiál a přístroje

- **Chemikálie**

adenin	Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika)
ampicilin	Sigma-Aldrich
dihydrogenfosforečnan draselný	Lach-Ner (Neratovice, Česká republika)
dihydrogenfosforečnan sodný monohydrát	Merck (Praha, Česká republika)
DMSO	Duchefa (Haarlem, Nizozemí)
kyselina fosforečná 85 %	Lachema (Brno, Česká republika)
glukosa	Penta (Chrudim, Česká republika)
glycerol	Penta
hydrogenfosforečnan draselný	Lach-Ner
hydroxid sodný	Penta
chlorid draselný	Lachema
chlorid hořečnatý hexahydrát	Sigma-Aldrich
chlorid kobaltnatý	Sigma-Aldrich
chlorid rtuťnatý	Fluka Biochemika (Buchs, Švýcarsko)
chlorid sodný	Lach-Ner
chlorid vápenatý bezvodý	Penta
chlorid zinečnatý	Fluka Biochemika
kyselina chlorovodíková	Lachema
imidazol	Sigma-Aldrich
IPTG	Duchefa
agar	Duchefa
Ni-NTA agarosa	QIAGEN (Hilden, Německo)
Protein assay	Bio-Rad laboratories (Richmond, USA)
Tris	Duchefa
Triton X-100	Sigma-Aldrich
trypton	Duchefa
kvasničný extrakt	Sigma-Aldrich

- **Mikroorganismy, vektory a použitý software**

vektor pET100/D-TOPO s <i>SPBC1198.02</i>	Mgr. Hana Pospíšilová, Ph.D., UP Olomouc, Česká republika
<i>Escherichia coli</i> BL21Star(DE3)	Invitrogen (Carlsbad, USA)
UV-visible Chemstation Software	Agilent (Santa Clara, USA)
BioEdit 7.0.5.3	Volně dostupné na internetu (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html)

- **Přístrojové vybavení**

autokláv MLS 3020	Sanyo (Mnichov, Německo)
french press FA080 Thermo	TechLab (Praha, Česká republika)
centrifuga mikro200R	Hettich (Tuttlingen, Německo)
centrifuga Rotanta 460R	Hettich
digestoř	Forlab-Block (Valašské meziříčí, Česká republika)
laminární box	Forlab-Block
spektrofotometr	Agilent
atomový absorpční spektroskop	Agilent

3.2 Metody

3.2.1 Složení kultivačního LB média

Na jeden litr LB média je zapotřebí 5 g kvasničného extraktu, 10 g NaCl a 10 g tryptonu. Úprava pH na 7.2 pomocí NaOH. Sterilizace média probíhala autoklávováním po dobu 20 minut při teplotě 121 °C. Po autoklávování bylo přidáno antibiotikum ampicilin o výsledné koncentraci 100 mg/l a sterilní 1 % glukosa.

3.2.2 Kultivační podmínky a exprese rekombinantní adenindeaminasy

Modifikované *E. coli* BL21Star(DE3) nesoucí plazmid pET100/D-TOPO s genem *SPBC1198.02* pro adenindeaminasu byly kultivovány v 50 ml LB média s ampicilinem a glukosou při 37 °C a 160 rpm (otáčkách za minutu) cca 16 hodin. Poté následovala inokulace 2.5 litru LB média napěstovanou kulturou z předchozího dne a inkubace při 37 °C/ 160 rpm asi 2 - 3 hodiny, tj. do $OD_{600} = 0.4 - 0.6$. Po dosažení této hodnoty byla přidáním IPTG o výsledné koncentraci 0.2 mM indukována exprese proteinu s následnou kultivací při 18 °C do druhého dne.

3.2.3 Purifikace rekombinantní adenindeaminasy

Purifikace rekombinantní deaminasy probíhala následujícím způsobem. Nejprve byla kultura s nadexprimovanou adenindeaminasou centrifugována při 4000 g/ 45minut/ 4 °C. Supernatant byl odlit a sediment rozsuspendován v lyzačním pufru (0.25 % Triton X-100, 50 mM $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8). Následovalo rozbití buněk pomocí „french pressu“: Ocelové součásti „french pressu“ byly pomocí ethanolu a destilované vody zbaveny konzervačního oleje, vychlazeny na ledu a po sestavení součástí následovalo promytí 3x ethanolem a 3x destilovanou vodou. Pro promytí došlo k samotnému rozbití buněk tlakem 20 000 psi. Po rozbití se přístroj znovu promyl 3x ethanolem, poté 3x destilovanou vodou, součásti se odmontovaly a zakonzervovaly olejem. Hrubý extrakt byl po celou dobu udržován na ledu. Následovala centrifugace hrubého extraktu při 4000 g/ 30 minut/ 4 °C; supernatant (cytosol; tzv. rozpustná fáze), který obsahoval požadovaný protein byl přelit do 50 ml falkonek,

vždy po cca 10 ml a do každé falkonky bylo přidáno 0.5 ml 50 % směsi Ni-NTA. Poté následovala inkubace při mírném třepání po dobu 60 minut při teplotě 4 °C. Po inkubaci následovala centrifugace ve vychlazené centrifuze při 1000 g/ 10 sekund/ 4 °C. Vzniklý supernatant se opatrně odpipetoval cca 0.5 cm nad sediment. Sediment byl poté promyt promývacím pufrům (50 mM NaH₂PO₄·H₂O, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, úprava pH H₃PO₄ na pH 8) a mírnými pohyby došlo k promíchání. Promývání se provádělo 5x a celkový objem použitého promývacího pufru byl 50 ml (tedy 5x10 ml). Po každém promytí se vzorek centrifugoval při 1000 g/ 10 sekund/ 4 °C a supernatant se odlil. Po pátém centrifugování a odstranění supernatantu byly falkonky centrifugovány po šesté bez přídavku promývacího pufru a následně byly odstraněny poslední zbytky supernatantu. Poté následovalo vymytí proteinu pro jeho získání z komplexu s Ni-NTA, ve kterém se protein váže histidinovou kotvou, pomocí elučního pufru s imidazolem (50 mM NaH₂PO₄·H₂O, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol, úprava pH H₃PO₄ na pH 8). K sedimentu byly přidány 2 ml elučního pufru, došlo k promíchání, inkubaci na ledu po dobu 5 minut a centrifugaci při 1000 g/ 10 sekund/ 4 °C. Supernatant pak obsahoval uvolněnou adenindeaminasu. Eluce se opakovala, dokud bylo uvolňováno dostatečné množství rekombinantního proteinu. Obsah proteinu byl stanoven modifikovanou metodou dle Bradfordové.

