

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## Štúdium mutantných foriem nukleozid-*N*- ribohydrolázy 2b z kukurice (*Zea mays*)

### DIPLOMOVÁ PRÁCA

**Autor:** Bc. Eva Hájková  
**Študijný program:** B1406 Biochemie  
**Študijný obor:** Biochemie  
**Forma štúdia:** Prezenčné  
**Vedúci práce:** Mgr. David Kopečný, Ph.D.  
**Termín odovzdania práce:** 29.4.2015

Prehlasujem, že som predloženú diplomovú prácu vypracovala samostatne za použitia citovanej literatúry. Súhlasím so zverejnením diplomovej práce podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách. Bola som oboznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon.

V Olomouci dňa 29.4.2015

.....

Eva Hájková

Týmto by som chcela poďakovať svojmu školiteľovi Mgr. Davidovi Kopečnému, Ph.D. za odborné a trpezlivé vedenie pri tvorbe tejto diplomovej práce. Taktiež by som chcela poďakovať Mgr. Martine Kopečnej, Ph.D. a Mgr. Radke Končitíkovej za všestrannú pomoc pri plnení experimentálnej časti práce.

## Bibliografická identifikácia:

Meno a priezvisko autora	Eva Hájková
Názov práce	Štúdium mutantných foriem nukleozid- <i>N</i> -ribohydrolázy 2b z kukurice ( <i>Zea mays</i> )
Typ práce	diplomová
Pracovisko	Oddelenie biochémie proteínov a proteomiky , CRH, Prírodovedecká fakulta Univerzity Palackého
Vedúci práce	Mgr. David Kopečný, Ph.D.
Rok obhajoby	2015
Abstrakt	<p>Táto práca sa zaoberá mutagenézou, purifikáciou a charakterizáciou nukleozid-<i>N</i>-ribohydrolázy 2b z kukurice (<i>Zea mays</i>). Teoretická časť je venovaná literárnej rešerši, ktorá zahŕňa purínový a pyrimidínový metabolizmus v rastlinách a výskyt nukleozid-<i>N</i>-ribohydroláz v rozličných organizmoch, ich kryštalickú štruktúru a kinetické vlastnosti.</p> <p>Experimentálna časť je zameraná na klonovanie, expresiu génu <i>ZmNRH2b</i> v bunkách baktérie <i>E.coli</i>, miestne riadenú mutagenéziu a purifikáciu príslušných rekombinantných proteínov <i>ZmNRH2b</i> - WT a mutantov H91A, D241A, D241Y, K289A a H249A pomocou afinitnej chromatografie. Analýza pomocou gélovej chromatografie ukázala, že <i>ZmNRH2b</i> sa vyskytuje ako dimér. Potom pomocou CD spektroskopie bolo overené, či sú študované mutantné formy správne zložené. Pre <i>ZmNRH2b</i> a K289A bola stanovená teplotná stabilita. Nakoniec bola preštudovaná substrátová špecificita všetkých proteínov s použitím niekoľkých purínových a pyrimidínových nukleozidov, pre enzýmy boli stanovené kinetické parametre <math>K_m</math> a <math>V_{lim}</math>.</p>
Kľúčové slová	nukleozid- <i>N</i> -hydroláza, purín, pyrimidín, metabolizmus, kukurica

Počet strán	62
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

**Bibliographical identification:**

Autor's first name and surname	Eva Hájková
Title	The study of mutants of nucleoside- <i>N</i> -ribohydrolase 2b from 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.
The year of presentation	2015
Abstract	<p>This thesis deals with mutagenesis, purification and characterization of nucleoside-<i>N</i>-ribohydrolase 2b from maize (<i>Zea mays</i>). The theoretical part is devoted to literary review, which includes metabolism of purines and pyrimidines in plants and presence of nucleoside-<i>N</i>-ribohydrolases in various organisms, known crystal structures and kinetic parameters. The experimental part focuses on cloning, expression of gene <i>ZmNRH2b</i> gene in <i>E. coli</i> cells, site-directed mutagenesis and purification of the recombinant proteins ZmNRH2b (WT) and mutant variants H91A, D241A, D241Y, H249A and K289A by affinity chromatography. Gel permeation chromatography analysis showed that ZmNRH2b occurs as a dimer and CD spectroscopy measurements confirmed that all variants are properly folded. Thermostability of WT and K289A variant was determined. Finally, the substrate specificity of all variants using several purine and pyrimidine nucleosides was analyzed, and kinetic parameters <math>K_m</math> and <math>V_{lim}</math> were determined.</p>
Keywords	nucleoside- <i>N</i> -ribohydrolase, purine, pyrimidine, metabolism, maize

Number of pages	62
Number of appendices	0
Language	Slovak

# OBSAH

<b>1 CIELE PRÁCE</b> .....	- 10 -
<b>2 ÚVOD</b> .....	- 11 -
<b>3 TEORETICKÁ ČASŤ</b> .....	- 12 -
3.1 Purínový a pyrimidínový metabolizmus v rastlinách .....	- 12 -
3.1.1 Biosyntéza purínov.....	- 14 -
3.1.1.1 De novo biosyntéza purínov.....	- 14 -
3.1.1.2 Katabolizmus purínov.....	- 16 -
3.1.1.3 Recyklácia purínov.....	- 18 -
3.1.2 Biosyntéza pyrimidínov.....	- 18 -
3.1.2.1 De novo biosyntéza pyrimidínov.....	- 18 -
3.1.2.2 Katabolizmus pyrimidínov.....	- 19 -
3.1.2.3 Recyklácia pyrimidínov .....	- 20 -
3.2 Nukleozid- <i>N</i> -ribohydrolázy .....	- 21 -
3.2.1 Kinetické vlastnosti nukleozid- <i>N</i> -ribohydroláz .....	- 25 -
<b>4 PRAKTICKÁ ČASŤ</b> .....	- 29 -
4.1 Biologický materiál.....	- 29 -
4.2 Použité chemikálie.....	- 29 -
4.3 Prístrojové vybavenie.....	- 32 -
4.4 Metódy.....	- 33 -
4.4.1 Klonovanie.....	- 33 -
4.4.1.1 PCR amplifikácia.....	- 33 -
4.4.1.2 Agarózová elektroforéza a purifikácia z gélu .....	- 33 -
4.4.1.3 Transformácia <i>E. coli</i> .....	- 34 -
4.4.2 Produkcia kukuričných rekombinantných proteínov v <i>E.coli</i> .....	- 34 -
4.4.3 Extrakcia ZmNRH2b a jeho mutantných foriem .....	- 35 -
4.4.4 Purifikácia ZmNRH2b a jeho mutantných foriem .....	- 35 -
4.4.5 Gélová permeačná chromatografia .....	- 36 -
4.4.6 Kontrola úrovne expresie pomocou SDS-PAGE .....	- 36 -
4.4.7 Stanovenie koncentrácie proteínov .....	- 37 -
4.4.8 Stanovenie teplotnej stability.....	- 38 -
4.4.9 Stanovenie nukleozidázovej aktivity.....	- 38 -
4.4.10 Testovanie substrátovej špecificity, stanovenie $K_m$ a $V_{lim}$ .....	- 39 -
4.4.11 CD spektroskopia.....	- 39 -



<b>5 VÝSLEDKY</b> .....	<b>Chyba! Záložka nie je definovaná.</b>
5.1 Miestne riadená mutagenézia ZmNRH2b a výber klonov .....	<b>Chyba! Záložka nie je definovaná.</b>
5.2 Testovanie expresie pomocou SDS-PAGE .....	<b>Chyba! Záložka nie je definovaná.</b>
5.3 Overenie zloženia (sekundárnej štruktúry) produkovaných NRH foriem .....	<b>Chyba! Záložka nie je definovaná.</b>
5.4. Molekulové vlastnosti mutantných foriem .....	<b>Chyba! Záložka nie je definovaná.</b>
5.5 Stanovenie koncentrácie proteínov .....	<b>Chyba! Záložka nie je definovaná.</b>
5.4 Stanovenie teplotnej stability ZmNRH2b a mutantnej formy K289A .	<b>Chyba! Záložka nie je definovaná.</b>
5.5 Stanovenie substrátovej špecificity ZmNRH2b .....	<b>Chyba! Záložka nie je definovaná.</b>
5.6 Stanovenie kinetických parametrov ZmNRH2b .....	<b>Chyba! Záložka nie je definovaná.</b>
<b>6 DISKUSIA</b> .....	<b>Chyba! Záložka nie je definovaná.</b>
<b>7 ZÁVER</b> .....	- 57 -
<b>8 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY</b> .....	- 58 -

# 1 CIELE PRÁCE

- Teoretická časť:

Vypracovanie literárnej rešerše k téme práce, ktorá zahrňuje:

purínový a pyrimidínový metabolizmus v rastlinách, bakteriálne, protozoálne a rastlinné nukleozid-*N*-ribohydrolázy, ich výskyt a substrátovú špecificitu, kinetické vlastnosti, reakčný mechanizmus nukleozid-*N*-ribohydroláz.

- Experimentálna časť:

Klonovanie, expresia génu *ZmNRH2b* v *E.coli*, extrakcia, purifikácia rekombinantného proteínu.

Mutagenézia a purifikácia mutantných foriem.

Stanovenie molekulovej hmotnosti a overenie správneho zloženia mutantných proteínov.

Meranie teplotnej stability a substrátovej špecificity *ZmNRH2b* - WT a jeho mutantných foriem.

## 2 ÚVOD

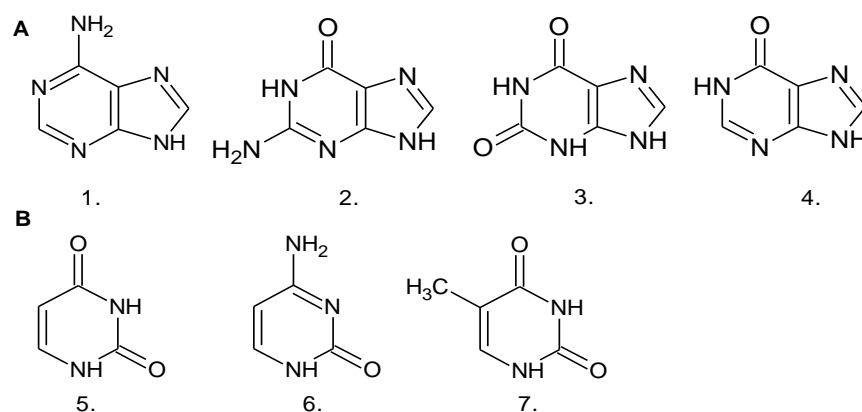
Metabolizmus purínov a pyrimidínov má významnú úlohu pri raste a vývoji rastlín. Nukleotidy sú súčasťou základných koenzýmov, sú stavebnými zložkami nukleových kyselín, energeticky bohatých látok a sú predchodcami alkaloidov a cytokinínov. Metabolizmus purínov a pyrimidínov zahŕňa *de novo* syntézu, katabolizmus a recykláciu týchto látok. Dôležitým enzýmom v tomto procese je nukleozid-*N*-ribohydroláza (NRH), ktorá štepí nukleozidy na príslušnú bázu a ribózu, a tým vyvažuje recykláciu a katabolizmus purínov a pyrimidínov. NRH sú pomerne dobre preštudované v mikroorganizmoch, ktoré nemajú schopnosť syntetizovať puríny *de novo*, a tak sú NRH kľúčovými enzýmami dráhy purínovej recyklácie, napríklad *Crithidia*, *Leishmania* alebo *Trypanosoma*.

NRH sú lokalizované v cytozóle. Ich charakteristickým znakom je aspartátový cluster sekvencie DXDXXXDD. V aktívnom mieste sa nachádza vapenatý ión. Všetky NRH sú špecifické pre ribózu, ale vykazujú značnú variabilitu v preferencii nukleových báz. Kukurica obsahuje päť génov pre nukleozid-*N*-ribohydrolázy - NRH1a, NRH1b, NRH2a, NRH2b a NRH3. Táto práca je zameraná na charakterizáciu NRH2b, ktorá preferuje uridín oproti purínovým ribozidom a jej mutantných foriem H91A, D241A, D241Y, H249A a K289A. Boli stanovené ich molekulové vlastnosti pomocou SDS-PAGE a gélovej permeačnej chromatografie. Taktiež bola určená teplotná stabilita, substrátová špecifita a kinetické parametre  $K_m$  a  $V_{lim}$  s vybranými purínovými a pyrimidínovými nukleozidmi.

