

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**N-acetylaminotransferasa z mechu *Physcomitrella*
patens**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Jan Tancer
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. David Kopečný, Ph.D.
Rok:	2021

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

V Olomouci dne 10.5.2021

.....
Jan Tancer

Velmi rád bych poděkoval vedoucímu své práce Mgr. Davidu Kopečnému, Ph.D. za jeho odborné vedení, trpělivost a rady při zpracování bakalářské práce. Dále bych rád poděkoval Mgr. Martině Kopečné, Ph.D. za pomoc a rady při zpracování experimentální části této práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Jan Tancer
Název práce	N-acetylaminotransferasa z mechu <i>Physcomitrella patens</i>
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. David Kopečný, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021

Abstrakt

Tato bakalářská práce je věnována N-acetylaminotransferase (NATA) z mechu *Physcomitrella patens*. V teoretické části je popsán metabolismus polyaminů, jejich syntéza a degradace se zaměřením na acetylaci a známé enzymy u rostlin a savců. V experimentální části byl klonován gen *PpNATA* do expresního vektoru pET-28a. Expresí genu v buňkách *E.coli* byl získán rekombinantní protein obsahující histidinovou kotvu umožňující purifikaci afinitní chromatografií. Pomocí metody SDS-PAGE byla ověřena produkce proteinu, čistota a metodou nano-diferenciální skenovací fluorimetrie bylo ověřeno stabilita proteinu a stabilizace vazbou na acetyl-CoA. Pomocí bioinformatických postupů byla predikována sekundární a terciární struktura proteinu na základě dostupných struktur savčí N-acetylaminotransferasy a dále bylo analyzováno vazebné místo pro vazbu acetyl-CoA v modelu *PpNATA*.

Klíčová slova	acetylace, heterologní exprese, <i>Physcomitrella patens</i> , polyaminy, transferasa
Počet stran	67
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Jan Tancer
Title	N-acetylaminotransferase from moss <i>Physcomitrella patens</i>
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. David Kopečný, Ph.D.
The year of presentation	2021

Abstract

This bachelor thesis is focused on the N-acetyl aminotransferase (NATA) from the moss *Physcomitrella patens*. The theoretical part describes the metabolism of polyamines, their synthesis and degradation with a focus on acetylation and known enzymes in plants and mammals. In the experimental part, the *PpNATA* gene was cloned into the expression vector pET-28a. The gene was expressed in *E. coli* cells yielding a recombinant protein comprising a histidine-tag allowing the affinity chromatography purification. The protein production and purity were verified by SDS-PAGE, and protein stability and the effect of acetyl-CoA binding was analyzed by the nano-differential scanning fluorimetry. Bioinformatic approaches were used to predict the secondary and tertiary structure of the protein was predicted based on the available structural data of N-acetyl aminotransferases, and the binding site for acetyl-CoA in the *PpNATA* model was further analyzed.

Keywords	acetylation, heterologous expression, <i>Physcomitrella patens</i> , polyamines, transferase
Number of pages	67
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1	ÚVOD	8
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	9
2.1.	Polyaminy	9
2.2.	Biosyntéza polyaminů	11
2.3.	Oxidace polyaminů	12
2.4.	Arylamin-N-acetyltransferasy	14
2.4.1.	Lidské N-acetyltransferasy (NAT)	16
2.4.2.	Spermidin/spermin-N-acetyltransferasa (SSAT)	17
2.4.3.	N-acetyltransferasy (NATA) v rostlinách	23
2.5.	Acetyl Co-A	25
2.6.	Přenos acetylu – acetylace histonů	26
2.6.1.	Přenos acetylu - histonacetyltransferasa	26
2.7.	Rodina enzymů GNAT	27
2.8.	<i>Physcomitrella patens</i>	28
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
3.1.	Materiál	30
3.1.1.	Použitý biologický materiál	30
3.1.2.	Použitá chemikálie	30
3.1.3.	Použitá kity a návody	31
3.1.4.	Použitá přístroje	31
3.2.	Metody	32
3.2.1.	Polymerázová řetězová reakce	32
3.2.2.	Elektroforetická separace DNA a purifikace	33
3.2.3.	Klonování cDNA do vektoru pET-28a	33
3.2.4.	Transformace bakteriálních buněk <i>Escherichia coli</i>	34
3.2.5.	Purifikace plasmidové DNA a screening klonů	35
3.2.6.	Produkce rekombinantního proteinu	35
3.2.7.	Extrakce rekombinantního proteinu PpNATA	36
3.2.8.	Purifikace afinitní chromatografií	36
3.2.9.	SDS – PAGE	37
3.2.10.	Nano-diferenciální skenovací fluorimetrie (nano-DSF)	38
3.3.	Bioinformatické servery	39
3.3.1.	Phytozome	39
3.3.2.	UniProt	39
3.3.3.	Phyre 2	39
3.3.4.	PSIPRED/DISOPRED	39
4	VÝSLEDKY	40
4.1.	Klonování	40

4.2. Produkce a purifikace rekombinantního proteinu	42
4.3. Stanovení stability proteinu	44
4.4. Porovnání sekvencí savčích a rostlinných N-acetyltransferas	45
4.5. Predikce sekundární struktury (PSIPRED)	48
4.6. Predikce sekundární struktury (DISOPRED)	50
4.7. Predikce sekundární struktury (Phyre 2).....	51
4.8. Predikce terciární struktury	52
4.9. Vazba acetyl-CoA v lidské a rostlinné N-acetyltransferase.....	55
5 DISKUZE	57
6 ZÁVĚR	60
7 LITERATURA	61
8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	66

CÍLE

Teoretická část

- Vypracování literární rešerše na téma metabolismus polyaminů, jejich syntézy a degradace a dosavadních poznatků k funkci N-acetyltransferas

Experimentální část

- Klonování a purifikace N-acetyltransferasy (NATA) z mechu *Physcomitrella patens*, ověření stability proteinu
- Porovnání sekvencí savčích a rostlinných N-acetyltransferas
- Predikce sekundární a terciární struktury mechové NATA

1 ÚVOD

N-acetyltransferasy (NAT) katalyzují přenos acetylové skupiny z acetyl-CoA na arylaminy, arylhydraziny nebo N-hydroxyarylaminy. NAT katalyzují tři druhy reakcí. Jedná se o N-acetylaci, O-acetylaci a N,O-acetylaci. Zejména N-acetylace hraje důležitou roli v buňkách. Univerzálním mechanismem se jeví ping pongový bi-bi mechanismus.

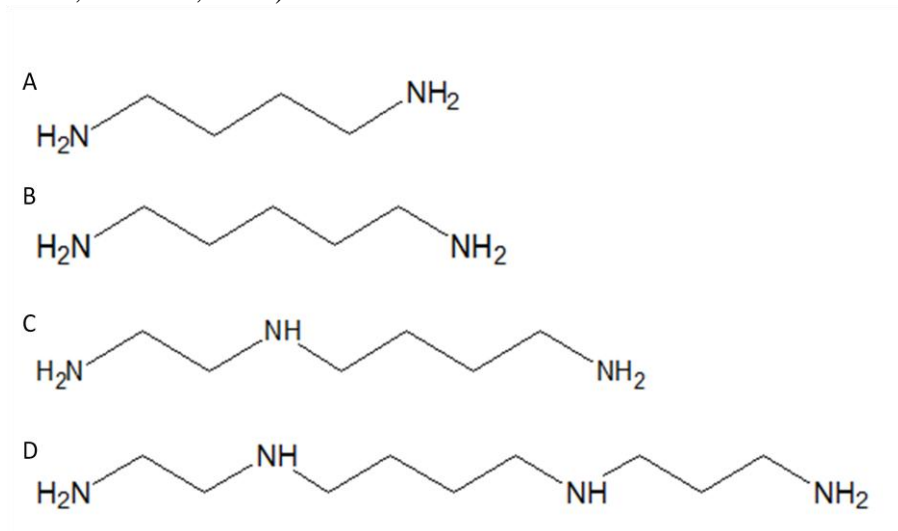
Enzymy NAT se vyskytují u savců, bakterií, rostlin a hub. U lidí existují tři lokusy NAT, z nichž jeden je pseudogen. Lidské NAT hrají významnou roli při metabolismu léčiv nebo v případě různých onemocnění. V případě rostlin, NAT katalyzují acetylaci putrescinu, ornithinu a diaminopropanu. Acetylované substráty mají vliv na uzavírání stomat listů nebo na akumulaci peroxidu vodíku v buňkách.

Práce je zaměřena na N-acetylaminotransferasu z mechu *Physcomitrella patens* (*PpNATA*), ve které se nachází pouze jeden gen pro tento protein. Cílem práce je klonování genu *PpNATA*, jeho následná exprese a purifikace rekombinantního proteinu. U získaného proteinu bude dále studována jeho stabilita, a také predikována sekundární a terciární struktura pomocí bioinformatických postupů. Získané poznatky přispějí k podrobnější charakterizaci tohoto enzymu.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1. Polyaminy

Polyaminy jsou alifatické polykationtové sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností. Nacházejí se v buňkách napříč všemi živými organismy (Kusano *et al.*, 2008). Homeostázy polyaminů v buňce je dosaženo zejména regulací jejich syntézy a katabolismu. Vyskytují se volné, konjugované nebo ve vázané formě s různými makromolekulami. Mezi nejvýznamnější polyaminy vyskytující se u živočichů, rostlin a bakterií se řadí diamin putrescin (Put; butan-1,4-diamin), diamin kadaverin (pentan-1,4-diamin), tetraamin spermin (Spm; [*N,N'*-bis(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin]) a triamin spermidin (Spd; [*N*-(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin]) (Obr. 1), (Cervelli *et al.*, 2014). V bakteriích, jako je *E.coli*, je putrescin nejzastoupenějším polyaminem, zatímco u eukaryot jsou spermin a spermidin zastoupeny ve větších množstvích. V houbách, jako je na příklad *Saccharomycotina subphylum*, se spermin vůbec nevyskytuje (Gevrekci, 2017). Dalším aminem je agmatin, dekarboxylovaný arginin, který je syntetizován rostlinami, ale ne savci. Bylo prokázáno, že agmatin funguje jako neurotransmiter, ale nebylo doposud dokázáno, zda je tato funkce fyziologicky důležitá (Pegg, 2009). Dalšími polyaminy jsou norspermidin, homospermidin, homospermin, norspermin nebo thermospermin vyskytující se u bakterií, řas nebo hub (Shaw *et al.*, 2010; Michael, 2016).



Obr. 1 Nejvýznamnější polyaminy vyskytující se u živočichů, rostlin a bakterií. A – putrescin, B – kadaverin, C – spermidin, D - spermin

V rostlinných buňkách se polyaminy vyskytují zejména v cytoplazmě, pak také v chloroplastech, vakuolách nebo mitochondriích. Množství polyaminů v rostlinách se liší v závislosti na druhu rostliny, na daném orgánu, ale také na vývojovém stádiu. (Pál *et al.*, 2019).

Mezi diaminy můžeme zařadit ornitin, tryptamin, diaminopropan nebo ethylendiamin. Ornithin je neesenciální aminokyselina. Je meziproduktem v močovinovém cyklu. Dále působí jako substrát pro řadu enzymů. Podílí se na produkci růstového hormonu a hraje zásadní roli ve správné činnosti jater a imunitního systému. Studie prokázaly, že zvýšená hladina ornitinu u člověka je známkou patologických stavů. Vzniká hydrolytickým štěpením aminokyseliny argininu za katalýzy enzymu arginasy (Sivashanmugan *et al.*, 2017). Tryptamin, indolaminový metabolit tryptofanu, je amin vyskytující se v centrální nervové soustavě savců. Známé tryptaminy, jako psilocybin, fungují jako halucinogeny, což jsou látky schopné měnit smyslové vnímání nebo nálady. Hlavním strukturním komponentem, který dává halucinogenní vlastnosti je jádro indolu. Předpokládá se, že funguje jako neurotransmitter nebo neuromodulátor (Yu *et al.*, 2003; Araújo *et al.*, 2015).

Polyaminy hrají důležitou roli při oxidačním stresu rostlin. Mohou zvyšovat aktivitu různých antioxidačních enzymů nebo mohou regulovat míru oxidačního stresu způsobeného různými faktory prostředí. Také se podílejí na mnoha fyziologických procesech v buňce. Například tetraamin spermin brání produkci oxidu dusnatého (NO) v makrofázích a reguluje pohyb lidských neutrofilů. Zvýšené hladiny sperminu byly objeveny ve tkáních po poraněních, zánětech nebo infekcích (Zhang *et al.*, 1997; Kusano *et al.*, 2008).

Polyaminy se také účastní syntézy proteinů, buněčného růstu a dalších metabolických dějů. Bylo prokázáno, že vyřazení genů kódujících ornitin dekarboxylasu nebo S-adenosylmethionin dekarboxylasu, způsobilo časnou embryonální letalitu u myši (Igarashi *et al.*, 2019).

Při fyziologickém pH mají pozitivní náboj, díky kterému se mohou vázat na makromolekuly, jakými jsou DNA nebo RNA, a tím se podílejí na regulaci jejich funkcí (Kusano *et al.*, 2008). Intracelulární polyaminy se převážně nacházejí jako komplex polyamin-RNA. V případě *E.coli* se 90 % spermidinu a 48 % putrescinu nachází právě v takovém komplexu. Zjistilo se, že polyaminy stabilizují RNA tím, že jí udržují

v určité konformaci, ve které molekula RNA zůstává rozpustná a schopná interakce s jinými molekulami. Právě stabilizace nukleových kyselin je zvláště důležitá u termofilních mikroorganismů, u kterých se stále více ukazuje, že právě polyaminy hrají důležitou roli při jejich tepelné odolnosti (Gevrekci, 2017).

Poruchy v metabolismu polyaminů jsou spojeny s onkologickými onemocněními (Cervelli *et al.*, 2012). Biosyntéza zmíněných hlavních polyaminů může být navozena v reakci na patogenní infekci rostlin (Lou *et al.*, 2016).

2.2. Biosyntéza polyaminů

Prekurzory pro syntézu jsou aminokyseliny L-arginin a L-methionin. Syntéza putrescinu probíhá přes ornithin produkovaný z argininu za katalýzy enzymem arginasou (EC 3.5.3.1) a ornitin dekarboxylasou (ODC, EC 4.1.1.17). Tento enzym je tedy kritickým místem při udržování hladiny polyaminů (Pegg, 2009). Hladiny ODC reagují na mnoho podnětů, včetně hormonů, růstových faktorů, onkogenů a obsahu volných polyaminů (Casero *et al.*, 2018). Polyaminy indukují expresi proteinového inhibitoru ODC, který se nazývá antizym. Ten se může vázat na ODC monomer, a tím bránit tvorbě aktivního dimeru. Nadměrná exprese ODC může vyvolat onkogenní transformaci, což naznačuje, že tento enzym může být proonkogenem. Enzym ODC je závislý na pyridoxal fosfátu (PLP). Savčí ODC má jeden z nejkratších poločasů popsaných pro savčí proteiny. Enzymaticky aktivní ODC je homodimer, ve kterém každý monomer obsahuje dvě domény – N-terminální a C-terminální doménu (Uridales *et al.*, 2001; Bae *et al.*, 2018). Druhou alternativní cestou je syntéza putrescinu z agmatinu, který vzniká enzymatickou dekarboxylací argininu pomocí arginindekarboxylasy (ADC, EC 4.1.1.19). Agmatin slouží jako substrát pro agmatiniminohydrolasu (AIH, EC 3.4.3.12) za vzniku N-karbamoylputrescinu. Posledním krokem je hydrolýza N-karbamoylputrescinu na putrescin pomocí N-karbamoylputrescinamidohydrolasy (CPA, EC 3.5.1.53). Nicméně, pro syntézu vyšších polyaminů je vyžadována aminopropylová skupina. Tu poskytuje S-adenosylmethionindekarboxylasa (AdoMetDC) tím, že katalyzuje dekarboxylaci S-adenosylmethioninu (AdoMet) na S-adenosylmethioninamin. Spermidin a spermin jsou syntetizovány z putrescinu a aminopropylových zbytků, které jsou postupně dodány methioninem (Bitrián *et al.*, 2012). Přeměna putrescinu na spermidin probíhá za účasti enzymu spermidinsynthasy (SPDS, EC 2.5.1.16). Syntézy sperminu se účastní enzym sperminsynthasa (SPMS, EC 2.5.1.22). Lidská SPDS a SPMS patří do

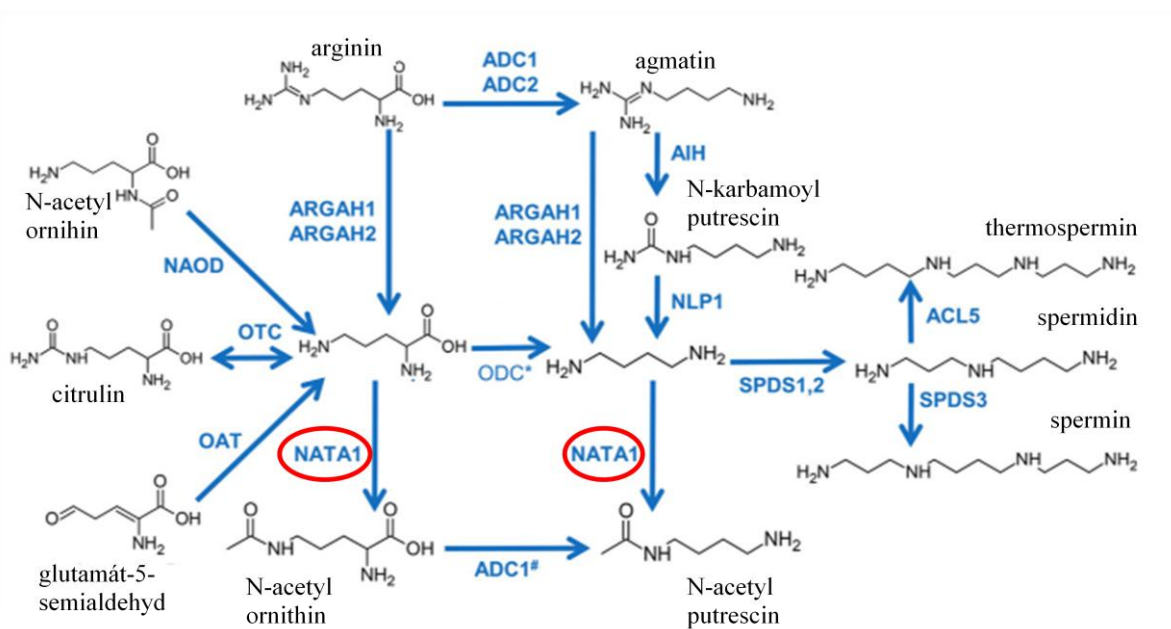
aminopropyltransferas. Oba enzymy se od sebe liší ve struktuře aktivního místa a obsahují dva konzervované zbytky asparagové kyseliny (Asp201 a Asp276), které zřejmě hrají důležitou roli v katalytickém mechanismu. Reakce těchto dvou enzymů jsou inhibovány 5'-methylthioadenosinem (Wu *et al.*, 2008).

Diamin kadaverin, strukturně podobný putrescinu, je syntetizován jinou cestou oproti ostatním polyaminům. Vzniká z L-lysinu. V bakteriích, sinicích a rostlinách je L-lysin přeměňován na kadaverin za pomoci enzymu lysin dekarboxylasy (LDC, EC 4.1.1.18). Nicméně, v savčích buňkách a u buněk hub nebyl gen pro lysin dekarboxylasu identifikován. I přes to je v savčích buňkách přítomen. Kadaverin lze převést na aminopropylovou formu (aminopropylkadaverin), která je blízkým analogem spermidinu, a může být produkována v savčích buňkách pomocí SPDS (Bekebrede *et al.*, 2020).

2.3. Oxidace polyaminů

Polyaminy jsou oxidovány heterogenní třídou aminoxidas. Diaminoxidázy (DAO) jsou aminoxidas obsahující měď (CuAO, EC 1.4.3.6). Jinou třídou aminoxidas jsou polyaminoxidas (PAO, EC 1.5.3.11-17) s kofaktorem flavindenindinukleotidem (FAD). CuAO převážně oxidují primární skupiny putrescinu a kadaverinu. Spermin a spermidin oxidují pouze v malé míře. Oxidací putrescinu vzniká 4-aminobutanal, amoniak a peroxid vodíku (Tavladoraki *et al.*, 2016). Vzniklý aminoaldehyd je metabolizován na γ -aminomáselnou kyselinu Rostlinné a bakteriální PAO katalyzují přeměnu spermidinu a sperminu na 4-aminobutanal, 1,3-diaminopropan a peroxid vodíku. To znamená, že rostlinné PAO jsou zapojeny do terminálního katabolismu polyaminů (Kusano *et al.*, 2008). Naopak savčí PAO transformují spermidin a spermin na putrescin. Oxidace polyaminů pomocí PAO vede k produkci aminoaldehydů a peroxidu vodíku, nikoli k amoniaku (Sebela *et al.*, 2001). Oxidace polyaminů pomocí PAO je hlavním zdrojem hromadění peroxidu vodíku v rostlinné tkáni vyvolané stresem. V *Arabidopsis thaliana* bylo identifikováno pět PAO isoform – PAO1 až PAO5. Z toho jsou PAO2, PAO3 a PAO4 cíleny na peroxisomy, PAO1 a PAO5 jsou cytosolické. *Arabidopsis* PAO oxidují spermin a spermidin efektivněji než N-acetylspermin a N-acetylspermidin. Sperminoxidasa (SMO) je FAD závislá aminoxidasa, která řídí zpětnou přeměnu sperminu na spermidin za současné tvorby 3-aminopropanalu a peroxidu vodíku (Kusano *et al.*, 2008; Yoda *et al.*, 2009). U člověka se gen *SMO* nachází na chromozomu 2 a existují dvě katalyticky aktivní

isoformy – SMO1 a SMO5, které se nacházejí v cytoplasmě a v buněčném jádru. SMO hraje důležitou roli při udržení homeostázy polyaminů v buňkách. Dysregulace tohoto enzymu může vést k několika patologickým stavům. Peroxid vodíku i 3-aminopropanal, patří mezi cytotoxické sloučeniny. Z toho důvodu aktivita SMO může ovlivnit fyziologii a patologii organismu (Cervelli *et al.*, 2012).