Připravený protein byl poté upraven pro skladování. Nejdříve byl dialyzován ve 4 litrech primárního pufru (10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 7) dva dny a poté byl protein centrifugován při 5000 g/ 5.5 minuty/ 4 °C, supernatant se přepipetoval do 15 ml falkonky a byla stanovena koncentrace proteinu. Nakonec byl přidán sterilní glycerol o finální koncentraci 10 %. Takto se vzorek skladoval po 1 ml alikvotech při 4 °C.

3.2.4 Složení sekundárních dialyzačních pufrů

Pro určení vlivu různých iontů kovu na aktivitu adenindeaminasy byl připraven 10 mM Tris/HCl pufr pH 7 s přídavkem různých iontů (Tab.3).

Tabulka 3 – Sekundární dialyzační pufrы.

číslo pufru	typ pufru	koncentrace pufru	pH pufru
1	pufr Tris/HCl	10 mM	7
2	pufr Tris/HCl + 10 mM NaCl	10 mM	7
3	pufr Tris/HCl + 10 mM CaCl ₂	10 mM	7
4	pufr Tris/HCl + 10 mM MgCl ₂	10 mM	7
5	pufr Tris/HCl + 10 mM CoCl ₂	10 mM	7
6	pufr Tris/HCl + 10 mM MnCl ₂	10 mM	7
7	pufr Tris/HCl + 10 mM HgCl ₂	10 mM	7

8	pufr Tris/HCl + 10 mM ZnCl ₂	10 mM	7
9	pufr Tris/HCl + 10 mM CuCl ₂	10 mM	7
10	pufr K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ (K-fosfátový)	10 mM	7

Pufr Tris/HCl bez přídavku soli sloužil jako srovnávací pufr, zatímco K-fosfátový pufr sloužil jako kontrolní, jelikož je optimálním pufr pro studovaný enzym (Pospíšilová et al., 2008).

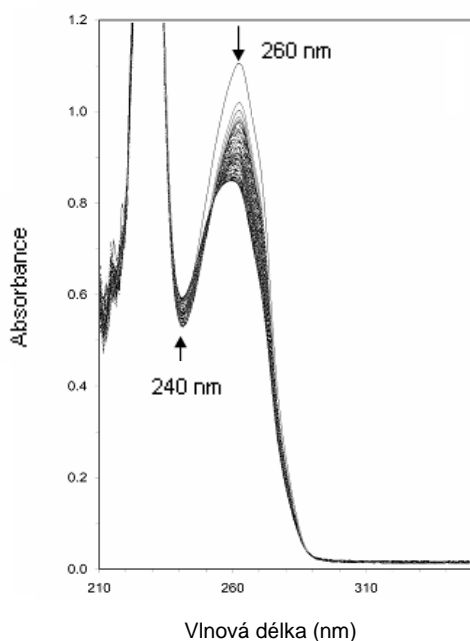
3.2.5 Stanovení koncentrace rekombinantní adenindeaminasy

Principem stanovení koncentrace proteinu je posun absorpčního maxima ze 465 nm na 595 nm při vazbě Coomassie Brilliant Blue G 250 na protein. Vzorek obsahoval: 780 µl vody + 20 µl proteinu + 200 µl reakčního činidla. Blank obsahoval: 800 µl vody + 200 µl reakčního činidla. Koncentrace proteinu byla určena z kalibrační křivky.

3.2.6 Měření aktivity rekombinantní adenindeaminasy

Před vlastním měřením aktivity byl 1 ml alikvotu proteinu dialyzován v 500 ml příslušného sekundárního dialyzačního pufru při 4 °C po dobu 24 hodin. Po dialýze následovala centrifugace (5000 g/ 5 minut/ 4 °C) a stanovení koncentrace proteinu dle Bradfordové.

Aktivita proteinu byla stanovena spektrofotometricky a to vždy v kontrolním 10 a 100 mM K-fosfátovém pufru a dále v pufru o stejném složení, v jakém probíhala sekundární dialýza. Stanovení aktivity bylo prováděno po dobu 200 sekund s 0.1 mM adeninem (zásobní roztok 10 mM adeninu byl rozpuštěn v DMSO) při 33 °C v celkovém reakčním objemu 3 ml, kdy byla sledována změna absorbance při 240 nm, což odpovídá nárůstu produktu (hypoxanthinu), viz Obr.13.



Obrázek 13 – Spektrální změny hydrolyzy adeninu za vzniku hypoxanthinu.

Reakční roztok byl pre-inkubován 1 minutu a vlastní enzymatická reakce byla zahájena přidáním substrátu adeninu za stálého míchání.

V každém pufru bylo měření opakováno minimálně třikrát (pokud se výsledky lišily, provádělo se měření vícekrát).

Výpočet specifické aktivity byl prováděn pomocí vzorce $\text{kat/mg} = ((\Delta A_{240} \text{ za } s / (\epsilon_{240}^P - \epsilon_{240}^S) \times \text{ředění proteinu} \times \text{celkový objem v litrech}) / \text{konc. proteinu v mg/ml}$.

3.2.7 Atomová absorpční spektroskopie

Přítomnost zinku a jeho množství bylo stanoveno pomocí atomové absorpční spektroskopie (AAS) ve spolupráci s Ing. Davidem Mildem, Ph.D. na Katedře analytické chemie (UP Olomouc).

Vzorek proteinu se ředil pro měření na výslednou koncentraci 0.05 mg/ml. Nejdříve byla proměřena řada standardů o známé koncentraci zinku. Následně byla vytvořena kalibrační křivka závislosti absorbance jednotlivých standardů na jejich koncentraci. Poté se proměřil vzorek a z kalibrační křivky byla odečtena koncentrace zinku ve vzorku, ze které byl vypočítán počet atomů zinku na jednu molekulu enzymu.