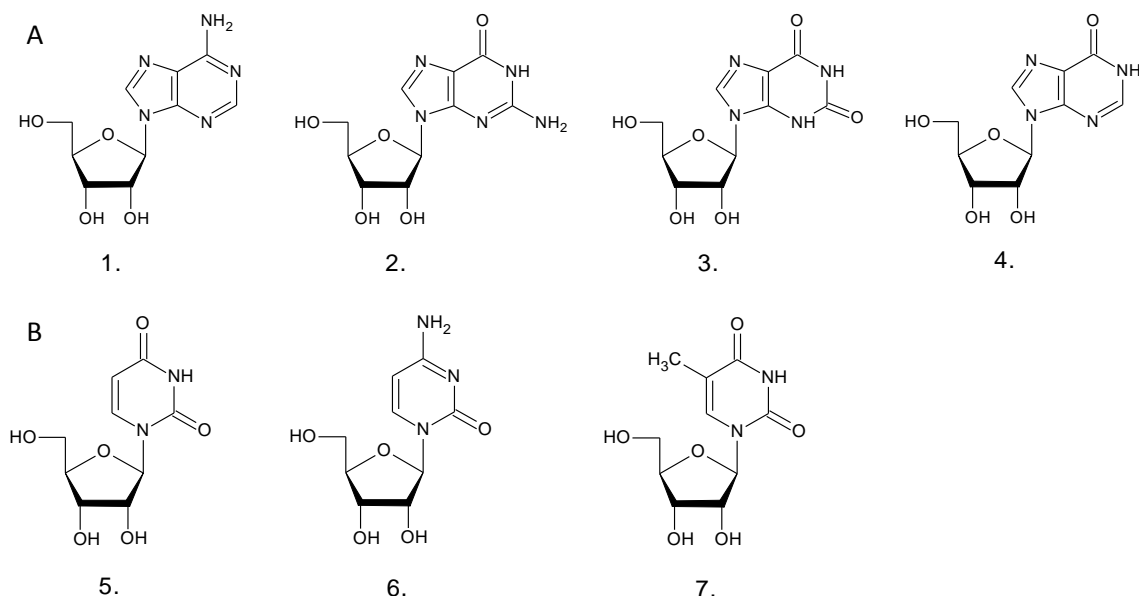
## 3 TEORETICKÁ ČASŤ

### 3.1 Purínový a pyrimidínový metabolizmus v rastlinách

Purínové a pyrimidínové nukleotidy môžu mať v rastlinách rôznu funkciu a ich biosyntéza a metabolizmus ako taký sú pre rastlinný vývoj a rast životne dôležité. Purínové a pyrimidínové nukleotidy sa skladajú z heterocyklickej purínovej alebo pyrimidínovej báze, ktorá je spojená cez *N*-glykozidovú väzbu s C1 atómom ribózy. V závislosti na stave energie je esterifikovaná hydroxylová skupina na atóme C5 ribózy jedným až tromi fosfátmi. Predstaviteľmi purínových báz sú adenín, hypoxantín, xantín a guanín. Zástupcami pyrimidínových báz sú cytozín, uracil a tymín (obrázok 1). Od nich sú odvodené ribozidy: adenosín, guanosín, xantosín, inozín, uridín, cytidín a tymidín (obrázok 2).



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



**Obrázok 2. Štruktúrne vzorce purínových (A) a pyrimidínových (B) ribozidov.** 1 - adenosín, 2 - guanosín, 3 - xantosín, 4 - inozín, 5 - uridín, 6 - cytidín, 7 - tymidín.

Nukleotidy patria medzi najdôležitejšie zložky v rastlinnom metabolizme. Sú stavebnými blokmi jadrovej DNA, ich transkriptov a mRNA, vo forme rRNA a tRNA sú zapojené do syntézy proteínov. Sú regulátormi syntézy aminokyselín, fosfolipidov, glykolipidov, cukrov a polysacharidov. Počas procesu fotosyntézy a dýchania je purínový nukleotid ATP produkovaný z ADP a fosfátu ako hlavný trifosfát pre úschovu chemickej energie. Kým ATP je základný donor energie vo väčšine syntetických reakcií, v rastlinách sú pyrimidíny UTP a UDP kosubstráty alebo energeticky bohaté prekurzory pre sacharidový metabolizmus a syntézu celulózy a komponentov bunkovej steny. V bunkovej signalizácii sú využívané cyklické nukleotidy (cAMP) ako druhí poslovia.

Purínové a pyrimidínové nukleotidy sú priame prekurzory pre syntézu esenciálnych kofaktorov ako nikotínamidové a flavínové koenzýmy či acetylkoenzým A. Taktiež fungujú ako prekurzory vitamínov skupiny B - tiamínu, riboflavínu a kyseliny listovej (Herz et al., 2000; Hanson a Gregory, 2002). Nukleotidy tiež slúžia ako prekurzory molekúl sekundárnych metabolitov, ako sú alkaloidy a fytohormóny cytokiníny, ktoré majú významný vplyv na rast a vývoj (Schoor a Moffatt, 2004). Sú dôležité pri delení a elongácii pletív ako komponenty DNA, pri syntéze organel počas procesu bunkového delenia a ako komponenty RNA sú základnými zložkami metabolických procesov (Smith, 1995, Senecoff et al., 1996).

Základné poznatky o rastlinnom metabolizme purínov a pyrimidínov boli odvodené predovšetkým zo štúdií o mikroorganizmoch a zvieratách (Rolfes, 2006, Zalkin a Nygaard, 1996, Henderson a Paterson, 1973). V rastlinách je stále mnoho biochemických aspektov nejasných, aj keď nukleotidy hrajú významnú úlohu v celkovom metabolizme. Purínové a pyrimidínové nukleotidy môžu vznikať syntézou *de novo* zo základných molekúl alebo recykláciou s už existujúcich báz, nukleotidov alebo nukleových kyselín. Metabolizmus nukleotidov taktiež zahrňuje ich degradáciu na jednoduché molekuly, a tým môžu poskytovať stavebné komponenty ako dusík, uhlík či fosforečný anión na syntézu ďalších zlúčenín.

Nukleotidy adenín a uracil sa vyskytujú v organizme vo väčšej miere ako guanín alebo cytozín (Wagner a Backer, 1992). Tento fakt ukazuje, že adenínové a uracilové nukleotidy majú hlavnú rolu ako kofaktory v metabolizme či syntéze nukleových kyselín. Všetky nukleotidy sú presne rozdelené medzi cytozol, plastidy a mitochondrie rastlinných buniek.

### 3.1.1 Biosyntéza purínov

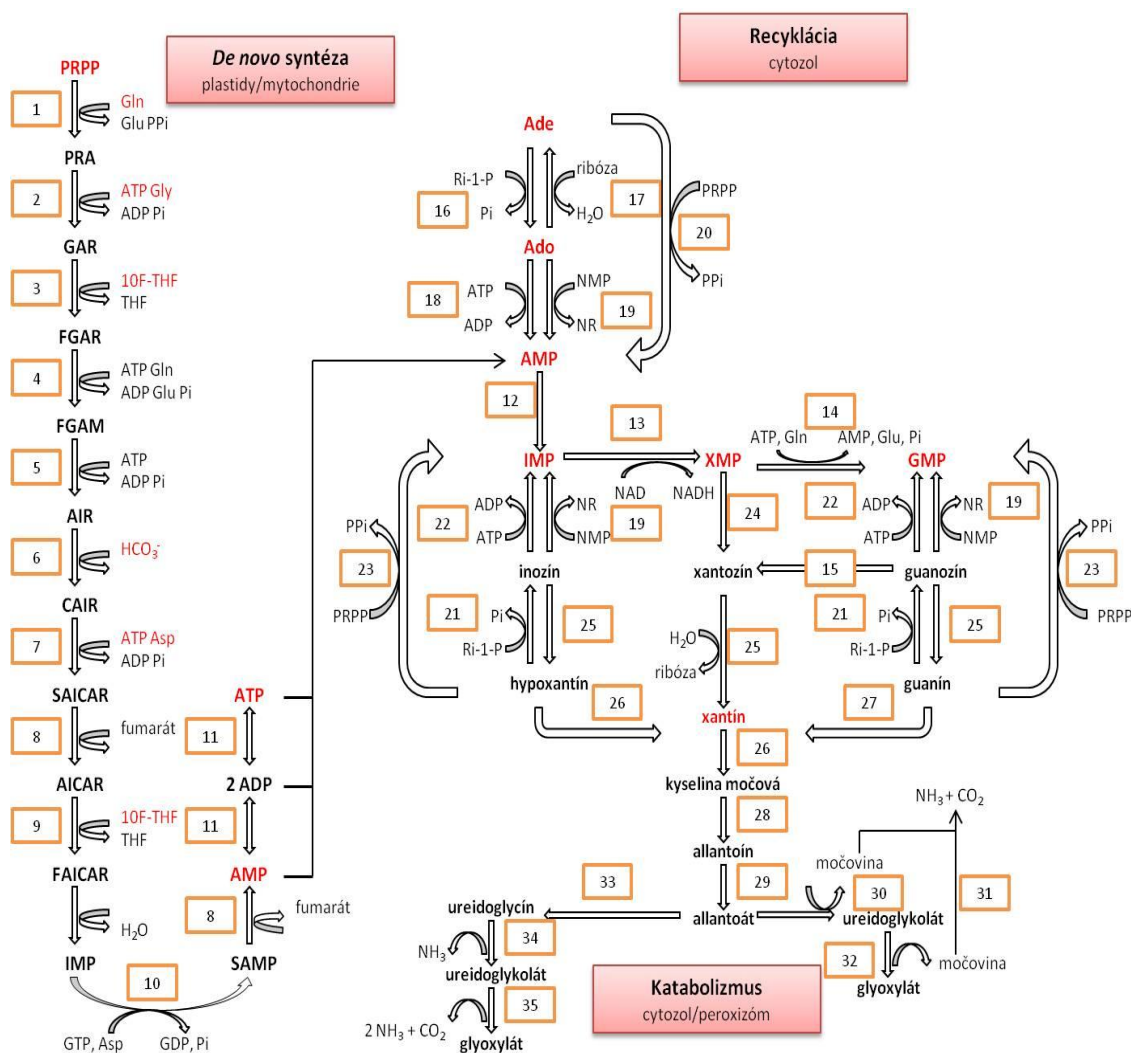
#### 3.1.1.1 De novo biosyntéza purínov

*De novo* biosyntetická dráha purínových nukleotidov, AMP a GMP, z 5-fosforibozyl-1-pyrofosfátu (PRPP) je zobrazená na obrázku 3 a príslušné enzýmy v tabuľke 1. Purínové nukleotidy sú tvorené z menších molekúl, sú to aminokyseliny aspartát, glutamín a glycín, z aktivovaného ribózového prekursoru PRPP, z oxidu uhličitého a z 10-formyltetrahydrofolátu. Základná biochemická a molekulárna analýza purínovej biosyntézy bola uskutočnená v mikroorganizmoch (Zalkin a Nygaard, 1996) a zvieratách (Buchanan J.M. a Hartmann S.C., 1959). Detailné štúdie kompletného genómu *Arabidopsis* (Boldt a Zrenner, 2003) ukazujú, že rastliny syntetizujú IMP, AMP a GMP podobnými reakciami aké boli nájdené v mikroorganizmoch a zvieratách.

Biosyntéza purínov štartuje formovaním fosforibozylamínu (PRA) z PRPP a glutamínu. Táto reakcia je katalyzovaná PRPP-amidotransferázou. GAR-syntetáza katalyzuje ATP dependentnú tvorbu glycínamidribonukleotidu (GAR). GAR je následne transformovaný enzýmom GAR-transformylázou (GART) s využitím 10-formyltetrahydrofolátu (10F-THF) za vzniku formylglycínamidribonukleotidu (FGAR). Následne za spotreby ATP a glutamínu formylglycínamidinribonukleotidsyntetáza (FGAMS) katalyzuje tvorbu formylglycínamidinribonukleotidu (FGAM). Nasleduje uzavretie kruhu za vzniku 5-aminoimidazolribonukleotidu (AIR) a spotrebuje sa ďalšie ATP. Táto reakcia je katalyzovaná AIR-syntázou (AIRS). Na vytvorenie skeletu druhého kruhu je potrebné vložiť oxid uhličitý, aspartát a druhú molekulu 10F-THF. AIR je karboxylovaný AIR-karboxylázou na 4-karboxyaminoimidazolribonukleotid (CAIR). Pridaním aspartátu a ďalšej molekuly ATP vznikne N-sukcinyl-5-aminoimidazol-4-karboxamidribonukleotid (SAICAR). Tento krok je katalyzovaný SAICAR-syntázou. Fumarát je uvoľnený pomocou adenylosukcinátlyázy (ASL) za vzniku 5-aminoimidazol-4-karboxamid-ribonukleotid (AICAR). Posledné dva kroky na vytvorenie prvej kompletnej purínovej molekuly IMP sú katalyzované bifunkčným enzýmom 5-aminoimidazol-4-karboxamidribonukleotidformyltransferázou/ inozínmonofosfátcyklohydrolázou (ATIC). V prvej časti reakcie je konečný uhlík purínového kruhu poskytnutý od 10F-THF a vznikne 5-formaminoimidazol-4-karboxamid-ribonukleotid (FAICAR). FAICAR podlieha dehydratácií, kruh sa uzatvára a vzniká IMP.

Po tvorbe IMP sa *de novo* biosyntéza purínov delí na dve časti. Nahradením karboxylovej skupiny na atóme C6 aminoskupinou vzniká adenzínmonofosfát. Táto aminoskupina je poskytnutá aspartátom a guanozínmonofosfát je donorom energie na vznik adenozylsukcinátu (SAMP). SAMP-syntáza (ASS) katalyzuje tento krok

biosyntézy. ASL katalyzuje odstránenie fumarátu a vzniká AMP. Druhá časť vedie k tvorbe GMP a je iniciovaná oxidáciou IMP, nasledovaná vnesením aminoskupiny, ktorú poskytuje glutamín. Xantozínmonofosfát (XMP) je formovaný IMP-dehydrogenázou využívajúca NAD ako vodíkový akceptor. Posledný krok vzniku GMP je katalyzovaný GMP-syntázou (GMPS).



**Obrázok 3. Všeobecná schéma rastlinného purínového metabolizmu.** Príslušné enzýmy sú zobrazené v tabuľke 1. Zobrazené metabolické komponenty sú: *PRPP* - 5-fosforibozyl-1-pyrofosfát, *Gln*- glutamín, *Glu*- glutamát, *PPi*- pyrofosfát, *PRA* - 5-fosforibozylamín, *Gly*- glycín, *GAR* - glycinamidribonukleotid, *10F-THF*- 10-formyltetrahydrofolát, *FGAR* - formylglycinamidribonukleotid, *FGAM* - formylglycinamidinribonukleotid, *AIR* - 5-aminoimidazol-ribonukleotid, *CAIR* - 4-karboxyaminoimidazolribonukleotid, *Asp*- aspartát, *SAICAR* - N-sukcynyl-5-aminoimidazol-4-karboxamidribonukleotid, *AICAR* - 5-aminoimidazol-4-karboxamidribonukleotid, *FAICAR* -5-formaminoimidazol-4-karboxamidribonukleotid, *SAMP* - adenylosukcinát, *XMP* - xantozínmonofosfát, *IMP* - inozínmonofosfát, *AMP* - adenzínmonofosfát, *GMP* - guanozínmonofosfát, *Ade*- adenín, *Ado*- adenzín.

