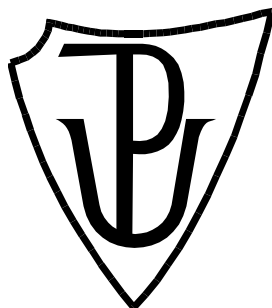


# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## Studium mutantních forem nukleosid-*N*- ribohydrolasy 3 z kukuřice (*Zea mays*)

### DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	<b>Bc. Lucie Popovičová</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. David Kopečný, Ph.D.</b>
Termín odevzdání:	20. července 2015

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 20. července 2015

Lucie Popovičová

Prostřednictvím této práce bych chtěla především poděkovat svému školiteli Mgr. Davidu Kopečnému, Ph.D. za vedení diplomové práce, které bylo velmi odborné a trpělivé. Taktéž bych chtěla poděkovat paní Mgr. Martině Kopečné, Ph.D. a Mgr. Radce Končítíkové, Ph.D. za jejich pomoc při vykonávání experimentální práce v laboratoři.

### Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení	Lucie Popovičová
Název práce	Studium mutantních forem nukleosid- <i>N</i> -ribohydrolasy 3 z kukuřice
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Oddělení biochemie proteinů a proteomiky, CRH, PŘF UP
Vedoucí práce	Mgr. David Kopečný, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2015
Abstrakt	<p>Tato práce se věnuje cílené mutagenезi nukleosid-<i>N</i>-ribohydrolasy 3 z kukuřice seté (<i>ZmNRH3</i>) a následné charakterizaci několika mutantních forem. Cílem v teoretické části práce bylo zpracovat přehlednou rešerši, která bude zahrnovat metabolismus purinů a pyrimidinů v rostlinách a dále přítomnost a funkci dosud popsanych nukleosid-<i>N</i>-ribohydrolas v různých organismech. V praktické části této práce bylo provedeno klonování, místně cílená mutagenезe, exprese <i>ZmNRH3</i> v buňkách <i>E. coli</i>, purifikace rekombinantního proteinu <i>ZmNRH3</i>-WT a dalších 7 mutantních forem K279A, W226A, W226Y, Y231A, Y231D, H81A a H239A pomocí afinitní chromatografie. Provedením SDS-PAGE bylo možno určit, zda a jak jsou dané mutantní varianty v bakterii produkované. Pomocí CD spektroskopie bylo ověřeno, zda jsou mutantní proteiny správně složené. Metodou gelové permeační chromatografie byla stanovena molekulová hmotnost WT a mutantní formy K279A . Dále bylo provedeno měření teplotní</p>

stability, substrátové specificity a kinetických parametrů  $K_m$  a  $V_{max}$ .

Klíčová slova	Kukuřice, místně cílená mutageneze, pyrimidin, purin, nukleosid- <i>N</i> -ribohydrolasa, metabolismus
Počet stran	70
Počet příloh	0
Jazyk	Český

### **Bibliographical identification:**

First name and surname	Lucie Popovičová
Title	Study of mutant forms of nucleoside- <i>N</i> -3 ribohydrolasy maize ( <i>Zea mays</i> )
Type of thesis	Master
Department	Department of Protein Biochemistry and Proteomics, CRH, Faculty of Science, UP
Supervisor	Mgr. David Kopečný, Ph.D.
Year of presentation	2015

#### Abstract

This master thesis focuses on site-directed mutagenesis of nucleoside-*N*-ribohydrolase 3 from maize (ZmNRH3) and subsequent characterization of several mutant forms. The aim of the theoretical part is to provide a literature review, which will cover purine and pyrimidine metabolism in plants and the presence and function of previously described nucleoside-*N*-ribohydrolases in various organisms. In the experimental part of this work, cloning, site-directed mutagenesis of ZmNRH3 and the expression in *E. coli* were performed followed by purification of recombinant protein ZmNRH3-WT and other seven mutant variants K279A, W226A, W226Y, Y231A, Y231D, H81A and H239A using affinity chromatography. SDS-PAGE was done to determine whether and how are above mutant variants produced in bacteria. CD spectroscopy was used to verify whether mutant proteins are properly folded. Molecular weights of WT and mutant form K279A were

determined by gel permeation chromatography. Furthermore, thermostability as well as substrate specificity and kinetic parameters  $K_m$  and  $V_{max}$  were determined.

Keywords	Maize, site-directed mutagenesis, pyrimidine, purine nucleoside-N-ribohydrolasa, metabolism
Number of pages	70
Number of appendices	0
Language	Czech

## OBSAH

<b>1 CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>- 10 -</b>
<b>2 ÚVOD .....</b>	<b>- 11 -</b>
<b>3 TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>- 12 -</b>
3.1 Metabolismus purinových a pyrimidinových nukleotidů v rostlinách .....	- 12 -
3.2 Biosyntéza purinů .....	- 14 -
3.2.1 Biosyntéza purinů <i>de novo</i> .....	- 14 -
3.2.2 Recyklace purinových nukleotidů .....	- 16 -
3.2.3 Katabolismus purinových nukleotidů .....	- 17 -
3.3 Biosyntéza pyrimidinů .....	- 19 -
3.3.1 Biosyntéza pyrimidinů <i>de novo</i> .....	- 19 -
3.3.2 Recyklace pyrimidinových nukleotidů .....	- 20 -
3.3.3 Katabolismus pyrimidinových nukleotidů .....	- 21 -
3.4 Nukleosid- <i>N</i> -ribohydrolasy (nukleosidasy, NRH) .....	- 22 -
3.5 Cytokininové ribosidy .....	- 30 -
<b>4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>- 31 -</b>
4.1 Použitý biologický materiál .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.2 Použité chemikálie .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.3 Přístrojové vybavení .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4. 4 Použité metody .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.4.1 Klonování .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.4.2. Produkce rekombinantních proteinů v <i>E. coli</i> .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.4.3 SDS-PAGE, úroveň exprese ZmNRH3 a jeho mutantních forem .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.4.4. Gelová permeační chromatografie – stanovení molekulové hmotnosti ZmNRH3 a mutantní formy K279A .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.4.5 Stanovení koncentrace proteinů metodou Bradfordové .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.4.6 Metoda CD spektroskopie .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.4.7 Stanovení teplotní stability proteinů ZmNRH3 a K279A .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.4.8 Stanovení aktivity ZmNRH3 a jeho mutantních forem ...	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.4.9 Měření substrátové specifity a stanovení $K_M$ a $V_{lim}$ .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
<b>5 Výsledky .....</b>	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>



5.1 Místně cílená mutageneze <i>ZmNRH3</i> .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
5.2. Testování úrovně exprese všech forem <i>ZmNRH3</i> pomocí SDS-PAGE .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
5.3. Molekulové vlastnosti <i>ZmNRH3</i> a jeho mutantních forem ..	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
5.4. Stanovení koncentrace proteinů .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
5.5. Ověření sekundární struktury <i>ZmNRH3</i> a jeho mutantních forem.....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
5.6. Stanovení teplotní stability .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
5.7. Porovnání substrátové specifity <i>ZmNRH3</i> .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
5.8. Stanovení kinetických parametrů <i>ZmNRH3</i> a jeho mutantních forem.....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
<b>6 Diskuse</b> .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
<b>7 Závěr</b> .....	<b>- 32 -</b>
<b>8 Literatura</b> .....	<b>- 33 -</b>

## 1 CÍLE PRÁCE

### ➤ Teoretická část:

- Vypracovat literární rešerši k tématu práce
- Charakterizovat metabolismus purinů a pyrimidinů v rostlinách
- Popsat bakteriální, protozoální a rostlinné nukleosid-*N*-ribohydrolasy, výskyt, substrátová specifita
- Popis reakčního mechanismus *N*-ribohydrolas

### ➤ Experimentální část:

- Klonování
- Expresse genu v *E. coli*, extrakce, purifikace rekombinantního proteinu
- Optimalizace exprese při různých teplotách a koncentracích IPTG
- Teplotní stabilita a stanovení molekulové hmotnosti gelovou chromatografií
- PCR, místně řízená mutageneze, testování exprese získaných mutantních forem v *E. coli*, SDS-PAGE
- Analýza substrátových a kinetických vlastností vs WT

## 2 ÚVOD

Nukleosid hydrolasy nebo nukleosid-*N*-ribohydrolasy (NRH) jsou enzymy patřící do skupiny hydrolas, katalyzující hydrolytické štěpení nukleosidů na svou příslušnou nukleobázi a cukr. V tomto případě se jedná o ribózu. NRH byly poprvé objeveny u prvoků, v kvasinkách a bakteriích např. u *Leishmania major* nebo *Trypanosoma vivax*. Později byl jejich výskyt prokázán i u hmyzu (*Aedes Aegypti*) nebo rostlin jako je *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays* nebo *Physcomitrella patens*. Tyto enzymy jsou vysoce specifické vůči ribóze a jsou lokalizovány v cytosolu. Můžeme je také zařadit do skupiny metaloproteinů, protože se v jejich aktivním místě nachází vápenatý ion. NRH jsou také velmi variabilní, co se týče preference vůči nukleobázím. Rozdělit je můžeme do 4 tříd dle substrátové specifity: NRH specifické pro pyrimidiny (Cyt, Uri, CU-NRH), pro puriny (Ino, Ado, Gua, IAG-NRH), specifické pro 6-oxopuriny (Gua, Ino, IG-NRH) a nespecifické NRH (IU-NRH).

Metabolismus purinů a pyrimidinů hraje klíčovou úlohu v růstu a vývoji rostlin, uchování informací a katalytické aktivitě. Nukleotidy jsou důležité intermediáty syntézy nukleových kyselin, zatímco nukleotidové cukry jako je v tomto případě ribóza, je důležitá pro skladování látek biosyntézy, pro výstavbu sloučenin nebo slouží jako prekurzory cytokininů a alkaloidů. Další skutečností je, že purinové nukleotidy jsou zapojeny do přenosu signálu a jsou součástí kofaktorů, které se účastní enzymatických reakcí např. NAD, FAD a acetyl CoA. Metabolismus nukleotidů je možno rozdělit do tří částí: *de novo* syntéza, recyklace (interkonverze) a katabolismus.

