

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Charakterizace nukleosid-*N*-ribohydrolasy 2b
z kukuřice seté (*Zea mays*)**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Lucie Kozielová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. David Kopečný, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	5. srpna 2013

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne 5. srpna 2013

Kozielová Lucie

Prostřednictvím této práce bych chtěla poděkovat především vedoucímu práce Mgr. Davidu Kopečnému, Ph.D. za jeho trpělivost, odborné a cenné rady při vedení bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Martině Kopečné, Ph.D. za její všestrannou pomoc s pomocí při experimentální části práce. V neposlední řadě děkuji svým rodičům a rodině za podporu jak psychickou tak i finanční.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Lucie Kozielová
Název práce	Charakterizace nukleosid- <i>N</i> -ribohydrolasy 2b z kukuřice seté (<i>Zea mays</i>)
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení biochemie proteinů a proteomiky, CRH, PŘF UP
Vedoucí práce	Mgr. David Kopečný, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2013
Abstrakt	<p>Tato práce se zabývá purifikací a charakterizací nukleosid-<i>N</i>-ribohydrolasy 2b (NRH2b) z kukuřice seté (<i>Zea mays</i>). V teoretické části této bakalářské práce bylo cílem vypracovat literární rešerši zahrnující metabolismus purinů a pyrimidinů v rostlinách. Dále jsou popsány jednotlivé metody, použité substráty a také popis rostliny <i>Zea mays</i>.</p> <p>Experimentální část se věnuje expresi genů <i>ZmNRH2a</i> a <i>ZmNRH2b</i> v buňkách <i>E. coli</i>. a následné purifikací rekombinantních proteinů metodou afinitní chromatografie. Analýza pomocí SDS-PAGE ukázala, že rekombinantní enzym <i>ZmNRH2b</i> je produkován v mnohonásobně vyšší míře než <i>ZmNRH2a</i>. Tento enzym se vyskytuje jako dimer s molekulovou hmotností 78 kDa. Dále byla studována teplotní stabilita, substrátová specificita enzymu a kinetické parametry K_m a V_{max} s použitím několika purinových a pyrimidinových ribozidů.</p>
Klíčová slova	Nukleozid- <i>N</i> -ribohydrolasa, metabolismus, pyrimidin, purin, nukleozid, ribozid, kukuřice setá
Počet stran	49
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Lucie Kozielová
Title	Characterization of nucleoside-N-ribohydrolase 2b from maize (<i>Zea mays</i>)
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Protein Biochemistry and Proteomics, CRH, Faculty of Science, UP
Supervisor	Mgr. David Kopečný, Ph.D.
The year of presentation	2013
Abstract	<p>This work deals with the purification and characterization of nucleoside-N-ribohydrolase 2b (NRH2b) from maize (<i>Zea mays</i>). The theoretical part of this thesis was aimed on a review of purine and pyrimidine metabolism in plants. Further on, description of the methods, substrates and a description of the maize plant is provided. The experimental part deals with the expression of genes <i>ZmNRH2a</i> and <i>ZmNRH2b</i> genes in <i>E. coli</i> cells and subsequent purification of recombinant proteins by affinity chromatography. Analysis by SDS-PAGE showed that the recombinant enzyme ZmNRH2b is produced in much higher yield than ZmNRH2a. The enzyme occurs as a dimer with a molecular weight of 78 kDa. Further on, the thermal stability, substrate specificity and kinetic parameters K_m and V_{max} were investigated using several purine and pyrimidine ribosides.</p>
Keywords	Nucleoside-N-ribohydrolase, metabolism pyrimidine, purine, nucleoside, riboside, <i>Zea mays</i>
Number of pages	49
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

OBSAH	- 6 -
1 CÍLE PRÁCE	- 7 -
2 ÚVOD	- 9 -
3 TEORETICKÁ ČÁST	- 10 -
3.1 Použitý organismus kukuřice setá (<i>Zea mays</i> L.)	- 10 -
3.2 Nukleozid- <i>N</i> -ribohydrolázy	- 12 -
3.3 Metabolismus purinů a pyrimidinů	- 16 -
3.4 Metabolismus purinů	- 18 -
□ De novo syntéza	- 18 -
□ Recyklace purinů	- 19 -
□ Katabolismus purinů	- 19 -
3.5 Metabolismus pyrimidinů	- 22 -
□ De novo syntéza	- 22 -
□ Recyklace pyrimidinů	- 23 -
□ Katabolismus pyrimidinů	- 24 -
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	- 26 -
4.1 Biologický materiál	- 27 -
4.2 Použité chemikálie	- 27 -
4.3 Přístrojové vybavení	- 29 -
4.4 Metody	- 30 -
5 Výsledky	- 35 -
5.1 Stanovení molekulové hmotnosti permeační chromatografií	- 36 -
5.2 Stanovení molekulové hmotnosti pomocí SDS-PAGE	- 36 -
5.3 Stanovení koncentrace proteinů	- 36 -
5.4 Stanovení teplotní stability ZmNRH2b	- 39 -
5.5 Stanovení substrátové specifity ZmNRH2b a ZmNRH2a	- 39 -
5.6 Stanovení kinetických parametrů pro ZmNRH2b	- 40 -

6 Diskuse.....	- 42 -
7 Závěr.....	- 45 -
8 Použitá literatura	- 46 -

1 CÍLE PRÁCE

- **Teoretická část:**

Vypracování přehledné rešerše k tématu práce, která bude obsahovat:

- Metabolismus purinů a pyrimidinů
- Bakteriální a rostlinné nukleosid-*N*-ribohydrolasy, výskyt, substrátová specifita
- Reakční mechanismus nukleosid-*N*-ribohydrolas

- **Experimentální část**

- Exprese genu v *E. coli*, extrakce a purifikace rekombinantního proteinu
- Stanovení teplotní stability enzymů
- Zjištění molekulové hmotnosti – oligomerizačního statusu
- Analýza substrátové specifity a porovnání jednotlivých substrátů

2 ÚVOD

Metabolismus purinů a pyrimidinů je základním a klíčovým metabolismem ve vývoji rostliny, poněvadž přítomné nukleotidy jsou základními stavebními látkami nukleových kyselin a tvoří součásti dalších významných látek. Mohou být prekurzory alkaloidů a cytokininů, významnými nosiči energie jako je ATP nebo intermediáty koenzymů NAD a FAD.

Metabolismus nukleotidů lze rozdělit do 3 základních kroků, tj. *de novo* syntéza, recyklace (interkonverze) a katabolismus. Enzymy, tzv. Nukleosid-*N*-ribohydrolasy (NRH, nukleosidasy), katalyzují hydrolytické štěpení nukleosidů na příslušnou bázi a cukr ribózu. NRH jsou vysoce specifické vůči ribóze a jsou lokalizovány v cytosolu. V aktivním místě těchto enzymů se nachází vápenatý ion a tímto lze tyto enzymy zařadit do skupiny metaloproteinů. Kukuřice obsahuje 5 genů, a to *NRH1a*, *NRH1b*, *NRH2a*, *NRH2b* a *NRH3*

Cílem této práce je charakterizace kukuřičné NRH, konkrétně NRH2a a NRH2b a stanovení substrátové specificity s vybranými purinovými a pyrimidinovými ribozidy jako potenciálními substráty.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Modelový organismus kukuřice (*Zea mays L.*)

V této práci jsou studovány enzymy z rostlinného modelového organismu kukuřice seté. Je to jednoletá jednoděložná rostlina, která se řadí do čeledi lipnicovitých (*Poaceae*). Celkem je uznáno 5 druhů, ovšem nejvíce využívaná je kukuřice setá pravá. Další jednoleté divoké rostliny jsou označovány jako teosint. Jejím hlavním centrem výskytu a vývoje je oblast Střední Ameriky tj. Mexico (Hraška a kol., 1989).

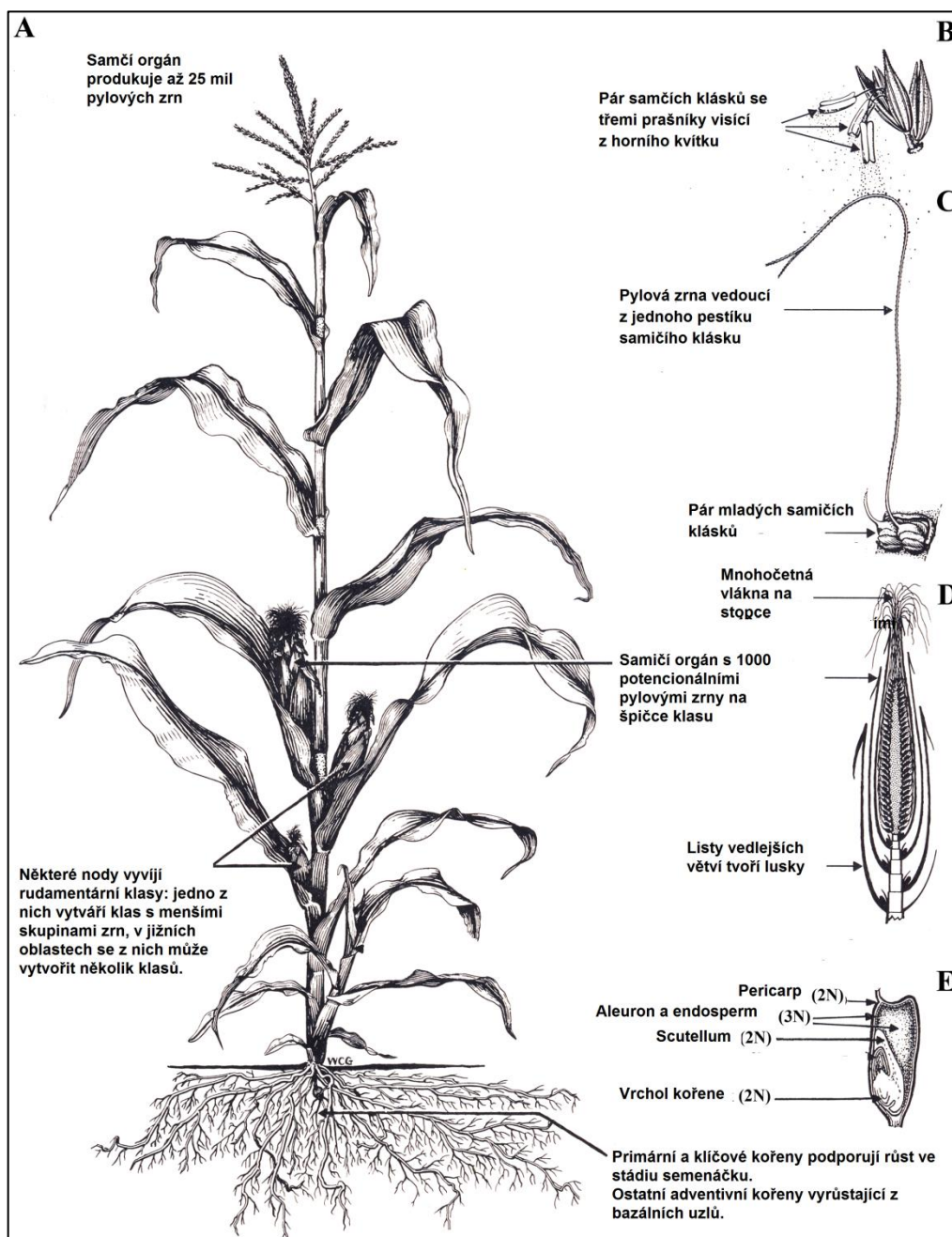
Kukuřice je termofilní rostlina, tudíž je třeba zajistit její odolnost vůči chladu v našich podmínkách. Právě tímto problémem se zabývalo mnoho zemědělců a také vědců. Velmi výrazné úspěchy v úrodnosti byly dosaženy pomocí šlechtění, kdy vyšlechtěné osivo zvýšilo úrodnost o třetinu (Rod a kol., 1982).

Genom kukuřice je středně velký (2,5 Gbp) ve srovnání s mnoha podobnými nebo příbuznými druhy trav jako je rýže (0,4 Gbp), čirok (0,75 Gbp), ječmen (6 Gbp) a pšenice (17 Gbp). Kukuřice setá se řadí k mnoha nejvýznamnějším světovým plodinám. Kromě jejího agronomického významu, je také nepostradatelným modelovým organismem pro základní výzkum téměř sto let. Ve výzkumu je předmětem pro dlouhodobé biologicko-botanické studie jakou je například domestikace rostlin, evoluce genomu, vývojová fyziologie, epigenetika, ochrana proti škůdcům, kvantitativní dědictví a srovnávací genomika (Strable *et al*, 2009).

Kukuřice se skládá z kořenového systému, stébla, listu, liguly (bezchlorofylová membrána), laty, květu a palice. Kořeny mohou být primární, boční klíční kořeny, sekundární kořeny podzemní i nadzemní (vzdušné). Stéblo je kolmé, vysoké, silnější děleno články, které obsahují dřev. Listy jsou vstřícné a žilnatina paralelní. Lata je samčí květenství, palice samičí. Květ je obalen pluchou a pluškou, vždy je jeden z nich fertilní (Špaldon a kol., 1986) (obrázek 1).

Tato rostlina je opylována větrem. Samčí a samičí květy se nacházejí na samostatných stopkách, což zabezpečuje cizosprašnost. Samčí orgány se nachází v horní části hlavního stonku a samičí ve středu hlavního stonku (Strable *et al*, 2009).

Kukuřičné zrno je složeno převážně ze škrobu, tuku, bílkovin a minerálních látek. Zastoupení kyselin linolové, olejové, palmitové a stearové zde není zanedbatelné. Celkový obsah esenciálních AMK je poměrně nepříznivý, poněvadž kukuřičný zein neobsahuje tryptofan, lysin, cystin a metionin. Pomocí šlechtění se tyto důležité složky zvyšují, a tudíž se rostlina stává více výnosnější a energeticky potřebnou pro lidstvo (Špaldon a kol., 1968b).