Organizácia purínovej biosyntézy u rastlín sa líši od biosyntézy mikroorganizmov a vyšších eukaryotov (Boldt a Zrenner, 2003). U prokaryotov jednotlivé gény kódujú jednofunkčné enzýmy (s výnimkou bifunkčného enzýmu ATIC), zatiaľ čo ostatné vyššie eukaryotá obsahujú jednotlivé gény kódujúce mono-, bi- a trifunkčné proteíny (Smith a Atkins, 2002). Organizácia biosyntézy purínov v rastlinách sa viac podobá tej prokariotnej s monofunkčnými enzýmami.

### 3.1.1.2 Katabolizmus purínov

Metabolizmus purínov hrá významnú rolu v metabolizme rastlinného dusíku. Zvieratá a ostatné vyššie primáty postrádajú enzým urikázu a finálny produkt katabolizmu purínových nukleotidov je kyselina močová, ktorá je vylučovaná ako hlavný zdroj odpadového dusíku. Rastliny sú závislé na efektívnom využití dusíka a musia s ním hospodáriť úspornejšie, preto sa snažia v čo najväčšej miere dusík recyklovať. Takže nukleové bázy a ich deriváty sú degradované až na oxid uhličitý a amoniak, ktorý je znova fixovaný. Všetky enzýmy biochemicky detegované v rastlinnom metabolizme purínov sú zobrazené na obrázku 3 a v tabuľke 1.

Po konverzii AMP na IMP pomocou AMP-deaminázy, existujú dva možné postupy pre nasledujúci katabolizmus adenínových nukleotidov. IMP je buď defosforilovaný na inozín pomocou 5'-nukleotidázy alebo fosfatázy, následne je hydrolyzovaný na hypoxantín inozín-guanínnukleozidázou a ďalej je transformovaný na xantín xantíndehydrogenázou (XDH). Druhou možnosťou je, že IMP je transformovaný na XMP IMP-dehydrogenázou (IMPDH), potom pomocou 5'-nukleotidázy metabolizovaný na xantozín, ktorý je potom prevedený na xantín pomocou inozín-guanínnukleozidázou. Obe cesty degradácie adenínových nukleotidov sú závislé na AMP-deamináze, keďže neobsahujú adenín- a adenozáindeaminázu. Naopak, guanozáindeamináza je prítomná v rastlinách a guanínové nukleotidy sú degradované defosforyláciou. Vzniká guanozín, ktorý je potom deaminovaný na xantozín alebo transformovaný na guanín pomocou enzýmu inozín-guanínnukleozidázy a vedie k tvorbe xantínu. Na xantín sú degradované všetky purínové metabolity pred členením purínového kruhu.

Následná degradácia purínovej báze xantínu je vykonaná xantíndehydrogenázou a vedie k vytvoreniu kyseliny močovej. Urikáza potom štepí kyselinu močovú na allanotín, ktorý je ďalej konvertovaný na allantóat enzýmom allantoinázou a allantóat je oxidovaný na kyselinu allantóovú. Tá je prevedená na ureidoglykolát alebo ureidoglycín a vznikajú konečné produkty: oxid uhličitý, amoniak a glykoxylát. Finálne produkty môžu byť opäť použité v procese fotosyntézy (CO<sub>2</sub>)



alebo reasimilované fotorespyráciou glykolátu a GOGAT (glutamínoxoglutarát-aminotransferáza) cyklom.

Purínová katabolická dráha má dôležitú a esenciálnu funkciu v syntéze alkaloidov teobromínu a kofeínu (Ashihara a Crozier, 1999). Tieto metylované xantínové deriváty majú úlohu v obrane mladých listových pletív pred larvami hmyzu alebo sú uvoľňované do pôdy a inhibujú klíčenie semien iných rastlinných druhov.

**Tabuľka 1. Zhrnutie enzýmov zapojených do metabolizmu purínov.**

	Názov enzýmu	EC číslo
1	PRPP-amidotransferáza	EC 2.4.2.14
2	GAR-syntáza	EC 6.3.4.13
3	GAR-transformyláza	EC 2.1.2.2
4	FGAM-syntáza	EC 6.3.5.3
5	AIR-syntáza	EC 6.3.3.1
6	AIR-karboxyláza	EC 4.1.1.21
7	SAICAR-syntáza	EC 6.3.2.6
8	adenylosukcinátlyáza	EC 4.3.2.2
9	AICAR-transformyláza	EC 2.1.2.3
10	adenylosukcinátsyntáza	EC 6.3.4.4
11	adenylátkináza	EC 2.7.4.3
12	AMP-deamináza	EC 3.5.4.6
13	IMP-dehydrogenáza	EC 1.1.1.205
14	GMP-syntáza	EC 6.3.5.2
15	guanozindeamináza	EC 3.5.4.15
16	adenozínfosforyláza	EC 2.4.2.1
17	adenozínnukleozidáza	EC 3.2.2.1
18	adenozínkináza	EC 2.7.1.20
19	nukleozidfosfotransferáza	EC 2.7.1.77
20	adenínfosforibozyltransferáza	EC 2.4.2.7
21	inozín-guanozínfosforyláza	EC 2.4.2.1
22	inozín-guanozínkináza	EC 2.7.1.73
23	hypoxantín-guanínfosforibozyltransferáza	EC 2.4.2.8
24	5'-nukleotidáza	EC 3.1.3.5
25	inozín-guanozínnukleozidáza	EC 3.2.2.2
26	xantíndehydrogenáza	EC 1.1.1.204
27	guanindeamináza	EC 3.5.4.15
28	urikáza	EC 1.7.3.3
29	allantoináza	EC 3.5.2.5
30	allantoikáza	EC 3.5.3.4
31	ureáza	EC 3.5.1.5
32	ureidoglykolátlyáza	EC 4.3.2.3
33	allantoínideamináza	EC 3.5.3.9
34	ureidoglycínamidohydroláza	
35	ureidoglykoláthydroláza	EC 3.5.3.19

### 3.1.1.3 Recyklácia purínov

Recyklácia purínov je energeticky výhodná, pretože vyžaduje len jednu molekulu ATP na rozdiel od *de novo* syntézy, ktorá je energeticky veľmi náročná a vyžaduje päť nukleotidov na tvorbu AMP a sedem nukleotidov na syntézu GMP. Recyklácia purínov slúži na regeneráciu rastlinných nukleotidov konvertovaním purínových báz, nukleozidov a nukleotidov, ktoré vznikli počas rastlinného metabolizmu. Všetky enzýmy recyklačného cyklu sa nachádzajú v cytozole. Táto dráha je zobrazená na obrázku 3 a enzýmy sú zaznamenané v tabuľke 1.

Purínové bázy adenín a guanín môžu byť prevedené na príslušné monofosfáty enzýmami adenínfosforibozyltransferázou alebo hypoxantín-guanínfosforibozyltransferázou využívajúc PRPP ako zdroj fosfátu. Ďalšia reakcia je katalyzovaná adenosínfosforylázou alebo inozín-guanozínfosforylázou. Premena adenosínu, inozínu a guanosínu na IMP, XMP a GMP môže byť katalyzovaná adenosínkinázou a inozín-guanosínkinázou alebo nukleozidfosfotransferázou. Okrem toho, adenosindeamináza, guanosín deamináza a adenosínnukleozidáza prispievajú k recyklačnej dráhe purínov. Prítomnosť adenosindeaminázy v rastlinách je stále otázna, pretože aktivita tohto enzýmu nie je jednoznačne preukázaná. Avšak v genómu *Arabidopsis* bol objavený jeden gén (*At4g04880*) pre adenosindeaminázu a mohla by byť overená jeho expresia (Schoor a Moffatt, 2004).

Enzýmy z recyklačného cyklu, adenínfosforibozyltransferáza a adenosínkináza, majú tiež dôležitú úlohu premene cytokinínov (Moffatt a Ashihara, 2002). Prirodzene vyskytujúce sa cytokiníny sú N<sup>6</sup>-substituované deriváty adenínu. Sú syntetizované pridaním izopentenylu k AMP za vzniku izopentenyladenosínmonofosfátu. Izoprenoidný postranný reťazec je následne upravený tak, aby viedol k tvorbe rozličných cytokinínových derivátov.

### 3.1.2 Biosyntéza pyrimidínov

#### 3.1.2.1 De novo biosyntéza pyrimidínov

Biosyntéza *de novo* pyrimidínov je evolučne zakonzervovaný proces vo všetkých organizmoch a je definovaná ako tvorba UMP z karbamoylfosfátu, aspartátu a 5-fosforibozyl-1-pyrogfosfátu (PRPP). Je tiež známa ako orotátová dráha. Skladá sa zo šiestich krokov, ktoré sú naznačené na obrázku 4 a enzýmy sú vypísané v tabuľke 2.

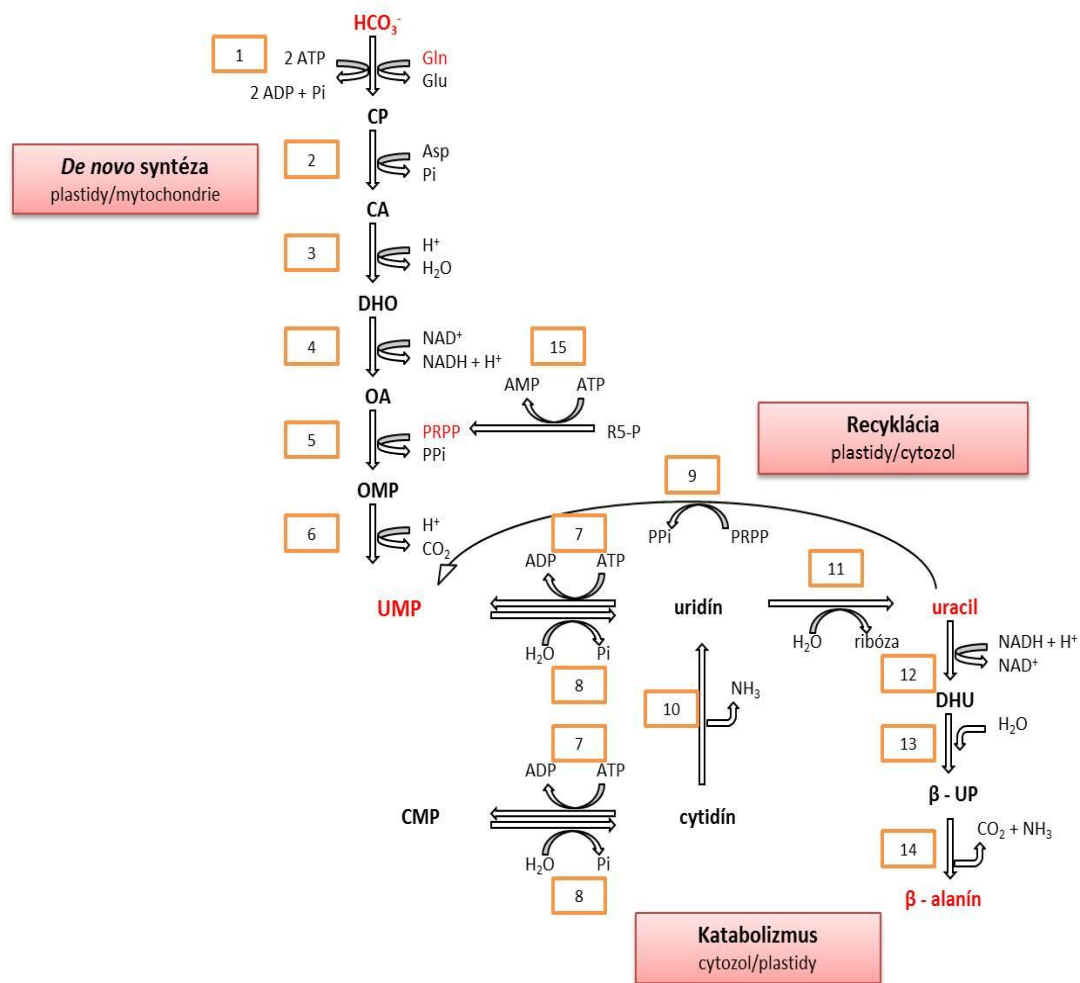
Karbamoylfosfátsyntáza produkuje karbamoylfosfát zlúčením uhličitanu, ATP a aminoskupiny. Karbamoylfosfát nie je využitý len pri *de novo* syntéze pyrimidínov, ale aj ako prekursor biosyntézy arginínu. Ďalší krok, ktorý je katalyzovaný aspartáttranskarbamoylázou, zahrňuje kondenzáciu karbamoylfosfátu s aspartátom za tvorby karbamoylaspartátu. Tento krok je špecifický pre pyrimidínovú syntézu. Cyklizácia karbamoylaspartátu za vzniku pyrimidínového kruhu je katalyzovaná enzýmom dihydroorotázou. Následne je dihydroorotát oxidovaný dihydroorotátdehydrogenázou a produktom je orotát. Ten je kondenzovaný s PRPP na orotidín-5'-monofosfát pomocou orotátfosforibozyltransferázy, ktorý je potom dekarboxylovaný orotidylátdekarboxylázou na uridín-5'-monofosfát.

Hoci je pyrimidínová *de novo* syntéza konzervovaná, existujú určité odlišnosti medzi baktériami, kvasinkami a vyššími eukaryotami (Nara et al., 2000). V baktériách každý enzymatický krok je katalyzovaný iným proteínom kódovaný rozličným génom (Neuhard a Nygaard, 1987). V rastlinách sú prvé tri kroky katalyzované troma jednotlivými proteínmi (Doremus, 1986), zatiaľ čo u cicavcov sú všetky tri kroky zabezpečené jedným multifunkčným proteínom nazývaným CAD: karbamoylfosfátsyntáza-aspartáttranskarbamoyláza-dihydroorotáza (Hiroyuki et al., 1996). U rastlín a cicavcov sú posledné dva kroky katalyzované odlišnými doménami bifunkčného enzýmu zvaného UMP-syntáza (Walther et al., 1984).