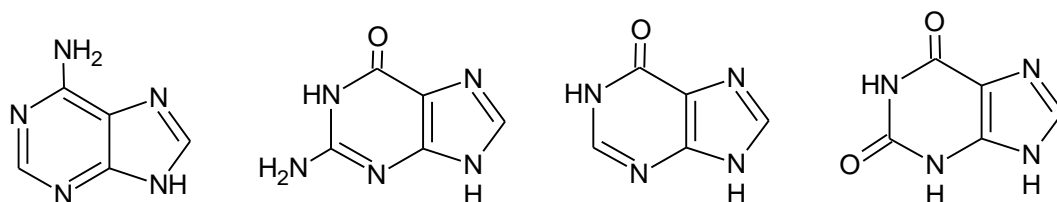
Kukuřice setá obsahuje 5 genů – NRH1a, NRH1b, NRH2, NRH2b a NRH3. Tato práce je zaměřená na gen *NRH3* a jeho mutantní varianty K279A, W226A, W226Y, Y231A, Y231D, H81A a H239A. Byla studována substrátová specifita, teplotní stabilita a stanoveny kinetické parametry s vybranými pyrimidinovými a purinovými ribosidy.

### 3 TEORETICKÁ ČÁST

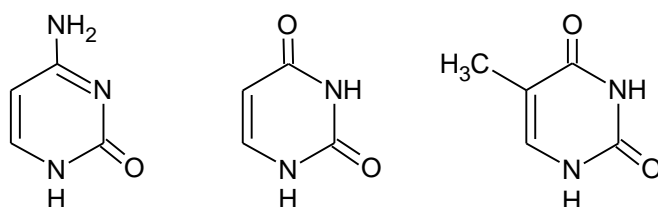
#### 3.1 Metabolismus purinových a pyrimidinových nukleotidů v rostlinách

Nukleotidy jsou sloučeniny složené z heterocyklické pyrimidinové nebo purinové báze, na níž je navázán monosacharid složený z pěti jednotek uhlíku (ribóza u RNA nebo deoxyribóza u DNA) a připojen jeden nebo více zbytků kyseliny fosforečné. Nukleotidy purinů a pyrimidinů, respektive jejich metabolismus, jsou důležité pro vývoj a růst rostlin. Sehrávají hlavní a zásadní roli v uchovávání informací jako stavební složky DNA v jádře buňky, DNA-syntetizující organely nebo také komponenty transkriptů (Senecoff *et al.*, 1993). Ribonukleová kyselina, r-RNA a t-RNA, jsou základními komponenty pro syntézu bílkovin. Zástupci purinových bází jsou adenin, guanin, xantin a hypoxantin (obrázek 1) a pyrimidinových cytosin, uracil, thymin (obrázek 2). Od těchto bází jsou odvozené ribosidy (obrázek 3 a 4).

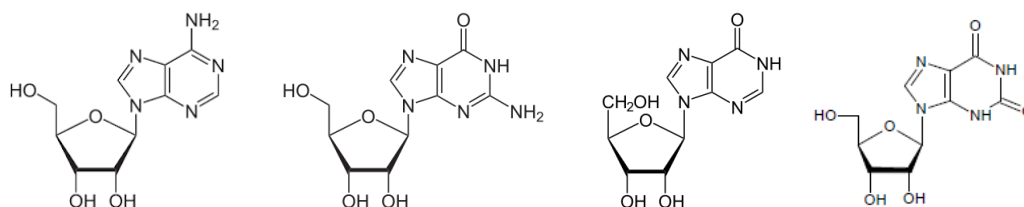
Nukleotidy se mohou uplatnit jako prekurzory pro přímou syntézu vitamínů např. riboflavinu, thiaminu, folátů či kyseliny listové (Crozier *et al.*, 2000, Hanson a Gregory, 2002, Herz *et al.*, 2000). Mohou být ale také prekurzory esenciálních kofaktorů oxidoreduktas např. nikotinamidových ( $\text{NAD}^{\pm}$ ), flavinových (FAD) nebo kofaktorů transferas jako je např. acetyl CoA.



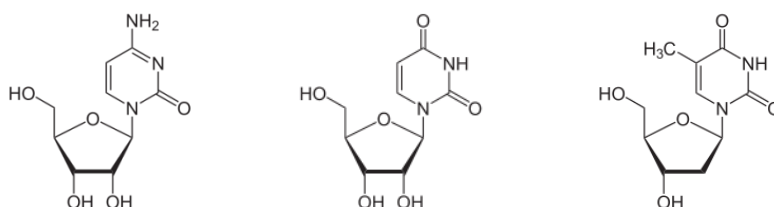
Obrázek 1. Strukturální vzorce purinových bází - zleva: adenin, guanin, hypoxantin, xantin



Obrázek 2. Strukturální vzorce pyrimidinových bází – zleva: cytosin, uracil, thymin



**Obrázek 3. Strukturální vzorce purinových ribosidů – zleva:** adenosin, guanosin, inosin, xantosin



**Obrázek 4. Strukturální vzorce pyrimidinových ribosidů – zleva:** cytidin, uridin, thymidin

Purinové nukleotidy ATP jsou během energetických základních procesů fotosyntézy a respirace produkovány z ADP a příslušného fosfátu. Tento proces je obecně velmi důležitý pro zachování chemické energie, protože tato molekula (ATP) je největším zdrojem energie ve velké většině všech metabolických reakcí. Při rozkladu ATP na ADP a AMP dochází nejen k uvolnění energie, ale také k tvorbě důležitých makromolekul. AMP hraje zásadní roli v syntéze proteinů, kdy je aktivátorem aminokyselin a ADP je potřebný pro syntézu škrobu a celulózy. Také pyrimidinové nukleotidy jsou důležitými látkami. Např. deriváty UDP a UTP jsou substráty syntézy a také degradace cukru sacharózy, UDP je také prekurzorem syntézy celulózy, glykoproteinů, fosfolipidů či dalších polysacharidů (Lim a Bowles, 2004). Za zmínku stojí také cyklické formy těchto nukleotidů (cAMP, cGMP atd.). Tyto látky plní důležitou roli v buněčné signalizaci, kdy slouží jako druzí poslové.

Existují studie, že tyto nukleotidy hrají roli i v syntéze cytokininů, což jsou látky, řadí se do skupiny fytohormonů a ve své struktuře obsahují  $N^6$ -substituovaný derivát adeninu. Příznivě ovlivňují buněčnou diferenciaci a podporují aktivní růst (D'Agostino a Kieber, 1999).

Způsob syntézy nukleotidů lze rozdělit do dvou tříd: *de novo* syntéza a recyklace. První způsob, tedy *de novo* syntéza, je syntéza tzv. od začátku. Tato cesta je ovšem v porovnání s druhým způsobem, recyklací, velmi energeticky náročná, a tudíž nevýhodná. Recyklace využívá již vzniklé meziprodukty a

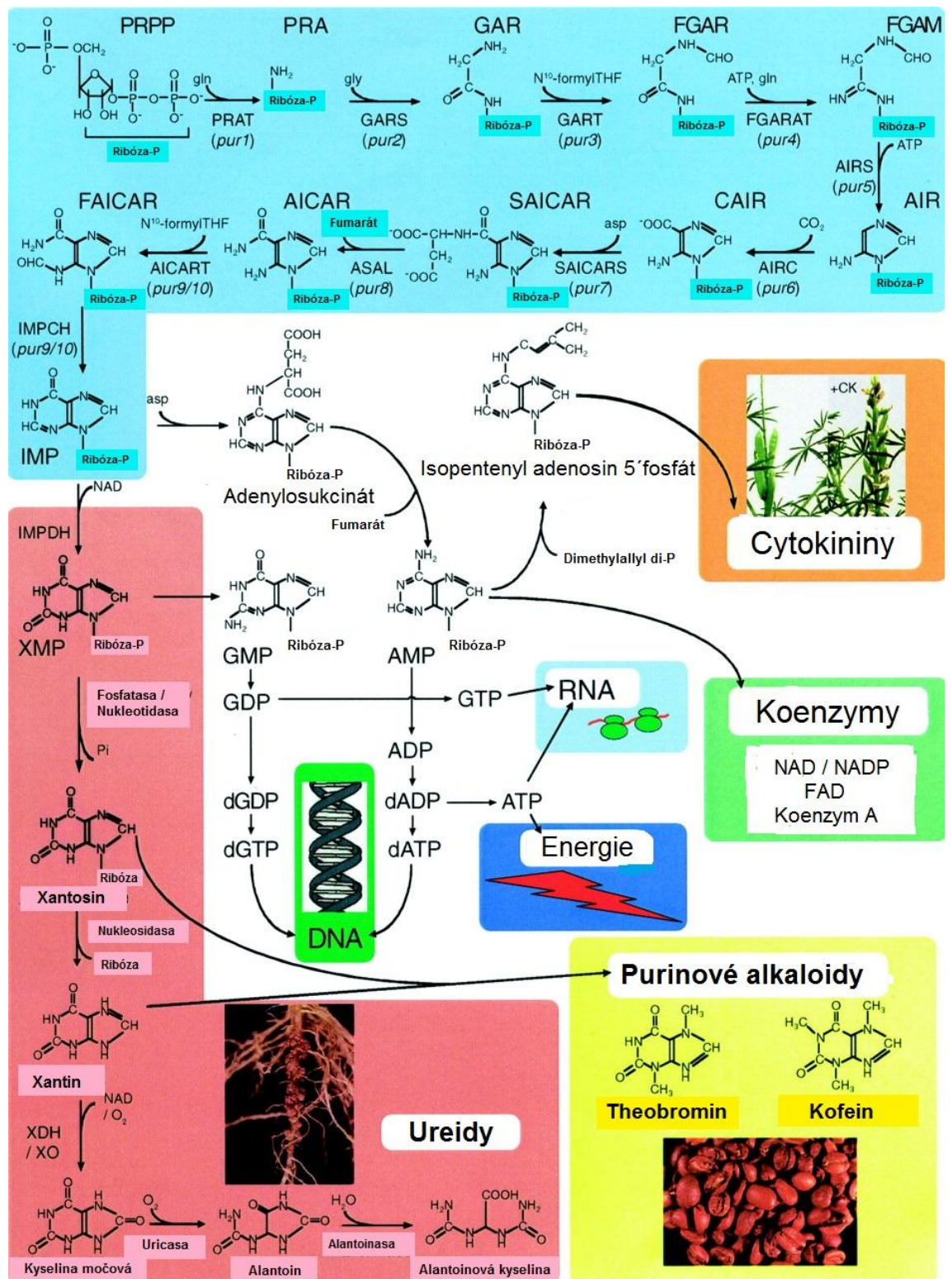
dotváří tak jen výsledné produkty za výrazně nižší podíly energie. Enzymy těchto obou těchto drah jsou považovány za základní a v buňce aktivní, proto lze říci, že se vyskytují ve všech buňkách (Moffatt a Ashihara, 2002).