3.3 Výsledky a diskuze

Protein, se kterým byla během této bakalářské práce prováděna měření, byl získán heterologní expresí z purifikované adenindeaminasy pocházející původem z kvasinky *Schizosaccharomyces pombe*. Příslušný gen v expresním vektoru pET100/D-TOPO byl získán jak je popsáno v článku Pospíšilová et al., 2008.

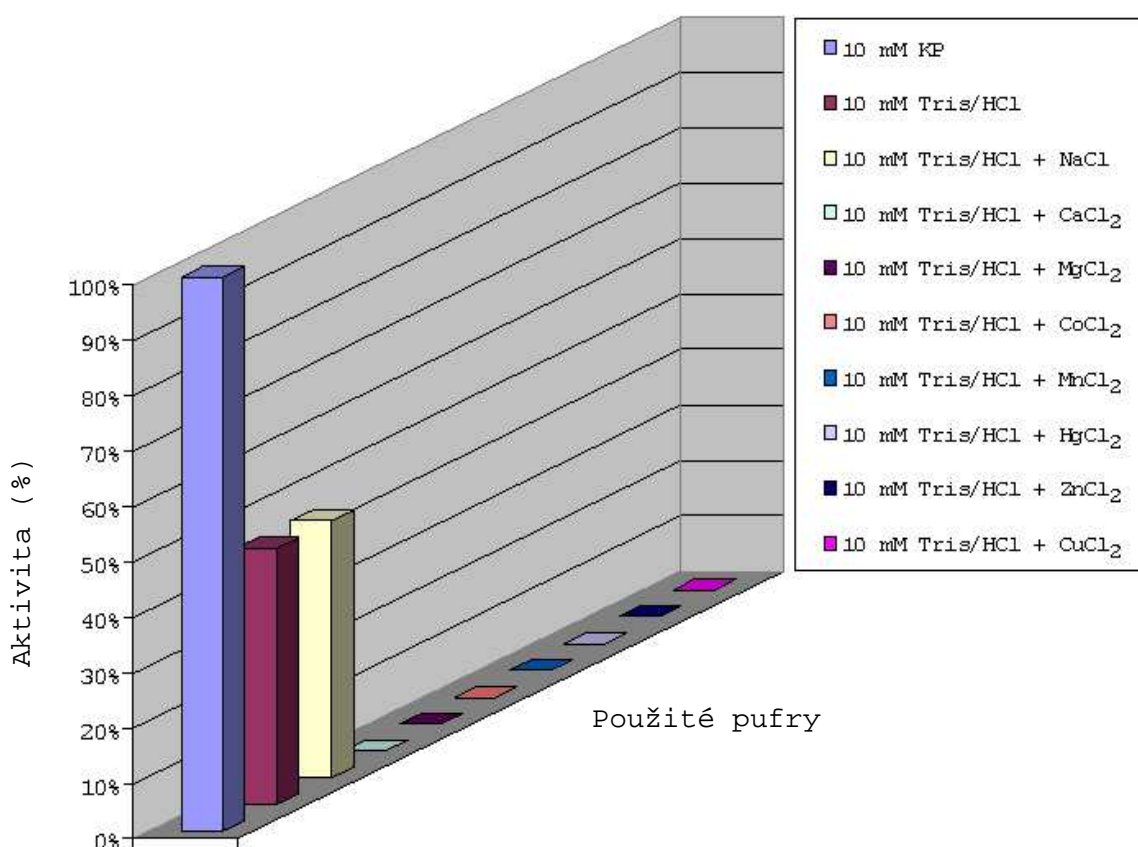
3.3.1 Vliv dialyzačního pufru na aktivitu deaminasy

Jak bylo uvedeno v teoretické části, studovaný kvasinkový enzym – adenindeaminasa – se řadí mezi metalo-dependentní proteiny. Z tohoto důvodu se dá očekávat, že enzymatická aktivita proteinu bude silně ovlivněna přítomností nebo nepřítomností iontů kovů v různé koncentraci. Experiment byl navržen tak, že do 10 mM Tris/HCl pufru o pH 7 byly přidány 10 mM soli jak je uvedeno v Tab.4 a na Obr.14.

Tabulka 4 – Vliv dialyzačního pufru na aktivitu enzymu.

Dialyzační pufr	Specifická aktivita adenindeaminasy
pufr 10 mM KP	100 %
pufr 10 mM Tris/HCl	46.25 %
pufr 10 mM Tris/HCl + NaCl	46.32 %
pufr 10 mM Tris/HCl + CaCl ₂	0 %

pufr 10 mM Tris/HCl + MgCl ₂	0 %
pufr 10 mM Tris/HCl + CoCl ₂	0 %
pufr 10 mM Tris/HCl + MnCl ₂	0 %
pufr 10 mM Tris/HCl + HgCl ₂	0 %
pufr 10 mM Tris/HCl + ZnCl ₂	0 %
pufr 10 mM Tris/HCl + CuCl ₂	0 %



Obrázek 14 – Vliv dialyzačního pufru na aktivitu enzymu.

Po provedení sekundární dialýzy v takovýchto pufrch (jak je popsáno v metodách) byl pozorován vliv příslušného iontu kovu na aktivitu adenindeaminasy v optimálním reakčním 100 mM K-fosfátovém pufru (Pospíšilová et al., 2008). Jako kontrolní sekundární dialyzační pufr sloužil standardní 10 mM K-fosfátový pufr obsahující K⁺ ionty – vliv draselných solí byl testován již dříve (Pospíšilová et al., 2008). Při porovnání výsledků je patrné, že samotný pufr Tris/HCl snižuje aktivitu enzymu o více než 50 % oproti optimálnímu K-fosfátovému pufru a ani přidavek NaCl do dialyzačního pufru nezmenší tento pokles aktivity. Dialýza proteinu v přítomnosti Ca²⁺, Mg²⁺, Co²⁺, Mn²⁺ a Zn²⁺ iontů způsobila ztrátu enzymové aktivity a v přítomnosti Hg²⁺ iontů dokonce došlo k vysrážení proteinu.