### 3.1.2.2 Katabolizmus pyrimidínov

Pyrimidínové nukleotidy sú katabolizované na pyrimidínové nukleozidy odstránením fosfátovej skupiny v reakcii katalyzovanej pyrimidín špecifickou 5'-nukleotidázou, napríklad uridínmonofosfáthydrolyázou. Následne v reakcii katalyzovanej cytidindeaminázou je odstránená aminoskupina a cytidín je deaminovaný na uridín a neskôr metabolizovaný na uracil. Pyrimidínové bázy uracil a tymín sú potom degradované redukčnou cestou v troch po sebe idúcich reakciách, ktoré sú katalyzované dihydrouracildehydrogenázou, dihydropyrimidínázou a  $\beta$ -ureidopropionázou. Katabolizmus je naznačený na obrázku 4 a enzýmy popísané v tabuľke 2.

Chemicky je degradačná dráha opačná k *de novo* syntéze a vedie k tvorbe  $\beta$ -alanínu alebo  $\beta$ -aminobutyrátu skrz uvoľnenie amoniaku a oxidu uhličitého. Pyrimidíny, podobne ako puríny, môžu byť tiež metabolizované na sekundárne rastlinné produkty so špecifickými obrannými schopnosťami (Kafer et al., 2004).



**Obrázok 4. Všeobecná schéma rastlinného pyrimidínového metabolizmu.** Príslušné enzýmy sú zobrazené v tabuľke 2. Zobrazené metabolické komponenty sú: CP - karbamoylfosfát, CA - karbamoylaspartát, DHO - dihydrorotát, OA - kyselina orotová, OMP - orotidín-5'-monofosfát, UMP - uridínmonofosfát, CMP - cytozínmonofosfát, DHU - dihydrouracil,  $\beta$ -UP -  $\beta$ -ureidopropionát, R5-P - ribóza-5-fosfát, Gln - glutamín, Glu - glutamát, Asp - aspartát, PRPP - 5-fosforibozyl-1-pyrofosfát, PPI - pyrofosfát, Pi - anorganický fosfát.

### 3.1.2.3 Recyklácia pyrimidínov

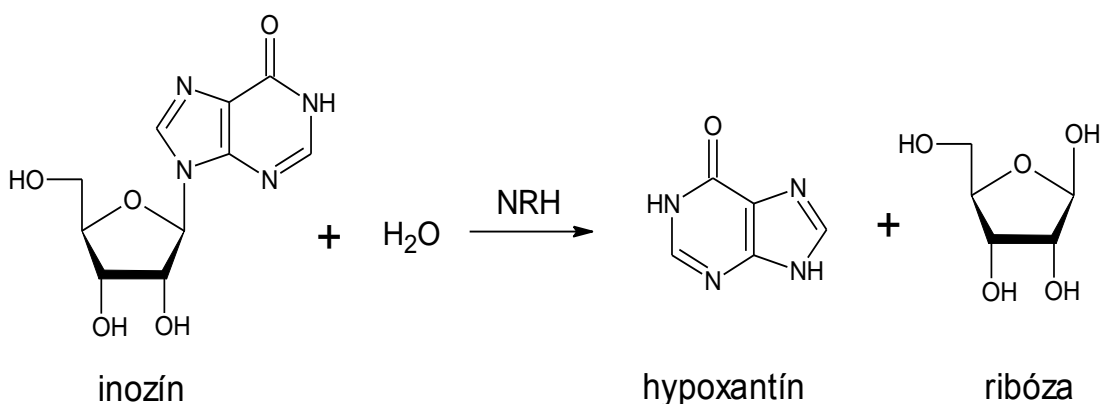
Bunky si vyvinuli mechanizmus na opakované využitie nukleozidov a nukleobáz cez recyklačné reakcie, pretože *de novo* syntéza je veľmi energeticky náročná. Nukleozidy uridín, cytidín a tymidín sú recyklované na ich nukleotidy pomocou špecifických nukleozidkináz (uridinkináza, cytidinkináza). Uracil, ako jediný z pyrimidínových báz, je priamo prevedený na UMP v reakcii katalyzovanej uracilfosforibozyltransferázou, ktorá má v rastlinách podstatne nižšiu aktivitu ako nukleozidkinázy (Ashihara et al., 2000). V *Arabidopsis*, rodina uracilfosforibozyltransferáz pozostáva z niekoľkých členov. Sú lokalizovaní v plastidoch alebo cytozole (Schmid et al., 2005), a preto je pravdepodobné, že recyklácia pyrimidínov prebieha práve v týchto organelách.

Tabuľka 2. Zhrnutie enzýmov zapojených do metabolizmu pyrimidínov.

Číslo	Názov enzýmu	EC číslo
1	karbamoylfosfátsyntáza	EC 6.3.5.5
2	aspartáttranskarbamoyláza	EC 2.1.3.2
3	dihydroorotáza	EC 3.5.2.3
4	dihydroorotátdehydrogenáza	EC 1.3.99.11
5	orotátfosforibozyltransferáza	EC 2.4.2.10
6	orotidin-5'-fosfátdekarboxyláza	EC 4.1.1.23
7	uridín-cytidínkináza	EC 2.7.1.48
8	pyrimidín špecifická 5'-nukleotidáza	EC 3.1.3.5
9	uracilfosforibozyltransferáza	EC 2.4.2.9
10	cytidindeamináza	EC 3.5.4.5
11	uridínnukleozidáza	EC 3.2.2.3
12	dihydrouracildehydrogenáza	EC 1.3.1.2
13	dihydropyrimidináza	EC 3.5.2.2
14	$\beta$ -ureidopropionáza	EC 3.5.1.6
15	PRPP-syntáza	EC 2.7.6.1

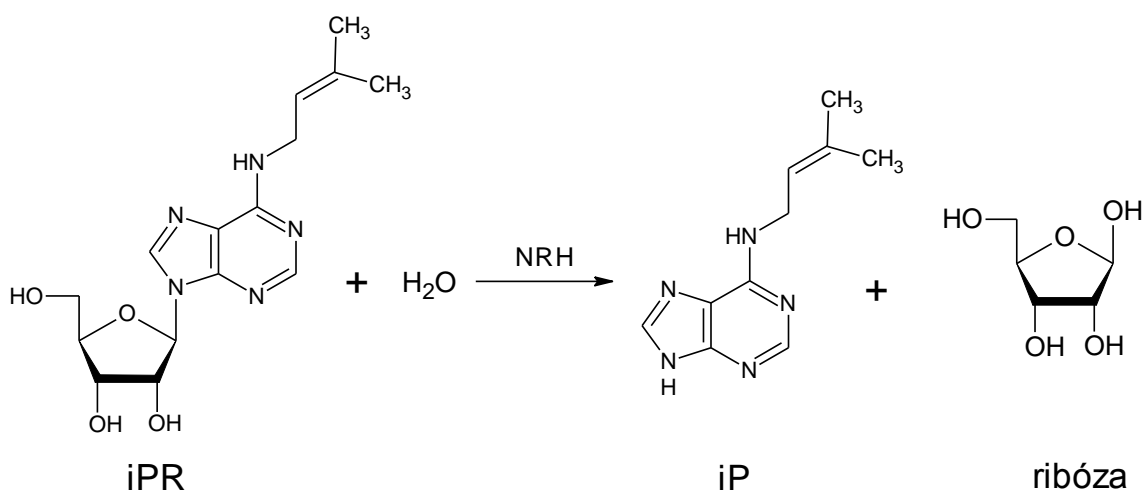
### 3.2 Nukleozid-*N*-ribohydrolázy

Nukleozid-*N*-ribohydrolázy (EC 3.2.2.x) sú glykozidázy, ktoré katalyzujú štiepenie *N*-glykozidovej väzby nukleozidov za vzniku nukleobázy a ribózy (obrázok 5). Enzýmy s nukleozidhydrolázovou aktivitou sú dôležité pre recyklačnú dráhu patogénnych organizmov, ktoré nie sú schopné syntetizovať puríny *de novo*. V literatúre sa môžeme stretnúť s rôznymi názvami pre túto triedu enzýmov, ako napríklad nukleozid-*N*-ribohydrolázy, nukleozidhydrolázy či ribohydrolázy, alebo len skrátene NRH. Kukurica obsahuje päť génov pre NRH - *NRH1a*, *NRH1b*, *NRH2a*, *NRH2b* a *NRH3*.



Obrázok 5. Reakčný mechanizmus nukleozid-*N*-ribohydroláz na príklade inozínu. Báza hypoxantín a ribóza vznikajú hydrolýzou *N*-glykozidovej väzby.

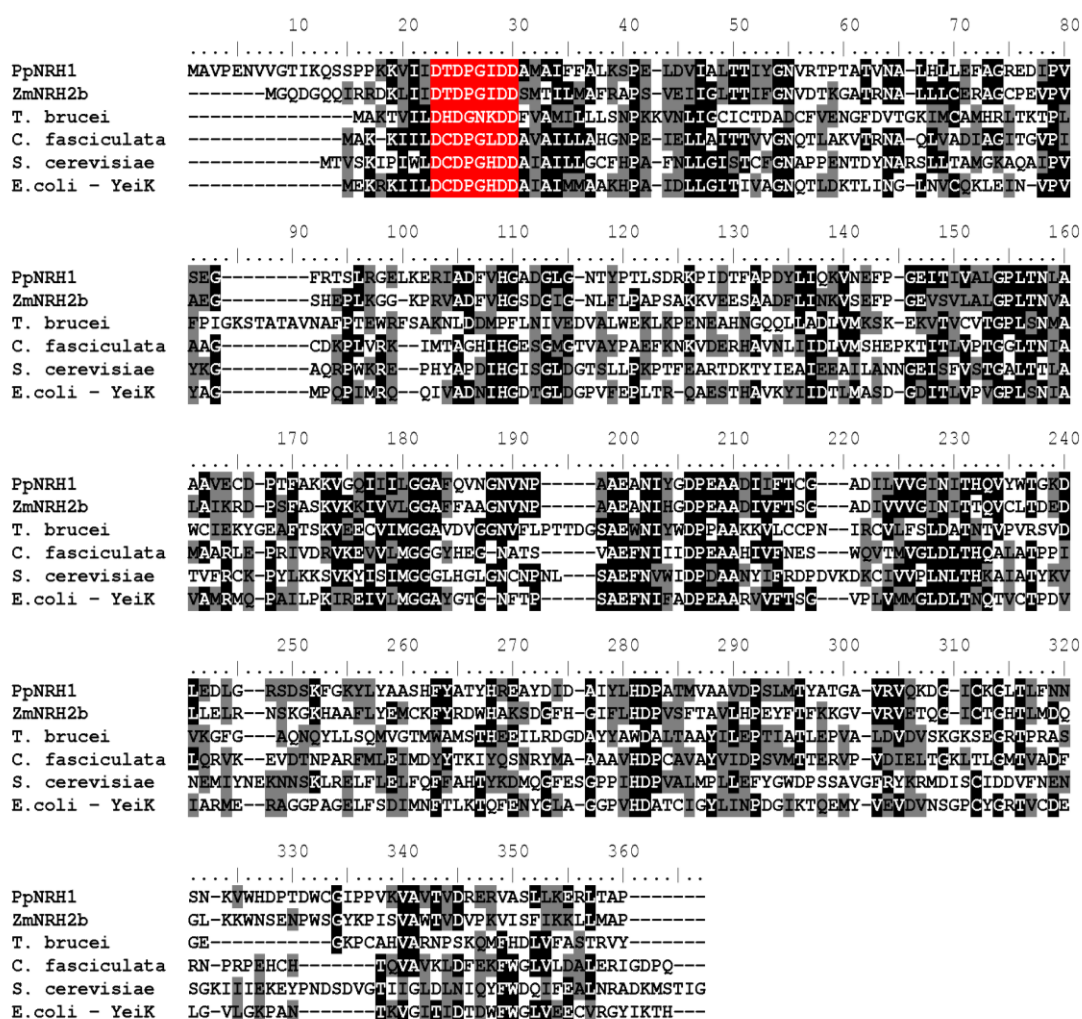
Ako bolo uvedené v kapitole 3.1.1.3, tak enzýmy recyklačnej dráhy purínov sa nachádzajú i v metabolizme cytokinínov. Sú to rastlinné hormóny, ktoré regulujú mnoho vývojových procesov ako bunkové delenie, starnutie listov a apikálnu dominanciu. Chemicky sú derivátmi adenínu, ktoré sú delené podľa substituentu na pozícií N<sup>6</sup> adenínového cyklu na izoprenoidné a aromatické. Môžu sa vyskytovať vo forme voľnej bázy, ribozidu, O- alebo N-glykozidov. Voľné bázy sú aktívnou formou cytokinínov, ostatné formy majú zásobnú alebo transportnú funkciu (Mok a Mok, 2001). Na obrázku 6 je zobrazená hydrolýza pomocou NRH izopentenyladenínribozidu (iPR) na voľnú ribózu a cytokinín izopentenyladenín (iP).



**Obrázok 6. Reakčný mechanizmus nukleozid-*N*-ribohydroláz na príklade iPR.** Cytokinín iP a ribóza vznikajú hydrolýzou *N*-glykozidovej väzby.