Purinový a pyrimidinový metabolismus je nutné brát jako celek, a tudíž zahrnuje jak již zmíněnou *de novo* syntézu, recyklaci, tak i degradaci. Tato dráha je důležitá z hlediska velkého zisku energie a jednotlivé odbourané komponenty lze použít pro syntézy jiných větších složek či sloučenin. Extracelulární hydrolýzou nukleových kyselin dochází k vzájemné interakci endonukleas, fosfodiesteras a nukleosidových fosforylas. Příslušné endonukleázy degradují DNA a RNA, které vedou k tvorbě oligonukleotidů a ty jsou dále štěpeny fosfodiesterasami na volné nukleosidy. V případě, že nukleosidy nebo báze nejsou dále spotřebovávány, purinové báze jsou degradovány na kyselinu močovou a pyrimidinové báze na  $\beta$ -aminoisobutyryát,  $\text{NH}_3$  a  $\text{CO}_2$ .

## **3.2 Biosyntéza purinů**

### **3.2.1 *De novo* biosyntéza purinů**

Purinové nukleotidy jsou syntetizovány z malých molekul, jako jsou aminokyseliny, glycin, glutamin, aspartát, aktivovaný ribózový prekurzor PRPP, 10-formyl tetrahydrofolát a  $\text{CO}_2$ . Základní biochemické a molekulární studie biosyntézy purinů byly provedeny v mikroorganismech (Rebora *et al.*, 2001, Zalkin & Dixon, 1992, Zalkin & Nygaard, 1996) a na zvířatech (Buchanan & Hartmann, 1959). Rostliny využívají téměř stejné reakce k syntéze AMP, IMP a GMP (Boldt a Zrenner, 2003). Jednotlivé enzymatické kroky reakcí purinové biosyntézy jsou shrnuty na obrázku 5.



Obrázek 5. Zjednodušené schéma zahrnující de novo syntézu, recyklaci a katabolismu purinových nukleotidů. (Převzato a upraveno podle Smith a Atkins, 2002)

Tvorbou 5-fosforibosyl-1-amiu (PRA) z PRPP a glutaminu za pomoci fosforibosylpyrofosfátamidotransferasy (PRAT) začíná samotná biosyntéza purinových nukleotidů. GAR syntasa katalyzuje za pomoci 1 molekuly ATP tvorbu glycinamidribonukleotidu (GAR) tím, že připojí glycin pomoci amidové vazby k PRA. Následně je za pomoci enzymu GAR transformylasy transformován a vzniká formylglycinamidribonukleotid (FGAR) za účasti 10 - formyltetrahydrofolátu. Přeměnu na formylglycinamidinribonukleotid (FGAM) za spotřeby energie ve formě ATP a glutaminu má na svědomí enzym FGAR-reduktasa-syntetasa. Další ATP je třeba v momentu, kdy dochází k uzavírání kruhu do cyklického 5 -aminoimidazolribonukleotidu (AIR) pomoci AIR-syntasy. Dále dochází za pomoci enzymu AIR-karboxylasy ke vzniku 4-karboxyaminoimidazolribonukleotidu (CAIR). Celý kruh je poté utvořen navázáním aspartátu za vzniku, N-sukcinyl-5-aminoimidazol-4-karboxamidribonukleotidu (SAICAR) za spotřeby 1 ATP pomoci SAICAR-syntasy. Z kruhu poté vystupuje fumarát za vzniku 5 – aminoimidazol – 4 – karboxamidribonukleotidu (AICAR). Dokončení molekuly purinu se účastní enzym (ATIC) (5–aminoimidazol–4-karboxamidribonukleotidformyltransferasa/inosinmonofosfátcyklohydrolasa, který je enzymem bifunkčním a plní dvě funkce – transferasovou a hydrolasovou. Kruh je uzavřen poté tak, že je 5–formaminoimidazol–4-karboxamidribonukleotid (FAICAR) dehydratován, utvoří se molekula inosinmonofosfátu (IMP). Dále lze dráhy rozdělit na dva bloky – tvorba AMP a tvorba guanosinmonofosfátu (GMP) prostřednictvím xanthosinmonofosfátu (XMP) (Zrenner *et al.*, 2006).

### 3.2.2 Recyklace purinových nukleotidů

Vzhledem k tomu, že *de novo* syntéza nukleotidů potřebuje mnohonásobně větší podíl energie ve formě ATP, kdy je zapotřebí pět molekul ATP pro produkci AMP nebo sedm pro syntézu GMP. Recyklace vyžaduje pouze jednu molekulu ATP, což je pro buňku energeticky výhodné. Recyklační dráhy využívají nukleosidů nebo nukleotidů vyloučených jako vedlejší produkty buněčného metabolismu nukleových kyselin. Recyklací se korigují i hladiny bází a nukleosidů, aby nedocházelo k inhibicím metabolických reakcí (Ashihara a



Crozier, 1999). Enzymy recyklačních drah se nachází v cytosolu (obrázek 5). Rozdílem mezi recyklací a *de novo* syntézou je také vysoký stupeň kontroly recyklačních drah u různých eukaryotních organismů.

Důležitou skupinou enzymů, které se podílejí na recyklaci, jsou enzymy zvané ribohydrolasy. Nukleosidfosforylasy purinů, které katalyzují přechod ribózafosfátu na ribosid, hrají základní roli oproti enzymům zvaných nukleosidfosfotransferasy, které katalyzují reakci přeměny ribosidu na nukleotid (Wagner a Backer, 1992).

Purinové báze jako adenin, guanin a hypoxantin, jsou metabolizovány dvěma enzymy: adenin-fosforibosyltransferasou a hypoxantin / guaninfosforibosyltransferasou na AMP, GMP a IMP. Jako zdroj fosfátu slouží PRPP (Schoor a Moffatt, 2004).

Jak bylo zjištěno, adeninfosforibosyltransferasa a adenosinkinasa, jsou důležité při přeměně cytokininů (Moffatt a Ashihara, 2002). Cytokiny jsou  $N^6$ -substituované deriváty, které vznikají připojením isopentenylu k AMP za vzniku isopentenyladenosinmonofosfátu. Poté je postranní isoprenoidní řetězec upraven tak, aby vedl k tvorbě různých derivátů (Allen *et al.*, 2002)

### **3.2.3 Katabolismus purinových nukleotidů**

Degradace purinů představuje významnou roli v metabolismu dusíku u rostlin. Rozkladem nukleotidů vznikají nukleosidy za pomoci enzymů zvaných nukleotidas. Konečné produkty se od sebe ale výrazně liší, především proto, že např. u savců je konečným produktem kyselina močová, u jiných zase alantoin (Henderson a Paterson, 1973). To je způsobeno absencí enzymu urikasy u primátů a konečným produktem katabolismu purinů je kyselina močová jako hlavní odpadní zdroj dusíku. Rostliny jsou závislé na efektivnosti využití dusíku, což znamená přednost ukládání před vyloučením (Smith a Atkins, 2002). V absolutní většině rostliny purinové nukleotidy oxidačně degradují skrz kyselinu močovou na alantoin, oxid uhličitý a  $NH_3$ , který je pak prostřednictvím GOGAT (glutamin-oxoglutarát-aminotransferasa) dráhy reasimilován (Schubert a Boland, 1990), (Todd a Polacco, 2004). Rozdílem oproti *de novo* syntéze purinových nukleotidů je kompartmentace katabolismu podle orgánů. Např. v kořenech rostlin, kde se výše uvedené látky hromadí,

jsou přesouvány do jiných částí rostliny a poté degradovány úplně. Zajímavé je, že většina enzymů, které se v celkovém katabolismu přirozeně vyskytují, nejsou u všech organismů. Příkladem je alanindeaminasa, která se vyskytuje u zvířat, ovšem tento enzym u rostlin není přítomen (Moffatt a Ashihara, 2002).

Výše zmíněnou recyklační drahou některé purinové báze reagují s PRPP a vytvoří se AMP nebo GMP. Po konverzi AMP na IMP pomocí AMP deaminasy (AMPD), jsou dvě cesty pro následné odbourání adeninových nukleotidů. IMP je defosforylován na inosin pomocí 5'-nukleotidasy nebo fosfatasy, poté hydrolyzován na hypoxantin reakcí s inosin/guanin nukleosidasou a dále transformován přes xantindedydrogenasu (XDH) na xantin. Alternativní cestou je pak způsob transformace IMP na XMP pomocí IMPDH (IMP-dehydrogenasa) a dále převedení na xanthosin pomocí 5'-nukleotidasy. Ten je pak transformován na xantin pomocí inosin/guanin nukleosidasy. Tato dráha je výhodná např. pro luštěniny, jako je sója (Smith a Atkins, 2002). Obě tyto cesty odbourávání závisí na AMPD, ovšem rostliny neobsahují alanindeaminasu a adenosindeaminasu (Yabuki a Ashihara, 1991). Jako protiklad lze vzít v úvahu guanosindeaminasu, která je v rostlinách detekována. Z toho vyplývá, že guaninové nukleotidy jsou katabolizovány defosforylací za zisku guanosinu, který je pak deaminován na xanthosin nebo přeměněn na guanin dráhou vedoucí k tvorbě xantinu. Tyto dráhy mají společný produkt xantin, což je centrální metabolit purinů (Ashihara a Suzuki, 1997), (Stasolla *et al.*, 2003).