Obr. 1 Dospělá rostlina kukuřice seté. A) Rostlina se skládá v dospělosti z nadzemní a podzemní části. Internodia rozčleňují rostlinu, v jednotlivých poté rostou klasy. **B)** Samčí květenství představuje lata klásků (střapec) a 3 tyčinky. Samčí klásky jsou v párech, jeden přisedlý a druhý stopkatý. Každý klásek má dva květy. **C)** Samičí orgány vyrůstají z úžlabního listu. Pouze jeden kvítek na klásku se vyvíjí až do dospělosti. Při opylení pyl putuje z rostoucí pylové láčky na vajíčko. Po fertilizaci se vaječník zvětší a produkuje jádro. **D)** Kukuřičný klas, lusk neboli palice přilehá k internodiám. Velký počet listenů. **E)** Zralé jádro obsahující zárodek je uzavřeno do oplodí, průhledná vrstva tkáně je mateřského původu. V dospělosti skrývá embryo pět nebo šest lístečků primordií a primární kořen. Endosperm hromadí rezervy škrobu, které jsou mobilizovány při klíčení a předávány přes scutellum rostoucím sazenicím. (Obrázek převzat a upraven podle Strable *et al.*, 2013)

3.2 Nukleosid-*N*-ribohydrolasy (nukleosidasy)

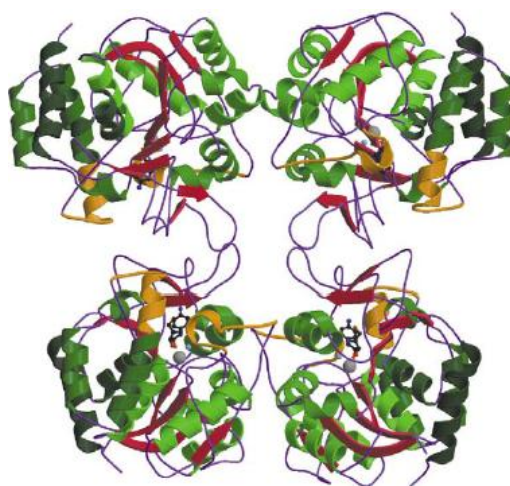
Nukleosid-*N*-ribohydrolasy (nukleosidasy) byly objeveny a popsány v bakteriích, kvasinkách a prvocích. Tyto enzymy katalyzují hydrolytické štěpení ribozidu na příslušnou bázi a ribózu (obrázek 6) (Verseés a Steyaert, 2003). Nukleosid-*N*-ribohydrolasy mají ve svém aktivním místě navázaný Ca^{2+} iont, tudíž je můžeme zařadit do skupiny metaloproteinů. Aktivní místo je specifické pro ribózu, kdy substrát se na něj váže přes ribozylový zbytek (Verseés *et al.*, 2001).

Metabolismus nukleotidů je možno rozdělit zhruba do tří částí, a to: *de novo* syntéza, recyklace a katabolismus. Rostliny mají schopnost degradovat i recyklovat zároveň. Klíčovým enzymem, který kontroluje, zda jsou tyto dvě fáze v rovnováze, je nukleosidasa. Tento enzym je dobře popsán u prvoků a kvasinek (Magni *et al.*, 1975, Gopaul *et al.*, 1996, Shi *et al.*, 1999, Mitterbauer *et al.*, 2002) a nedávno i pak ve vyšších rostlinách (Jung *et al.*, 2009). U savců je aktivním místem nukleosidfosforylasa (Parkin *et al.*, 1991). Ve studii, uskutečněné na *Arabidopsis thaliana* jako modelové rostlině, byla popsána uridinová specificita pro AtNRH1 (AtURH1). Tento enzym byl objeven jako cytoplazmatický a kódující gen byl exprimován kořenovém meristému, ochranných buňkách a zralých pylových zrnech. Rostliny se sníženou nebo naopak zvýšenou nukleosidasovou aktivitou vykazovaly zpožděnou germinaci (Jung *et al.*, 2011b). Později bylo prokázáno, že AtNRH1 je schopna hydrolyzovat také xantosin. Knockout mutant, vykazoval příznaky předčasného stárnutí, doprovázeného výraznou akumulací uridinu a xantosinu v podmínkách dlouhodobé tmy. U nejbližšího a dosud nedostatečně charakterizovaného homologu AtNRH1, AtNRH2, bylo zjištěno, že působí v pozdní fázi stárnutí a může hydrolyzovat inosin. AtNRH3, jakožto další izoforma, překvapivě funguje jako extracelulární, purin-specifická hydrolasa, která se podílí na degradaci extracelulárních nukleotidů a může se také podílet na patogenní reakci (Jung *et al.*, 2011).

Zatímco nukleotidy jsou důležitými meziprodukty v syntéze nukleových kyselin, nukleotidové cukry jsou důležité pro výstavbu komponentů, jako je např. celulóza. Kromě toho purinové nukleotidy jsou zapojeny do přenosu signálu a jsou součástí kofaktorů účastnících se na enzymatických reakcích (Riegler *et al.*, 2011). Purinové nukleotidy jsou odvozené od IMP (inosin-monofosfátu) (van Graaff *et al.*, 2004) a pyrimidinové od UMP (uridin-monofosfátu) (Giermann *et al.*, 2002, Schroder *et al.*, 2005). Velké množství nukleotidů je tvořeno transaminací, deaminací a oxidací heterocyklických systémů (Riegler *et al.*, 2011)

Nukleové báze a nukleozidy jsou recyklací převedeny na nukleozid monofosfát působením fosforibosyltransferasy-pyrofosfatasy a nukleosidkinasy. nukleosidkinasy. Oba tyto enzymy byly identifikovány v rostlinách na biochemické i molekulární úrovni (Moffatt et al, 2002;. Zrenner et al, 2006;. Islam et al., 2007). Největším přínosem recyklace jsou nižší požadavky na energii ve srovnání s *de novo* syntézou. Například *de novo* syntéza purinů vyžaduje pět molekul ATP, zatímco při recyklaci je třeba pouze jedna molekula. Dalším velkým rozdílem je vysoký stupeň kontroly *de novo* syntézy v porovnání s recyklací. *De novo* syntéza je velmi podobná jak v prokaryotických, tak i v eukaryotických organismech (Katahira & Ashihara, 2002,. Kafer et al, 2004).

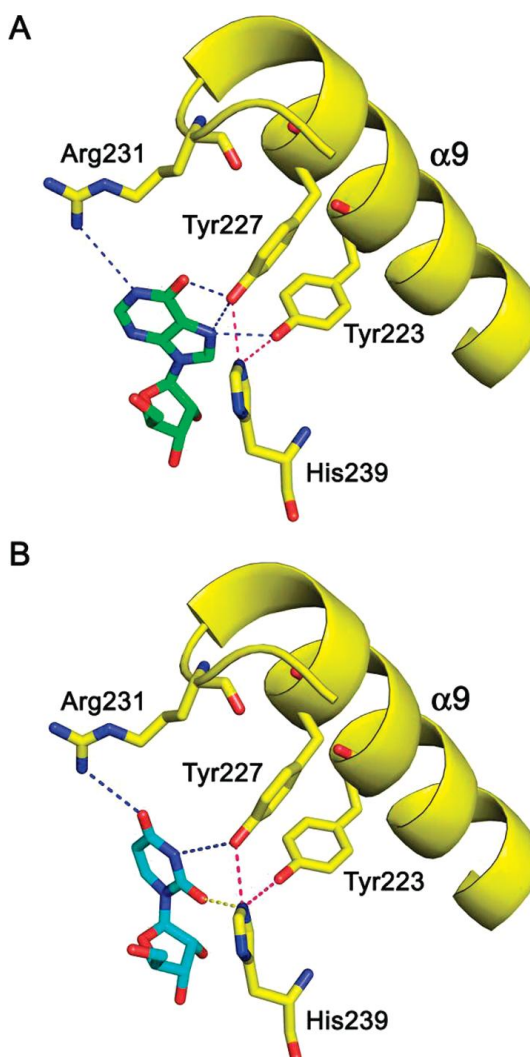
U některých organismů jako je *Trypanosoma vivax*, *Leishmania major* nebo *Crithidia fasciculata* je známá krystalická struktura NRH. *T. vivax* má dimerní strukturu, dvě aktivní místa v podobě Ca^{2+} iontu, které nejsou závislé (obrázek 3). *L. major* a *C. fasciculata* mají strukturu kvartérní, taktéž obsahující aktivní místa v podobě Ca^{2+} iontů (obrázek 2).



Obr. 2 Kvartérní struktura *Crithidia fasciculata* IU-NH. Červeně znázorněny beta listy, zeleně šroubovice. Pořadí šroubovic je indikováno od N-konce k C-konci. (Obrázek převzat od Verseés *et al.*, 2003).



Obr. 3 Dimerní struktura *Trypanosoma vivax* IAG-NH. Obě aktivní místa nezávislá na sobě znázorněna dvěma Ca^{2+} ionty v podobě dvou modrých kuliček. (Obrázek převzat od Verseés et al., 2001).



Obr. 4 Srovnání vazeb substrátů IU-NH z *C. fasciculata*. Znázornění dvou modelů IU-NH vazby aktivního místa na (A) inosin (B) uridin. Model na obrázku (A) byl získán superpozicí vazbou na inosin uzavřením struktury IU-NH přechodem substrátu v inhibitor. Model na obrázku

(B) byl získán na základě konformace inhibitoru v IU-NH komplex. Přerušované modré vazby znázorňují možné vodíkové vazby mezi enzymem a bází. Přerušované růžové čáry znázorňují interakci mezi dvěma rezidui Tyr-Tyr-His triádou. Tyr 227 je správně orientován pro vytvoření vodíkové vazby na atomu N7 hypoxantinu. His239 je vzdálený, ale jeho pozice je mírně pod optimální polohou s ohledem na akceptorový atom. Aktivní místo doplňuje hypoxantin a neumožňuje alternativní konformace jako *syn* nebo *anti* (Obrázek převzat z Iovane *et al.*, 2008)

NRH jsou klasifikovány do čtyř skupin na základě substrátové specifity na substrátově nespecifické z *Leishmania major* (Shi *et al.*, 1999), preferující inosin a uridin (IU-NRH) (Parkin *et al.*, 1991) a inosin a uridin (IU-NRH) (Estupiñán a Schramm, 1994) z *Crithidia fasciculata* a poslední NRH preferující inosin, adenosin a guanosin (IAG-NRH) vykazující substrátovou specifitu k purinovým nukleozidům z *Trypanosoma brucei* (Parkin, 1996).

Kinetické vlastnosti nukleosid-*N*-ribohydrolas nejsou doposud zcela charakterizovány a v literatuře popsány. Tato studie je aplikovaná pouze na úzkém výběru organismů. Např. *Trypanosoma brucei* jako zástupce protozomálních organismů u níž byly kinetické vlastnosti stanoveny, preferuje jako substráty adenosin, guanosin a inosin. Nese označení IAG nukleosidhydrolasa. Tento enzym má dimerní strukturu. Tato studie prokázala, že nejlepším substrátem je inosin, který má K_m 18 μM a V_{lim} 0,8 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Hodnoty K_m jsou v podstatě srovnatelné u purinů i u pyrimidinů. Hodnota K_{cat}/K_m pro inosin, adenosin a guanosin je $1,9 \times 10^6$, $1,2 \times 10^6$ a $0,83 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Rychlost hydrolýzy purinového substrátu cytidinu je V_{lim} je 0,07 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$ a rychlost hydrolýzy pyrimidinového substrátu uridinu je V_{lim} je 0,00032 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Z tohoto vyplývá, že pyrimidinové nukleozidy jsou horšími substráty než purinové. (Parkin *et al.*, 1996).

Jako další organismus, u kterého byly popsány kinetické vlastnosti, je možno uvést bakterii s názvem *Escherichia coli*. Zde byly prokázány a charakterizovány dva proteiny. Protein YeiK (Giabbai & Degano, 2004) a protein YbeK (Muzzolini *et al.*, 2006). Oba tyto proteiny jsou v literatuře popsány jako pyrimidin specifické NRH. Bylo zjištěno, že katalytická účinnost YeiK vůči substrátu inosinu, adenosinu a guanosinu byla víc jak tisíckrát nižší než vůči uridinu, z čehož vyplývá, že předchozí si tři substráty jsou brány za neaktivní (Estupinan & Schramm, 1994; Parkin *et al.*, 1991; Pelle *et al.*, 1998). YbeK hydrolyzuje přirozeně se vyskytující pyrimidinové nukleozidy 100-10000 krát účinněji. Z pyrimidinových derivátů je hydrolyzován uridin nejefektivněji s cca s 10krát vyšší hodnotou k_{cat}/K_m než cytidin, a to zejména z důvodu nižší hodnoty K_m . *Crithidia fasciculata* účinně hydrolyzuje purinové nukleozidy. Studium kinetiky u *C. fasciculata* prokázaly, že katalýza inosinu probíhá v důsledku narušení substrátu

k oxoniovým kationtům až k jeho destabilizaci. Parciální záporný náboj je vyvíjen na dusíkaté báze a protoanion se podílí na odstupu skupiny, což je nutné pro efektivní katalýzu. Dosud není známo, zda se stejná strategie používá pro stabilizaci negativního náboje u hydrolýzy jako purinových tak pyrimidinových nukleozidů. Dosud jsou technicky specifické dvě aktivní místa, která vyvolávají až padesátinásobně větší katalytickou účinnost enzymu vůči inosinu, z čehož vyplývá, že IU-NH se vyznačují katalytickou triádou složenou z histidinu a dvou zbytků tyrosinu. Ten umožňuje efektivní protonaci purinové báze (Iovane *et al.*, 2008).

3.3 Metabolismus purinů a pyrimidinů

Purinové a pyrimidinové nukleotidy hrají zásadní roli v ukládání informací jako stavební kameny DNA v jádře nebo DNA-syntetizující organely a jako komponenty transkriptů (Senecoff *et al.*, 1993). Ribozomální a transferová RNA je také základní součástí pro syntézu bílkovin. Nukleotidy také slouží jako prekurzory pro přímé syntézy vitamínů skupiny B např. kyselina listová, riboflavin, thiamin a foláty (Crozier *et al.*, 2000, Hanson & Gregory, 2002, Herz *et al.*, 2000).

Purinové a pyrimidinové nukleotidy jsou prekurzory esenciálních kofaktorů např. NAD[±], FAD a acetyl CoA. Dále jsou esenciálními články pro syntézu cytokininů, což jsou rostlinné hormony kontrolující růst a vývoj rostlin (D'Agostino & Kieber, 1999). Mezi purinové báze řadíme adenin, guanin, xantin a hypoxantin. Naopak mezi pyrimidinové zástupce patří cytosin, uracil a thymin (obrázek 5a, b).