Ribohydrolázy sú široko rozšírené metaloproteíny s unikátnou topológiou  $\beta$ -listov. V aktívnom mieste sa nachádza vápenatý ión (obrázok 8). Všetky NRH sú špecifické pre ribózu, ale vykazujú značnú variabilitu v preferencii nukleových báz (Verseés et al., 2001). Sú charakteristické svojím poznávacím aspartátovým clustrom sekvencie DXDXXXDD na N-terminálnom konci polypeptidového reťazca (obrázok 7). Nukleozid-*N*-ribohydrolázy sú lokalizované v cytózole. V prírode sú pomerne rozšírené, nachádzajú sa v kvasinkách (Kurtz et al., 2002), v baktériách (Petersen a Møller, 2001), v mesozoách (Verseés et al., 2003) či v rastlinách (Jung et al., 2009), ale vyskytujú sa aj v hmyze (Ribeiro a Valenzuela, 2003), avšak nie je dôkaz o ich aktivite u cicavcov (Parkin et al., 1991). Obsahujú nukleozidfosforylázy, ktoré vedú k tvorbe nukleobázy a ribózy. NRH sú rozdelené na základe ich špecifity voči substrátom na 4 skupiny: nešpecifické NRH, ktoré hydrolyzujú inozín a uridín - IU-NRH (Parkin et al., 1991; Shi et al., 1999), druhú skupinu tvoria purín-špecifické adenosín/guanosín/inosín-NRH (Parkin, 1996), ďalej sú to 6-oxopurín-špecifické

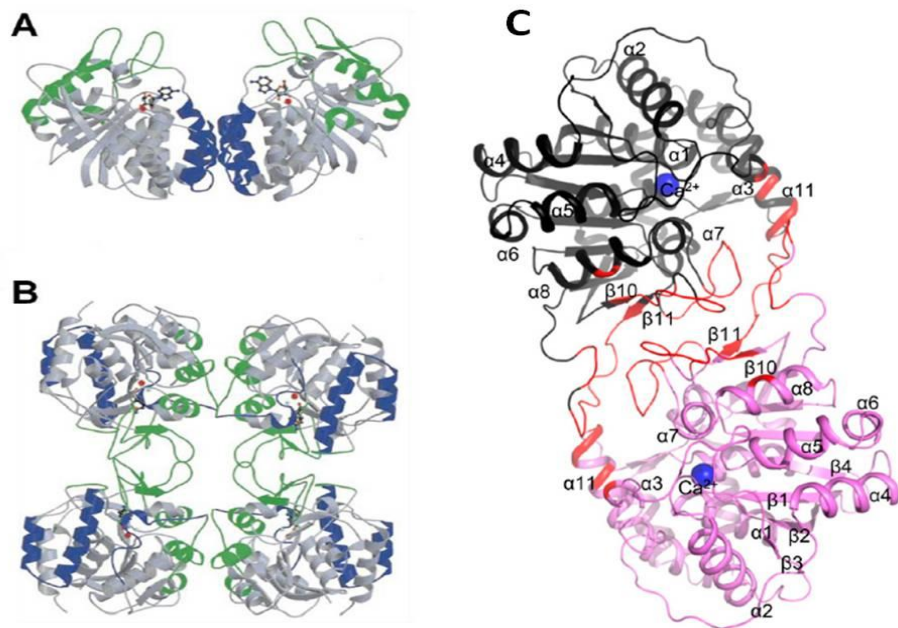
inozín/guanozín-NRH (Estupiñán a Schramm, 1994) a nakoniec pyrimidín-špecifické cytidín/uridín-NRH (Giabbai a Degano, 2004).



**Obrázok 7. Porovnanie aminokyselinových sekvencií NRH z rôznych organizmov.** Rastlinné NRH z *Physcomitrelly patens* (PpNRH1) a z kukurice (ZmNRH2b), protozoálne NRH z *T. brucei* a *C. fasciculata*, kvasinková NRH zo *S.cerevisiae* a bakteriálna NRH z *E.coli* (YeiK). V červenej je vyznačený motív unikátny pre NRH a ktorý sa podieľa na väzbe  $Ca^{2+}$  iónu a 2-OH skupiny ribózy.

Kryštalická štruktúra je známa len u niekoľkých organizmov, napríklad u *Leishmania major* (Shi et al., 1999), *Trypanosoma vivax* (Verseés et al., 2001), *Escherichia coli* (Iovane et al., 2008; Muzzolini et al., 2006), ale odnedávna je známa i kryštalická štruktúra NRH z machu *Physcomitrella patens* či kukurice (Kopečná et al., 2013). Všetky študované parazitické NRH majú tetramérnu štruktúru, okrem NRH z *T.vivax* (TvNRH), ktorá je homodimér (Verseés, 2001). Taktiež ribohydrolázy z machu (PpNRH1) a kukurice (ZmNRH3) majú dimérnu štruktúru, ale je iná ako dimér TvNRH (Kopečná et al., 2013) (obrázok 8). TvNRH má dve na sebe nezávislé aktívne miesta, v strede ôsmich  $\beta$ -skladaných listov. Vápenatý ión situovaný v aktívnom mieste je viazaný s karboxylovými skupinami troch aspartátov (dva aspartáty poskytujú

po jednom kyslíku, tretí poskytuje dva kyslíky), s karbonylovou skupinou treonínu, s dvoma hydroxylovými skupinami ribózy a s vodou (Verseés et al., 2001). Rastlinné nukleozidribohydrolázy PpNRH1 a ZmNRH3 majú v aktívnom mieste jediný rozdiel v tom, že je namiesto karbonylovej skupiny treonínu viazaná karbonylová skupina leucínu. Štruktúrne porovnanie miest viažúcich substrát ukázalo, že rozdiel medzi PpNRH1 a ZmNRH3 je v jednom reziduu, ktoré obklopuje nukleobázu a tým je Y244 u PpNRH1, ktoré je nahradené W u ZmNRH3 (Kopečná et al., 2013) (obrázok 9D).



**Obrázok 8. Porovnanie kvartérnych štruktúr (A) IAG-NRH z *T. vivax*, (B) IU-NRH z *C. fasciculata*, (C) PpNRH1.** (A): Diména štruktúra IAG-NRH. (B): Tetraména štruktúra IU-NRH. (C): Diména štruktúra PpNRH1. Jedna podjednotka je označená čiernou farbou, druhá podjednotka ružovou. Modrou farbou je vyznačený  $Ca^{2+}$  ión, interakcie medzi podjednotkami sú označené červenou farbou.

Pre podaktoré nukleozid-*N*-ribohydrolázy bol určený pH profil. Jednou z nich je napríklad IAG-NRH z *Trypanosoma brucei brucei* (Parkin, 1996). pH profil hydrolýzy inozínu ukazuje, že k úplnej katalytickej kapacite tejto ribohydrolázy prispievajú tri protonované skupiny. Plató v oblasti okolo pH 7,5 ukazuje, že dve formy enzýmu sú katalyticky aktívne. Jedna skupina s  $pK_a$  v blízkosti 6,5 a dve skupiny s  $pK_a$  v blízkosti 8,8 sú zodpovedné za efektívnejšiu katalýzu. Strata protónu z kyslejšej skupiny znižuje  $V_{lim}$  približne desaťkrát. Avšak strata dvoch protónov vyúsťuje do kompletnej inaktivácie NRH. pH profil v závislosti na  $V_{lim}/K_m$  neukazuje v rozmedzí pH 5 - 8 žiadne zmeny v katalytickej aktivite, ale účinnosť katalýzy výraznejšie klesá pri pH väčšom ako 8. Je to spôsobené dvoma ionizovateľnými skupinami na voľnom enzýme. Taktiež bolo stanovené pH optimum pre NRH z *Bacillus thuringiensis* (Liang et al., 2008). Najvyššia aktivita enzýmu v tomto prípade bola pozorovaná v okolí pH 6. Pre NRH



z *Physcomitrella patens* (Kopečná et al., 2013) bolo tiež určené pH optimum medzi pH 7,5 až 8.

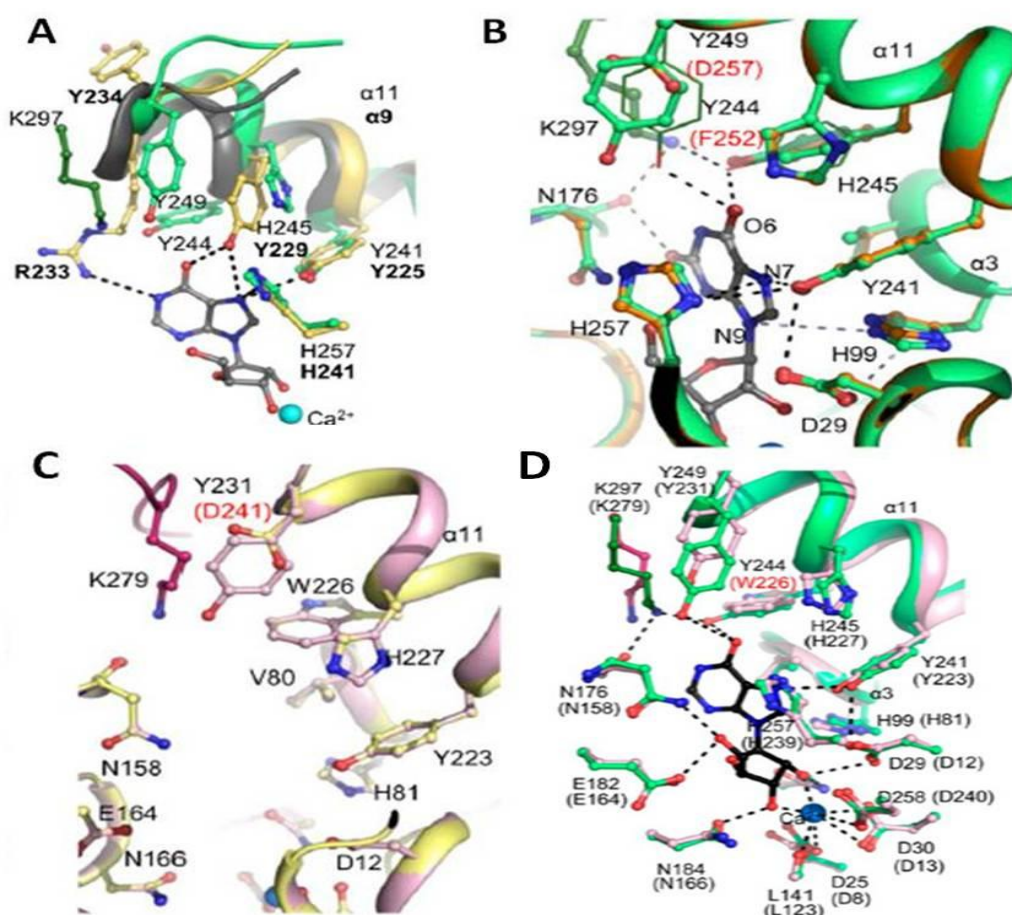
Ako už bolo vyššie uvedené, metabolická úloha nukleozid-N-ribohydroláz bola najviac preštudovaná u parazitických protozoách. Nemajú schopnosť syntetizovať puríny *de novo* a tak sú NRH kľúčovými enzýmami dráhy purínovej recyklácie u purín-*auxotrofných* organizmoch, ako napríklad *Trypanosoma brucei*. Tieto parazity nahrádzajú aktivitu nukleozidfosforylázy, ktorá sa vyskytuje u prokaryot a vyšších eukaryot, práve aktivitou ribohydrolázy. Tým, že absentuje ich aktivita v ľudskom metabolizme a naopak, sú nepostradateľné pre protozoá, tak práve kvôli tejto metabolickej odlišnosti sú nukleozidribohydrolázy považované za atraktívny cieľ pri vývoji špecifických antiparazitických liečiv a ich možnom chemoterapeutickom využití.

Niekoľko nukleozid-N-ribohydroláz bolo identifikovaných v rastlinách, napríklad v jačmeni (Guranowski a Schneider, 1977), v pšenici (Chen a Kristopeit, 1981), vo fazuli (Achar a Vaidyanathan, 1967), v paradajke (Burch a Stuchbury, 1986), v káve (Campos et al., 2005) alebo v čaji (Imagawa et al., 1979). Nedávno bola publikovaná detailná štúdia o génovej rodine NRH z *Arabidopsis thaliana* (Jung et al., 2009, 2011). Enzým AtNRH1 vykazuje najvyššiu hydrolázovú aktivitu voči uridínu a xantozínu, ale tiež môže hydrolyzovať cytokinínový ribozid  $N^6$ -(2-izopentenyl)adenozín (iPR), AtNRH2 podporuje hydrolýzu inozínu a prejavuje sa v neskoršej fáze starnutia. Taktiež boli charakterizované IU-NRH z dvoch ďalších organizmov, zástupca nižších rastlín mach *Physcomitrella patens* a kukurica *Zea mays* (Kopečná et al., 2013).

### 3.2.1 Kinetické vlastnosti nukleozid-N-ribohydroláz

IU-NRH, ako je napríklad CfNRH (Parkin et al., 1991), majú charakteristickú trojicu rezíduí, ktorá pozostáva z jedného H a dvoch Y. Táto trojica viaže substrát a umožňuje efektívnu protonizáciu atómu N7 purínovej bázy (odstupujúca skupina). Zaujímavé je, že takáto trojica rezíduí sa nevyskytuje v CU-NRH z *E.coli* (Giabbai a Degano, 2004, Muzzolini 2006), čo naznačuje, že rezíduá potrebné pre aktiváciu odstupujúcej skupiny, keď je protonizovaná pyrimidínová báza, sú odlišné od tých, čo sú potrebné pre puríny. Konkrétna trojica rezíduí v Cf-NRH sú Y229, Y225 a H241 (obrázok 9A), pričom rezíduum H241 protonizuje atóm N7 (Gopaul, et al., 1996). PpNRH1, ktorá je taktiež IU-NRH, má ekvivalentnú trojicu rezíduí pozostávajúcu z H245, Y241 a H257 (Kopečná et al., 2013) (obrázok 9B). Na základe tohto zistenia bola navrhnutá mutagenézia ekvivalentného histidínu v modele ZmNRH2b a mutantná

forma H249A bola študovaná v tejto práci. Miesto viažuce substrát u PpNRH1 obsahuje dve ďalšie rezíduá Y244 a Y249, ktoré sú viazané k nukleobáze a sú ekvivalentné k rezíduám I228 a Y234 v CfNRH, ktorá obsahuje v mieste viažucom substrát ešte rezíduum R233, ktoré je lokalizované na smyčke nasledujúcej po mobilnom  $\alpha$ 9-helixe. Zaujímavé je, že postranný reťazec K297, z druhej podjednotky PpNRH1, sa nachádza na podobnom mieste ako R233, čo naznačuje dôležité dimérne usporiadanie pri enzymatickej funkcii rastlinných NRH (Kopečná et al., 2013) (obrázok 9B). Na základe tohto zistenia bola navrhnutá mutagenézia ekvivalentného lyzínu v modele ZmNRH2b a mutantná forma K289A bola študovaná v tejto práci. Na obrázku 9C je zobrazené aktívne miesto ZmNRH3, v ktorom sa nachádza rezíduum H81, ktorému odpovedá H91 v ZmNRH2b a bola navrhnutá mutagenézia ekvivalentného histidínu v modele ZmNRH2b a mutantná forma H91A bola študovaná v tejto práci.