3.3.2 Vliv reakčního pufru na aktivitu deaminasy

Dále byla sledována případná změna aktivity enzymu po sekundární dialýze při užití různých reakčních pufrů. Jako reakční pufr sloužil opět 100 mM K-fosfátový pufr (očekávaná optimální aktivita enzymu), 10 mM K-fosfátový pufr (možno očekávat stejnou nebo nižší aktivitu enzymu v důsledku 10-ti násobného poklesu koncentrace K^+) a pufr o stejném složení jako pufr použitý k sekundární dialýze. Všechny dialyzační i reakční pufrы měly pH 7.

Hodnoty v dané sérii měření byly vztaženy k aktivitě získané měřením ve 100 mM K-fosfátovém pufru. Jak je ukázáno v Tab.5 a na Obr.15, aktivita studovaného enzymu po dialýze v optimálních podmínkách (10 mM K-fosfátovém pufru) byla snížena o téměř 70 %, pokud byla snížena koncentrace draselných kationtů 10x.

Tabulka 5 – Vliv reakčního pufru na aktivitu enzymu.

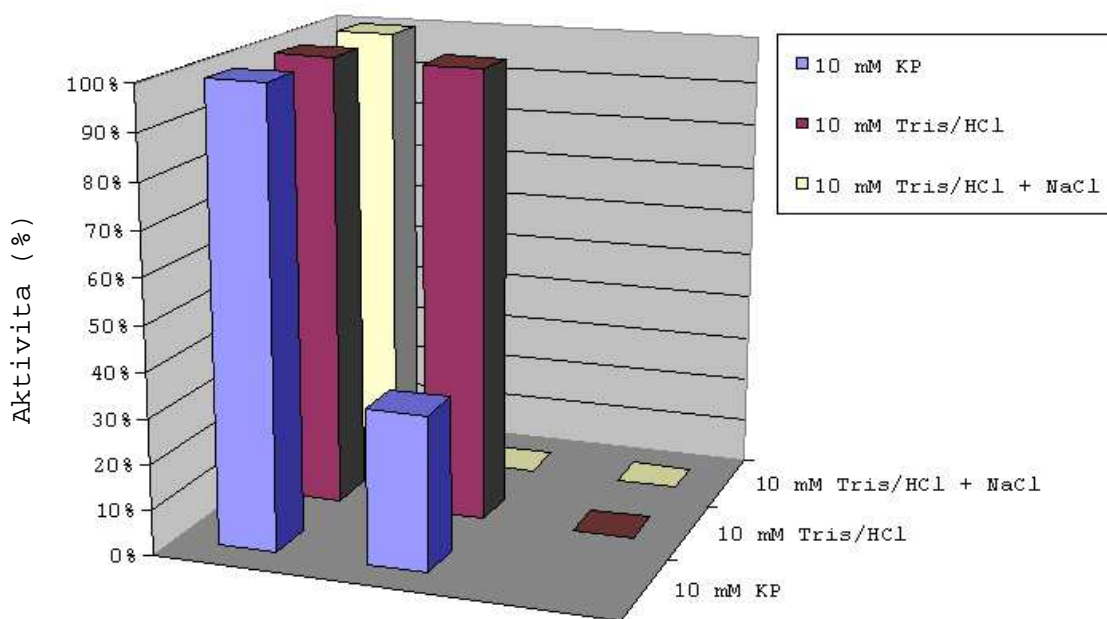
Dialyzační pufr	RP* 100 mM KP [▲]	RP* 10 mM KP [▲]	RP = DP [○]
pufr 10 mM KP	100 %	33.99 %	
pufr 10 mM Tris/HCl	100 %	99.48 %	0 %
pufr 10 mM Tris/HCl + NaCl	100 %	<100 % [•]	0 %
pufr 10 mM Tris/HCl + CaCl ₂	0 %	0 %	0 %
pufr 10 mM Tris/HCl + MgCl ₂	0 %	0 %	0 %
pufr 10 mM Tris/HCl + CoCl ₂	0 %	0 %	0 %
pufr 10 mM Tris/HCl + MnCl ₂	0 %	0 %	0 %
pufr 10 mM Tris/HCl + HgCl ₂	0 %	0 %	0 %
pufr 10 mM Tris/HCl + ZnCl ₂	0 %	0 %	0 %
pufr 10 mM Tris/HCl + CuCl ₂	0 %	0 %	0 %

* RP = reakční pufr

○ DP = dialyzační pufr

▲ KP = K-fosfátový pufr

• <100 % - v důsledku poškození deuteriové lampy byla zaznamenána nepřesná data. Vzhledem k dříve získaným údajům předpokládáme, že by tato hodnota měla dosahovat maximálně 100 % aktivity detekované pro 100 mM K-fosfátový pufr.



Obrázek 15 – Porovnání reakčních pufrů.