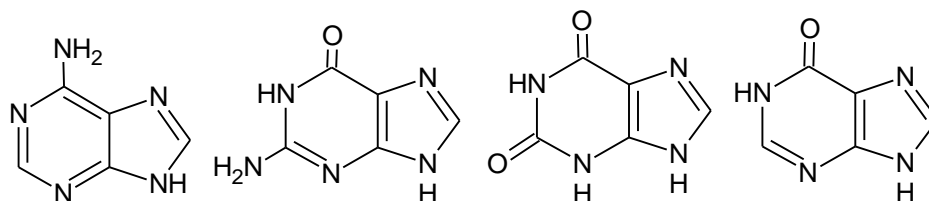
Během základních energetických procesů fotosyntézy a respirace, jsou purinové nukleotidy ATP vyráběny z ADP a fosfátu, který je důležitý obecné zachování chemické energie. ATP je největším energetickým zdrojem ve většině metabolických reakcí a také slouží k tvorbě důležitých makromolekul jako je např. AMP, který aktivuje aminokyseliny pro syntézu bílkovin a ADP, který je potřebný pro syntézu celulózy nebo škrobu. V rostlinách mají pyrimidinové nukleotidy důležité funkce při vytváření substrátů. Pyrimidinové deriváty UTP a UDP se přímo podílejí jako substráty na syntéze a degradaci sacharózy a energetický sacharidový nukleotid UDP je prekurzorem pro syntézu celulózy a dalších polysacharidů, glykoproteinů, a fosfolipidů. UDP působí také jako glukosylový donor sekundárních metabolitů a hormonů v mnoha reakcích katalyzovaných glykosyltransferasou (Lim & Bowles, 2004).

Existují dva hlavní způsoby syntézy nukleotidů, a to: *de novo* syntéza a recyklace. *De novo* syntéza purinových a pyrimidinových nukleotidů začíná tzv. od nuly za pomoci 5 -fosforibosyltransferasy-1-pyrofosfátu slučováním jednoduchých molekul, jako jsou oxid uhličitý, aminokyseliny a tetrahydrofolát. Tato dráha k vytvoření

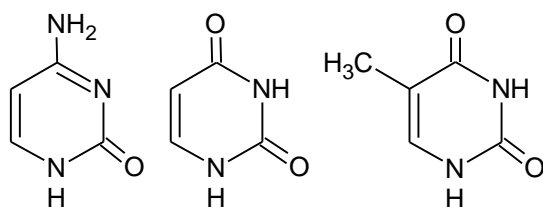
nukleotidů je vysoce energeticky náročná v porovnání s recyklací. Biosyntetické enzymy obou těchto drah jsou klasifikovány jako základní a buněčně aktivní, tudíž se předpokládá, že jsou přítomny ve všech buňkách (Moffatt & Ashihara, 2002).

Metabolismus purinů a pyrimidinů zahrnuje *de novo* syntézu, recyklaci a degradaci. Při degradaci na příslušnou bázi je uvolněno velké množství energie a takto vzniklé základních stavebních složky lze použít pro syntézu dalších molekul a sloučenin. Základní a důležitá reakce, která charakterizuje nukleosid-*N*-ribohydrolasy je vyobrazena níže (obrázek 6).

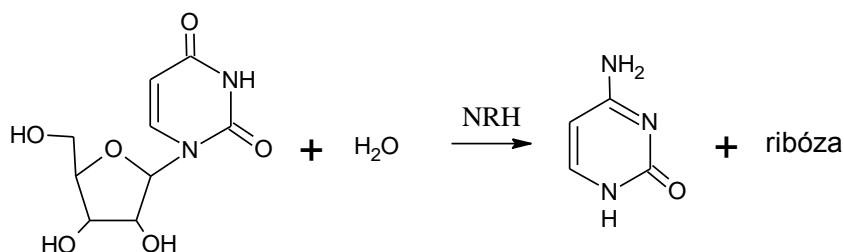
A)



B)



Obr. 5 Strukturní vzorce purinových a pyrimidinových bází. **A) Purinové** – zprava: adenin, guanin, xantin, hypoxantin **B) Pyrimidinové** – zprava: cytidin, uracil, tymin



Obr. 6 Reakční mechanismus nukleosid-*N*-ribohydrolas. Odbourání ribozidu tj. uracilu na příslušnou bázi uridin a pentózu tj. ribóza.

3.4 Metabolismus purinů

- **De novo syntéza**

De novo syntéza, vedoucí k tvorbě AMP (adenosinmonofosfát) a GMP (guanosinmonofosfát) začíná převodem aminoskupiny z glutaminu na PRPP (fosforibosylpyrofosfát). Vzhledem k tomu, že PRPP je využíván jak pro *de novo* syntézu, tak při recyklaci purinových i pyrimidinových nukleotidů, je také potřebný pro syntézu NAD, histidinu a tryptofanu. Purinové a pyrimidinové syntézy nukleotidů a metabolismus ovlivňují různé metabolické dráhy (Krath & Hove-Jensen, 1999). Purinové nukleotidy jsou vytvářeny *de novo* syntézou z malých molekul, jako jsou aminokyseliny glycin, glutamin, a aspartát, aktivovaná ribóza jako předchůdce PRPP, 10-formyltetrahydrofolát, a oxid uhličitý. Základní biochemická a molekulární analýza purinové biosyntézy byla provedena na mikroorganismech (Rebora *et al.*, 2001, Zalkin & Dixon, 1992, Zalkin & Nygaard, 1996) a na zvířatech (Buchanan & Hartmann, 1959). Dřívější biochemické a molekulární studie ukázaly, že rostliny využívají téměř stejné reakce syntetizující AMP, GMP a IMP jak bylo prokázáno u mikroorganismů nebo u zvířat.

Biosyntéza purinů začíná tvorbou PRA (fosforibosylaminu) z PRPP a glutaminu, kdy za pomoci enzymu fosforibosylpyrofosfátamidotransferasy je aminoskupina přenesena. GAR (glycinaminoribonukleotid) tvořený GAR-syntasou, katalyzuje tvorbu ribonukleotidu tím, že připojí glycin prostřednictvím amidové vazby z PRA. K tomu je potřeba 1 ATP molekula. GAR je následně transformován enzymem GART (transformylasou) s použitím 10-formyltetrahydrofolátu za vzniku FGAR (formylglycinamidribonukleotidu). Následně FGAR-reduktasa-syntetasa katalyzuje reakci, kdy dochází ke spotřebě ATP, glutaminu a následně k tvorbě FGAM (formylglycinamidinribonukleotid). FGAM pak prochází krokem, kdy AIR – syntetasa uzavírá kruh na AIR (5-aminoimidazolribonukleotid) a je upotřebena další molekula ATP. Vložení CO_2 , aspartátu a druhé molekuly 10F-THF je tímto sestaven druhý kruh purinové dráhy a spotřebuje se další ATP. Vše probíhá za katalýzy AIR-karboxylasy a vzniká CAIR (4-karboxyaminoimidazolribonukleotid). Kruh je dotvořen přidáním aspartátu, další molekuly ATP, SAICAR (N-sukcinyl-5-aminoimidazol-4-karboxamidribonukleotidu) za pomoci SAICAR-syntetasy. Fumarát vystupuje ven z kruhu pro výstavbu AICAR (5-aminoimidazol-4-karboxamidribonukleotidu).

Posledními dvěma kroky k dotvoření kompletní purinové molekuly je zapotřebí enzym ATIC (5-aminoimidazol-4-karboxamidribonukleotidformyltransferasa / inosinmonofosfátcyklohydrolasa), kdy je poslední uhlík přenesen z 10F-THF. FAICAR (5-formaminoimidazol-4-karboxamidribonukleotid) je dehydratován, tím se uzavře kruh

a vytvoří se IMP (inosinmonofosfát). Po vzniku IMP se syntéza dělí na 2 části. Z jedné části vzniká AMP a z druhé vzniká přes XMP (xantosinmonofosfát) GMP (guanosinmonofosfát). Schéma znázorňuje obrázek 7 (Zrenner *et al.*, 2006).

- **Recyklace purinů**

Recyklace purinových nukleozidů a nukleotidů probíhá jejich vyloučením jako vedlejších produktů buněčného metabolismu nebo z katabolismu nukleových kyselin. Tato strategická dráha pro syntézu purinových nukleotidů je energeticky velmi výhodná pro buňku, protože vyžaduje pouze jednu molekulu ATP (fosforylace nukleozidů na nukleotidy) a ne pět pro tvorbu AMP a sedm pro tvorbu GMP. Jako příklad slouží období germinace rostliny. Báze a nukleozidy uvolněné ze zásobních orgánů rostlin recyklují touto cestou tyto látky, a tak urychlují růst rostliny. Recyklací se snižuje hladina bazí a nukleozidů, protože by se tak mohly stát inhibitory pro jiné metabolické reakce. (Ashihara & Crozier, 1999). Na rozdíl od reakcí *de novo* syntézy, mají vysoký stupeň kontroly u různých eukaryotních organismů, reakce recyklace purinů jsou mnohem složitější a nejsou zcela objasněny.

Enzymy podílející se na recyklaci nazýváme ribohydrolasy. Tyto enzymy jsou velmi důležité, protože je tímto reakce katalyzována na přechodu mezi recyklací a katabolismem. Purinové nukleosidfosforylasy, převádějící ribózafosfát v ribozid, hrají zásadní roli v této dráze na rozdíl od nukleosidfosfotransferasy, které převádějí ribozid v nukleotidy (Wagner & Backer 1992). Adenin, guanin a hypoxantin jsou recyklovány na AMP, GMP a IMP pomocí dvou enzymů adenin-fosforibosyltransferasy a hypoxantin/guaninfosforibosyltransferasy. Purinové báze mohou být recyklovány až na nukleotidy pomocí nukleozidů (Moffatt & Ashihara, 2002). Díky studiu cytokininů byly objeveny enzymy podílející se recyklaci purinů adeninfosforibosyltransferasa a adenosinkinasa, protože tyto enzymy úzce souvisí s již zmiňovaným metabolismem cytokininů (Moffatt & Ashihara, 2004).

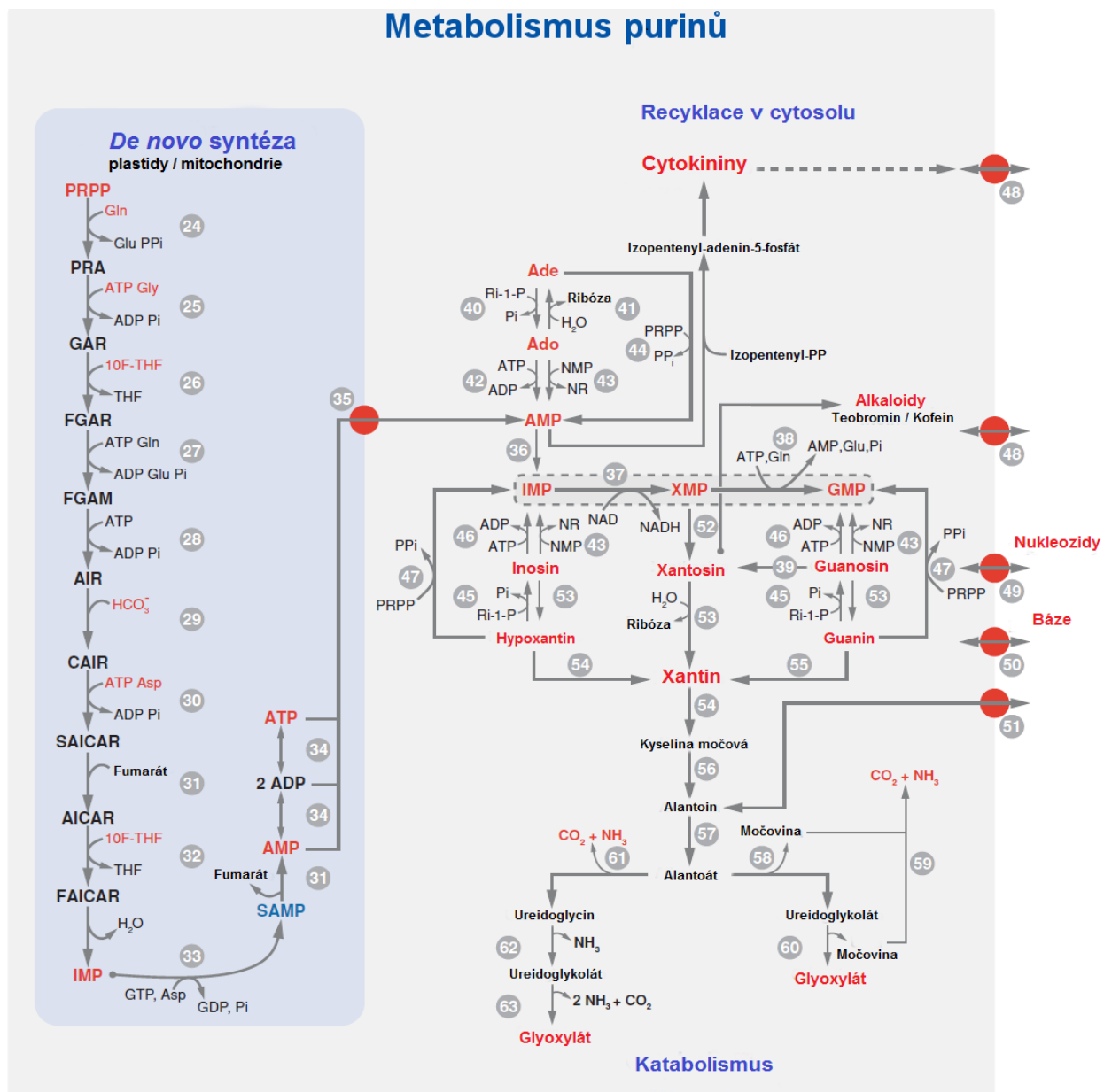
- **Katabolismus purinů**

Štěpením nukleových kyselin vznikají volné nukleotidy, které se působením nukleotidasy mění na nukleozidy. Výsledné produkty katabolismu purinů se od sebe výrazně liší. Příkladem může být kyselina močová, která je konečným produktem savců včetně člověka, nicméně u jiných savců se tvoří allantoin (Henderson & Paterson, 1973). U většiny rostlin jsou purinové nukleotidy odbourávány skrz močovinu, allantoin a alantoát na NH_3 a CO_2 . V orgánech rostlin např. kořeny, kde se hromadí tyto látky, jsou koncovými produkty této dráhy a jsou přesunuty do jiných částí rostlin, kde jsou

odbourány úplně. Na rozdíl od *de novo* syntézy purinových nukleotidů, je jejich katabolismus rozčleněn podle orgánů. Značná řada enzymů účastnících se v každém kroku katabolismu v přírodě existují, ovšem některé enzymy, které se běžně u zvířat vyskytují, rostlinám chybí. Typickým příkladem je ADA (alanindeaminasa), která je vyvinuta u zvířat, ale u většiny rostlin tento enzym přítomen není (Moffatt & Ashihara, 2002).