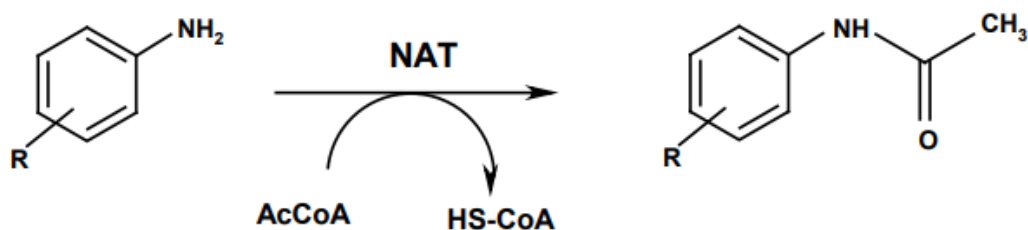
Obr. 2 Struktura polyaminů, jejich biosyntéza a vzájemná přeměna. Místa, kde účinkuje NATA, jsou vyznačena v červeném kroužku. Použité zkratky: ADC – arginin dekarboxylasa, ARGAH – arginin aminohydrolasa, NATA – N-acetyltransferasa, AIH – arginin aminohydrolysa, SPDS – spermin/spermidin synthasa, NLP – nitrilasa, ACL – acyltransferasa, NAOD – N-acetylornithin deacetylasa, OAT – ornithin acetyltransferasa, OTC – ornithin transkarbamylasa, ODC – ornithin dekarboxylasa (převzato a upraveno dle Lou *et al.*, 2020)

2.4. Arylamin-N-acetyltransferasy

Arylamin-N-acetyltransferasy (NAT, EC 2.3.1.5) jsou jinak nazývány také acetyl-CoA-dependentními N-acetyltransferasami. Katalyzují přenos acetylové skupiny (-COCH₃) z acetyl koenzymu A (AcCoA) na arylaminy, arylhydraziny a N-hydroxyarylaminy. Významně se podílejí na detoxikaci nebo bioaktivaci karcinogenů a některých léků (Kawamura *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2021).

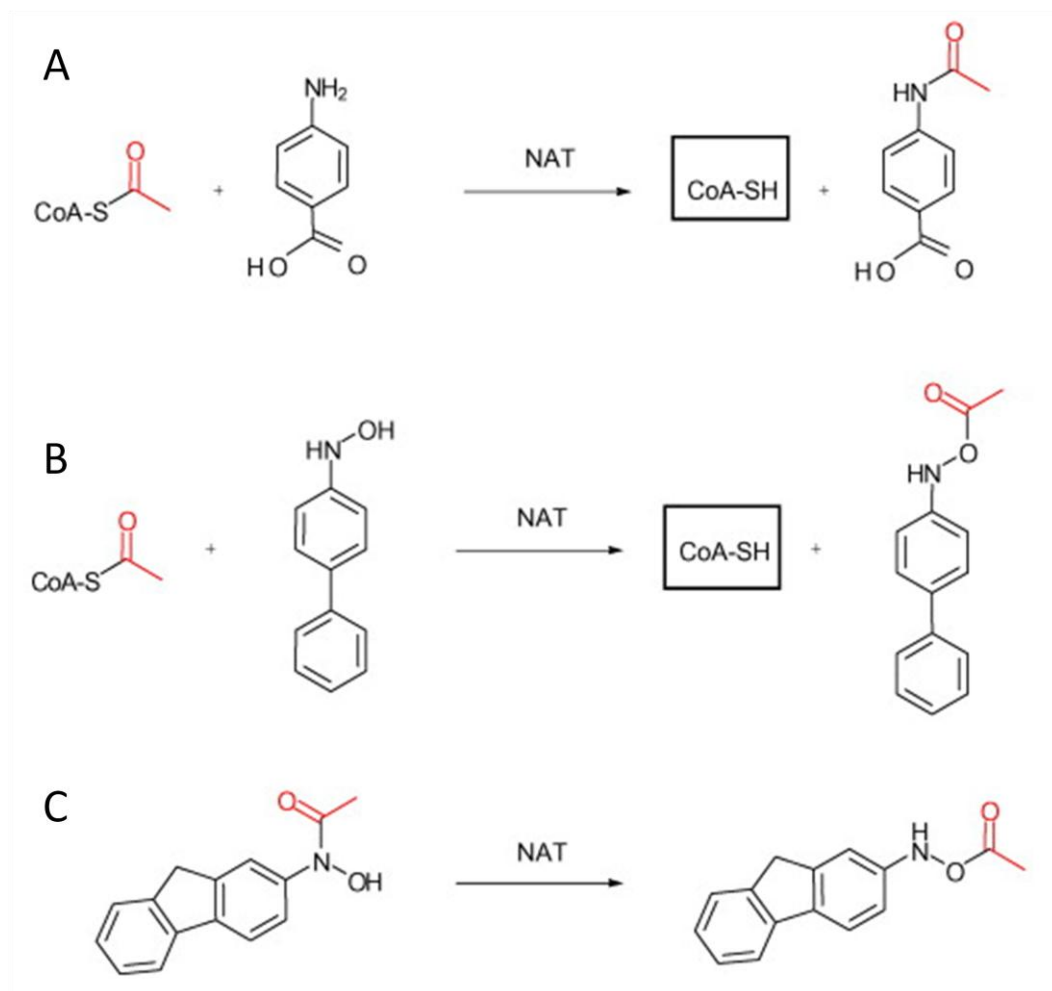
NAT katalyzují N-acetylaci (obvykle deaktivace), O-acetylaci (obvykle aktivace), ale také intramolekulární N,O-acetylaci (Obr. 3, 4), (Hein *et al.*, 2000; Sim *et al.*, 2014). Mechanismus reakce katalyzované pomocí enzymu NAT je ping pongový bi-bi. Tento mechanismus se jeví jako univerzální pro všechny aktivní NAT (Sikora *et al.*, 2008).

N-terminální acetylace se řadí mezi nejběžnější posttranslační modifikace proteinů u eukaryot. Hraje významnou roli v různých buněčných funkcích, jakou je vazba DNA, interakce protein-protein nebo stabilita proteinu (Zhang *et al.*, 2019). Během vystavení organismu cizím molekulám, jakými jsou například xenobiotika, je důležité udržet homeostázu v organismu. Hlavním mechanismem pro udržení homeostázy je xenobiotická biotransformace. Aktivita NAT se může měnit vlivem kouření, virovými infekcemi, ale také užíváním různých druhů drog (Makarova, 2008).



Obr. 3 Schéma reakce katalyzované NAT. Přenos acetylu z donoru na akceptor (převzato a upraveno dle Jancova *et al.*, 2010).

Enzymy NAT byly objeveny a charakterizovány u řady savců, bakterií nebo hub. Bylo zjištěno, že u bakterií je množství acetylovaných proteinů mnohem nižší než u eukaryot (Zhang *et al*, 2019). U lidí, myši a potkanů existují tři lokusy NAT, avšak u lidí je jeden z nich pseudogen – NATP1. U všech isoenzymů savců existuje vysoký stupeň homologie (více než 80 %), (Wang *et al*, 2005; Jancova *et al*, 2010).



Obr. 4 Reakce katalyzované prostřednictvím NAT. A – N-acetylace, přenos acetylu z donoru na aminovou skupinu akceptoru; B – O-acetylace, přenos acetylu z donoru na atom kyslíku akceptoru; C – N,O-acetylace, intramolekulární přenos acetylu (převzato a upraveno dle Sim *et al*, 2014).

2.4.1. Lidské N-acetyltransferasy (NAT)

U lidí existují dva odlišné isoenzymy N-acetyltransferas – N-acetyltransferasa 1 (NAT1) a N-acetyltransferasa 2 (NAT2). Oba geny NAT a pseudogen NATP1 jsou lokalizovány na krátkém raménku chromozomu 8, konkrétně 8p22. Oba lidské isoenzymy jsou polymorfní. NAT1 a NAT2 mají různou substrátovou specifitu. Zatímco lidská NAT1 má specifitu pro p-aminosalicylát, p-aminobenzoovou kyselinu a p-aminobenzoylglutamát, lidská NAT2 je specifická pro isonikotinylhydrazid (isoniazid) a sulfamethazin (Payton *et al.*, 1999; Kawamura *et al.*, 2005). N-acetylace isoniazidu nebo sulfamethazinu rozdělila lidskou populaci na rychlé, střední a pomalé acetylátorové fenotypy. Různé etnické populace se mohou výrazně lišit v metabolismu léčiv. Polymorfismus těchto enzymů má také velký význam pro pochopení nežádoucích vedlejších účinků. Pomalý fenotyp NAT zvyšuje citlivost na toxicitu isoniazidů a na rakovinu močového měchýře (Sim *et al.*, 2014). Etnické rozdíly v NAT1 a NAT2 genotypové frekvenci mohou být faktorem výskytu rakoviny (Hein *et al.*, 2000). Isoniazid, který je doporučený při léčbě tuberkulózy, je metabolizován enzymem NAT2 (Toure *et al.*, 2016). Epidemiologické studie naznačují, že polymorfismy NAT1 a NAT2 ovlivňují predispozici k rakovině močového měchýře, prsu, hlavy a krku nebo plic. Vliv NAT1 a NAT2 genotypu na riziko rakoviny se liší podle místa orgánu, což pravděpodobně odráží tkáňovou specifitu těchto isoenzymů. NAT1 je nadměrně exprimován například při karcinomu prsu (Hein *et al.*, 2000; Sim *et al.*, 2014; Butcher *et al.*, 2020).

Jedná se o cytosolické enzymy. Jejich výskyt je lokalizován v mnoha tkáních. NAT1 má všudypřítomnou tkáňovou distribuci, naopak NAT2 se vyskytuje hlavně v játrech, tlustém střevě a střevním epitelu. NAT1 může hrát roli v metabolismu folátů, protože katabolit kyseliny listové, p-aminobenzoylglutamát, je N-acetylován pomocí NAT1 (Wang *et al.*, 2005; Jancova *et al.*, 2010).

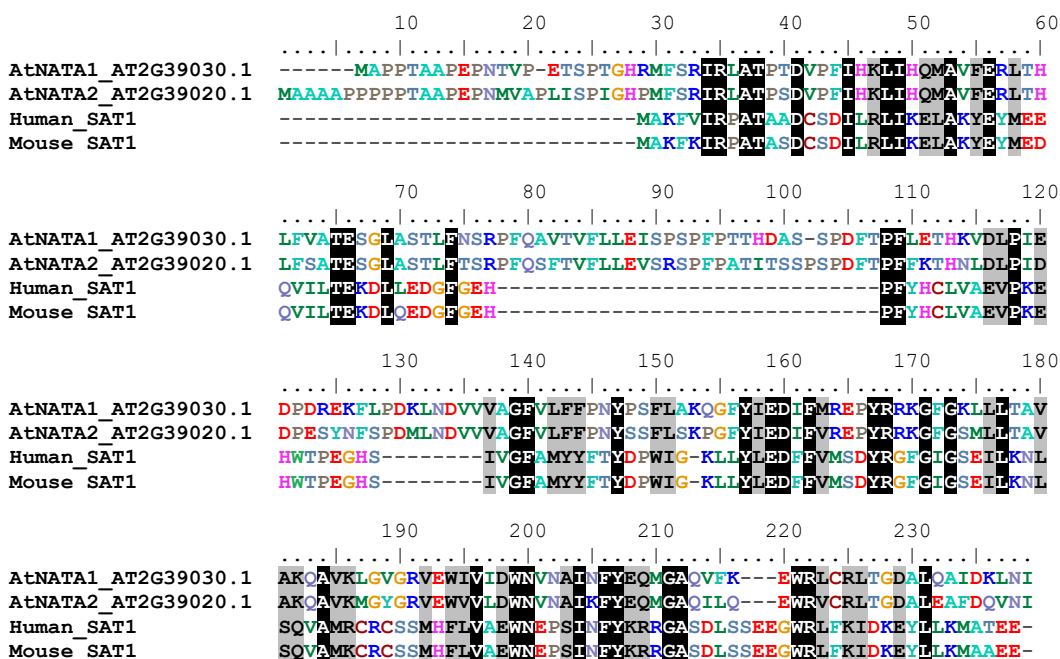
Inhibiční vliv na NAT1, nikoli NAT2, má kyselina kávová a kyselina gallová. NAT2 je inhibována skopuletinem nebo kurkuminem (Kukongviriyapan *et al.*, 2006).

2.4.2. Spermidin/spermin-N-acetyltransferasa (SSAT)

Spermidin/spermin-N-acetyltransferasa (SSAT) se řadí mezi diaminové N-acetyltransferasy u živočichů. Lidský SSAT (hSSAT, SAT1) je lokalizován na chromozomu X, konkrétně na Xp22.1 a souvisí s mnoha chorobami, jako je například rakovina tlustého střeva (Zhu *et al.*, 2006).

HsSSAT1 byl považován za cíl léčby rakoviny. Genový lokus BC011751 z *Homo sapiens* byl označen jako HsSSAT2 kvůli své 46% sekvenční identitě s HsSSAT1. Nadměrná exprese HsSSAT2 nezvýšila množství acetylpolyaminů ani nezměnila hladinu buněčných polyaminů. Zjistilo se, že HsSSAT2 nepřenáší skupinu acetyl-CoA na polyaminy, ale spíše na thialysin [2-amino-3-(2-aminoethylsulfanyl)propanová kyselina], který je strukturálním analogem L-lysinu. Proto byl přejmenován na thialysin acetyltransferasu. Fyziologická role HsSSAT2 enzymu je stále nejasná (Han *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2010).

Nejblížejšími homology SSAT jsou u rostlin právě NATA geny (Obr. 5).



Obr. 5 Porovnání sekvencí obou N-acetyltransferas z *A. thaliana* a dvou savčích sekvencí spermidin/spermin-N-acetyltransferasy.

Enzym SSAT1 má obvykle krátký biologický poločas, je účinně ubikvitylován a následně degradován proteazomem. Oproti SSAT1 je SSAT2 stabilnější a také mu chybí lysinový zbytek v poloze 87. Tato poloha může být zásadním místem pro ubikvitinaci proteinu SSAT1 (Coleman *et al.*, 2004). Topologie a struktura centrálního jádra každého monomeru SSAT je typická pro členy rodiny GNAT (Bewley *et al.*, 2006).

SSAT je obvykle přítomen ve velmi nízkých množstvích, ale je snadno indukovaný zvýšenými koncentracemi volných polyaminů (Casero *et al.*, 2018). Katalyzuje N-acetylaci sperminu a spermidinu, tím že přidává acetylové skupiny na jejich aminopropylvé konce. Tím vznikají méně nabitě deriváty, které se vylučují z buňky nebo podléhají dalšímu metabolismu. Jedná se o bod obratu metabolické dráhy polyaminů (Zhu *et al.*, 2006). Tímto je regulován obsah buněčných polyaminů. SSAT je velmi přísně regulován, aby se udržela polyaminová homeostáza (Pegg, 2008). Nadměrná exprese SSAT způsobuje rychlé vyčerpání zásoby polyaminů (Ou *et al.*, 2016). Bylo zjištěno, že aktivita SSAT spojuje metabolismus polyaminů s metabolismem lipidů a sacharidů prostřednictvím změn v obsahu acetyl-CoA a ATP (Pegg, 2008).

U lidských SSAT1 a SSAT2 byla zkoumána jejich substrátová specifita a kinetické vlastnosti (Tab. 1). Bylo zjištěno, že nejlepším substrátem je spermidin (Coleman *et al.*, 2004).

Tab. 1 Kinetická analýza lidské SSAT1 a SSAT2 (převzato a upraveno dle Coleman *et al.*, 2004)

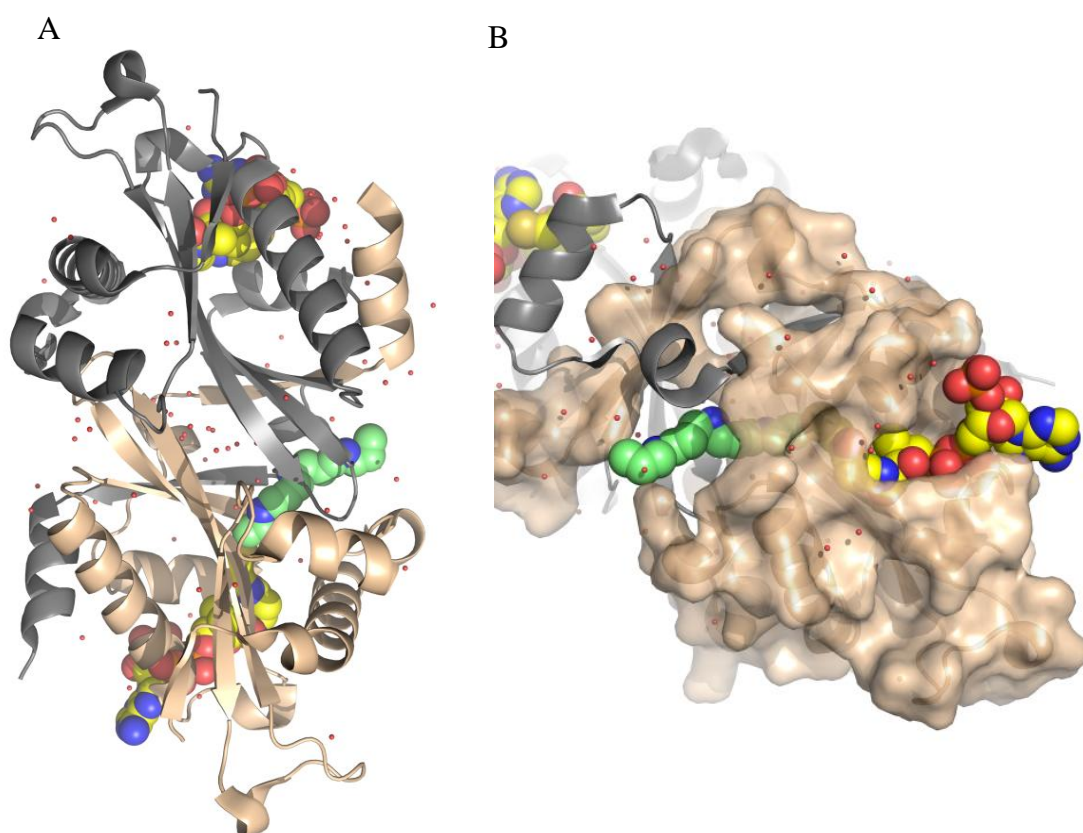
	Substrát	K_m (mmol l ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ s ⁻¹)
Lidská SSAT2	Putrescin	8,20	0,0023	0,28
	Spermidin	13,40	0,0072	0,54
	Spermin	4,80	0,0020	0,42
	1,3-diaminopropan	1,60	0,0137	8,70
	Norspermidin	6,00	0,0168	2,80
	Thialysin	0,29	5,250	18100,00
Lidská SSAT1	Spermidin	0,058	8,700	150000,00
	Spermin	0,0037	5,000	1351350,00
	Thialysin	Žádná reakce	-	-

V článku Hegde *et al.*, 2007, byly publikovány kinetické parametry pro lidskou SSAT. Hodnoty pro acetyl-CoA byly stanoveny při fixní koncentraci spermidinu. Na základě výše zmíněného článku bylo pozorováno, že acetyl-CoA byl preferovaným donorem acetylu.

Tab. 2 Kinetické parametry pro acetyl-CoA (převzato a upraveno dle Hegde *et al.*, 2007)

Substrát	K_m ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	k_{cat} (min^{-1})	V/K ($\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$)
Acetyl-CoA	$3,8 \pm 0,2$	590 ± 9	$155 \cdot 10^6$

Ve struktuře mutantu K26R lidské SSAT1 (2B4B), (Obr.6), která je publikovaná, je CoA vázán v obou podjednotkách dimeru, zatímco diamin je navázán pouze v jedné. Skrze strukturu prochází tunel, na jehož obou koncích jsou navázány acetyl-CoA. Uprostřed struktury dochází k přenosu acetylu na diamin. Acetyl-CoA i diamin jsou z venkovní části přístupny solventu, ale místo, kde dochází k reakci je uloženo uvnitř struktury. Detaily mechanismu jsou vysvětleny v článku Bewley *et al.*, 2006. Vedle této struktury existuje ještě několik struktur lidských SSAT1, které jsou označeny pomocí PDB kódů na serveru <https://www.rcsb.org/>: 2B3U, 2B3V, 2B4D, 2B58, 2B5G, 2F5I, 2FXF, 2G3T a 2JEV.



Obr. 6 Sekundární struktura lidského SSAT1 (2B4B). (A) Zelenou barvou je zobrazen navázaný N-ethyl-N-[3-(propylamino)propyl]propan-1,3-diamin. Žlutou barvou je zobrazen navázaný CoA. (B) Zelenou barvou je zobrazen navázaný N-ethyl-N-[3-(propylamino)propyl]propan-1,3-diamin. Žlutou barvou je zobrazen navázaný CoA. Je zde vyobrazen také povrch.

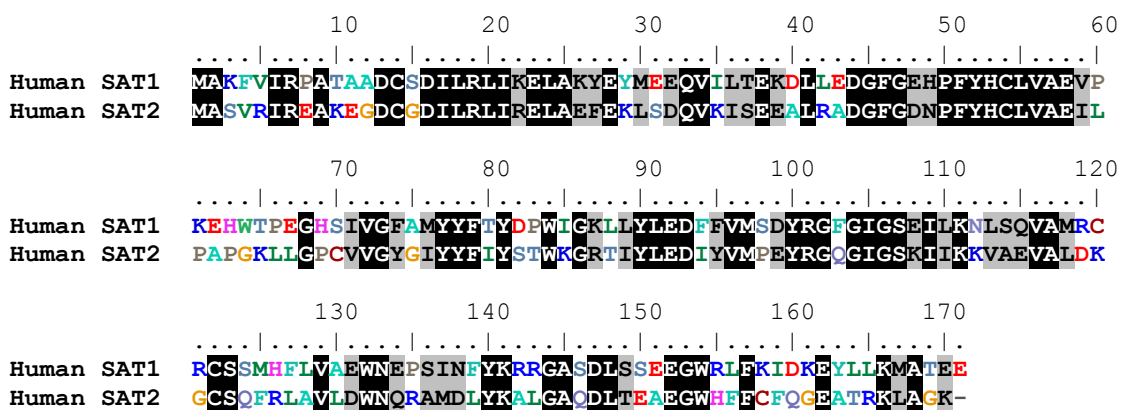
Za pomoci serveru PDB (<https://www.wwpdb.org/>) byly vybrány struktury lidských SAT1, SAT2 a následně seskupeny (Tab. 3). U jednotlivých struktur byly popsány navázané ligandy a případné mutace.