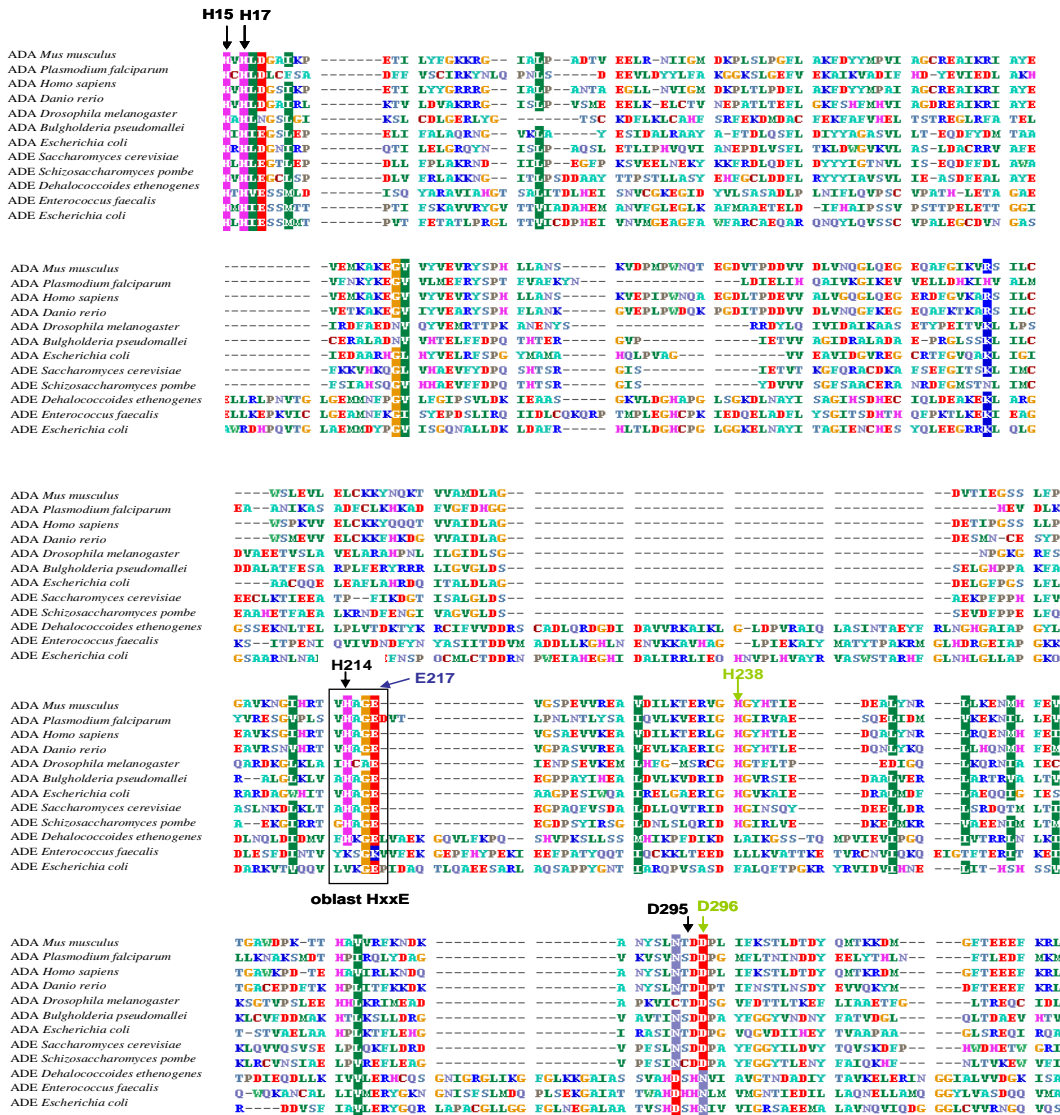
Při užití sekundárního dialyzačního pufru bez přítomných iontů byla aktivita při porovnání s optimálním pufrům značně snížena (viz výše) a ani měření ve 100 mM K-fosfátovém pufru nemá, vzhledem ke stejné aktivitě enzymu detekované v 10 mM K-fosfátovém pufru, pozitivní efekt na stabilitu enzymu. V reakčním prostředí bez přítomnosti iontů kovu nebyla v tomto případě detekována žádná aktivita. Obdobného výsledku bylo dosaženo dialýzou enzymu v 10 mM Tris/HCl s 10 mM NaCl (Tab.5). V přítomnosti iontů Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} a Cu^{2+} nebyla detekována žádná aktivita a to ani při užití 100 mM K-fosfátového pufru během enzymové reakce.

3.3.3 Predikce a stanovení kovu přítomného v kvasinkových deaminasach

Vzhledem k neznámé struktuře kvasinkových adenindeaminas byl v této práci určen a kvantifikován kov nutný pro funkci tohoto metaloproteinu.

Pomocí programu BioEdit byly vyhledány aminokyselinové sekvence adenin/adenosindeaminas různých organismů, včetně adenosindeaminasy *Mus musculus*, u které byla určena struktura a bylo zjištěno, že obsahuje vázaný zinek. Residua, která u *Mus musculus* váží zinek jsou H15, H17, H214 a D295 (Obr.16). Vzhledem k podobné proteinové struktuře byla tato residua nalezena i u adenindeaminasy *Schizosaccharomyces pombe*, a proto předpokládáme obsah zinku i u tohoto enzymu.

Ostatní vysoce konzervovaná residua (E217, H238 a D296) sice neváží zinek, ale jsou důležitá pro aktivitu enzymu (Obr.16).



Obrázek 16 – Porovnání aminokyselinových sekvencí adenindeaminas a adenosin deaminas různých organismů s adenosindeaminasou *Mus musculus* (v obrázku jsou vyznačena residua vážící zinek – H15, H17, H214 a D295 a residua důležitá pro enzymatickou aktivitu - E217, H238 a D296).

Obsah zinku byl stanoven pomocí atomové absorpční spektroskopie, kdy byla zjištěna koncentrace zinku 0.034 mg.l⁻¹, což odpovídá jednomu atomu zinku na molekulu proteinu (s chybou 8.8 %).

4 Závěr

V teoretické části byly shrnuty informace o kvasinkových adenindeaminasach a bylo navázáno na jejich podobnost s adenosindeaminasami. Byly také shrnuty poznatky o dalších zástupcích amidohydrolas.

Cílem práce bylo sledování působení různých kovových iontů na rekombinantní kvasinkovou adenindeaminasu. Enzym byl aktivní pouze po dialýze v přítomnosti draselných a sodných iontů nebo i bez přídavku soli v dialyzačním pufru. Přítomnost dvojmocných iontů kovů vedla ke ztrátě enzymatické aktivity a v přítomnosti iontů Hg^{2+} byl protein zcela denaturován. Bylo potvrzeno, že pro aktivitu studovaného enzymu je nutná přítomnost jednomocných iontů kovů, které jsou v optimální koncentraci důležité pro stabilitu enzymu, což potvrzuje ztráta enzymatické aktivity po dialýze proteinu bez iontů kovů, kdy byl reakčním pufrem opět jen Tris/HCl. Protein dialyzován v takovém prostředí byl ale stále aktivní, pokud byl jako reakční pufr použit 10 nebo 100 mM K-fosfátový pufr. Z tohoto můžeme usuzovat, že K^+ a Na^+ se uplatňují např. jako sekundární kovové ligandy stabilizující proteinovou strukturu. Dále byl predikován a stanoven kov přítomný v kvasinkové deaminase. Toto stanovení se provádělo na základě porovnání neznámé struktury zkoumané adenindeaminasy ze *Schizosaccharomyces pombe* s popsanou strukturou adenosindeaminasy z *Mus musculus*, která obsahuje mononukleární Zn^{2+} centrum subtypu III. Pomocí AAS bylo určeno, že adenindeaminasa ze *Schizosaccharomyces pombe* obsahuje jeden atom zinku.