Již výše zmíněnou recyklací jsou některé molekuly purinových bazí schopné reakce s PRPP a tím se mohou znovu vytvořit příslušné nukleosidmonofosfáty jako je AMP nebo GMP. Po konverzi na AMP a IMP enzymem AMPD (AMP-deaminasa), jsou možné dva způsoby následného katabolismu nukleotidů adeninu. IMP je buď defosforylován na inosin za katalýzy 5-nukleotidasy / fosfatasy a následně hydrolyzován na hypoxantin za pomoci inosin / guanin nukleosidasy. Jinou variantou je IMP transformován na XMP enzymem IMPDH a dále metabolizován na xantosin a ten posléze je transformován na xantin. Následná degradace purinových bází xantinu se provádí dehydrogenasami a vede ke vzniku kyseliny močové. Enzym urikasa převede kyselinu močovou na alantoin, který se následně převede na alantoát enzymem alantoinasou (Stasolla, Katahira, Thorpe & Ashihara, 2003). Deriváty kyseliny močové, alantoin a alantoát jsou důležité při ukládání dusíku u luštěnin (Smith & Atkins, 2002). Kyselina alantoová se transformuje na ureidoglykolát nebo na ureidoglycin, kdy jsou ještě tyto látky dále metabolizovány na konečné produkty katabolismu purinů jako je amoniak, oxid uhličitý a glyoxylát. Tyto konečné produkty mohou být znovu využity při fotosyntéze nebo reasimilovány fotorespirátory GOGAT cyklem. Uhlíku a dusík u těchto purinových katabolických drah hraje důležitou roli při syntéze alkaloidů teobrominu a kofeinu (Ashihara & Suzuki, 2004). Tyto denaturované deriváty xantinu jsou nepostradatelné pro obranu mladých listových tkání proti hmyzu nebo se uvolňují do půdy a inhibují klíčení semen u jiných druhů rostlin. Kromě toho jsou tyto deriváty zajímavé pro biotechnologický výzkum plodin k výrobě nápojů bez kofeinu (Zrenner *et al.*, 2006).

Metabolismus purinů



Obr. 7 Schéma zahrnující *de novo* syntézu, recyklaci a katabolismus purinových nukleotidů. Enzymy podílející se na jednotlivých reakcích jsou uvedeny pod čísly: (24) PRPP amidotransferasa, (25) GAR syntetasa, (26) GAR transformylasa, (27) FGAM syntetasa, (28) AIR syntetasa, (29) AIR karboxylasa, (30) SAICAR syntasa, (31) Adenylosukcinátlyasa, (32) AICAR transformylasa/IMPcyklohydrolasa, (33) Adenylosukcinátsyntasa, (34) Adenylátkinasa, (35) StBT1 adeninnukleotiduniporter, (36) AMP deaminasa, (37) IMP dehydrogenasa, (38) GMP syntasa, (39) Guanosindeaminasa, (40) Adenosinfosorylase (41) Adenosinnukleosidasa, (42) Adenosinkinasa, (43) Nukleosidfosfotransferasa, (44) Adeninfosforibosyltransferasa, (45) Inosin-guanosinfosorylase, (46) Inosin-guanosinkinasa, (47) Hypoxantin-guaninfosforibosyltransferasa, (48) PUP purinpermeasa transporter, (49) ENT nukleosid transporter, (50) Xantin-uracilpermeasa, (51) Alantoin transportery, (52) Nukleotidasa, (53) Inosin-guanosinnukleozidasa, (54) Xantindehydrogenasa, (55) Guanindeaminasa, (56) Urikasa, (57) Alantoinamidohydrolasa, (58) Alantoátamidohydrolasa, (59) Ureasa, (60)

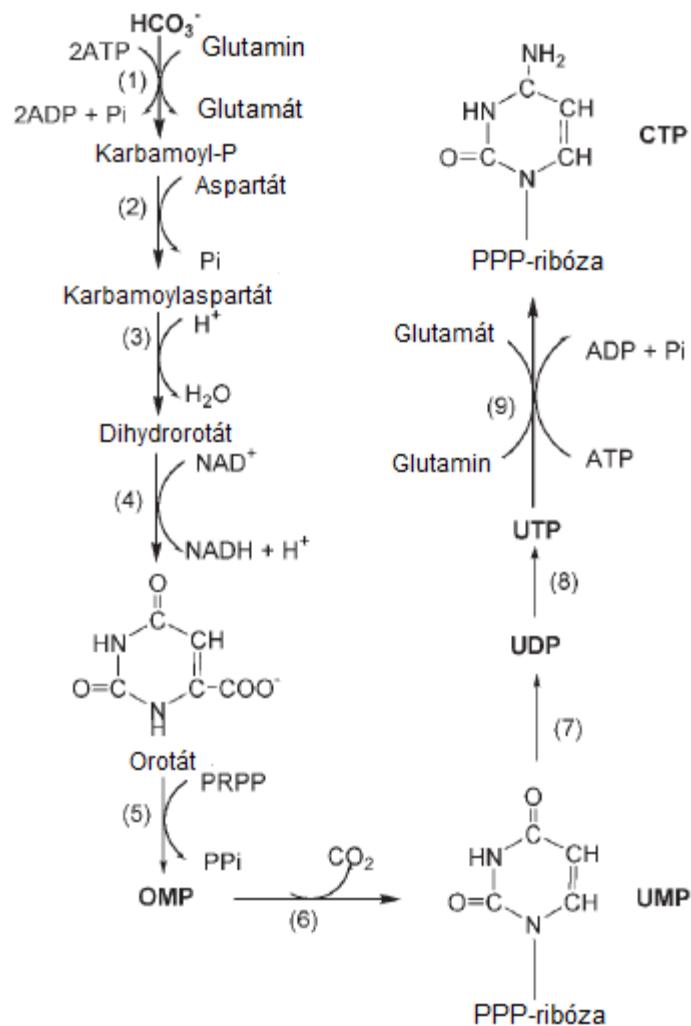
Ureidoglykolátlyasa, (61) Alantoindeaminasa, (62) Ureidoglycindeaminohydrolasa, (63) Ureidoglykoláthydrolasa. (obrázek převzat a upraven podle Zrenner *et al.*, 2006).

3.5 Metabolismus pyrimidinů

- **De novo syntéza**

De novo syntéza pyrimidinových nukleotidů, je spjata s tvorbou CP (karbamoylfosfát) cytosolovým enzymem CPS (karbamoylfosfátsyntetasa). CP vzniká reakcí s glutaminem a oxidem uhličitým za spotřeby ATP. Přestože sled reakcí pro syntézu pyrimidinových nukleotidů v rostlinách je v podstatě stejný jako u zvířat a mikroorganismů (Wagner & Baker, 1992), organizace, kontrolní mechanismus a lokalizace enzymů je v rostlinách odlišná od ostatních organismů.

Syntéza se skládá ze šesti reakcí. Počáteční reakcí, která je katalyzovaná CPS, je tvorba CP v kombinaci s uhličitánem, ATP a aminoskupinou přenesenou z glutaminu. Tři další reakce jsou nutné k vytvoření pyrimidinového kruhu. Fosforibozylová skupina PRPP se připojí k pyrimidinu, orotátu a vytvoří se tak OMP (5'-monofosfátorotidin), který je následně dekarboxylován na UMP jako první pyrimidinový nukleotid. Ten je poté fosforylován na UDP a UTP. Přenos aminoskupiny z glutaminu na UTP vede k syntéze CTP (Zrenner *et al.*, 2006). Schéma znázorňující *de novo* syntézu uvedeno níže (obrázek 8)



Obr. 8 Schéma *de novo* syntézy pyrimidinových nukleotidů v rostlinách. Enzymy katalyzující reakce jsou uvedeny vzestupně podle uvedených čísel: (1) Karbamoylfosfátsyntetasa, (2) Aspartáttranskarbamyolasa, (3) Dihydroorotasa, (4) Dihydroorotátdehydrogenasa, (5-6) UMP-syntetasa (orotátfosforibozyltransferasa + orotidin-5-fosfátdekarboxylasa), (7) UMP-kinasa, (8) Nukleoziddifosfátkinasa, (9) CTP-syntetasa (obrázek převzat a upraven podle Moffatt & Ashihara, 2002).

- **Recyklace pyrimidinů**

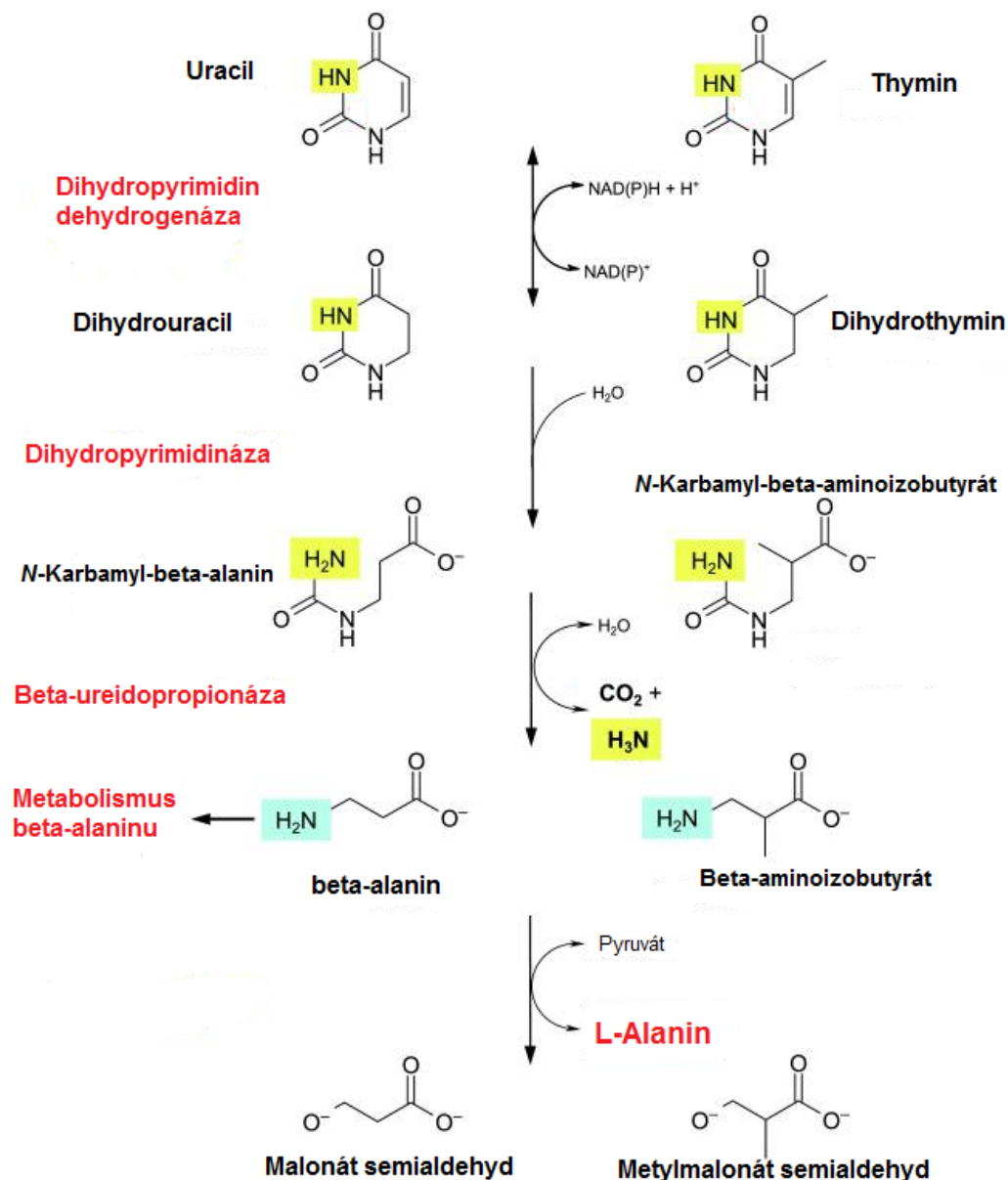
Vzhledem k tomu, že *de novo* biosyntetické dráhy jsou energeticky náročné, rostlinné buňky znovu využívají pyrimidinové báze a nukleozidy odvozené z již předešle vytvořených nukleotidů. Nukleotidy jsou katabolizovány na nukleozidy a jejich volné báze a tudíž jsou do reakce zapojeny postupně enzymy nukleosidas a nukleotidas. Konkrétně se může jednat o URH a UMPH. Nukleozidy v rostlinách mohou být přímo fosforylovány pomocí UK (nukleosidkinasami). Příkladem může být UK (uridinkinasa). Z toho vyplývá, že pouze uracil může být přímo převeden pomocí

UPRT (uracilfosforibosyltransferasy) na UMP jako jediný z pyrimidinových bazí (Kanamori & Fukuda *et al.*, 1981).

- **Katabolismus pyrimidinů**

Pyrimidinové nukleotidy jsou katabolizovány na své příslušné báze za pomoci nukleozidů. Ačkoli oxidativní i reduktivní odbourávání pyrimidinových bazí bylo prokázáno u všech organismů, pyrimidinové báze uracil a thymin jsou katabolizovány především v rostlinách (Wasternack, 1978). Uracil a thymin jsou odbourávány třemi reakcemi katalyzovanými dihydrouracildehydogenasou, dihydropyrimidinasou a β -ureidopropionasou. Konečnými produkty těchto reakcí jsou buď β -alanin nebo β -aminoizobutyryát. To závisí především na tom, zda je odbouráván thymin nebo uracil. V obou případech se ale stávají vedlejšími produkty amoniak a oxid uhličitý. Katabolismus uracilu může být velmi dobrým a důležitým zdrojem β -alaninu, který je prekurzorem pantotenátu koenzymu A (Wasternack, 1978 & Walsh *et al.*, 2001). Cytosin není substrátem pro katabolismus a rostliny navíc postrádají enzym cytosindeaminasu, může degradace pokračovat cestou uridinu. Cytidin vytvořený z CMP je tudíž převeden na uridin CDA (cytidindeaminasou).

O prvních dvou enzymech (dihydrouracildehydogenasa, dihydropyrimidinasu) existuje málo informací, ovšem třetí enzym účastnící se katabolizmu pyrimidinů β -UP (β -ureidopropionasa), patřící do třídy EC 3.5.1.6, byla nedávno popsána v literatuře (Walsh *et al.*, 2001). Nativní β -UP, částečně přečištěná z čerstvě etiolizovaných výhonků kukuřice seté, měly K_m s 11 a 6 mM pro β -UP a β -ureidoisobutyryát. PH optimum pro tento enzym je dosti široké (6,0 - 7,2) a jeho molekulová hmotnost je odhadována na 440 kD. Jen pro zajímavost, gen *Arabidopsis thaliana* kódující protein má 405 aminokyselin, 55% homologii s β -UP a byl popsán a izolován z krysích jater (Kvalnes-Krick & Traut, 1993). Schéma katabolizmu uvedeno na obrázku 9.