Následná degradace purinu je uskutečněna pomocí xantindehydrogenasy a vede k tvorbě kyseliny močové. Urikasy poté pak převedou kyselinu močovou na allantoin, allantoinasa na alantoát. Až je vše převedeno na finální produkty  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CO}_2$  a glyoxylát, mohou být tyto látky opět použity pro další dráhy jako je fotosyntéza nebo GOGAT cyklus. Recyklace uhlíku a dusíku drahami katabolismu purinů, mají velmi důležitou roli při syntéze alkaloidů teobrominu a kofeinu (Ashihara a Suzuki, 2004), (obrázek 5). Tyto metylované deriváty xantinu jsou také důležité jako obrana mladých listových tkání proti hmyzu nebo jsou uvolňovány do půdy k inhibici klíčení semen. Zajímavá je také skutečnost, že deriváty xantinu mají význam i v biotechnologickém výzkumu plodin, a to ve výrobě bezkofeinových nápojů (Zrenner *et al.*, 2006).

### 3.3 Biosyntéza pyrimidinů

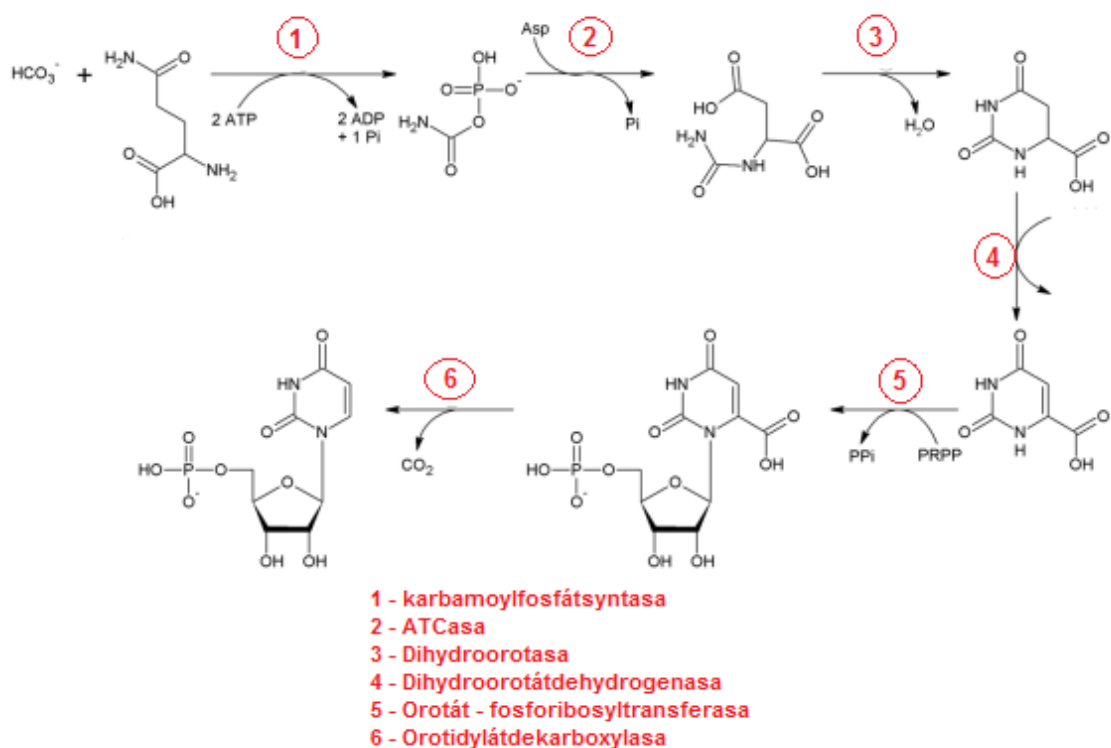
#### 3.3.1 *De novo* biosyntéza pyrimidinů

Syntéza pyrimidinů *de novo* vychází z tvorby UMP (uridinmonofosfát) z karbamoylfosfátu (CP), aspartátu a 5-fosforibosyl-1-pyrofosfátu (PRPP) za účasti cytosolového enzymu karbamoylfosfátsyntetasy (CPS). Tato dráha je také nazývána jako dráha orotátu. Karbamoylfosfátsyntetasa produkuje karbamoylfosfát s pomocí uhličitanu, ATP a aminoskupiny, která pochází z glutaminu. Samotný CP není zapotřebí jen pro *de novo* syntézu pyrimidinů, ale také slouží jako prekurzor biosyntézy argininu. Další krok reakce tvoří karbamoylaspartát pomocí aspartáttranskarmamoylasy (ATCasa). Cyklizace karbamoylaspartátu pro uzavření kruhu je katalyzována enzymem dihydroorotasou (DHOasa). Poté se dihydroorotát (DHO) oxiduje dihydroorotátdehydrogenasou (DHODH) na orotát (OA). Ten kondenzuje s PRPP na orotidin-5'-monofosfát (OMP) pomocí orotátfosforibosyltransferasy (OPRTasa). Následně proběhne dekarboxylace a vznikne uridin-5'-monofosfát (obrázek 6).

I když je *de novo* syntéza konzervovaná, existují různé rozdíly mezi bakteriemi, kvasinkami či vyššími eukaryoty (Nara *et al.*, 2000). Například u *Escherichia coli* a jiných bakterií je každý enzymatický krok katalyzován jiným enzymem a ten kódován jiným genem (Neuhard a Nygaard, 1987). V rostlinách jsou první tři kroky katalyzovány třemi samostatnými enzymy, zatímco u savců jsou první tři kroky katalyzovány multifunkčním enzymem karbamoylfosfátsyntasou – aspartátaminotransferasou – transkarmamoylasou - dihydroorotasou (Hiroyuki *et al.*, 1996). V rostlinách a u savců jsou poslední dva kroky katalyzovány enzymem UMP-syntasou (UMPasa) s odlišnými bifunkčními doménami. Z fylogenetického hlediska je organizace drah výrazně chimérická (CTPasa u cyanobakterií, DHOasa v protistech, ATCasa u eukaryot, DHODH a UMP u vyšších eukaryot), (Nara *et al.*, 2000). Z prvních studií celkového genomu rostlin a také *E. coli* bylo zjištěno, že za vznik pyrimidinu a argininu je zodpovědná jen jedna forma CPSasy. Dnes je ovšem známo, že většina ostatních vyšších eukaryot má dva typy CPSasy. CPSasa I je specifická na amoniak, nachází se v mitochondriích a je zodpovědná za biosyntézu argininu. CPSasa II přednostně využívá glutamin, nachází se v cytosolu, a přispívá

biosyntéze pirimidinu (Thoden *et al.*, 2002).

Biosyntéza pyrimidinů není nějak výrazně regulována transkripčními faktory, výjimkou jsou jen některé změny, které byly způsobeny dlouhým vývojovým přechodem (Giermann *et al.*, 2002). Regulace drah je na úrovni pozitivní a negativní zpětné vazby působící na CPAasu a ATPasu. Odpovědi těchto enzymů byly poprvé objasněny u mikrobů a představují klasické příklady alosterické regulace. Alosterická inhibice CPSasy pomocí UMP může být překonána ornithinem, pravděpodobně pro umožnění vstupu CP, který má být vyráběn pro biosyntézu argininu, ovšem i nezávisle pro další syntézu pyrimidinových nukleotidů (O'Neal a Naylor, 1976). U savců tato regulace probíhá prostřednictvím fosforylace proteinkinasy A (Carrey a Hardie, 1988) a MAP kinasy (Graves *et al.*, 2000)



**Obrázek 6. Schéma biosyntézy pyrimidinů.** Jednotlivé enzymy, které katalyzují reakce, jsou uvedeny pod obrázkem. (Převzato a upraveno z diplomové práce Ondřeje Kotlanda, 2012)

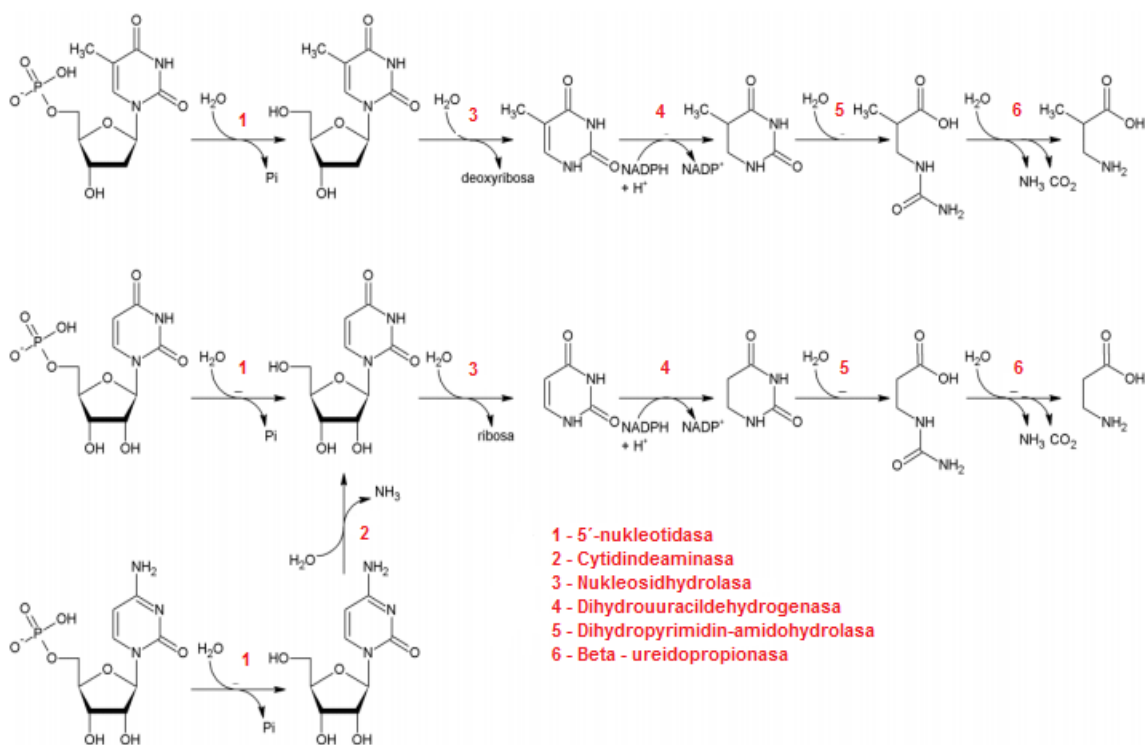
### 3.3.2 Recyklace pyrimidinových nukleotidů

Rostlinné buňky využívají znovu pyrimidinové báze a nukleosidy

odvozené již z předešle vytvořených nukleotidů proto, že biosyntetické dráhy jsou velmi energeticky náročné. Do reakcí tudíž vstupují postupně nukleosidas a nukleotidas. Např. uridin a cytidin jsou převáděny na příslušné nukleotidy uracil a cytosin pomocí uridinkinasy a cytidinkinasy (Ashihara *et al.*, 2000). Jako jediný uracil může být ale převeden přímo na UMP enzymem uracilfosforibosyltransferasou (UPRT), (Kanamori *et al.*, 1981). Tyto enzymy jsou lokalizovány v cytosolu nebo plastidech, proto je pravděpodobné, že jednotlivé kroky recyklace budou probíhat právě v těchto organelách (Schmid *et al.*, 2005).