Tab. 3 Známé struktury lidských SSAT v PDB databance (<https://www.wwpdb.org/>)

Organismus	PDB ID	Ligandy	Mutace	Citace
Human SAT1	2B3U	SO ₄ ²⁻	K26R	Bewley <i>et al.</i> , 2006
	2B3V	Acetyl-CoA	K26R	Bewley <i>et al.</i> , 2006
	2B4B	CoA, B33	K6R	Bewley <i>et al.</i> , 2006
	2B4D	CoA	-	Bewley <i>et al.</i> , 2006
	2B58	CoA	K26R	Bewley <i>et al.</i> , 2006
	2B5G	SO ₄ ²⁻	-	Bewley <i>et al.</i> , 2006
	2F5I	-	-	Zhu <i>et al.</i> , 2006
	2FXF	Acetyl-CoA, acetát, Ca ²⁺	-	Zhu <i>et al.</i> , 2006
	2G3T	-	-	Zhu <i>et al.</i> , 2006
	2JEV	NHQ	-	Hegde <i>et al.</i> , 2007
Human SAT2	2BEI	Acetyl-CoA	-	Han <i>et al.</i> , 2006
	2Q4V	Acetyl-CoA	-	Levin <i>et al.</i> , 2007

B-3-3 – N-ethyl-N-[3-(propylamino)propyl]propan-1,3-diamin, NHQ – N1-acetylspermin-S-CoA

Dále byla porovnána sekvence lidské SAT1 (P21673) a lidské SAT2 (Q96F10), (Obr. 7) a následně srovnání jejich identity v proteinech pomocí serveru LALIGN (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/lalign/>). Bylo zjištěno, že proteinová identita je 46 % a nukleotidová identita činí 75 %.



Obr. 7 Porovnání sekvence lidské SAT1 a lidské SAT2.

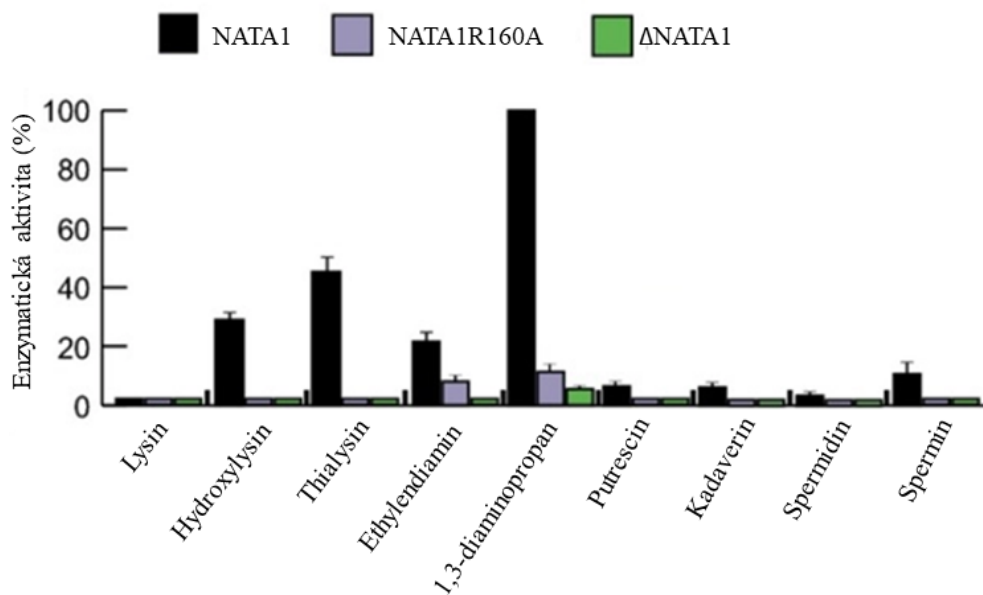
2.4.3. N-acetyltransferasy (NATA) v rostlinách

Geny *NATA1* a *NATA2* z modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* jsou nejbližšími homology známých savčích polyaminacetyltransferas. *AtNATA1* katalyzuje acetylaci putrescinu na výsledný N-acetylputrescin. Acetylovaný putrescin hraje roli v regulaci akumulace peroxidu vodíku. *AtNATA1* také produkuje N-acetylnornithin z ornitinu a acetyluje 1,3-diaminopropan, který je uváděn jako produkt oxidační deaminace sperminu a spermidinu. 1,3-diaminopropan se vyskytuje jak v bakteriích, tak i u člověka. V rostlinách je syntetizován v metabolismu polyaminů, společně s peroxidem vodíku. Jeho koncentrace je závislá na množství polyaminů. Bylo prokázáno, že *NATA1* má vyšší afinitu k ornitinu než k putrescinu. Acetylace 1,3-diaminopropanu spouští jeho latentní aktivitu, která pak blokuje aktivní transport iontů přes plazmatickou membránu, které jsou regulovány ABA, aby se zpomalilo uzavírání stomat. N-acetyl-1,3-diaminopropan je tedy antagonistou stomatálního uzavírání vyvolaného kyselinou abscisovou (ABA). Zdá se, že neacetylovaný DAP je bez biologické aktivity což dokazuje, že acetylace je klíčovou reakcí pro jeho aktivaci. ABA podporuje zavření stomat listů za účelem udržení vody, ale na úkor dostupnosti oxidu uhličitého (Jammes *et al*, 2014; Lou *et al*, 2016; Lou *et al.*, 2020).

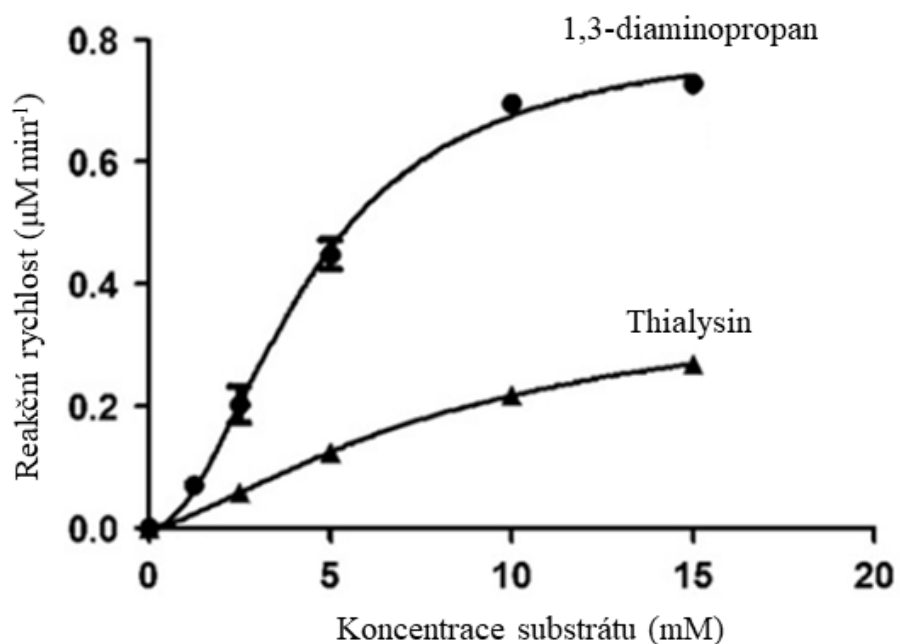
NATA1 obsahuje Gcn5 doménu, která byla identifikována v histonacetyltransferasach. Bylo zjištěno, že *NATA1* je v sekvenci blíže lidským SSAT než dalším rostlinným N-acetyltransferasam (Lou *et al.*, 2020).

Expese *NATA1* je silně indukována signální molekulou kyselinou jasmonovou nebo methyl jasmonátem při obraně rostlin, a také koronatinem, což je toxin produkovaný bakterií *Pseudomonas syringae*. V případě bakterií na povrchu listů, může koronatin zabránit uzavírání stomat. *NATA1* v rostlinném floému přeměňuje esenciální aminokyseliny na formu, kterou hmyz již nemůže využít. To vede ke zvýšení rezistence vůči mšicím (Adio *et al.*, 2011; Lou *et al*, 2016).

Expese *NATA1*, ale nikoli *NATA2*, způsobují akumulaci N-acetylputrescinu. Gen *NATA2* přímo sousedí s genem *NATA1* v genomu *Arabidopsis thaliana* a kóduje protein, který je z 80 % identický s *NATA1*. Nicméně, expese *NATA2* není indukována kyselinou jasmonovou nebo koronatinem. *NATA2* je během vývoje *Arabidopsis* exprimována na rovnoměrně vysoké úrovni (Adio *et al.*, 2011; Lou *et al*, 2016).



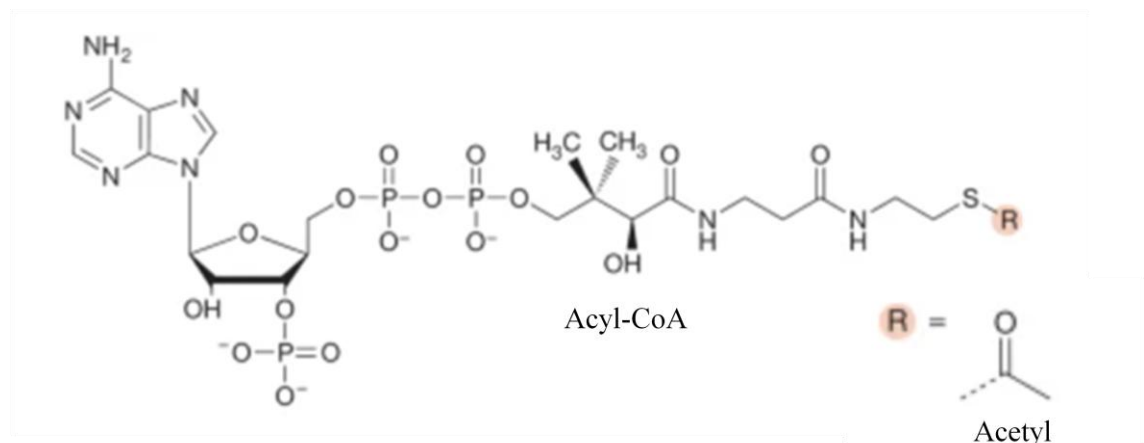
Obr. 8 Aktivita N-acetyltransferasy NATA1 testovaná s uvedenými aminy jako akceptory acetylu. Nejlepším substrátem pro NATA1 se jeví 1,3-diaminopropan (převzato a upraveno dle Jammes *et al.*, 2014).



Obr. 9 Enzymatická kinetika NATA1 na 1,3-diaminopropan a thialysin. Nejlepším substrátem pro NATA1 je 1,3-diaminopropan (převzato a upraveno dle Jammes *et al.*, 2014).

2.5. Acetyl Co-A

Acetyl-CoA je membránově neprostupující molekula tvořena acetylovou skupinou (CH_3CO) spojená s koenzymem A (CoA) prostřednictvím thioesterové vazby. Jedná se o metabolit odvozený z katabolismu glukózy, mastných kyselin a aminokyselin. V průběhu glykolýzy se glukóza rozkládá na dvě molekuly acetyl-CoA. Při přebytku sacharidů nebo glukózy dochází k nasměrování acetyl-CoA z mitochondrií zpět do cytosolu pro syntézu mastných kyselin a sterolů. Zásoby acetyl-CoA se také využívají pro acylaci histonů nebo aktivaci genové exprese (Shi *et al*, 2015).



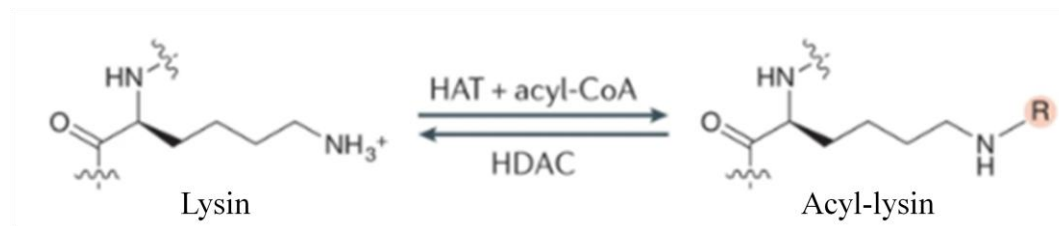
Obr. 10 Obecná struktura acyl-CoA, kde R zobrazuje specifickou skupinu (převzato a upraveno dle Sabari *et al.*, 2017).

2.6. Přenos acetylu – acetylace histonů

Proces acetylace histonů v eukaryotických buňkách byl objeven před mnoha lety. Od začátku 70. let byly izolovány různé aktivity histonacetyltransferas (HAT), (Sternner *et al.*, 2000). Histony podléhají velké škále posttranslačních modifikací, které charakterizují a formují funkční stavy chromatinu. Chyby způsobené v regulaci těchto modifikací jsou úzce spojeny s řadou onemocnění – neurologické nebo vývojové poruchy, ale také různé druhy rakoviny. Funkční významy všech acetylačních modifikací nebyly zcela objasněny, avšak mnoho studií ukázalo, že acetylace histonu souvisí s genovou expresí a regulací. Úzký vztah panuje mezi acetylací histonu a rakovinou prsu (Sabari *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2018). Acetylace histonů jsou řízeny rovnováhou aktivity mezi (HAT) a histondeacetylasy (HDAC). HAT lze rozdělit do pěti rodin: rodina p300/CBP, rodina GNAT, rodina SRC, rodina MYST a rodina TAFII 250.

2.6.1. Přenos acetylu - histonacetyltransferasa

Histonacetyltransferasy (HAT) katalyzují přenos acetylové skupiny z acetyl koenzymu A na ϵ -aminoskupiny lysinových postranních řetězců v N-koncové oblasti histonu. U některých HAT se nedávno ukázalo, že acetylují lysinové zbytky v proteinech, souvisejících s transkripcí. Enzymy HAT byly rozděleny do dvou kategorií. HAT typu A se nachází v jádře, zatímco HAT typu B se nachází v cytoplazmě. HAT typu B nejspíše zaujímají v buňce úklidovou roli. Katalyzují acetylaci volných histonů v cytoplazmě, které se následně transportují do jádra, kde mohou být poté deacetylovány a zakomponovány do chromatinu. HAT typu A acetylují nukleosomální histony v chromatinu v jádře (Sternner *et al.*, 2000). Acetylace histonu neutralizuje pozitivní náboj lysinových zbytků, které ovlivňují protein-protein interakci mezi histony se záporně nabitým hlavním řetězcem DNA. To vede k uvolněnější struktuře chromatinu. HDAC naopak katalyzují deacetylaci hydrolysou acetylových skupin z lysinových zbytků a mohou vést k tvorbě heterochromatinu (Gil *et al.*, 2017).

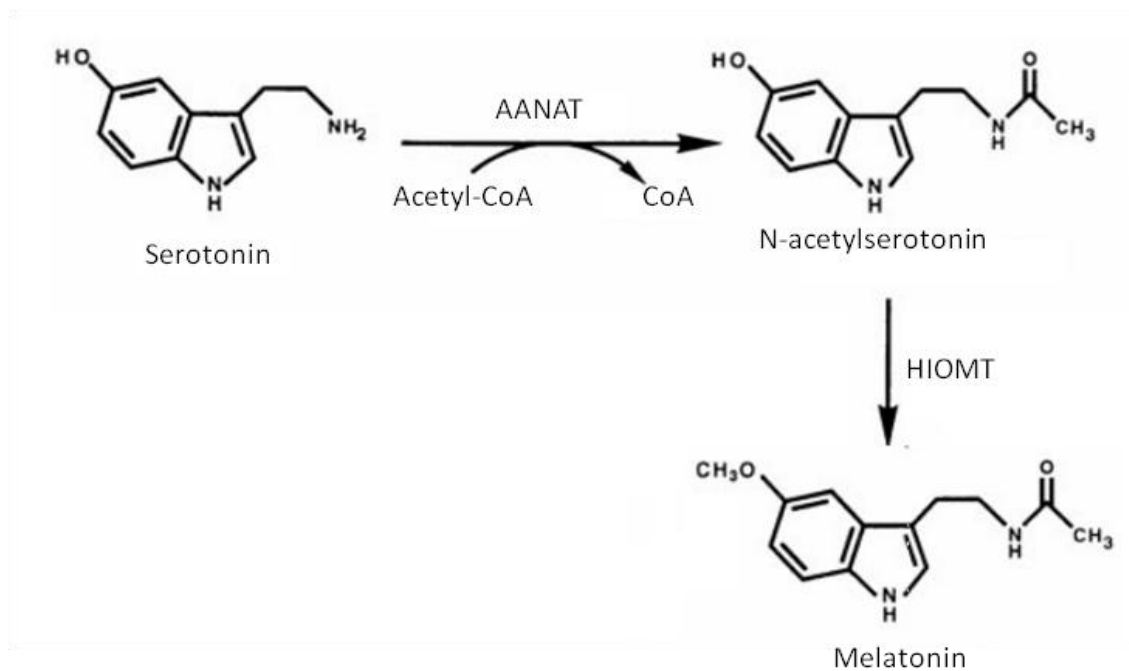


Obr. 11 Přidání nebo odstranění acylové skupiny z histonu Lys se provádí v přítomnosti histonacetyltransferas (HAT) nebo histondeacetyltransferas (HDAC), (převzato a upraveno dle Sabari *et al.*, 2017).

2.7. Rodina enzymů GNAT

Skupina acetyl-CoA-dependentních N-acetyltransferas (Modis *et al.*, 1998). Všichni zástupci této rodiny sdílejí společné strukturní rysy spojení s vazbou acetyl-CoA (Klein, 2007). GNAT katalyzují přenos acylové skupiny z acylovaného koenzymu A (Acyl-CoA) na aminoskupinu různých substrátů. Většina enzymů GNAT využívá i acetyl-CoA (Salah Ud-Din *et al.*, 2016). Významně se liší na C-konci, zatímco N-konec je poměrně konzervovaný. Enzymy z této rodiny plní různé funkce, mezi které patří metabolismus aminokyselin, rezistence na léky, detoxikace, aktivace transkripčního faktoru nebo acetylace histonů (Modis *et al.*, 1998).

Arylalkylamin N-acetyltransferasa (AANAT; EC 2.1.3.87) neboli serotonin N-acetyltransferasa je enzym, který je součástí rodiny GNAT. Jedná se o předposlední enzym v biosyntéze melatoninu (5-methoxy-N-acetyltryptamin) ze serotoninu (Mesangeau *et al.*, 2003). Katalyzuje reakci konverze serotoninu na N-acetylserotonin, který je dále převeden na melatonin pomocí hydroxyindol-O-methyltransferasou (HIOMT; EC 2.1.1.4). AANAT je regulován pomocí cAMP. AANAT se vyskytuje v epifýze a na sítnici oka. V sítnici je umístěn na receptorech. Členové rodiny AANAT byli nalezeni pouze u grampozitivních bakterií, hub, řas, hlavonožců a obratlovců (Zheng *et al.*, 2001).



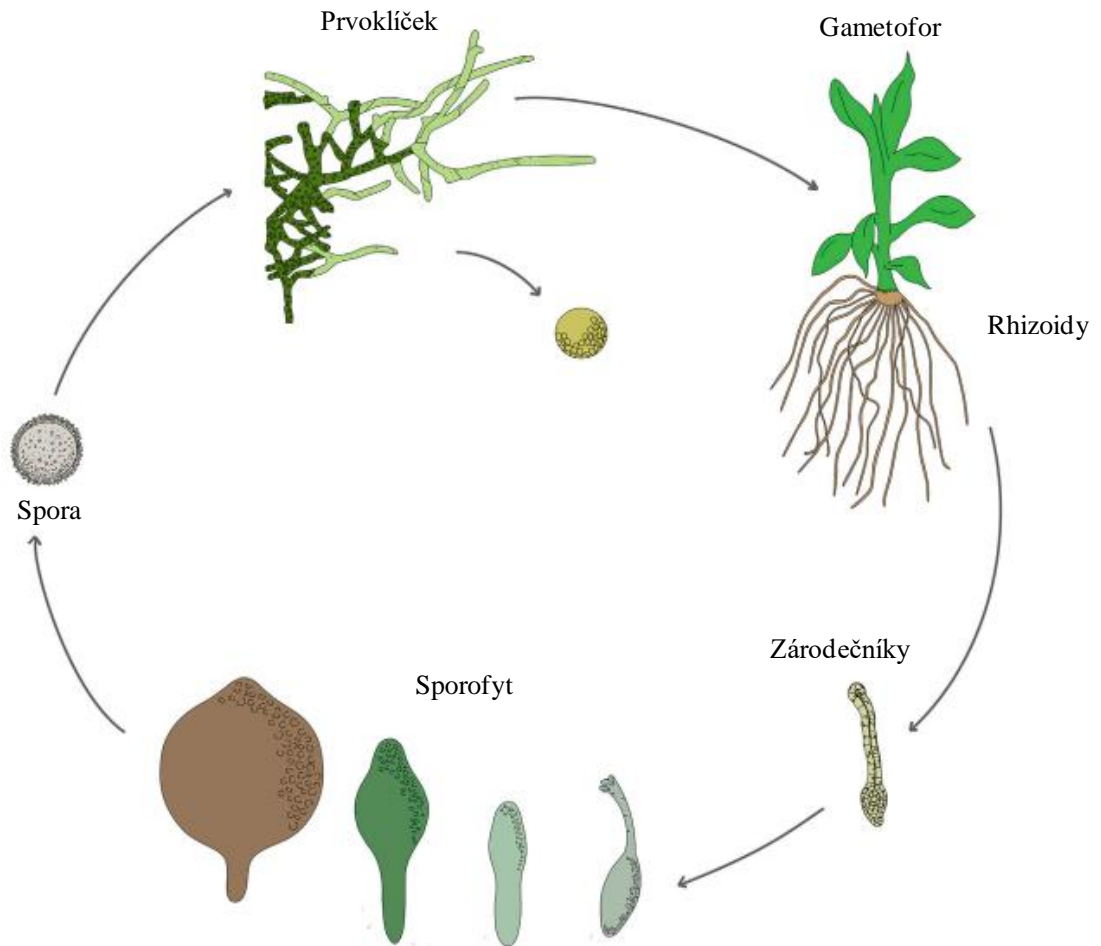
Obr. 12 Biochemická dráha syntézy melatoninu ze serotoninu. Serotonin je za pomoci serotonin N-acetyltransferasy (AANAT) a hydroxyindol-O-methyltransferasy (HIOMT) přeměněn na melatonin (převzato a upraveno dle Hickman *et al.*, 1999).