Obr. 9 Schéma katabolismu pyrimidinových nukleotidů. Názvy enzymů katalyzující reakce jsou uvedeny nalevo červeně. N-3 pyrimidinový dusík (lehké zvýraznění) je vyloučen ve formě amoniaku. Čtvrtým krokem β -alaninaminotransferasa (BAT) přenáší pyrimidin N-1 (tmavší zvýraznění) na pyruvát nebo 2-oxoglutarát za vzniku L-alaninu nebo L-glutamátu. Toto schéma shrnuje oba atomy dusíků putující do centrálního metabolismu dusík. (Převzato a upraveno podle Zrenner *et al.*, 2009)

3.6 Kontrolní mechanismy

Většina studií metabolismu nukleotidů v rostlinách je založena buď na molekulární úrovni nukleotidů, nebo na expresi genů podílejících se na metabolismu nukleotidů. Pro získání hlubšího pohledu na koordinaci nukleotidové syntézy a jejího použití, je nutné integrovat studie exprese proteinů a zapojit je do metabolismu. Tyto

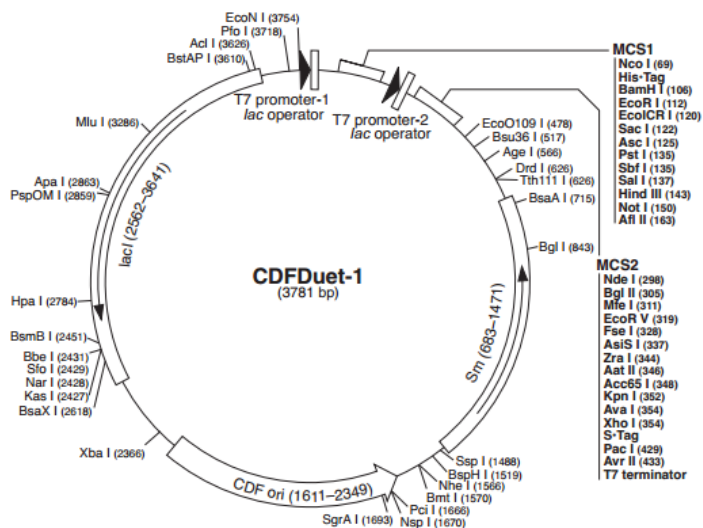
studie prokážou, zda jsou nukleozidy přítomny v malých množstvích a jestli se okamžitě recyklují, popřípadě se hromadí na významné a měřitelné úrovni. U mikrobů je pravděpodobně vyvinuta recyklace pro usnadnění využití nukleozidů a jejich volných bází v médiu. Zejména u mnohobuněčných organismů jsou nukleozidy výhodněji přepravovány než fosforylované, tudíž vysoce polární nukleotidy.

Nejdůležitější a základním faktorem pro kontrolu řídicího mechanismu purinového metabolismu je dostupnost a aktivita enzymu PRPP. Pro rychlost této syntézy je důležitý pozitivní i negativní mechanismus u některých kroků syntézy, které vyvolávají AMP, ADP, GMP a GDP. Výsledek vzájemné spolupráce jednotlivých kroků je ten, že při dostatku GTP se urychlí přeměna IMP na AMP a tudíž je-li dostatek ATP, urychlí se přeměna XMP na GMP. Tato syntéza zaručuje tvorbu téměř stejného množství GMP jako AMP.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Biologický materiál

- Konstrukty *ZmNRH2a* a *ZmNRH2b* naklonované do expresního vektoru pCDFDuet a vložené v expresních buňkách *E. coli* T7 express (New England Biolabs) byly poskytnuty školitelem (obrázek 9)



Obr. 10 Schéma expresního vektoru pCDFDuet-1 (Novagen, La Jolla, USA).

4.2 Použité chemikálie

- α -amylasa (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- adenosin (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- akrylamid (Bio-Rad, USA)
- ampicilin (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- apoferritin (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- B-Per (Thermo, USA)
- BioSafe Coomassie (Bio-Rad, USA)
- Blue Dextran (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- dodecylsírán sodný (Bio-Rad, USA)
- DNAsa (Top-Bio, ČR)
- ethanol (Lach-Ner, ČR)
- glukosa (Chemapol, ČR)
- glycerol (Lach-Ner, ČR)
- hovězí sérový albumin (Sigma-Aldrich, USA)
- hovězí trypsin (MP Biomedicals, USA)
- hovězí thyroglobulin (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)

- hydroxid sodný (Lach-Ner, ČR)
- chlorid hořečnatý (AppliChem, SRN)
- chromatografický sorbent Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Biosciences, Švédsko)
- chromatografický sorbent: HIS-Select Cobalt (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- cytidin (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- imidazol (Fluka; dodala Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- inhibitor proteas (Sigma, ČR)
- inosin (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid (Fermentas, Litva)
- guanidin hydrochlorid (AppliChem, SRN)
- guanosin (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- kanamycin (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, ČR)
- kvasinková alkoholdehydrogenasa
- LB-medium (Roth, SRN)
- lysozym (Fluka; Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- methanol (Lach-Ner, ČR)
- močovina (Sigma-Aldrich, USA)
- n-butanol (Lach-Ner, ČR)
- nikotinamidadeninukleotid (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (Bio-Rad, USA)
- persíran amonný (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- proteinové standardy pro gelovou permeační chromatografii (Bio-Rad, USA)
- Protein Ladder (10-250 kDa) (BioLabs, USA)
- RNAsa (Fermentas, Litva)
- sacharosa (Lachema, ČR)
- streptomycin (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- tris(hydroxymethyl)aminomethan tj. Tris (MP Biomedicals, USA)
- uridin (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)
- xantosin (Sigma-Aldrich Chemie, SRN)

Složení použitých pufrů:

- **Zásobní**
400 mM Tris-HCl pH 8
- **Pufr pro měření kinetiky**
200 mM Tris-HCl pH 8,
400 mM KCl,
1 mM DTT

- **Ekvilibrační** **na 100 ml**
20 mM Tris-HCl pH 8 5 ml 400 mM Tris-HCl pH 8
100 mM NaCl 10 ml 1M NaCl
5% glycerol 10 ml 50% glycerolu
10 mM imidazol 0,5 ml 2M imidazolu pH 8
H₂O 74,5 ml vody

- **Eluční** **na 100 ml**
20 mM Tris-HCl pH 8 5 ml 400 mM Tris-HCl pH 8
100 mM NaCl 10 ml 1M NaCl
5% glycerol 10 ml 50% glycerolu
250 mM imidazol 12,5 ml 2M imidazolu pH 8
H₂O 62,5 ml vody

- **Promývací** **na 100 ml**
20 mM Tris-HCl pH 8 5 ml 400 mM Tris-HCl pH 8
100 mM NaCl 10 ml 1M NaCl
5% glycerol 10 ml 50% glycerolu
H₂O 75 ml vody

4.3 Přístrojové vybavení

- analytické váhy (Sartorius, SRN)
- Centrifuga 5430 (Eppendorf, SRN)
- Centrifuga 5430r (Eppendorf, SRN)
- Centrifuga Benchtop 14-16Ks (Sigma, SRN)
- digitální pH metr (Multical WTW, SRN)

- digitální předvážky (KERN, SRN)
- elektroforetická komůrka (Bio-Rad, USA)
- elektromagnetická míchačka (IKA, SRN)
- laminární box (Schoeller, ČR)
- kapalinový chromatograf pro střednětlakou chromatografii BioLogic Duo Flow (Bio-Rad, USA)
- magnetická míchačka (IKA, SRN)
- minicentrifuga BLUE.EUV (Labnet, USA)
- pH metr pH525 (WTW Mulical, SRN)
- sada pipet (5000, 1000, 200, 100, 20, 10, 2.5 µl) (Eppendorf, SRN)
- spektrofotometr LightWave II UV-Vis WPA (Biochrom, UK)
- spektrofotometr UV-VIS s (Agilent, SRN)
- termostat láznový cc1-106A (Huber, SRN)
- thermocykler (Eppendorf, SRN)
- transiluminátor VL TFP-M/WL (East port)
- třepačka Max-Q (Barnstedt/Labline)

Vybavení laboratoře:

Erlenmayerovy baňky, odměrné válce, kádinky, lžičky, špachtle, parafilm, mikrozkuřavky, tuby, rukavice, magnetická míchadla, křemenné kyvety, pipety, špičky, led, stříčky s etanolem a vodou, stojany na pipety, PC sestava

4.4 Metody

4.4.1 Expresse rekombinantního proteinu kukuřice z *E. coli*

- **Příprava prekultury**

Do sterilní tuby bylo nalito 10 ml LB (Luria – Bertani) média, 1 ml 20% glukosy a antibiotikum streptomycin na finální koncentraci 50 µg ml⁻¹. Inokulace 2-5 µl kultury *E. coli* byla provedena ze zásobní mikrozkuřavky z mrazícího boxu. Inkubace takto vytvořené prekultury probíhala přes noc při 37°C při mírném třepání na třepačce.

- **Příprava kultury**

Prekultura byla centrifugována (4000 g, 5 minut, 4 °C), supernatant vylit a zbylá usazenina obsahující bakterie byla rozsuspendována v 10 ml připraveného LB (Luria – Bertani) média se streptomycinem. Bakterie byly přelity do Erlenmayerovy baňky se

zbylými 90 ml LB média s antibiotikem. Inkubace této kultury trvala cca 90 minut při 30°C na třepačce. Po 90 minutách byla změřena optická densita ($OD_{600} = 0,5$) pomocí spektrofotometru, kdy se odebral 1 ml kultury a jako blank sloužilo čisté LB médium. Produkce rekombinantního proteinu *ZmNRH2a* a *ZmNRH2b* byla indukována po přidavku 200 μ l 0,5M IPTG (isopropyl- β -thiogalaktopyranosid) při 20 °C na třepačce přes noc. Vše probíhalo ve sterilním prostředí v laminárním boxu. Erlenmayerovy baňky byly přikryty alobalem, který byl propíchnut, aby bakterie mohly přijímat kyslík a růst.

4.4.2 Extrakce a purifikace ZmNRH

- **Extrakce**

Celá kultura byla centrifugována při 4000 g, 20 minut při 20°C. Bakteriální usazenina byla rozpuštěna v 1,25 ml 400 mM Tris-HCl pufru (pH 8), 0,25 ml 400 mM $MgCl_2$, 50 μ l inhibitoru proteas a doplněna vodou do 3 ml a promíchána na vortexu. Poté bylo přidáno 3 ml B-PERu, promícháno na vortexu a inkubováno 10 minut při pokojové teplotě. Následně bylo přidáno 100 μ l lysozymu, promícháno na vortexu a inkubováno dalších 30 minut při pokojové teplotě, dokud roztok nezgelovatěl. Dále byla přidána voda (4 ml), 8 μ l RNAsy, 8 μ l DNAsy 1. Vzorek byl inkubován 30 minut při 37°C na vodní lázni. Poté byl přidán 1 ml 1M NaCl, 1 ml 50% glycerolu, odebral se lyzát. Zbytek se centrifugoval při 10 000 g 30 minut při 4°C. Supernatant byl přelit do nové tuby a lyzát byl centrifugován 10 minut při 10 000 g. Usazenina byla rozsuspendována v 50 μ l 4M močoviny.

- **Purifikace**

Afinitní chromatografie je metoda, která je založená na dělení proteinů ze směsi proteinů využívající afinitní ligand, který je kovalentně vázaný na pevný nosič. Prolitím kolony roztokem, který obsahuje biologicky aktivní látku, je tato látka zachycena. Tento proces je zaštitěn přes kolonu His selected kobalt gel (Sigma Aldrich, SRN). Ty jsou vysoce selektivní pro rekombinantní proteiny s histidinovou kotvou a prakticky neváže další proteiny.

Tyto 3 ml kobaltnaté kolony byly promyty 3x 5 ml ekvilibračního pufru a centrifugovány 1 minutu při 400 g. Na kolony byl nanesen supernatant a poté byly umístěny do rotátoru a inkubovány 30 min při 4°C. Kolony byly centrifugovány 1 min při 300 g a proteklá frakce byla uschována (frakce *Flow-trough*). Dále byly třikrát

promyty 5 ml ekvilibračního pufru. Po tomto promytí byl použit eluční pufr (4 ml), a kolonky byly 30 minut inkubovány na rotátoru při 4 °C. Centrifugace probíhala do čisté plastové tuby (frakce *eluče*). Získaný protein byl následně zahuštěn ultrafiltrací na objem 5 ml a uchován pro další použití.

4.4.3 SDS - PAGE

SDS-PAGE označuje elektroforézu v polyakrylamidovém gelu s přítomností dodecylsírany sodného. Tato metoda využívá rozdílnou migraci v elektrickém poli, která je dána velikostí molekuly. Dodecylsírany sodný dává proteinům záporný náboj a tudíž migrují k anodě.

- **Příprava vzorků pro elektroforézu**

K bakteriální usazenině před indukcí a po indukci bylo přidáno 50 µl 8M močoviny, důkladně bylo vše rozpuštěno a poté bylo přidáno 50 µl vzorkovacího pufru. Vzorky byly inkubovány 10 minut při 100°C, dále ochlazeny, a centrifugovány na mikrocentrifuze. Dalším krokem bylo odebrání vzorku 50 µl rozpustné frakce a 50 µl nerozpustné frakce. K nim bylo přidáno 50 µl vzorkovacího pufru a směs byla inkubována 10 minut při 100°C, nechala zchladnout a centrifugovala na mikrocentrifuze. Totéž se provedlo s frakcemi flow-through a elucí.