### 3.3.3 Katabolismus pyrimidinových nukleotidů

Pyrimidinové nukleotidy jsou katabolizovány na pyrimidinové nukleosidy odstraněním fosfátové skupiny reakcí, která je katalyzována 5'-nukleotidasou např. UMPH (uridinmonofosfáthydrolasa). Nukleosidy jsou pak převedeny na volné pyrimidinové báze odstraněním ribózy pomocí nukleosidas např. URH. Protože zvířata ani rostliny nemají cytosindeaminasu, musí být cytidin deaminován cytidindeaminasou (CDA) na uridin a ten je poté převeden na uracil. Uracil a tymin jsou pak degradovány reduktivní drahou (Wasternack *et al.*, 1978) ve třech po sobě jdoucích krocích pomocí dihydrouracildehydogenasy (PYD1), dihydropyrimidinasy (PYD2) a  $\beta$ -ureidopropionasy (PYD3), (obrázek 7). Alternativní drahou mohou být nukleosidy převedeny zpět na nukleotidy recyklační drahou. Degradace je reverzí *de novo* syntézy, kdy vzniká  $\beta$ -alanin prekurzor pantotenátu z koenzymu A nebo  $\beta$ -aminobutyrate a uvolní se  $\text{NH}_3$  a  $\text{CO}_2$ . Pyrimidiny mohou být také metabolizovány na sekundární rostlinné produkty (lathyrin, vicin, convicin) s obrannými specifickými funkcemi (Kafer *et al.*, 2004)



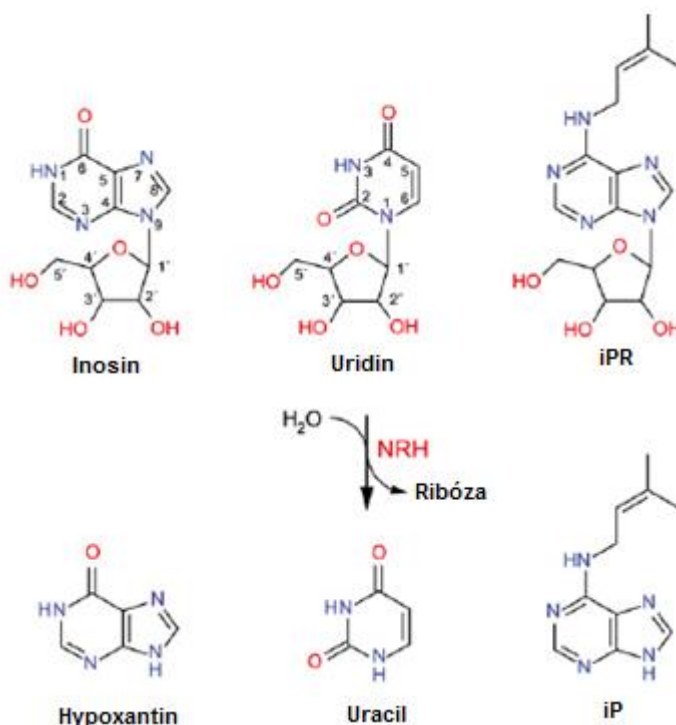
**Obrázek 7. Schéma katabolismu pyrimidinů.** Jednotlivé enzymy účastníci se katabolismu jsou vypsány na pravé straně obrázku. (převzato z diplomové práce Ondřeje Kotlanda, 2012)

### 3.4 Nukleosid-*N*-ribohydrolasy (nukleosidasy, NRH)

Nukleosid-*N*-ribohydrolasy byly nalezeny v bakteriích (Petersen *et al.*, 2001), kvasinkách (Kurtz *et al.*, 2002), prvocích (Pellé *et al.*, 1998) a hmyzu (Riberio *et al.*, 2003) i rostlinách (Jung *et al.*, 2009). Překvapivě, ale tyto geny nebyly nalezeny u savců. Funkce těchto nukleosidas byla dobře popsána u cizopasných prvků jako je např. *Trypanosoma vivax*, *Leishmania major* nebo *Crithidia fasciculata*. V těchto organismech jsou využity především purinové ribosidy (Hammond a Gutteridge, 1984). Parazitičtí prvoci spoléhají na recyklaci purinů kvůli přežití proto, že na rozdíl od většiny ostatních živých organismů, postrádají *de novo* biosyntetickou purinovou dráhu. Vzhledem k této skutečnosti byly studovány interakce metabolismu mezi parazitem a hostitelem za účelem využití potenciálních pozitivních cílů jako chemoterapeutické intervence (Verseés *et al.*, 2001). V průběhu uplynulých let byly NRH klasifikovány do čtyř podskupin dle preference vůči nukleobázi:

- specifické pro pyrimidiny (Cyt, Uri), (Giabbai a Degano, 2004).
- specifické pro puriny (Ino, Ado, Xan), (Parkin *et al.*, 1996)
- specifické pro 6 - oxopuriny (Gua, Ino), (Estupiñán a Schramm, 1994)
- nespecifické NRH (IU-NRH), (Parkin *et al.*, 1991; Shi *et al.*, 1999)

NRH katalyzují hydrolytické štěpení ribosidu na příslušnou bázi a ribózu (obrázek 8). Jsou klíčovým enzymem kontrolující, zda jsou syntéza, recyklace a katabolismus nukleotidů v rovnováze. NRH jsou z funkčního hlediska glykosidasy – hydrolyzují N-glykosidickou vazbu  $\beta$ -ribonukleosidů. Patří do skupiny metalloproteinů. Ve své struktuře obsahují vápenatý iont. Aktivní místo je specifické vůči ribóze, ale ne vůči nukleobázi. V sekvencích se objevuje charakteristický N-terminální DXDXXXDD motiv (Verseés *et al.*, 2001). V této práci je zkoumanou rostlinou kukuřice setá (*Zea mays*). Ta obsahuje celkem 5 genů NRH, a to *NRH1a*, *NRH1b*, *NRH2a*, *NRH2b* a *NRH3*.



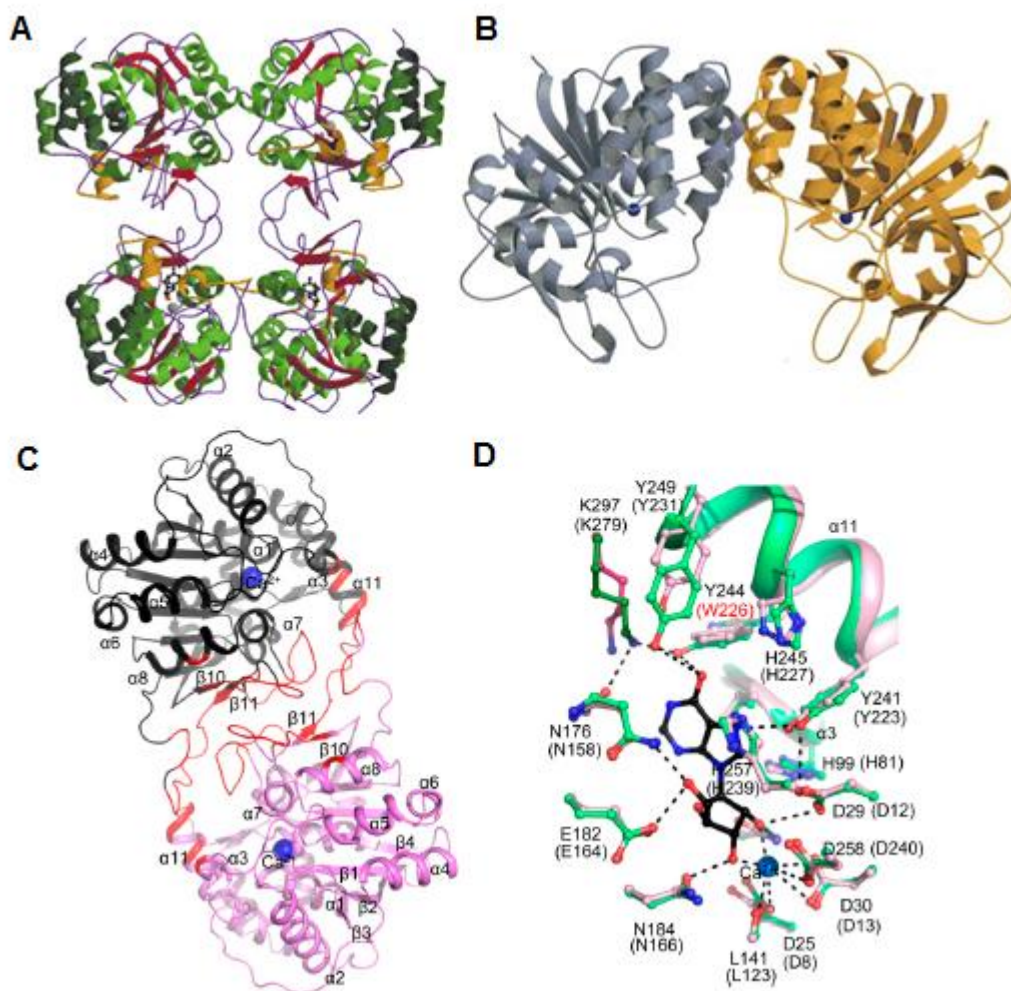
**Obrázek 8. Reakční mechanismus NRH.** Příkladem je přeměna inosinu na hypoxantin, uridinu na uracil a iPR na iP. Do reakce vstupuje voda a vystupuje ribóza. (Převzato a upraveno z Kopečná *et al.*, 2013)

U některých organismů jako je *Trypanosoma vivax* (Verseés *et al.*, 2001), *Leishmania major* (Shi *et al.*, 1999) nebo *Escherichia coli* (Iovane *et al.*, 2008; Muzzolini *et al.*, 2006) je známa i krystalová struktura NRH. Nedávno byla zjištěna i krystalová struktura NRH mechu *Physcomitrella patens* a kukuřice *Zea mays* (Kopečná *et al.*, 2013). Struktury parazitických organismů jsou tetramerní, výjimkou je organismus *Trypanosoma vivax*, který je NRH homodimerní (Verseés, 2001). Dimerní jsou také NRH z kukuřice a mechu, ovšem od *T. vivax* se liší (Kopečná *et al.*, 2013), (obrázek 9).