**Obrázok 9. (A): Porovnanie miest viažucich substrát u PpNRH1 (zelená farba) a CfNRH (žltá farba).** Čiernou farbou je znázornený  $\alpha$ -helix 9 (ekvivalent  $\alpha$ -helixu 11 u rastlinných NRH). **(B): Naviazanie bázy xantozínu v aktívnom mieste PpNRH1.** Prestavba postranných reťazcov Y244 a Y249 je zobrazená ako plná čiara, vodíkové väzby sú zobrazené ako prerušované čiary. Model PpNRH2 je zobrazený oranžovou na porovnanie. Rozdiely medzi dvoma NRH sú znázornené červenou farbou. **(C): Porovnanie usporiadania aktívnych miest ZmNRH2b (žltá farba) a ZmNRH3 (ružová farba).** Rozdiely v sekvencii medzi ZmNRH2b a ZmNRH3 sú znázornené červenou. **(D): Aktívne miesto PpNRH1 a ZmNRH3.** Interakcia medzi PpNRH1 (zelená farba) a ZmNRH3 (ružová farba) so substrátom inozínom (čierna farba).

Kinetické vlastnosti NRH nie sú doteraz celkom známe a preštudované. Tieto štúdie sú aplikované len na niekoľkých organizmoch. Jedným z nich je *T. brucei brucei* (Parkin, 1996). Pre túto IAG-NRH je najlepším substrátom inozín ( $K_m$  18  $\mu\text{M}$  a  $V_{lim}$  0,8  $\mu\text{mol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ). Hodnoty Michaelisovej konštanty sú približne rovnaké pre pyrimidínové i purínové nukleozidy (15  $\mu\text{M}$  pre adenzín, 106  $\mu\text{M}$  pre cytidín). Naopak, rýchlosť hydrolyzy  $V_{lim}$  pre pyrimidínové substráty cytidín a uridín je oveľa nižšia ako u purínových ribozidov. Z *E.coli coli* stanovené kinetické parametre u dvoch enzýmov - YeiK (Giabbai a Degano, 2004) a YbeK (Muzzolini et al., 2006). YeiK je špecifický pre puríny. Katalytická účinnosť voči uridínu bola asi 1000-krát väčšia ako u adenzínu, guanozínu a inozínu (neaktívne substráty). Na druhú stranu, YbeK je charakterizovaný ako pyrimidín špecifická NRH. Purínové ribozidy sú hydrolyzované so 100 - 1000-krát menšou účinnosťou v porovnaní s pyrimidínovými nukleozidmi.

Z rastlinných NRH bola preštudovaná ribohydroláza z *Arabidopsis thaliana* (AtNRH1) (Jung et al., 2009). Enzým vykazoval najvyššiu hydrolyzáčovú aktivitu pre uridín ( $K_m$  - 0,8 mM), nasledovali inozín ( $K_m$  - 1,4 mM) a adenzín ( $K_m$  - 0,7 mM). Taktiež bol schopný hydrolyzovať cytokinínový derivát izopentenyladenín-ribozid. Rozdiel medzi substrátmi bol najmä v rýchlosti hydrolyzy. Hodnota  $V_{lim}$  pre uridín je 0,004  $\text{mmol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$ , zatiaľ čo limitná rýchlosť hydrolyzy adenzínu a inozínu bola o niekoľko rádov nižšia ( $V_{lim}$  pre inozín len  $7,7 \times 10^{-6} \text{mmol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ,  $V_{lim}$  pre adenzín 0,0002  $\text{mmol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ). Ako bolo uvedené vyššie, nedávno boli charakterizované NRH z *P. patens* (PpNRH) a zo *Z. mays* (ZmNRH) (Kopečná et al., 2013). PpNRH1 je najaktívnejšia voči dvom purínovým ribozidom - xantozínu a inozínu. Nižšiu aktivitu vykazuje s adenzínom, uridínom a guanozínom. Naopak, PpNRH2 preferuje pyrimidínový ribozid uridín a má menšiu aktivitu voči xantozínu a inozínu. Podobne je na tom i ZmNRH2a a ZmNRH2b. Aktivita ZmNRH2b je 10 - 200-krát vyššia ako u ZmNRH2a a PpNRH2. ZmNRH3 uprednostňuje inozín a xantozín, ostatné nukleozidy sú slabšie substráty. PpNRH1 a ZmNRH3 vykazujú najvyššiu katalytickú účinnosť pre inozín a xantozín, kým ZmNRH2a a ZmNRH2b pre uridín a xantozín, aj keď v tomto prípade bola hodnota  $K_m$  pre uridín pomerne vysoká (ZmNRH2a - 468  $\mu\text{M}$ , ZmNRH2b - 514  $\mu\text{M}$ ).

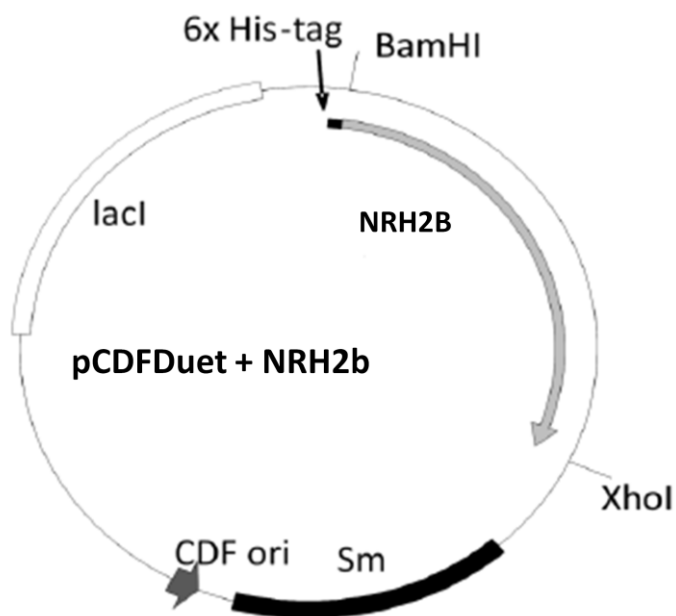
V práci Kopečná et al., 2013 sú študované kinetické parametre mutantných foriem PpNRH1 so substrátmi xantozínom a inozínom. Tri mutanty Y241A, Y249A a H245A majú niekoľkonásobne vyššiu hodnotu  $K_m$  s inozínom ako s xantozínom, čo naznačuje stratu interakcie s 6-oxoskupinou inozínu. Xantozín má o jeden kyslíkový atóm viac, vplyv na hodnotu  $K_m$  je menej výrazný, pretože ďalšia oxoskupina tvorí ďalšiu vodíkovú väzbu s kyslíkom na hlavnom reťazci N176 (obrázok 9B). Xantozín

môže byť taktiež stabilizovaný interakciou s K297. Rezíduum H245 je plne konzervované u všetkých rastlinných NRH a dokovacia štúdia naznačuje, že neinteraguje so žiadnou nukleobázou. Hodnoty  $K_m$  pre mutantnú formu Y241A sú vyššie, ale nie tak ako už u zmienených mutantov. Znížená hodnota katalytickej aktivity je pravdepodobne dôsledkom neefektívnej stabilizácie negatívneho náboja odstupujúcej skupiny, ktorá vedie k zvýšeniu energetickej bariéry na dosiahnutie tranzitného stavu. Všetky kinetické parametre sú v súlade s dokovacou štúdiou a ukazujú na esenciálnu úlohu dvoch reziduí, Y244 a Y249, pri väzbe purínových ribozidov u PpNRH1. ZmNRH3 obsahuje tryptofán (W226) v polohe zodpovedajúcej Y244 v PpNRH1 a kineticky sú si veľmi podobné. Tyrozín na pozícii 249 môže byť veľmi dôležitý pri určení substrátovej špecificity. PpNRH2, ZmNRH2a a ZmNRH2b, ktoré sú aktívne voči uridínu a xantozínu, majú rezíduum D na pozícii 249 a ostatné rezíduá v aktívnom mieste sú identické. Nahradenie D za Y je sprevádzané 3-5 - krát vyššími hodnotami  $K_m$  pre inozín a o polovicu menšími hodnotami  $K_m$  voči uridínu. Na základe tohto zistenia bola navrhnutá mutagenézia ekvivalentného aspartátu v modele ZmNRH2b a mutantné formy D241A a D241Y boli študované v tejto diplomovej práci.

## 4 PRAKTICKÁ ČASŤ

### 4.1 Biologický materiál

- expresný vektor pCDFDuet (Merck-Millipore, obrázok 10)



Obrázok 10. Schéma expresného vektoru pCDFDuet.

- RNA na reverznú transkripciu bola izolovaná z päťdňových kukuričných semien použitím roztoku Plant RNA Isolation Aid a bola upravená TURBO DNase-free kitom, cDNA bola potom syntetizovaná pomocou SuperScript II reverznej transkriptázy, a takto pripravená bola poskytnutá školiteľom na začiatok práce
- kompetentné T7express NEB bunky *E.coli*

### 4.2 Použité chemikálie

- (2S,3S) -1,4-bis(sulfanyl)butan-2,3-diol (Sigma-Aldrich, USA)
- AccuPrime Pfx SuperMix (Invitrogen, USA)
- adenzín (Sigma-Aldrich, USA)
- agaróza (Sigma-Aldrich, USA)
- akrylamid (Bio-Rad, USA)
- cytidín (Sigma-Aldrich, USA)
- dihydrogénfosforečnan draselný (Merck, Nemecko)

- DNAza (TopBio, ČR)
- dodecylsírán sodný (Bio-Rad, USA)
- ethanol (Lach-Ner, ČR)
- etidiumbromid (TopBio, ČR)
- farbiaci roztok Coomassie blue (Bio-Rad, USA)
- gama-globulín (Bio-Rad, USA)
- glukóza (Chemapol, ČR)
- glycerol (Lach-Ner, ČR)
- guanidín-HCl (AppliChem, SRN)
- guanozín (Sigma-Aldrich, USA)
- hydroxid sodný (Lach-Ner, ČR)
- chlorid draselný (Sigma-Aldrich, USA)
- chlorid horečnatý (AppliChem, SRN)
- chlorid sodný (Lach-Ner, ČR)
- chromatografický sorbent Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Biosciences, Švédsko)
- chromatografický sorbent: HIS-Select Cobalt (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- imidazol (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- inhibítor proteáz (Sigma, ČR)
- inozín (Sigma-Aldrich, USA)
- isopropyl- $\beta$ -D-tiogalaktopyranozid (Fermentas, Litva)
- kit Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, USA)
- kit Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA)
- kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, ČR)

- LB médium (Roth, SRN)
- ligafast pufer (Promega, USA)
- močovina (Sigma-Aldrich, USA)
- myoglobín (Bio-Rad, USA)
- *N,N,N,N*-tetramethylethylendiamín (Bio-Rad, USA)
- *N,N*-metylén-bisakrylamid (Bio-Rad, USA)
- *N*<sup>6</sup>-(2-izopenteny)adenozín (Olchemim, ČR)
- *n*-butanol (Lach-Ner, ČR)
- nikotínamidadenindinukleotid (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- OrangeLoading Dye (Thermo Scientific, USA)
- ovalbumín (Bio-Rad, USA)
- persíran amónny (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- Protein Ladder (10-250 kDa) (BioLabs, USA)
- restrikčné enzýmy: DpnI, Sac, XhoI
- RNAza (TopBio, ČR)
- SOC (Super Optimal broth with Catabolite) médium
- streptomycín (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- T4 DNA ligáza (Promega, USA)
- TAE (Tris-acetát-EDTA) pufer
- thyroglobulín (Bio-Rad, USA)
- *trans*-zeatínribozid (Olchemim, ČR)
- tris(hydroxymetyl)aminometán, t.j. Tris (MP Biomedicals, USA)
- Tris-HCl pufer, pH 6,8
- Tris-HCl pufer, pH 7,5

- Tris-HCl pufer, pH 8,8
- uridín (Sigma-Aldrich, USA)
- vitamín B12 (Bio-Rad, USA)
- xantozín (Sigma-Aldrich, USA)

### **4.3 Prístrojové vybavenie**

- analytické váhy (Sartorius, SRN)
- CD spektrofotometer Jasco-J815 (Jasco, Japonsko)
- centrifúga 5430 (Eppendorf, SRN)
- centrifúga 5430R (Eppendorf, SRN)
- centrifúga Benchtop 4-16 K (Sigma, SRN)
- digitálny pH meter (Multical WTW, SRN)
- elektroforetická komôrka (Bio-Rad, USA)
- elektromagnetická miešačka (IKA, SRN)
- kvapalinový chromatograf pre strednotlakovú chromatografiu BioLogic Duo Flow (Bio-Rad, USA)
- laminárny box (Schoeller, ČR)
- magnetická miešačka (IKA, SRN)
- minicentrifúga BLUE (Labnet, SRN)
- PCR termocykler (Eppendorf, SRN)
- rotátor (Biosan, USA)
- spektrofotometer LightWave II UV-Vis II diode array UV/Visible (Biochrom Ltd, UK)
- spektrofotometer UV-VIS s (Agilent, SRN)
- termostat (Labnet, USA)
- trepačka RCT basic (IKA, SRN)



- UV transluminátor (East Port, Francúzsko)
- vortex (Stuart, UK)

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

## 4.4 Metódy

### 4.4.1 Klonovanie

#### 4.4.1.1 PCR amplifikácia

Do mikroskúmaviek bolo napipetované 0,5 µl cDNA dodanej školiteľom, po 1 µl forwardového a reverzného primeru (tabuľka 3) a 22,5 µl AccuPrime Pfx SuperMix. Mikroskúmavky boli scentrifugované a vložené do cycleru. Všetky mutantné formy boli naklonované pomocou fosforylovaných primerov s mutáciou na 5'-konci jedného z nich. PCR reakcia bola prevedená v 35 cykloch PCR produkty mutantných variant boli ošetrené pomocou enzýmu DpnI, vypurifikované z gélu a ligované pomocou T4 DNA ligázy (viď nižšie).