- **Sestavení aparatury pro nalévání gelů, příprava gelů**

Aparatura pro nalévání gelu byla připravena podle návodu výrobce sestavy. Gel zaostřovací a dělicí byl připraven podle tabulky 1, která je uvedena níže. Po 5 sekundách byl nalit mezi skla gel dělicí. Roztok gelu byl převrstven několika kapkami *n*-butanolu a ponechán polymerovat 20 minut při laboratorní teplotě. Po zatuhnutí dělicího gelu byl odstraněn filtračním papírem *n*-butanol, poté převrstvení vodou a ta byla opětovně odsáta filtračním papírem. Mezi skla byl nalit zaostřovací gel a vsunut hřebínek pro vytvoření jamek k nanesení vzorku. Roztok byl ponechán polymerovat 35 minut při laboratorní teplotě. Poté byla aparatura přenesena do elektroforetické komůrky, kde byl nalit elektrodotový pufr (0,025 M Tris, 0,192 M glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3). Do jamek, které byly vytvořeny hřebínkem, bylo nanášeno 5 µl vzorku a standardu Protein Ladder (10-250 kDa). Komůrka byla uzavřena a připojena ke zdroji napětí na 120 V. Po 20 minutách, kdy došlo k rozostření zaostřovacího gelu, bylo napětí zvednuto na 180 V. Po ukončení elektroforézy (1 hod) bylo sejmuto víko, vytáhnuty

skla a gel oříznut. Přes noc byl ponechán v barvicím roztoku Coomassie Brilliant Blue. Druhý den byl odbarven a několikrát promyt destilovanou vodou a poté vyfocen.

Tabulka 1 Příprava dělicího a zaostřovacího gelu

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

4.4.4 Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace vzorků proteinů *ZmNRH2a* a *ZmNRH2b* byla měřena spektrofotometricky při 280 nm po zahuštění a eliminaci imidazolu proti destilované vodě. Výpočtem koncentrace pomocí programu ProtParam (Expasy.org) a sekvence studované *ZmNRH2* (NCBI kód HQ825161) bylo zjištěno, že 1 mg/ml proteinu při 280 nm má absorpenci 0,755. Program počítá extinkční koeficienty proteinů pomocí Edelhochovy metody (Edelhoch, 1967).

$$c \text{ (mg/ml)} = \frac{A \text{ vzorku}}{A \text{ ProtParam}} \times \text{ředění}$$

4.4.5 Stanovení teplotní stability proteinů

Vzorek byl inkubován při dané teplotě v rozmezí 4°C až 73°C po dobu 30 minut, poté byl dán na 30 minut na led a následně mohla být spektrofotometricky měřena jeho zbytková aktivita. Reakční směs obsahovala 10 µl enzymu, 400 µl daného substrátu a 1590 µl reakčního pufru. Celkový objem v kyvetě tedy činil 2 ml.

4.4.6 Stanovení molekulové hmotnosti *ZmNRH2b* gelovou permeační chromatografií

Gelová permeační chromatografie je metoda využívající porézní chromatografickou kolonu s přesně definovanými velikostmi pórů. Z toho vyplývá, že větší molekuly, než je velikost pórů, jsou eluovány dříve než molekuly, které jsou menší

a vstupují do nitra gelových částic. V tomto případě byla použita kolona Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Biosciences, Švédsko) tvořená agarosou, která je připojena k dextranu a má vysokou mechanickou odolnost. Tato kolona je určena pro středotlakou chromatografii, tudíž byla napojena na středně tlaký systém Biologic Duo flow (Bio-Rad, USA). Mobilní fáze se skládala z 50 mM K-fosfátového pufru, pH 7, který obsahoval 100 mM NaCl. Průtoková rychlost byla 0,7 ml.min⁻¹. Jako standard (Sigma - Aldrich Chemie) byl použit protein Blue Dextran (2 000 kDa), hovězí thyroglobulin (669 kDa), β-amylasa ze sladkých brambor (200 kDa), hovězí sérový albumin (66 kDa), apoferritin z koňské sleziny (443 kDa), kvasinková alkoholdehydrogenasa (150 kDa) a karboanhydrasa z hovězích erytrocytů (29 kDa).

4.4.7 Stanovení aktivity *ZmNRH2a* *ZmNRH2b*

Samotná aktivita je definována jako rychlost katalyzované reakce, proto se jako její jednotka uvádí 1 katal (kat), která vyjadřuje přeměnu jednoho molu substrátu za jednu sekundu. Tato jednotka je ovšem značně veliká, tudíž se používá menší jednotka a to μkat nebo nkat. Dříve se používala tzv. mezinárodní jednotka enzymové kinetiky s definicí katalyzující přeměnu jednoho mikromolu substrátu za jednu minutu (Šípal *et al*, 1992)

Vztah vyjadřující aktivitu enzymu:

$$a(kat) = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{V}{\epsilon \times l}$$

příčemž $a(kat)$ je vypočítaná hodnota aktivity v jednotkách katal, ΔA je změna absorbance, Δt je změna v čase (doba reakce) v jednotce (s), V je objem reakční směsi v kyvetě v jednotkách (ml), ϵ je molární absorpční koeficient v jednotkách (M⁻¹ cm⁻¹) a l je šířka kyvety v jednotkách (cm).

Aktivita je měřena spektrofotometricky, kdy se do kyvety napipetuje daný objem pufru, vypočítaný objem substrátu na požadovanou koncentraci, poté se reakční směs startuje přidáním substrátu a měří se absorbance po určitou dobu a při vlnové délce, která koresponduje se substrátem (tabulka 2).

Tabulka 2 Vlnové délky použitých substrátů

Název substrátu	Vlnová délka (nm)
Adenosin	260
Inosin	248
Uridin	262
Xantosin	248

4.4.8 Substrátová specifita, stanovení K_m a V_{max}

Michaelisova konstanta (K_m) je vyjádřena koncentrací substrátu, kdy reakce probíhá v polovině její maximální rychlosti, tudíž je mírou afinity enzymu k substrátu. V_{max} nebo V_{lim} vyjadřuje maximální rychlost, která je mírou celkové koncentrace daného enzymu (Šípál *et al*, 1992). Obě tyto veličiny zahrnuje rovnice Michaelise-Mentenové, jejíž vztah je:

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

Pro měření substrátové specifiity byly jednotlivé substráty připraveny rozpuštěním substrátu v 10ml Tris-HCl pufru, pH8 na koncentraci 1 mM. Po celou dobu byly uchovávány v lednici a po dobu měření na ledu.

5 Výsledky

5.1 Stanovení koncentrace proteinů

Obsah proteinů ZmNRH2a a ZmNRH2b byl vypočítán pomocí programu ProtParam, který stanovil, že 1 mg/ml proteinu při 280 nm má absorbanci 0,755. Absorbance vzorků byly vypočítány spektrofotometricky při 280 nm.

$$c \text{ (mg/ml)} = \frac{A_{\text{vzorku}}}{A_{\text{ProtParam}}} \times \text{ředění}$$

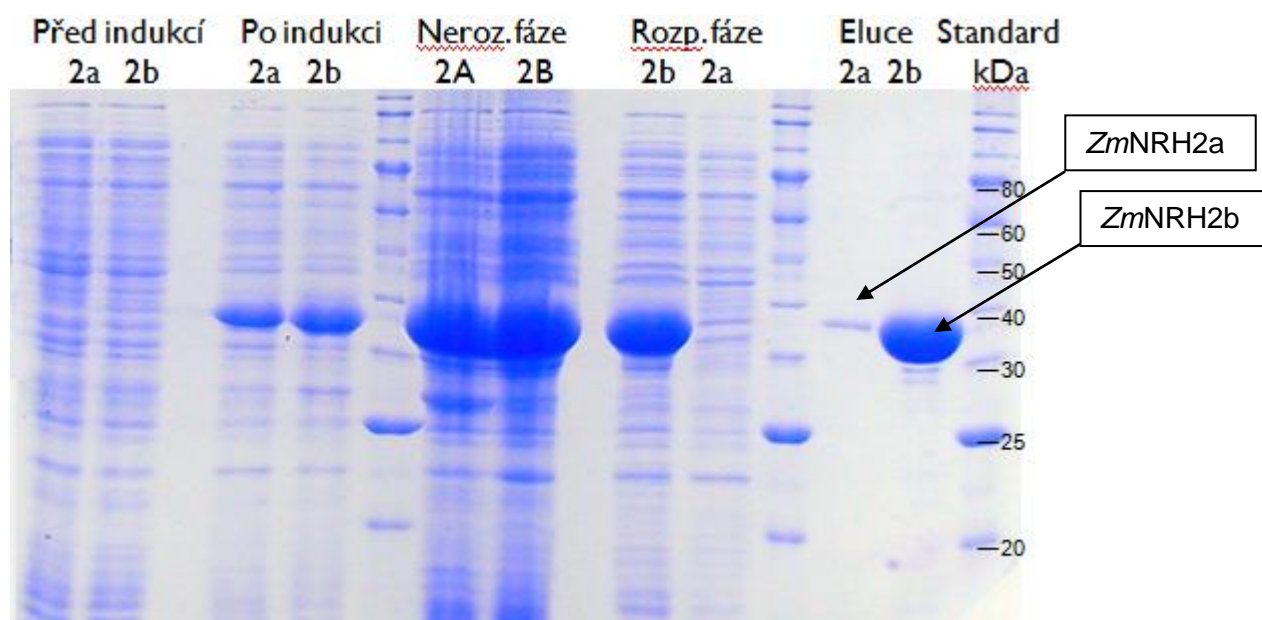
Z výše uvedeného vzorce byl vypočítán celkový obsah proteinu v zásobním roztoku (tabulka 4). Koncentrace proteinu ZmNRH2a byla 0,96 mg ml⁻¹ a proteinu ZmNRH2b byla 21,56 mg ml⁻¹.

Tabulka 4 Stanovení koncentrace proteinů

	$A_{\text{ProtParam}}$	A_{vzorku}	Ředění	C_{vzorku} (mg ml ⁻¹)
ZmNRH2a	0,755	0,0699	10	0,93
ZmNRH2b	0,755	1,6279	10	21,56

5.2 Stanovení molekulové hmotnosti pomocí SDS-PAGE

Pomocí této metody bylo možno vyhodnotit úroveň exprese jednotlivých proteinů a stanovit pomocí standardů molekulovou hmotnost monomerní jednotky tohoto proteinu (obrázek 11). Na obrázku 11 je vidět produkce proteinu před a po přidání IPTG, v rozpustné a nerozpustné fázi. Jak je z obrázku vidět, oba proteiny jsou exprimovány silně do inkluzních tělísek. Méně byl produkován protein ZmNHR2a do rozpustné fáze oproti ZmNRH2b, a tudíž byl použit pro další experimentální použití. Teoretická hmotnost této monomerní jednotky odpovídá přibližně 35 kDa vypočítané na základě aminokyselinové sekvence v programu ProtParam (obrázek 16) a liší se minimálně od experimentálně zjištěné hodnoty 38 kDa.



Obr. 11 SDS-PAGE rekombinacích proteinů. Jako standard byl použit Protein Ladder (10-250 kDa).

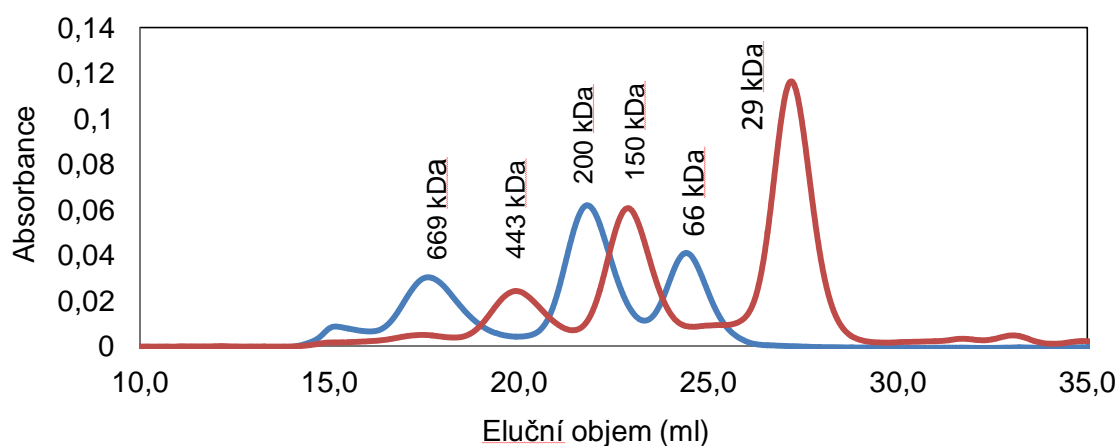
5.3 Stanovení molekulové hmotnosti permeační chromatografií

Díky gelové permeační chromatografii bylo možno stanovit za nativních podmínek molekulovou hmotnost. Na kolonu Superdex 200 HR 10/30 byly naneseny jednotlivé standardy a poté náš neznámý vzorek. Průtoková rychlost byla nastavena na 0,7 ml/min. Kalibrační přímkou jsem sestavila pomocí logaritmů molekulových hmotností jednotlivých standardů vnesených proti jejich elučním objemům (tabulka 3, obrázek 11). Touto metodou bylo zjištěno, že molekulová hmotnost proteinu ZmNHR2b se neshoduje s hmotností monomeru. Rekombinantní ZmNRH2b se vyskytuje jako dimer s molekulovou hmotností 77,6 kDa.