Asymetrická jednotka krystalu PpNRH1 obsahuje 4 velmi podobné dimery s průměrem střední kvadratické odchylky 0,75 Å pro všechny Ca atomy. Asymetrická jednotka krystalu ZmNRH3 obsahuje pouze jeden dimer. Monomery a dimery PpNRH1 a ZmNRH3 si jsou velmi podobné. Každý monomer má typické složení obsahující 12 β-vláken a 13 α-šroubovic. Všechny NRH, co byly doposud studovány a objasněny, jsou homotetramery. Výjimkou je TvNRH, který je homodimerem (Verseés *et al.*, 2001), i když PpNRH1 a ZmNRH3 jsou také dimerní, jejich dimer je odlišný od toho z TvNRH (Kopečná *et al.*, 2013).

Rozdíl mezi PpNRH1 a ZmNRH3 je v aktivním místě. Vápenatý iont, který je situovaný v aktivním místě, je vázaný s karboxylovými skupinami třech aspartátů (dva aspartáty poskytují po jednom kyslíku, třetí poskytuje dva kyslíky), s karboxylovou skupinou treoninu, s dvěma hydroxylovými skupinami ribózy a vodou (Verseés *et al.*, 2001). Při porovnání struktur bylo prokázáno, že rozdíl je v pouze v jednom reziduu, které obklopuje nukleobázi a tím je tyrosin v pozici 244 u PpNRH1 a nahrazený tryptofanem u ZmNRH3 (obrázek 8D), (Kopečná *et al.*, 2013).





**Obrázek 9. Krystalové struktury NRH z vybraných organismů. A) Kvartérní struktura IU-NRH z *Crithidia fasciculata*. Červeně jsou znázorněny  $\beta$ -skládané listy, zeleně  $\alpha$ -šroubovice, smyčky jsou znázorněny žlutě a v aktivním se nacházejí dva vápenaté ionty. (Převzato od Verseés *et al.*, 2003). B) Dimerní struktura IAG – NRH z *Trypanosoma vivax*. Obě aktivní místa jsou nezávislá na sobě v podobě dvou modrých kuliček jako vápenaté ionty. Uprostřed je 8  $\beta$ -skládaných listů. C) Dimerní struktura PpNRH1. Jedna z podjednotek je znázorněna černě, druhá fialově. Vápenatý iont v aktivním místě je vyobrazen jako modrá kulička. Vzájemný dotyk obou jednotek je vyznačen červeně. D) Aktivní místa se substrátem. Zeleně je PpNRH1, růžově ZmNRH3. Jako substrát je použit inosin a znázorněn je černě.**

Během evoluce docházelo k výrazné diverzifikaci, což vedlo k tvorbě izoform např. u *Oryza sativa* nebo *Selaginella moellendorffii* (patří do clade I i clade II), (Rensing *et al.*, 2007). Třidu rostlinných IU-NRH lze rozdělit do dvou podtříd (Kopečná *et al.*, 2013). Podtřída I obsahuje NRH, které nesou reziduum Tyr v poloze 249 (dle číslování pro NRH1 mechu *Physcomitrella patens*), jehož přítomnost souvisí s preferencí k substrátům inosinu a xanthosinu. Podtřída II

má ve stejném místě Asp a preferenční aktivitu vůči uridinu a xanthosinu. PpNRH1 je ve stejné podtřídě I jako ZmNRH1a a ZmNRH1b a ZmNRH3, zatímco ZmNRH2a, ZmNRH2b, PpNRH2 a PpNRH3 jsou v podtřídě II. NRH jsou samozřejmě schopny působit na širokou škálu ribosidů včetně těch cytokininových a nemohou být proto striktně zařazeny jako specifické pro puriny nebo pro pyrimidiny (Jung *et al.*, 2009).

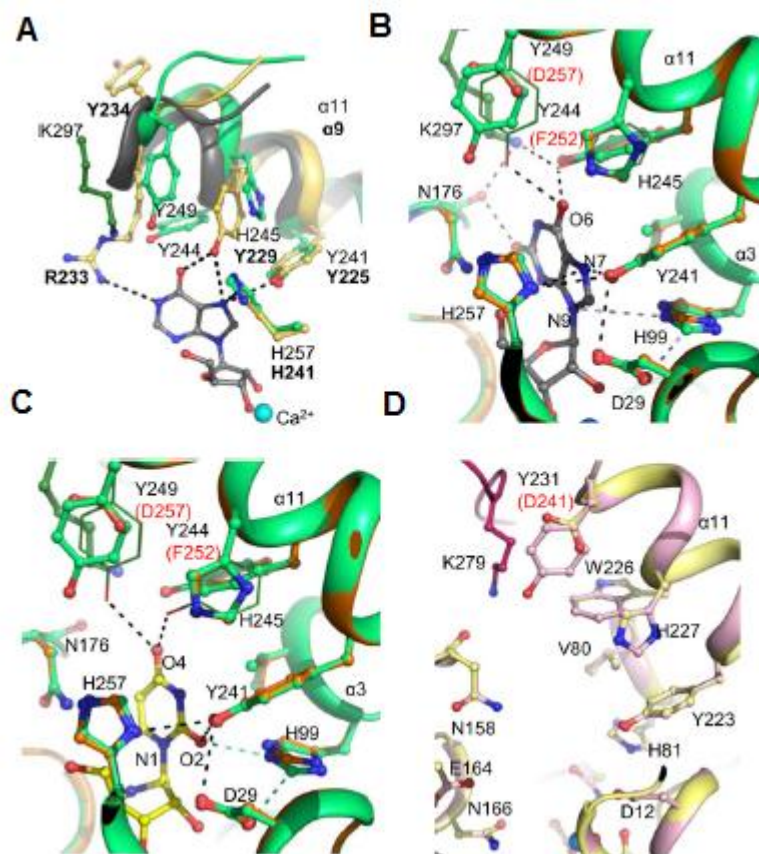
PpNRH1 a ZmNRH3 si jsou v preferenci substrátů velmi podobné (Kopečná *et al.*, 2013). PpNRH1 je nejaktivnější vůči dvěma purinům a to xanthosinu a inosinu. Slabší aktivitu vykazuje vůči adenosinu, guanosinu a uridinu. ZmNRH3 přednostně hydrolyzuje inosin a xanthosin, zatímco zbývající nukleosidy jsou výrazně slabšími substráty. Oproti tomu PpNRH2 preferuje uridin a je méně aktivní vůči xanthosinu a inosinu. Co se týče ZmNRH2a a ZmNRH2b, jsou také nejaktivnější k uridinem. Aktivita ZmNRH2b je 10 a 200x vyšší než u ZmNRH2a a PpNRH2. Specifická aktivita u NRH závisí na hodnotě pH. Jak bylo zjištěno u PpNRH1, vysoká aktivita se pohybovala mezi pH 7 a 9 (Kopečná *et al.*, 2013). U *Trypanosoma brucei* pH profil hydrolýzy inosinu ukazuje, že k úplné katalytické kapacitě přispívají tři protonované skupiny. Jedna skupina s  $pK_a$  v blízkosti 6,5 a dvě skupiny s  $pK_a$  v blízkosti 8,8. Ztrátou protonu z kyselější skupiny způsobí snížení  $V_{lim}$  přibližně desetkrát. Pokud dojde ke ztrátě obou protonů, dojde k úplné inaktivaci NRH (Parkin, 1996). Taktéž bylo studováno pH optimum NRH z *Bacillus thuringiensis*, kdy nejvyšší aktivita byla pozorována v oblasti pH 6 (Liang *et al.*, 2008).

Specifická aktivita u NRH závisí na hodnotě pH. Jak bylo zjištěno u PpNRH1, vysoká aktivita se pohybovala mezi pH 7 a 9. Proto všechny další kinetické analýzy byly měřeny při pH 7,5 (Kopečná *et al.*, 2013). U *Trypanosoma brucei* pH profil hydrolýzy inosinu ukazuje, že k úplné katalytické kapacitě přispívají tři protonované skupiny. Jedna skupina s  $pK_a$  v blízkosti 6,5 a dvě skupiny s  $pK_a$  v blízkosti 8,8. Ztrátou protonu z kyselější skupiny způsobí snížení  $V_{lim}$  přibližně desetkrát. Pokud dojde ke ztrátě obou protonů, dojde k úplné inaktivaci NRH (Parkin, 1996). Taktéž bylo studováno pH optimum NRH z *Bacillus thuringiensis*, kdy nejvyšší aktivita byla pozorována v oblasti pH 6 (Liang *et al.*, 2008).

*Crithidia fasciculata* má ve své struktuře trojici reziduí, které vážou

substrát, a tímto umožňuje protonizaci atomu N7 purinové báze. Jedno je představováno histidinem a dvě tyrosinem (Parkin *et al.*, 1991). *E. coli* tuto trojici reziduí nemá. To znamená potřebu reziduí pro aktivaci odstupující skupiny, ovšem když je protonizována pyrimidinová báze jsou odlišné od těch purinových. PpNRH1 má také trojici reziduí skládající se z H245, Y241 a H257. Díky tomu zjištění bylo možno navrhnout mutageneze histidinu v ZmNRH3 (Kopečná *et al.*, 2013). V této práci byla studována forma H81A a H239A.