5 Seznam použité literatury

- Abbondandolo A., Weyer A., Heslot H., Lambert M. (1971) Study of adenine aminohydrolase in the yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Bacteriol.* **108**, 959-963.
- Abu-Shady M. R., Elshafei A. M., el-Beih F. M., Mohamed L. A. (1994) Properties of adenosine deaminase in extracts of *Aspergillus terricola*. *Acta Microbiol. Pol.* **43**, 305-311.
- Agarwal R. P., Cha S., Crabtree G. W., Parks R. E. Jr. (1978) The Chemistry of C-nucleosides and their analogs II: C-nucleosides of condensed heterocyclic bases. In *Chemistry and Biology of Nucleosides and Nucleotides* (Harmon R. E., Robins R. K. Townsend L. B., eds.), pp. 159-197, Academic Press, New York.
- Agarwal R. P., Spector T., Parks R. E. Jr. (1977) Tight-binding inhibitors - IV. inhibition of adenosine deaminases by various inhibitors. *Biochem. Pharm.* **26**, 359-367.
- Allam A. M., Elawamry Z. A., Elzainy T. A. (1981) Discrete activities for adenine and adenosine deaminations in extracts of *Streptomyces viridiviolaceus*. *Egypt J. Bot.* **24**, 149-152.
- Andreini C., Bertini I., Cavallaro G., Holliday G. L., Thornton. (2008) Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. *J. Biol. Inorg. Chem.* **13**, 2088-2089.
- Ataie G., Safarian S., Divsalar A., Saboury A. A., Moosavi-Movahedi A. A., Ranjbar B., Cristalli G., Mardanian S. (2004) Kinetic and structural analysis of the inhibition of adenosine deaminase by acetaminophen. *J. Enzyme. Inhib. Med.* **19**, 71-78.
- Aubert S. D., Li Y., Raushel F. M. (2004) Mechanism for the hydrolysis of organophosphates by the bacterial phosphotriesterase. *Biochemistry* **43**, 5707-5715.
- Bertini I., Calderone V., Fragai M., Luchinat C., Maletta M., Yeo K. J. (2006) Snapshots of the reaction mechanism of matrix metalloproteinases. *Angel. Chem. Int. Ed.* **45**, 7952-7955.
- Buchbinder J. L., Stephenson R. C., Dresser M. J., Pitera J. W., Scanlan T. S., Fletterick R. J. (1998) Biochemical characterization and crystallographic structure of an *Escherichia coli* protein from the phosphotriesterase gene family. *Biochemistry* **37**, 5096-5106.
- Degtyarenko K. (2000) Bioorganic motifs: towards functional classification of metalloproteins. *Bioinformatics* **16**, 851-864.
- Evans B. E., Wolfenden R. V. (1973) Catalysis of covalent hydration of pteridine by adenosine

aminohydrolase. *Biochemistry* **12**, 392-398.

Gabellieri E., Bernini S., Piras L., Cioni P., Balestreri E., Cercignani G., Felicioli R. (1986) Purification, stability and kinetic properties of highly purified adenosine deaminase from *Bacillus cereus* NCIB 8122. *Biochim. Biophys. Acta* **884**, 490-496.

Guranowski A. (1982) Purine catabolism in plants – purification and some properties of inosine from yellow lupin (*lupinus-luteus* L.) seeds. *Plant Physiol.* **70**, 344-349.

Harbison G. R., Fisher J. R. (1973) Purification, properties and temperature dependence of the adenosine deaminase from a poikilotherm (Bay scallop). *Arch. Biochem. Biophys.* **154**, 81-95.

Heppel L. A., Hurwitz J., Horecker B. L. (1957) Adenine deaminase of *Azotobacter vinelandii*. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 630-633.

Holm L., Sander C. (1997) An evolutionary treasure: Unification of a broad set of amidohydrolases related to urease. *Proteins* **28**, 72-82.

Hong L., Mulholland J., Chinsky J. M., Knudsen T. B. (1991) Developmental expression of adenosine deaminase during decidualization in the rat uterus. *Biol. Reprod.* **44**, 83-93.

Hough R. F., Bass B. L. (1994) Purification of the *Xenopus laevis* doublestranded RNA adenosine deaminase. *J. Biol. Chem.* **269**, 9933-9939.

Challa A., Johnson S., Robertson K., Gunasekaran M. (1999) Properties of adenosine deaminase from *Candida albicans*. *J. Basic Microbiol.* **39**, 97-101.

Chen G., Edwards T., D'souza V. M., Holz R. C. (1997) Mechanistic studies on the aminopeptidase from *Aeromonas proteolytica*: A two-metal ion mechanism for peptide hydrolysis. *Biochemistry* **36**, 4278-4286.

Chinsky J. M., Ramamurthy V., Fanslow W. C., Ingolia D. E., Blackburn M. R., Shaffer K. T., Higley H. R., Trentin J. J., Rudolph F. B., Knudsen T. B. (1990) Developmental expression of adenosine deaminase in the upper alimentary-tract of mice. *Differentiation* **42**, 172-183.

Christianson D. W., Lipscomb W. N. (1989) Carboxypeptidase-A. *Acc. Chem. Res.* **22**, 62-69.

Iwaki-Egawa S., Watanabe Y. (2002) Characterization and purification of adenosine deaminase 1 from human and chicken liver. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* **133**, 173-182.