2.8. *Physcomitrella patens*

Physcomitrella patens je jednodomá rostlina, která se řadí do rodiny *Funariaceae*. Roste zejména v mírném podnebném pásu na severní polokouli. Mech *P. patens* je využíván jako modelový organismus pro nižší rostliny. Využívá se k studiu vývoje rostlin za pomoci kombinace fyziologických, genetických a molekulárních technik. Je využívána kvůli své vysoké účinnosti homologní rekombinace, což umožňuje přímou náhradu genů. Je také vhodný pro morfogenezi na buněčné úrovni. Mechy se vyznačují nízkou mírou strukturní a vysokou mírou chemické složitosti. Genom obsahuje přibližně 500 Mbp rozdělených na 27 chromozomech (Reski *et al.*, 2018). *P. patens* vykazuje zvýšenou toleranci vůči abiotickým stresům (Rensing *et al.*, 2005).

Životní cyklus *P. patens* (Obr. 13) je typický i pro ostatní mechy. Dominantní generací je haploidní gametofyt, který odlišuje mechy od semenných rostlin, u nichž v cyklu dominuje polyploidní sporofyt. Zahrnuje střídání haploidního gametofytu a diploidního sporofytu. Gametofyt má dvě hlavní vývojová stádia. Počáteční fáze je generována klíčením spor. Druhá fáze vývoje gametofytů zahrnuje gametofory, tedy listové výhonky. Ty vznikají z protonemy a jsou místem gamet. Protonema mechu zahrnuje dva typy buněk podlouhlého tvaru – chloronema a kaulonemata.

Chloronemální buňky obsahují chloroplasty a jsou tedy zapojeny do fotosyntézy. Kaulonemální buňky obsahují méně plastidů, ale jsou delší a užší než buňky chloronemální. Samčí gamety, spermatozoidy, jsou produkovány v anteridiích a samičí pohlavní buňky v archeconiích. K oplození dochází v přítomnosti vody. Z diploidní zygoty pak mitoticky vzniká zárodek (Cove a Knight, 1993; Menand *et al.*, 2007).



Obr. 13 Životní cyklus *Physcomitrella patens* (převzato a upraveno dle Ortiz-Ramírez *et al.*, 2016).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Materiál

3.1.1. Použitý biologický materiál

- cDNA z mechu *Physcomitrella patens* (izolovala Mgr. Martina Kopečná, Ph.D.)
- expresní vektor pET-28a (Novagen, Německo)
- kompetentní buňky T7 *Escherichia coli* (New England Biolabs, USA)
- kompetentní buňky NEB 5-alpha *Escherichia coli* (New England Biolabs, USA)

3.1.2. Použité chemikálie

- AccurPrime Pfx SuperMix (Invitrogen, USA)
- 6x DNA Loading Dye (Thermo Scientific, USA)
- agarosa (Sigma-Aldrich, Německo)
- kanamycin (Roth, Německo)
- akrylamid (Bio-Rad, USA)
- *n*-butanol (Lach-Ner, Česká republika)
- Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad, USA)
- CutSmart pufr (New England Biolabs, USA)
- PlatinumTM Multiplex PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, USA)
- NdeI (New England Biolabs, USA)
- Sall-HF (New England Biolabs, USA)
- BamHI-HF (New England Biolabs, USA)
- Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, USA)
- DNAsa1 (Amresco, USA)
- methanol (Sigma-Aldrich, Německo)
- RNAsa1 (Amresco, USA)
- dodecylsulfát sodný (Amresco, USA)
- ethidium bromid (Acros Organics, Česká republika)
- Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs, USA)
- glycerol (Lach-Ner, Česká republika)
- isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid (Ducheve, Nizozemsko)
- imidazol (Sigma-Aldrich, Německo)
- chlorid sodný (Lach-Ner, Česká republika)

- kyselina octová (Lach-Ner, Česká republika)
- k chlorovodíková (Lach-Ner, Česká republika)
- Laemmliho pufr (Bio-Rad, USA)
- Luria-Broth (LB) médium (Roth, Německo)
- pufr LDS 4x (Invitrogen, USA)
- močovina (Lach-Ner, Česká republika)
- merkaptoethanol (Sigma-Aldrich, Německo)
- *N, N, N', N'*- tetramethylenethyldiamin TEMED (Bio-Rad, USA)
- persíran amonný (Sigma-Aldrich, Německo)
- primery (Sigma-Aldrich, Německo)
- Protein ladder 10 – 200 kDa (New England Biolabs, USA)
- SOC Medium (New England Biolabs, USA)
- TAE pufr (VWR, Česká republika)
- tris(hydroxymethyl)aminomethan (MP Biomedicals, Francie)
- T4 DNA ligasa (NEB, USA)
- inhibitor proteas (cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, USA)

3.1.3. Použité kity a návody

- GeneJET Gel Extraction kit (Thermo Scientific, USA).
- GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, USA)

3.1.4. Použité přístroje

- PCR cykler (Eppendorf, Německo)
- sada pipet (Eppendorf, Německo)
- kolonky HisPur Cobalt Spin Columns (Thermo Scientific, USA)
- minitřepačka MS 3 Basic (IKA, Německo)
- spektrofotometr UV-VISs (Agilent, USA)
- chlazená centrifuga 5430R (Eppendorf, Německo)
- termostat 2-blokový (Labnet, USA)
- termostat lážňový (Merci, Česká republika)
- třepačka (Barnstead, USA)
- zdroj napětí (Bio-Rad, USA)

- Cell Disruptor – One Shot Model (Constant Systems, UK)
- centrifuga (Sigma-Aldrich, USA)
- digestoř (Merci, Česká republika)
- filtrační centrikon (Merck Millipore, USA)
- DeNovix spektrofotometr (DeNovix, USA)
- digitální předvážky (OHAUS, Švýcarsko)
- magnetická míchačka (IKA RET basic C, Německo)
- Tycho NT.6 (Nanotemper, Německo)
- inkubátor (Sanyo, Japonsko)
- centrifuga ministar (VWR, USA)
- Gel Doc EZ Systém (Bio-Rad, USA)
- laminární box (Merci, Česká republika)
- centrifugační filtry (Merck Millipore, USA)
- UV-transiluminátor (Eatport, Česká republika)

3.2. Metody

3.2.1. Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) byla použita pro amplifikaci genu *NATA* z *Physcomitrella patens* (*PpNATA*) s pomocí AccurPrime Pfx SuperMix polymerasy (Invitrogen, USA) a specifických primerů (Tab. 4). Primery byly navrženy tak, aby obsahovaly restriční místo pro následné vložení do expresního vektoru. Restriční směs o objemu 25 µl byla připravena smícháním 1 µl cDNA z mechu, po 0,5 µl forward a reverse primeru a 22,5 µl AccurPrime Pfx Supermixu (Invitrogen, USA). PCR reakce byla zahájena denaturací DNA při 95 °C po dobu 5 minut. Následovalo 35 cyklů sestávajících se z těchto tří kroků: 95 °C po dobu 15 s (denaturace DNA), 63,3 °C po dobu 30 s (nasedání primerů) a 68 °C po dobu 1 minuty (elongace fragmentu).

Tab. 4 Sekvence primerů použitých pro klonování genu *PpNATA*.

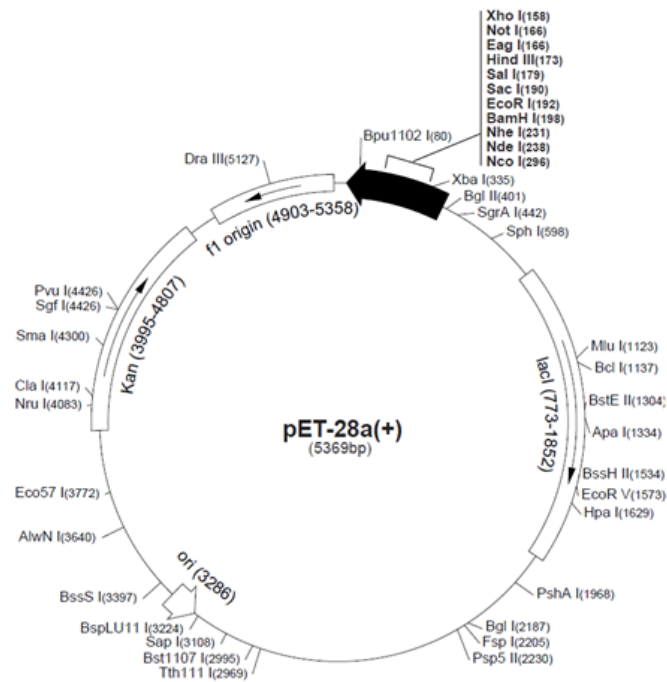
Gen	Sekvence primerů	T _a (°C)
<i>PpNATA</i>	FP: 5' - CAGTCATATGGCGATGGAAGGGACAC – 3'	66,3
	RP: 5' - CACGTCGACTCAAAGCGCACACGCTTC – 3'	69,5

3.2.2. Elektroforetická separace DNA a purifikace

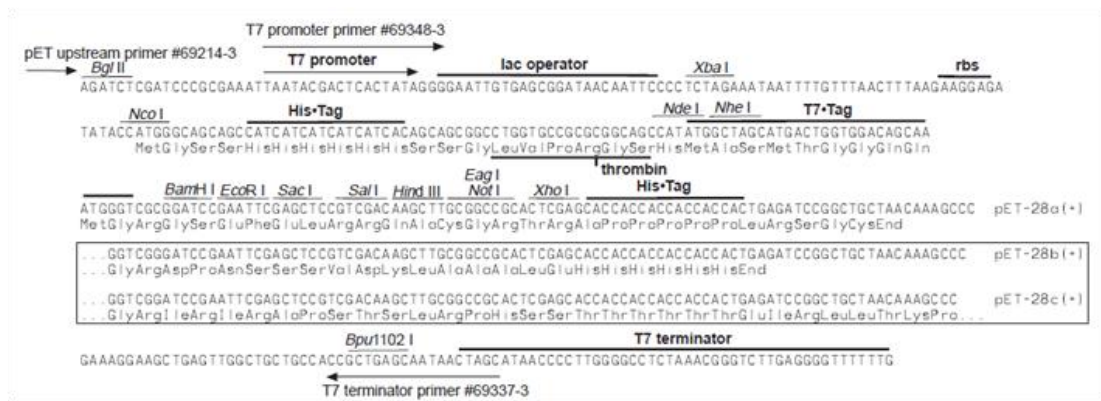
K analýze PCR produktů byla použita agarosová elektroforéza. K produktu PCR byl přidán vzorkovací pufr 6x DNA Loading Dye (Thermo Scientific, USA). Separace byla provedena na 1% agarosovém gelu v TAE pufru (0,04 mol l⁻¹ Tris, 0,02 mol l⁻¹ kyselina octová, 0,001 mol l⁻¹ EDTA, pH 8,4 s 0,001% ethidium bromid) při 100 V po dobu 45 minut. Pro určení molekulové hmotnosti byl nanesen také Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, USA). Pro vizualizaci byl použit UV transluminátor. Gel byl následně vyfocen pomocí přístroje Gel DocTM EZ Systém (Bio-RAD, USA). Amplifikovaná DNA byla vyčištěna pomocí kitu GeneJET Gel Extraction kit (Thermo Scientific, USA).

3.2.3. Klonování cDNA do vektoru pET-28a

Vyčištěné fragmenty DNA byly naštípány v CutSmart pufru restrikními enzymy NdeI a Sall-HF (New England Biolabs, USA). Štěpení probíhalo přes noc v inkubátoru nastaveném na 37 °C. Inerty naštípané přes noc byly následně přečištěny pomocí kitu GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, USA). Expresní vektor pET-28a (Novagen, Německo), (Obr. 14) byl taktéž naštípan pomocí trojice restrikních enzymů, konkrétně NdeI, Sall-HF a BamHI-HF, v přítomnosti CutSmart pufru přes noc. Následně bylo provedeno přečištění pomocí GeneJet Gel Extraction kitu (Thermo Scientific, USA). V dalším kroku byla změřena koncentrace DNA fragmentu a připravených vektorů pomocí nanodropu (DeNovix, USA). Ligace byla provedena pomocí T4 DNA ligasy (NEB, USA) po dobu 1 h za laboratorní teploty mezi NdeI a Sall místa vektoru pET-28a (Obr. 15).



Obr. 14 Mapa expresního vektoru pET-28a.



Obr. 15 Mapa honovacího místa expresního vektoru pET-28a.

3.2.4. Transformace bakteriálních buněk *Escherichia coli*

Pro transformaci rekombinantní plasmidové DNA byly použity kompetentní buňky NEB 5-alpha *Escherichia coli* (New England Biolabs, USA). K těmto buňkám byla přidána ligační směs. Následovala inkubace po dobu 20 minut na ledě. Poté transformace za pomoci teplotního šoku (30 s, 42 °C) a následně byly buňky inkubovány po dobu 2 minut na ledě. Dalším krokem bylo přidání SOC média (New England Biolabs, USA) a buňky byly poté regenerovány při 37 °C po dobu 30 minut. Po

regeneraci byly transformované buňky rozetřeny na Petriho misky, které obsahovaly LB agar (Luria-Bretani) s kanamycinem. Buňky byly ponechány růst přes noc při 37 °C.

Narostlé kolonie transformovaných buněk byly pomocí sterilní kličky naočkovány do tekutého LB média, které obsahovalo kanamycin. Inkubace proběhla přes noc na třepačce při rychlosti 150 otáček za minutu a 37 °C.

3.2.5. Purifikace plasmidové DNA a screening klonů

Bakteriální kultura byla centrifugována při 4000 x g po dobu 10 minut. Purifikace plasmidové DNA byla provedena opět pomocí GeneJet Plasmid Miniprep kitu (Thermo Scientific, USA).

Pro ověření přítomnosti insertu a jeho správné velikosti byl proveden screening kolonií pomocí PCR s komerčními primery T7. Vzorek po eluci byl použit jako templát pro PCR reakci. K takto připravenému templátu byl přidán 1 µl forward a reverse primeru a 10 µl PlatinumTM Multiplex PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, USA). PCR reakce byla zahájena denaturací DNA při 98 °C po dobu 30 s. Následovalo 35 cyklů sestávajících se z těchto tří kroků: 98 °C po dobu 10 s (denaturace DNA), 50 °C po dobu 10 s (hybridizace, nasedání primerů T7) a 72 °C po dobu 2 minut (elongace fragmentu). Po PCR reakci byla provedena agarosová elektroforéza.

Pozitivní plasmidy byly sekvenovány u firmy Segme (ČR) a následně použity pro transformaci do expresních kompetentních buněk T7 Express *E.coli* (New England Biolabs, USA). Proces transformace byl proveden teplotním šokem podle stejného protokolu, jaký byl použit pro kompetentní buňky NEB 5-alpha (New England Biolabs, USA).

3.2.6. Produkce rekombinantního proteinu

Pro produkci rekombinantního proteinu byla nejprve ve 100 ml Erlenmayerově baňce připravena prekultura obsahující 10 ml LB média, příslušného antibiotika, kterým byl kanamycin, 1% (w/v) glukosa a 5 µl jedné bakteriální kolonie. Kultivace proběhla přes noc při 37 °C. Následující den byla prekultura centrifugována při 5000 x g a 20 °C po dobu 5 minut. Supernatant byl odlit. Sediment, který obsahoval bakterie, byl rozpuštěn v 5 ml nového LB média s kanamycinem. Byl odebrán 1 ml vzorku, do kterého bylo přidáno 190 µl 50% glycerolu. Vzorek byl promíchán a zamražen při teplotě -80 °C. Z původního vzorku bylo dále odebráno 200 µl do 10 ml LB média s příslušným

antibiotikem a inkubováno při 37 °C za mírného třepání než absorbance při 600 nm (OD_{600}) dosáhla hodnoty 1. Následně byl odebrán vzorek o objemu 1 ml, který byl centrifugován a sediment byl zamražen při teplotě -20 °C.

Ke zbývající kultuře byl přidán isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG) o různých koncentracích: 0,00005 mol l^{-1} , 0,00010 mol l^{-1} , 0,00050 mol l^{-1} a 0,001 mol l^{-1} . IPTG indukuje expresi proteinu. Kultury byly následně inkubovány přes noc na třepačce při 20 °C. Druhý den byly kultury naředěny čistým LB médiem, aby výsledná absorbance při 600 nm (OD_{600}) byla stejná jako před přidáním IPTG, a centrifugovány (5000 x g, 20 minut, 10 °C). Supernatant byl odpipetován a pelet byl zamražen při -20 °C. Další den byly odebrané a zamražené vzorky rozpuštěny ve 30 μ l 8 mol l^{-1} močoviny a bylo k nim přidáno 10 μ l vzorkovacího pufru LDS 4x (Invitrogen, USA). Vzorek byl povařen při 100 °C po dobu 5 minut a mírně centrifugován.

3.2.7. Extrakce rekombinantního proteinu PpNATA

Bakteriální pelet byl rozsuspendován v 6 ml extrakčního pufru o složení 0,050 mol l^{-1} Tris-HCl pH 8,0 a 50 μ l inhibitorů proteas (cOmpleteTM, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, USA). Buňky byly lyzovány pomocí přístroje Cell Disruptor – One Shot Model (Constant Systems, UK) při 25 kpsi. Následně bylo k lyzátu přidáno 10 μ l DNAsy1 a 10 μ l RNAsy1. Lyzát byl inkubován po dobu 30 min při 37 °C. Po inkubaci bylo přidáno 0,1 mol l^{-1} NaCl a 5% glycerol. Celý lyzát byl centrifugován při 12 000 x g po dobu 30 min a teplotě 4 °C. Supernatant, který obsahoval rozpustné proteiny včetně PpNATA byl použit pro purifikaci. V sedimentu zůstaly inkluzní tělíska a nerozpustné proteiny.

3.2.8. Purifikace afinitní chromatografií

Rekombinantní protein, nesoucí 6xHis-tag kotvu, byl purifikován pomocí afinitní chromatografie na centrifugačních kolonkách, které obsahují Sepharosu s navázanými Co^{2+} ionty (HisPur Cobalt Spin Columns, Thermo Scientific, USA). Nejprve byly kolonky promyty ekvilibračním pufrům o složení 0,02 mol l^{-1} Tris-HCl pH 8,0, 0,01 mol l^{-1} imidazol, 5% glycerol a 0,3 mol l^{-1} NaCl. Následně byl na kolonky aplikován buněčný lyzát obsahující solubilizované proteiny. Kolonky byly inkubovány 30 minut na rotátoru při 4 °C. Následovala centrifugace při 300 x g a 4 °C po dobu 1 minuty, při které protekly kolonkou nezachycené proteiny tzv. flow-through frakce. Poté bylo provedeno trojitě promytí kolonky ekvilibračním pufrům a centrifugace (300 x g, 4 °C,

1 minuta). Eluce byla provedena dvakrát vždy za pomoci 5 ml elučního pufru (0,020 mol l⁻¹ Tris-HCl pH 8,0, 0,3 mol l⁻¹ NaCl, 5% glycerol a 0,25 mol l⁻¹ imidazol). Následovala inkubace na rotátoru při 4 °C po dobu 30 minut. Obě eluční frakce byly spojeny a takto získaný enzym byl promyt pufrém (0,02 mol l⁻¹ Tris-HCl pH 8,0, 0,1 mol l⁻¹ NaCl, 5% glycerol). Následně bylo provedeno zakoncentrování pomocí centrifugačních filtrů (Merck Millipore, USA) na 1 – 3 ml.

3.2.9. SDS – PAGE

K detekci úspěšně produkovaných proteinů byla provedena elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS). Principem této metody je rozdílná elektroforetická mobilita látek a také velikost těchto látek v elektrickém poli. Velké molekuly jsou v gelu méně pohyblivé než molekuly menší.

Polyakrylamidový gel vzniká polymerační reakcí akrylamidu (AA) s *N,N'*-metylenbisakrylamidem (BIS). Reakce je zahájena volnými radikály, které vznikají při rozkladu persíranu amonného (APS). Pro jejich stabilizaci je za potřebí, přidat *N,N,N',N'*-tetramethylethylendiamin (TEMED). Za pomoci SDS jsou proteiny rozpuštěny a vzniká na nich záporný náboj. Dělení probíhá v diskontinuálním systému. Ten je vytvořen pomocí dvou gelů o různém složení, rozdílné iontové síly a pufrů, které se liší hodnotami pH. Složení gelů je v Tab. 5.

Tab. 5 Složení gelu pro SDS-PAGE.

Jednotlivé složky	Dělicí gel (12 %), (ml)	Zaostřovací gel (14 %), (ml)
AA/BIS (30 %/0,8 %)	4,000	0,650
TrisHCl pH 8,8 (1,5 mol l ⁻¹)	2,500	-
TrisHCl pH 6,8 (0,5 mol l ⁻¹)	-	1,250
Destilovaná H ₂ O	3,200	2,950
SDS (10 %)	0,100	0,100
APS (10 %)	0,050	0,060
TEMED	0,015	0,015

Podle Tab. 5 byl připraven nejprve dělicí gel. Následně byl pomocí pipety aplikován mezi skla a byl převrstven *n*-butanolem. Po ukončení polymerační reakce (cca 35 minut) byl *n*-butanol odstraněn. Následně byl připraven zaostřovací gel, který byl aplikován na gel dělicí. Byl do něj usazen hřebínek, který sloužil k vytvoření jamek. Poté proběhla polymerační reakce, která opět trvala 35 minut. Po ukončení polymerační reakce byly skla s gely vloženy do elektroforetické komůrky. Prostor mezi skly i vně skel byl zaplněn elektrodoým pufrem (0,025 mol l⁻¹ Tris pH 8,3, 0,192 mol l⁻¹ glycin, 0,1% (w/v) SDS). Následně byl vyjmut hřebínek.