Vybrané mutantní formy Y241A, Y244A, H245A, a Y249A vykazují nižší míru aktivity (přibližně 100-, 16-, 10- a 22 - násobně nižší  $k_{cat}$  hodnoty pro inosin) a mají vyšší hodnoty  $K_m$ . Rezidua H245 a H81 jsou plně konzervována. Pro tuto práci byly navrženy mutantní formy ZmNRH3 (obrázek 11) H81A a H239A. ZmNRH3 obsahuje tryptofan W226 ekvivalentní s Y244 v PpNRH1. Navrženy byly mutantní formy W226A a W226Y. V poloze 249 je umístěn tyrosin, který může být zodpovědný za substrátovou specifitu. PpNRH2, ZmNRH2a a ZmNRH2b, které preferují substrát uridin a xanthosin mají reziduum D249. Mutantními formami pro tuto práci jsou Y231A a Y231D. Dvě rezidua u PpNRH1 Y244 a Y249 váží nukleobázi a jsou ekvivalentní reziduím I228 a Y234 v CfNRH. Zajímavostí je, že postranní řetězec K297, který se nachází v druhé podjednotce PpNRH1, se podobá R33 v CfNRH lokalizovaném na smyčce mobilního  $\alpha$ 9-helixu (Kopečná *et al.*, 2013). Na základě tohoto zjištění byla navrhována mutageneze ekvivalentního lysinu v ZmNRH3 a mutantní forma K279A je studována v této práci. Na obrázku 10 je vyobrazeno aktivní místo kukuřičné ZmNRH3, kde se nachází reziduum H81 a H239 ekvivalentní k H82 a H239 v YeiK, His99 a His257 v PpNRH1 nebo H91 a H249 v ZmNRH2b (Kopečná *et al.*, 2013), (Obrázek 9). Vybrané mutantní formy byly studovány v této práci.

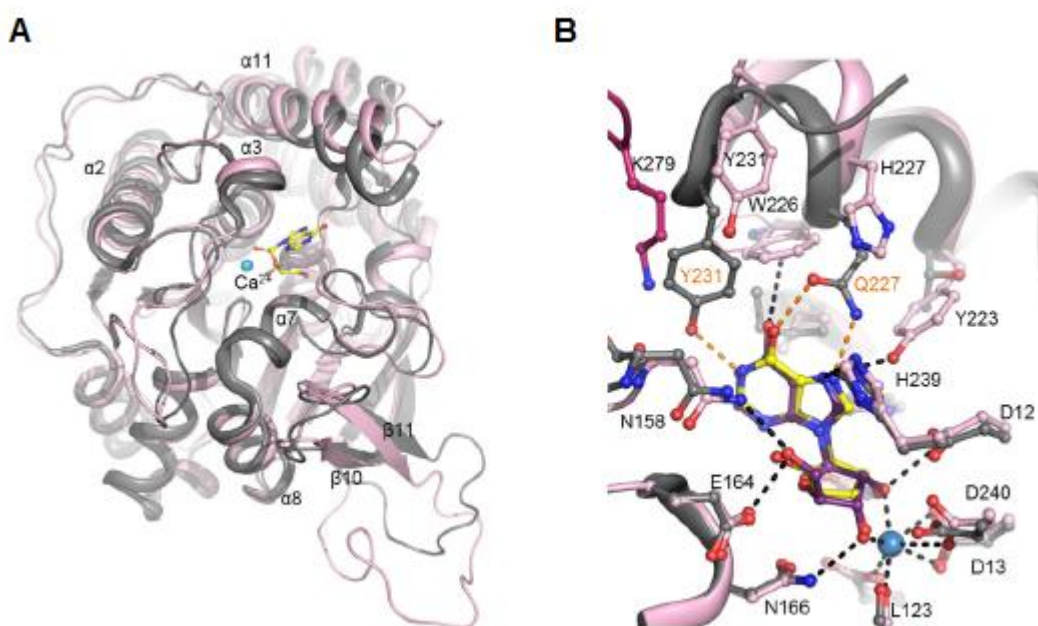


**Obrázek 10. Porovnání míst, které vážou substrát. A) Substrát v místě vazby u PpNRH1 (znázorněn zeleně) a CfNRH (znázorněn žlutou barvou).  $\alpha$ -helix 9, který je vyobrazen černě, je ekvivalentí  $\alpha$ -helixu 11 u rostlinných NRH. Obrázek B a C - Vazba nukleobází xantosinu a uridinu v aktivním místě PpNRH1 (zelená barva). Přestavba postranních řetězců Y244 a Y249 je vyobrazena plnou čarou. Pro srovnání je model PpNRH2 uveden v oranžové barvě. Vodíkové vazby jsou znázorněny jako přerušované čáry, a ty, které jsou závislé na orientaci imidazolového kruhu H99, jsou uvedeny světle modře. D) Porovnání uspořádání aktivních míst ZmNRH3 (růžová barva) a ZmNRH2b (žlutá barva). Rozdíly v sekvenci mezi oběma NRH jsou znázorněny červenou barvou.**

NRH u protozoálních organismů jako *Trypanosoma brucei* (Parkin, 1991) preferuje substráty adenosin, guanosin a inosin, a je řazen do skupiny IAG nukleosidas. Nejlepším substrátem IAG-NRH je inosin s hodnotami  $K_m$  18  $\mu\text{M}$  a  $V_{\text{lim}}$  0,8  $\mu\text{mol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$ . Tyto hodnoty jsou srovnatelné u purinů i pyrimidinů. Hodnoty  $K_{\text{cat}}/K_m$  pro inosin, adenosin a guanosin jsou  $1,9 \times 10^6$ ,  $1,2 \times 10^6$  a  $0,83 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Rychlost hydrolýzy purinového substrátu cytidinu je  $V_{\text{lim}}$  je 0,07  $\mu\text{mol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$ , pyrimidinového substrátu uridinu je  $V_{\text{lim}}$  je 0,00032  $\mu\text{mol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$  a z toho plyne, že purinové nukleosidy jsou lepšími substráty

(Parkin et al., 1996).

Dalším příkladem organismu je *Escherichia coli*, kde byly charakterizovány dvě NRH jako specifické: YeiK (Giabbai a Degano, 2004) a YbeK (Muzzolini et al., 2006, obrázek 11). U proteinu YeiK bylo zjištěno, že jeho katalytická účinnost vůči uridinu byla více jak tisíckrát vyšší než vůči adenosinu, guanosinu a inosinu (Estupiñán a Schramm, 1994; Parkin et al., 1991; Pelle et al., 1998). YbeK hydrolyzuje 100-10000x účinněji pyrimidinové nukleosidy, především uridin. Purinové nukleosidy podle studií účinně hydrolyzuje NRH z *Crithidia fasciculata*, především inosin (Iovane et al., 2008).



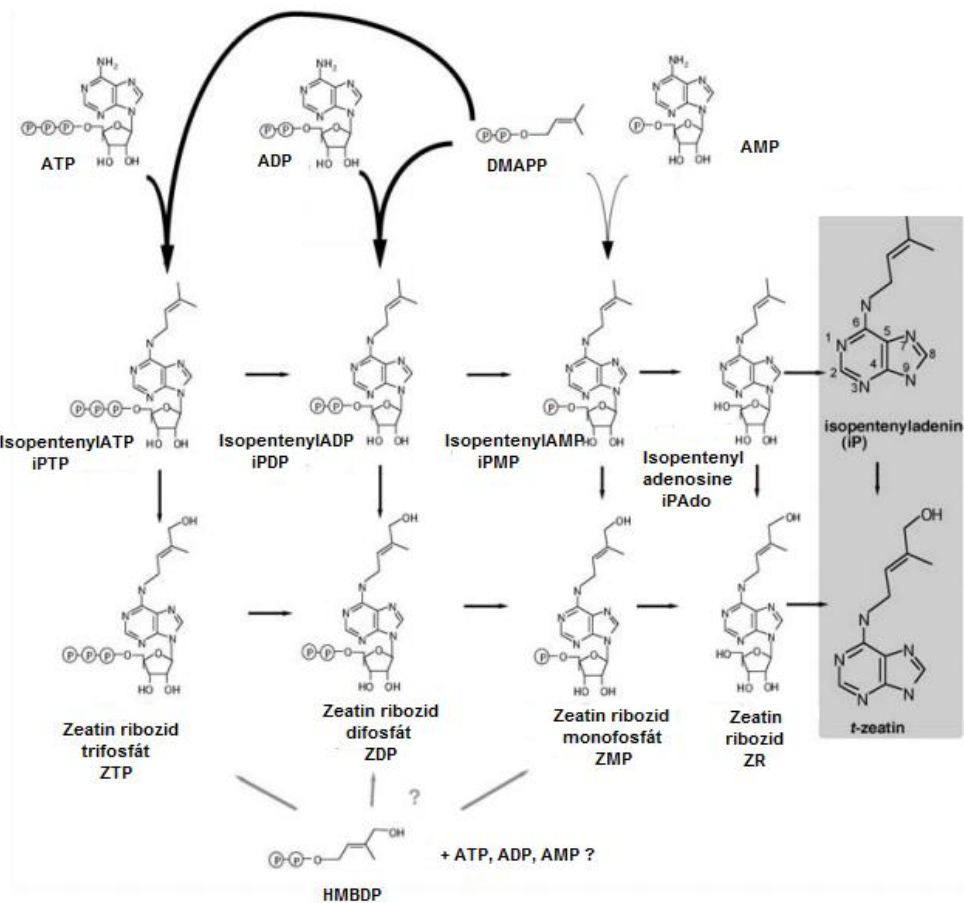
**Obrázek 11 Rozdíl mezi strukturami NRH (YeiK a ZmNRH3) . A) Superpozice monomeru ZmNRH3 (růžově) a monomeru YeiK (šedě).** Podobnost sekvence je z 34%. V aktivním místě se nachází substrát inosin. Rozdíl mezi těmito dvěma strukturami koresponduje s  $\beta$ 10- $\beta$ 11 smyčkami. **B) Místo vazby substrátu YeiK (šedě) a ZmNRH3 (růžově).** Residua AMK jsou označena, vodíkové můstky jsou znázorněny u ZmNRH3 fialově a koordinace vápenatého iontu je přerušované černé linie. Residuum W226 je flexibilní. Oranžově přerušované je znázorněna interakce YeiK s inosinem.