**Tabuľka 3. Páry primerov použité pri klonovaní ZmNRH 2B.** FP- forwardový primer, RP- reverzný primer, T<sub>a</sub> - teplota pre dosadenie primerov.

Gén	Pár primerov	T <sub>a</sub> (°C)
<i>ZmNRH2B - WT</i>	FP: 5' - ATCGAGCTCGATGGGGCAGGACGGCCAGCAGAT - 3' RP: 5' - AGACTCGAGTCATGGTGCCATGAGCAGCTTC - 3'	65,0
<i>ZmNRH2B - H91A</i>	FP: 5' - GCTGGGTCAGATGGCATTGGGA - 3' RP: 5' - AACGAAATCAGCAACACGG - 3'	53,0
<i>ZmNRH2B - D241A</i>	FP: 5' - CTGGTTTTTCATGGAATTTTCCTT - 3' RP: 5' - CAGACTTGGCATGCCAATCTCTG - 3'	52,0
<i>ZmNRH2B - D241Y</i>	FP: 5' - TATGGTTTTTCATGGAATTTTCCT - 3' RP: 5' - AGACTTGGCATGCCAATCTC - 3'	50,5
<i>ZmNRH2B - H249A</i>	FP: 5' - GCTGATCCTGTGAGCTTCACTCG - 3' RP: 5' - AAGGAAAATTCATGAAAACCA - 3'	52,0
<i>ZmNRH2B - K289A</i>	FP: 5' - GCAAAGTGGGAATTCAGAGAACCCAT - 3' RP: 5' - CAATCCCTGATCCATCAAAGTG - 3'	56,0

#### 4.4.1.2 Agarózová elektroforéza a purifikácia z gélu

Na agarózovú elektroforézu bol pripravený 1% agarózový gél (1 g agarózy v 100 ml 1x riedeného TAE pufru). Do komôrky pre elektroforézu napipetujeme 50 µl

0,07% etidiumbromidu, naň bola pridaná rozpustená agaróza a dobre premiešané hrebienkom. Nechalo sa tuhnúť minimálne 30 minút. Potom do jamiek boli napipetované PCR produkty zmiešané s farbičkou 6x OrangeLoading Dye. Celá aparatúra bola pripojená k zdroju napätia na 100 V a nechala sa migrovať. Po skončení elektroforézy bol gél prenesený na UV transluminátor a pomocou skalpelu vyrezaný amplifikovaný band zodpovedajúcej veľkosti. Následne bol band prenesený do ependorfky a zvážený. Na purifikáciu bol použitý kit Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification System. K vyrezanému bandu bol pridaný Membrane Binding Solution (10 µl na 10 mg agarózového bandu). Nechalo sa inkubovať pri 58 °C kým sa gél kompletne nerozpustil. Kolónka na purifikáciu bola umiestnená do zbernej tuby a na filter prenesený všetok rozpustený gél, centrifugovaný 1 minútu pri 16 000 x g. Kolónka bola premytá 700 µl Wash Solution a opäť sa centrifuguje 1 minútu pri 16 000 x g a znova premyje 500 µl Wash Solution. Centrifuguje sa 5 minút pri 16 000 x g. Filter bol prenesený do čistej ependorfky a elúciu bola prevedená 50 µl vody. K eluovanej DNA bol pridaný 1 µl restrikčného enzýmu Dpn1 a nechalo sa inkubovať cez noc na 37 °C. Na druhý deň bol pripravený 1% agarózový gél. Naštiepená DNA bola zmiešaná s farbičkou 6x OrangeLoading Dye, a takto pripravené vzorky napipetujeme do pripravených jamiek a necháme migrovať.

Plazmid bol vypurifikovaný rovnakým spôsobom ako predošlý deň a elúcia bola prevedená pomocou 25 µl vody. Vypurifikovaný fragment bol následne zaligovaný do vektoru pridaním pufru 2x ligafast a T4 DNA ligázy.

#### **4.4.1.3 Transformácia *E. coli***

Na transformáciu boli pripravené Petriho misky s LB agarom a antibiotikom streptomycín o koncentrácii 50 µg ml<sup>-1</sup>. Na transformáciu boli použité kompetentné T7express NEB bunky *E.coli*. K týmto bunkám bolo napipetovaných 5 µl vypurifikovaných plazmidov a celá zmes bola inkubovaná na ľade 20 minút. Samotná transformácia buniek bola prevedená teplotným šokom pri 42 °C vo vodnom kúpeli počas 30 sekúnd. Následne bolo pridané k bunkám 125 µl SOC média a suspenzia bola inkubovaná 30 minút pri 37 °C. Potom boli takto pripravené bunky napipetované na Petriho misky a agarom, rozotrené sklenenými guľčkami a inkubované cez noc pri 37 °C.

#### **4.4.2 Produkcia kukuričných rekombinantných proteínov v *E.coli***

Kultivácia bakteriálnej prekultúry prebehla v Erlenmayerových bankách, v ktorých bolo 20 ml Lauria- Bertani (LB) média, 1 ml 20% glukózy, 500 µl antibiotika streptomycín (výsledná koncentrácia 50 µg/ml) a 5 µl kultúry *E.coli* nesúcej gén pre

tvorbu rekombinantných proteínov. Takto pripravené prekultúry boli inkubované na trepačke za mierneho trepania pri 30 °C cez noc. Na druhý deň boli pripravené LB média so streptomycínom do 500 ml Erlenmayerových baniek. Prekultúry boli scentrifugované (5 min, 4000 x g, 20 °C) a pelety resuspendované v 10 ml pripraveného LB média so streptomycínom. Potom boli prenesené do zvyšného LB média a boli inkubované približne hodinu na trepačke pri 30 °C. Následne bola zmeraná optická denzita pri vlnovej dĺžke 600 nm, ktorej hodnota bola približne 0,6. Do kultúr bolo potom pridaných 200 µl 0,5 M IPTG a indukcia prebiehala pri 20 °C cez noc na trepačke.

#### **4.4.3 Extrakcia ZmNRH2b a jeho mutantných foriem**

Najprv bola lyzačná cela daná do mraziaceho boxu na - 80 °C na dobu 15 minút. Následne bol bakteriálny pelet po indukcii rozsuspendovaný v 6 ml 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 a v 50 µl inhibítora proteáz. Do prístroja cell lyzer bol napipetovaný rozsuspendovaný pelet, nasadená lyzačná cela a spustená lyzácia. Zlyzované bunky boli odpipetované do čistej falkony. Nakoniec bol celý lyzačný systém dvakrát prepláchnutý vodou a 20% etanolom. Potom bol k lyzátu pridaných 10 µl RNAsy a 10 µl DNAsy a inkubované 30 minút vo vodnom kúpeli pri 37 °C. Následné bolo pridaných 0,75 ml 1M chloridu sodného a 0,75 ml 50% glycerolu a zmes bola centrifugovaná 30 minút pri 4 °C a 12000 x g. Supernatant bol prenesený do novej falkony pre purifikáciu.

#### **4.4.4 Purifikácia ZmNRH2b a jeho mutantných foriem**

Supernatant, s obsahom požadovaného proteínu, bol purifikovaný afinitnou chromatografiou s imobilizovanými kobaltnými iontami (His-selected cobalt gel, Thermo). Proteín sa zachytil na kolóne histidínovou kotvou. Najprv boli kolónky niekoľkokrát premyté ekvilibračným pufrom (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM imidazol, 5% glycerol, 100 mM NaCl), na ne bol nanesený supernatant z extrakcie a boli inkubované 1 hodinu pri 4 °C na rotátore. Kolónky boli potom znova centrifugované (300 x g, 1 min) a opäť premyté ekvilibračným pufrom. Následne bol pridaný elučný pufer (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 250 mM imidazol, 5% glycerol, 100 mM NaCl) a kolónky boli znovu inkubované na rotátore po dobu 30 minút pri 4 °C. Proteín je pri použití vysokej koncentrácie imidazolu vytesnený z väzby a uvoľnený do elúátu, pretože imidazol má k iontom kovu vysokú afinitu. Pomocou centrifugácie bola elúcia prevedená v dvoch krokoch. Frakcie boli nakoniec spojené a zakoncentrované centrifugáciou na objem približne 1,5 ml pomocou filtrov Centricon Plus 10 kDa (Merck-Millipore, USA). Kolónky boli dvakrát premyté elučným pufrom, trikrát vodou a na elúciu

zostávajúcich nečistôt bol použitý 6 M guanidín-HCl. Nakoniec boli ešte prečistené vodou a uschované s 20% etanolom.

#### **4.4.5 Gélová permeačná chromatografia**

Na stanovenie molekulovej hmotnosti enzýmu v natívnom stave bola využitá gélová permeačná chromatografia. Analýza prebiehala na kvapalinovom chromatografe pre strednetlakovú chromatografiu BioLogic DuoFlow (Bio-Rad). Pre meranie bola použitá kolóna Superdex 200 HR10/30 (Amersham Biosciences, Švédsko), tvorená zosieťovanou agarózou pripojenou k dextranu. Mobilnou fázou bol 50 mM K-fosfátový pufer, pH 7, s obsahom 150 mM NaCl. Prietoková rýchlosť bola 0,7 ml min<sup>-1</sup>. Ako proteínové štandardy boli použité vitamín B12 (1,35 kDa), konský myoglobín (17 kDa), kurací ovalbumín (44 kDa), hovädzí gama-globulín (158 kDa) a tyroglobulín (670 kDa)

#### **4.4.6 Kontrola úrovne expresie pomocou SDS-PAGE**

K screeningu expresie jednotlivých proteínov bola použitá elektroforéza na polyakrylamidovom géle s prídavkom dodecylsírany sodného (SDS), ktorý dáva bielkovinám uniformný záporný náboj a teda jednotne putujú k anóde a sú delené na základe rozdielnej veľkosti molekúl a odlišnej elektroforetickej pohyblivosti v elektrickom poli. Bola pripravená prekultúra pozostávajúca z glukózy, antibiotika streptomycin, LB média a z buniek mojich vzoriek. Cez noc som to bolo inkubované na trepačke pri 37 °C. Na druhý deň bola prekultúra centrifugovaná a pelet rozpustený v 1 ml LB média a prenesený do pripravenej kultúry pozostávajúcej z LB média a streptomycínu. Tá bola inkubovaná pri 30 °C asi 1 hodinu, a potom bolo zmerané OD<sub>600</sub>. Keď bola táto hodnota približne 0,6, tak bol odobratý 1 ml kultúry, scentrifugovaná a pelet rozpustený v 20 µl 8M močoviny. Do zvyšnej kultúry bolo pridané IPTG a nechalo sa inkubovať 2 hodiny pri 20 °C. Potom bola zmeraná hodnota OD<sub>600</sub>, vzorky boli nariadené na takú hodnotu, aká bola pred indukciou a takto nariadená vzorka bola centrifugovaná a pelet rozpustený v 20 µl 8M močoviny. Zvyšná kultúra bola inkubovaná cez noc pri 20 °C. Na druhý deň bola znovu upravená hodnota OD<sub>600</sub> na pôvodnú pred indukciou, centrifugovaná a pelet rozpustený v 20 µl 8M močoviny. Zvyšok kultúry bol taktiež scentrifugovaný a pelet rozsuspendovaný v zmesi Tris-HCl, pH 8, MgCl<sub>2</sub> a inhibítore proteáz. Pridaný bol B-PER, lyzozým, 1 µl RNAsy a DNAsy, NaCl a glycerol a celá táto zmes bola centrifugovaná. Supernatant bol prenesený do novej ependorfy, čo je rozpustná frakcia a pelet bol rozpustený v 1,5 ml 8M močoviny, čo bola nerozpustná frakcia.

Príprava vzoriek (pred indukciou, po indukcii po 2 hodinách, po indukcii cez noc, rozpustná a nerozpustná frakcia) pre elektroforézu prebiehala zmiešaním 20  $\mu$ l danej vzorky s farbou Loading Dye s merkptoetanolom. Vzorky boli zahriate na 100 °C na 5 minút a následne nanášané do jamiek. Zaostrovací a deliaci gél bol pripravený podľa tabuľky 4. Medzi dve sklá, upevnené v nalievacom stojane, bol nanesený deliaci gél, ktorý bol prevrstvený *n*-butanolom a nechal sa polymerizovať približne 30 minút pri laboratórnej teplote. Po jeho stuhnutí bol vyliaty *n*-butanol a povrch gélu bol premytý deionizovanou vodou. Potom bol na povrch naliaty zaostrovací gél a vsadený hrebienok na vytvorenie jamiek a gél sa opäť nechal stuhnúť. Po polymerácii boli sklá vložené do elektroforetickej komôrky a medzi ne bol naliaty elektródový pufer (0,025 M Tris, 0,192 M glycin, 0,1 % SDS, pH 8.3). Potom boli do jamiek napipetované vzorky a vhodný štandard a komôrka bola pripojená k zdroju napätia na 120 V. Asi po hodine bola elektroforéza ukončená, gél bol vybratý a opláchnutý deionizovanou vodou a cez noc farbený farbiacim roztokom Coomassie Brilliant Blue. Na druhý deň bol gél odfarbený odfarbovacím roztokom (35% metanol a 10% kyselina octová).