Vzorky z extrakce a purifikace byly smíchány s Laemmliho pufrem 4x (BioRad, USA). Poté byly krátce povařeny při 100 °C po dobu 5 minut. Takto připravené vzorky byly nanесeny do jamek gelu. Ke kontrole migrace byl použit Protein ladder 10 – 200 kDa (New England Biolabs, UK). Následně byla elektroforetická komůrka uzavřena a připojena ke zdroji napětí. Elektroforéza probíhala přibližně 1,5 h při napětí 120 V a 180 V. Pro vizualizaci vzorků byl gel ponořen do barvicího roztoku Coomassie Brilliant Blue (0,0025% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250, 40% (v/v) methanol, 7% (v/v) kyselina octová) a ponechán v něm přes noc. Následující den byl gel odbarven roztokem, který obsahoval 35% (v/v) metanolu a 10% (v/v) kyselinu octovou.

3.2.10. Nano-diferenciální skenovací fluorimetrie (nano-DSF)

Stabilita proteinu je řízena termodynamicky. Za fyziologických podmínek je obvykle stabilnější složený stav oproti stavu rozloženému, tedy neaktivnímu. Složená může být pouze část proteinu, většinou je však složený celý. Nano diferenciální skenovací fluorimetrie (nano-DSF) detekuje malé změny ve fluorescenci tryptofanu a tyrosinu v proteinech. Fluorescence těchto aminokyselin je silně závislá na okolí. Fluorescenční detektor je schopen měřit intenzitu fluorescence při dvou různých vlnových délkách – 330 nm a 350 nm (Chattopadhyay *et al.*, 2019).

Měření probíhalo na přístroji Tycho NT.6 (Nanotemper). Vzorek pro měření byl připraven smícháním 5 μl 28 mmol l⁻¹ acetyl-CoA, 5 μl enzymu PpNATA (klon 1) a 40 μl pufru (0,020 mol l⁻¹ HEPES pH 7,4, 0,150 mol l⁻¹ NaCl). Vzorky byly naplněny do kapilár a vloženy do přístroje. Následně byly vzorky zahřívány od 35 °C do 95 °C rychlostí 3 °C za minutu.

3.3. Bioinformatické servery

3.3.1. Phytozome

Phytozome byl poprvé spuštěn v roce 2008. Jedná se o vytvořený portál pro srovnání a analýzu dat rostlinného genomu. Dále umožňuje přístup k evoluční historii genových rodin, jednotlivých genů, jejich struktur a k souborům rostlinné genomiky, které se skládají z úplných genomů a funkčních informací o jednotlivých genech a genových rodinách (Goodstein *et al.*, 2012).

3.3.2. UniProt

UniProt (Universal Protein Resource) je databáze proteinových sekvencí a jejich funkčních informací. Byla vytvořena pro lepší orientaci ve velkém množství sekvencí a dostupných informací pro proteiny. V databázi existuje více než 60 miliónů sekvencí. Databáze také poskytuje archiv zvaný UniParc, který obsahuje kompletní sadu známých sekvencí (Pichler *et al.*, 2018).

3.3.3. Phyre 2

Server Phyre 2 slouží pro predikci a analýzu proteinových struktur, jejich funkcí a vazebných míst pro ligandy. Klíčovým principem je, že proteinová struktura je evolučně konzervovanější než sekvence daného proteinu. Modelování sekvence proteinu je složeno ze čtyř kroků: shromažďování homologních sekvencí, skládání knihovny sekvencí, modelování smyčky a umístění postranního řetězce (Kelley *et al.*, 2015).

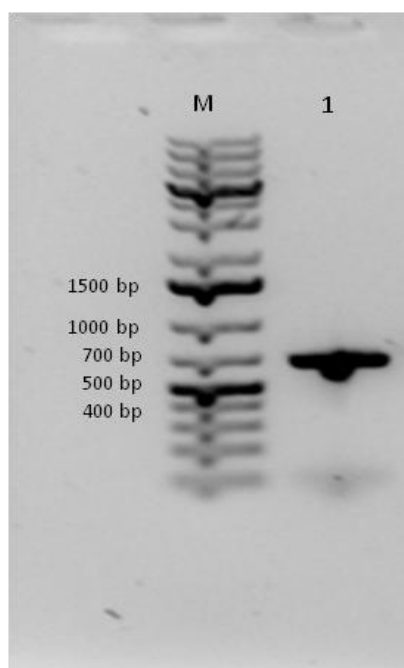
3.3.4. PSIPRED/DISOPRED

PSIPRED je k dispozici ve formě webové služby, ale také, jako software. Je využíván ke zkoumání sekundární proteinové struktury ze zadané primární sekvence. Predikce je založena na třech fázích: generování sekvenčního profilu, predikce počáteční sekundární struktury a filtrování predikované struktury. Počáteční úloha sekvenční analýzy závisí nejčastěji na PSIBLAST, což umožňuje vyhledávání souvisejících sekvencí, nicméně se jedná o časově náročný proces (Buchan *et al.*, 2013). Server DISOPRED je využíván pro predikci proteinové struktury. Proces predikce je za využití neuronové sítě. Využívá metodu, která predikuje neuspořádané oblasti v proteinu, tedy pro neuspořádaná rezidua (Jones, 1999; Ward *et al.*, 2004).

4 VÝSLEDKY

4.1. Klonování

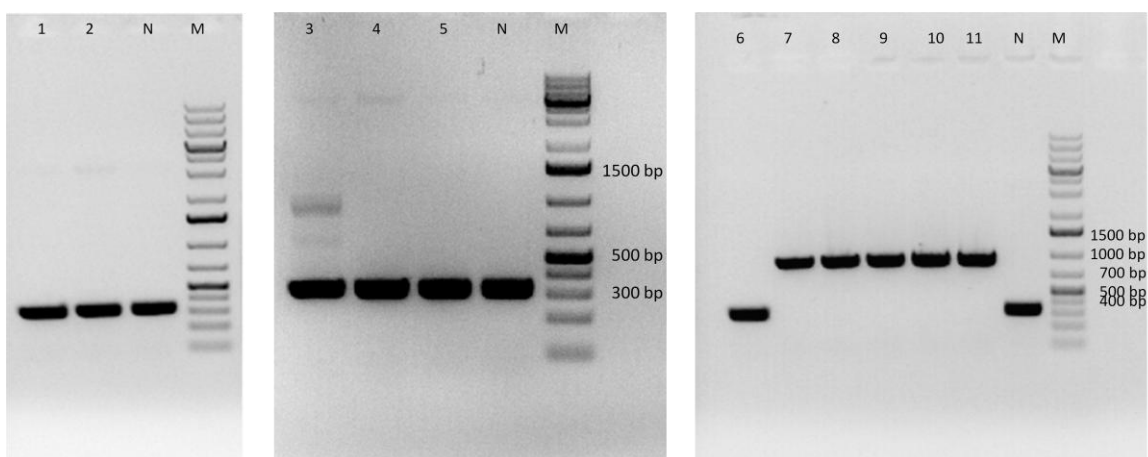
Za pomoci PCR metody byl amplifikován z cDNA gen kodující PpNATA za použití specifických primerů (Tab. 4) a AccurPrime Pfx SuperMix polymerasy. PCR byla provedena ve 35 cyklech (denaturace DNA při 95 °C po dobu 15 s, nasedání primerů při 63,3 °C po dobu 30 s a elongace při 68 °C po dobu 1 minuty). Amplifikovaný fragment byl vyhodnocen pomocí gelové elektroforézy (Obr. 16).



Obr. 16 Amplifikace genu *PpNATA*. M – Marker GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (New England Biolabs, UK); 1 – vzorek s amplifikovaným PCR produktem.

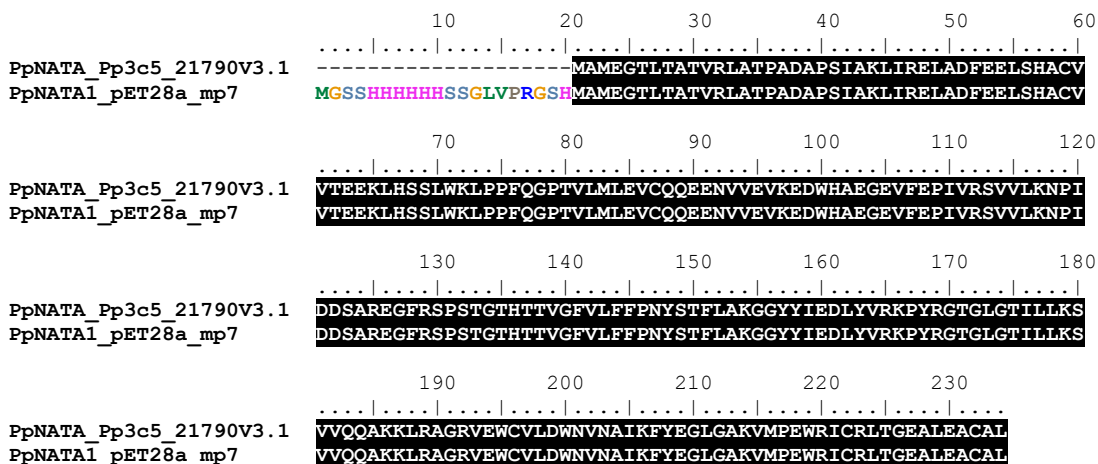
Fragmenty DNA byly dále přečištěny a naštípány restrikcími enzymy NdeI a Sall-HF stejně jako expresní vektor pET-28a. *PpNATA* a expresní vektor pET-28a byly přečištěny a poté kvantifikovány na spektrofotometru (DeNovix, USA). Následně byl gen *PpNATA* zaligován do pET-28a za pomoci T4 DNA ligasy. Konstrukty byly transformovány do kompetentních buněk bakterií *E.coli* NEB 5-alpha. Transformace byla provedena pomocí teplotního šoku. Následovala kultivace přes noc na pevném LB médiu a selekce v přítomnosti kanamycinu.

Po transformaci vyrostlo velké množství klonů. Následně bylo vybráno 11 klonů pro ověření přítomnosti fragmentu *PpNATA* za pomoci metody PCR (Obr. 17). Pozitivních bylo 5 klonů. Pro produkci plasmidu a dále pro sekvenaci byl vybrán klon č. 7 (Obr. 17).



Obr. 17 Ověření pozitivních klonů. M – GeneRuler™ 1 kb Plus DNA ladder (New England Biolabs, UK), N – negativní kontrola prázdný expresní vektor pET-28a, 1-11 klony nesoucí plasmid *PpNATA* pET-28a.

Sekvenace (Obr. 18) prokázala, že se v sekvenci nevyskytují žádné záměny nukleotidů a tudíž ani záměny na úrovni aminokyselin.

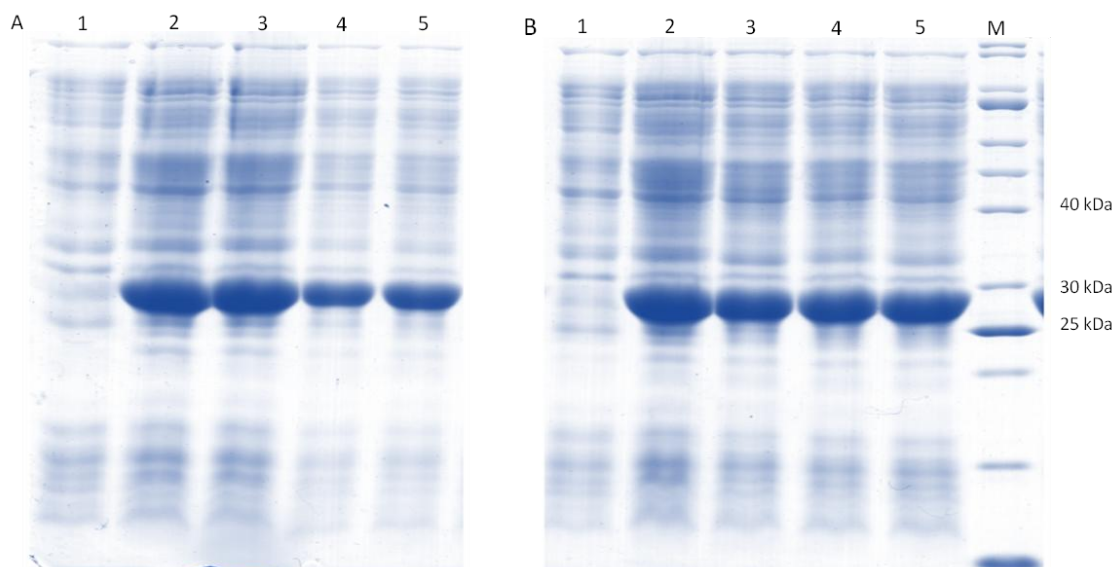


Obr. 18 Sekvence výsledného klonu PpNATA pET-28a mp7 po sekvenaci včetně N-terminálního 6xHis-tagu.

4.2. Produkce a purifikace rekombinantního proteinu

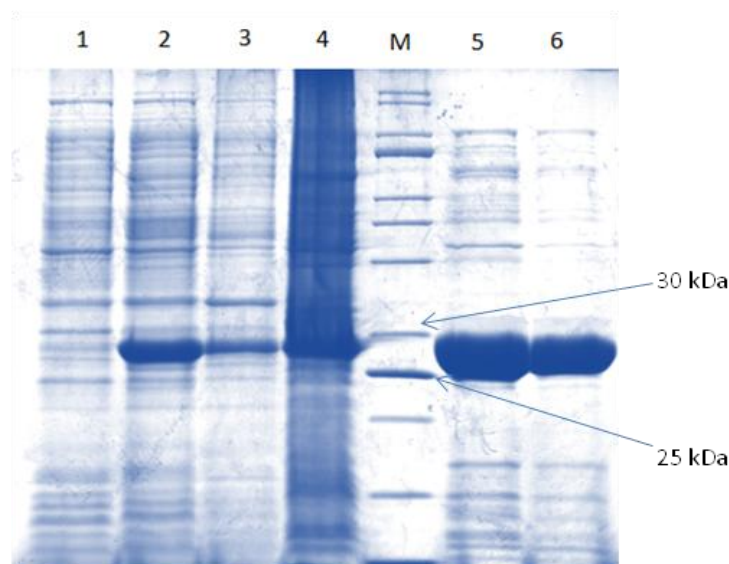
Expres proteinu *PpNATA* byla zahájena přidavkem IPTG o různých koncentracích s cílem ověřit vliv koncentrace IPTG na výslednou produkci.

Pro zjištění, zda je rekombinantní protein v bakteriích produkován, byl odebrán 1 ml bakteriální kultury před indukcí, kdy absorbance při 600 nm dosáhla hodnoty 1. Dále pak po indukcí při 20 °C přes noc byl také odebrán vzorek bakterií (1ml) a naředěn na stejnou absorbanci, jaká byla před indukcí. Po centrifugaci byl sediment rozpuštěn v 8 mol l⁻¹ močovíně a následně smíchan s Laemmliho pufrem. Po odbarvení SDS-PAGE bylo zřetelné, že v požadované oblasti byl viditelný nárůst obsahu požadovaného proteinu nad 25 kDa (očekávaná velikost je 26 kDa).



Obr. 19 Ověření produkce rekombinantního proteinu *PpNATA* ve dvou kloněch v T7 buňkách *E.coli*. (A) *PpNATA* – klon 1. 1 – vzorek před indukcí, 2 – 50 μmol l⁻¹ IPTG, 3 – 100 μmol l⁻¹ IPTG, 4 – 500 μmol l⁻¹ IPTG, 5 – 1 mmol l⁻¹ IPTG. (B) *PpNATA* – klon 2. 1 – vzorek před indukcí, 2 – 50 μmol l⁻¹ IPTG, 3 – 100 μmol l⁻¹ IPTG, 4 – 500 μmol l⁻¹ IPTG, 5 – 1 mmol l⁻¹ IPTG, M – Protein ladder 10-200 kDa (New England Biolabs, UK).

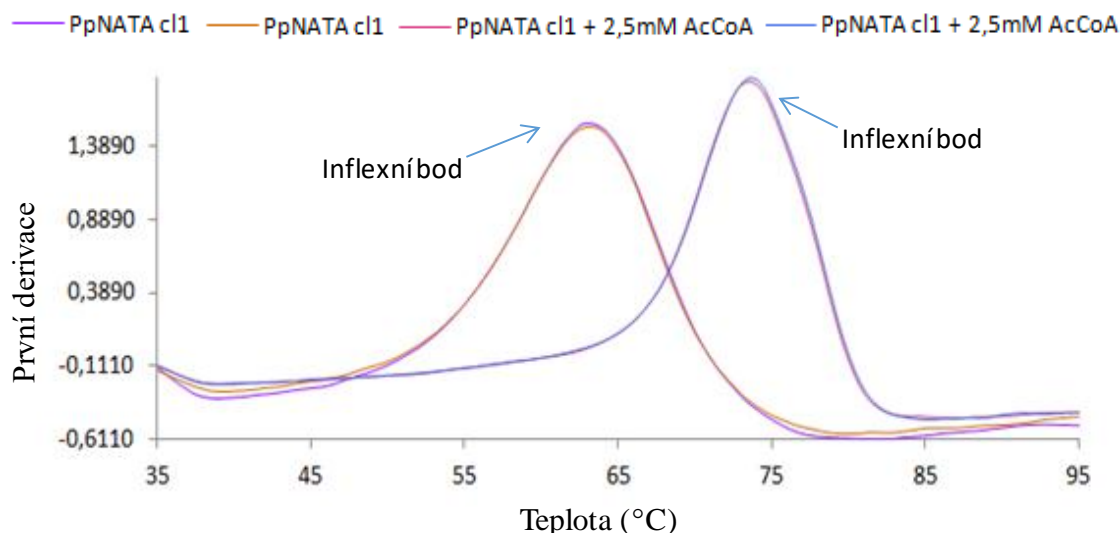
Dále byla provedena analýza rozpustné a nerozpustné frakce a purifikace. Rozpustná frakce byla použita pro purifikaci enzymu pomocí afinitní chromatografie. Eluce nastala zvýšenou koncentrací imidazolu v pufru. Složení elučního pufru bylo 0,020 mol l⁻¹ Tris-HCl pH 8,0, 0,3 mol l⁻¹ NaCl, 5% glycerol a 0,25 mol l⁻¹ imidazol. Isoelektrický bod proteinu je 6,3. Byl zjištěn pomocí serveru ExPASy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>). Lyzát bakterií před indukcí a po indukci, a také vzorky během extrakce tzn. rozpustná a nerozpustná frakce a purifikovaný protein, byly povařeny při 100 °C po dobu 5 minut s Laemmliho pufrem a následně vyhodnoceny pomocí SDS-PAGE.



Obr. 20 SDS-PAGE vzorků získaných po extrakci a purifikaci. 1 – vzorek před indukcí, 2 – vzorek po indukci 1 mmol l^{-1} IPTG, 3 – nerozpustná frakce (inkluzní tělíška), 4 – rozpustná frakce, M - Protein ladder 10-200 kDa (New England Biolabs, UK), 5 a 6 – vzorky po provedení afinitní chromatografie.

4.3. Stanovení stability proteinu

Měření stability proteinu probíhalo na přístroji Tycho NT.6 (Nanotemper). Vzorek pro měření PpNATA byl vložen do 20 mmol l^{-1} pufru HEPES pH 7,4 v přítomnosti 150 mmol l^{-1} NaCl bez a v přítomnosti $2,5 \text{ mmol l}^{-1}$ acetyl-CoA, který je koenzymem. Vzorky byly naplněny do kapilár a vloženy do přístroje. Následně byly vzorky zahřívány od $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ do $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ rychlostí $3 \text{ }^{\circ}\text{C}$ za minutu. Na Obr. 20 jsou vyznačeny inflexní body, při kterých došlo k rozvolnění struktury proteinu (teploty tání). Ze získaných výsledků (Obr. 21) vyplývá, že enzym PpNATA je výrazně stabilizován vazbou koenzymu acetyl-CoA, a tím je zvýšena teplota, při které dochází k tepelné denaturaci (rozvolnění struktury).



Obr. 21 Ukázka první derivace poměru fluorescence při 330 nm a 350 nm definující denaturační křivku proteinu PpNATA a acetyl-CoA. Na obrázku je vyznačen inflexní bod, který představuje teplotu tání.

4.4. Porovnání sekvencí savčích a rostlinných N-acetyltransferas

Pro porovnání podobností v sekvenci N-acetyltransferas bylo vybráno několik rostlinných a savčích NAT. Templátem byla N-acetyltransferasa z mechu *Physcomitrella patens*. Na základě výsledků bylo zjištěno, že PpNATA je podobností blíže k savčím SAT1 (Obr. 22).