Z rostlinné říše byla prostudována NRH z *Arabidopsis thaliana* (AtNRH1), (Jung et al., 2009). Enzym vykazoval vysokou aktivitu s uridinem ( $K_m$  - 0,8 mM), poté s inosinem ( $K_m$  - 1,4 mM) a adenosinem ( $K_m$  - 0,7 mM). Je schopen také

hydrolyzovat cytokininový derivát isopentenyladenosin. Rozdíly jsou znatelné mezi substráty hlavně v rychlosti hydrolyzy. Hodnota  $V_{lim}$  uridinu je  $0,004 \text{ mmol s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ , zatímco limitní rychlost adenosinu a inosinu byla o několik řádů nižší ( $V_{lim}$  pro inosin  $7,7 \times 10^{-6} \text{ mmol s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  a  $V_{lim}$  pro adenosin  $0,0002 \text{ mmol s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ).

### 3.5 Cytokininové ribosidy

Cytokinininy jsou významné deriváty purinu, které slouží jako fytohormony, které kontrolují mnoho procesů v (Chen, 1997). Z chemického hlediska se jedná o přírodní  $N^6$ - substituované adeniny a jejich ribosidy, ribotidy a glykosidy. Rozmanitost  $N^6$  substituentů je dána původem různých typů cytokininů. Cytokinininy byly objeveny jako látky, které podporují buněčné dělení v tkáňových kulturách tabáku (Miller *et al.*, 1955), a bylo prokázáno, že regulují i několik dalších vývojových drah. Příznivě ovlivňují apikální dominanci, expanzi listů, oddalují senescenci a urychlují klíčení semen (Mok, 1994). Přírodní formy cytokininů jsou především deriváty adeninu např. isopentenyladenin a *trans*-zeatin. Syntetické cytokinininy zahrnují analoga adeninu např. kinetin a 6-benzyladenin. Přesto, že cytokinininy mají výrazný vliv na vývoj rostlin, není přesně znám jejich mechanismus účinku. Model syntézy cytokininů je vyobrazen na obrázku 12. V živočišných buňkách byl objeven pouze jeden cytokinin a to isopentenyladenosin (IPR). Prokázán byl v cytosolu u eukaryotických i prokaryotických buněk ve volné i vázané formě na t-RNA (Faust *et al.*, 1991).



**Obrázek 12.** Model syntézy cytokininů. U mikroorganismů hraje hlavní roli připojení fosforylového isopentenylového řetězce (DMAPP) na adenosinmohofosfát (AMP). U vyšších rostlin připojení DMAPP na adenosindifosfát (ATP). V šedém sloupci jsou uvedeny cytokininy iP a *t*-ZR, které se přímo vážou k cytokininovým receptorům a tím ovlivňují vývoj rostlin (Převzato a upraveno z Kakimoto, 2003).

## Závěr

- V teoretické části této diplomové práce byl shrnut a popsán metabolismus pyrimidinových a purinových bází, dále byly popsány charakteristické znaky nukleosid-*N*-ribohydrolas, jejich krystalická struktura a popis příbuznosti s jinými rostlinami a organismy. Zmíněn byl i metabolismus cytokininů.
- V praktické části této práce byl popsán postup klonování, extrakce a purifikace jednotlivých rekombinantních proteinů pomocí afinitní chromatografie. Dále byla zjištěna úroveň exprese a molekulová hmotnost proteinů pomocí gelové permeační chromatografie, sestavena křivka teplotní stability proteinu ZmNRH3-WT a K279A, grafy substrátové specifity s jednotlivými substráty a shrnuty kinetické parametry. Bylo zjištěno, že nejlepším substrátem pro WT, K279A, W226A a W226Y je inosin a pro Y231A, Y231D, H81A a H239A xanthosin. Z toho vyplývá, že všechny tyto enzymy preferují purinové báze.



## 8 Literatura

- Ashihara, H. (1983) Changes in activities of purine salvage and ureide synthesis during germination of black gram (*Phaseolus mungo*) seeds. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 113: 47-60
- Ashihara, H., Y. Takasawa, T. Suzuki (1997) Metabolic fate of guanosine in higher plants. *Physiologia Plantarum* 100: 909-916
- Ashihara, H., C. Stasolla, N. Loukanina, T.A. Thorpe (2001) Purine metabolism during white spruce somatic embryo development: salvage of adenine, adenosine, and inosine. *Plant Science* 160: 647-657
- Ashihara, H., S. Wakahara, M. Suzuki, A. Kato, H. Sasamoto, S. Baba (2003) Comparison of adenosine metabolism in leaves of several mangrove plants and a poplar species. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 133-139.
- Ashihara, H., T. Suzuki (2004) Distribution and biosynthesis of caffeine in plants. *Frontiers in Bioscience* 9: 1864-1876
- Campos A., Rijo – Johansen M.J, Carniero M.F., Fevereiro P., (2005) Purification and characterisation of adenosine nucleosidase from *Coffea arabica* young leaves. *Phytochemistry* 66 (2): 147-151
- Buchanan J.M., Hartmann S.C. (1959) Enzymatic reactions in the synthesis of the purines. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 21:199–216.
- 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.
- Chen CM. (1997) Cytokinin biosynthesis and interconversion. *Physiol Plant* 101 (4): 665-673

- Degano M., Gopaul D. N., Scapin G., Schramm V. L. and Sacchettini 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
- Faust JR, Dice JF. (1991) Evidence for isopentenyladenine modification on a cell cycle-regulated protein. *J Biol Chem* 266 (15): 9961-9970
- 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.
- Gopaul D.N., Meyer S.L., Degano M., Sacchettini J.C., Schramm V.L. (1996) Inosine-uridine nucleoside hydrolase from *Crithidia fasciculata*: genetic characterization, crystallization, and identification of histidine 241 as a catalytic site residue. *Biochemistry* 35: 5963–5970.
- 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.

Hiroyuki I., Miwa F., Setsuko I., Maki K., Maki M., et al. (1996) Molecular cloning of a human cDNA encoding a trifunctional enzyme of carbamoyl-phosphate synthetase/aspargate transcarbamoylase-dihydroorotase in de novo pyrimidine synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219:249–55.

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.

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.

Kafer C., Zhou L., Santose D., Guirgis A., Weers B., et al. (2004) Regulation of pyrimidine metabolism in plants. *Front. Biosci.* 9:1611–25.

Kopečná M., Blaschke H., Kopečný D., Vigouroux A., Končítíková R., Novák O., Kotland O., Strnad M., Moréra S., von Schwartzenberg K. (2013). Structure and function of nucleoside hydrolases from *Physcomitrella patens* and maize catalyzing the hydrolysis of purine, pyrimidine and cytokinin ribosides. *Plant Physiology* 163: 1568-1583.

- Kakimoto T. (2003) Biosynthesis of cytokinins. *J Plant Res.* 116:233–239
- Kanamori-Fukuda, I., Ashihara, H., and Komamine, A. (1981). Pyrimidine nucleotide biosynthesis in *Vinca rosea* cells: Changes in the activity of *de novo* and salvage pathways during growth in a suspension culture. *J. Exp. Bot.* 32, 69-78.
- Katahira, R., H. Ashihara (2002) Profiles of pyrimidine biosynthesis, salvage and degradation in disks of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *Planta* 215: 821-828.
- Katahira, R., H. Ashihara (2006) Profiles of purine biosynthesis, salvage and degradation in disks of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *Planta*, 225: 115-126.
- Khan, A.I., Chowdhry, B.Z. and Yon, R.J. (1999). Wheat-germ Kvalnes-Krick, K.L., and Traut, T.W. (1993). Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding b-alanine synthase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 268, 5686-5693.
- Kurtz J.E., Exinger F., Erbs P., Jund R. (2002) The *URH1* uridine ribohydrolase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* 41: 132-141.
- Liang Liang, Xihong He, Gang Liu and Huarong Tan (2008) The role of a purine-specific nucleoside hydrolase in spore germination of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology*, 154, 1333–1340.
- Magni, G., E. Fioretti, P.L. Ipata, P. Natalini (1975) Baker's yeast uridine nucleosidase. Purification, composition, and physical and enzymatic properties. *The Journal of Biological Chemistry* 250 (1): 9-13
- 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.

Miller CO, Skoog F, Von Saltza MH, Strong M. (1955) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J Am Chem Soc* 77(5): 1392

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.

Mok MC: Cytokinins and plant development an overview. In: *Cytokinins: Chemistry, Activity and Function*. Mok DWS, Mok MC (eds.). Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 155-166, 1994

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.

Nara T., Hshimoto T., Aoki T. (2000) Evolutionary implications of the mosaic pyrimidine- biosynthetic pathway in eukaryotes. *Gene* 257:209–22.

Neuhard J., Nygaard P. (1987) Purines and pyrimidines. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, ed. FC Neidhardt, JL Ingraham, BK Low, B Magasan

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. *Physiology*, (New Ser.), ed. A Pirson, MH Zimmermann, 14B:263–301. Berlin:Springer-Verlag
- 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.
- Rolfes R.J. (2006) Regulation of purine nucleotide biosynthesis: in yeast and beyond. *Biochemical Society Transactions* 34 (5): 786-790.
- 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.
- Senecoff, J.F., R.B. Meagher (1993) Isolating the *Arabidopsis thaliana* genes for de novo purine synthesis by suppression of *Escherichia coli* mutants. I. 5'-phosphoribosyl-5-aminoimidazole synthetase. *Plant Physiology* 102: 387-399.
- 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.
- Shaw G. (1994) Chemistry of adenine cytokinins. *In: Cytokinins: Chemistry, Activity and Function*. Mok DWS, Mok MC (eds.) Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 15-34

- Smith, P.M.C., C.A. Atkins (2002) Purine biosynthesis. Big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation. *Plant Physiology* 128: 793-802.
- Smith J. L. (1995) Enzymes of nucleotide synthesis. *Curr Opin Struct Biol* 5: 752-757.
- Schmid, M., Davison, T.S., Henz, S.R., Pape, U.J., Demar, M., Vingron, M., Scholkopf, B., Weigel, D., Lohmann, J.U. (2005) A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nature Genet.* **37**, 501-506.
- Schoor S., Moffatt B.A. (2004) Applying high throughput techniques in the study of adenosine kinase in plant metabolism and development. *Frontiers in Bioscience* 9, 1771-1781.
- Strable J. and Scanlon M. (2009) Maize (*Zea mays*): A Model Organism for Basic and Applied Research in Plant Biology. Cold Spring Harb Protoc, doi:10.1101/pdb.emo132
- Stasolla C., Katahira R., Thorpe T.A., Ashihara H. (2003) Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants. *J. Plant Physiol.* 160, 1271-1295.
- 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.