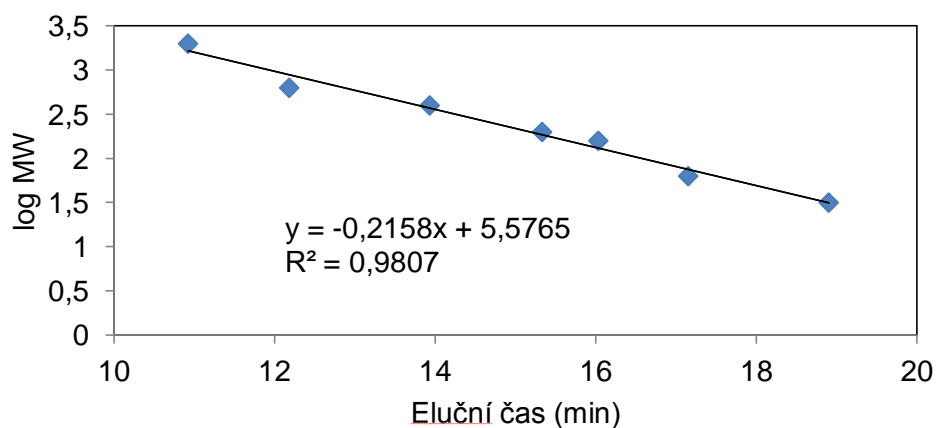
Tabulka 3: Výsledky gelové permeační chromatografie

Standard	MW (kDa)	log MW	Eluční objem (ml)
karboanhydráza	29	1,46	18,97
hovězí sérový albumin (BSA)	66	1,82	17,14
alkoholdehydrogenáza	150	2,17	16,03
α -amyláza	200	2,30	15,35
apoferitin	443	2,65	13,87
tyreoglobulin	669	2,83	12,39

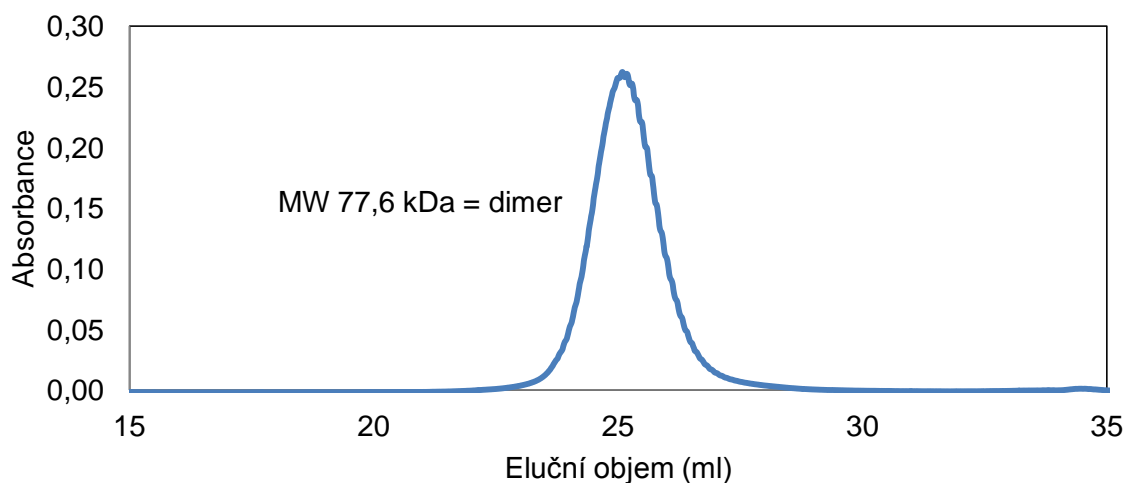
A)



B)



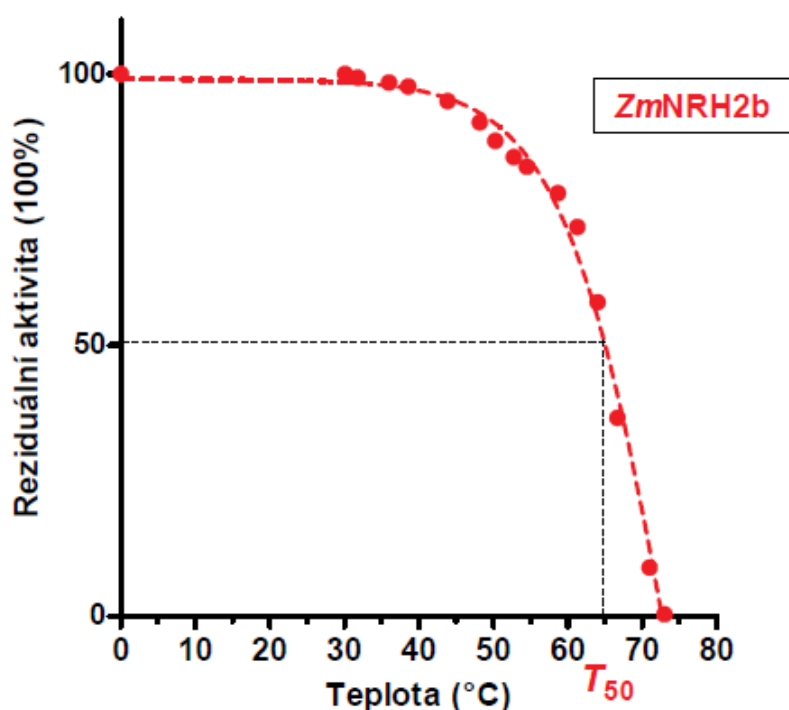
C)



Obr. 12 Gelová permeační chromatografie. Kolona Superdex 200 HR 10/30, průtok 0,7ml/min. A: Jako standard byla použita karboanhydrasa (29 kDa), BSA (66 kDa), alkoholdehydrogenasa (150 kDa), α -amylasa (200 kDa), apoferritin (443 kDa), tyreoglobulin (669 kDa). **B:** Graf lineární závislosti logaritmů jednotlivých standardů proti elučním časům. **C:** Graf píku elučního času proteinu ZmNRH2a.

5.4 Stanovení teplotní stability ZmNRH2b

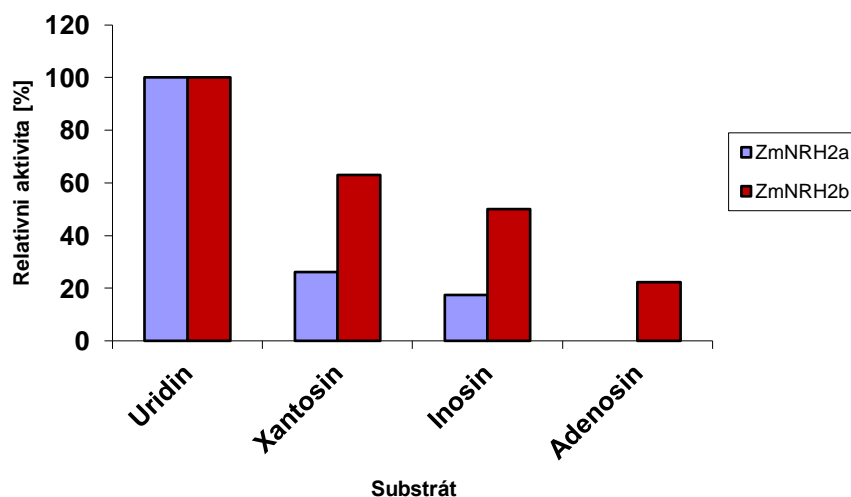
Teplotní stabilita byla stanovena pro ZmNRH2b, kdy tento protein byl inkubován 30 minut v rozmezí teplot od 4 - 73°C. Protein ZmNRH2b vykazoval teplotní stabilitu přibližně do 45 °C a potom ztrácel svou aktivitu. Hodnota T_{50} , což je teplota, při které je zachováno 50 % aktivity po 30 minutové inkubaci při dané teplotě, činila 65 °C (obrázek 13).



Obr. 13 Teplotní stabilita ZmNRH2b. Enzym byl inkubován v teplotním rozmezí od 4°C do 73°C. Reakční směs obsahovala 10 μ l enzymu, 400 μ l daného substrátu (uridin) a 1590 μ l reakčního pufru. Celkový objem v kyvetě činil 2 ml.

5.5 Stanovení substrátové specifity ZmNRH2b a ZmNRH2a

V této práci byly použity 4 substráty – uridin, xantosin, inosin a adenosin při 150 μ M koncentraci pro analýzu obou isoenzymů. Aktivita enzymů ZmNRH2a a ZmNRH2b byla nejvyšší s uridinem. Druhým nejlepším substrátem pro oba enzymy byl xantosin, ZmNRH2a s ním vykazoval 26% aktivitu a ZmNRH2b 63% aktivitu oproti uridinu. Jako třetí nejlepší substrát byl inosin, se kterým ZmNRH2a vykazoval 17% aktivitu a ZmNRH2b 50% aktivitu. Téměř žádnou aktivitu vykazoval ZmNRH2a s adenosinem, zatímco ZmNRH2b s ním vykazoval 22% aktivitu ve srovnání s uridinem (obrázek 14).



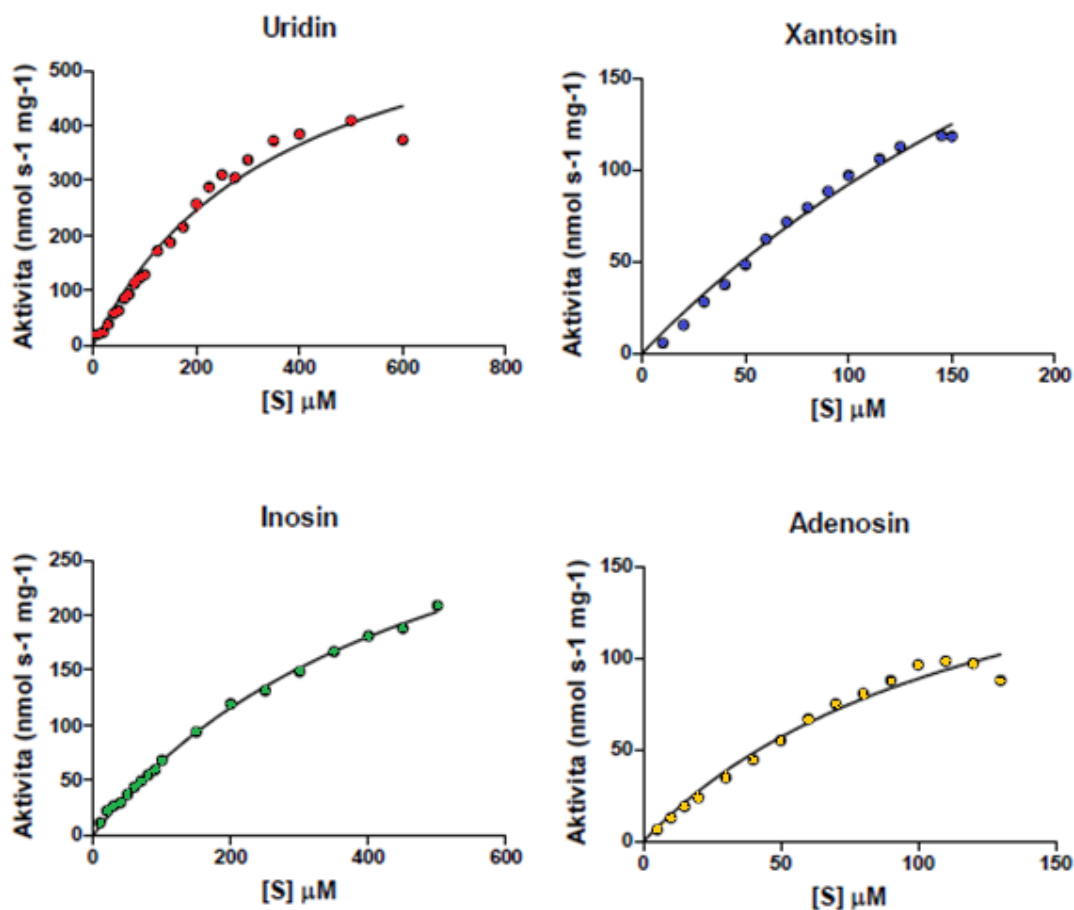
Obr. 14 Substrátová specifita. Reakční směs v kvetě obsahovala 150 μ M roztok substrátu, 200 mM Tris-HCl pufr a příslušné množství enzymu. K porovnání relativní aktivity byl vybrán uridin jako 100%.

5.6 Stanovení kinetických parametrů pro ZmNRH2b

Kinetické parametry byly stanoveny jen pro ZmNRH2b. Druhý isoenzym nebyl z důvodu nízké produkce analyzován. Pro stanovení kinetických parametrů byly naměřeny saturační křivky pro jednotlivé substráty (obrázek 15), ze kterých bylo možno poté určit Michaelisovu konstantu K_m , limitní rychlost V_{lim} a relativní poměr V_{lim}/K_m (tabulka 5). Pyrimidinové nukleozidy jsou všeobecně preferovanými substráty před purinovými. Z tohoto tvrzení vyplývá, že protein ZmNRH2b má nejvyšší afinitu k substrátu uridinu, který je nejlepším substrátem a poměr V_{lim}/K_m je 1. K němu jsou poté vztaženy ostatní tři substráty. Nejvyšší hodnota limitní rychlosti byla naměřena s uridinem ($709,1 \pm 57 \text{ nmol s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). U substrátu inosinu byla naměřena vyšší hodnota K_m oproti uridinu, avšak limitní rychlost je zde podstatně nižší. Nejmenší hodnota V_{lim} je naopak u adenosinu ($259,8 \pm 26 \text{ nmol s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). Hodnoty limitní rychlosti u xantosinu a inosinu jsou poměrně srovnatelné. Z tabulky je vidět, že adenosin má nižší K_m a V_{lim} oproti xantosinu, ovšem poměr V_{lim}/K_m je vyšší.

Tabulka 5 Kinetické parametry ZmNRH2b pro jednotlivé substráty

ZmNRH2b			
Substrát	K_m (uM)	V_{lim} (nmol s ⁻¹ mg ⁻¹)	V_{lim}/K_m (%)
Uridin	377,1 ± 61	709,1 ± 57	1
Xantosin	368,2 ± 90	430,8 ± 100	0,62
Inosin	505,4 ± 16	408,2 ± 32	0,43
Adenosin	181,6 ± 26	259,8 ± 26	0,76



Obr. 15 Saturační křivky ZmNRH2b s jednotlivými substráty. Měření probíhalo v prostředí zásobního pufru 200mM Tris-HCl (pH 8.0).

6 Diskuse

Tato bakalářská práce je zaměřená na charakterizaci nukleosid-*N*-ribohydrolas z kukuřice (*Zea mays*), přičemž zahrnuje expresi, purifikaci rekombinantních proteinů ZmNRH2a a ZmNRH2b. Dále byla stanovena molekulová hmotnost a kinetické parametry ZmNRH2b.

Z bakteriální kultury *E. coli* byly oba enzymy extrahovány a poté přečištěny pomocí afinitní chromatografie s použitím kolonek obsahující kobaltnaté ionty. Metodou SDS-PAGE byla stanovena a ověřena úroveň exprese obou proteinů a čistota po purifikaci pro další použití. Výsledná koncentrace obou proteinů pro ZmNRH2a byla 1 mg/ml a pro protein ZmNRH2b 22 mg/ml.

Pomocí metody SDS-PAGE bylo možno stanovit přibližnou molekulovou hmotnost monomeru proteinu ZmNRH2b za denaturačních podmínek. Za těchto podmínek bylo experimentálně zjištěno, že tento protein má přibližnou molekulovou hmotnost 38,5 kDa. Teoretická molekulová hmotnost monomerní jednotky, vypočítaná pomocí programu ProtParam, činila 35 kDa. Za nativních podmínek, metodou gelové permeační chromatografie bylo zjištěno, že tento protein se vyskytuje přednostně jako dimer s molekulovou hmotností 77,6 kDa. Tudiž experimentálně zjištěná hodnota a hodnota vypočítaná se nepatrně liší.