Pro zjednodušení byly názvy sekvencí psány zkráceně. Zde jsou uvedeny celé názvy: AtNATA1_Q9ZV05_AT2G39030.1, AtNATA2_AT2G39020.1, GmNATA1_Glyma.10G109000.1, ZmNATA_AC149475.2_FG007, ZmNATA2_AC209858.4_FGT004, OsNATA_Os03g05710.1, SiNATA_Seita.9G537900.1, PtNATA1_Potri.008G037700.1, PtNATA2_Potri.010G224800.1, PtNATA3_Potri.008G037600.1, SmNATA_231364, SpNATA_Sphfalx0052s0040.1, PpNATA_XP_024375106.1, MpNATA_Mapoly0179s0017.1, ScNATA_Sacu_v1.1_s0014.g006170, Human SAT1 (P21673), Mouse SAT1 (P48026), Human NAT1 (P18440), Human NAT2 (P11245)

```

      10      20      30      40      50      60
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
PpNATA      -----MAMEG-----TLTATVRLATPADAPSTAKLIRRLADPEEL
AtNATA1     -----MAPPTAAPENVTVP-ETSPTG--HRMFSRIRLATPTDVPFIHKLIHQMAVFERL
AtNATA2     MAAAAPPPPTAAPENMVAPLISPIG--HPMFSRIRLATPTSDVPFIHKLIHQMAVFERL
GmNATA1     MAAAAPPPPTAAPENPATSLPET----TPLFTRIRLATPTSDVPFIHKLIHQMAVFERL
ZmNATA      ----MAAAPCSTTFSG-----DVWAEIRLASASDVPHIIRLIHQMAVEFELL
ZmNATA2     ----MAAPANSTTFSG-----DVWAEIRLADARVPPIIRLIHQMAVEFELL
OsNATA      ----MATPANATTFSG-----DVWAEIRLADSSDVPHIIRLIHQMAVEFELL
SiNATA      ----MAPPANSTTFSG-----DVWAEIRLADARVPPIIRLIHQMAVEFELL
PtNATA1     MAAAAPPPPTPAPSAPTGLPDSSTPVGHPLEFARIRLATPLDIPHIHKLIHQMAVEFEL
PtNATA2     MAAAAPPPPTPAPSAPTGLPDSSTPVGHPLEFARIRLATPLDVPNIQKLIHQMAVEFEL
PtNATA3     MASTISPPAAAAALASIAATPTTLVG--QHQLYTRIRLATPADVPPIHKLIHQMAVFONE
SmNATA      -----MASVRIASPRDVPYIASMIAQIAKFERL
SpNATA      -MSGSLVAMATDSSGS-----SVVVTVRLAAGKQVIRVIAALIRLAVFERL
MpNATA      ----MATEAAK-----RAGVHVIRLATKADVPAIKRIRLIALALYKEL
ScNATA      ----MASFQQ-----VALAHVIRLATVEDMPLVLRLLIQQLAEFELL
Human SAT1  -----MAKFVIRPATAADCSDLRLRLIKELAKYEVFM
Mouse SAT1  -----MAKFKIRPATAADCSDLRLRLIKELAKYEVFM
Human NAT1  ----MDIEAYLERIGYKSRNKLDLETLTDILQHQIRAVPFENLNHCGDAMDGLGLEAIF
Human NAT2  ----MDIEAYFERIGYKNSRNKLDLETLTDILEHQIRAVPFENLNHCGQAMGLGLEAIF

```

```

      70      80      90      100     110     120
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
PpNATA      SHACVVIT-----EEKLHSSLWKLKLP--PFQGTIVLMEVQCQ--
AtNATA1     THLFVAT-----ESGLASTLFSNR--PFQAVTVFLEISP--
AtNATA2     THLFSAT-----ESGLASTLFSR--PFQSFTVFLIEVSR--
GmNATA1     THLFSAT-----ESSLSSTLFTSP--PFQSFTVFLIEASP--
ZmNATA      TDLFAAT-----EELITSTLFPSPPEPFTSFTALVDLSP--
ZmNATA2     TDLFAAT-----EELITSTLFPSPPEPFTSFTALVDLSP--
OsNATA      TDLFAAT-----HELITSTLFPSPPREPFTSFTALVDLSP--
SiNATA      TDLFAAT-----EELITSTLFPSPAPEPFTSFTALVDLSP--
PtNATA1     THLFTAT-----ESSLASTLEKSP--PFLSFTIFLIEVSS--
PtNATA2     THLFTAT-----ESDLASTLEKSP--PFQSFTIFLIEVSS--
PtNATA3     THLFTAT-----ESSLASTLFSR--PFQSFTVFLIEVSS--
SmNATA      ADACIGT-----EEQYRSTLENAP--AFQGLTVLLEISR--
SpNATA      EHACEVT-----DSKLESSLWNLKLP--PFQGTIVLMEVGGPR
MpNATA      PEQCHAT-----ESALESSLERQP--PFEGVTVLMEELDP-L
ScNATA      ADMCVAT-----VEKLEATLFOOK--PLQGTIVLLELSH--
Human SAT1  EEQVILT-----EKDLEEDGFGEH--PFYHCLVAEVPKEH--
Mouse SAT1  EDQVILT-----EKDLEEDGFGEH--PFYHCLVAEVPKEH--
Human NAT1  DQVRRNRGGWCLOVNHLLYWALTTIGFETTMGGYVYSTPAKKYSTGMHLLDQVTTID-
Human NAT2  DHIVRRNRGGWCLOVNLQLLYWALTTIGFQTTMGGYFIPPVKNKYSTGMVHLLDQVTTID-

```

```

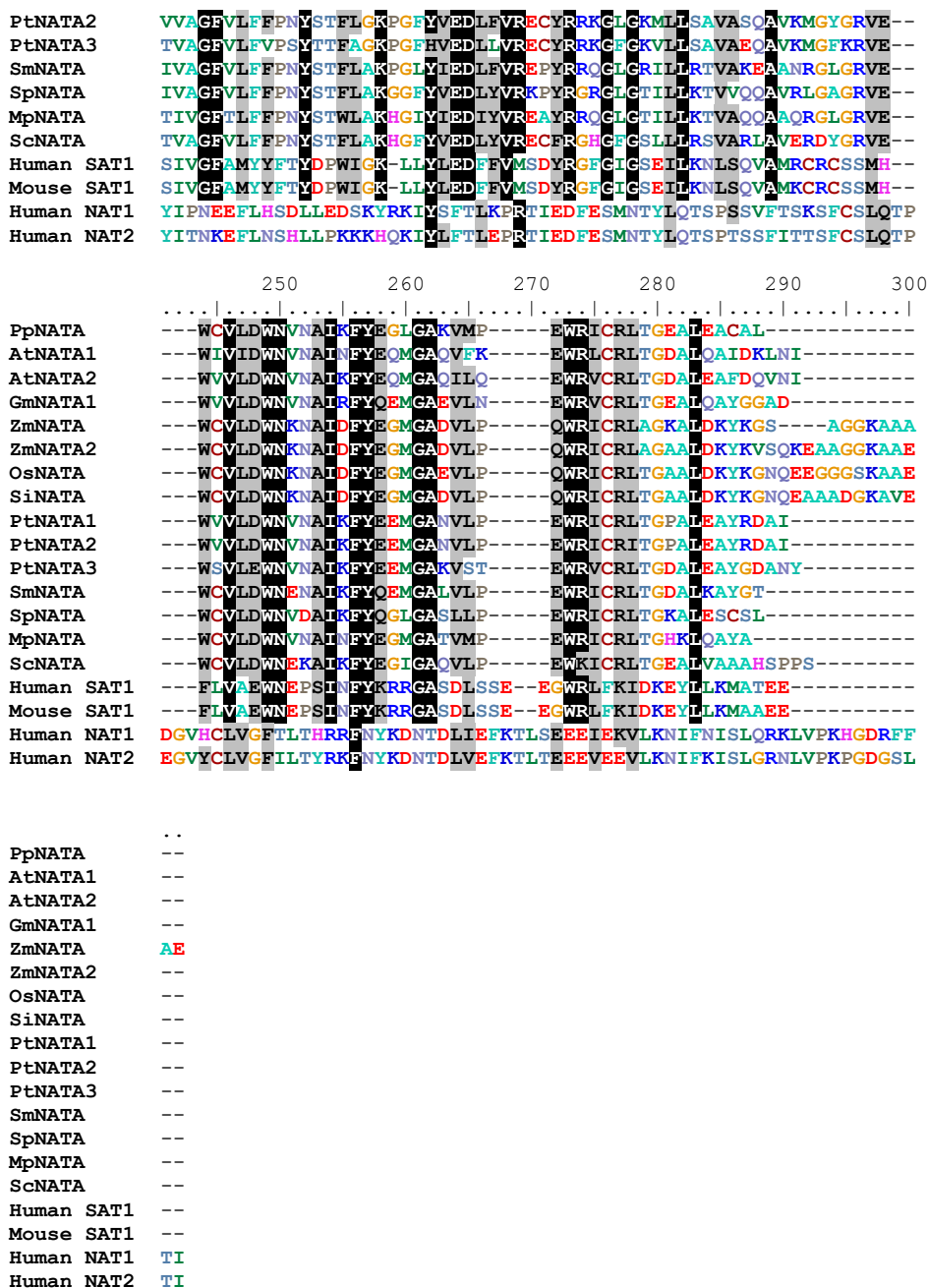
      130     140     150     160     170     180
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
PpNATA      -QEENVVEVKEDWHAEGEVFEPIVRSVVLKNP-----IDD SAREGFRSPSTGT--H
AtNATA1     -SFPPTTHDAS-SPDFTPFLETHKVDLP-----IEDDREKELPDKLND---V
AtNATA2     -SFPPATITSSPSDFTPFKTHNLDLP-----IDDPSYNSFPDMLND---V
GmNATA1     -TPFLNS-TLNPFPYKPIKLLNLSNP-----INDPESDTEKT-LDG---V
ZmNATA      -SPVAPDPSSTIASRRLDLS--ASP-----LADPEAAAFASPRGGG---R
ZmNATA2     -TPILPDSSTIASRRLDLS--ASP-----LADPEAATFASPRGGG---R
OsNATA      -SPLPASGPSTIASHCLDLS--ASP-----LADPEAAAFASPRGGG---R
SiNATA      -SPVVPDSSSTIGSLRLDLS--ASP-----LADPEAAAFASPRGGG---R
PtNATA1     -HPFEKD-SNFHSQSFTPIERIFNLDHS-----LIDPEAETFKNINGD---V
PtNATA2     -RPFEKD-SNLHSQNFTPIERINLDHS-----LSDPEAETFRNGINGD---A
PtNATA3     -NPFKN--IHSFAFLPIERTVLVDHV-----AADPEAETFKSGVANEDDDV
SmNATA      -SSASN--AAAGDCIASQVE--IGAE-----IADPDKDFFTSDSG---R
SpNATA      SEDDQHEQEDKDLNLQQSFEEVVRLEKLSSP-----IADPDAAASERSTADER---R
MpNATA      NSGPVAEDGLDRSSGELAYEIN--LKG-----VEDPDAAEFVSSHDET---R
ScNATA      -VSSGNTTSSADSKESVQEVH--LRSS-----IHDPDALSFGSGHA---R
Human SAT1  -----WTFEG-----H
Mouse SAT1  -----WTFEG-----H
Human NAT1  ---GRNYIVDAGFRSYQMWQPLELISGKDQPQVPCVFRLTEENGFWYLDQIRRE---Q
Human NAT2  ---GRNYIVDAGSGSSSQMWQPLELISGKDQPQVPCIFCLTEERGIWYLDQIRRE---Q

```

```

      190     200     210     220     230     240
.....|.....|.....|.....|.....|.....|
PpNATA      TTVGFVLEFPNYSTFLAKGGYIIEDLYVRKPMRGTGLCTILLKSVVQQAKKLRGRVE--
AtNATA1     VVAGFVLEFPNYPSFLAKGGFYIEDIFMRPEPVRKRGCKLLLTAVAKQAVKLVGRVE--
AtNATA2     VVAGFVLEFPNYSSFLSKPGFYIEDIFVREPEPVRKRGCFSMLLTAVAKQAVKMGYGRVE--
GmNATA1     TVVGFVLEFPNYSTFLKPGFYVEDLEFVRECYRKRKGFGRMLLSAVAKQAVKMEYGRVE--
ZmNATA      VTAGFVICFPNYSTFLSKPGLYVEDIFVRAPTWRRRGLGRMMLSAVAGRAAELMGGRVE--
ZmNATA2     VTAGFVICFPNYSTFLSKPGLYVEDIFVRAPTWRRRGLGRMMLSAVAGRAAELMGGRVE--
OsNATA      VTAGFVICFPNYSTFLSKPGLYVEDIFVRAPTWRRRGLGRMMLSAVAGRAAELMGGRVE--
SiNATA      VTAGFVICFPNYSSFLSKPGLYVEDIFVRAPTWRRRGLGRMMLSSVAGRAAELMGGRVE--
PtNATA1     VVAGFVLEFPNESTFLKPGFYVEDLEFVRECYRKRKGLCKLLLSAVASQAVKMGYGRVE--

```



Obr. 22 Porovnání sekvencí savčích a rostlinných N-acetyltransferas.

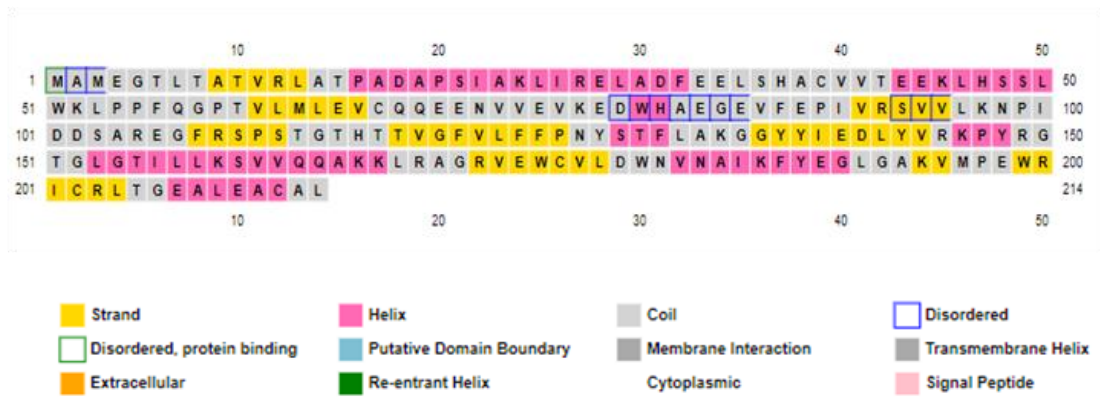
Po porovnání sekvencí mezi savčími a rostlinnými NAT bylo provedeno srovnání identity v proteinech mezi vybranými rostlinnými NAT. PpNATA vykazovala největší shodu s SpNATA – 63% identita sekvencí (83% podobnost), zatímco nejnižší shoda byla zaznamenána u ZmNATA2 a OsNATA – 45% identita sekvencí (66% podobnost), (Tab. 6).

Tab. 6 Srovnání identity v proteinech. Proteinová identita je psána před závorkou, zatímco nukleotidová je uvedena v závorkách. Zeleně je vyznačena sekvence s největší podobností, naopak červeně jsou vyznačeny sekvence s podobností nejnižší. Porovnání bylo provedeno pomocí serveru LALIGN (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/lalign/>). PpNATA – *Physcomitrella patens*, AtNATA1, AtNATA2 – *Arabidopsis thaliana*, GmNATA – *Glycine max*, ZmNATA1, ZmNATA2 – *Zea mays*, OsNATA – *Oryza sativa*, SiNATA – *Setaria italica*, PtNATA1, PtNATA2, PtNATA3 – *Populus trichocarpa*, SmNATA – *Selaginella moellendorffii*, SpNATA – *Salix purpurea*, MpNATA – *Marchantia polymorpha*. Zkratky sekvencí odpovídají názvům na začátku kapitoly 4.4.

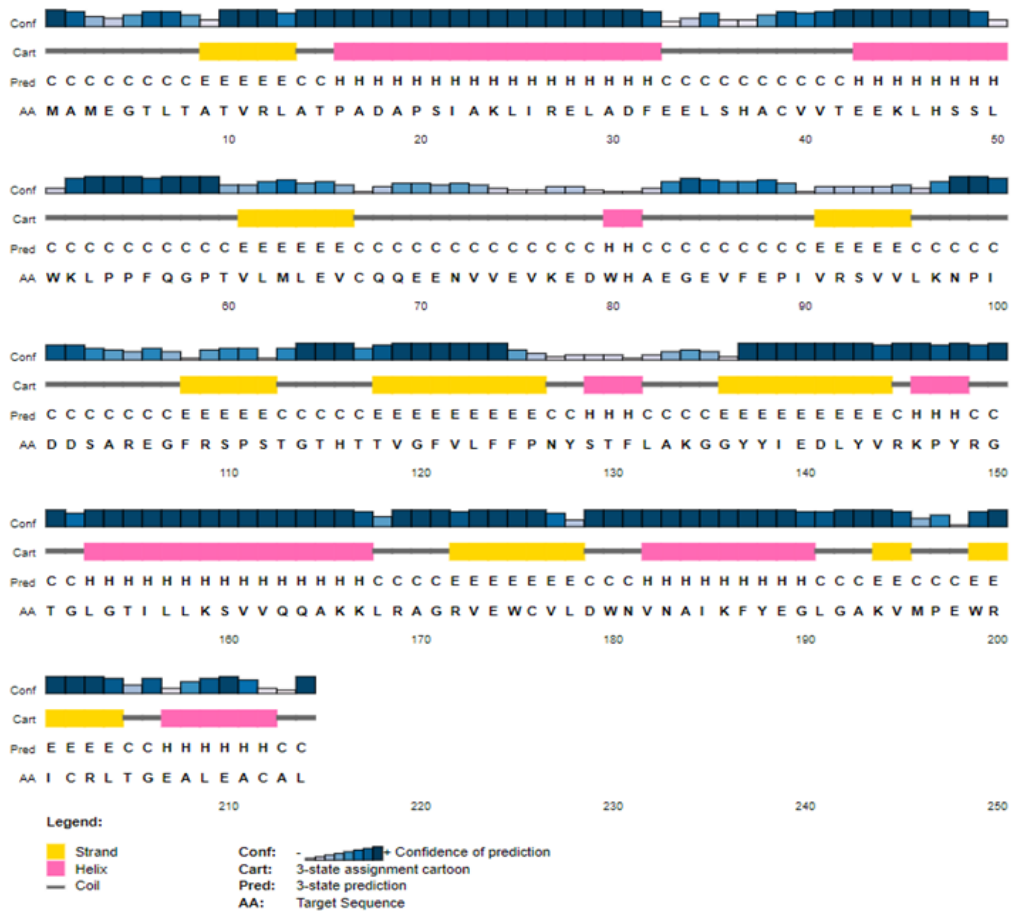
	Pp	At1	At2	Gm	Zm1	Zm2	Os	Si	Pt1	Pt2	Pt3	Sm	Sp	Mp
Pp	48 (75)	49 (74)	51 (76)	45 (68)	45 (66)	45 (66)	46 (68)	53 (75)	53 (77)	47 (71)	52 (73)	63 (83)	56 (73)	
At1		79 (92)	64 (84)	48 (75)	48 (74)	52 (76)	49 (72)	62 (82)	62 (82)	58 (76)	53 (77)	47 (71)	48 (78)	
At2			71 (86)	52 (74)	51 (74)	56 (76)	53 (74)	68 (84)	69 (84)	59 (79)	53 (76)	46 (70)	47 (76)	
Gm				56 (78)	55 (76)	55 (77)	53 (75)	69 (86)	69 (86)	61 (79)	56 (78)	50 (76)	50 (77)	
Zm1					92 (95)	86 (93)	89 (94)	56 (76)	55 (77)	48 (72)	53 (78)	46 (72)	49 (72)	
Zm2						87 (96)	91 (97)	56 (77)	55 (77)	48 (72)	52 (78)	46 (70)	49 (71)	
Os							87 (95)	54 (75)	54 (76)	48 (72)	53 (77)	47 (68)	48 (71)	
Si								54 (76)	54 (76)	47 (71)	54 (78)	46 (70)	48 (76)	
Pt1									93 (99)	68 (82)	52 (77)	51 (76)	50 (78)	
Pt2										66 (83)	53 (77)	51 (76)	51 (78)	
Pt3											50 (73)	44 (70)	44 (73)	
Sm												55 (75)	56 (75)	
Sp													54 (77)	

4.5. Predikce sekundární struktury (PSIPRED)

Pomocí primární sekvence byla provedena predikce sekundární struktury s využitím serveru PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>), (Obr. 23, 24). Bylo predikováno 8 α -helixů, 10 β -vláken a také málo uspořádaná rezidua, konkrétně rezidua č. 2 (A; Ala), 3 (M; Met), 79 (D; Asp), 80 (W; Trp), 81 (H; His), 82 (A; Ala), 83 (E; Glu), 84 (G; Gly), 85 (E; Glu), 93 (S; Ser), 94 (V; Val) a 95 (V; Val).



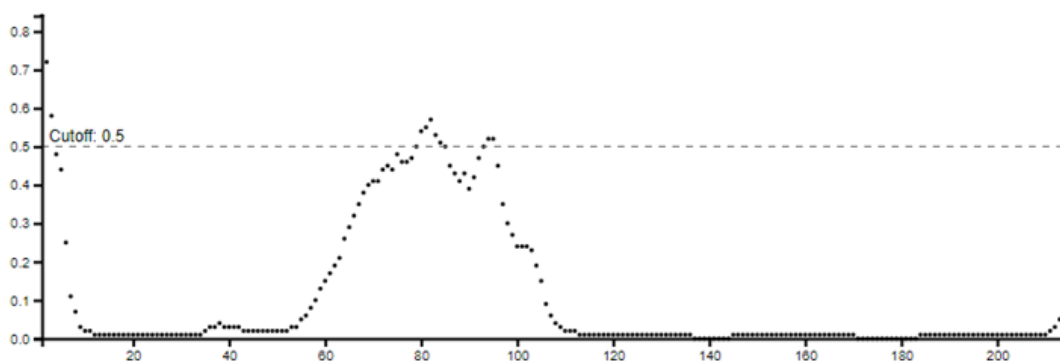
Obr. 23 Grafická predikce sekundární struktury pomocí serveru PSIPRED. Helixy jsou zobrazeny růžově. β -vlákna jsou zobrazena žlutě. Smyčky jsou zobrazeny šedě. Predikované neuspořádané části jsou zobrazeny modrým ohraničením.



Obr. 24 Grafická predikce sekundární struktury pomocí serveru PSIPRED. Helixy (H) jsou zobrazeny růžově. β -vlákna (E) jsou zobrazena žlutě. Smyčky (C) jsou zobrazeny šedě.