**Tabuľka 4. Zloženie zaostrovacieho a deliaceho gélu.**

	<b>Deliaci gél (12%)</b>	<b>Zaostrovací gél (4%)</b>
	<b>(ml)</b>	<b>(ml)</b>
Tris/HCl, 1.5 M, pH 8.8	2,5	-
Tris/HCl, 0.5 M, pH 6.8	-	1,25
AA/BIS	4	0,65
H <sub>2</sub> O	3.2	2.95
SDS (10 %)	0.1	0.1
APS (10 %)	0.05	0.06
TEMED	0.015	0.015

#### **4.4.7 Stanovenie koncentrácie proteínov**

Koncentrácia jednotlivých proteínov bola stanovená metódou Bradfordovej a spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 280 nm. Princípom Bradfordovej metódy je tvorba komplexu medzi triarylmetánovým farbivom Brilliant Blue G-250 v kyslom prostredí a proteínom. Zo zásobného roztoku BSA (2000  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) bola pripravená koncentračná rada 25 do 2000  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>. Na meranie absorbancie pri vlnovej dĺžke 595 nm sa použilo 50  $\mu$ l vzorku alebo štandardu a 1,5 ml Bradfordovej činidla. Zmes bola inkubovaná 10 minút pri laboratórnej teplote a následne bola premeraná absorbanca.

Koncentrácia proteínov po zahustení a eliminácii imidazolu bola stanovená aj spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 280 nm, voda bola použitá ako blank. Na výpočet koncentrácie bol použitý vzorec:

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

kde  $A_{ProtParam}$  odpovedá absorbcii daného proteínu pri koncentrácii 1 mg ml<sup>-1</sup>. Zo známej sekvencie aminokyselín proteínu (GenBank kód: JQ594984) bola určená absorbcia pomocou programu ProtParam na stránke ExPASy.org (<http://web.expasy.org/protparam/>). Tento program vyhodnotí molárne extinkčné koeficienty proteínov na základe Edelhochovej metódy (Edelhoch, 1967), ale extinkčné koeficienty pre tyrozín a tryptofán sú určené metódou podľa Pace et al. (Pace et al., 1995).

#### 4.4.8 Stanovenie teplotnej stability

Pre určenie teplotnej stability boli enzýmy inkubované 30 minút pri určitých teplotách v rozsahu 4 °C až 70 °C a potom bola určená ich zvyšková aktivita. Reakčnú zmes v 2 ml kyvete tvoril pufer 200 mM Tris -HCl, pH 7,5 s 1 mM DTT a 400 mM KCl, 200 μM substrát, v tomto prípade bol použitý xantozín, a jednotlivé enzýmy (wild type a mutantná forma K289A).

#### 4.4.9 Stanovenie nukleozidázovej aktivity

Aktivita enzýmu je definovaná ako rýchlosť katalyzovanej reakcie. Ako základná jednotka sa udáva 1 katal (kat), čo je taká aktivita enzýmu, čo premení 1 mol substrátu za 1 sekundu. Táto aktivita je vyjadrená vzťahom:

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

kde  $\Delta A$  je zmena absorbcie,  $\Delta t$  je čas reakcie v sekundách,  $\epsilon$  je molárny absorpčný koeficient udávaný v M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>,  $V$  je objem kyvety v litroch a  $l$  je šírka kyvety daná v centimetroch. Molárny absorpčný koeficient pre jednotlivé substráty je uvedený v tabuľke 5.

Enzýmová aktivita bola určená spektrofotometricky metódou podľa Parkina (Parkin, 1996). Vlnová dĺžka a molárny absorpčný koeficient bol zvolený v závislosti na použitom substráte (tabuľka 2). Konečný objem reakčnej zmesi v kyvete bol 2 ml. Túto zmes tvoril 200 mM Tris- HCl pufer (pH 7,5) s 1mM DTT, 400 mM KCl, daný substrát a vybraný enzým štartoval reakciu.

**Tabuľka 5. Spektroskopické vlastnosti substrátov.** Substráty použité pri meraní a ich molárne absorpčné koeficienty a vlnové dĺžky.

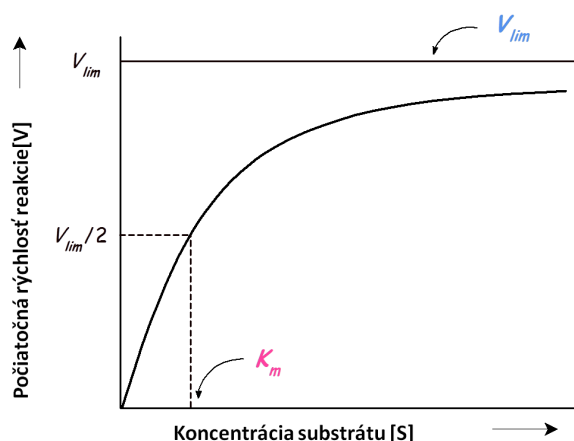
Substrát	Molárny absorpčný koeficient ( $M^{-1}cm^{-1}$ )	Vlnová dĺžka (nm)
Adenozín	-1400	276
Cytidín	-3420	280
Guanozín	-4100	253
Inozín	-920	280
Uridín	-1800	280
Xantozín	-3700	245
iPR	-1370	289
tZR	-1480	289

#### 4.4.10 Testovanie substrátovej špecificity, stanovenie $K_m$ a $V_{lim}$

Na stanovenie kinetických konštánt  $K_m$  a  $V_{lim}$  bol použitý program GrafPad Prism 5.0 za využitia nelineárnej regresie. Kinetika Michaelis-Mentenovej využíva základný vzorec:

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

kde  $V$  udáva počiatočnú reakčnú rýchlosť,  $V_{lim}$  je limitná rýchlosť reakcie,  $[S]$  je koncentrácia substrátu a  $K_m$  udáva Michaelisovu konštantu. Grafickým zobrazením rovnice je hyperbola (obrázok 11).



**Obrázok 11.** Závislosť rýchlosti katalyzovanej reakcie na koncentrácii substrátu.

#### 4.4.11 CD spektroskopia

Cirkulárny dichroizmus (CD) je jav, ktorý nastáva vtedy, keď absorpcia ľavotočivej a pravotočivej zložky je rôzna pri prechode prostredím. Grafickým

vyjadrením je krivka závislosti rozdielu molárných absorpčných koeficientov pre ľavotočivú a pravotočivú formu v závislosti na vlnovej dĺžke. Cirkulárny dichroizmus je vhodný na štúdium konformačných zmien makromolekúl, interakcie medzi proteínmi. Využíva sa pri porovnaní štruktúr proteínov získaných z rozdielnych zdrojov alebo rôznych mutantov toho istého proteínu.

Sekundárna štruktúra môže byť určená pomocou CD spektroskopie v ďalekej UV-oblasti. V týchto vlnových dĺžkach je chromofórom peptidová väzba.  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -skladaný list a náhodne skladaná štruktúra majú charakteristický tvar a veľkosť spektra.  $\alpha$ -helix má negatívny vrchol pri vlnovej dĺžke 208 nm a 222 nm, a pozitívny pri hodnote 190 nm.  $\beta$ -skladaný list má negatívny vrchol pri 218 nm a pozitívny pri 196 nm. Po zmeraní jednotlivých spektier musia byť hodnoty elipticity ( v jednotkách mdeg) prevedené na jednotky reziduálnej elipticity ( $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ ) pomocou rovnice:

$$[\theta] = \frac{100 (\text{signál})}{Cnl},$$

kde  $\theta$  je reziduálna elipticita, signál je výstup v jednotkách mdeg, C je proteínová koncentrácia v mM, n je počet aminokyselinových reziduí a l je dĺžka kvety v cm. Každé spektrum je priemerom troch skenov na dosiahnutie optimálneho signálu a odstránenie šumu. Jednotlivé enzýmy boli nariedené na koncentráciu približne 0,25 mg ml<sup>-1</sup> v 20 mM Tris- HCl pufri, pH 8,0. Meranie prebiehalo od 195 nm do 400 nm. Nakoniec bol pomocou programu K2D2 stanovený obsah  $\alpha$ -helixov a  $\beta$ -skladaných listov.



## 7 ZÁVER

- V teoretickej časti tejto diplomovej práce bola vypracovaná literárna rešerš zahŕňajúca poznatky o pyrimidínovom a purínovom metabolizme. Taktiež boli spomenuté nukleozid-*N*-ribohydrolázy, ich charakteristické znaky, kryštalická štruktúra, výskyt v protozoách či rastlinách a doposiaľ preštudované kinetické parametre NRH u niekoľkých organizmov.
- V experimentálnej časti bol popísaný postup klonovania, izolácie a purifikácie jednotlivých proteínov pomocou afinitnej chromatografie. Potom bola zistená úroveň expície a molekulové vlastnosti ZmNRH2b. Tiež bola zostavená krivka teplotnej stability vybraných enzýmov a graf substrátovej špecificity s určitými substrátmi. Nakoniec boli stanovené kinetické parametre  $K_m$  a  $V_{lim}$ . Z meraní vyplynulo, že najvhodnejším substrátom pre ZmNRH2b - WT bol pyrimidínový nukleozid uridín, ale pre mutantné formy to bola purínová báza xantozín.

## 8 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

Achar B.S., Vaidyanathan C.S. (1967) Purification and properties of uridine hydrolase from mung-bean (*Phaseolus radiatus*) seedlings. Arch Biochem Biophys 119: 356–362.

Ashihara H., Crozier A. (1999). Biosynthesis and metabolism of caffeine and related purine alkaloids in plants. *Adv. Bot. Res.* 30:118–205.

Ashihara, H., Stasolla, C., Loukanina, N., Thorpe, T.A. (2000) Purine and pyrimidine metabolism in cultured white spruce (*Picea glauca*) cells: Metabolic fate of C-14-labeled precursors and activity of key enzymes. *Physiol. Plant.* 108, 25-33.

Boldt R., Zrenner R. (2003) Purine and pyrimidine biosynthesis in higher plants. *Physiol. Plant.* 117:297–304.

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.

Campos A., Rijo-Johansen M.J., Carneiro M.F., Fevereiro P. (2005) Purification and characterisation of adenosine nucleosidase from *Coffea arabica* young leaves. *Phytochemistry* 66 (2): 147-151.

Doremus D. H. (1986) Organization of the pathway of de novo pyrimidine nucleotide biosynthesis in pea (*Pisum sativum* L. cv. Progress No. 9) leaves. Arch. Biochem. Biophys. 250:112–119.

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-glycosylase from *Crithidia fasciculata*. *J Biol Chem* 269: 23068–23073.

Giabbai B., Degano M. (2004) Crystal structure to 1.7 Å of the *Escherichia coli* pyrimidine nucleoside hydrolase YeiK, a novel candidate for cancer gene therapy. *Structure* 12: 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-aspartate 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.
- Iovane E., Giabbai B., Muzzolini L., Matafora V., Fornili A., Minici C., Giannese F., Degano M. (2008) Structural basis for substrate specificity in group I nucleoside hydrolases. *Biochemistry* 47: 4418–4426.
- 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.
- 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 Schwanzenberg 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.

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.

Moffatt B. A., Ashihara H. (2002) Purine and pyrimidine nucleotide synthesis and metabolism. In *The Arabidopsis Book*, ed. CR Somerville, EM Meyerowitz. Rockville, MD: Am. Soc. Plant Biol. doi/10.1199/tab.0018. <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>.

Mok D.W., Mok M.C. (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annual review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52, 89-118.

Muzzolini L., Versées W., 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 Magasanik, M Schaechter, HE Umbarger, pp. 445–473. Washington, DC: ASM Press.

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.
- 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.
- Senecoff J. F., McKinney E. C., Meagher R. B. (1996) De novo purine synthesis in *Arabidopsis thaliana*. II The PUR7 gene encoding 5'-phosphoribosyl-4-(*N*-succinocarboxamid)-5-aminoimidazole synthetase is expressed in rapidly dividing tissues. *Plant Physiol* 112: 905-917.
- Shi W., Schramm V.L., Almo S.C. (1999) Nucleoside hydrolase from *Leishmania major*: cloning, expression, catalytic properties, transition state inhibitors, and the 2.5-Å crystal structure. *J Biol Chem* 274: 21114–21120
- 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.
- Smith J. L. (1995) Enzymes of nucleotide synthesis. *Curr Opin Struct Biol* 5: 752-757.
- Smith P. M. C, Atkins C. A. (2002) Purine biosynthesis. Big in cell division, even bigger innitrogen assimilation. *Plant Physiol.* 128:793–802.
- 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.
- Wagner K.G., Backer A. I. (1992) Dynamics of nucleotides in plants studied on a cellular basis. *Int. Rev.Cytol.* 134:1–84.

Walther R., Wald K., Glund K., Tewes A. (1984) Evidence that a single polypeptide catalyses the two step conversion of orotate to UMP in cells from a tomato suspension culture. *J. Plant Physiol.* 116:301–11.

Zalkin H., Nygaard P. P. (1996) Biosynthesis of purine nucleotides. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, ed. FC Neidhardt, R Curtiss III, JL Ingraham, ECC Lin, KB Low, et al, pp. 561–579. Washington, DC: ASM Press  
Henderson J.F., Paterson A.R.P. (1973) *Nucleotide Metabolism - An Introduction*. Academic Press, New York.