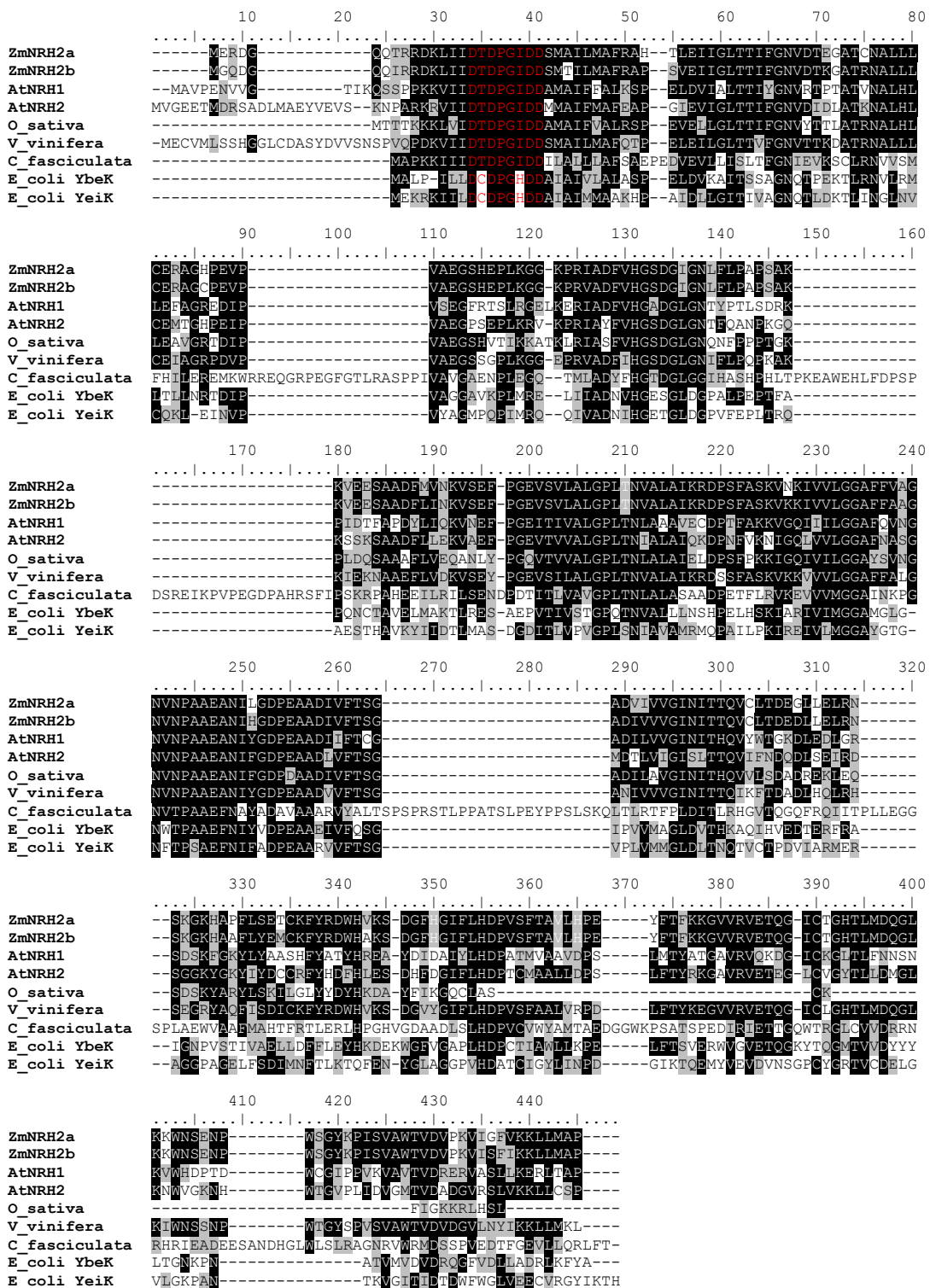
Pro tento protein byla zjištěna i teplotní stabilita. Enzym ZmNRH2b vykazoval teplotní stabilitu cca do 45°C, poté aktivita markantně klesala. Hodnota T_{50} je 65°C.

Na obrázku 16, který je uveden níže, je vyobrazena sekvence ZmNRH2a a ZmNRH2b. Všechny nukleosid-*N*-ribohydrolasy obsahují aspartátový cluster sekvence DXDXXXDD, který se nachází na N-konci. Bakteriální, protozoální a kvasinkové sekvence se liší od těch rostlinných tím, že jejich sekvence obsahuje motiv DTDPGIDD. Druhý a čtvrtý aspartát se podílí na koordinaci vápenatého iontu s aktivním místem a třetí aspartát je důležitý pro vazbu 2-OH skupiny ribózy (Jung *et al.*, 2009).

Dále byla stanovena substrátová specifita pro ZmNRH2b i ZmNRH2a, kdy aktivita těchto enzymů byla testována se čtyřmi substráty (uridin, inosin, adenosin, xantosin) při koncentraci 150 μ M. Aktivita enzymů ZmNRH2a a ZmNRH2b byla nejvyšší s uridinem jako 100%, k němu byly vztaženy zbylé tři substráty. Druhým substrátem pro oba enzymy byl xantosin, ZmNRH2a vykazoval 26% aktivitu a ZmNRH2b přibližně trojnásobně větší aktivitu (63%). Jako třetím substrátem byl inosin, který pro ZmNRH2a vykazoval aktivitu z 17% a pro ZmNRH2b z 50%. Nulová aktivita, tudíž kdy nedošlo k přeměně, byla stanovena u enzymu ZmNRH2a se substrátem adenosinem, pro enzym ZmNRH2b byl stanoven na 22% (obrázek 14). Všeobecně je

nejlepším studovaným substrátem uridin, tudíž ZmNRH2b upřednostňuje pyrimidinové nukleozidy před purinovými. Naopak je tomu u AtNRH1 nebo u PpNRH1 (Schaefer, 2002, Hájková, 2013). Tyto dva enzymy upřednostňují purinové nukleozidy před pyrimidinovými (Jung *et al.*, 2009).

Kinetické parametry (K_m , V_{lim} , poměr K_m/V_{lim}) zahrnuje tabulka 5 a obrázek 14. Z těchto údajů vyplývá, že ZmNRH2b preferuje uridin (K_m/V_{lim} 1, K_m 377,1 ± 61 μM a V_{lim} 709,1 ± 57 nmol s⁻¹ mg⁻¹) a adenosin, poněvadž poměr V_{lim}/K_m je 1 a 0,76. Poměr K_m/V_{lim} 0,76 u adenosinu je vyšší než u xantosinu 0,62, ovšem v porovnání s hodnotami K_m a V_{lim} dalších substrátů je hydrolyzován nejméně. Inosin s poměrem K_m/V_{lim} 0,43 a hodnotami K_m 505,4 ± 16 a V_{lim} 408,2 ± 32 je lepším substrátem než adenosin. Naopak je tomu při porovnání s ostatními organismy např. s *Arabidopsis thaliana*, *Physcomitrella patens* nebo *Escherichia coli*. AtNRH1, enzym pocházející z *Arabidopsis thaliana*, má nejvyšší afinitu zejména k uridinu (hodnota K_m je 0,8 mM a hodnota V_{lim} je 0,004 mmol s⁻¹ mg⁻¹) (Jung *et al.*, 2009). WT-PpNRH1 (*Physcomitrella patens*) vykazuje nejvyšší afinitu k substrátům inosinu a xantosinu, naopak nejmenší afinita byla prokázána u adenosinu. U bakterie *Escherichia coli* byly popsány dva enzymy YbeK a Yeik. U těchto dvou nukleozid-*N*-ribohydrolas bylo zjištěno, že katalytická účinnost Yeik vůči substrátu inosinu, adenosinu a guanosinu byla víc jak tisíckrát nižší než vůči uridinu a YbeK hydrolyzuje přirozeně se vyskytující pyrimidinové nukleozidy 100-10000 krát účinněji (jako studovaný ZmNRH2b). Z pyrimidinových derivátů je hydrolyzován uridin nejefektivněji s cca s 10krát vyšší hodnotou k_{cat}/K_m než cytidin, a to zejména z důvodu nižší hodnoty K_m (83 μM) (Muzolini *et al.*, 2006). Mutace YeiK má silný vliv na hydrolýzu inosinu a katalytickou účinnost, poněvadž se faktor účinnosti (k_{cat}/K_m) zvyšuje. Mutant snižuje aktivační energii pro oba substráty uridin i inosin a až čtyřicetinasobně zvyšuje katalytickou účinnost. Další pozoruhodný objev je ten, že mutací je až pětadesátkrát snížena afinita k substrátu uridinu za podmínek nasycení substrátu, z čehož vyplývá značně zvýšený obrat k efektivněji zvýšené afinitě inosinu. Katalytická účinnost *C. fasciculata* k inosinu je 1,9 x 10³ M⁻¹ s⁻¹. V porovnání s YeiK nebo YbeK činí k_{cat} 3,6 s⁻¹ a hodnota K_m je zde podstatně vyšší. Tento rozdíl lze připsat změnám v aktivním místě, které vyplývají z evolučního vývoje u přírodních IU-NH (Iovane *et al.*, 2008).



Obr. 16 Porovnání sekvenční ZmNRH2a, ZmNRH2b a dalších vybraných organismů jako jsou *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Vitis vinifera*, *E. coli*. Červeně je znázorněn motiv, který je specifický pro rostlinné nukleosid-*N*-ribohydrolasy a podílí se na vazbě Ca^{2+} iontu a 2-OH skupiny ribózy.

7 Závěr

- V teoretické části této bakalářské práce je popsán metabolismus pyrimidinových a purinových bazí, popis rostliny, ze které jsou enzymy použity, příbuznost s jinými rostlinami a organismy jako bakterie, kvasinky a vyšší rostliny.
- Experimentální část zahrnuje expresi, extrakci a purifikaci rekombinantních proteinů *ZmNRH2a* a *ZmNRH2b*. Následně byla zjištěna jejich molekulová hmotnost a úroveň exprese za pomoci gelové permeační chromatografie, celková koncentrace těchto proteinů. Těmito metodami byla zjištěna nízká úroveň exprese proteinu *ZmNRH2a*, a tudíž jeho další nepoužitelnost k dalšímu měření. U druhého proteinu tomu bylo naopak. U něj byla navíc sestavena křivka teplotní stability, substrátová specificita, kdy bylo zjištěno, že nejlepším substrátem je pyrimidinová báze uridin a kinetické parametry jednotlivých substrátů, výpočet K_m a V_{max} .

8 Použitá 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
- Degano M., Gopaul D. N., Scapin G., Schramm V. L. and Sacchetini J. C. (1996) Three-dimensional structure of the inosine-uridine nucleoside N-ribohydrolase from *Crithidia fasciculata*. *Biochemistry*, 35,5971-5980
- Edelhoch H. (1967) Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry* 6, 1948-1954.
- Estupiñán B., Schramm V. L. (1994) Guanosine- Inosine-preferring nucleoside N-glycohydrolase from *Crithidia fasciculata*. *The Journal of Biological Chemistry* 269, 23068-23073
- Giabbai B. and Degano M. (2004) Crystal Structure to 1.7Å of the *Escherichia coli* Pyrimidine Nucleoside Hydrolase YeiK, a Novel Candidate for Cancer Gene Therapy. *Structure*, Volume 12, Issue 5, 739-749.
- Guranowski A. and Schneider Z. (1977) Purification and characterization of adenosine nucleosidase from barley leaves. *Biochimica et Biophysica Acta* 482: 145-158.
- Hájková E. (2013) Charakterizácia dvoch nukleozid-N-ribohydroláz z machu (*Physcomitrella patens*), bakalárská práca, Univerzita Palackého, Olomouc
- Henderson, J.F. and Paterson, A.R.P. (1973). *Nucleotide Metabolism: An Introduction* (New York, Academic Press), pp.1-304.

- 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.
- Hraška Š. a kolektiv (1989) Špeciálna genetika poľnohospodárskych rastlín, pp 79-95, Príroda, Bratislava, ČSSR
- 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.
- 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.
- 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.
- Moffatt B.A. and Ashihara H. (2002) Purine and pyrimidine nucleotide synthesis and metabolism. *The Arabidopsis Book* 1 published by American Society of Plant Biologists.
- Muzzolini L., Versées W., Paola Tornaghi P., Van Holsbeke E., Steyaert J., Degano M. (2006) New Insights into the Mechanism of Nucleoside Hydrolases from the Crystal

- Structure of the *Escherichia coli* YbeK Protein Bound to the Reaction Product. *Biochemistry* 45, 773-782.
- 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.
- Perera, R.J., Linard, C.G. and Signer, E.R. (1993). Cytosine deaminase as a negative selectable marker for *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 23, 793-799.
- 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
- Rod J. a kolektiv (1982) Šlechtění rostlin, pp 225-230, Státní zemědělské nakladatelství, Praha, ČSSR
- 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.
- Smith, P.M.C., C.A. Atkins (2002) Purine biosynthesis. Big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation. *Plant Physiology* 128: 793-802.
- 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.
- Špaldon E. a kolektiv (1986) Rostlinná výroba, pp 230-235, Státní zemědělské nakladatelství, Praha, ČSSR

- Šípal a kolektiv (1992), Biochemie, pp 176-180, Státní pedagogické nakladatelství. Praha, ČR
- 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.
- Turčinov H., 2011. Identifizierung und charakterisierung der Ribohydrolase-(RH)-Familie aus dem Laubmoos *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. und ihr funktionelle *knockout*. Department Biologie der Fakultät Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften. Universität Hamburg, Hamburg.
- Verseés W. and Steyaert J. (2003) Catalysis by nucleoside hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology* 13: 731-738.
- Verseés W., Decanniere K, Pelle R., Depoorter J., Brosens E, Parkin D.W., Steyaert J. (2001) Structure and function of a novel purine specific nucleoside hydrolase from *Trypanosoma vivax*. *Journal of Molecular Biology* 307: 1363-1379.
- Verseés W., Van Holsbeke E., De Vos S., Decanniere K., Zegers I., Steyaert J. (2003) Cloning, preliminary characterization and crystallization of nucleoside hydrolases from *Caenorhabditis elegans* and *Campylobacter jejuni*. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography* 59: 1087-1089
- Vincenzetti S, Cambi A, Neuhard J, Schnorr K, Grelloni M, Vita A. 1999. Cloning, Wagner, K.G., A.I. Backer (1992) Dynamics of nucleotides in plants studied on a cellular level. In: K.W. Jeon, M. Friedlander (Hrsg.) *International Review of Cytology*. Academic Press, San Diego: 1-84.
- Walsh TA, Green SB, Larrinua IM, Schmitzer PR. 2001. Characterisation of plant, 125:1001–11
- 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.