4.6. Predikce sekundární struktury (DISOPRED)

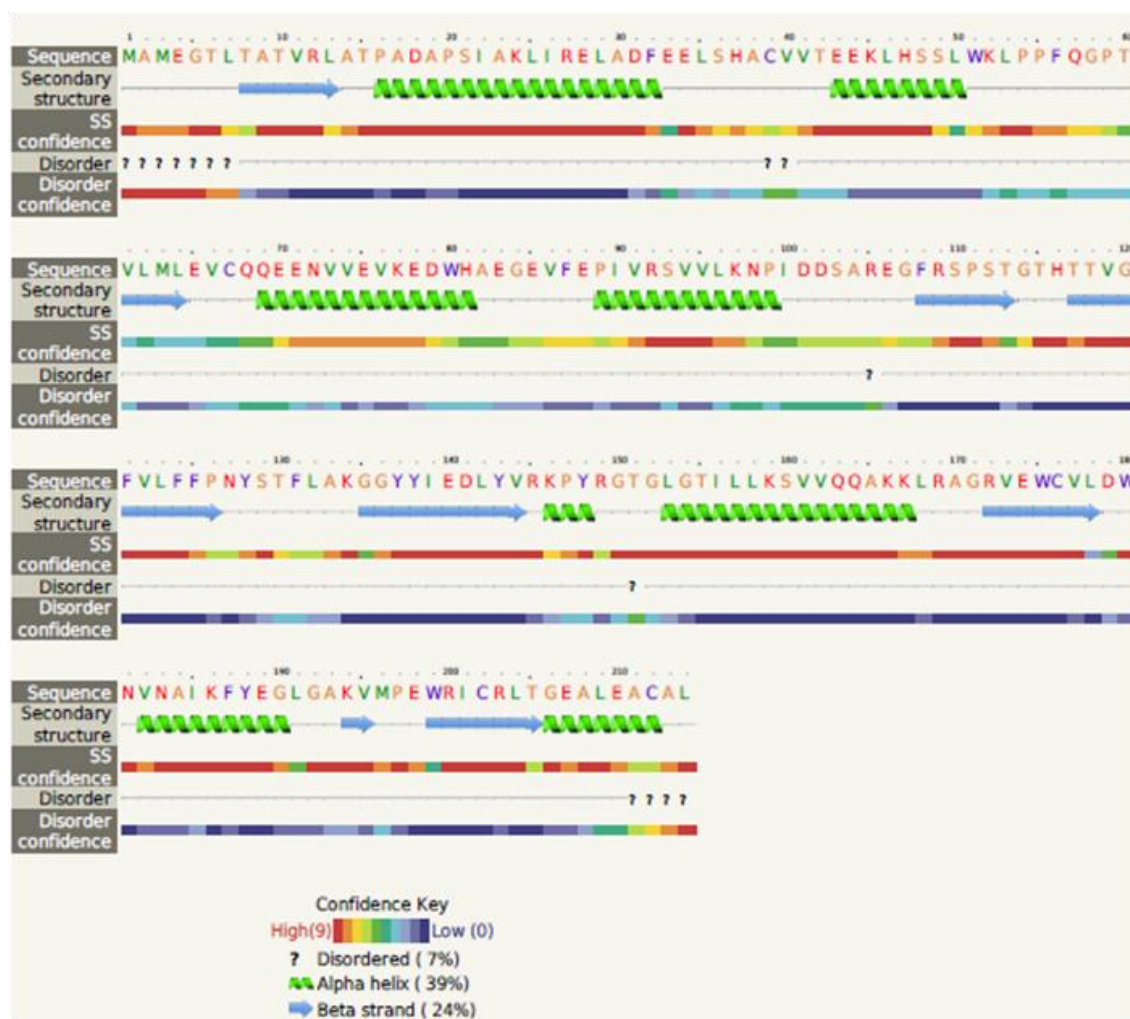
Pomocí serveru DISOPRED byla predikována sekundární struktura a zobrazena ve formě grafu (Obr. 25). V grafu je zobrazena hodnota cutoff (0,5), která udává uspořádanost jednotlivých částí predikované struktury.



Obr. 25 Predikce sekundární struktury pomocí serveru DISOPRED. Osa x znázorňuje počet aminokyselin. Osa y znázorňuje procentuální pravděpodobnost predikce. Hodnota cutoff je nastavená na 0,5 (50 %). Části, které se nachází pod hodnotou cutoff jsou uspořádané, naopak, ty které se nacházejí nad hodnotou cutoff jsou neuspořádané.

4.7. Predikce sekundární struktury (Phyre 2)






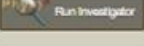

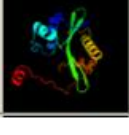
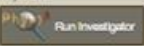
Pomocí primární sekvence byla provedena predikce sekundární struktury s využitím serveru Phyre 2 (Obr. 26). Bylo detekováno 8 α -helixů a 8 β -vláken. V počtu β -vláken se tato predikce mírně liší od predikce s využitím serveru PSIPRED. Helix v oblasti mezi 70 a 80 není predikován s vysokou spolehlivostí (tzv. Disorder Confidence), tudíž se potvrzuje částečná predikce s výsledkem serveru PSIPRED.



Obr. 26 Grafická predikce sekundární struktury pomocí serveru Phyre 2. Helixy jsou zobrazeny zeleně. β -vlákna jsou zobrazena modře. Spolehlivost predikce je znázorněna v odstínech červené (nejnižší predikce) až po odstíny modré (nejvyšší predikce).

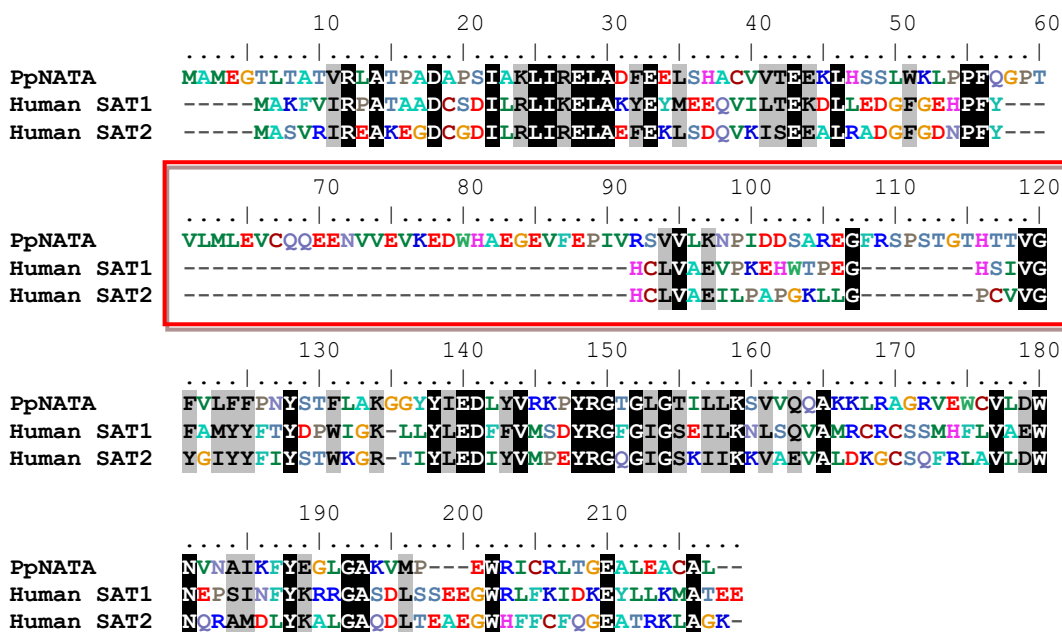
4.8. Predikce terciární struktury

Programem Phyre 2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) byly zobrazeny tři nejpravděpodobnější PDB struktury pro N-acetyltransferasu z mechu *Physcomitrella patens* (Obr. 27): 3I9S (Deshpande *et al.*, 2009) – struktura z mobilního metagenomu *Vibrio cholerae* (podobnost 20 %), 2BEI (Han *et al.*, 2006), – struktura thilalysin N-acetyltransferasy (SSAT2) z *Homo sapiens* (podobnost 33 %), 2FE7 (Zhang *et al.*, 2005) – struktura N-acetyltransferasy z *Pseudomonas aeruginosa* (podobnost 46 %).

#	Template	Alignment Coverage	3D Model	Confidence	% I.d.	Template Information
1	c3f9a			99.9	20	PDB header: transferase Chain: A: PDB Molecule: integron cassette protein; PDBTitle: structure from the mobile metagenome of v.cholerae. integron2 cassette protein vch_cass6 
2	d2bea1			99.9	33	Fold: Acyl-CoA N-acyltransferases (Nat) Superfamily: Acyl-CoA N-acyltransferases (Nat) Family: N-acetyl transferase, NAT 
3	d2fe7a1			99.9	46	Fold: Acyl-CoA N-acyltransferases (Nat) Superfamily: Acyl-CoA N-acyltransferases (Nat) Family: N-acetyl transferase, NAT 

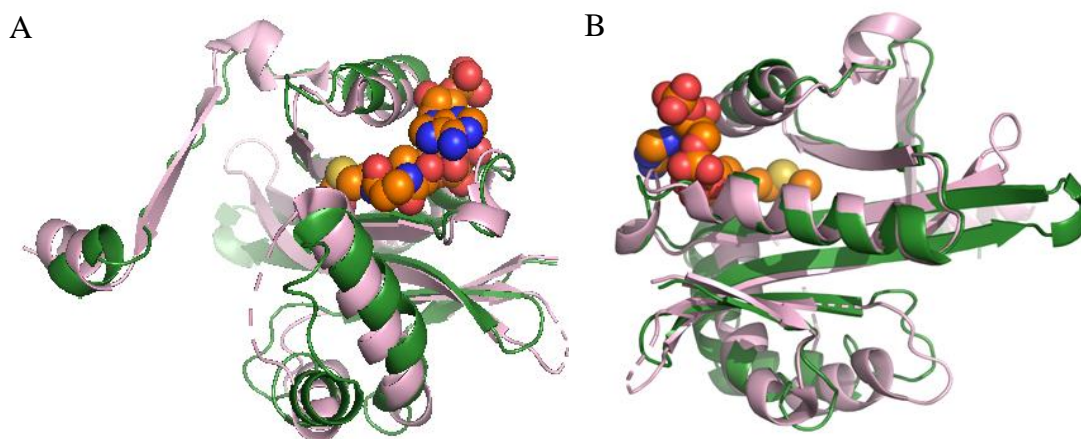
Obr. 27 Nejpravděpodobnější struktury pro vytvoření modelu N-acetyltransferasy z mechu *Physcomitrella patens* v programu Phyre 2. V prvním sloupci (Template) je uvedeno číslo PDB kódu. Druhý sloupec (Alignment Coverage) znázorňuje pokrytí sekvence. 3D model zobrazuje PDB model. Čtvrtý sloupec (Confidence) znázorňuje spolehlivost modelu. Pátý sloupec (% i.d.) znázorňuje identitu sekvence. Šestý sloupec (Template Information) poskytuje informace detailu z PDB databáze.

Na základě výsledků Phyre 2 (Obr. 27) je evidentní, že nejvyšší identitu sekvence má N-acetyltransferasa z *Pseudomonas aeruginosa* a N-acetyltransferasa (SSAT2) z *Homo sapiens*. Z důvodu, že u prvního enzymu není uvedena dosud žádná publikace, pouze PDB kódy, byla PpNATA dále porovnána s lidskou SAT2 (Obr. 28), (Han *et al.*, 2006). U lidských SAT2 se vyskytuje nekonzervovaná část sekvence, která se nachází pouze u rostlinných enzymů (zobrazena v červeném rámečku na Obr. 28).



Obr. 28 Porovnání sekvencí PpNATA a lidské SAT1, SAT2. Červeně je označena nekonzervovaná část přítomná pouze v rostlinných enzimech.

Pomocí serveru Phyre 2(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) byl získán model PpNATA, který byl následně zpracován v programu PyMOL. Byla provedena superpozice monomerů s lidskou SSAT2 (2BEI) a následně byly vygenerovány dva obrázky vzájemně otočené o 180° (Obr. 29).



Obr. 29 Porovnání 3D modelu monomeru PpNATA a struktury monomeru lidské SSAT2 (2BEI). PpNATA je vyznačena zelenou, SSAT2 je vyznačen růžovou, acetyl-CoA je vyznačen oranžově kuličkovým modelem. Obrázky A a B jsou vzájemně otočeny o 180°.

4.9. Vazba acetyl-CoA v lidské a rostlinné N-acetyltransferase

Dle predikce terciární struktury bylo vyobrazeno vazebné místo acetyl-CoA, pomocí programu PyMOL, v modelu PpNATA a lidské SSAT2 (2BEI). Nukleotidové složky acetyl-CoA jsou vázány do vazebného místa lidské SSAT2 přímo vodíkovými vazbami, ale také vodíkovými vazbami skrze molekuly vody (Obr. 30). Níže jsou uvedené aminokyseliny podílející se na vazbě nukleotidových složek acetyl-CoA v lidské SSAT2 a v závorkách za nimi jsou vždy uvedeny aminokyseliny modelu PpNATA na ekvivalentních pozicích.

Adeninový kruh acetyl-CoA je v modelu lidské SSAT2 vázáný skrze tři vody. Přes první vodu je navázán na kyslík hlavního řetězce Arg101 (Arg149), skrze druhou vodu je navázán na kyslík postranního řetězce stejného argininu, tj. Arg101 (Arg149). Přes třetí molekulu vody je navázán na kyslíkový a dusíkový atom pantothenátu a následně je přes sousední molekulu vody navázán ještě na další kyslíkový atom pantothenátu.

Ribosa-3-fosfát acetyl-CoA je v modelu lidské SSAT2 vázána skrze dvě molekuly vody. Přes první molekulu vody je vázána na kyslíkový atom hlavního řetězce Arg135 (Asn183) a přes druhou molekulu vody je vázána na kyslíkový atom hlavního řetězce Asp138 (Lys186). Hydrofobními interakcemi se uplatňuje ještě postranní řetězec Leu139 (Phe187), tato záměna aminokyselin by mohla měnit afinitu mezi savčími a rostlinnými N-acetyltransferasami.

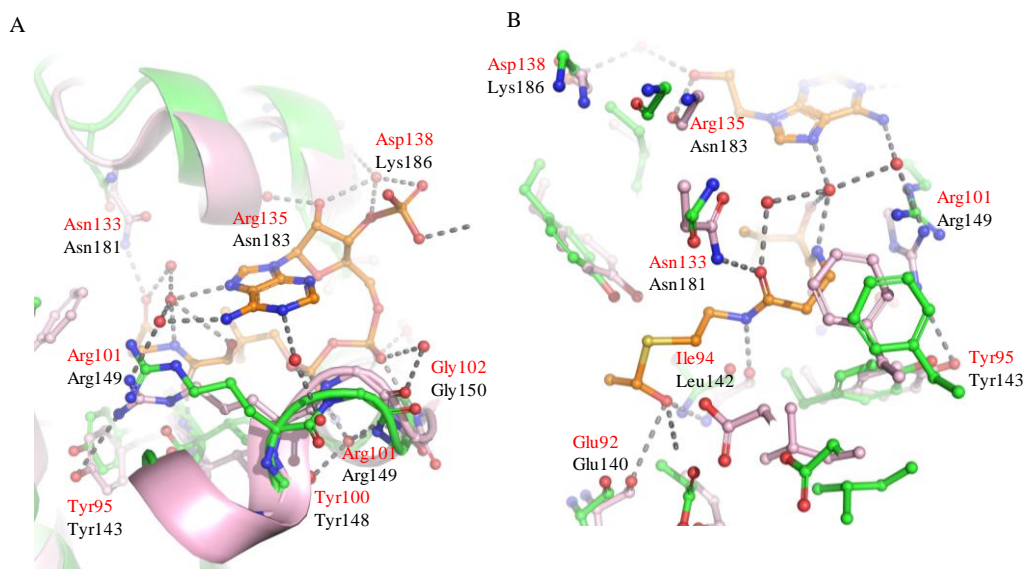
První fosfát je vázána přímo a přes dvě molekuly vody. Přes první molekulu vody je vázána na kyslíkový atom postranního řetězce Ser107 (Thr155) a také přímo na jeho dusíkový atom hlavního řetězce. Přímo je vázán na dusíkový atom hlavního řetězce Gly104 (Gly152) a skrze druhou vodu na kyslíkový atom hlavního řetězce Gly102 (Gly150).

Druhý fosfát je vázán přímo a přes jednu molekulu vody. Přímo je vázán na dusíkový atom Gly106 (Gly154) a na dusíkový atom Gly102 (Gly150). Přes molekulu vody je vázán na dusíkový atom Gly104 (Gly152), Gln103 (Thr151) a kyslíkový atom hlavního řetězce Tyr100 (Tyr148).

Pantothenát je přímo vázán na dusíkový atom Val96 (Val144). Dále je vázán přes molekulu vody na adeninový kruh, jak bylo vysvětleno dříve a na dusíkový atom Asn133 (Asn181). Hydrofobními interakcemi se uplatňuje Phe27 (Phe32).

Merkaptoethylamin je vázán pouze jednou vodíkovou vazbou na kyslíkový atom hlavního řetězce Ile94 (Leu142).

Acetylová skupina je stabilizována na dvou místech. Je vázána přes dusíkový atom na Ile94 (Leu142) a přes kyslíkový atom hlavního řetězce Glu92 (Glu140).



Obr. 30 Vazba acetyl-CoA v lidské SSAT2 a PpNATA. Černě jsou zobrazena rezidua PpNATA. Červeně jsou zobrazena rezidua lidské SSAT2.

5 DISKUZE

V článku Lou *et al.*, 2016 byla měřena kinetika rostlinného enzymu AtNATA1 pro acetyl-CoA. Hodnota K_m acetyl-CoA, která se pohybuje v rozmezí 5,05 až 70,7 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (Tab. 7), byla měřena při koncentraci 5 mmol l^{-1} příslušného aminu. Jako substráty byly použity ornithin, putrescin a 1,3-diaminopropan. V teoretické části bakalářské práce (Tab. 2) byly uvedeny kinetické parametry pro lidskou SSAT. Hodnota K_m pro acetyl-CoA, měřena při fixní koncentraci spermidinu, byla 3,8 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Enzymy rostlinné i živočišné vykazují podobné hodnoty K_m . Acetyl-CoA je tedy preferovaným donorem acetylu.

Tab. 7 Stanovení hodnoty K_m pro substráty (převzato a upraveno dle Lou *et al.*, 2016).

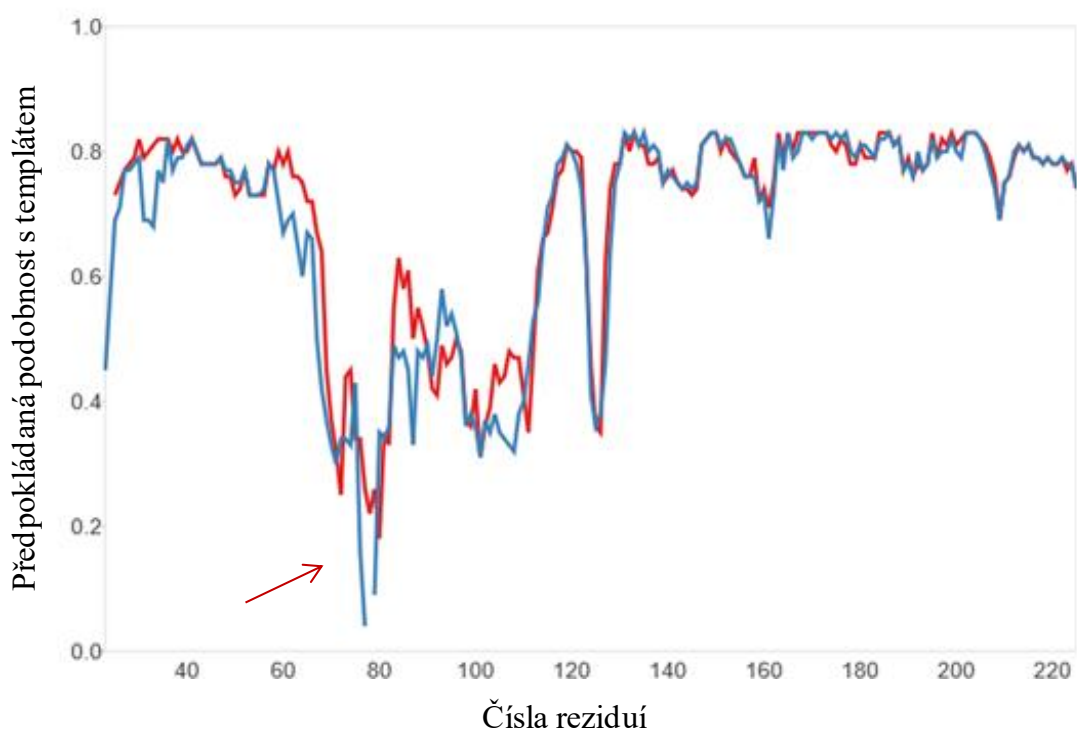
Substrát	Acetyl-CoA
	K_m ($\mu\text{mol l}^{-1}$)
Ornithin	$5,05 \pm 1,26$
Putrescin	$41,8 \pm 6,36$
1,3-diaminopropan	$70,7 \pm 18,9$

Na základě predikce terciární struktury bylo vyobrazeno vazebné místo acetyl-CoA v modelu PpNATA a lidské SSAT2. Při porovnání vazebných míst mezi těmito modely bylo nalezeno 5 odlišných reziduí. Konkrétně se jedná o rezidua Arg135 (Asn183), Asp138 (Lys186), Ser107 (Thr155), Gln103 (Thr151) a Ile94 (Leu142), která se na vazbě acetyl-CoA podílejí hlavním nebo postranním řetězcem. Rezidua uvedená před závorkou patří k modelu lidské SSAT2 a rezidua v závorce patří k modelu PpNATA. Zbylá rezidua jsou konzervovaná.

Rezidua Arg135, Asp138, Gln103 a Ile94 se v modelu lidské SSAT2 podílejí na vazbě acetyl-CoA hlavním řetězcem, z tohoto důvodu bude mít jejich záměna, v modelu PpNATA za Asn183, Lys186, Thr151 a Leu142 (v daném pořadí), pravděpodobně malý vliv na změnu vlastností. Nicméně, případě rezidua Ser107 (v modelu lidské SSAT2), který se na vazbě acetyl-CoA podílí jeho postranním řetězcem, došlo k záměně za Thr155 (v modelu PpNATA). V tomto případě může dojít ke ztrátě vodíkové vazby nebo hydrofobní interakce, což by mělo za následek změnu vlastností.