Jun H. K., Kim T. S., Sakai T. (1991) Purification and characterization of extracellular

- adenosine deaminase from a *Streptomyces* sp. *J. Ferment. Bioeng.* **71**, 6-11.
- Jun H. K., Kim T. S., Yeeh Y. (1994) Purification and characterization of an extracellular adenosine deaminase from *Nocardioides* sp. J-326TK. *Biotechnol. Appl. Bioc.* **20**, 265-277.
- Jun H. K., Sakai T. (1979) Some properties of adenine deaminase of *Pseudomonas synxantha*. *J. Ferment. Technol.* **57**, 294-299.
- Katahira R., Ashihara H. (2006) Profiles of purine biosynthesis, salvage and degradation in disks of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *Planta* **225**, 115-126.
- Keegan L. P., Gerber A. P., Brindle J., Leemans R., Gallo A., Keller W., O'Connell M. A. (2000) The properties of a tRNA-specific adenosine deaminase from *Drosophila melanogaster* support an evolutionary link between pre-mRNA editing and tRNA modification. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 825-833.
- Kidder G. W., Nolan L. L. (1979) Adenine aminohydrolase: Occurrence and possible significance in trypanosomid flagellates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 3670-3672.
- Kim K., Kim M. L., Chung J., Ahn J. H., Rhee S. (2009) Crystal structure of metal-dependent allantoinase from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **387**, 1067-1074.
- Kredich N. M., Hershfield M. S. (1989) Immunodeficiency diseases caused by adenosine deaminase deficiency and purine nucleoside phosphorylase deficiency. In *The metabolit basis of inherited disease* (Scriver C. R., et al., eds.), pp. 1045-1075, McGraw-Hill, New York.
- Kurz L. C., Frieden C. (1983) Adenosine deaminase – solvent isotope and pH effects on the binding of transition state and ground-state analog inhibitors. *Biochemistry* **22**, 382-389.
- Lee P. C. (1973) Developmental changes of adenosine deaminase, xanthine-oxidase, and uricase in mouse tissues. *Dev. Biol.* **31**, 227-233.
- Leung H. B., Kvalnes-Krick K. L., Meyer S. L., deRiel J. K., Schramm V. L. (1989) Structure and regulation of the AMP nucleosidase gene (*amn*) from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **28**, 8726-8733.
- Ling F., Inoue Y., Kimura A. (1991) Purification and characterization of adenosine deaminase from *Klebsiella* sp. LF 1202. *J. Ferment. Bioeng.* **71**, 89-92.
- Lupidi G., Marmocchi F., Cristalli G. (1998) Inhibition studies on membrane adenosine deaminase from human placenta. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **46**, 1071-1080.

- Luthi D., Gunzel D., McGuigan J. A. S. (1999) Mg-ATP binding: Its modification by spermine, the relevance to cytosolic Mg^{2+} buffering, changes in the intracellular ionized Mg^{2+} concentration and the estimation of Mg^{2+} by P-31-NMR. *Exp. Physiol.* **84**, 231-252.
- Matsui H., Shimaoka M., Kawasaki H., Takenaka Y., Kurahashi O. (2001) Adenine deaminase activity of the *yicP* gene product of *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 1112-1118.
- Matthews B. W. (1988) Structural basis of the action of thermolysin and related zinc peptidases. *Acc. Chem. Res.* **21**, 333-340.
- Moffatt B. A., Ashihara H. (2002) Purine and pyrimidine nucleotide synthesis and metabolism. In *The Arabidopsis Book* (Somerville C. R., Meyerowitz E. M., eds.), pp. 1-20, Rockville, MD: American Society of Plant Biologists.
- Moffatt B. A., Stevens Y. Y., Allen M. S., Snider J. D., Pereira L. A., Todorova M. I., Summers P. S., Weretilnyk E. A., Martin-McCaffrey L. (2002) Adenosine kinase deficiency is associated with developmental abnormalities and reduced transmethylation. *Plant Physiol.* **128**, 812-821.
- Murray A. W. (1971) The biological significance of purine salvage. *Annu. Rev. Biochem.* **40**, 811-826.
- Nygaard P. (1978) Adenosine deaminase from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **51**, 508-512.
- Nygaard P., Duckert P., Saxild H. H. (1996) Role of adenine deaminase in purine salvage and nitrogen metabolism and characterisation of the *ade* gene in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **178**, 846-853.
- Ogasawara N., Goto H., Yamada Y., Watanabe T., Asano T. (1982) AMP deaminase isozymes in human tissues. *Biochim. Biophys. Acta* **714**, 298-306.
- Pickard M. A. (1975) Purification and some properties of the soluble and membrane-bound adenosine deaminases of *Micrococcus sodonensis* ATCC 11880 and their distribution within the family *Micrococcaceae*. *Can. J. Biochem.* **53**, 344-353.
- Porter, D. J., Austin, E. A. (1993) Cytosine deaminase. The roles of divalent metal ions in catalysis, *J. Biol. Chem.* **268**, 24005-24011.
- Pospíšilová H, Šebela M, Novák O, Frébort I. (2008) Hydrolytic cleavage of N6-substituted adenine derivatives by eukaryotic adenine and adenosine deaminases. *Biosci. Rep.* **28**, 335-347.

Pospíšilová H., Frébort I. (2007) Aminohydrolases acting on adenine, adenosine and their derivatives. *Biomed. Pap.* **151**, 3-10.

Pospíšilová H., Novák O., Frébortová J., Strnad M., Frébort I.: Oxidative and hydrolytic cleavage of cytokinin derivatives with biomedical and biotechnological potential. *International Symposium of Fifth 21st Century COE "Towards Creating New Industries Based on Inter-Nanoscience"*, Awaji, Japan 2006, Abstracts p. 15-20.

Ribard C., Rochet M., Labedan B., Daignan-Fornier B., Alzari P., Scazzocchio C., Oestreicher N. (2003) Sub-families of α/β barrel enzymes: A new adenin deaminase family. *J. Mol. Biol.* **334**, 1117-1131.

Rosinová M., Zelinková E., Zelinka J. (1978) Adenosine aminohydrolase from *Streptomyces aureofaciens*. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **43**, 2324-2329.