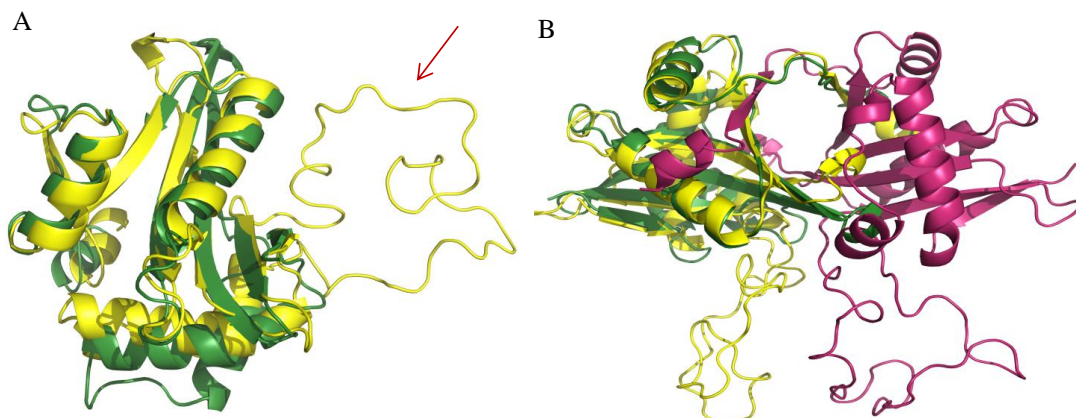
N-acetyltransferasa z *Physcomitrella patens* byla také porovnána s N-acetyltransferasou z *Arabidopsis thaliana*. Sekvence pro *Arabidopsis* N-acetyltransferasu (AtNATA1) má UniProt číslo (Q9ZV05), a to lze použít pro hledání modelu na serveru SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>).

V tomto případě, je možno získat model i s částí, která není u jiných N-acetyltransferas. Odhad kvality modelu (Obr. 31) ukazuje nízkou podobnost této části v porovnání s templátem (2FE7 – N-acetyltransferasa z *Pseudomonas aeruginosa*).



Obr. 31 Odhad kvality modelu. Na ose x jsou zobrazena čísla reziduí. Na ose y je zobrazena předpokládaná podobnost s templářem. Řetězec A je zobrazen červeně. Řetězec B je zobrazen modře. Červená šipka ukazuje mobilní část, která nemá analogní část u jiných N-acetyltransferas, kromě rostlinných.

V programu PyMOL byl vygenerován model porovnávající predikci struktury PpNATA se strukturou AtNATA1 (Obr. 32). Model neukazuje přítomnost sekundární struktury, tudíž nevíme, jak je model přesný. Červenou šipkou je zobrazena mobilní část, která se neobjevuje u PpNATA.



Obr. 32 (A) Monomer modelu PpNATA se strukturou monomeru AtNATA1. Monomer PpNATA je zobrazen zeleně. Monomer AtNATA1 je zobrazen žlutě. Červená šipka ukazuje mobilní část, která nemá analogní část u jiných PpNATA. **(B) Dimer modelu PpNATA se strukturou dimeru AtNATA1.** Model PpNATA je zobrazen zeleně. Podjednotky dimeru AtNATA1 jsou zobrazeny žlutě a růžově. Model neukazuje přítomnost sekundární struktury.

Studium substrátové specificity a substrátového místa nebylo možné dokončit kvůli pandemické situace způsobené SARS-CoV-2, a proto bude cílem diplomové práce.

6 ZÁVĚR

V teoretické části bakalářské práce byla vypracována literární rešerše na téma metabolismus polyaminů, jejich syntézy a degradace a dosavadních poznatků k funkci N-acetyltransferas.

Experimentální část byla věnována enzymu PpNATA. Cílem práce bylo klonování genu rostlinné *PpNATA* do expresního vektoru pET-28a. Následně exprimování genu a získání rekombinantního proteinu v bakteriích *E. coli*. Byla také ověřena stabilita enzymu PpNATA a bylo zjištěno, že po navázání acetyl-CoA na enzym dochází k vzestupu teploty, při které dochází k tepelné denaturaci (rozvolnění struktury). Dále byla provedena predikce sekundární struktury za použití serveru PSIPRED/DISOPRED a Phyre 2 a také predikce struktury terciární s využitím serveru Phyre 2 a programu PyMOL.

7 LITERATURA

Adio, A. M., Casteel, C. L., De Vos, M., Kim, J. H., Joshi, V., Li, B., Juárez, C., Daron, J., Kliebenstein, D. J., Jander, G. (2011): Biosynthesis and defensive function of Nδ-acetylornithine, a jasmonate-induced Arabidopsis metabolite. *The Plant cell*, **23**, 3303–3318.

Araújo, A. M., Carvalho, F., Bastos, M., Guedes de Pinho, P., Carvalho, M. (2015): The hallucinogenic world of tryptamines: an updated review. *Archives of toxicology*, **89**, 1151–1173.

Bae, D. H., Lane, D., Jansson, P. J., Richardson, D. R. (2018): The old and new biochemistry of polyamines. *Biochimica et biophysica acta. General subjects*, **1862**, 2053–2068.

Bekebrede, A. F., Keijer, J., Gerrits, W., Boer, V. (2020): The Molecular and Physiological Effects of Protein-Derived Polyamines in the Intestine. *Nutrients*, **12**, 197.

Bewley, M. C., Graziano, V., Jiang, J., Matz, E., Studier, F. W., Pegg, A. E., Coleman, C. S., Flanagan, J. M. (2006): Structures of wild-type and mutant human spermidine/spermine N1-acetyltransferase, a potential therapeutic drug target. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 2063–2068.

Bitrián, M., Zarza, X., Altabella, T., Tiburcio, A. F., Alcázar, R. (2012): Polyamines under Abiotic Stress: Metabolic Crossroads and Hormonal Crosstalks in Plants. *Metabolites*, **2**, 516–528.

Buchan, D. W., Minneci, F., Nugent, T. C., Bryson, K., & Jones, D. T. (2013): Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic acids research*, **41**, 349–357.

Butcher, N. J., Burow, R., Minchin, R. F. (2020): Modulation of Human Arylamine N-Acetyltransferase 1 Activity by Lysine Acetylation: Role of p300/CREB-Binding Protein and Sirtuins 1 and 2. *Molecular pharmacology*, **98**, 88–95.

Casero, R. A., Jr, Murray Stewart, T., & Pegg, A. E. (2018): Polyamine metabolism and cancer: treatments, challenges and opportunities. *Nature reviews. Cancer*, **18**, 681–695.

Cervelli, M., Angelucci, E., Germani, F., Amendola, R., Mariottini, P. (2014): Inflammation, carcinogenesis and neurodegeneration studies in transgenic animal models for polyamine research. *Amino acids*, **46**, 521–530.

Cervelli, M., Amendola, R., Polticelli, F., Mariottini, P. (2012): Spermine oxidase: ten years after. *Amino acids*, **42**, 441–450.

Coleman, C. S., Stanley, B. A., Jones, A. D., & Pegg, A. E. (2004): Spermidine/spermine-N1-acetyltransferase-2 (SSAT2) acetylates thialysine and is not involved in polyamine metabolism. *The Biochemical journal*, **384**, 139–148.

Coon, S. L., Del Olmo, E., Young, W. S., 3rd, Klein, D. C. (2002): Melatonin synthesis enzymes in *Macaca mulatta*: focus on arylalkylamine N-acetyltransferase (EC 2.3.1.87). *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **87**, 4699–4706.

Cove D. J., Knight C. D. (1993): The Moss *Physcomitrella patens*, a Model System with Potential for the Study of Plant Reproduction. *The Plant Cell*, **5**, 1483-1488.

Drazic, A., Myklebust, L. M., Ree, R., Arnesen, T. (2016): The world of protein acetylation. *Biochimica et biophysica acta*, **1864**, 1372–1401.

ExPASy ProtParam home page: <https://web.expasy.org/protparam/> (5.5.2021).

- Gevrekci A. Ö. (2017): The roles of polyamines in microorganisms. *World journal of microbiology & biotechnology*, **33**, 204.
- Gil, J., Ramírez-Torres, A., Encarnación-Guevara, S. (2017): Lysine acetylation and cancer: A proteomics perspective. *Journal of proteomics*, **150**, 297–309.
- Goodstein, D. M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R. D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N., Rokhsar, D. S. (2012): Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic acids research*, **40**, 1178–1186.
- Guo, P., Chen, W., Li, H., Li, M., Li, L. (2018): The Histone Acetylation Modifications of Breast Cancer and their Therapeutic Implications. *Pathology oncology research : POR*, **24**, 807–813.
- Han, B. W., Bingman, C. A., Wesenberg, G. E., & Phillips, G. N., Jr (2006): Crystal structure of Homo sapiens thialysine Nepsilon-acetyltransferase (HsSSAT2) in complex with acetyl coenzyme A. *Proteins*, **64**, 288–293.
- Hegde, S. S., Chandler, J., Vetting, M. W., Yu, M., Blanchard, J. S. (2007): Mechanistic and structural analysis of human spermidine/spermine N1-acetyltransferase. *Biochemistry*, **46**, 7187–7195.
- Hein, D. W., Doll, M. A., Fretland, A. J., Leff, M. A., Webb, S. J., Xiao, G. H., Devanaboyina, U. S., Nangju, N. A., Feng, Y. (2000): Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, **9**, 29–42.
- Hickman, A. B., Namboodiri, M. A., Klein, D. C., Dyda, F. (1999): The structural basis of ordered substrate binding by serotonin N-acetyltransferase: enzyme complex at 1.8 Å resolution with a bisubstrate analog. *Cell*, **97**, 361–369.
- Chattopadhyay, G., Varadarajan, R. (2019): Facile measurement of protein stability and folding kinetics using a nano differential scanning fluorimeter. *Protein science : a publication of the Protein Society*, **28**, 1127–1134.
- Igarashi, K., Kashiwagi, K. (2019): The functional role of polyamines in eukaryotic cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **107**, 104–115.
- Jammes, F., Leonhardt, N., Tran, D., Bousserouel, H., Véry, A. A., Renou, J. P., Vavasseur, A., Kwak, J. M., Sentenac, H., Bouteau, F., Leung, J. (2014): Acetylated 1,3-diaminopropane antagonizes abscisic acid-mediated stomatal closing in Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **79**, 322–333.
- Jancova P., Anzenbacher P., Anzenbacherova E. (2010): Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czechoslov.* **154**, 103–116.
- Jones D. T. (1999): Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *Journal of molecular biology*, **292**, 195–202.
- Kawamura, A., Graham, J., Mushtaq, A., Tsiftoglou, S. A., Vath, G. M., Hanna, P. E., Wagner, C. R., Sim, E. (2005): Eukaryotic arylamine N-acetyltransferase. Investigation of substrate specificity by high-throughput screening. *Biochemical pharmacology*, **69**, 347–359.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., Sternberg, M. J. (2015): The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature protocols*, **10**, 845–858.
- Klein D. C. (2007): Arylalkylamine N-acetyltransferase: "the Timezyme". *The Journal of biological chemistry*, **282**, 4233–4237.

Kukongviriyapan, V., Phromsopha, N., Tassaneeyakul, W., Kukongviriyapan, U., Sripa, B., Hahnvajanawong, V., Bhudhisawasdi, V. (2006): Inhibitory effects of polyphenolic compounds on human arylamine N-acetyltransferase 1 and 2. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*, **36**, 15–28.

Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C., Takahashi, Y. (2008): Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*, **228**, 367–381.

LALIGN home page: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/lalign/> (3.5.2021)

Lee, S. B., Park, J. H., Woster, P. M., Casero, R. A., Jr, Park, M. H. (2010): Suppression of exogenous gene expression by spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1 (SSAT1) cotransfection. *The Journal of biological chemistry*, **285**, 15548–15556.

Levin, E. J., Kondrashov, D. A., Wesenberg, G. E., Phillips, G. N., Jr (2007): Ensemble refinement of protein crystal structures: validation and application. *Structure* (London, England, 1993), **15**, 1040–1052.

Liu, X., Liu, Y., Zhao, G., Zhang, Y., Liu, L., Wang, J., Wang, Y., Zhang, S., Li, X., Guo, D., Wang, P., Xu, X. (2021): Biochemical Characterization of Arylamine N-acetyltransferases From *Vibrio vulnificus*. *Frontiers in microbiology*, **11**, 595083.

Lou, Y. R., Ahmed, S., Yan, J., Adio, A. M., Powell, H. M., Morris, P. F., Jander, G. (2020): Arabidopsis ADC1 functions as an N^δ-acetylornithine decarboxylase. *Journal of integrative plant biology*, **62**, 601–613.

Lou, Y. R., Bor, M., Yan, J., Preuss, A. S., Jander, G. (2016): Arabidopsis NATA1 Acetylates Putrescine and Decreases Defense-Related Hydrogen Peroxide Accumulation. *Plant physiology*, **171**, 1443–1455.

Makarova S. I. (2008): Human N-acetyltransferases and drug-induced hepatotoxicity. *Current drug metabolism*, **9**, 538–545.

Menand, B., Calder, G., Dolan, L. (2007): Both chloronemal and caulonemal cells expand by tip growth in the moss *Physcomitrella patens*. *Journal of experimental botany*, **58**, 1843–1849.

Michael A. J. (2016): Polyamines in Eukaryotes, Bacteria, and Archaea. *The Journal of biological chemistry*, **291**, 14896–14903.

Modis, Y., Wierenga, R. (1998): Two crystal structures of N-acetyltransferases reveal a new fold for CoA-dependent enzymes. *Structure*, **6**, 1345–1350.

Mesangeau, C., Yous, S., Chavatte, P., Ferry, G., Audinot, V., Boutin, J. A., Delagrangé, P., Bennejean, C., Renard, P., Lesieur, D. (2003): Design, synthesis and in vitro evaluation of novel benzo[b]thiophene derivatives as serotonin N-acetyltransferase (AANAT) inhibitors. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, **18**, 119–125.

Ou, Y., Wang, S. J., Li, D., Chu, B., Gu, W. (2016): Activation of SAT1 engages polyamine metabolism with p53-mediated ferroptotic responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **113**, E6806–E6812.

Ortiz-Ramírez, C., Hernandez-Coronado, M., Thamm, A., Catarino, B., Wang, M., Dolan, L., Feijó, J. A., Becker, J. D. (2016): A Transcriptome Atlas of *Physcomitrella patens* Provides Insights into the Evolution and Development of Land Plants. *Molecular plant*, **9**, 205–220.

Pál, M., Ivanovska, B., Oláh, T., Tajti, J., Hamow, K. Á., Szalai, G., Khalil, R., Vanková, R., Dobrev, P., Misheva, S. P., Janda, T. (2019): Role of polyamines in plant growth regulation of Rht wheat mutants. *Plant physiology and biochemistry*. **137**, 189–202.

Payton, M., Auty, R., Delgoda, R., Everett, M., & Sim, E. (1999): Cloning and characterization of arylamine N-acetyltransferase genes from *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*: increased expression results in isoniazid resistance. *Journal of bacteriology*, **181**, 1343–1347.

Pegg A. E. (2009): Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB life*, **61**, 880–894.

Phyre 2 home page: <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index> (3.5.2021).

Pichler, K., Warner, K., Magrane, M., UniProt Consortium (2018): SPIN: Submitting Sequences Determined at Protein Level to UniProt. *Current protocols in bioinformatics*, **62**, e52.

PSIPRED home page: <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/> (3.5.2021).

RCSB PDB: <https://www.rcsb.org/> (5.5.2021).

Rensing, S. A., Fritzowsky, D., Lang, D., Reski, R. (2005): Protein encoding genes in an ancient plant: analysis of codon usage, retained genes and splice sites in a moss, *Physcomitrella patens*. *BMC genomics*, **6**, 43.

Reski, R., Bae, H., Simonsen, H. T. (2018): *Physcomitrella patens*, a versatile synthetic biology chassis. *Plant cell reports*, **37**, 1409–1417.

Sabari, B. R., Zhang, D., Allis, C. D., Zhao, Y. (2017): Metabolic regulation of gene expression through histone acylations. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **18**, 90–101.

Salah Ud-Din, A. I., Tikhomirova, A., Roujeinikova, A. (2016): Structure and Functional Diversity of GCN5-Related N-Acetyltransferases (GNAT). *International journal of molecular sciences*, **17**, 1018.

Sebela, M., Radová, A., Angelini, R., Tavladoraki, P., Frébort, I., I, & Pec, P. (2001): FAD-containing polyamine oxidases: a timely challenge for researchers in biochemistry and physiology of plants. *Plant science: an international journal of experimental plant biology*, **160**, 197–207.

Shaw, F. L., Elliott, K. A., Kinch, L. N., Fuell, C., Phillips, M. A., Michael, A. J. (2010): Evolution and multifarious horizontal transfer of an alternative biosynthetic pathway for the alternative polyamine sym-homospermidine. *The Journal of biological chemistry*, **285**, 14711–14723.

Shi, L., Tu, B. P. (2015): Acetyl-CoA and the regulation of metabolism: mechanisms and consequences. *Current opinion in cell biology*, **33**, 125–131.

Sikora, A. L., Frankel, B. A., Blanchard, J. S. (2008): Kinetic and chemical mechanism of arylamine N-acetyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry*, **47**, 10781–10789.

Sim, E., Abuhammad, A., Ryan, A. (2014): Arylamine N-acetyltransferases: from drug metabolism and pharmacogenetics to drug discovery. *British journal of pharmacology*, **171**, 2705–2725.

Sivashanmugam, M., Jaidev, J., Umashankar, V., Sulochana, K. N., (2017): Ornithine and its role in metabolic diseases: An appraisal. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, **86**, 185–194.

Sterner, D. E., Berger, S. L. (2000): Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, **64**, 435–459.

SWISS-MODEL home page: <https://swissmodel.expasy.org/> (4.5.2021).

Tavladoraki, P., Cona, A., & Angelini, R. (2016): Copper-Containing Amine Oxidases and FAD-Dependent Polyamine Oxidases Are Key Players in Plant Tissue Differentiation and Organ Development. *Frontiers in plant science*, **7**, 824.

Toure, A., Cabral, M., Niang, A., Diop, C., Garat, A., Humbert, L., Fall, M., Diouf, A., Broly, F., Lhermitte, M., Allorge, D. (2016): Prevention of isoniazid toxicity by NAT2 genotyping in Senegalese tuberculosis patients. *Toxicology reports*, **3**, 826–831.

Urdiales, J. L., Medina MA, Sánchez-Jiménez, F. (2001): Polyamine metabolism revisited. *European journal of gastroenterology & hepatology*, **13**, 1015–1019.

Wang, H., Liu, L., Hanna, P. E., Wagner, C. R. (2005): Catalytic mechanism of hamster arylamine N-acetyltransferase 2. *Biochemistry*, **44**, 11295–11306.

Ward, J. J., McGuffin, L. J., Bryson, K., Buxton, B. F., Jones, D. T. (2004): The DISOPRED server for the prediction of protein disorder. *Bioinformatics* (Oxford, England), **20**, 2138–2139.

Wu, H., Min, J., Zeng, H., McCloskey, D. E., Ikeguchi, Y., Loppnau, P., Michael, A. J., Pegg, A. E., Plotnikov, A. N. (2008): Crystal structure of human spermine synthase: implications of substrate binding and catalytic mechanism. *The Journal of biological chemistry*, **283**, 16135–16146.

Yoda, H., Fujimura, K., Takahashi, H., Munemura, I., Uchimiya, H., & Sano, H. (2009): Polyamines as a common source of hydrogen peroxide in host- and nonhost hypersensitive response during pathogen infection. *Plant molecular biology*, **70**, 103–112.

Yu, A. M., Granvil, C. P., Haining, R. L., Krausz, K. W., Corchero, J., Küpfer, A., Idle, J. R., Gonzalez, F. J. (2003): The relative contribution of monoamine oxidase and cytochrome p450 isozymes to the metabolic deamination of the trace amine tryptamine. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **304**, 539–546.

Zhang, M., Caragine, T., Wang, H., Cohen, P. S., Botchkina, G., Soda, K., Bianchi, M., Ulrich, P., Cerami, A., Sherry, B., Tracey, K. J. (1997): Spermine inhibits proinflammatory cytokine synthesis in human mononuclear cells: a counterregulatory mechanism that restrains the immune response. *The Journal of experimental medicine*, **185**, 1759–1768.

Zhang, P., Liu, P., Xu, Y., Liang, Y., Wang, P. G., Cheng, J. (2019): N-acetyltransferases from three different organisms displaying distinct selectivity toward hexosamines and N-terminal amine of peptides. *Carbohydrate research*, **472**, 72–75.

Zheng, W., Scheibner, K. A., Ho, A. K., Cole, P. A. (2001): Mechanistic studies on the acetyltransferase activity of serotonin N-acetyltransferase. *Chemistry & biology*, **8**, 379–389.

Zhu, Y. Q., Zhu, D. Y., Yin, L., Zhang, Y., Vornrhein, C., Wang, D. C. (2006): Crystal structure of human spermidine/spermine N1-acetyltransferase (hSSAT): the first structure of a new sequence family of transferase homologous superfamily. *Proteins*, **63**, 1127–1131.

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AANAT arylalkylamin-N-acetyltransferasa

AA/BIS akrylamid/bisakrylamid

APS persíran amonný

ADC arginindekarboxylasa

AIH agmatiniminohydrolasa

AdoMetDC S-adenosylmethionin dekarboxylasa

AdoMet S-adenosylmethionin

cDNA komplementární deoxykarboxylová kyselina

CoA koenzym A

CPA N-karbamoylputrescinamidohydrolasa

CuAO aminooxidasa obsahující měď

DAO diaminoxidas

FAD flavinadenindinukleotid

HAT histonacetyltransferasa

HDAC histondeacetylasa

IPTG isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid

LB Luria – Broth médium

NAT N-acetyltransferasa

ODC ornitin dekarboxylasa

PAO aminooxidas

PCR polymerázová řetězová reakce

PLP pyridoxal fosfát

SDS dodecylsulfát sodný

SPDS spermidin synthasa

SPMS spermin synthasa

SSAT spermidin/spermin-N-acetyltrasnefrasa

TAE tris-acetát-ethylendiamintetraoctová kyselina

TEMED *N,N,N',N'*-tetramethylethylendiamin

TRIS tris(hydroxymethyl)aminomethan