Sawa, T., Fukagawa, Y., Homma, I., Takeuchi, T., Umezawa H. (1967) Mode of inhibition of coformycin on adenosine deaminase. *J. Antibiot.* **20**, 227-231.

Seibert C. M., Raushel F. M. (2005) Structural and catalytic diversity within the amidohydrolase superfamily. *Biochemistry* **44**, 6383-6391.

Shi W., Chance M. R. (2008) Metallomics and metalloproteomics. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 3040-3048.

Schramm V. L., Baker, D. C. (1985) Spontaneous epimerization of (*S*)-deoxycoformycin and interaction of (*R*)-deoxycoformycin, (*S*)-deoxycofomycin, and 8-ketodeoxycoformycin with adenosine deaminase. *Biochemistry* **24**, 641-646.

Schwarzenbacher R., Canaves J. M., Brinen L. S., Dai X., Deacon A. M., Elsliger M. A., Eshaghi S., Floyd R., Godzik A., Grittini C., Grzechnik S. K., Guda C., Jaroszewski L., Karlak C., Klock H. E., Koesema E., Kovarik J. S., Kreuzsch A., Kuhn P., Lesley S. A., McMullan D., McPhillips T. M., Miller M. A., Morse A., Moy K., Ouyang J., Robb A., Rodrigues K., Selby T. L., Spraggon G., Stevens R. C., van den Bedem H., Velasquez J., Vincent J., Wang X., West B., Wolf G., Hodgson K., Wooley J., Wilson I. A. (2003) Crystal structure of uronate isomerase (Tm0064) from *Thermotoga maritima* at 2.85 Å resolution, *Proteins* **53**, 142-145.

Singh L. S., Sharma R. (2000) Purification and characterization of intestinal adenosine deaminase from mice. *Mol. Cell. Biochem.* **204**, 127-134.

Smith P. M. C., Atkins C. A. (2002). Purine biosynthesis. Big in cell division, even bigger in

nitrogen assimilation. *Plant Physiol.* **128**, 793-802.

Sugadev R., Kumaran D., Burley S. K., Swaminathan S.: Crystal structure of an adenine deaminase. *New York Structural Genomics Research Consortium (Nysgrc)*, 2006, (PDB accession 2ICS).

Tainer J. A., Roberts V. A., Getzoff E. D. (1991) Metal-binding sites in proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2**, 582-591.

Thoden J. B., Phillips G. N. Jr., Neal T. M., Raushel F. M., Holden H. M. (2001) Molecular structure of dihydroorotase: A paradigm for catalysis through the use of a binuclear metal center, *Biochemistry* **40**, 6989-6997.

Todd C. D., Tipton P. A., Blevins D. G., Piedras P., Manuel P., Polacco J. C. (2006) Update on ureide degradation in legumes. *J. Exp. Bot.* **57**, 5-12.

Tsukada T., Yoshino M. (1980) Adenosine deaminase from *Azotobacter vinelandii* - purification and properties. *Arch. Microbiol.* **128**, 228-232.

Vallee B. L., Auld D. S. (1990) Active-site zinc ligands and activated H₂O of zinc enzymes. *Proc. Natl. Acad. Scii USA* **87**, 220-224.

Wang Z., Quioco F. A. (1998) Complexes of adenosine deaminase with two potent inhibitors: X-ray structures in four independent molecules at pH of maximum activity, *Biochemistry* **37**, 8314-8324.

Washabaugh M. W., Collins K. D. (1984) Dihydroorotase from *Escherichia coli* – purification and characterization. *J. Biol. Chem.* **259**, 3293-3298.

Wilson D. K., Rudolph F. B., Quioco F. A. (1991) Atomic structure of adenosine deaminase complexed with a transition state analog - understanding catalysis and immunodeficiency mutations, *Science* **252**, 1278-1284.

Wolfenden R., Kaufman J., Macon J. B. (1969) Ring-modified substrates of adenosine deaminase. *Biochemistry* **8**, 2412-2415.

Woo P. W. K., Dion H. W., Lange S. M., Dahl L. F., Durham, L. J. (1974) Novel adenosine and ara-a deaminase inhibitor, (*R*)-3-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-3,6,7,8-tetrahydroimidazo[4,5-*d*] [1,3]diazepin-8-ol. *J. Heterocycl. Chem.* **11**, 641-643.

Xu J., Zhang H. Y., Xie C. H., Xue H. W., Dijkhuis P., Liu C. M. (2005) EMBRYONIC

FACTOR 1 encodes an AMP deaminase and is essential for the zygote to embryo transition in *Arabidopsis*. *Plant J.* **42**, 743-756.

Yabuki N., Ashihara H. (1991) Catabolism of adenine nucleotides in suspension-cultured plant cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1073**, 474-480.

6 Seznam použitých zkratek

2'-dAMP	2'-deoxyadenosinmonofosfát
AAS	atomová absorpční spektroskopie
ADA	adenosindeaminasa
ADAR	adenosindeaminasa působící na RNA
ADAT	tRNA-specifická adenosindeaminasa
ADE	adenindeaminasa
AGD	<i>N</i> -acetylglukosamin-6-fosfátdeacetylasa
AMP	adenosinmonofosfát
AMPD	adenosinmonofosfátdeaminasa
ATP	adenosintrifosfát
CAD	velký polyfunkční protein
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CDA	cytidindeaminasa
DAA	deacetylasa D-aminokyselin
DCF	(8 <i>R</i>)-hydroxyl-2'-deoxykoformycin
DHO	dihydroorotasa
DMSO	dimethylsulfoxid
EC	zkratka enzymové komise (Enzyme Commission)
His-Tag	histidinová kotva (sekvence šesti a více histidinů za sebou na C- nebo N- konci proteinu)
IMP	inosinmonofosfát
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
LB médium	Luria Broth médium
OD ₆₀₀	optická densita při 600 nm
PHP	PTE homologíí protein
psi	tlak v librách na čtvereční palec
PTE	fosfotriesterasa

RDP	ledvinná dipeptidasa
rpm	otáčky za minutu
TIM barel	triosafosfát-isomerasový barel
Tris	tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transferová RNA
URI	uronátisomerasa